MUNI PHARM

Zkouška disoluce a metody stanovení obsahu

Doc. Mgr. Jan Muselík, Ph.D.

Instrumentální analytické metody ve farmaceutické technologii/ Ústav farmaceutické technologie

2

Zkouška disoluce pevných lékových forem

Zkouškou disoluce se stanovuje množství uvolněné léčivé látky z pevné lékové formy (např. tablet, tobolek a čípků nebo transdermálních náplastí) v určitém čase a za přesně stanovených podmínek (*in vitro*).

Disoluce je nezbytný test při vývoji pevné lékové formy a jako součást kontroly kvality a je používána:

- Při **optimalizaci výrobních podmínek** (koncentrace, technologické parametry výroby, výběr nejvhodnějších pomocných látek) a výběr vhodných vzorků na další testování (např. *in vivo* testy).
- Pro odhad **mechanismu uvolňování** z lékové formy.
- Pro **ověření kvality přípravků (QC)**.

5

- Zkouška disoluce je používána při potvrzení neměnné kvality produktu (**stabilitní testy**). V pravidelných intervalech se provádí zkouška disoluce testovaného přípravku v předem stanovených podmínkách. Získané disoluční profily se porovnávají se vstupním disolučním profilem. Testují se 2-3 šarže konečného přípravku.
- Uplatňuje se při vývoji originálních léků i generik, používá se při porovnání disolučních profilů různých přípravků před započetím **bioekvivalenčních studií** nebo jako jejich ekvivalent (**biowaiver**, dle BCS).
- Odhad chování lékové formy v živém organismu – tzv. **in-vivo/in-vitro korelace** (IVIVIC). Potřeba testování nových léčiv a generických přípravků na živém organismu je velice nákladná, a proto se dnes vyvíjejí stále sofistikovanější metody, jak na základě výsledků „in vitro" předpovědět hladiny léčiv, resp. terapeutický účinek „in vivo".

6

Farmakokinetika popisuje osud léčiva po podání do organismu a rozlišuje následující fáze:

- Absorpce (vstřebávání) – v závislosti na povaze fyzikálně-chemické povaze látky, lékové formy, způsobu podání atd.
- Distribuce – transport léčiva do tkání, přestup přes biologické bariéry
- Metabolismus (biotransformace)
- Eliminace

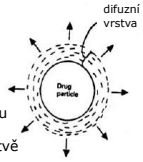
Biologická dostupnost je údaj, který vyjadřuje procento podané dávky, které je organismem využito. Biologickou dostupnost ovlivňuje zejména:

- Vstřebatelnost látky (nejčastěji po p. o. podání)
- Degradace látky ještě před vstřebáním
- First-pass efekt

$BD = AUC_{p.o.} / AUC_{i.v.}$

7

Parametry zkoušky disoluce



$\frac{dM}{dt} = DA\,(C_S - C_t)/h$ **Rychlost disoluce**

D = difuzní koeficient léčivé látky
A = plocha povrchu, která je v kontaktu s kapalinou
h = tloušťka difuzní vrstvy
C_S = koncentrace roztoku léčivé látky v difuzní vrstvě
C_t = koncentrace léčivé látky v čase t v roztoku

Maximální rychlost disoluce lze předpokládat, když $C_t = 0$; se zvyšující se C_t rychlost disoluce klesá (nutno dodržet **sink podmínky**).

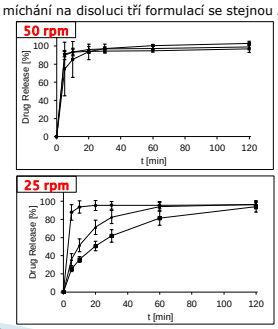
Difuzní koeficient (D) je závislý na **teplotě**, viskozitě prostředí a **průměru difundujících částic**.

Rychlost míchání disoluční kapaliny ovlivňuje tloušťku difuzní vrstvy (simulace peristaltiky).

8

Příklady

Vliv rychlosti míchání na disoluci tří formulací se stejnou API



9

Volba disolučního média v závislosti na fyzikálně chemických vlastnostech léčivé látky

Celá řada léčivých látek jsou soli, slabé kyseliny nebo báze, které prochází přes lipofilní membránu GIT v nedisociované formě. **pH prostředí** (respektive **pK_a léčivé látky**) ovlivňuje **disociaci** a **rozpustnost** a tím také vstřebávání, transport a vylučování léčiva. Nutno používat pH disolučního média, které odpovídá podmínkám v GIT.

Pro průnik lipofilní membránou gastrointestinálního traktu (GIT) je důležitá optimální **lipofilita** léčivé látky (velká lipofilita => kumulace; malá lipofilita => rychlá eliminace). Při zkoušce disoluce lipofilních léčiv je možno použít přídavku solubilizátoru (0,1-1 %).

Přítomnost enzymů (tzv. biorelevantní média)

Iontová síla

10

Běžně používané podmínky pro disoluci

Základní média – HCl o pH 1,2 (simulace podmínek v žaludku)
– fosfátový pufr (pH od 6,8 do 7,8) (simulace podmínek v tenkém střevě)
– objem 500 - 1000 ml (obvykle 900 ml)

Biorelevantní média – obsah enzymů, žluč. kyselin, atd.

Zkouška disoluce pro **minimálně 6 tablet/tobolek**

Otáčky – košíčku 50 - **100** min^{-1}
– míchadla **50** - 75 min^{-1} (25 min^{-1} pro ODT)

Teplota: **37 ± 0,5 °C** (32 ± 0,5 °C pro transdermální přípravky)

Ukončení disoluce: uvolněno alespoň 75 % léčiva (75-85 %)

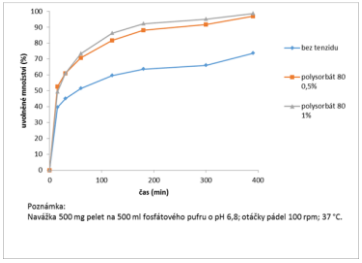
Označení	Název	Hodnota pH
voda	Voda	7,0
SGF	Umělá žaludeční šťáva	1,0-1,2
SDF	Umělá duodenální šťáva	3,5-6,1
SIF	Umělá střevní šťáva	6,8-7,2
SCF	Umělá kolonická šťáva	5,8-7,8

Základní disoluční média

11

Příklady

Vliv přídavku tenzidu do disolučního média

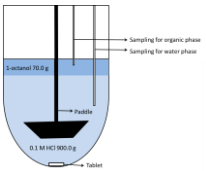


Poznámka:
Navážka 500 mg pelet na 500 ml fosfátového pufru o pH 6,8; otáčky pádel 100 rpm; 37 °C.

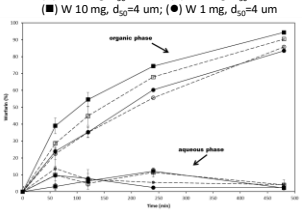
12

Příklady

Léčivo přechází v žaludku vlivem kyselého pH na nerozpustnou formu:
Bifázická disoluce



(□) W 10 mg, d_{50}=22 um; (○) W 1 mg, d_{50}=22 um
(■) W 10 mg, d_{50}=4 um; (●) W 1 mg, d_{50}=4 um



13

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS)

BCS rozděluje léčiva dle rozpustnosti a vstřebatelnosti.

Rozpustnost se hodnotí jako schopnost jedné terapeutické dávky léčiva rozpustit se z 85 % ve 250 ml média v rozsahu pH 1 - 6,8.

Vstřebatelnost je schopnost jedné terapeutické dávky léčiva vstřebat se při perorálním podání do systémového oběhu.

Třída	Rozpustnost	Vstřebatelnost
I	vysoká	vysoká
II	nízká	vysoká
III	vysoká	nízká
IV	nízká	nízká

Rozdělení látek podle biofarmaceutického klasifikačního systému

Poznámka: **BCS biowaver** pro třídy I a III např. při změně síly, složení nebo technologie (při splnění dalších podmínek)

14

PŘÍKLADY VYUŽITÍ ZKOUŠKY DISOLUCE
Optimalizace složení lékové formy

Příklad: úprava rychlosti rozpouštění léčiva z lékové formy
V současnosti stále častěji vývoj prakticky nerozpustných léčivých látek (léčiv): cytostatika, antibiotika, imunosupresiva, antidiabetika, antidepresiva vyšších generací.

Nejméně 40 % současných léčiv tvořeno těžce rozpustnými substancemi.

Úpravy lékové formy zvyšující rozpustnost:

- solubilizace (povrchově aktivní látky)
- molekulární inkluze (cyklodextriny)
- modifikátory pH

a další ....

16

Úpravy léčivé látky zvyšující rozpustnost :

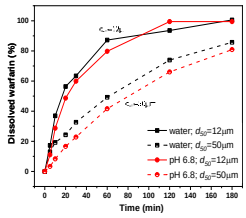
- tvorba solí (sodné a draselné soli se rozpouští rychleji než volné kyseliny)
- příprava hydrátů
- příprava glykosylovaných derivátů
- proléčiva
- změna krystalické struktury (polymorfismus, tvar krystalu)
- velikost částic - menší velikost částic zvyšuje rychlost rozpouštění (neplatí vždy, může docházet ke shlukování částic)

Rozpustnost – míra rozpustnosti (mísitelnosti) látky; kvantitativním vyjádřením je koncentrace nasyceného roztoku (za dané teploty).

17

Příklad

Vliv velikosti částic API na disoluci



18

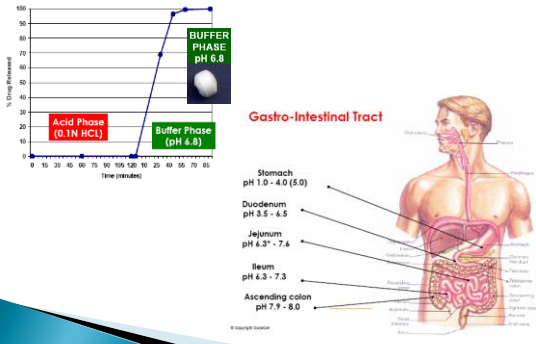
Optimalizace řízeného uvolňování léčiva

- prodloužené uvolňování
- zpožděné uvolňování léčiva
- pulzní uvolňování

Jde o léčiva, která jsou vyrobena takovým postupem a v takové formě, aby zabezpečila terapeutickou (léčebnou) hladinu léčivé látky v organismu po potřebnou dobu, většinou se jedná o dobu delší, než po podání základní formy léčiva. Posunutí uvolnění léčiva je např. používáno, když je třeba, aby léčivo nemuselo být podáváno v noci nebo dosáhlo terapeutické dávky v určitou denní dobu, nebo začalo působit v určité části trávícího traktu apod.

19

Příklad: Disoluční křivka pro obalenou lékovou formu (zpožděné uvolňování - uvolnění účinné látky ve střevě)



20

Odhad kinetiky a mechanismu uvolňování

Z průběhu zkoušky disoluce lze určit **kinetiku a mechanismus uvolňování léčivé látky** (u přípravků s prodlouženým uvolňováním).

- kinetika 0. řádu $M_t / M_\infty = k_0.t$
- kinetika 1. řádu $M_t / M_\infty = 1 - e^{k_1.t}$
- modely pro učení mechanismu uvolňování léčiva (difuze, bobtnání, eroze nebo jejich kombinace)

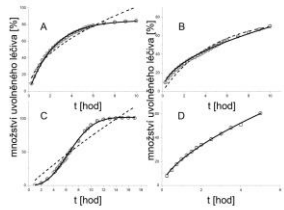
Korsmeyer-Peppas: $M_t / M_\infty = k.t^n$

n	Mechanismus uvolňování léčiva
0,5	Fickova difuze
0,5 < *n* < 1,0	anomální transport – kombinace difuze a bobtnání
1,0	kinetika 0–řádu (nezávislá na koncentraci léčiva) – tzv. *Case–II transport*
vyšší než 1,0	Bobtnání se s časem zrychluje – tzv. *Super Case–II transport*

21

Příklady

Odhad kinetiky a mechanismu uvolňování



Ukázka proložení různých typů disolučního profilu: (A) (—) vyhovující model I. řád, (---) nevyhovující Higuchiho model, **(B)** (—) vyhovující Higuchiho model, (---) nevyhovující model I. řád, **(C)** (—) vyhovující Weibullův model, (---) nevyhovující model I. řád, **(D)** (—) vyhovující Korsmeyerův-Peppasův model

22

Porovnání disolučních profilů

Shodu disolučních profilů je nutné ověřovat u:

- stabilitních testů (porovnání disolučních křivek v různých časech)
- bioekvivalečních studií (porovnání disolučních křivek originálu a generika), BCS biowaver
- kontroly kvality (porovnání disolučních křivek z různých šarží)

Faktor podobnosti f_2 nabývá hodnot 0 – 100. Hodnota 50 – 100 ukazuje na podobné disoluční profily a hodnota v intervalu 0 – 50 ukazuje na nepodobné disoluční profily.

$$f_2 = 50 \times \log\left\{\left[1+(1/n)\sum_{i=1}^{n}|R_i - T_i|^2\right]^{-0,5} \times 100\right\}$$

kde n je počet časových bodů, R_i a T_i jsou množství uvolněné léčivé látky srovnávacího (R) a hodnoceného (T) vzorku v daném čase.

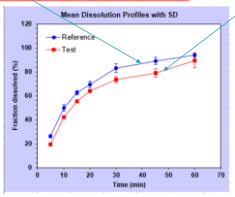
23

Příklady

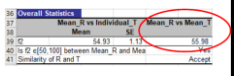
Porovnání disolučních profilů – faktor podobnosti f_2

Time (min)	Ref.1 F(%)	Ref.2 F(%)	Ref.3 F(%)	Ref.4 F(%)	Ref.5 F(%)	Ref.6 F(%)
0	24.06	26.81	27.33	25.36	26.13	27.42
10	45.26	51.84	48.16	51.21	49.41	52.11
15	61.22	62.24	60.09	63.55	62.09	65.61
20	66.04	67.25	69.35	71.09	68.84	73.54
30	80.25	85.97	81.14	83.47	79.08	88.19
45	86.09	89.22	89.72	89.24	87.32	93.56
60	91.72	93.39	93.75	92.12	95.92	95.22

Time (min)	Test.1 F(%)	Test.2 F(%)	Test.3 F(%)	Test.4 F(%)	Test.5 F(%)	Test.6 F(%)
0	17.32	17.82	18.97	19.97	21.29	20.25
10	41.81	42.13	42.64	42.82	41.87	41.85
15	56.72	56.42	56.08	53.23	55.73	53.89
20	63.04	64.04	64.62	64.87	61.85	64.92
30	77.83	74.65	73.91	72.49	69.35	72.37
45	80.07	74.28	77.93	82.63	82.94	75.36
60	89.08	95.34	96.31	90.88	85.33	80.24



Poznámka:
Pokud je průměrná hodnota disoluce pro oba přípravku do času 15 minut více než 85 %, lze profily automaticky považovat za podobné.



Pravidla pro výpočet f_2: min. 3 body (bez času 0); pouze 1 hodnota > 85 %; RSD max. 10 % (1. bod RSD max. 20 %).

24

Přístroje pro disoluci

Přesně dané rozměry prostoru ve kterém dochází k disoluci.

Použitelnost pro různé lékové formy, jednoduché vkládání a odběr vzorků.

Zamezení odpařování disoluční kapaliny.

Reprodukovatelné nastavení podmínek disoluce (teplota; počet otáček, případně průtoková rychlost disoluční kapaliny; čas, způsob a množství odebraného roztoku ke stanovení obsahu účinné látky).

Zamezení vibrací nebo výkyvů, rotace hnací hřídele a průtok celou jsou plynulé, bez vírů a bublinek.

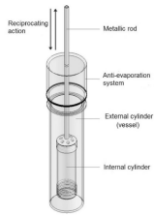
Všechny části přístroje, které přicházejí do styku s přípravkem nebo disoluční kapalinou, jsou chemicky inertní, a tedy neadsorbují hodnocené látky, nereagují ani neinterferují se zkoušeným vzorkem.

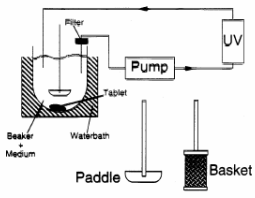
Propojení s vhodnou analytickou metodou pro stanovení obsahu účinné látky.

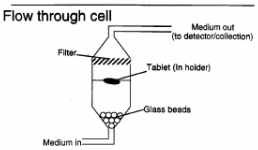
25

Typy přístrojů dle ČL:

1. přístroj s míchadly
2. přístroj s košíčky
3. přístroj s průtokovou celou
4. přístroj s vratným válcem







27

Metody pro pevné lékové formy

Nejběžněji používané jsou přístroje s míchadly a košíčky. Jsou to uzavřené systémy, ve kterých zůstává uvolněná léčivá látka v průběhu celého experimentu. *In-vivo* je léčivá látka absorbována, proto jsou používány také přístroje s průtokovou celou (otevřený systém, uvolněná účinná látka je unášena z průtokové cely – **„sink" podmínky**). Nevýhodou tohoto systému je, že na lékovou formu nepůsobí mechanické síly, které by simulovaly peristaltický pohyb v lidském těle. Přístroj s vratným válcem umožňuje jednoduchou změnu disoluční kapaliny.

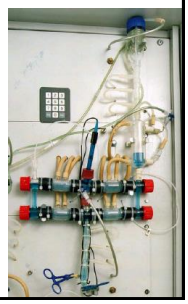
28

Disoluční model gastrointestinálního traktu

Počítačem řízený *in-vitro* systém
Průběžné sledování a regulování mnoha parametrů (teplota, pH, žaludeční a střevní promíchávání, transport peristaltickým pohybem, trávicí enzymy)
Systém může obsahovat i střevní mikroflóru

Aplikace:
- dostupnost účinné látky pro absorpci
- řízené uvolňování léčiva
- interakce léčiva s potravou
- biokonverze látek mikroflórou

Výhody:
Reprodukovatelnost výsledků, rychlé studie vzhledem ke studiích na zvířatech, odpadají etické problémy s pokusy na zvířatech, možnost sledovat průchod vzorku žaludkem a střevem v čase.



29

Průběh uvolňování účinné látky z lékové formy při disoluci sledujeme **vhodnou analytickou metodou**.
Výběr metody závisí na:
- fyzikálně-chemických vlastnostech vzorku (např. absorpce záření sledovanou látkou)
- koncentraci sledované látky
- jednoduchosti metody a ceně

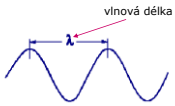
Velmi často používanou metodou je UV/VIS spektrometrie (on-line). Okamžité stanovení obsahu účinné látky pomocí UV/VIS spektrometrie se používá u disoluce v případě, že sledovaná látka absorbuje záření při vlnových délkách, kde neabsorbují jiné látky obsažené v měřeném roztoku. Pokud tomu tak není, je nutné účinnou látku nejprve oddělit od ostatních pomocí některé separační techniky (např. kapalinová chromatografie).

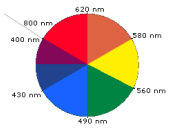
30

Zkouška disoluce on-line
Detekce UV/VIS spektrometrií

Při identifikaci je jedním z jasných rozdílů mezi látkami jejich barva.

Když prochází bílé světlo roztokem nebo je odraženo povrchem barevné látky, je část záření absorbována.
Zbylé záření (to které se nám jeví jako barva předmětu) bude mít barvu komplementární k absorbovaným vlnovým délkám.





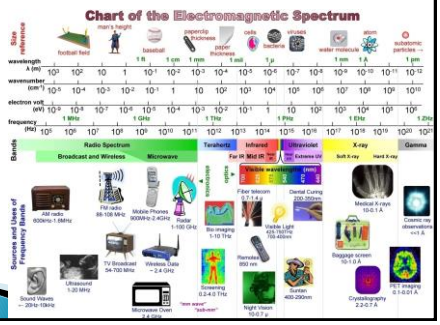
31

Viditelné záření představuje jen malou část celkového elektromagnetického spektra. Většina záření kolem nás není vidět, ale může být pozorována (využívána) přístroji. Rozsah elektromagnetického záření je od krátkých vlnových délek (vysoká energie = X-ray, gama) k dlouhým vlnovým délkám (nízká energie = radiové vlny).

Energie spojená s danou oblastí spektra je úměrná frekvenci.

$$\nu = c/\lambda$$
$$\Delta E = h * \nu$$

ν - frekvence
λ - vlnová délka
c - rychlost světla
E - energie
h - Planckova konstanta

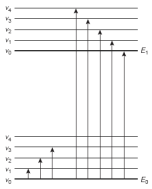


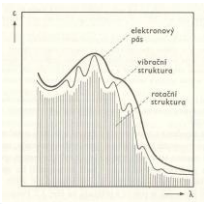
32

Teoretické základy

Energie molekuly
- vnitřní — energetické hladiny atomů
- pohybová — eneretické hladiny elektronů E_E
  - translační E_T (není kvant.)
  - rotační E_R (plynné skup.)
  - vibrační E_V

$E_E > E_V > E_R > E_T$



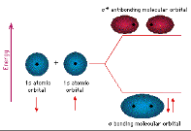


33

Mezi barvou látek (absorbovanými vlnovými délkami) a strukturou existuje souvislost.
Při absorpci ultrafialového nebo viditelného záření molekulou nebo iontem dojde k přechodu elektronu na vyšší energetickou hladinu. Energie absorbovaného záření odpovídá energetickému rozdílu mezi hladinami.

elektrony
- **valenční** — vazebné orbitaly; antivazebné orbitaly
- subvalenční (vnitřní hladiny; neovlivněny UV/VIS zářením)
- **nevazebné** (zůstávají v původních atomových orbitalech; volné elektronové páry)

Energie dodaná zářením excituje elektron z orbitalu v základním stavu do orbitalu s vyšší energií.



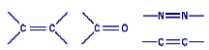
Orbital ohraničuje oblast, kde je nejvyšší pravděpodobnost výskytu daného elektronu.

34

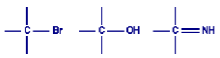
Přechody elektronů nastávají mezi několika typy orbitalů:

1. σ (vazebný)

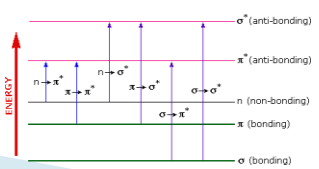
2. π (vazebný)



3. n (nevazebný)



4. σ^* (antivazebný)
5. π^* (antivazebný)



35

6 TYPŮ:

σ→π*
π→σ*
σ→σ* - vzdálená UV oblast
- jednoduché vazby

} malý význam

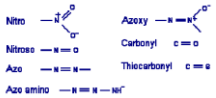
n→σ* - molekuly s volnými elektronovými páry (v nevazebných orbitalech); **O, S, N**

π→π* - nenasycené sloučeniny

n→π* - -C=O⟩ -C=S⟩ -N=O⟩

36

CHROMOFOR– funkční skupina v molekule odpovědná za absorpci záření v UV a Vis oblasti.

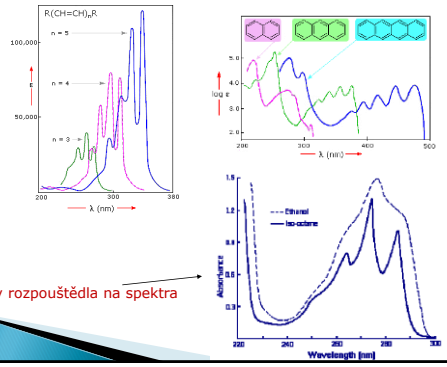


AUXOCHROM – funkční skupina, která způsobuje posun λ absorpčních maxim chromoforů a mění intenzitu pásů, př.: OH, NH_2, halogenidy.

Bathochromní (červený) posun – k delším λ.
Hypsochromní (modrý) posun – ke kratším λ.
Hyperchromní efekt – zvýšení intenzity absorpce.
Hypochromní efekt – snížení intenzity absorpce.

37

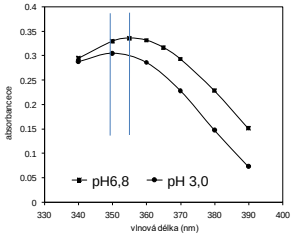
Vliv konjugace na spektra



Vliv rozpouštědla na spektra

38

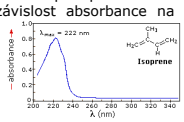
Vliv pH rozpouštědla na spektra



39

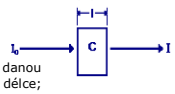
Měření spekter

Když je vzorek vystaven záření o energii odpovídající možnému elektronovému přechodu v molekule, část této energie bude absorbována a dojde k excitaci elektronu do orbitalu s vyšší energií. Spektrometr zaznamená vlnové délky při kterých tato absorpce nastala, společně s intenzitou absorpce pro každou vlnovou délku. Výsledné spektrum je závislost absorbance na vlnové délce.



Transmitance: $T = I/I_0 * 100$ (%)
Relativní část prošlého záření

Absorbance (extinkce):
$A = \log I_0/I$ ← Lambert-Beerův zákon
$A = \varepsilon * c * l$
c = koncentrace (mol/l); l = tloušťka vrstvy (cm);
ε = molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce; $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$)

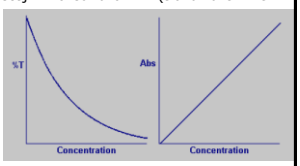


$A^{1\%}_{1cm}$ - specifická absorbance, vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g/l měřenou v 1 cm vrstvě při určité vlnové délce

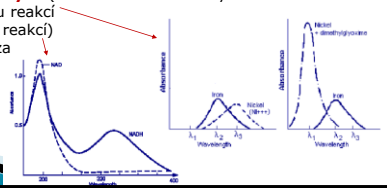
40

Absorbance se měří nejčastěji v rozsahu 0 – 1 (90% záření ze zdroje je absorbováno).

0%T = ∞ A
0.1% = 3.0A
1.0%T = 2.0A
10%T = 1.0A
100% = 0A



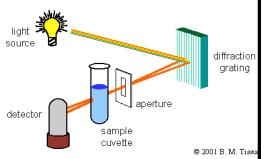
Využití:
kvantitativní analýza (stanovení obsahu látky ve zředěném roztoku)
sledování průběhu reakcí
kinetika (rychlost reakcí)
kvalitativní analýza



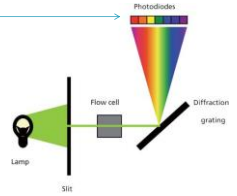
41

Instrumentace

Zdroje záření – nejčastěji deuteriová lampa (UV/VIS), přístroje pouze pro viditelnou oblast používají wolframovou žárovku.



Monochromátory – výběr vlnové délky při které měříme (mřížka nebo hranol; materiál křemen, sklo, kazivec, ...). Často se používají i přístroje s **diodovým polem** (tzv. DAD).



42

Diodové pole (diode array detector, DAD) – seskupení několika set fotodiod, které pokrývají všechny vlnové délky v UV/VIS oblasti => měří celé absorpční spektrum vzorku najednou, není nutný monochromátor, měření je mnohem rychlejší.

Detektory – fotonásobiče, fotoelektrické články. Pracují tak, že dopadající záření uvolňuje elektrony z povrchu fotonásobiče nebo fotoelektrického článku => vzniklý proud se měří.

Kyvety – pro UV oblast křemen, pro VIS oblast sklo (nebo plast – kyvety jednorázové).

UV/VIS oblast
cca 100 000 - 300 000 Kč

VIS oblast

cca 50 000 Kč

43