

# Oslobađanje lijekova iz koloidnih terapijskih sustava in vitro

---

Hafner, Anita; Karković Marković, Ana; Ferić, Nikolina; Filipović-Grčić, Jelena

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2013, 69, 603 - 614**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:514906>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Oslobađanje lijekova iz koloidnih terapijskih sustava *in vitro*

ANITA HAFNER<sup>1</sup>, ANA KARKOVIĆ MARKOVIĆ<sup>2</sup>, NIKOLINA FERIĆ<sup>3</sup>,  
JELENA FILIPOVIĆ-GRČIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku tehnologiju

<sup>2</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za fizikalnu kemiju

<sup>3</sup>PLIVA Hrvatska d.o.o., Odjel za farmakovigilanciju

## UVOD

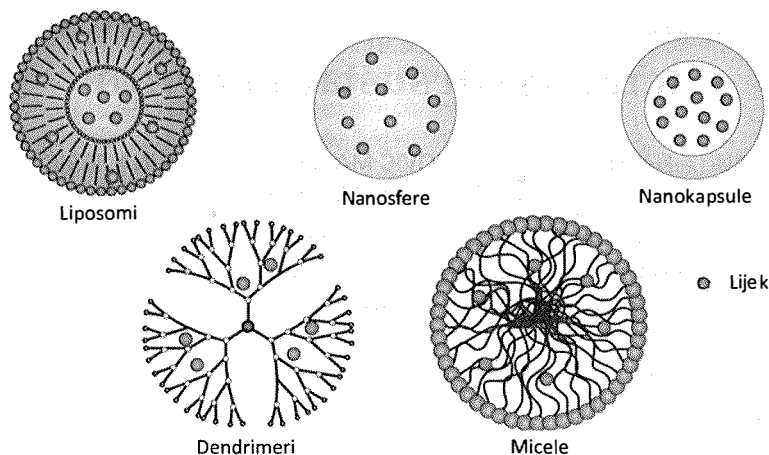
Suvremena istraživanja u području farmacije dijelom su usmjerena prema sinteziranju i izoliranju potpuno novih ljekovitih tvari, a dijelom prema novim i boljim metodama oblikovanja i primjeni već poznatih ljekovitih tvari – novim terapijskim sustavima. Terapijski sustavi mogu dopremiti djelatnu tvar na željeno mjesto u potrebnoj dozi i trajanju, s predvidljivom i reproducibilnom kinetikom te smanjenim nuspojavama. Naime, glavne prepreke stizanju lijekova do odgovarajućeg biološkog odjeljka su nedostatna topljivost u vodi i nestabilnost te ograničeni transport kroz biološke barijere, što u konačnici znači malu bioraspoloživost. Terapijski sustavi mogu poboljšati topljivost lijeka, zaštititi lijek od razgradnje u biološkoj okolini i olakšati mu transport do mjesta djelovanja. Tim se konceptom mogu poboljšati svojstva klasičnih, na tržištu već prisutnih lijekova, te još važnije, novi terapijski sustavi mogu omogućiti uvođenje novih terapeutika kao što su peptidi, glikoproteini, oligonukleotidi i geni (1–4).

Među terapijskim sustavima s najvećim farmaceutskim potencijalom posebno mjesto zauzimaju koloidni terapijski sustavi. Sposobnost tih sustava da poboljšaju farmakokinetička svojstva lijeka ovisi o svojstvima koloidnog nosača kao što su veličina čestica, površinski naboj, hidrofilnost površine i stabilnost, ali isto tako i o uspješnosti uklapanja i kinetici oslobađanja lijeka.

## Koloidni terapijski sustavi

Koloidni terapijski sustavi su disperzni sustavi u kojima je lijek sadržan u disperznoj fazi koju čine čestice nanometarskih veličina građene od polimera i/ili lipida. Svaka nanočestica disperzne faze je nosač lijeka. Nosači lijeka u koloidnim terapijskim sustavima mogu biti liposomi, micelle, dendrimeri, nanosfere i nanokapsule koji

se međusobno razlikuju po građi i načinju uklapanja lijeka (slika 1.). Disperzna faza jednoliko je razdijeljena u disperznom sredstvu (kontinuiranoj fazi) koje je najčešće vodeni medij.

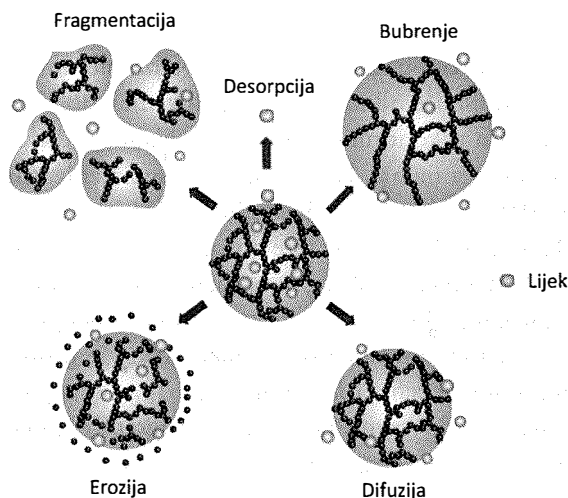


**Slika 1.** Shematski prikaz nosača lijeka u koloidnim terapijskim sustavima (prilagođeno prema (5)); Zasada se na EU tržištu nalazi desetak liposomskih pripravaka od kojih većina sadrži uklopljene antitumorske lijekove (primjerice, DepoCyt<sup>®</sup>, Caelyx<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup>, DaunoXome<sup>®</sup>, Mepact<sup>®</sup>), te albuminske nanočestice s paklitakselom (Abrexane<sup>®</sup>), koji se pokazao učinkovitijim od prethodnih oblika paklitaksela (6).

Molekule lijeka mogu biti vezane za polimerne i/ili lipidne molekule koloidnog nosača vodikovom, ionskom, dipolnom ili kovalentnom vezom i/ili mogu biti fizički uklopljene (inkapsulirane) ili adsorbirane na površinu koloidnog nosača – nanočestice. U većini slučajeva uključeno je više različitih mehanizama vezanja/uklapanja (7). Proces u kojem molekule lijeka napuštaju nosač i postaju raspoložive za apsorpciju i farmakološku aktivnost naziva se oslobađanje lijeka. Mehanizam oslobađanja lijeka ovisi o svojstvima nosača i načinu vezanja/uklapanja lijeka u nosač pa se tako oslobađanje lijeka može odvijati desorpcijom s površine, otapanjem i difuzijom kroz (izbubreni) matriks ili stijenku (membranu), erozijom ili fragmentacijom matriksa nosača (slika 2.). Ukoliko su molekule lijeka kovalentno vezane za polimerne nosače oslobađanju prethodi kemijsko ili enzimsko cijepanje tih veza u organizmu. U većini slučajeva radi se o kombinaciji navedenih mehanizama oslobađanja. Ako je lijek uklopljen unutar matriksa uključeni su procesi difuzije i erozije, dok će difuzija biti glavni mehanizam ako nosač nije biorazgradljiv. Ako je nosač građen od polimera koji bubri, oslobađanje lijeka bit će kontrolirano difuzijom kroz izbubreni matriks.

### Zašto se provodi ispitivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro*?

Ispitivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* je standardizirano ispitivanje koje se provodi radi osiguranja kvalitete gotovih lijekovitih oblika, od klasičnih čvrstih oralnih oblika (tableta, kapsula) do suspenzija, krema, masti, gelova, supozitorija,



Slika 2. Mehanizmi oslobađanja lijeka iz nosača (prilagodeno prema (8)).

transdermalnih sustava i brojnih pripravaka produljenog oslobađanja lijeka. Ispitivanja kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* mogu se koristiti i za predviđanje ponašanja sustava *in vivo*. *In vitro* oslobađanje lijeka može poslužiti i kao indirektna mjera raspoloživosti lijeka, posebice u preliminarnoj fazi razvoja formulacije. Ako se utvrdi *in vitro* *in vivo* korelacija, pri određenim uvjetima *in vitro* oslobađanje lijeka može poslužiti u određivanju bioekvivalencije (9, 10). Standardne aparature za ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro* (aparatura s rotirajućom košaricom, aparatura s rotirajućom lopaticom, *reciprocating cylinder* (uranjajući cilindri), aparatura s protočnom ćelijom) detaljno su opisane u Europskoj farmakopeji (11).

### Ispitivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz koloidnih terapijskih sustava

Određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* predstavlja važan korak u razvoju i kontroli kvalitete koloidnih terapijskih sustava. Kinetika oslobađanja lijeka *in vitro* otkriva osnovne značajke fizičko-kemijske strukture i ponašanja formulacije na molekularnom nivou, moguće interakcije molekula lijeka i molekula nosača te njihov utjecaj na brzinu i mehanizam oslobađanja lijeka. Te spoznaje pridonose usmjerenom razvoju koloidnih terapijskih sustava kojima se lijek može dopremiti na ciljno mjesto u pravo vrijeme i u potrebnoj količini. Oslobađanje lijeka iz nosača nanometarskih veličina uglavnom je bifazni proces: početno naglo oslobađanje (koje je posljedica velikog omjera ukupne površine prema volumenu nanočestica) praćeno je sporijim (kontroliranim) oslobađanjem (12). Produljeno oslobađanje lijeka osnovni je preduvjet za postizanje produljenog učinka lijeka. Pripravci s produljenim oslobađanjem lijeka odlikuju se postizanjem jednoličnije koncentracije lijeka u krvi i smanjenjem toksičnosti i nuspojava lijeka.

## Metode

Određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz koloidnih sustava predstavlja veliki izazov. Glavne poteškoće odnose se na odjeljivanje oslobođenog lijeka od suspendiranih čestica nosača u kontinuiranoj fazi (9). Naime, odjeljivanje je tim teže i sporije što su čestice nosača manje. Istodobno se uz smanjenje veličina čestica može očekivati sve brže oslobađanje lijeka zahvaljujući većoj izloženoj površini s koje se oslobađanje događa. U konačnici sve je teže postići dovoljno brzo odjeljivanje čestica od molekula oslobođenog lijeka s obzirom na brzinu oslobađanja lijeka. Metode *in vitro* ispitivanja oslobađanja lijekova koje se trenutno primjenjuju pri karakterizaciji koloidnih sustava su metode membranske difuzije, metode uzorkovanja i odjeljivanja, metode kontinuiranog tečenja i *in situ* metode. Te su metode u nastavku prikazane zajedno s njihovim prednostima, nedostacima i ograničenjima. Kvaliteta i značaj rezultata ispitivanja kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* prvenstveno ovise o odabiru metode ispitivanja i o njenim izvedbenim postavkama (vrsta i volumen receptorskog medija, temperatura, miješanje...) o kojima će ovisiti:

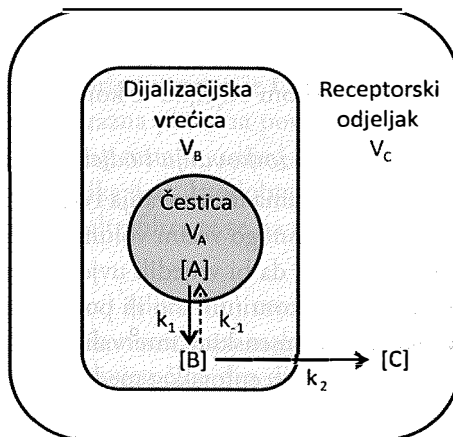
1. Uvjeti osigurane topljivosti koji su postignuti ako je volumen receptorskog medija najmanje tri puta veći od volumena potrebnog za pripremu zasićene otopine lijeka, uzimajući u obzir količinu lijeka koja je sadržana u pripravku (13). Iako uvjeti osigurane topljivosti ne moraju vrijediti u *in vivo* uvjetima, poželjno ih je osigurati tijekom *in vitro* ispitivanja oslobađanja. Ako se koriste mali volumeni receptorskog medija, može se primijeniti potpuna zamjena medija u svrhu očuvanja uvjeta osigurane topljivosti.
2. Mogućnost točnog određivanja početnog naglog oslobađanja lijeka, jer ono može utjecati na učinkovitost i sigurnost primjene *in vivo*.
3. Mogućnost određivanja utjecaja promjene parametara proizvodnog postupka na formulaciju (robustnost metode). Takvo razlučivanje korisno je u kontroli kvalitete, a može pridonijeti i dizajnu i razvoju koloidnih terapijskih sustava (10).

### Metode membranske difuzije

Metode membranske difuzije smatraju se najprikladnijim za određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz nosača nanometarskih veličina. Pri tim metodama koloidni terapijski sustav (donorski odjeljak) odijeljen je od receptorskog medija (receptorski odjeljak) dijalizacijskom membranom. Odabire se membrana definirane veličine pora koja omogućuje difuziju molekula lijeka, ali ne i difuziju čestica koloidnog nosača, u receptorski medij. Uz preporučeno stalno miješanje obaju odjeljaka, lijek prvo difundira iz nosača u kontinuiranu fazu u donorskom odjeljku, a potom kroz dijalizacijsku membranu u receptorski odjeljak (slika 3.). U određenim vremenskim razmacima uzimaju se uzorci receptorskog medija u kojima se određuje koncentracija oslobođenog lijeka (7). Volumen kontinuirane faze ( $V_B$ ) u kojoj su čestice suspendirane obično je 6–10 puta manji od volumena receptorskog medija ( $V_C$ ), čime se

osigurava koncentracijski gradijent nužan za difuziju lijeka u receptorski medij i očuvanje uvjeta osigurane topljivosti (10).

Najčešće se mali volumen koloidnog terapijskog sustava stavlja u dijalizacijsku vrećicu (donorski odjeljak) koja se uranja u veći volumen receptorskog medija (receptorski odjeljak) (slika 3.). Umjesto dijalizacijske vrećice mogu se koristiti i kivete koje na dnu imaju dijalizacijsku membranu. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka može se provoditi i na difuzijskoj čeliji koju čine donorski i receptorski odjeljci između kojih je postavljena dijalizacijska membrana.



Slika 3. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka iz koloidnog nosača metodom membranske dijalize upotrebom dijalizacijske vrećice

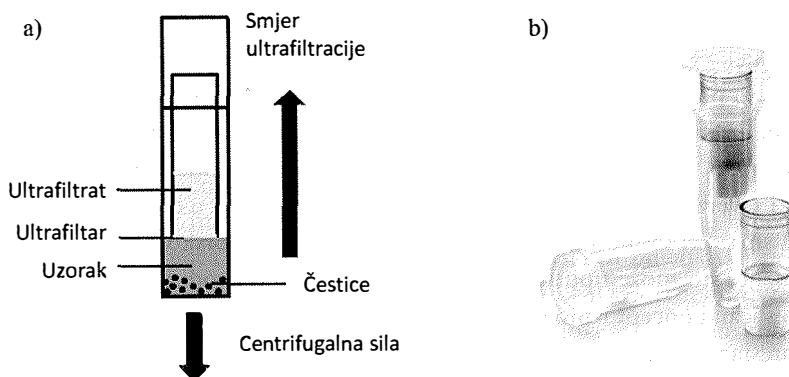
U metode membranske difuzije ubraja se i metoda reverzne dijalize, kod koje se čestice s uklopljenim lijekom dispergiraju u vanjskom mediju, a u dijalizacijskoj vrećici se nalazi receptorski medij u koji će oslobođene molekule lijeka difundirati te se stoga uzorci za određivanje koncentracije oslobođenog lijeka uzimaju iz dijalizacijske vrećice. Prednosti reverzne nad klasičnom dijalizom su sigurni uvjeti osigurane topljivosti, a mogućnost začepjenja pora dijalizacijske membrane je minimalna (9).

Metode membranske dijalize su iznimno zastupljene u ispitivanju *in vitro* oslobađanja lijeka iz koloidnih sustava. Prednosti metoda dijalize pred drugim metodama su jednostavnost uzorkovanja i nadomještanja receptorskog medija s obzirom da su čestice fizički (dijalizacijskom membranom) odijeljene od receptorskog medija. No, važno je ipak naglasiti da nekritična interpretacija dobivenih rezultata može navesti na pogrešne zaključke o kinetici oslobađanja lijeka iz koloidnih nosača (14, 15). Naime, kako je već rečeno, pojava lijeka u receptorskom mediju posljedica je dvaju procesa: (a) oslobađanja lijeka iz nosača u kontinuiranu fazu u donorskom odjeljku i (b) difuzije lijeka kroz dijalizacijsku membranu iz donorskog u receptorski odjeljak. Svaki od ta dva procesa može ograničavati brzinu dijalizacijskog procesa. Ako je difuzija kroz dijalizacijsku membranu ograničavajući faktor, onda dobiveni rezultati ne govore mnogo o kinetici oslobađanja lijeka iz nosača. Također, treba razmotriti i mogućnosti reverzibilnog vezanja oslobođenog lijeka na nosač u donorskom odjeljku, koje mogu smanjiti termodinamičku aktivnost lijeka u donorskom odjeljku a time i brzinu difuzije, što može uputiti na pogrešne zaključke o produljenom oslobađanju lijeka. Vrlo sličan koncept iznio je i Washington C., naglašavajući da ako u donorskom odjeljku prestanu vrijediti uvjeti osigurane topljivosti (uslijed brzog oslobađanja lijeka, malog volumena donorskog odjeljka i/ili ograničene difuzije kroz dijalizacijsku

membranu) brzina difuzije lijeka u receptorski medij neće značajno ovisiti o brzini oslobađanja lijeka, već o koeficijentu razdjeljenja lijeka između nosača i kontinuirane faze u donorskom odjeljku te konstanti brzine difuzije lijeka u mediju (16).

### Metode uzorkovanja i odjeljivanja

U metodama uzorkovanja i odjeljivanja suspenzije čestica s uklopljenim lijekom razrjeđuju se mnogo većim volumenom receptorskog medija. Volumen medija treba biti prilagođen da bi vrijedili uvjeti osigurane topljivosti. Miješanje tijekom ispitivanja može biti kontinuirano ili povremeno. Uzorci razrijeđenog sustava uzimaju se u određenim vremenskim intervalima. Nakon uzorkovanja potrebno je nadomjestiti uzeti volumen receptorskog medija, da bi se očuvali uvjeti osigurane topljivosti (10). U uzetim uzorcima čestice se odjeljuju od medija s oslobođenim lijekom centrifugiranjem ili filtracijom (7). Takav pristup široko je primjenjivan u ispitivanju oslobađanja lijeka iz mikročestica koje se mogu uspješno odijeliti filtriranjem ili centrifugiranjem u trajanju od najviše nekoliko minuta, dok oslobađanje lijekā traje satima. Ipak, kako se veličina čestica smanjuje, teškoće odjeljivanja se povećavaju. Za potpuno odjeljivanje čestica nanometarskih veličina primjenjuje se ultracentrifugiranje i ultrafiltracija. No, treba imati na umu da primjena tako jakih sila u svrhu odjeljivanja čestica može narušiti njihov integritet i tako utjecati na profil oslobađanja uklopljenog lijeka (17). Pri ultrafiltraciji treba uzeti u obzir mogućnost vezanja oslobođene frakcije lijeka na filtre. Danas su dostupne ultrafiltracijske membrane s malim kapacitetom vezanja, ali čak i one adsorbiraju male količine lijekova. Također, čestice mogu začepiti pore filtra što rezultira ograničenim volumenom filtriranog uzorka. Brza i korisna varijanta te tehnike uključuje razrjeđivanje male količine (oko 10 mg) suspendiranih čestica sa 100 mL kontinuirane faze u injekciji volumena 100 mL opremljenoj membranskim filtrom (0,2  $\mu\text{m}$ ). Na taj se način može postići vrlo kratki vremenski interval uzimanja uzoraka (~30 s), ali začepljenje filtra obično ograničava broj uzoraka koji se mogu dobiti (9).



**Slika 4.** Shematski prikaz sustava Centrisart® (Sartorius) (a) te dijelovi sustava Microcon (Millipore) (b) (18)

Odjeljivanje čestica od medija s oslobođenim lijekom može se brzo postići centrifugalnom ultrafiltracijom. Široka dostupnost jednostavnih centrifugalnih ultrafiltra čini ovu metodu lako primjenjivom. Osobito koristan sustav je Centrisart<sup>®</sup> (Sartorius) kod kojeg kiveta s ultrafiltrom u početku prazna pluta na površini uzorka u glavnoj centrifugalnoj kiveti. Centrifugiranjem takvog sustava, uslijed djelovanja centrifugalne sile, filtrat ulazi u kivetu s ultrafiltrom (slika 4.a). Istodobno, sila koja djeluje na čestice u uzorku usmjerena je suprotno od ultrafiltra te se na taj način izbje-gava njegovo začepljenje (9).

Na tržištu je dostupan i Microcon<sup>®</sup> (Millipore) (slika 4.b) centrifugalni filtar pomoću kojeg se jednostavno i učinkovito mogu ukoncentrirati makromolekularne otopine. Riječ je o iznimno jednostavnom sustavu kojeg čine dva dijela: cilindrični nosač celulozne membrane (veličina pora od 3000 do 100000 Da) na koju se nanosi uzorak i klasična polipropilenska kiveta zapremnine 1,5 mL u koju se nosač može uložiti. Nakon zatvaranja, sustav se centrifugira. Membrana niskog adsorptivnog kapaciteta osigurava visok prinos (> 95 % uzorka) s faktorom koncentriranja do 100 puta te pouz-dane i reproducibilne rezultate. Volumeni uzorka mogu biti u rasponu od 10–500  $\mu$ l (18).

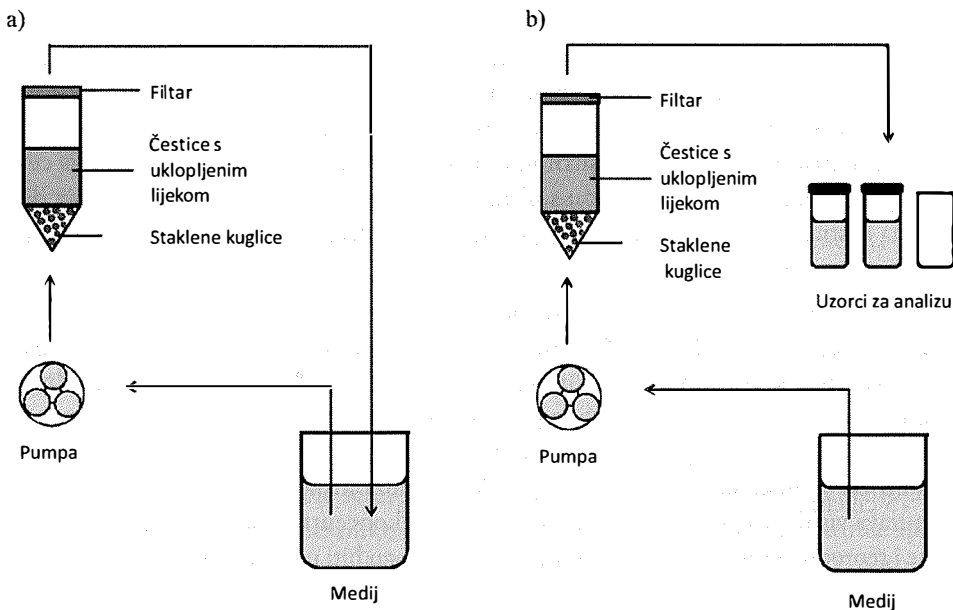
Svim metodama uzorkovanja i odjeljivanja zajednički nedostatak je gubitak čes-tica nosača s uklopljenim lijekom uslijed uzorkovanja, što u konačnici rezultira nepot-punim profilom oslobađanja lijeka (19).

### Metode kontinuiranog tečenja

Za metode kontinuiranog tečenja karakterističan je konstantan protok medija kroz ćeliju koja sadrži čestice s uklopljenim lijekom (slika 5.). Koristi se aparatura s protočnom ćelijom (*Apparatus 4-flow-through cell*), opisana u Europskoj farmakopeji, a sastoji se od spremnika receptorskog medija, pumpe koja osigurava protok medija kroz protočnu ćeliju (od dna prema vrhu), vertikalno postavljene protočne ćelije sa sustavom za filtriranje i vodene kupelji koja održava temperaturu receptorskog medija na  $37 \pm 0.5^\circ$  (11). Konus na dnu ćelije obično je ispunjen staklenim kuglicama. Recep-torski medij može cirkulirati (slika 5.a) ili se može konstantno dovoditi svježi medij (slika 5.b) (10).

Najvažnija prednost metoda kontinuiranog tečenja je mogućnost automatizacije svih procesa, uključujući zamjenu medija, uzorkovanje i analizu uzoraka. Nedostaci metode su varijacije brzine protoka zbog začepjenja pora filtra zbog čega se povećava tlak u sustavu. U većini slučajeva se, zbog smanjene brzine protoka, lijek nepotpuno oslobađa iz čestica nosača zbog njihove sporije hidratacije te otapanja i difuzije lijeka u medij. Stoga je brzina protoka vrlo važan parametar pri određivanju kinetike oslo-bađanja lijeka *in vitro* metodom kontinuiranog tečenja. Drugi važan parametar je volu-men medija, kojeg treba prilagoditi topljivosti lijeka i osjetljivosti analitičke metode za određivanje koncentracije oslobođenog lijeka. U slučaju cirkuliranja medija, uvjeti osigurane topljivosti mogu se očuvati zamjenom dijela volumena ili cijelog volumena medija (10).





**Slika 5.** Shematski prikaz ispitivanja *in vitro* oslobađanja metodom kontinuiranog tečenja: (a) uz cirkulaciju medija, (b) uz stalno dovođenje svježeg medija.

### *In situ* metode

*In situ* metode podrazumijevaju određivanje koncentracije oslobođenog lijeka direktno u receptorskom mediju bez potrebe uzorkovanja i odjeljivanja čestica nosača od molekula oslobođenog lijeka. Te su metode rijetko primjenjive, jer zahtijevaju analitičke metode koje su osjetljive na otopljeni (oslobođeni) lijek, a neosjetljive na uklopljeni lijek, onaj unutar čestica nosača ili vezan za njihovu površinu. Od tih metoda najčešće se primjenjuje optička apsorpcija jer većina molekula ima različite spektroskopske značajke ovisno o tome jesu li vezane za čestice ili se nalaze slobodne u otopini. Također se mogu primjenjivati i elektrokemijske metode, polarografija i ion-selektivna detekcija. Nadalje, budući da su mnogi lijekovi slabe kiseline ili baze, njihovo oslobađanje uzrokovat će promjenu pH receptorskog medija, pa stoga praćenje promjene pH može poslužiti kao metoda određivanja koncentracije oslobođenog lijeka (9).

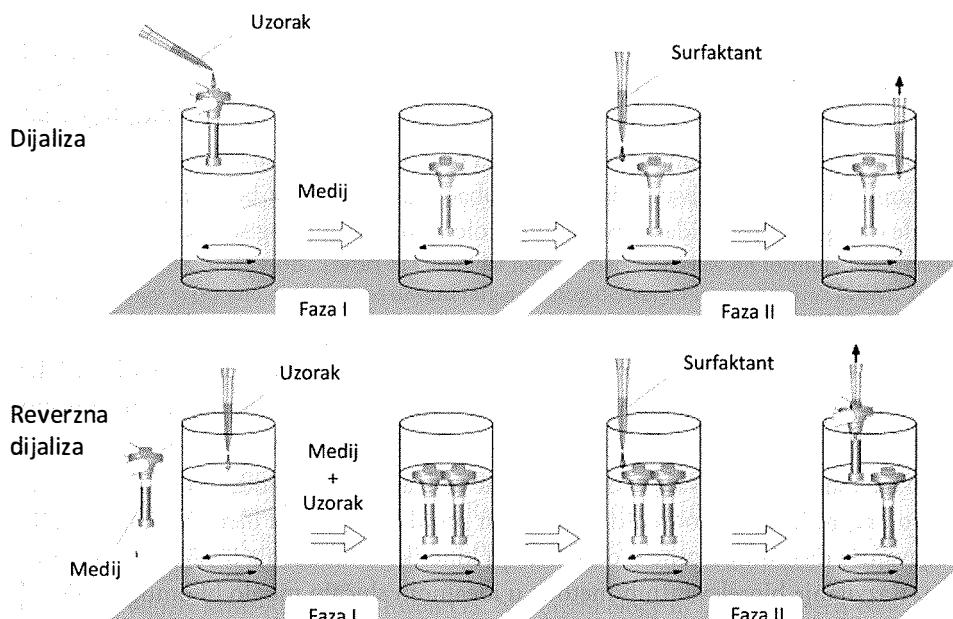
### Novija istraživanja

Suvremena istraživanja fokusirana su na modificiranje postojećih metoda ispitivanja *in vitro* oslobađanja u svrhu bolje karakterizacije koloidnih sustava. U dosadašnjim ispitivanjima pokazano je da je metoda kontinuiranog tečenja prikladna za određivanje kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz nosača mikrometarskih veličina (19, 20). No, koloidni terapijski sustavi poput suspenzija liposoma, mikroemulzija ili nanosuspenzija mogu blokirati filter na protočnoj ćeliji ili proći kroz njega. Stoga su

Bhardwaj i Burgess modificirali metodu kontinuiranog tečenja ugradnjom dijalizacijskog cilindričnog adaptera u standardnu protočnu ćeliju, u koji je stavljen uzorak koloidnog sustava (21). Razvijena metoda pokazala se prikladnom i zadovoljavajuće diskriminatornom za određivanje kinetike oslobađanja iz različitih formulacija liposoma i drugih disperznih sustava.

Abdel-Mottaleb i Lamprecht (17) nedavno su razvili metodu membranske difuzije koja se temelji na modifikaciji aparature s rotirajućom košaricom (11). Kao donorski odjeljak korištena je staklena košarica koja je od receptorskog medija odijeljena dijalizacijskom membranom. Takvim pristupom je osigurana konstantna površina kroz koju lijek difundira, a time i bolja reproducibilnost rezultata u usporedbi s rezultatima dobivenim pri primjeni dijalizacijske vrećice. Također, razvijena metoda pokazala se uspješnom u detektiranju razlika u profilu oslobađanja lijeka iz različitih nanosustava (liposoma, polimernih i lipidnih nanočestica).

S ciljem razvijanja biorelevantne metode ispitivanja oslobađanja lijeka iz liposoma namijenjenih za parenteralnu primjenu Xu i suradnici razvili su metodu bifazne reverzne dijalize (22). U prvoj fazi, primjenom pufera kao vanjskog medija, imitirani su uvjeti koji vrijede tijekom cirkulacije liposoma u krvi, a u drugoj fazi, dodatkom otopine surfaktanta u vanjski medij, simulirano je oslobađanje lijeka na mjestu djelovanja – u tkivu (slika 6.). Uočeno je značajno smanjenje varijabilnosti rezultata u usporedbi s rezultatima dobivenim pri primjeni klasične metode dijalize. Razvijena metoda bifazne reverzne dijalize pokazala se zadovoljavajuće diskriminatornom pri



Slika 6. Prikaz bifazne dijalize i bifazne reverzne dijalize (prilagodeno prema (22)).

određivanju kinetike oslobađanja lijeka iz liposoma različitog sastava i primjenjivom pri kontroli kvalitete formulacija liposoma.

U novije vrijeme razvijaju se i metode tzv. ubrzanog oslobađanja lijeka iz depo pripravaka za parenteralnu (intramuskularnu, subkutanu i intraartikularnu) primjenu među kojima su i neki koloidni terapijski sustavi (23), a prema uzoru na ubrzano starenje koje se uspješno koristi pri ispitivanju stabilnosti i predviđanju roka valjanosti lijekova. Ubrzano oslobađanje može se postići promjenom pH, temperature ili miješanja receptorskog medija. Te su metode primjenjive ako je promjenom navedenih parametara moguće ubrzati proces oslobađanja a da se pri tom mehanizam oslobađanja lijeka ne mijenja (24).

## SAŽETAK

Razvoj novih terapijskih sustava koji mogu dostaviti lijek na pravo mjesto i u pravo vrijeme, u potrebnoj dozi i trajanju predstavlja koncept kojim se mogu poboljšati svojstva klasičnih, na tržištu već prisutnih lijekova, ali i omogućiti uvođenje novih terapeutika poput peptida, glikoproteina, oligonukleotida i gena. Među terapijskim sustavima s najvećim farmaceutskim potencijalom svakako su koloidni terapijski sustavi, o čemu svjedoči i niz ljekovitih pripravaka prisutnih na svjetskom i europskom tržištu u kojima je lijek uklopljen u koloidni nosač.

Određivanje kinetike oslobađanja lijekova *in vitro* iz koloidnih sustava važan je korak u njihovom razvoju i kontroli kvalitete, ali predstavlja i veliki izazov s obzirom na poteškoće odjeljivanja koloidnog nosača od receptorskog medija u kojem je potrebno odrediti sadržaj oslobođenog lijeka. Sada se u tu svrhu primjenjuju metode membranske difuzije, metode uzorkovanja i odjeljivanja, metode kontinuiranog tečenja i *in situ* metode, koje su u ovom radu prikazane zajedno s njihovim prednostima, nedostacima i ograničenjima. Naglašena je i potreba za daljnjim razvijanjem (standardiziranih) metoda ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijeka koje bi u idealnom slučaju mogle omogućiti predviđanje ponašanja koloidnog terapijskog sustava *in vivo*.

## ZAKLJUČAK

Predstavljene metode omogućuju različite izvedbe određivanja kinetike oslobađanja lijeka *in vitro* iz koloidnih sustava. No, s obzirom na nedostatke i ograničenja opisanih metoda, potreban je oprez pri interpretaciji dobivenih rezultata.

Suvremena istraživanja fokusirana su na razvijanje metoda kojima je moguće točno i reproducibilno odrediti cjelokupan profil oslobađanja lijeka, te koje su zadovoljavajuće diskriminatorne u određivanju kinetike oslobađanja iz različitih formulacija. Razvijanje biorelevantnih metoda u idealnom slučaju moglo bi omogućiti predviđanje ponašanja koloidnog terapijskog sustava *in vivo*.

## In vitro drug release from colloidal delivery systems

by A. Hafner, A. Karković Marković, N. Ferić, J. Filipović-Grčić

### Abstract

The development of new drug carrier systems able to deliver drug to the target site in time and at required dose and release manner represents a concept aiming to improve pharmacokinetics of existing drugs, but also to enable introducing of new therapeutic options including peptide, glycoprotein, oligonucleotide and gene therapy. Research progress within the field of pharmaceutical nanotechnology implies great potential of colloidal drug delivery systems, witnessed also by the presence of nanotherapeutics based on colloidal carriers in the global and EU pharmaceutical market.

Assessment of *in vitro* drug release profile is essential in development and quality control of colloidal drug delivery systems. However it represents a great challenge considering the difficulties in separating the colloidal carrier from the release media which needs to be assessed for the released drug content. Currently used methods for *in vitro* release testing from these dosage forms are membrane dialysis methods, sample and separate methods, continuous-flow methods and *in situ* methods, which are herein presented discussing their advantages, disadvantages and limitations. Need for further development of (standardized) methods for *in vitro* drug release assessment, which would ideally enable the prediction of *in vivo* behaviour of the colloidal systems, has also been highlighted.

(<sup>1</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, <sup>2</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Physical Chemistry, <sup>3</sup>PLIVA Croatia, Division of Pharmacovigilance)

1. Alonso MJ. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.* 2004; 58:168–172.
2. Mishra B, Pate BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: NBM.* 2010; 6:9–24.
3. Johnston APR, Such GK, Ng SL, Caruso F. Challenges facing colloidal delivery systems: From synthesis to the clinic. *Curr. Opin. Colloid. In.* 2011; 16:171–181.
4. Beija M, Salvayre R, Lauth-de-Viguerie N, Marty JD. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends Biotechnol.* 2012; 30:485–496.
5. Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; 10:682–692.
6. Svenson S. Clinical translation of nanomedicines. *Curr. Opin. Solid St. M.* 2012; 16:287–294.
7. Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS. *Nanotechnology in Drug Delivery.* New York: Springer, 2009.

8. Matalanis A, Jones OG, McClements DJ. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocoll.* 2011; 25:1865–1880.
9. Benita S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
10. D'Souza SS, DeLuca PP. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm. Res.* 2006; 23:460–474.
11. *European Pharmacopoeia*, section 2.9.3., 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2012.
12. Lamprecht A. *Nanotherapeutics drug delivery concepts in nanoscience*. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2009.
13. *United States Pharmacopeia 36/National Formulary 31, The Dissolution Procedure / General Information*. Twinbrook Parkway, Rockville, 2008.
14. Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study. *Int. J. Pharm.* 2012; 434:28–34.
15. Modi S, Anderson BD. Determination of Drug Release Kinetics from Nanoparticles: Overcoming Pitfalls of the Dynamic Dialysis Method. *Mol. Pharm.* 2013 (DOI: 10.1021/mp400154a)
16. Washington C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *Int. J. Pharm.* 1989; 56:71–74.
17. Abdel-Mottaleb MMA, Lamprecht A. Standardized in vitro drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2011; 37:178–184.
18. Microcon® Centrifugal Filters for Protein and DNA Concentration, <http://www.millipore.com/catalogue/module/c113861/>, datum pristupa: 4.7.2013.
19. Rawat A, Burgess DJ. USP apparatus 4 method for in vitro release testing of protein loaded microspheres. *Int. J. Pharm.* 2011; 409:178–184.
20. Zolnik B, Raton JL, Burgess D. Application of USP apparatus 4 and in situ fiber optic monitoring to microspheres release testing. *Dissolution Technol.* 2005; 12:11–14.
21. Bhardwaj U, Burgess, DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *Int. J. Pharm.* 2010; 388:287–294.
22. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.* 2012; 426:211–218.
23. Larsen C, Larsen SW, Jensen H, Yagmur A, Røstergaard J. Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009; 6:1283–1295.
24. Brown CK, Friedel HD, Barker AR, Buhse LF, Keitel S, Cecil TL, Kraemer J, Morris JM, Reppas C, Stickelmeyer MP, Yomota C, Shah VP. FIP/AAPS joint workshop report: dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 2011; 12:782–794.

*Primljeno 11. srpnja 2013.*