

**FAKULTETA ZA FARMACIJO  
KATEDRA ZA BIOFARMACIJO IN FARMAKOKINETIKO**

**M. Bogataj, M. Kerec, I. Grabnar, S. Primožič, A. Mrhar**

**VAJE IZ BIOFARMACIJE S  
FARMAKOKINETIKO**

**SKRIPTA**

Ljubljana, 2001

## KAZALO

1. vaja: PORAZDELITVENI KOEFICIENT .....	2
2. vaja: KONSTANTA IONIZACIJE.....	8
3. vaja: ANTACIDI .....	15
4. vaja: DIFUZIJA IZ POLTRDNIH DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIK .....	24
5. vaja: VEZAVA NA ALBUMINE.....	30
6. vaja: BIOADHEZIJA.....	34
7. vaja: METODA REZIDUALOV .....	39
8. vaja: FARMAKOKINETIČNA SIMULACIJA.....	46
9. vaja: HITROST ABSORPCIJE .....	55

**Izdala Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko  
Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.**

## 1. vaja: PORAZDELITVENI KOEFICIENT

Če damo neko spojino (učinkovino) v zmes dveh topil, ki se med seboj ne mešata, se bo razporedila med obe topili v določenem koncentracijskem razmerju. Porazdelitveni koeficient je definiran kot razmerje koncentracij učinkovine med organsko in vodno fazo v ravnotežnem stanju in je konstanta za učinkovino v določenem sistemu topil pri konstantnih zunanjih pogojih.

Termodinamski porazdelitveni koeficient ( $P^T$ ) je definiran kot razmerje molskih ulomkov topljenca v organski fazi ( $(x_i)_o$ ) in vodni fazi ( $(x_i)_v$ ):

$$P^T = \frac{(x_i)_o}{(x_i)_v} \quad (1)$$

Termodinamskega porazdelitvenega koeficienta ne smemo zamenjevati z običajnim izrazom za porazdelitveni koeficient ( $P$ ), ki predstavlja razmerje molarnih koncentracij:

$$P = \frac{C_o}{C_v} \quad (2)$$

kjer je  $C_o$  koncentracija učinkovine v organski in  $C_v$  koncentracija učinkovine v vodni fazi v ravnotežnem stanju.

Enačba 2 velja, kadar je učinkovina v enaki obliki v organski in vodni fazi, kar pomeni, da ne pride do asociacije, niti do disociacije molekul, v nobeni od faz. Če kateri od teh dveh procesov poteče, je potrebno to upoštevati tudi pri izračunu porazdelitvenega koeficienta. Za učinkovine, ki so šibke kisline in ionizirajo (in disociirajo) samo v vodni fazi, do asociacije pa ne pride v nobeni fazi, velja naslednja enačba:

$$P_n = \frac{[HA]_o}{[HA]_v + [A^-]_v} \quad (3)$$

kjer je  $P_n$  **navidezni porazdelitveni koeficient**,  $[HA]_o$  koncentracija neionizirane oblike v organski fazi,  $[HA]_v$  in  $[A^-]_v$  pa koncentraciji neionizirane ter ionizirane oblike v vodni fazi. Navidezni porazdelitveni koeficient dobimo, če izračunamo razmerje izmerjenih koncentracij po stresanju obeh faz, pri določenem pH vodne faze. **Pravi porazdelitveni koeficient  $P$**  pa predstavlja razmerje koncentracij neioniziranih oblik učinkovine v organski in vodni fazi:

$$P = \frac{[HA]_o}{[HA]_v} \quad (4)$$

Podobni enačbi lahko napišemo tudi za šibke baze.

Pravi porazdelitveni koeficient lahko izračunamo iz navideznega, če poznamo pH vodne faze, pri katerem je bil določen in konstanto ionizacije oz. pKa vrednost učinkovine. Naslednji enačbi sta izpeljani iz enačb 3 in 4 in Henderson-Hasselbachove enačbe:

za šibke kisline:

$$P = P_n \cdot (1 + K_a/[H^+]) = P_n \cdot (1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (5)$$

za šibke baze:

$$P = P_n \cdot (1 + [H^+]/K_a) = P_n \cdot (1 + 10^{pK_a-pH}) \quad (6)$$

## DOLOČANJE PORAZDELITVENEGA KOEFICIENTA

Porazdelitveni koeficient lahko določamo računsko in eksperimentalno:

- računsko določanje porazdelitvenega koeficienta:
  - računanje po Hanschu
  - računanje po Rekkerju
- eksperimentalno določanje porazdelitvenega koeficienta:
  - porazdelitvena metoda
  - kromatografske metode:
    - HPLC
    - TLC

### **Računsko določanje porazdelitvenega koeficienta**

Računske metode za določanje porazdelitvenega koeficienta temeljijo na aditivnosti in predpostavljajo, da je lipofilnost molekule enaka vsoti hidrofobnih prispevkov posameznih strukturnih fragmentov (substituent) te molekule. Prispevki substituent k lipofilnosti molekule so odvisni tudi od okolja v katerem se substituent nahajajo. Med različnimi pristopi, ki so jih različni avtorji uporabljali za izračun porazdelitvenega koeficienta, sta se izkazala kot najbolj uporabna pristopa Hanscha in Rekkerja.

### **Eksperimentalno določanje porazdelitvenega koeficienta**

#### **1. PORAZDELITVENA METODA**

Postopek določanja porazdelitvenega koeficienta s porazdelitveno metodo poteka tako, da učinkovino raztopimo v vodi ali v pufru znane pH vrednosti in stresamo z enakim ali različnim volumnom organskega topila. Če je za izvedbo poskusa ugodnejše, lahko učinkovino raztopimo v organskem topilu in nato dodamo vodno fazo. Po vzpostavitvi ravnotežja določimo koncentracijo učinkovine v vodni in organski fazi in izračunamo porazdelitveni koeficient. Poleg opisane klasične izvedbe poznamo tudi različne modifikacije porazdelitvene metode. Kot organsko topilo se najpogosteje uporablja n-oktanol, zaradi njegove podobnosti s strukturami bioloških sistemov (lipofilna veriga in polarna skupina). Dobre strani uporabe n-oktanola so topnost mnogih organskih spojin v tem topilu, nizek parni tlak pri sobni temperaturi in

možnost spektroskopskega določanja vsebnosti učinkovin v oktanolu v UV področju. Tudi večina računskih metod temelji na eksperimentalnih podatkih, ki so bili določeni v sistemih z oktanolom; na sistem oktanol/voda se tako nanašajo Hanscheve hidrofobne konstante ( $\pi$ ) in Rekkerjeve fragmentne konstante (f). Uporaba n-oktanola pri porazdelitveni metodi ima tudi nekatere slabe strani, ker se del vode porazdeli v oktanolno fazo, v manjši meri pa tudi oktanol v vodno, sam postopek je sorazmerno dolgotrajen, učinkovine se lahko adsorbirajo na steklo, pri klasični izvedbi metode pa potrebujemo tudi sorazmerno veliko količino učinkovin in oktanela.

Iz izmerjenih koncentracij učinkovine v organski in vodni fazi v ravnotežju izračunamo navidezni porazdelitveni koeficient, za učinkovine, ki v vodni fazi disociirajo, pa lahko, ob upoštevanju pH vodne faze in pKa učinkovine, iz enačb 5 in 6 izračunamo tudi pravi porazdelitveni koeficient. Če namesto n-oktanola uporabimo druga organska topila, velja med porazdelitvenimi koeficienti organsko topilo/voda za dve različni topili (I, II) naslednja zveza:

$$\log P_{II} = a \cdot \log P_I + b \quad (7)$$

a,b...konstanti

## 2. KROMATOGRFSKE METODE

Pri kromatografskih metodah se učinkovina porazdeli med stacionarno in mobilno fazo, ki imata različno lipofilnost. Iz eksperimentalno dobljenih rezultatov kromatografskih metod lahko izračunamo parameter, ki predstavlja merilo lipofilnosti učinkovine, za serijo učinkovin pa lahko poiščemo tudi korelacijo med tem parametrom in porazdelitvenim koeficientom oktanol/voda.

### 2.a. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Za določanje porazdelitvenega koeficienta se uporablja obratno fazna HPLC, kjer predstavlja stacionarna faza lipofilno, mobilna pa hidrofilno komponento sistema, v katerem se porazdeljuje učinkovina. Stacionarna faza je silikagel, ki ima na hidroksilne skupine vezane alkilne verige, mobilno fazo pa predstavljata voda oz. pufer in organski modifikator (npr. metanol). Merimo retencijske čase za učinkovino ( $t_R$ ) in za spojino, ki se ne retenira ( $t_0$ ) in izračunamo kapacitivnostni faktor učinkovine ( $k'$ ), ki je merilo lipofilnosti učinkovine:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8)$$

Korelacija med kapacitivnostnim faktorjem in porazdelitvenim koeficientom oktanol/voda (P) je naslednja:

$$\log k' = p \cdot \log P + q \quad (9)$$

kjer sta p in q konstanti.

Porazdelitveni koeficient P lahko izračunamo na različne načine, najpogosteje se uporabljata metoda analogne vrste in metoda z določanjem "log Kw".

### **Metoda analogne vrste**

Kapacitivnostni faktor določimo čim večjemu številu strukturno podobnih učinkovin, za katere poznamo vrednost porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda, da so tako zajete vse možne interakcije med učinkovino in mobilno ter stacionarno fazo. S pomočjo dobljene korelacije med kapacitivnostnim faktorjem in porazdelitvenim koeficientom (enačba 9), nato izračunamo porazdelitveni koeficient nove učinkovine.

### **Metoda "log Kw"**

V mobilni fazi spreminjamo delež vodne faze v čim širšem možnem intervalu (npr. 10-90%) in za vsako uporabljeno mobilno fazo določimo kapacitivnostni faktor učinkovine. Z ekstrapolacijo določimo vrednost kapacitivnostnega faktorja za mobilno fazo, ki bi vsebovala 100% vode in kjer velja:  $\log k' = \log Kw$ . Vrednost "log Kw" je merilo za porazdelitev učinkovine med lipofilno stacionarno fazo in vodno fazo brez dodatkov organskih topil, in zato bolje opredeli lipofilnost učinkovine kot kapacitivnostni faktor, določen ob uporabi mobilne faze, ki vsebuje tudi organsko topilo. Na enak način, kot pri prej opisani metodi analogne vrste, pa lahko tudi tukaj določimo korelacijo med log Kw in log P, ter izračunamo porazdelitveni koeficient oktanol/voda za novo učinkovino.

## **2.b. Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Za določanje porazdelitvenega koeficienta uporabljamo obratno fazno TLC, torej predstavlja stacionarna faza lipofilno, mobilna pa hidrofilno komponento sistema, v katerem se učinkovina porazdeljuje. Pri TLC določamo retencijske faktorje učinkovine ( $R_f$ ) v določenem sistemu mobilne in stacionarne faze, ter iz njih izračunamo parameter " $R_m$ " po naslednji enačbi:

$$R_m = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right) \quad (10)$$

Podobno kot pri HPLC, lahko, za serijo strukturno podobnih spojin, poiščemo korelacijo med logaritmom porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda ( $\log P$ ) in parametrom  $R_m$ , ter nato izračunamo vrednost porazdelitvenega koeficienta za novo učinkovino.

## **LITERATURA:**

1. Martin A. et al., Physical pharmacy, Lea &Febiger, Philadelphia, London, 1993.
2. Wells J.I., Pharmaceutical preformulation: The physicochemical properties of drug substances, Ellis Horwood, Chichester, 1988.

## NALOGE

1. Kisli učinkovini smo s porazdelitveno metodo določili vrednost navideznega porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda (pufer) 0,50 pri pH 3,5 in 0,16 pri pH 4,0. Ali bi pri pH 1,5 s to metodo določili pravi ali navidezni porazdelitveni koeficient in zakaj?

(R: Navidezni porazdelitveni koeficient, ker je razlika med pKa (=1,74) in pH majhna.)

2. 25 mg učinkovine raztopimo v 100 ml pufru s pH 3,0. 1 ml dobljene raztopine redčimo z istim pufrom na 25 ml in 20 ml te raztopine stresamo z 20 ml n-oktanol. Ko se vzpostavi ravnotežje med vodno in oktanolno fazo, odpipetiramo 3 ml vodne faze, jo redčimo s pufrom pH 3,0 do 25 ml in v tej raztopini določimo koncentracijo učinkovine 0,5 mg/l. Izračunaj porazdelitveni koeficient učinkovine in ugotovi ali je pravi ali navidezni, če je konstanta ionizacije učinkovine pKa = 3,31!

(R: Navidezni porazdelitveni koeficient;  $P_n = 1,4$ )

3. Kisli učinkovini določimo navidezni porazdelitveni koeficient 0,7 v sistemu n-oktanol/pufer. Izračunaj pravi porazdelitveni koeficient učinkovine, če je v vodni fazi (pufru) 25% učinkovine ionizirane!

(R:  $P = 0,93$ )

4. V sistemu n-oktanol / voda smo določali porazdelitveni koeficient učinkovine pri pH vrednostih 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 9, ter ugotovili naslednjo linearno odvisnost ( $r=0,998$ ):

$$P_n^{-1} = 0,36 + 2,25 \cdot 10^{-5} \cdot [H^+]^{-1}$$

Ugotovi ali je učinkovina kislina ali bazična, ter izračunaj njeno konstanto ionizacije ter pravi porazdelitveni koeficient! Ali smo pri pH 4,0 eksperimentalno določili pravi ali navidezni porazdelitveni koeficient?

## NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

### Določanje porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda za fenobarbiton, barbiton in sulfacetamid-Na

#### Fenobarbiton:

Natehtamo 140-150 mg substance, jo raztopimo v majhnem volumnu etanola v 50 ml merilni bučki in dopolnimo z vodo do oznake. Dobljeno raztopino redčimo z vodo 5ml/50ml. 15 ml te raztopine nato dodamo v lij ločniku 15 ml n-oktanola in stresamo 30 minut. Vodnima raztopinama pred in po stresanju izmerimo absorbanci pri valovni dolžini 270 nm.

#### Barbiton:

Natehtamo 30-40 mg substance, jo raztopimo v majhnem volumnu etanola v 50 ml merilni bučki in dopolnimo z vodo do oznake. Dobljeno raztopino redčimo 5ml/50ml. 15 ml te raztopine nato dodamo v liju ločniku 15 ml n-oktanola in stresamo 30 minut. Vodni raztopini pred in po stresanju redčimo 1/5 z vodo in jima izmerimo absorbanci pri valovni dolžini 220 nm.

#### Sulfacetamid-Na:

Natehtamo 40-50 mg substance in jo raztopimo v 50 ml vode. 15 ml te raztopine dodamo v liju ločniku 15 ml n-oktanola in stresamo 30 minut. 1 ml preostale raztopine redčimo z vodo na 100 ml. Enako redčimo tudi vodno fazo po stresanju z n-oktanolom, nato pa obema raztopinama izmerimo absorbanco pri 256 nm.

Iz dobljenih rezultatov izračunamo porazdelitvene koeficiente (P) vseh treh substanc in poiščemo korelacijo med P in RSA (relativna specifična absorpcija - sorazmerna konstanti hitrosti absorpcije) ter med log P in log RSA.

#### Vrednosti RSA:

- fenobarbiton: 3,3
- barbiton: 2,5
- sulfacetamid-Na: 0,6



## 2. vaja: KONSTANTA IONIZACIJE

Konstanta ionizacije predstavlja merilo kislosti oz. bazičnosti spojin (učinkovin). Namesto "konstanta ionizacije" se pogosto uporablja izraz "konstanta disociacije", vendar pomena obeh izrazov nista popolnoma enaka. Veliko večkomponentnih sistemov namreč lahko disociira (se loči - razdruži na komponente), ne da bi pri tem nastali ioni - tak primer je sistem encim-substrat, v nekaterih primerih pa lahko učinkovine ionizirajo (nastanejo ioni), ne da bi pri tem prišlo do disociacije, npr. dipolarni ioni (zwitterioni).

Ionizacija šibkih kislin je predstavljena v enačbi 1:



konstanta ionizacije  $K_a$  pa je definirana z enačbo 2:

$$K_a^T = \frac{a(\text{H}^+) \cdot a(\text{A}^-)}{a(\text{HA})} \quad (2)$$

Oznake  $a(\text{H}^+)$ ,  $a(\text{HA})$  in  $a(\text{A}^-)$  pomenijo aktivnosti vodikovih ionov ter neionizirane in ionizirane oblike kisline. Konstanta ionizacije, izražena z enačbo 2 se zato imenuje tudi termodinamska konstanta ionizacije ( $K_a^T$ ). V enačbi 3 so namesto aktivnosti uporabljene koncentracije, ki so označene z oglatimi oklepaji ( $[\text{H}^+]$ ,  $[\text{HA}]$ ,  $[\text{A}^-]$ ),  $K_a^C$  pa pomeni koncentracijsko konstanto ionizacije:

$$K_a^C = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (3)$$

Z uporabo aktivnosti zajamemo medsebojne privlake med ioni in nepopolno hidratacijo ionov v raztopinah z visoko koncentracijo. Čim nižja je koncentracija, manjše so interakcije in pri neskončnem razredčenju postane koncentracijska konstanta ionizacije enaka termodinamski. Vendar pa lahko vseeno uporabljamo izraz za koncentracijsko konstanto ionizacije, kadar so koncentracije v raztopinah manjše kot 0,01 mol/l in so prisotni samo enovalentni ioni.

Konstanta ionizacije je odvisna od temperature, zato ob podatku za vrednost konstante vedno navajamo tudi temperaturo, pri kateri je bila določena.

## DOLOČANJE KONSTANTE IONIZACIJE

Določanje konstante ionizacije temelji na neki lastnosti učinkovine (absorpcija svetlobe, porazdelitev med organsko in vodno fazo, topnost ...), ki je različna za ionizirano in neionizirano obliko. Izjema je potenciometrična metoda, kjer lahko koncentracije ionizirane in neionizirane oblike direktno izračunamo iz dobljenih eksperimentalnih rezultatov. Najpogosteje uporabljane metode so naslednje:

1. potenciometrična
2. spektrofotometrična
3. topnostna
4. porazdelitvena
5. HPLC
6. druge metode: konduktometrična, termometrična metoda, Ramanova spektrometrija...

### 1. POTENCIOMETRIČNA METODA

Postopek določanja poteka tako, da raztopino učinkovine, znane koncentracije, titriramo z močno kislino ali bazo in merimo razliko potencialov med elektrodo, katere potencial se spreminja s koncentracijo vodikovih ionov (običajno steklena elektroda) in referenčno elektrodo, s konstantnim potencialom (običajno kalomelova elektroda). Razlika potencialov je merilo za aktivnost vodikovih ionov v raztopini. Postopek običajno poteka tako, da s pH-metrom direktno merimo pH vrednost v raztopini po dodajanju močne kisline ali baze.

Optimalna koncentracija učinkovine je 0,01 mol/l. S potenciometrično metodo dobimo dobre rezultate za pKa vrednosti med 2,5 in 11, interval pa lahko nekoliko razširimo z upoštevanjem aktivnosti ali z uporabo drugih elektrod. Pravilo, ki se ga moramo pri potenciometričnih določitvah konstante držati, če želimo dobiti točne rezultate je, da mora biti vrednost pKa večja od negativnega logaritma koncentracije:  $pK_a > -\log C$ . Pri optimalni koncentraciji 0,01 mol/l lahko torej določamo vrednosti pKa večje od 2. Problem pri tej metodi lahko predstavljajo slabo topne učinkovine, s katerimi ne moremo doseči dovolj visoke koncentracije.

#### Računanje:

Iz začetne koncentracije učinkovine in dodatkov kisline ali baze pri titraciji izračunamo koncentraciji ionizirane in neionizirane oblike, vrednosti pH pa merimo med poskusom. Konstanto ionizacije lahko izračunamo z enačbo 4 ali 5:

$$\text{učinkovina je šibka kislina: } pK_a = pH + \log \left( \frac{[HA]}{[A^-]} \right) \quad (4)$$

$$\text{učinkovina je šibka baza: } pK_a = pH + \log \left( \frac{[BH^+]}{[B]} \right) \quad (5)$$

## 2. SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

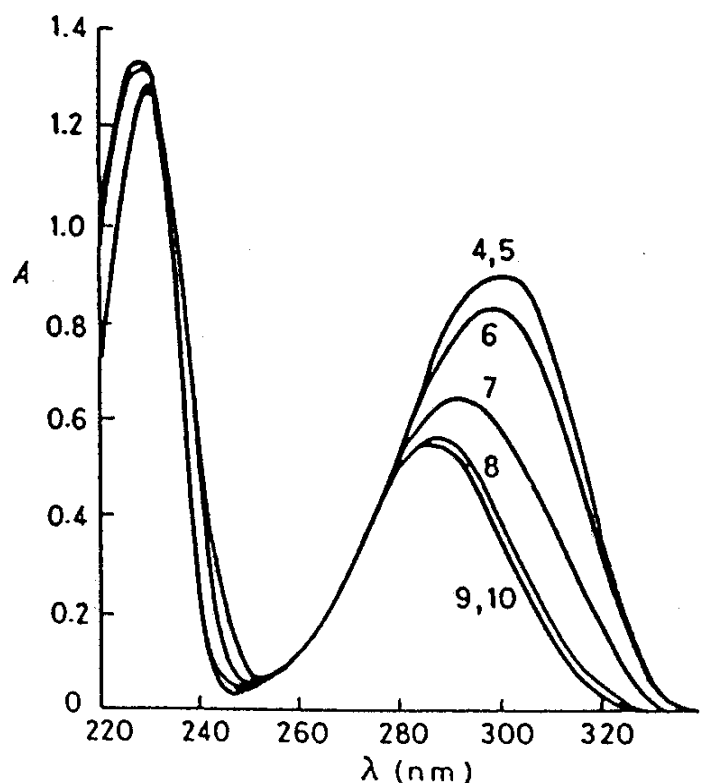
Spektrofotometrična metoda temelji na različni absorpciji svetlobe ionizirane in neionizirane oblike raztopljene učinkovine. Metodo lahko uporabimo, kadar:

- učinkovina absorbira svetlobo v UV ali vidnem področju, in
- se absorpcija molekularne oblike in iona razlikuje v valovni dolžini in / ali intenziteti

Postopek določanja poteka v naslednjih stopnjah:

1. posnamemo UV ali vidna spektra ionizirane in neionizirane oblike: učinkovino raztopimo v pufrih z dovolj nizko in z dovolj visoko pH vrednostjo, tako da je prisotna samo ionizirana ali neionizirana oblika
2. izberemo analitsko valovno dolžino, pri kateri je razlika med absorbancama ionizirane in neionizirane oblike največja
3. pripravimo raztopine učinkovine enakih koncentracij, v pufrih različnih pH vrednosti, in izmerimo absorbance pri izbrani valovni dolžini
  - najprej določimo približno vrednost konstante ionizacije, tako, da izvedemo meritve na širokem pH intervalu, med pH popolnoma ionizirane in pH popolnoma neionizirane oblike
  - pH interval zožimo na vrednosti:  $\text{pH} = \text{pKa} \pm 0, 0.2, 0.4, 0.6$  in izmerimo absorbance.
4. izmerimo tudi absorbanci popolnoma ionizirane in popolnoma neionizirane oblike raztopinama iste koncentracije, pri isti valovni dolžini.

Na sliki so prikazani UV spektri bazične učinkovine pri različnih pH:



Iz spektrov je razvidno, da je učinkovina popolnoma protonirana pri pH 4, v neprotonirani obliki pa je pri pH 10. Analitska valovna dolžina je 310 nm.

Vrednost pKa izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log \frac{A_I - A}{A - A_N} \quad (6)$$

učinkovina je šibka baza:

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log \frac{A - A_N}{A_I - A} \quad (7)$$

kjer je A absorbanca učinkovine v pufru določene pH vrednosti,  $A_N$  absorbanca neionizirane in  $A_I$  absorbanca ionizirane oblike.

### 3. TOPNOSTNA METODA

Topnostna metoda temelji na različni topnosti ionizirane in neionizirane oblike učinkovine v vodnem mediju. To pomeni, da topnostno metodo lahko uporabljamo za določanje konstante ionizacije učinkovin, pri katerih je topnost odvisna od njihove ionizacije oz. od pH medija. Metoda je primerna za učinkovine, ki so zelo slabo topne.

Postopek izvedemo tako, da določimo topnost učinkovine v pufrih različnih pH vrednosti. Presežek učinkovine mešamo v pufru toliko časa, da se vzpostavi ravnotežje med raztopljeno in neraztopljeno učinkovino. Neraztopljeni del odfiltriramo, bistri nasičeni raztopini pa določimo koncentracijo učinkovine in pH. Postopek izvajamo pri konstantni temperaturi in ionski moči.

Vrednost pKa lahko izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$S = S_0 + (S_0 \cdot K_a \cdot (1/[H^+])) \quad (8)$$

$$\text{pKa} = \text{pH} - \log ((S/S_0) - 1) \quad (9)$$

učinkovina je šibka baza:

$$S = S_0 + ((S_0/K_a) \cdot [H^+]) \quad (10)$$

$$\text{pKa} = \text{pH} + \log ((S/S_0) - 1) \quad (11)$$

kjer pomeni  $S_0$  topnost neionizirane oblike učinkovine in S topnost učinkovine pri določenem pH vodnega medija (za šibke kisline:  $S = [HA] + [A^-]$ )

#### 4. PORAZDELITVENA METODA

Porazdelitvena metoda temelji na različnem porazdeljevanju ionizirane in neionizirane oblike učinkovine med organsko in vodno fazo. Običajno predpostavimo, da učinkovina ionizira v vodni fazi in da se v organsko fazo porazdeljuje samo neionizirana oblika. V vodni fazi imamo torej ravnotežje med ionizirano in neionizirano obliko, v organski pa imamo samo neionizirano obliko, ki je v ravnotežju z neionizirano obliko učinkovine v vodni fazi.

Postopek poteka tako, da določimo navidezni porazdelitveni koeficient učinkovine pri različnih pH vodne faze. Učinkovino raztopimo v vodni fazi (ali organski) in jo stresamo z organsko (vodno) fazo toliko časa, da se učinkovina porazdeli med obe fazi in se vzpostavi ravnotežje. Določimo ravnotežni koncentraciji učinkovine v organski in vodni fazi in izračunamo navidezni porazdelitveni koeficient za serijo pufrih raztopin z različnimi pH.

Konstanto ionizacije izračunamo po naslednjih enačbah:

učinkovina je šibka kislina:

$$pK_a = pH - \log \left( \frac{P}{P_n} - 1 \right) \quad (12)$$

učinkovina je šibka baza:

$$pK_a = pH + \log \left( \frac{P}{P_n} - 1 \right) \quad (13)$$

kjer sta P pravi in  $P_n$  navidezni porazdelitveni koeficient.

#### 5. HPLC

HPLC metoda temelji na različnem porazdeljevanju ionizirane in neionizirane oblike učinkovine med stacionarno in mobilno fazo, pri čemer lahko pride do porazdelitve obeh oblik v obe fazi. Določamo kapacitivnost učinkovine pri različnih pH mobilne faze.

Za šibko kislino lahko izračunamo konstanto ionizacije s pomočjo naslednje enačbe:

$$k' = \frac{k_n' + k_i' \cdot (K_a/[H^+])}{1 + K_a/[H^+]} \quad (14)$$

kjer je  $k'$  kapacitivnost učinkovine,  $k_i'$  kapacitivnost ionizirane oblike in  $k_n'$  kapacitivnost neionizirane oblike.

#### LITERATURA:

A. Albert, E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, A Laboratory Manual, Chapman and Hall, London, New York, 1984.

## NALOGE

1. Izpelji enačbo, ki prikazuje odvisnost topnosti od pH za bazo (kislino)!
2. V litru puferne raztopine s pH 3 se raztopi 1,2 mg kisle učinkovine, če pa pH dvignemo na 5 se je v 1 litru raztopi 3,2 mg. pH raztopin se po dodatku učinkovine ne spremeni. Izračunaj konstanto ionizacije učinkovine in topnost njene neionizirane oblike! Molekulska masa učinkovine je 118.

(R:  $S_0 = 1,18 \text{ mg/l}$ ;  $pK_a = 4,77$ )

3. Opiši princip določanja konstante ionizacije s topnostno metodo!
4. Kakšen je osnovni princip določanja konstante ionizacije s spektrofotometrično metodo? Navedi stopnje dela!
5. Pripravili smo raztopine kisle učinkovine enakih koncentracij v pufrih z različnimi pH in na spektrofotometru izmerili absorbance teh raztopin, ki so podane v tabeli. S pomočjo navedenih podatkov oceni interval v katerem leži  $pK_a$  in nato izračunaj točno vrednost  $pK_a$ !

pH	1	3	5	7	9
A	0,105	0,103	0,501	0,809	0,807

(R: Interval: 3-7;  $pK_a = 4,89$ ;  $A_I = 0,808$ ;  $A_N = 0,104$ ;  $A = 0,501$ )

6. Iz 5 M raztopine HCl želimo pripraviti raztopino HCl s pH = 1,9. Katera od naslednjih redčenj so pravilna:
  - a) 25ml/100ml in 10ml/100ml
  - b) 5ml/10ml in 5ml/100ml
  - c) 1ml/100ml in 10ml/100ml in 25ml/100ml
  - d) 25ml/50ml in 5ml/10ml in 1ml/100ml
  - e) 2ml/10ml in 25ml/100ml in 10ml/100ml

(R: d)

7. Kako bi iz 1,12 mol/l raztopine učinkovine pripravili 4,48 mmol/l raztopino? Navedi dva načina redčenja ter vrsto in volumne uporabljene steklovine!

(R: npr.:  $1/25 + 1/10$  ali  $1/50 + 2/10$ ; 1 ml osnovne raztopine vzamemo s polnilno pipeto, damo v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake, od te raztopine vzamemo 1 ml s polnilno pipeto, ...)

8. Konstanto ionizacije učinkovine, ki vsebuje kisle funkcionalne skupine smo določali s spektrofotometrično metodo in dobili rezultate, ki so prikazani v tabeli. Ugotovi koliko konstant ima učinkovina v testiranem pH območju in izračunaj njihove vrednosti!

pH	0,5	1	3	5	7	9	11	12
A	0,011	0,009	0,323	0,610	0,609	0,822	1,121	1,120

## NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

### 1. Določanje konstante ionizacije borne kisline s potenciometrično metodo

Pripravimo 100 ml  $10^{-2}$ M vodne raztopine  $H_3BO_3$  ( $M(\text{borne kisline})=61.8$ ) in ji izmerimo pH. Med mešanjem z magnetnim mešalom dodajamo po 0,1 ml 1M NaOH in po vsakem dodatku izmerimo pH vrednost. Postopek zaključimo po desetih dodatkih NaOH.

Konstanto izračunamo po Henderson-Hasselbachovi enačbi iz podatkov, ki jih dobimo po vsakem dodatku baze. Kot rezultat podamo povprečno vrednost konstante ionizacije.

### 2. Določanje konstante ionizacije diazepama s spektrofotometrično metodo

Pripravimo 25 ml  $4 \cdot 10^{-3}$ M raztopine diazepama ( $M(\text{diazepama})=284$ ) v metanolu. Po 1 ml te raztopine redčimo na 50 ml z 1M HCl in 0,1M NaOH, posnamemo UV spektra in iz spektrov določimo valovno dolžino, pri kateri bomo izvajali meritve. Nato redčimo po 1 ml osnovne raztopine do 50 ml s puferskimi raztopinami naslednjih pH vrednosti: 2.8, 3.1, 3.4, 3.8 in 4.2. Vsem vzorcem izmerimo pH na pH-metru in absorbance na spektrofotometru. Absorbance protonirane oz. neprotinirane oblike določimo z redčitvijo 1 ml osnovne raztopine na 50 ml z 1M HCl in oz. 0,1M NaOH.

Konstanto ionizacije izračunamo za vsako meritev posebej in podamo rezultat kot povprečje vseh izračunanih vrednosti.

### **3. vaja: ANTACIDI**

Antacidi so zdravila, ki po peroralni aplikaciji vežejo želodčno kislino. Najpogostejši mehanizmi delovanja antacidov so nevtralizacija HCl, adsorpcija HCl in mehanska zaščita sluznice pred delovanjem HCl in prebavnih sokov. Dober antacid nevtralizira samo odvečno želodčno kislino in vzdržuje pH želodca med 3 in 5. V tem pH področju prebavni encimi ustrezno delujejo in ne povzročajo korozivnih poškodb na sluznici. Če antacid v večji meri nevtralizira želodčno kislino in so pH vrednosti višje, pride do povečanega nastajanja HCl (sekundarna hipersekrecija HCl), verjetno zaradi povečanega sproščanja gastrina in histamina, hkrati pa je moteno tudi proteolitično delovanje želodčnega soka zaradi inaktivacije pepsina in katepsina. Antacidi se uporabljajo pri povečanem izločanju želodčne kisline in pri ulkusni bolezni, dajejo pa se običajno 1 uro po jedi ali med dvema obrokom. Pri sočasnem jemanju antacidov in drugih zdravil lahko pride do medsebojnih interakcij.

Delitev antacidov po Tomiću je naslednja:

- alkalijske soli
- zemljoalkalijske soli, oksidi in hidroksidi
- silikati
- aluminijeve soli in hidroksidi
- bizmutove soli

#### **Alkalijske soli**

Po peroralni aplikaciji nevtralizirajo želodčno kislino. Kot antacidi se uporabljajo hidrogenkarbonati, laktati, citrati in acetati natrija in kalija. Ker se absorbirajo lahko povzročijo splošno alkalozo, ker se kation dalj časa zadrži v organizmu, anion pa se metabolizira in hitro izloči.

- natrijev hidrogenkarbonat

Nevtralizira želodčno kislino, pH želodca se lahko dvigne na 7 ali več. Učinek je hiter in kratkotrajen. Pri nevtralizaciji se sprošča CO<sub>2</sub>, ki razteza želodec in tako lahko ublaži spazme in bolečino, lahko pa povzroči tudi perforacijo želodčnega ulkusa. Zaradi visokega pH in zaradi sproščenega CO<sub>2</sub> pride do močne sekundarne sekrecije HCl. Natrijev hidrogenkarbonat povzroča splošno alkalozo.

- kalijev hidrogenkarbonat

Ima enak učinek kot natrijev hidrogen karbonat; daje se ga, če je za bolnika kalij kot kation bolj ustrezen od natrija.



## **Zemljoalkalijske soli, oksidi in hidroksidi**

Po peroralni aplikaciji nevtralizirajo želodčno kislino. Iz prebavnega trakta se le malo absorbirajo in ne povzročajo splošne alkaloze.

- magnezijev oksid, magnezijev hidroksid, magnezijev karbonat

Močno nevtralizirajo želodčno kislino, do pH 7 ali več in povzročajo sekundarno hipersekrecijo HCl.

Magnezijev hidroksid deluje zelo hitro, magnezijev karbonat pa zaradi svoje kristalne strukture nekoliko počasneje. Magnezijev klorid, ki nastane pri nevtralizaciji deluje laksativno.

- magnezijev peroksid

Pri reakciji s HCl nastane nascentni kisik. Magnezijev peroksid deluje antacidno, antiseptično in dezodorantno.

- kalcijev karbonat

Kalcijev karbonat nevtralizira želodčno kislino hitro in učinkovito. Hitrost delovanja je odvisna od velikosti delcev in kristalne strukture  $\text{CaCO}_3$ . Po Tomiću nevtralizira samo višek HCl in ne povzroča hipersekrecije, po Varagiću pa lahko nevtralizira vso prisotno kislino v želodcu in povzroči sekundarno hipersekrecijo HCl. Višek  $\text{CaCO}_3$  mehansko ščiti sluznico želodca, zato mora biti v obliki drobnih, kroglastih delcev (praecipitatum).

Pri dolgotrajnem jemanju kalcijevega karbonata, posebno, če se hkrati pije večje količine mleka, pride do absorpcije večjih količin kalcija in do mlečno alkalnega sindroma.

$\text{CaCO}_3$  deluje obstipantno.

- kalcijevi fosfati

## **Silikati**

Silikati vežejo kislino z adsorpcijo. Uporabljajo se v obliki zemljoalkalijskih in aluminijevih soli.

- magnezijev trisilikat

Deluje počasi in dolgotrajno. V želodcu nastane koloidna silicijeva kislina, ki počasi veže HCl z adsorpcijo. Presežek Mg trisilikata ne dvigne pH nad fiziološko mejo in ne povzroča sekundarne hipersekrecije HCl.

- magnezijev aluminijev silikat

Mg Al silikat veže želodčno kislino z adsorpcijo. Učinek traja dolgo časa.

### **Aluminijev hidroksid in soli**

Tvorijo hidrofilne koloide, ki imajo pufrsko-antacidne in adsorptivne lastnosti. Ne povzročajo alkaloze.

- aluminijev hidroksid

Nevtralizira in adsorbira presežek želodčne kisline ter deluje kot adstringens. V želodcu tvori gel, ki prekrije sluznico in adsorbira HCl, toksine in bakterije. pH želodca vzdržuje v fiziološkem področju pri vrednostih 4-5. Ne povzroča sekundarne hipersekrecije HCl. Aluminijev hidroksid nevtralizira kislino počasneje kot magnezijev hidroksid ali karbonat in kot kalcijev karbonat.

Pri nevtralizaciji HCl z  $\text{Al(OH)}_3$  nastane  $\text{AlCl}_3$ , ki se veže s fosfati v črevesju v netopen Al fosfat, le-ta pa se izloči z blatom. Zaradi opisanega procesa pride pri dolgotrajni uporabi velikih doz  $\text{Al(OH)}_3$  do hipofosfatemije.

- aluminijev fosfat

Dvigne pH v želodcu na 3, ne povzroči nefiziološke alkalizacije želodčnega soka in ne sekundarne hipersekrecije HCl. V primerjavi z aluminijevim hidroksidom aluminijev fosfat ne preprečuje absorpcije fosfatov iz prebavnega trakta.

### **Bizmutove soli**

Adsorbirajo želodčno kislino in delujejo adstringentno. Velike doze bizmutovih soli so toksične.

### **LITERATURA:**

1. Tomić D., Farmakoterapija, Medicinska knjiga, Beograd, Zagreb, 1989
2. Varagić V.M. in Milošević M.P., Farmakologija, Medicinska knjiga, Beograd, Zagreb, 1985.
3. Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics, Gilman AG Rall TW et al., Dallas, Texas, 1990.

## NALOGE

1. Tabletam Acimola, Kompensana in Rupuruta določamo nevtralizacijsko kapaciteto po predpisu po USP XXIII. Volumni porabljene NaOH so naslednji: Acimol 25,7 ml, Kompensan 43,8 ml in Rupurut 29,8 ml. Nevtralizacijske kapacitete, ki smo jih določili, padajo po naslednjem vrstnem redu:

- a) Rupurut > Kompensan > Acimol
- b) Kompensan > Rupurut > Acimol
- c) Acimol > Rupurut > Kompensan
- d) Acimol > Kompensan > Rupurut
- e) Rupurut > Acimol > Kompensan
- f) Kompensan > Acimol > Rupurut

(R: c)

2. Kakšen je mehanizem antacidnega delovanja alkalijskih soli in kakšni so možni stranski učinki? Navedi dva predstavnika!

3. Opiši antacidno delovanje derivatov aluminija! Kateri predstavniki se uporabljajo, navedi njihove prednosti in stranske učinke!

4. Kako bo pacient, ki ima težave zaradi povečanega izločanja želodčne kisline, občutil delovanje vsakega od spodaj navedenih antacidov nekaj minut po aplikaciji, ter 1 do 2 uri po aplikaciji:

- a) silikatov (apliciramo najmanjšo predpisano dozirano količino zdravila)
- b)  $\text{NaHCO}_3$  (apliciramo najmanjšo enkratno dozo učinkovine)

- Silikati, po nekaj minutah:
- Silikati, po 1-2 urah:
- $\text{NaHCO}_3$ , po nekaj minutah:
- $\text{NaHCO}_3$ , po 1-2 urah:

5. Nevtralizacijsko kapaciteto smo določili dvema antacidoma, ki sta bila vgrajena v tableti. V tableti A je bilo 0,5g  $\text{NaHCO}_3$ , ki se je sproščal iz tablete s konstantno hitrostjo 2mmol/min, v tableti B pa 0,5g  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , ki se je sproščal s konstantno hitrostjo 0,1mmol/min. Izračunaj nevtralizacijski kapaciteti tablet A in B, glede na, v navodilu predpisano minimalno dozirano količino zdravila (v obeh primerih je to ena tableta), ki smo ju določili po postopku po USP 23! (atomske mase: Na=23, Mg=24,3; čas stika antacida s HCl pred začetkom titracije je 15 minut)

## NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

1. S preliminarnim testom za določanje nevtralizacijske kapacitete antacidov (USP XXIII, predpis <1001>) ugotovite, če je dobljeno zdravilo antacid in za zdravila, ki so antacidi določite njihovo nevtralizacijsko kapaciteto po istem predpisu.

Testirana zdravila:

- Acimol, tablete
- Acimol, suspenzija
- Duobloc, žvečilne tablete
- Gelusil Lac, tablete
- Gelusil Lac, praški
- Gastal, tablete
- Gastal, suspenzija
- Kompensan, tablete
- Rupurut, suspenzija
- Rupurut, tablete
- Venter, tablete
- Venter, granule
- natrijev hidrogenkarbonat, prašek

2. Preučite dobljene rezultate za vsa zdravila glede na njihovo kemično sestavo, dozo in indikacijsko področje.

1995

USP 23

NF 18

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA

THE NATIONAL FORMULARY

*By authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc., meeting at Washington, D.C., March 8-10, 1990. Prepared by the Committee of Revision and published by the Board of Trustees*

*Official from January 1, 1995*



UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC.  
12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852

# General Chapters

## General Information

The chapters in this section are informational, and, aside from excerpts given herein from federal Acts and regulations that may be applicable, they contain no standards, tests, or assays, nor other mandatory specifications, with respect to any Pharmacopeial article. The excerpts from pertinent federal Acts and regulations included in this section are placed here inasmuch as they are not of Pharmacopeial authorship. Revisions of the federal requirements that affect these excerpts will be included in *USP Supplements* as promptly as practicable. The official requirements for Pharmacopeial articles are set forth in the *General Notices*, the individual monographs, and the *General Tests and Assays* Chapters of this *Pharmacopeia*.

### (1001) ANTACID EFFECTIVENESS

Presented here are the tablet disintegration test and the acid-neutralizing capacity test, as prescribed in the *Code of Federal Regulations*, that are part of the federal Food and Drug Administration requirements for assuring that over-the-counter (OTC) antacid preparations shall be generally recognized as safe and effective and that they shall not be misbranded. These tests are general in nature, and while it is obligatory that OTC antacid products comply with these requirements for safety and efficacy, for purposes of determining the strength, quality, and purity of official antacids, the Pharmacopeial standards and tests set forth in the individual monographs are determinative.

#### § 331.23 Temperature standardization.

All tests shall be conducted at  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$ , or  $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$ .

#### § 331.24 Tablet disintegration test.

A tablet disintegration test shall be performed on tablets that are not to be chewed following the procedures described in the *United States Pharmacopeia XVIII* (page 932). If the label states the tablet may be swallowed, it must disintegrate within a 10-minute time limit pursuant to the test procedure using simulated gastric fluid test solution without enzymes, the *United States Pharmacopeia XVIII* page 1026, rather than water as the immersion fluid.

#### § 331.25 Preliminary antacid test.

(a) *pH meter*. Standardize the pH meter at pH 4.0 with the standardizing buffer and check for proper operation at pH 1 with 0.1 *N* HCl.

(b) *Dosage form testing*—(1) *Liquid sample*. Place an accurately weighed (calculate density) and well mixed amount of the antacid product equivalent to the minimum labeled dosage; e.g., 5 mL, into a 100-mL beaker. Add sufficient water to obtain a total volume of about 40 mL and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.25.

(2) *Chewable and nonchewable tablet sample*. Place an accurately weighed amount of a tablet composite equivalent to the minimum labeled dosage into a 100-mL beaker. (The composite

shall be prepared by determining the average weight of not less than 20 tablets and then comminuting the tablets sufficiently to pass through a number 20 U.S. standard mesh sieve and held by a number 100 U.S. standard mesh sieve.) Mix the sieved material to obtain a uniform sample. If wetting is desired, add not more than 5 mL of 95 percent ethanol and mix to wet the sample thoroughly (ethanol may effect the acid neutralizing capacity). Add water to a volume of 40 mL and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. (Capsules should be tested in the same manner using the sieved capsule powder as the sample.) Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.25.

(3) *Effervescent sample*. Place an amount equivalent to the minimum labeled dosage into a 100-mL beaker. Add 10 mL water and swirl the beaker gently while allowing the reaction to subside. Add another 10 mL of water and swirl the beaker gently. Wash down the walls of the beaker with 20 mL of water and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.25.

(4) *Chewing gum samples with antacid in coating*. Place the number of pieces of gum equivalent to the minimum labeled dosage in a 100-mL beaker. Add 40 mL of water and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 2 to 3 minutes. Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.25.

(c) *Test procedure*—(1) Add 10.0 mL of 0.5 *N* HCl to the test solution while stirring on the magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m.

(2) Stir for exactly 10 minutes after addition of acid.

(3) Read and record pH.

(4) If pH is below 3.5, the product shall not be labeled as an antacid. If the pH is 3.5 or greater, determine the acid neutralizing capacity according to the procedure set forth in § 331.26.

#### § 331.26 Acid neutralizing capacity test.

(a) *pH meter*. Standardize the pH meter at a pH of 4.0 with the standardizing buffer and check for proper operation at pH 1 with 0.1 *N* HCl.

(b) *Dosage form testing*—(1) *Liquid sample*. Place an accurately weighed (calculate density) and well mixed amount of product equivalent to the minimum labeled dosage (e.g., 5 mL, etc.) into a 250 mL beaker. Add sufficient water to obtain a total volume of about 70 mL and mix on the magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.26.

(2) *Chewable and nonchewable tablet sample*. Place an accurately weighed amount of a tablet composite equivalent to the minimum labeled dosage into a 250 mL beaker. (The composite shall be prepared by determining the average weight of not less than 20 tablets and then comminuting the tablets sufficiently to pass through a number 20 U.S. standard mesh sieve and held by a number 100 U.S. standard mesh sieve. Mix the sieved material

NOTE—Volume 21, part 331, of the *Code of Federal Regulations*, revised as of April 1, 1978, covers regulations pertaining to antacid products for over-the-counter (OTC) human use.

1845

to obtain a uniform sample.) If wetting is desired, add not more than 5 mL of 95 percent ethanol and mix to wet the sample thoroughly (ethanol may effect the acid neutralizing capacity). Add water to a volume of 70 mL and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. (Capsules should be tested in the same manner using the sieved capsule powder as the sample.) Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.26.

(3) *Effervescent sample.* Place an amount equivalent to the minimum labeled dosage into a 250 mL beaker. Add 10 mL water and swirl the beaker gently while allowing the reaction to subside. Add another 10 mL of water and swirl the beaker gently. Wash down the walls of the beaker with 50 mL of water and mix on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m. for about 1 minute. Analyze the sample according to the procedure set forth in § 331.26.

(4) *Sample and test procedure for chewing gum with anti-acid in coating.* Assay six pieces of gum individually in the following manner.

(i) Place one piece of gum in a 250-mL beaker and add 50 mL of water.

(ii) Pipette in 30.0 mL of 1.0 *N* HCl and stir on magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m.

(iii) Stir for exactly 10 minutes after addition of acid.

(iv) Stop the stirrer and remove the gum using a long needle or similar utensil.

(v) Rinse the long needle or utensil and the gum with 20 mL of water into the sample beaker.

(vi) Stir for exactly 5 additional minutes.

(vii) Begin titrating immediately and in a period of time not to exceed 5 minutes titrate the excess 1.0 *N* HCl with 0.5 *N* NaOH to stable pH of 3.5.

(viii) Check sample solution 10 to 15 seconds after obtaining a pH of 3.5 to determine that the pH is stable.

(ix) Average the results of the six individual assays and calculate the total mEq based on the minimum labeled dosage as follows:

$$\text{mEq/piece of gum} = (30.0 \text{ mL})(\text{normality of HCl}) - (\text{mL of NaOH})(\text{normality of NaOH}).$$

Total mEq per labeled minimum dose = (number of pieces of gum in minimum dosage)  $\times$  (mEq/piece of gum).

(c) *Acid neutralizing capacity test procedure (except chewing gum)*—(1) Pipette 30.0 mL of 1.0 *N* HCl into the sample solution while stirring on the magnetic stirrer at  $300 \pm 30$  r.p.m.

(2) Stir for exactly 15 minutes after addition of acid.

(3) Begin titrating immediately and in a period not to exceed an additional 5 minutes titrate the excess 1.0 *N* HCl with 0.5 *N* NaOH to stable pH of 3.5.

(4) Check the sample solution 10 to 15 seconds after obtaining a pH of 3.5 to make sure the pH is stable.

(5) Calculate the number of mEq of acid neutralized by the sample as follows:

$$\text{Total mEq} = (30.0 \text{ mL})(\text{normality of HCl}) - (\text{mL of NaOH})(N \text{ of NaOH}).$$

Use appropriate factors, i.e., density, average tablet weight, etc., to calculate the total mEq of acid neutralized per minimum labeled dosage.

extract to remove any dispersed water. Determine the absorbances of the cyclohexane extracts of the *Test Solution* and the *Standard Solution* in a 1-cm cell at the wavelength of maximum absorbance at about 380 nm, with a suitable spectrophotometer, using the cyclohexane extract of the reagent blank as the blank, and compare the absorbances: the absorbance of the *Test Solution* is not greater than that of the *Standard Solution* where a 200-mg test specimen has been taken, or is not greater than one-half that of the *Standard Solution* where a 100-mg test specimen has been taken.

## OTHER TESTS AND ASSAYS

### (301) ACID-NEUTRALIZING CAPACITY

**NOTE**—All tests shall be conducted at a temperature of  $37 \pm 3^\circ$ .  
**Standardization of pH Meter**—Standardize a pH meter using the 0.05 *m* potassium biphthalate and 0.05 *m* potassium tetraoxalate standardizing buffers as described under *pH* (791).

**Magnetic Stirrer**—Transfer 100 mL of water to a 250-mL beaker containing a 40- × 10-mm magnetic stirring bar that is coated with solid perfluorocarbon and has a spin ring at its center. Adjust the power setting of the magnetic stirrer to produce a stirring rate of  $300 \pm 30$  rpm when the stirring bar is centered in the beaker, as determined by a suitable optical tachometer.

#### Test Preparation—

**Powders**—Transfer the accurately weighed portion of the substance specified in the individual monograph to a 250-mL beaker, add 70 mL of water, and mix on the *Magnetic Stirrer* for 1 minute.

**Effervescent Solids**—Transfer an accurately weighed quantity, equivalent to the minimum labeled dosage, to a 250-mL beaker, add 10 mL of water, and swirl the beaker gently while allowing the reaction to subside. Add another 10 mL of water, and swirl gently. Wash the walls of the beaker with 50 mL of water, and mix on the *Magnetic Stirrer* for 1 minute.

**Suspensions and Other Liquids**—Shake the container until the contents are uniform, and determine the density. Transfer an accurately weighed quantity of the uniform mixture, equivalent to the minimum labeled dosage, to a 250-mL beaker, add water to make a total volume of about 70 mL, and mix on the *Magnetic Stirrer* for 1 minute.

**Lozenges**—Accurately weigh not less than 20 lozenges, and determine the average weight. Select and weigh 2 lozenges, and transfer them to a 250-mL beaker containing 70 mL of water.

**Nonchewable Tablets**—Weigh not less than 20 tablets, and determine the average tablet weight. Grind the tablets to a fine powder, mix to obtain a uniform mixture, and transfer an accurately weighed quantity of it, equivalent to the minimum labeled dosage, to a 250-mL beaker. If wetting is desired, add not more than 5 mL of alcohol (neutralized to an apparent pH of 3.5), and mix to wet the specimen thoroughly. Add 70 mL of water, and mix on the *Magnetic Stirrer* for 1 minute.

**Chewable Tablets**—Prepare as directed for *Nonchewable Tablets*.

**Tablets That Are Required To Be Chewed**—Transfer 1 Tablet to a 250-mL beaker, add 50 mL of water, and mix on the *Magnetic Stirrer* for 1 minute.

**Capsules**—Weigh accurately not less than 20 capsules. Remove the capsule contents completely, with the aid of a cotton swab if necessary. Accurately weigh the empty capsules, and determine the average weight of the contents per capsule. Mix the combined capsule contents to obtain a uniform mixture, and proceed as directed for *Nonchewable Tablets*, beginning with "transfer an accurately weighed quantity of it."

**Procedure for Powders, Effervescent Solids, Suspensions and Other Liquids, Lozenges, Nonchewable Tablets, Chewable Tablets, and Capsules**—Pipet 30.0 mL of 1.0 *N* hydrochloric acid VS into the *Test Preparation* while continuing to stir with the *Magnetic Stirrer*. [NOTE—Where the acid-neutralizing capacity of the specimen under test is greater than 25 mEq, use 60.0 mL of 1.0 *N* hydrochloric acid VS.] Stir for 15 minutes, accurately timed, after the addition of the acid, begin to titrate immediately, and in a period not to exceed an additional 5 minutes, titrate the excess hydrochloric acid with 0.5 *N* sodium hydroxide VS to attain a stable (for 10 to 15 seconds) pH of 3.5. Calculate the number of mEq of acid consumed, and express the result in terms of mEq of acid consumed per g of the substance tested. Each mL of 1.0 *N* hydrochloric acid is equal to 1 mEq of acid consumed.

**Procedure for Tablets That Are Required To Be Chewed**—Pipet 30.0 mL of 1.0 *N* hydrochloric acid VS into the *Test Preparation* while continuing to stir with the *Magnetic Stirrer* for 10 minutes, accurately timed, after the addition of the acid. Discontinue stirring briefly, and without delay remove any gum base from the beaker using a long needle. Promptly rinse the needle with 20 mL of water, collecting the washing in the beaker, and resume stirring for 5 minutes, accurately timed, then begin to titrate immediately, and in a period not to exceed an additional 5 minutes, titrate the excess hydrochloric acid with 0.5 *N* sodium hydroxide VS to attain a stable (for 10 to 15 seconds) pH of 3.5. Calculate the number of mEq of acid consumed by the Tablet tested. Each mL of 1.0 *N* hydrochloric acid is equal to 1 mEq of acid consumed.

### (311) ALGINATES ASSAY

In a suitable closed system, liberate the carbon dioxide from the uronic acid groups of about 250 mg of the test specimen by heating with about 6 *N* hydrochloric acid, and sweep the carbon dioxide by means of an inert gas into a titration vessel containing 25.0 mL of 0.25 *N* sodium hydroxide VS. Add 10 mL of barium chloride solution (1 in 10) to the titration vessel, insert a tight stopper, and shake the flask gently for 1 to 2 minutes. Allow to stand for at least 5 minutes. Add 3 drops of phenolphthalein TS, and titrate with 0.1 *N* hydrochloric acid VS to the first loss of a pink endpoint. Perform a blank determination (see *Residual Titrations under Titrimetry* (541)). Each mL of 0.25 *N* sodium hydroxide consumed is equivalent to 5.5 mg of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>).

In a suitable system, precautions must be taken against leakage and overheating of the reaction mixture, and there should be adequate sweeping time and avoidance of entrainment of hydrochloric acid. The system is not considered to be suitable unless a 250-mg test specimen of D-glucuronolactone, accurately weighed, results in a net titration value between 11.0 and 11.7 mL of 0.25 *N* sodium hydroxide. One suitable system, with accompanying procedure, is given below.

**Apparatus**—The apparatus shown in the accompanying diagram consists essentially of a soda lime column, *A*, a mercury valve, *B*, connected through a side arm to a reaction flask, *D*, by means of a rubber connection, *C*. Flask *D* is a 100-mL round-bottom, long-neck boiling flask, resting in a suitable heating mantle, *E*.

The reaction flask is provided with a reflux condenser, *F*, to which is fitted a delivery tube, *G*, of 40-mL capacity, having a stopcock, *H*. The reflux condenser terminates in a trap, *I*, containing 25 g of 20-mesh zinc or tin, which can be connected with an absorption tower, *J*.

The absorption tower consists of a 45-cm tube fitted with a medium-porosity, sintered-glass disk sealed to the inner part above the side arm and having a delivery tube sealed to it extending down to the end of the tube. A trap, consisting of a bulb of approximately 100-mL capacity, is blown above the sintered-glass disk, and the outer portion of a ground spherical joint is sealed on above the bulb. A 250-mL conical flask, *K*, is connected to the bottom of the absorption tower. The top of the tower is connected to a soda lime tower, *L*, which is connected to a suitable pump to provide vacuum and air supply, the selection of which is made by a three-way stopcock, *M*. The volume of air or vacuum is controlled by a capillary-tube regulator or needle valve, *N*.

All joints are size <sup>3</sup>/<sub>16</sub> . ground spherical type.



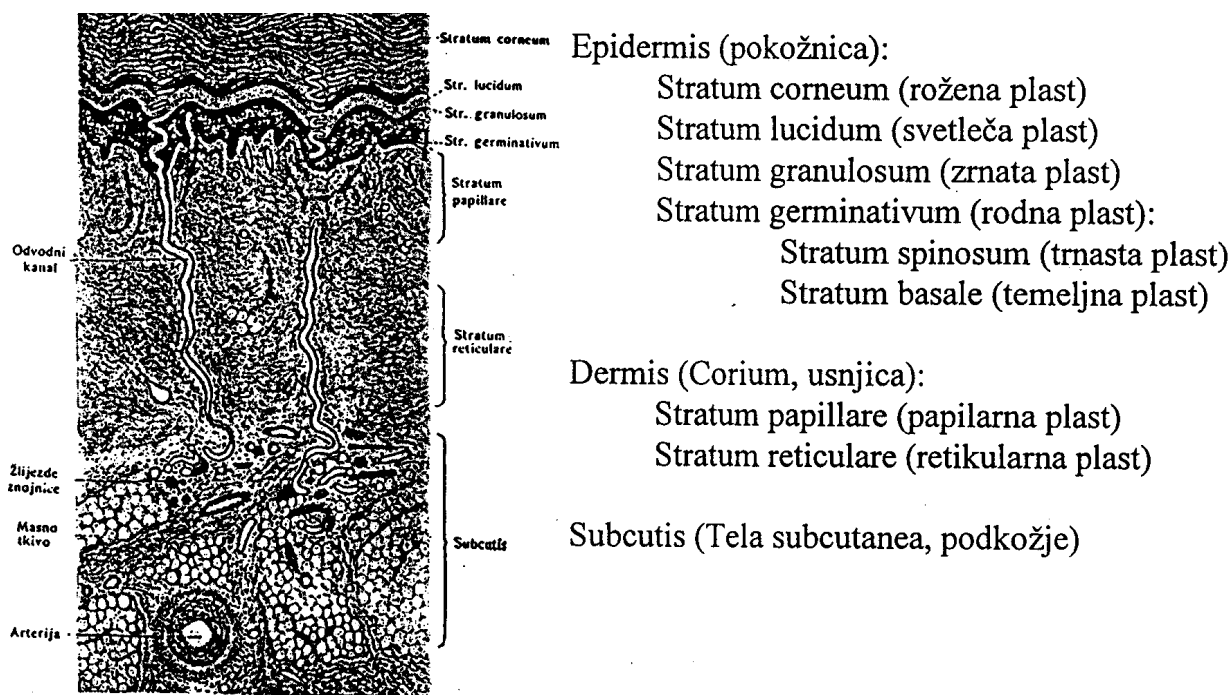
## 4. vaja: DIFUZIJA IZ POLTRDNIH DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIK

**1) Poltrdne dermalne farmacevtske oblike:** Tvorijo jih enostavne ali sestavljene podlage, v katerih je raztopljena ali dispergirana ena ali več zdravilnih učinkovin. Razlikujemo več vrst poltrdnih dermalnih farmacevtskih oblik:

- mazila
- kreme
- gele
- paste

Vse so namenjene nanašanju na kožo ali na določene površine sluznice in lahko delujejo lokalno ali sistemsko. Terapevtska učinkovitost poltrdnih dermalnih farmacevtskih oblik je lahko ob isti učinkovini, vgrajeni v različne podlage, različna. Izbira optimalne podlage je odvisna od fizikalno-kemičnih lastnosti učinkovine in vehikla kot tudi od stanja in vrste kože, na katero bomo dermalno zdravilo aplicirali.

**2) Zgradba kože** (lat. cutis, gr. derma)



**3) Perkutana absorpcija:** Definirana je kot penetracija učinkovine s površine kože v kožo ali skozi kožo v krvni obtok. Pomembni faktorji tega procesa so mehanizem in hitrost prodiranja učinkovine v kožo in porazdelitev učinkovine neposredno po perkutani absorpciji. Ločimo dva glavna načina prehoda učinkovin v kožo in skozi njo:

- *transepidermalni*, ki poteka skozi celotno epidermo,
- *transfolikularni*, ki poteka v glavnem skozi žleze lojnice.

a) Transepidermalna absorpcija: Površina epiderme je 10 do 100-krat večja od površine kožnih žlez. Na njeni površini nastaja tanek film, ki je sestavljen iz sebuma, znoja in odluščenih poroženelih celic. Ker je ta film po sestavi in debelini neenakomeren, največkrat ne predstavlja ovire prodirajoči učinkovini.

Zaroženela plast je debela 20-40 µm. Njena glavna sestavina je keratin, beljakovina s sulfhidrilnimi skupinami, ki adsorbira velike količine vode. V tej plasti so tudi površinski lipidi, ki so razporejeni v prostorih med celicami. Ta plast deluje kot rezervoar za učinkovino in vzdržuje njen maksimalni koncentracijski gradient tik nad kožno bariero in s tem zavira prehod oziroma absorpcijo.

Območje kožne bariere se nahaja med zaroženelo in znato plastjo. To je elektronegativno nabita plast, ki odbija anione in privlači katione. Debela je 10 µm in ovira prehod molekul z molekulsko maso večjo od 200-300. Najhitreje prehajajo učinkovine s porazdelitvenim koeficientom  $k_{o/v}=1$ , kar pomeni, da ima bariera tako lipofilne kot hidrofilne lastnosti. Molekul, ki prehajajo bariero ni veliko. Na njihovi nadaljnji poti se vežejo na generativno plast epiderme ali pa jih tkivna tekočina odplavi v limfne in krvne žile. V splošnem velja, da hitrost penetracije učinkovin raste v naslednjem zaporedju:

$$\text{hidrofilne} < \text{lipofilne} < \text{amfifilne}$$

b) Transfolikularna absorpcija: Poteka skozi tako imenovane kožne adnekse, pretežno skozi žleze lojnice. Pri tem je odločilna topnost učinkovine v sebumu. Skozi sebum prodre učinkovina do lojne žleze, katere membrana je bolj prepustna od kožne bariere.

#### 4) Faktorji, ki vplivajo na perkutano absorpcijo:

##### - Stanje kože

Zgoraj našteje ugotovitve veljajo za zdravo, nepoškodovano kožo. Prepustnost poškodovane kože (travme, mehurji, ekcemi) je v splošnem zvečana. Kožna bariera je lahko poškodovana ali uničena in substance prosto prehajajo v usnjico. Na drugi strani pa je perkutana absorpcija močno zmanjšana v starosti, predvsem zaradi atrofičnih sprememb kožnih adneksov.

##### - Permeabilnostni koeficient učinkovine

Permeabilnostni koeficient je lahko podan s spodnjo enačbo:

$$P_{eff} = \frac{D \cdot P}{x}$$

P ... porazdelitveni koeficient učinkovine med kožno bariero in vehiklom

D ... povprečni difuzijski koeficient učinkovine v barieri

x ... difuzna razdalja (efektivna debelina kožne bariere)

Difuzivnost substanc s podobno molekulsko maso in velikostjo se ne spreminja močno. Nasprotno pa je porazdelitveni koeficient občutljiva in kompleksna funkcija molekularne strukture in velikosti molekule. Učinkovina dobro prodira v kožo, če je porazdelitveni koeficient koža/vehikel velik. Na drugi strani pa učinkovina ne more zapustiti kože, če je porazdelitveni koeficient koža/receptorska tekočina velik. Zaradi tega so najbolj zaželene učinkovine s porazdelitvenim koeficientom  $\approx 1$ .

#### - Vpliv vlage

Voda je v veliki meri adsorbirana na kožne beljakovine in njihove razgradne produkte. Prisotnosti vlage vpliva na prepustnost posameznih plasti kože. Vpliv vlage je še posebno pomemben za učinkovine, ki so pretežno hidrofilne. Znano je, da nekateri živčni bojni strupi hitreje penetrirajo skozi vlažno kot skozi suho kožo. Posebno važna je hidratacija zaroženele plasti, pri čemer pride do razširitve por. Brezvodne maščobne podlage so najbolj okluzivne in inducirajo največjo hidratacijo kože zaradi akumulacije znoja na površini med kožo in dermalno obliko. V/O emulzije so manj okluzivne, O/V emulzije pa ponavadi invertirajo zaradi izhlapevanja vode, pri čemer se ustvari zvezni oljni film, ki vsebuje raztopljeno učinkovino. Pri vodotopnih vehiklih izhlapevanje vode iz podlage vpliva na hidratacijo zaroženele plasti le v manjši meri. Suspendirani delci v pudrih ali pastah zmanjšajo efekt oljnega filma in s tem okluzivnost vehikla. Nekatere poltrdne dermalne farmacevtske oblike pri aplikaciji prekrijemo s povoji, s tem zadržimo perspiracijo in povečamo hidratacijo. Do neke mere vpliva na hidratacijo kože tudi debelina nanešenega sloja pripravka.

#### - Vpliv podlage

Glavna naloga podlage je omogočiti čim boljši stik med učinkovino in kožo. Najbolje se absorbirajo učinkovine iz vehiklov, ki se dobro razmažejo in se mešajo s sebumom. Vehikel sam ni sposoben zagotoviti absorpcije učinkovin, ki se slabo absorbirajo, lahko pa na drugi strani vpliva na absorpcijo učinkovin, ki se dobro absorbirajo. Bistvene so permeabilnostne lastnosti učinkovine v vehiklu in kožni barieri ter hidratacija kože.

Splošnih zakonitosti, ki bi veljale za razvrstitev posameznih podlag v korelaciji z absorpcijo učinkovin, je malo. Ugotovitve v literaturi so vezane na različne učinkovine in eksperimentalne metode, ki so bile uporabljene v posameznih primerih.

#### - Vpliv površinsko aktivnih snovi

Te snovi emulgirajo sebum in zvečajo perkutano absorpcijo. Holesterol, primešan podlagi, poveča absorpcijo, medtem ko apliciran na kožo pred aplikacijo pripravka zmanjša njeno prepustnost za učinkovino. Zelo pomembna je pravilna izbira površinsko aktivne snovi, saj lahko pride do inkompatibilnosti, npr. kompleksacije učinkovine. Izkazalo se je, da neionski emulgatorji najbolje pospešujejo perkutano absorpcijo.

#### - Vpliv koncentracije učinkovine

Za suspenzijske poltrdne dermalne oblike velja:

$$dq/dt = (A \cdot D \cdot C_s / 2t)^{1/2}$$

A ... koncentracija učinkovine

D ... difuzijska konstanta učinkovine v zunanji fazi pripravka

C<sub>s</sub>... topnost učinkovine v zunanji fazi pripravka

t ... pretečen čas

#### - Vpliv pH

Hitrost absorpcije učinkovin, ki so šibke kisline ali baze, je močno odvisna od pH vehikla. Aktivnostni koeficient molekularne oblike učinkovine je funkcija pH pri vrednostih pH > pK<sub>a</sub> za kisline in pri vrednostih pH < pK<sub>w</sub> - pK<sub>b</sub> za baze.

- Ostali faktorji

Med ostale faktorje štejemo način absorpcije, površino kože, na katero apliciramo poltrdno dermalno farmacevtsko obliko, čas kontakta med pripravkom in kožo, pogostnost aplikacije, temperaturo kože...

## 5) Metode določevanja perkutane absorpcije

Te metode v splošnem delimo na 'in vitro' in 'in vivo' metode. 'In vitro' metode so primerne predvsem za določanje sproščanja učinkovine iz podlage, ne moremo pa iz njihovih rezultatov napovedati hitrosti in obsega perkutane absorpcije.

- Penetracija v modele

Ta pojem obsega različne 'in vitro' metode, ki jih uporabljamo v primerjalnih študijah sproščanja. Najpogostejši sistem je agar gel, katerega zvezna faza je voda in predstavlja zato v primerjavi s kožo dokaj enostavno strukturo. Med sistemi najdemo še membrane iz celuloznega filtra in ovčjega mehurja in tudi te so le grob približek kompleksnemu in dinamičnemu sistemu - koži.

- Histološke študije

Pri teh perkutano absorpcijo vrednotimo z opazovanjem histoloških rezov kožnega tkiva. Opazuje se določen efekt, npr. keratoliza ali obarvanje tkiva.

- Uporaba označevalcev

V ta namen se uporabljajo različna barvila, fluorescentne snovi in izotopi. Pogoj za njihovo uporabo je, da prodirajo skupaj z učinkovino, ker sicer pride do napak. Pri uporabi radioaktivnih označevalcev je ta bojazen odveč, saj lahko vključimo radioaktivni atom (tricij ali radioaktivni jod) v molekulo učinkovine. Detekcija je možna na več načinov: direktno štetje na površini kože, avtoradiografija (histološki rezi osvetljujejo fotografski film) in meritev radioizotopa v tkivih in telesnih tekočinah.

- Merjenje fizioloških učinkov

Hitrost in obseg perkutane absorpcije vrednotimo s hitrostjo nastopa in intenzivnostjo farmakološkega učinka. Meri se npr. dvig krvnega pritiska, vazodilatacija, nastop anestezije, znižanje praga bolečine, smrt...

- Analiza tkiv

S primerno analitsko metodo določujemo koncentracijo oz. količino učinkovine v koži, krvi, urinu, posameznih organih. Poznati moramo farmakokinetične parametre učinkovine.

- Izgubljanje učinkovine z mesta aplikacije

Pri tem iščemo razliko med aplicirano dozo in trenutno količino učinkovine na mestu aplikacije. Pogosto je težko kvantitativno odstraniti učinkovino s površine kože.

Med pretežno lipofilnimi spojinami je perkutana absorpcija dokazana za benzokain, sulfanilamid, salicilno kislino, morfin, pilokarpin, fenol, sarin, med pretežno hidrofilnimi pa za tiaminijev klorid, vitamin C, soli alkaloidov, penicilin G-kalijeva sol, natrijev salicilat itd. Posebno veliko študij perkutane absorpcije je opravljenih na področju vitaminov, kortikosteroidov in spolnih hormonov.

## NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

### Naloga:

Določi hitrost sproščanja borne kisline iz naslednjih podlag, pripravljenih po Ph.Jug.IV:

1. Excipiens ad unguenta
2. Excipiens ad unguenta antibiotica
3. Excipiens ad oculenta
4. Excipiens emulsificans
5. Excipiens emulsificans aquosum
6. Excipiens lanacoli
7. Excipiens lanacoli aquosum
8. Excipiens macrogoli
9. Glyceroli unguentum

### Izvedba:

Pripravimo gel (I) in raztopino (II).

I: Agar	10 g	II: 0.1 M NaOH	30 ml
Glicerol	10 g	2% fenolftalein	9 ml
Aq. purif.	900 ml	Aq. purif.	ad 100 ml

Ob segrevanju raztopimo agar v vodi in glicerolu ter dodamo raztopino II. Raztopljeno maso vlijemo v petrijevke v višini 5 mm in pustimo, da se ohladi. S plutovrtom premera 16 mm izvrtamo luknjo na sredini agarnege gela. Na dno luknje nakapamo 3 kaplje stopljenega agarja, da preprečimo prodiranje učinkovine izpod podlage. Tako pripravljeno petrijevko stehtamo. Nato 9 g podlage dodamo 1 g borne kisline in temeljito homogeniziramo. S to poltrdno dermalno obliko previdno napolnimo luknjo v agarni podlagi, tako da je nivo dermalne oblike enak nivoju agarja. Petrijevko ponovno stehtamo in tako določimo maso mazilne podlage, ki je v izvrtini. V času ene ure vsakih deset minut merimo premer nevtralizacijske cone. Premer izmerimo v treh pravokotnih smereh in širino nevtralizacijske cone izračunamo po formuli:

$$y = \frac{\sum D - n \cdot d}{2 \cdot n}$$

y ..... širina nevtralizacijske cone  
D..... zunanji premer cone vključno s premerom izvrtine  
 $\sum D$  ... vsota vseh meritev v času t  
d ..... premer izvrtine  
n ..... število meritev v času t

Rezultate cele skupine zberemo in jih v dnevniku prikažemo tako tabelarično kot tudi grafično.

Za svojo mazilno podlago izračunamo še mole borne kisline, ki so se sprostile v agarni gel v merjenih časih. Pri tem predpostavimo popolno nevtralizacijo borne kisline in NaOH. Rezultate predstavimo grafično.

S pomočjo spodnje enačbe izračunamo za svojo podlago vsaj tri permeabilnostne koeficiente in njihovo povprečno vrednost.

$$P_{eff} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot c_0}$$

$P_{eff}$  .....permeabilnostni koeficient

$dQ/dt$  ....hitrost prehoda učinkovine v agarji gel

$A$  .....površina agarja, ki je v stiku s poltrdno dermalno obliko

$c_0$  ..... začetna koncentracija učinkovine

### RAČUNSKA NALOGA

Premer izvrtine v agarjem gelu, kamor naneseemo mazilo je 10 mm. Koncentracija NaOH v agarjem gelu je 0,5 mol/L. Debelina gela je 10 mm. Ko napolnimo mazilo v izvrtino, sta nivoja mazila in agarnega gela enaka. Z mazilom smo v izvrtino vnesli 7,85 mmol borne kisline. Kakšen % ZU se sprosti iz mazila v času neskončno?

## 5. vaja: VEZAVA NA ALBUMINE

### PLAZEMSKI PROTEINI

	ALBUMINI	$\alpha_1$ – KISLI GLIKOPROTEIN	LIPOPROTEINI
ZMANJŠANJE KONC.	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Starost</li><li>♦ Opekline</li><li>♦ Ciroza jeter</li><li>♦ GI bolezni</li><li>♦ Nosečnost</li><li>♦ Operacije</li><li>♦ Renalne motnje</li><li>♦ Bakterijska pljučnica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Nefrotski sindrom</li><li>♦ Oralni kontraceptivi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Hipertiroidizem</li><li>♦ Poškodbe</li></ul>
POVEČANJE KONC.	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Benigni tumorji</li><li>♦ Naporni treningi</li><li>♦ Hipotiroidizem</li><li>♦ Nevroze</li><li>♦ Psihoze</li><li>♦ Shizofrenija</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Staranje</li><li>♦ Poškodbe</li><li>♦ Miokardni infarkt</li><li>♦ Renalne motnje</li><li>♦ Revmatoidni artritis</li><li>♦ Stres</li><li>♦ Operacije</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>♦ Diabetes</li><li>♦ Hipotiroidizem</li><li>♦ Nefrotski sindrom</li></ul>

### RAVNOTEŽNA DIALIZA

Ravnotežna dializa je poleg ultrafiltracije, ultracentrifugiranja in gelske filtracije primerna metoda ločevanja prostega in na makromolekule vezanega liganda. Pogosto se uporablja za določevanje stopnje vezave učinkovin na plazemske proteine.

Dializa poteka v celici, ki jo na dva dela enakih volumnov razmejuje polprepustna membrana. V enem od prostorov se nahaja plazma z učinkovino, v drugem pa pufer. Separacija proste in vezane učinkovine temelji na difuziji proste učinkovine iz plazme preko polprepustne membrane v pufer. Prehod kompleksov plazemski protein-  
učinkovina je onemogočen zaradi velikosti membranskih por (cut-off membrane je manjši od molekulske mase plazemskih proteinov). Prosta učinkovina prehaja membrano do vzpostavitve ravnotežja, ko se koncentracija učinkovine v pufru izenači s koncentracijo proste učinkovine v plazmi.

Z določitvijo pufrske in plazemske koncentracije učinkovine se lahko izračunajo parametri vezave učinkovine na plazemske proteine (asociacijska konstanta, odstotek vezane učinkovine, stopnja vezave, število vezavnih mest, število razredov vezave).

Na hitrost vzpostavitve ravnotežja pri ravnotežni dializi vplivajo temperatura, vrsta membrane in mešanje. Dializa običajno poteka pri telesni temperaturi. Čas dialize je potrebno določiti eksperimentalno.

Določitev proste frakcije učinkovine je lahko netočna zaradi:

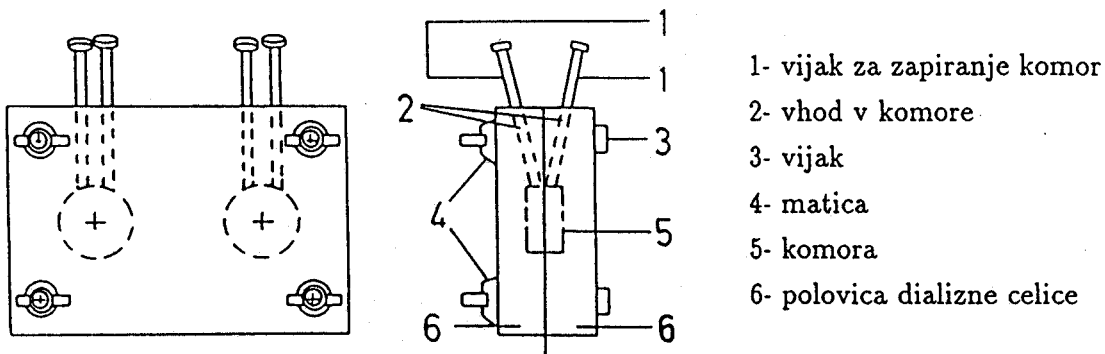
- vpliva pH: pH se zviša zaradi izgube CO<sub>2</sub> iz plazme pred dializo ali med njo. Sprememba pH je pomembna pri učinkovinah, katerih vezava je odvisna od pH.
- volumskega premika: volumski premik pomeni povečanje volumna plazme zaradi difuzije vode iz pufru v plazmo, ki je posledica večjega osmotskega tlaka plazme. Zmanjša se koncentracija plazemskih proteinov, zato se spremenita stopnja vezave in kapaciteta vezanja, medtem ko vpliva na asociacijsko konstanto ni. Osmotski gradient zmanjšamo z uporabo izotoničnih pufrskih raztopin in z vključevanjem polimerov v pufer (npr. dekstran).
- Donnanovega efekta: naboj plazemskih proteinov in učinkovine lahko povzroči različno koncentracijo proste učinkovine na obeh straneh membrane. Razlika v naboju se lahko zmanjša z uporabo pufru z dovolj veliko kapaciteto ali z dodatkom nevtralnih soli ustrezne koncentracije.
- nelinearne vezave učinkovine na plazemske proteine: v ravnotežju je plazemska koncentracija učinkovine nižja kot na začetku dialize (razlika je odvisna od odstotka vezave), zato velja dobljeni odstotek vezave za končno plazemsko koncentracijo. Pri učinkovinah, katerih vezava je v danem koncentracijskem območju odvisna od koncentracije učinkovine, je potrebnih več eksperimentov, da lahko določimo odstotek vezave pri začetni koncentraciji. Za večino učinkovin je v območju terapevtskih koncentracij vezava na plazemske proteine linearna (neodvisna od koncentracije).
- vezave učinkovine na dializno celico in membrano
- časa dialize: pri nestabilnih učinkovinah

## NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

### **Izvedba:**

Membrano vstavimo med plošči dializne celice, ki ju privijemo skupaj (slika 1). Vdolbine na eni strani membrane napolnimo s pomočjo injekcijske brizge (po 1 mL) z izotoničnim fosfatnim pufrom (pH=7.4). Na drugi strani membrane napolnimo eno vdolbino z raztopino albuminov (slepi vzorec), ostale štiri vdolbine pa z raztopino piroksikama v raztopini albuminov. V vseh štirih vdolbinah celice morajo biti iste koncentracije učinkovine. Odprtine zamašimo z vijaki. Dializa poteka 4 ure pri 37°C ob občasnem mešanju.





Slika 1: Dializna celica

Uporabili bomo štiri različne začetne koncentracije piroksikama v raztopini albuminov.

Po končani dializi odvezamemo pufrske dializate učinkovine. Dializate iste koncentracije združimo v centrifugirki, prav tako slepe dializate. Vsebino premešamo na ekscentričnem stresalniku. Pufrskim raztopinam na UV-spektrofotometru izmerimo absorbanco glede na slepi dializat. Merimo pri valovni dolžini 354 nm.

**Izračuni:**

Meritve vseh skupin združimo in izračune podamo v tabeli:

Ctot (mg/L)	Ctot (mol/L)	A	Cf (mol/L)	Cpl (mol/L)	Cb (mol/L)	% vezave	v	v / Cf

A.....absorbanca

Ctot.....totalna (začetna) konc. učinkovine v raztopini albuminov

Cf.....koncentracija nevezane učinkovine v pufru v stanju ravnotežja

Cb.....koncentracija vezane učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja

Cpl..... celokupna koncentracija učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja (plazemska koncentracija učinkovine)

$$Cpl = Ctot - Cf$$

$$Cb = Ctot - 2 \cdot Cf$$

$$\% \text{ vezave} = Cb / Cpl \cdot 100$$

$$v = Cb / Cproteinov$$

$$M_{\text{piroksikama}} = 331.35$$

$$C_{\text{albuminov}} = 40 \text{ g/L}$$

$$M_{\text{albuminov}} = 65000$$

**Naloga:**

1. Izračunaj odstotek vezave piroksikama na albumine plazme pri različnih plazemskih koncentracijah učinkovine v raztopini albuminov in to odvisnost prikaži na grafu.
2. Iz Scatchardovega diagrama ( $v/C_f = n \cdot K_a - K_a \cdot v$ ) določi za interakcijo piroksikama s plazemskimi albumini asociacijsko konstanto ( $K_a$  (L/mol)) in število vezavnih mest piroksikama na molekuli vezavnega proteina ( $n$ ).

**Priloga:** Umeritvena krivulja za pufrske raztopine piroksikama (absorbanca izmerjena pri valovni dolžini 354 nm). Dobite na vajah!

**RAČUNSKÉ NALOGE**

1.) Pri metodi ravnotežne dialize uporabljamo sistem s koncentracijo albuminov 40g/L. V tem sistemu je v ravnotežju delež proste zdravilne učinkovine 0.08, koncentracija vezane zdravilne učinkovine pa je  $1.6 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Izračunaj ravnotežno koncentracijo proste zdravilne učinkovine in afinitetno konstanto vezanja učinkovine na eno vezavno mesto.

$$MM_{\text{albuminov}} = 65000$$

2.) Delež na proteine vezane učinkovine določamo z metodo ravnotežne dialize. Uporabljamo sistem s koncentracijo proteinov 70 g/L. Izhodna raztopina pri dializi vsebuje 200 mg zdravilne učinkovine v litru plazme. Učinkovina se pri terapevtskih koncentracijah veže na plazemske proteine 96%. Izračunaj število vezavnih mest učinkovine na molekuli plazemskega proteina, če je asociacijska konstanta  $23.7 \cdot 10^3$  L/mol.

$$MM_{\text{plaz. proteinov}} = 80000 \text{ g/mol}$$

$$MM_{\text{učinkovine}} = 250 \text{ g/mol}$$

## **6. vaja: BIOADHEZIJA**

Bioadhezija je sposobnost medsebojne vezave dveh komponent, od katerih je vsaj ena biološka. Tako definiran izraz je zelo širok, v farmaciji pa se uporablja za adhezijo zdravilnih pripravkov na kožo, sluznico in tudi za adhezijo na trda tkiva. Na področju zdravilnih pripravkov se ta izraz pogosto razume kot sinonim za mukoadhezijo, to je za adhezijo na sluznico - mukozo, ali pa na mukus, ki sluznico prekriva.

### **Mehanizmi bioadhezije**

Večina bioadhezivnih pripravkov, ki se danes uporabljajo ali proučujejo, stopa v interakcije z mukusom. Komponenta pripravka, ki pri tem sodeluje je bioadhezivni polimer, biološka komponenta pa so glikoproteini mukusa. Pri tem procesu nujno sodeluje voda, ki omogoči hidratacijo, razširitev in prepletanje verig obeh komponent. Mehanizmi adhezije na sluznicah prebavnega trakta so do neke mere poznani, jih pa še vedno intenzivno proučujejo.

Proces bioadhezije lahko razdelimo na naslednje stopnje:

1. Tvorba tesnega stika med bioadhezivom in tkivom, ki je lahko posledica
  - a) dobrega močenja površine tkiva
  - b) nabrekanja bioadheziva
2. Penetracija bioadheziva v gube tkiva in/ali interpenetracija verig bioadheziva in mukusa
3. Tvorba kemijskih vezi
4. Ločitev površin ob koncu bioadhezije

Za bioadhezijo trdnih zdravilnih pripravkov je nujna prisotnost vode, za maksimalno bioadhezijo pa je potrebna optimalna količina vode. Bioadheziv v prisotnosti vode hidratira, kar ima za posledico relaksacijo prej zvitih polimernih molekul. Prekinitev intra in intermolekularnih interakcij poveča gibljivost makromolekul in olajša penetracijo v tkivne gube ter omogoči interpenetracijo verig polimera in mukusa. Interpenetracija oz. prepletanje verig polimera in mukusa daje določen prispevek k jakosti bioadhezivne vezi, hkrati pa omogoči približevanje funkcionalnih skupin na polimeru in mukusu ter vzpostavitev kemijskih vezi. V bioadheziji zdravilnih pripravkov prevladujejo šibke vezi, kot so vodikova in Van der Waalsove vezi, kovalentne vezi pa so zaradi svoje ireverzibilnosti nezaželjene.

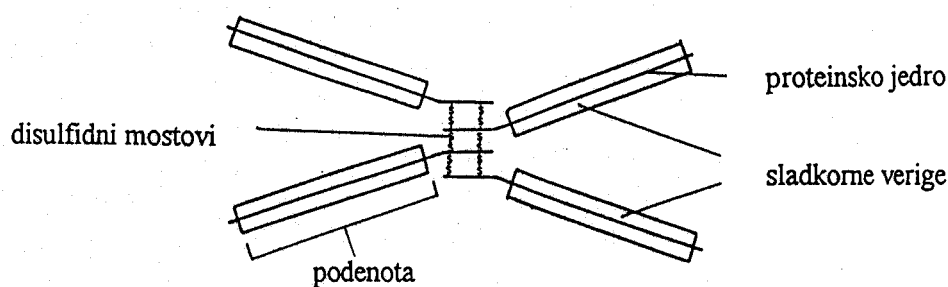
### **Bioadhezivni polimeri**

Bioadhezivi, ki se uporabljajo, so praviloma polimeri visokih molekularskih mas, ki imajo več skupnih značilnosti. Ena bistvenih značilnosti so funkcionalne skupine, ki jih vsebujejo. Najmočnejši bioadhezivi vsebujejo karboksilne skupine, pogoste so tudi hidroksilne, amidne in sulfatne funkcionalne skupine. Kationski polimeri se sorazmeroma redko uporabljajo, ker se lahko močno vežejo na negativno nabito površino celic in poškodujejo celice. Med ostalimi lastnostmi polimerov sta pomembni še gibljivost molekul in njihova sposobnost za nabrekanje, ki omogočita ustrezno razširitev polimernih verig in prepletanje z verigami mukusa. Na jakost bioadhezije vpliva tudi molekularska masa polimerov.

## Mukus

Kot biološka komponenta sodeluje pri bioadheziji v večini primerov mukus, ki prekriva sluznice. Mukus je viskozna tekočina, ki prekriva sluznice vseh notranjih traktov v organizmu: gastrointestinalni, respiratorni, urogenitalni trakt in očesno sluznico. Mukus vsebuje 0,5-5% glikoproteinov, 0,5-1% prostih proteinov, 1% soli, zelo majhne količine nukleinskih kislin in lipidov ter 95% vode. Sestava mukusa je odvisna od njegovega izvora. Najpomembnejša sestavina mukusa so mukusni glikoproteini ali mucini, od katerih so v večini primerov odvisne fizikalne lastnosti mukusa.

Glikoproteinske makromolekule, ki so bistvena sestavina mukusa imajo zelo visoko molekulsko maso. Sestavljene so iz glikoproteinskih podenot, ki so med seboj povezane v makromolekulo na različne načine; lahko zaporedno ali pa v obliki mlina na veter, kot je prikazano na spodnji sliki. Glikoproteinske podenote so zgrajene iz linearne proteinskega jedra, na katerega so vezane stranske verige oligosaharidov. Sladkorni del predstavlja več kot 70% suhe mase glikoproteinov. Strukturo glikoproteinskih podenot pogosto razlagajo z "bottle brush" modelom, tj. struktura "krtače za steklenice", kjer kovinska os krtače predstavlja linearno, rahlo zvito proteinsko jedro, nanj pa je kovalentno vezanih več sto ali tisoč kratkih oligosaharidnih verig. Sladkorne verige vsebujejo samo različnih monosaharidnih enot, njihova dolžina pa je pri človeku do 19 monosaharidov. Vsak od petih različnih sladkorjev ima značilno strukturo, ki vpliva na lastnosti glikoproteinske makromolekule. Zelo pomembna je sialična kislina, ki daje glikoproteinom negativni naboj. Na sladkornih verigah so vezane tudi sulfatne skupine, ki tudi prispevajo k celotnemu negativnemu naboju glikoproteinov.



## Metode za vrednotenje bioadhezije

Jakost bioadhezije med sluznico (mukusom) in polimerom, ter procese, ki pri tem potekajo lahko ovrednotimo z različnimi metodami. Z različnimi instrumentalnimi metodami lahko proučujemo površinske lastnosti potencialnih bioadhezivov ter interakcije med mukusom in bioadhezivnimi polimeri, merimo lahko silo, ki je potrebna za ločitev pripravka od sluznice ali mukusa, lahko pa tudi "in vivo" spremljamo obnašanje bioadhezivnega pripravka na sluznici.

## **Možnosti aplikacij bioadhezivnih farmacevtskih oblik**

Bioadhezivne farmacevtske oblike lahko apliciramo peroralno, oralno, nazalno, rektalno, cervikalno, vaginalno, okularno in intravezikalno (v sečni mehur). Namenjene so za lokalno in sistemsko zdravljenje. Prednosti, ki jih imajo bioadhezivne farmacevtske oblike pred klasičnimi so odvisne predvsem od mesta aplikacije. Prednosti bioadhezivnih oblik, ki veljajo za vse načine aplikacij pa so:

- podaljšan čas zadrževanja oblike na mestu adhezije
- tesen stik oblike z membrano, skozi katero se učinkovina lahko absorbira
- lokalizacija oblike na željenem mestu

Podaljšan čas zadrževanja omogoči popolnejšo absorpcijo učinkovine iz farmacevtskega pripravka in je pomemben pri učinkovinah, katerih absorpcija je nepopolna zaradi prehitre odstranitve pripravka. Zaradi vzpostavitve tesnega stika med pripravkom in membrano, je tik na membrani visoka koncentracija učinkovine, ki omogoči hiter in obsežen pretok učinkovine skozi absorbirajočo membrano. Zelo tesen stik se lahko vzpostavi pri pripravkih za aplikacijo na sluznice v organizmu, ki so dosegljive od zunaj in lahko zato apliciramo pripravek z določenim pritiskom, medtem, ko tako tesnega stika drugje npr. v prebavnem traktu ni mogoče doseči. Z uporabo bioadhezivnih sistemov lahko tudi dosežemo, da se farmacevtski pripravek zadrži dalj časa na željenem mestu. To je pomembno, ker se tako zmanjšajo toksični učinki na drugih delih, zelo ugodno pa je tudi v prebavnem traktu za učinkovine, ki se absorbirajo le na omejenem delu. Če dosežemo adhezijo farmacevtskih pripravkov na mestu absorpcije, lahko močno povečamo biološko uporabnost takih učinkovin. Novejše raziskave kažejo, da je uspešnost bioadhezije pripravkov v prebavnem traktu vprašljiva, medtem, ko so pri od zunaj dosegljivih sluznicah dokazali uspešnost bioadhezije in dobili zelo dobre rezultate tako pri lokalnem, kot tudi pri sistemskem zdravljenju.

## VPRAŠANJA

1. Opiši princip delovanja aparature za vrednotenje jakosti bioadhezije z merjenjem sile ločevanja polimernega filma (pripravka) in biološkega substrata (mukusa, sluznice)!
2. Navedi vsaj tri polimere, ki so dobri bioadhezivi! Posledica česa so bioadhezivne sposobnosti vsakega od polimerov?
3. Zakaj so negativni polimeri najpogosteje uporabljeni bioadhezivi? Upoštevaj, da je tudi mukus negativno nabit!
4. Zakaj se pozitivno nabiti polimeri, kjer je pri njihovi adheziji dodatna možnost privlaka pozitivnih in negativnih nabojev, redkeje uporabljajo kot bioadhezivi?
5. Pri katerih pH vrednostih (glede na pKa) ima poliakrilna kislina najboljše bioadhezivne lastnosti in zakaj?
6. Kako vpliva količina vode na jakost bioadhezije?
7. Sluznice katerih organov so najbolj primerne za aplikacijo bioadhezivnih oblik in za kakšen način delovanja učinkovine po aplikaciji (sistemski, lokalni) je katera sluznica ustrežnejša?
8. Katere prednosti in pomanjkljivosti ima bukalni bioadhezivni farmacevtski pripravek v primerjavi s klasičnim trdnim peroralnim pripravkom, če gre v obeh primerih za sistemsko aplikacijo?
9. Katere so prednosti in pomanjkljivosti nazalne aplikacije bioadhezivnih pripravkov? Katere farmacevtske oblike lahko apliciramo nazalno?

## LITERATURA

1. Junginger H.E., Mucoadhesive hydrogels, Pharm.Ind. 53(11), 1056-1065, 1991.
2. Mikos A.G., Peppas N.A., Systems for controlled release of drugs. V. Bioadhesive systems, S.T.P. Pharma 2(19), 705-716, 1986.

## NALOGE

1. Med katerima komponentama se vzpostavijo vezi pri bioadheziji zdravilnega pripravka na sluznico? Katere strukturne elemente, pomembne za bioadhezijo, vsebujeta ti dve komponenti?
2. Katere sestavine mukusa sodelujejo pri bioadheziji? Opiši osnovno strukturo najpomembnejše sestavine in navedi dele (funkcionalne skupine...), ki so pomembni za vzpostavljanje vezi pri bioadheziji!
3. Pripraviti želimo tableto z bioadhezivnimi lastnostmi za bukalno aplikacijo, ki jo bomo porabili za lokalno zdravljenje. Katero (katere) bioadhezivne komponente bi lahko uporabili in zakaj bi se tableta adherirala (do kakšnih interakcij bi prišlo med bioadhezivnimi komponentami tablete in mukusom sluznice)?

## **7. vaja: METODA REZIDUALOV**

### **1. UVOD**

Pomemben del preučevanja usode zdravila v telesu je farmakokinetična analiza eksperimentalnih podatkov. V študijah farmakokinetike učinkovin dobimo podatke, ki opisujejo časovne poteke njihovih koncentracij v posameznih telesnih tekočinah (krvi, urinu, tkivih...). Obdelava informacije teče v smeri postavitve farmakokinetičnega modela ter določevanja vrednosti njegovih parametrov. Pri tem se poslužujemo metod grafične in numerične analize. Namen vaje je predstaviti **metodo rezidualov** kot eno izmed orodij za pridobivanje farmakokinetičnih parametrov iz eksperimentalnih podatkov.

Farmakokinetični procesi potekajo v kompleksnem biološkem sistemu. Zato njihovo spremljanje in razlaga nujno potrebuje poenostavitve, ki omogočijo, da si organizem lahko predstavljamo kot "črno škatlo" z definiranim vhodom in izhodom. Tako pridemo do modeliranja, postopka, ki je uveljavljen v večini modernih znanosti. Modeliranje pomeni iskanje, izgradnjo, študij in preverjanje **modela**, t.j. strukture, ki v bistvenih lastnostih zadovoljivo predstavlja dogajanje v sistemu, ki ga proučujemo. Model temelji na matematičnih relacijah, ki opisujejo odvisnost izbrane spremenljivke (npr. krvne koncentracije) od neodvisne spremenljivke (npr. časa). Cilj modeliranja je torej pridobivanje pregledne, matematično izražene in eksperimentalno preverjene predstave o preučevanem biološkem sistemu.

Modeli imajo svojo **strukturo** in svoje **parametre**. Struktura je prisotna v matematičnih relacijah (funkcijah), ki definirajo odvisnost med spremenljivkami v modelu, npr. med časom in koncentracijo. Parametri so koeficienti enačb, npr. hitrostne in sorazmernostne konstante.

Modele delimo na:

- empirične in eksplikativne: Empiričnim modelom je edini cilj redukcija informacije v eksperimentalnih podatkih. Na drugi strani eksplikativni (mehanistični) modeli skušajo prodreti v notranjo strukturo preučevanih sistemov in matematično opisati mehanizme, ki v njih potekajo.
- statične in dinamične: Prvi opisujejo časovno neodvisne pojave kakršna so na primer ravnotežja procesa. Dinamični modeli privzemajo čas kot neodvisno spremenljivko.
- deterministične in stohastične: Deterministični modeli predpostavljajo, da so količine, ki v njih nastopajo, enolično določene, drugi pa vpeljujejo tudi eno ali več slučajnostnih komponent kot na primer eksperimentalno napako ali spremenljivost nekega parametra med posameznimi osebki iste populacije.
- linearne in nelinearne: Linearni modeli so tisti, ki predstavljajo časovno neodvisnost vrednosti in števila parametrov modela. Za razliko od njih vključujejo nelinearni modeli tudi spremenljive parametre. Primer nelinearnega modela je farmakokinetični model, ki opisuje izločanje učinkovine pri pacientu z zmanjšano ledvično funkcijo v času pred, med in po priključitvi na umetno ledvico. V času



med priključitvijo na umetno ledvico vpliva poleg pacientovega telesnega klirensa na izločanje učinkovine tudi klirens aparature.

V nadaljevanju nas bodo zanimali **farmakokinetični prostorski modeli**, ki so glede na zgornje opredelitve eksplikativni, dinamični, deterministični in linearni. Pri teh modelih se biološki organizem poenostavi do nivoja homogenega prostora z določenim volumnom. Prostorov je v takem modelu lahko tudi več, vsi pa so povezani v smislu dinamičnega ravnotežja.

V primeru linearnih prostorskih modelov lahko hitrost spreminjanja količine učinkovine v posameznem prostoru opišemo s sistemom linearnih diferencialnih enačb, pri čemer je število diferencialnih enačb enako številu prostorov ( $n$ ). Linerana diferencialna enačba splošne oblike se glasi:

$$\frac{dm_i}{dt} = \sum_{j=1}^n k_{ji} \cdot x_j - \sum_{i=1}^n k_{ij} \cdot x_i - k_{i0} \cdot x_i + m_i(t)$$

$m_i$  predstavlja količino učinkovine v prostoru  $i$ , parametri  $k_{ij}$  so hitrostne konstante, ki predstavljajo intenzivnost transporta učinkovine iz  $i$ -tega v  $j$ -ti prostor,  $k_{ji}$  hitrostne konstante, ki predstavljajo intenzivnost transporta iz  $j$ -tega v  $i$ -ti prostor,  $k_{i0}$  predstavlja hitrostno konstanto eliminacije učinkovine,  $m_i(t)$  pa aplicirano dozo učinkovine. Če poznamo volumne prostorov ( $V_i$ ), lahko izračunamo koncentracije učinkovine v posameznih prostorih ( $c_i$ ).

Sistem diferencialnih enačb predstavlja **matematični model**, katerega rešitev je **poliekspencialna funkcija** oblike:

$$m_i(t) = A_{1i} e^{-\lambda_1 t} + A_{2i} e^{-\lambda_2 t} + \dots + A_{ni} e^{-\lambda_3 t} \quad i = 1, 2, \dots, n$$

V vsakem prostoru lahko torej izrazimo časovne poteke učinkovine kot vsoto eksponencialnih funkcij. Konstantam  $A_{ij}$  pravimo **komponente lastnega vektorja**  $A_i$ , konstantam  $\lambda$  pa **lastne vrednosti**. Oboji so funkcije parametrov modela  $k_{ij}$ .

Na osnovi te zveze lahko večino farmakokinetičnih profilov tretiramo kot poliekspencialne funkcije. Pri dvoprostornem farmakokinetičnem modelu z intravensko aplikacijo obsega poliekspencialna enačba prva dva člena. Po peroralni aplikaciji dobimo dodatni tretji člen z negativnim predznakom. Takšne modelne funkcije lahko uporabljamo za simulacijo nivojev učinkovine v posameznih prostorih sistema. V vzorčenih prostorih (npr. krvi) lahko odziv modela (vrednosti modelne funkcije) primerjamo z eksperimentalnimi vrednostmi in na ta način ocenjujemo ustreznost modela. V nevzorčenih prostorih pa lahko z modelnimi funkcijami dobimo informacijo o nivojih učinkovine.

## 2. METODA REZIDUALOV

Metoda rezidualov predstavlja orodje za pridobivanje vrednosti lastnih vrednosti in lastnih vektorjev poliekspencialnih krivulj. Splošna enačba poliekspencialne krivulje se glasi:

$$c_p(t) = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + A_3 \cdot e^{-\lambda_3 \cdot t} + \dots + A_n \cdot e^{-\lambda_n \cdot t}$$

Člene poliekspencialne krivulje razdelimo po velikosti:

$$\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots > \lambda_n$$

Po določenem času  $t^*$  vsi členi funkcije razen zadnjega postanejo enaki nič, torej po času  $t^*$  velja:

$$c_p(t) = A_n \cdot e^{-\lambda_n \cdot t}$$

Po logaritmiranju obeh strani dobimo enačbo premice:

$$\ln(c_p(t)) = \ln(A_n) - \lambda_n \cdot t$$

V **semilogaritemskem nanosu** torej v zadosti dolgem času iz poliekspencialne krivulje dobimo premico z naklonom  $\lambda_n$ . To je zadnji, najpočasnejši člen krivulje. Če ga odštejemo od krivulje  $c_p(t)$ , dobimo količino, ki jo imenujemo **preostanek ali rezidual**  $c'_p(t)$ :

$$c'_p(t) = c_p(t) - A_n e^{-\lambda_n \cdot t} = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + \dots + A_{n-1} \cdot e^{-\lambda_{n-1} \cdot t}$$

Dobljene vrednosti rezidualov nanesemo v semilogaritemski diagram napram času in ponovno ugotovimo, da točke v časih, ki so večji od določenega časa  $t^{**}$ , iz krivulje oblikujejo premico. Ta premica podaja parametra predzadnjega člena poliekspencialne funkcije. Postopek nato ciklično ponavljamo in na ta način pridemo do vseh parametrov poliekspencialne krivulje. Od tod v angleški literaturi za metodo rezidualov termin "stripping" ali "peeling off".

V praktičnih situacijah nimamo opravka s krivuljami, marveč s skupinami točk (eksperimentalnimi meritvami). Pri tem poskušamo v vsaki fazi strippinga grafično ali analitično potegniti najboljšo premico skozi zadnje točke v nanosu koncentracij ali rezidualov v semilogaritemskih diagramih.

Izvedbo metode bomo spoznali na spodnjem primeru.

**PRIMER:** Po intravenski aplikaciji smo v plazmi izmerili naslednje koncentracije učinkovine:

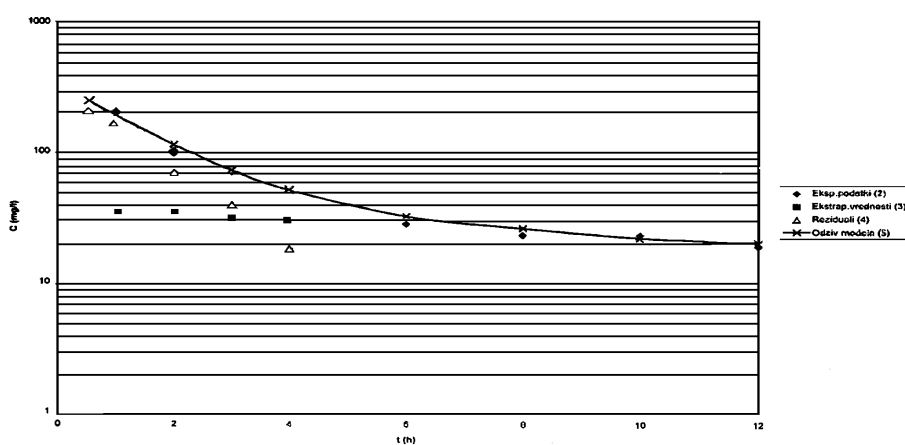
t (h)	plazemske konc. (mg/l)	ekstrapolirane konc. (mg/l)	reziduali (mg/l)	odziv modela (mg/l)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
0.5	244	35	209	251
1	203	34	169	189
2	102	33	69	113
3	70	31	39	72
4	48	30	18	51
6	28	-	-	32
8	23	-	-	26
10	23	-	-	22
12	19	-	-	20

Podatke iz kolon (1) in (2) vnesemo v semilogaritemski papir in skozi zadnje štiri točke potegnemo premico. Premico ekstrapoliramo na ordinato in tako dobimo vrednost  $A_2 = 36 \text{ mg/l}$ . Iz naklona premice ocenimo  $\lambda_2 = 0.049 \text{ h}^{-1}$  ter določimo razpolovno dobo terminalne faze diagrama, ki znaša 14.1 h.

Počasni eksponencialni člen je torej  $A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} = 36 \cdot e^{-0.049 \cdot t}$  oz. grafični zapis premice je  $\ln 36 - 0.049 \cdot t$ . V nadaljevanju določimo tej premici ekstrapolirane vrednosti za čase, ki so manjši od  $t^*$  in so enaki časom vzorčenja (kolona 3). Njihove vrednosti odštejemo od meritev in dobimo rezidualne (kolona 4). Vrednosti rezidualov znova vnesemo v semilogaritemski diagram in dobimo novo premico z večjim naklonom in večjim odsekom na ordinati ( $A_1 = 300 \text{ mg/l}$ ,  $\lambda_1 = 0.66 \text{ h}^{-1}$ ).

Bieksponencialna enačba se torej glasi:

$$c_p(t) = 300 \cdot e^{-0.66 \cdot t} + 36 \cdot e^{-0.049 \cdot t} \quad (\text{mg/l})$$



Slika 1: Semilogaritemski naris eksperimentalnih podatkov in rezidualov.

Dobljena bieksponecialna enačba opisuje potek koncentracij učinkovine v plazemskem prostoru, iz katerega smo vzorčili po intravenski aplikaciji. Tovrstna enačba pripada dvoprostornemu farmakokinetičnemu modelu. Počasni del krivulje pripisujemo sistemski eliminaciji, hitri del pa porazdelitvi učinkovine v sistemu. Govorimo tudi o počasni, terminalni beta fazi in hitri alfa fazi krivulje. S to enačbo lahko ob vstavljanju ustreznih vrednosti za čas (kolona 1) dobimo odzive modelne funkcije oz. simulirane krvne nivoje učinkovine (kolona 5). Iz parametrov  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  z ustreznimi algoritmi dobimo parametre modela.

Naklone premic in odseke na ordinatah lahko izračunamo tudi z metodo linearne regresije najmanjših kvadratov. Ta metoda je seveda pravilnejša, predpostavlja pa uporabo ustreznih regresijskih algoritmov.

Podoben pristop imamo tudi pri strippingu krivulj, pridobljenih iz podatkov po peroralni aplikaciji učinkovine. Pri teh je padajoči del krivulje seveda pod ekstrapoliranim delom terminalne krivulje. Rezidualom, dobljenim v tem diagramu, obrnemo predznak, zato ima tudi koeficient  $A_1$  v tem primeru negativen predznak. V primeru enoprostornega modela s peroralno aplikacijo velja  $A_1 = -A_2$ , kar izpolnjuje začetni pogoj:  $t = 0$ ,  $c = 0$ .

## NALOGA

Po peroralni aplikaciji 200 mg zdravilne učinkovine smo v plazmi izmerili naslednje koncentracije učinkovine:

t (h)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	6	8
$c_p$ (mg/l)	0	3.90	6.13	7.67	6.36	4.24	2.66	1.63	0.99	0.37

S pomočjo metode rezidualov določi konstanto hitrosti absorpcije, konstanto hitrosti eliminacije in biološko razpolovno dobo učinkovine v plazmi. Ob predpostavki, da je volumen distribucije učinkovine 12 litrov, izračunaj tudi faktor absorpcije učinkovine.

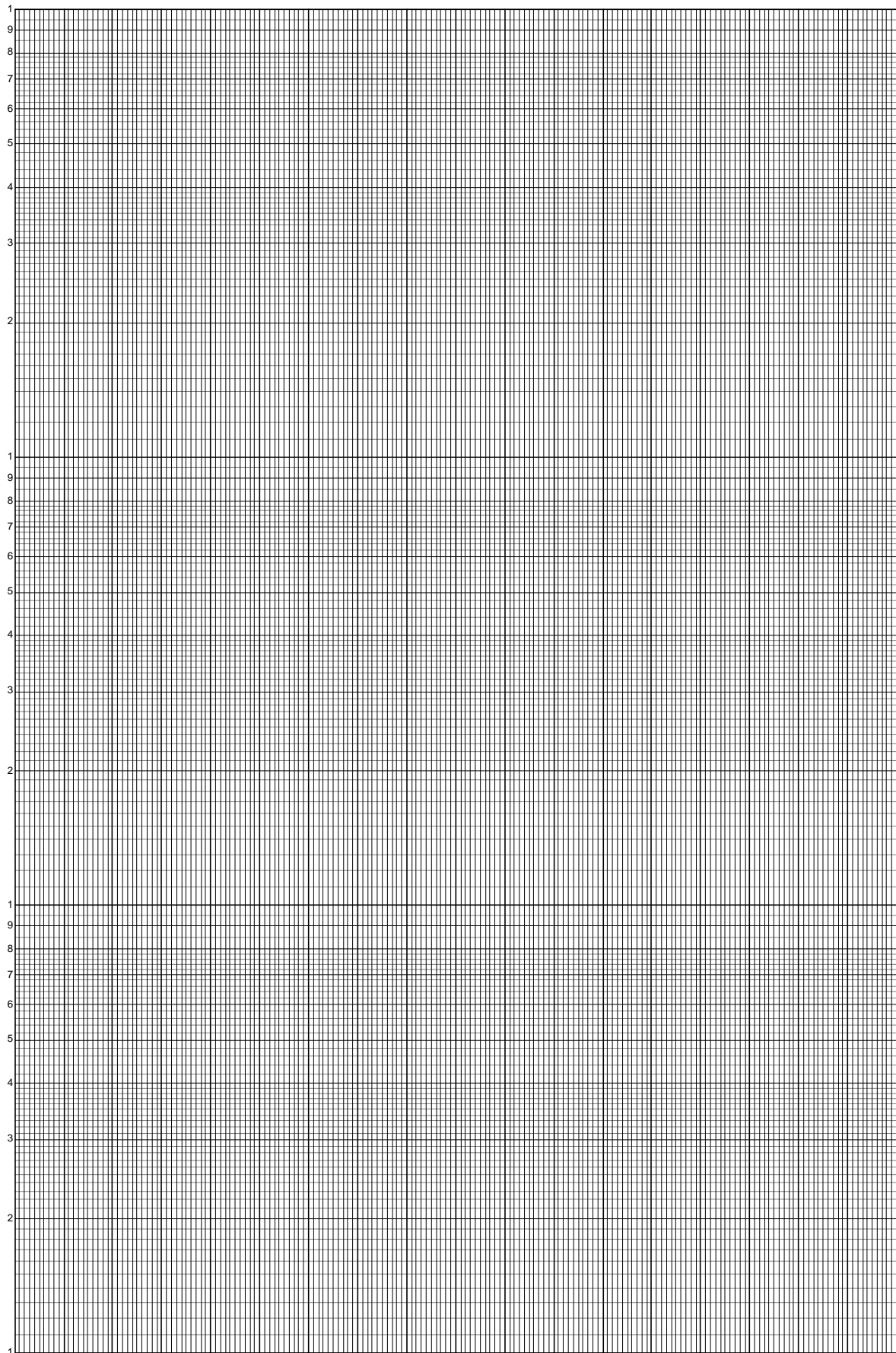
### Rešitev:

t (h)	plazemska konc. (mg/L)	ekstrapolirana konc. (mg/L)	reziduali (mg/L)	odziv modela (mg/L)
0	0			
0,25	3,9			
0,5	6,13			
1	7,67			
2	6,36			
3	4,24			
4	2,66			
5	1,63			
6	0,99			
8	0,37			

Enačba modela:

Izračuni:

Rezultati:  
 $k_a =$   
 $k_{el} =$   
 $t_{1/2} =$   
 $F =$



Slika 2: Semilogaritemski naris eksperimentalčnih podatkov in rezidualov.

## **8. vaja: FARMAKOKINETIČNA SIMULACIJA**

### **1. UVOD**

Simulacijo lahko v farmakokinetiki obravnavamo kot postopek napovedovanja, pri katerem s pomočjo izbranega modela in z uporabo ustreznega simulacijskega orodja preučujemo transportne lastnosti učinkovin. Simulacijska orodja so najpogosteje računalniški programi, ki omogočajo učinkovito reševanje matematičnih modelov. Simulacija omogoča preučevanje nekega sistema brez posebnih eksperimentalnih podatkov in je zato še posebej pomembna v primerih, ko bi bilo eksperimentalno vrednotenje sistema tehnično ali etično oteženo (npr. vzorčenje v tkivih, spreminjanje doze, iskanje odgovorov na vprašanja vrste "kaj če..."). Po drugi strani pa uporaba simulacije zahteva od raziskovalca določeno previdnost, saj je kvaliteta njenih rezultatov povsem odvisna od kvalitete vhodnih podatkov. Predpostavlja namreč določeno predznanje o sistemu, ki mora biti predhodno zagotovljeno s pomočjo eksperimentalnih študij. Če želimo na primer preučevati vpliv spremenjenega systemskega očistka na plazemske nivoje dane učinkovine, moramo v eksperimentalni farmakokinetični študiji z intravensko aplikacijo učinkovine in z merjenjem njenih koncentracij v plazmi najprej določiti ali vsaj oceniti njegovo vrednost. Na podoben način določimo vse osnovne farmakokinetične parametre ali pa jih, odvisno od primera, najdemo v literaturi. Nato lahko na primer z računalniško simulacijo ugotovljamo vpliv spremembe očistka (npr. 60% padec zaradi ledvične odpovedi) na plazemske oz. tkivne nivoje učinkovine. Simulacija je torej ena od metod farmakokinetične študije. Z njo lahko s spreminjanjem posameznih parametrov proučujemo oziroma opazujemo spremembo koncentracij učinkovine v posameznem prostoru farmakokinetičnega modela.

Strukturo modela določa število in razporeditev njegovih prostorov, parametri pa omogočajo številčno vrednotenje intenzivnosti transportnih procesov. Vrsto modela pogojuje fizikalna oz. fiziološka narava elementov modela. V prostorskem farmakokinetičnem modelu prostori predstavljajo imaginarne strukture z dokaj nedefiniranim razmerjem do stvarnih fizioloških lastnosti organizma. Tako na primer centralni prostor pri teh modelih poleg vaskularnega volumna zajema tudi volumen dobro prekravljenih organov. Parametri modela so kinetične konstante, ki imajo le omejen biološki pomen. Kljub temu so prostorski modeli v farmakokinetiki najpogosteje uporabljeni modeli, saj nudijo dokaj ugodno razmerje med računsko zahtevnostjo in sposobnostjo opisovanja transportnih procesov.

Za razliko od prostorskih imajo fiziološki pretočni modeli strukturo, ki je osnovana na realnih volumnih organov, na realnih porazdelitvenih koeficientih in na realnih krvnih pretokih (hitrosti perfuzije) skozi posamezen organ. Navkljub temu dejstvu pa imajo le omejeno vlogo v farmakokinetiki, saj vključujejo večje število parametrov in so računsko zahtevnejši.

### **2. NAMEN**

Z računalniško simulacijo ugotovljamo spremembo odziva izbranega prostornega farmakokinetičnega modela, medtem ko mu spreminjamo različne parametre. Izraz "odziv modela" označuje simulirani koncentracijski profil učinkovine v odvisnosti od časa.

### 3. MAXSIM

V farmakokinetiki se najpogosteje uporabljajo simulacijski programi ACSL, SAAM, MAXSIM, PCNONLIN, SIMCOS in SIMED, ki se med seboj razlikujejo po stopnji prilagojenosti farmakokinetični problematiki, kvaliteti uporabniškega vmesnika in stopnji odprtosti. Medtem ko je MAXSIM opremljen zgolj s knjižnico v praksi najbolj verjetnih modelov, programi kot so ACSL, SAAM in SIMCOS omogočajo programiranje strukture in parametrov modela za vsak problem posebej.

Delo v MAXSIMu poteka z meniji. Izberemo željen model in njegova struktura se nam prikaže na ekranu. Nato v vhodni razpredelnici, katere oblika je odvisna od vrste modela, spremenimo posamezne parametre modela. Ti parametri so lahko različni:

- makro konstante:  $\alpha$ ,  $\beta$ , A, B
- volumni porazdelitve:  $V_c$ ,  $V_{ss}$
- način aplikacije: intravenska ali peroralna (IV ali PO)
- biološka uporabnost: F
- konstanta absorpcije:  $k_a$
- doziranje: začetna doza, vzdrževalna doza, število doz, dozirni interval
- parametri simulacije: čas opazovanja in pogostost meritev oz. dolžina simulacijskega koraka
- učinek: koncentracija v krvi pri 90% maksimalnega učinka in faktor sigmoidnosti
- terapevtski interval: minimalna toksična in minimalna terapevtska koncentracija
- grafični prikaz: linearen ali logaritemski odnos na y osi
- in drugo

V strukturi izbranega modela spreminjamo vrednosti enega parametra ob nespremenjenih vrednostih ostalih parametrov. Ko imamo izbrane željene parametre, poženemo simulacijski tek in dobimo odziv modela. Gre za prikaz časovne odvisnosti koncentracij učinkovine v centralnem (plazemskem) prostoru in perifernem (tkivnem) prostoru. V tkivnem prostoru gre za simulacijo koncentracij, ker tu navadno ne izvajamo meritev. Nasprotno lahko simulacijski rezultat v plazemskem ali krvnem prostoru primerjamo z eksperimentalnimi podatki, ki jih sočasno vrišemo v diagram.

Dobljene koncentracijske profile vrednotimo v smislu vzporednosti krivulj, sprememb v naklonih krivulj, proporcionalnosti površin pod krivuljami in sprememb v položaju maksimumov koncentracij ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ).

#### 3.1. Pregled knjižnice farmakokinetičnih modelov programa MAXSIM

Z izbiro ustrezne postavke v glavnem meniju programa si prikličemo na ekran slikovne prikaze posameznih vrst modelov:

- prostorski model
- perfuzijski model
- placentarni model
- pljučni model

Preučimo njihove strukture! Kateri parametri opisujejo lastnosti prostorov? Kateri parametri opisujejo povezave med prostori?



### 3.2. Enoprostorni model, intravenska injekcija

#### **a) vpliv količine aplicirane učinkovine (D)**

$$D_1 = 1500 \text{ mg}$$

$$D_2 = 3000 \text{ mg}$$

Z večanjem količine aplicirane učinkovine se proporcionalno povečuje koncentracija učinkovine v plazmi.

#### **b) vpliv volumna porazdelitve ( $V_p$ )**

$$V_{p1} = 8.93 \text{ L}$$

$$V_{p2} = 20 \text{ L}$$

Z večanjem volumna porazdelitve se proporcionalno zmanjšuje koncentracija učinkovine v plazmi.

#### **c) vpliv konstante hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ )**

$$k_{el1} = 0.29 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{el2} = 0.4 \text{ h}^{-1}$$

Manjša je konstanta hitrosti eliminacije, počasneje se učinkovina izloča iz plazme in večje so njene koncentracije v plazmi.

### 3.3. Dvoprostorni model, intravenska injekcija

#### **a) vpliv makro konstante $\alpha$**

$$\alpha_1 = 0.66$$

$$\alpha_2 = 0.33$$

$$\alpha_3 = 1.32$$

Pri nižjih vrednostih  $\alpha$  je čas distribucije daljši. Kot posledica tega koncentracija učinkovine v tkivih počasneje narašča in doseže maksimum kasneje kot pri višjih vrednostih  $\alpha$ . Koncentracija učinkovine v plazmi počasneje pade. Faza, ko v sistemu prevlada eliminacija učinkovine, se pri nižjih vrednostih  $\alpha$  začne kasneje. Zakaj so terminalni deli krivulj v centralnem in tkivnem prostoru vzporedni?

### b) vpliv makro konstante $\beta$

$$\beta_1 = 0,05$$

$$\beta_2 = 0.025$$

$$\beta_3 = 0.1$$

Ker je  $\alpha$  konstantna, so pri različnih vrednostih  $\beta$  nakloni začetnih delov tkivnih in plazemskih krivulj nespremenjeni. Pri nižjih vrednostih  $\beta$  je eliminacija učinkovine počasnejša, zato je upad koncentracij učinkovine počasnejši tako v plazmi kot v tkivu. Tako v obeh prostorih zasledimo višje koncentracije učinkovine. Pri manjši vrednosti  $\beta$  dosežemo maksimalno koncentracijo učinkovine v tkivu kasneje, je pa ta višja kot pri večji vrednosti  $\beta$ .

### c) vpliv volumna centralnega prostora ( $V_C$ )

$$V_{C,1} = 8.93 \text{ L}$$

$$V_{C,2} = 4.5 \text{ L}$$

$$V_{C,3} = 18 \text{ L}$$

Če je volumen centralnega prostora zmanjšan, pride do povečanja koncentracij učinkovine tako v centralnem kot v tkivnem prostoru. Povečanje koncentracij je proporcionalno.

## 3.4. Enoprostorni model, peroralna aplikacija

### a) vpliv količine aplicirane učinkovine ( $D$ )

$$D_1 = 2000 \text{ mg}$$

$$D_2 = 3000 \text{ mg}$$

Z aplikacijo večje količine aplicirane učinkovine se proporcionalno poveča koncentracija učinkovine v plazmi.

### b) vpliv faktorja absorpcije ( $F$ )

$$F_1 = 1$$

$$F_2 = 0.6$$

$$F = \frac{AUC_{peros}}{AUC_{iv}}$$

Faktor absorpcije je razmerje med površino pod krivuljo po peroralni aplikaciji in površino pod krivuljo po intravenski aplikaciji. Je merilo za obseg absorpcije in zavzema vrednosti  $0 \leq F \leq 1$ . Z večanjem faktorja absorpcije se koncentracija učinkovine v plazmi proporcionalno povečuje.

**c) vpliv volumna porazdelitve ( $V_p$ )**

$$V_{p1} = 8.93 \text{ L}$$

$$V_{p2} = 20 \text{ L}$$

Z večanjem volumna porazdelitve se proporcionalno zmanjšuje koncentracija učinkovine v plazmi.

**d) vpliv konstante hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ )**

$$k_{el1} = 0.29 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{el2} = 0.5 \text{ h}^{-1}$$

Večja kot je konstanta hitrosti eliminacije, hitreje se učinkovina izloča iz plazme. Maksimalna koncentracija učinkovine v plazmi je manjša in prej se doseže.

**e) vpliv konstante hitrosti absorpcije ( $k_a$ )**

$$k_{a1} = 1 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{a2} = 0.6 \text{ h}^{-1}$$

Konstanta hitrosti absorpcije vpliva tako na maksimalno koncentracijo učinkovine kot na čas v katerem se doseže ta maksimalna koncentracija. Pri višjih vrednostih te konstante je čas za doseg maksimuma krajši, maksimum pa je višji. Kakšen je vpliv spremembe  $k_a$  na eliminativne dele krivulj?

**f) flip – flop učinek**

$$k_a > k_{el} \quad (k_a = 1 \text{ h}^{-1}, k_{el} = 0.29 \text{ h}^{-1})$$

$$k_a < k_{el} \quad (k_a = 0.29 \text{ h}^{-1}, k_{el} = 1 \text{ h}^{-1})$$

$$k_a \cong k_{el} \quad (k_a = 0.5 \text{ h}^{-1}, k_{el} = 0.5 \text{ h}^{-1})$$

Če je konstanta hitrosti absorpcije manjša v primerjavi s konstanto hitrosti eliminacije, pride do tako imenovanega FLIP-FLOP učinka. V tem primeru naklon terminalnega dela koncentracijske krivulje ne prikazuje več eliminacije, ampak absorpcijo, saj le-ta omejuje hitrosti transporta v celotnem sistemu. Ta učinek se pojavi pri pripravkih z zadržanim sproščanjem.

V primeru, ko sta konstanta hitrosti absorpcije in konstanta hitrosti eliminacije približno enaki, terminalni del koncentracijske krivulje tudi v semilogaritemskem nanosu ni linearen. Za določitev parametrov modela ne moremo uporabiti metode rezidualov.

### 3.5. Dvoprostorni model, peroralna aplikacija

#### **a) vpliv faktorja absorpcije (F)**

$$F_1 = 1$$
$$F_2 = 0.8$$
$$F_3 = 0.5$$

Z večanjem faktorja absorpcije se koncentracija učinkovine v plazmi proporcionalno povečuje.

#### **b) vpliv konstante hitrosti absorpcije ( $k_a$ )**

$$k_{a,1} = 1 \text{ h}^{-1}$$
$$k_{a,2} = 0.5 \text{ h}^{-1}$$
$$k_{a,3} = 2 \text{ h}^{-1}$$

Večja kot je konstanta hitrosti absorpcije, prej se doseže maksimalna koncentracija učinkovine v plazmi, ki je tudi višja. Konstanta hitrosti absorpcije ne vpliva na AUC.

#### **c) flip – flop učinek**

$$k_a > k_{el} \quad (k_a = 1, k_{el} = 0.29)$$
$$k_a < k_{el} \quad (k_a = 0.1, k_{el} = 1)$$

V primeru flip – flop modela, ko je  $k_a < k_{el}$ , terminalni del koncentracijske krivulje prikazuje absorpcijo in ne eliminacijo, kot je to v primeru, če je  $k_a > k_{el}$ . Iz koncentracijskega profila je tudi v semilogaritemskem nanosu težko določiti ali gre za enoprostorni ali dvoprostorni flip-flop model, saj počasna absorpcija prekrije tako distributivno kot tudi eliminativno fazo in daje navzven izgled enoprostornega modela.

### 3.6. Spreminjanje kinetike eliminacije učinkovine

Linearno kinetiko eliminacije spremenimo v Michaelis-Mentenovo kinetiko, kjer gre za kombinacijo 0. in 1. reda eliminacije. Pri tej kinetiki eliminacije so koncentracije učinkovine tako v plazmi kot v tkivih višje v primerjavi z linearno kinetiko eliminacije. Kako vpliva spreminjanje Michaelis-Mentenovih parametrov  $K_m$  in  $v_{max}$  na nivoje učinkovine?

## 4. EXCEL

### 4.1. Enoprostorni model, intravenska infuzija

#### a) vpliv hitrosti dovajanja infuzije ( $k_0$ )

$$k_{01} = 10 \text{ mg/h}$$

$$k_{02} = 20 \text{ mg/h}$$

Večja kot je hitrost dovajanja infuzije, višje so plazemske koncentracije učinkovine. Hitrost, s katero dosežemo stacionarno stanje, je neodvisna od hitrosti dovajanja infuzije.

#### b) vpliv volumna porazdelitve ( $V_p$ )

$$V_{p1} = 15 \text{ L}$$

$$V_{p2} = 20 \text{ L}$$

Z večanjem volumna porazdelitve se proporcionalno zmanjšuje koncentracija učinkovine v plazmi.

#### c) vpliv konstante hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ )

$$k_{el1} = 0.1 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{el2} = 0.8 \text{ h}^{-1}$$

Pri večji konstanti hitrosti eliminacije se učinkovina hitreje izloča iz plazme in posledično so njene koncentracije v plazmi manjše. Stacionarno stanje je prej doseženo.

#### d) vpliv časa prekinitve infuzije ( $T$ )

$$T_1 = 3 \text{ h}$$

$$T_2 = 20 \text{ h}$$

Dovajanje infuzije lahko prekinemo še preden se v plazmi vzpostavi stacionarno stanje ali pa šele v času, ko je koncentracija učinkovine v plazmi že konstantna. V obeh primerih je naklon terminalne faze enak.

#### 4.2. Enoprostorni model, intravenska injekcija, večkratna aplikacija

##### **a) vpliv inicialne (začetne) doze ( $D_i$ )**

$$D_{i1} = 5 \text{ mg}$$

$$D_{i2} = 20 \text{ mg}$$

Inicialna doza ne vpliva na koncentracijo učinkovine v stacionarnem stanju ter na čas, v katerem se le-to doseže. Prav tako ne vpliva na nihanja koncentracij v stacionarnem stanju.

##### **b) vpliv vzdrževalne doze ( $D_m$ )**

$$D_{m1} = 5 \text{ mg}$$

$$D_{m2} = 10 \text{ mg}$$

Večja je vzdrževalna doza, večja je koncentracija učinkovine v stacionarnem stanju. Vzdrževalna doza ne vpliva na čas vzpostavitve stacionarnega stanja v plazmi, saj je le-ta odvisen le od biološke razpolovne dobe učinkovine. Pri nižjih vzdrževalnih dozah so nihanja med maksimalno in minimalno koncentracijo učinkovine v stacionarnem stanju manjša.

##### **c) vpliv volumna porazdelitve ( $V_p$ )**

$$V_{p1} = 20 \text{ L}$$

$$V_{p2} = 40 \text{ L}$$

Večji volumen porazdelitve povzroči manjše plazemske koncentracije učinkovine. Ne vpliva na čas, ko se doseže stacionarno stanje, zmanjša pa nihanja plazemskih koncentracij učinkovine v stacionarnem stanju.

##### **d) vpliv konstante hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ )**

$$k_{el1} = 0.02 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{el2} = 0.03 \text{ h}^{-1}$$

Pri večji konstanti hitrosti eliminacije so plazemske koncentracije učinkovine manjše. Stacionarno stanje se prej doseže. Nihanje plazemskih koncentracij je neodvisno od konstante hitrosti eliminacije.

**e) vpliv dozirnega intervala ( $\tau$ )**

$$\tau_1 = 6 \text{ h}$$

$$\tau_2 = 8 \text{ h}$$

Dozirni interval ne vpliva na hitrost vzpostavitve stacionarnega stanja in na nihanja med največjimi in najmanjšimi koncentracijami v plazmi. Kako vpliva dozirni interval na nivo koncentracij v stacionarnem stanju?

**LITERATURA:**

1. J.Gabrielsson, S. Isaksson, Manual to MAXSIM, Simulation of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, A computer program for pharmacokineticsimulations, Biopharmacon, Uppsala 1989, 1-29.

## 9. vaja: HITROST ABSORPCIJE

Biološka uporabnost je definirana kot merilo za **obseg in hitrost absorpcije** učinkovine v centralni krvni obtok po ekstravaskularni (neintravenski) aplikaciji. **Obseg absorpcije** predstavlja delež aplicirane učinkovine, ki v nespremenjeni obliki doseže centralni krvni obtok. Časovni potek plazemske koncentracije učinkovine pa je odvisen tudi od kinetike procesa absorpcije. Na biološko uporabnost učinkovine tako vpliva tudi **hitrost absorpcije**, to je hitrost s katero učinkovina prihaja v centralni krvni obtok. Do zmanjšanja obsega absorpcije lahko pride zaradi predsistemskega metabolizma v prebavnem traktu ali jetrih, zaradi nepopolnega sproščanja iz farmacevtske oblike ali zaradi prisotnosti "absorpcijskega okna". Do sprememb hitrosti absorpcije pride največkrat zaradi hitrosti sproščanja, ki je posledica različnih pristopov k oblikovanju zdravil. Glede na namen oblikovanja je možno hitrost absorpcije ali pospešiti ali zadržati.

Največkrat predpostavimo, da absorpcija po ekstravaskularni aplikaciji poteka v skladu s kinetiko prvega reda z različno vrednostjo konstante  $k_a$  ali z različno absorpcijsko razpolovno dobo  $t_{1/2} = 0,693/k_a$ . Ocene za vrednosti  $k_a$  dobimo največkrat s pomočjo metode rezidualov iz plazemske koncentracijske krivulje ali iz urinske kumulativne količinske krivulje ob predpostavki, da se učinkovina porazdeljuje v skladu z zakonitostmi enoprostornega modela. Predpostavka o kinetiki absorpcije prvega reda je često zelo slabo utemeljena, posebno pa to velja za primere, ko imamo opravka s farmacevtsko obliko, ki sprošča učinkovino z drugačno kinetiko (ničti red, zaporedno ničti in prvi red ali obratno, vzporedno ničti in prvi red). V teh primerih moramo postopati tako, da najprej poiščemo odvisnost deleža oziroma odstotka absorbirane učinkovine od časa, nato pa iz diagrama delež oziroma odstotek neabsorbirane količine učinkovine-čas ali logaritem deleža oziroma odstotka neabsorbirane količine učinkovine-čas ugotovimo kinetiko absorpcije in vrednost konstante  $k_a$ .

Kot podatkovna baza za ugotavljanje kinetike absorpcije nam služi:

- **plazemska koncentracijska krivulja,**

rezultat farmakokinetične analize na osnovi te krivulje je Wagner-Nelsonova enačba:

$$\frac{(U_A)_t}{(U_A)_\infty} = \frac{(C_p)_t + k_{el} \int_0^t C_p dt}{k_{el} \int_0^\infty C_p dt} \quad (1)$$

Števec v enačbi 1 je definiran z vsoto plazemske koncentracije učinkovine v času  $t$  ter produktom celokupne konstante hitrosti eliminacije učinkovine in površine pod plazemsko koncentracijsko krivuljo na intervalu od časa 0 do  $t$ . Imenovalec je podan s produktom celokupne konstante hitrosti eliminacije učinkovine in površine pod plazemsko koncentracijsko krivuljo na intervalu od časa 0 do  $\infty$ .



- **urinska kumulativna količinska krivulja,**

rezultat farmakokinetične analize na osnovi te krivulje je Nelsonova enačba

$$\frac{(U_A)_t}{(U_A)_\infty} = \frac{(dU_{EU}/dt)_t + k_{el}(U_{EU})_t}{k_{el}(U_{EU})_\infty} \quad (2)$$

Števec v enačbi 2 je definiran z vsoto hitrosti izločanja učinkovine v urin v časovnem intervalu od  $t_1$  do  $t_2$  ter produktom celokupne konstante hitrosti eliminacije in do časa  $t$  v urin izločene količine učinkovine. Imenovalec je podan s produktom celokupne konstante hitrosti eliminacije učinkovine in celokupne v urin izločene količine učinkovine.

Vrednost konstante  $k_a$  izračunamo z metodo parov ali z metodo linearne regresije s pomočjo enačb (3) in (4), odvisno od tega ali daje linearni odnos logaritma frakcije neabsorbirane količine učinkovine ali frakcija neabsorbirane količine učinkovine v odvisnosti od časa. V prvem primeru dobimo vrednost  $k_a$ , ki je konstanta prvega reda z enoto  $h^{-1}$ , v drugem primeru pa dobimo vrednost  $k_a$ , ki je konstanta ničtega reda z enoto  $mg/h$ .

$$\ln \left[ 1 - \frac{(U_A)_t}{(U_A)_\infty} \right] = -k_a t \quad (3)$$

$$(U_A)_t = -k_a t \quad (4)$$

## DOLOČEVANJE HITROSTI ABSORPCIJE

Pri računski metodi za določevanje hitrosti absorpcije izhajamo iz plazemske koncentracijske krivulje ali urinske kumulativne količinske krivulje. Oba profila dobimo s pomočjo ustrezno načrtane farmakokinetične študije, ki sestoji iz naslednjih faz:

- izbor prostovoljcev
- aplikacija učinkovine v ustreznem odmerku in na ustrezen način
- odvzem plazemskih in/ali urinskih vzorcev v ustreznih časovnih intervalih
- analiza plazemskih in urinskih vzorcev na vsebnost učinkovine
- grafični prikaz odvisnosti plazemskih koncentracij in/ali urinskih kumulativnih količin od časa.

Postopek za določevanje hitrosti absorpcije je ilustriran z naslednjim primerom.

Po zaužitju 1 g počasi absorbirajoče učinkovine smo dobili trenutne plazemske koncentracije in kumulativne v urin izločene količine. Vrednosti so podane v tabeli 1.

Tabela 1: Koncentracije učinkovine v plazmi in kumulativne v urin izločene količine učinkovine po peroralni aplikaciji v odvisnosti od časa.

t (h)	$(C_p)_t$ (mg/L)	$(U_{EU})_t$ (mg)
1	20,4	10
2	32,9	23
3	39,1	46
4	41,7	70
6	40,8	119
8	36,4	166
10	31,2	206
12	25,8	242
16	17,8	293
20	12,5	325
24	8,0	352
28	6,0	366
32	3,9	378
36	2,7	383
40	1,8	389
48	-	400
56	-	400

S pomočjo podatkov v tabeli 1 (koloni t(h) in  $(C_p)_t$  (mg/L)) pristopimo k izračunu veličin iz števca in imenovalca enačbe (1), pri čemer  $k_{el}$  izračunamo z metodo parov ali z metodo linearne regresije iz naklona terminalnega dela plazemske koncentracijske krivulje v diagramu  $\ln(C_p)_t = f(t)$ , površine pod plazemsko koncentracijsko krivuljo na intervalu od časa nič do t pa izračunamo s trapezoidno metodo. Rezultati te analize so zbrani v tabeli 2.

Tabela 2: Izračun veličin Wagner-Nelsonove enačbe ( $k_{el} = 0,094 \text{ h}^{-1}$ ).

T (h)	$(C_p)_t$ (mg/L)	$\int_0^t C_p dt$ (mg/L)	$k_{el} \int_0^t C_p dt$ (mg/L)	$(U_A)_t/V$ (mg/L)	$(U_A)_t/(U_A)_\infty$	$100[1-(U_A)_t/(U_A)_\infty]$ (%)
1	20.4	10.20	0.96	21.36	0.34	66.4
2	32.9	36.85	3.47	36.37	0.57	42.8
3	39.1	72.85	6.86	45.96	0.72	27.7
4	41.7	113.25	10.66	52.36	0.82	17.6
6	40.8	195.75	18.42	59.22	0.93	6.8
8	36.4	272.95	25.68	62.08	0.98	2.3
10	31.2	340.55	32.05	63.25	1.00	-
12	25.8	397.55	37.41	63.21	0.99	-
16	17.8	484.75	45.61	63.41	1.00	-
20	12.5	545.35	51.32	63.82	1.00	-
24	8	586.35	55.18	63.18	0.99	-
28	6	614.35	57.81	63.81	1.00	-
32	3.9	634.15	59.67	63.57	1.00	-
36	2.7	647.35	60.92	63.62	1.00	-
40	1.8	656.35	61.76	63.56	1.00	-
$\infty$	-	675.48	63.56	63.56	1.00	-

Iz tabele 2 je razvidno, da se do konca prve ure absorbira 34% učinkovine oziroma jo je še 66% neabsorbirane. Enako velja za drugo uro (57% absorbirane, 43% neabsorbirane), tretjo uro (72% absorbirane, 28% neabsorbirane) preko četrte in šeste do konca osme ure, ko se absorbira 98% učinkovine, neabsorbirane pa ostane samo 2%. Deleži so podani glede na celotno količino absorbirane učinkovine.

S pomočjo podatkov v tabeli 1 (koloni t(h) in  $(U_{EU})_t$  (mg) pristopimo k izračunu veličin v števcu in imenovalcu enačbe 2, pri čemer izračunamo  $k_{el}$  z metodo parov ali z metodo linearne regresije iz naklona terminalnega dela krivulje v urin izločenih količin izločenih količin učinkovine v diagramu  $\ln((U_{EU})_\infty - (U_{EU})_t) = f(t)$ , časovno odvisnost diferenciala  $(dU_{EU}/dt)_t$  pa izračunamo iz podatkov v tabeli 1 tako, da so srednji časi intervalov v katerih računamo hitrost izločanja učinkovine v urin enaki časom odvzema urinskih vzorcev. Rezultati te analize so zbrani v tabeli 3.

Tabela 3: Izračun veličin Nelsonove enačbe ( $k_{el} = 0,095h^{-1}$ ).

T (h)	( $U_{EU}$ ) <sub>t</sub> (mg)	$t_1-t_2$ (h)	( $\Delta U_{EU}/\Delta t$ ) <sub>t</sub> (mg/h)	$k_{el}(U_{EU})_t$ (mg/h)	( $U_A$ ) <sub>t</sub> · $k_{eu}$ (mg/h)	( $U_A$ ) <sub>t</sub> /( $U_A$ ) <sub>∞</sub>	100[1 - ( $U_A$ ) <sub>t</sub> /( $U_A$ ) <sub>∞</sub> ] (%)
1	10	0-2	11.50	0.95	12.45	0.33	67.3
2	23	1-3	18.00	2.19	20.19	0.53	47.0
3	46	2-4	23.50	4.38	27.88	0.73	26.9
4	70	2-6	24.00	6.67	30.67	0.80	19.5
6	119	4-8	24.00	11.34	35.34	0.93	7.3
8	166	6-10	21.75	15.82	37.57	0.99	1.4
10	206	8-12	19.00	19.63	38.63	1.01	-
12	242	8-16	15.88	23.06	38.94	1.02	-
16	293	12-20	10.38	27.92	38.30	1.00	-
20	325	16-24	7.38	30.97	38.35	1.01	-
24	352	20-28	5.13	33.55	38.67	1.01	-
28	366	24-32	3.25	34.88	38.13	1.00	-
32	378	28-36	2.13	36.02	38.15	1.00	-
36	383	32-40	1.38	36.50	37.87	0.99	-
40	389	32-48	1.38	37.07	38.45	1.01	-
48	400	40-56	0.69	38.12	38.81	1.02	-
56	400						

Rezultati analize kinetike absorpcije po Nelsonovi metodi so primerljivi rezultatom Wagner-Nelsonove analize. Tako hitrost absorpcije kot tudi red kinetike lahko torej določimo neodvisno od vrste podatkov. Z uporabo enačbe 3 in metode parov ali linearno regresijo ugotovimo, da je v tem primeru kinetika procesa absorpcije prvega reda, vrednost konstante absorpcije  $k_a$  pa je  $0,5 h^{-1}$ .

#### LITERATURA:

1. Gibaldi M., Perrier D., Pharmacokinetics, Marcel Dekker, Inc., New York, 1975, 130-136.
2. Welling P.G., Pharmacokinetics, Processes and Mathematics, American Chemical Society, Washington (DC), 1997, 232-234.