



KATARZYNA CENTKOWSKA

**ZASTOSOWANIE KOMPLEKSU NITROGLICERYNY
Z β -CYKLODEKSTRYNĄ W MAŚCIACH
O DZIAŁANIU MIEJSCOWYM I TABLETKACH
PODJĘZYKOWYCH**

**Praca wykonana w
Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
w celu uzyskania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych**

Promotor rozprawy:
prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska

Gdańsk 2010

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	5
STRESZCZENIE.....	7
SUMMARY	10
I. WSTĘP	14
1. CYKLODEKSTRYNY I ICH KOMPLEKSY Z SUBSTANCJAMI LECZNICZYMI ...	14
1.1. Ogólna charakterystyka	14
1.2. Toksyczność	18
1.3. Zastosowanie w technologii farmaceutycznej	20
1.3.1. Cyklodekstryny w tabletkach	24
1.3.2. Cyklodekstryny w preparatach do użytku zewnętrznego	29
2. NITROGLICERYNA (NTG)	40
2.1. Ogólna charakterystyka substancji	40
2.2. Trwałość NTG i sposoby stabilizacji	42
2.3. Charakterystyka kompleksu inkluzyjnego NTG- β -CD	43
2.4. Zastosowanie NTG	46
2.4.1. Preparaty do stosowania miejscowego	47
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	52
III. METODY	55
1. APARATURA, SPRZĘT LABOLATORYJNY, ODCZYNNIKI I MATERIAŁY	55
1.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	55
1.2. Odczynniki	56
1.3. Materiały	58
2. ANALIZA ILOŚCIOWA NTG METODĄ HPLC	59
3. ANALIZA NTG W ROZTWORACH WODNYCH	61
3.1. Badanie rozpuszczalności	61
3.2. Trwałość NTG w roztworach	61
3.2.1. Hydroliza NTG	61
3.2.2. Długoterminowe badania trwałości NTG w roztworach wodnych	61
3.3. Zgodność chemiczna membran z NTG	62
3.4. Badanie uwalniania NTG z kompleksu	62
4. SPORZĄDZANIE TABLETEK PODJĘZYKOWYCH	63
4.1. Tabletki placebo	63
4.2. Tabletki z NTG	64

5. BADANIA	65
5.1. Badanie czasu rozpadu	65
5.1.1. Badanie wstępne	65
5.1.2. Metoda farmakopealna	65
5.1.3. Badanie <i>in vivo</i>	65
5.2. Ocena organoleptyczna	66
5.3. Odporność tabletek na zgniatanie (twardość)	66
5.4. Jednolitość masy	66
5.5. Zawartość substancji czynnej	66
5.6. Badanie trwałości tabletek	67
6. OPRACOWANIE SKŁADU PREPARATÓW PÓLSTAŁYCH	68
6.1. Skład jakościowy i ilościowy	68
6.2. Metoda sporządzania	71
7. BADANIA	72
7.1. DSC (różnicowa kalorymetria skaningowa)	72
7.2. Badanie kinetyki uwalniania NTG z maści	72
7.2.1. Komora ekstrakcyjna typu VanKel – aparat VK	73
7.2.2. Komora typu Mutimer – aparat MU	75
7.2.3. Komora dializacyjna – aparat D	75
7.3. Badania reologiczne	76
7.3.1. Badanie właściwości reologicznych żeli - układ pomiarowy wrzeczona zanurzeniowego	78
7.3.2. Badania właściwości reologicznych maści i kremów - układ pomiarowy płytka-stożek	78
7.4. Obserwacje makroskopowe, badania organoleptyczne	78
7.5. Obserwacja mikroskopowa i pomiar wielkości cząstek	79
7.6. Badanie zawartości NTG w maściach i kremach	79
7.7. Pomiar pH kremów	79
7.8. Badania trwałości maści i kremów	80
8. BADANIE PRZEZSKÓRNEJ PENETRACJI NTG W WARUNKACH <i>EX VIVO</i>	82
8.1. Przygotowanie skóry i ekwilibracja układu	82
8.2. Badanie przenikania NTG do skóry i przez skórę	83
8.3. Oznaczanie zawartości NTG w skórze ludzkiej	83
9. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	84
IV. WYN.....	86
1. ANALIZA NTG W ROZTWORACH WODNYCH	86
1.1. Rozpuszczalność NTG	86
1.2. Hydroliza NTG	87
1.3. Trwałość NTG w roztworach wodnych	88
1.4. Szybkość uwalniania NTG z kompleksu	89
2. TABLETKI PODJĘZYKOWE	90
3. BADANIA TRWAŁOŚCI TABLETEK Z NTG	92

4. MOŻLIWOŚĆ ZASTOSOWANIA DSC W OZNACZANIU KOMPLEKSU NTG-CD W MAŚCIACH	97
5. BADANIA UWALNIANIA NTG Z MAŚCI, KREMU I ŻELU	99
5.1. Uwalnianie z maści	99
5.2. Uwalnianie z kremu	101
5.3. Uwalnianie z żelu	102
5.4. Wpływ rodzaju aparatu na kinetykę uwalniania NTG z maści i żeli	105
5.4.1. Wpływ grubości warstwy preparatu na proces uwalniania NTG	108
5.5. Wpływ rodzaju membrany na kinetykę uwalniania NTG	109
6. BADANIA REOLOGICZNE	110
6.1. Powtarzalność metody	115
7. BADANIA TRWAŁOŚCI	118
7.1. Obserwacje makroskopowe	113
7.2. Obserwacje mikroskopowe	121
7.3. Pomiar wielkości cząstek	124
7.4. Pomiar pH	125
7.5. Zawartość NTG	125
7.6. Reologia	127
7.7. Uwalnianie	132
8. BADANIA PRZENIKANIA NTG DO SKÓRY W WARUNKACH <i>EX VIVO</i>	137
V. Dyskusja wyników	142
VI. Wnioski	161
VII. Piśmiennictwo	164

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

- **BCS klasyfikacja** – system klasyfikacji biofarmaceutycznej
(*Biopharmaceutical Classification System*)
- **b.w.** – brak wpływu
- **b.z.** – bez zmian
- **CD** – cyklodekstryna
- **cP** - krospowidon
- **cpm** – cykle na minutę
- **Cup.** – błona Cuprophan
- **D** – komora dializacyjna, rotacyjna
- **DSC** – różnicowa kalorymetria skaningowa
(*Differential Scanning Calorimetry*)
- **EMA** – Europejska Agencja Leków
(*European Medicines Agency*)
- **F** – komora typu Franza
- **GP** – glikol propylenowy
- **HEC** – hydroksyetyloceluloza
- **HDPE** – polietylen o wysokiej gęstości
- **HP-CD** – pochodna hydroksypropylowa - CD
- **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa
(*High Performance Liquid Chromatography*)
- **KCD** – krem zawierający kompleks NTG-CD
- **KcP** - krem zawierający rozcierkę NTG-cP
- **LD₅₀** – dawka śmiertelna w odniesieniu do 50% populacji
(*Lethal dose 50*)
- **m-c** - miesiąc
- **M-CD** – pochodna metylowa CD
- **MCD** – maść zawierający kompleks NTG-CD
- **McP** – maść zawierający rozcierkę NTG-cP
- **MF** – mieszanina fizyczna NTGcP i βCD
- **MI** – mirystynian izopropylu
- **MU** – komora typu Mutimer
- **m.cz.** – masa cząsteczkowa
- **n.b.** – nie badano

- **NLPZ** – niesteroidowe leki przeciwzapalne
- **NTG** – nitrogliceryna
- **NTG-CD** – kompleks inkluzyjny nitrogliceryny z β -cyklodekstryną
- **NTG-cP** – rozciera nitrogliceryny z krospowidonem
- **PM-CD** – pochodna metylowa – CD (częściowo podstawiona)
- **PP** - polipropylen
- **PTFE** – politetrafluoroetylen
- **RH** - wilgotność względna
(*relative humidity*)
- **RM-CD** – pochodna metylowa – CD (losowo podstawiona)
- **rpm** – obroty na minutę
- **SBE-CD** – pochodna sulfobutylowa – CD
- **Sig.** – membrana dializacyjna (rękaw)
- **W** – komora dyfuzyjna, wertykalna
- **ZCD** - żel zawierający kompleks NTG-CD
- **ZcP** - żel zawierający rozcierkę NTG-cP
- **VK** – komora ekstrakcyjna typu VanKel

STRESZCZENIE

Cyklodekstryny (CD) to substancje pomocnicze, które mogą tworzyć z cząsteczkami związków leczniczych kompleksy inkluzyjne. W preparatach farmaceutycznych są używane przede wszystkim w celu poprawy trwałości, rozpuszczalności oraz biodostępności substancji czynnych.

Przedmiotem prowadzonych badań był kompleks inkluzyjny NTG z β -CD. W pracy oceniono możliwości jego zastosowania w preparatach farmaceutycznych: tabletkach podjęzykowych oraz maściach przeznaczonych do miejscowej terapii szczeliny odbytu. W tabletkach podstawowym celem zastosowania formy skompleksowanej była poprawa trwałości NTG. W USA i Europie NTG w tabletkach stabilizowana jest krospowidonem, jedynie w Japonii dostępny jest preparat zawierający kompleks NTG-CD. Natomiast w maściach założono, że poza poprawą trwałości kompleks umożliwi uzyskanie spowolnionego uwalniania, co powinno zmniejszyć przenikanie NTG do krążenia ogólnego, a tym samym ograniczyć działania niepożądane terapii miejscowej szczeliny odbytu. Do chwili obecnej zarejestrowano tylko jeden produkt półstały zawierający kompleks deksametazon-CD (Japonia), zastosowanie CD w maści o spowolnionym uwalnianiu byłoby więc innowacyjnym rozwiązaniem.

W celach porównawczych badania prowadzono zarówno dla kompleksu inkluzyjnego NTG-CD (2% NTG), jak i dla formy nieskompleksowanej - rozcierka NTG z krospowidonem (NTG-cP – 25% NTG).

Chociaż w badaniach wstępnych wykazano, że CD nie zwiększa trwałości NTG w środowisku wodnym, jednak nie miało to potwierdzenia w odniesieniu do form stałych i półstałych.

W pierwszym etapie badań opracowano skład tabletek podjęzykowych (0,5 mg NTG) zapewniający krótki czas rozpadu i akceptowalne odczucia organoleptyczne (brak odczucia „piasku” po rozpadzie). Przy zastosowaniu jako substancji rozsadzających modyfikowanych skrobi: Starch 1500 i StarLac, uzyskano czas rozpadu *in vitro* poniżej 2 min. Ze względów aplikacyjnych probanci preferowali tabletki ze StarLac. Kompleksowanie zapewniało większą trwałość NTG w tabletkach, przy czym obserwowano, że Starch 1500 umożliwia otrzymanie bardziej trwałych tabletek z NTG-CD niż StarLac. Mimo to w żadnej z badanych formułacji z NTG-CD nie uzyskano

wymaganej dla celów rejestracyjnych trwałości, gdyż po 12 miesiącach zawartość NTG wyniosła jedynie 87% wartości początkowej.

W kolejnym etapie oceniono możliwość stosowania kompleksu NTG-CD w maści (0,2% NTG) do miejscowej terapii szczeliny odbytu. Istotne było uzyskanie przedłużonego uwalniania *in vitro*, a w konsekwencji spowolnienie przenikania przez skórę. Zastosowano zarówno podłoża zawierające wodę (hydrożel, krem w/o), jak i podłoże bezwodne (maść absorpcyjna).

Najważniejszym testem do oceny preparatów było badanie szybkości uwalniania, jednakże ze względu na brak korelacji *in vivo/in vitro* dla stwierdzenia modyfikacji uwalniania konieczne było również określenie przenikania NTG do skóry *ex vivo*.

Wytypowano model doświadczalny badania uwalniania *in vitro*. Spośród trzech stosowanych komór, różniących się sposobem mieszania płynu akceptorowego i grubością warstwy preparatu (D, VK i MU), najbardziej odpowiednią zarówno dla badania żeli jak i maści okazała się komora ekstrakcyjna (VK).

Stwierdzono, że zastosowanie podłoża bezwodnego oraz kremu zawierającego 20% wody umożliwia otrzymanie maści o spowolnionym uwalnianiu, natomiast podłoże hydrożelowe, niezależnie od użytej formy substancji czynnej, zapewniało bardzo szybkie uwalnianie NTG. Na podstawie wyników badania uwalniania wykazano, że etanol zawarty w hydrożelu wypiera NTG z kompleksu inkluzyjnego. Również w maści bezwodnej obserwowano wpływ substancji pomocniczych na trwałość kompleksu NTG-CD, np. wzrost szybkości uwalniania obserwowano w obecności laurylosiarczanu sodu.

W pracy wykazano, że badanie szybkości uwalniania pozwala na wykrycie niezgodności i ocenę trwałości kompleksu NTG-CD w podłożu maściowym, natomiast metoda DSC nie umożliwia takiej analizy, ze względu na interferencje pików tła i zbyt małe stężenie substancji czynnej.

Badanie długoterminowe stabilności zaprojektowano z uwzględnieniem możliwości pełnej oceny maści. Oznaczano zarówno parametry wymagane przez FP VIII (zawartość substancji czynnej, wielkość cząstek, pH), jak i testy zalecane (lepkość, szybkość uwalniania). Stwierdzono, że w podłożu emulsyjnym w/o bardzo szybko dochodzi do zaniku efektu spowolnionego uwalniania, gdyż już po 1 miesiącu przechowywania (25°C) uwalnianie jest identyczne dla formy skompleksowanej i nieskompleksowanej NTG. Zmiany zachodziły wolniej w temp. 4°C. Wykazano, że jedynie zastosowanie bezwodnego podłoża lipofilowego umożliwi uzyskanie trwałej maści, o przedłużonym uwalnianiu z NTG-CD. Wszystkie preparaty charakteryzowały się jednak zadowalającą trwałością

reologiczną i nie obserwowano znaczących zmian lepkości czy tiksotropii. Ponadto stwierdzono, że kompleksowanie NTG z CD prowadziło do ochrony maści przed zółknięciem w wyniku oddziaływania temperatury i światła.

Końcowym etapem pracy było określenia stopnia wchłaniania NTG do skóry, w zależności od użytej formy substancji czynnej. Badania prowadzone *ex vivo* z użyciem skóry ludzkiej wykazały, że w przypadku maści wchłanianie NTG do skóry z kompleksu zachodzi 3-krotnie wolniej niż z rozcierki, natomiast z kremu wchłania się 2-krotnie mniej substancji. Niezależnie od użytej formy NTG przenikanie substancji czynnej do skóry ludzkiej było wolniejsze z kremu niż z lipofilowej maści.

Prezentowane wyniki badań wskazują, że istnieje możliwość stosowania kompleksu NTG-CD w technologii zarówno tabletek jak i preparatów półstałych, a forma kompleksu jest korzystniejsza ze względu na poprawę trwałości NTG.

Szczególnie obiecujące dla dalszego rozwoju produktu handlowego są wyniki uzyskane dla maści. Ponieważ użyto tradycyjne podłoże, a β -CD jest dopuszczona do użycia w preparatach farmaceutycznych, kolejnym etapem w rozwoju technologii w przypadku tej formułacji powinny być badania kliniczne maści z udziałem pacjentów. Natomiast technologia tabletek podjęzykowych, pomimo wyraźnie zwiększonej trwałości NTG w kompleksie, ze względu na znaczny ubytek substancji czynnej w czasie przechowywania tabletek oraz duży wpływ substancji pomocniczych wymaga dalszego rozwoju.

SUMMARY

Cyclodextrins (CD) are excipients that can form inclusion complexes with drug molecules. In pharmaceutical preparations, CDs are used mainly to improve stability, solubility and bioavailability of active substances.

The research was focused on inclusion complex of NTG with β -CD. The aim was to evaluate possibility of the use of NTG-CD complex in pharmaceutical preparations such as sublingual tablets against angina pectoris and ointments for topical treatment of anal fissures. NTG stability improvement was the main reason of the use of the complexed drug in tablets. Japan is the only country where NTG tablets containing the complex NTG-CD are available, while in USA and Europe NTG in tablets is stabilized with crospovidone. In ointments it was assumed that beside the stability improvement the complex form enables gaining sustained release, which should decrease NTG absorption to systemic circulation and by the same will cause reduction of cardiac side effects observed during topical therapy of anal fissure. Till now, only one semisolid product containing inclusion complex (dexamethasone-CD, Japan) was registered, so the use of CD in sustained release ointment would be still an innovative solution.

The research was designed to compare two forms of active substance: a complex NTG-CD (2% w/w NTG) and a free NTG form titrated with crospovidone (NTG-cP, 25% w/w NTG).

Although in the preliminary research it was demonstrated that CD does not improve stability of NTG in aqueous environment, however that was not true for solid and semisolid formulations.

At the first stage of the study composition of sublingual tablets was elaborated, which allowed for short disintegration time and acceptable organoleptic properties (no “sand” sensation after disintegration). Due to applying two types of modified starches: Starch 1500 and StarLac, as excipients, the disintegration *in vitro* time shorter than 2 min was achieved. For application reasons probants preferred tablets with StarLac. The research showed that complex form provided better NTG stability in tablets and at the same time it was observed that Starch 1500 enables obtaining more stable tablets with NTG-CD than StarLac. Despite that, none of the examined formulations with NTG-CD complex had proper stability for registration purposes because after 12 months the content of NTG was only 87% of the initial dose.

At the next stage of the research the possibility of application of NTG-CD complex in ointments (0,2% NTG) for topical treatment of anal fissure was evaluated. The main goal was to get prolonged *in vitro* release and, as a consequence, slower skin permeability. An anhydrous lipophilic base and water containing bases (hydrogel, cream w/o) were employed.

The dissolution test was the most important for examination of the preparations, however because of the lack of *in vitro/in vivo* correlation it was also necessary to estimate skin permeability of NTG to prove the sustained drug release from the ointments.

The experimental model of *in vitro* dissolution test was proposed. Three dissolution apparatus (D, VK, MU) differing with dissolution medium mixing method and with different thickness of the preparation layer were used. It turned out that the extraction chamber (VK) was the most suitable for testing ointments and gels.

It was verified that in case of anhydrous base or cream (20% water), it is possible to formulate with NTG-CD sustained release ointments, whereas in case of hydrogel the release of NTG was very fast.

On the base of the dissolution results it was proved that ethanol present in the hydrogel displaces NTG from the inclusion complex. The influence of other excipients on the stability of inclusion complex NTG-CD was also observed in case of anhydrous ointment. For example the increase of dissolution rate in the presence of lauryl sulphate was demonstrated.

It was shown that dissolution tests enable detection of incompatibilities and estimation of NTG-CD complex stability in semisolid base, whereas DSC method does not allow such analysis due to the background peaks interferences and low concentration of the active substance.

While designing the long term stability research it was taken into consideration that the studies should ensure overall product examination. The parameters required by Polish Pharmacopoeia VIII (active substance content, particles size, pH) as well as only recommended (viscosity, dissolution rate) were determined. It was concluded that in the cream base the loss of the sustained release effect is very fast, because after 1 month storage the release rate is the same for both: complexed and uncomplexed form of NTG. The changes, however were slower at 4°C. It was demonstrated that the usage of lipophilic anhydrous base is the only way to obtain stable sustained release ointment with NTG-CD. Rheological properties (viscosity and thixotropy) of all examined preparations were not subjected to significant changes during storage. Furthermore it was proved that NTG

complexation leads to the quite efficient ointment protection against becoming yellow which was caused by temperature and light.

The final stage of the work was determination of the NTG skin absorption from ointments and creams depending on NTG form. The experiments conducted *ex vivo* on human skin showed that in case of ointment NTG skin absorption is three times lower from the complexed than from uncomplexed form, while in case of creams it is only two times lower. The permeation of active substance to the skin from the cream was lower than from the lipophilic ointment, irrespective of the drug form.

The results show that it is possible to use NTG-CD complex in tablets technology as well as in semisolid preparations and the form of complex is more favorable due to higher NTG stability. The results obtained for the anhydrous ointment are especially advantageous for further commercial product development. Due to standard ointment base used in the research and β -CD approval for pharmaceutical preparation, the next stage in the technology development in case of this formulation, should be clinical test with patients' participation.

Despite of the proven much better NTG stability in tablets when used in complexed form, during long term storage the loss of NTG was still high. It was also observed that the choice of excipients has significant influence on NTG stability. For those reasons sublingual tablets technology requires further development.

I. WSTĘP

1. CYKLODEKSTRYNY I ICH KOMPLEKSY Z SUBSTANCJAMI LECZNICZYMI

1.1. Ogólna charakterystyka

Cyklodekstryny (CD) zostały odkryte w 1891 r. przez francuskiego naukowca Villiers'a. Uzyskał on 3 g krystalicznej substancji („celulozyny”) w procesie rozkładu 1000 g skrobi z zastosowaniem kultur bakteryjnych. W 1903 r. austriacki mikrobiolog Schardinger wyodrębnił dwa związki, nazwał je: α - i β -dekstryną, natomiast γ -dekstryna została wyizolowana dopiero 32 lata później. W latach 40-tych XX w. określono strukturę krystalograficzną dekstryn metodą rentgenografii strukturalnej, odkryto zdolność cyklicznych dekstryn do tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Początkowo otrzymywano jedynie niewielkie ilości cyklodekstryn, dopiero pod koniec lat siedemdziesiątych XX w. postęp w biotechnologii umożliwił produkcję odpowiedniej czystości cyklodekstryn na skalę przemysłową [1 - 4].

Naturalne cyklodekstryny występują w formie krystalicznego, bezzapachowego, białego proszku o lekko słodkim smaku. Różnią się wielkością pierścienia oraz właściwościami fizykochemicznymi (tabela 1). Niemożliwe jest ze względów przestrzennych otrzymanie cyklicznej struktury zbudowanej z mniej niż 6 monomerów glukozy, natomiast istnieją wyższe homologii, jednak nie mają one zastosowania praktycznego [5].

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne cyklodekstryn [2, 5, 6]

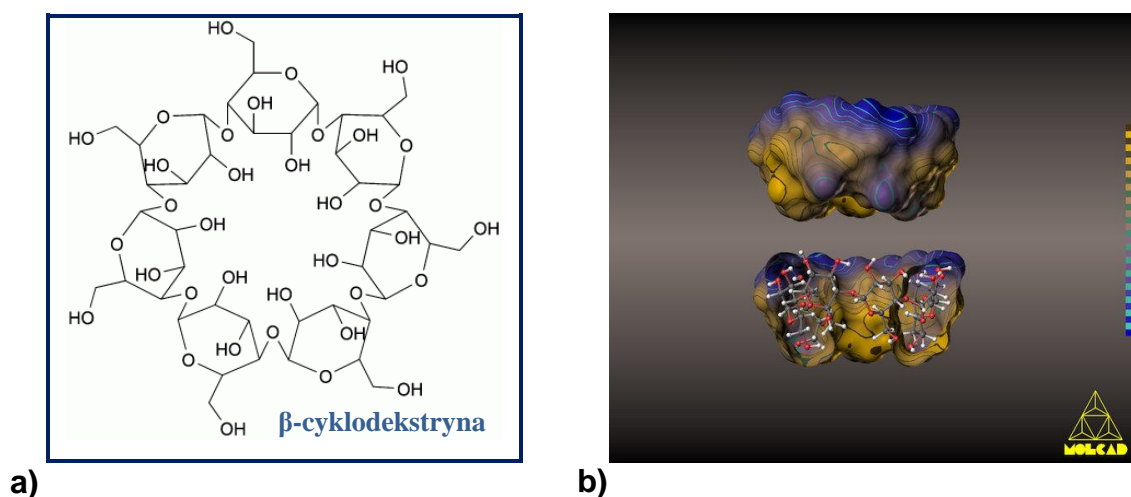
CD	Liczba jednostek glukozy	M.cz.	Rozpuszczalność w wodzie [% w/w]			Średnica wnętrza [Å]	Objętość wnętrza [Å ³]	Zawartość wody krystalizacyjnej [% w/w]
			20°C	25°C	35°C			
α -CD	6	972	9,0	12,7	20,4	4,7 - 5,3	174	10,2
β -CD	7	1135	1,64	1,88	2,83	6,0 - 6,5	262	13,2 - 14,5
γ -CD	8	1297	18,5	25,6	39,0	7,5 - 8,3	427	8,13 - 17,7

Cyklodekstryny pod względem chemicznym są cyklicznymi oligosacharydami (węglowodany) zbudowanymi z jednostek α -D-glukopyranozy połączonymi wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Najbardziej rozpowszechnionymi naturalnymi CD są: α -, β - i γ -

cyklodekstryna, zbudowane odpowiednio z 6, 7 i 8 jednostek [5, 7]. CD w formie krystalicznej są stabilnymi hydratami, zawierają od 8 do 18% wody związanej zarówno z wnętrzem pierścienia jak i zewnętrzną jego powierzchnią. Przykładowo w dwunastowodnej β -CD 6,5 cząsteczki H_2O znajduje się we wnętrzu pierścienia i 5,5 na zewnątrz.

CD są trwałe chemicznie. Ze względu na stabilną strukturę krystalograficzną posiadają stosunkowo dużą wartość temperatury topnienia (rozkładu) w zakresie od 240 do 265°C [5]. Nie są podatne na hydrolizę zasadową, natomiast w środowisku silnie kwaśnym mogą hydrolizować do liniowych maltosacharydów [8].

Pierścień CD ma kształt ściętego stożka (toroidu) (ryc. 1b) [5, 2]. Naturalne CD posiadają grupy hydroksylowe w liczbie: 18 (α -CD), 21 (β -CD) i 24 (γ -CD), które mogą być modyfikowane chemicznie. Wyróżnia się trzy grupy pochodnych: hydrofilowe, hydrofobowe i jonowe [9]. Do często stosowanych pochodnych naturalnych CD należą pochodne hydrofilowe: hydroksypropylowe (HP-CD), metylowe (M-CD: RM-CD – losowo podstawione, PM-CD – częściowo podstawione, DM-CD - dwupodstawione), a ostatnio również pochodna jonowa - sulfobutylova (SBE-CD) [5, 10, 11].



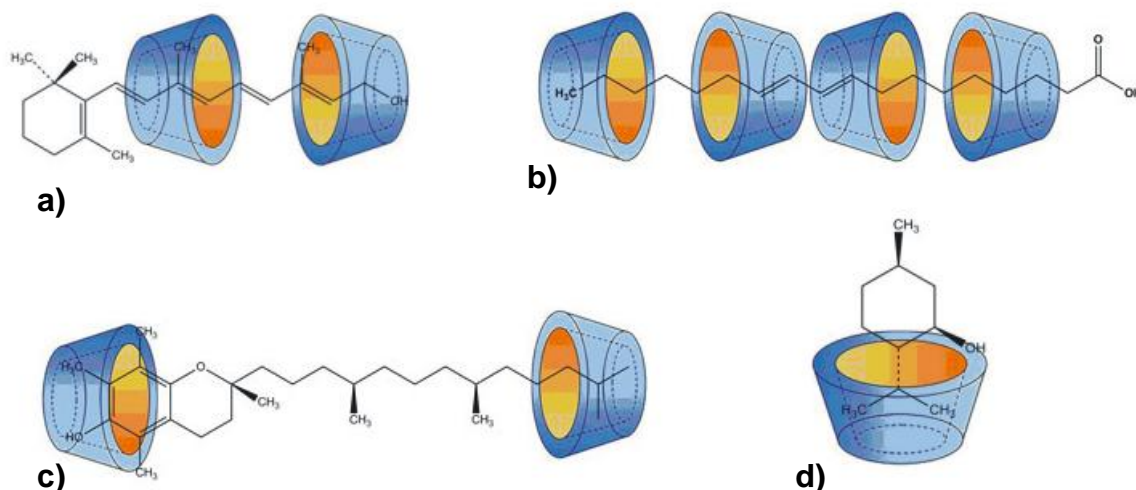
Ryc. 1. Struktura β -CD: **a** - płaska struktura pierścienia; **b** – komputerowa wizualizacja struktury przestrzennej pierścienia, uwzględniająca topografie obszarów hydrofilowych (niebieskie) i hydrofobowych (żółte) [a – FP VIII; b - 12].

Rozmieszczenie grup hydroksylowych na zewnątrz pierścienia nadaje cząsteczce CD charakter hydrofilowy, natomiast jej wewnętrzna przestrzeń, z powodu obecności atomów węgla, wodoru oraz mostków tlenowych, ma charakter hydrofobowy (apolarny). Dzięki takiej budowie CD tworzą rozpuszczalne w środowisku wodnym kompleksy inkluzyjne.

Cząsteczka kompleksowana ulega inkluzji do wnętrza CD tworząc z nią kompleks typu „gość–gospodarz”, przy czym nie dochodzi do powstawania wiązań kowalencyjnych. Cząsteczka „gościa” wnika do wnętrza „gospodarza” poprzez wyparcie cząsteczek wody, co powoduje obniżenie energii układu. Na tworzenie się kompleksu mają również wpływ takie czynniki jak: oddziaływania Van’der Walsa, wiązania wodorowe, zmiana napięcia powierzchniowego, czy rozluźnienie napięcia szkieletu pierścienia [2, 5].

Kompleksowanie jest z reguły procesem zależnym od stężenia, a uzyskany stosunek molowy substancji czynnej do CD (np. 1:1, 1:2, 2:1, 2:2), poza właściwościami fizycznymi inkorporowanego leku, może również wynikać z wyjściowego stężenia substratów [7]. Przykłady kompleksów o różnym stosunku stechiometrycznym gość - gospodarz, zależnym od budowy cząsteczki, podano na ryc. 2.

W niektórych przypadkach wydajność kompleksowania jest niewielka i w związku z tym duża ilość CD jest zawarta w produkcie końcowym [2, 4].



Ryc. 2. Kompleksy inkluzyjne: **a)** retinolu (1:2); **b)** kwasu linolenowego (1:4);
c) α -tokoferolu (1:2); **d)** mentolu (1:1) [13].

W przypadku rozpuszczenia formy stałej kompleksu (krystalicznej lub amorficznej) w roztworze wodnym ustala się stan równowagi asocjacyjno-dysocjacyjnej, który można opisać matematycznie stałą dysocjacji (K_d) lub stałą trwałości (K_c) kompleksu [3]. Kompleks „gość” (G) : „gospodarz” (CD) o stechiometrii 1:1 opisują następujące równania:



$$K_c = \frac{[CDG]}{[CD] \times [G]} \quad (2)$$

$$K_d = \frac{[CD] \times [G]}{[CDG]} \quad (3)$$

Stała K_c wskazuje jak silne jest wiązanie pomiędzy lekiem a CD i jest miarą powinowactwa cząsteczki „gościa” do wnętrza pierścienia „gospodarza”. Wartość K_c jest specyficzna dla danej substancji, zależna od jej właściwości fizykochemicznych. Średnie wartości stałej K wyznaczone na podstawie zestawień statystycznych dla α -CD, β -CD i γ -CD wynoszą odpowiednio 123, 490 i 525 mol/l⁻¹ [2, 14]. Wyznaczony czas półtrwania kompleksu stanowi część sekundy, co oznacza, że w roztworze substancja czynna jest naprzemiennie zamykana i wykluczana z wnętrza CD [10]. Uwalnianie substancji czynnej z kompleksu jest głównie wynikiem dysocjacji zachodzącej w płynach ustrojowych. W przypadku podania miejscowego: do oka, na błonę śluzową nosa czy skórę, gdzie brak jest dużej ilości płynu dysocjacja jest niewielka lub nie zachodzi, a uwalnianie leku jest wynikiem wychwytu tkankowego [15]. W przypadku dużych wartości K_c (>10000 mol/l⁻¹) może dochodzić do obniżenia biodostępności leku na skutek słabej dysocjacji kompleksu. Nadmiar CD w miejscu podania przesuwa równowagę asocjacyjno-dysocjacyjną w stronę form niezdisocjowanych, przez co zwiększy stałą trwałości kompleksu. Zastosowanie dużego nadmiaru CD w formulacjach może, więc prowadzić do obniżenia biodostępności substancji czynnej [2, 16].

Zarówno β -CD (Betadeks) jak i α -CD (Alfadeks) posiadają status farmakopealnych substancji pomocniczych - ich monografie znajdują się w obowiązującej Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur. 6) i w Farmakopei Polskiej VIII oraz Brytyjskiej (BP), a także w Farmakopei Amerykańskiej (USP). Monografia Betadeksu została wprowadzona do Ph. Eur. w 1997 r.

Spośród licznych pochodnych jedynie HP- β -CD jest substancją farmakopealną posiadającą monografię w Ph. Eur. i BP (Hydroksypropylobetadeks). Farmakopealna HP- β -CD musi posiadać wartość podstawienia molowego w zakresie 0,4 – 1,5. Od stopnia podstawienia HP- β -CD zależą właściwości fizykochemiczne np. rozpuszczalność. Uzyskane pochodne są zawsze mieszaniną związków o różnym stopniu podstawienia, tak więc substancje farmakopealne otrzymywane przez różnych producentów mogą nie być tożsame [7, 17, 18]. Różnice w rozpuszczalności obserwuje się np. dla kompleksów diklofenaku sodu z HP- β -CD: przy stopniu podstawienia CD równym 0,39 rozpuszczalność wyniosła 226 μ g/ml, a przy stopniu 0,9 aż 1030 μ g/ml.

1.2. Toksyczność

Uważa się, że naturalne CD po podaniu doustnym nie wykazują działania toksycznego. Naturalne CD są trawione poprzez bakterie flory jelitowej w okrężnicy. W wyniku hydrolizy enzymatycznej CD powstają między innymi glukoza i maltoglikosacharydy, substancje ulegające procesowi fermentacji do CO₂ i H₂O [5, 6]. β -CD oraz α -CD są metabolizowane wolniej niż γ -CD. Jedynie γ -CD ulega rozkładowi w wyniku działania α -amylazy już w górnej części przewodu pokarmowego [3, 8]. Pochodne (DM- β -CD czy HP- β -CD) nie są rozkładane w układzie pokarmowym i są wydalane z kałem w formie niezmienionej [8].

Wykazano w badaniach na szczurach, że LD₅₀ przy podaniu parenteralnym osiąga duże wartości i wynosi 1000 mg/kg, 788 mg/kg i >3750 mg/kg, odpowiednio dla α -CD, β -CD i γ -CD [8]. Natomiast ustalenie LD₅₀ dla podania doustnego było niemożliwe, gdyż jak wykazali Szejtli i Sebestyen [7], nawet zastosowanie dawek: 12,5 g/kg, 18,8 g/kg oraz 8 g/kg odpowiednio dla α -CD, β -CD i γ -CD, nie powodowało zgonu zwierząt.

Stwierdzono, że podawanie CD szczurom, przez 6 miesięcy, w ilości 1,6 g/kg/dzień (około 3,2% dziennej diety) nie powoduje zmian w morfologii narządów, w obrazie tkanek oraz masie ciała zwierząt [8]. U psów podanie 10% CD (α -CD i γ -CD) względem diety (przez 90 dni) powodowało biegunki i wymioty, nie obserwowano zmian w obrazie narządów [20, 21]. Obawy co do bezpieczeństwa stosowania doustnego dużych dawek CD wynikają z faktu, iż β -CD podawana pozajelitowo charakteryzuje się nefrotoksycznością oraz właściwościami hemolitycznymi (duże dawki), a nie wykluczono możliwości niewielkiego wchłaniania CD przez błony śluzowe układu pokarmowego [7, 8, 19]. Irie i wsp. [22] w badaniach na szczurach wykazali, że podanie doustne dawki 500 mg/kg

naturalnych CD nie powoduje ich znaczącej absorpcji z układu pokarmowego (w moczu oznaczono odpowiednio 1,95, 0,45 i 0,38% dawki aplikowanych α -CD, β -CD i γ -CD). Również Olivier i wsp. [23] obserwowali niewielkie stężenie β -CD (0,1 – 0,3% aplikowanej dawki) w moczu szczurów, których 10% diety stanowiły CD. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że β -CD przenika przez ścianę izolowanego jelita szczura w wyniku dyfuzji biernej, jednakże proces ten przebiegał powoli [8]. W ostatnio publikowanych pracach przeglądowych przeważa pogląd, że CD naturalne nie przenikają przez ścianę układu pokarmowego [7, 24].

Stan wiedzy dotyczący możliwości wchłaniania CD, a zwłaszcza β -CD, przez błonę śluzową układu pokarmowego u ludzi jest jednak niewystarczający. Z tego względu komisja ekspercka WHO – JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) wprowadziła ograniczenie dziennego spożycia β -CD do 5 mg/kg [7, 25]. Nie dopuszcza się stosowania pochodnych metyloowych doustnie, ze względu na ich silniejsze oddziaływanie z błonami biologicznymi oraz brak wystarczających danych dotyczących toksyczności [8, 24].

Aplikacja roztworów wodnych CD bezpośrednio na błonę śluzową (nosa, jamy ustnej, pochwy) jest uważana za bezpieczną w szerokim zakresie stężeń, zarówno dla naturalnych CD, jak i ich pochodnych. Jedynie w przypadku metylowych pochodnych powinno się ograniczać stężenie oraz czas aplikacji. Metylowe pochodne β -CD są uważane za bezpieczne w stężeniu poniżej 5% [26 - 28].

Asai i wsp. [27] wykazali, że podawanie 20% roztworu RM- β -CD powoduje poważne uszkodzenia (nawet utratę integralności tkanki) w błonie śluzowej nosa u szczurów, natomiast roztwór 5% prowadził jedynie do niewielkich zmian morfologicznych, ale tylko przy długotrwałym stosowaniu. Podobne rezultaty uzyskali Boulmedarat i wsp. [26] dla nabłonka jamy ustnej w warunkach *in vitro*. W przypadku nabłonka rogówki ludzkiej cytotoksyczność CD maleje w następującej kolejności: α -CD > DM- β -CD >> SBE- β -CD = HP- β -CD > γ -CD [29]. Spośród naturalnych CD jedynie α -CD wykazały pewne działanie drażniące po podaniu do oka, lecz pochodne HP- β -CD były dobrze tolerowane u królików nawet w stężeniu do 12%. Z kolei roztwory RM- β -CD, nawet w stężeniu 5%, wykazują właściwości cytotoksyczne [5, 29, 30]. Pomimo doniesień o drażniącym działaniu M- β -CD podawanych na błony śluzowe, istnieją jednak zarejestrowane preparaty handlowe [31]:

- Clorocil – krople do oczu – roztwór chloramfenikolu w kompleksie z RM- β -CD;
- Calidiol[®] – spray do nosa – roztwór estradiolu w kompleksie z RM- β -CD.

Stwierdzono, że stosowanie β -CD na powierzchnię skóry, nawet w warunkach okluzji nie powoduje podrażnień ani reakcji alergicznych [5, 6]. Piel i wsp. [32] wykazali bardzo dobrą tolerancję skóry (brak zmian struktury warstwy rogowej) wobec wodnych rozworów naturalnych CD oraz ich pochodnych, z wyjątkiem DM- β -CD, które zaburzały układ dwuwarstwy lipidowej. Uważa się, że naturalne CD oraz ich hydroksypropylowe lub sulfobutyłowe pochodne, ze względu na dużą masę cząsteczkową (>1000) oraz hydrofilowy charakter, nie przenikają przez nieuszkodzoną barierę skórną, jednakże według niektórych autorów w pewnych warunkach, np. okluzji, CD w niewielkim stopniu są w stanie pokonać barierę skórną [5, 8, 9, 33 - 35]. Legendre i wsp. [35] w badaniach *ex vivo* z użyciem radioznaczonych cząsteczek RM- β -CD wykazali, że od 0,1% do 0,2% aplikowanej dawki CD przenika do płynu akceptorowego (24 h) i około 0,7% adsorbuje się na powierzchni warstwy rogowej. Nawet zastosowanie DMSO nie powodowało zwiększenia przenikania cząsteczek RM- β -CD przez skórę.

1.3. Zastosowanie w technologii farmaceutycznej

Kompleksy substancji leczniczych z CD, ze względu na brak wiązań kowalencyjnych, nie są traktowane jako nowe substancje czynne czy cząsteczki modyfikowane strukturalnie. CD rozpatrywane są w kategorii substancji pomocniczych dodawanych do formulacji [7, 36].

Kompleksy inkluzyjne substancji leczniczych z CD są stosowane w farmacji głównie w celu zwiększenia rozpuszczalności i poprawy biodostępności substancji leczniczej. Ponadto kompleksowanie może wpływać na poprawę trwałości chemicznej np. substancji lotnych, substancji podlegających hydrolizie, utlenianiu, fotolizie czy izomeryzacji. Poprzez zastosowanie formy kompleksu możliwe jest również przeprowadzanie niektórych ciekłych substancji w formę stałą, maskowanie nieprzyjemnego smaku i zapachu, czy zmniejszenie właściwości drażniących błony śluzowe (tabela 2).

CD jako substancje pomocnicze w produktach leczniczych po raz pierwszy użyto w celu poprawy trwałości prostaglandyn. Pierwszym zarejestrowanym preparatem zawierającym CD były tabletki podjęzykowe Prostarmon E wprowadzone na rynek japoński w 1976 r. przez firmę Ono Pharmaceutical. Prostarmon zawiera 0,5 mg

prostaglandyny E₂ i 6 mg β-CD. Kolejny preparat zarejestrowano w 1979 r. Była to prostaglandyna E₁ w formie kompleksu z α-CD, w preparacie przeznaczonym do podania pozajelitowego [1, 37].

Tabela 2. Przykładowe funkcje cyklodekstryn w produktach leczniczych [37 - 38]

Cel kompleksowania	Substancja czynna	CD	Nazwa preparatu
Zwiększenie trwałości	PGE ₂ PGE ₁ Limaprost Olej czosnkowy Nitrogliceryna	β-CD α-CD α-CD β-CD β-CD	Prostarmon E Prostavašin Opalmon Xund Nitropen
Poprawa rozpuszczalności	Itrakonazol Diklofenak sodu Chloramfenikol Zyprasydonu maleinian Nimesulid PGE ₁	HP-β-CD HP-γ-CD M-β-CD SBE-β-CD β-CD α-CD	Sporanox Voltaren ophta Clorocil Zeldox Mesulide Fast Prostavašin
Maskowanie smaku	Cetyryzyna Nikotyna Olej czosnkowy	β-CD β-CD β-CD	Zyrtec Nicorette microtabs Xund
Poprawa biodostępności	Piroksykam Itrakonazol Estradiol Nimesulid	β-CD HP-β-CD M-β-CD β-CD	Brexin Sporanox Aerodil Mesulide fast
Zmniejszenie drażnienia	Nikotyna Piroksykam	β-CD β-CD	Nicorette microtabs Brexin

W 2008 r. firma Schering-Plough wprowadziła na rynek europejski Bridion - pierwszy preparat zawierający CD jako substancję aktywną. Jest to roztwór do iniekcji zawierający modyfikowaną cząsteczkę γ-CD (Sugammadex), stosowany w anestezjologii. Działanie preparatu polega na znoszeniu efektu zwiotczenia mięśni wywołanego podaniem rekuronium lub wekuronium, poprzez selektywne kompleksowanie tych leków w krwiobiegu. Preparat w Europie może być podawany od 2 roku życia, natomiast w USA nie uzyskał akceptacji FDA, ze względu na zbyt mało danych dotyczących potencjalnych reakcji alergicznych [4, 40, 41].

W tabelach 3 i 4 przedstawiono zestawienie handlowych preparatów farmaceutycznych zawierających w składzie CD naturalne oraz ich pochodne.

Tabela 3. Produkty lecznicze zawierające naturalne cyklodekstryny [1, 4, 7, 10, 37, 39]

Substancja lecznicza	Nazwa handlowa preparatu	Postać leku	Producent, kraj
β-cyklodekstryna			
Beneksatu chlorowodorek	Ulgut, Lonmiel	kapsułki, kapsułki	Teikoku, Japonia Shionogi, Japonia
Cefalosporyna (ME 1207)	Meiact	tabletki	Meiji Seika, Japonia
Chlordiazepoksyd	Transillium	tabletki	Gador, Argentyna
Nimesulid	Nimedex, Mesulid fast	tabletki, saszetki	Novartis
Omeprazol	Omebeta	tabletki	Betafarm, Niemcy
Kwas tiaprofenowy	Surgamyl	tabletki	Roussel-Maestrelli, Włochy
Piroksydam	Brexin, Cicladol Brexidol,	tabletki, saszetki, czopki roztwór (pediatryczny)	Chiesi, Włochy Ache, Brazylia
Difehydraminy chlorowodorek, Chlorteofilina	Stada-Travel	tabletki do żucia	Stada, Niemcy
Nikotyna	Nicorette*, Nicogum	tabletki podjęzykowe, gumy do żucia	Pharmacia, Szwajcaria
Nitrogliceryna	Nitropen	tabletki podjęzykowe	Nippon Kayaku, Japonia
PGE ₂	Prostarmon E*	tabletki podjęzykowe	Ono, Japonia
Olej czosnkowy	Allidex, Tegra, Xund Garlessence	tabletki, drażetki	Bipharm, Hermes, Niemcy Pharmafontana, USA
Jod	Mena-Gargle	roztwór	Kyushin, Japonia
Deksametazon	Glymesason	maść, tabletki	Fujinaga, Japonia
Dekstrometorfan	Rynathisol	b.d.	Synthelabo, Włochy
Cetyryzyna	Cetizin	tabletki do żucia	Losan Pharma, Niemcy
Cizapryd	Coordinax Propulsid	czopki	Janssen, Belgia
Refekoksib	Rofizgel	tabletki	Wockhardt, Indie
Flunaryzyna	Fluner	tabletki	Geno Pharmaceuticals, Indie
Betahistydyna	Betahist	tabletki	Geno Pharmaceuticals, Indie
Tiomersal	Vitaseptol	krople do oczu	Europhta, Monako
Meloxicam	Mobitil	tabletki, czopki	Medical Union Pharmaceuticals, Egipt
α-cyklodekstryna			
PGE ₁	Prostavasin*, Edex Prostandin 500	roztwór do wstrzyknięć i wlewu i.v. roztwór do wlewu i.v.	Ono, Japonia, Schwarz, Germany, USA Ono, Japonia,
Limaprost (pochodna PGE ₁)	Opalmon	tabletki	Ono, Japonia
Hexatyl cefotiamu	Pansporin T	tabletki	Takeda, Japonia
Alprostadil	Rigidur, Caverjet Dual	roztwór do wstrzyknięć i.v.	Ferring, Niemcy Pfizer
γ-cyklodekstryna			
Minoksydil	Alopexy	roztwór	Pierre Fabre, Francja

Tabela 4. Produkty lecznicze zawierające pochodne cyklodekstryn [1, 4, 7, 37, 39, 42]

Substancja lecznicza	Nazwa handlowa preparatu	Postać leku	Producent, kraj
Hydroksypropylo-β-cyklodekstryna			
Hydrokortyzon	Dexacort	roztwór	Islandia
Itrakonazol	Sporanox	roztwór do wlewu i.v.	Janssen, Belgia
Cizaprid	Propulsid	czopki	Janssen, Belgia
Indometacyna	Indocid*	krople do oczu (roztwór)	Chauvin, Francja
Mitomycyna	MitoExtra, Mitozytrex	roztwór do wlewu i.v.	Novartis, Szwajcaria
Metylo-β-cyklodekstryna			
Chloramfenikol	Clorocil	krople do oczu, roztwór	Oftardel, Portugalia
17-β-estradiol	Aerodiol*	aerozol donosowy, (roztwór)	Servier, Francja
Sulfobutyleter-β-cyklodekstryna			
Worikonazol	Vfend	roztwór do wstrzyknięć i.v.	Pfizer, USA
Zyprasydonu maleinian	Zeldox, Geodon	roztwór do wstrzyknięć i.m.	Pfizer, USA
Arypiprazol	Abilify*	roztwór do wstrzyknięć i.v.	Bristol-Myers Squibb, Włochy
Maropitantu cytrynian	Cerenia**	tabletki	Pfizer Animal Health, USA
Amiodaronu chlorowodorek	Nexterone	roztwór do wstrzyknięć i.v.	Prism Pharmaceuticals USA
Hydroksypropylo-γ-cyklodekstryna			
Diclofenak	Voltaren ophta*	krople do oczu, roztwór	Novartis, Francja
Tc-99 Tebrosim	Cardiotec	roztwór do wstrzyknięć i.v.	Bracco, USA

* preparaty zarejestrowane w Polsce; ** preparat weterynaryjny

Ilość zarejestrowanych preparatów (około 40) jest niewielka w stosunku do ilości zgłoszeń patentowych i publikacji [4, 7]. Praktyczne wykorzystanie CD, jako substancji pomocniczej przez przemysł jest z reguły ograniczone, gdyż w przypadku produktów odtwórczych, preparaty zawierające kompleks CD nie są biorównoważne z produktami zawierającymi substancję czynną nieskompleksowaną, a supergeneryki podlegają pełnym badaniom rejestracyjnym wymaganym dla nowych produktów, co wiąże się ze znacznymi kosztami rejestracyjnymi [39]. Ponadto w technologii problem może stanowić zgodność CD lub kompleksu inkluzyjnego lek-CD z pozostałymi substancjami pomocniczymi, takimi jak współrozpuszczalniki, środki konserwujące, polimery [2].

1.3.1. Cyklodekstryny w tabletkach

Podstawowym celem stosowania CD w tabletkach doustnych jest poprawa biodostępności poprzez zwiększenie rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania [5]. W odniesieniu do tabletek stosowanych w jamie ustnej najczęściej następuje zmniejszenie drażnienia błony śluzowej czy maskowanie smaku [5, 7]. CD mogą zwiększać fizyczną i chemiczną trwałość substancji czynnej. Pochodne CD mogą również zapewniać modyfikację działania leku poprzez: przedłużenie uwalniania (di- i trietylo- β -CD) [16, 43], pH zależne - opóźnione uwalnianie (karboksymetyloetylo- β -CD o pK_a 3,7) [10] lub celowane uwalnianie (np. w okrężnicy, poprzez tworzenie nierozpuszczalnych koniugatów trawionych przez florę bakteryjną) [11, 46]. CD najczęściej są stosowane w postaci kompleksów inkluzyjnych z substancją czynną, jednakże w niektórych przypadkach może być wystarczające użycie mieszaniny fizycznej [5, 14]. Wykazano, że CD mogą pełnić funkcję klasycznych środków pomocniczych ułatwiających technologię wytwarzania - jako substancje wypełniające, wiążące, porofory lub związki osmotycznie czynne [5, 10, 14, 44 - 46]. Tego typu rozwiązania nie znalazły jednak praktycznego zastosowania w produktach rynkowych.

Przykłady zastosowania CD w celu zwiększenia biodostępności substancji leczniczej po podaniu doustnym przedstawione zostały w tabeli 5.

Tabela 5. Wpływ CD na właściwości biofarmaceutyczne substancji czynnych [7, 10, 46, 47]

Obserwowany wzrost:	CD	Substancja czynna
- biodostępności	β -CD	ketoprofen, gryzeofulwina, terfenadyna
- rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania	HP- β -CD DM- β CD SBE- β -CD ME- β -CD β -CD	ketoprofen, fenytoina, gliklazyd, albendazol, kwas ursodeoksycholowy, cynaryzyna takrolimus spironolakton, atowakwon, cynaryzyna fenytoina okskarbazepina
- przenikania	HP- β -CD	flutamid
- trwałości w przewodzie pokarmowym	HP- β -CD γ -CD	rutyna digoksyna
- biodostępności po podaniu podjęzykowym	HP- β -CD	klomipramina, testosteron
- biodostępności po podaniu dopoliczkowym	SBE- β -CD HP- β -CD	danazol

Substancje pomocnicze stosowane w celu zwiększenia wydajności kompleksowania, takie jak hydrofilowe polimery (np. powidon) czy kwasy organiczne (np. kwas winowy, cytrynowy), często powodują dodatkowy wzrost biodostępności leku z kompleksu. Ketokonazol stosowany w formie kompleksu złożonego z β -CD i kwasu winowego (*ternary complex*) charakteryzuje się większą biodostępnością (u królików) w porównaniu z kompleksem ketokonazol- β -CD oraz wolnym ketokonazolem (AUC wyniosło odpowiednio 3,85; 0,65 i 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) [39].

Singh i wsp. [48] wykazali zwiększoną skuteczność przeciwwgrzybiczną (wobec *Candida albicans*) doustnych tabletek bioadhezyjnych zawierających kompleks inkluzyjny klotrymazolu z HP- β -CD. Ilość uwolnionego klotrymazolu z matrycy tabletki (guma ksantanowa i karbopol) zawierającej kompleks była dwukrotnie większa i wyniosła 40% po 8 h. W badaniach wykazano brak wpływu CD na właściwości bioadhezyjne tabletek. Dodatek CD do matrycy wpływa natomiast na zwiększenie sorpcji wody i powoduje pęcznienie matrycy tabletki mukoadhezyjnej [49].

Szejtli [39], na podstawie zestawienia wyników literaturowych (badań wykonanych u ludzi i zwierząt), stwierdził, że w przypadku podawania form skompleksowanych dochodzi do wzrostu biodostępności, a średni wzrost AUC i C_{max} wyniósł odpowiednio $1,8 \pm 0,5$ razy ($n = 44$) i $1,7 \pm 0,5$ razy ($n = 26$), natomiast wartość T_{max} uległa skróceniu o około 50% ($n = 19$). Większość substancji czynnych podawanych doustnie w formie skompleksowanej (z α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD, M- β -CD) wykazuje dwukrotnie większą biodostępność względem form nieskompleksowanych, w związku z czym zastosowanie kompleksowania prowadzi do powstania supergeneryku.

Stosując kompleksowanie leku z CD można zmienić klasyfikację BCS danej substancji - z klasy II (słabo rozpuszczalna i łatwo przenikająca) na klasę I (łatwo rozpuszczalna i łatwo przenikająca). Taki efekt otrzymano na przykład dla tolbutamidu, spironolaktonu, fenytoiny, nifedypiny, czy glibenklamidu. Również substancje klasy IV (słabo rozpuszczalne i słabo przenikające) w wyjątkowych przypadkach (rozpuszczalność < 1 ng/ml) mogą charakteryzować się lepszą biodostępnością w wyniku kompleksowania (np. nikotynian tokoferolu, itrakonazol) [50]. W przypadku substancji klasy I kompleksowanie nie zwiększa biodostępności, ale może zapewnić szybsze wystąpienie efektu terapeutycznego, a w przypadku NLPZ (np. piroksykamu, fenbufenu, ketoprofenu) zmniejszenie działania drażniącego [24].

W przeszłości dużo uwagi poświęcono możliwości zwiększenia trwałości leków w wyniku kompleksowania, jednakże procesy zachodzące w fazie stałej są dość złożone, zachodzą stosunkowo wolno i dotyczą niewielu substancji [46] (tabela 6). CD zwiększają trwałość np. nikardypiny, kolchicyny, prostaglandyny E₂, diklofenaku, sulfametoksazolu, a także substancji lotnych np. nitrogliceryny, monoazotanu izosorbidu, klofibratu, czy olejku cytrynowego [5, 7].

Tabela 6. Wpływ CD na trwałość substancji czynnych w formie stałej

Substancja czynna	CD	Efekt	Źródło
Prostaglandyna E ₂	β-CD	poprawa termostabilności	[5]
Vitamina D ₃	β-CD	100% zawartości przez 25 dni w 50°C	[5]
Nitrogliceryna	β-CD	zwiększenie termostabilności poprzez obniżenie lotności	[51]
Glibenklamid	β-CD	100% zawartości oraz brak zmian w kinetyce uwalniania do 4 lat	[46]
Diklofenak sodu	β-CD	poprawa termostabilności	[46]
Kwinapril	β-CD, HP-β-CD	zahamowanie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji	[46]
Tetracyklina	HP-β-CD	poprawa fotostabilności	[52]

CD mogą być również stosowane w celu maskowania nieprzyjemnego, a zwłaszcza gorzkiego smaku, co szczególnie jest ważne dla tabletek przeznaczonych do stosowania w jamie ustnej. Dzięki tym właściwościom udało się wyeliminować, bądź w znacznym stopniu zmniejszyć nieprzyjemny smak: bromku oksyfenonu, ceteryzyny, nikotyny, bromowodoru dekstrometorfanu, klofibratu, czy acetaminofenu [7, 38]. β-CD zastosowano w tym celu w preparatach handlowych, na przykład w tabletkach do żucia z ceteryzyną czy nikotyną (również w tabletkach podjęzykowych).

Spośród wielu prac badawczych dotyczących tabletek z CD (baza Scopus 449 rekordów) kilka doniesień dotyczy preparatów do stosowania w jamie ustnej. Badano możliwość sporządzania i zastosowania tabletek podjęzykowych z testosteronem lub estradiolem (w kompleksie z HP-β-CD), nitrogliceryną (z β-CD) oraz preparatów mukoadhezyjnych (tabletki dopoliczkowe) zawierających: danazol lub klotrymazol (z HP-β-CD), piroksykam (z β-CD), a także tabletek ulegających rozpadowi w jamie ustnej z octanem tokoferolu (z HP-β-CD) [45, 47, 49, 51, 53, 54].

CD w preparatach do stosowania w jamie ustnej są używane głównie w celu uzyskania bardzo szybkiego rozpuszczania substancji czynnej w miejscu podania, co zapewnia wzrost biodostępności w wyniku zwiększenia przenikania leku przez błonę śluzową jamy ustnej. CD mogą również pełnić rolę promotorów wchłaniania poprzez bezpośrednie oddziaływanie z błoną śluzową jamy ustnej. W przypadku tabletek dopoliczkowych CD mogą być również stosowane w celu przyspieszenia uwalniania substancji czynnej (erozja matrycy) lub w celu zwiększenia bioadhezji preparatu.

Przykładem wykorzystania CD w preparatach do stosowania w jamie ustnej jest kompleksowanie testosteronu oraz progesteronu i estradiolu z HP- β -CD, co zapewniało bardzo dobrą biodostępność po podaniu podjęzykowym [53, 54]. W badaniach *in vivo* (6 ochotników) wykryto, że 90% estradiolu podawanego podjęzykowo w formie kompleksu (1:1) uległo wchłonięciu, a połowiczny czas absorpcji wyniósł 7 min. Efekt przyspieszonego uwalniania był znoszony przy zastosowaniu nadmiaru CD (w stosunku do stechiometrii kompleksownia) i obserwowano nawet spowolnienie uwalniania.

Motoyama i wsp. [45] wykazali, że CD dodawana do tabletek szybko rozpadających się w jamie ustnej wpływa na czas rozpadu matrycy. W badaniach *in vivo* czas rozpadu tabletek z tokoferolem wzrastał wraz ze wzrostem stężenia HP- β -CD (z 30 s do 160 s przy zwiększeniu zawartości CD z 5% do 40%). Jednocześnie zaobserwowano, że dodatek CD zwiększa wytrzymałość mechaniczną tabletek, co było zjawiskiem korzystnym.

Pomimo obiecujących wyników uzyskanych z użyciem HP- β -CD, w chwili obecnej brak jest zarejestrowanych tabletek z tą pochodną (tabela 4). Większość stałych preparatów doustnych zawiera β -CD, jedynie dwa preparaty zawierają α -CD, natomiast spośród pochodnych wykorzystano SBE- β -CD w jednym preparacie handlowym.

Aspekt technologiczny

Podstawowe ograniczenie w stosowaniu CD w stałych doustnych postaciach stanowi dawka leku, która może być umieszczona w tabletku czy kapsułce [14, 39]. CD posiadają dużą masę cząsteczkową (od 970 do 1300 Da), tak więc udział procentowy substancji czynnej ulegającej „zamknięciu” w kompleksie jest niewielki (zazwyczaj są to związki o masie cząsteczkowej 120–350 Da), nawet przy dużej wydajności kompleksowania. Przykładowo, 100 mg kompleksu (o stechiometrii 1:1) utworzonego pomiędzy naturalną CD a lekiem może zawierać maksymalnie 25 mg substancji czynnej,

co oznacza, że procentowy udział substancji czynnej skompleksowanej w masie tabletki wzrasta przynajmniej 4-krotnie względem formy wolnej.

CD w formie krystalicznej mogą być tabletkowane w procesie bezpośredniego prasowania, bądź po uprzedniej granulacji (zarówno metodą na mokro, jak i na sucho) [5, 14]. Spośród naturalnych CD jedynie γ -CD charakteryzuje się niską podatnością na kompresję, wysoką kruchością i bardzo słabą zsypywalnością, w związku z czym w jej przypadku konieczne jest stosowanie granulacji. Wykazano, że β -CD wymaga niewielkich stężeń substancji poślizgowych (od 0,1% do 0,5%). β -CD charakteryzuje się dobrą prasowalnością w wyniku kompaktorowania, lepszą niż fosforan wapnia czy suszona rozpyłowo laktoza [14]. Dostępna jest modyfikowana β -CD do tabletkowania bezpośredniego. Jest to forma aglomerowana betadeksu (Kleptose DC, prod. Roquette), która posiada jeszcze lepszą zsypywalność [55]. Pande i Shangraw [56] wykazali, że forma aglomerowana jest bardziej podatna na kompresję względem formy nieaglomerowanej, jednakże po dehydratacji różnice te zanikają.

Fizykochemiczne właściwości CD są bardzo ważne dla procesu tabletkowania. CD mogą występować w różnych formach krystalograficznych i mogą zawierać różną ilość wody hydratacyjnej (np. β -CD \times 11 H₂O i β -CD \times 12 H₂O). Ich gwałtowne suszenie najczęściej prowadzi do powstania formy amorficznej [5]. Amorficzne CD charakteryzują się słabą zsypywalnością. Również siły kohezji i twardość tabletek po sprasowaniu formy amorficznej są niezadowalające. Obserwowano liniową zależność pomiędzy twardością tabletek wykonanych przez sprasowanie β -CD, a zawartością wody – wraz ze wzrostem zawartości wody z 2% do 16% twardość wzrosła odpowiednio z 25 do 300 N [5].

Krystaliczne CD przeciętnie zawierają około 12 - 16% wody. W wyniku suszenia zawartość wody może być obniżona do 7%, jednak nie jest to forma stabilna, gdyż po pewnym czasie CD adsorbują wodę z otoczenia [5, 14]. Podatność na kompresję form bezwodnych jest niewielka, poprawia się wraz ze wzrostem wilgoci. Stopień uwodnienia CD jest parametrem krytycznym dla tabletkowania, ponieważ woda w tym przypadku działa jak plastyfikator ułatwiający deformację proszku (deformacja plastyczna). Stwierdzono, że 14% wody w β -CD jest optymalne dla uzyskania dobrego kompaktorowania. W trakcie wytwarzania tabletek należy więc zwrócić szczególną uwagę na możliwość sorpcji bądź desorpcji wody oraz na interakcje pomiędzy CD a innymi substancjami pomocniczymi.

Użycie kompleksu inkluzyjnego leku z CD zmienia właściwości masy tabletkowej i uzyskanych tabletek. Między innymi wynikać to może z faktu, że kompleksy lek-CD charakteryzują się znacznie niższą zawartością wody (np. 7% dla kompleksów lek- β -CD) niż krystaliczna CD [5]. Suihko i wsp. [57] wykazali, że kompleks tolbutamidu z HP- β -CD charakteryzuje się dużo gorszą ściśliwością i słabszą zsypywalnością niż CD i mieszanina fizyczna tolbutamidu z CD. W zależności od użytej formy substancji czynnej (porowatość, powierzchnia właściwa itp.) otrzymane tabletki odznaczały się różnymi właściwościami fizykochemicznymi.

Tasic i wsp. [58] badali wpływ β -CD (50%) na właściwości wiążące paracetamolu podczas kompresji. Wykazali, że mieszanina fizyczna CD z paracetamolem ulega prasowaniu w taki sam sposób jak substancja czynna nieskompleksowana (mechanizm fragmentacji), natomiast kompleks paracetamol-CD - zgodnie z mechanizmem charakterystycznym dla CD (deformacja plastyczna).

1.3.2. Cyklodekstryny w preparatach do użytku zewnętrznego

Podstawowym celem stosowania CD w preparatach do użytku miejscowego jest zwiększanie rozpuszczalności (zwłaszcza w kroplach do oczu), zwiększanie biodostępności, poprawa trwałości oraz zmniejszenie drażnienia miejscowego [5, 9, 17, 31, 33].

Do chwili obecnej wprowadzono na rynek niewiele preparatów do stosowania miejscowego zawierających CD jako substancję pomocniczą, w tym tylko jedną maść (tabela 3 i 4).

Wpływ na trwałość substancji czynnej

Lach i Chain [wg 5] już w 1964 r. wykazali, że zastosowanie kompleksu benzokainy z β -CD wpływa na spowolnienie hydrolizy estru w roztworze wodnym.

CD mogą zwiększać lub zmniejszać trwałość substancji czynnych (w formie stałej oraz w roztworach). W tabeli 7 przedstawiono przykłady wpływu CD i ich pochodnych na trwałość substancji leczniczych w roztworach wodnych.

Ponieważ preparaty do stosowania miejscowego bardzo często są roztworami wodnymi (krople do oczu, nosa, roztwory) lub zawierają wodę (hydrożele, kremy, emulsje), dochodzi w nich do dysocjacji kompleksu i część substancji aktywnej przebywa poza wnętrzem CD, przez co nie jest chroniona. W związku z tym głównym czynnikiem

decydującym o możliwości poprawy trwałości substancji czynnej jest stała trwałości kompleksu (K_c).

Tabela 7. Wpływ cyklodekstryn na rozkład substancji leczniczych w roztworach wodnych [5, 59, 60]

Substancja	Zwiększenie trwałości	Obniżenie trwałości
Amfoterycyna B	γ -CD	
Indometacyna	β -, γ -, HP- β -, DM- β -CD	α -CD
Metronidazol	β -CD	
Mitomycyna C	γ -, β -CD	
Prostaglandyna E ₁	HP- β -CD	α -, β -CD
Witamina A (octan)		DM- β -CD
Witamina D ₃	DM- β -CD	
Nitrogliceryna		β -CD
Disoksaryl	DM- β -CD	

Jednym z przykładów zwiększania trwałości w środowisku hydrofilowym (krople do nosa) jest disoksaryl (nowy związek przeciwwirusowy). Roztwór wodny kompleksu disoksarylu z DM- β -CD o pH 7,0 był trwały 15 dni (temp. 4°C), natomiast w tych warunkach substancja aktywna nieskompleksowana całkowicie hydrolizowała w czasie 36 h [59].

Nadal prowadzone są liczne prace doświadczalne nad możliwością zastosowania CD między innymi do stabilizacji peptydów, substancji lotnych, fotostabilizacji czy ochrony leku przed metabolizmem tkankowym w miejscu podania.

W przypadku stabilizacji peptydów, inkluzji nie podlega cała cząsteczka a jedynie pewne jej fragmenty [11, 46]. W badaniach *in vitro* wykazano, że utworzenie kompleksu czynnika wzrostu komórek naskórka (rhEGF) z HP- β -CD znacznie zwiększa jego trwałość (temp. 4°C) względem wolnego peptydu w podłożu hydrożelowym (poloksamer) [61].

Zastosowanie CD może powodować obniżenie lotności substancji [4, 6, 51]. Proniuk i wsp. [62] wykazali, że zastosowanie HP- β -CD obniża lotność NN-dietylo-3-metylobenzamidu. Jednocześnie udowodnili, że zwiększenie trwałości może zależeć od rodzaju użytej CD. Na przykład HP- β -CD istotnie zwiększała trwałość, natomiast γ -CD w niewielkim stopniu (w obu przypadkach uzyskano kompleks inkluzyjny). Również w przypadku kompleksu nitrogliceryny z β -CD dochodzi do poprawy trwałości głównie w

wyniku obniżenia lotności [51]. Wpływ kompleksowania na właściwości nitrogliceryny opisano w rozdziale 2.4.

Poprawa trwałości może dotyczyć także zahamowania rozkładu enzymatycznego, co może przyczynić się do zwiększenia biodostępności niektórych preparatów. Przykładowo, wykazano poprawę zarówno trwałości chemicznej, jak i obniżenie rozkładu enzymatycznego gancyklowiru kompleksowanego z HP- β -CD w kroplach do oczu [63]. Również kompleksowanie deksametazonu z β -CD i HP- β -CD chroni substancję czynną przed metabolizmem przez enzymy w skórze. Po 2 h inkubacji w homogenizacie skóry w przypadku nieskompleksowanego deksametazonu degradacji uległo 65% leku, a w przypadku kompleksu jedynie 30% [64]. Jednak wyniki uzyskane dla skóry nie mają zapewne znaczenia praktycznego ze względu na brak przenikania cząsteczek CD do tej tkanki.

Możliwa jest stabilizacja prostaglandyny E₁ w preparatach półstałych. Z udziałem kompleksu PGE₁ z karboksymetyloetylo- β -CD otrzymano trwałą maść na podłożu z mieszaniny alkoholi tłuszczowych i glikolu propylenowego, przeznaczoną do leczenia schorzeń naczyń obwodowych [65]. Należy tutaj podkreślić, iż bardzo duże znaczenie ma rodzaj zastosowanej CD, gdyż, tak jak podano w tabeli 7, zastosowanie α -CD czy β -CD powoduje przyspieszenie rozkładu PGE₁ w roztworze wodnym.

Istnieje kilka prac badawczych dotyczących potencjalnej fotostabilizacji filtrów słonecznych poprzez kompleksowanie [66 - 70]. Scalia i wsp. [66, 70] uzyskali nieznaczny wzrost fotostabilności w wyniku kompleksowania trans-2-etyloheksylo-p-metoksycynamonianu z β -CD oraz istotną poprawę trwałości 4-metylobenzylidynianu kamfory w kompleksie z RM- β -CD. Kompleksowanie kwasu sulfonowego fenylobenzimidazolu z HP- β -CD prowadzi do znacznej poprawy trwałości substancji w kremie. Po 6 miesiącach przechowywania (temp. 25°C) pozostało odpowiednio 99% i 81% dawki początkowej dla kompleksu oraz formy nieskompleksowanej. W przypadku bezpośredniego naświetlania kompleksu nie obserwowano również tworzenia się wolnych rodników obecnych w formie nieskompleksowanej [67].

Lin i wsp. [71, 72] donoszą o zwiększonej fotostabilności kompleksu kwasu retinoinowego oraz tretinoiny z HP- β -CD. Również Caddeo i wsp. [73] wykazali, że kompleksowanie tretinoiny (z β -CD) zwiększa jej trwałość. Natomiast Brisaert i wsp. [74] oraz Froming i Szejtli [5] piszą o braku możliwości stabilizacji tretinoiny poprzez kompleksowanie.

W wyniku zwiększenia trwałości substancji leczniczej może dojść do poprawy biodostępności leku. Zwiększona trwałość w roztworze wodnym prostaglandyny E₁ skompleksowanej z użyciem HP-β-CD oraz dobra rozpuszczalność pozwoliły na otrzymanie zadowalającej biodostępności hormonu po podaniu donosowym u szczurów [60].

Z użyciem CD stabilizowano roztwory przesycone, co prowadziło do zwiększenia biodostępności. Dzięki użyciu HP-β-CD udało się uzyskać wzrost przenikania diklofenaku sodu z roztworu przesyconego (w obecności hypromelozy) [75].

Trwałość kompleksów w preparatach

Stosowanie CD w preparatach dość często wiąże się z ryzykiem występowania interakcji pomiędzy wnętrzem cząsteczki CD a innymi składnikami. Zjawisko to może prowadzić do wypierania z połączenia kompleksowego substancji czynnej i przez to wpływa na uwalnianie leku.

W roztworach wodnych stosowanie niskich stężeń współrozpuszczalników, takich jak etanol czy glikol propylenowy, może prowadzić do wyparcia substancji czynnej (testosteronu, ibuprofenu) z wnętrza CD [2, 16]. W przypadku kompleksu piroksyjamu z HP-β-CD obserwowano 28-krotny spadek stałej stabilności kompleksu w obecności glikolu propylenowego [76]. Huang i wsp. [66] opisali powstawanie połączeń kompleksowych pomiędzy α-CD a polimerami: makrogolem i polikaprolaktonem.

Do jednej z częściej opisywanych niezgodności należy oddziaływanie CD ze środkami konserwującymi. Poza wyparciem substancji aktywnej z połączenia kompleksowego (skutkującym np. obniżeniem rozpuszczalności czy trwałości) prowadzi to również do osłabienia skuteczności przeciwdrobnoustrojowej. Przykładowo, wykazano istnienie interakcji pomiędzy HP-β-CD a chlorkiem benzalkoniowym, glukonianem chlorheksydyny, chlorambutanolem czy parabenami (metylowy i propylowy). Wykazano również, że środki konserwujące o charakterze lipofilowym silniej oddziałują z CD (parabeny) od środków rozpuszczalnych w wodzie (chlorek benzalkoniowy, glukonian chlorheksydyny, bronopol). Z tego względu w preparatach zawierających CD zaleca się stosowanie środków konserwujących rozpuszczalnych w wodzie, a ich stężenie powinno być nieco większe od standardowo używanego [31, 46, 78, 79]. Również związki powierzchniowo czynne, takie jak laurylosiarczan sodu czy polisorbit 20, mogą wypierać lek z kompleksu [80].

W preparatach półstałych obserwowano interakcje pomiędzy składnikami podłoża a kompleksem, które zależały od rodzaju użytej CD. Przykładowo HP- γ -CD i γ -CD zastosowane w celu zapobiegania rekrytalizacji trudno rozpuszczalnego serykozydu zwiększały trwałość substancji w emulsjach do stosowania zewnętrznego (preparaty były trwałe przez 6 miesięcy w temp. 40°C). Natomiast β -CD w tym układzie nie zwiększała trwałości, gdyż dochodziło do szybkiego wytrącenia substancji czynnej, co autorzy tłumaczą dysocjacją kompleksu z powodu interakcji pomiędzy wnętrzem β -CD a składnikami emulsji [81].

Wpływ cyklodekstryn na uwalnianie substancji czynnych z maści

Ze względu na fakt, iż preparaty zawierające kompleksy inkluzyjne z reguły charakteryzują się różnym od preparatu odniesienia (forma nieskompleksowana) profilem uwalniania, badanie szybkości uwalniania dla tych form jest podstawowym, często wykonywanym testem.

CD mogą powodować zarówno wzrost, jak i spadek szybkości uwalniania. Przykłady substancji, dla których obserwowano zmiany w kinetyce uwalniania po zastosowaniu kompleksowania przedstawiono w tabeli 8.

Kinetyka uwalniania leków z kompleksów zawartych w preparatach półstałych przede wszystkim zależy od właściwości fizykochemicznych podłoża i będzie różna w zależności od typu maści [82, 83]. Znaczenie ma rodzaj oraz stężenie użytych CD, przy czym zastosowanie nadmiaru CD prawie zawsze prowadzi do spowolnienia uwalniania [84].

W przypadku zawiesin wodnych substancji czynnej (roztwór nasycony) wzrost stężenia CD prowadzi do wzrostu przenikania, natomiast w układach, w których lek występuje tylko w formie rozpuszczonej (roztwory nienasycone) wzrost stężenia CD prowadzi do obniżenia dyfuzji [84].

Wzrost szybkości uwalniania najczęściej związany jest ze zwiększeniem rozpuszczalności substancji leczniczej w podłożu i z reguły dotyczy substancji trudno rozpuszczalnych (lipofilowych) wprowadzanych do podłoża hydrofilowych. Zwiększenie rozpuszczalności może być zarówno wynikiem zastosowania kompleksu, jak i wprowadzenia dodatku CD do podłoża [5, 33].

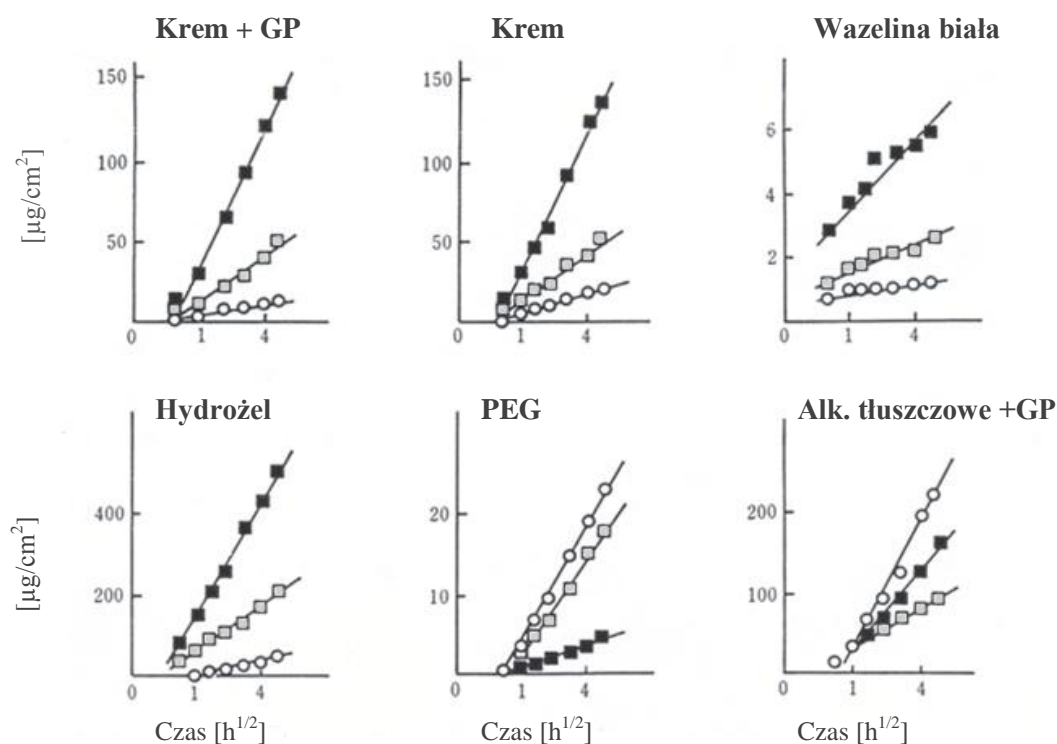
Tabela 8. Przykłady substancji, dla których wykazano zwiększenie lub obniżenie uwalniania w wyniku kompleksowania z CD

Zwiększenie uwalniania				
Nr	Substancja	Cyklodekstryna	Preparat	Źródło
1.	Diklofenak sodu	β -CD, HP- β -CD	Hydrożel (hypromeloza)	[85]
2.	Sulfometizol			
3.	Piroksykam	β -CD, RM- β -CD	Hydrożel (hypromeloza)	[76]
4.	Hydrokortyzon	β -CD, HP- β -CD	Krem o/w	[86]
5.	Kwas 4-bifenyloctowy	β -CD, HP- β -CD, DM- β -CD	Maść hydrofilowa	[87]
6.	Minocyklina	β -CD, α -CD	Maść hydrofilowa	[88, 89]
7.	Prednizolon	β -CD, DM- β -CD	Maść hydrofilowa, maść absorpcyjna, wazelina, hydrożel	[90]
8.	Kwas azeleinowy	HP- β -CD	Zawiesina wodna	[91]
9.	Fenbufen	β -CD, HP- β -CD, PM- β -CD	Emulsja w/o, wazelina, maść absorpcyjna, makrogolowa (tylko HP- β -CD)	[82]
10.	Diklofenak sodu	β -CD	Hydrożel (metyloceluloza, hypromeloza)	[16]
11.	Piroksykam			
12.	Naproksen	β -CD,	Hydrożel, krem, maść	[92]
Zmniejszenie uwalniania				
Nr	Substancja	Cyklodekstryna	Preparat	Źródło
1.	Minocyklina	DM- β -CD, γ -CD, TM- β -CD	Maść hydrofilowa	[88, 89]
2.	Triamcinolon	γ -CD-NMA (akrylamidometyl)	Hydrożel	[93]
3.	Estradiol	M- β -CD, HP- β -CD	Hydrożel	[94]
4.	Piroksykam	β -CD	Hydrożel	[95]
5.	Klotrymazol	β -CD	Hydrożel	[96]
6.	Prednizolon	β -CD, DM- β -CD	Maść makrogolowa, maść absorpcyjna (70% glikolu propylenowego)	[90]
7.	Nikotyna	β -CD	TTS	[97]
8.	Flurbiprofen	β -CD	Hydrożel (metyloceluloza, hypromeloza)	[16]
9.	Pilokarpina	β -CD	Insert oczny z metylocelulozy	[16]
10.	Kamfora	HP- β -CD, HP- γ -CD	Roztwór	[9]
11.	Hydrokortyzon	HP- β -CD	Roztwór	[98]
12.	Oksybenzon	HP- β -CD	Roztwór	[99]

W badaniach wykazano wzrost szybkości uwalniania dla leków z grupy NLPZ (piroksykam, diklofenak sodu), kortykosteroidów (betametazon, prednizolon, dipropionian beklometazonu), czy substancji stosowanych w terapii trądziku (kwas azelainowy) (tabela 8). W przypadku piroksykamu zastosowanie kompleksu inkluzyjnego z CD prowadziło do wzrostu uwalniania z 10% po 60 h do 100% po 10 min [76].

Bardzo duże znaczenie dla uwalniania ma rodzaj użytego podłoża. Hydrofilowe CD będą zwiększały uwalnianie lipofilowych substancji z hydrofilowych podłoży zawierających wodę. W przypadku kortykosteroidów szybkość uwalniania wzrastała z preparatów zawierających wodę, natomiast preparaty zawierające alkohole tłuszczowe, glikol propylenowy czy makrogol charakteryzowały się spowolnionym uwalnianiem [83].

Na ryc. 3 przedstawiono wyznaczone przez Uekamę i wsp. [83] profile uwalniania z kompleksów inkluzyjnych prednizolonu z β -CD i DM- β -CD.



Ryc. 3. Wpływ składu preparatów półstałych oraz zastosowanej formy substancji leczniczej na profil uwalniania prednizolonu (GP – glikol propylenowy):

○ – prednizolon, □ – kompleks prednizolonu z β -CD, ■ – kompleks prednizolonu z dimetylo- β -CD

Najwięcej prednizolonu uwolniło się z hydrożelu - prawie 4-krotnie więcej niż z kremu (40% wody). Dodatek glikolu propylenowego (GP) nie miał wpływu na szybkość uwalniania z kremu. Zastosowanie obu typów CD zwiększało uwalnianie substancji czynnej z preparatów zawierających wodę (hydrożel, krem), przy czym wzrost uwalniania był znacząco wyższy w przypadku pochodnej metylowej β -CD. Uzyskano odpowiednio 4- i 10-krotnie większe uwalnianie prednizolonu po zastosowaniu kompleksu z β -CD oraz DM- β -CD, zarówno w hydrożelu jak i kremie. Natomiast w przypadku preparatów bezwodnych: maści makrogolowej (PEG) oraz maści składającej się z alkoholi tłuszczowych i glikolu propylenowego, ilość uwolnionej substancji czynnej z kompleksu była znacznie mniejsza niż obserwowana dla wolnego prednizolonu.

Odwrotną zależność pomiędzy udziałem wody w podłożu a uwalnianiem wyznaczono dla fenbufenu (lek przeciwzapalny). W tym przypadku uwalnianie zachodziło szybciej z podłoża bezwodnych. Spośród badanych prób największe uwalnianie uzyskano z kompleksu fenbufenu z HP- β -CD inkorporowanego do maści makrogolowej – było ono 20-krotnie większe od uzyskanego dla substancji nieskompleksowanej. Natomiast zastosowanie β -CD i PM- β -CD nie miało wpływu na kinetykę uwalniania substancji czynnej z tego podłoża [82].

Na przykładzie diklofenaku sodu w kompleksie z HP- β -CD lub β -CD wykazano, że uwalnianie leku może zależeć od stężenia polimeru w matrycy hydrożelowej oraz stechiometrii kompleksu. W żelach zawierających 1% hypromelozy uwalnianie diklofenaku sodu z kompleksów z HP- β -CD było szybsze od uzyskanego dla nieskompleksowanej substancji, niezależnie od stechiometrii kompleksowania (lek:CD 2:1; 1:1; 1:3). Natomiast z żelu zawierającego 2% polimeru tylko kompleks o stechiometrii 2:1 uwalniał lek z większą szybkością, podczas gdy uwalnianie z kompleksów o stechiometrii 1:3 i 1:1 było spowolnione. Autorzy zakładają, że w przypadku niskich stężeń CD dochodzi do zmniejszenia oddziaływań lek – polimer w związku, z czym dyfuzja zachodzi szybciej, natomiast przy nadmiarze CD w podłożu dochodzi do utrudnienia dyfuzji poprzez dodatkowe oddziaływanie leku z pierścieniami CD [85].

Spadek szybkości uwalniania najczęściej związany jest ze zmniejszeniem rozpuszczalności substancji czynnej, w przypadku zastosowania CD będzie miał miejsce dla kompleksów o niskiej rozpuszczalności (izoterma rozpuszczalności typu B) [16]. Na uwalnianie ma również wpływ stała trwałości kompleksu. Uważa się, że uwalnianie może być spowolnione przy wartościach $>10000 \text{ mol/l}^{-1}$. Zastosowanie nadmiaru CD w

preparacie najczęściej prowadzi do zmniejszenia uwalniania, poprzez zmniejszenie aktywności termodynamicznej substancji czynnej w podłożu [76, 85]. Duże znaczenie ma także rodzaj podłoża. Przede wszystkim zastosowanie podłoża bezwodnych lipofilowych może powodować obniżenie uwalniania, gdyż brak jest środowiska do dysocjacji kompleksu [83].

Wpływ cyklodekstryn na przenikanie substancji czynnych przez skórę

Największe nadzieje wiązano z możliwością użycia CD, jako uniwersalnych promotorów wchłaniania [9, 100]. Uważa się, że niektóre CD mogą oddziaływać bezpośrednio z barierami biologicznymi, jednak zdania, co do siły oddziaływania i rzeczywistego wpływu na promocję wchłaniania są podzielone [5, 8, 9, 33, 101, 102].

Mechanizm działania CD jako promotorów wchłaniania najprawdopodobniej polega na czasowym zaburzaniu struktury warstw lipidowych w barierach organizmu, w tym również w obszarach międzykomórkowych lipidów warstwy rogowej naskórka. CD tworzą kompleksy inkluzyjne z substancjami wchodzącymi w skład błon komórkowych lub naskórka, takimi jak: fosfolipidy (zwłaszcza fosfatydylocholina i sfingomielina), lecytyna, cholesterol czy polipeptydy, jednakże w warunkach standardowej aplikacji oddziaływania te będą osłabiane przez interakcje leku i składników podłoża z wnętrzem CD [9, 35, 98, 100].

CD nie przenikają do skóry przez barierę *stratum corneum* [9]. Udowodniono, że jedynie metylowe pochodne CD są w stanie w niewielkim stopniu oddziaływać z cholesterolem i triglicerydami na powierzchni warstwy rogowej skóry, jednak badania z użyciem DSC i spektrofotometrii w podczerwieni wykazały brak zmian w strukturze warstwy rogowej [9]. Wykazano, że RM- β -CD dopiero w stężeniu 10% (roztwór wodny) w istotny sposób ekstrahuje cholesterol z izolowanego naskórka (nawet 5-krotnie obniżają stężenie), nie wpływa jednak na zawartość ceramidów i wolnych kwasów tłuszczowych [35].

Za główne przyczyny wzrostu biodostępności w wyniku kompleksowania uważa się obecnie zwiększoną dostępność leku na powierzchni bariery biologicznej oraz zwiększoną rozpuszczalność substancji czynnej w podłożu [84, 103]. Loftsson i Masson [33] podają, że CD mogą zwiększać dostępność leków jedynie w przypadku obecności wody w preparacie. Stwierdzono również, że tylko, jeśli lek posiada właściwości

fizykochemiczne pozwalające na absorpcję do tkanki, będzie dochodzić do zwiększonego wchłaniania substancji czynnej z formy kompleksu [15].

W tabeli 9 przedstawiono przykłady leków, dla których wykazano zmiany w przenikaniu przez skórę *in vitro* w obecności CD.

Tabela 9. Przykłady substancji, dla których wykazano wpływ CD na wchłanianie do skóry lub przenikanie przez nią

Substancja	Formulacja		Skóra	Efekt	Źródło
	CD	Podłoże			
Serikozyd	γ -CD	emulsja o/w	świni	2,6 x większe przenikanie	[79]
Celekoksib	HP- β -CD (5%)	zawiesina	ludzka (okluzja)	6 x większe przenikanie	[104]
	DM- β -CD (5%)	roztwór		7 x większe przenikanie	
Ibuprofen	HP- β -CD (10%)	roztwór	bezwłosych myszy	15 x większe przenikanie; 3 x większa absorpcja	[105]
	HP- β -CD (20%)			brak wpływu na przenikanie i absorpcja	
Ketoprofen	HP- β -CD	zawiesina pH 4,5	szczura	3 x większe przenikanie	[106]
Hydrokortyzon	M- β -CD	zawiesina	bezwłosych myszy	wzrost przenikania	[107]
Hydrokortyzon	β -CD HP- β -CD	żel krem o/w	ludzka	2 x mniejsza absorpcja	[101]
Butylmetoksydibenzoylmetan	SBE- β -CD	roztwór (etanol: glikol propylenowy: woda)	ludzka	3,5 x mniejsza absorpcja do epidermy, w <i>s.c.</i> brak różnic	[108]
Pribedil	RM- β -CD	roztwór	bezwłosych szczurów	obniżenie przenikania	[35]
Deksametazon	HP- β -CD	hydrożel (2% HEC)	bezwłosych myszy	3 x większe przenikanie	[64]
	β -CD			2 x większe przenikanie	
Bupranolol	HP- β -CD (10%)	zawiesina	szczura	3,8 x większe przenikanie	[109]
	PM- β -CD (10%)			4,6 x większe przenikanie	
Oksybenzon	HP- β -CD	zawiesina	bezwłosych myszy	35 x większe przenikanie	[110]
Lewotyroksyna	DM- β -CD	roztwór	królika	1,5 x mniejsza absorpcja (nieistotne statystycznie)	[111]
Kapsaicyna	HP- β -CD (2,2%)	roztwór	szczura	1,4 x większe przenikanie	[112]
	HP- β -CD (15%)			11,4 x mniejsze przenikanie	
Metopimazyna	HP- β -CD (20%)	roztwór	świni	1,6 x większe przenikanie	[113]
	PM- β -CD (20%)			4 x większe przenikanie	

s.c. – warstwa rogowa

Gdy dochodzi do wzrostu rozpuszczalności substancji czynnej w wyniku kompleksowania, wzrasta najczęściej również przenikanie. Zależność taką uzyskano na przykład dla serikozydu z β -CD i γ -CD, hydrokortyzonu z M- β -CD, ketoprofenu z HP- β -CD oraz celekoksibu z M- β -CD i HP- β -CD.

Podjęmowano próby zastosowania CD jako promotorów sorpcji umożliwiających podanie przezskórne leku w celu wywołania działania ogólnego [103, 109, 114]. Utworzenie kompleksów bupranololu z HP- β -CD i PM- β -CD powoduje zarówno wzrost rozpuszczalności leku, jak i zwiększenie przenikania *in vitro*. Przenikanie bupranololu było odpowiednio 4- i 5-krotnie większe dla kompleksów z HP- β -CD i PM- β -CD niż dla zawiesiny substancji czynnej [109].

Jedynie w przypadku PM- β -CD, skóra wstępnie traktowana tą pochodną (10% m/obj.) wykazywała prawie 2-krotnie większą przepuszczalność dla bupranololu. Metylowa pochodna działa jak klasyczny promotor wchłaniania, zwiększa przenikanie leku w wyniku zaburzenia bariery skórnej (jednakże różnica między CD była niewielka) [109]. Również przenikanie metopimazyny (leku przeciwwymiotnego) jest większe, gdy lek występuje w postaci kompleksu inkluzyjnego z PM- β -CD. Zwiększenie przenikania przez skórę świnią nie pozwoliło jednak na uzyskanie stężenia terapeutycznego, umożliwiającego osiągnięcie działania przeciwwymiotnego [103].

Czasem, pomimo znacznego zwiększenia rozpuszczalności substancji czynnej w wyniku kompleksowania, może dojść do obniżenia jej przenikania do skóry. Wykorzystuje się ten efekt w celu obniżania wchłaniania substancji o działaniu miejscowym charakteryzujących się potencjalnym działaniem toksycznym np. filtrów słonecznych, środków konserwujących, składników perfum [9, 33].

Przykładem jest zastosowanie kompleksu inkluzyjnego lewosimendanu z HP- β -CD. Uzyskano 16-krotny spadek szybkości przenikania substancji czynnej przez naskórek ludzki *ex vivo* w porównaniu do roztworu wodnego (pH 5), przy czym rozpuszczalność formy skompleksowanej była ponad 80 razy większa [114]. Wykazano zmniejszone przenikanie przez skórę myszy *ex vivo* parabenu metylu kompleksowanego HP- β -CD oraz parabenu propylu w kompleksie z β -CD i DM- β -CD [9].

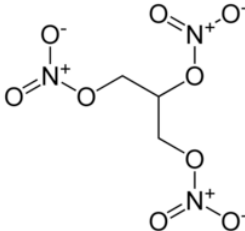



Jednym z nowszych pomysłów na zastosowanie w podłożu maściowym kompleksów lek-CD jest celowane podawanie leków do mieszków włosowych. Na przykładzie kompleksu inkluzyjnego kurkuminy z HP- γ -CD wykazano, że możliwe jest przenikanie cząsteczek kompleksów do podstawy włosa [115].

2. NITROGLICERYNA

2.1. Ogólna charakterystyka

Nitrogliceryna (NTG) (tabela 10) to ester kwasu azotowego i glicerolu. Jest to substancja nietrwała chemicznie (pkt. 2.2.).

Tabela 10. Właściwości fizykochemiczne nitrogliceryny [116 - 119]

1. Wzór strukturalny	
2. Nazwa chemiczna	triazotan glicerolu, triazotan 1,2,3-propanotriolu (IUPAC)
3. Wzór sumaryczny	C ₃ H ₅ N ₃ O ₉
4. Masa cząsteczkowa	227,09 g/mol
5. Postać	lotna, oleista ciecz; występuje w dwóch formach krystalicznych: labilnej (temp. topn. + 2,8°C) stabilnej (temp. topn. + 13,2°C)
6. Temperatura topnienia	+ 13,2°C
7. Temperatura wrzenia	145°C (gwałtowny rozkład)
8. Rozpuszczalność	woda – 1 : 800, etanol – 1 : 4 słabo rozpuszczalna w glicerolu, miesza się z acetonem, chloroformem, eterem
9. logP	1,6 [wg 116]; 2,0 [wg 119]
10. Status	substancja farmakopealna: Ph. Eur., B.P., USP, FP
11. Bezpieczeństwo	wybuchowa, silnie toksyczna, groźna dla środowiska   

NTG to bezbarwna bądź blado żółta, lotna, oleista ciecz charakteryzująca się słodkawym, piekącym smakiem. Jest substancją wybuchową i eksploduje pod wpływem gwałtownego ogrzewania bądź wytrząsania.

NTG jest głównie stosowana w leczeniu choroby niedokrwiennej serca, zwłaszcza w napadach dławicy piersiowej w celu przerwania bólu wieńcowego. NTG to donor tlenu azotu (NO), główne jej działanie polega na rozszerzaniu naczyń krwionośnych tętniczych oraz bardzo silnym naczyń żylnych obwodowych. NO aktywuje cyklazę guanylową, przez co wpływa na stężenie jonów Ca^{2+} i rozkurcz mięśni gładkich [120, 121]. Ze względu na zdolność relaksacji mięśni gładkich, w tym wewnętrznego zwieracza odbytu, NTG ostatnio stosowana jest również miejscowo w leczeniu przewlekłej szczeliny odbytu [122 - 125].

NTG jest dobrze absorbowana przez błonę śluzową jamy ustnej i przewodu pokarmowego oraz przez skórę. Niezależnie od drogi podania, biodostępność NTG jest mniejsza niż 100% [121, 126]. Iga i Ogawa [119] wykazali, że biodostępność NTG po podaniu doustnym u psów wynosi tylko około 2%. NTG po podaniu doustnym ulega silnej biotransformacji, jest raptownie i prawie całkowicie metabolizowana w wątrobie (efekt pierwszego przejścia), natomiast podana dożylnie ulega rozkładowi enzymatycznemu (czerwone krwinki) i hydrolizie (surowica). W wyniku biotransformacji NTG powstaje tlenek azotu oraz dwunitraty, które w wyniku dalszej hydrolizy metabolizowane są do nieaktywnych mononitratów [121, 122, 127].

Okres półtrwania po podaniu dożylnym wynosi od 2 do 5 min, a po podaniu podjęzykowym około 5 min. Czas działania NTG w zależności od drogi podania przedstawiono w tabeli 11 [122, 123]. Około 20% dawki podanej podjęzykowo wydala się z moczem w czasie 24 h, głównie w postaci mononitratów [120].

Tabela 11. Czas działania NTG [122, 123]

Droga podania	Początek działania	Czas działania
wlew dożylny	1 – 2 min (natychmiast)	3 – 5 min
tabletki podjęzykowe	po 1 – 3 min	30 – 60 min
maść	w ciągu 30 min	4 – 8 h
TTS	w ciągu 30 min	8 – 24 h

Z powodu silnej biotransformacji w wątrobie, stężenie NTG wykrywane we krwi są na poziomie ng/ml. W zależności od drogi podania wykrywano wyższe stężenia po podaniu podjęzykowym lub przez skórę niż doustnym.

Po podaniu podjęzykowym tabletki zawierającej 0,3 mg NTG już po 3 min we krwi oznaczano 1,4 ng/ml substancji czynnej, natomiast podanie doustne 6,5 mg bądź aplikacja na skórę 16 mg (w maści lipofilowej) dawała odpowiednio stężenia rzędu 0,2 i 0,3 ng/ml w czasie 20 i 60 min po podaniu [120].

2.2. Trwałość NTG i sposoby stabilizacji

NTG jest nietrwała chemicznie. Ulega hydrolizie oraz rozkładowi termicznemu. Dochodzi do adsorpcji i absorpcji NTG do opakowań z tworzyw sztucznych oraz gumy [116, 123, 127 - 130]. Straty w zawartości NTG w preparatach leczniczych są przede wszystkim powodowane jej lotnością oraz interakcją z materiałem opakowania [116, 127, 131].

BP zaleca przechowywać stężone roztwory NTG w pojemnikach zamkniętych, bez dostępu światła w temp. od 8 do 15°C. Przechowywanie czystej substancji jest zabronione ze względu na właściwości wybuchowe, natomiast rozcieńczone formy stałe można przechowywać w zamkniętych opakowaniach w temperaturze nieprzekraczającej 25°C. NTG jest substancją lotną, prężność par w temp. 20°C wynosi 0,00026 mm [127].

Rozkład termiczny rozpoczyna się już w temp. 50-60°C. W temp. 135°C powstają żółte pary azotu, substancja wybuchu przy 218°C z wydzieleniem obojętnych gazów (pary wodnej, dwutlenku węgla, tlenu i azotu). NTG jest trwała w roztworach o lekko kwaśnym odczynie (pH 3 - 6) oraz względnie trwała w roztworach obojętnych, natomiast ulega szybkiemu rozkładowi w obecności silnych alkaliów. W wyniku hydrolizy alkalicznej powstają początkowo ketony i jony azotanowe, a następnie dikarbonyłowe i trikarbonyłowe produkty rozkładu oraz glicerol. Hydroliza w środowisku kwaśnym przebiega wolniej, prowadząc do powstania 1,3- oraz 1,2-diazotanu glicerylu (1:2) [116].

NTG podlega w znacznym stopniu adsorpcji oraz absorpcji do opakowań wykonanych z tworzyw sztucznych, takich jak chlorek poliwinylu, propionian celulozy, polistyren oraz polietylen. Adsorbuje również do zamknięć, z którymi nie ma bezpośrednio kontaktu, zwłaszcza do gumowych zatyczek w fiolkach iniekcyjnych. Nie absorbuje natomiast lub absorbuje w niewielkim stopniu do pojemników ze szkła oraz tub wykonanych z polietylenu o wysokiej gęstości (HDPE) [123, 127, 131]. Nie obserwowano również adsorpcji NTG do filtrów nylonowych. Wiele danych dotyczących oddziaływania NTG z opakowaniami odnosi się do roztworów lub koncentratów do podania pozajelitowego [127, 128-130].

W latach 60-tych i 70-tych XX w. prowadzono liczne badania nad stabilizacją NTG w tabletkach i roztworach [132-140]. W ich wyniku firma Park-Davis wprowadziła na rynek amerykański pierwsze tabletki z NTG określone mianem stabilizowanych (wczesne lata 70-te). Były to tabletki formowane przez wylewanie (*molded*) zawierające dodatek niskocząsteczkowego makroglu. W tym czasie firma Eli Lilly, w oparciu o badania Pikala i Le, zastosowała w celu poprawy trwałości NTG powidon, natomiast dwa lata później firma Warner Chilcott (USA) jako pierwsza wprowadziła tabletkowanie bezpośrednie używając do stabilizacji celulozę mikrokrystaliczną i powidon [132]. Dostępne na rynku europejskim (w tym w Polsce) tabletki NTG do tej pory są wykonywane w ten sposób, a ich skład nie uległ zmianie.

Obecnie, ze względu na swoje właściwości, NTG występuje tylko w formie rozcieńczonej o zalecanym stężeniu nieprzekraczającym 10%. W produktach leczniczych do rozcieńczania używa się następujących substancji obojętnych: laktozy, glukozy, mannitolu, sorbitolu, makroglu oraz substancji o właściwościach obniżających lotność, takich jak: glikol propylenowy, glikol tetrametylenowy, powidon, poloksamer, acetylowane monoglicerydy, celulozę mikrokrystaliczną. Jednakże niektóre z tych substancji (np. etanol, makrogle) w dużych stężeniach mogą przyspieszać rozkład NTG. Alternatywną metodą poprawy trwałości jest tworzenie kompleksów inkluzyjnych NTG z β -CD (NTG-CD) [5, 116, 117, 127, 131, 141].

2.3. Charakterystyka kompleksu inkluzyjnego NTG-CD

Kompleks inkluzyjny NTG z β -CD został otrzymany przez japońskich naukowców: Akito, Nakajima i Horioka i opatentowany w 1975 r. przez firmy Tein Limited (Osaka) oraz Nippon Kayaku Kabushiki Kaisha (Tokio) [51]. Opatentowano kompleks, metodę jego otrzymywania oraz zastosowanie skompleksowanej formy NTG do otrzymywania stałych doustnych postaci leku (granulat, tabletki) charakteryzujących się zwiększoną trwałością substancji czynnej.

Akito i wsp. [51] zastosowali metodę tworzenia kompleksów w roztworze wodnym. W temp. 50 - 80°C do roztworu CD (5 - 14%), wprowadzano, w trakcie mieszania, substancję leczniczą (NTG lub NTG w roztworze etanolem lub acetonie), a następnie w wyniku chłodzenia dochodziło do wytrącenia utworzonych kompleksów. Uzyskano w kompleksie zawartość NTG w zakresie od 8 do 15%. Na podstawie badań

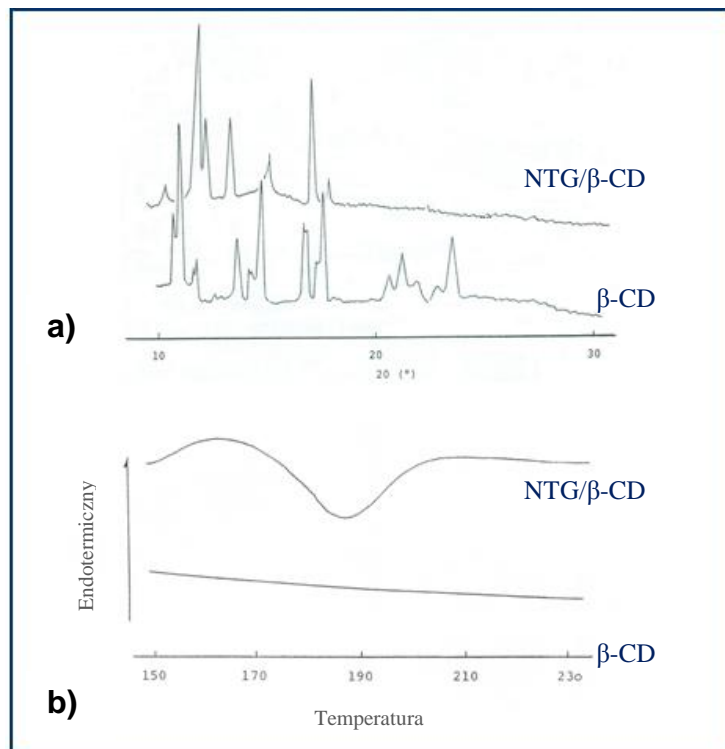
rentgenokrytalograficznych i różnicowej analizy termicznej wykazano, że NTG w otrzymanej substancji występuje w formie kompleksu inkluzyjnego NTG-CD.

Zwiększona trwałość NTG w postaci kompleksu względem formy rozcierki z laktozą, jest wynikiem przede wszystkim obniżenia lotności substancji aktywnej. Tabletki sporządzane metodą bezpośredniego tabletkowania charakteryzowały się lepszą trwałością NTG w formie kompleksu niż w rozcierce z celulozą mikrokrystaliczną. Wykazano również w przypadku kompleksu (dla 4 probantów) nieznacznie większą skuteczność w obniżaniu tętniczego ciśnienia krwi i zwiększaniu szybkości pracy serca [51].

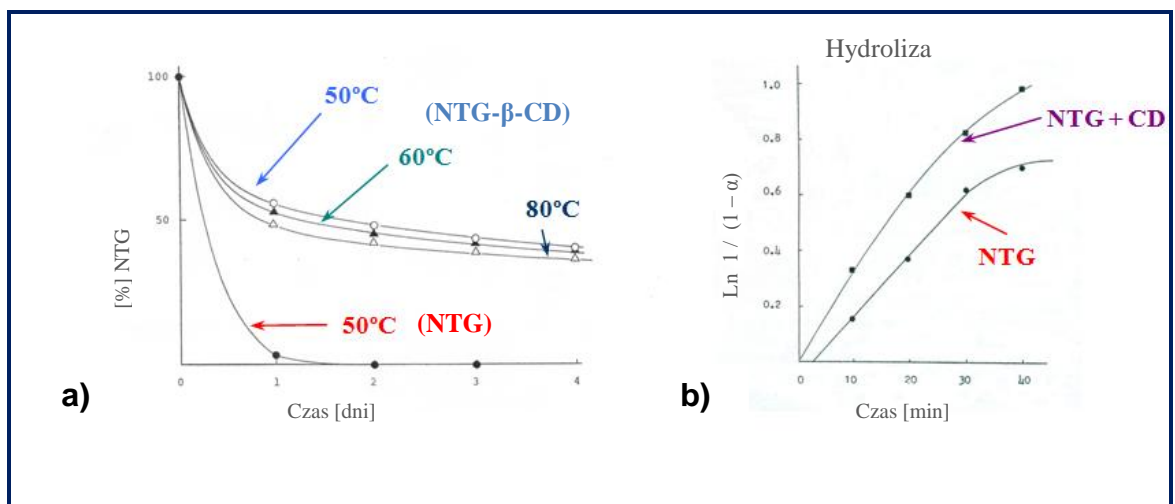
Tomono i wsp. [142], poza zastosowaniem kompleksów z CD, podjęli również próbę stabilizacji NTG rozpuszczalnymi w wodzie polimerami: kopolimerem epichlorohydryny z β -CD (CDPS) i pullulanem (polimer α -1,6 glukanu). W przypadku zastosowania kompleksu NTG z CDPS obserwowano znaczne obniżenie lotności NTG, jednak w temp. 40°C kompleks inkluzyjny NTG-CD był bardziej trwały. Pullulan nie wpływał w sposób istotny na obniżenie lotności NTG.

Kompleks inkluzyjny pomiędzy NTG i β -CD, został również otrzymany i opisany w 1979 r. przez Węgrów: Stadle-Szoke i Szejtliego [143] oraz w 1981 r. przez Japończyków: Yamaoka i wsp. [144]. Na ryc. 4 przedstawiono widmo rentgenokrytalograficzne i termogram DSC kompleksu NTG-CD.

Wykazano, że zastosowanie kompleksowania obniża lotność NTG również w przypadku prób przechowywanych w krótkim czasie (4 dni) w podwyższonej temperaturze (w zakresie od 50 do 80°C) (ryc. 5). Ubytek NTG niestabilizowanej z rozartych tabletek po 1 dniu (temp. 50°C) wynosił 100%, w przypadku kompleksu pozostało jeszcze 60% substancji czynnej. W roztworze alkalicznym (0,02 mol/l NaOH) NTG w postaci skompleksowanej hydrolizuje jednak szybciej.



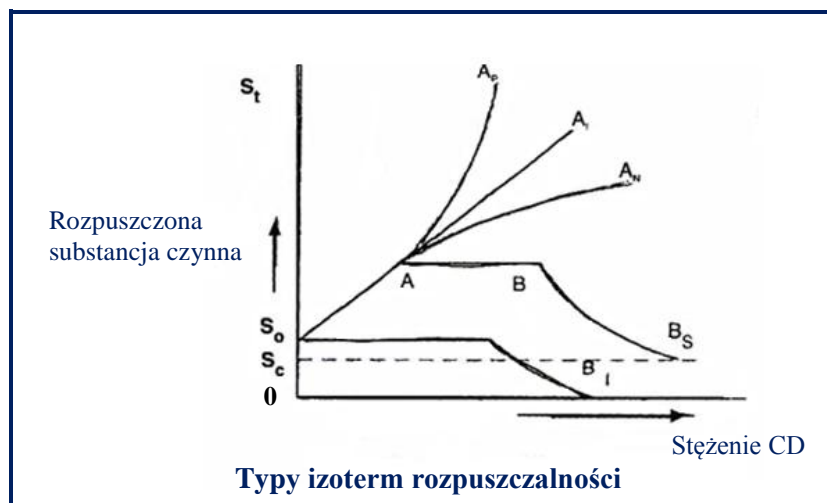
Ryc. 4. Widmo rentgenokrytalograficzne (a) oraz termogram DSC (b) β -CD i kompleksu inkluzyjnego NTG- β -CD [144].



Ryc. 5. Wpływ temperatury (a) i hydrolizy alkalicznej (0,02 mol/l NaOH, temp. 47°C) (b) na trwałość NTG w obecności CD [144].

Na ryc. 6 przedstawiono przebieg izoterm rozpuszczalności substancji leczniczych w zależności od stężenia CD. Stwierdzono doświadczalnie, że w środowisku wodnym wraz ze wzrostem stężenia CD zwiększa się rozpuszczalność substancji leczniczej (izoterma typu A), lecz także może dojść do zmniejszenia rozpuszczalności przy wzroście stężenia CD powyżej pewnej wartości (izoterma typu B_s). Ponadto pewne substancje mogą nie wykazywać wzrostu rozpuszczalności w obecności CD, a przy dużym nadmiarze CD może dojść do całkowitego wytrącenia się substancji leczniczej z roztworu (izoterma typu B_l).

Tomono i wsp. [142] wyznaczyli dla NTG izotermy rozpuszczalności typu B_s. (ryc. 6). Stężenie rozpuszczonej NTG nieznacznie wzrasta (z 4,2 do 5,6 x 10⁻³ mol/l) przy stężeniu CD wynoszącym około 10⁻³ mol/l, natomiast wzrost stężenia CD powyżej 7 x 10⁻³ mol/l powoduje spadek rozpuszczalności NTG. Kompleks inkluzyjny NTG-CD charakteryzuje się więc ograniczoną rozpuszczalnością, zależną od stężenia CD.



Ryc. 6. Wpływ cyklodekstryny na rozpuszczalność substancji [wg 5]

- S₀ – rozpuszczalność substancji czynnej bez CD
- S_c – limit rozpuszczalności dla słabo rozpuszczalnego kompleksu
- S_t – stężenie rozpuszczonej substancji czynnej.

2.4. Zastosowanie NTG

NTG w zależności od potrzeb klinicznych jest podawana drogą podjęzykową (tabletki, aerozole), podpoliczkową (tabletki, kapsułki miękkie), doustną (tabletki i kapsułki o przedłużonym działaniu), przezskórną (maści i transdermalne systemy

terapeutyczne) lub dożylną (wstrzyknięcia, wlewy) [119, 122, 123, 146]. Preparaty o przedłużonym działaniu (tabletki, plastry transdermalne) stosuje się prewencyjnie w zapobieganiu napadom dławicy piersiowej.

2.4.1. Preparaty do stosowania miejscowego

Pierwsze produkty do stosowania miejscowego zawierające NTG wprowadzono na rynek w latach 50-tych XX w. Były to maści, w których NTG występowała w postaci rozcierki z laktozą w podłożu złożonym z lanoliny i wazeliny (1% Neo-Doner w Niemczech i 2% Nitrol oraz Nitro-Bid w USA). Stwierdzono, że trzykrotna aplikacja maści zawierającej 2% NTG (Nitrol) na powierzchnię 50 cm² skóry dostarcza 36 mg substancji czynnej w ciągu doby. Preparaty te były przeznaczone do przezskórnego podawania NTG w terapii dusznicy bolesnej. W chwili obecnej w tym celu stosuje się systemy transdermalne (po raz pierwszy wprowadzone w 1980 r.) [126].

Poza głównym zastosowaniem w dusznicy bolesnej, NTG jest obecnie używana w terapii przewlekłej szczeliny odbytu (sfinkterotomia chemiczna) - w formie 0,2% maści do stosowania miejscowego (0,2%). W latach 1992- 1993 Rattan i Chakder oraz O’Kelly i wsp. [146] stwierdzili w badaniach *in vitro*, że NO jest neuroprzebieżnikiem powodującym rozkurcz wewnętrznego zwieracza odbytu. Wykazano, że donory tlenu azotu, powodując rozkurcz wewnętrznego zwieracza obniżają ciśnienie spoczynkowe w kanale odbytu i eliminują główną przyczynę choroby [6].

W latach 1995 - 2001 prowadzono intensywne badania nad skutecznością kliniczną maści zawierającej NTG w sfinkterotomii chemicznej (tabela 12). W badaniach klinicznych wykazano dobrą skuteczność terapeutyczną 0,2% maści z NTG (od 30 do 86%) podawanej przez okres od 6 do 8 tygodni [1, 6]. Maść powinna być aplikowana 2 -3 razy dziennie w ilości 300 - 500 mg, co odpowiada 0,7 - 1,0 mg substancji czynnej [146, 125].

Obecnie uważa się, że zarówno podawanie miejscowe 0,2% maści z NTG jak i innych preparatów używanych w sfinkterotomii chemicznej (iniekcje toksyny botulinowej, aplikacja 2% maść z chlorowodorkiem dilitiazemu) powinny stanowić terapię pierwszego rzutu w leczeniu przewlekłej szczeliny odbytu, przed zastosowaniem leczenia chirurgicznego [123, 146, 147, 148]. Jednakże niektórzy badacze wskazują na niewystarczającą skuteczność terapii NTG. Z powodu nawrotów choroby zalecają stosowanie donatorów tlenu azotu jedynie w celu zwalczania objawów, w tym znoszenia bólu (wskazania terapeutyczne zawarte w ulotce preparatu Rectogesic[®] 0,4%).

Tabela 12. Zestawienie danych literaturowych dotyczących skuteczności farmakoterapii szczeliny odbytu przy zastosowaniu NTG

Lp.	Autor i data [źródło]	c [%]	n	Ilość dawek	Czas terapii	Częstotliwość wyst. bólu głowy [%]	Odsetek wyleczonych [%]
1.	Gorfine 1995 [wg 146]	0,5	15	-	-	35	80
2.	Lund 1996 [150]	0,2	21	2 x	od 4 do 6	19	86
3.	Watson 1996 [151]	0,2 - 0,8	13	2 x	6	-	66
4.	Bacher 1997 [152]	0,2	20	3 x	4	20	63
5.	Lund 1997 [153]	0,2	38	2 x	8	58	68
6.	Carapeti 1999 [154]	0,2 0,6	23	3 x	8	72	65 70
7.	Brisinda 1999 [155]	0,2	25	2 x	6	20	60
8.	Kennedy 1999 [156]	0,2 0,2	43 17	-	4 kontynuacja	29 -	46 59
9.	Hyman 1999 [wg 146]	0,3	17	3 x	8	75	41
10.	Zuberi 2000 [wg 146]	0,2	18			72	67
11.	Altomare 2000 [157]	0,2	59	2 x	do 4	34	49
12.	Palazzo 2000 [wg 146]	0,5	45	-	-	84	73
13.	Hasegawa 2000 [wg 146]	0,2	40	-	-	61	33
14.	Richard 2000 [wg 146]	0,25	44	-	-	84	30
15.	Skinner 2001 [158]	0,2	13	4 x	4	-	53
16.	Pitt 2001 [159]	0,2	64	2 x	od 4 do 12	64	41
17.	Evans 2001 [145]		60			n.b.	60
18.	Kocher 2002 [160]	0,2	29	2 x	od 6 do 8	59	86
19.	Bielecki 2002 [161]	0,5	22	2 x	8	33	85

n - ilość badanych osób

c [%] - stężenie NTG w podawanym preparacie

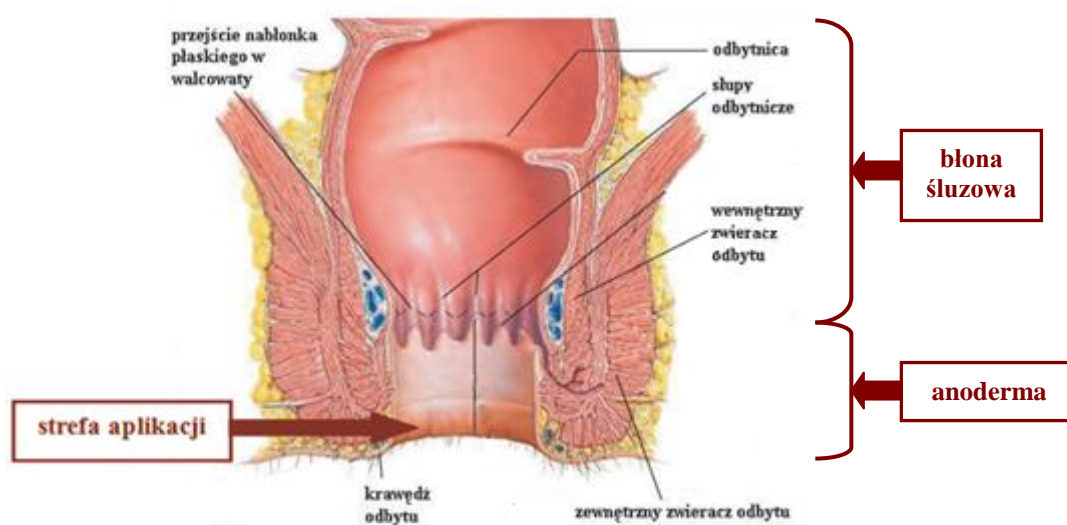
ilość dawek - częstotliwość podania w czasie 24 h

czas terapii - czas podawania preparatu w tygodniach

odsetek wyleczonych - bezpośrednio po zakończeniu terapii

NTG stosowana w końcowym odcinku kanału odbytniczego przenika do krwiobiegu, co powoduje liczne działania niepożądane, takie jak spadek ciśnienia tętniczego, nudności, tachykardię oraz zawroty i bóle głowy, te ostatnie występują bardzo często (10 - 84%) i prowadzą u wielu pacjentów do rezygnacji z terapii [140, 139].

W prawidłowej terapii ważna jest poprawna aplikacja maści. Różni się ona od sposobu podawania tradycyjnych maści doodbytniczych i polega na naniesieniu maści na skórę okolicy odbytu (o szerokości 1 cm) lub na obszar anodermy (ryc. 7). Głębsza aplikacja (na błonę śluzową) powoduje wzrost przenikania substancji leczniczej do łożyska naczyniowego i nasilone występowanie działań niepożądanych. Chociaż więc maść klasyfikuje się jako doodbytnicza, wchłanianie substancji leczniczej odbywa się przez skórę (anodermę), a nie przez błonę śluzową [12, 147, 150, 153, 156, 159]. Jednakże w części prac klinicznych zalecano płytką aplikację doodbytniczą [152, 157, 158].



Ryc. 7. Budowa anatomiczna odbytnicy i odbytu – zaznaczono prawidłowe miejsce aplikacji NTG w terapii szczeliny odbytu [149].

Na rynku europejskim w Wielkiej Brytanii dostępne są preparaty handlowe NTG w postaci maści przeznaczonej do stosowania „doodbytniczego” zawierające NTG w stężeniu 0,2% (Rectogesic[®], Cellegy, Australia) oraz 0,4% (Rectogesic[®], ProStrakan, UK) odpowiednio w podłożu złożonym z etanolu, lanoliny, wazeliny i parafiny ciekłej lub wazeliny lanoliny i glikolu propylenowego [162, 163, 164]. Preparaty te różnią się wskazaniem terapeutycznym. Maść 0,2% została zarejestrowana jako preparat stosowany w leczeniu szczeliny odbytu, jednocześnie znoszący objaw bólu towarzyszący schorzeniu, natomiast maść 0,4% we wskazaniach ma jedynie znoszenie objawów bólu (2006 r.). W badaniach, klinicznych przeprowadzonych przy rejestracji maści 0,4% (aplikowanej dwa razy na dobę) nie wykazano skuteczności terapeutycznej maści w leczeniu szczeliny odbytu (brak różnic statystycznych względem *placebo*), natomiast wykazano działanie

przeciwbólowe. W badaniach stwierdzono bardzo częste występowanie działań niepożądanych, w tym występowanie bólu głowy (u 57% pacjentów) [165].

Na rynku polskim Rectogesic 0,4% (Pem Pharmaceutical Services, UK) uzyskał dopuszczenie do obrotu w lutym 2007 r. [163]. Jest on jednak obecnie niedostępny handlowo i z tego względu lekarze przepisują recepty na maści recepturowe. Recepty te wykonuje się poprzez rozcieńczanie maści Nitrocard (2% NTG) lanoliną lub mieszaniną lanoliny i wazeliny [125, 166].

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Zasadniczym celem pracy była ocena możliwości stosowania kompleksu inkluzyjnego NTG-CD (prod. Dynamit Nobel) w tabletkach podjęzykowych (0,5 mg NTG) oraz w maści o modyfikowanym uwalnianiu (0,2% NTG). Dodatkowo w pracy oceniono rozpuszczalność i trwałość NTG w roztworach wodnych w obecności β -CD.

NTG jest nietrwała chemicznie i w celu jej stabilizacji w latach 70-tych XX w. otrzymano i opatentowano kompleks inkluzyjny NTG-CD. W chwili obecnej forma skompleksowana NTG jest stosowana w tabletkach podjęzykowych jedynie w Japonii (Nitropen, Nippon Kayaku), natomiast tabletki dostępne w Stanach Zjednoczonych i Europie jako substancję stabilizującą zawierają krospowidon. Brak preparatu z kompleksem NTG-CD na rynku polskim oraz brak publikowanych danych porównawczych dotyczących trwałości NTG w obecności cP lub β -CD uzasadnia podjęcie badań w tym temacie.

NTG stosowana w terapii szczeliny odbytu w postaci maści wywołuje liczne działania niepożądane związane z obniżaniem ciśnienia tętniczego krwi. Założono, że opracowana maść z NTG-CD będzie charakteryzować się modyfikowanym (spowolnionym) uwalnianiem dzięki zastosowaniu formy kompleksu, co obniży wchłanianie NTG do krążenia ogólnego i zapewni zmniejszenie częstotliwości występowania działań niepożądanych. Ponadto użycie formy skompleksowanej powinno zwiększyć trwałość NTG w preparatach półstałych. Zastosowanie CD w maści byłoby innowacyjne, gdyż obecnie praktycznie brak jest preparatów półstałych zawierających CD, mimo licznych badań prowadzonych w tym zakresie. β -CD nie była wcześniej stosowana w pracach badawczych do spowalniania uwalniania NTG z maści.

Ze względu na brak metody farmakopealnej badania dostępności farmaceutycznej z preparatów półstałych, za konieczne uznano wytypowanie odpowiedniego modelu doświadczalnego i optymalizację parametrów badania. Oceniono możliwość zastosowania trzech dostępnych handlowo aparatów.

W przypadku maści nie występuje korelacja uwalniania *in vivo/in vitro*, za niezbędne uznano więc badanie przenikania substancji leczniczej przez skórę ludzką, w celu potwierdzenia możliwości uzyskania spowolnionego wchłaniania NTG do tkanki w wyniku kompleksowania z CD.

Główne założenia pracy realizowano poprzez cele cząstkowe:

1. Opracowanie składu tabletek podjęzykowych NTG w kompleksie z β -CD, charakteryzujących się szybkim rozpadem i odpowiednimi właściwościami aplikacyjnymi.
2. Długoterminowa ocena trwałości tabletek podjęzykowych, z uwzględnieniem wpływu użytej formy substancji czynnej (NTG-CD lub NTG-cP) oraz rodzaju substancji rozsadzających i wypełniających (Starch 1500, StarLac, Tabletoza).
3. Opracowanie składu maści (żel, maść absorpcyjna i krem) o spowolnionym uwalnianiu zawierających 0,2% NTG w kompleksie z β -CD.
4. Wyznaczenie odpowiedniego modelu do badania szybkości uwalniania z maści oraz optymalizacja warunków tego testu.
5. Porównanie trwałości maści i kremów wykonanych z NTG-CD i NTG-cP z uwzględnieniem oceny trwałości kompleksu w podłożach, wpływu substancji pomocniczych oraz właściwości reologicznych.
6. Ocenę stopnia przenikania NTG w warunkach *ex vivo* do skóry ludzkiej w zależności od użytej formy NTG i typu zastosowanego podłoża maściowego.

III. METODY

1. APARATURA, SPRZĘT LABORATORYJNY, ODCZYNNIKI I MATERIAŁY

1.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Aparat do badania czasu rozpadu (typ PTZ-3E, Pharmatest, Hainburg, Niemcy)
- Aparat do badania dostępności farmaceutycznej metodą łopatkową (PharmaTest typ PTW S3, Hainburg, Niemcy)
- Aparat do otrzymywania wody oczyszczonej metodą wymiany jonowej i odwróconej osmozy (Elix3, Millipore, Bedford, USA)
- Chłodziarka G-18 (ZPUCH Polarus, Bochnia)
- Komora dializacyjna, Biodialyser, poj. 1000 µl (Sigma, Darmstadt, Niemcy)
- Komora laminarna (model Lamil, Karstulan Metall OY, Karstula, Finlandia)
- Komory dyfuzyjne, przepływowe, dwuczęściowe wykonane z teflonu (Crown Glass Company, Somerville, USA)
- Komory ekstrakcyjne do badania uwalniania typu VanKela (Erweka, Heusenstamm, Niemcy)
- Komory statyczne do badania uwalniania z maści typu Mutimer (Nova, Poznań)
- Komora dyfuzyjna typu Franza, szklana (Crown Glass Company, Somerville, USA)
- Komora dyfuzyjna, wertykalna z pleksiglasu (Projekt Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, wykonana w warsztatach Akademii Medycznej w Gdańsku)
- Łaźnia z termostatem (Grant Y14, Merc, Grant Instruments, Cambridge, Anglia)
- Łaźnia ultradźwiękowa (Unitra Unima, Olsztyn)
- Mieszadło elektromagnetyczne (Typ MR 3001 K, Heidolph, Kelheim, Niemcy)
- Mieszadło elektromagnetyczne ze stabilizacją temperatury – typ MS 11HS (Wigo, Piastów)
- Mikroskop Motic B1 – 223A (Motic Wetzlar, Niemcy) wyposażony w kamerę cyfrową Panasonic (typ GP-KR 222E, Matsushita Communication Industrial, Osaka, Japonia)
- pH-metr Orion (model 350, Orion Research, Boston, USA)
- Pompa perystaltyczna (typ 1B.1003-R/65, Petro Gas Ausrüstungen, Berlin, Niemcy)

- Sterylizator powietrzny - KC-100/200 (Zakłady Aparatury Precyzyjno-Medycznej „Premed”, Marki)
- Szafa klimatyczna (typ Binder, Merck, Tuttingen, Niemcy)
- Szafa klimatyczna (typ KK-120, MEGASERW)
- Tabletkarka uderzeniowa (EKO, Korsch, Berlin, Niemcy) zintegrowana z układem pomiaru siły nacisku (typ UCT 5882/S, Spais, Gdańsk)
- Twardościomierz (Erweka TBH 20, Heusenstamm, Niemcy)
- Unguator e/s (Gako, Konietzko, Bamberg, Niemcy)
- Waga analityczna (typ WAX62, Zakład Mechaniki Precyzyjnej - Radwag, Radom)
- Waga elektroniczna (typ WPS 210/C/2, Zakład Mechaniki Precyzyjnej - Radwag, Radom)
- Wirówka WE-6 (Mechanika Precyzyjna, Warszawa)
- Wiskozymetr (ViscoTester HAAKE typ VT 550, Karlsruhe, Niemcy)
- Wytrząsarka laboratoryjna z łaźnią wodną (typ 357, Zakład aparatury Elektronicznej Elpan, Lubawa)
- Wytrząsarka do probówek „Vortex” (DUN, Warszawa)
- Zestaw do różnicowej kalorymetrii skaningowej - DSC (model DSC 204-G, Netzsch-Geratebau GmbH, Selb, Niemcy)
- Zestawy do wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC (Merck Hitachi, Darmstadt, Niemcy) wyposażone w:

Zestaw I

- *autosampler L-7200*
- *interfejs D-7000*
- *detektor UV/VIS L-7420*
- *pompa L-7100*

Zestaw II

- *integrator D-2500A*
- *detektor UV/VIS L-4250*
- *pompa L-6200*

1.2. Odczynniki

- Ac-Di-Sol – kroskarmeloza sodowa (FMC BioPolymer, Philadelphia, USA)
- Alkohol cetostearylowy (Sigma – Aldrich – Fluka, St. Louis, USA)
- β -cyklodekstryna (CykloLab, Budapeszt, Węgry)

- Etanol 95° (Polmos, Białystok)
- Empiwax - laurylosiarczan sodu z alkoholem cetostearylowym w stosunku 1 : 9 (Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Usługowe Chemco, Sobowidz)
- Glikol propylenowy (Ixo Neuber, Kędzierzyn-Koźle)
Ludwigshafen, Niemcy)
- Kwas borny (Laboratorium Galenowe Lefarm, Bydgoszcz)
- Metanol (POCH, Gliwice)
- Mirystynian izopropylu (P.O.Ch., Gliwice)
- Natrosol[®] 250 HX Pharm - hydroksyetyloceluloza (HEC) (Aqualon Division of Hercules, Rijswijk, Holandia), lepkość 1% roztworu: 2000 mPas
- Nitrogliceryna (NTG-CD) w postaci kompleksu z β -cyklodekstryną, zawartość nitrogliceryny 1,98% (Dynamit Nobel, Leverkusen, Niemcy)
- Nitrogliceryna (NTG-cP) w postaci rozcierki z krospowidonem, zawartość nitrogliceryny 24,74 % (Dynamit Nobel, Leverkusen, Niemcy)
- Parafina ciekła (Laboratorium Galenowe, Olsztyn)
- Sodu azydek (Sigma chemical, St. Louis, USA)
- Sodu chlorek (POCH, Gliwice)
- StarLac – współwytwarzana mieszanina skrobi kukurydzianej i laktozy
15 : 85 (Meggles, Wusserburg, Niemcy)
- Starch 1500 – częściowo preżelowana skrobia kukurydziana (Colorcon, Dartford, Anglia)
- Stearynian magnezu, FP VI
- Tabletoza 80 – laktoza aglomerowana (Meggles, Wussenburg, Niemcy)
- Tlenek cynku (PPF Hasco – Lek, Wrocław)
- Wazelina biała (Laboratorium Galenowe, Olsztyn)
- Woda oczyszczona (aparatur do otrzymywania wody oczyszczonej metodą wymiany jonowej i odwróconej osmozy – Elix3, Millipore, Bedford, USA)
- Vivastar – ultraamylopektyna – glikolan sodowy skrobi (J. Rottenmaier, Rosenberg, Niemcy)

1.3. Materiały

- Bibuła filtracyjna (Rundifilter MN 615, Macherey-Nagel, Niemcy)
- Kolumna LiChrospher 100 RP z wypełnieniem oktadecylosilanolowym – C18 (5 µm; 125 mm x 4 mm) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Membrany celulozowe:
 - Cuprophan - membrana półprzepuszczalna z estrów celulozy – typ 150 pm, m.cz. 10000 (Medicell International, Londyn, Wielka Brytania)
Przed użyciem membranę umieszczano w wodzie w temp. 37°C na 24 h.
 - Błona dializacyjna (rękaw) – membrana celulozowa m.cz. 12400 (Sigma - Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)
Przed użyciem zgodnie z zaleceniami producenta, w celu usunięcia glicerolu, membranę zanurzano we wrzącej wodzie na 5 min, a następnie natychmiast przenoszono do zimnej wody.

Zwilżone membrany przechowywano w temp. 4°C (do 7 dni).

- Film parafinowy - Parafilm (American National Can, USA)
- Płytki Petriego (szklane)
- Sita stalowe o wielkości oczek: 0,08 i 0,1 mm
- Skóra ludzka pochodząca ze zwłok, pobierana z klatki piersiowej (Katedra Patologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)
- Opakowania:
 - Fiolki z szkła oranżowego z nakrętkami z wkładką z PTFE (American National Can, USA)
 - Naczynka wagowe ze szlifem (Labart, Jankin, Warszawa)
 - Pudełka wykonane z polietylenu o wysokiej gęstości (HDPE) (Polipack, Gościcino)
 - Fiolki Chromacol (Trumbull, USA)

2. ANALIZA ILOŚCIOWA NTG METODĄ HPLC

Analizę ilościową NTG prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w układzie faz odwróconych [167]. Stosowano kolumnę z wypełnieniem oktadecylsilolowym – C18. Fazę ruchomą stanowił 50% (obj./obj.) roztwór metanolu, a przepływ wynosił 1 ml/min. Stosowano objętość nastrzyku 20 μ l. Detekcji dokonywano z użyciem detektor UV-Vis przy długości fali $\lambda = 210$ nm.

Przy zastosowaniu podanych warunków możliwe było jednoczesne oznaczanie NTG oraz produktów jej rozkładu. Przykładowe chromatogramy uzyskane dla wzorców podano na ryc. 8. Czas retencji (t_r) triazotanu 1,2,3-propanotriolu (NTG) wynosił ok. 6 min.

Oznaczenia prowadzono z wykorzystaniem krzywych wzorcowych wykonanych dla roztworów NTG w zakresie stężeń 1 - 200 μ g/ml. Analizowano trzy osobne serie wzorców wykonane z zastosowaniem dwóch używanych form NTG: NTG-CD oraz NTG-cP. Wykazano w badanym zakresie stężeń prostoliniową zależność pomiędzy polem powierzchni pików a stężeniem substancji. Wyznaczono równania regresji:

Zestaw do HPLC I:

$$\text{dla NTG-CD:} \quad C = (P - 4,84) / 18,11 \quad R^2 = 0,99999$$

$$\text{dla NTG-cP:} \quad C = (P - 5,27) / 16,71 \quad R^2 = 0,99999$$

Zestaw do HPLC II:

$$\text{dla NTG-CD:} \quad C = (P - 5,91) / 18,59 \quad R^2 = 0,99999$$

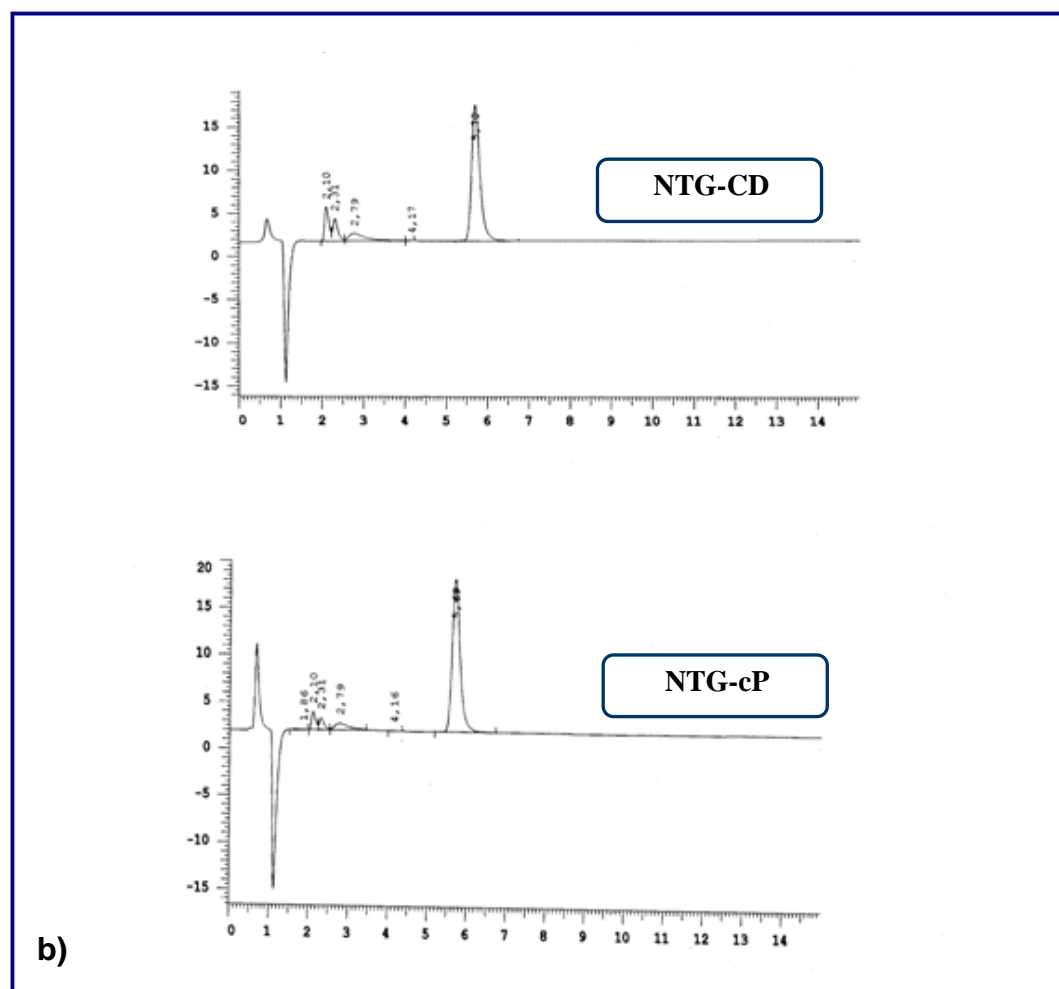
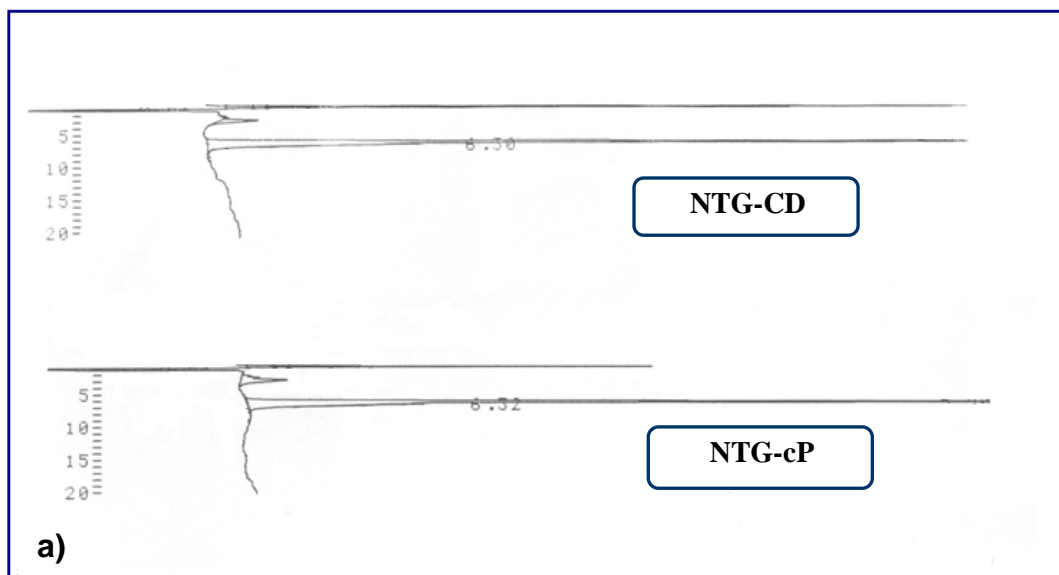
$$\text{dla NTG-cP:} \quad C = (P - 1,21) / 18,38 \quad R^2 = 0,99997$$

gdzie:

C – stężenie nitrogliceryny [μ g/ml]

P – pole powierzchni pików wyrażone w tysiącach

R^2 - współczynnik determinacji (kwadrat współczynnika korelacji)



Ryc. 8. Przykładowe chromatogramy otrzymane dla roztworów wzorcowych NTG: (a) – zestaw do HPLC I – wzorce o stężeniu 50 µg/ml NTG, $t_{rNTG} = 6,3 - 6,5$ min oraz (b) - zestaw do HPLC II – wzorce o stężeniu 10 µg/ml NTG, $t_{rNTG} = 5,7$ min.

3. ANALIZA NTG W ROZTWORACH WODNYCH

3.1. Badanie rozpuszczalności

Wyznaczono rozpuszczalność NTG w wodzie, w temp. 37°C. Badania wykonano dla formy kompleksu inkluzyjnego (NTG-CD), jak i dla formy rozcierki (NTG-cP). Próbki zawierające nadmiar substancji (0,8% NTG-cP lub 10,1% NTG-CD, co odpowiada 0,2% NTG), umieszczano w szklanych, szczelnie zamkniętych fiolkach, a następnie wytrząsano 24 h (150 cpm, amplituda 10; temp. $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Próbki płynu z nad osadu pobierano po 1 h, 3 h, 6 h i 24 h, wirowano (3500 rpm, 15 min), po czym natychmiast rozcieńczano 1:1 wodą. Stężenie NTG oznaczano metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*). Wykonano po 3 powtórzenia.

3.2. Trwałość NTG w roztworach

3.2.1. Hydroliza NTG

W celu wyznaczenia czasów retencji produktów hydrolizy NTG przeprowadzono rozkład substancji czynnej (NTG-CD) w środowisku kwaśnym oraz alkalicznym. Do 20 mg substancji dodawano 10 ml 1 mol/l HCl lub 1 mol/l NaOH. Następnie próby w próbkach ogrzewano przez 30 min we wrzącej łaźni wodnej. Po ostudzeniu zawiesinę wirowano 10 min (3500 rpm). Roztwór z nad osadu analizowano metodą HPLC.

3.2.2. Długoterminowe badanie trwałości NTG w roztworach wodnych

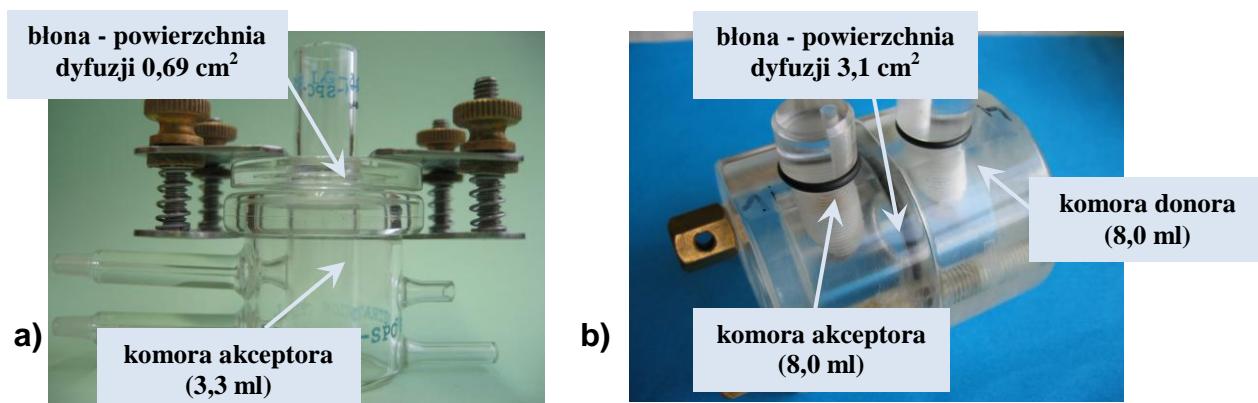
Wodne roztwory NTG o stężeniu 100 µg/ml i 20 µg/ml przygotowano z formy kompleksu NTG-CD i rozcierki NTG-cP. Roztwory przechowywano w fiolkach (po 5 ml) ze szkła oranżowego z korkiem z wkładką z PTFE. Zamknięcia fiolek dodatkowo uszczelniono parafilmem. Roztwory przechowywano w warunkach odpowiadających badaniom długoterminowym - 25°C/60% RH oraz badaniom przyspieszonego starzenia - 40°C/75% RH [168]. Stężenie NTG oznaczano (n = 6) metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*) po 1, 3, 6 i 12 miesiącach przechowywania w temp. 25°C oraz po 1, 3 i 6 miesiącach w temp. 40°C.

3.3. Zgodność chemiczna membran z NTG

Określono zgodność NTG z dializacyjną membraną celulozową. Fragmenty membrany o powierzchni 1 cm^2 umieszczano na czas 6 h w fiolkach szklanych w 3,0 ml rozcieńczonego roztworu NTG ($50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ i $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$), wytrząsano w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (50 cpm). Roztwór analizowano metodą HPLC (*Metody pkt. 2.*) ($n = 2$).

3.4. Badanie uwalniania NTG z kompleksu

Badano zawiesiny zawierające 0,8% NTG-cP lub 10,1% NTG-CD (0,2% NTG). Zastosowano dwa rodzaje aparatów: aparat F – komora Franza umieszczona na mieszadle magnetycznym, termostatowana płaszczem wodnym (ryc. 9a) oraz aparat W – wertykalna komora dyfuzyjna, umieszczona w termostatowanej wytrząsarce (ryc. 9b).



Ryc. 9. Komory do badania uwalniania NTG z zawiesin: *a)* – komora Franza, *b)* – komora wertykalna.

Badanie prowadzono w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$, stosując 0,9% NaCl jako płyn akceptorowy. W aparacie F umieszczano na powierzchni membrany 1 ml odpowiedniej zawiesiny, natomiast w aparacie W - 8,0 ml w komorze akceptora. Badania prowadzono z użyciem dializacyjnej błony celulozowej. Membrany przygotowano zgodnie z procedurą podaną w rozdziale „Metody” (*pkt. 1.3.*).

W aparacie F zawiesinę umieszczano na membranie i w czasie badania nie była ona mieszana, natomiast komora W w trakcie badania była wytrząsana (150 cpm , amplituda 10). Po 1 h, 3 h i 6 h, pobierano próbki płynu akceptorowego ($0,5 \text{ ml}$), a pobraną objętość uzupełniano 0,9% NaCl.

4. SPORZĄDZANIE TABLETEK PODJĘZYKOWYCH

4.1. Tabletki placebo

Porównywano wpływ czterech różnych substancji rozsadzających na czas rozpadu tabletek *placebo*. Zastosowano w różnym stężeniu (% m/m) następujące substancje rozsadzające: Vivastar (5% - 15%), Ac-Di-Sol (2% - 8%), Starch 1500 (2% i 10%) i StarLac (74% i 99%). Badano tabletki z dodatkiem, bądź bez dodatku, β -CD. Składy formulacji podano w tabeli 13 (seria I). Na podstawie uzyskanych wyników wybrano dwie formulacje. Wykonano tabletki *placebo* z dodatkiem β -CD (25%) lub cP (2%) (seria II).

Wykonano tabletki o średniej masie ok. 100 mg. Zastosowano metodę tabletkowania bezpośredniego. Użyto tabletkarkę uderzeniową wyposażoną w stemple płaskie o średnicy 6 mm.

Substancję czynną (NTG-CD lub NTG-cP) przesiewano przez sito o średnicy oczek 100 μ m, natomiast substancję poślizgową (stearynian magnezu) przez sito 80 μ m. W pierwszym etapie substancję leczniczą mieszano z substancją wypełniającą i rozsadzającą (15 do 30 min), a następnie dodawano stearynian magnezu. Ze względu na niewielką masę przygotowywanych serii tabletek podjęzykowych (2,5 g) stosowano ręczne zasypywanie matrycy. Proces tabletkowania prowadzono bez kontroli siły nacisku (seria I) lub przy użyciu kontrolowanej siły kompresji (seria II do badań właściwości aplikacyjnych). Zastosowano zintegrowany z tabletkarką układ pomiarowy – tensometryczny UTC 5882S Spais, o dokładności pomiarowej wynoszącej ok. 0,6 kN.

Określono właściwości organoleptyczne (odczucie ziarnistości) badanych formulacji (*Metody, pkt. 5.2.*). Dla wybranych tabletek wyznaczono czas rozpadu *in vivo*, a także właściwości aplikacyjne (odczucia smakowe, ziarnistość) (*Metody, pkt. 5.1.3.*).

Tabela 13. Skład (mg/tabletka) tabletek placebo

Zastosowane substancje pomocnicze	Formulacje					
SERIA I						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Ac-Di-Sol	2,0	2,0	4,0	4,0	8,0	8,0
Stearynian magnezu	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tabletosa 80	72,0	97,0	70,0	95,0	66,0	91,0
β-CD	25,0	-	25,0	-	25,0	-
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Vivastar	5,0	5,0	10,0	10,0	15,0	15,0
Stearynian magnezu	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tabletosa 80	69,0	94,0	64,0	89,0	59,0	84,0
β-CD	25,0	-	25,0	-	25,0	-
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Starch 1500	2,0	2,0	5,0	5,0	10,0	10,0
Stearynian magnezu	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tabletosa 80	72,0	97,0	69,0	94,0	64,0	89,0
β-CD	25,0	-	25,0	-	25,0	-
	P1	P2				
StarLac	74,0	99,0				
Stearynian magnezu	1,0	1,0				
β-CD	25,0	-				
SERIA II						
A	P1-II	P2-II				
StarLac	74,0	97,0				
Stearynian magnezu	1,0	1,0				
β-CD	25	-				
cP	-	2,0				
B					P5-II	P6-II
Starch 1500					10,0	10,0
Stearynian magnezu					1,0	1,0
Tabletosa 80					64,0	87,0
β-CD					25,0	-
cP					-	2,0

4.2. Tabletki z NTG

Wytypowano dwa rodzaje tabletek o różnym składzie substancji pomocniczych (A i B). Wykonano tabletki zawierające 0,5 mg substancji czynnej w formie: NTG-cP lub NTG-CD (tabela 14).

Tabela 14. Skład tabletek (mg/tabletka) przeznaczonych do badań trwałości
– zawartość NTG 0,5 mg; masa tabletki 100 mg

	CD/A	cP/A	CD/B	cP/B
NTG-CD	25,0	-	25,0	-
NTG-CP	-	2,0	-	2,0
StarLac	74,0	97,0	-	-
Starch 1500	-	-	10,0	10,0
Tabletoza 80	-	-	64,0	87,0
Stearynian magnezu	1,0	1,0	1,0	1,0

Sporządzono dwie serie tabletek przeznaczone do badań trwałości: serię I (100 tabletek, co odpowiadało 10 g masy) oraz serię II (120 tabletek, co odpowiadało 12 g masy). Tabletki wykonano metodą opisaną powyżej (pkt. 4.1.) stosując kontrolę, wyznaczonej względem twardości, siły kompresji. Tabletki o twardości około 40 N, w zależności od składu substancji pomocniczych, uzyskano przy nacisku wynoszącym od 3 do 9 kN (tabela 25).

5. BADANIA

5.1. Badanie czasu rozpadu

5.1.1. Badanie wstępne

Ze względu na lepszą możliwość obserwacji zachowania tabletek w wodzie oraz możliwość użycia małych objętości płynu, w badaniach wstępnych czas rozpadu wyznaczano w kolbkach stożkowych (poj. 25 ml), stosując 10 ml wody o temp. 37°C. Zawartość mieszano ruchem kolistym wykonując około 80 rpm.

5.1.2. Metoda farmakopealna

Zastosowano aparat farmakopealny do badania tabletek (wg FP VIII – monografia „Czas rozpadu tabletek i kapsulek”). Badanie prowadzono z użyciem 800 ml wody o temp. $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. W badaniach nie stosowano dysków obciążających.

5.1.3. Badanie *in vivo*

Badano tabletki *placebo* serii II (skład podano w tabeli 13). Badanie przeprowadzono dla grupy 12 ochotników (3 mężczyzn i 9 kobiet) w wieku od 24 do 55

lat. Probandi nie spożywali pokarmu najmniej 30 min przed testem. Tabletki *placebo* była umieszczana pod językiem, a osoby były poinstruowane, by w czasie testu nie przemieszczać tabletki w jamie ustnej.

5.2. Ocena organoleptyczna

Badano wszystkie tabletki *placebo* serii I (skład podano w tabeli 13). Grupa 3 ochotników (kobiety) określiła przydatność aplikacyjną preparatów, zwracając szczególną uwagę na odczucie ziarnistości. Zastosowano procedurę opisaną w punkcie 5.1.3.

5.3. Odporność tabletek na zgniatanie (twardość)

Badanie wykonano zgodnie z wymaganiami monografii 2.9.8. w FP VIII, z zastosowaniem automatycznego twardościomierza. Pomiary wykonano w co najmniej 3 powtórzeniach. Oznaczano siłę, przyłożoną wzdłuż osi, potrzebną do zniszczenia tabletki. Uzyskane wyniki, przedstawiono jako średnią wartość siły wyrażoną w newtonach [N].

5.4. Jednolitość masy

Badanie masy wyznaczono według monografii 2.9.5. FP VIII, dla 10 losowo wybranych tabletek.

5.5. Zawartość substancji czynnej

Oznaczano średnią zawartość substancji czynnej w tabletkach. W moździerzu proszkowano 6 losowo wybranych tabletek każdej serii. Do fiolek odważano dokładnie po około 90 mg rozartej masy tabletkowej. Próbkę poddawano dwuetapowej ekstrakcji: w pierwszym etapie dodawano 2,5 ml wody, zawiesinę wstawiano na 5 min do łaźni ultradźwiękowej, następnie dodawano 2,5 ml metanolu, mieszano (1 min) z użyciem Vortexu, a następnie ponownie wstawiano do łaźni ultradźwiękowej (5 min). Zawiesinę wirowano (15 min przy 3500 rpm). Roztwór pobrany z nad osadu, ze względu na obecność stearynianu magnezu na powierzchni cieczy, sączono przez bibułę filtracyjną. Stężenie NTG oznaczano w przesączu stosując metodę HPLC (*Metody, pkt. 2.*).

5.6. Badania trwałości tabletek

Wytypowano dwa rodzaje tabletek różniące się użytą substancją rozsadzającą i wypełniającą. Seria A zawierała Starch 1500 oraz aglomerowaną laktozę, natomiast seria B StarLac (tabela 14). Wykonano po dwie serie tabletek z NTG-cP i NTG-CD (*pkt. 4.2.*).

Tabletki serii I poddano wstępnym badaniom trwałości w warunkach bezpośredniej ekspozycji na wilgoć i temperaturę (40°C/75% RH, w naczyniu otwartym). Tabletki (po 6 sztuk) umieszczono na płytce Petriego. Po upływie 14 i 30 dni w pojedynczych tabletkach oznaczono zawartość NTG (*Metody, pkt. 5.4.*).

Długoterminowe badania trwałości w warunkach wymaganych dla przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej wykonano dla serii II z użyciem szklanych opakowań bezpośrednich. Tabletki pakowano (po 5 sztuk) do oranżowych fiolek z nakrętką z wkładką z PTFE i dodatkowo zamknięcie uszczelniano parafilmem. Fiolki umieszczano w szafach klimatycznych, w odpowiednich warunkach: 25°C/60% RH i 40°C/75% RH [168]. Bezpośrednio po wykonaniu oraz w czasie przechowywania oznaczano: zawartość substancji czynnej, czas rozpadu *in vitro*, twardość, jednolitość masy (*Metody, pkt. 5.*). Tabletki przechowywane w warunkach badania długoterminowego analizowano po 1, 3, 6 i 12 miesiącach, natomiast przechowywane w temp. 40°C - po 1, 3 i 6 miesiącach. Badania prowadzono zgodnie ze schematem podanym w tabeli 15.

Tabela 15. Plan badań trwałości tabletek podjęzykowych z NTG
(seria II),(skład podano w tabeli 14)

Warunki przechowywania	Badania	Czas przechowywania (miesiące)				
		t = 0	t = 1	t = 3	t = 6	t = 12
40°C/75%RH	1. Obserwacja makroskopowa	+	+	+	+	n.b.
	2. Zawartość	+	n.b.	+	+	n.b.
	3. Czas rozpadu	+	n.b.	n.b.	+	n.b.
	4. Twardość	+	n.b.	n.b.	+	n.b.
	5. Masa	+	+	+	+	n.b.
25°C/60%RH	1. Obserwacja makroskopowa	+	+	n.b.	+	+
	2. Zawartość	+	n.b.	n.b.	+	+
	3. Czas rozpadu	+	n.b.	n.b.	n.b.	+
	4. Twardość	+	n.b.	n.b.	n.b.	+
	5. Masa	+	+	n.b.	+	+

6. OPRACOWANIE SKŁADU PREPARATÓW PÓLSTAŁYCH

W badaniach wstępnych oceniano możliwość uzyskania preparatu charakteryzującego się modyfikowanym uwalnianiem substancji czynnej poprzez zastosowanie formy kompleksu inkluzyjnego NTG z β -CD. Porównano wpływ rodzaju użytego podłoża: bezwodna maść absorpcyjna, emulsja w/o oraz hydrożel (zawartości NTG 0,2g/100g) na kinetykę uwalniania NTG w zależności od użytej formy substancji czynnej (kompleks inkluzyjny, rozcierka). Badanie uwalniania NTG przeprowadzono z zawiesin: kompleksu inkluzyjnego NTG-CD (10% m/m), rozcierki NTG-cP (0,8% m/m) oraz mieszaniny fizycznej NTG-cP z β -CD (0,8% + 9,8% m/m). Określono również wpływ niektórych substancji pomocniczych na kinetykę uwalniania NTG.

6.1. Skład jakościowy i ilościowy

Wykonano kremy, maści i żele o składzie podanym w tabeli 16.

*Tabela 16. Skład [%] podstawowych formułacji kremów w/o, maści absorpcyjnych i żeli
(zawartość NTG 0,2%)*

	Krem		Maść			Żel	
	KCD	KcP	MCD	McP	MF	ZCD	ZcP
Parafina ciekła	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	-	-
Mirystynian izopropylu	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-
Alkohol cetostearylowy	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-
Wazelina biała	40,0	49,2	60,0	69,2	59,4	-	-
Woda	20,0	20,0	-	-	-	68,0	77,2
Etanol	-	-	-	-	-	10,0	10,0
Glikol propylenowy	-	-	-	-	-	10,0	10,0
HEC	-	-	-	-	-	2,0	2,0
NTG-CD	10,0	-	10,0	-	-	10,0	-
NTG-cP	-	0,8	-	0,8	0,8	-	0,8
β-CD	-	-	-	-	9,8	-	-

Dodatkowo, do badań właściwości fizycznych i biofarmaceutycznych wykonano preparaty o składzie podanym w tabeli 17 (maści), 18 i 19 (żele) oraz 20 (kremy).

*Tabela 17. Skład [%] maści przeznaczonych do badań wpływu substancji pomocniczych
na uwalnianie NTG*

	M1CD	M1cP	M2CD	M2cP	M3CD	M3cP
NTG – CD	10,0	-	10,0	-	10,0	-
NTG – cP	-	0,8	-	0,8	-	0,8
Mirystynian izopropylu	5,0	5,0	-	-	-	-
Alkohol cetostearylowy	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-
Parafina płynna	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Wazelina biała	60,0	69,2	65,0	74,2	65,0	74,2
Empiwax	-	-	-	-	10,0	10,0

Tabela 18. Skład [%] żeli przeznaczonych do badań wpływu substancji pomocniczych na kinetykę uwalniania NTG

	Z1CD	Z1cP	Z2CD	Z3CD	Z4CD	Z4cP
NTG – CD	10,0	-	10,0	10,0	10,0	-
NTG – cP	-	0,8	-	-	-	0,8
HEC	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Etanol	-	-	10,0	-	10,0	10,0
Glikol propylenowy	-	-	-	10,0	10,0	10,0
Woda	88,0	97,2	78,0	78,0	68,0	77,2

Tabela 19. Skład [%] żeli przeznaczonych do badania właściwości reologicznych

	Zr1	Zr2	Zr3	Zr4a	Zr4CD
HEC	2,2	2,2	2,2	2,2	2,0
Etanol	-	11,1	-	11,1	10,0
Glikol propylenowy	-	-	11,1	11,1	10,0
Woda	97,8	86,7	86,7	75,6	68,0
β-CD	-	-	-	-	10,0

Tabela 20. Skład [%] maści i kremów przeznaczonych do badania właściwości reologicznych

	MrA	MrACD	KrA	KrACD	MrB	MrBcP	KrB	KrBcP
Mirystynian izopropylu	5,55	5,0	5,55	5,0	5,04	5,0	5,04	5,0
Alkohol cetostearylowy	11,11	10,0	11,11	10,0	10,08	10,0	10,08	10,0
Parafina płynna	16,66	15,0	16,66	15,0	15,12	15,0	15,12	15,0
Wazelina biała	66,66	60,0	44,44	40,0	69,75	69,2	49,59	49,2
Woda			22,22	20,0			20,16	20,0
β-CD	-	10,0		10,0	-	-		0,8
cP	-	-			-	0,8		

Do badań trwałości wykonano dodatkową serię maści (MCD i McP) i kremów (KCD i KcP) o składzie zgodnym z podanym w tabeli 16. Preparaty wykonano w ilości 150 g, rozdozowano (po około 15 g) do szklanych szczelnie zamkniętych, jałowych opakowań (naczynka wagowe z szlifem dodatkowo uszczelnianym parafilmem). Kremy do badań trwałości, w celu zachowania maksymalnej czystości mikrobiologicznej, wykonano zgodnie z podanym poniżej opisem, z tym, że w loży z laminarnym nawiewem jałowego powietrza, zachowując warunki postępowania aseptycznego (korzystano z wyjałowionego sprzętu i opakowań; stosowano jałową wodę).

6.2. Metoda sporządzania

Żele

Podłoża żelowe wykonano z zastosowaniem mieszadła magnetycznego. W zlewce, przy niskich obrotach mieszadła, łączono składniki płynne, a następnie na powierzchni fazy wodnej rozpraszano substancję żelującą – hydroksyetylocelulozę. Zawiesinę ogrzewano do temp. 40°C, mieszając aż do całkowitego spęczenia polimeru. Żel doprowadzono do temperatury pokojowej. Żele z NTG wykonano w następujący sposób: w moździerzu zawieszono substancję leczniczą (NTG-CD lub NTG-cP) w niewielkiej ilości podłoża żelowego a następnie do otrzymanego koncentratu dodawano porcjami resztę podłoża. W analogiczny sposób wykonano żele *placebo* z β -CD. Uzyskane preparaty umieszczano w pudełkach aptecznych (PP). Żele przechowywano w temp. 4°C przez okres nieprzekraczający 14 dni.

Maści

Podłoża do maści (tabele 16, 17, 20) wykonano metodą topienia stałych składników. Stosowano dwie metody łączenia składników – w moździerzu lub w ungwatorze.

Wykonanie w moździerzu - do stopionej w parownicy wazeliny białej i alkoholu cetostearylowego wprowadzano mirystynian izopropylu połączony wcześniej w zlewce z parafiną ciekłą. Gorące płynne podłoże przenoszono do moździerza i mieszano pistlem do uzyskania półstałej konsystencji.

Wykonanie w ungwatorze - do pojemnika od ungwatora przenoszono stopione w parownicy składniki: wazelinę białą i alkohol cetostearylowy, dodawano mirystynian izopropylu połączony z parafiną ciekłą w zlewce. Gorące płynne podłoże mieszano przy

użyciu ungwatora do uzyskania konsystencji półstałej w temperaturze zbliżonej do pokojowej, stosując 3 poziomych szybkości przez 15 min.

Maści z NTG wykonano w następujący sposób: rozcierano w moździerzku substancję leczniczą (NTG-CD lub NTG-cP) z niewielką ilością podłoża, a następnie do otrzymanego koncentratu dodawano porcjami resztę podłoża. Preparaty przechowywano w pudełkach (PP) w lodówce.

Kremy

Podłoża do kremu wykonano stosując podłoże absorpcyjne (sposób wykonania opisano powyżej) w wyniku emulgowania 20% wody. Wodę dodawano do podłoża w moździerzku lub ungwatorze. W przypadku użycia ungwatora składniki podłoża połączono mieszając 2 min (poziomych obrotów – 5), a następnie dodawano odpowiednią ilość wody ponownie mieszając (2 min, poziomych obrotów - 5). Substancje stałe inkorporowano, analogicznie jak w przypadku żeli i maści, w moździerzku. Skład kremów podano w tabeli 16.

7. BADANIA

7.1. DSC (różnicowa kalorymetria skaningowa)

Termogramy różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) wykonano w Zespole Pracowni Fizykochemicznych Uniwersytetu Gdańskiego. Wyznaczono termogramy kompleksu inkluzyjnego NTG-CD oraz żelu i maści zawierających 10% NTG-CD, (preparaty MCD i ZCD- tabela 16). Próbkę NTG-CD (8 mg) lub badanych preparatów (40 mg) ogrzewano od temp. 10°C do 400°C z szybkością 10°C/min. Pomiar prowadzono względem pustego tygla. Prędkość przepływu gazu nośnego (argon) wynosiła 30 ml/min. Dane analizowano przy pomocy oprogramowania Origin Pro 7.5.

7.2. Badanie kinetyki uwalniania NTG z maści

Ze względu na brak metody farmakopealnej badanie kinetyki uwalniania prowadzono stosując trzy różne (dostępne handlowo) aparaty do badania szybkości uwalniania. Badanie prowadzono z zastosowaniem:

- teflonowej komory ekstrakcyjnej typu VanKel – **aparat VK** (ryc. 10 i 11),
- aparatu wg Mutimer – **aparat MU** (ryc. 12),
- komory dializacyjnej – **aparat D** (ryc. 13).

Doświadczenia wykonano w układzie, w którym kompartment donora (maść) oddzielono od kompartmentu akceptora (płyn akceptorowy) półprzepuszczalną błoną dializacyjną (Cuprophan lub rękaw dializacyjny). Błony przed badaniem poddawano hydratacji (*Metody, pkt. 1.3*).

Badanie prowadzono w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Jako płyn akceptorowy stosowano wodę oczyszczoną – 50 ml. Po 1, 3 i 6 h badania uwalniania pobierano próbki płynu akceptorowego (2 ml). Pobraną objętość płynu akceptorowego uzupełniano wodą o temp. 37°C . Stężenie NTG oznaczano stosując metodę HPLC (*Metody, pkt. 2.*).

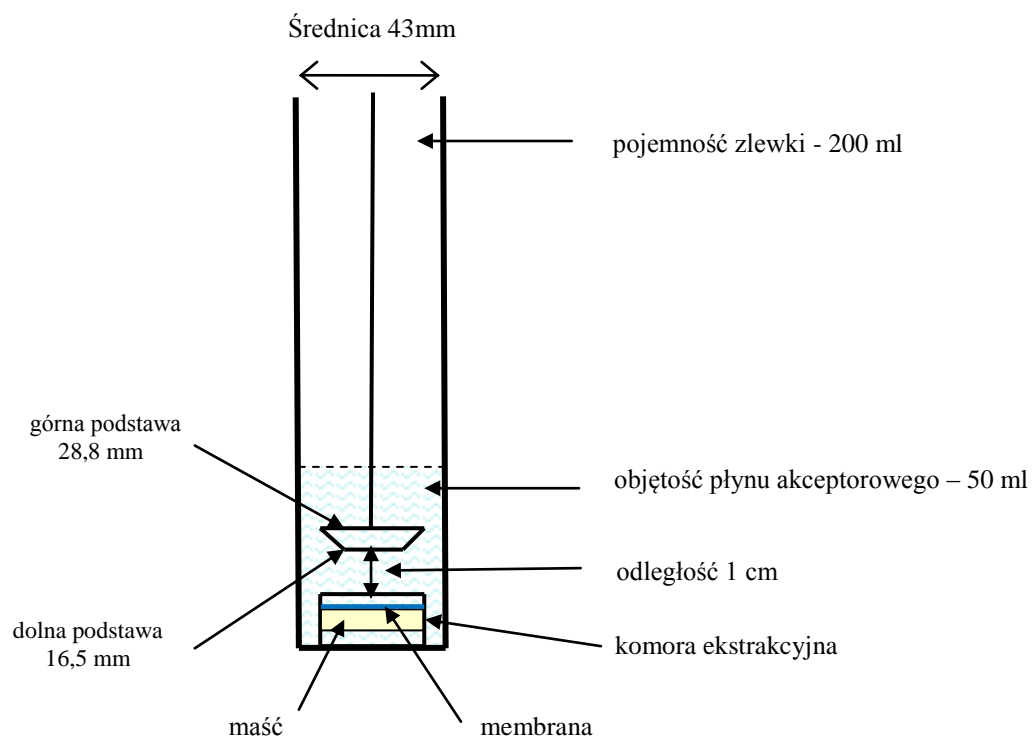
7.2.1. Komora ekstrakcyjna typu VanKel – aparat VK

Teflonową komorę ekstrakcyjną (ryc. 10) umieszczano w farmakopealnym aparacie łopatkowym do badania uwalniania. Zastosowano zlewki i łopatki o mniejszych rozmiarach niż przeznaczone do badania tabletek (ryc. 11).

W komorze umieszczano odważoną próbkę o masie dokładnie ok. 1 g (warstwa o grubości ok. 3,2 mm). Powierzchnia uwalniania wynosiła 3,17 cm². Maść przykrywano błoną dializacyjną dbając o całkowite usunięcie powietrza. Prędkość obrotów mini-łopatki wynosiła 50 rpm.



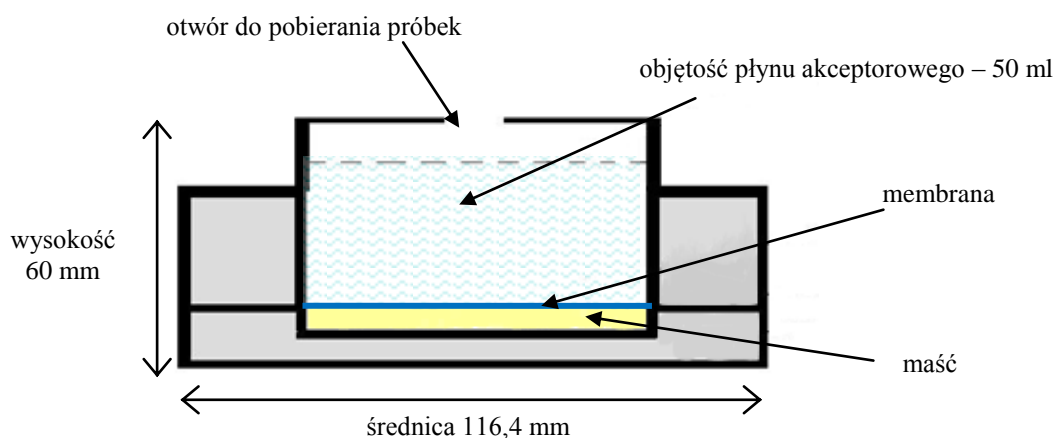
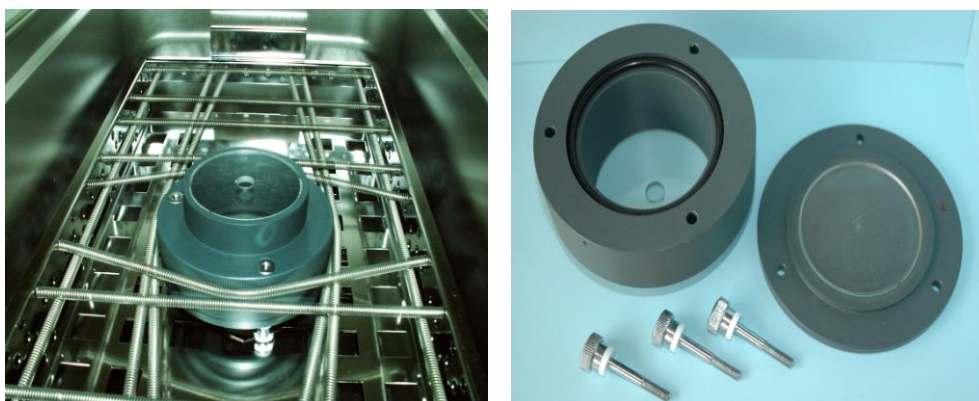
Ryc. 10. Komora ekstrakcyjna stosowana w badaniu uwalniania (typu VanKel).



Ryc. 11. Schemat budowy aparatu do badania uwalniania (typu VanKel).

7.2.2. Komora typu Mutimer – aparat MU

Badanie prowadzono w komorze wykonanej z tworzywa sztucznego (ryc. 12), znajdującej się w termostатовanej wytrząsarce z łaźnią wodną (37°C). Stosowano szybkość wytrząsania 50 cpm. W komorze umieszczano ok. 4 g preparatu tworząc warstwę grubości 1,2 mm. Powierzchnia właściwa uwalniania wynosiła 37,9 cm². Na preparat nakładano błonę – Cuprophan, dbając by powietrze zostało całkowicie usunięte.

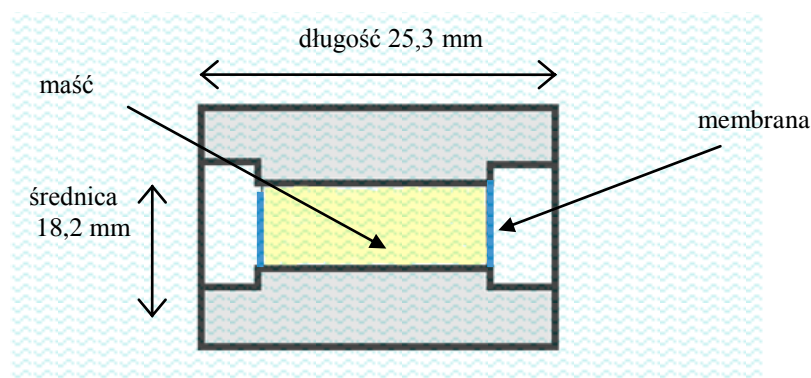
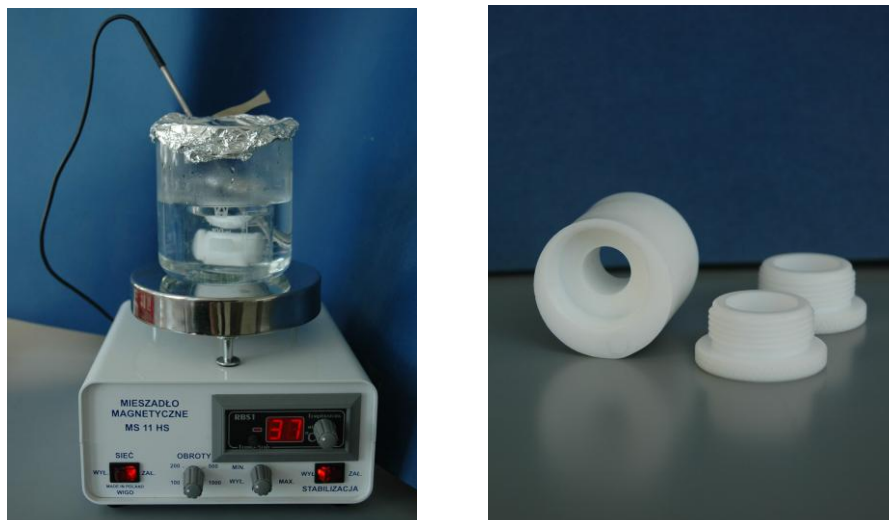


Ryc. 12. Aparat wg Mutimer (zdjęcie stosowanego modelu doświadczalnego oraz schemat budowy komory).

7.2.3. Komora dializacyjna – Aparat D

Teflonową komorę dializacyjną umieszczano w zlewce stanowiącej zbiornik płynu akceptorowego (50 ml), zlewka była zewnętrznie termostатовana (37°C) (ryc. 13). W trakcie badania komora obracała się z szybkością 50 rpm. W komorze

dializacyjnej umieszczano około 1 g preparatu. Z obu stron nakładano błonę dializacyjną (łączna powierzchnia dyfuzji wynosiła 1,49 cm²).



Ryc .13. Komora dializacyjna – Aparat D (zdjęcie stosowanego modelu doświadczalnego oraz schemat budowy komory).

7.3. Badania reologiczne

Badania wykonano metodą opisaną w FP VIII w monografii 2.2.10 „Pomiar lepkości z użyciem lepkościomierza rotacyjnego (lepkościomierz typu stożek-platek oraz lepkościomierz osiowy – wrzeczono zanurzeniowe)”.

Preparaty przechowywane w lodówce (4°C) przed badaniem poddawano ekwilibracji w celu uzyskania temperatury pokojowej (umieszczano na 4 h przed badaniem w pomieszczeniu, w którym wykonywano test).

Zastosowano wiskozymetr VT 550, pracujący w układzie pomiarowym:

- wrzeciona zanurzeniowego (układ pomiarowy FL 100),
- płytki-stożka (układ pomiarowy PK 1°) (ryc. 14).



Ryc. 14. Reometr typu VT 550 – układ pomiarowy płytka-stożek.

Dane pomiarowe rejestrowano i analizowano przy użyciu oprogramowania Haake RheoWin 3.5 Data Manager. Analizowano krzywe lepkości i krzywe płynięcia wykonane przy zastosowaniu trybu CR ($n = 6$) oraz wyznaczano lepkość dynamiczną i tiksotropię. Tiksotropia jest polem, wyznaczonym z różnicy w powierzchni pomiędzy polem pod wstępującą i zstępującą krzywą płynięcia (pętla histerezy), obrazuje odwracalne (zależną od czasu) zmiany struktury. W badaniach trwałości dodatkowo wyznaczano wartość pola powierzchni pod wstępującą krzywą płynięcia (Pt-płynięcie), charakteryzujące wewnętrzną strukturę preparatu.

Wartością mierzoną jest wartość naprężenia ścinającego w funkcji prędkości ścinania, natomiast lepkość dynamiczna wyznaczana była pośrednio na podstawie następującej zależności [169, 170]:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

gdzie:

η - lepkość dynamiczna [$\text{N/m}^2 \cdot \text{s} = \text{Pa} \cdot \text{s}$]

τ - naprężenie ścinające [$\text{N/m}^2 = \text{Pa}$]

$\dot{\gamma}$ - prędkość ścinania [s^{-1}]

7.3.1. Badanie właściwości reologicznych żeli - układ pomiarowy wrzeciona zanurzeniowego

W trakcie badania w szklanej zlewce (80 ml) umieszczano około 50 ml próbki żelu, uważając, by nie powstawały pęcherze powietrza. Próbki badano po 15 min, licząc czas od momentu zanurzenia wrzeciona w próbce.

Badanie wykonano stosując następujące parametry:

- promień wirnika 11 mm
- wysokość wirnika 16 mm
- odległość łopatki wirnika od ściany zlewki ok. 10 mm
- zakres prędkości ścinania: od 0 do 10 s⁻¹ w czasie 120 s; krzywe płynięcia uzyskano przy wzrastającej prędkości (krzywe wstępujące) oraz po 5 s - przy malejącej prędkości (krzywe zstępujące).

Zastosowany układ wrzeciona zanurzeniowego umożliwiał badanie hydrożeli, natomiast niemożliwe było przy jego użyciu badanie maści i kremów.

7.3.2. Badania właściwości reologicznych maści i kremów - układ pomiarowy płytko-stożek

Na płytkę podstawową nanoszono około 300 mg preparatu. Próbki badano po 15 min (czas od momentu wypełnienia szczeliny płytko-stożek).

Badanie wykonano stosując następujące parametry:

- promień stożka 14 mm
- kąt stożka 1°
- szczelina 0,2 mm
- zakres prędkości ścinania: od 0,1 do 40 s⁻¹ w czasie 30 s; krzywe płynięcia uzyskano przy wzrastającej prędkości (krzywe wstępujące) oraz po 5 s - przy malejącej prędkości (krzywe zstępujące).

7.4. Obserwacje makroskopowe, badania organoleptyczne

Wizualnie i organoleptycznie oceniano ewentualne zmiany zabarwienia, zapachu czy konsystencji (rozwarstwienie oraz rozsmarowywalność na skórze). Wykonano zdjęcia preparatów.

7.5. Obserwacja mikroskopowa i pomiar wielkości cząstek

Dokonano oceny wizualnej preparatów przy pomocy mikroskopu optycznego wyposażonego w kamerę cyfrową. Na szkiełko podstawowe nanoszono około 6 mg próbki. Przygotowywano po 3 preparaty mikroskopowe. Wybrane obrazy mikroskopowe rejestrowano w postaci zdjęć.

Wielkość cząstek badano stosując 5-krotne powiększenie. Przy użyciu oprogramowania MultiScan Base mierzono maksymalną długość każdej z cząstek. W maściach i kremach zawierających NTG-cP w każdym preparacie wybierano losowo 6 pól, w których mierzono wielkość wszystkich obecnych w danym polu cząstek o rozmiarach powyżej 10 μm . W preparatach zawierających NTG-CD (większa zawartość cząstek stałych) wybierano losowo 3 pola. Obraz każdego pola dzielono na cztery ćwiartkowe obszary (A, B, C, D). Wielkość wszystkich cząstek ($> 10 \mu\text{m}$) mierzono w 2 obszarach (A, D). Zmiany w wielkości cząstek kontrolowano w przedziałach wielkości: 10 – 30 μm , 30 – 60 μm , 60 – 90 μm oraz $> 90 \mu\text{m}$.

7.6. Badanie zawartości NTG w maściach i kremach

Do szklanych kolbek stożkowych odważano dokładnie ok. 250 mg maści. Dodawano 25 ml 50% (obj./obj.) metanolu. Szczelnie zamknięte kolbki umieszczano w łaźni wodnej (temp. 50°C) na 30 min. Po upływie 15 oraz 30 min zawartość kolbek intensywnie ręcznie wytrząsano (1 min). Następnie zawartość chłodzono 1 h w lodówce i sączone przez bibułę filtracyjną do kolbek miarowych (25 ml). Przesącz uzupełniano do objętości 25 ml, popłukując kolbkę i sączonek 50% metanolem [167]. Zawartość NTG w otrzymanych próbkach ($n = 4$) oznaczono metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*).

7.7. Pomiar pH kremów

Do 1 g kremu dodawano 5 ml wody i wytrząsano energicznie (ręcznie), następnie ogrzewano w temp. 50°C przez 10 min (fiolki szczelnie zamknięte). Mieszano przez kilkanaście sekund na wytrząsarce do próbówek „Vortex” i pozostawiano na 1 h w lodówce. Po przesączeniu przez bibułę filtracyjną badano pH otrzymanego przesączu ($n = 2$).

7.8. Badania trwałości maści i kremów

Badano maści i kremy serii T (MCD, McP, KCD, KcP) o składzie podanym w tabeli 16 (*Metody, pkt. 6.*). Maści i kremy przechowywano w lodówce (temp. 4°C) i w szafach klimatycznych (25°C/60% RH i w 40°C/75% RH). Naczynka umieszczano w kartonowych pudełkach, w celu zabezpieczenia próbek przed wpływem światła.

Preparaty analizowano bezpośrednio po wykonaniu ($t = 0$) i po upływie 1, 3, 6 i 12 miesięcy przechowywania - w warunkach badania długoterminowego i w warunkach przyspieszonego starzenia (tabela 21) [168].

W przypadku preparatów przechowywanych w temp. 4°C i 25°C badano kinetykę uwalniania NTG (*pkt. 7.2.1.*), zawartość NTG (*pkt. 7.6.*), wielkość cząstek zawieszonych (*pkt. 7.5.*) oraz oceniano wygląd (*pkt. 7.4.*). Mierzono także pH kremów (*pkt. 7.7.*). Natomiast w przypadku preparatów przechowywanych w temp. 40°C badano tylko zawartość substancji czynnej oraz oceniano wygląd.

W badaniach szybkości uwalniania zastosowano teflonową komorę ekstrakcyjną typu VanKel. Wykonano 6 powtórzeń dla każdej próby, wyznaczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe.

W badaniach reologicznych zastosowano układ pomiarowy płytko-stożek (układ pomiarowy PK 1°), stosując warunki badania podane w punkcie 7.3.2. Lepkość dynamiczną wyznaczono przy prędkościach ścinania: 2,3 i 20 s⁻¹. Wyznaczono również wartość tiksotropii oraz pole powierzchni pod krzywą płynięcia.

Dodatkowo określono wpływ światła dziennego na zmianę zabarwienia maści i kremów w warunkach pełnej ekspozycji (fiolka szklana). Próbki przechowywane w temperaturze pokojowej (średnia ok. 20°C) obserwowano przez okres 30 dni.

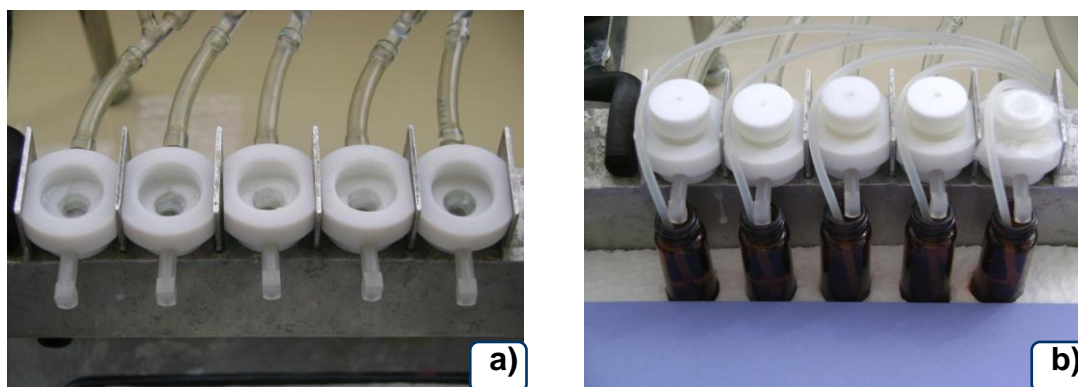
8. BADANIE PRZEZSKÓRNEJ PENETRACJI NTG W WARUNKACH *EX VIVO*

Za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w badaniach wykorzystywano skórę ludzką pochodzącą ze zwłok. Badania prowadzono z użyciem skóry pochodzącej z klatki piersiowej (okolice mostka). Dawcami były kobiety w wieku 30 - 45 lat.

8.1. Przygotowanie skóry i ekwilibracja układu

Bezpośrednio po pobraniu skóry usuwano tkankę podskórną, skórę płukano z użyciem 0,9% NaCl, osuszano, a następnie zamrażano w temp. - 35°C do czasu badania. Przed użyciem skórę rozmrażano w temperaturze pokojowej, oceniano integralność warstwy naskórka (brak uszkodzeń mechanicznych) przy użyciu lupy, stosując 8-krotne powiększenie.

Wycięte fragmenty skóry płukano w roztworze 0,9% NaCl, osuszano na bibule i umieszczano w teflonowych komorach przepływowych typu Bronaugh o powierzchni przenikania 0,64 cm² (ryc. 15). Komory termostatowano zewnętrznym panelem grzewczym o temp. 37°C i utrzymywano ciągły przepływ płynu (0,9% NaCl z dodatkiem 0,005% azydku sodu, jako środka konserwującego). Przepływ płynu akceptorowego (7 ml/h) utrzymywano za pomocą pompy perystaltycznej. Po 3 h ekwilibracji наносono preparat.



*Ryc. 15. Komory przepływowe stosowane w badaniu przenikania przez skórę (typu Bronaugh)
a) – przed umieszczeniem skóry, b) – w trakcie badania przenikania*

8.2. Badanie przenikania NTG do skóry i przez skórę

Zawiesina wodna

Na powierzchnię skóry (0,64 cm²) наносono 0,5 ml zawiesiny zawierającej 8,0 mg/ml NTG-cP (co odpowiadało 1,0 mg NTG). Po 3 h zawiesinę usuwano i płukano 5-krotnie powierzchnię skóry za pomocą 200 µl wody. Analizowano zawartość NTG w tkance (*pkt. 8.3.*) i w płynie akceptorowym metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*). Doświadczenia wykonano 5-krotnie.

Maści i kremy

Na skórę aplikowano za pomocą strzykawki (poj. 2 ml) około 400 µl maści MCD lub kremu KCD (odpowiednio 0,45 ± 0,09 g maści z NTG-cP, 0,52 ± 0,04 g maści z NTG-CD oraz 0,31 ± 0,03 g kremu z NTG-cP lub NTG-CD). Po 5 h usuwano preparat z powierzchni skóry przy pomocy szpatułki i wacika. Powierzchnię skóry płukano 3-krotnie porcjami po 200 µl metanolu i 2-krotnie stosując 200 µl wody. Analizowano zawartość NTG w tkance (*pkt. 8.3.*) i w płynie akceptorowym metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*). Doświadczenia wykonano przynajmniej 5-krotnie.

8.3. Oznaczanie zawartości NTG w skórze ludzkiej

Zawiesina

Skórę usuwano z komór, osuszano bibułą i wycinano z niej fragmenty odpowiadające powierzchni przenikania. Dzielono je na dwie części, po czym każdą

ważono. Jedną część umieszczano w fiolkach ze szkła oranżowego, dodawano 1,0 ml metanolu i poddawano 2-krotnej ekstrakcji, wytrząsając 24 h w temperaturze pokojowej. W celu separacji skóry właściwej, drugą część zanurzano na 1 min w wodzie o temp. 60°C, a następnie za pomocą pincety oddzielano naskórek. Naskórek i skórę właściwą ważono, umieszczano w osobnych fiolkach. Fragmenty naskórka, uzyskane z 2 – 3 eksperymentów, umieszczano w jednej fiołce oznaczając w nich sumaryczną zawartość NTG, natomiast skórę właściwą analizowano w pojedynczych fragmentach. Dodawano 1,0 ml metanolu i poddawano dwukrotnej ekstrakcji (wytrząsarka, 24 h, temp. pokojowa). Stężenie NTG w ekstraktach metanolowych oznaczano metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*).

Kremy i maści

Skórę usuwano z komór, osuszano bibułą i wycinano z niej fragmenty odpowiadające powierzchni przenikania. Fragmenty skóry ważono i umieszczano pojedynczo w fiolkach ze szkła oranżowego, poddawano dwukrotnej ekstrakcji zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Stężenie NTG w ekstraktach oznaczano metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*).

9. OCENA STATYSTYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW

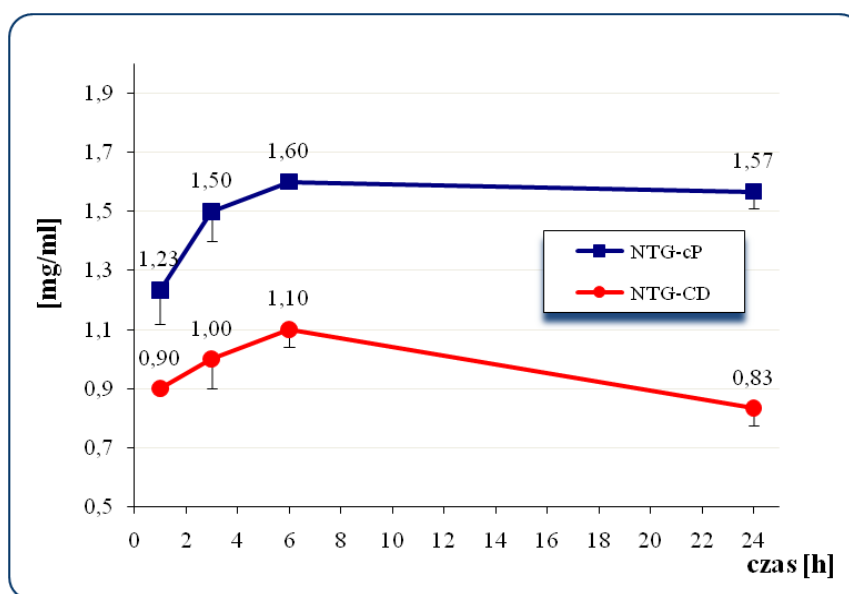
Analizę statystyczną dla porównania profili uwalniania (wartości w danych punktach czasowych) oraz przenikania NTG do skóry wykonano przy użyciu testu t-Studenta (program Microsoft Excel). Weryfikację hipotez przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

IV. WYNIKI

1. ANALIZA NTG W ROZTWORACH WODNYCH

1.1. Rozpuszczalność NTG

Na ryc. 16 przedstawiono wyniki badania rozpuszczalności NTG, w zależności czy występowała w formie skompleksowanej, czy w formie rozcierki. Zmiany stężenia NTG w roztworze oznaczano w czasie 24 h, w temp. 37°C (*Metody, pkt. 3.1.*).



Ryc. 16. Rozpuszczalność NTG w zależności od formy: rozcierka (NTG-cP) lub kompleks inkluzyjny (NTG-CD) ($\bar{x} \pm SD$; $n = 3$).

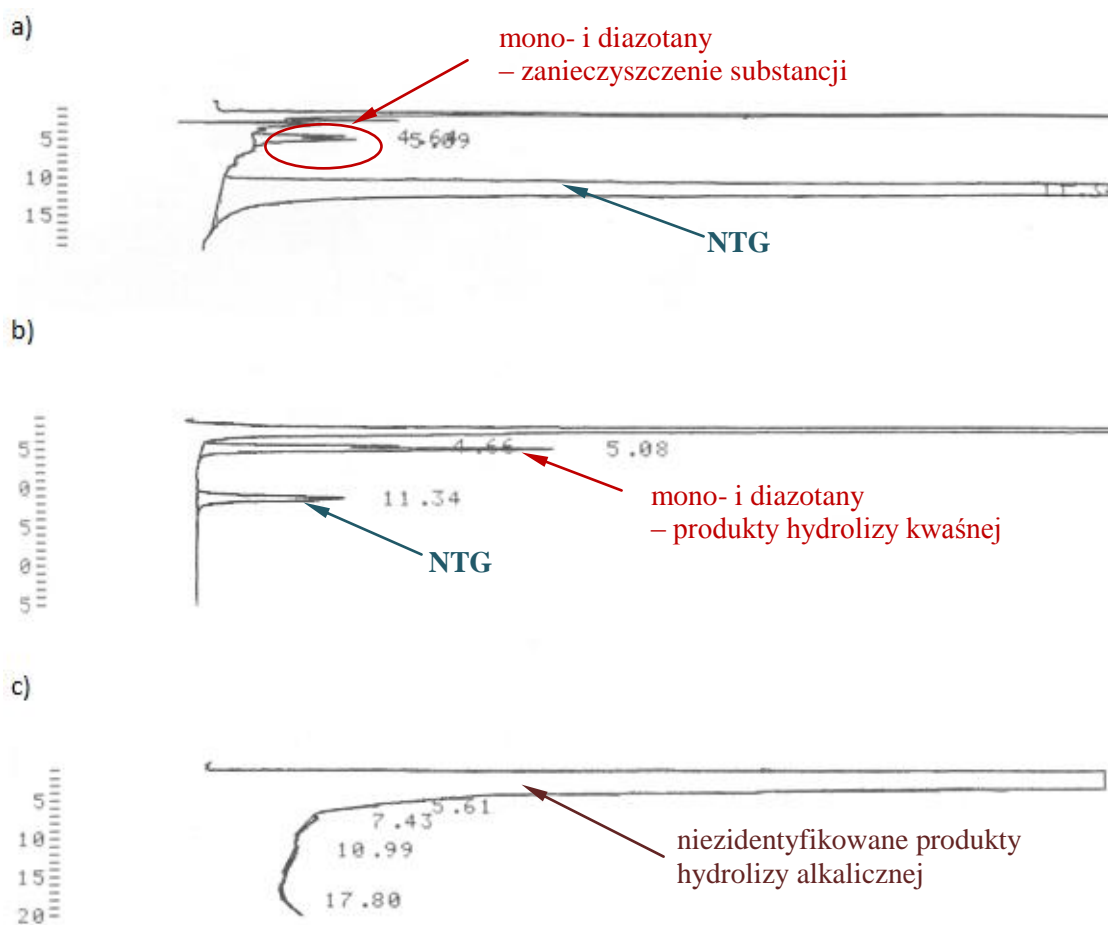
Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że po 6 h stężenie frakcji rozpuszczonej osiągnęło wartość maksymalną. Rozpuszczalność wyniosła odpowiednio 1,6 mg/ml i 1,1 mg/ml, dla NTG-cP i NTG-CD. β -CD (10%) obniża rozpuszczalność NTG o około 30% względem formy nieskompleksowanej.

Dodatkowo w przypadku kompleksu inkluzyjnego NTG-CD obserwowano po 24 h obniżenie rozpuszczalności NTG.

1.2. Hydroliza NTG

W celu określenia produktów rozkładu oraz możliwości ich oznaczania metodą HPLC, przeprowadzono hydrolizę kwaśną i alkaliczną skompleksowanej formy NTG (NTG-CD) w warunkach stresowych (*Metody, pkt. 3.2.1.*).

Chromatogram roztworu wodnego NTG-CD (przed hydrolizą) przedstawia ryc. 17 a, natomiast chromatogramy NTG po hydrolizie kwaśnej oraz alkalicznej przedstawiono na ryc. 17 b i c.



Ryc. 17. Chromatogramy roztworów NTG-CD (NTG 100 µg/ml): przed hydrolizą (a) i po przeprowadzeniu hydrolizy kwaśnej (b) lub alkalicznej (c); (t_r NTG = 11,3 min).

W wyniku hydrolizy w środowisku kwaśnym powstają głównie mono- i diazotany, natomiast w wyniku hydrolizy alkalicznej produkt końcowy stanowi alkohol – propanotriol i jony azotowe (reakcja może przebiegać z produktami pośrednimi – powstają ketony i jony azotowe) [14].

Analiza chromatograficzna substancji czynnej wykazała występowanie niewielkich pików mono- i diazotanów (stanowiących do 1,5% powierzchni pików NTG) świadczących o zanieczyszczeniu substancji wyjściowej produktami degradacji NTG (ryc. 17 a).

W przypadku hydrolizy alkalicznej, w zastosowanych warunkach analizy HPLC nie udało się określić produktów rozkładu, natomiast mono- i diazotany powstałe na skutek hydrolizy kwaśnej charakteryzują się czasem retencji krótszym od NTG, mieszczącym się w zakresie od 4 do 5 min (ryc. 17).

1.3. Trwałość NTG w roztworach wodnych

Badano trwałość roztworów wodnych NTG (NTG-cP lub NTG-CD) o stężeniu 20 µg/ml i 100 µg/ml, przechowywanych w temp. 25°C lub 40°C (*Metody, pkt. 3.2.2.*). Wyniki oznaczania zawartości NTG w czasie do 6 lub 12 miesięcy przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Zawartość NTG [% zawartości początkowej] w roztworach wodnych NTG-CD i NTG-cP przechowywanych w temp. 25°C i 40°C ($n \geq 2$)

Stężenie [µg/ml]	Czas	40°C		25°C	
		NTG-CD	NTG-cP	NTG-CD	NTG-cP
20	1 m-c	90,8	88,7	98,2	91,2
	3 m-c	78,5	73,0	91,3	84,4
	6 m-c	39,1	48,5	53,5	87,2
100	1 m-c	97,0	96,3	97,4	100,3
	3 m-c	91,3	88,2	96,4	94,4
	6 m-c	83,7	84,1	76,7	92,6
	12 m-c	74,4	80,9	66,8	91,1

Zarówno w przypadku NTG-CD jak i NTG-cP w roztworach wodnych obserwowano rozkład substancji czynnej w czasie przechowywania, przy czym był on szybszy w temp. 40°C. W czasie do 3 miesięcy, niezależnie od temperatury przechowywania, spadek stężenia NTG w roztworach NTG-CD był mniejszy (20 µg/ml) lub porównywalny (100 µg/ml) z obserwowanym w roztworach z NTG-cP.

Wyniki uzyskane po 6 oraz 12 miesiącach przechowywania roztworów NTG-CD w temp. 25°C, mogą wskazywać na przyspieszony rozkład substancji czynnej w środowisku wodnym w obecności β -CD. Może to jednak wynikać z faktu, iż w niektórych próbkach roztworów NTG-CD po 6 miesiącach przechowywania obserwowano oznaki wzrostu bakterii lub grzybów, niewystępujące w przypadku roztworów NTG-cP.

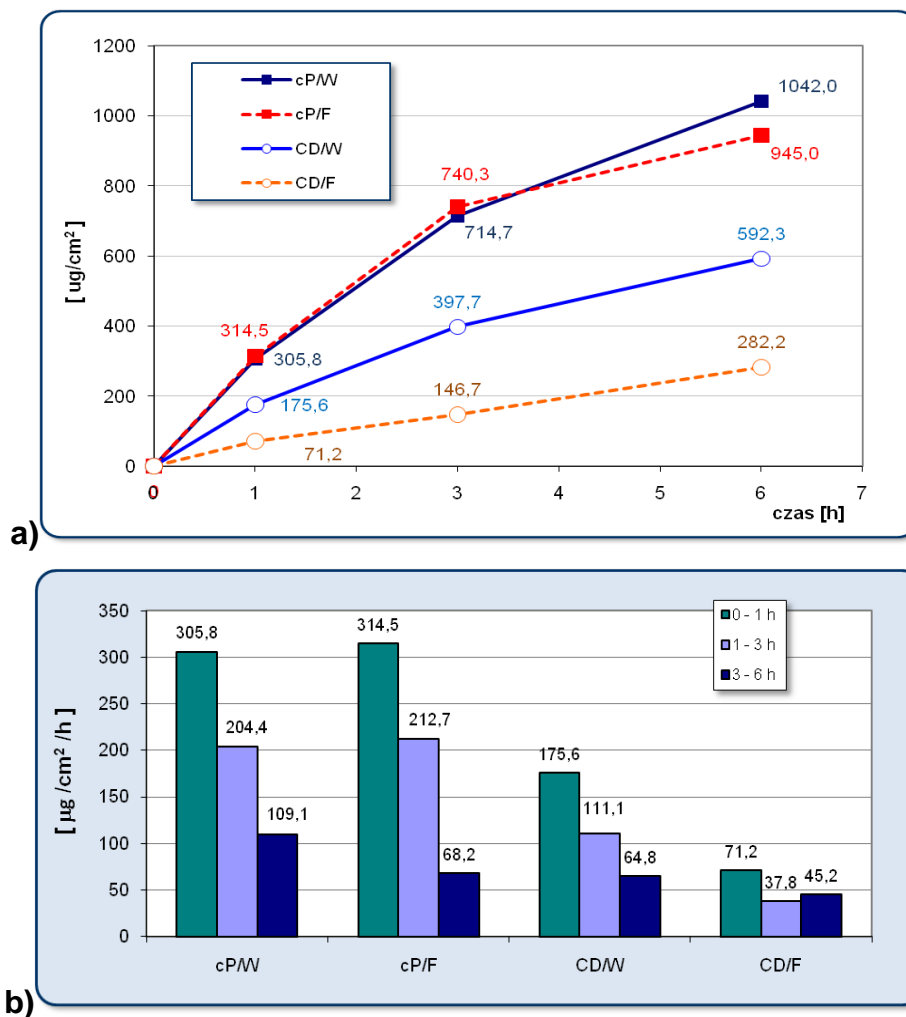
Piki produktów hydrolizy kwaśnej ($t_r = 4-5$ min) rejestrowane na chromatogramach po 6 miesiącach stanowiły od 2,9 do 5,5% powierzchni piku NTG. W roztworach bezpośrednio po przygotowaniu mono- i di azotany stanowiły do 2% powierzchni piku NTG, nie obserwowano więc znaczącego wzrostu zawartości tych produktów.

1.4. Szybkość uwalniania NTG z kompleksu

Badania przeprowadzono z użyciem membrany dializacyjnej, w dwóch różnych aparatach: w komorze Franza i w komorze wertykalnej (*Metody, pkt. 3.4.*), a wyniki przedstawiono na ryc. 18. Przedstawiono profile uwalniania NTG jako zależność ilości uwolnionej substancji czynnej ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) od czasu oraz podano szybkość uwalniania ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) w przedziałach czasowych: 0 - 1 h, 1 - 3 h i 3 - 6 h.

Szybkość uwalniania NTG z zawiesiny NTG-cP (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NTG) była podobna w obu aparatach (F i W) i malała w czasie. Uwalnianie NTG z zawiesiny NTG-CD było wolniejsze (2- lub 3-krotnie) i zależało od typu aparatu.

W przypadku rozcierki NTG-cP uzyskano zbliżoną szybkość uwalniania w obu komorach, natomiast uwalnianie z zawiesiny NTG-CD przebiega z różną szybkością w zależności od użytej komory. 2-krotnie szybsze uwalnianie w komorze wertykalnej W, obserwowane jest prawdopodobnie dlatego, że w aparacie Franza nie ma mieszania w komorze donora. Ze względu na różną ilość substancji stałej w zawieszynie NTG-cP i NTG-CD (odpowiednio 6 mg i 80 mg) oraz różną strukturę osadu, mniejsza szybkość uwalniania z kompleksu prawdopodobnie jest również wynikiem braku mieszania zawiesiny w komorze donora w aparacie Franza.



Ryc. 18. Profil uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z zawieszin: NTG-CD lub NTG-cP w komorze Franza (F) lub komorze wertykalnej (W) (n = 2).

2. TABLETKI PODJĘZYKOWE

Tabletki placebo

Wykonano dla tabletek placebo (Metody, tabela 13) wstępne badania wpływu substancji rozsadzającej na czas ich rozpadu.

Dla tabletek o twardości do 100 N możliwe było uzyskanie czasu rozpadu poniżej 100 s w przypadku zastosowania wszystkich czterech substancji rozsadzających (tabela

23). Najszybszy rozpad uzyskano stosując substancje pomocnicze: Starch 1500 (10%), Ac-Di-Sol (2%) oraz Vivastar (5%).

Tabela 23. Wpływ rodzaju substancji rozsadzających oraz ich stężenia na właściwości organoleptyczne i fizyczne tabletek podjęzykowych (n = 3)

Substancja		Placebo I (CD)			Placebo II (bez CD)		
Rodzaj	Stężenie [%]	Twardość [N]	Czas rozpadu [s]	Odczucie ziarnistości*	Twardość [N]	Czas rozpadu [s]	Odczucie ziarnistości*
Ac-Di-Sol	2	60	44	+++	81	26	+++
	4	91	60	+++	82	49	+++
	8	100	115	++++	84	78	++++
Starch 1500	2	72	84	++	67	124	++
	5	91	63	++	63	32	++
	10	85	44	++	68	24	++
Vivastar	5	89	97	+	55	28	+
	10	86	94	+	60	34	+
	15	80	97	+	63	52	+
StarLac	74	35	30	+			
	99				56	36	+

* - odczucie ziarnistości (+ nieznaczne, ++++ bardzo intensywne)

Ze względu na bardzo duże odczucie ziarnistości, pomimo szybkiego rozpadu już przy stężeniu 2%, formułacja z Ac-Di-Sol została odrzucona. Zrezygnowano również z zastosowania ultraamylopektyny (Vivastar), gdyż w tym przypadku czasy rozpadu uzyskane dla tabletek z CD były relatywnie długie w porównaniu do formułacji zawierających skrobię. Preparaty wykonane z użyciem Starch 1500 lub StarLac charakteryzowały się zarówno krótkim czasem rozpadu *in vitro*, jak i odpowiednimi parametrami aplikacyjnymi (*Metody, pkt. 5.1.1. i 5.2.*). W przypadku skrobi konieczne jest jednak użycie wyższych stężeń substancji rozsadzającej. Czas rozpadu tabletek wykonanych z dodatkiem 2% Starch 1500 przekraczał 2 min i był najdłuższy spośród wyznaczonych wartości, jednakże w przypadku zwiększenia ilości tej substancji do 10% rozpad następował bardzo szybko, nawet w ciągu 24 s (bez CD).

Ze względu na brak kontroli nacisku w czasie kompresji, tabletki serii próbnej w sposób istotny różnią się twardością, z tego względu niemożliwe jest dokładne określenie

wpływu dodatku β -CD (w stężeniu 25%) na skuteczność działania substancji rozsadzających.

Na podstawie wyników badań wstępnych wytypowano dwa środki rozsadzające, Starch 1500 i StarLac. Dla tabletek *placebo* (tabela 24) o wybranym składzie wyznaczono czas rozpadu *in vivo* i *in vitro* (Metody, pkt. 5.1.2. i 5.1.3.). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 24.

Tabela 24. Czas rozpadu *in vitro* i *in vivo* wybranych tabletek *placebo*

Substancja rozsadzająca	Stężenie [%]	Symbol tabletek	Substancja stabilizująca	Czas rozpadu	
				<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Starch 1500	10	P1-II	β -CD	34	91 \pm 13
	10	P2-II	cP	24	109 \pm 28
StarLac	75	P5-II	β -CD	44	32 \pm 17
	95	P6-II	cP	42	30 \pm 15

Czas rozpadu tabletek wykonanych ze Starch 1500, wyznaczony *in vitro*, był krótszy od uzyskanego dla tabletek zawierających StarLac, zwłaszcza w przypadku P6-II. Natomiast *in vivo* krótszy czas rozpadu wyznaczono dla tabletek zawierających StarLac i był on podobny do wyznaczonego w warunkach *in vitro*.

Podobnie jak doświadczenia *in vitro*, badania *in vivo* wskazują, że duża zawartość CD nie wpływa w sposób znaczący na proces rozpadu tabletek. W badaniach *in vivo* probanci mieli wytypować formułację o najlepszych cechach aplikacyjnych, w większości przypadków (75%) preferowane były tabletki zawierające StarLac (krótszy czas rozpadu w jamie ustnej, lekko słodkawy smak oraz minimalne odczucie „piasku”). Rodzaj stosowanej substancji stabilizującej (cP lub CD) nie miał istotnego wpływu na preferencje pacjentów, chociaż w przypadku tabletek z CD za korzystny uznano lekko słodkawy smak.

3. BADANIE TRWAŁOŚCI TABLETEK Z NTG

Przeprowadzono krótkoterminowe badania stresowe na płycie Petriego, a także właściwe badania trwałości - w warunkach odpowiadających testowi przyspieszonego starzenia (6 m-cy) oraz w warunkach testu długoterminowego (12 m-cy) zgodnie z wytycznymi EMEA (Metody, pkt. 5.6.).

W tabeli 25 przedstawiono właściwości fizykochemiczne dwóch serii tabletek z NTG (*Metody, pkt. 5.*).

Tabela 25. Właściwości dwóch serii (I i II) tabletek z NTG-CD lub NTG-cP

Formulacja	Substancje rozsadzająca i wypełniająca	Seria	Nacisk [kN]*	Właściwości			
				Twardość [N]*	Masa [mg]	Czas rozpadu [s]	Zawartość NTG** [%]
CD/A	StarLac	I	3,2	64 60; 69	106,6 ± 1,4	100	105,2
		II	3,2 2,6; 4,0	40 ± 7	101,2 ± 1,5	270	104,5
cP/A	StarLac	I	3,2	34 35; 43	105,3 ± 1,1	40	108,3
		II	3,7 2,9; 4,2	32 ± 0,6	98,4 ± 2,0	52	119,7
CD/B	Starch 1500 Tabletosa 80	I	3,6	38 28; 43	100,8 ± 1,1	140	95,8
		II	6,4 5,4; 7,9	41 ± 2	100,9 ± 1,4	95	95,7
cP/B	Starch 1500 Tabletosa 80	I	8,1	43 41; 46	97,6 ± 1,7	38	108,0
		II	8,6 7,8; 9,3	32 ± 5	99,8 ± 1,1	38	117,8

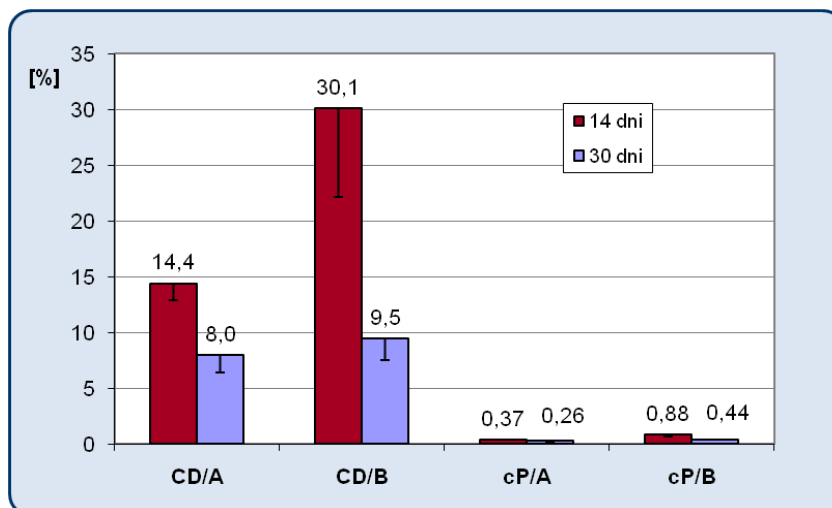
* podano wartość średnią lub minimalną i maksymalną (n = 20)

** % zawartości teoretycznej

Tabletki charakteryzowały się twardością w zakresie od 30 do 40 N (wyjątek stanowiła formacja CD/A serii I - 60 N), uzyskaną przy zastosowaniu odpowiedniego nacisku w trakcie procesu tabletkowania. Nacisk wyniósł od 3 do 9 kN, odpowiednio dla serii CD/A < CP/A < CD/B < CP/B . Nacisk konieczny do otrzymania tabletek o twardości około 40 N był wyższy w przypadku zastosowania aglomerowanej laktozy (Tabletosa 80) i Starch 1500 (formulacja B). Zaobserwowano również, że w przypadku formacji B nieco wyższe wartości siły były konieczne do sprasowania tabletek zawierających krospowidon, natomiast zastosowana forma substancji czynnej nie wpływała na nacisk w trakcie tabletkowania mas zawierających StarLac. Wszystkie tabletki, z wyjątkiem CD/A serii II, charakteryzował krótki (poniżej 2 min) czas rozpadu *in vitro*.

Trwałość chemiczna

Wyniki badań stresowych przedstawiono na ryc. 19. W warunkach bezpośredniej ekspozycji tabletek na wysoką wilgotność powietrza (75%) oraz podwyższoną temperaturę (40°C), dochodzi do gwałtownego spadku zawartości NTG. Chociaż proces ten jest wolniejszy przy zastosowaniu formy kompleksu inkluzyjnego, to jednak po upływie 30 dni w warunkach stresowych pozostało mniej niż 10% leku w tabletkach z NTG-CD.

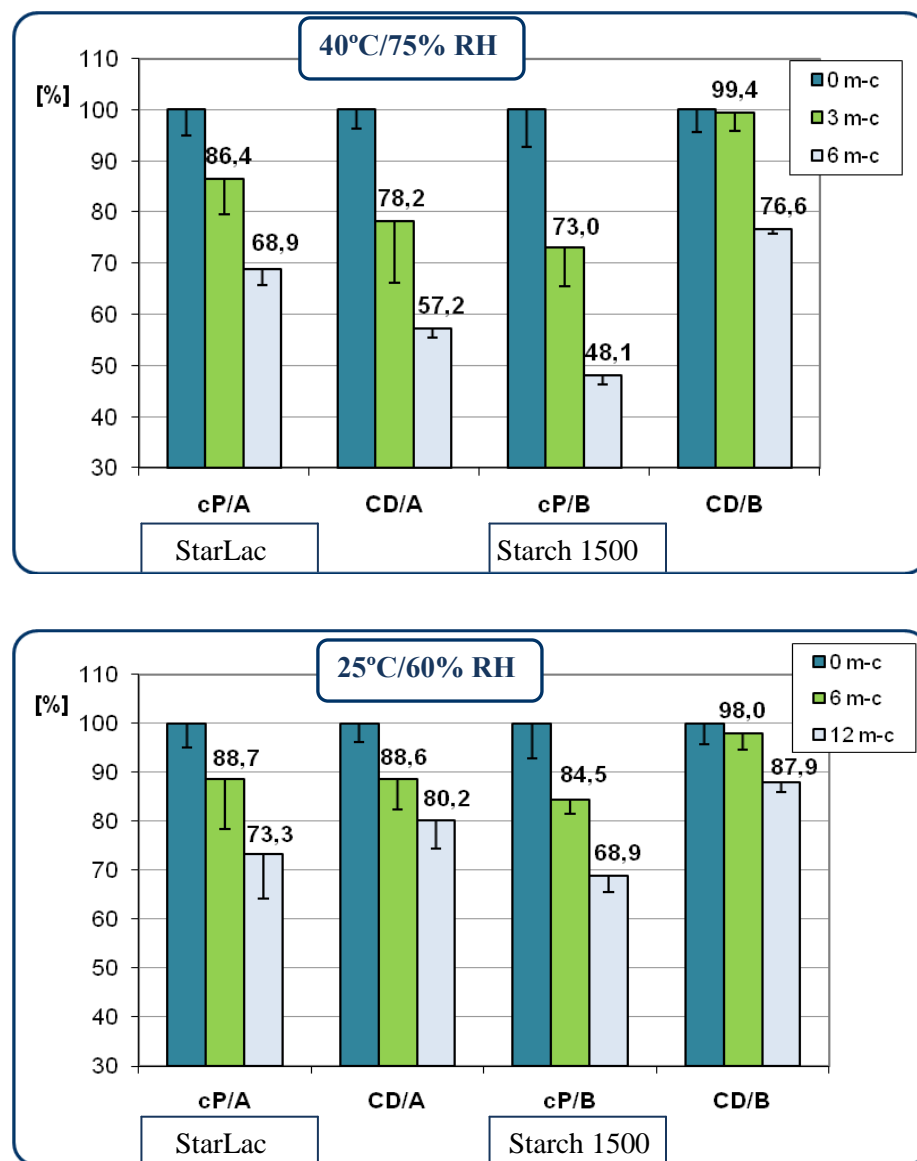


Ryc. 19. Zawartość NTG w tabletkach [% zawartości początkowej] po 14 i 30 dniach przechowywania w warunkach bezpośredniej ekspozycji na warunki klimatyczne 40°C i 75%RH ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$).

Gdy użyto cP jako czynnika stabilizującego NTG, już po upływie 14 dni w tabletkach znajdowano mniej niż 1% początkowej dawki leku. Dodatkowo w trakcie przechowywania zaobserwowano w tabletkach z NTG-cP pojawienie się zmian na powierzchni – pojedyncze zgrubienia pojawiły się po 14 dniach, a po 30 dniach cała powierzchnia była grudkowata. Proces ten był bardziej widoczny w formulacji B (Tabletoza i Starch 1500).

Wyniki badań długoterminowych przedstawiono na ryc. 20. Na ich podstawie stwierdzono, że po upływie 6 miesięcy spadek zawartości NTG był znaczny we wszystkich tabletkach przechowywanych w 40°C, przy czym do obniżenia zawartości NTG najwolniej dochodziło w formulacji CD/B - po 3 miesiącach zawartość nie uległa zmianie, natomiast po 6 miesiącach ubytek zawartości przekraczał 20%. Tabletki zawierające Starch 1500 i

NTG-cP okazały się najmniej trwałe (po 6 miesiącach zawartość wynosiła niecałe 50% wartości początkowej).



Ryc. 20. Wpływ substancji pomocniczych na zawartość NTG [% dawki początkowej] w tabletkach zawierających NTG-cP lub NTG-CD przechowywanych w 25°C i 40°C (StarLac - formacja A i Starch 1500 - formacja B) ($\bar{x} \pm SD$; n = 3).

Rozkład NTG w tabletkach zachodzi wolniej w temp. 25°C. Również w tej temperaturze najwyższą trwałość NTG uzyskano w tabletkach zawierającej Starch 1500 i NTG-CD, jednakże po 12 miesiącach również w tym przypadku ubytek NTG przekraczał 10%.

W formulacji zawierającej StarLac nie obserwowano istotnych różnic w trwałości NTG pomiędzy formą rozcierki a kompleksu, a ubytek substancji czynnej po 12 miesiącach nawet w temperatura pokojowej wynosił 20% lub więcej.

Zastosowana metoda HPLC (*Metody, pkt. 2.*), pozwalała na oznaczanie produktów rozkładu NTG (ryc. 17). W tabletkach bezpośrednio po sporządzeniu pole powierzchni głównego piku produktów rozkładu (azotan 2,3-dihydroksy-1-propanolu i azotan 2,2-dihydroksy-1,3-propanodiolu) stanowiło 0,8 – 2,0% pola powierzchni piku NTG. Po 12 miesiącach przechowywania w temp. 25°C wartość ta wynosiła 1,4 – 2,0%, natomiast dla tabletek przechowywanych w temp. 40°C po 6 miesiącach 3,8 - 5,7%. Nie udało się jednak na tej podstawie ustalić zależności pomiędzy składem użytych substancji pomocniczych, a występowaniem produktów rozkładu.

Trwałość fizyczna

Trwałość fizyczną tabletek podjęzykowych oceniano na podstawie pomiaru: twardości, czasu rozpadu oraz kontroli masy (*Metody, pkt. 5.*). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 26.

Tabela 26. Właściwości fizyczne tabletek podjęzykowych z NTG ($\bar{x} \pm SD, n=6$) przechowywanych w temp. 40°C (6 m-cy) lub 25°C (12 m-cy)

Parametr	Czas [m-c]	Temp. [°C]	CD/A	cP/A	CD/B	cP/B
Masa [mg]	t = 0	25	101,2 ± 1,5	98,4 ± 2,0	100,9 ± 1,4	99,8 ± 1,1
	t = 12	25	101,1 ± 1,3	98,1 ± 1,1	102,0 ± 2,7	98,8 ± 1,7
	t = 6	40	103,0 ± 2,6	99,0 ± 2,6	100,5 ± 3,7	100,0 ± 1,6
Twardość [N]	t = 0	25	40 ± 7	32 ± 0,6	41 ± 2	32 ± 5
	t = 12	25	37 ± 7	37 ± 2	44 ± 2	28 ± 4
	t = 6	40	23 ± 1	25 ± 2	24 ± 2	21 ± 0,6
Czas rozpadu[s]	t = 0	25	215 ± 65	43 ± 8	43 ± 31	31 ± 6
	t = 12	25	139 ± 42	43 ± 10	72 ± 22	23 ± 5
	t = 6	40	59 ± 30	31 ± 9	47 ± 15	8 ± 5

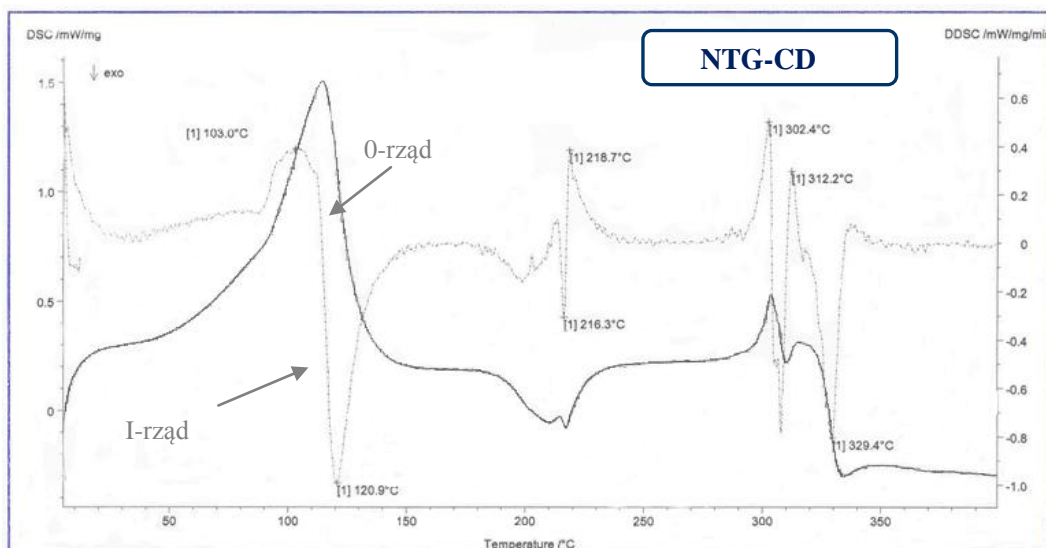
Nie obserwowano zmian masy przechowywanych tabletek. W żadnym z badanych typów tabletek przechowywanych w temp. 25°C przez okres 12 miesięcy nie obserwowano istotnych zmian w twardości. Natomiast w próbach przechowywanych w temp. 40°C dochodziło do obniżenia twardości, a zmiany te zależały od użytej formy substancji

czynnej. W przypadku tabletek zawierających kompleks NTG-CD twardość zmalała dwukrotnie, niezależnie od użytych substancji pomocniczych, podczas gdy w formulacji zawierającej NTG-cP twardość obniżyła się tylko o około 20%.

Czas rozpadu (*in vitro*) uległ skróceniu w dwóch formulacjach: tabletkach CD/A zawierających StarLac oraz tabletkach cP/B zawierających Starch 1500, przy czym zmiana ta była większa w preparatach przechowywanych w temp. 40°C. Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednak skorelować zmian twardości tabletek ze zmianą czasu rozpadu.

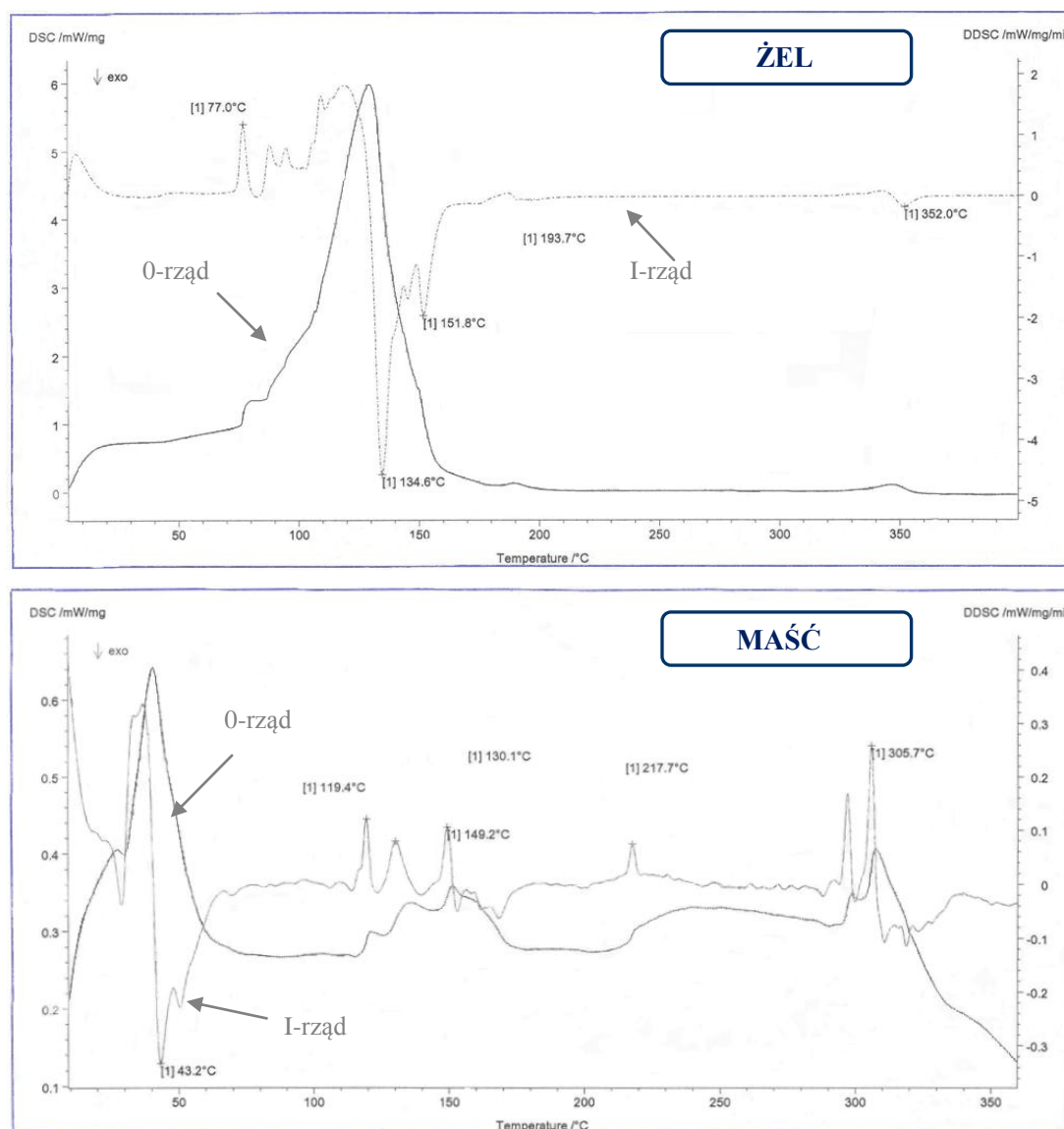
4. MOŻLIWOŚĆ ZASTOSOWANIA DSC W OZNACZANIU KOMPLEKSU NTG-CD W MAŚCIACH

Ryc. 21 przedstawia termogram (zerowego i pierwszego rzędu) otrzymany dla kompleksu inkluzyjnego NTG-CD (*Metody, pkt. 7.1.*). Na krzywej zerowego rzędu występują trzy piki - dwa piki endotermiczne o maksimach w temp. 114°C (245 J/g) i 304°C (14 J/g) oraz jeden egzotermiczny w temp. 217°C (-39 J/g). Pik endotermiczny o maksimum przy 114°C związany jest z dehydratacją wody krystalizacyjnej cyklodekstryny. Charakterystyczny dla kompleksu NTG-CD pik egzotermiczny występuje przy 217°C [103], natomiast w temp. 304°C dochodzi do rozkładu β -CD [102]. Widmo I rzędu potwierdza rozmieszczenie pików.



Ryc. 21. Termogram DSC zerowego i pierwszego rzędu wykonany dla kompleksu inkluzyjnego NTG-CD.

Na termogramach kompleksu inkluzyjnego inkorporowanego do podłoża absorpcyjnego oraz hydrożelowego, przedstawionych na ryc. 22, brak jest pik egzotermicznego (217°C) charakterystycznego dla kompleksu NTG-CD, występują natomiast piki pochodzące od składników podłoża. W przypadku hydrożelu dominuje pik egzotermiczny o maksimum w temp. 129°C (1199 J/g), będący wynikiem dehydratacji podłoża próbki, natomiast w maści obserwujemy piki przemian fazowych składników lipofilowych: pojedynczy pik o maksimum w 40°C (38 J/g) oraz złożony przy temp. 151°C (17 J/g).

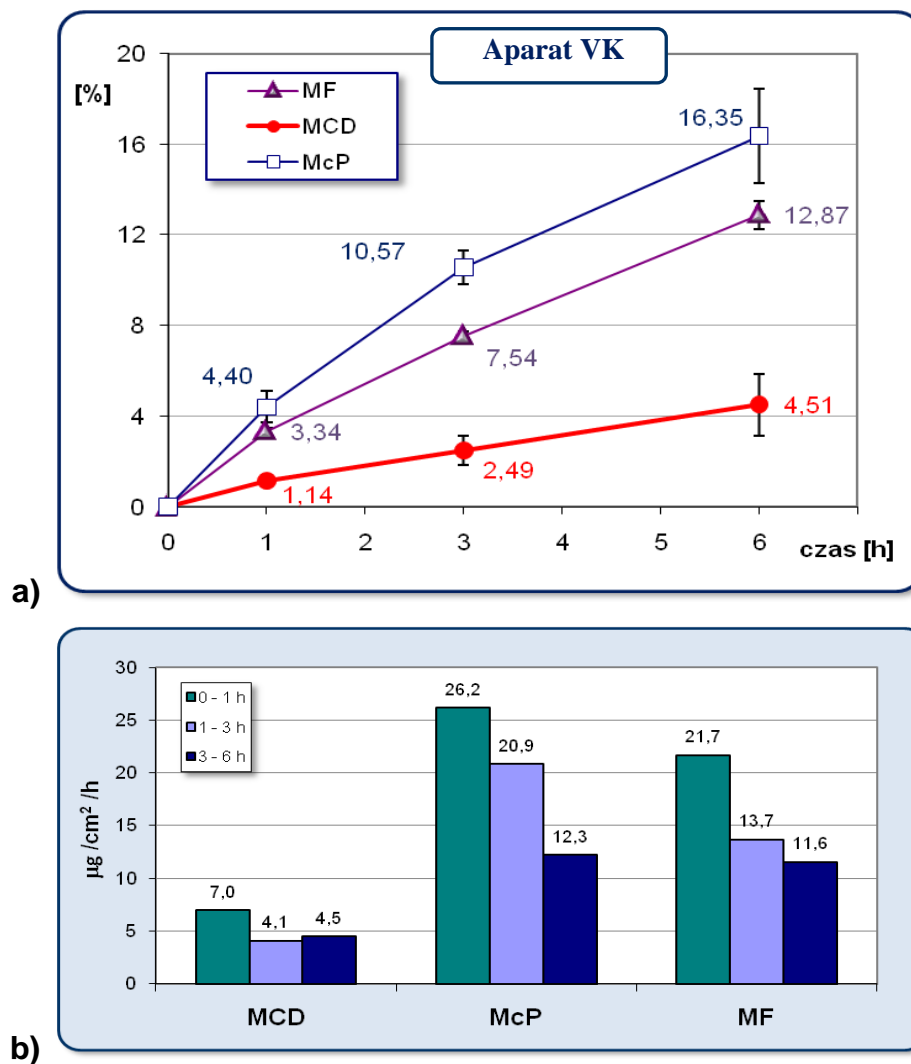


Ryc. 22. Termogramy DSC zerowego i pierwszego rzędu wykonane dla żelu i maści absorpcyjnej z NTG-CD.

5. BADANIE UWALNIANIA NTG Z MAŚCI, KREMU I ŻELU

5.1. Uwalnianie z maści

Profile uwalniania NTG z maści absorpcyjnej, o składzie podanym w tabeli 16 (str. 69), przedstawiono na ryc. 23 (Metody, pkt. 7.2.1.).



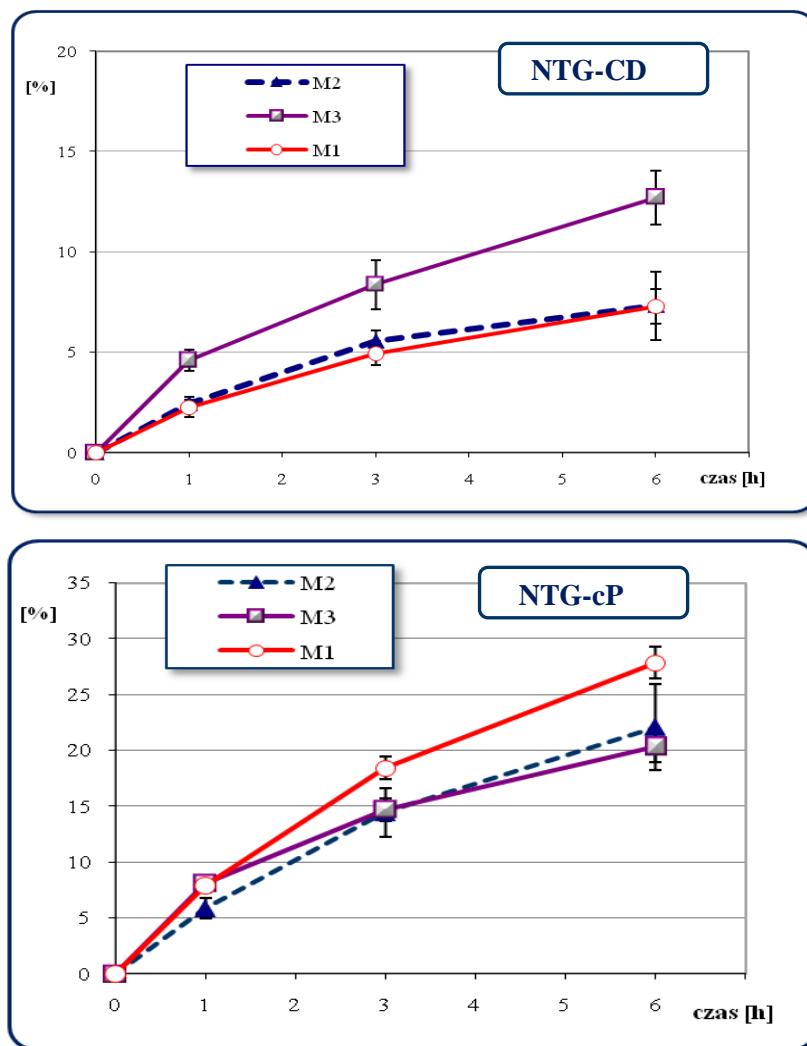
Ryc. 23. Profil uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z maści absorpcyjnej zawierającej: NTG-CD (MCD), NTG-cP (McP) lub mieszaninę fizyczną (NTG-cP + CD) (MF) ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 3$).

Szybkość uwalniania NTG z maści zawierającej NTG-cP jest stosunkowo duża - w czasie 6 h uwolnieniu ulega około 16% NTG. Szybkość uwalniania NTG z maści zawierającej NTG-CD jest odpowiednio prawie trzykrotnie (2,8-razy) i prawie czterokrotnie (3,6-razy) mniejsza od szybkości uzyskanej dla mieszaniny fizycznej (NTG-cP + β -CD) i formy nieskompleksowanej (NTG-cP).

Oceniono wpływ dodatku mirystynianu izopropylu oraz wpływ rodzaju użytego emulgatora (alkohol cetostearylowy lub Empiwax) na uwalnianie NTG z maści. Skład preparatów (M1CD, M2CD, M3CD i M1cP, M2cP, M3cP) podano w tabeli 17 (str. 69). Wyniki przedstawiono na ryc. 24.

W preparacie z NTG-CD zastosowanie Empiwaxu (M3) powodowało istotny wzrost ($p < 0,05$) uwalniania NTG względem preparatu zawierającego alkohol cetostearylowy (M2), natomiast obecność mirystynianu izopropylu (M1) nie zmieniała kinetyki uwalniania. Rodzaj zastosowanego emulgatora nie miał wpływu na uwalnianie NTG z maści zawierającej substancję czynną w formie rozcierki (NTG-cP) - kinetyka uwalniania z preparatu M2 i M3 jest zbliżona, a jedynie w pierwszej godzinie badania obserwowano niewielkie (istotne statystycznie; $p < 0,05$) różnice pomiędzy formulacjami. W przeciwieństwie do maści zawierającej formę skompleksowaną NTG, w preparacie z rozcierką NTG-cP obecność mirystynianu izopropylu (M1) w istotny sposób zwiększa szybkość uwalniania.

W celu dalszego wyjaśnienia obserwowanych różnic porównano ilość wody zaabsorbowanej przez podłoże w trakcie 6 h badania uwalniania. W maściach zawierających zarówno NTG-CD, jak i NTG-cP (niezależnie od rodzaju użytego emulgatora, M2 i M3), ilość wchłoniętej przez podłoże wody była niewielka - wyniosła od 3 do 4%.



Ryc. 24. Profile uwalniania NTG z maści absorpcyjnych zawierających NTG-CD

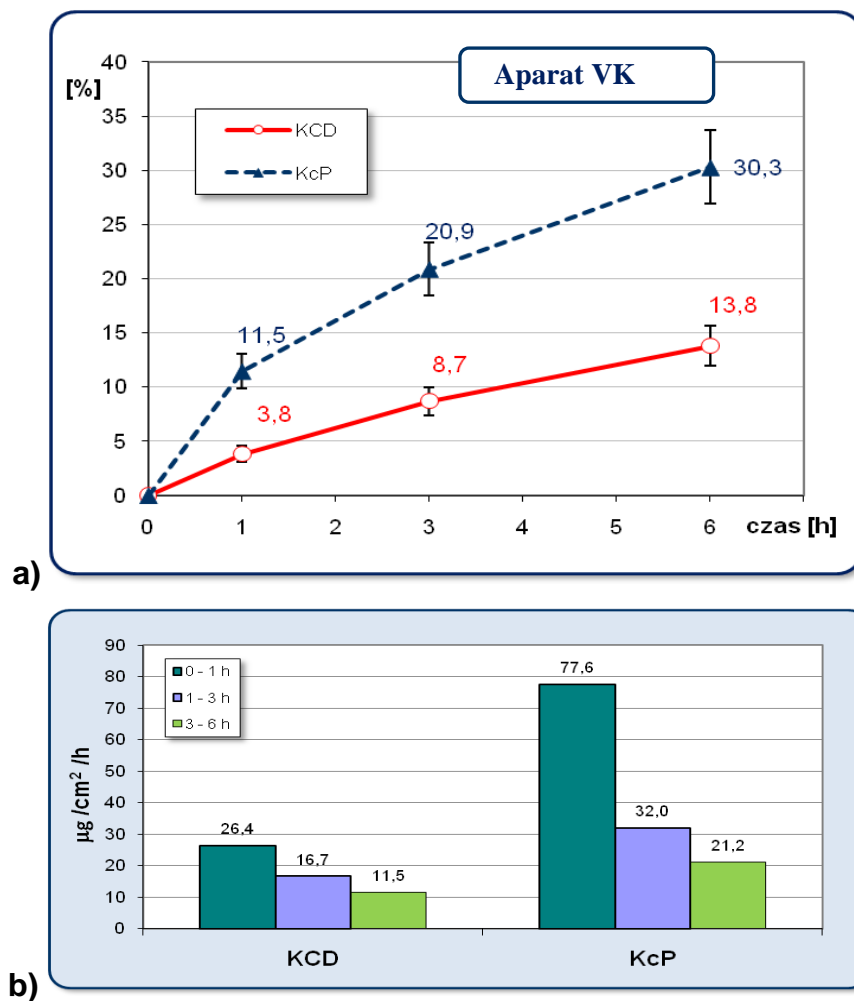
lub NTG-cP ($\bar{x} \pm SD, n = 3$):

M1 – maść z alkoholem cetostearylowym i mirystynianem izopropylu;

M2 – maść z alkoholem cetostearylowym; M3 – maść z Empiwaxem.

5.2. Uwalnianie z kremu

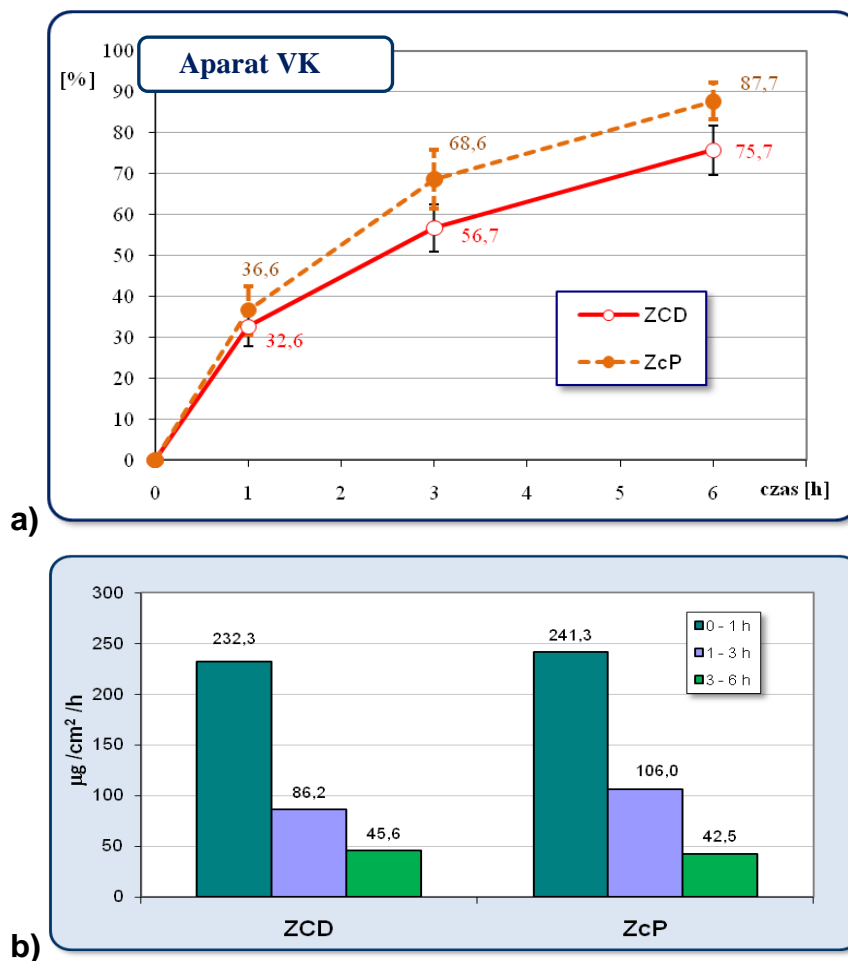
Na ryc. 25 przedstawiono profile uwalniania NTG z kremów w/o obserwowane w komorze VK. Całkowita ilość NTG uwolniona po 6 h badania wynosiła 30,3% (KcP) oraz 13,8% (KCD). Uzyskano około 2,5-krotnie mniejszą szybkość uwalniania substancji czynnej z preparatu zawierającego NTG-CD w stosunku do kremu z NTG-cP.



Ryc. 25. Profile uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z kremu zawierającego: NTG-CD (KCD) lub NTG-cP (KcP) ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 6$).

5.3. Uwalnianie z żelu

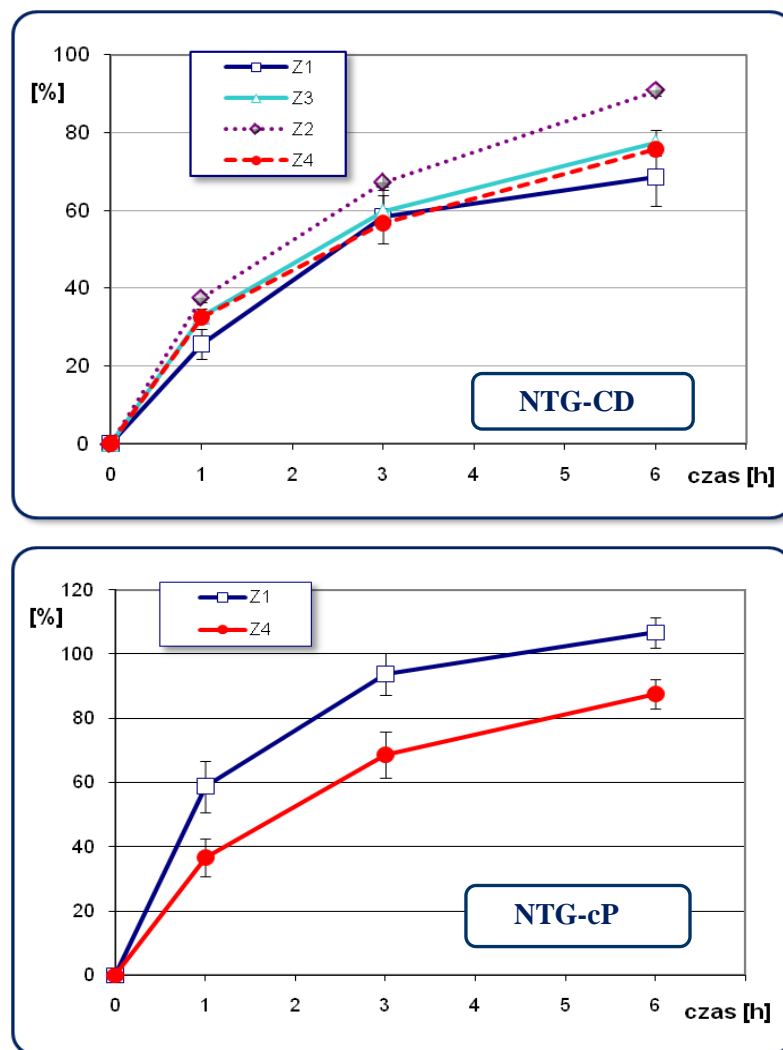
Na ryc. 26 przedstawiono profile uwalniania NTG z hydrożeli (ZCD i ZcP - tabela 16) uzyskane z użyciem komory VK (Metody, pkt. 7.2.1.). Szybkość uwalniania substancji czynnej z żelu zawierającego NTG-CD była tylko nieznacznie mniejsza od obserwowanej dla żelu z NTG-cP. Ilość uwolnionej substancji czynnej w 1 h badania jest taka sama dla obu form (NTG-CD i NTG-cP), natomiast niewielkie różnice w uwalnianiu NTG (około 10%) obserwowane po 3 i 6 h są istotne statystycznie ($p < 0,05$).



Ryc. 26. Profile uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z żelu zawierającego: NTG-CD (ZCD) lub NTG-cP (ZcP) ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$).

Oceniono wpływ dodatku etanolu (10%) i glikolu propylenowego (10%) na kinetykę uwalniania NTG z hydrożelu (*Metody, pkt. 7.2.1.*). Skład preparatów (Z1CD, Z2CD, Z3CD, Z4CD i Z1cP, Z4cP) podano w tabeli 18 (str. 70). Wyniki przedstawiono na ryc. 27.

Dodatek glikolu propylenowego i etanolu do żelu (Z4) zawierającego NTG-cP powodował spowolnienie uwalniania NTG, lecz efekt ten nie występował w żelu zawierającym NTG-CD. W przypadku kompleksu NTG-CD kinetyka uwalniania z preparatów zawierających dodatek glikolu propylenowego oraz glikolu propylenowego i etanolu jest zbliżona do formulacji nie zawierającej tych substancji. W żelach z NTG-CD obserwowano natomiast wzrost uwalniania NTG w preparacie zawierającym etanol (Z2).



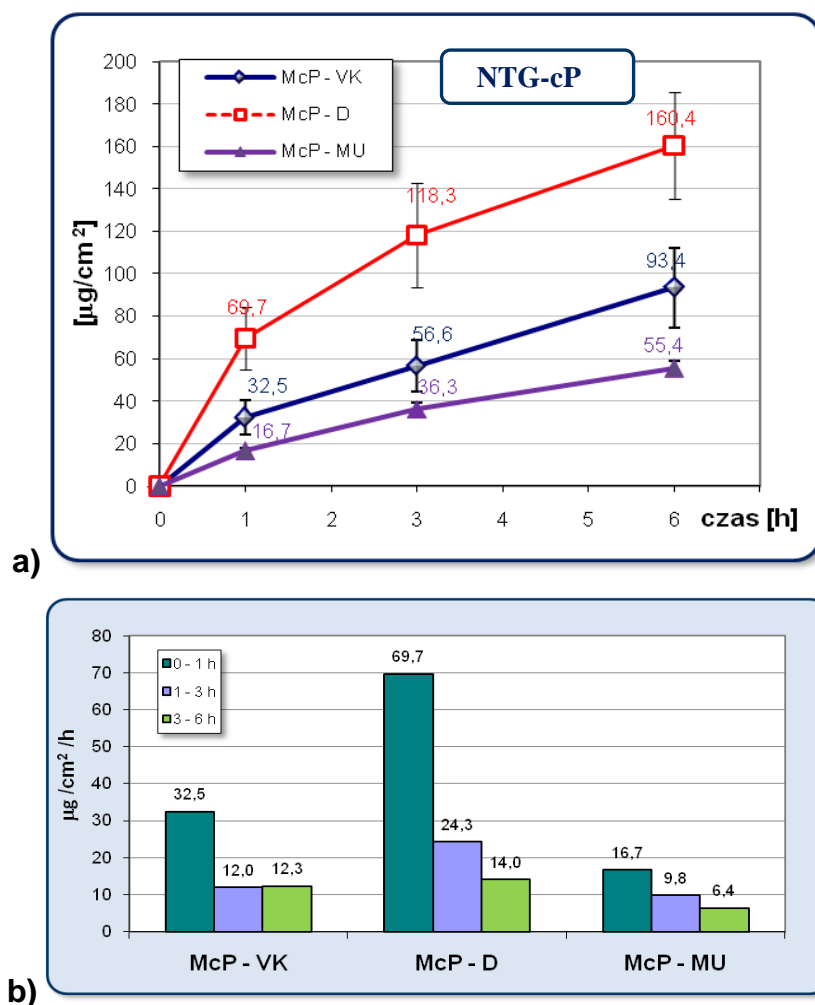
Ryc. 27. Wpływ dodatku rozpuszczalników: etanolu i glikolu propylenowego na uwalnianie NTG z żeli zawierających NTG-CD lub NTG-cP ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 3$):

Z1 – żel podstawowy; Z2 – dodatek 10% etanolu; Z3 – dodatek 10% glikolu propylenowego; Z4 – dodatek 10% glikolu propylenowego i 10% etanolu.

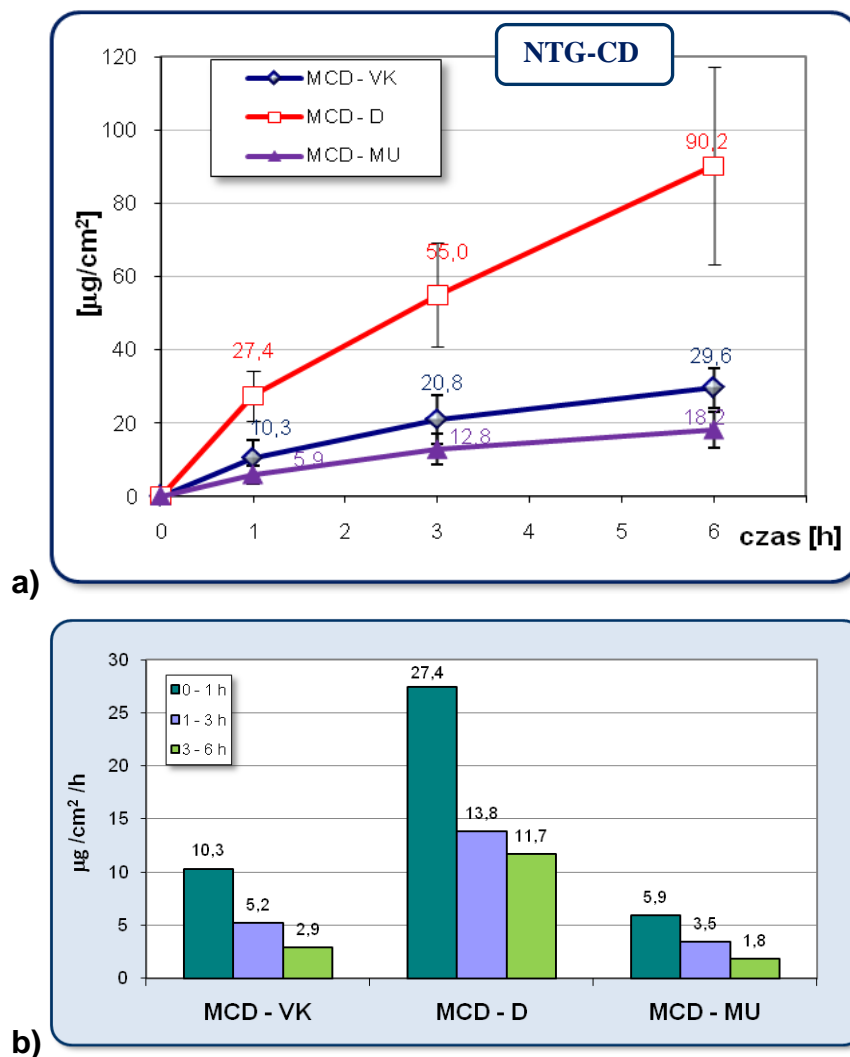
W czasie eksperymentu zaobserwowano, że podłoża hydrożelowe w znacznym stopniu absorbowały wodę. Ilość ta zależała od użytej formy substancji czynnej. Większa ilość wody dyfundowała do preparatu zawierającego NTG-CD niż NTG-cP (żele podstawowe – Z1) i wyniosła odpowiednio 37,4% i 22,7% w stosunku do początkowej masy.

5.4. Wpływ rodzaju aparatu na kinetykę uwalniania NTG z maści i żeli

W badaniach uwalniania z maści (MCD i McP, o składzie podanym w tabeli 16) porównano trzy aparaty: komorę dializacyjną (D), komorę ekstrakcyjną typu VanKel (VK) oraz komorę typu Mutimer (MU), natomiast do badań uwalniania z żeli wytypowano aparat VK i MU (*Metody, pkt. 7.2.*). Zastosowane komory charakteryzowały się różną powierzchnią uwalniania oraz różną grubością warstwy badanego preparatu. Ze względu na te różnice, ilość uwolnionej NTG wyrażono nie jako % dawki, ale jako masę NTG uwalnianą na jednostkę powierzchni ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$, wartość bezwzględna). Uzyskane w różnych aparatach profile uwalniania NTG z maści oraz wyznaczone wartości szybkości uwalniania przedstawiono na ryc. 28 i 29.



Ryc. 28. Profile uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z maści zawierającej NTG-cP w komorze dializacyjnej (D - $n \geq 3$), komorze ekstrakcyjnej (VK - $n \geq 6$) lub komorze typu Mutimer (MU - $n \geq 6$).

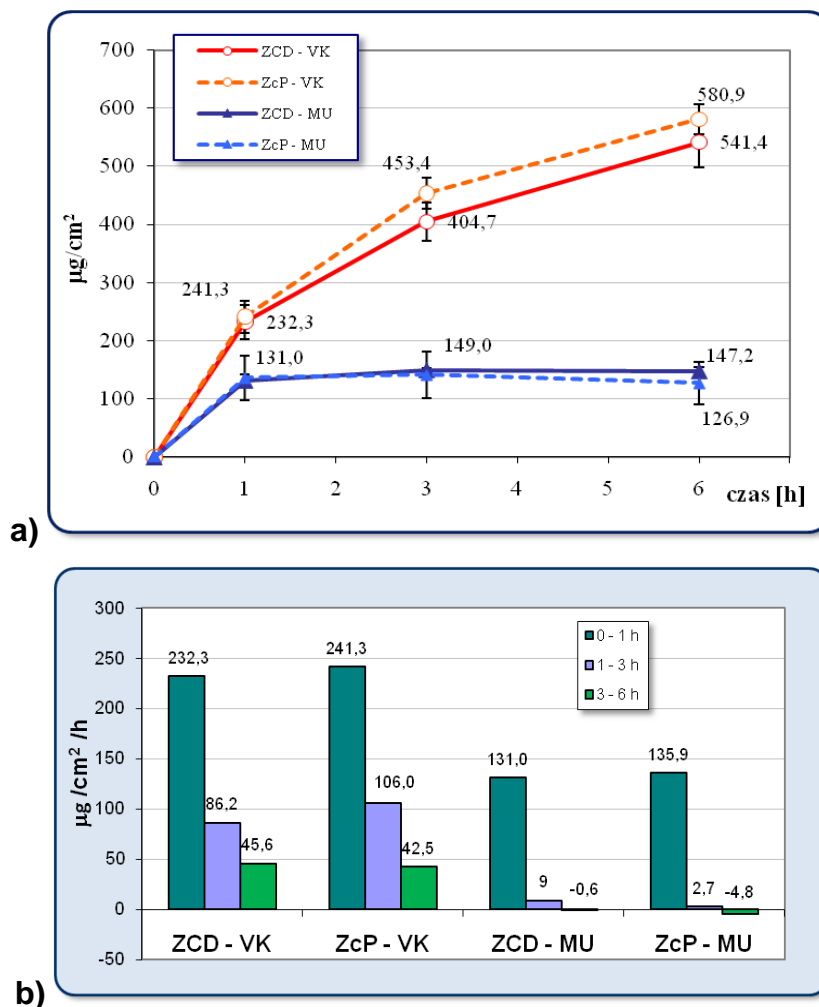


Ryc. 29. Profile uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z maści zawierającej NTG-CD z zastosowaniem komory dializacyjnej (D - $n \geq 3$), komory ekstrakcyjnej (VK - $n \geq 6$) lub komory typu Mutimer (MU - $n \geq 6$).

Stwierdzono, że uwalnianie NTG z maści zachodzi najszybciej przy zastosowaniu komory D (średnia szybkość uwalniania wynosiła: 17,0 i 36,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, odpowiednio dla MCD i McP). Uwalnianie NTG jest znacznie wolniejsze w przypadku pozostałych komór (MU i VK), przy czym najwolniej zachodzi w komórce MU. Niezależnie od zastosowanej formy NTG (NTG-cP i NTG-CD) uwalnianie z maści jest około 1,6 razy wolniejsze w aparacie MU niż VK.

Ze względu na znacznie wyższe wartości szybkości uwalniania oraz duże wartości odchylenia standardowego uzyskane w komórce D, w dalszych badaniach nie stosowano tego aparatu.

Na ryc. 30 przedstawiono profile uwalniania NTG z żeli (ZCD i ZcP o składzie podanym w tabeli 16), wyznaczone w komorach VK i MU (*Metody, pkt. 7.2.*).



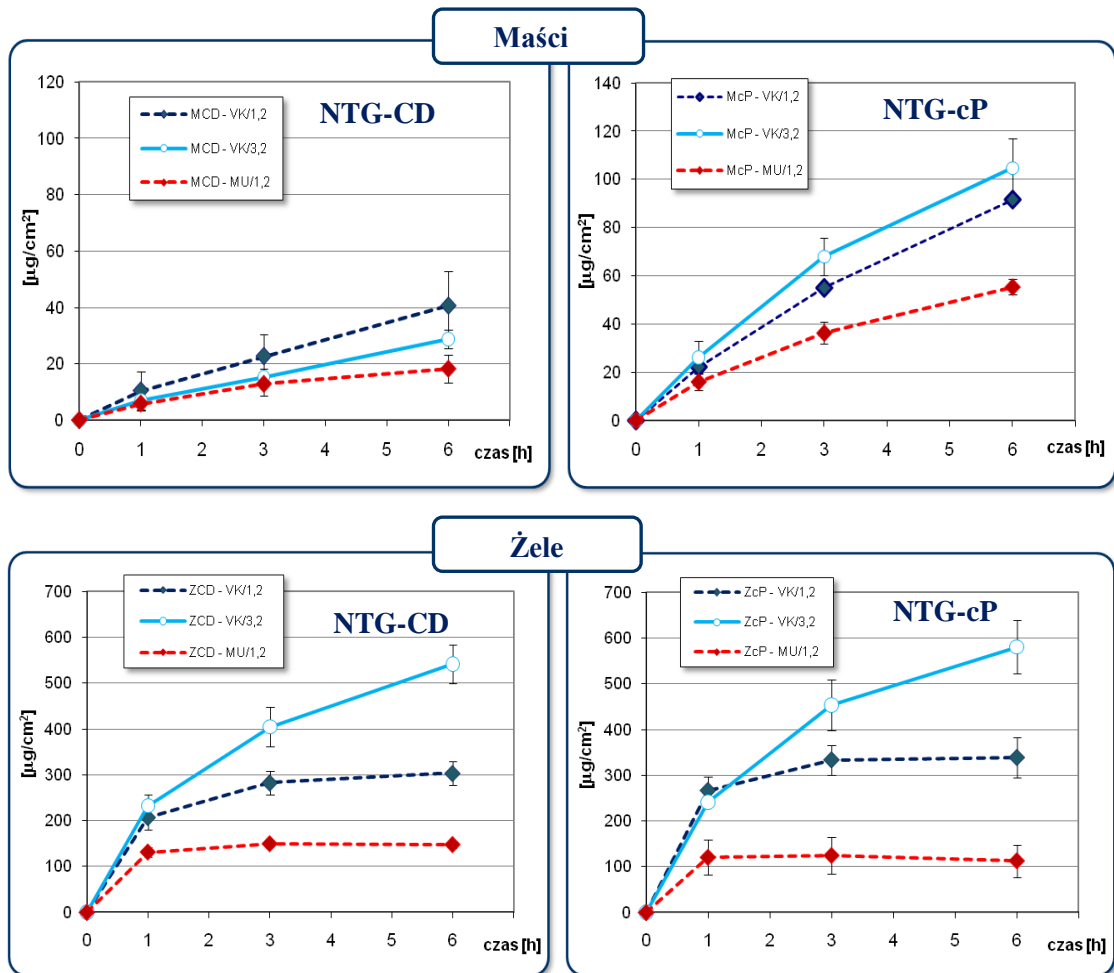
Ryc. 30. Profile uwalniania NTG (a) oraz szybkość uwalniania w przedziałach czasowych (b) z żeli zawierających: NTG-CD lub NTG-cP z zastosowaniem komory ekstrakcyjnej (VK) lub komory typu Mutimer (MU) ($\bar{x} \pm SD, n \geq 6$).

Niezależnie od zastosowanego aparatu uwalnianie NTG przebiega w podobny sposób dla obu form substancji czynnej (NTG-CD, NTG-cP). Jednakże obserwowana niewielka różnica w ilości uwalnianej substancji czynnej pomiędzy NTG-CD a NTG-cP w komorze VK jest istotna statystycznie ($p < 0,05$). Również ilość NTG uwolniona z żelu jest różna w obu aparatach i jest 4-krotnie większa w komorze VK względem ilości uwalnianej w komorze MU (ryc. 30). W komorze VK po 6 h uwalniało się odpowiednio 76% i 88% NTG, natomiast w komorze MU już po 1 h badania uwalniała się większość zawartej w

żelu substancji czynnej (71% -NTG-CD i 69% - NTG-cP). W komorze MU w czasie kolejnych 5 h brak jest dalszego wzrostu stężenia substancji czynnej w płynie akceptorowym (*plateau*).

5.4.1. Wpływ grubości warstwy preparatu na proces uwalniania NTG

Na ryc. 31 przedstawiono wyniki badania uwalniania NTG z maści i żeli (*tabela 16*) uzyskane przy zastosowaniu aparatu VK i MU (*Metody, pkt. 7.2.*). Aparat VK ze względu na regulowaną głębokość komory donora umożliwił badanie uwalniania z zastosowaniem różnej grubości warstwy preparatów – 1,2 lub 3,2 mm.



Ryc. 31. Wpływ grubości warstwy preparatu (1,2 mm – linie przerywane; 3,2 mm - linia ciągła) na ilość uwolnionej NTG w aparatach: VK i MU ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 6$).

Pomimo tej samej grubości preparatu w komorze donora (maść, żel - 1,2 mm) występują znaczące różnice w kinetyce uwalniania NTG (dla obu form substancji czynnej) pomiędzy aparatami VK i MU. Ilość uwolnionej NTG na jednostkę powierzchni jest 2- i 3-krotnie większa, odpowiednio dla maści i żelu w komorze VK względem MU. Różnica w kinetyce uwalniania pomiędzy aparatami nie jest zatem wyłącznie wynikiem różnej grubości preparatu.

Uwalnianie z żelu aplikowanego w cienkiej warstwie (1,2 mm), zarówno w aparacie VK jak i MU prowadzi do zahamowania uwalniania (*plateau*), odpowiednio po 1 h i 3 h badania uwalniania. Pomimo zachowanych warunków *sink* nie dochodzi do całkowitego uwolnienia leku.

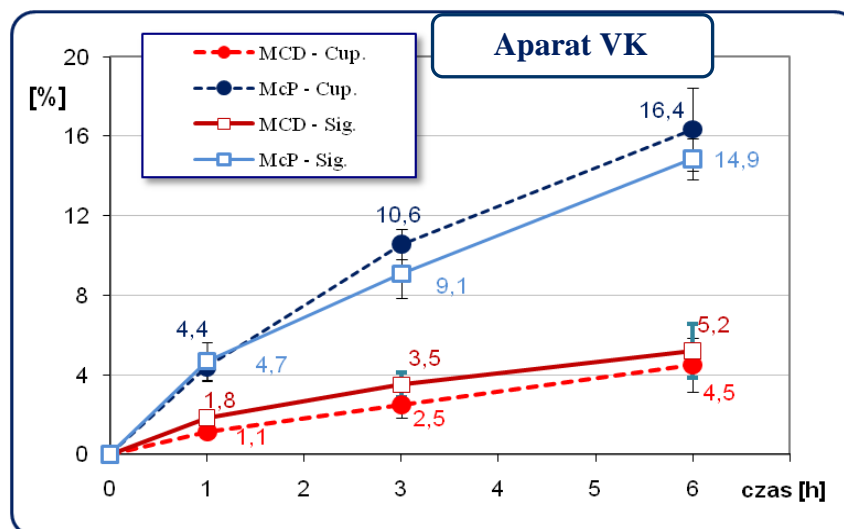
W żelach prawie trzykrotne zwiększenie grubości warstwy aplikowanego preparatu w komorze VK, prowadzi do znacznego zwiększenia ilości uwolnionej substancji leczniczej, natomiast w maściach uzyskane różnice są niewielkie.

5.5. Wpływ rodzaju membrany na kinetykę uwalniania NTG

Badano wpływ typu membrany celulozowej (Cuprophan – Cup. lub błona dializacyjna - Sig.) na kinetykę uwalniania NTG z maści MCD oraz McP (tabela 16). Profile szybkości uwalniania wyznaczono w aparacie VK (*Metody, pkt. 7.2.*). Wyniki przedstawiono na ryc. 32.

Niezależnie od użytej formy NTG, dla obu błon dializacyjnych (Cuprophan i rękaw dializacyjny) uzyskano podobną kinetykę uwalniania. Niewielkie różnice w szybkości uwalniania (około 10%) są nieistotne statystycznie ($p < 0,05$).

Badano również zgodność NTG z błoną dializacyjną wykonaną z estrów celulozy (*Metody, pkt. 1.3.*). W trakcie 6 h badania w temp. 37°C nie obserwowano spadku stężenia NTG w żadnej z badanych próbek (zarówno w roztworze 50 µg/ml jak i 100 µg/ml) i zawartość w badanych roztworach stanowiła 98,5% i 100% zawartości początkowej.



Ryc. 32. Wpływ rodzaju użytej błony: Cuprophan (Cup. – linia przerywana) lub rękaw dializacyjny (Sig. – linia ciągła) na kinetykę uwalniania NTG z maści (MCD i McP) ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 6$).

6. BADANIA REOLOGICZNE

Badania reologiczne podłoży maściowych (krem w/o – KrA i KrB oraz maść absorpcyjna - MrA i MrB; skład podano w tabeli 20) prowadzono stosując rotor płytko-stożek (*Metody, pkt. 7.3.*). Badano także wpływ dodawanych składników nierozpuszczalnych – analizując preparaty *placebo* zawierające cP (0,8% - KrBcP i MrBcP) lub β -CD (10% - KrACD i MrACDM). Składy preparatów podano w tabeli 20.

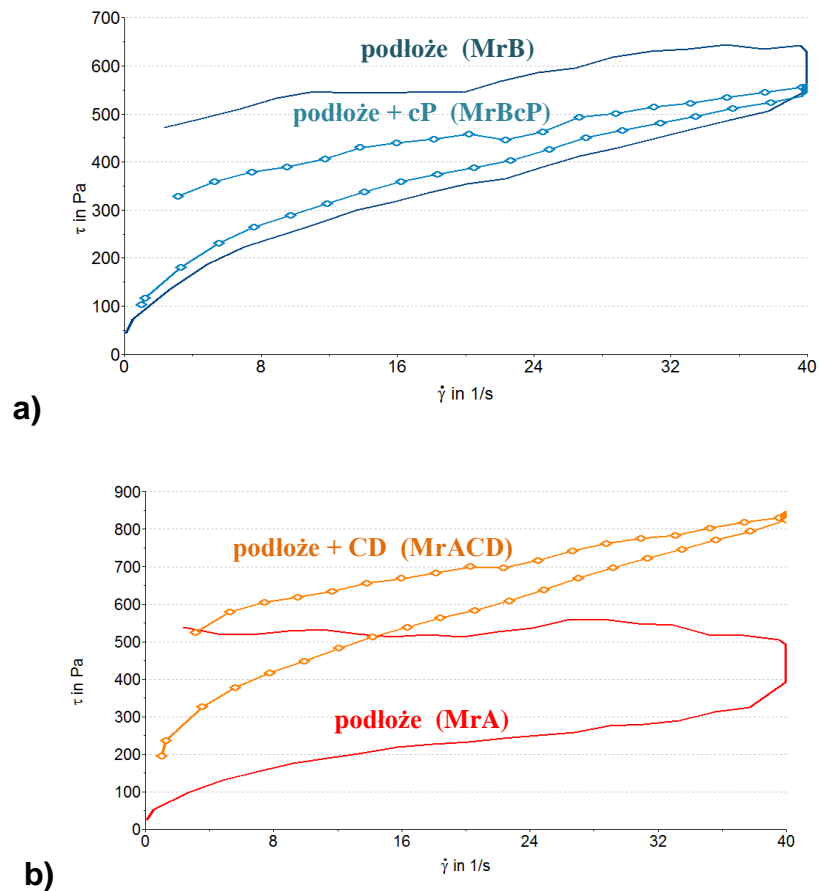
W tabeli 27 przedstawiono wartości lepkości i tiksotropii, natomiast krzywe płynięcia na ryc. 33 i 34.

Tabela 27. Właściwości reologiczne podłoży maściowych (krem w/o i maść absorpcyjna) oraz preparatów placebo zawierających CD lub cP ($\bar{x} \pm SD$, $n \geq 4$)

Preparaty		Lepkość [Pa · s]		Tiksotropia [Pa/s]
		2,3 [1/s]	40 [1/s]	
Maść	MrA	225,4 ± 10,4	11,4 ± 1,6	12351 ± 2647
	MrACD	179,0 ± 19,6	19,1 ± 1,7	5481 ± 486
Krem	KrA	211,2 ± 19,0	17,9 ± 0,5	8743 ± 282
	KrACD	173,5 ± 1,0	17,3 ± 1,0	8484 ± 161
Maść	MrB	202,8 ± 17,0	15,6 ± 0,9	8527 ± 646
	MrBcP	121,0 ± 17,4	12,4 ± 1,3	3405 ± 321
Krem	KrB	258,5 ± 34,0	19,3 ± 1,4	13806 ± 161
	KrBcP	156,7 ± 6,4	15,7 ± 0,2	5927 ± 79

Dla podłoży (MrA i MrB) rejestrowano typowe dla maści reogramy charakteryzujące się znaczną powierzchnią pętli histerezy (ryc. 33 i 34). Podłoża te nieznacznie różnią się przebiegiem krzywych płynięcia. Różnice w strukturze widać wyraźnie w wyznaczonych wartościach tiksotropii: wartości uzyskane dla MrA są około 1,5 razy wyższe od wyznaczonych dla MrB (w podłożu tym CD zastąpiła część wazeliny) (tabela 27). Pomimo różnic w strukturze, podłoża maściowe (MrA i MrB) posiadają podobną wartość lepkości strukturalnej.

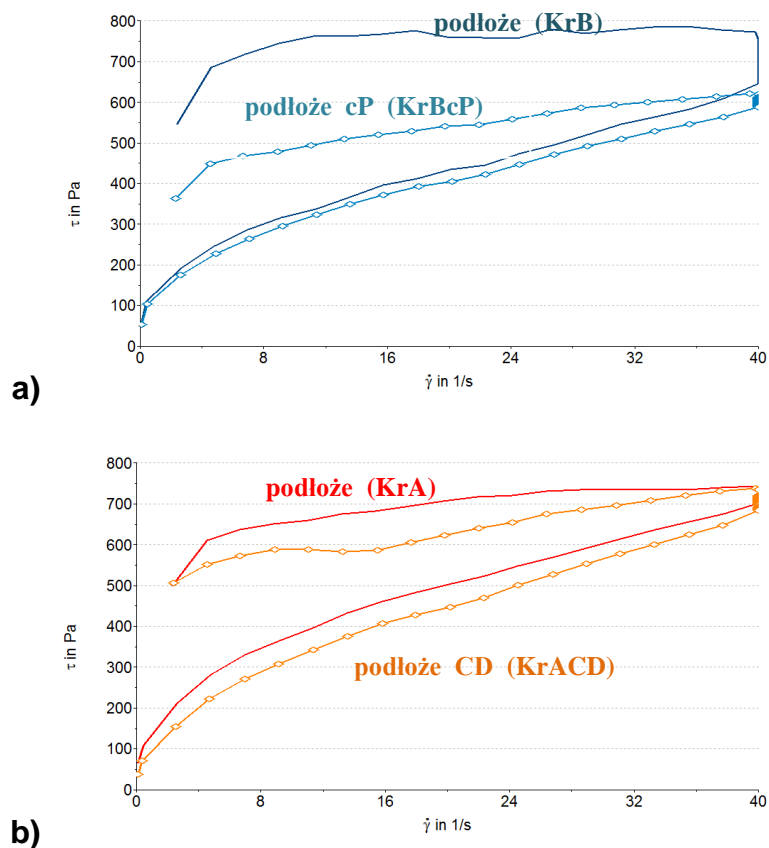
Po inkorporacji cząstek stałych zmianie uległa kinetyka płynięcia. Maści *placebo* (MrACD i MrBcP) posiadały niższą lepkość początkową (wyznaczaną przy niskich prędkościach ścinania – 2,3 s⁻¹) oraz ponad dwukrotnie niższą wartość tiksotropii niż podłoża bez cP lub CD (tabela 27). Większy wpływ na zmianę właściwości reologicznych miał dodatek cP niż β-CD.



Ryc. 33. Wpływ dodatku cP (0,8%) (a) lub CD (10%) (b) na reologię podłoża absorpcyjnego.

Reogramy uzyskane dla podłoży emulsyjnych (KrA i KrB) charakteryzują się znaczną powierzchnią pętli histerezy, a przebieg krzywych płynięcia jest zbliżony do obserwowanego dla maści.

W przeciwieństwie do maści inkorporacja CD do podłoża kremowego nie zmienia struktury preparatu, natomiast wprowadzenie cP wpływa na przebieg krzywej płynięcia. W kremie z cP (KrBcP) wyznaczona wartość tiksotropii jest prawie dwukrotnie niższa od uzyskanej dla podłoża, natomiast krem zawierający CD (KrACD) posiada taką samą wartość tiksotropii co podłoże.



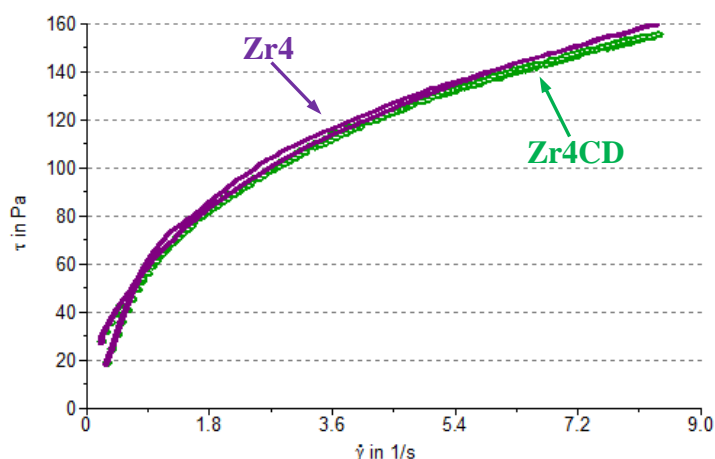
Ryc. 34. Wpływ dodatku (a) - cP lub (b) - CD na reologię podłoża emulsyjnego w/o.

W przypadku żeli oceniono jedynie wpływ dodatku CD na strukturę preparatów i nie badano podłoży z inkorporowanym cP (skład preparatów podano w tabeli 19). Badania reologiczne hydrożeli prowadzono stosując rotor osiowy w kształcie gwiazdy (*Metody, pkt. 7.3.1.*). Ze względu na bardzo dobrą powtarzalność wyników (ryc. 38) badania przeprowadzono dla pojedynczych prób. Reogramy podłoża żelowego oraz podłoża z dodatkiem zawieszonyj CD (10%) przedstawiono na ryc. 35, natomiast wyznaczone wartości lepkości zebrano w tabeli 28.

Tabela 28. Właściwości reologiczne podłoży żelowych oraz preparatu placebo zawierającego CD (10%) ($n = 1$)

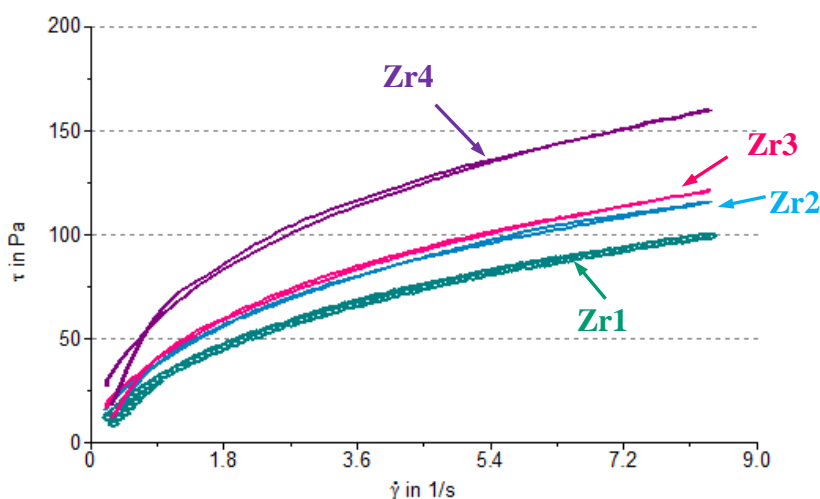
Lepkość [Pa · s]	Szybkość [1/s]	Preparaty				
		Zr1	Zr2	Zr3	Zr4	Zr4CD
	0,5	37,15	46,16	48,41	69,82	72,05
	8,0	12,13	13,88	14,02	18,08	19,01

Brak pętli histerezy pozwala stwierdzić, że badane żele nie posiadają właściwości tiksotropowych. Krzywe płynięcia otrzymane dla żeli Zr4CD i Z4 mają taki sam przebieg, co świadczy o tym, że β -CD dodana do podłoża nie wpływa na strukturę żelu. Również wartość lepkości dynamicznej wyznaczona dla Zr4CD i Z4 jest taka sama (tabela 28).



Ryc. 35. Wpływ dodatku CD (10%) na przebieg krzywej płynięcia żelu zawierającego glikol propylenowy i etanol (Zr4).

Na ryc. 36 i w tabeli 28 przedstawiono wpływ dodatku etanolu i glikolu propylenowego na właściwości reologiczne żeli (Zr1 – Zr4). Najwyższą wartością lepkości charakteryzował się żel zawierający dodatek obu substancji (Zr4), była ona prawie dwukrotnie wyższa od lepkości preparatu odniesienia (Zr1 - bez dodatków). Również żele zawierające w swym składzie glikol bądź etanol charakteryzują się wyższą lepkością od żelu odniesienia.



Ryc. 36. Wpływ składu podłoża na przebieg krzywych płynięcia dla żeli zawierających: 2,2% hydroksyetylocelulozy (Zr1) i etanol (Zr2), glikol propylenowy (Zr3) lub glikol propylenowy i etanol (Zr4).

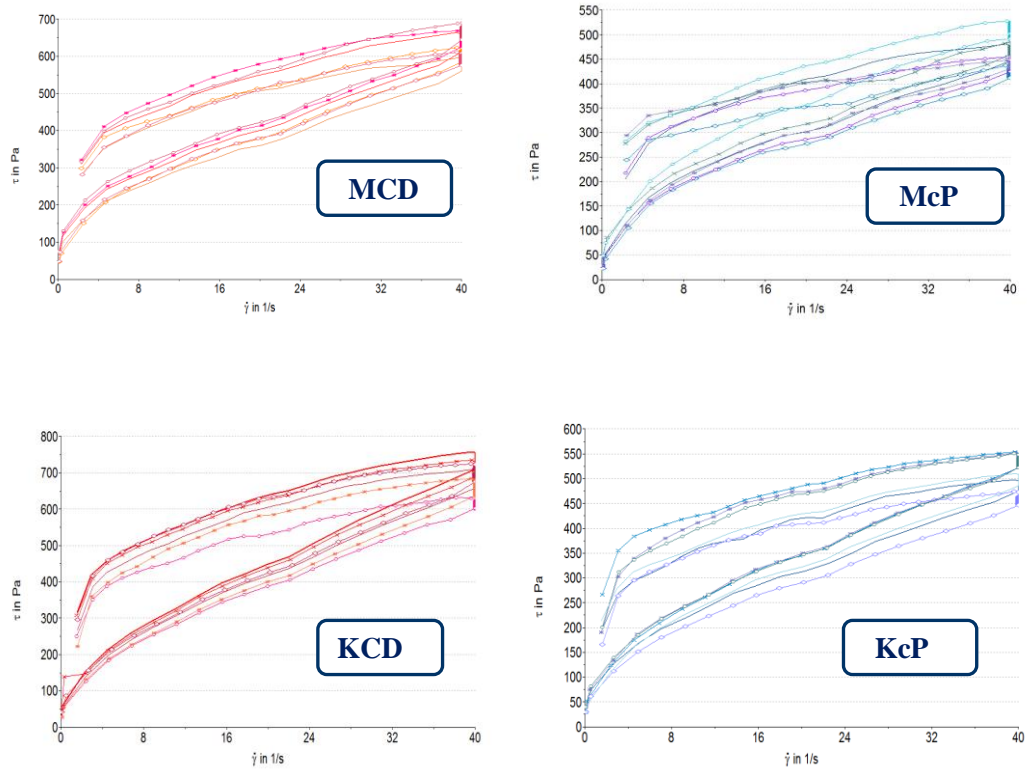
6.1. Powtarzalność metody

Na ryc. 37 przedstawiono krzywe płynięcia uzyskane dla 6 równoległych analiz maści i kremów ($t = 0$), a w tabeli 29 oznaczone wartości lepkości. Uzyskana powtarzalność wyników jest zbliżona zarówno dla maści jak i dla kremów, niezależnie od użytej formy substancji czynnej, co świadczy o tym, że różnica w ilości inkorporowanych stałych cząstek, nie miała wpływu na powtarzalność wyników (10% krystalicznego kompleksu NTG-CD względem 0,8% amorficznego NTG-cP). Otrzymano zadowalającą powtarzalność wyników dla maści oraz kremów z inkorporowaną substancją czynną (NTG-CD i NTG-cP).

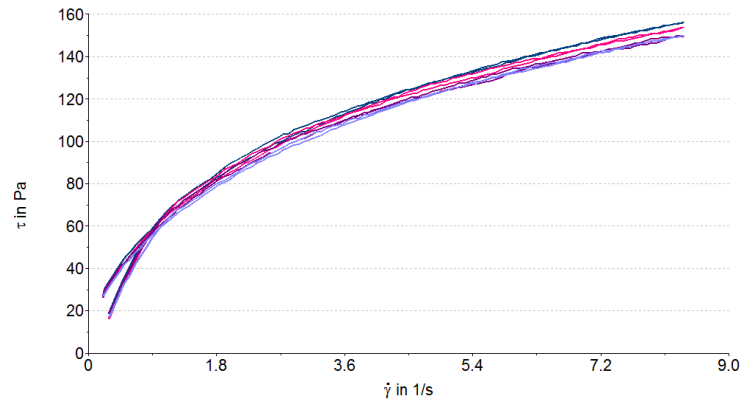
Tabela 29. Wyniki pomiarów lepkości wykonanych w ciągu dwóch dni ($t = 0$) dla kremów KCD i KcP, maści MCD i McP ($n = 6$) oraz żelu placebo Zr4

Preparat	Pomiar płytka-stożek							
	Lepkość [Pa · s]; $\gamma = 2,3$ [1/s]							
	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	SD
MCD	134,7	129,4	90,7	137,7	119,1	118,4	121,7	17,1
McP	89,3	102,3	94,6	123,5	120,3	122,6	108,8	15,3
KCD	140,9	114,5	133,2	135,5	125,9	120,5	128,4	9,9
KcP	87,3	115,7	85,6	98,6	99,12	93,16	96,6	10,9
	Lepkość [Pa · s]; $\gamma = 40,0$ [1/s]							
MCD	16,5	15,6	16,7	17,2	15,0	15,2	16,0	0,9
McP	13,1	10,9	11,2	11,0	12,1	13,1	11,9	1,0
KCD	18,1	15,7	18,2	18,0	17,6	17,0	17,4	1,0
KcP	12,7	13,7	11,8	13,7	13,7	12,7	13,1	0,8
Preparat	Pomiar cylinder							
	Lepkość [Pa · s]; $\gamma = 0,5$ [1/s]							
Zr4	66,4	67,5	64,2	61,9	63,0	69,8	65,5	3,0
	Lepkość [Pa · s]; $\gamma = 8,0$ [1/s]							
Zr4	17,6	18,6	17,6	17,4	16,7	18,7	17,8	0,8

Na ryc. 38 przedstawiono krzywe płynięcia uzyskane dla 4 równoległych pomiarów żelu Zr4. Zastosowana metoda charakteryzowała się dobrą powtarzalnością uzyskanych wyników.



Ryc. 37. Uzyskane w ciągu dwóch dni krzywe płynięcia kremów KCD i KcP i maści MCD i McP $t = 0$ ($n = 6$).



Ryc. 38. Uzyskane w ciągu dwóch dni krzywe płynięcia żelu Zr4 ($n = 4$).

7. BADANIA TRWAŁOŚCI

Badania trwałości prowadzono dla maści i kremów zawierających NTG (0,2%) w formie rozcierki lub w formie kompleksu inkluzyjnego. Próbki przechowywano przez okres 12 miesięcy w warunkach testu długoterminowego (temp. 25°C oraz 4°C), a także w warunkach testu przyspieszonego starzenia (*Metody, pkt. 7.8.*). Preparaty analizowano zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 21.

7.1. Obserwacje makroskopowe

W tabeli 30 przedstawiono wyniki obserwacji makroskopowych maści i kremów (*Metody, pkt 7.4.*) przechowywanych przez okres 12 miesięcy w różnych warunkach temperatury.

Konsystencja badanych maści oraz kremów zawierających NTG-CD lub NTG-cP po 12 miesiącach nie ulegała zmianie. Preparaty były miękkie, łatwo ulegały rozsmarowaniu. Jedynie w maściach przechowywanych w temp. 40°C, obserwowano niewielkie zmiany - doszło do wyolejenia składników ciekłych na obrzeżach powierzchni preparatu w opakowaniach (nie ujęto tych obserwacji w tabeli). Zmiany te były bardziej widoczne w preparatach zawierających NTG w formie rozcierki.

W temp. 40°C obserwowano zmianę barwy preparatów. W przypadku maści żółknięcie pojawiło się już po 1 miesiącu. Zmiana zabarwienia pogłębiała się w czasie, przy czym zmiana barwy była wyraźniejsza w preparatach zawierających NTG-cP. Po 12 miesiącach przechowywania maści z NTG-cP były ciemnożółte, natomiast maści z NTG-CD pozostawały jedynie lekko beżowe. W przypadku kremów zmiana barwy pojawiała się dopiero po 6 miesiącach przechowywania (40°C) i była niewielka. W temperaturze pokojowej zmiana barwy następuje tylko w preparatach z NTG-cP, przy czym szybciej i intensywniej w maści niż w kremie. Na ryc. 39 i 40 przedstawiono zdjęcia wybranych preparatów obrazujące zmiany zabarwienia.

Tabela 30. Wyniki obserwacji makroskopowej maści i kremów zawierających NTG-cP i NTG-CD przechowywanych w czasie do 12 m-cy

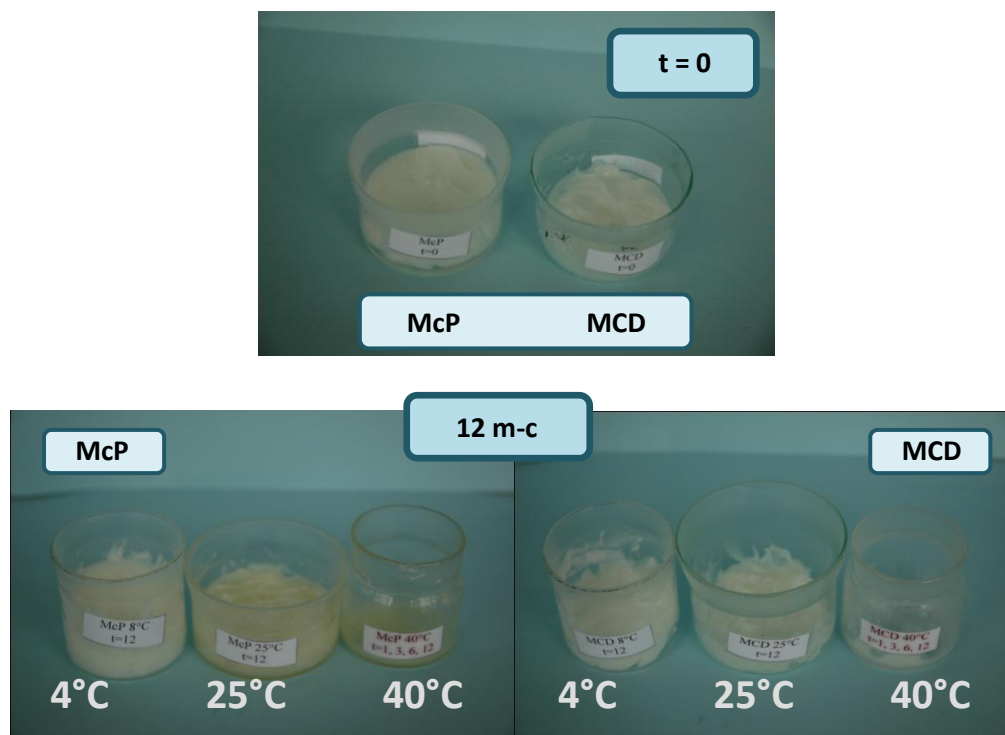
Preparat	Temp.	Kolor (żółknięcie)				Zapach (intensywność)				Konsystencja (jednorodność)			
		1 m-c	3 m-c	6 m-c	12 m-c	1 m-c	3 m-c	6 m-c	12 m-c	1 m-c	3 m-c	6 m-c	12 m-c
KCD	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	↑	↑↑	↑↑	↑↑	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	25°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	40°C	b.z.	b.z.	b.z. ⁺	b.z. ⁺	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
KcP	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	25°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z. ⁺	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	40°C	b.z.	b.z.	b.z. ⁺	b.z. ⁺	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
MCD	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	25°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	40°C	b.z. ⁺	b.z. ⁺	b.z. ⁺	b.z. ⁺	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
McP	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z. ⁺	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	25°C	b.z. ⁺	+	++	++	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
	40°C	+	++	+++	++++	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.

b.z. – brak zmian

b.z.⁺ - niewielka różnica w stosunku do stanu początkowego, nie wpływająca w sposób istotny na jakość preparatu

+ - widoczna zmiana zabarwienia (++ - intensywna, +++ - bardzo intensywna)

↑- intensywność zapachu – (↑↑- intensywny, ↑↑↑ - bardzo intensywny)

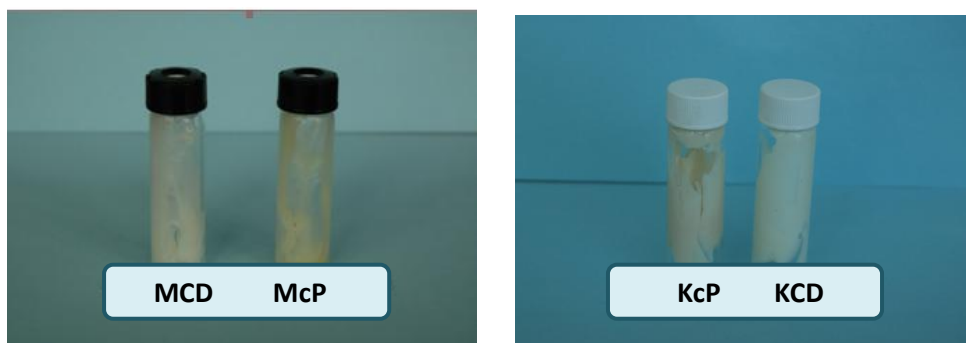


Ryc. 39. Wygląd maści zawierających NTG-CD lub NTG-cP - bezpośrednio po wykonaniu oraz przechowywanych przez 12 m-cy (bez dostępu światła).



Ryc. 40. Wygląd kremów zawierających NTG-CD lub NTG-cP - bezpośrednio po wykonaniu oraz przechowywanych przez 12 m-cy (bez dostępu światła).

Dodatkowo porównano zmianę zabarwienia maści i kremów eksponowanych na światło słoneczne przez okres 1 miesiąca. Zdjęcia preparatów po okresie obserwacji przedstawiono na ryc. 41. W maści zawierającej NTG-CD dochodziło do nieznacznej zmiany barwy (lekkie żółknięcie) w porównaniu ze stanem początkowym, natomiast maść zawierająca NTG-cP żółkła znacznie. W kremach również dochodzi do istotnej zmiany barwy, przy czym była ona intensywniejsza w preparacie z NTG-cP.



Ryc. 41. Wygląd maści i kremów przechowywanych w warunkach pełnej ekspozycji na światło słoneczne (1 m-c).

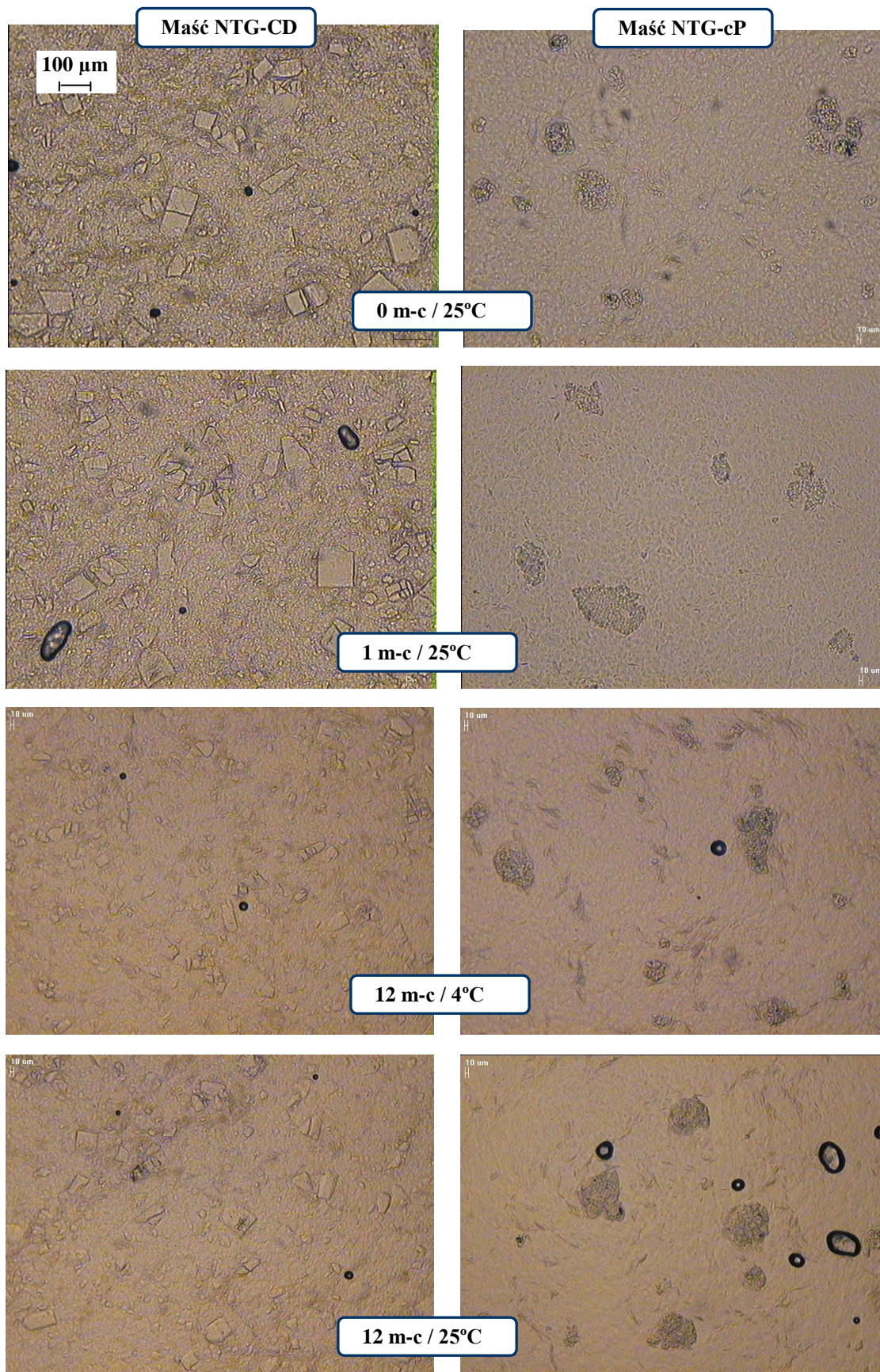
W kremach zawierających NTG-CD powstawał specyficzny, nieprzyjemny zapach, a w trakcie przechowywania preparatów dochodziło do intensyfikacji przykrej woni (tabela 31). Zjawisko to nie występowało w preparatach z NTG-cP. Maści bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania pozostają bezzapachowe, niezależnie od użytej formy substancji czynnej.

7.2. Obserwacje mikroskopowe

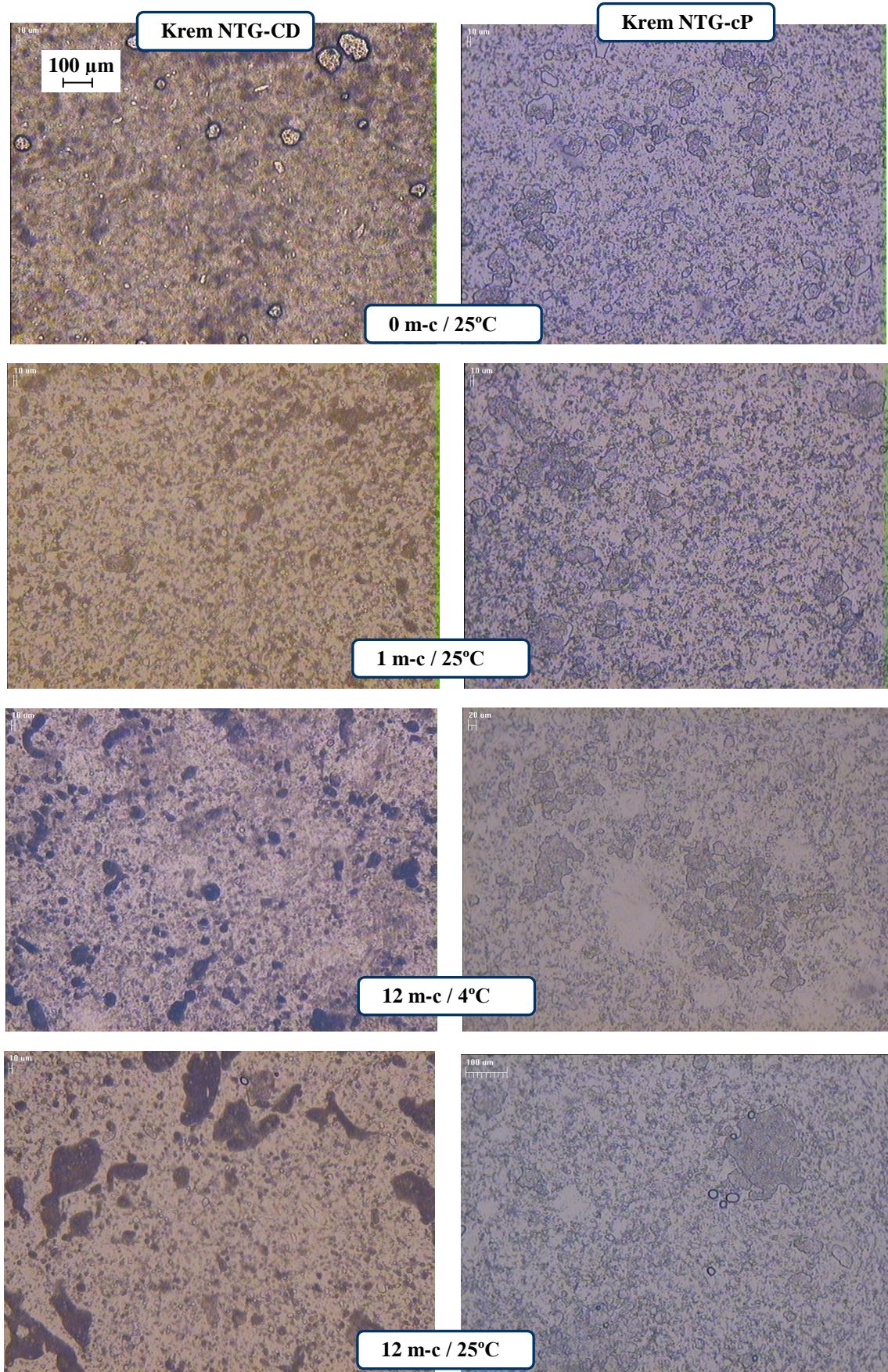
Obrazy mikroskopowe maści oraz kremów zawierających NTG w formie kompleksu lub rozcierki wykonane bezpośrednio po sporządzaniu preparatów oraz w trakcie 12 miesięcy przechowywania przedstawiono na ryc. 42 i 43.

NTG-cP występuje w preparatach w formie amorficznych cząstek, wyglądem nie różniących się od substancji użytej do wykonania preparatów. Cząstki krospowidonu mogą tworzyć skupiska (aglomeraty) o wielkości nawet do 350 μm . W czasie 12 miesięcy przechowywania, zarówno w maściach jak i kremach wykonanych z NTG-cP nie obserwowano żadnych zmian.

Kompleks NTG-CD w maści występuje w postaci kryształów o regularnych kształtach (długości do 120 μm) i wyglądzie identycznym z formą stałą, natomiast w kremie z NTG-CD zauważono brak charakterystycznych regularnych kryształów. Już bezpośrednio po wykonaniu obserwowano jedynie cząstki sferyczne, o nierównej krawędzi i wielkości wynoszącej do 60 μm . W obrazie kremu z NTG-CD dodatkowo obserwowano ciemne obszary („plamy”) występujące w podłożu emulsyjnym (ryc. 43).



Ryc. 42. Zdjęcia mikroskopowe maści MCD i McP wykonane bezpośrednio po sporządzeniu ($t=0$) oraz po upływie 1 m-c lub 12 m-cy.



Ryc. 43. Zdjęcia mikroskopowe kremów KCD i KcP wykonane bezpośrednio po sporządzeniu ($t = 0$) oraz po upływie 1 m-c lub 12 m-cy.

W maściach zawierających NTG-CD obraz mikroskopowy preparatu nie zmieniał się, natomiast w kremach z NTG-CD już po 1 miesiącu przechowywania w temp. pokojowej nie obserwowano większych kryształów, a widoczne są jedynie cząstki o wielkości do 30 μm . Zmiany w obrazie mikroskopowym zachodzą również w przypadku preparatów przechowywanych w temp. 4°C.

7.3. Pomiar wielkości cząstek

Wyznaczono wielkość cząstek w maściach i kremach zawierających NTG-CD (kryształy) i NTG-cP (cząstki amorficzne) w czasie do 12 miesięcy przechowywania (*Metody, pkt. 7.5.*). We wszystkich próbkach określono procentowy udział cząstek w przedziałach wielkości: 10 – 30 μm , 30 – 60 μm , 60 – 90 μm , > 90 μm . Ze względu na zachodzące zmiany ilościowe w tabeli 31 przedstawiono liczbę wszystkich zmierzonych cząstek CD w kremach.

Zarówno w maściach jak i kremach zawierających rozcierkę NTG-cP nie obserwowano znaczących zmian ilościowych mierzonych cząstek i ich aglomeratów, co może być już zauważone podczas obserwacji jakościowych (ryc. 42 i 43). Najwięcej było cząstek średniej wielkości (30 – 60 μm) – od 40 do 50%, natomiast cząstki duże > 90 μm stanowiły do 20%.

Tabela 31. *Zmiana wielkości i liczby cząstek w w maściach i kremach zawierających kompleks NTG-CD*

Wielkość [μm]	Liczba cząstek					
	Maści		Kremy			
	MCD/t=0	MCD/t=12	KCD/t=0	KCD/t=1	KCD/t=3	KCD/t=12
10 - 30	280	262	138	161	56	57
30 - 60	80	117	33	8	2	3
60 – 90	18	33	3	0	0	0
> 90	4	7	0	0	0	0
suma	382	419	174	169	58	60

W kremach zawierających NTG-CD bezpośrednio po wykonaniu nie obserwuje się cząstek dużych (> 90 μm), które obecne są w niewielkiej ilości w maściach.

W czasie 12 miesięcy przechowywania (temp. 25°C oraz 4°C) w maści NTG-CD nie zmienia się istotnie całkowita ilość mierzonych cząstek oraz udział procentowy cząstek poszczególnej wielkości. Najwięcej było cząstek małych (10 – 30 µm) – od 50 do 70%, natomiast cząstki duże > 90 µm stanowiły do 2,0% badanych kryształów.

W kremach zawierających kompleks NTG-CD obserwowano zmiany ilościowe i jakościowe mierzonych cząstek, które potwierdzają opisane powyżej obserwacje obrazów mikroskopowych (ryc. 43). Już w czasie 1 miesiąca w obrazie brak jest dużych kryształów (brak cząstek > 60 µm, trzykrotnie maleje liczba cząstek o wielkości 30 – 60 µm). Po 3 miesiącach przechowywania trzykrotnie maleje całkowita ilość zawieszonych cząstek, lecz w czasie dalszego przechowywania kolejne zmiany nie występowały.

7.4. Pomiar pH

W tabeli 32 przedstawiono wyniki pomiaru pH fazy wodnej kremów wykonane w czasie do 12 miesięcy przechowywania (*Metody, pkt. 7.7.*).

Bezpośrednio po wykonaniu w kremach zawierających NTG-CD i NTG-cP wartość pH jest podobna i wynosi odpowiednio: 5,1 i 5,6. Badane preparaty charakteryzowały się pH zbliżonym do pH fizjologicznego ludzkiej skóry (pH 5,5).

Tabela 32. Wartość pH fazy wodnej kremów przechowywanych w czasie do 12 m-cy (n=2)

Czas	KCD		KcP	
	25°C	4°C	25°C	4°C
0 m-c	5,15	5,15	5,56	5,56
12 m-c	4,53	4,57	5,47	5,57

W trakcie przechowywania w kremach zawierających NTG-CD i NTG-cP temperatura (4°C i 25°C) nie wpływa na zmianę pH. Jedynie w preparacie z NTG-CD po 12 miesiącach dochodzi do niewielkiego obniżenia (ok. 0,5 jednostki) pH.

7.5. Zawartość NTG

Wyniki badania zawartości NTG (*Metody, pkt. 7.6.*) w maściach i kremach przedstawiono w tabeli 33. Bezpośrednio po wykonaniu preparatów zawartość NTG

mieściła się w zakresie od 0,186 do 0,197%. W stosunku do zawartości deklarowanej oznaczano więc 97,5 i 93%, odpowiednio dla MCD i McP oraz 98,5 i 93% NTG, odpowiednio dla KCD i KcP.

Tabela 33. Zawartość NTG w maściach i kremach podczas przechowywania do 12 m-cy ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$)

Czas/temp.		Zawartość [mg/100 g]			
		MCD	McP	KCD	KcP
0 m-c	25°C	1,95 ± 0,02	1,86 ± 0,04	1,97 ± 0,05	1,86 ± 0,02
Czas/temp.		Zawartość [% ± sd]			
		MCD	McP	KCD	KcP
1 m-c	25°C	95,4 ± 2,6	103,7 ± 0,5	92,9 ± 3,3	98,9 ± 2,7
	40°C	102,5 ± 7,0	102,1 ± 1,6	95,4 ± 4,8	100,5 ± 6,9
3 m-c	4°C	96,4 ± 3,7	100,5 ± 4,8	110,2 ± 0,9	117,2 ± 8,7
	25°C	101,0 ± 5,0	100,5 ± 3,7	99,5 ± 2,0	100,5 ± 3,2
	40°C	102,5 ± 7,0	110,2 ± 14,6	104,5 ± 7,7	105,9 ± 6,0
6 m-c	4°C	105,1 ± 6,8	104,8 ± 1,5	103,5 ± 0,5	98,4 ± 7,6
	25°C	107,6 ± 6,2	102,6 ± 1,0	102,0 ± 0,5	103,2 ± 2,6
	40°C	96,4 ± 5,8	99,4 ± 1,6	95,9 ± 1,0	106,4 ± 2,5
12 m-c	4°C	107,7 ± 2,8	117,7 ± 2,7	106,0 ± 2,4	112,4 ± 2,4
	25°C	103,6 ± 3,5	111,29 ± 0,5	103,5 ± 3,9	111,3 ± 1,9
	40°C	92,3 ± 5,0	85,5 ± 5,6	81,2 ± 4,3	81,7 ± 3,3

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że NTG w formie kompleksu i rozcierki, zarówno w podłożu absorpcyjnym jak i kremie, jest trwała chemicznie. W żadnym z badanych układów nie wykazano znaczącego spadku zawartości NTG (< 5%) w czasie 12 miesięcy przechowywania w temp. 4°C i 25°C oraz w czasie do 6 miesięcy w temp. 40°C. Po 12 miesiącach przechowywania w temp. 40°C tylko preparat MCD, posiada ponad 90% zawartości początkowej NTG, natomiast w preparatach: McP, KcP i KCD, dochodzi do obniżenia zawartości NTG do 80%. Istotny jest brak różnic pomiędzy kremem zawierającym NTG-CD i NTG-cP.

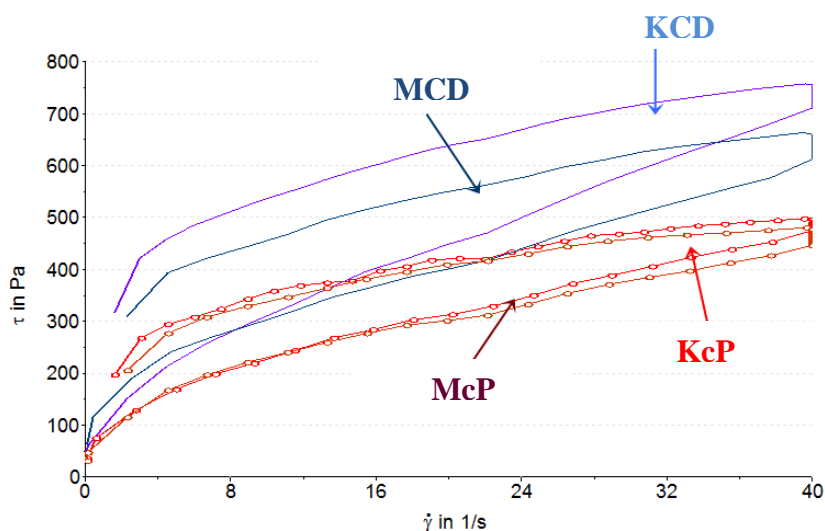
Należy zauważyć, że w preparatach zawierających NTG-cP, analizowanych po 12 miesiącach, oznaczona ilość NTG była znacznie wyższa (ponad 10%) od wartości początkowej. Nie wykryto przyczyny tego zjawiska.

7.6. Reologia

Badania reologiczne dla maści (kremu w/o i maści absorpcyjnej) prowadzono stosując układ pomiarowy płytka–stożek (*Metody, pkt. 7.3.*).

Krzywe płynięcia formulacji KCD, KcP, MCD i McP obserwowane bezpośrednio po sporządzeniu przedstawiono na ryc. 44. Badane preparaty charakteryzowały się znacznymi właściwościami tiksotropowymi, o czym świadczą pętle histerezy widoczne na reogramach.

W przypadku obu form substancji czynnej (NTG-CD i NTG-cP), maści i kremy bezpośrednio po wykonaniu, charakteryzują się podobnym przebiegiem krzywych płynięcia oraz zbliżoną wartością lepkości (*tabela 35 i 36*). Widoczne w przypadku NTG-CD niewielkie różnice w strukturze pomiędzy kremem i bezwodną maścią są nieistotne, biorąc pod uwagę wyznaczoną dokładność pomiarów (*Wyniki, ryc. 37 i tabela 29*).



Ryc. 44. Reogramy maści i kremów zawierających NTG-CD lub NTG-cP ($t=0$).

Nie obserwowano więc różnic w parametrach reologicznych związanych z zastosowanym podłożem (maść czy krem - 20% wody), natomiast rodzaj użytej substancji (NTG-cP - 0,8% fazy stałej lub NTG-CD - 10%) miał na nie wpływ. Lepkość oraz wartość

tiksotropii wyznaczone dla preparatów z NTG-CD były około 30% większa od wartości uzyskanych dla preparatów z NTG-cP.

W tabelach 34 i 35 przedstawiono wyznaczone wartości parametrów reologicznych maści i kremów w czasie ich przechowywania (do 12 m-cy). Prezentowane dane nie uwzględniają wyników uzyskanych dla kremów po 3 miesiącach przechowywania, gdyż odbiegały one znacząco od pozostałych rezultatów. Ze względu na fakt, iż tylko te pomiary wykonywano w miesiącach letnich, uznano, że różnica jest wynikiem niewłaściwych temperaturowych warunków badania.

Tabela 34. Parametry reologiczne kremów: lepkość dynamiczna (η), płynięcie (Pt) i tiksotropia wyznaczone w czasie do 12 m-cy przechowywania ($\bar{x} \pm SD, n \geq 5$)

Preparat	Czas/temp.		η [Pa · s]		Tiksotropia [Pa/s]	Płynięcie - Pt [Pa/s]
			2,3 [1/s]	20 [1/s]		
KCD	0 m-c	25°C	128,4 ± 9,9	29,5 ± 2,0	7682,7 ± 642,6	22500,0 ± 1438,1
		25°C	165,9 ± 34,1	35,5 ± 4,3	8372,5 ± 756,5	26091,7 ± 3033,4
	12 m-c	4°C	173,7 ± 44,4	36,3 ± 1,5	9292,0 ± 983,2	26626,7 ± 1078,1
		25°C	125,8 ± 16,8	29,6 ± 1,7	7203,8 ± 275,8	21735,0 ± 1288,7
KcP	0 m-c	25°	96,6 ± 10,9	18,5 ± 7,7	5156,2 ± 559,4	16716,7 ± 1241,6
		25°C	125,7 ± 13,0	27,3 ± 1,0	6743,8 ± 274,5	17205,0 ± 7280,2
	12 m-c	4°C	154,5 ± 10,5	28,4 ± 1,6	7751,0 ± 434,6	21147,1 ± 805,0
		25°C	133,1 ± 15,8	26,5 ± 2,0	6546,8 ± 475,4	19383,3 ± 1516,0

Z powodu logarytmicznego przebiegu krzywej lepkości w początkowym odcinku, lepkość strukturalna wyznaczana przy niskiej prędkości ścinania (ok. 2 s^{-1}) charakteryzuje się dość dużym odchyleniem wynoszącym nawet do 20% ($n = 6$), natomiast dla prędkości wyższych przebieg krzywej lepkości jest liniowy ($20 - 40 \text{ s}^{-1}$), a odchylenie nie przekracza 10%.

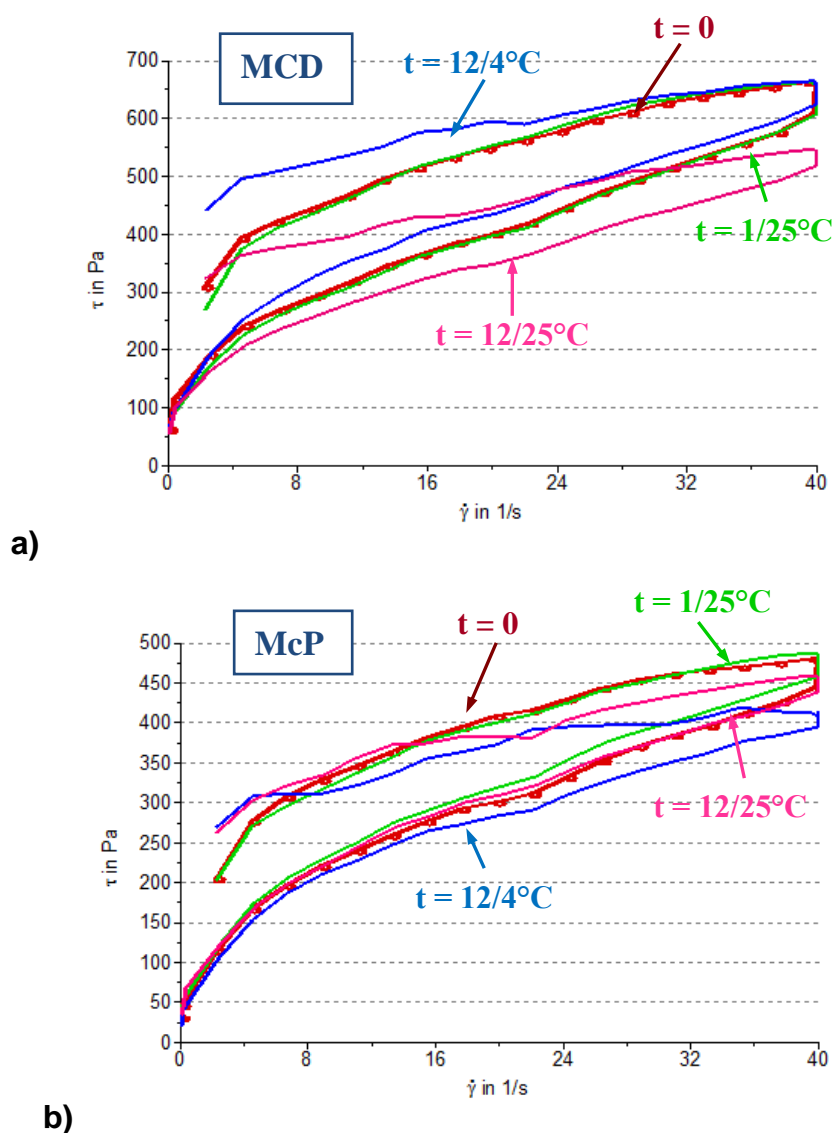
Tabela 35. Parametry reologiczne maści: lepkość dynamiczna (η), płynięcie (Pt) i tiksotropia wyznaczone w czasie do 12 m-cy przechowywania ($\bar{x} \pm SD, n \geq 5$)

Preparat	Czas/temp.		η [Pa · s]		Tiksotropia [Pa/s]	Płynięcie - Pt [Pa/s]
			2,3 [1/s]	20 [1/s]		
MCD	0 m-c	25°C	129,8 ± 9,2	27,1 ± 1,5	5747,2 ± 375,4	19898,3 ± 1139,1
		25°C	126,6 ± 22,2	27,4 ± 1,9	6025,0 ± 455,9	20153,3 ± 1437,2
	3 m-c	4°C	162,5 ± 28,3	32,0 ± 2,4	6664,4 ± 1206,4	23820,0 ± 1375,5
		25°C	143,9 ± 17,7	28,9 ± 0,9	6300,2 ± 433,7	21148,0 ± 658,5
	12 m-c	4°C	188,0 ± 25,4	28,7 ± 2,2	6474,8 ± 457,1	21523,3 ± 1365,6
		25°C	149,7 ± 10,1	23,5 ± 2,5	5111,5 ± 880,9	17796,7 ± 1711,2
McP	0 m-c	25°C	108,8 ± 15,3	20,1 ± 1,4	3884,5 ± 395,3	14766,7 ± 939,5
		25°C	88,7 ± 9,6	22,1 ± 12,4	2755,6 ± 1337,4	14154,0 ± 690,0
	3 m-c	4°C	134,4 ± 12,1	26,1 ± 1,2	3235,0 ± 1109,9	15540,0 ± 7692,4
		25°C	108,9 ± 15,8	20,0 ± 0,7	2919,2 ± 463,9	15140,0 ± 527,3
	12 m-c	4°C	133,0 ± 18,5	19,4 ± 0,5	4425,8 ± 386,2	14371,7 ± 547,2
		25°C	102,0 ± 16,2	18,0 ± 1,3	3401,0 ± 221,6	13478,0 ± 968,9

Zmiany parametrów reologicznych były zależne od temperatury przechowywania, zarówno w przypadku maści jak i kremów. We wszystkich próbkach przechowywanych w temp. 4°C dochodzi do wzrostu wyznaczanych parametrów, przy czym zmiany w KCD są niewielkie, natomiast w KcP wzrost jest znaczny (około 1,5 x większa lepkość i tiksotropia). W kremach z NTG-cP nawet w temperaturze pokojowej obserwowano wzrost lepkości i tiksotropii (po 12 m-cy), podczas gdy parametry te nie ulegały zmianie zarówno

w kremie z CD jak i maściach zawierających obie formy substancji czynnej (NTG-CD oraz NTG-cP).

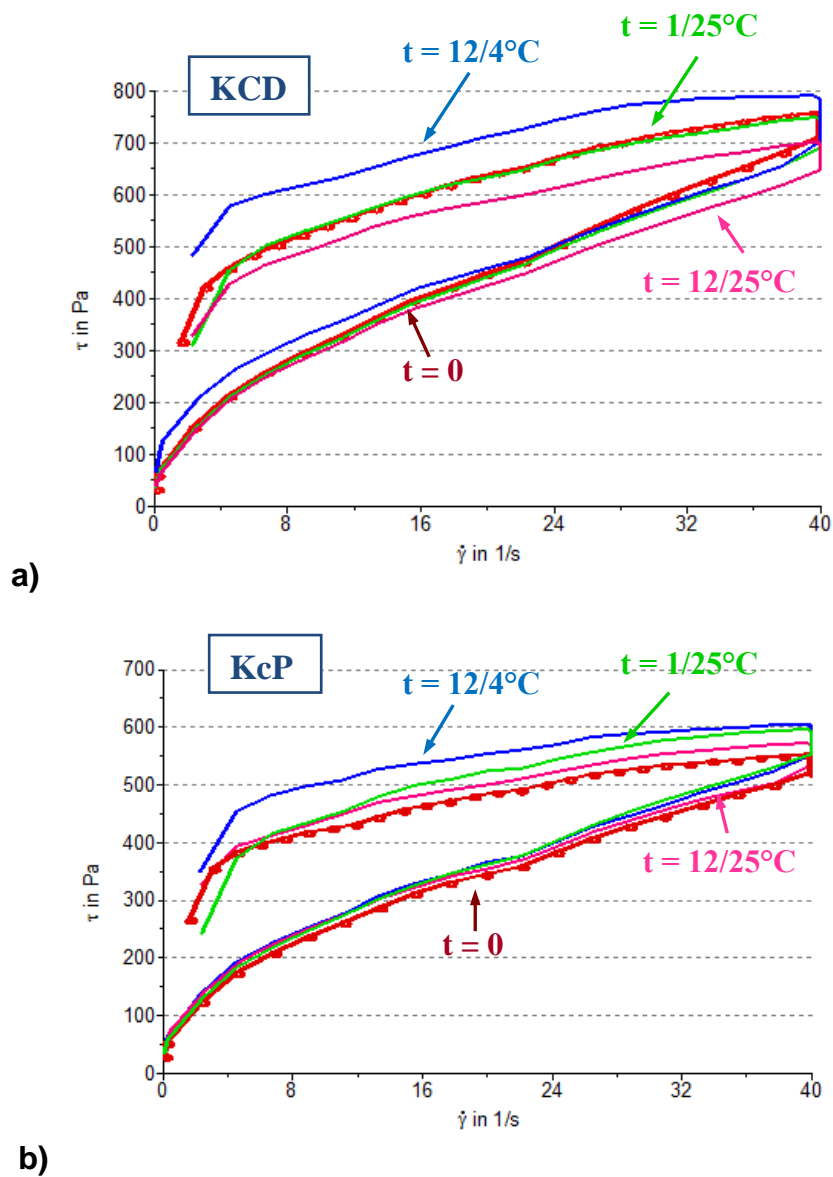
Parametr Pt (pole powierzchni pod wstępującą krzywą płynięcia) opisujący strukturę preparatów, niezależnie od temperatury przechowywania, nie zmienia się istotnie w czasie w badanych maściach (MCD i McP), natomiast w kremie KcP widoczny jest pewien wzrost tej wartości jednakże jest on niewielki. Wpływ przechowywania na zmiany struktury preparatów obrazują również reogramy przedstawione na na ryc. 45 i 46.



Ryc. 45. Reogramy maści zawierających NTG-CD (a) lub NTG-cP (b) wykonane po sporządzeniu ($t=0$) oraz po 1m-cu i 12 m-cach przechowywania (4°C lub 25°C).

Struktura maści w trakcie przechowywania (12 m-cy), niezależnie od temperatury (4°C i 25°C) była stabilna. Jedynie w przypadku MCD przechowywanej przez 12 miesięcy w 25°C dochodzi do zmiany w kinetyce płynięcia (osłabienie struktury) lecz jednocześnie nie obserwowano zmian lepkości tej próby.

W kremach z NTG-cP w czasie 12 miesięcy nie dochodzi do zmian w kinetyce płynięcia niezależnie od temperatury przechowywania. Obserwowane w czasie przechowywania niewielkie różnice w przebiegu krzywych płynięcia kremu z NTG-CD, biorąc pod uwagę wyznaczoną dokładność pomiarów (Wyniki, ryc. 37), można uznać za nieistotne.



Ryc. 46. Reogramy kremów zawierających NTG-CD (a) lub NTG-cP (b) wykonane po sporządzeniu ($t=0$) oraz po 1 m-cu i 12 m-cach przechowywania (4°C lub 25°C).

Biorąc pod uwagę powtarzalność pomiarów reologicznych oraz fakt, że farmakopea za istotne przyjmuje jedynie znaczące różnice we właściwościach reologicznych, można stwierdzić, że badane maści i kremy posiadają stabilną strukturę wewnętrzną.

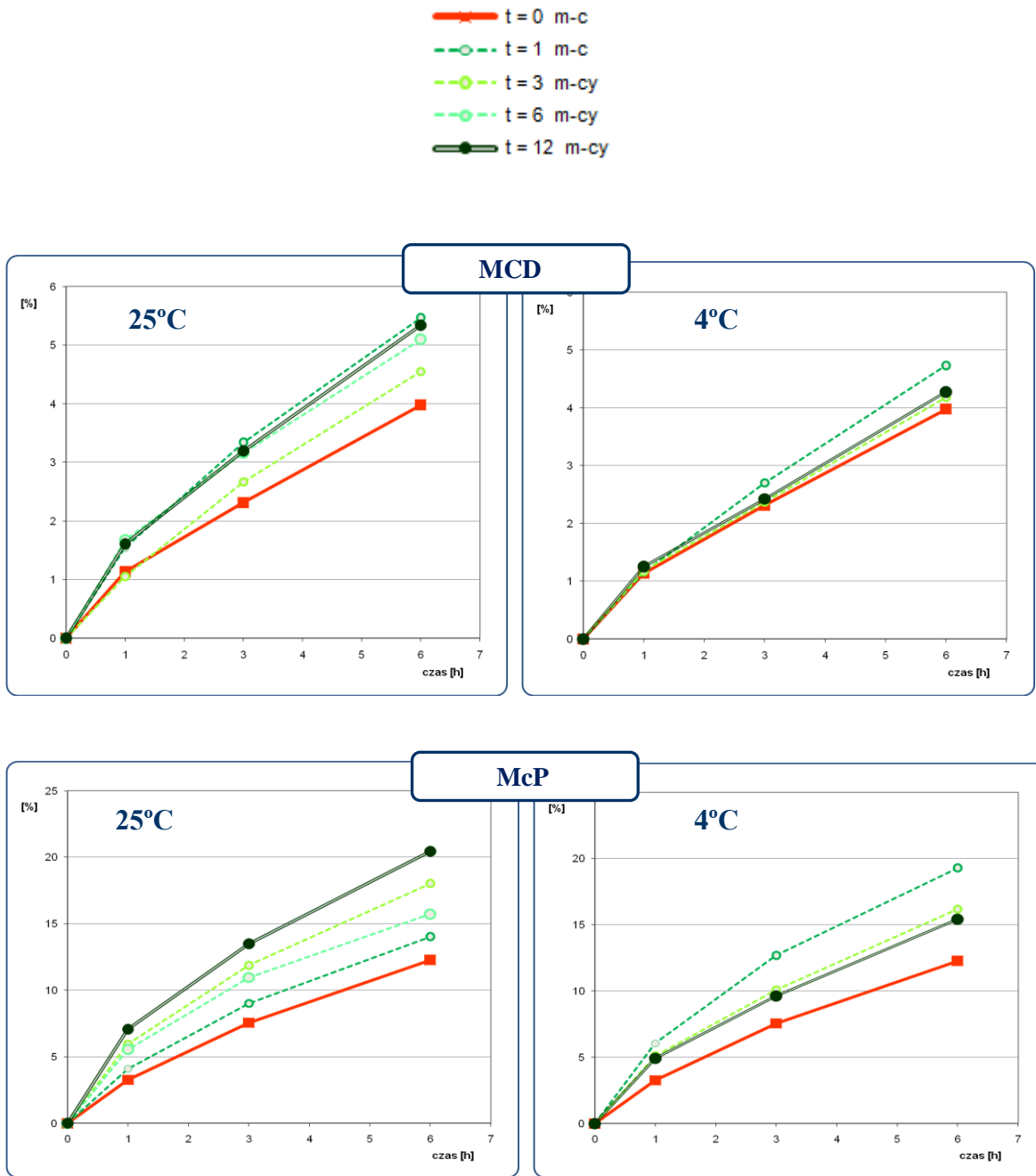
7.7. Uwalnianie

Badanie kinetyki uwalniania NTG z maści i kremów prowadzono przez okres 12 miesięcy stosując komorę ekstrakcyjną typu VanKel (*Metody, pkt. 7.2.1.*). Ilość uwolnionej NTG wyrażona jako % dawki całkowitej (po 1, 3 i 6 h badania). Uzyskane wyniki podano w tabeli 36.

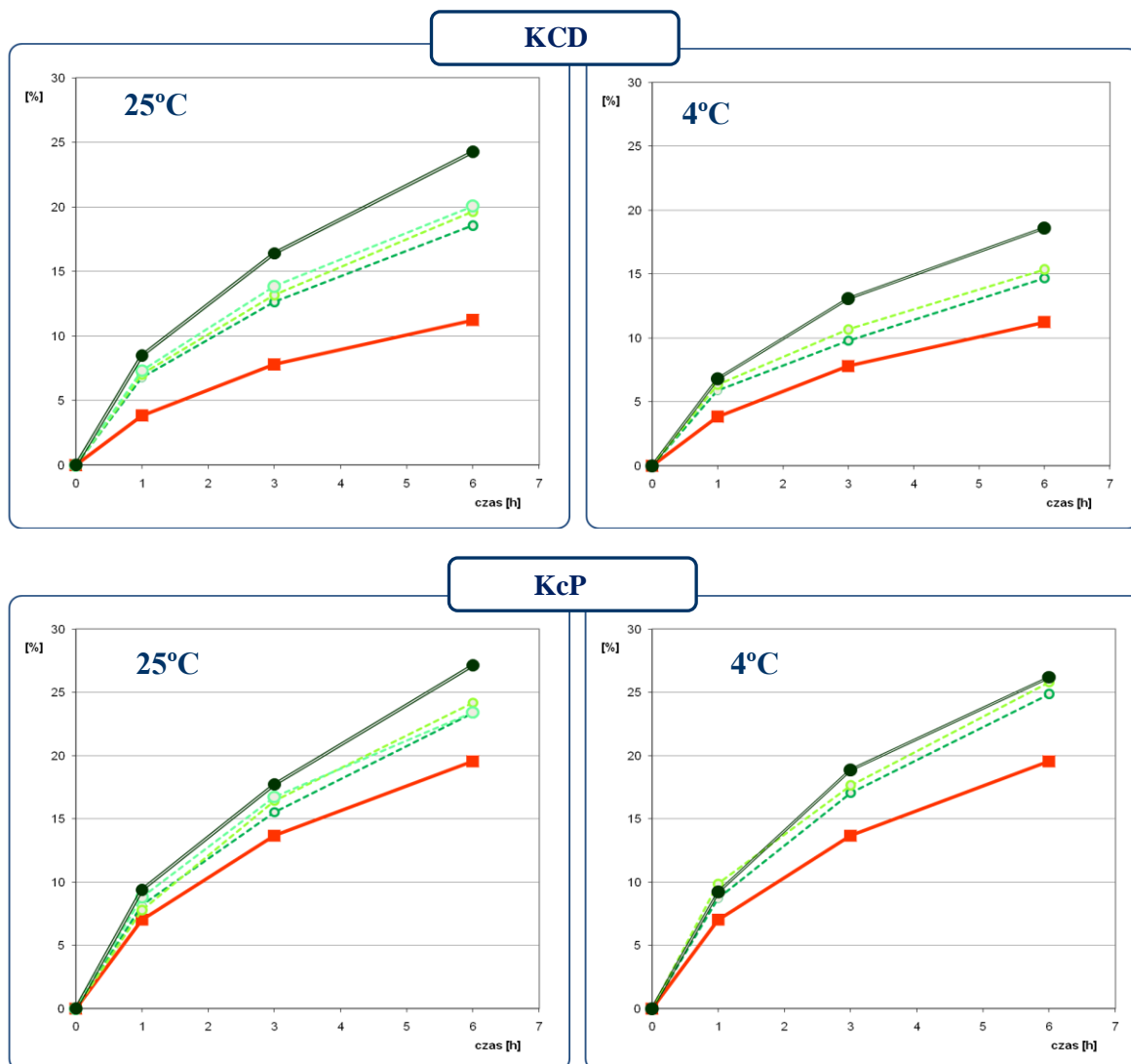
Na ryc. 47 i 48 przedstawiono profile uwalniania NTG z maści i kremów uzyskane w zależności od rodzaju użytej formy NTG i czasu przechowywania preparatów.

Tabela 36. Uwalnianie NTG (% dawki całkowitej po 1, 3 i 6 h) z kremów i maści przechowywanych do 12 m-cy
w temp. 4°C i 25°C ($\bar{x} \pm SD$, n = 6)

Czas/temp.		MCD			McP			KCD			KcP		
		1h	3h	6h	1h	3h	6h	1h	3h	6h	1h	3h	6h
0 m-c		1,14 ± 0,15	2,31 ± 0,41	3,98 ± 0,91	3,26 ± 0,92	7,56 ± 1,61	12,28 ± 2,33	3,83 ± 0,31	7,80 ± 1,26	11,23 ± 0,88	7,03 ± 0,65	13,67 ± 1,46	19,55 ± 1,24
1 m-c	25°C	1,54 ± 0,50	3,34 ± 1,23	5,47 ± 1,89	4,09 ± 0,29	9,01 ± 0,82	14,04 ± 1,07	6,77 ± 0,74	12,63 ± 0,96	18,55 ± 1,47	8,16 ± 0,82	15,52 ± 1,33	23,35 ± 96
3 m-c	25°C	1,05 ± 0,16	2,67 ± 0,37	4,55 ± 0,75	5,95 ± 0,42	11,88 ± 1,03	18,03 ± 2,07	7,03 ± 2,07	13,18 ± 1,47	19,63 ± 2,06	7,78 ± 1,77	16,44 ± 1,47	24,17 ± 2,47
	4°C	1,15 ± 0,18	2,70 ± 0,38	4,73 ± 0,96	6,05 ± 0,57	12,70 ± 1,42	19,30 ± 1,57	5,89 ± 1,58	9,78 ± 2,08	14,67 ± 1,90	8,72 ± 1,04	17,05 ± 1,79	24,87 ± 2,49
6 m-c	25°C	1,67 ± 0,44	3,16 ± 0,36	5,10 ± 0,38	5,55 ± 0,42	10,96 ± 0,85	15,72 ± 1,14	7,32 ± 0,79	13,85 ± 1,05	20,06 ± 1,49	8,81 ± 1,22	16,74 ± 2,66	23,41 ± 2,58
	4°C	1,17 ± 0,14	2,37 ± 0,22	4,18 ± 0,40	4,91 ± 0,89	9,63 ± 0,64	15,43 ± 0,46	6,33 ± 0,87	10,66 ± 0,65	15,36 ± 0,98	9,86 ± 1,37	17,65 ± 1,43	25,80 ± 1,89
12 m-c	25°C	1,61 ± 0,33	3,19 ± 0,29	5,34 ± 0,45	7,06 ± 0,97	13,49 ± 1,33	20,45 ± 2,13	8,49 ± 1,09	16,40 ± 2,33	24,25 ± 3,60	9,38 ± 0,65	17,72 ± 1,44	27,13 ± 1,70
	4°C	1,27 ± 0,23	2,43 ± 0,21	4,27 ± 0,34	4,19 ± 1,94	10,95 ± 1,46	17,86 ± 2,48	6,81 ± 0,78	13,07 ± 1,52	18,58 ± 0,64	9,23 ± 0,37	18,86 ± 2,04	26,19 ± 1,76



Ryc. 47. Wpływ czasu (do 12 m-cy) i warunków przechowywania (temp. 4°C i 25°C) na uwalnianie NTG (% dawki całkowitej) z maści zawierających NTG-CD lub NTG-cP (\bar{x} , $n = 6$).



Ryc. 48. Wpływ czasu (do 12 m-cy) i warunków przechowywania (temp. 4°C i 25°C) na uwalnianie NTG (% dawki całkowitej) z kremów z NTG-CD lub z NTG-cP (\bar{x} , $n = 6$) – legenda podana na ryc. 47.

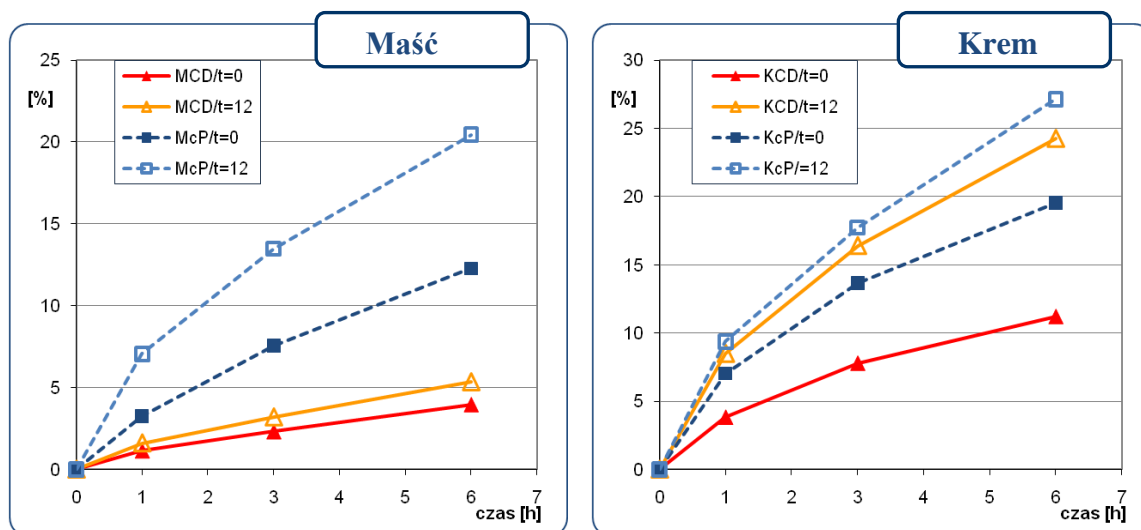
Na podstawie wyników przedstawionych na ryc. 47 można stwierdzić, że nie dochodzi do powstania istotnych zmian w profilu uwalniania NTG z maści zawierających kompleks NTG-CD przechowywanych w temp. 4°C. Natomiast w preparatach umieszczonych w temp. 25°C obserwowano już po 1 miesiącu wzrost ilości uwalnianej NTG (o około 20%), lecz wyniki uzyskane po 3 - 12 miesięcy nie potwierdzają dalszego postępowania zjawiska wzrostu szybkości uwalniania.

W maściach z NTG-cP w czasie przechowywania w temp. 25°C obserwowano wzrost szybkości uwalniania, który po 12 miesiącach wyniósł 65%. Temperatura

przechowywania miała wpływ na trwałość maści z NTG-cP i wzrost szybkości uwalniania był mniejszy (ok. 45% po 12 miesiącach) w maści przechowywanej w temp. 4°C.

Analizując profile uwalniania uzyskane dla kremów z NTG-CD stwierdzono, że szybkość uwalniania wzrasta w sposób istotny w czasie, zarówno w próbach przechowywanych w temp. 25°C jak i 4°C, przy czym zmiany te zachodziły szybciej w temperaturze pokojowej. Już po 1 miesiącu przechowywania w temp. 25°C obserwowano prawie dwukrotny wzrost szybkości uwalniania NTG względem wartości początkowej. Ilość NTG uwolnionej po 1 miesiącu (18,5% po 6 h) jest zbliżona do wartości uzyskanej dla preparatu zawierającego formę nieskompleksowaną NTG (19,5%). W trakcie kolejnych miesięcy przechowywania kremów z NTG-CD, dochodziło do dalszego wzrostu szybkości uwalniania NTG, przy czym zmiany w preparatach przechowywanych w lodówce przebiegają wolniej.

Na ryc. 49, w celu zilustrowania wpływu formy NTG na zmiany w kinetyce uwalniania zachodzące w czasie, przechowywania zestawiono profile uwalniania wyznaczone po wykonaniu maści i kremów ($t=0$) z profilami wyznaczonymi po 12 miesiącach przechowywania (w temp. 25°C) (zestawienie zawiera dane przedstawione powyżej na ryc. 47 i 48).



Ryc. 49. Wpływ formy NTG (rozcierki z cP lub kompleksu z β -CD) na zmianę szybkości uwalniania w czasie 12-mcy przechowywania maści i kremów.

Jedynie w maści lipofilowej, zawierającej formę skompleksowaną NTG, szybkość uwalniania w czasie 12 miesięcy nie zmienia się znacząco, natomiast w preparacie

zawierającym rozcierkę NTG z cP wzrost szybkości uwalniania jest duży (2-krotny). Krem z kompleksem NTG-CD nie wykazuje oczekiwanej trwałości.

8. BADANIA PRZENIKANIA NTG DO SKÓRY W WARUNKACH *EX VIVO*

Kolejnym etapem pracy było określenie stopnia przenikania NTG w warunkach *ex vivo*, do skóry ludzkiej w zależności od zastosowanego podłoża (zawiesina wodna, krem w/o, maść absorpcyjna) oraz użytej formy substancji leczniczej (*Metody, pkt. 8.*).

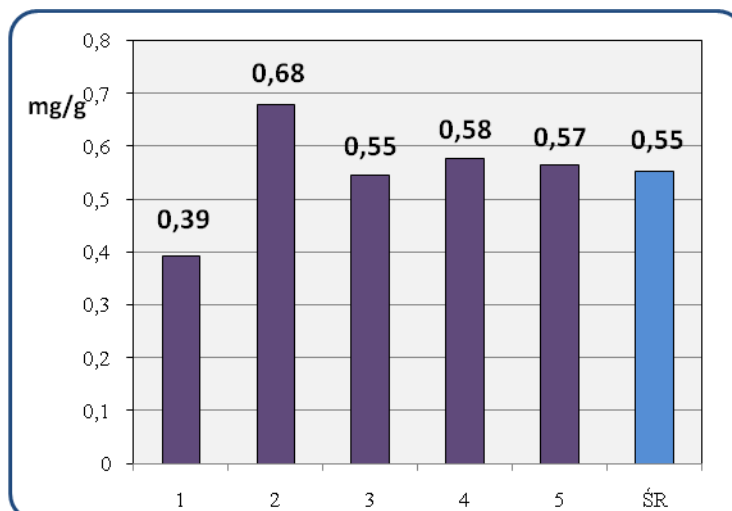
Dane przedstawione na ryc. 50 - 52 uzyskano stosując jednokrotną ekstrakcję tkanek metanolem. W toku badań wykazano, że w płynach z ekstrakcji (drugiej i trzeciej) stężenie NTG było nieoznaczalne przy użyciu wybranej metody HPLC (< 200 ng/ml).

Zawiesina

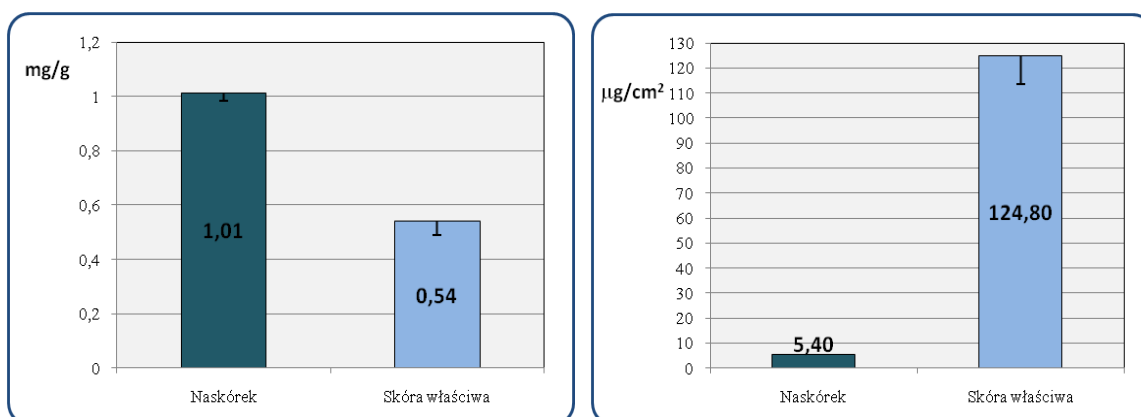
Określono przenikanie NTG do skóry z zawiesiny wodnej zawierającej 0,8% NTG-cP. Ilości NTG oznaczone w skórze niedzielonej przedstawiono na ryc. 50, natomiast na ryc. 51 podano wyniki uzyskane dla rozdzielonych warstw: naskórka i skóry właściwej.

Powtarzalność metody wyznaczono dla 5 eksperymentów. Oznaczona ilość NTG w skórze całkowitej wyniosła $550 \pm 100 \mu\text{g/g}$, co stanowi $4,2 \pm 0,84\%$ nanoszonej dawki. Powtarzalność otrzymana, w modelu biologicznym z użyciem skóry ludzkiej *ex vivo* jest dostateczna.

Porównano ilość NTG zaabsorbowaną po 3 h aplikacji przez naskórek i skórę właściwą. Uzyskane wyniki przedstawiono jako ilość NTG obecną w 1 g lub w 1 cm^2 tkanki (ryc. 51).



Ryc. 50. Ilość NTG oznaczona w skórze po 3 h aplikacji zawiesiny NTG-cP (0,2% NTG) – poszczególne próby (n=5) oraz wartość średnia.



Ryc. 51. Porównanie ilości NTG oznaczonej w warstwach skóry po 3 h aplikacji zawiesiny zawierającej NTG-cP (0,2% NTG) ($\bar{x} \pm SD$, n = 5).

Ilość NTG (wyrażona w $\mu\text{g/g}$), która uległa wchłonięciu do naskórka była dwukrotnie większa od ilości oznaczonej w skórze właściwej (odpowiednio 1014 i 540 $\mu\text{g/g}$). Jednakże biorąc pod uwagę fakt, iż masa naskórka w przypadku badanych fragmentów tkanki wynosiła średnio około 2,2 % całkowitej masy skóry, można stwierdzić że większość NTG ulega dyfuzji do skóry właściwej – ponad 20-razy więcej NTG było w skórze właściwej ($125 \mu\text{g/cm}^2$) niż w naskórku ($5,4 \mu\text{g/cm}^2$).

Stwierdzono, że rozdział termiczny skóry na naskórek i skórę właściwą z użyciem wody o temp. 60°C nie wpływa na zawartość NTG w badanej tkance. Łączna ilość

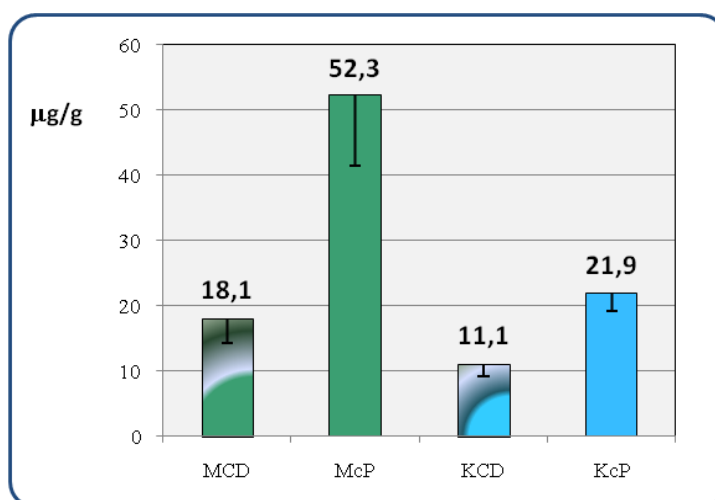
substancji oznaczona w naskórku i skórze właściwej po rozdzieleniu wyniosła 560 $\mu\text{g/g}$ i była równa ilości NTG oznaczonej w niedzielonych fragmentach skóry tzn. 551 $\mu\text{g/g}$.

Stężenie NTG uzyskane w płynie akceptorowym po 3 h badania przenikania z zawiesin było nieoznaczalne przy użyciu wybranej metody analitycznej ($< 200 \text{ ng/ml}$).

Maści i kremy

Wyniki przenikania NTG do skóry w zależności od użytego podłoża (maść absorpcyjna lub krem) i rodzaju formy substancji czynnej (rozcierka lub kompleks) przedstawiono na ryc. 52.

Z preparatów półstałych, w czasie 5 h do naskórka przenikało mniej niż 1% aplikowanej dawki NTG. W dalszych badaniach analizowano zawartości NTG jedynie w niedzielonych fragmentach skóry (ryc. 52).



Ryc. 52. Porównanie przenikania NTG do skóry całkowitej z maści i kremów ($\bar{x} \pm SD$ $n = 5 - 7$).

Niezależnie od rodzaju zastosowanej formy NTG obserwowano znacznie mniejsze przenikanie substancji czynnej do skóry z kremów niż z maści. Z preparatów półstałych przenikanie było znacznie mniejsze niż z zawiesiny wodnej. Ilość NTG wchłonięta do skóry ludzkiej z maści i kremu (McP i KcP) w czasie 5 h była odpowiednio 10-krotnie i 25-krotnie mniejsza od ilości NTG wchłanianej z zawiesiny wodnej (NTG-cP) po 3 h badania.

Ilość NTG, która uległa dyfuzji do skóry z maści wyniosła $18,1 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$ oraz $52,2 \pm 10,8 \mu\text{g/g}$, odpowiednio dla MCD i McP. Prawie 3-krotnie wolniejsze przenikanie z maści zawierającej NTG w formie kompleksu w porównaniu z formą nieskompleksowaną

świadczy o spowolnionym uwalnianiu leku z tej postaci. Ilość NTG, która uległa dyfuzji do skóry z kremu wyniosła $11,1 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$ oraz $21,9 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$, odpowiednio dla KCD i KcP, tak więc przenikanie było 2-krotnie mniejsze po zastosowaniu kompleksu z CD.

V. Dyskusja Wyników

Do chwili obecnej na rynku światowym pojawiło się około 40 produktów leczniczych zawierających CD. W większości z nich zastosowano naturalne CD (około 70% preparatów), w tym głównie β -CD (*Wstęp, tabela 3 i 4*). CD mogą występować w produktach podawanych drogą doustną, pozajelitową oraz miejscowo. Większość z preparatów zawierających naturalne CD to formy stałe (tabletki, kapsułki), natomiast roztwory (doustne, do stosowania zewnętrznego lub pozajelitowego) zazwyczaj zawierają pochodne CD, ze względu na ich znacznie lepszą rozpuszczalność. Pomimo wielu lat intensywnych badań, zastosowanie CD w technologii farmaceutycznej nie jest duże i dotyczy głównie prostych fizykochemicznie układów (tabletki konwencjonalne, roztwory). Praktycznie brak jest preparatów półstałych, czy preparatów o modyfikowanym lub kontrolowanym uwalnianiu (np. TTS, układy wielozbiornikowe, emulsje) [4].

Obserwuje się wprawdzie wzrost zainteresowania zastosowaniem CD w preparatach na skórę (*Wstęp, tabela 9*), ale prawdopodobnie wynika to z poszukiwań dla celów przemysłu kosmetycznego (w 2009 aż 74% z 9400 opublikowanych prac dotyczyła zastosowań w kosmetykach, a jedynie 6% w preparatach farmaceutycznych) [4]. Jednocześnie brak jest prac dotyczących trwałości kompleksów w układach półstałych oraz prac opisujących interakcje pomiędzy CD a substancjami pomocniczymi. W przypadku form stałych zwraca się obecnie większą uwagę na wpływ innych substancji pomocniczych na trwałość kompleksu lek-CD.

W podjętych w pracy badaniach oceniono możliwość stosowania kompleksu inkluzyjnego NTG- β -CD (1:1), wytwarzanego przez firmę Dynamit Nobel, w tabletkach podjęzykowych oraz półstałych preparatach do stosowania zewnętrznego. Zawartość NTG w używanej substancji wynosiła jedynie 2% (wg certyfikatu analizy 1,98%), tak więc β -CD występuje w nadmiarze, ponieważ przy uwzględnieniu stechiometrii kompleksu 1:1 NTG powinna stanowić 17% masy. Duża zawartość CD w substancji może stanowić ograniczenie technologiczne [14, 39, 84]. W pracy korzystano z gotowej formy kompleksu, w związku z czym nie przeprowadzono badań identyfikacyjnych kompleksu, lecz wyznaczono jedynie rozpuszczalność NTG (*Metody, pkt. 3.1.*). Dane literaturowe na temat właściwości kompleksu NTG-CD zostały przedstawione we wstępie (*pkt. 2.3.*).

NTG z powodu małej trwałości i wybuchowości [116], nie może być przechowywana w formie czystej cieczy, dlatego jako substancję odniesienia do badań wybrano rozciek NTG z cP (25% NTG). cP jest powszechnie stosowany do stabilizacji

NTG w preparatach stałych, gdyż wykazuje wyższą skuteczność niż inne substancje rozcieńczające [132, 134 - 136].

Realizację tematu rozpoczęto od wyznaczenia rozpuszczalności NTG w wodzie (37°C) w obecności substancji stabilizujących – cP i CD. Rozpuszczalność NTG w wodzie jest mniejsza (o około 30%), gdy użyty jest kompleks NTG-CD zamiast rozcierki NTG-cP (*Wyniki, ryc. 16*). Nie jest wykluczone, że efekt ten związany jest z nadmiarem CD. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi [142], gdyż ustalono wcześniej, że NTG posiada izotermę rozpuszczalności typu B_s – obecność CD (powyżej 1%) powoduje ograniczenie rozpuszczalności leku. Efekt ten nie stanowił przeszkody w realizacji zamierzonego celu, ponieważ celem badań nie była solubilizacja NTG, lecz modyfikacja uwalniania lub zwiększenie trwałości. Ograniczona rozpuszczalność nie wyklucza użycia kompleksu w tabletkach podjęzykowych, w których konieczna jest szybka biodostępność, gdyż CD podawane na błony śluzowe mogą promować wchłanianie [1, 24, 26]. Otrzymano dla tabletek podjęzykowych z kompleksem NTG nieznacznie większą skuteczność w obniżaniu tętniczego ciśnienia krwi i zwiększaniu szybkości pracy serca względem tabletek podjęzykowych z innymi formami NTG [51]. W odrębnych badaniach wykazano również, że β -CD zwiększa szybkość uwalniania NTG z tabletek [4].

Analizę ilościową NTG w badanych próbkach (roztwory wodne, płyny akceptorowe, a także ekstrakty z maści, tabletek i ze skóry) przeprowadzono metodą HPLC (*Metody, pkt. 2.*). Zastosowana metoda pozwoliła na jednoczesne oznaczanie substancji czynnej i produktów hydrolizy kwaśnej, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi [167].

Zarówno CD jak i cP nie wykazywały interakcji z NTG w czasie analizy ilościowej. cP jest nierozpuszczalny w wodzie i metanolu [6], nie był więc obecny w analizowanych roztworach. β -CD jest nierozpuszczalna w metanolu i trudno rozpuszczalna w 50% roztworze metanolu (0,3 g/100 ml) [4], a także nie wykazuje absorpcji w zakresie UV-Vis [4], dzięki czemu możliwe było oznaczanie NTG w obecności β -CD (*Metody, ryc. 8*).

Zawartość NTG w tabletkach oraz maściach oznaczano prowadząc ekstrakcję 50% roztworem metanolu, natomiast oznaczenia ilościowego w tkance (skóra, warstwa rogowa) dokonywano po ekstrakcji metanolem. W roztworach metanolowych NTG występuje w formie nieskompleksowanej.

W przypadku tabletek ekstrakcję metanolem prowadzono po uprzednim sproszkowaniu tabletek i wytrząsaniu z wodą (*Metody, pkt. 5.5.*). Ekstrakcję z maści prowadzono metodą opisaną przez Krzeka i wsp. [167]. Uzyskano bardzo dobry odzysk NTG z próbek maści ($\geq 99\%$).

W pracy podjęto próbę otrzymania trwałych tabletek podjęzykowych zawierających kompleks NTG-CD. W celu poprawy trwałości NTG preparat dostępny w Japonii zawiera kompleks inkluzyjny NTG-CD, natomiast tabletki dostępne na rynku europejskim oraz w USA zawierają krospowidon. Brak publikowanych badań porównawczych dotyczących trwałości NTG w obecności cP lub β -CD uzasadniał podjęcie tego tematu.

Sporządzano tabletki podjęzykowe zawierające NTG w dawce zwykle stosowanej w terapii napadów dławicy piersiowej, tzn. 0,5 mg. Założono, że tabletki powinny charakteryzować się niewielką masą i rozmiarem oraz szybkim rozpadem, gdyż ten parametr warunkuje w dużym stopniu biodostępność NTG [127]. Ze względu na zastosowanie tabletek w jamie ustnej istotne były również korzystne odczucia organoleptyczne.

Zastosowano metodę tabletkowania bezpośredniego (*Metody, pkt. 4.*). Użycie form rozcieńczonych NTG było korzystne ze względu na bezpieczeństwo tabletkowania [5, 51], lecz niewielki (0,5%) udział substancji czynnej, może być przyczyną niehomogennego rozmieszczenia NTG w masie tabletkowej, a w konsekwencji niejednorodności dawki.

Na etapie opracowywania składu tabletek zastosowano nowoczesne substancje rozsadzające, takie jak glikolan sodowy skrobi (Vivastar) i kroskarmelozę sodową (Ac-Di-Sol), które są skuteczne już w niskich stężeniach ($< 5\%$). Stosowano również skrobię modyfikowaną (10%): przeżelowaną skrobię kukurydzianą (Starch 1500) oraz współsuszoną mieszaninę skrobi kukurydzianej i laktozy (StarLac). Na podstawie czasu rozpadu *in vitro* (*Wyniki, tabela 23*) wyznaczono optymalne stężenia substancji rozsadzających. Badanie prowadzono dla tabletek *placebo* bez CD lub z CD (25%). Dla tabletek o twardości nieprzekraczającej 100 N możliwe było uzyskanie szybkiego rozpadu (< 100 s) z użyciem wszystkich badanych substancji (w stężeniu do 10%). Tabletki serii próbnych różniły się istotnie twardością ze względu na brak kontroli siły nacisku, w związku z czym nie można było jednoznacznie ocenić czy CD wpływa na rozpad (*tabela 23*).

Nowoczesne substancje rozsadzające po podaniu na błonę śluzową mogą powodować nieprzyjemne odczucia organoleptyczne („piasek”) [171]. Taki efekt

obserwowano dla Ac-Di-Sol, z tego powodu wyeliminowano tę substancję z dalszych badań. Z kolei Vivastar, pomimo dobrych właściwości aplikacyjnych, nie został wybrany ze względu na stosunkowo długi czas rozpadu sporządzonych tabletek (*Wyniki, tabela 23.*). Takich kłopotów nie obserwowano przy zastosowaniu skrobi jako substancji rozsadzającej. Ostatecznie wybrano, pomimo konieczności użycia nieco większych stężeń (powyżej 10%), modyfikowane skrobie: Starch 1500 i StarLac, które zgodnie z danymi literaturowymi pozwalają na uzyskanie mas do tabletkowania charakteryzujących się bardzo dobrą zsypywalnością [172 - 174].

Masy do tabletkowania zawierające współsuszoną laktozę ze skrobią (StarLac) wymagały użycia mniejszej siły nacisku niż laktoza w mieszaninie ze skrobią (Tabletoza 80 i Starch 1500) (*Wyniki, tabela 25*). Bardzo dobre właściwości mechaniczne tabletek ze StarLac uzyskane przy małych wartościach siły nacisku prawdopodobnie wynikają ze zmiany właściwości fizycznych mieszaniny laktozy i skrobi podczas współsuszenia [172, 174]. StarLac charakteryzuje się dużą wartością deformacji plastycznej w trakcie prasowania, znacznie wyższą niż mieszanina suszonej rozpyłowo laktozy (FlowLac) i skrobi kukurydzianej [175].

Tabletki zawierające StarLac, ze względu na krótszy czas rozpadu w jamie ustnej, lekko słodkawy smak oraz minimalne odczucie ziarnistości, po rozpadzie, były najbardziej akceptowane przez probantów (*Wyniki, tabele 23 i 24*). Należy jednak dodać, że tabletki ze Starch 1500 zostały również uznane za odpowiednie. Znaczny udział CD w masie tabletek nie wpływał na czas rozpadu (*in vitro* i *in vivo*) tabletek sporządzanych z użyciem StarLac i Starch 1500 (*Wyniki, tabela 24*). Nie obserwowano skrócenia czasu rozpadu, chociaż taki efekt opisano dla tabletek z chloramfenikolem, kiedy β -CD znacznie skracała ich czas rozpadu, przy jednoczesnym zwiększeniu twardości [5].

Dążąc do maksymalnie akceptowalnego odczucia organoleptycznego podjęto próbę zastosowania w tabletkach jako środka poślizgowego rozpuszczalnego w wodzie makroglu 6000 (2%) zamiast nierozpuszczalnego stearynianu magnezu. Okazało się jednak, że dochodziło do adhezji masy do stempli, co uniemożliwiało tabletkowanie.

W przypadku tabletek podstawowym celem było uzyskanie poprawy trwałości NTG w wyniku zastosowania kompleksu inkluzyjnego. Kluczowe było więc określenie trwałości chemicznej NTG w tabletkach w obecności wybranych substancji pomocniczych. W celu uzyskania szybkiej wstępnej oceny tabletki serii I poddano bezpośredniej ekspozycji na podwyższoną temperaturę (40°C) i wilgotność (75% RH) (*Metody, pkt. 5.6.*).

Już w czasie 14 dni dochodziło do gwałtownego spadku zawartości NTG we wszystkich badanych formulacjach, chociaż proces ten następował wolniej w tabletkach z NTG-CD (*Wyniki, ryc. 19*).

Pomimo, że temperatura wrzenia NTG to 146°C, do jej powolnego parowania dochodzi już w temperaturze pokojowej [116]. Ponieważ tabletki były przechowywane w otwartych naczyniach, a w analizowanych próbkach nie obserwowano dużych wartości pików produktów rozkładu, ubytek NTG tłumaczy się przede wszystkim jej lotnością. Dane literaturowe również wskazują, że główną przyczyną spadku zawartości NTG w trakcie przechowywania tabletek jest jej lotność w temperaturze pokojowej [51].

Znaczenie miał również skład pozostałych substancji pomocniczych. Wyraźnie większą trwałość NTG obserwowano w tabletkach zawierających Starch 1500 niż w tabletkach ze StarLac. Poprawa trwałości NTG w obecności Starch 1500 może być wynikiem ochrony kompleksu przed wilgocią, w tym przed wodą hydratacyjną zawartą w znacznej ilości w β -CD (około 14%). Wykazano na przykład, że Starch 1500 zwiększał trwałość chemiczną substancji podatnych na hydrolizę, takich jak chlorowodorek ranitydyny, czy kwas acetylosalicylowy [176, 177]. Starch 1500, ze względu na modyfikację (prezelowanie) w procesie otrzymywania, zbudowany jest z rozgałęzionych łańcuchów amylopektyny (część hydrofilowa) oraz nierozgałęzionych – amylozy (część hydrofobowa). Taka budowa umożliwia zatrzymanie cząsteczek wody, przez co zmniejsza się ich aktywność [173, 176]. Podobne właściwości wykazano dla dekstrozy, gdyż stwierdzono, że jej dodatek (20%) poprawia trwałość tabletek zawierających kompleks inkluzyjny limaprostu z α -CD [178].

Badania stresowe nie zawsze odzwierciedlają zmiany zachodzące w czasie rzeczywistym. Ważnym czynnikiem, który należy uwzględniać jest opakowanie bezpośrednie produktu. Zdecydowano, by prowadzić badanie w fiolkach szklanych zamykanych pełnymi kapsłami z PTFE, które nie powinny wpływać na trwałość NTG. (*Metody, pkt. 5.6.*). Wnioski z analizy prób w warunkach przechowywania długoterminowego (12 miesięcy w temp. 25°C) są zgodne z uzyskanymi w warunkach przyspieszonego starzenia oraz we wstępnych badaniach stresowych (*Wyniki, ryc. 20*). Mniejszy ubytek NTG obserwowano w tabletkach CD/B, z NTG-CD i Starch 1500 (po 12 miesiącach wykrywano 87% NTG). Pomimo korzystnego wpływu kompleksowania z β -CD, w żadnym z badanych układów nie uzyskano wymaganej dla celów rejestracyjnych trwałości NTG, ponieważ ubytek substancji leczniczej przekraczał 10%.

Jednakże badania wykonano dla niewielkich laboratoryjnych serii, które były wytwarzane w warunkach doświadczalnych (pomieszczenie nieklimatyzowane, ręczny zasyp matrycy), a biorąc pod uwagę, że w dostępnych na rynku polskim tabletkach Nitroglicerinum (Lek, Polska) użyta jest rozcierka NTG z krospowidonem, z której korzystaliśmy w wykonanych przez nas tabletkach, należy oczekiwać, że zastosowanie kompleksu NTG-CD zapewni poprawę trwałości substancji czynnej.

Zgodnie z celem pracy ocena możliwości stosowania kompleksu NTG-CD dotyczyła również preparatów półstałych. Obecnie bardzo rzadko stosuje się maści z NTG (2%) do przezskórnego podawania leku w dusznicy bolesnej. Od niedawna NTG jest jednak używana w miejscowej terapii przewlekłej szczyliny odbytu, w postaci 0,2% lub 0,4% (terapia bólu) maści (*Wstęp, pkt. 2.4.1.*). W Polsce brak jest produktu NTG o takim stężeniu i wskazaniu terapeutycznym. Pomimo niskiego stężenia NTG, główną wadą sfinkterotomii chemicznej jest występowanie działań ubocznych wynikających z szybkiego przenikania NTG do krążenia ogólnego (*Wstęp, pkt. 2.4.1.*). Spowolnienie uwalniania może ograniczać wchłanianie NTG przez skórę przy zapewnieniu miejscowego działania leku. Założono więc, że opracowany preparat powinien zawierać 0,2% NTG i charakteryzować się modyfikowanym uwalnianiem. Efekt spowolnionego uwalniania można uzyskać poprzez kompleksowanie substancji leczniczych, jeżeli stała trwałości kompleksu jest duża oraz gdy obniżona jest rozpuszczalność substancji czynnej [1, 5, 10, 16].

Wyniki badania rozpuszczalności wykazały, że β -CD ogranicza rozpuszczalność NTG w wodzie (*Wyniki, ryc. 16*). Przeprowadzono badania uwalniania NTG z zawiesiny NTG-CD i NTG-cP (0,2% NTG). Układ zawierał jedynie zdyspergowaną substancję czynną z nośnikiem, w celu wyeliminowania wpływu substancji dodatkowych na kinetykę uwalniania. Zastosowano dwa różne modele badawcze. W zależności od użytego aparatu (komora wertykalna – W i komora Franza – F), uzyskano odpowiednio 2- lub 3-krotnie wolniejsze uwalnianie NTG z dyspersji NTG-CD niż z zawiesiny NTG-cP (*Wyniki, ryc. 18*). Różnice w dwóch doświadczalnych modelach prawdopodobnie są rezultatem braku mieszania w komorze donora w aparacie F (*Metody, pkt. 3.4.*) przez co dochodziło do sedimentacji cząstek stałych na powierzchni membrany (układ horyzontalny). W obu modelach potwierdzono jednak, że CD spowalnia uwalnianie NTG.

Farmakopea wymaga, by prowadzić badanie uwalniania dla preparatów o modyfikowanym uwalnianiu. Badanie to nie jest natomiast obowiązkowe dla maści i brak

jest farmakopealnej metody prowadzenia takiego testu [179]. Jedyne wytyczne dotyczące badania uwalniania z preparatów półstałych zostały opublikowane w roku 1997 przez FDA [180]. W niniejszej pracy nie zastosowano zalecanej w nich komory Franza, która stwarzała problemy techniczne w doświadczeniach z zawiesinami wodnymi. Uwzględniono natomiast wytyczne dotyczące czasu badania (6 h).

Użyto błonę dializacyjną, co zapewniło stałą powierzchnię dyfuzji i ochronę przed mieszaniem preparatu z płynem. Membrany nie mogą stanowić bariery dla dyfundujących cząsteczek substancji czynnej oraz muszą być obojętne względem uwalnianego leku [179, 181, 182]. Wu i wsp. [183] wykazali, że w przypadku preparatów półstałych z NTG zastosowanie membran o charakterze lipofilowym (politetrafluoroetylen, polipropylen) spowalnia uwalnianie substancji czynnej. Odpowiednie są błony hydrofilowe (mieszane estry celulozy, polisulfony, włókna szklane), przy czym ważna jest ich charakterystyka: grubość i porowatość. Zastosowano membrany z estrów celulozy zatrzymujące związki o m.c. powyżej 10.000 Da. W badaniach początkowo stosowano błonę dializacyjną (prod. Sigma), która nie posiada określonej w charakterystyce grubości, a następnie Cuprophan (prod. Medicell), o grubości wynoszącej $10 \mu\text{m} \pm 0,5$. Obserwowano niewielkie (około 10%) i nieistotne statystycznie różnice w wynikach uzyskanych przy użyciu obu membran (*Wyniki, ryc. 32*). Ze względu na prawdopodobnie mniejszą grubość, znaczną porowatość oraz wskazanie w USP w dalszych badaniach stosowano jedynie błonę Cuprophan.

Ponieważ NTG ulega sorpcji do tworzyw [116], konieczne było wykazanie braku interakcji z materiałem membrany. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że NTG nie ulega adsorpcji do błony z estrów celulozy, nawet z rozcieńczonych roztworów wodnych (temp. 37°C) (*Wyniki, pkt. 5.5.*).

Stosowano trzy dostępne handlowo komory: dializacyjną - D, typu Mutimer - MU i typu VanKel - VK. Aparaty charakteryzowały się różną powierzchnią uwalniania, sposobem i szybkością mieszania płynu akceptorowego oraz grubością warstwy preparatu (*Metody, pkt. 7.2.*). Oceniając szybkość uwalniania NTG z maści absorpcyjnej stwierdzono, że jest różna we wszystkich trzech aparatach, niezależnie od użytej formy substancji czynnej (NTG-CD i NTG-cP). Znacznie większą szybkość uwalniania uzyskano w komorze D (*Wyniki, ryc. 28 i 29*). Szybsze uwalnianie z użyciem komory D może być wynikiem dużej prędkości mieszania (50 rpm), a nawet działania siły odśrodkowej (rotacja zbiornika donora), co w szczególności w przypadku zawiesin (NTG-CD, NTG-cP), dodatkowo powoduje przemieszczanie się zdyspergowanych cząstek substancji

czynnej na powierzchnię membrany. Zbyt szybkie i wymuszone uwalnianie jest zjawiskiem niekorzystnym, a uzyskana szybkość uwalniania może być w dużym stopniu niezależna od składu preparatu (np. mniejszy wpływ lepkości). W dalszych badaniach zrezygnowano więc z użycia komory D. Aparaty MU i VK użyto w badaniach porównawczych hydrożeli.

Niewielka różnica w szybkości uwalniania z żeli pomiędzy preparatami zawierającymi formę skompleksowaną i wolną NTG, obserwowana w komorze VK, jest istotna statystycznie. Natomiast wartości wyznaczone w komorze MU nie różnią się istotnie, w przypadku żeli z NTG-CD i NTG-cP. W komorze MU dyfuzja zachodziła bardzo szybko i już po 1 h badania uzyskano *plateau*, chociaż nie osiągnięto całkowitego uwolnienia leku - jedynie około 80% dawki uległo uwolnieniu. Różnice w szybkości uwalniania w komorach MU i VK mogą być spowodowane dwoma czynnikami: różnym mieszanym płynu lub różną grubością warstwy preparatu. Komora MU nie posiada regulowanej objętości i warstwa aplikowanej maści była 3-krotnie cieńsza niż w komorze VK. W celu eliminacji tej różnicy przeprowadzono uwalnianie w komorze VK, stosując taką samą jak w komorze MU warstwę preparatu (1,2 mm). Profile uwalniania dla maści oraz żeli aplikowanych w warstwie 1,2 mm są różne w obu komorach – szybsze jest uwalnianie [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] w komorze VK (*Wyniki, ryc. 31*). Prawdopodobnie różnice w kinetyce uwalniania pomiędzy aparatami wynikają więc z zastosowania odmiennych technik mieszania płynu akceptorowego. W komorze VK warstwa nasycona likwidowana jest przez obracającą się nad membraną łopatkę, natomiast w komorze MU płyn jest jedynie „kołysany” (wytrząsarka). W obu przypadkach sposób mieszania jest na tyle łagodny, że nie wpływa na złożę preparatu, a może jedynie wpływać na szybkość eliminacji warstwy nasyconej. Pomimo różnic w szybkości mieszania w obu aparatach można obserwować, że dyfuzja zależna jest zarówno od składu podłoża jak i formy substancji czynnej.

W toku przeprowadzonych badań nie udało się wyjaśnić niecałkowitego uwolnienia substancji leczniczej z żeli. Uwolnienie maksymalnie 80% NTG i zahamowanie uwalniania po 1 h może wynikać z interakcji NTG-CD z polimerem w żelu. Inne czynniki, takie jak stężenie NTG czy CD w płynie akceptorowym, mogą mieć również znaczenie.

W obu użytych modelach doświadczalnych (komora MU i VK) możliwe było wykazanie różnic w kinetyce uwalniania pomiędzy formą skompleksowaną i nieskompleksowaną NTG. Badania dowiodły, że w przypadku podłoży lipofilowych

możliwe jest stosowanie modeli charakteryzujących się różną grubością warstwy preparatu, a sposób mieszania akceptora jedynie w niewielkim stopniu zwiększa dyfuzję. Jednocześnie stwierdzono, że w przypadku podłoży hydrofilowych (hydrożel) różnice w konstrukcji aparatów mogą wpływać na uzyskane profile, co stwarza problemy interpretacyjne. W przypadku badań uwalniania z preparatów półstałych, przy doborze modelu doświadczalnego należy wziąć pod uwagę szereg czynników. Poza wymaganymi warunkami *sink* bardzo ważne są również: sposób mieszania płynu akceptorowego, grubość aplikowanej warstwy preparatu, masa preparatu czy charakter fizykochemiczny podłoża.

Opracowanie technologii preparatów półstałych (0,2% NTG) do stosowania miejscowego w terapii szczeliny odbytu wymagało doboru składu podłoża. Istotne było uzyskanie przedłużonego uwalniania *in vitro* z maści zawierających NTG-CD. Wykonano preparaty zarówno na bezwodnym podłożu absorpcyjnym, jak i na podłożach zawierających wodę – emulsji w/o i hydrożelu (*Metody, tabela 16*). Zdecydowano się na użycie podłoży zawierających wodę, gdyż we wcześniejszych badaniach wykazano, że szybkość uwalniania z dyspersji wodnej NTG-CD jest spowolniona względem formy nieskompleksowanej. Pozwalało to przypuszczać, że mimo zachodzącej dysocjacji uwalnianie w obecności wody będzie spowolnione.

Badania uwalniania prowadzono z maści zawierającej kompleks NTG-CD, formę nieskompleksowaną NTG-cP oraz mieszaninę fizyczną β -CD z NTG-cP. Uzyskane dane (*Wyniki, ryc. 23*) potwierdziły możliwość modyfikacji uwalniania NTG z maści poprzez zastosowanie formy kompleksu NTG-CD. Szybkość uwalniania z kompleksu zawartego w maści jest prawie 4-krotnie mniejsza niż z maści z rozcierką NTG z cP. Jednocześnie wykazano, że zastosowanie mieszaniny fizycznej NTG (NTG-cP) i CD także spowalnia uwalnianie, aczkolwiek w znacznie mniejszym stopniu (o około 20%).

Spowalnianie uwalniania substancji dość dobrze rozpuszczalnej w wyniku wprowadzenia kompleksu lek-CD do bezwodnej matrycy zostało już opisane w literaturze. Davies i wsp. [wg 16] zastosowali kompleksowanie pilokarpiny z β -CD w celu przedłużenia uwalniania leku z insertu okulistycznego. Kompleks pilokarpiny z β -CD charakteryzował się słabą rozpuszczalnością (izoterma typu B). Uwalnianie pilokarpiny z matrycy z metylocelulozy było znacznie wolniejsze, gdy użyto kompleks niż gdy zastosowano substancję czynną w formie wolnej lub jako mieszaninę fizyczną z CD.

Uwalnianie substancji leczniczych z maści wykonanych na podłożach lipofilowych bezwodnych jest wolne i dotyczy jedynie części aplikowanej dawki. W maściach lipofilowych dyfuzja zachodzi tylko z warstwy w bezpośrednim kontakcie z płynem, między innymi z powodu braku penetracji wody (płynu akceptorowego) do podłoża. Szybsze uwalnianie *in vitro* i z reguły większą dostępność dawki uzyskuje się z preparatów zawierających wodę [184]. W przypadku kremu w/o uwalnianie NTG z formy skompleksowanej było 2,5-krotnie wolniejsze niż z preparatów zawierających formę nieskompleksowaną (*Wyniki, ryc. 25*). Taki sam stosunek uwalniania (2 - 3-krotne spowolnienie) uzyskano dla wodnych dyspersji obu form NTG (*Wyniki, ryc. 18*).

Mniejsza różnica w szybkości uwalniania NTG z kremu KCD i KcP (w obecności wody), niż obserwowana dla maści bezwodnej, jest prawdopodobnie wynikiem częściowej dysocjacji kompleksu i większej dostępności wolnej NTG w preparacie. Podobnej zależności w modyfikacji uwalniania spodziewano się w przypadku badanego hydrożelu (ZCD). Okazało się jednak (*Wyniki, ryc. 26*), że obie formy NTG uwalniają substancję czynną z podobną szybkością (10% różnicy). Kinetyka uwalniania jest dość zaskakująca, biorąc pod uwagę znaczny nadmiar obecnych w preparacie CD oraz różnice uwalniania obserwowane w przypadku wodnej dyspersji. Ponieważ badany żel zawierał dodatek rozpuszczalników (etanol, glikol propylenowy), konieczna była ocena wpływu tych substancji pomocniczych na trwałość kompleksu.

Podstawową techniką oceny kompleksów, ze względu na szeroką dostępność jest DSC [5, 185]. W literaturze można spotkać doniesienia dotyczące oceny przy jej użyciu między innymi czopków czy maści [186, 187, 188, 189].

Termogramy DSC wykonano w Zespole Pracowni Fizykochemicznych Uniwersytetu Gdańskiego (*Metody, pkt. 7.1.*) dla kompleksu NTG-CD oraz dla zawierających go: maści absorpcyjnej i hydrożelu. Otrzymane widmo termiczne NTG-CD jest zgodne z danymi literaturowymi [51, 141]. O występowaniu kompleksu inkluzyjnego pomiędzy NTG a CD świadczy egzotermiczny pik rozkładu NTG o minimum w temp. 217°C. Wolna NTG jest lotna i dochodzi do jej utraty w niższych zakresach temperatur [51]. Na termogramach wykonanych dla form półstałych (*Wyniki, ryc. 22*) wyraźnie zaznaczają się piki efektów cieplnych tła (podłoża maściowego), które przy niewielkim stężeniu substancji czynnej (0,2%) uniemożliwiają oznaczanie efektów cieplnych charakterystycznych dla NTG-CD. Metoda ta nie może być stosowana w ocenie jakości ani trwałości badanych preparatów.

W literaturze dostępne są doniesienia dotyczące interakcji pomiędzy substancjami powierzchniowo czynnymi (np. w płynie akceptorowym), środkami konserwującymi czy rozpuszczalnikami a kompleksami tworzonymi przez CD (*Wstęp, pkt. 1.3.2.*). Opierając się na wcześniejszych rezultatach badań kinetyki uwalniania, zdecydowano, że badanie uwalniania jest wystarczające do oceny interakcji podłoże-kompleks i trwałości kompleksów w preparatach. W przypadku maści absorpcyjnych oceniono wpływ użytego emulgatora oraz mirystynianu izopropylu, natomiast w żelach rozpuszczalników: glikolu propylenowego i etanolu (*Wyniki, ryc. 24 i 27*). Zarówno w przypadku żeli jak i maści rodzaj użytych substancji pomocniczych wpływał na szybkość uwalniania *in vitro*.

Szybkość uwalniania NTG z maści z kompleksem NTG-CD w obecności laurylosiarczanu sodu (Empiwax) wzrasta dwukrotnie względem preparatu z alkoholem cetostearylowym, osiągając wartość podobną do formy nieskompleksowanej. Typ emulgatora nie zmienia kinetyki uwalniania formy nieskompleksowanej NTG, dlatego najprawdopodobniej wzrost uwalniania z kompleksu jest wynikiem wyparcia NTG z wnętrza CD przez laurylosiarczan sodu. Mirystynian izopropylu nie miał wpływu na uwalnianie NTG z kompleksu, natomiast zwiększał szybkość uwalniania formy nieskompleksowanej. Zmiana kinetyki uwalniania z maści z NTG-cP może być wynikiem rozpuszczania lipofilowej NTG w mirystynianie, dzięki czemu ułatwiona jest dyfuzja do płynu akceptorowego. Brak zmiany w kinetyce uwalniania z kompleksu świadczy o jego stabilności w podłożu w obecności mirystynianu izopropylu.

W hydrożelach wykazano, że etanol w znacznym stopniu przyspiesza uwalnianie z kompleksu NTG-CD, a glikol propylenowy nie ma wpływu na ten proces (*Wyniki, ryc. 27*). Jednakże brak wpływu etanolu w obecności glikolu propylenowego na uwalnianie z NTG-CD jest trudny do wyjaśnienia, zwłaszcza, że uwalnianie NTG z nieskompleksowanej formy było w znacznym stopniu spowolnione, jeżeli żel zawierał glikol propylenowy i etanol.

Otrzymane *in vitro* wyniki szybkości uwalniania pozwoliły stwierdzić, że wybrane podłoże absorpcyjne wykonane z alkoholem cetostearylowym i mirystynianem izopropylu nie wykazuje interakcji z NTG-CD, natomiast etanol zawarty w hydrożelu prawdopodobnie zmniejsza stabilność kompleksu, gdyż wyraźnie zwiększa ilość uwalniania NTG z formy skompleksowanej.

Ponieważ rozpuszczalniki, takie jak etanol, czy glikol propylenowy, powinny raczej zwiększać szybkość dyfuzji NTG z matrycy niż ją spowalniać, podjęto próbę wyjaśnienia

ich wpływu na szybkość uwalniania wyznaczając lepkość podłoża hydrożelowych. Stwierdzono, że dodatek zarówno etanolu jak i glikolu propylenowego istotnie podwyższa lepkość preparatów (*Wyniki, tabela 28*) oraz usztywnia strukturę (*Wyniki, ryc. 36*). Wzrost lepkości tłumaczy obniżenie szybkości uwalniania (utrudniona dyfuzja) leku z formy rozcierki, natomiast niejednoznaczne wyniki przy uwalnianiu kompleksu z żeli prawdopodobnie spowodowane są znoszeniem się efektów: wyparcia NTG przez etanol i efekt zwiększania lepkości, lub świadczą o bardziej złożonym mechanizmie, jak np. interakcje CD z polimerem podłoża żelowego.

Jug i wsp. [76] opisali spadek lepkości żeli z hypromelozą po inkorporacji kompleksów inkluzyjnych piroksykanu z β -CD i RM- β -CD. Autorzy tłumaczą zmiany powstaniem potrójnego kompleksu pomiędzy polimerem i kompleksem, a w konsekwencji osłabieniem oddziaływania pomiędzy łańcuchami polimerowymi w strukturze żelu. Natomiast Bouldermorat i wsp. [190] opisują nieznaczny wzrost lepkości żelu z karbopolem w obecności naturalnych CD oraz 2-krotny wzrost w obecności ME-CD. Stwierdzono, że oddziaływania wolnych grup hydroksylowych pierścienia CD z polimerem prowadzą do zwiększenia lepkości, a jeżeli oddziaływania (pomiędzy łańcuchami polimeru a grupami metylowymi) mają charakter hydrofobowy dochodzi do obniżenia lepkości.

Oceniono wpływ CD na lepkość wykonanych hydrożeli z HEC. Dodatek CD nie wpływał na strukturę, o czym świadczy niezmienny przebieg krzywej płynięcia (*Wyniki, ryc. 35*) oraz brak różnic w lepkości badanych układów (*Wyniki, tabela 28*). Przytoczone powyżej dane literaturowe dotyczą karbopolu oraz hypromelozy, możliwe jest więc, że w przypadku HEC nie dochodzi do zmiany lepkości i oddziaływania CD z polimerem. Ponieważ w przypadku żelu podstawowego, wykonanego bez dodatku rozpuszczalników, widoczna jest znacząca różnica w szybkości uwalniania pomiędzy formą skompleksowaną i nieskompleksowaną (ilość uwolnionej NTG po 6 h wynosi odpowiednio 65% i 100% dla NTG-CD i NTG-cP), a żel z glikolem i etanolem charakteryzuje się praktycznie takim samym uwalnianiem dla obu form NTG, prawdopodobne jest, że to oddziaływanie etanolu z NTG-CD wpływa na zmianę kinetyki uwalniania.

Oznaczono również właściwości reologiczne kremów i maści *placebo* oraz ich podłoża (*Wyniki, ryc. 33 i 34, tabela 27*). Stwierdzono, że CD, pomimo znacznego udziału procentowego (10%), nie zmienia lepkości kremu, a w maściach powoduje jedynie wzrost lepkości w wyższych zakresach szybkości ścinania. Może być to jednak wynikiem

obecności cząstek stałych, a nie oddziaływania CD ze składnikami maści. Również zmiany przebiegu krzywych płynięcia można prawdopodobnie tłumaczyć obecnością cząstek stałych w szczelinie pomiarowej. Inkorporowanie cP zarówno do maści jak i kremu, pomimo jego niewielkiego udziału procentowego (0,8%), istotnie obniżało lepkość prób. Ponieważ spadek lepkości wystąpił zarówno w bezwodnej maści, jak i w kremie, jej zmiana nie jest wynikiem pęcznienia cP pod wpływem wody. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie jest możliwe wyjaśnienie tego efektu na poziomie molekularnym.

Zastosowanie kompleksu inkluzyjnego NTG-CD w maści absorpcyjnej oraz w kremie pozwala na uzyskanie modyfikowanego (spowolnionego) uwalniania substancji czynnej, natomiast takiego efektu nie uzyskuje się w żelach, w których już bezpośrednio po wykonaniu prawdopodobnie dochodzi do interakcji pomiędzy zawartymi w nich rozpuszczalnikami a kompleksem.

W przypadku maści (szczególnie wielofazowych) poza trwałością chemiczną bardzo duże znaczenie ma również trwałość fizyczna układu. Zaplanowano dla preparatów o modyfikowanym uwalnianiu (maść i krem) długoterminowe badania trwałości (12 m-cy) przechowując je w temp. 4°C i 25°C (*Metody, pkt. 7.8.*). Wyniki badań trwałości przedstawiono w pkt. 7.

Podobnie jak w przypadku tabletek, w celu wyeliminowania wpływu opakowania, preparaty umieszczano w szklanych szczelnie zamkniętych pojemnikach (*Metody, pkt. 7.8.*). W czasie do 12 miesięcy zarówno maści, jak i kremy, niezależnie od użytej formy substancji czynnej, charakteryzowały się odpowiednią konsystencją – nie dochodziło do rozwarstwiania się preparatów czy utraty homogenności, a preparaty łatwo rozsmarowywały się na skórze.

W badaniach reologicznych wykazano, że przechowywane w lodówce maści i kremy charakteryzowały się nieco większą wartością pętli histerezy i wyższą lepkością (*Wyniki, tabele 34 i 35*). W preparatach przechowywanych w temperaturze pokojowej widoczne są pewne różnice pomiędzy wyznaczanymi wartościami reologicznymi, jednakże biorąc pod uwagę wartości odchyłeń oraz długoterminową obserwację, można stwierdzić, że nie doszło do istotnych zmian lepkości czy tiksotropii. Badane maści i kremy odznaczały się zadowalającą trwałością fizyczną (*Wyniki, ryc. 45 i 46*).

Lepkość strukturalna maści i kremów zawierających NTG-CD była nieco większa niż preparatów z NTG-cP (*Wyniki, tabele 34 i 35*). W pierwszym miesiącu

przechowywania obserwuje się pewien wzrost lepkości kremów, lecz nie zostało to potwierdzone po 12 miesiącach przechowywania. Dodatkowo, ze względu na problemy techniczne oraz zbyt wysoką temperaturę otoczenia (w reometrze termostatowana jest jedynie dolna płytką pomiarowa), wyniki po 3 miesiącach badań lepkości obarczone były błędem i zostały odrzucone.

Przechowywane preparaty żółkły, a zmiana barwy pogłębiała się w czasie i dotyczyła głównie maści absorpcyjnych zawierających formę nieskomplekowaną NTG (*Wyniki, tabela 30*). Stwierdzono, że stopień żółknięcia był zarówno zależny od ekspozycji na światło, jak i na temperaturę. Zastosowanie formy NTG-CD ogranicza zmianę zabarwienia w maściach lecz nie w kremach. Ponieważ w kremie zawierającym NTG-CD w wyniku dysocjacji obecna jest również wolna NTG (tak jak w przypadku kremu z NTG-cP) można przypuszczać, że zmiana zabarwienia dotyczy interakcji substancji czynnej z substancjami pomocniczymi. Żółknięcie występuje również w próbkach chronionych od światła, nie jest więc wykluczone występowanie interakcji pomiędzy składnikami podłoża a NTG, jednakże nie wpływa to na trwałość chemiczną NTG.

Obawy co do trwałości oraz zgodności podłoża emulsyjnego z kompleksem NTG-CD wzbudził nieprzyjemny „octowy” zapach, który powstawał w trakcie inkorporowania kompleksu do kremu, nie występujący w przypadku maści absorpcyjnej. W trakcie przechowania próbek kremów woń ulegała nasileniu (*Wyniki, tabela 30*). Należy dodać, że zawiesiny wodne NTG-CD były bezzapachowe, w związku z czym zachodzące zmiany nie wynikają jedynie z obecności wody, a przyczyna jest bardziej złożona.

Obserwacje mikroskopowe preparatów potwierdzają występowanie interakcji NTG-CD z podłożem w kremach. Obraz mikroskopowy, w tym zmniejszenie się liczby cząstek stałych, wskazuje na rozpuszczanie się kryształów CD, ich rozkład lub innego rodzaju interakcje (*Wyniki, ryc. 43, tabela 31*). Zmiany obrazu pogłębiają się w trakcie pierwszych 3 miesięcy przechowywania i są zależne od temperatury. Pozostałe w podłożu cząstki mają owalny kształt, bez ostrych krawędzi.

Zanik kryształów nie jest związany z ich rozpuszczaniem w ciekłych składnikach podłoża, ponieważ CD są nierozpuszczalne zarówno w parafinie jak i w mirystynianie izopropylu. Wykazano również, że wprowadzenie mirystynianu do podłoża bezwodnego nie zmienia kinetyki uwalniania, w związku z czym nie powinno dochodzić do bezpośrednich oddziaływań pomiędzy wnętrzem CD a tą cieczą.

W przypadku rozcierki NTG-cP w czasie przechowywania nie dochodzi do zmian zarówno w ilości jak i jakości rozproszonych cząstek stałych. Również badane maści zawierające kompleks NTG-CD, są trwałe i charakteryzowały się homogennością rozproszenia substancji oraz brakiem zmian w morfologii i ilości kryształów (*Wyniki, ryc. 42*).

Oznaczona wartość pH kremów wynosi: 5,1 i 5,5 odpowiednio dla KCD i KcP (*Wyniki, tabela 32*) jest więc podobna dla obu form NTG i zbliżona do fizjologicznego pH skóry. Dodatkowo lekko kwaśny odczyn fazy wodnej jest korzystny ze względu na trwałość NTG ponieważ roztwory o pH w zakresie od 5 do 7 są najmniej podatne na hydrolizę [116]. Preparaty były trwałe i po 12 miesiącach jedynie w kremie z kompleksem (KCD) pH uległo nieznacznemu obniżeniu (o 0,5 jednostki).

Istotne dla oceny trwałości preparatu jest określenie zawartości substancji czynnej (*Metody, pkt. 7.6.*). Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że niezależnie od temperatury przechowywania i użytej formy NTG jest stosunkowo trwała chemicznie w obu typach podłoża (*Wyniki, tabela 33*). Jedynie test prowadzony w warunkach przyspieszonego starzenia (40°C) przez okres 12 miesięcy wskazuje na dodatkowy stabilizujący efekt formy skompleksowanej. Spośród badanych preparatów tylko w maści MCD zawartość NTG po 12 miesiącach wynosi ponad 90%, natomiast w pozostałych preparatach (McP, KcP i KCD) zawartość ulega obniżeniu do 80%. Uzyskane dane potwierdzają, że NTG w kremie prawdopodobnie przechodzi w formę wolną w wyniku dysocjacji i/lub interakcji CD ze składnikami podłoża. Szybciej zachodzące zmiany zabarwienia (głównie preparaty z NTG-cP) oraz zmiana zapachu kremów z NTG-CD nie są potwierdzone obserwowanym profilem zmian stężenia NTG w maściach i kemach szczególnie, że nie występuje duży wzrost produktów rozkładu.

Uzyskane wyniki charakteryzują się również dość dużymi wartościami odchyień (nawet do 10%), a w pojedynczych próbach maści oraz kremu z NTG-cP oznaczana zawartość przekracza wartość początkową. Obserwowane różnice mogą być wynikiem niehomogenności z powodu zmian morfologii cząstek cP i tworzenia agregatów (*Wyniki, ryc. 42 i 43*).

Dla oceny właściwości preparatów farmaceutycznych, obecnie najważniejszym testem jest badanie uwalniania, jednakże dla maści nie jest ono tak powszechnie stosowane jak dla tabletek. W przedstawionej pracy dowiedziono, że to badanie jest rzeczywiście niezwykle cenne dla oceny trwałości preparatów. Badania uwalniania umożliwia całkowitą

ocenę trwałości fizykochemicznej maści, pozwala na obserwację zmian właściwości reologicznych (np. lepkości), zmian w składzie preparatu, między innymi wynikających z rozkładu składników (np. hydrolizy, fotolizy) lub ich interakcji. Badanie to, jak wcześniej wykazano, pozwala na ocenę trwałości kompleksu w podłożach półstałych.

Badanie uwalniania prowadzono z zastosowaniem aparatu VK (*Metody, pkt. 7.2.1.*). W czasie przechowywania obserwowano wzrost szybkości uwalniania w przechowywanych preparatach, zależny od formy substancji leczniczej, typu podłoża i warunków przechowywania (*Wyniki, ryc. 47 i 48, tabela 35*). Jedynie w przypadku maści zawierających kompleks inkluzyjny, przechowywanych w temp. 4°C, nie dochodzi do istotnych zmian w szybkości uwalniania w czasie do 12 miesięcy. Wzrost uwalniania z maści NTG-CD przechowywanych w temp. 25°C był niewielki (po 12 miesiącach wynosił około 20%), natomiast znaczącą zmianę szybkości uwalniania (wzrost nawet o 60%) obserwowano w maściach zawierających NTG-cP (przechowywanych w temp. 4°C i 25°C). Szybkość uwalniania z kremu NTG-cP wzrastała (maksymalnie o 20%), niezależnie od temperatury przechowywania, w znacznie mniejszym stopniu niż z maści (nawet o 60%). Różnica wynikająca z zastosowania CD w maściach była więc bardzo istotna.

Tak dużego wpływ na stabilizację profili uwalniania NTG w wyniku kompleksowania nie obserwowano w kremach. Na zmiany w kinetyce uwalniania z KCD duży wpływ miała temperatura przechowywania, niska temperatura (4°C) zwiększała trwałość kompleksu w podłożu emulsyjnym. W wyniku obecność wody (20%) w podłożu bardzo szybko dochodzi do wyparcia NTG z połączenia kompleksowego.

Stała trwałości kompleksu jest parametrem zależnym od temperatury i wraz z jej wzrostem maleje [5]. Zależność ta tłumaczy zwiększoną trwałość zarówno maści jak i kremu z NTG-CD w niskiej temperaturze oraz brak wpływu temperatury na uwalnianie z preparatów z NTG-cP. Na podstawie uzyskanych wyników trudno jednoznacznie ocenić, czy przejście NTG do formy wolnej jest jedynie wynikiem dysocjacji kompleksu w czasie czy również interakcji kompleks-podłoże. Można przypuszczać, biorąc pod uwagę zdjęcia mikroskopowe oraz natychmiastowe pojawienie się zapachu, że do oddziaływania składników podłoża (rozpuszczalników) z CD dochodzi już w trakcie sporządzania preparatu.

Badania takie jak dostępność farmaceutyczna czy konsystencja stanowią podstawowe testy, które są konieczne dla opracowania produktu. Ze względu na brak korelacji *in vivo/in vitro* w przypadku maści, nie jest jednak możliwa ocena przenikania

leku na podstawie badań uwalniania. Preparaty dermatologiczne aplikowane na skórę uwalniają substancję leczniczą poprzez bezpośrednią dyfuzję leku z podłoża do warstwy rogowej stanowiącej barierę lipofilową (10 – 50 μm), którą tworzą warstwowo ułożone, ściśle upakowane komórki z przestrzeniami lipidowymi. W modelach doświadczalnych *in vitro* dyfuzja zachodzi więc z podłoża maściowego do hydrofilowego kompartmentu (płynu akceptorowego), natomiast w warunkach aplikacji *in vivo* akceptor ma charakter lipofilowy i dyfuzja zależy od współczynnika podziału podłoże/warstwa rogowa. Z tego względu w przypadku maści, poza badaniem dostępności farmaceutycznej, konieczne jest wykonanie badań przenikania przez skórę. Najczęściej, ze względów praktycznych, testy przenikania wykonuje się *in vitro* stosując izolowaną skórę zwierzęcą lub ludzką (badania *ex vivo*). Ocena właściwości biofarmaceutycznych maści z NTG była ważnym etapem pracy. W celu określenia wpływu czynników technologicznych na przenikanie NTG badania prowadzono dla zawiesiny wodnej NTG-cP oraz dla maści i kremu z NTG-CD i NTG-cP (*Metody, pkt. 8*).

Na podstawie wyników uzyskanych dla zawiesiny zawierającej niemodyfikowaną formę NTG wyznaczono powtarzalność metody (*Wyniki, ryc. 49*). Wyniki uzyskane z użyciem modeli biologicznych z reguły charakteryzują się dość dużą zmiennością. Otrzymane dane charakteryzowały się dostateczną do porównania preparatów powtarzalnością (różnica pomiędzy wartością średnią a pojedynczymi próbami maksymalnie wyniosła 30%).

Na podstawie badania przezskórnej penetracji NTG z zawiesiny (*Wyniki, ryc. 50*) można stwierdzić, że NTG łatwo penetruje do warstwy rogowej naskórka i ulega w niej znacznej kumulacji. Po 3 h aplikacji stężenie NTG w naskórku jest 2-krotnie wyższe niż w skórze właściwej. Takie właściwości substancji są zgodne z jej charakterystyką fizykochemiczną (niska masa cząsteczkowa, lipofilowość, występowanie w formie niezdysonowanej) które wskazują, że NTG charakteryzuje się dużym powinowactwem do warstwy rogowej i łatwo pokonuje lipofilową barierę skórną. Po 3 h badania większość zabsorbowanej NTG znajdowała się w skórze właściwej, natomiast praktycznie nie wykrywano NTG w płynie akceptorowym.

Przenikanie NTG do skóry z preparatów półstałych było znacznie mniejsze niż z zawiesiny wodnej zarówno dla formy skompleksowanej jak i nieskompleksowanej (odpowiednio 1,6 i 2,4 razy), co można tłumaczyć lepkością podłoża i jego lipofilowością (*Wyniki, ryc. 52*). Nie jest jasne, dlaczego większa ilość NTG przenika do skóry z maści

niż z kremów. Prawdopodobnie jednym z czynników, które zwiększają przenikanie z lipofilowego podłoża jest wywołana przez nie okluzja, która zwiększa stopień nawodnienia tkanki (podłoże emulsyjne posiada niewielkie właściwości okluzyjne). Dla terpenów (lipofilowa substancja ciekła) zawartych w kremach o/w oraz w emulsji obserwowano mniejsze przenikanie względem roztworów olejowych [191].

Uzyskane wyniki wskazują iż właściwym podłożem jest maść absorpcyjna, zarówno ze względu na trwałość jak i na modyfikację uwalniania. W badaniach rozwojowych zwrócono szczególną uwagę na pełną kontrolę jakości maści, dzięki czemu możliwa była eliminacja interakcji kompleksu z niektórymi substancjami pomocniczymi (Empiwax, etanol).

NTG stosowana w leczeniu szczeliny odbytu powinna penetrować do skóry właściwej i mięśnia podskórnego (zwieracza odbytu), jednakże nie powinna szybko osiągać naczyń żylnych, gdyż jej działanie ogólne jest przyczyną występowania działań niepożądanych. Opracowany preparat powstały zawierający kompleks NTG-CD w podłożu bezwodnym spełnia wszystkie przyjęte w pracy wymagania względem maści przeznaczonej do terapii szczeliny odbytu. Otrzymana maść charakteryzowała się spowolnionym uwalnianiem NTG *in vitro* oraz wolniejszym jej przenikaniem do skóry ludzkiej *ex vivo*. Uzyskano również zwiększoną trwałość w porównaniu z preparatem zawierającym formę nieskompleksowaną (NTG-cP). Pomimo wykonanych badań *ex vivo*, kolejnym etapem przed wprowadzeniem tego produktu powinna być weryfikacja skuteczności terapeutycznej oraz ocena eliminacji działań niepożądanych, wykonana w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów.

VI. WNIOSKI

W pracy zaprezentowano technologiczne, analityczne i biofarmaceutyczne badania tabletek podjęzykowych i maści zawierających kompleks inkluzyjny nitrogliceryny z β -cyklodekstryną (NTG-CD). Rezultaty badań porównawczych postaci leków zawierających NTG-CD i NTG-cP (rozcierka NTG z krospowidonem) pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków, dotyczących możliwości zastosowania NTG-CD w technologii farmaceutycznej:

1. Dobór właściwych substancji pomocniczych umożliwił otrzymanie tabletek podjęzykowych zawierających NTG-CD charakteryzujących się krótkim czasem rozpadu i odpowiednimi właściwościami aplikacyjnymi. Spośród dwóch wybranych formułacji, układ zawierający Starch 1500 zapewniał większą niż StarLac trwałość NTG w kompleksie.
2. Zastosowanie formy skompleksowanej NTG zwiększało jej trwałość w tabletkach podjęzykowych. Mimo to w badaniach długoterminowych nie uzyskano wymaganej dla celów rejestracyjnych trwałości NTG w tabletkach.
3. Dzięki zastosowaniu formy NTG-CD w lipofilowej maści i w kremie w/o uzyskano spowolnione uwalnianie NTG w warunkach *in vitro*. Natomiast z powodu dysocjacji kompleksu nie uzyskano takiego efektu stosując podłoże hydrożelowe.
4. Badania uwalniania poprzedzono wyborem optymalnych warunków doświadczalnych. Spośród trzech stosowanych komór (D, VK i MU), różniących się sposobem mieszania płynu akceptorowego i grubością warstwy preparatu, komora ekstrakcyjna (VK) była odpowiednia zarówno do badania żeli jak i maści.
5. Badania uwalniania pozwoliły na ocenę trwałości kompleksu NTG-CD w stosowanych podłożach oraz na wykrycie interakcji zachodzących pomiędzy kompleksem a substancjami pomocniczymi. Stwierdzono, że dodatek laurylosiarczanu sodu (maść absorpcyjna) oraz etanolu (hydrożel) prowadzi do wzrostu szybkości uwalniania NTG z preparatów zawierających NTG-CD.

6. Zastosowanie podłoży lipofilowych bezwodnych (maść absorpcyjna) umożliwia sporządzenie trwałej maści o modyfikowanym uwalnianiu zawierającej kompleks inkluzyjny NTG-CD. Natomiast w podłożu emulsyjnym (krem w/o) dochodzi do szybkiego (1 miesiąc) zaniku tego efektu. Długoterminowe badania trwałości (12 miesięcy) potwierdziły brak zmian właściwości reologicznych maści i kremów z NTG-CD.

7. Udowodniono, że opracowane preparaty (maść bezwodna i krem w/o) z NTG-CD zapewniają mniejsze przenikanie NTG do skóry ludzkiej *ex vivo* niż maści z NTG-cP. Ponadto dyfuzja NTG do skóry jest wolniejsza z kremu niż z lipofilowej maści absorpcyjnej.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Loftsson T., Duchene D.: Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 1-11
2. Loftsson T., Brewster M.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1017-1024
3. Del Valle M.: Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39 (2004) 1033-1046
4. <http://www.cyclolab.hu/dwn/szentevienna2.pdf> (Szente L.: Cyclodextrins In 2010: Unusual harmony between science, technology and industry. 15th International Cyclodextrin Symposium, Vienna)
5. Fromming K.H., Szejtli J.: Topics in inclusion science. Vol. 5: Cyclodextrins in pharmacy, Kluwer Academic Publishers, London, 1994
6. Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J. (red.): Handbook of pharmaceutical excipients, Wydanie IV, Pharmaceutical Press, London, 2003, s. 186-189
7. Swarbrick J. (red.): Encyclopedia of pharmaceutical technology. Vol 2; Mosher G., Thompson D.O.: Complexation: cyclodextrins. Informa Healthcare, 2007, s. 671-695
8. Irie T., Uekama K.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 147-161
9. Matsuda H., Arima H.: Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 81-89
10. Stella V.J., Rajewski R.A.: Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 14 (1997) 556-565
11. Uekama K.: Design and evaluation of cyclodextrin – based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 900–913
12. <http://csi.chemie.tu-darmstadt.de/ak/imm/redirect.cgi?filename=http://csi.chemie.tu-darmstadt.de/ak/imm/publications/papers/paper11/index.html> (Lichtenthaler F.W., Immel S.: On the hydrophobic characteristic of cyclodextrins: computer – aided visualization of molecular lipophilicity patterns. Molecular modeling of saccharides, IX)
13. <http://www.wacker.com/cms/en/products-markets/productselector/productselector.jsp?cmd=changebrand&brandfilter=&brand=12#redResult> (Wacker Chemie; charakterystyka kompleksów Cavamax®)
14. Miller L.A., Carrier R.L., Ahmed I.: Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1691–1707
15. Stella V.J., Rao V.M., Zannou E.A., Zia V.: Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv. Drug. Deliv.* 36 (1999) 3-16
16. Bibby D.C., Davies N.M., Tucker I.G.: Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 1-11
17. Cal K., Centkowska K.: Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2007) 467 – 478

18. Proniuk S., Blanchard J.: Influence of degree of substitution of cyclodextrins on their colligative properties in solution. *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1086-1090.
19. Rajewski R.A., Stella V.J.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1142-1169
20. Til H.P., Bar A.: Subchronic (13-week) oral toxicity study of gamma-cyclodextrin in dogs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 27 (1998) 159-165
21. Lina B.A., Bar A.: Subchronic (13-week) oral toxicity study of alpha-cyclodextrin in dogs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39 (2004) 27-33
22. Irie T., Tsunenari Y., Uekama K., Pitha J.: Effect of bile on the intestinal absorption of α -cyclodextrin in rats. *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 41-44
23. Olivier P., Verwaerde F., Hedges A.R.: Subchronic toxicity of orally administered beta-cyclodextrin in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.* 10 (1991) 407-419
24. Loftsson T., Brewster M.E., Masson M.: Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *Am. J. Drug. Delivery* 2 (2004) 1-15
25. <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/en/index.html>
26. Boulmedarat L., Bochot A., Lesieur S., Fattal E.: Evaluation of buccal methyl- β -cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 1300-1309
27. Asai K., Morishita M., Katsuta H., Hosoda S., Shinomiya K., Noro M., Nagai T., Takayama K.: The effects of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rat nasal mucosa. *Int. J. Pharm.* 246 (2002) 25-35
28. Agu R.U., Jorissen M., Willems T., Van den Mooter G., Kinget R., Verbeke N., Augustijns P.: Safety assessment of selected cyclodextrins – effect on ciliary activity using a human cell suspension culture model exhibiting *in vitro* ciliogenesis. *Int. J. Pharm.* 193 (2000) 219-226
29. Jansen T., Xhonneux B., Mesens J., Borgers M.: Beta-cyclodextrins as vehicles in eye-drop formulations: an evaluation of their effects on rabbit corneal epithelium. *Lens Eye Toxic. Res.* 7 (1990) 459-468
30. Saarinen-Savolainen P., Jarvinen T., Araki-Sasaki K., Watanabe H., Urtti A.: Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm. Res.* 15 (1998) 1275-1280
31. Stefansson E., Loftsson T.: Cyclodextrins in eye drop formulations. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 44 (2002) 23-27
32. Piel G., Moutard S., Uhoda E., Pilard F., Pierard G.E., Perly B., Delattre L., Evrard B.: Skin compatibility of cyclodextrins and their derivatives: a comparative assessment using a corneoxenometry bioassay. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 479-482
33. Loftsson T., Masson M.: Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 225 (2001) 15-30

34. Shaker D.S., Ghanem A.H., Li S.K., Warner K.S., Hashem F.M., Higuchi W.I: Mechanistic studies of the effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on in vitro transdermal permeation of corticosterone through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 1-11
35. Legendre J.Y., Rault I., Petit A., Luijten W., Demuyneck I., Horvath S., Ginot Y.M., Cuine A.: Effects of β -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug S-9977. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (1995) 311-322
36. Loftsson T., Brewster M.E.: Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. *Pharm Technol. Eur. maj* (1997) 26-34
37. Davis M.E., Brewster M.E.: Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Drug Discov.* 3 (2004) 1023-1035
38. Szejtli J., Szente L.: Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005) 115–125
39. Szejtli J.: Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 52 (2005) 1-11
40. http://www.bridion.com/HCP/About_Bridion/Introducing_BRIDION/index.asp
41. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000885/WC500052310.pdf (charakterystyka preparatu Bridion)
42. <http://cydexpharma.com/approvedproducts.html> (charakterystyka preparatu Nexterone)
43. Sinha V., Nanda A., Kumria R.: Cyclodextrins as sustained-release carriers. *Pharm Tech. październik* (2002) 36-44
44. Sotthivirat S., Haslam J.L., Lee P.I., Rao V.M., Stella V.J.: Release mechanisms of a sparingly water-soluble drug from controlled porosity-osmotic pump pellets using sulfobutylether- β -cyclodextrin as both a solubilizing and osmotic agent. *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1992–2000
45. Motoyama K., Nagatomo K., Elazim S.O., Hirayama F., Uekama K., Arima H.: Potential use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for preparation of orally disintegrating tablets containing *dl*- α -tocopheryl acetate, and oily drug. *Chem. Pharm. Bull.* 57 (2009) 1206-1212
46. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K.: Cyclodextrins in drug delivery: an update review. *AAPS PharmSciTech.* 6 (2005) 329–355
47. Patel N.V., Chotai N.P., Patel M.P.: Tablet formulation studies on an oxcarbazepine- β -cyclodextrin binary system. *Pharmazie* 63 (2008) 275-281
48. Singh L.S., Jain S., Muthu M.S., Tilak R.: Preparation and evaluation of buccal bioadhesive tablets containing clotrimazole. *Curr. Drug Deliv.* 5 (2008) 133–141
49. Jug M., Becirevic-Lacan M.: Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccoadhesive tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 251 – 260
50. Loftsson T.: Cyclodextrins and the biopharmaceutics classification system of drugs. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 44 (2002) 63-67

51. patent nr. 4,073,931, Akito et al.: Nitroglycerine inclusion compounds with cyclodextrin and composition containing same., USA, 1978
52. Moreno-Cerezo J.M., Cordoba-Diaz M., Cordoba-Diaz D.: A stability study of tetracycline and tetracycline cyclodextrins in tablets using a new HPLC method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 417-426
53. Fridiksdottir H., Loftsson T., Gudmundsson J.A., Bjarnson G.J., Kjeld M., Thorsteinsson T.: Design and in vivo testing of 17 β -estradiol-HPCD sublingual tablets. *Pharmazie* 51 (1996) 39–41
54. Pitha J., Harman S.M., Michel M.E.: Hydrophilic cyclodextrins derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. *J. Pharm. Sci.* 75 (1986) 165-166
55. <http://www.roquette-pharma.com>
56. Pande G., Shangraw R.: Characterization of β -cyclodextrin for direct compression tableting: II The role of moisture in the compactibility of β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 124 (1995) 231–239
57. Suihko E., Korhonen O., Jarvinen T., Ketolainen J., Jarho P., Laine E., Paronen P.: Complexation with tolbutamide modifies the physicochemical and tableting properties of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 137 – 145
58. Tasic L.J., Pintye-Hodi K., Szabo-Revesz P.: Evaluation of the compression behavior of paracetamol tablets produced by dispersion in β -cyclodextrin. Part I: Scanning electron microscopic study of tablets. *J. Incl Phen. Molec. Recog. Chem.* 28 (1997) 299-314
59. Ventura C.A. , Giannone I., Musumeci T., Pignatello R., Ragni L., Landolfi C., Milanese C., Paolino D., Puglisi G.: Physico-chemical characterization of disoxaril-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex and in vitro permeation studies. *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 233–240
60. Gu F., Cui F., Gao Y.: Preparation of prostaglandin E₁-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex and its nasal delivery in rats. *Int. J. Pharm.* 290 (2005) 101-108
61. Kim E.Y., Gao Z., Park J., Li H., Han K.: rhEGF/HP- β -CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 159–167
62. Proniuk S., Liederer B.M., Dixon S.E., Rein J.A., Kallen M.A., Blanchard J.: Topical formulation studies with DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) and cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 101–110
63. Tirucherai G.S., Mitra A.K.: Effect of hydroxypropyl beta cyclodextrin complexation on aqueous solubility, stability, and corneal permeation of acyl ester prodrugs of ganciclovir. *AAPS PharmSciTech.* 4 (2003)
64. Lopez R.F.V., Collett J.H., Vitoria M., Bentley L.B.: Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *Int. J. Pharm.* 200 (2000) 127-132
65. Uekama K., Adachi H., Irie T., Yano T., Saita M., Noda K.: Improved transdermal delivery of prostaglandin E₁ through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl-beta-cyclodextrin and penetration enhancers. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 119-121

66. Scalia S., Molinari A., Casolari A., Maldotti A.: Complexation of the sunscreen agent, phenylbenzimidazole sulphonic acid with cyclodextrins: effect on stability and photo-induced free radical formation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 241–249
67. Scalia S., Casolari A., Iaconinoto A., Simeoni S.: Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1181–1189
68. Yang J., Wiley C.J., Godwin D.A., Felton L.A.: Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 605-612
69. Anselmi C., Centini M., Maggiore M., Gaggelli N., Andreassi M., Buonocore A., Beretta G., Facino R.M.: Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 645-652
70. Scalia S., Tursilli R., Iannuccelli V.: Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: Effect on photostability and human stratum corneum penetration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 29-34
71. Lin H.S., Chean C.S., Ng Y.Y., Chan S.Y., Ho P.C.: 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid. *J. Clin. Pharm. Ther.* 25 (2000) 265–269
72. Lin H.S., Chan S.Y., Low K.S.Y., Shoon M.L., Ho P.C.: Kinetic study of a 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based formulation of all-trans-retinoic acid in sprague-dawley rats after oral or intravenous administration. *J. Pharm. Sci.* 199 (2000) 49–57
73. Caddeo C., Manconi M., Valenti D., Pini E., Sinico C.: Photostability and solubility improvement of β -cyclodextrin-included tretinoin. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 59 (2007) 293-300
74. Brisaert M., Plaizier-Vercammen P.: Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 49–57
75. Dias M.M.R., Raghavan S.L., Pellett M.A., Hadgraft J.: The effect of β -cyclodextrins on the permeation of diclofenac from supersaturated solutions. *Int. J. Pharm.* 263 (2003) 173-181
76. Jug M., Becirevic-Lacan M., Kwokal A., Cetina-Cizmek B.: Influence of cyclodextrin complexation on piroxicam gel formulations. *Acta. Pharm.* 55 (2005) 223–236
77. Huang L., Allen E., Tonelli A.: Study of the inclusion compounds formed between α -cyclodextrin and high molecular weight poly(ethylene oxide) and poly(ϵ -caprolactone). *Polymer* 39 (1998) 4857–4865
78. Chan L.W., Kurup T.R.R., Muthaiah A., Thenmozhiyal J.C.: Interaction of p-hydroxybenzoic esters with beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 195 (2000) 71-79
79. Loftsson T., Stefansdottir O., Friourisdottir H., Guomundsson O.: Interactions between preservatives and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (1992) 1477-1484

80. Veiga M.D., Ahsan F.: Influence of surfactants (present in the dissolution media) on the release behavior of tolbutamide from its inclusion complex with β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (2000) 291–299
81. Rode T., Frauen M., Muller B.W., Dusing H.J., Schonrock U., Mundt C., Wenck H.: Complex formation of sericoside with hydrophilic cyclodextrins: improvement of solubility and skin penetration in topical emulsion based formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55 (2003) 191–198
82. Krasowska H., Czechowska D., Bura I.: In vitro release fenbufen and its inclusion complexes with cyclodextrins from different ointment bases. *Acta. Pol. Pharm.* 54 (1997) 23-30
83. Uekama K., Masaki K., Arimori K., Irie T., Hirayama F.: Effects of β - and dimethyl- β -cyclodextrins on release and percutaneous absorption behaviors of prednisolone from some ointments bases, *Yakugaku Zasshi* 107 (1987) 449–456
84. Loftsson T., Sigfusson S.D., Sigurdsson H.H., Masson M.: The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: the aqueous diffusion layer. *S.T.P. Pharm. Sci.* 13 (2003) 125-131
85. Pose-Vilarnovo B., Rodriguez-Tenreiro C., Santos J.F., Vazquez-Doval J., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Torres-Labandeira J.J.: Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. *J. Controlled Release* 94 (2004) 351–363
86. Preiss A., Mehnert W., Fromming K.: In vitro hydrocortisone release from ointments in presence of cyclodextrins. *Pharmazie* 49 (1994) 902–907
87. Arima H., Miyaji T., Irie T., Hirayama F., Uekama K.: Possible enhancing mechanism of the cutaneous permeation of 4-biphenylacetic acid by β -cyclodextrin derivatives in hydrophilic ointment. *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 582-586
88. Shigeyama M., Hgaya T., Kawashima Y., Takeuchi H., Hino T.: Modification of the physicochemical properties of minocycline hydrochlorid ointment with cyclodextrines for optimum treatment of bedsore. *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000) 617–622
89. Shigeyama M.: Preparation of a gel-forming ointment base applicable to the recovery stage of bedsore and clinical evaluation of a treatment method with different ointment bases suitable to each stage of bedsore. *Yakugaku Zasshi* 142 (2004) 55–67
90. Uekama K., Masaki K., Arimori K., Irie T., Hirayama F.: Effects of β - and dimethyl β -cyclodextrins on release and percutaneous absorption behaviors of prednisolone from some ointment bases. *Yakugaku Zasshi* 107 (1987) 449–456
91. Manosroi J., Apriyani M., Foe., K., Manosroi A.: Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 293 (2005) 235–240
92. Celebi N., Kislal O., Tarmici N.: The effect of β -cyclodextrin and penetration additives on the release of naproxen from ointment bases. *Pharmazie* 48 (1993) 914–917
93. Siemoneit U., Shmitt C., Alvarez-Lorenzo C., Luzardo A., Otero-Espinar F., Concheiro A., Blanco-Mendez J.: Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability. *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 66-74

94. Rodriguez-Tenreiro C., Alvarez-Lorenzo C., Rodriguez-Perez A., Concheiro A., Torres-Labandeira J.J.: Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66 (2007) 55-62
95. Dalmora M.E, Dalmora S.L., Oliveira A.G.: Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 45–55
96. Bilensoy E., Rouf M.A., Vural I., Sen M., Hincal A.A.: Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech.* 7 (2006) 1–7
97. Davaran S., Rashidi M.R., Khandaghi R., Hashemi M.: Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch. *Pharm. Res.* 51 (2005) 233-237
98. Loftsson T., Olafsdottir B., Bodor N.: The effect of cyclodextrins on transdermal delivery of drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37 (1991) 30–33
99. Sarveiya V., Templeton J.F., Benson H.A.E.: Inclusion complexation of the sunscreen 2-hydroxy-4-methoxy benzophenone (oxybenzone) with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: effect on membrane diffusion. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 49 (2004) 275–281
100. Loftsson T., Olafsson J.: Cyclodextrins: new delivery systems in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 37 (1998) 241–246
101. Preiss A., Mehnert W., Fromming K.H.: Penetration of hydrocortisone into excised human skin under the influence of cyclodextrins. *Pharmazie* 50 (1995) 121-126
102. Lopez R., Collet J., Bentley M.: Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *Int. J. Pharm.* 200 (2000) 127-132
103. Kear C.L., Yang J., Godwin D.A., Felton L.A.: Investigation into the mechanism by which cyclodextrins influence transdermal drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (2008) 692–697
104. Ventura C.A., Tommasini S., Falcone A., Falcone A., Giannone I., Paolino D., Sdrafkakis V., Mondello M.R., Puglisi G.: Influence of modified cyclodextrins on solubility and percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Int. J. Pharm.* 314 (2006) 37-45
105. Godwin D.A., Wiley C.J., Felton L.A.: Using cyclodextrin complexation to enhance secondary photoprotection of topically applied ibuprofen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62 (2006) 85–93
106. Sridevi S., Diwan P.V.: Optimized transdermal delivery of ketoprofen using pH and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as co-enhancers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 151-154
107. Siguroardottir A.M., Loftsson T.: The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 73-78
108. Simeoni S., Scalia S., Benson H.A.E.: Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. *Int. J. Pharm.* 280 (2004) 163-171

109. Babu R.J., Pandit J.K.: Effect of cyclodextrins on the complexation and transdermal delivery of bupranolol through rat skin. *Int. J. Pharm.* 271 (2004) 155-165
110. Felton L.A., Wiley C.J., Godwin D.A.: Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 1117-1124
111. Padula C., Pappani A., Santi P.: In vitro permeation of levothyroxine across the skin. *Int. J. Pharm.* 349 (2008) 161–165
112. Zi P., Yang X., Kuang H., Yang Y., Yu L.: Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. *Int. J. Pharm.* 358 (2008) 151-158
113. Bounoure F., Lahiani-Skiba M., Barbot C., Sughir A., Mallet E., Jezequel S., Didier L., Arnaud P., Skiba M.: Effect of partially methylated β cyclodextrin on percutaneous absorption of metopimazine. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 57 (2007) 191-195
114. Valjakka-Koskela R., Hirvonen J., Monkkonen J., Kiesvaara J., Antila S., Lehtonen L., Urtti A.: Transdermal delivery of levosimendan. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 343-350
115. Konradsdottir F., Ogmundsdottir H., Sigurdsson V., Loftsson T.: Drug targeting to the hair follicles: a cyclodextrin-based drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 266–269
116. Connors K. A., Amidon G. L., Stella V. J.: Chemical stability of pharmaceuticals. A handbook for pharmacists, John Wiley & Sons Inc., Toronto 1986, 625–629
117. Xu Q.A., Trissel L.A., Stability-indicating HPLC methods for drug analysis. Pharmaceutical Press., Washington, 2003, 474-476
118. Moffart A.C., Oselton M.D., Widdop B.: Clarke's analysis of drugs and poisons. Wydanie III, Vol. 2, Pharmaceutical Press, London, 2004, s. 1084
119. Iga K., Ogawa Y.: Sustained-release buccal dosage forms for nitroglycerin and isosorbide dinitrate: increased bioavailability and extended time of absorption when administered to dogs. *J. Controlled Release* 49 (1997) 105-113
120. Clarke E.G.C., Moffat A.: Clarke's isolation and identification of drugs. Wydanie II, The Pharmaceutical Press, London, 1986, s. 643
121. Dollery C.: Therapeutic drugs, Vol 1, Churchill Livingstone, London, 1991, s. 46-50
122. USP DI, Wydanie XXI, Drug information for the health care professional. Vol 1, Micromedex, Englewood, 2001, s. 2208-2216
123. Sweetman S.C., Martindale. Wydanie 35, The complete drug reference. Pharmaceutical Press, London 2007, s. 1165-1166
124. Kostowski W., Herman Z.S.: Farmakologia. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy. PZWL, Warszawa, 2005, s. 501–505
125. Centkowska K, Żebrowska M., Sznitowska M.: Zastosowanie recepturowych maści z diltiazemem lub nitrogliceryną w terapii przewlekłej szczeliny odbytu. *Terapia i Leki.* 1 (2008) 51-55

126. Cleary G., Topical delivery systems in: Shah V.P., Maibach H.I., Topical Drug Bioavailability, bioequivalence and penetration, Plenum Press, New York (1993), s. 37–42
127. Lund W. (red.): The pharmaceutical codex. Principles and practice of pharmaceutics. Wydania XII, The Pharmaceutical Press, London, (1994), s. 884–888
128. Tracy T.S, Bowman L., Black C.D.: Nitroglycerin delivery through a polyethylene-lined intravenous administration set. *Am. J. Hosp. Pharm.* 46 (1989) 2031–2563
129. Driver P.S., Jarvi E.J., Gratzner P.L.: Stability of nitroglycerin as nitroglycerin concentrate for injection stored in plastic syringes. *Am. J. Hosp. Pharm.* 50 (1993) 2561–2563
130. Salomies H.E.M., Heinonen R.M., Topilla M.A.I.: Sorptive loss of diazepam, nitroglycerin and warfarin sodium to polypropylene-lined infusion bags (Softbags). *Int. J. Pharm.* 110 (1994) 197-201
131. Fusari S.A.: Nitroglycerin sublingual tablets II: preparation and stability of a new, stabilized, sublingual molded nitroglycerin tablet. *J. Pharm. Sci.* 62 (1973) 2012–202
132. Dorsch B., Shangraw R.: Stability of stabilized nitroglycerin tablet in typical distribution and administration systems. *Am. J. Hosp. Pharm.* 32 (1975) 795-808
133. Fung H., Yap S.K., Rhodes C.: Development of a stable sublingual nitroglycerin tablet II: formulation and evaluation of tablets containing povidone. *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 558–560
134. Pikal M.J., Lukes A.L., Conine J. W.: Effect of nitroglycerin-soluble additives on the stability of molded nitroglycerin tablets. *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 1608–1612
135. Suphajettra P., Strohl J.H., Lim J.K.: Nitroglycerin stability in polyethylene glycol 400 and povidone solutions. *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 1394–1396
136. Fung H., Yap S.K., Rhodes C.T.: Development of a stable sublingual nitroglycerin tablet I: interaction of nitroglycerin with selected macromolecules. *J. Pharm. Sci.* 63 (1974) 1810–1811
137. Goodhart F.W., Gucluyildiz H., Daly R.E., Chafetz L., Ninger F.C.: Stabilized compressed nitroglycerin tablets. *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 1466–1467
138. Page D.P., Carson N.A., Buhr C. A., Flinn P.E., Wells C.E., Randall M.T.: Stability study of nitroglycerin sublingual tablets. *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 140–146
139. Pikal M.J., Bibler D.A., Rutherford B.: Polymer sorption of nitroglycerin and stability of molded nitroglycerin tablets in unit-dose packaging. *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1292–1293
140. Pikal M.J., Lukes A.L., Fells L.F.: Vapor pressure of nitroglycerin in sublingual molded tablets: implications for stability. *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 1278-1284
141. Tomono K., Ueda H., Saitoh T., Saitoh T., Nagai T.: Complexation of nitroglycerin with several β -cyclodextrin polymers by grinding method. *Yakuzaigaku* 48 (1988) 9-16
142. Tomono K., Ueda H., Saitoh T., Nagai T.: Interaction of nitroglycerin with water-soluble β -cyclodextrin polymer. *Yakuzaigaku* 47 (1987) 133-140

143. Stadler-Szoke A., Szejtli J.: The inclusion complex of nitroglycerol β -cyclodextrin. *Acta. Pharm. Hung.* 49 (1979) 30-34.
144. Yamaoka K., Yamagishi Y., Takayama K., Nambu N., Nagai T.: Interaction of nitroglycerin with β -cyclodextrin in solution and in solid state. *Yakuzaigaku* 41 (1981) 231–236
145. Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.: *Leki współczesnej terapii. Encyklopedia dla farmaceuty. Wydanie XII, Split Trading, Warszawa, 2005, 306*
146. Utzig M.J., Kroesen A.J., Buhr H.J.: Concepts in pathogenesis and treatment of chronic anal fissure - a review of the literature. *J. Gastrointest. Surg.* 98 (2003) 968-974
147. <http://www.mp.pl/artykuly/?aid=26090> (Herman R.M., Wałęga P., Cegielný T., Frey J., Kenig J., Nowakowski M., Sałówa J., Snyder K.: Postępy w koloproktologii w 2004 roku. *Medycyna Praktyczna Chirurgia* 2005/01)
148. McLeod R.S., Evans J.: Symptomatic care and nitroglycerin in the management of anal fissure. *J. Gastrointest. Surg.* 6 (2002) 278-280
149. [http:// www.netteranatomy.com/](http://www.netteranatomy.com/) (atlas anatomiczny, Elsevier)
150. Lund J.N., Armitage N.C., Scholefield J.H.: Use of glyceryl trinitrate ointment in the treatment of anal fissure. *Br. J. Surg.* 83 (1996) 776-777
151. Watson S.J., Kamm M.A., Nicholls R.J. Phillips K.S.: Topical glyceryl trinitrate in the treatment of chronic anal fissure. *Br. J. Surg.* 83 (1996) 771-775
152. Bacher H., Mischinger H.J.: Local nitroglycerin for treatment of anal fissures: an alternative to lateral sphincterotomy. *Dis. Colon. Rectum.* 40 (1997) 840-845
153. Lund J.N., Scholefield J.H.: A randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of glyceryl trinitrate ointment in treatment of anal fissure. *Lancet* 349 (1997) 11-14
154. Carapeti E.A., Kamm M.A., McDonald P.J., Chadwick S.J.D., Melville D., Phillips R.K.S.: Randomized controlled trial shows that glyceryl trinitrate heals anal fissures, higher doses are not more effective, and there is a high recurrence rate. *Gut.* 44 (1999) 727-730
155. Brisinda G., Maria G., Bentivoglio A.R., Cassetta E., Gui D., Albanese A.: A comparison of injections of botulinum toxin and topical nitroglycerin ointment for the treatment of chronic anal fissure. *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 65-69
156. Kennedy M.L., Soweter S., Nguyen H., Lubowski D.Z.: Glyceryl trinitrate ointment for the treatment of chronic anal fissure: results of a placebo-controlled trial and long-term follow-up. *Dis. Colon. Rectum.* 42 (1999) 1000-1006
157. Altomare D.F., Rinaldi M., Milito G., Arcana F., Spinelli F., Nardelli N., Scardigno D., Pulvirenti-D'Urso A., Bottini C., Pescatori M., Lovergelio R.: Glyceryl trinitrate for chronic anal fissure - healing or headache? *Dis. Colon. Rectum.* 43 (2000) 174-179
158. Skinner S.A., Polglase A.L., Le C.T., Winnett J.D.: Treatment of anal fissure with glyceryl trinitrate in patients referred for surgical management. *ANZ J. Surg.* 71 (2001) 218-220
159. Pitt J., Williams S., Dawson P.M.: Reasons for failure of glyceryl trinitrate treatment of chronic fissure-in -ano. *Dis. Colon Rectum.* 44 (2001) 864-867

160. Kocher H.M., Steward M., Leather J.M., Cullen P.T.: Randomized clinical trial assessing the side-effects of glyceryl trinitrate and diltiazem hydrochloride in the treatment of chronic anal fissure. *Br. J. Surg.* 89 (2002) 413-417
161. Bielecki K., Kołodziejczak M.: A prospective randomized trial of diltiazem and glyceryltrinitrate ointment in the treatment of chronic anal fissure. *Colorectal Dis.* 5 (2002) 256-257
162. Tjandra J.J., Tan J.J.Y., Lim J.F., Murray-Green C., Kennedy M.L., Lubowski D.Z.: Rectogesic[®] (glyceryl trinitrate 0,2%) ointment relieves symptoms of hemorrhoids associated with high resting anal canal pressure. *Colorectal Dis.* 9 (2006) 457–463
163. http://www.urpl.gov.pl/rejestr_ch/Rectogesic_masc.pdf (ulotka preparatu Rectogesic 0,4%)
164. <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/r/rectogesicoint.htm> (Medsafe - New Zealand Medicines and Medical Devices Safety Authority; Rectogesic 0,2% - information for health professionals)
165. <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/l-unit1/documents/websiteresources/con014889.pdf> (Public assesment report mutual recognition procedure. Rectogesic 0,4% rectal ointment; UK licence no: PL 1650810037)
166. <http://www.paddocklabs.com/html/resource/pdf/Sec%20Artem%2014.2.pdf> (Secundum Artem: Compounding rectal dosage forms, part I, Vol. 14, no. 2)
167. Krzek J., Moniczewska M., Zabierowska - Ślusarczyk G.: The HPLC determination of propane-1,2,3-triyl trinitrate and impurities: (2*RS*)-3-hydroxypropane-1,2-diyl dinitrate and 2-hydroxypropane-1,3-diyl dinitrate in ointment. *J. Pharm. Anal.* 33 (2004) 403–409
168. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002651.pdf (ICH Topic Q 1 A (R2) Stability testing of new drug substances and products, EMEA, 2003)
169. Schramm G., *Reologia. Podstawy i zastosowania.*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 1998, 13-34
170. Brummer R., *Rheology essentials of cosmetic and food emulsions.* Springer, Berlin 2006, 25-50
171. Swarbrick J.: *Encyclopedia of pharmaceutical technology.* Wydanie III, Vol. 6, Augsburg L.A.: Super disintegrants characterization and function. Informa Healthcare, New York, 2007, 3553-3567
172. Gohel M.C.: A review of co-processed directly compressible excipients. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8 (2005) 76–93
173. www.colorcon.com
174. www.meggle-pharma.com
175. www.roquette-pharma.jp (Hauschild K., Picker K.M.: Tableting of StarLac compared to tableting of binary mixtures from spray-dried lactose and maize starch)

176. Cunningham C.R., Kinsey B.R.: Formulation of acetylsalicylic acid tablets or aqueous enteric film coating. *Pharm. Technol. Eur. maj* (2001) 44-53
177. http://www.colorcon.com/literature/marketing/ex/Starch%201500/ex_td_ranitidine2_ver1_aug05.pdf (Direct compression formulation using Starch 1500® with ranitidine HCl (150 mg) tablets, film coated with Opadry® II - 85F Series).
178. Sekiya N., Nishiwaki A., Nishiura A., Yamamoto M., Takeda K., Iohara D., Hirayama F., Arima H., Uekama K.: Improved stability of Opalmon® tablets under humid conditio IV: Effect of polysaccharides and disintegrants on the stability and dissolution property of Opalmon® tablets. *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 7-11
179. Janicki S., Sznitowska M., W. Zieliński, Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków, Ośrodek Informacji Naukowej Polfa, Warszawa (2001), s. 95 – 104, 219 - 224
180. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070930.pdf>
181. Eros I., Abu-Eida E.Y., Csoka I., Santa Z., cerna A., Kover T.: Optimization of drug release rom dermatological semisolid preparations. *Drug Dev. Res.* 59 (2003) 316-325
182. Thakker K.D., Chern W.: Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms-case study. *Dissolution Technologies maj* (2003) 10-15
183. Wu S.T., Shiu G.K., Simmons J.E., Bronaugh R.L., Skelly J.P.: In vitro release o nitroglycerin from topical products by use of artificial membranes. *J. Pharm. Sci.*81 (1992) 1153-1156
184. Samczewka G., Ciałkowska-Rysz A.: Badania porównawcze dostępności farmaceutycznej chlorowodorku i siarczanu morfiny z modelowych maści i hydrożeli. *Polska Medycyna Paliatywna* 5 (2006) 94-107
185. Gordano F., Novak C., Moyano J.R.: Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Tchermochimica Acta* 380 (2001) 123-151
186. Radecki A, Wesołowski M.: Studies on use of differential thermal and thermogravimetric techniques for checking compositions of some drug formulations. *J. Therm. Anal.* 17 (1979) 73-80
187. Ozguney I., Ozcan I., Ertan G., Guneri T.: The preparation and evaluation of sustained release suppositories containing ketoprofen and Eudragit RL 100 by using factorial design. *Pharm. Devel. Technol.* 12 (2007) 97-1
188. Ballmann C., Mueller B.W.: Stabilizing effect of cetostearyl alcohol and glycerylmonstearateas co-emulsifiers on hydrocarbon-free o/w glyceride creams. *Pharm. Dev. Technol.* 13 (2008) 433-445
189. Wesołowski M.: Analiza termiczna w farmacji. *Labolatorium* 4 (2007) 33-36
190. Boulmendarat L., Grossiord J., Fttal E., Bochot A.: Influence of methyl-β-cyclodextrin and liposomes on rheologiczł properties of Carbopol 974P gels. *Int J Pharm.* 254 (2003) 59–64
191. Cal K.: How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination of terpenes? *Arch. Dermatol. Re.* 297 (2006) 311-315