

DISOLUČNÍ STUDIE V HODNOCENÍ PERORÁLNÍCH LÉKŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM LÉČIVA

KATEŘINA DVOŘÁČKOVÁ, TEREZA BAUTZOVÁ a MILOSLAVA RABIŠKOVÁ

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 61242 Brno
dvorackovak@vfu.cz

Došlo 28.4.10, přepracováno 24.9.10, přijato 11.11.10.

Klíčová slova: disoluční zkouška, perorální lékové formy, simulace podmínek trávicího traktu

Úvod

Disoluční (rozpuštěcí) studie jsou jednou z hlavních charakteristik lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva. Stanovuje se jimi uvolňování léčivé látky z lékové formy v předepsané kapalině (disoluční médium, disoluční roztok) a v předepsaném čase. Přestože se používají zejména k hodnocení kvality léčivých přípravků, odhaduje se na základě jejich výsledků také biologická dostupnost léčivé látky *in vivo* (korelace *in vitro/in vivo*)¹ a bioekvivalence generických léků, tj. používá se ke stanovení shody s danými požadavky na disoluci, která se hodnotí na základě faktorů podobnosti a rozdílnosti². Zkouška disoluce se při vývoji nových léčivých přípravků používá i k odhadu chování lékové formy v organismu. Předpověď terapeutické účinnosti na základě korelace výsledků *in vitro/in vivo* je však často velmi obtížná pro složitost procesů absorpce a distribuce léčiva k místu jeho působení v organismu. Přesto může poskytnout cennou informaci o biologické dostupnosti léku. Zkušenost ukazuje, že pokud se našel medicínsky významný rozdíl v biologické dostupnosti léčiv z různých přípravků, byl právě disoluční test efektivní metodou při jeho zjištění. Disoluční testy jsou velmi důležité zejména tehdy, když je rychlost rozpuštění léčivé látky limitujícím stupněm pro její absorpci. Proto se tyto testy používají jako významná lékopisná kontrolní metoda a jsou často nezbytnou částí registrační dokumentace léku³.

Disoluce perorálních léků se stanovuje v jednom ze čtyř přístrojů uvedených v lékopise, tj. přístroje s košíčkem, pádlem (míchadlem), vratným válcem a průtokovou celou⁴. Při stanovení disoluce léčivé látky je třeba specifikovat použitý přístroj, složení, objem a teplotu disolučního roztoku, rychlost otáčení nebo průtok disoluční kapaliny; dobu, metodu a množství zkoušeného roztoku pro vzorkování nebo podmínky průběžného sledování a metodu analýzy a kritéria přijatelnosti. V určeném časovém

intervalu se vzorky rozpuštěného léčiva odebírají a nahrazují stejným objemem čerstvého disolučního roztoku 37 °C teplého, případně se počítá s jeho úbytkem. Při použití automatického zařízení pro odběr vzorků on-line se disoluční kapalina vrací zpět do nádoby a není nutné ji doplňovat.

In vivo procházejí perorálně podané léky gastrointestinálním traktem (GIT) s proměnlivou hodnotou pH. Přestože lékopisy předepisují disoluční zkoušky v definovaných prostředích s různou hodnotou pH, případně s enzymy či povrchově aktivními látkami, nemusí vždy napodobovat přiměřeně skutečnou situaci léčivého přípravku v GIT. Z toho důvodu je výhodnější použít upravenou disoluční metodu s měnicími se hodnotami pH, která současně zohledňuje dobu setrvání lékové formy v určitých částech GIT a tak lépe vystihuje skutečné podmínky *in vivo* (tabulka I, cit.^{5–7}).

Ideální disoluční kapalina má napodobovat pH trávicích šťáv. Například 0,1 N HCl se používá k napodobení pH žaludku, přestože se zjistilo, že pH v žaludku se u většiny populace pohybuje mezi hodnotami 1–3 a potrava může zvýšit tuto hodnotu až na 3–5 (cit.^{8,9}). Mnohdy disoluce probíhá v roztocích s pH v neutrální oblasti, přestože se ví, že léková forma bude po spolknutí procházet oblastí s nižší pH hodnotou. Je třeba věnovat pozornost vlivu iontů v pufrch na rozpad lékových forem^{10,11} nebo na rychlost rozpuštění léčivých látek⁹. Porovnávat by se měly zásadně pouze výsledky získané při stejných podmínkách za použití stejných disolučních kapalin. Výběr pH může být kritický. Proto se musí pH disoluční kapaliny zvolit tak, aby co nejlépe odpovídalo podmínkám *in vivo* pro možný odhad *in vitro*/korelace *in vivo*.

K napodobení podmínek *in vivo* doporučují někteří autoři přidat do média různé látky reprezentující určité složky potravy nebo přirozeně se vyskytující tenzidy. Povrchově aktivní látky se například přidávají k léčivům s nízkou rozpustností k napodobení účinků žlučových solí¹². Přidané látky však nesmí interagovat s rozpouštějícím se léčivem¹³.

I přes četná zdokonalení ve složení roztoků používaných k disoluci, většina metod nezohledňuje dobu, kterou léčivý přípravek setrvává v jednotlivých částech GIT (viz tab. I). Pro lékové formy s velmi pomalým uvolňováním léčivé látky nebo pro ty, které mají léčivo transportovat až do distální části tlustého střeva – kolonu, je třeba vzít v úvahu i sníženou hodnotu pH ve srovnání s tenkým střevem, která se v tomto úseku GIT vyskytuje díky okyselení střevního obsahu produkty bakteriální fermentace¹⁴.

Ještě nižší hodnota pH, tj. přibližně 4–6, byla zaznamenána u pacientů s idiopatickým střevním zánětlivým onemocněním (intestinal bowel disease IBD, tj. ulcerózní kolitida a Crohnova choroba)^{15,16}. Z toho důvodu nemusí být lékové systémy založené na uvolnění léčivé látky při vysokém pH (7,0–7,8) pro farmakoterapii těchto onemocnění účinné. Slibné se zdá být použití některých polysacharidů, např. pektinů, chitosanu, dextranů, amylosy nebo chondroitin sulfátu, jako součástí obalů transportujících

Tabulka I

Proměnlivost pH v trávicím traktu, doba průchodu (upraveno podle cit.¹⁰⁻¹²) a návrh hodnot pH pro disoluční zkoušky

Část GIT	Zdraví dobrovolníci pH hodnota	Návrh hodnoty pH pro disoluční zkoušku	Pacienti s IBD ^a pH hodnota	Návrh hodnoty pH pro disoluční zkoušku u lékových forem pro pacienty s IBD
Žaludek <i>doba průchodu</i>	1,2–5 ^b 1–5 h	1,2 nebo 3,0 ^b	1,55–4,4	3,0
Dvanáctník <i>doba průchodu</i>	4,5 ^b –6,5 5–60 ^b min	5,5	nestanoveno	5,5 ^c
Proximální tenké střevo	6–7	6,8	6,3–7,2	6,8
Distální tenké střevo <i>doba průchodu v tenkém střevě</i>	6,5–7,5 3–5 h	6,8 a 7,5	6,8–8,3	7,5
Kolon <i>doba průchodu</i>	5,5–8 ^b 15–72 ^b h	6,8	4–6	4 a 6

^a IBD – inflammatory bowel disease, nespecifická střevní zánětlivá onemocnění, ^b s potravou, ^c pro krátký pobyt léku v této části GIT lze u lékových forem pro uvolňování léčiva v kolonu vynechat

léčivou látku až do místa jejího působení – kolonu. U těchto látek probíhá v kolonu pomalá hydrolýza jejich glykosidových vazeb působením zde sídlící bakteriální mikroflóry¹⁷. Pro obaly založené na mikrobiálním rozkladu je pak kromě proměnlivé hodnoty pH a zohlednění časových intervalů nezbytná také přítomnost vhodných enzymů (β-glukosidasa) v disoluční kapalině¹⁸.

Cílem této práce je ukázat na dvou přípravcích navržených pro terapii ulcerózní kolitidy rozdílnost v uvolňování léčiva běžně používanými disolučními metodami a námi navrženou disoluční metodou zohledňující výše zmíněné principy, tj. proměnlivé pH v GIT, časové intervaly v jednotlivých jeho úsecích a obsah β-glukosidasy v disolučním médiu. Jako přípravky sloužily pelety s obsahem rutinu, obalené buď novým typem polyakrylátového obalu Eudragit[®] FS, rozpustným při pH 7, nebo polysacharidovým obalem založeným na alginátech a rozkládajícím se působením β-glukosidasy.

Experimentální část

Materiál

Vzorky pelet s obsahem rutinu (RU) obalené buď polysacharidovým obalem založeným na alginátech v množství 18 % nebo polyakrylátovým obalem tvořeným kopolymerem kyseliny metakrylové a methylmetakrylátového esteru (v poměru 1:10; Eudragit[®] FS 30 D, Evonik Röhm GmbH, Germany) v množství 15 %. Velikost obalených pelet byla 0,5–1,0 mm. K disoluci se použily lékopisné tlumivé roztoky: fosforečnanový pufr s pH 3,0 nebo

6,0; acetátový pufr s pH 4,0; Na₃PO₄ · 12 H₂O (Lach-ner, Neratovice, Česká republika) k úpravě pH a β-glukosidasa (MP Biomedicals, Solon, USA, 3811 U/ mg) k simulaci enzymatického prostředí kolonu. Všechny použité látky vyhovovaly požadavkům platného lékopisu.

Disoluční zkouška

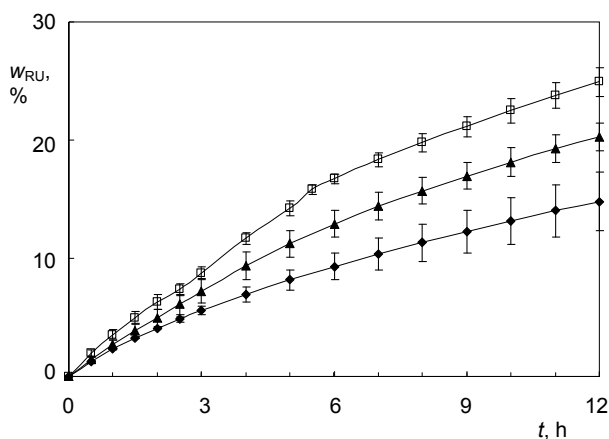
Ke stanovení uvolňování léčivé látky z navážky vzorku obalených pelet odpovídající vždy dávce 15 mg rutinu se použila košíčková disoluční metoda. Jako disoluční kapalina se zvolily lékopisné pufrы v množství 500 ml, o teplotě 37±0,5 °C; rychlost otáček košíčku byla 100 za minutu. Disoluční aparaturou byla on-line linka Sotax AT7 Smart (Donaulab, Švýcarsko), kde se vzorky automaticky odebíraly a spektrofotometricky měřily při vlnové délce 362 nm (spektrofotometr Lambda 25 Perkin Elmer, USA). Při disoluci se zohlednily hodnoty pH a doby setrvání pelet v jednotlivých úsecích GIT. Konkrétně se tedy nejprve vložil vzorek obalených pelet do fosforečnanového pufru pH 3,0 (0–2 h; simulace prostředí žaludku). Pak se do disoluční kapaliny přidala 2,1 g Na₃PO₄ · 12 H₂O, tím její hodnota pH vzrostla na 6,8. V tomto prostředí se vzorek ponechal další tři hodiny (2–5 h; simulace prostředí tenkého střeva). Protože v distální části tenkého střeva pH vzrůstá až nad neutrální hodnotu (7,5 u zdravých dobrovolníků a 8,3 u pacientů s IBD⁷), zohlednily jsme tento fakt 30minutovým působením pufru s pH 7,5. Ke zvýšení hodnoty pH se do lázně přidaly další 3 g Na₃PO₄ · 12 H₂O. Vzhledem k tomu, že se pH v kolonu pohybuje v průměru okolo hodnoty 6,8 (u zdravých jedinců) a 4–6 (v případě zánětlivých onemocnění této části GIT), vybraly se tyto

hodnoty jako mezni a vzorky se v dalších hodinách (5,5 až 22 h) nechaly rozpouštět buď ve foforečnanovém pufru pH 6,0 bez (vzorky s polyakrylátovým obalem) a s β -glukosidasou (vzorky s polysacharidovým obalem) nebo v acetátovém pufru s pH 4,0. Disoluční prostředí bylo třeba po 5,5 h zkoušky vyměnit. První tři hodiny disoluční zkoušky se vzorky odebíraly v 30minutových intervalech, ve zbývajících 19 hodinách v hodinových intervalech (s výjimkou mezi 5.–6. h). Se vzorkem odebraná disoluční kapalina se po změření automaticky vracela zpět do disolučních nádob. pH pufrů se před každým stanovením ověřilo na pH metru (Hanna Instruments, USA). Disoluce se prováděla vždy se šesti vzorky, výsledná hodnota je jejich průměrem \pm směrodatná odchylka.

Výsledky a diskuse

Vzorek pelet obalený polysacharidovým obalem by měl chránit léčivou látku před rozpuštěním v horních částech GIT a měl by léčivo uvolnit až po rozložení polysacharidů působením střevní bakteriální mikroflóry (*in vitro* simulované přidavkem β -glukosidas v disoluční kapalině). Obr. 1 ukazuje disoluční profily pelet s polysacharidovým obalem při různých hodnotách pH bez obsahu β -glukosidas. V prostředí o pH 3,0 se uvolnilo jen $14,8 \pm 2,47$ % léčiva, při pH 6,8 to bylo $20,29 \pm 1,18$ % látky a při disoluci s proměnlivým pH bez přidavku enzymu (tj. 0–2 h pH 3,0; 2–5 h pH 6,8; 5–5,5 h pH 7,5; 5,5–12 h pH 6,0) pouze $24,95 \pm 0,01$ % obsažené léčivé látky po 12 h disoluce.

Z výsledků vyplývá, že je zapotřebí do disolučního roztoku přidat určité množství enzymu β -glukosidas, který by rozložil polysacharidový obal také v podmínkách

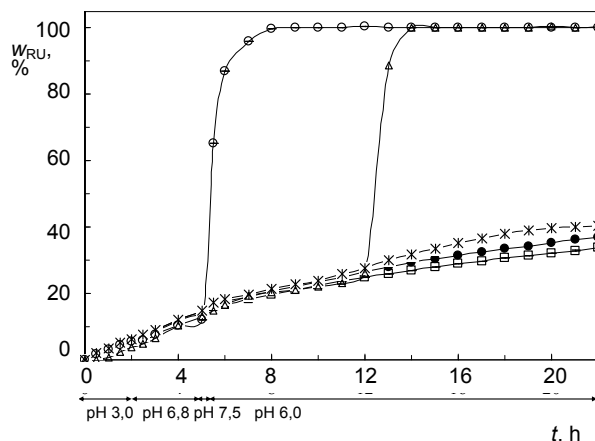


Obr. 1. Disoluční profily pelet s polysacharidovým obalem při různých pH; □ pH 3,0; 6,8; 7,5; 6,0, ◆ pH 3,0, ▲ pH 6,8

in vitro. V literatuře se uvádí jeho různá koncentrace^{19–22}, která bude záviset na aktivitě enzymu a na množství polysacharidového substrátu (tj. obsahu polysacharidů ve vzorku). Proto jsme koncentraci β -glukosidas vyzkoušely experimentálně. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2. Malý přírůstek enzymu (tj. v koncentracích 0,004 % a 0,02 %) uvolňování léčiva zásadně neovlivnil. Teprve 0,06% koncentrace β -glukosidas v disoluční kapalině urychlila rozpouštění léčivé látky po 7 h disoluce v pufru s pH 6,0. Jako optimální se jeví koncentrace 0,1 %, protože při tomto složení disoluční kapaliny se léčivo začalo uvolňovat ihned po snížení pH roztoku na hodnotu 6,0 a bylo z lékové formy uvolněno kompletně po 7 h disoluční zkoušky.

Obr. 3 porovnává disoluční profily vzorku s polysacharidovým obalem a vzorků s polyakrylátovým obalem při proměnlivém pH prostředí disoluce bez přidavku enzymu β -glukosidas s koncovými roztoky s pH 4,0 a 6,0.

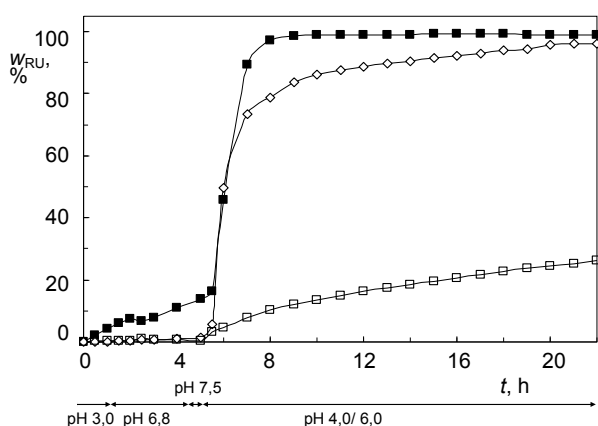
Z výsledků je vidět, že disoluční profil se u pelet obalených polysacharidovým obalem přes absenci enzymu v roztoku s nižším koncovým pH neliší od disolučního profilu s koncovým roztokem pH 6,0 a β -glukosidasou (viz obr. 2). Polysacharidový roztok, kterým se pelety obalovaly, měl hodnotu pH 3,8, která se blížila hodnotě acetátového pufru s pH 4,0. Zatímco při nižším pH nebo vyšším pH (nad 5,0) se obal nerozpouštěl, v disoluční kapalině s pH 4,0 se rozpustil během 45 min. Uvolňování léčivé látky ze vzorku pelet obalených polyakrylátovým obalem bylo významně závislé na pH zvolených pufrů. Jak uvádí výrobce²³, rozpouští se tento obal tvořený novějším typem Eudragitu FS při pH 7,0 a vyšším. Měl by tedy sloužit pro uvolňování léčiva v distální části tenkého střeva nebo až v kolonu podle toho, jak rychle se léčivo z lékové formy uvolní.



Obr. 2. Disoluční profily pelet s polysacharidovým obalem při proměnlivém pH a různém obsahu β -glukosidas; □ bez enzymu pH 3,0; 6,8; 7,5; 6,0, ● β -glukosidas 0,004%, × β -glukosidas 0,02%, Δ β -glukosidas 0,06%, ○ β -glukosidas 0,1%

Jak je z obr. 3 patrné, při disoluční zkoušce s proměnlivým pH (0–2 h pH 3,0; 2–5 h pH 6,8; 5–5,5 h pH 7,5; 5,5–22 h pH 6,0) a koncovým roztokem s pH 6,0 se po krátké změně pH na 7,5 uvolnilo jen minimální množství léčiva a jeho uvolňování v následujících hodinách bylo velmi pomalé (26 % uvolněného rutinu po 22 h zkoušky). Krátká doba působení pH 7,5 nestačila k rozpuštění obalu a potřebnému uvolnění celého obsahu rutinu. K podobným výsledkům došel také Poelvoorde a spol.²⁴. Prostředí s koncovým pH 4,0 však po 6 h způsobilo uvolnění 49,6 % léčiva a jeho úplné uvolnění v následujících hodinách. Lze to vysvětlit narušením obalu po druhé výrazné změně pH a rozpuštěním pomocných látek v jádře pelet, které napomohly rychlému uvolnění léčiva. Podle *in vitro* zkoušek použití obalů s rozpustností závislou na pH tak nemusí vést u všech pacientů s idiopatickým střevním zánětem k uvolnění léčiva v potřebném úseku gastrointestinálního traktu.

Směrodatné odchylky v disolučních profilech byly velmi nízké s maximální hodnotou 0,056 a pro lepší přehlednost nebyly do obr. 2 a 3 zařazeny.



Obr. 3. Porovnání disolučních profilů obalených pelet při různých disolučních podmínkách; ■ polysacharidový obal pH 3,0; 6,8; 7,5; 4,0, ◇ Eudragit FS 3,0; 6,8; 7,5; 4,0, □ Eudragit FS 3,0; 6,8; 7,5; 6,0

Závěr

Z našich výsledků i nedávno publikovaných prací jiných autorů vyplývá důležitost disoluční zkoušky s proměnlivým pH co nejpřesněji napodobující podmínky v gastrointestinálním traktu pro hodnocení perorálních lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva tak, aby podávala pravdivou, pro vývojového technologa zásadní informaci o možném chování lékové formy v podmínkách *in vivo*. Nutné je zohlednění časů průchodu navrhované lékové formy jednotlivými úseky gastrointestinálního traktu na lačno i v nasyceném stavu podle předpokládaného způsobu užívání i přidání dalších pomocných látek společ-

livěji napodobujících situace *in vivo*, které by mohly ovlivnit uvolňování léčiva z lékové formy. Pokud je lék určen pro pacienty s patologicky změněnými podmínkami v gastrointestinálním traktu, měla by se tato změna odrazit také v disoluční zkoušce. Jedině při zachování výše zmíněných aspektů bude disoluční zkouška skutečně cennou metodou vypovídající o možném chování léku v organismu.

Experimentální práce byla podporována projektem NS10222-2/2009 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Seznam zkratk

ČSL 4	Československý lékopis 4
GIT	gastrointestinální trakt
IBD	inflammatory bowel disease
RU	rutin
USP	United States Pharmacopoeia
W_{RU}	množství uvolněného rutinu
t	čas

LITERATURA

- Sutton C. S., Hu M.: AAPS, 8 (2006), <http://www.aapsj.org>, staženo 12. 4. 2010.
- Dvořáčková K., Rabišková M., Masteiková R., Muselík J., Krejčová K.: Drug Dev. Ind. Pharm. 35, 930 (2009).
- Swarbrick J., Boylan J. C. (ed.): *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker Inc., New York 1991.
- Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*. Grada Publishing, a. s., Praha 2009
- Chuong M. C., Christensen J. M., Ayres J. W.: Dissolution Technologies 8, 7 (2008).
- Press A. G., Hauptmann I. A., Hauptmann L., Fuchs B., Fuchs M., Ewe K., Ramadori G.: Aliment. Pharmacol. Ther. 12, 673 (1998).
- Nugent S. G., Kumar D., Rampton D. S., Yazaki E., Evans D. F.: Gut 48, 571 (2001).
- Avdeef A.: Curr. Topics Med. Chem. 1, 277 (2001).
- Ungell A. L., Abrahamsson B., v knize: *Pharmaceutical Formulation and Preformulation* (Gibson M., ed.), kap. 4. Interpharm/ CRC, Boca Raton 2004.
- Washington N., Washington C., Wilson C. G.: *Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption*. Taylor and Francis, New York 2001.
- Rajabi-Siahboomi A. R., Melia C. D.: Proct. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater 21, 25 (1994).
- Ashby L. J., Beezer A. E., Buckton G.: Int. J. Pharm. 51, 245 (1989).
- Aiache J. M., Pierre N., Beyssac E., Prasad V. K., Skelly J. P.: J. Pharm. Sci. 78, 261 (1989).
- Gander B., Ventouras K., Gurny R., Doelker E.: Int. J. Pharm. 27, 117 (1985).
- Evans D. F., Pye G., Bramley R., Clark A. G., Dyson T. J., Hardcastle J. D.: Gut 29, 1035 (1988).

16. Pye G., Evans D. F., Ledingham S., Hardcastle D. J.: *Gut* 31, 1355 (1990).
17. Shimono N., Takatori T., Ueda M., Mori M., Nakamura Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 51, 620 (2003).
18. Kaur K., Kim K.: *Int. J. Pharm.* 366, 140 (2009).
19. Friend D. R.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 247 (2005).
20. Nuthanid J., Huanbutta K., Luangtana-anan M., Sriamornsak P., Limmatvapirat S., Puttipipatkachorn S.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 253 (2008).
21. Wei H., Li-Fang F., Bai X., Chun-Lei L., Qing D., Youg-Zhen C., De Ying C.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 266 (2009).
22. Bigucci F., Luppi B., Cerchiara T., Sorrenti M., Bettinetti G., Rodriguez L., Zecchi V.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 435 (2008).
23. Evonik Industries: *Eudragit® Application Guidelines*. 11. vyd., Evonik, Darmstadt 2009.
24. Poelvoorde N., Huyghebaert N., Vervaeet C., Remon J. P.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 969 (2008).

K. Dvořáčková, T. Bautzová, and M. Rabišková
(*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno*): **Dissolution Study in the Evaluation of Oral Preparations with Controlled Drug Release**

Dissolution studies bring important characteristics of the oral preparations. They are used for estimation of behavior of new dosage forms *in vivo*. Pharmacopoeias prescribe dissolution testing using buffers, which can contain enzymes and surfactants. However, current methods are not always mimicking the real conditions *in vivo*. The preparations administered orally pass through the gastrointestinal tract (GIT) at varying pH values. A dissolution method was developed intended for drug targeting into the colon using the time periods and pH of buffers corresponding to those in the GIT. The dissolution method in the presence or absence of β -glucosidase was used to evaluate drug release from pellets coated with a polysaccharide or polyacrylic.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze upozorňuje
na přijímací řízení do
bakalářských studijních programů
Chemie, Biochemie a KATA
pro akademický rok 2011/2012.**

Ke studiu budou přijati uchazeči s ukončeným úplným středním nebo úplným středním odborným vzděláním, kteří splní požadavky testu všeobecných studijních předpokladů. Přihlášky a podrobné informace lze získat na adrese: PŘF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel: 221 951 155, 221 951 156.

Přihlášky ke studiu se přijímají do 28. února 2011.

Další informace naleznete na webových stránkách PŘF UK – www.natur.cuni.cz