

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

ÚSTAV TECHNOLOGIE LÉKŮ

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Brno 2017

PharmDr. Ivana Lukášová

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

ÚSTAV TECHNOLOGIE LÉKŮ



**VYUŽITIE INŠTRUMENTÁLNYCH METÓD PRI HODNOTENÍ
KVALITY FARMACEUTICKÝCH PRODUKTOV**

Dizertačná práca

Odbor: Farmaceutická technológia – galenická farmácia

Brno 2017

PharmDr. Ivana Lukášová

Vedúci dizertačnej práce:

doc. Mgr. Jan Muselík, Ph.D.

ABSTRAKT

Dizertačná práca na tému „**Využitie inštrumentálnych metód pri hodnotení kvality farmaceutických produktov**,“ je komentovaným prehľadom publikačných výstupov vedecko-výskumnej činnosti študentky PharmDr. Ivany Lukášovej, ktoré vznikli v rámci doktorského študijného programu v odbore Farmaceutická technológia - galenická farmacie na Ústave technológie liekov Farmaceutickej fakulty Veterinárnej a farmaceutickej univerzity Brno a počas polročného pracovného pobytu cez program Erasmus+ na Oddelení farmaceutickej technológie Universität Hamburg.

Teoretická časť práce je zameraná na pevné liekové formy, konkrétne na tablety a mukoadhezívne filmy. Fokus v časti o tabletách je zaoštrý najmä na dosiahnutie vyhovujúcej obsahovej rovnorodosti pri nízkom obsahu účinnej látky, skúšku disolúcie liečiv prechádzajúcich pri nízkom pH na ťažko rozpustnú formu a na najčastejšie problémy vyskytujúce sa v priebehu tabletovania, so zameraním na lepenie účinnej látky k povrchu razidiel. U mukoadhezívnych filmov sa venuje najmä metódam prípravy a výroby, hodnoteniu a zaoberá sa možnosťami ich využitia v terapii mykotických ochorení dutiny ústnej. Teoretická časť je pretkaná experimentmi, ktorých hlavnou náplňou je využitie analytickej metódy HPLC. Uvedená metóda bola použitá pri stanovení obsahu warfarínu vo vzorkách tabletových zmesí a tabliet a tiež k vyhodnoteniu skúšky disolúcie. Výsledky boli použité k hodnoteniu obsahovej rovnorodosti podľa požiadaviek liekopisu a Správnej výrobnéj praxe. Na ich základe bolo nájdené vhodné zloženie a technologické parametre pre prípravu vyhovujúcich tabliet. V zmesiach sa podarilo minimalizovať chybu vzorkovania a posúdiť vplyv veľkosti častíc na chybu vzorkovania. Pre tablety s warfarínom bola navrhnutá skúška disolúcie vhodná k porovnaniu disolučných profilov pri rutinnej kontrole. V ďalšom experimente bolo kvantitatívne stanovené množstvo prilepeného ibuprofenu k povrchu razidiel pri rôznej lisovacej sile, pri použití viacerých typov klzív a poťahového materiálu razidiel. Na základe výsledkov sa podarilo vybrať vhodné zloženie, nastavenie lisovacích parametrov a najvhodnejší materiál razidla, ktorý minimalizuje lepenie aj pri rutinnom používaní. Metóda HPLC bola použitá aj na stanovenie množstva absorbovaného ciklopiroxolamínu z plazmy kráľika po podaní bukálneho filmu. Z výsledkov boli vypočítané farmakokinetické parametre, na základe ktorých bola overená vhodnosť skúmaného terapeutického systému k liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej.

Kľúčové slová: pevné liekové formy, obsahová rovnorodosť, warfarín, skúška disolúcie, lepenie, ibuprofen, mukoadhezívne liekové formy, ciklopiroxolamín.

ABSTRACT

Dissertation on "**Using Instrumental Methods in Evaluation of Quality of Pharmaceutical Products**" is an overview with a commentary on the publication of scientific research results of the student PharmDr. Ivana Lukášová, which were established within the framework of the doctoral study program in the field of Pharmaceutical Technology - Galenic Pharmacy at the Department of Pharmaceutics of the Faculty of Pharmacy of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno and during the half-year traineeship through the Erasmus + programme at the Institute of Pharmacy at the Universität Hamburg.

The theoretical part of the dissertation is focused on solid dosage forms of medicine, namely tablets and mucoadhesive films. The focus in the tablet oriented component of the thesis is particularly aimed on achieving a satisfactory dose uniformity at a low drug content, a drug dissolution test at low pH to a poorly soluble form and the most common problems encountered during tablet pressing process, focusing on the active substance sticking to the surface of the dies. It is focused mainly on methods of preparation and production, evaluation in the part on mucoadhesive films, and deals with the possibilities of their use in the treatment of mycotic diseases of the oral cavity. The theoretical part is covered by experiments, the main purpose of which is the use of analytical HPLC method. This method was used to determine the warfarin content of tablet blends and tablets samples and to evaluate the dissolution test. The results were used to evaluate the dose uniformity according to pharmacopoeia requirements and Good Manufacturing Practice. Based on these, the appropriate composition and technological parameters for the preparation of suitable tablets have been found. We were able to minimize the sampling error and assess the effect of particle size on the sampling error in the mixtures. For warfarin tablets a dissolution test was proposed to compare the dissolution profiles during routine control. In another experiment, an amount of adhered ibuprofen to the surface of the dies at different pressing forces was quantitatively determined, using multiple types of lubricants and stamping dies material. Based on the results, it was possible to select the appropriate composition, the pressing parameters settings and the most suitable dies material, which minimizes sticking even in routine use. The HPLC method was also used to determine the amount of ciclopirox olamine absorbed from rabbit plasma after buccal film administration. From the results, the pharmacokinetic parameters were evaluated, which assessed the suitability of the therapeutic system to treat mycotic diseases of the oral cavity.

Keywords: solid drug forms, content uniformity, warfarin, dissolution testing, sticking, ibuprofen, mucoadhesive dosage forms, ciclopiroxolamine.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som predloženú dizertačnú prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Brno 2017

PharmDr. Ivana Lukášová

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala doc. Mgr. Janovi Muselíkovi, Ph.D. za cenné rady, nápady, trpezlivosť a odborné vedenie počas celého doktorského štúdia. Ďalej by som chcela poďakovať Prof. Claudii S. Leopold, Dr. Albrechtovi Sakmannovi a celému kolektívu Oddelenia farmaceutickej technológie Universität Hamburg, kde som spolupracovala na výskume lepenia ibuprofenu počas polročného pracovného pobytu cez program Erasmus+ pod vedením doktorandky Claudie Al-Karawi.

Veľká vďaka patrí tiež celému kolektívu Ústavu technológie liekov Farmaceutickej fakulty VFU Brno za vytvorenie príjemného študijného a pracovného prostredia. Veľké ďakujem patrí predovšetkým vedúcemu ústavu doc. PharmDr. et Mgr. Davidovi Vetchému, Ph.D. a PharmDr. Alešovi Francovi, Ph.D. za návrhy a pripomienky pri príprave publikácií.

V neposlednej rade patrí veľké ďakujem celej mojej rodine, Stefanovi a priateľom, ktorí mi boli veľkou oporou počas celého štúdia.

PharmDr. Ivana Lukášová

OBSAH

1. ÚVOD A CIELE PRÁCE.....	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1 TABLETY.....	10
2.1.1 Homogenizácia a granulácia.....	12
2.1.2 Teoretické aspekty priameho lisovania.....	15
2.1.3 Všeobecné problémy počas lisovania tabliet.....	17
2.1.4 Obsahová rovnorodosť.....	17
2.1.5 Warfarín.....	18
2.1.5.1 Biologická dostupnosť a záměna warfarínu.....	21
2.1.6 Hmotnostná rovnorodosť.....	27
2.1.7 Nevyhovujúca pevnosť tabliet.....	28
2.1.8 Vrstvenie a viečkovanie.....	29
2.1.9 Lepenie.....	30
2.1.10 Ibuprofen.....	33
2.1.10.1 Lepenie ibuprofenu.....	33
2.1.11 Skúška disolúcie.....	37
2.1.11.1 Hodnotenie podobnosti disolučných profilov.....	37
2.1.11.2 Skúška disolúcie solí slabých kyselín ťažko rozpustných liečiv.....	38
2.1.11.3 Skúška disolúcie tabliet s obsahom warfarínu.....	39
2.1.11.4 Skúška disolúcie tabliet s obsahom ibuprofenu.....	45
2.2 MUKOADHEZÍVNE FILMY.....	46
2.2.1 Metódy prípravy a výroby filmov.....	47
2.2.2 Hodnotenie filmov.....	48
2.2.2.1 Hodnotenie mukoadhezívnych vlastností.....	49
2.2.2.2 Hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností.....	50
2.2.3 Mukoadhezívna cesta podania liečivých látok.....	50
2.2.4 Dutina ústna ako miesto pre aplikáciu liečiv.....	51
2.2.5 Orálna kandidóza.....	53
2.2.6 Mukoadhezívne liekové formy s antimykotickým účinkom.....	54
2.2.7 Ciklopiroxolamín.....	57

2.2.7.1	Mechanizmus účinku	58
2.2.7.2	Metódy stanovenia.....	61
2.2.7.3	Farmakokinetické štúdie ciklopiroxolamínu	69
3.	ZÁVER	74
4.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	76
5.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	109
6.	PREHĽAD PUBLIKAČNEJ ČINNOSTI.....	112
6.1	EXPERIMENTÁLNE ČLÁNKY	112
	MUSELÍK, J., FRANC, A., DOLEŽEL, P., GONĚC, R., KRONDLOVÁ, A. a LUKÁŠOVÁ, I. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. <i>Acta Pharmaceutica</i> . 2014, 64(3):355-367. doi: 10.2478/acph-2014-0022. (IF ₂₀₁₃ = 1,025).....	112
	LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., GAJDOŠOVÁ, M., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K., a JEKL, V. Pharmacokinetics of ciclopirox olamine after buccal administration in rabbits. <i>Current Drug Delivery</i> . 2017, 14(1):99-108. doi: 10.2174/1567201813666160502142856. (IF ₂₀₁₇ = 1,446).....	126
	AL-KARAWI, C., LUKÁŠOVÁ, I., SAKMANN, A. a LEOPOLD, C.S. Novel aspects on the direct compaction of ibuprofen with special focus on sticking. <i>Powder Technology</i> . 2017, 317:370-380. doi: 10.1016/j.powtec.2017.05.014. (IF ₂₀₁₅ = 2,759).....	137
	LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A., GONĚC, R., MIKA, F. a VETCHÝ, D. Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active substance. <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> . 2017, 109:541-547. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.017. (IF ₂₀₁₆ = 3,756).	149
	LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J. a FRANC, A. Vývoj disolučnej metódy pre tablety s obsahom warfarínu sodného. <i>Česká a slovenská farmacie</i> . 6/2017. (N35-2017; in print).	157
6.2	ĎALŠIE PRÍSPEVKY A GRANTOVÉ PROJEKTY.....	174
	LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K. a JEKL, V. <i>In vivo</i> evaluation of mucoadhesive buccal films with ciclopirox olamine in rabbits. Poster. 10 th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 1st to 7th April 2016 SECC, Glasgow, United Kingdom.....	174
	LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A. a GONĚC, R. Quality assurance of tablets containing warfarín. Poster. 2 nd European Conference on Pharmaceutics: Novel Dosage Forms, Innovative Technologies, 3rd to 4th April 2017 Krakow, Poland.	176
	MUSELÍK, J., LUKÁŠOVÁ, I., FRANC, A., SABADKOVÁ, D., MAJERČÍKOVÁ, D. a ĎUROVCOVÁ, V. Tvorba biorelevantní disoluční metody pro kontrolu kvality tablet s obsahem warfarínu: Príspevok zo zborníka. 2014. IGA VFU Brno č. 55/2014/FaF.	178

1. ÚVOD A CIELE PRÁCE

Predkladaná dizertačná práca je komentovaným prehľadom publikačnej činnosti, ktorá vznikla v priebehu doktorského študijného programu v odbore Farmaceutická technológia – galenická farmacie na Ústave technológie liekú Farmaceutickej fakulty Veterinárni a farmaceutickej univerzity Brno a počas polročného pracovného pobytu cez program Erasmus+ na Oddelení farmaceutickej technológie Universität Hamburg. Hlavným zameraním je využitie analytických metód pri hodnotení obsahovej rovnorodosti a skúšky disolúcie pevných liekových foriem, ďalej pri stanovení množstva prilepeného liečiva na razidle po lisovaní tabliet rotorovým tabletovacím lisom a pri stanovení množstva absorbovaného liečiva z biologického materiálu. Dizertačná práca je rozdelená na dve hlavné časti – teoretickú a prehľad publikácií. Teoretická časť práce má za cieľ priniesť informácie týkajúce sa najmä problematiky obsahovej rovnorodosti tabliet s obsahom liečiva s úzkym terapeutickým indexom, ďalej sa zaoberá problematikou lisovania tabliet, so zameraním na lepenie, skúškou disolúcie tabliet s obsahom účinnej látky povahy slabej kyseliny a v poslednej časti sa venuje mukoadhezívnym filmom a možnosťami ich využitia pri liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej. Prehľad publikácií zahŕňa 4 experimentálne články vydané v časopisoch s impakt faktorom, 1 experimentálny článok publikovaný v časopise Česká a slovenská farmacie, 2 príspevky prezentované vo forme posteru na zahraničnej konferencii (Glasgow, Krakow) a príspevok zo Zborníka tuzemskej konferencie IGA VFU.

Cieľom experimentov, z ktorých vychádzajú publikácie, bolo využitie analytických metód pri hodnotení pevných liekových foriem so zameraním na stanovenie obsahu warfarínu v tabletových zmesiach a tabletách, skúšku disolúcie liečiv prechádzajúcich v kyslom prostredí žalúdka na ťažko rozpustnú formu, na stanovenie množstva prilepeného ibuprofenu na povrchu razidiel a na stanovenie množstva absorbovaného ciklopiroxolamínu z plazmy kráľika po podaní bukalného mukoadhezívneho filmu. Všetky analytické stanovenia prebiehali pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (*High-performance liquid chromatography, HPLC*). Okrem stanovenia obsahu warfarínu v tabletových zmesiach a tabletách, bolo cieľom hodnotenie obsahovej rovnorodosti (*Content uniformity, CU*) podľa požiadaviek Českého liekopisu (ČL) 2009, čl. 2.9.6 a čl. 2.9.40, FDA a požiadaviek firmy DuPont. Ďalším cieľom bola optimalizácia zloženia,

postupu prípravy a hodnotenie vplyvu kritických parametrov na obsahovú rovnorodosť. Cieľom bolo overiť, či vyrobené šarže vyhovujú nielen požiadavkám CU ČL, ale či dôjde k ich splneniu aj na požadovanej štatistickej hladine významnosti (Cpk, Bergumova metóda). V nadväzujúcich experimentoch bolo cieľom overiť možnosť prípravy rôznych síl tabliet zo spoločnej zmesi (*Common blend, CB*), a to za podmienok „*worst case*,“ kedy bol obsah warfarínu zámerne vychýlený o $\pm 4\%$ teoretického obsahu. Ďalším cieľom bolo hodnotenie pripravených tabliet pomocou skúšky disolúcie. Za týmto účelom bolo nutné optimalizovať disolučné podmienky vo vodnom prostredí, v prostredí pufru s pH 6,8 aj podmienky pre bifázickú disolúciu (oktanol/0,1 M HCl). Cieľom bolo modifikovať disolučné podmienky tak, aby došlo k rozlíšeniu jednotlivých síl tabliet a bolo možné určiť aj ich kvalitu. Metóda HPLC bola ďalej použitá pri stanovení množstva ibuprofenu prilepeného na horné a dolné razidlo v priebehu lisovania na rotorovom tabletovacom lise. Cieľom týchto experimentov bolo na základe množstva prilepeného ibuprofenu k hornému, resp. dolnému razidlu zvoliť vhodné nastavenie lisovacej sily, vybrať vhodné klzivo a razidlo tak, aby bolo lepenie ibuprofenu najnižšie. Ďalším cieľom bolo zvoliť najodolnejšie razidlo, u ktorého rutinným používaním nedošlo k zvýšeniu lepenia. Ďalším stanoveným cieľom bol vývoj vhodnej analytickej metódy pre stanovenie ciklopiroxolamínu z krvnej plazmy a následná aplikácia validovanej HPLC metódy na stanovenie množstva absorbovaného ciklopiroxolamínu z králičej plazmy v *in vivo* experimente po aplikácii mukoadhezívneho bukálneho filmu. Cieľom bolo zo získaných dát vypočítať farmakokinetické parametre a posúdiť vhodnosť aplikácie mukoadhezívnej bukálnej liekovej formy s obsahom ciklopiroxolamínu k liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Tablety

Tablety predstavujú najrozšírenejšiu a najpopulárnejšiu liekovú formu pre perorálne podanie liečivých prípravkov. Ponúkajú množstvo výhod oproti ostatným liekovým formám z hľadiska produkcie a tiež z pohľadu pacienta i lekára. Z hľadiska produkcie sa jedná predovšetkým o veľmi ekonomický spôsob výroby, ľahkú manipuláciu pri balení, skladovaní a distribúcii a tiež vykazujú vysokú chemickú, fyzikálnu a mikrobiálnu stabilitu [1, 2]. Z pohľadu pacienta, sa jedná o konvenčnú, bezbolestnú, neinvazívnu a jednoduchú aplikačnú cestu, ktorá je najväčším dôvodom ich pretrvávajúcej popularity a dobrej compliance. Vlastnosti konvenčných, neobalených tabliet je možné ľahko vylepšiť alebo modifikovať použitím filmových potáhov, ktoré môžu mať taktiež pozitívny efekt na pacientovu compliance. Filmové potahy môžu byť aplikované na zlepšenie mechanickej odolnosti tabliet [3], na uľahčenie prehĺtania (napr. Medcoat[®]), na maskovanie nepríjemnej chuti alebo zápachu [4] alebo na kontrolu uvoľňovania účinnej látky v gastrointestinálnom trakte [5, 6].

Tablety sú vyrábané stlačovaním prášku, v priebehu ktorého dochádza k zlisovaniu jeho jednotlivých častíc do koherentného výlisku [7]. Okrem prášku, sú často využívané tiež granuláty pripravené suchou alebo vlhkou granuláciou. Priame lisovanie však aj naďalej zostáva metódou prvej voľby pre tablety s obsahom termolabilných účinných látok a látok citlivých na vlhkosť [1]. Pri priamom lisovaní, je pomocou tabletovacieho lisu lisovaná zmes, ktorá bola pripravená suchým miesením individuálnych zložiek. Dôležitými predpokladmi pre lisovanie takto pripravenej zmesi, sú vyhovujúce tokové vlastnosti a stlačiteľnosť [8, 9]. Kvôli uľahčeniu procesu lisovania a pre dosiahnutie požadovaných vlastností tabliet, sa formulácia skladá z niekoľkých zložiek, ako je účinná látka, príp. látky (*Active pharmaceutical ingredient(s), API(s)*) a rôznych pomocných látok s rozličnými vlastnosťami a funkciou. Medzi typické pomocné látky používané pri lisovaní sa radia plnivá (napr. laktóza, manitol), spojivá (napr. mikrokryštalická celulóza, povidon), klzné a antiadhezívne látky (napr. stearan horečnatý, glycerol bahenát, koloidný oxid kremičitý), a rozvoľňovadlá (napr. krosopovidón, kroskarmelóza sodná). Každá použitá pomocná látka ovplyvňuje lisovateľnosť príslušnej formulácie a podieľa sa tak na finálnych vlastnostiach tablety [10, 11]. Z literatúry je známe, že niektoré pomocné látky pridané do lisovacej

zmesi aj v malom množstve, môžu výrazne ovplyvniť celý lisovací proces a vlastnosti vyrobenej tablety. Znáмым príkladom je nepriaznivý účinok hydrofóbneho klziva stearanu horečnatého na pevnosť tabliet [12-14].

Tablety musia spĺňať množstvo liekopisných požiadaviek. Jednou z nich je pevnosť, ktorá by mala byť dostatočne vysoká, aby tableta vydržala mechanické namáhanie počas výrobného procesu, balenia, dopravy a dispenzácie [15]. Okrem mechanickej odolnosti, rozpadu, oderu či iných požiadaviek liekopisu, nemožno zabudnúť ešte na jednu zo základných požiadaviek na kvalitu liekovej formy a tou je obsahová rovnorodosť. Obsahová rovnorodosť závisí od rovnomernej distribúcie účinnej látky, príp. látok v tablete a úzko súvisí s konštantnou hmotnosťou tabliet [16]. Je známe, že obsahovo uniformnejšie bývajú tablety s vyššou hmotnosťou; vyššia variabilita obsahu je častejšia u tabliet s nižšou hmotnosťou a nižším obsahom účinnej látky. U týchto tabliet je dosiahnutie obsahovej rovnorodosti ťažké, a preto je potrebný dobrý kontrolný mechanizmus, aby sa zabránilo kolísaniu obsahu účinnej látky a jeho negatívnym dôsledkom [16]. Zvlášť veľkú pozornosť je potrebné venovať výrobe tabliet s nízkym obsahom liečiva s úzkym terapeutickým indexom, ako je napríklad nepriamo pôsobiace antikoagulans warfarín. U tejto skupiny liečivých látok môže mať nevyhovujúca obsahová rovnorodosť až fatálne následky v podobe zvýšenej alebo zníženej koagulácie, ktoré môžu viesť k hospitalizácii a v najhoršom prípade až k smrti pacienta.

Napriek tomu, že produkcia tabliet prebieha vo veľkom množstve už po desaťročia, stále sú dostupné len obmedzené poznatky pre pochopenie fyzikálnych procesov a faktorov, ktoré spôsobujú problémy pri produkcii. Častý problém predstavuje homogenizácia, ktorá predchádza priamemu lisovaniu a faktory, ktoré môžu ovplyvniť miesenie jednotlivých zložiek zmesi. Jedná sa najmä o vplyv fyzikálno-chemických vlastností, ako je hustota, veľkosť, tvar a elektrostatický náboj častíc, ďalej o vplyv dĺžky a rýchlosti miesenia, náplň a voľbu zariadenia, veľkosť násady a poradie miesených komponent. Čo sa samotného procesu lisovania týka, medzi najčastejšie problémy patrí nevyhovujúca hmotnosť, pevnosť, vrstvenie, viečkovanie a lepenie. Početné štúdie sa zaoberali vplyvom rozličných premenných (napr. použitá lisovacia sila, množstvo a typ klziva), ktoré ovplyvňujú tendenciu farmaceutických formulácií k lepeniu, ale mnohé prípady doteraz neboli objasnené. S lepením veľmi úzko súvisí obsahová a hmotnostná rovnorodosť. Pri použití metódy HPLC k stanoveniu množstva účinnej látky, ktoré adheruje k povrchu razidiel, je možné stanoviť, resp. predpokladať, že čím vyššiu tendenciu k lepeniu použitá formulácia má, tým ťažšie bude u nej splnenie liekopisných

kritérií obsahovej a hmotnostnej rovnorodosti. Do skupiny látok s tendenciou lepiť sa patria účinné látky ako je napr. ibuprofen, flurbiprofen, amlodipín, teofylín a celekoxib [17]. Medzi najdôležitejšie premenné, ktoré ovplyvňujú priame lisovanie sa radia fyzikálno-chemické vlastnosti zmesi, lisovacia schopnosť, typ a množstvo použitého klziva, lisovacia sila, materiál razidiel (napr. titán nitrit, chróm nitrit) a sila, ktorou je tableta odstránená z matrice (*take-off force*).

K stanoveniu *in vitro* uvoľňovania účinnej látky z liekovej formy sa využíva skúška disolúcie. Je to liekopisom predpísaná skúška, ktorá sa používa vo vývoji a výskume k odhadu chovania liekovej formy v gastrointestinálnom trakte, je nástrojom kontroly kvality a používa sa tiež k stanoveniu bioekvivalencie. Skúška je pomerne jednoduchá, avšak problém nastáva vtedy, ak je účinná látka ťažko rozpustná, čo zahŕňa triedy II. a IV. biofarmaceutického klasifikačného systému (*Biopharmaceutics Classification System; BCS*). Do uvedených tried spadá 30 - 40 % nových API [18, 19]. Disolúcia zahŕňa dva kroky: uvoľnenie API vplyvom rozpadu alebo erózie liekovej formy a jej následné rozpustenie v disolučnom médiu. Rýchlosť disolúcie závisí od pomalšieho z uvedených krokov [20]. Rozpustnosť API závisí od jej fyzikálno-chemických vlastností, ako je chemická forma (napr. soľ, voľná kyselina, voľná zásada) a fyzikálna forma (napr. amorf alebo kryštál). Skúška disolúcie ťažko rozpustných API s okamžitým uvoľňovaním zahŕňa vývoj a validáciu takej testovacej metódy, ktorá je dostatočne diskriminačná, čo je však neľahká úloha, nakoľko uvoľnené množstvo API je príliš nízke (zvyčajne nemožno dosiahnuť 100 %) a aj rýchlosť uvoľňovania je príliš pomalá pre prevedenie konvenčných testov [21]. Množstvo uvoľneného ťažko rozpustného liečiva je možné zvýšiť napr. zväčšením objemu disolučného média, príp. zamenou za iné s odlišným pH, pridaním tenzidov, kosolventov alebo prevedením bifázickej disolučnej skúšky.

2.1.1 Homogenizácia a granulácia

Proces homogenizácie alebo miesenia má za cieľ zabezpečiť homogénne rozdelenie dvoch alebo viacerých látok. Jednou z nich je zvyčajne účinná látka, príp. látky a ďalšou je pomocná látka alebo zmes pomocných látok, ktoré prispievajú k lisovateľnosti, či k ďalšiemu spracovaniu účinnej látky. Pri výrobe tabliet priamym lisovaním je potrebné zabezpečiť rovnomerné rozdelenie účinnej látky v celej zmesi tak, aby vykazovala každá časť zmesi rovnaké zloženie a stavbu, tzn. aby pri lisovaní bola API rovnomerne rozdelená

v celej zmesi a následne aj vo vyrobených tabletách. Tým je zabezpečená tiež vyhovujúca obsahová rovnorodosť.

Rovnomerná distribúcia účinnej látky je problematická najmä u nízko dávkových prípravkov a u zmesí so sklonom k segregácii. Najlepšiu homogenitu je možné dosiahnuť vtedy, keď sú spolu miesené prášky s rovnakými fyzikálno-chemickými vlastnosťami (hustota, veľkosť, tvar a elektrostatický náboj častíc), čo je však v praxi skôr zriedkavý prípad. Dôležitá je tiež vzájomná indiferentnosť miesených zložiek. Teoreticky najlepšiu homogenitu je možné docieľiť miesením guľovitých častíc s priemerom nad 150 μm , s rovnakou hustotou a hmotnostným pomerom [22]. Dôležitú úlohu pri homogenizácii zohráva aj správna voľba dĺžky a rýchlosti miesenia, poradie pridávania miesených komponent, ale aj náplň a výber miešacieho zariadenia a spôsob pohybu prášku v ňom. Málokedy platí, že s dlhšou dobou miesenia je dosiahnutý vyšší stupeň homogenity. Pri nadmernom miesení často dochádza k rozdeľovaniu zmesi na základe veľkosti a hmotnosti častíc vplyvom tzv. „*premiešania*“ [23]. Čas miesenia je závislý od fyzikálnych vlastností zmesi a hustoty. Dĺžka miesenia, potrebná k dosiahnutiu adekvátnej homogenity, sa stanovuje zvyčajne experimentálne pomocou analýzy vzoriek, ktoré sú odobrané z vopred stanovených miest v priebehu, či na konci procesu miesenia [24]. Rýchlosť miesenia nesmie prekročiť tzv. *kritickú rýchlosť*, pri ktorej dochádza k odstredivému pohybu častíc, ktorého výsledkom je nehomogenita zmesi. Čo sa poradia miesených komponent týka, známy je príklad klziva stearanu horečnatého, ktorý tvorí na povrchu účinnej látky hydrofóbny film v prípade, že je v zmesi prítomný od začiatku, čím zabraňuje účinnému miešaniu, zhoršuje lisovateľnosť zmesi, pevnosť výliskov a rozpad [25-27]. V zmesiach s warfarínom sa potvrdil tento negatívny účinok na homogenitu a na základe experimentov bolo stanovené, že k najlepšej homogenite zmesi dochádza pri 15 minútovom miešaní, pričom najprv je zmes miesená 10 minút bez stearanu horečnatého a následne po jeho pridaní ešte 5 minút [23, 25, 28-30]. Pri plnení miešacieho zariadenia je potrebné dodržiavať jeho maximálne prípustné naplnenie, aby bol zabezpečený dostatočný priestor pre pohyb častíc. Pracovná objemová kapacita miesičov sa udáva v rozmedzí 30 – 70 % z celkového objemu miesiča [31, 32]. Tvar nádoby miesiča zohráva rovnako veľmi dôležitú úlohu. Preferované sú nádoby asymetrické podľa osi otáčania, aby bol zamedzený pohyb prášku v radiálnom smere [31]. V miešacích zariadeniach dochádza spravidla k segregácii vplyvom vzniku tzv. „*hluchých miest*,“ v ktorých vďaka konštrukcii zariadení často dochádza k nedostatočnému premieseniu [33]. Aby k tomuto javu nedochádzalo, využíva farmaceutická technológia

účinnnejšie 3D miesiče (napr. Turbula), kde sa miesiaci kontajner otáča okolo 3 ôs [34]. Ďalšiu možnosť predstavuje použitie tzv. rýchlobežných miesičov, ktoré sú však veľmi nákladné a nemajú výhody 3D miesičov, kde obvykle stačí do miesiča upevniť kontajner s ingredienciami [25]. V miesičoch je miešanie dosiahnuté s použitím jedného alebo viacerých nasledujúcich mechanizmov: *difúzne miešanie* (mikromiešanie), *konvektívne miešanie* (makromiešanie) a *šmykové miešanie* [35]. Pri zabezpečení homogenity nemožno zabudnúť ani na vplyv povrchových elektrostatických síl. Tie vznikajú nielen medzi časticami samotného prášku (napr. pri rozdrobovaní alebo preosievaní), ale môžu vzniknúť aj medzi časticami prášku a stenami miešacej nádoby vplyvom nárazov a trenia [36].

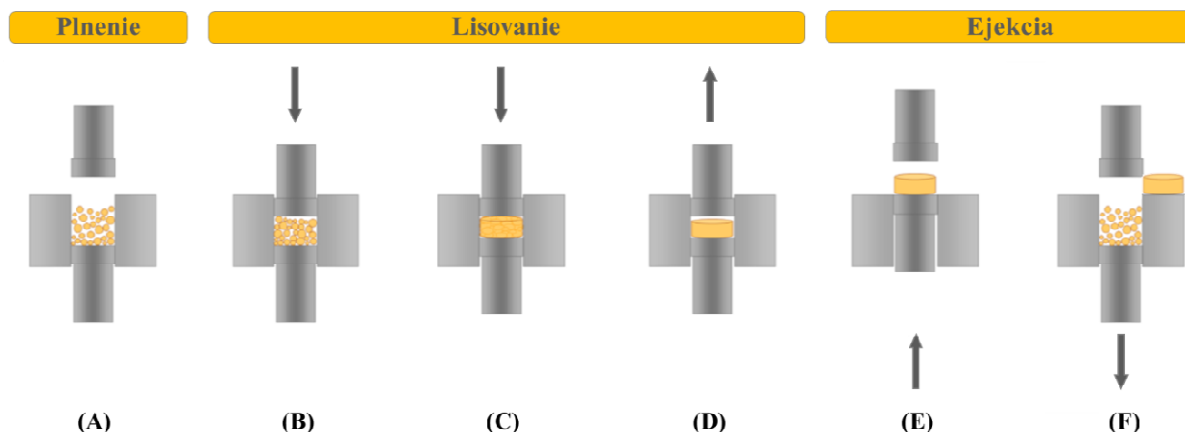
Ako už bolo naznačené, častým problémom pri miesení je segregácia, ku ktorej dochádza prakticky pri každej manipulácii s práškom, vrátane miesenia fáz, vzorkovania, vyprázdňovania miesiča, či pri dávkovaní prášku do tabletovacieho lisu. Eliminovať sklon zmesi k segregácii je možné správnou voľbou veľkosti a tvaru miesených častíc. Súhrne by sa dalo povedať, že všetky faktory, ktoré napomáhajú k zlepšeniu homogenity, prispievajú tiež k zníženiu segregácie. Odber vzoriek spolu s homogenizáciou predstavuje kritický krok pri stanovení obsahovej rovnorodosti. Len s reprezentatívnymi a autentickými vzorkami je možné podať relevantnú výpoveď o kvalite a zložení zmesi. U suchých zmesí sa obvykle odoberajú vzorky o hmotnosti trojnásobku hmotnosti tablety [37].

Farmaceutická technológia ponúka niekoľko možností odberu vzoriek. Najjednoduchšie je vzorkovanie kalibrovanou lopatkou, kde však môže dôjsť k nežiaducej segregácii v priebehu vnorenia lopatky do zmesi a k odobratiu nereprezentatívnej vzorky. Ďalšou možnosťou je odber pomocou vzorkovacej ihly, ktorá sa pod určitým uhlom ponorí do vzorky a odoberie sa jej časť. Aj tu však vplyvom tlaku pri zasúvaní ihly dochádza k rozdrúžovaniu zmesi. Navyše tu môže dôjsť k selektívnemu zachytávaní jednotlivých zložiek k vnútornému povrchu ihly. Poslednou uvádzanou možnosťou je odber vzoriek z prúdu toku zmesi, napr. pri jej vypúšťaní z miesiča [38]. Pri malom množstve tabletoviny je však táto možnosť prakticky neuskutočniteľná. Pri žiadnej z používaných metód odberu vzoriek nie je možné zaručiť úplnú elimináciu chyby vzorkovania. U zmesí s warfarínom sa zistila chyba vzorkovania, pod ktorú sa podpísala najmä veľkosť častíc a elektrostatický náboj, vplyvom ktorého došlo pravdepodobne k segregácii [23, 29, 30]. Segregáciu zmesi nie je možné vždy úplne eliminovať a zatiaľ nie je dostupná ani žiadna adekvátna technika vzorkovania, ktorá úplne eliminuje chybu vzorkovania.

Problém so segregáciou a zabezpečením homogenity u nízko dávkových prípravkov je možné vyriešiť voľbou technológie spracovania zmesi. Farmaceutická technológia preto ponúka niekoľko možností výroby, ako je vlhká granulácia, suchá granulácia, granulácia tavením, fluidná granulácia a v poslednom čase aj impregnácia [39]. Granulácia napomáha minimalizovať segregáciu a zlepšuje obsahovú rovnorodosť [40], ale je časovo náročná a vyššia teplota môže nepriaznivo ovplyvniť stabilitu [41]. Pri vlhkej granulácii hrozí migrácia API v granulách v priebehu sušenia, čo zhoršilo obsahovú rovnorodosť [16]. Príkladom je nízko dávkový prípravok s obsahom 2 mg warfarínu sodného pripravený vlhkou granuláciou. Experimentálnym stanovením CU bola zistená nedostatočná obsahová rovnorodosť (88 %), ktorej príčinou bola migrácia účinnej látky v priebehu sušenia granulátu [16]. K dosiahnutiu vyhovujúcej CU došlo pridaním aditíva - kyseliny alginovej (15 %) [16]. Vplyvom rozpustnosti API vo vlhčive a vplyvom vysokej zbytkovej vlhkosti [42], môže dôjsť tiež k zmenám v disolúcii [43]. Pre prípravu tabliet je preto naďalej vhodná a používaná metóda priameho lisovania, u ktorej sa preferuje kryštalická API [44]. Absenciou zvýšenej teploty a rozpustením API vo vlhčive, či v zbytkovej vlhkosti tu nedochádza k prechodu na amorfnú fázu [45]. Existuje však riziko segregácie pri miešaní a preplňovaní zmesi alebo vibráciami v tabletovačke, čo zhoršuje CU [40] a preto je nevyhnutná optimalizácia kritických výrobných parametrov.

2.1.2 Teoretické aspekty priameho lisovania

Pri výrobe tabliet, dochádza vplyvom pôsobenia tlaku na prášok alebo granulát k jeho stlačeniu za vzniku tablety. Tablety sú typicky formované pri tzv. uni-axiálnej kompresii za použitia horného, dolného razidla a matrice [7]. Základnými krokmi pri výrobe sú plnenie, lisovanie a ejakcia (vysunutie tablety) [46], ktoré nasledujú po homogenizácii zložiek alebo granulácii. Lisovací proces je schematicky znázornený na Obrázku 1 (A-F).



Obrázok 1. Schematické znázornenie lisovania tabliet (excentrický tabletovací lis): (A) plnenie matrice, (B) posunutie a reorganizácia častíc, (C) fragmentácia a deformácia častíc, (D) dekompresia, (E) ejekcia, (F) fáza plnenia a odsunu vylisovanej tablety (prevzaté a upravené z [47-49]).

Počas plnenia matrice (1A), je prášok alebo granulát naplnený pôsobením gravitácie z násypky do matrice; pozícia dolného razidla ovplyvňuje množstvo prášku tečúceho do matrice a tým aj hmotnosť tablety. V tejto fáze sa uplatňujú iba sily pôsobiace medzi jednotlivými časticami. Ich veľkosť závisí od tvaru častíc, povrchových vlastností, hustoty a celkovej hmotnosti prášku/granulátu plneného do matrice [50]. Ďalší krok je iniciovaný vstupom horného razidla do dutiny matrice (1B). Vzdialenosť medzi horným a dolným razidlom sa znižuje, čím sa vyvíja tlak na lisovaný materiál prítomný v matrici. Výsledkom je posunutie a reorganizácia častíc, v dôsledku ktorej klesá objem a rastie hustota lisovaného materiálu. V priebehu tohto deja dochádza tiež k vytlačeniu vzduchu z matrice. Následne, v určitom stupni hustoty, dochádza k imobilizácii častíc materiálu v matrici, čím sa zabráni vzniku nového usporiadania častíc (elastická vs. plastická deformácia). V tejto fáze je tableta v matrici formovaná radom súbežných vnútorných procesov, ktoré vedú k fragmentácii a deformácii (1C) a nakoniec k formovaniu konečných výlisokov [51]. Vo fáze dekompresie klesá pôsobiaca lisovacia sila (1D). Tablety vykazujú do určitej miery elastické zotavenie, výsledkom ktorého je objemová expanzia. Tá vzniká v dôsledku tzv. stresovej relaxácie vo vnútri tablety a vyjadruje zmenu objemu tablety po 24 hodinách po vylisovaní tablety [52, 53]. Táto zmena je spôsobená elasticky deformovanými časticami, ktoré čiastočne nadobudli svoj pôvodný tvar. Z tohto dôvodu sa k ďalším analýzám zvyčajne používajú tablety po minimálne 24 hodinovom státi od nalisovania [54, 55]. V poslednej fáze (1E) je hotový výlisok pohybom dolného razidla smerom hore vysunutý z matrice. Násypka odsunie tabletu a dostáva sa nad matricu.

Dolné razidlo sa vráti späť do spodnej pozície, matrica sa naplní práškom a celý cyklus sa opakuje (1F).

2.1.3 Všeobecné problémy počas lisovania tablet

Medzi najčastejšie vznikajúce problémy v priebehu lisovania patrí kolísanie hmotnosti tablet a s ním súvisiaca obsahová rovnorodosť, nevyhovujúca pevnosť, vrstvenie, viečkovanie alebo lepenie. Tieto problémy môžu viesť k rejekcii celých šarží z dôvodu nevyhovujúcej kvality alebo bezpečnosti a k nemalým obchodným stratám. Zdrojom problémov v priebehu lisovania môže byť samotný proces, použité zariadenie, zloženie formulácie alebo kombinácia uvedených faktorov. Literatúra uvádza, že všeobecné problémy, s ktorými sa pri výrobe tablet stretávame, by sa dali pripísať najmä zlému zloženiu (~34 %), nevyhovujúcej obsahovej/hmotnostnej rovnorodosti (~27 %) a len v ~14 % prípadov nedostatočnej alebo nesprávnej (~15 %) manipulácii s lisovacím zariadením [56].

2.1.4 Obsahová rovnorodosť

Jeden zo základných parametrov kvality tablet predstavuje obsahová rovnorodosť (*Content uniformity, CU*). Ph.Eur. (ČL 2009 čl. 2.9.6) a USP hodnotia obsahovú rovnorodosť na základe nájdeného obsahu u desiatich vzoriek a ich priemeru, pričom hlavný interval pre jednotlivé vzorky je 85 – 115 % [57, 58]. Z tohto princípu vychádzajú aj požiadavky FDA, ktoré sa týkajú najmä tabletovín a kde sa liekopisný limit zužuje na 90 – 110 % a zároveň sa požaduje RSD do 5 % [59]. Nedostatkom článku 2.9.6 je, že nezohľadňuje správnosť priemerného obsahu, ale stanovuje iba to, či je množstvo účinnej látky v požadovanom rozmedzí, pričom do úvahy neberie teoretické množstvo účinnej látky. Tento nedostatok u dávkových liekových foriem odstraňuje článok 2.9.40 Ph.Eur. (ČL 2009 čl. 2.9.40) [57], ktorý pri výpočte zohľadňuje aj odchýlku nájdeného priemerného obsahu od obsahu teoretického.

Pre zabezpečenie vyhovujúcej obsahovej rovnorodosti pri procesnej validácii je nutné použiť štatistický aparát, ktorý na štatisticky významnej hladine spoľahlivosti zabezpečí, že všetky následne vyrobené šarže opäť vyhovejú stanoveným liekopisným limitom. K tomuto účelu je možné využiť tzv. index spôsobilosti procesu C_{pk} a Bergumovu metódu.

Index spôsobilosti procesu (*Capability index; Cpk*) je štatistickým ukazovateľom vlastnej variability procesu [60] a je definovaný ako minimum z jeho horného a dolného indexu. K výpočtu (1) je potrebný aritmetický priemer nameraných hodnôt \bar{X} (zvyčajne $n = 10$) a smerodajná odchýlka s . Za horný (USL), príp. dolný (LSL) tolerančný limit sa dosadia hodnoty hornej a dolnej tolerančnej hranice CU podľa požiadaviek liekopisu (čl. 2.9.6), prípadne požiadavky FDA, ktoré sa používajú najmä na hodnotenie zmesí.

$$\hat{C}_{pk} = \min \frac{(USL - \bar{X}; \bar{X} - LSL)}{3s} \quad (1)$$

Proces je spôsobilý ak je vypočítaná hodnota C_{pk} indexu ≥ 1 . Hodnota $C_{pk} = 1$ vyjadruje, že 99,73 % vyrobených produktov vyhovie stanovenému limitu [61]. Tento limit je zároveň akceptovateľný pre validáciu obsahovej rovnorodosti tabletovej zmesi [62].

Bergumova metóda vychádza z čl. 2.9.40 a obvykle sa využíva na hodnotenie tabliet. Jedná sa o tabelované hodnoty RSD, ktoré na definovanej hladine spoľahlivosti (obvykle $\alpha = 0,1$) zaručia, že najmenej 95 % následne vyrobených šarží vyhovie liekopisným požiadavkám [63]. Hodnoty RSD sú tabelované na základe počtu vzoriek a nájdeného priemerného obsahu účinnej látky. Bergumova metóda je najprísnejším a najspoľahlivejším nástrojom používaným pri procesnej validácii obsahovej rovnorodosti tabliet.

2.1.5 Warfarín

Warfarín, 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-fenylbutyl)-chromén-2-ón, patrí medzi liečivá s úzkym terapeutickým indexom (*Narrow therapeutic index, NTI*) [64]. Táto účinná látka sa používa od päťdesiatych rokov minulého storočia k prevencii trombóz a tromboembólií [65]. Hodnota pK_a warfarínu je 5,08 [66]. Podľa Ph.Eur. je dostupný ako amorf alebo kryštalická sodná soľ, kde je ku kryštalickej štruktúre pripojený izopropylalkohol v pomere 2:1 [45]. Kryštalická forma vplyvom zvýšenej teploty a času nevratne konvertuje na lepšie rozpustný amorf, čo môže ovplyvniť jej uvoľňovanie [45].

V minulosti bola náhrada prípravku (Coumadine[®]) s obsahom kryštálu za generikum (Panwarfarine[®]) s obsahom amorfu príčinou krvácania [67]. Podľa literatúry bola príčinou pravdepodobne nevyhovujúca obsahová rovnorodosť [68], no diskutovaná bola aj náhrada kryštálu za amorf [69]. Po tejto udalosti bol dokonca amorfný warfarín vyradený zo substitučnej liečby v USA [29]. Hoci je príčina nejasná [70] a tablety nebolo

možné považovať za terapeuticky ekvivalentné [71], pri zabezpečovaní kvality je potrebné zohľadniť nielen požiadavky CU, ale aj kvalitu použitej API.

Kvôli príslušnosti warfarínu k NTI liečivám, je pri jeho užívaní nutná zvýšená opatrnosť. Nežiaduce účinky sa u pacientov užívajúcich NTI liečivá vyskytujú až 2x častejšie v porovnaní s pacientmi užívajúcimi ostatné liečivá (40 % vs. 19 %) [72]. Pre bezpečnú farmakoterapiu je potrebná starostlivá titrácia dávky a pravidelné monitorovanie pacienta [68, 73]. U NTI liečiv platí na začiatku terapie zásada „*start low and go slow*“ (začni nízkou dávkou a zvyšuj ju pomaly) [74]. Príčinou nežiaducich účinkov a vysokého interakčného potenciálu warfarínu, je silná väzba k plazmatickým proteínom (~99 %) a metabolizmus cestou cytochrómového P₄₅₀ systému [75, 76]. Liekové, potravinové a nápojové interakcie vedú k zmenám v množstve neviazaného warfarínu, ktorý je dostupný pre klinický účinok. Aj malé zmeny systémovej koncentrácie, môžu viesť k významným zmenám vo farmakodynamickej odpovedi, ktorá sa odráža v zmene protrombínového času a INR alebo objavením hemoragických či tromboembolických príhod [77]. Ohrozenou skupinou sú najmä pacienti v pokročilom veku, pacienti s komorbiditami alebo polypragmatickí pacienti [78].

So zmenami systémovej koncentrácie warfarínu úzko súvisí biologická dostupnosť a tiež obsah warfarínu v tablete – obsahová rovnorodosť. V prípade, že v šarži kolíše obsah warfarínu v tabletách v oblasti dolnej alebo hornej hranice povoleného liekopisného limitu na obsahovú rovnorodosť, pričom šarža vyhovie, môžu sa tieto zmeny u citlivého pacienta prejaviť zvýšeným, resp. zníženým účinkom warfarínu. Z uvedeného dôvodu je potrebný pri výrobe a testovaní dobrý kontrolný mechanizmus a dôsledná procesná validácia obsahovej rovnorodosti. Pre zabezpečenie obsahu a obsahovej rovnorodosti, s ohľadom na úzky terapeutický index warfarínu, uvádza monografia „*Warfarin sodium tablets*“ v USP požiadavku pre priemerný obsah warfarínu limit 95 – 105 % [79] a viacerí výrobcovia používajú prísnejší limit obsahovej rovnorodosti v porovnaní s liekopisom. Konkrétne sa jedná o limit firmy DuPont Pharma, ktorý postupne prijali aj ďalší generickí výrobcovia (Apotex, Taro Pharmaceuticals) [80, 81]. DuPont Pharma vlastnila do roku 1996 v USA monopol na distribúciu warfarínu [68, 82]. V snahe zabrániť generickej substitúcii žiadala firma FDA o prijatie striktniejšieho limitu CU pre tablety s obsahom warfarínu a pre skúšku bioekvivalencie. Prísnejší limit CU chcela firma presadiť aj do USP. Táto snaha však bola zamietnutá [83].

Podľa limitu CU DuPont Pharmacy musí obsah v jednotlivých tabletách z desiatich testovaných jednotiek spadať do intervalu 92,5 – 107,5 % a RSD musí byť do 3 % [68].

Ak v prvom stupni testovania nevyhovuje obsah v 1 tablete, ale spadá do intervalu 87,5 – 112,5 %, nastupuje druhý stupeň testovania, ktorý vyžaduje testovanie ďalších 20 tabliet. Požiadavky sú splnené, ak RSD 30 tabliet nie je väčšia ako 3,9 % a žiadna tableta nie je mimo stanovený rozsah 87,5 – 112,5% a maximálne jedna je mimo interval 92,5 – 107,5 % deklarovanej sily.

Pre lepšie pochopenie použijem príklad: pacient dostal od lekára k prevencii trombózy po úraze tablety s obsahom 1 mg warfarínu. Koľko mg warfarínu môže v skutočnosti jeho tableta obsahovať, keď do úvahy zoberieme povolené odchýlky CU podľa liekopisu a požiadavky firmy DuPont?

Riešenie: Podľa požiadaviek Ph.Eur. (čl. 2.9.6)/USP je pre CU povolený interval 85 – 115 % v 1. stupni testovania a 75 – 125 % v 2. stupni testovania [57, 58]. Podľa uvedeného liekopisného článku, môže teda pacientova tableta obsahovať 0,85 – 1,15 mg warfarínu v 1. stupni testovania a 0,75 – 1,25 mg v 2. stupni, pričom tableta stanoveným požiadavkám CU vyhoví. Podľa požiadaviek firmy DuPont (92,5 – 107,5 % v 1. stupni testovania, resp. 87,5 – 112,5 % v 2. stupni testovania), môže 1 mg tableta obsahovať 0,93 – 1,08 mg API v 1. stupni testovania a 0,88 – 1,23 mg v 2. stupni testovania, pričom tableta opäť požiadavkám vyhoví. Príklady ďalších síl sú uvedené v Tabuľke 1.

Vplyv množstva účinnej látky v tablete vzrastie na význame, keď si uvedomíme, že dávka warfarínu je u pacientov upravovaná v závislosti na zmenách v intenzite terapie (antikoagulačného účinku) a pri titracii sa dávka typicky zvyšuje, resp. znižuje len o 5 – 15 % dennej dávky [68].

Tabuľka 1: Možný obsah účinnej látky v tablete podľa požiadaviek Ph.Eur. (čl. 2.9.6) (85 – 115 %) a DuPont (92,5 – 107,5 %). (prevzaté a upravené z [78]).

	Sila tablety				
	2 mg	2,5 mg	4 mg	5 mg	7,5 mg
Ph.Eur. (čl. 2.9.6)					
1. stupeň (mg)	1,70-2,30	2,13-2,88	3,40-4,60	4,20-5,75	6,30-8,63
2. stupeň (mg)	1,50-2,50	1,88-3,13	3,00-5,00	3,75-6,25	5,63-9,38
DuPont					
1. stupeň (mg)	1,85-2,15	2,31-2,69	3,70-4,30	4,63-5,38	6,94-8,06
2. stupeň (mg)	1,75-2,25	2,19-2,81	3,50-4,50	4,38-5,63	6,56-8,44

2.1.5.1 Biologická dostupnosť a zámena warfarínu

Biologická dostupnosť je definovaná ako rýchlosť a rozsah, v ktorom je liečivá látka absorbovaná a dosiahne miesto svojho účinku, resp. systémovú cirkuláciu. Miera biologickej dostupnosti po perorálnom podaní je závislá na množstve skutočností, medzi ktoré je možné zaradiť fyzikálno-chemické vlastnosti liečiva, fyziologické aspekty organizmu, typ liekovej formy, súčasný príjem potravy, biorytmy a intra- a interindividuálne rozdiely v ľudskej populácii [84]. Na základe biologickej dostupnosti dvoch produktov (originál a generikum) sa stanovuje bioekvivalencia produktov. Dva navzájom bioekvivalentné produkty, je možné vzájomne zamieňať, avšak nie vždy je zámena doporučovaná, najmä u NTI liečiv. Generickí výrobcovia Taro Pharmaceuticals a Apotex majú vo svojej špecifikácii prísnejšie limity nielen pre obsahovú rovnorodosť, ale aj pre bioekvivalenciu. Tieto generiká sú považované za ekvivalentné s referenčným produktom (originálom), pretože ich farmakokinetické vlastnosti (AUC a c_{\max}) ležia v rozpätí 80 – 125 % referenčného produktu a to na prísnejšej hladine spoľahlivosti $\alpha = 0,05$, namiesto obvyklých $\alpha = 0,10$ [85]. Guideline EMA z roku 2010 navrhuje pre liečivá s úzkym terapeutickým indexom zúženie akceptačného intervalu u bioekvivalenčných štúdií pre AUC a c_{\max} na 90 – 111,11 % [86].

V jednodávkovej štúdii u zdravých dobrovoľníkov, bola porovnávaná biologická dostupnosť 10 mg warfarínu od rôznych výrobcov. Porovnávané boli nasledovné produkty: Coumadin (Endo, sodná soľ; referenčný produkt), Warfilone (Frosst, sodná soľ), Warnerin (Warner/Chilcott, sodná soľ) a Antitrombín-K (Purdue Frederick, draselná soľ). Zistilo sa kolísanie AUC medzi 87 – 101 % referenčného produktu (100 %) [87]. Rozdiely boli zistené taktiež u hodnôt c_{\max} (78 – 100 % v porovnaní s referenčným produktom) a t_{\max} (1,8 – 3,7 hodín). Hoci klinický význam týchto rozdielov nie je známy, na základe doterajších zistení nie je podľa autorov rozumné a bezpečné zamieňať jeden produkt za iný, hoci všetky produkty vykazujú akceptovateľné charakteristiky biologickej dostupnosti [87]. Problematickým sa preto zdá byť predovšetkým to, že u produktov sa do úvahy berie priemerná biologická dostupnosť, pričom sa často zabúda na individuálnu odpoveď pacienta, ktorá môže, ale tiež nemusí spadať do kritérií FDA [88]. Okrem individuality každého jedinca, je potrebné vziať do úvahy tiež aktuálny obsah účinnej látky v tablete a obsahovú rovnorodosť medzi a v rámci jednotlivých šarží [68].

Diskusia o zámene warfarínu a dostatočnosti zavedených bioekvivalenčných skúšok prebieha aj v súčasnosti nielen v Českej republike, ale aj v ďalších krajinách Európy a sveta. Pred dvoma rokmi bola napríklad v Dánsku zrušená možnosť používania generických náhrad warfarínu. Reakciou na zákaz, bolo množstvo prevedených metaanalýz, ktoré štatisticky preukázali, že pri prechode na bioekvivalentné generikum, pacienti nie sú ohrození viac ako tí, ktorí pokračujú v liečbe originálom [89].

Vplyvom procesných parametrov na obsahovú rovnorodosť nízko dávkových prípravkov s obsahom sodnej soli warfarínu vo forme klatrátu s izopropanolom sa zaoberal experimentálny článok (plné znenie článku na strane 112):

MUSELÍK, J., FRANC, A., DOLEŽEL, P., GONĚC, R., KRONDLOVÁ, A. a LUKÁŠOVÁ, I. **Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP.** *Acta Pharmaceutica*. 2014, **64**(3):355-367. doi: 10.2478/acph-2014-0022. (IF₂₀₁₃ = 1,025).

Cieľom tejto experimentálnej práce bolo posúdiť vplyv premenných (veľkosť častíc plniva a čas prídavku klziva) na obsahovú rovnorodosť tabletových zmesí a tabliet s obsahom kryštalického warfarínu (2 %). K posúdeniu CU tabletových zmesí boli použité limity Ph.Eur. 2.9.6 a limity FDA a následne Cpk index, ktorý bol vypočítaný pre tieto limity. K posúdeniu CU tabliet bol použitý článok Ph.Eur. 2.9.6 a 2.9.40 (zodpovedajúci čl. <905> USP) a k overeniu štatistickej významnosti Cpk index a Bergumova metóda. Pre tablety bol overený aj limit 92,5 – 107,5 % s RSD max. 3 % firmy DuPont. Ďalším cieľom bolo overiť, či rozdrúžovanie zmesi v priebehu miesenia a vzorkovania môže byť spôsobené vplyvom elektrostatického náboja, ktorý sa v zmesi v priebehu miesenia vytvára. Táto práca nadväzovala na predchádzajúce pokusy [23, 25].

V práci boli sledované nasledovné premenné: veľkosť častíc plniva (Di-cafos; fosforečnan vápenatý) a čas prídavku magnéziom stearátu. Veľkosť častíc plniva bola $d_{50} = 61,1$ a $d_{50} = 152,3$ μm , a zvolené boli dve technológie A – všetky zložky zmesi miesené dohromady 15 minút/B – miesenie 10 minút bez magnéziom stearátu a následne 5 minútové miesenie s ním.

Ukázalo sa, že výsledky obsahovej rovnorodosti boli ovplyvnené veľkosťou častíc fosforečnanu vápenatého, ale taktiež časom prídavku magnéziom stearátu.

Pri použití plniva o väčšej veľkosti častíc bola dosiahnutá lepšia CU. Výsledky F-testu zhody rozptylov ($p \leq 0,05$) pre obsahy u technológií A a B, ukázali signifikantne menší rozptyl nameraných obsahov liečiva v zmesiach pripravených s použitím plniva o väčšej veľkosti častíc. Toto zistenie platí pre obe technológie. Vplyv technológie na výsledné rozptyly obsahov liečiva pomocou F-testu neukázal štatisticky významný rozdiel medzi rozptylmi obsahov liečiva v zmesiach pripravených technológiou A a B. Tieto výsledky boli potvrdené u zmesí s menšou aj väčšou veľkosťou častíc plniva. Za kritický faktor pre dosiahnutie uniformity sa na základe výsledkov javí distribúcia veľkosti častíc plniva. Prídavok klziva v rôznom čase miesenia neovplyvňoval štatisticky významne pozorované rozptyly v obsahoch liečiva u pripravených zmesí. Testovanie vplyvu prídavku magnéziu stearátu na veľkosť elektrostatického náboja bolo prevedené na modelových zmesiach warfarínu sodného klatrátu a Di-cafosu s rôznou veľkosťou častíc. Pri tomto meraní čisté plniva s rôznou veľkosťou častíc, ani ich zmesi s warfarínom nevykazovali štatisticky významne odlišné náboje. Po pridaní magnéziu stearátu k zmesiam došlo k štatisticky významným zmenám elektrostatického náboja. U plniva s väčšou distribúciou častíc bolo pozorované zníženie absolútnej hodnoty náboja. Pri použití menších častíc plniva sa absolútna hodnota celkového náboja naopak zvýšila. Tieto merania vysvetlili lepšiu homogenitu zmesí pri použití plniva s väčšou veľkosťou častíc, nakoľko bol potlačený vznik elektrostatického náboja, ktorý môže negatívne ovplyvňovať výslednú homogenitu zmesi, resp. zvyšovať chybu vzorkovania.

Všetkým hodnoteným kritériám pre obsahovú rovnorodosť vyhovelí tabletové zmesi pripravené s použitím plniva s väčšou veľkosťou častíc a všetky 3 šarže s neskorším prídavkom magnéziu stearátu (technológia B).

Výsledky analýzy čiastočných najmenších štvorcov (*Partial least square regression, PLS*) pomocou ktorej bol posúdený vplyv technologických premenných (veľkosť častíc plniva, čas prídavku klziva) na responzné premenné (RSD, Cpk podľa kritérií Ph.Eur. 2.9.6 a FDA) ukázali signifikantný vplyv premennej veľkosti častíc na všetky sledované premenné. Analýzou bol ďalej dokázaný významný vplyv interakcie technológie B a veľkých častíc plniva na hodnotu RSD. Touto kombináciou dochádza k významnému zníženiu hodnoty RSD a potenciálne signifikantnému zvýšeniu oboch hodnôt Cpk indexu. Túto kombináciu je možné považovať za najvhodnejšiu. Výsledky PLS regresie potvrdzujú výsledky hodnotenia uniformity podľa hodnotených kritérií pre obsahovú rovnorodosť.

Analýza obsahovej rovnorodosti tabliet nalisovaných z tabletových zmesí pomocou F-testu zhody rozptylov ($p \leq 0,05$) ukázala signifikantne menší rozptyl nameraných obsahov warfarínu v tabletách pripravených zo zmesí s väčšími časticami plniva u technológie A. U technológie B nebol zistený významný vplyv veľkosti častíc použitého plniva na CU tabliet. Vzhľadom na to, že u tabletových zmesí, z ktorých boli tablety pripravené, bol štatisticky významný rozdiel pozorovaný, dá sa domnievať, že sa nejednalo o chybu CU, ale o chybu vzorkovania. Toto tvrdenie je v súlade so zisteným nárastom celkového elektrostatického náboja u zmesí pripravených s použitím plniva o menšej veľkosti častíc. Elektrostatický náboj negatívne ovplyvňuje chybu vzorkovania, ktorá bola pravdepodobne hlavnou príčinou pozorovanej horšej obsahovej rovnorodosti zmesí pripravených technológiou A. U tabliet, rovnako ako u zmesí, nebol zistený štatisticky významný rozdiel (F-test) medzi technológiou A a B. Kritériám CU tabliet vyhovel len tablety pripravené s použitím plniva s väčšou veľkosťou častíc pripravené technológiou B. U tohto zloženia bola zistená tiež zanedbateľná chyba vzorkovania, čo pravdepodobne súvisí s nižším elektrostatickým nábojom binárnej zmesi warfarínu s týmto plnivom. Uvedené tablety vyhovujú tiež úzkemu limitu CU firmy DuPont.

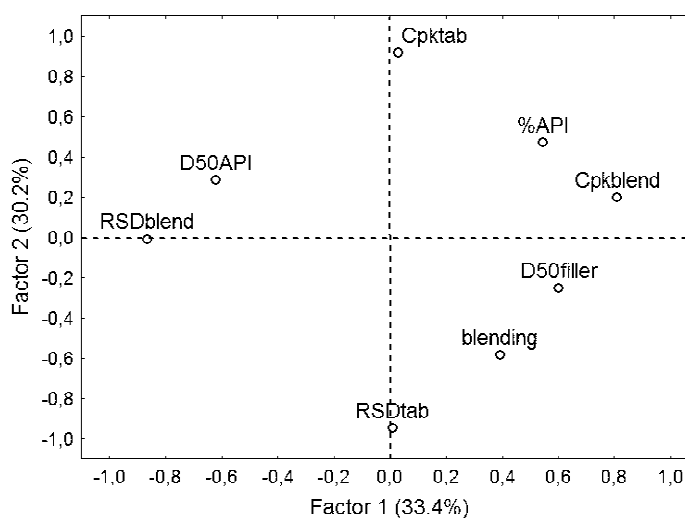
Nájdením optimálneho postupu prípravy priamo lisovaných tabliet zo spoločnej zmesi s obsahom sodnej soli kryštalického warfarínu v rozsahu 1 – 10 mg s použitím faktorovej analýzy sa zaoberal experimentálny článok (plné znenie článku na strane 149):

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A., GONĚC, R., MIKA, F. a VETCHÝ, D. **Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active substance.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **109**:541-547. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.017. (IF₂₀₁₆ = 3,756).

Jedným z cieľov článku, bolo overenie vhodnosti faktorovej analýzy pri optimalizácii kritických výrobných parametrov, tak aby bola umožnená produkcia tabliet s obsahom warfarínu s vyhovujúcou CU v celej terapeuticky používanej škále. Ďalším stanoveným cieľom bolo overenie robustnosti metódy prípravy tabliet zo spoločnej

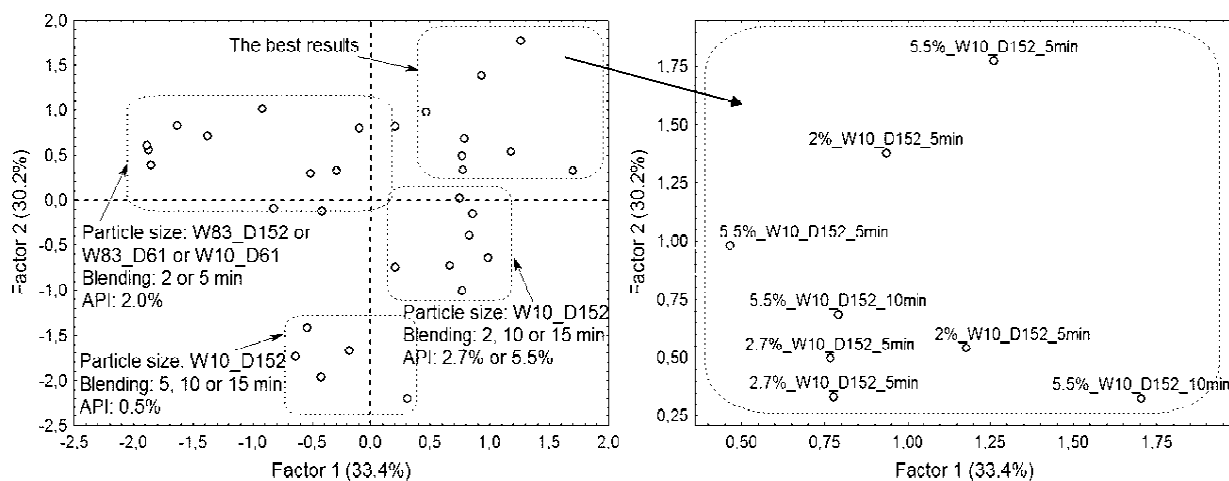
zmesi (CB) metódou „worst case,“ ktorá simulovala odchýlenie obsahu warfarínu na 96, resp. 104 % teoretického obsahu.

Faktorovou analýzou bol hodnotený dátový súbor 32 vzoriek, ktoré boli vybrané z predchádzajúcich experimentov [23, 25, 28, 29, 90, 91]. Hodnotil sa vplyv formulačných a procesných parametrov (distribúcia veľkosti častíc API a plniva, obsah API a dĺžka miesenia tabletovej zmesi po prídavku klziva) na CU zmesi a tablet. Z grafu faktorových záťaží (Obrázok 2) sa zistilo, že obsahová rovnorodosť zmesí nekoreluje s obsahovou rovnorodosťou tablet, čo je možné vysvetliť chybou vzorkovania zmesí [29, 38].



Obrázok 2. Graf faktorových záťaží.

V grafe faktorových záťaží, bola pozorovaná korelácia veľkosti častíc plniva s Cpk zmesi a korelácia veľkosti častíc API s RSD zmesi. Lepšia uniformita zmesí bola dosiahnutá pri použití väčších častíc plniva a menších častíc API, čo je v súlade s výsledkami predchádzajúcej práce, v ktorej bolo popísané, že modelová zmes sodnej soli warfarínu ($d_{50} = 10,3 \mu\text{m}$) s Di-cafosom (plnivo) a magnézium stearátom vykazovala väčší elektrostatický náboj pri použití menších častíc plniva, než pri použití väčších častíc $d_{50} = 61,1/152,3 \mu\text{m}$ [29]. Elektrostatický náboj môže zvyšovať chybu vzorkovania zmesi a jeho potlačenie preto pozitívne ovplyvňuje výslednú homogenitu tabletovej zmesi. Veľkosť častíc API ani plniva nie je významne korelovaná s obsahovou rovnorodosťou tablet, čo znamená, že distribúcia veľkosti častíc ovplyvňuje najmä chybu vzorkovania zmesi a nie CU tablet. Graf faktorových skóre (Obrázok 3) zobrazuje optimálnu dĺžku miesenia zmesi.



Obrázok 3. Graf faktorových skóre.

Najlepšie výsledky boli dosiahnuté u zmesí miesených 5 minút po pridaní lubrikantu. Ďalej bola z grafu zistená optimálna koncentrácia API v zmesi, pričom najlepšie výsledky boli dosiahnuté u vzoriek s obsahom API 2 %, 2,7 % a 5,5 %, s dĺžkou miesenia po pridaní lubrikantu 5 minút a pri použití malých častíc API ($d_{50} = 10,3 \mu\text{m}$) a veľkých častíc plniva ($d_{50} = 152,3 \mu\text{m}$). Ako optimálna koncentrácia API bola zvolená 2 %, pretože u tejto koncentrácie vykazovali obe pripravené šarže vyhovujúcu CU. Pri tejto koncentrácii je možné pripraviť tablety v celom terapeutickom rozsahu síl 1 – 10 mg metódou CB a pre každú silu je možné docieľiť výrobu výliskov s adekvátnymi rozmermi a hmotnosťou. Nevyhovujúca je koncentrácia API 0,5 %, u ktorej bola pozorovaná významná korelácia s RSD tabliet; uvedená koncentrácia negatívne ovplyvňuje CU tabliet. Na základe faktorovej analýzy sa podarilo nájsť optimálne hodnoty kritických parametrov výroby tabliet s obsahom warfarínu. Optimalizované technologické podmienky sa použili k výrobe tabliet priamym lisovaním zo spoločnej zmesi, ktoré mali overiť výsledky faktorovej analýzy a robustnosť navrhnutej prípravy tabliet.

Z CB boli pripravené 3 šarže zmesí a následne tabliet, pričom v jednej bol obsah warfarínu 100 %, v ďalších dvoch bol obsah warfarínu 96 a 104 %. Šarža A, reprezentovala prípad, kedy je teoretický obsah API vychýlený o -4% , šarža B, reprezentovala 100% obsah API a šarža C $+4 \%$. Obsahy boli zvolené na základe monografie „*Warfarin sodium tablets*,“ ktorá požaduje obsah v tablete 95 – 105 % [79]. Výsledky fyzikálnych vlastností zmesí sa prakticky nelíšili a vyhoveli požadovaným limitom. Všetky zmesi vyhoveli požiadavkám obsahovej rovnorodosti a vďaka vyhovujúcej hodnote Cpk indexu pre limity Ph.Eur. 2.9.6 je u nich zabezpečené, že 99,7 % následne vyrobených šarží aj s limitným obsahom (96 – 104 % teoretického obsahu API)

vyhovie danému liekopisnému limitu. S ohľadom na výsledky faktorovej analýzy, bola analyzovaná modelová zmes s obsahom sodnej soli warfarínu, Di-cafosu a stearanu horečnatého pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie a energeticky disperznej röntgenovej spektroskopie s cieľom overiť vznik „interaktívnej práškovej zmesi“ medzi časticami API a plniva. Vznik interakcie medzi časticami API a plniva nebol pozorovaný. Zo zmesí boli následne nalisované tablety, ktoré vykazovali vyhovujúce liekopisné fyzikálne vlastnosti a podobné výsledky neliekopisných parametrov. Vyrobené boli tablety s obsahom 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7,5 a 10 mg sodnej soli warfarínu, pričom množstvo liečivej látky v tablete bolo dané hmotnosťou tablety, ktorá bola v rozsahu 54,2 – 542,0 mg. Tablety všetkých síl pripravených zo zmesí A, B a C vyhoveli liekopisným kritériám uvedeným v článku Ph.Eur. 2.9.6 a 2.9.40. Vypočítané hodnoty C_{pk} boli ≥ 1 . Bergumovej metóde nevyhoveli šarže B a C s obsahom warfarínu 1 mg. Dôvodom je pravdepodobne nízka hmotnosť tabliet, pretože sa jedná o jediný parameter, ktorým sa tieto tablety líšia od ostatných síl. Tieto šarže rovnako nespĺňajú ani vnútorné limity komerčných výrobcov [68]. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že technologické parametre zvolené na základe výsledkov faktorovej analýzy zabezpečia prípravu tabliet priamym lisovaním zo spoločnej zmesi, ktoré vyhovujú liekopisným limitom a aj splnenie uvedených liekopisných limitov na požadovanej štatistickej hladine významnosti, okrem tabliet s obsahom 1 mg warfarínu. Optimalizácia technologických parametrov s využitím faktorovej analýzy sa javí ako vhodný štatistický nástroj, ktorý je použiteľný aj v praxi výrobcami liečiv k optimalizácii výroby z výsledkov prepustených šarží.

2.1.6 Hmotnostná rovnorodosť

Hmotnostná rovnorodosť úzko súvisí s CU. Variabilná hmotnosť tabliet je významným predispozičným faktorom pre nevyhovujúcu obsahovú rovnorodosť, pretože vplyvom kolísania hmotnosti, zároveň dochádza ku kolísaniu obsahu účinnej látky.

Častou príčinou nevyhovujúcej hmotnostnej rovnorodosti je nerovnomerné plnenie matrice tabletovinou v dôsledku nevyhovujúcich tokových vlastností lisovanej zmesi [92]. Tie sú spôsobené príťažlivými silami pôsobiacimi medzi jednotlivými časticami prášku. Príťažlivé sily podporujú tvorbu agregátov, pre ktoré sú typické horšie tokové vlastnosti. Tokové vlastnosti ovplyvňujú tiež fyzikálne vlastnosti tabletoviny, ako je veľkosť a tvar častíc a obsah vlhkosti [93-95]. Nevyhovujúcu hmotnostnú

rovnorodosť tabliet je možné upraviť zlepšením tokových vlastností tabletoviny a to buď pridaním dostatočného množstva klziva [96], alebo optimalizáciou distribúcie veľkosti častíc zmesi granuláciou [97]. Vysoká hmotnostná variabilita môže byť spôsobená tiež lepením prášku k povrchu razidiel. Najčastejším riešením je opäť prídanie klziva k zmesi alebo zámena razidiel. Okrem formulačných parametrov môže byť nevyhovujúca hmotnostná rovnorodosť spôsobená tiež nevhodným nastavením tabletovacieho lisu alebo procesu.

2.1.7 Nevyhovujúca pevnosť tabliet

Pevnosť tabliet je jednou z najrelevantnejších vlastností tabliet, ktorá charakterizuje stlačiteľnosť tabletoviny a mechanickú odolnosť tabliet. Považuje sa za ukazovateľ mechanickej odolnosti v priebehu lisovania, balenia, transportu a dispenzácie [15]. Najčastejšou príčinou nevyhovujúcej pevnosti, sú nedostatočné väzbové vlastnosti tabletoviny, ktoré je možné zlepšiť prídavkom spojiva. Ďalšou častou príčinou býva nadmerné množstvo klziva (lubrikantu) vo formulácii.

Jedným z najčastejšie používaných lubrikantov je magnézium stearát. Pri výrobe tabliet sa najčastejšie používa v koncentráciách 0,25 – 5,0 % [98]. Literatúra uvádza, že magnézium stearát vykazuje negatívny účinok na lisovateľnosť prášku a to znížením mechanickej pevnosti tabliet [13, 14]. Tento fenomén je vysvetľovaný tvorbou tenkého filmu lubrikantu na povrchu častíc prášku v priebehu lisovania [26]. Vzniknutá fyzikálna bariéra oslabuje interpartikulárne väzbové sily medzi časticami prášku, výsledkom ktorých je nedostatočná pevnosť tabliet. Možné riešenie uvedeného problému predstavuje zmena zloženia tabletoviny – zámena klziva alebo úprava množstva. Ďalším typickým účinkom magnézium stearátu je predĺženie času rozpadu tabliet a zníženie rýchlosti disolúcie v dôsledku hydrofobicity [99, 100]. V literatúre je možné nájsť tiež prípad, kedy magnézium stearát v zmesi s ibuprofenom vykazoval prekvapivo kratší čas rozpadu ako natrium-stearyl-fumarát, [101] ktorý je považovaný za excelentné klzivo. Príznačný je preň kratší čas rozpadu v dôsledku nižšej hydrofobicity a menšej citlivosti na miešanie [102-104]. Vysvetlením môže byť vysoký obsah ibuprofenu v testovaných zmesiach, nakoľko ibuprofen je známy ako vysoko hydrofóbná látka [105-107]. Pri vysokom obsahu ibuprofenu v zmesi je pravdepodobne maskovaný vodu-odpudivý efekt pridaného klziva, čo vedie k času rozpadu nezávisle od hydrofobicity klziva [101].

Z faktorov nastavenia tabletovacieho lisu môže za nedostatočnú pevnosť zodpovedať nesprávne nastavenie lisovacej sily a rýchlosti lisovania. Primárnou funkciou lisovacej sily je zvýšenie kontaktného povrchu medzi časticami, pričom je uľahčená deformácia častíc a formovanie výliskov [50]. Čím je lisovacia sila vyššia, tým väčšia je tiež väzbová sila medzi časticami a následne aj pevnosť tabliet. K tomuto nárastu pevnosti však dochádza len po určitú lisovaciu silu, od ktorej sa už pevnosť nemení, pretože častice dosiahli najmenšiu vzdialenosť [108]. Niektoré zdroje uvádzajú, že pevnosť tabliet klesá so vzrastajúcou rýchlosťou lisovania. Tento jav je pripisovaný nižšiemu počtu interpartikulárných väzieb, v dôsledku skrátenia času potrebného pre plastickú deformáciu [109, 110]. Tento jav je v literatúre označovaný ako viskoelasticita [111-113].

2.1.8 Vrstvenie a viečkovanie

Vrstvenie (*Lamination*) je charakterizované ako separácia tabliet do 2 alebo viacerých laminárnych vrstiev (Obrázok 4A). Viečkovanie (*Capping*) sa popisuje ako čiastočná alebo kompletná separácia viečka alebo dna tablety (Obrázok 4B) [114]. Príčinou týchto javov môže byť nízky obsah vlhkosti v lisovanom prášku, nevhodná distribúcia veľkosti častíc, nadmerné množstvo klziva, nízke spojivové vlastnosti prášku, uzatvorené vzduchové bubliny vo výlisku, či veľká lisovacia sila [114-116].

Riešenie vrstvenia a viečkovania spočíva v úprave zloženia zmesi, príp. v zmene nastavení tabletovacieho lisu. Zloženie je možné upraviť napr. zvýšením množstva spojiva, alebo jeho zámennou, znížením obsahu klziva alebo jeho zámennou, či pridaním vlhčiva. Z nastavení tabletovacieho lisu, môže pomôcť týmto javom predchádzať zníženie rýchlosti lisovania a lisovacej sily, aplikácia predlisovacieho tlaku, či zámena razidiel [117, 118].



Obrázok 4. Schematické znázornenie vrstvenia (A) a viečkovania (B) tabliet.

2.1.9 Lepenie

Jednu z najčastejších vážnych komplikácií pri tabletovaní predstavuje lepenie (*Sticking*) účinnej látky k povrchu razidla. Tabletovanie účinnej látky, ktorá má tendenciu lepiť sa, môže spôsobiť finančné problémy a viesť tiež k strate investovaného času. Z tohto dôvodu je analýza kritických faktorov ovplyvňujúcich tento proces užitočným nástrojom šetriacim čas i peniaze. Lepenie môže ovplyvniť prídavok klznej látky do zmesi alebo použitie razidiel s upraveným povrchom, príp. zmena v nastavení tabletovacieho lisu. Lepenie ovplyvňuje tiež obsah vlhkosti v lisovanej zmesi [114]. V literatúre môžeme nájsť prípady, kedy sa so zvyšujúcim obsahom vody v prášku proporcionálne zvyšovalo tiež množstvo prášku nalepeného na razidle [119].

Lepenie vedie k vzniku vrstvy prášku naadherovanej k povrchu razidla. Dôsledkom lepenia býva predčasné ukončenie lisovacieho procesu a pre výsledné tablety je charakteristický drsný povrch a nekompletné ryhy. Tieto tablety sú nevyhovujúce a preto musia byť odstránené. V niektorých extrémnych prípadoch sa môže stať, že sa celá tableta prilepí k hornému razidlu, čo vedie k nežiaducemu sekundárnemu lisovaniu tablety spoločne s nasledujúcim plnením matrice. V tomto prípade dochádza k obrovskému zvýšeniu lisovacej sily, pretože sa v danom okamihu lisujú v podstate dve tablety naraz a môže dôjsť až k prasknutiu lisovacej stanice, ev. k vykĺbeniu u excentrického tabletovacieho lisu. V ďalšom extrémnom prípade, môže nalepenie tablety k ploche dolného razidla viesť k zvýšeniu sily potrebnej k jej odstráneniu z matrice (*take-off force*). Táto sila môže poškodiť tabletu alebo môže dôjsť k pretlačeniu časti alebo dokonca celej tablety pod stieračom späť do plniacej stanice. V oboch prípadoch môže dôjsť k poškodeniu lisovacích dielov a následne i celého lisovacieho zariadenia [120-122]. Uvedené komplikácie sa často vyskytujú u nových API ku koncu vývojového procesu, kedy lisovanie prebieha po prvý raz [123]. K problémom môže dôjsť aj u obchodovaných tabliet v prípade, že prebehli drobné úpravy na zariadení, či vo výrobnom procese.

Na zníženie alebo zabránenie lepenia sa k formuláciám pridávajú klzné látky [13, 124]. Jednou z najčastejšie používaných je magnézium stearát (MS). Táto pomocná látka sa vyznačuje redukciou trenia a lepenia a tiež cenovou dostupnosťou [13, 124, 125]. Známa je tiež kvôli negatívnemu vplyvu na pevnosť tabliet a predĺženému času rozpadu a uvoľňovania liečiva z formulácie [124]. Tieto negatíva sú výraznejšie s predĺžením času miesenia [126]. V kombinácii stearanových klzných látok (MS, kalcium-stearát, kyselina steárová a steryl alkohol) s ibuprofenom dochádza k vzniku eutektickej zmesi, v dôsledku

čoho klesá teplota topenia ibuprofenu a vzrastá adhézia [127, 128]. Literatúra uvádza, že u zmesí s obsahom magnéziom stearátu a talku, dochádza k zníženiu statického náboja, ktorý vzniká tokom častíc cez násypku tabletovacieho lisu [129]. V ďalšej štúdií sa zistilo, že antistatické vlastnosti takejto zmesi priamo úmerne klesajú so znížením koncentrácie lubrikantu [130]. Meraním interakčných síl medzi dvoma časticami magnéziom stearátu; magnéziom stearátu a mikrokryštalickej celulózy (MCC); časticami magnéziom stearátu a ocele; a časticami MCC a ocele pomocou atómovej silovej mikroskopie (*Atomic force microscopy, AFM*), boli namerané najväčšie príťažlivé sily medzi magnéziom stearátom a oceľou. Z výsledkov týchto meraní je zrejmé, že vplyvom prítomnosti lubrikantu, dochádza k zabráneniu priameho kontaktu častíc MCC s povrchom ocele (vyššia príťažlivá sila medzi magnéziom stearátom a oceľou), čím sa znižuje množstvo interakcií medzi časticami MCC-MCC, príp. MCC-ocel', ktoré môžu negatívne ovplyvniť veľkosť sily potrebnej na odstránenie tablety z matrice. V prítomnosti lubrikantu sa obmedzí priamy kontakt častíc MCC-ocel', čo sa odzrkadlí nižším trením a nižšími silami potrebnými k odstráneniu tablety z matrice [131]. Uvedeným spôsobom je možné vysvetliť funkciu klziva v zmesi a jeho schopnosť zabrániť tiež adherencii častíc účinnej látky k povrchu razidla. Ďalším často používaným klzivom je natrium-stearyl-fumarát, ktorý predstavuje dobrú, avšak pomerne drahú alternatívu k MS. Vyznačuje sa podobnými lubrikačnými vlastnosťami ako MS a zároveň menším množstvom chemických inkompatibilit a menej významným vplyvom na predĺženie rozpadu tabliet [102]. Novšie tzv. zmesné suché spojivá (*ko-procesné excipienty*) sa vyznačujú lepšími vlastnosťami, v porovnaní s pôvodnými látkami. Príkladom takéhoto spojiva je LubritoseTM MCC, ktorá obsahuje lubrikant a suché spojivo. Ko-procesné excipienty sú pri priamom lisovaní veľmi populárne, kvôli nižšej citlivosti pri miešaní a zníženiu množstva výrobných krokov [132].

Používanie razidiel s poťahom predstavuje ďalšiu možnosť redukcie lepenia s pridaným benefitom, ako je odolnosť voči korózii a opotrebovaniu [133-137]. Výber vhodného razidla pre tabletovanie určitej formulácie môže byť náročný, pretože poťahy sú považované za komplexné štruktúrované kompozitné materiály a ich interakcie so zmesou je preto ťažké predvídať [138, 139]. Na trhu je dostupných množstvo rôznych poťahových materiálov razidiel, ale len málo bolo systematicky testovaných so zameraním na redukcii lepenia a opotrebovania [123, 136]. Najčastejšie používaným poťahovým materiálom je tvrdý chróm (HCr) vyrábaný galvanizáciou [140]. Jeho antiadhézne vlastnosti sú porovnateľné až horšie, ako u razidiel bez poťahu (U) [122, 137]. Alternatívu predstavujú poťahy pripravené fyzikálnou depozíciou z plynnej fázy (*Physical vapor*

deposition, PVD), napr. titán nitrit (TiN) alebo chróm nitrit (CrN) [135, 140, 141]. Prevládajúcim PVD poťahom je TiN. Literatúra uvádza, že CrN predstavuje lepšiu voľbu v porovnaní s TiN a HCr [140, 142, 143]. Predmetom rôznych štúdií bola predovšetkým odolnosť poťahov voči oderu a korózii, ktoré predstavujú významný determinant pre použitie príslušného poťahu [138, 139, 141, 142]. Poťahové materiály pre špecifické požiadavky razidiel a ich vplyv na lepenie v čase pred a po opotrebovaní doteraz nebol skúmaný.

Množstvo nalepenej účinnej látky na razidle je možné stanoviť pomocou HPLC. Pri stanovení sa zvyčajne postupuje tak, že po nalisovaní určitého množstva tabliet za definovaných podmienok (predlisovacia sila, lisovacia sila, poloha dolného razidla, počet lisovacích cyklov atď.), sa z tabletovacieho lisu odstráni obe razidlá, ktoré sa následne očistia tak, aby zostala nalepeným práškom pokrytá len plocha horného a dolného razidla. Adherovaný prášok sa analyticky prevedie do odmernej banky, doplní po rysku a privedie k analýze. Množstvo nalepenej účinnej látky sa určí pomocou kalibračnej krivky a sleduje sa vplyv sledovaných parametrov (lisovacia sila, použité klzivo, materiál razidla) na množstvo nalepeného liečiva k hornému resp. dolnému razidlu [101].

Predikciu lepenia je možné testovať tiež pomocou atómového silového mikroskopu [136, 144]. Pomocou tohto mikroskopu, je možné získať poznatky o interakčných silách medzi časticami testovanej látky a povrchmi [145, 146]; prístroj umožňuje zobrazit' tiež topografiu povrchov s vysokým rozlíšením [147, 148]. Takto získané poznatky je možné použiť k lepšiemu pochopeniu fenoménu lepenia.

K popisu mechanizmu a kinetiky lepenia je možné použiť aj matematické vyjadrenie, ktoré navrhol Paul, *et al.* [17]. Model vychádza z Hillovej rovnice a je možné ho použiť pre 24 rozličných API, vrátane ibuprofenu. Model využíva analógiu s rýchlosťou enzýmovej reakcie, pričom porovnanie modelu Paula, *et al.* s Hillovou rovnicou má za cieľ získať viac informácií o význame sledovaných parametrov (miera lepenia, lisovacia sila, počet lisovacích cyklov). Aplikáciou uvedeného modelu, boli získané zhodné výsledky s experimentálnymi výsledkami lepenia. Tento model ponúka nový pohľad na kinetiku lepenia a umožňuje odhadnúť mieru lepenia, avšak len u určitých formulácií. Ďalšou limitáciou tohto modelu je, že tablety musia byť lisované pri presne definovanej lisovacej sile, za použitia stanoveného zariadenia a za vopred stanovených podmienok. V ďalšej štúdií od Paul, *et al.* [149] analýzou čiastočných najmenších štvorcov (*Partial least square analysis, PLS*) zistil, že plocha povrchu častíc prášku a pevnosť tablety v ťahu najviac

korešpondujú s lepením. Testovaný bol aj vplyv veľkosti častíc prášku, ejekčnej sily a sily potrebnej k odstráneniu tablety z matrice. Táto štúdia bola prevedená s 24 API, vrátane ibuprofenu.

2.1.10 Ibuprofen

Ibuprofen štruktúrne známy aj ako (\pm) -(R,S)-2-(4-izobutylfenyl)propánová kyselina, v organizme podlieha jednosmernej inverzii na S(+)-ibuprofen, ktorý predstavuje farmakodynamicky aktívnu časť molekuly [150, 151]. V prípravkoch sa zvyčajne vyskytuje vo forme voľnej kyseliny, ale tiež vo forme solí, esterov a komplexov [152]. Využíva sa k liečbe miernej až stredne silnej bolesti spôsobenej dysmenoreou, k liečbe bolesti hlavy, migrény, bolesti po operáciách a bolesti zubov. Typický je preň okrem analgetického tiež antiflogistický a antipyretický účinok [153, 154]. Vyznačuje sa silnou väzbou k plazmatickým proteínom (> 99 %) [155, 156] a širokým terapeutickým indexom. Hodnota pKa leží v rozmedzí 4,5 – 4,6 [157].

Z povahy účinnej látky (zlé tokové vlastnosti, stlačiteľnosť a nízka teplota topenia) vyplýva vysoká náchylnosť k lepeniu v priebehu lisovania. Ďalším problémom, s ktorým sa u ibuprofenu stretávame je jeho nízka rozpustnosť, s ktorou súvisia problémy pri prevedení skúšky disolúcie.

2.1.10.1 Lepenie ibuprofenu

Často je ako modelové liečivo v experimentoch na stanovenie lepenia k razidlám v priebehu lisovacieho procesu využívaný ibuprofen zo skupiny nesteroidných protizápalových liečiv (*Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs*) [120, 127, 158]. Podávaný je najmä perorálne vo forme tabliet. Lisovanie tejto API je veľkou výzvou v dôsledku jej zlých tokových vlastností a stlačiteľnosti a tiež kvôli príľnavosti k povrchu lisovacieho zariadenia [105, 106, 120]. Tento jav u ibuprofenu podporuje nízka teplota topenia (75 – 78 °C) [120]. Predpokladá sa, že vznikajúce interpartikulárne trenie v priebehu lisovania, vedie k lokálnemu zvýšeniu teploty na novo vznikajúcom povrchu tablety, pričom je indukované topenie prášku s nízkou teplotou topenia. Následná rýchla rekryštalizácia, vyplývajúca z poklesu lisovacej sily po prechode razidiel lisovacími valcami, spôsobuje adhéziu k lisovaciemu zariadeniu [127, 159]. Zvýšenie teploty v priebehu lisovania, môže viesť tiež k zvýšeniu pevnosti tabliet v ťahu [159-161]. Kvôli

zlým lisovacím vlastnostiam ibuprofenu v práškových formuláciách je preto často potrebná jeho predošlá granulácia [107, 162, 163]. Tento proces je však finančne náročný a vyžaduje tiež viac energie a času [163, 164].

Ďalšou možnosťou ako redukovať adhéziu práškových formulácií s ibuprofenom predstavuje zmena v nastavení lisovacích parametrov. Štúdia Aokiho a Danja [158] ukázala, že redukcia lisovacej rýchlosti a zvýšenie lisovacej sily vedie k redukcii lepenia ibuprofenu k povrchu razidiel. V literatúre je možné nájsť aj ďalšie prípady, kedy zvýšenie lisovacej sily viedlo k zníženiu lepenia ibuprofenu [120, 158, 165]. Zníženie lepenia pri zvýšení lisovacej sily sa vysvetľuje zvýšením príťažlivých síl vo vnútri tablety, ktoré presahujú sily pôsobiace medzi tabletou a povrchom razidla [158, 165, 166]. Redukovať lepenie formulácií s ibuprofenom, je možné tiež zámenou klziva alebo zmenou množstva, ale aj použitím razidiel s rozličným poťahom.

Sledovaním vplyvu zvolených premenných (typ klziva, lisovacia sila, materiál razidla) na lepenie ibuprofenu k hornému, resp. dolnému razidlu a stanovením najodolnejšieho poťahového materiálu razidla pre dlhodobé používanie sa zaoberal experimentálny článok (plné znenie článku na strane 137):

AL-KARAWI, C., LUKÁŠOVÁ, I., SAKMANN, A. a LEOPOLD, C.S. **Novel aspects on the direct compaction of ibuprofen with special focus on sticking.** *Powder Technology*. 2017, **317**:370-380. doi: 10.1016/j.powtec.2017.05.014. (IF₂₀₁₅ = 2,759).

Cieľom tejto experimentálnej práce bolo určiť a analyzovať kritické faktory ovplyvňujúce lepenie ibuprofenu v priebehu priameho lisovania na rotorovom lisovacom stroji a následne s využitím štatistickej a faktorovej analýzy pomocou Design Expert[®] software (DoE, verzia 8.0.7.1; Stat-Ease, USA) určiť optimálne nastavenie kritických parametrov pre redukcii lepenia. Zvláštna pozornosť bola v článku venovaná skúmaniu vplyvu zvoleného poťahového materiálu razidla na lepenie zvolenej API, pričom lepenie bolo skúmané u nových razidiel a po ich 3 ročnom používaní. Porovnávané bolo tiež lepenie pri laboratórnom a priemyselnom využití tabletovacieho lisu.

U 4 zmesí líšiacich sa lubrikantom (glycerol monostearát (GMS), magnézium stearát (MS), natrium-stearyl-fumarát (SSF) alebo Lubritose[™] MCC), bol na základe sypnej a zhustenej hustoty vypočítaný Hausnerov pomer, ďalej bol stanovený sypný uhol

a rýchlosť vytekania otvorom o priemere 10 mm (Ph.Eur. 2.9.36, 2.9.34). Všetky zmesi mali vyhovujúce tokové vlastnosti a bolo možné ich použiť k ďalšiemu testovaniu. U zmesí bola pomocou termo-hygrometra stanovená teplota a relatívna vlhkosť (*Relative humidity, RH*). Na stanovenie vplyvu klziva na zníženie teploty topenia ibuprofenu, boli pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (*Differential scanning calorimetry, DSC*) stanovené teploty topenia samotného ibuprofenu a ibuprofenu spolu s 0,83 % (w/w) lubrikantu GMS/MS/SSF; u vzorky s LubritoseTM MCC bolo použitých 41,67 % (w/w) lubrikantu, aby bol zachovaný rovnaký pomer klziva.

Tablety boli lisované v jedno razidlovom móde pomocou rotorového tabletovacieho lisu (FETTE 102i, Fette Compacting, Nemecko). Lisovanie tabliet prebiehalo v klimatizovanej miestnosti (21 °C a 45 % RH) s použitím konkávných razidiel (FETTE Compacting, Nemecko) o priemere 10 mm. Testované boli nasledovné poťahy razidiel: (chróm nitrit - FCG-CRN, titán nitrit - FCG-TIN, tvrdý chróm - FCG-HCP); razidlo bez poťahu - FCG-U slúžilo ako kontrola. Tablety boli lisované silou 5 kN, 12 kN (centrálny bod) alebo 19 kN. Množstvo ibuprofenu na hornom, resp. dolnom razidle bolo stanovené pomocou HPLC (Chromaster, USA). Rozpad tabliet bol stanovený najskôr 24 h od výroby podľa požiadaviek Ph.Eur. pre neobalené tablety. Okrem klasickej skúšky rozpadu bola vykonaná tiež modifikovaná skúška s použitím 0,3% vodného roztoku polysorbátu 80. Pevnosť, priemer, hmotnosť a výška tabliet boli taktiež stanovené. Pevnosť tabliet v ťahu (N/m^2), ktorá je merítkom mechanickej odolnosti tabliet, bola stanovená na základe výpočtu Pitta, *et al.* [167] pre bikonvexné tablety. U 3 tabliet nalisovaných pri lisovacej sile 5 a 19 kN s klzivom MS/SSF bola stanovená pravá hustota pomocou héliového pyknometra. Pomocou vzorca bola ďalej vypočítaná porozita tabliet.

Výsledky analýz pomocou DoE ukázali, že vzájomná interakcia lisovacej sily a poťahu razidla má významný vplyv na lepenie ibuprofenu k razidlu. Pri lisovacej sile 5 kN bolo stanovené množstvo ibuprofenu (μg) na razidlách v nasledovnom poradí: FCG-CRN < FCG-TIN < FCG-U < FCG-HCP. So vzrastajúcou lisovacou silou klesalo u všetkých poťahov množstvo ibuprofenu na razidle, pričom najnižšie stanovené množstvo ibuprofenu na razidlách bolo pri lisovacej sile 19 kN. Jedine u FCG-CRN nebolo množstvo ibuprofenu na razidle ovplyvnené lisovacou silou, čo možno vysvetliť nízkymi príťažlivými silami medzi poťahom a tabletou. Ďalšou sledovanou interakciou bol poťah-lubrikant. Lepenie na dolné razidlo FCG-HCP bolo najviac ovplyvnené výberom klziva. Najviac API bolo zistené pri použití LubritoseTM, nasledoval GMS a MS. Zmesi s SSF vykazovali najmenšie lepenie API zo všetkých lubrikantov. Menej významný

bol lubrikačný účinok na lepenie u horného razidla, čo je pravdepodobne spôsobené rozličnými mechanizmami odstránenia tablety z horného a dolného razidla.

Čas rozpadu sa predĺžil so vzrastajúcou lisovacou silou z 5 kN na 12 kN, ale klesol opäť pri 19 kN. Všetky tablety sa rozpadli v priebehu 7 minút, čím splnili liekopisné požiadavky pre rozpad neobalených tabliet, kde je stanovený limit 15 minút [57]. Literatúra uvádza, že so vzrastajúcou lisovacou silou rastú príťažlivé sily v tablete, čo sa prejaví predĺžením času rozpadu [99]. Pri vyššej lisovacej sile sa zvyšuje elastická deformácia prášku, zatiaľ čo plastická deformácia zostáva viac-menej konštantná. Výsledkom je vyššie elastické zotavenie tabliet lisovaných vyššou lisovacou silou. Predpokladá sa, že väzbové sily vo vnútri tabliet lisovaných silou 19 kN a ich čas rozpadu boli znížené práve týmto efektom [168]. Voľba klznej látky (GMS, MS, SSF, Lubritose™ (GMS)) lepenie významne neovplyvnila, ale jednoznačne sa prejavila pri rozpade tabliet. Toto pozorovanie bolo v rozpore s očakávaním podľa hydrofobicity klziva [99]. V tejto štúdií rástol čas rozpadu nasledovne: MS < Lubritose™ < SSF < GMS. Pri nízkej lisovacej sile bol rozpad GMS a SSF podobný. Pri použití 0,3% vodného roztoku polysorbátu 80 boli zistené veľmi podobné hodnoty rozpadu, takže sa nepotvrdila hypotéza, že lepšia zmáčanlivosť tabliet ovplyvní čas rozpadu.

Pevnosť tabliet v ťahu bola ovplyvnená všetkými premennými. Jej hodnota bola u všetkých tabliet nad 1,8 N/m². Pevnosť v ťahu podobne ako rozpad stúpala so zvýšením lisovacej sily a potom opäť klesala. Tento jav u tabliet s ibuprofenom asociuje s vyšším elastickým zotavením tabliet lisovaných vyššou lisovacou silou [105, 169]. Zo vzájomnej korelácie poťah-pevnosť v ťahu sa zistili rozdiely, ktoré pravdepodobne spôsobili odchýlky v dĺžke použitých razidiel; tie spôsobili o niečo vyššie hodnoty hmotnosti tabliet a lisovacej sily. Ďalšou analýzou však nebola zistená žiadna významná korelácia medzi razidlom a hmotnosťou tabliet. Zvolené klzné látky taktiež ovplyvnili pevnosť v ťahu tabliet, ktorá bola podobná u SSF, MS a Lubritose™, zatiaľ čo u GMS boli jej hodnoty o niečo vyššie.

Zistilo sa, že opotrebovanie razidla v priebehu 3 rokov používania významne ovplyvňuje anti-lepivé vlastnosti rozličných poťahov u horného aj dolného razidla. Najmenšie rozdiely boli zistené v lepení u FCG-HCP a FCG-CRN. Adhézia ibuprofenu k razidlu FCG-HCP bola vysoká, pričom bola závislá tiež od použitej lisovacej sily. U FCG-CRN bola naopak nízka a nezávislá od lisovacej sily. Za najlepší poťahový materiál razidla na základe výsledkov bol zvolený FCG-CRN, ku ktorému vykazoval ibuprofen najnižšiu adhéziu v priebehu lisovania a tento materiál vykazoval tiež najvyššiu

odolnosť v čase. Ako najmenej odolné poťahy bol vyhodnotený FCG-TIN a FCG-U, u ktorých s časom rástlo množstvo nalepeného ibuprofenu, najmä pri najmenej lisovacej sile. Výsledky lepenia na FCG-U v čase sú v rozpore s doterajšími výsledkami, v ktorých Roberts, *et al.* zistil, že lepenie je menšie u používaných razidiel FCG-U v porovnaní s novými [122]. Tento rozdiel môže byť spôsobený tiež kvalitou poťahu, príp. výrobcom.

Pri porovnaní laboratórneho a priemyslového využitia tabletovacieho lisu sa zistilo, že najviac prilepeného ibuprofenu na dolnom razidle bolo pri lisovacej sile 8 kN pri použití razidla FCG-HCP, pričom bola zistená vysoká smerodajná odchýlka, ktorá svedčí o nehomogénnom množstve adherujúceho ibuprofenu.

2.1.11 Skúška disolúcie

In vitro disolučné skúšky pevných liekových foriem sú veľmi dôležitým nástrojom pri vývoji liečiv. Disolučná skúška umožňuje stanovenie množstva uvoľnenej API (%) v čase za použitia vhodného disolučného média. Najčastejšie sa ako médium používa čistená voda alebo pufor s rôznym pH. Najčastejšie používaný je pufor s pH 1,2 (simulácia prostredia žalúdka) a s pH 6,8 (simulácia prostredia tenkého čreva). Podľa českého liekopisu je pri skúške možné použiť aparatúru obsahujúcu košík, pádlo, prietokový valec alebo prietokovú celu [57]. Disolúcia umožňuje selekciu a optimalizáciu formulácií, štúdium mechanizmov uvoľňovania API, zaisťuje rovnaké zloženie každej šarže, kontroluje kvalitu, monitoruje stabilitu a demonštruje bioekvivalenciu [170].

2.1.11.1 Hodnotenie podobnosti disolučných profilov

Po novelizácii doporučení FDA z roku 1997 [171], vzrástol v oblasti farmaceutického výskumu záujem a potreba nájsť vhodnú matematickú metódu pre hodnotenie podobnosti disolučných profilov. Túto potrebu uspokojil Moore a Flanner [172] vývojom matematickej metódy pre porovnanie disolučných profilov s použitím dvoch faktorov – faktora rozdielnosti (f_1) a faktora podobnosti (f_2) [173].

Pre porovnanie disolučných profilov stanovila FDA presné kritériá. Hodnotenie podobnosti je založené na viacerých podmienkach. Disolučné profily musia obsahovať minimálne 3 odberové body, vynímajúc $t = 0$. Pre každú formuláciu v každom odberovom bode, musí byť odobratých minimálne dvanásť individuálnych vzoriek testovaného

a referenčného prípravku (vzorky). Pre každú formuláciu nesmie existovať viac ako jedna priemerná hodnota väčšia ako 85 %. V prípade, že sa do 15 minút uvoľní viac ako 85 % liečiva, sú disolučné profily považované za podobné a žiadne ďalšie matematické hodnotenia alebo výpočty nie sú potrebné. RSD priemerov nesmie byť viac ako 20 % v prvom odberovom bode a zároveň musí byť menšia ako 10 % v každom ďalšom bode [173, 174].

Faktor rozdielnosti (f_1) slúži k vypočítaniu percentuálneho rozdielu (%) medzi referenčnou a testovacou disolučnou krivkou v každom odberovom bode. Môžeme povedať, že predstavuje akúsi mieru relatívnej chyby medzi týmito krivkami. K výpočtu slúži vzorec (2), kde n je počet odberových bodov, za R_t a T_t sa dosadia disolučné hodnoty referenčnej a testovanej vzorky v čase t . Vypočítané hodnoty f_1 v rozmedzí 0 – 15, vyjadrujú, že porovnávané disolučné krivky nie sú rozdielne [173].

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} * 100 \quad (2)$$

Faktor podobnosti (f_2) vyjadruje podobnosť referenčnej a testovacej disolučnej krivky v percentách (%). K výpočtu slúži vzorec (3), kde n je počet odberových bodov, za R_t a T_t sa dosadia disolučné hodnoty referenčnej a testovanej vzorky v čase t . V prípade, že sú dve disolučné krivky identické, nadobúda hodnota f_2 hodnotu 100. Pri priemernej variácii 10 % vo všetkých odberových bodoch, dochádza k zníženiu hodnoty na 50. Hodnoty f_2 v rozmedzí 50 – 100 vypovedajú o podobnosti porovnávaných disolučných kriviek [173, 175].

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} * 100 \right\} \quad (3)$$

2.1.11.2 Skúška disolúcie solí slabých kyselín ťažko rozpustných liečiv

Rozpustnosť liečiv povahy slabej zásady alebo slabej kyseliny, prípadne ich solí je rozdielna v závislosti od pH, vďaka čomu môžeme očakávať rozdielny stupeň disolúcie slabých kyselín alebo slabých zásad v rôznych častiach GIT. Stupeň disolúcie slabých kyselín, stúpa so zvyšujúcou sa hodnotou pH, u slabých zásad naopak klesá. Optimálne podmienky pre disolúciu slabých zásad sú preto v žalúdočných šťavách; u slabých kyselín

v prostredí tenkého čreva. Pri vytvorení soli z pôvodnej zlúčeniny dochádza k zmene disolučných podmienok. Vyššia rozpustnosť solí, je spôsobená schopnosťou zvýšiť pH difúznej vrstvy obklopujúcej pevnú liekovú formu.

Na farmaceutickom trhu je dostupných množstvo liečiv vo forme slabej kyseliny. Do tejto skupiny patria aj zvolené modelové liečivá warfarín a ibuprofen [176, 177]. Obe látky boli zaradené do II. triedy biofarmaceutického klasifikačného systému, pre ktorú je typická nízka rozpustnosť a vysoká permeabilita [152, 178]. Tieto liečivá sú vo vode ťažko rozpustné a preto sú často podávané vo forme soli (napr. warfarín sodný). V skutočnosti je však množstvo liečiva prijatého orálne nedostatočné k zmene celkového pH žalúdočných štiav. Pokiaľ sodná soľ slabej kyseliny prechádza v prostredí žalúdka z difúznej vrstvy do žalúdočnej šťavy, dochádza k okamžitej premene aniónovej formy slabo-kyslého liečiva na jeho kyslú formu, ktorá je vo vode zle rozpustná, čo často znemožní disolúciu [179]. Táto skutočnosť komplikuje použitie umelej žalúdočnej šťavy ako disolučného média u uvedenej skupiny účinných látok.

2.1.11.3 Skúška disolúcie tabliet s obsahom warfarínu

Pre zabezpečenie kvality vyrobených tabliet s obsahom warfarínu, je potrebné vhodne zvoliť disolučnú metódu, ktorá umožní vzájomné porovnanie disolučných kriviek pomocou výpočtu faktora rozdielnosti (f_1) a faktora podobnosti (f_2). USP, resp. FDA metóda, ktoré pre tablety s obsahom sodnej soli warfarínu používajú vodné médium pri otáčkach 50 rpm (prístroj s pádlom) nemá rozlišujúcu schopnosť [79, 180, 181], nie je biorelevantná a neumožňuje výpočet f_1 a f_2 [182]. Použitie média s pH 1,2, ktoré sa používa u tabliet s okamžitým uvoľňovaním, je nevhodné z dôvodu nízkej rozpustnosti API v kyslom prostredí [183]. Pri testoch s médiom s pH 4,5 sa zistilo nedostatočné množstvo uvoľnenej API (testované na tabletách s obsahom 5 mg API). Pri tomto pH je štandardný limit pre liekové formy s okamžitým uvoľňovaním dosiahnutý len v niektorých prípadoch [180, 184]. Pri obsahu 10 mg API, sa dá preto predpokladať ďalšie zníženie uvoľneného množstva, lebo väčšina molekúl warfarínu sa pri pH 4,5 nachádza v neionizovanej forme. Existujú aj biorelevantné metódy, ako je kombinácia média s pH 1,2, buď s následným zvýšením na pH 7,4 [185] alebo s n-oktanolom metódou bifázickej disolúcie [186]. Pri bifázickej disolučnej skúške sa ako disolučné médium používa 0,1 M HCl a n-oktanol. V kyslom prostredí HCl, prechádza sodná soľ warfarínu na málo rozpustnú neionizovanú formu, ktorá následne prejde do lipofilnej oktanolovej

fáze, čím je simulovaná absorpcia API z gastrointestinálneho traktu [186]. Uvedené metódy sú však pre rutinnú kontrolu technicky aj časovo náročné.

Dá sa skonštatovať, že iba disolučné metódy s použitím neutrálnych a mierne bázičných médií, v ktorých je API dobre rozpustná, sú vhodné pre disolúciu tabliet s najvyšším terapeutickým obsahom 10 mg warfarínu. Ako alternatíva k liekopisnej metóde využívajúcej vodu býva preto ponúkané médium o pH 6,8 [187, 188]. Pri použití tohto média sa predpokladá veľmi dobrá rozpustnosť warfarínu, čo vyplýva z jeho chemickej povahy. Vplyvom výskytu spoločného iónu sodíka v pufri a v molekule warfarínu, môže pri disolúcii však paradoxne dochádzať k spomaleniu rozpúšťania warfarínu a celkovo disolúcie [189]. Vďaka spomaleniu rozpúšťania by toto médium mohlo byť použité pre výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti a umožniť rozlíšenie medzi prípravkami s rozličnými kvalitatívnymi vlastnosťami, ktoré môžu byť ovplyvnené variabilitou výroby.

Všetky spomenuté metódy používajú otáčky pádiel nie menej ako 50 rpm, čo je doporučená rýchlosť pre lieky s okamžitým uvoľňovaním [173]. Niektoré súčasné práce naznačujú, že pre okamžité uvoľňovanie s dobre rozpustnou API je možné použiť aj nižšie otáčky, čo by mohlo mať rozlišujúci účinok [184].

Vývojom biorelevantnej disolučnej metódy pre kontrolu kvality tabliet s obsahom warfarínu sa zaoberal projekt tuzemskej konferencie IGA VFU Brno č. 55/2014/FaF (plné znenie na strane 178):

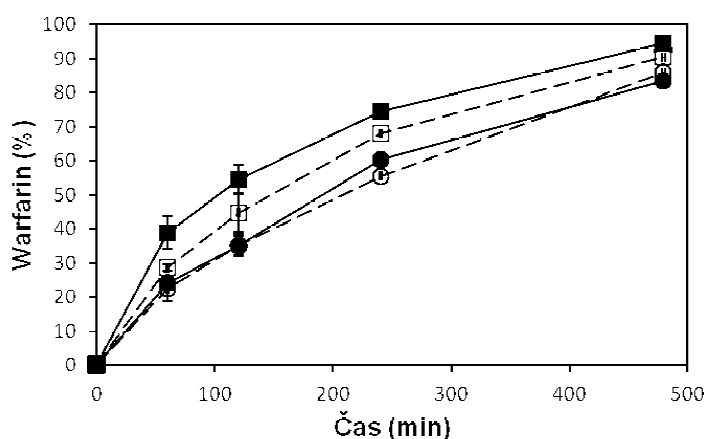
MUSELÍK, J., LUKÁŠOVÁ, I., FRANC, A., SABADKOVÁ, D., MAJERČÍKOVÁ, D. a ĎUROVCOVÁ, V. **Tvorba biorelevantní disoluční metody pro kontrolu kvality tablet s obsahem warfarínu.** Príspevok zo zborníka. 2014. IGA VFU Brno č. 55/2014/FaF.

Cieľom projektu bolo navrhnuť rozlišujúcu a biorelevantnú disolučnú metódu pre hodnotenie liekov s okamžitým uvoľňovaním liečivej látky vo forme solí slabých kyselín.

Zvolenou modelovou látkou bol klatrát sodnej soli warfarínu. Testované boli tablety s obsahom 1 a 10 mg API pripravené zo spoločnej zmesi (CB). Pre každú silu boli

pripravené 2 šarže, ktoré sa líšili distribúciou veľkosti častíc ($d_{90} = 10,3$ alebo $234,3 \mu\text{m}$). Úzka distribúcia častíc je označená písmenom A, široká písmenom B. Skúška disolúcie bola prevedená s použitím 900 ml 0,1 M HCl (simulácia prostredia žalúdka) a 70,0 g 1-oktanolu (simulácia prestupu cez biologické membrány) s využitím pádiel pri 50 rpm. Organická fáza bola odoberaná v čase 1, 2, 4 a 8 hodín.

Pri pohľade na disolučné krivky (Obrázok 5) je možné pozorovať, že disolučné profily sa navzájom líšia. Pri použití faktora podobnosti (f_2) a rozdielnosti (f_1) sa zistilo, že sa disolučné profily tablet s rozdielnym obsahom účinnej látky líšia, v prípade, že obsahujú API so širokou distribúciou veľkosti častíc ($f_2 = 40,9$; $f_1 = 29,3$). Disolučné profily tablet s rozdielnym obsahom účinnej látky, ale s obsahom API s úzkou distribúciou veľkosti častíc sú odlišné na základe porovnania vypočítanej hodnoty f_1 ($f_1 = 16,5$). Na základe výpočtu f_2 nebola preukázaná odlišnosť disolučných profilov; hodnota f_2 sa však blíži kritickej hodnote 50. Z uvedeného vyplýva, že za zvolených podmienok bifázickej skúšky disolúcie má táto metóda rozlišujúci charakter s ohľadom na obsah účinnej látky v tablete. Pri porovnaní disolučných profilov tablet s rovnakým obsahom API a s rozdielnou distribúciou veľkosti častíc liečiva bola na základe hodnôt f_2 a f_1 zistená podobnosť týchto disolučných profilov. Z číselných hodnôt f_2 a f_1 je možné pozorovať, že vplyv distribúcie veľkosti častíc na disolučný profil má väčší efekt u tablet s vyšším obsahom API ($f_2 = 54,5$; $f_1 = 11,7$), v porovnaní s tabletami s nižším obsahom API ($f_2 = 76,7$; $f_1 = 4,3$). Na základe výsledkov sa zistilo, že rozdielny obsah API v tabletách vedie k väčším rozdielom v disolúcii, než veľkosť častíc použitej substancie.



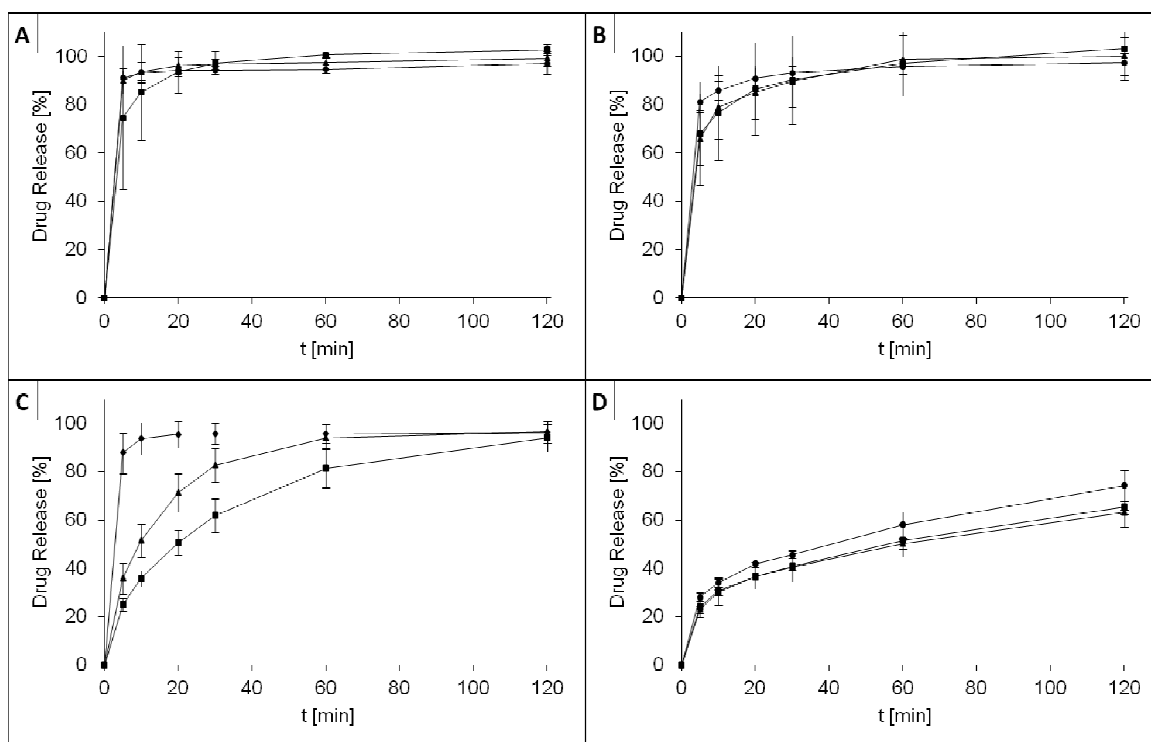
Obrázok 5. Disolučné profily tablet s obsahom warfarínu v biorelevantnom médiu; (□) W10A, (○) W1A, (■) W10B, (●) W1B.

Vytvorením ľahkej, lacnej a časovo nenáročnej rozlišovacej disolučnej metódy vhodnej pre rutinnú kontrolu tabliet s obsahom warfarínu sa zaoberal experimentálny článok (plné znenie článku na strane 149):

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A., GONĚC, R., MIKA, F. a VETCHÝ, D. **Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active substance.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **109**:541-547. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.017. (IF₂₀₁₆ = 3,756).

Jedným z cieľov uvedeného článku bolo nájsť ľahkej, lacnej a časovo nenáročnej rozlišovacej disolučnej metódy, ktorá by umožnila odlíšiť prípadné kvalitatívne vlastnosti tabliet, napr. v priebehu stabilitných štúdií, pri porovnaní rôznych šarží alebo porovnaní generických prípravkov.

Pre účel nájsť podmienok disolúcie pre výpočet f_1 a f_2 boli hodnotené krajné a stredové sily tabliet (1, 5 a 10 mg) pripravené lisovaním z CB (označenie 1_B, 5_B, 10_B Obrázok 6). Ako disolučné médium bola zvolená voda a pufr o pH 6,8. Vzorky boli odoberané v čase 5, 10, 20, 30, 60 a 120 minút. Pri použití USP metódy (voda, 50 rpm) došlo u síl 1, 5 a 10 mg k rozpusteniu najmenej 85 % API v priebehu 15 minút a preto bolo akékoľvek porovnanie disolučných profilov znemožnené (Obrázok 6A). Podobne pri použití pufru s pH 6,8 pri 50 rpm u všetkých síl došlo k rýchlemu uvoľneniu API (> 85 % do 20 minút; Obrázok 6B). Obidve metódy sa preto javia ako nevyhovujúca pre porovnanie disolučných profilov. Ďalej boli testované otáčky 25 rpm. V prostredí pH 6,8 došlo po 120 minútach u všetkých testovaných síl k uvoľneniu menej než 75 % API a disolučné profily sa nelíšili. Pri použití USP metódy s otáčkami 25 rpm sa zistilo, že po 60 minútach dôjde k uvoľneniu viac ako 80 % a po 120 minútach bola uvoľnená prakticky celá API, pričom došlo k viditeľnému rozlíšeniu jednotlivých síl (Obrázok 6C). V pufri (Obrázok 6D) tento jav nie je viditeľný pravdepodobne z dôvodu výskytu spoločného iónu, ktorý zabránil uvoľneniu sodnej soli warfarínu a celkovo došlo pri otáčkach 25 rpm v pufri k zníženiu rýchlosti uvoľňovania warfarínu v porovnaní s vodou [189]. Modifikáciou liekopisnej USP disolučnej metódy, a to znížením otáčok pádiel z 50 na 25 rpm, bola nájdená metóda vhodná pre porovnanie disolučných profilov tabliet s obsahom warfarínu.



Obrázok 6. Disolučné profily tabliet s obsahom warfarínu: **A** – voda, 50 rpm; **B** – pH 6,8, 50 rpm; **C** – voda, 25 rpm; **D** – pH 6,8, 25 rpm; (●) 1_B; (▲) 5_B; (■) 10_B; (mean ± SD; n = 6).

Vývojom disolučnej skúšky, ktorá by umožnila vzájomné porovnanie disolučných kriviek pomocou výpočtu faktorov podobnosti a rozdielnosti sa zaoberal článok (plné znenie článku na strane 157).

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J. a FRANC, A. **Vývoj disolučnej metódy pre tablety s obsahom warfarínu sodného.** *Česká a slovenská farmacie*. 2017, 6/2017. (N35-2017; *in print*).

Cieľom práce bolo overiť vhodnosť média o pH 6,8 pre disolúciu warfarínu na základe výpočtu faktorov podobnosti a rozdielnosti a overenie rozlišujúcej schopnosti použitého média s ohľadom na kvalitu použitej substancie a liekovej formy. K tomuto účelu boli pripravené tablety s obsahom 10 mg warfarínu, ktoré sa líšili veľkosťou častíc API (šarža I s $d_{50} = 4,8$ a šarža II s $d_{50} = 22,5$ μm) a ich radiálnou pevnosťou

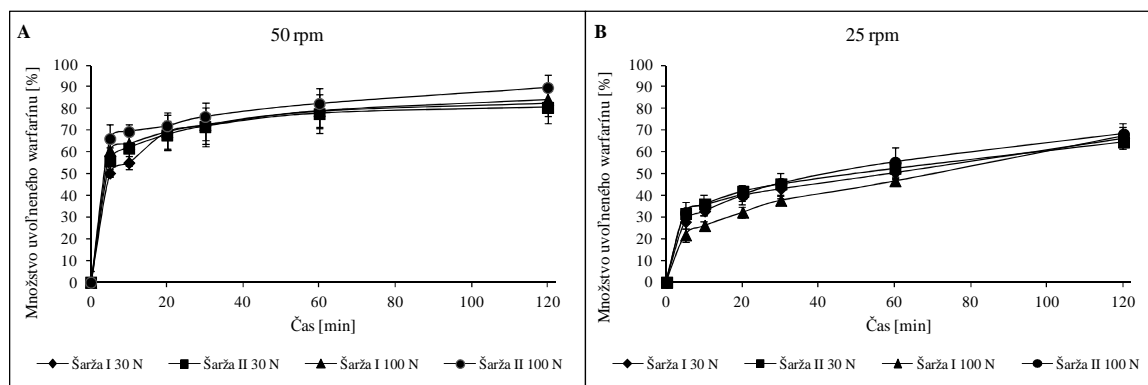
(30, resp. 100 N). Vyrobené tablety boli podrobené disolučnej skúške pri liekopisom stanovených otáčkach (50 rpm) a znížených otáčkach (25 rpm).

Fyzikálno-chemické vlastnosti pripravených zmesí (sytný uhol, index stlačiteľnosti, Hausnerov pomer, rýchlosť vytekania otvorom) a tabliet (pevnosť, oder, výška, rozpad, hmotnostná rovnorodosť) boli vyhovujúce podľa ČL 2009 [57]. Na základe výsledkov hodnotenia tabletových zmesí a tabliet sa zistilo, že zvolený technologický postup vedie k výrobe štandardných tabliet. Medzi šaržou I a II neboli zistené významné rozdiely, ktoré by mohli negatívne skresliť výsledky disolučnej skúšky.

Zmesi a tablety boli podrobené tiež skúške obsahovej rovnorodosti podľa kritérií ČL 2009 a FDA. Pre zabezpečenie, že nie len testovaná šarža, ale aj všetky nasledujúce splnia predpísané limity bol vypočítaný pre každú šaržu index spôsobilosti procesu (Cpk) a vypočítané hodnoty RSD tabliet boli porovnávané s hodnotami z Bergumovej metódy. Výsledky CU boli pre všetky testované zmesi a tablety vyhovujúce, čím je zabezpečené, že výsledky disolučnej skúšky nebudú negatívne ovplyvnené kolísaním obsahu liečiva v tabletách. Tablety splnili tiež limit výrobcu DuPont.

Vyrobené tablety boli následne podrobené skúške disolúcie v prostredí pufru s pH 6,8. Vplyvom výskytu spoločného iónu sodíka v pufre a v molekule warfarínu sa očakávalo spomalenie uvoľňovania warfarínu oproti vode, na základe ktorého bude možné vzájomné porovnanie disolučných profilov a prípadne tak bude možné rozlíšiť tiež kvalitu tabliet (veľkosť častíc API a pevnosť tabliet). Na Obrázku 7 sú vyobrazené disolučné krivky pri 50, resp. 25 rpm. Obe metódy umožňujú výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti, no nemajú rozlišujúci charakter. Pri otáčkach 25 rpm (Obrázok 7B) došlo k zníženiu rýchlosti uvoľňovania v porovnaní s otáčkami 50 rpm (Obrázok 7A), ale ani po 120 minútach nedošlo k uvoľneniu 80 % API. Na základe výpočtu faktorov podobnosti a rozdielnosti sa zistilo, že niektoré podobné krivky podľa f_2 (54,55 resp. 54,62) sú zároveň rozdielne podľa f_1 (19,16 resp. 16,75). Nesúlad medzi f_1 a f_2 je dobre známy aj z literatúry [186, 190], no pre legislatívne účely je rozhodujúci faktor podobnosti f_2 [191]. Vzhľadom k nejednotnosti záverov na základe výpočtu f_1 a f_2 boli disolučné profily porovnané taktiež pomocou výpočtu účinnosti disolúcie (D.E.), ktorá sa počíta na základe plochy pod disolučnou krivkou [190]. Literatúra uvádza, že pokiaľ je zmena D.E. medzi hodnotenými profilmi menšia ako 10, je možné profily považovať za podobné [190]. Pretože vypočítaná absolútna hodnota maximálnej zmeny D.E. medzi hodnotenými profilmi nepresiahla hodnotu 7, je možné na základe tohto parametra považovať profily za podobné. Zníženie otáčok teda nielen že nevedie k rozlišujúcemu charakteru, no nejaví

sa ako vhodné ani z hľadiska nedostatočného množstva uvoľnenej látky. Je teda možné konštatovať, že disolučné médium o pH 6,8 umožní porovnanie disolučných kriviek na základe výpočtu f_1 a f_2 , ale za daných podmienok bez rozlišujúceho charakteru. Len otáčky 50 rpm sa javia ako relevantné, pretože umožňujú splniť obvyklý liekopisný limit Q limitu (75 % + 5 %) [57].



Obrázok 7. Skúška disolúcie tabliet s obsahom 10 mg warfarínu pri 50 a 25 rpm v pufrí s pH 6,8.

2.1.11.4 Skúška disolúcie tabliet s obsahom ibuprofenu

Ibuprofen patrí medzi ťažko rozpustné liečivá prislúchajúce do II. triedy BCS [152]. Keďže sa jedná o slabú kyselinu, je jeho rozpustnosť, rovnako ako v prípade warfarínu, závislá od pH použitého média. Minimálna rozpustnosť ibuprofenu bola stanovená pri pH 2,0 [192]. Táto API nevykazuje pravý polymorfizmus, avšak má miernu tendenciu k modifikácii kryštalickej mriežky, čo môže ovplyvňovať aj jej disolučné správanie [152].

Disolučné skúšky s formuláciami obsahujúcimi ibuprofen zvyčajne prebiehajú pri 50 rpm s použitím pádiel (USP) [193], ale v literatúre nájdeme tiež štúdie s košíčkom [194]. Niektoré štúdie pri skúške disolúcie využívajú otáčky 200, 150, 100, príp. 75 rpm [177, 194-197]. Najčastejšie používaným médiom pri stanovení ibuprofenu je fosfátový pufor s pH 7,2 (USP) [193], 6,8 a voda. Pri disolúcii je možné použiť aj biorelevantné disolučné média ako je napr. FaSSIF (*Fasted state simulated intestinal fluid*; pH 6,5) a FeSSIF (*Fed state simulated intestinal fluid*; pH 5,0) [198], ale aj 0,1 M HCl (pH 1,2) v kombinácii s n-hexánom (bifázická disolučná skúška) [194, 199].

Ibuprofen vykazuje, podobne ako warfarín, nízku rozpustnosť pri pH 1,2 a 4,5 a vysokú rozpustnosť pri pH 6,8 až 7,2 [177, 194, 199, 200]. Pri pH 7,2 bola rozpustnosť

ibuprofenu dokonca až 90x vyššia v porovnaní s vodou [177]. Príčinou nízkej rozpustnosti ibuprofenu vo vode, je jej slabá pufrovacia kapacita, ktorá spôsobí vznik mikroklimatického prostredia v okolí častíc ibuprofenu. Hodnota pH tohto prostredia je blízka pKa ibuprofenu, v dôsledku čoho ibuprofen zostáva v neionizovanej forme a nedochádza k jeho ďalšiemu rozpúšťaniu. Pri pH 6,8 či 7,2 prebieha disolúcia ibuprofenu naopak rýchlo, pretože molekuly sa dostávajú do ionizovaného stavu, čím dochádza k zvýšeniu rozpustnosti API.

2.2 Mukoadhezívne filmy

Prítomnosť slín v asociácii s prehĺtaním, žuvaním, pitím a rozprávaním, spôsobuje rýchle vymytie účinnej látky z dutiny ústnej po podaní konvenčnej liekovej formy (napr. ústnej vody, pasty či suspenzie). Výsledkom je nízka terapeutická efektivita podaného prípravku [201-203]. Tento problém je možné vyriešiť aplikáciou mukoadhezívnych liekových foriem, najmä mukoadhezívnych tabliet a filmov.

Hlavnou výhodou filmov je najmä ich flexibilita a komfort, vďaka ktorým sú pacientmi v porovnaní s tabletami zvyčajne lepšie tolerované [204]. Pri liečbe lokálnych ochorení dutiny ústnej navyše chránia postihnuté miesta (rany), čo vedie k zníženiu bolesti a celkovej podpore terapie [205]. Množstvo bukálnych filmov bolo v posledných rokoch formulovaných k liečbe fungálnych infekcií dutiny ústnej ako je orálna kandidóza [206-210]. Lokálnej terapii ochorení dutiny ústnej sa dáva prednosť pred systémovou liečbou, kvôli častému výskytu rezistencie a nežiaducich účinkov systémovo podávaných liečiv, napr. azolových antimykotík [211]. Filmy umožňujú tiež podanie niektorých účinných látok so systémovým účinkom. Táto cesta podania je výhodná najmä pre podanie látok s vysokým *first-pass* metabolizmom, čím sa zvyšuje ich biologickú dostupnosť [212]. Predĺženie retenčného času u jednovrstvového filmu je možné dosiahnuť aplikáciou hydrofóbnej krycej vrstvy tvorenej napríklad etylcelulózou alebo zmesou bieleho včelieho vosku a bielej vazelíny [213].

Ideálny bukálny film by mal byť flexibilný, pružný, mäkký a zároveň odolný voči zlomeniu vplyvom stresu z činnosti dutiny ústnej. Film musí vykazovať dobrú bioadhezívnu silu, aby mohol zotrvať v dutine ústnej po požadovanú dobu. Bobtnanie filmu, ak k nemu dochádza, by nemalo byť príliš rozsiahle, aby sa zabránilo diskomfortu. Mechanické vlastnosti, bioadhezívne a bobtnavé vlastnosti filmu musia byť stanovené u každého filmu [214]. Hodnotením filmov sa podrobnejšie zaoberá kapitola 2.2.2.

Medzi nevýhody alebo obmedzenia tejto liekovej formy patrí veľkosť a množstvo liečiva, ktoré je touto cestou možné podať. Pre bukalne podanie sú preferované terapeutické systémy o veľkosti 1 - 3 cm² a podaná denná dávka liečiva ≤ 25 mg [215, 216]. Veľkosť terapeutického systému súvisí s plochou bukalnej sliznice. Celková plocha pre absorpciu liečiv v dutine ústnej je 170 cm², z čoho iba približne 50 cm² predstavuje nekeratinizované tkanivo spolu s bukalnou sliznicou [217, 218]. Maximálne trvanie účinku je približne 4 - 6 hodín, pričom príjem tekutín a jedla sa môže podieľať na včasnom odstránení aplikačného systému. Táto doba je obmedzená tiež neustálou výmenou slín a obmenou epitelu sliznice.

Veľkou výhodou tohto terapeutického systému je možnosť aplikácie terapeutického systému aj pacientom v bezvedomí a možnosť okamžitého prerušenia terapie jednoduchým odstránením zo sliznice [219, 220]. Je preto považovaná za veľmi bezpečný spôsob aplikácie liečiv.

2.2.1 Metódy prípravy a výroby filmov

Farmaceutická technológia ponúka viacero spôsobov prípravy filmov. Najčastejšie využívaná je metóda odparenia rozpúšťadla (*Solvent casting method*). Je to najmä kvôli jej jednoduchosti a nízkym nákladom. Pozornosť pri výrobe je sústredená predovšetkým na reologické vlastnosti roztoku alebo suspenzie, zadržané vzduchové bubliny, obsahovú rovnorodosť a reziduá rozpúšťadiel vo finálnej liekovej forme [221]. Kritickým výrobným krokom býva odstránenie vzduchových bublín z roztoku pripraveného na odparenie [222]. Ako rozpúšťadlo sa najčastejšie používa voda alebo zmesi vody a organických rozpúšťadiel. Použitie organických rozpúšťadiel je často diskutované a to nielen kvôli problémom súvisiacim so zbieraním rozpúšťadiel a reziduálnych rozpúšťadiel, ale najmä kvôli ich škodlivosti pre životné prostredie a zdravie [221]. Liečivo, ktoré je spravidla rozpustené alebo dispergované vo vhodnej kvapaline, sa pridáva do dôkladne zhomogenizovanej filmotvornej disperzie tesne pred procesom odlievania. Po odliatí disperzie nasleduje proces sušenia, v ktorom sú odstránené zbytkové rozpúšťadlá za presne definovaných podmienok. Posledným krokom výroby je vyrazenie konečnej liekovej formy [223].

Ďalšou častou metódou prípravy je extrúzia taveniny (*Hot-melt extrusion*), pri ktorej dochádza k taveniu zmesi všetkých pomocných látok v pevnom skupenstve, obvykle v zmesi s liečivom, za súčasnej homogenizácie. Tavenina je za kontrolovaných

podmienok pretlačená otvorom, ktorý je navrhnutý a nastavený tak, aby výsledným produktom bol film požadovanej hrúbky. Nasleduje chladenie a vyrazenie konečných liekových foriem [224, 225]. Celý proces prebieha za vysokých teplôt, preto nie je vhodný pre termolabilné účinné látky. Tento spôsob prípravy je využívaný na prípravu formulácií s riadeným uvoľňovaním, ako sú napr. matricové tablety, pelety alebo granuláty [226] a taktiež pri príprave orodispergovateľných filmov [227]. Pre obidve uvedené metódy (odparenie rozpúšťadla a extrúziu taveniny) je spoločné, že liečivá látka je pridávaná do filmotvornej disperzie a teda je vystavená množstvu procesných premenných, ktoré môžu ovplyvniť vlastnosti použitého liečiva [228]. V súčasnosti existujú rôzne varianty týchto základných procesov, napríklad metóda odlievania polotuhej disperzie (*Semisolid casting*) alebo extrúzia pevnej disperzie (*Solid-dispersion extrusion*) [229].

Medzi pomerne nové technológie patrí technológia valcovania filmu a metóda tlače liečiva na nemedikovaný film, ktorá je vhodná najmä pre nestále liečivá podávané v malej dávke a pre individualizáciu terapie [228, 229]. Podstatou metódy valcovania (*Rolling*) je valcovanie vysoko viskózneho materiálu s liečivom do podoby tenkého filmu. Výrobné zariadenie sa zvyčajne skladá z troch valcov. Filmotvorná zmes je rovnomerne dávkovaná na prvý valec, ktorého nastavenie ovplyvňuje výslednú hrúbku filmu. Film je následne prenášaný cez druhý valec na pohyblivý pás, ktorého rýchlosť riadi tretí valec [223]. Nasleduje proces sušenia, v ktorom sú odstránené zbytkové rozpúšťadla (najčastejšie voda alebo etanol) a vyrezanie konečnej liekovej formy [230]. Metóda tlače liečiva na nemedikovaný film (*Drug-printing*) predstavuje vysoko flexibilný a cenovo efektívny spôsob prípravy filmov. Táto technológia zaručuje presnosť dávkovania a homogénnu distribúciu liečiva v liekovej forme [229]. Pri tejto metóde liečivo nie je vystavené mechanickému stresu pri homogenizácii odlievacej disperzie ani zmenám teploty [231]. Z tohto hľadiska sa jedná o veľmi šetrný spôsob spracovania liečiva. Najčastejšie sú využívané dve metódy tlače liečiva na nemedikované filmy, konkrétne atramentová tlač (*Inkjet printing*) a flexotlač (*Flexographic printing*). Príkladom ďalších inovatívnych technológií je sprejové nanášanie účinnej látky na nemedikovaný film alebo elektrostatické zvlákňovanie [223].

2.2.2 Hodnotenie filmov

Na rozdiel od konvenčných pevných liekových foriem, nie sú spôsoby testovania pevných mukoadhezívnych liekových foriem zatiaľ štandardizované. Liekopis u filmov

predpisuje skúšku disolúcie, prípadne hmotnostnú a obsahovú rovnorodosť a rovnorodosť dávkových jednotiek [57]. S ohľadom na povahu liekovej formy, nie je možné pri hodnotení filmov použiť zavedené liekopisné metódy pre hodnotenie pevných liekových foriem ako je napr. skúška oderu alebo pevnosti. V súčasnosti sú používané mnohé neliekopisné metódy testovania a neustále sú vytvárané nové, čo značne limituje možnosť vzájomného porovnania a štatistického vyhodnotenia nameraných dát [232]. Pri hodnotení filmov sa často vychádza z metód pre hodnotenie transdermálnych filmov, avšak pre množstvo testov je nutné používať rôzne modifikované prístroje, ktoré inak slúžia iným účelom, napr. rovníramenné váhy pre meranie mukoadhezívnej sily. Hodnotenie vlastností mukoadhezívnych filmov môžeme rozdeliť na *hodnotenie mukoadhezívnych vlastností* a *hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností*.

2.2.2.1 Hodnotenie mukoadhezívnych vlastností

U filmov sa z mukoadhezívnych vlastností hodnotí *mukoadhezívna sila, dĺžka zotrvania a bobtnavosť filmu*. Hodnotenie môže prebiehať *in vitro*, *in vivo* alebo *ex vivo* [218].

Mukoadhezívna sila predstavuje silu potrebnú k rozrušeniu adhezívnych väzieb medzi povrchom sliznice a mukoadhezívnou liekovou formou. K meraniu sa často používa texturometer [224]. Literatúra popisuje tri možné spôsoby odtrhnutia liekovej formy od povrchu sliznice – ťahom, šmykom a odlúpnutím [233-235]. Okrem texturometru sa k testovaniu používajú aj upravené rovníramenné váhy. Po úvodnom kontakte liekovej formy a bukálnej sliznice (váhy sú v rovnovážnej polohe), je do kadičky na jednej strane váh prikvapkávaná voda, až kým nedôjde k odtrhnutiu liekovej formy a k prerušeniu mukoadhezívnych väzieb s povrchom sliznice. Sila potrebná k odtrhnutiu zodpovedá hmotnosti pridanej vody [234].

Dĺžka zotrvania vyjadruje dĺžku zotrvania liekovej formy v mieste aplikácie. Hodnotí sa pomocou modifikovaného prístroja na rozpad tabliet alebo aplikáciou dobrovoľníkom. Podľa Parmara, *et al.* [234] sa pri stanovení navlhčí mukoadhezívna strana filmu kvapkou fosfátového pufru (pH 6,8) a priloží sa na čerstvú králičiu, ovčiu alebo bravčovú bukálnu sliznicu, ktorá je prichytená ku sklenenej doštičke. V priebehu prvých 30 sekúnd sa film na sliznici pridrží. Takto pripravená aparatúra sa vkladá do kadičky s 200 ml fosfátového pufru (pH 6,8) vytemperovaného na $37 \pm 0,1$ °C. Po dvoch minútach sa celá aparatúra začne pohybovať smerom hore a dole rýchlosťou

50 ponorov/min, čím je napodobňované pohyblivé prostredie dutiny ústnej. Stanovuje sa čas, za ktorý dôjde k oddeleniu filmu od sliznice. Pri testovaní u zdravých dobrovoľníkov sa zaznamenáva čas príľnutia filmu ku sliznici a čas, kedy došlo ku kompletnému uvoľneniu alebo erózii filmu [233, 236].

Bobtnavosť filmu je dôležitým ukazovateľom, ktorý súvisí s adhezívnymi vlastnosťami polyméru použitého pri príprave filmu. Pri stanovení bobtnavosti, je na začiatku nutné zväžiť film v suchom stave ($t = 0$). Následne sa film umiestni na mokrý, zvyčajne 2% agarový gel; mukoadhezívnou stranou filmu k povrchu gélu. V stanovených časoch sa film odoberie z agarového podkladu, prebytočná voda na povrchu sa odstráni pomocou filtračného papiera a film sa zväží [234, 236, 237]. Percentuálny nárast hmotnosti (bobtnavosť) sa vypočíta podľa vzorca (4), kde m_t je hmotnosť nabobtnalého filmu v jednotlivých časoch t a m_0 je počiatočná hmotnosť filmu.

$$\% \text{ bobtnavosti} = \frac{(m_t - m_0)}{m_0} * 100 \quad (4)$$

2.2.2.2 Hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností

Z fyzikálno-chemických vlastností sa hodnotí *viskozita odlievacej disperzie, hmotnosť filmu, hrúbka filmu, obsahová rovnorodosť, mechanické vlastnosti filmu* (odolnosť voči pretrhnutiu, pevnosť v ťahu, percento predĺženia, Youngov modul pružnosti), *sklopná odolnosť, povrchové pH, skúška disolúcie* či *organoleptické vlastnosti* [57, 222, 224, 232, 234, 237-241].

2.2.3 Mukoadhezívna cesta podania liečivých látok

Mukoadhezívna cesta podania liečivých látok je v posledných rokoch jednou z najatraktívnejších aplikačných ciest. Mukoadhéziu môžeme definovať ako dej, pri ktorom dochádza k vzniku väzieb medzi 2 komponentmi, pričom jeden je biologického pôvodu a druhým je bioadhezívny polymér. Komponent biologického pôvodu reprezentuje sliznica úst, očí, nosa, čreva, rekta alebo vagíny [212]. Bioadhezívnym polymérom sa rozumie látka so schopnosťou adherovať k slizničnému povrchu. Proces mukoadhézie predstavuje komplexný dej a k jeho popisu môžeme nájsť v literatúre viacero prístupov, napr. *difúziu teóriu*, kedy mukoadhezívna väzba vzniká na základe penetrácie reťazcov

mukoadhezívneho polyméru do hlienovej vrstvy, *elektrónovú teóriu*, ktorá je vysvetľovaná princípom príťažlivosti opačne nabitých povrchov mukoadhezívnej látky a hlienovej vrstvy, *zmáčaciu teóriu*, pri ktorej sa mukoadhezívny polymér rozprestiera na sliznici v tesnom kontakte s hlienovou vrstvou alebo *adsorpčnú teóriu*, kedy pôsobením nekovalentných síl a interakcií dochádza k tesnému kontaktu mukoadhezívneho polyméru s hlienovou vrstvou sliznice [242-244].

Pre vznik mukoadhezívnej väzby sú potrebné štyri kroky: *hydratácia*, *bobtnanie polyméru*, *interpenetrácia* a *mechanické prepojenie* sliznice s polymérom [245]. Sila mukoadhezívnej väzby je ovplyvnená faktormi ako je molekulová hmotnosť polyméru, kontaktný čas so sliznicou, či rýchlosť bobtnania polyméru [246]. Polymér účastniaci sa mukoadhezívnej väzby môže byť prírodného, polosyntetického alebo syntetického pôvodu. Mukoadhezívne liekové formy môžeme okrem pôvodu deliť aj podľa skupenstva, či spôsobu výroby. Podľa skupenstva ich delíme na tekuté (napr. ústne vody, roztoky, výplachy), polotuhé (napr. krémy, gély, pasty) a tuhé (napr. tablety, pastilky, filmy) liekové formy [233]. Podľa spôsobu výroby napríklad mukoadhezívne filmy delíme na filmy pripravené metódou odparenia rozpúšťadla, extrúziou taveniny, valcovaním a tlačou.

2.2.4 Dutina ústna ako miesto pre aplikáciu liečiv

Dutina ústna je vďaka ľahkej prístupnosti považovaná za veľmi atraktívne miesto pre aplikáciu liečiv. Pre podanie liečiva sú vhodné 4 regióny, konkrétne: *bukálny*, *sublinguálny*, *palatálny* a *gingiválny* [247]. V tejto práci sa ďalej sústreďíme na región bukálny, ktorý je nekeratinizovaný, čo ho predurčuje najmä na aplikáciu lokálne pôsobiacich terapeutických systémov. Okrem lokálnej liečby môžu byť bukálne podané aj liečivá so systémovým účinkom [248]. Aby účinná látka mohla vyvolať systémový účinok je potrebné, aby prešla do systémového krvného obehu. Tu zohrávajú dôležitú úlohu najmä fyziologické aspekty dutiny ústnej, čo zahŕňa pH, objem slín, obmenu epitelu, enzymatickú aktivitu a permeabilitu sliznice [249]. Do úvahy je nutné brať tiež povahu liečivej látky (napr. veľkosť molekuly, hodnotu logP) a spôsob zapracovania liečivej látky do terapeutického systému (rozpustené vs. suspendované liečivo).

Hodnota pH dutiny ústnej je vďaka slinám udržiavaná v blízkosti neutrality (pH 6,7 – 7,3). Udržiavať ju pomáhajú pufrovacie systémy s obsahom bikarbonátu, fosfátov či peptidov [250, 251]. Hlavnou úlohou slín je odstraňovať zvyšky jedla a chrániť

povrch zubov pred pôsobením kyselín produkovaných orálnym biofilmom a dentálnym plakom. Prietok slín je ovplyvnený cirkadiálnym rytmom, pričom najnižší je zvyčajne počas spánku. Nízky prietok redukuje protektívnu funkciu slín a zvyšuje riziko kolonizácie dutiny ústnej mikroorganizmami. Povrch dutiny ústnej je kontinuálne omývaný nielen slinami, ale tiež tekutinou gingiválnych štrbín. Tieto tekutiny sú esenciálne pre udržanie orálneho ekosystému tým, že zabezpečujú pre mikroorganizmy vodu, živiny, adhérenciu a antimikróbne faktory [252]. Denný objem produkovaných slín leží medzi 0,5 a 2,0 l, avšak objem slín konštantne prítomný v ústach je okolo 1,1 ml, čo predstavuje relatívne malý objem tekutiny dostupnej na uvoľnenie účinnej látky z liekovej formy v porovnaní s GIT [249]. Vplyvom neustálej obmeny a produkcie slín dochádza k zníženiu koncentrácie podaného liečiva [253]. K obnove epitelu dutiny ústnej dochádza každých 3 až 8 dní. Pre porovnanie, k obmene kože dochádza približne každých 30 dní. Vplyvom neustálej a pomerne krátkej obmeny epitelu, môže dochádzať ku zmenám v absorpcii podaných látok [254]. Tá sa môže meniť tiež vplyvom rôznych ochorení. Enzymatická aktivita dutiny ústnej je v porovnaní s GIT nízka, vďaka čomu je možné aplikovať tiež liečivé látky povahy proteínov a peptidov [249, 255]. V bukálnej sliznici sú z enzýmov prítomné aminopeptidázy, karboxypeptidázy, dehydrogenázy a esterázy. Najväčšiu metabolickú bariéru pre podanie peptidov predstavujú aminopeptidázy [249]. Orálna sliznica má 4 - 4000 krát vyššiu permeabilitu v porovnaní s kožou [256]. Účinné látky penetrujú cez sliznicu dutiny ústnej pasívnou difúziou (paracelulárny alebo transcelulárny transport), nosičom sprostredkovaným aktívnym transportom alebo endo/exocytózou [249]. U bukálneho epitelu prevažuje najmä pasívna difúzia (paracelulárny transport), ktorým prestupuje napr. voda, etanol, cholesterol a tyreotropín uvoľňujúci hormón [257-259]. Nekeratinizovaný epitel, ktorý okrem bukálnej sliznice pokrýva aj mäkké podnebie a sublingválny región dutiny ústnej je priepustnejší ako keratinizovaný epitel ďasien a tvrdého podnebia, čo súvisí tiež s prekrvením daných regiónov [260, 261]. Lipofilná povaha bunkovej membrány umožňuje ľahší prienik molekulám s vyššou hodnotou $\log P$ [224]. Niektoré látky hydrofilnej povahy sú cez sliznicu transportované prostredníctvom prenášača [262]. Poznanie a porozumenie spôsobu, akým molekuly prechádzajú bukálnou sliznicou zohráva dôležitú úlohu pri formulácii nových terapeutických systémov, aby bol nájdený vhodný spôsob na uľahčenie absorpcie účinných látok.

2.2.5 Orálna kandidóza

Orálna kandidóza je jednou z najčastejších klinických foriem mukóznej kandidózne infekcie. Pôvodcom ochorenia je všadeprítomná, saprofytická huba z rodu *Candida*, najčastejšie *Candida albicans* (*C. albicans*). *Candidy* sú oválne, eliptické alebo cylindrické jednobunkové alebo dvojbunkové organizmy o veľkosti 3 - 5 μm s 2-vrstvovou bunkovou stenou.

Kandidózne ochorenie sa vyskytuje v každom veku, symptómy sú ale agresívnejšie u predčasne narodených detí, kojacich žien a starých ľudí. Rizikové faktory pre kolonizáciu u detí *Candida spp.* predstavuje nízka pôrodná hmotnosť (< 1000 g) a nízky gestačný vek (< 32 týždňov), užívanie tretej generácie cefalosporínov a oneskorené enterálne kŕmenie, ktoré mení ekológiu zažívacieho traktu [263]. Diagnostika orofaryngeálnej kandidózy zvyčajne nie je ťažká, pretože má identifikovateľné vlastnosti pri vizuálnom vyšetrení (biele až žlté povlaky na postihnutých slizniciach) a mikroorganizmy môžu byť kultivované zo sterov orofaryngeálnych defektov [264]. Ochorenie vyvoláva nepríjemný pocit v ústach a typicky u pacientov dochádza k výraznému zníženiu konzumácie jedla a pitia, čo ústí k nízkemu výživovému statusu a výraznému zníženiu kvality života [265].

Liečbou prvej voľby je topická liečba, ktorá je nasadená pri nekomplikovaných, lokalizovaných kandidózach [266, 267]. Z liekových foriem sú využívané ústne výplachy, orálne gély, pastilky, pasty a suspenzie. Uvoľnenie účinnej látky z týchto prípravkov prebieha spočiatku veľmi rýchlo a taktiež dochádza aj k rýchlemu poklesu koncentrácie vplyvom neustálej obmeny slín a prehĺtania k subterapeutickým hladinám [212]. Hlavnou príčinou zlyhania topických prípravkov je tiež nízka compliance [266], predovšetkým vtedy, keď je potrebné aplikovať prípravky viackrát za deň (napr. 5x/deň pastilky s klotrimazolom, 4x/deň orálny gél s mikonazolom). Ďalším častým problémom nízkej compliance je zlá chuť prípravkov a riziko vzniku zubného kazu, kvôli vysokej koncentrácii cukru, ktorá má maskovať nepríjemnú chuť [268]. Z tohto dôvodu, ale tiež pri nedostatočnej účinnosti lokálne pôsobiacich prípravkov, sú k liečbe používané systémové antimykotiká napr. flukonazol a mikonazol. Pri liečbe flukonazolom je podávaná dávka 100 mg/deň počas 1 - 2 týždňov. Negatívnym dôsledkom liečby je množstvo nežiaducich účinkov ako je bolesť hlavy, nauzea, pečenevá dysfunkcia až zlyhanie pečene. Flukonazol interaguje s mnohými súčasne podávanými liečivými prípravkami, zahŕňajúc orálne antidiabetiká, kumarínové antikoagulanty, cyklosporíny,

terfenadín, teofylín, fenytoin, rifampin a astemizol [269]. Patogénne kvasinky spôsobujúce orálnu kandidózu, sú zvyčajne detekované v povrchových vrstvách sliznice. Predpokladá sa, že účinok systémovo podávaného flukonazolu je čiastočne tiež lokálny vďaka jeho prítomnosti v orálnych tekutinách [270]. Topická účinnosť tejto látky spoločne s nežiaducimi účinkami a častými liekovými interakciami po systémovom podaní, bola podnetom k vytvoreniu novej lokálne pôsobiacej mukoadhezívnej bukálnej liekovej formy s obsahom flukonazolu, ktorá zvyšuje kontaktný čas medzi liečivou látkou a patogénnymi kvasinkami a to bez nepríjemnej chute a nutnosti častej aplikácie [271]. Ďalším často používaným antimykotikom k liečbe orálnej a vaginálnej kandidózy je mikonazol [272]. V súčasnosti je v zahraničí pre topickú liečbu dostupný vo forme gélu, ktorý sa aplikuje 3 - 4x denne po dobu 14 dní. V literatúre môžeme nájsť bukálne liekové formy aj s obsahom mikonazolu [273]. Terapeutická efektivita mukoadhezívnych bukálnych tabliet s mikonazolom bola dosiahnutá s 10-násobne nižšou dávkou mikonazolu ako v prípade použitia gélu (50 mg vs. 500 mg) pri podaní raz denne namiesto 4x denne [274].

Trend s mukoadhezívnymi liekovými formami pretrváva dodnes. Množstvo vedeckých skupín na celom svete sa zaoberá mukoadhezívnymi liekovými formami (najmä bukálnymi filmami a tabletami) s lokálnym účinkom v dutine ústnej pre liečbu nielen orálnej kandidózy, ale aj k liečbe iných ochorení [275-279]. U týchto liekových foriem sa obchádza krátky rezidenčný čas konvenčných prípravkov, nežiaduce účinky a časté liek-liekové interakcie systémovo podávaných antimykotík [280]. Lokálna liečba napomáha tiež k zníženiu výskytu rezistencie voči systémovým antimykotikám.

Mykotické ochorenia zaznamenali v posledných rokoch významný nárast, pretože obyvateľstvo je viac vystavené faktorom, ktoré podporujú vznik mykotických infekcií. Neliečené ochorenie môže mať fatálne následky [281]. Úmrtnosť následkom systémovej infekcie *Candidou* je viac ako 60 % a stále rastie [282].

2.2.6 Mukoadhezívne liekové formy s antimykotickým účinkom

Výhody aplikácie mukoadhezívnych bukálnych filmov pri liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej boli popísané v predchádzajúcich kapitolách. V literatúre môžeme nájsť rôzne mukoadhezívne liekové formy (filmy, náplasti, disky, tablety a gély) s antimykotickým účinkom. Stručný prehľad je uvedený na nasledujúcich riadkoch.

Rasool, *et al.* [273] sformulovali 5 rozličných formulácií s obsahom 20 mg mikonazol-nitrátu ($0,524 \text{ mg/cm}^2$) za použitia propylénglykolu 10 % w/w, polyetylénglykolu 3 % w/w, polysorbátu₂₀ 6 % w/w a kyseliny olejovej 5 % w/w a chitozanu ako filmotvorného polyméru. Filmy boli pripravené metódou odparenia rozpúšťadla. U pripravených filmov autori testovali ich účinnosť voči *C. albicans*. Filmy vykazovali dobrú antimykotickú účinnosť ($p < 0,05$). Účinnosť pripravených filmov bola vyššia oproti referenčnému orálnemu gélu Daktarin® s mikonazolom.

Basalious, *et al.* [283] pripravili mukoadhezívne bukálne filmy s flukonazolom s použitím nasledovných filmotvorných polymérov: hydroxypropylmetylcelulózy (HPMC), hydroxyetylcelulózy (HEC), chitozanu, Eudragitu a alginátu sodného samostatne alebo v kombinácii s bioadhezívnym polymérom (so sodnou soľou karboxymetylcelulózy (SCMC), karbopolom 974P alebo polykarbofilom). V hodnotení najlepšie uspeli filmy s obsahom 2 % HPMC a 1 % SCMC.

Yehia, *et al.* [284] pripravili priamym lisovaním mukoadhezívne bukálne disky s obsahom flukonazolu. Z pomocných látok bol pri príprave použitý karbopol 974P (Cp), sodná soľ karboxymetylcelulózy (SCMC) alebo alginát sodný (SALG) v kombinácii s hydroxypropylmetylcelulózou (HPMC) alebo hydroxyetylcelulózou (HEC). Ďalej pripravili bukálne disky metódou mrazového sušenia (*Freeze drying*) s obsahom rôznych kombinácií polymérov (SCMC/HPMC, Cp/HPMC, SALG/HPMC a chitozan/SALG). Disky boli testované *in vitro* a *in vivo*. Testované boli u nich adhezívne vlastnosti a uvoľňovanie účinnej látky. Obsah flukonazolu v diskoch bol 19,2 – 21,2 mg.

Kumar, *et al.* [201] pripravili *in situ* gél s obsahom 1% ciklopiroxolamínu. Pri príprave bola ďalej použitá gelanová guma (0,1 – 0,3M), alginát sodný (0,1 – 0,5M) a karbomér 934 (0,1 – 0,2M). Gély vykazovali *in situ* predĺženie rezidenčného času a predĺžené uvoľňovanie účinnej látky na viac ako 6 hodín.

Singh, *et al.* [210] pripravili lokálne pôsobiace bukálne mukoadhezívne filmy s obsahom klotrimazolu k liečbe orálnej kandidózy. Filmy boli sformulované tak, aby uvoľňovali liečivo v koncentrácii vyššej ako je MIC. Filmy obsahovali sodnú soľ karboxymetylcelulózy a karbopol 974P. Uvedená kombinácia bola použitá v dôsledku potenciálneho iritačného charakteru karbopolu k sliznici, ktorú zmiernuje práve kombinácia so sodnou soľou karboxymetylcelulózy, ktorá predstavuje neiritačný bioadhezívny polymér [285]. Koncentrácia glycerolu vo filmoch bola 1,5 %. Množstvo klotrimazolu vo filmoch bolo 1,43 – 1,48 mg. Filmy boli pripravené metódou odparením rozpúšťadla.

Khanna, *et al.* [207] pripravili taktiež filmy s obsahom klotrimazolu. Pri príprave bol ďalej použitý karbopol 934-P a hydroxypropylcelulóza v pomere 1:5. Ako rozpúšťadlo bol použitý 95% etanol. Použitým plastifikátorom bol propylénglykol. Filmy boli pripravené metódou odparením rozpúšťadla. Filmy boli hodnotené *in vitro* (bioadhezívne a fyzikálne vlastnosti, uvoľňovanie liečiva), boli u nich stanovené farmakokinetické parametre (t_{max} , c_{max} , AUC) a stanovila sa ich antimykotická aktivita. Hodnotená bola tiež stabilita pripravených filmov v priebehu skladovania.

BahriNajafi, *et al.* [286] pripravili bukálne filmy s obsahom nystatínu. Filmy obsahovali Eudragit RL100 a HPMC. Ako plastifikátor bol použitý glycerol, propylénglykol a polyetylénglykol 400 v rôznych pomeroch. Filmy boli pripravené metódou odparením rozpúšťadla. Najlepšie boli filmy pripravené s Eudragitom RL100 v kombinácii so zmesou glycerolu a propylénglykolu. Obsah nystatínu vo filmoch o rozmere 2x1 cm bol 10 mg.

Donnelly, *et al.* [206] pripravili mukoadhezívnu náplasť s obsahom metylénovej modrej, ktorá mala byť použitá pri fotodynamickej liečbe mykotických ochorení v dutine ústnej. Náplasti boli pripravené z vodného roztoku Gantrezu[®] (kopolymér) a tripropylénglykol metyl éteru. Zvýšená koncentrácia metylénovej modrej viedla k zvýšeniu mukoadhézie k tkanivu ošápaných, čo autori odôvodnili zvýšenou vnútornou súdržnosťou náplasti v dôsledku elektrostatických interakcií medzi katiónom liečiva a aniónovým kopolymérom.

Nafee, *et al.* [205] pripravili bukálne náplaste (*patches*) s obsahom 10 mg mikonazol-nitrátu. Prúžky obsahovali sodnú soľ karboxymetylcelulózy a chitozan alebo polyvinylalkohol (PVA), hydroxyetylcelulózu a hydroxypropylmetylcelulózu. Účinná látka bola z formulácie uvoľňovaná počas viac ako 5 hodín. Pridanie polyvinylpyrolidónu (PVP) zvyšovalo rýchlosť uvoľňovania. Optimálne uvoľňovanie bolo dosiahnuté za použitia 10 % w/v PVA a 5 % w/v PVP. Primeraný komfort po aplikácii bol dodržaný počas 6 hodín (testované *in vivo*).

Juliano, *et al.* [287] pripravili metódou odparením rozpúšťadla 6 rôznych formulácií filmov, jedno alebo dvojrstvých s obsahom 5 alebo 10 mg chlorhexidín acetátu, ktorý je taktiež možné použiť k prevencii a k liečbe orálnej kandidózy. Ako polymérna látka bol v experimente použitý alginát, hydroxypropylmetylcelulóza alebo chitozan. U filmov bola stanovená morfológia, obsah účinnej látky, uvoľňovanie liečiva a bobtnavosť. U zdravých dobrovoľníkov bola u najlepšej formulácie stanovená hladina

liečiva v slinách. Pripravené filmy boli dobre tolerované. Koncentrácie chlorhexidín acetátu v slinách boli nad MIC pre *C. albicans* počas 3 hodín.

Kuna, *et al.* [288] pripravili mukoadhezívne tablety pre orálnu aplikáciu CPX. Výlisky obsahovali 25 mg CPX. Nosnými pomocnými látkami bol karbomér a hypromelóza, klzné látky zastupoval stearan horečnatý a mastenec. Filmový poťah bol tvorený etylcelulózou, povidónom alebo Eudragitom E100. Použitým farbivom bola metyloranž sodná soľ a rozpúšťadlami bol 96% etanol, acetón a/alebo izopropylalkohol a čistená voda. Tablety boli hodnotené *in vivo* resp. *in vitro*. Najlepšie vlastnosti vykazovali tablety s obsahom 60 % karboméru.

2.2.7 Ciklopiroxolamín

Ciklopiroxolamín (CPX; 6-Cyklohexyl-1-hydroxy-4-methyl-2(*1H*)-pyridón viazaný s 2-aminoethanolom tzv. olamínom v pomere 1:1; Mr: 268,35 Da; CAS no. 41621-49-2) je off-patentová, syntetická, lipofilná (logP 2,35) [289] antimikrobiálna látka patriaca do skupiny hydroxypyridónových antimykotík. História tejto účinnej látky siaha do roku 1973, kedy bol objavený pod názvom HOE 296 [290].

Hydroxypyridónové antimykotiká sú štrukturálne a funkčne odlišné od ostatných imidazolových derivátov a iných antimykotík. Od azolov CPX odlišuje nielen chemická štruktúra, mechanizmus účinku, ale tiež pôsobenie na nedeliace sa patogénne bunky [291]. Terapeutický efekt 1% CPX je ekvivalentný s účinkom 0,77% ciklopiroxu [292]; etanolamínová časť zlúčeniny neprispieva k antimykotickému účinku [290]. Ten je spolu s antibakteriálnou aktivitou pripisovaný hydroxypyridónovej skupine. Elimináciou hydroxy-substituentu, dochádza ku kompletnej strate antiinfekčnej aktivity [291].

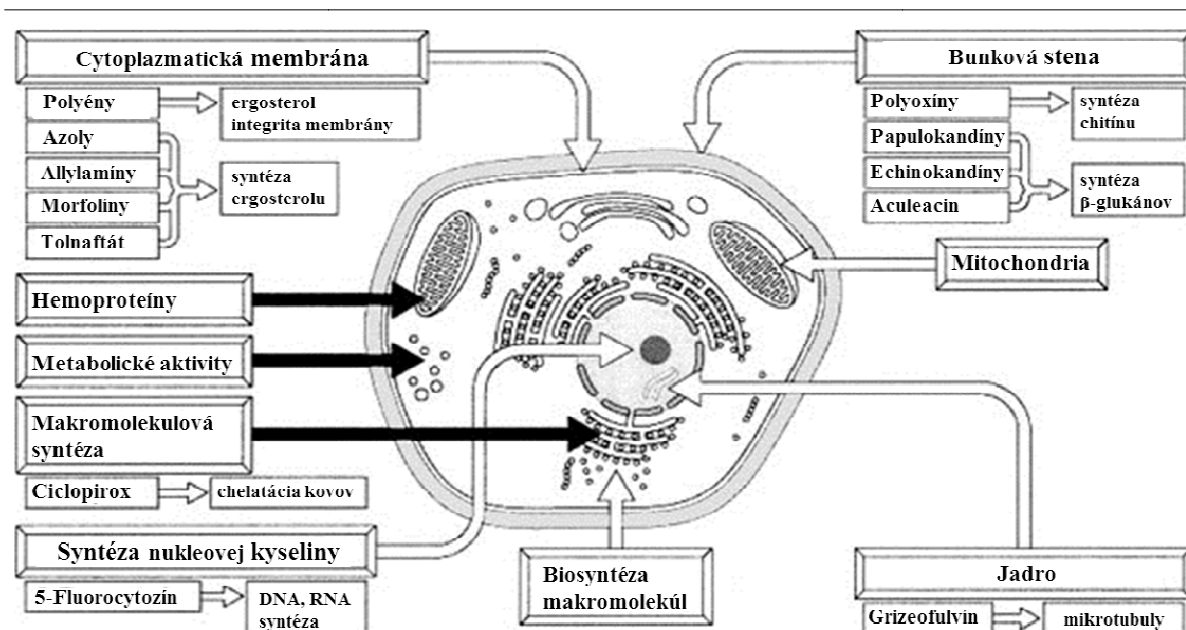
Liečivé prípravky s CPX sú registrované na celom svete v rozličných liekových formách (lak na nechty, krém, gél, šampón, púder atď.). Najčastejšie sa tieto prípravky využívajú k liečbe superficiálnych mykotických a kvasinkových infekcií (napr. kliečbe *tinea pedis*, *tinea cruris*, *tinea corporis*, *cutaneous candidiasis atinea versicolor*). Uplatnenie nachádzajú aj pri liečbe vaginálnej kandidózy, seborroickej dermatitídy, či onychomykózy [293]. Vo viacerých *in vitro* a *in vivo* štúdiách bola preukázaná účinnosť CPX aj pri liečbe nádorových ochorení [294-304]. V *in vitro* testovaní sa zistilo, že lokálna aplikácia CPX podporuje angiogénu a hojenie rán u diabetických myší [305]. Tento objav sľubuje nové možnosti využitia CPX pri liečbe diabetických rán [306]. CPX vykazuje tiež antialergické účinky [307, 308].

V závislosti od koncentrácie, vykazuje CPX fungicídny alebo fungistatický účinok [309]. Typická je preň tiež dobrá antibakteriálna a mierna protizápalová aktivita. V USA je CPX dostupný v 5 formuláciách: Loprox[®] krém 0,77%, Loprox[®] topická suspenzia 0,77%, Loprox[®] gél 0,77%, Loprox[®] šampón 1%, Penlac[™] lak na nechty, topický roztok 8% [310]. V ČR je CPX dostupný taktiež v 5 formuláciách, konkrétne v podobe dermálneho krému (Batrafen[®] 10 mg/g), vaginálneho krému (Dafnegin[®] 1 g/100 g), roztoku (Batrafen[®] roztok 10 mg/ml), laku na nechty (Polinail[®] 80 mg/g) a vaginálnych guličiek (Dafnegin[®] 100 mg) [311]. Dávkovanie prípravkov je 1 – 2 krát denne, do jedného až dvoch týždňov po odznení príznakov, aby sa zabránilo relapsu ochorenia. Perorálne liekové formy (tablety) na trhu zatiaľ nie sú dostupné, nakoľko bezpečnosť a farmakokinetika CPX po perorálnom podaní doteraz neboli rozsiahle skúmané [312] a v literatúre je dostupné len obmedzené množstvo dát [313, 314].

V ľudskom organizme sa CPX pevne viaže k plazmatickým proteínom (94 – 98 %) [313]. Degradácia prebieha glukuronidáciou a z organizmu sa CPX vylučuje prevažne vo forme kyseliny glukurónovej; 1 – 2 % podaného liečiva sú vylúčené ako *N*-deoxycyklopirox a vo forme ďalších neidentifikovaných metabolitov [313]. U prípravkov s CPX je preto veľmi nepravdepodobný vznik interakcií s liečivami metabolizovanými cestou cytochrómového P₄₅₀ systému [291].

2.2.7.1 Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku CPX doteraz nie je presne objasnený. Na rozdiel od azolových a imidazolových antimykotík, CPX nezasahuje do biosyntézy steroidov. Na Obrázku 8 sú vyobrazené miesta účinku jednotlivých skupín antimykotík v mykotickej bunke. Prvotné štúdie mechanizmu účinku dospeli k tomu, že CPX primárne interferuje s aktívnym príjmom a akumuláciou prekursorov makromolekulárnej syntézy [315]. Túto teóriu rozšírila a doplnila ďalšia štúdia [316], v ktorej sa ukázalo, že pôsobením CPX dochádza k intracelulárnej deplécii esenciálnych substrátov a iónov (draslík a fosfáty), čo vedie k inhibícii rastu a následnej smrti mikroorganizmu [316, 317]. Vedci sa domnievajú, že inhibícia celulórného príjmu esenciálnych látok, či strata iných látok predstavujú len sekundárny efekt k primárnemu, doteraz neznámemu mechanizmu účinku.



Obrázok 8. Vyobrazenie miesta účinku jednotlivých antimykotík v mykotickej bunke. Upravené a prevzaté z [318].

Celá trieda hydroxypyridónov je považovaná za iniciálnych inhibítorov G1/S fáze bunkového delenia [317]. Na hranici G1/S fáze účinkujú aj ďalšie látky ako je mimozin a 2-(4-hydroxytoluén-3-yl)-4,5-dihydro-4-carboxytiazol (HTDCT; Hoechst 768159). Uvedené látky (spolu s CPX) reverzibilne blokujú bunkový cyklus HL-60 promyeloidných leukemických buniek v rovnakej fáze bunkového cyklu. Všetky pôsobia v neskorej G1 fáze, kde sa zúčastňujú biochemických dejov, ktoré asociujú s prechodom z G1 do S fáze [298]. Príjem CPX bunkami sa zdá byť energeticky nezávislý a intracelulárna akumulácia liečiva môže viesť ku koncentráciám až 200 krát vyšším v porovnaní s okolitým prostredím. Viac ako 97 % akumulovaného liečiva sa ireverzibilne viaže k rôznym bunkovým štruktúram a organelám, ako je bunková membrána, bunková stena, mitochondrie, mikrozómy a ribozómy, zatiaľ čo len malé množstvo liečiva bolo stanovené v cytozolovej frakcii. Ireverzibilná väzba CPX k intracelulárnym štruktúram [315] zabraňuje tomu, aby sa CPX stal substrátom pre tzv. *drug resistance pumps* [290], vďaka čomu môže byť CPX dlhodobo používaný bez výrazného zníženia antimykotickej a antibakteriálnej aktivity.

Pri vysokých koncentráciách CPX, boli popísané zmeny v permeabilite bunkovej steny a zmeny v príjme, či vylučovaní esenciálnych substancií z bunky. Parciálna inhibícia respiračnej aktivity pri vysokých koncentráciách látky, je taktiež považovaná za sekundárnu voči ostatným efektom. *In vitro* stanovenie mechanizmu účinku za použitia tzv. *freeze-fracture technique* a elektrónovej mikroskopie ukázalo, že CPX modifikuje

plazmatickú membránu dermatofytov a *C. albicans* [319]. Účinok CPX na bunkovú ultraštruktúru bol dokázaný aj v *in vivo* klinickej štúdiu u 6 pacientov s *pityriasis versicolor*. V tejto štúdiu, bola evidovaná viditeľná dezorganizácia interných subštruktúr a významné poškodenie bunkovej membrány počas 3 a 15 dňovej liečby. Stanovenie prebehlo pomocou elektrónového mikroskopu [320].

Genetické štúdie u *C. albicans* ukázali, že v prítomnosti CPX, dochádza ku zmene v regulácii génov pre prenášač železa [290]. Výsledky naznačujú, že CPX asociuje s redukovanou dostupnosťou železa pre mykotické bunky, nakoľko po pridaní FeCl_3 k bunkám liečeným CPX došlo k zvráteniu účinku liečiva. Výsledky nedávnych štúdií ukázali, že CPX pravdepodobne nesie zodpovednosť za chelatáciu polyvalentných kationov nielen Fe^{3+} , ale aj Al^{3+} [299, 316]. Chelatácia železa a jeho obmedzená dostupnosť nevedie aj napriek up-regulácii génov rezistencie CDR_1 a CDR_2 k rozvoju rezistencie voči CPX [293]. Aktivita CPX, vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia (*Minimum inhibitory concentration; MIC*), bola inhibovaná pri koncentrácii $\geq 10^{-5}$ mol/l Fe^{3+} alebo Al^{3+} iónov. Vďaka chelatácii železa je CPX schopný inhibovať PHD-2 (*Prolyl hydroxylase domain*) a stabilizovať HIF-1 α (*Hypoxia-stabilized α -submit*) [306]. PHD-2 je kľúčovým na kyslíku závislý negatívny regulátor proteínovej stability HIF-1 α [321]. HIF-1 α indukuje vaskulárny endoteliálny rastový faktor *in vitro* aj *in vivo* [306]. Oba uvedené faktory majú veľký význam v hojení rán (napr. u diabetu). Existujú tiež domnienky o tom, že CPX účinkuje u kvasiniek interferenciou s posttranslačnou formáciou hypusínu [298]. Ďalším zistením je, že CPX účinkuje inhibíciou membránového transportného systému zablokovaním Na^+/K^+ -ATPázy [290]. Respiračné procesy u *C. albicans* sú inhibované v koncentrácií CPX 200 $\mu\text{g/ml}$; pri vysokých koncentráciách ($\geq 0,27$ mg/ml) inhibuje CPX oxidáciu NADH alebo sukcinátu v mitochondriách *Saccharomyces cerevisiae*. Intaktné kvasinky sú na inhibíciu oxidácie NADH oveľa citlivejšie ako izolované mitochondrie, preto sa predpokladá určitý interaktívny mechanizmus [316].

Ďalším pravdepodobným mechanizmom účinku CPX je inhibícia metalo-dependentných enzýmov (kataláz a peroxidáz), ktoré zodpovedajú za degradáciu toxických peroxidov v mykotickej bunke, čo je pravdepodobne najväčším determinantom pre antimykotickú aktivitu CPX [292, 312, 322]. Pri chelatovaní intracelulárnych iónov, CPX inhibuje na železe závislé enzýmy ako je ribonukleotidreduktáza [302], čím dochádza k zníženiu ponuky „normálnych“ deoxynukleotidov pre syntézu DNA a zvyšuje sa tak pomer antinukleotid/nukleotid [323]. Štúdie s *C. albicans* odhalili, že ciclopirox

neinhibuje syntézu bunkovej steny, ale zabraňuje inkorporácii rádioaktívnych prekursorov do proteínov, RNA a DNA [315]. Koncentrácie CPX nad 50 µg/ml vedú k úniku folín-pozitívnych substancií (amino kyselín a peptidov) a iónov draslíka z buniek *C. albicans* v dôsledku narušenia bunkovej membrány. Vysoké koncentrácie tiež značne inhibujú oxidatívne využitie glukózy a ďalších exogénnych substrátov *C. albicans*, ale neovplyvňujú endogénnu respiráciu, preto sa nepredpokladá, že jeho zásah do elektrónového transportu je primárnou príčinou antimykotického účinku. Pokles v RNA, DNA a proteínovej syntéze vedie pravdepodobne k blokáde transmembránového transportu prekursorov.

CPX indukuje bunkovú smrť u rakovinových buniek, napríklad buniek akútnej myeloidnej leukémie, rakoviny prsníka a rhabdomyosarkómových buniek [301, 302, 304]. Mechanizmus účinku indukcie bunkovej smrti u rakovinových buniek je len na začiatku stanovenia.

Účinná látka nie je mykotickou bunkou ani metabolizovaná, ani degradovaná [290, 315]. Subinhibičné koncentrácie spôsobujú zmeny v bunkových procesoch ovplyvňujúcich adhérenciu *C. albicans* k bukálnym a vaginálnym epiteliálnym bunkám [324]. Podobný efekt bol pozorovaný aj u rilopiroxu, ktorý taktiež patrí do skupiny hydroxypyridónových antimykotík [325]. Ako vidieť, mechanizmus účinku CPX je komplexný dej a pre jeho pochopenie a popis sú potrebné ďalšie výskumy.

2.2.7.2 Metódy stanovenia

Na stanovenie a kvantifikáciu CPX je v literatúre možné nájsť rozličné metódy. Najčastejšie sa jedná o metódy chromatografické [326-333], spektrofotometrické [334] a polarografické [335]. Z chromatografických metód sa najviac využíva HPLC [326-330], plynová chromatografia [331], tenkovrstvová chromatografia [313, 332] a micelárna elektrokinetická kapilárna chromatografia [333].

Využitie materiálov na báze kremíka, ktoré sú súčasťou stacionárnych fáz u HPLC, vedie k silným interakciám s analytom – s *N*-hydroxy-pyridónovou skupinou, ktorá sa prejavuje napr. vznikom niekoľkých rozmytých píkav alebo chvostovaním píkav, prípadne vznikom viacerých píkav a nelineárnymi kalibračnými krivkami [327, 328, 336]. K blokáde *N*-hydroxylovej funkčnej skupiny dochádza metyláciou s použitím dimetyl sulfátu. Produktom reakcie je 1-metoxypyridón, ktorý vykazuje normálne chromatografické správanie. K odstráneniu nadbytku dimetyl sulfátu, dochádza reakciou

s trietylamínom, ktorej výsledkom je vznik neextrahovateľného a so stanovením neinterferujúceho reakčného produktu [337]. Táto metóda sa v literatúre označuje ako predkolónová derivatizácia (*pre-column derivatization*) [327, 328, 337, 338] a jej aplikáciou je možné skrátiť dlhý premývací čas, ktorý je zakotvený v USP. Podľa neho sa pred stanovením CPX odporúča premyť kolónu zmesou vody, acetonitrilu, kyseliny octovej a acetylacetónu v pomere 500:500:1:1, po dobu najmenej 15 hodín; následne sa odporúča kolónu premyť mobilnou fázou po dobu minimálne 5 hodín pred stanovením [339]. Eliminovať chelatačný účinok CPX je možné tiež použitím mobilnej fázy s obsahom disodnej soli EDTA [329, 340, 341].

Tenkovrstvová chromatografia vykazuje pri stanovení CPX nízku špecifitu, pretože voľná kyselina, a ani aminoetanolová soľ nemigrujú ako uniformný bod [332]. Príčinou je opäť *N*-hydroxy-pyridónová skupina CPX.

CPX je možné stanoviť aj kapilárnou elektroforézou s bezkontaktnou vodivostnou detekciou [342]. Pri tejto metóde dochádza v alkalickom médiu (pH = 12) ku konverzii CPX na anión a jeho detekcia je možná kapilárnou elektroforézou s bezkontaktnou vodivostnou detekciou bez použitia elektroosmotického modifikátora toku, nakoľko sa jedná o nízko-mobilnú zlúčeninu. Touto metódou je možné za použitia kyseliny octovej (pri nízkych pH) stanoviť tiež etanolamín vo forme katiónu. Dobré výsledky tejto techniky boli popísané v mnohých aplikáciách na rôznych matriciach [343-346]. Ďalšiu možnosť predstavuje spektrofluorimetrické stanovenie CPX, pri ktorom dochádza k tvorbe ternárneho komplexu CPX s chloridom terbitým a disodnou soľou EDTA [347].

Pred analýzou vzoriek, či už liekovej formy alebo biologického materiálu, musí byť každá analytická metóda validovaná. Validáciou sa rozumie overenie zásadných charakteristík používanej metódy. Jedná sa predovšetkým o posúdenie vhodnosti metódy pre dané stanovenie a tiež o overenie spoľahlivosti a reprodukovateľnosti dosiahnutých výsledkov. Medzi sledované charakteristiky analytických metód podľa ICH guideline patrí: *špecifita, linearita, rozsah, pravdivosť, precíznosť (opakovateľnosť, medziľahlá precíznosť a reprodukovateľnosť), medza detekcie a medza stanovenia* [348]. Uvedené charakteristiky sú sledované u metód stanovujúcich obsah a u disolučných skúšok, pričom medza detekcie a medza stanovenia nemusia byť stanovené. Pri identifikácii analytu sa podľa uvedenej normy stanovuje len špecifita. Pri kvantitatívnom stanovení nečistôt sú sledované všetky charakteristiky, ale detekčný limit nie je vždy nutné stanoviť. Pri stanovení limitu nečistôt sa stanovuje špecifita a detekčný limit.

Špecifita (*Specificity*) je taká vlastnosť metódy, ktorá umožňuje jednoznačne stanoviť analyt v prítomnosti iných zložiek, napr. nečistôt, rozkladných produktov alebo matrice. Pri stanovení špecifity analytickej metódy sa využívajú pozitívne (vzorky s analytom) a negatívne vzorky (vzorky bez analytu nazývané tiež blanky). U vzoriek plazmy je možné špecifitu stanoviť porovnaním analýzy vzorky plazmy s obsahom stanovovaného analytu o známej koncentrácii (pozitívna vzorka) a vzorky čistej plazmy (negatívna vzorka). U biologických matric (napr. plazma, moč) sa odporúča použitie negatívnych vzoriek z minimálne šiestich zdrojov [349]. Týmto postupom je možné odhaliť prítomnosť nečistôt či iných zložiek, ktoré by mohli rušiť jednoznačné stanovenie analytu a vyvolať tzv. matricový efekt. Matricový efekt je súhrnný vplyv hlavných zložiek vzorky na signál analytu. Tento vplyv môže byť pozitívny alebo negatívny, ale v každom prípade dochádza k ovplyvneniu signálu, čo má za následok skreslený, falošný výsledok stanovenia. Potenciálne interferujúce substancie pri stanovení z biologickej matrice predstavujú endogénne súčasti matrice, metabolity, rozkladné produkty, ale tiež súčasne podávaná medicína a iné exogénne xenobiotiká podávané v priebehu štúdie. Ak je metóda určená na kvantifikáciu viac ako jedného analytu, každá analyzovaná látka by sa mala testovať, aby nedochádzalo k interferencii pri stanovení [349]. V chromatografii sa u kritických separácii testuje špecifita rozlíšením dvoch analytov s blízkym retenčným časom. Pri skúškach čistoty píku sa odporúča dôkaz toho, že daný pík neprináleží viac ako jednej zlúčenine, napr. pomocou hmotnostnej spektrometrie [348]. Norma *Bioanalytical Method Validation* používa pre špecifitu všeobecnejší názov selektivita (*Selectivity*) [349].

Pravdivosť (*Trueness*) sa stanovuje opakovanou analýzou vzorky a následným porovnaním s referenčnou hodnotou, napr. známou koncentráciou analytu alebo známym obsahom. Pravdivosť je v nepriamo úmernom vzťahu so systematickou chybou merania a nie je vôbec spojená s náhodnou chybou merania. Pre vyjadrenie pravdivosti sa často využíva výťažnosť (*Recovery*). Jedná sa o pomer nájdeného relatívneho obsahu analytu k referenčnému obsahu (100 %). Ďalšou možnosťou vyjadrenia je rozdiel medzi priemerom a akceptovanou referenčnou hodnotou, teda vyjadrenie systematickej chyby merania (*Bias*). Číselné vyjadrenie pravdivosti sa uvádza spolu s intervalom spoľahlivosti (*Confidence interval, CI*). Minimálny počet stanovení pre stanovenie pravdivosti metódy je 9. Odporúča sa stanovenie na 3 rôznych koncentračných hladinách (3 koncentrácie/3 opakovania) [348]. Podľa FDA je priemerná výťažnosť pri stanovení pravdivosti $100 \pm 2\%$ pre každú koncentráciu v rozsahu koncentrácií 80 – 120 % [350].

Príklad: Experimentálne sa z desiatich analýz zistili tieto hodnoty obsahu bária vo vzorke v $\mu\text{g/kg}$: 2,15; 2,18; 2,07; 2,15; 2,09; 2,17; 2,15; 2,10; 2,13; 2,08. Referenčná hodnota certifikovaného referenčného materiálu je 2,350 $\mu\text{g/kg}$. Výťažnosť v % pre jednotlivé hodnoty je: 91,49; 92,77; 88,09; 91,49; 88,94; 92,34; 91,49; 89,36; 90,64; 88,51. Priemerná výťažnosť z $n = 10$ je 90,51 %; CI $\alpha = 0,05$ je (89,32 – 91,70). Pravdivosť vyjadrená rozdielom oproti referenčnej hodnote; pravdivosť vyjadrená systematickou chybou je referenčná hodnota – experimentálne zistená hodnota z 10 stanovení a jej jednotlivé hodnoty sú: 0,20; 0,17; 0,28; 0,20; 0,26; 0,18; 0,20; 0,25; 0,22; 0,27. Priemerná hodnota z $n = 10$ je 0,22; CI $\alpha = 0,05$ je (0,19 – 0,25).

Pri validácii bioanalytických metód FDA odporúča [349] stanovenie pravdivosti metódy s použitím minimálne piatich stanovení pre danú koncentráciu, pričom odporúča stanovenie u minimálne 3 koncentrácií v rozsahu očakávaných koncentrácií. Priemer by mal byť v rozmedzí 15 % skutočnej hodnoty s výnimkou LQL (dolná medza stanovenia), kde odchýlka nesmie byť viac ako 20 %. Odchýlka priemeru od skutočnej hodnoty slúži ako miera presnosti.

Linearita (Linearity) vyjadruje schopnosť analytickej metódy poskytnúť odozvu, ktorá lineárne závisí od koncentrácie alebo obsahu analytu, tzn. čím viac analytu sa vo vzorke nachádza, tým väčšia je odozva detektora. Linearita je teda chápaná ako priamková závislosť medzi dvoma premennými – odozvou prístroja a koncentráciou/obsahom analytu. Linearita by mala byť stanovená v rámci rozsahu metódy. Stanoviť ju je možné aj vizuálne vzájomným porovnaním chromatogramov kalibračných roztokov, kde sa v závislosti od koncentrácie mení výška píku (vizuálne stanovenie dopĺňa rovnica regresie). Linearitu matematicky vyjadruje korelačný koeficient (R). Prípustná hodnota je $R \geq 0,999$. Lineárna rovnica má tvar (5),

$$y = ax + b \quad (5)$$

kde y je odozva (napr. plocha píku), x koncentrácia analytu, a je smernica priamky a b úsek, ktorý vyjadruje posun na ose x . Ideálne je uprednostňovaný vzťah, kde b je štatisticky nevýznamne odlišné od nuly. Roztoky pre overovanie linearity sa pripravujú buď priamo navážením analytu, alebo riedením zo zásobného roztoku. Zvyčajne sa pripravuje 5 rôznych koncentrácií [348]. FDA odporúča obsah analytu v rozsahu 80 - 120 % teoretického obsahu analytu; to isté platí aj pre stanovenie nečistôt [351].

Kalibračná krivka u vzoriek stanovovaných z biologickej matrice [349] by mala byť pripravená rovnakým postupom ako ostatné vzorky, pričom sa k čistej matrici pridáva známe množstvo analytu. Kalibračná krivka by mala obsahovať blank (vzorka matrice bez analytu a interného štandardu), vzorku matrice s prídavkom interného štandardu bez analytu (nulová vzorka) a z minimálne 6 nenulových vzoriek (vzorky matrice s analytom a interným štandardom), ktoré pokrývajú očakávaný rozsah koncentrácií, vrátane dolnej medze stanovenia (LQL). Pri validácii je potrebné vykonať minimálne 6 opakovaných meraní v priebehu niekoľkých dní na minimálne 4 koncentračných hladinách (LQL, nízka, stredná a vysoká), kedy je každá vzorka analyzovaná 2x. Odozva analytu u biologických vzoriek u LQL by mala byť aspoň päťnásobkom odozvy blanku. Minimálny počet vzoriek k stanoveniu LQL je 5, z ktorých sa vypočíta RSD a/alebo interval spoľahlivosti. Maximálna povolená RSD je 20 % a pravdivosť v rozmedzí 20 % požadovanej koncentrácie [349]. U vyšších koncentrácií je požadovaná maximálna odchýlka od nominálnej koncentrácie do 15 % [349].

Rozsah (Range) špecifikovaný interval koncentrácií, ktoré možno s definovanou presnosťou zisťovať danou metódou. Zvyčajne je rozsah stanovený v priebehu stanovenia linearity. Vyjadrením je interval, ktorý ohraničuje najnižšia a najvyššia koncentrácia analytu, pre ktorú bolo stanovené, že metóda je lineárna, pravdivá a precízna. Pri stanovení obsahu API alebo liekovej formy a pre skúšku disolúcie je požadovaný minimálny rozsah 80 – 120 % testovanej koncentrácie. Pri stanovení CU sa požaduje minimálny rozsah 70 – 130 %. Pri stanovení nečistôt sa rozsah určí od úrovne stanovenia nečistôt až do 120 %. Ak je spolu hodnotená čistota a obsah v jednom teste s použitím 100% štandardu, linearita by mala pokrývať rozsah od stanoveného obsahu nečistôt až do obsahu 120 % [348].

Precíznosť (Precision) vyjadruje vzájomnú tesnosť v súbore výsledkov získaných opakovaním meraní s použitím jednej homogénnej vzorky za rovnakých podmienok. Precíznosť je mierou rozptýlenia nameraných hodnôt. Jej matematickým vyjadrením je smerodajná odchýlka, RSD alebo interval spoľahlivosti. Čím menšie hodnoty smerodajná odchýlka a RSD nadobúda, tým väčšia je precíznosť merania. Precíznosť sa vzťahuje na náhodnú chybu merania a je mierou blízkosti výsledkov. Pri jej stanovení sa neberie do úvahy skutočná hodnota, napr. koncentrácie analytu, ale iba hodnoty jednotlivých stanovení.

Príklad: Experimentálne sa z desiatich analýz jednej vzorky zistili tieto hodnoty obsahu warfarínu vo vzorke v mg: 2,15; 2,18; 2,07; 2,15; 2,08; 2,17; 2,14; 2,10; 2,14; 2,07. Priemerná hodnota z $n = 10$ je 2,125 mg. Smerodajná odchýlka je 0,041, RSD 1,95 % a CI pre $\alpha = 0,05$ je (2,095 – 2,155).

Rozlišujeme tri úrovne precíznosti: opakovateľnosť, medziľahlú precíznosť a reprodukovateľnosť [348].

Opakovateľnosť (Repeatability) vyjadruje precíznosť stanovenia za rovnakých podmienok v priebehu krátkeho časového úseku (napr. 24 hodín). Vyjadruje precíznosť medzi jednotlivými stanoveniami. Minimálny počet stanovení opakovateľnosti je 9, príp. 3 koncentrácie/3 opakovania alebo 6 stanovení pri 100 % testovanej koncentrácii.

Medziľahlá precíznosť (Intermediate precision) vyjadruje variabilitu v laboratórnych podmienkach: rôzne dni, rôzni analytici, zariadenie atď.

Reprodukovateľnosť (Reproducibility) vyjadruje precíznosť medzi laboratóriami. Vzťahuje sa na merania uskutočnené na rovnakom materiáli rôznymi analytikmi pracujúcimi na rôznych miestach. Reprodukovateľnosť sa stanovuje v prípade štandardizácie analytického stanovenia. Využíva sa napr. pri tvorbe liekopisov.

Pri validácii bioanalytických metód FDA odporúča [349] precíznosť merať s použitím minimálne piatich stanovení pre každú koncentráciu, pričom minimálne 3 koncentračné hladiny by mali byť v rozsahu očakávaných koncentrácií. RSD pre každú koncentračnú hladinu nesmie prekročiť 15 % s výnimkou LQL, kde musí byť do 20 %.

Medza detekcie (Detection limit, DL) je najnižšia detekovateľná koncentrácia analytu, ktorej prítomnosť vo vzorke ešte možno danou metódou spoľahlivo dokázať; nejedná sa o exaktnú hodnotu koncentrácie. Stanovuje sa analýzou vzoriek so známou koncentráciou analytu a určuje ho najnižšia koncentrácia, pri ktorej je analytický signál štatisticky významne odlišný od šumu. Medza detekcie nadobúda v porovnaní s medzou stanovenia nižšie hodnoty. Stanovenie prebieha buď metódou pomeru signál-šum, alebo výpočtom podľa vzorca (6), kde σ je smerodajná odchýlka odozvy detektora (meranej veličiny, napr. plochy pod píkom) a S je smernica kalibračnej krivky. Možností pre výpočet pomocou vzorca je v literatúre dostupných viacero.

$$DL = 3,3 * \frac{\sigma}{S} \quad (6)$$

Pri metóde využívajúcej pomer signál-šum sa porovnávajú namerané signály vzorky so známou nízkou koncentráciou analytu a slepej vzorky (tzv. blanku). Pri stanovení medze detekcie je akceptovaný pomer signál-šum 3:1 alebo 2:1 [348]. Význam má najmä pri stopovej analýze, čo je spoločné aj pre medzu stanovenia. Vypočítať medzu detekcie je možné aj pomocou medze stanovenia ($QL/3$). Hodnota medze detekcie by mala byť 10x nižšia, ako je bežne analyzovaná koncentrácia [351, 352].

Medza stanovenia (Quantitation limit, QL) predstavuje najmenšiu koncentráciu analytu (dolná medza stanovenia), ktorá je detekovateľná s prijateľnou precíznosťou a pravdivosťou, a obvykle býva trojnásobkom medze detekcie ($DL*3$). Niekedy sa udáva tiež horná medza stanovenia, ktorú predstavuje najväčšia koncentrácia analytu, pri ktorej ešte má stanovenie dohodnutú metrologickú kvalitu. K stanoveniu je možné opäť použiť pomer signál-šum, kedy sa opäť porovnávajú namerané signály vzorky so známou koncentráciou analytu a blanku. Akceptovaný je pomer signál-šum 10:1. K výpočtu je možné použiť taktiež vzorec (opäť možnosť viacerých ako u DL) (7), kde σ a S sú zhodné ako v prípade vzorca pre výpočet DL [348, 351, 353].

$$QL = 10 * \frac{\sigma}{S} \quad (7)$$

Robustnosť (Robustness) vyjadruje mieru vplyvu premenných podmienok pri analýze na výsledok analytického stanovenia. Pri vývoji metódy sú sledované uskutočnené zmeny a ich dopad na parametre merania, vďaka čomu je možné stanoviť spoľahlivosť metódy počas bežného používania. Jedná sa najmä o vplyv zmeny použitej kolóny (napr. zámena výrobcu, série), zloženia mobilnej fázy a jej pH, teploty, rýchlosti prietoku mobilnej fázy a stability analyzovaných vzoriek. Výsledkom je stanovenie kritických parametrov, ktoré vyžadujú starostlivú kontrolu [351, 352].

Norma FDA, ktorá sa zaoberá validáciou bioanalytických metód okrem hodnotenia uvedených parametrov požaduje tiež stanovenie *výtlačnosti a stability* [349].

Výtlačnosť (Recovery) popisuje extrakčnú efektivitu analytickej metódy v rámci limitov variability. Stanovuje sa prídavkom známeho množstva analytu k biologickej matrici, pričom k analýze vzorky dochádza po extrakcii analytu. Výsledok stanovenia analytu po extrakcii sa porovnáva so skutočnou koncentráciou čistého štandardu. Výtlačnosť nemusí byť 100 %, ale výtlačnosť analytu a interného štandardu by mala byť konzistentná, precízna a reprodukovateľná. Pri stanovení by sa mali porovnať výsledky

extrahovaných vzoriek s nízkou, strednou a vysokou koncentráciou s neextrahovanými štandardmi, ktoré predstavujú 100 %.

Stabilita (Stability) hodnotí stabilitu analytu s ohľadom na predpokladané podmienky počas manipulácie so vzorkou od jej odberu až po samotnú analýzu. Rozdeľuje sa na: *stabilitu počas cyklu zmrazenia a rozmrazenia, krátkodobú stabilitu pri laboratórnej teplote* po dobu 4 – 24 hodín, *dlhodobú stabilitu*, ktorá hodnotí vplyv dlhodobého uskladnenia od prvého predpokladaného odberu vzorky až po poslednú očakávanú analýzu, *stabilitu analytu v zásobnom roztoku a stabilitu po úprave vzorky*, kde sa hodnotí stabilita v autosampleri počas sekvencie analýz. Cieľom stability je dokázať, že koncentrácia analytu vo vzorke v čase analýzy korešponduje s koncentráciou analytu v čase odberu vzorky [349, 354]. Stabilita liečiva v biologických tekutinách je funkciou skladovacích podmienok, chemických vlastností liečiva, matrice a obalu, pričom stabilita sa vždy určuje pre danú matricu a daný spôsob skladovania. Pri stabilitných skúškach by mali byť dodržiavané rovnaké podmienky ako u reálnych vzoriek, pričom testovať je potrebné aj stabilitu analytu v kalibračných (zásobných) roztokoch. Testované roztoky sa u stabilitných štúdií porovnávajú s čerstvo pripravenými roztokmi. Stanovenie prebieha minimálne v troch opakovaníach pre nízku a vysokú koncentráciu analytu. Stabilita je vyhovujúca, ak sú výsledky v rozmedzí 15 % nominálnych koncentrácií [349].

Metódy využívajúce interný štandard

Interný štandard (IS) je látka, ktorá nie je obsiahnutá vo vzorke, s fyzikálno-chemickými vlastnosťami čo najpodobnejšími fyzikálno-chemickým vlastnostiam analyzovanej látky, ktorá má byť identifikovaná, a ktorá sa pridá do každej vzorky, ako aj do každého kalibračného štandardu [355]. Pri metóde využívajúcej vnútorný štandard sa vyjadruje relatívna hodnota (pomer) signálu analytu voči signálu porovnávacej zlúčeniny (IS), ale podobných chromatografických vlastností, ktorá sa vo vzorke pôvodne nenachádzala, ale pridala sa do roztoku vzorky v známom množstve/koncentracii. Podmienkou je, aby interný štandard nereagoval so stanovovanou látkou a mal odlišný retenčný čas od stanovovaného analytu. Výhodou tohto postupu je eliminácia chýb v meraní objemu pri dávkovaní kvapalných vzoriek. Pri stanovení je možné použiť *jeden kalibračný roztok* alebo sa využíva *kombinovaná metóda kalibračnej krivky s IS*.

Pri použití *jedného kalibračného roztoku* sa pripraví zmesný roztok IS a analytu v rádovo porovnateľných koncentráciách. Z chromatogramov opakovaných analýz

známeho objemu kalibračného roztoku sa vyhodnotí vzájomný pomer plôch píkov oboch látok a jeho priemerná hodnota. Predpokladom použitia tohto prístupu je lineárna závislosť.

Pri použití *kombinovanej metódy kalibračnej krivky s IS* sa pripraví séria kalibračných roztokov s rôznou koncentráciou analytu a zvyčajne rovnakou koncentráciou vnútorného štandardu. Z chromatogramov sa určia vzájomné pomery plôch pík analytu a IS. Pomer signálov sa tak stane novým signálom, ktorý je od náhodných vplyvov stanovenia nezávislý. Ak je koncentrácia IS vo všetkých roztokoch rovnaká, nezávisle premennou sa stáva priamo koncentrácia analytu v kalibračných roztokoch [351, 356]. Metóda sa uplatňuje najmä pri komplexných postupoch prípravy vzoriek (napr. viacnásobné extrakcie), u vzoriek s nízkou koncentráciou (napr. farmakokinetické štúdie) a pri vzorkách so širokým rozsahom očakávaných koncentrácií vo vzorke (napr. farmakokinetické štúdie) [351].

2.2.7.3 Farmakokinetické štúdie ciklopiroxolamínu

V literatúre je možné nájsť málo farmakokinetických štúdií s CPX. Autori sa zameriavajú skôr na koncentráciu účinnej látky v mieste aplikácie, ale nerozoberajú množstvo a kinetiku liečiva, ktoré sa po aplikácii vstrebáva do systémového obehu.

Dostupné sú *in vivo* farmakokinetické štúdie s CPX u králikov po jednodávkovom i.v. a vaginálnom podaní CPX v dávke 15 mg/kg [326], ďalej štúdie po dermálnej aplikácii u kráľika v dávke 2 – 5 mg/kg, po vaginálnej aplikácii 1% krému samičkám beagla v dávke 1 mg/kg, po p.o. aplikácii u psa v dávke 10 a 15 mg/kg, po i.v. aplikácii psovi v dávke 15 mg/kg, po dermálnej aplikácii u psa v dávke 2 mg/kg, po p.o. podaní negravidným samičkám potkana v dávke 1 mg/kg, po dermálnej aplikácii 1% krému na pokožku chrbta u človeka v dávke 36 až 37 mg [313], po každodennej aplikácii 8% laku na nechty zdravým dobrovoľníkom [291]. Stanovenie farmakokinetiky CPX po orálnom podaní doteraz nebolo popísané, hoci CPX vykazuje výhodné vlastnosti pre lokálnu liečbu mykotických infekcií v dutine ústnej (nízky výskyt rezistencií, vyhovujúci bezpečnostný profil).

Pokiaľ ide o lokálne podanie CPX, ktoré sa väčšinou používa v klinickej praxi, chýbajú v literatúre podrobné farmakokinetické parametre. Okrem toho boli údaje väčšinou získané zo štúdií vykonaných u odlišných druhov, v inej liekovej forme, dávke

a ceste podania. Priame porovnanie farmakokinetických parametrov je preto problematické.

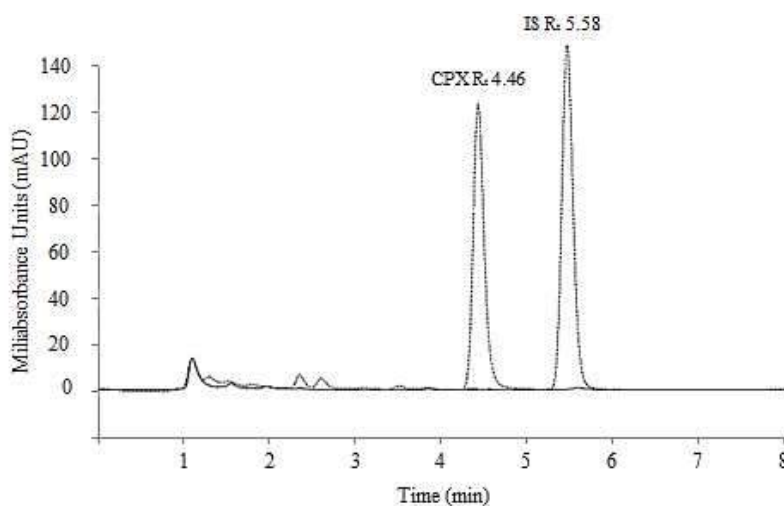
Stanovením koncentrácie ciklopiroxolamínu v plazme a stanovením farmakokinetiky po bukálnnej aplikácii mukoadhezívneho filmu pripraveného metódou odparením rozpúšťadla na Ústave technológie liekú VFU Brno, sa zaoberal experimentálny článok (plné znenie článku na strane 126):

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJZIOK, J., GAJDOŠOVÁ, M., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K. a JEKL, V. **Pharmacokinetics of ciclopirox olamine after buccal administration in rabbits.** *Current Drug Delivery*. 2017, **14**(1):99-108. doi: 10.2174/1567201813666160502142856. (IF₂₀₁₇ = 1,446).

Cieľom tejto experimentálnej práce bolo stanoviť farmakokinetické parametre po podaní bukálnneho filmu šiestim samčekom novozélandského bieleho SPF kráľika (*Oryctolagus cuniculus*), kmeň Hsd:lf:NZW, Harlan Laboratories Inc., Belton, UK). Testovaným zvieratám boli bukálnne aplikované 4 filmy s CPX o celkovej dávke 34,4 (33,0; 35,9) mg.kg⁻¹ (hodnoty v zátvorke vyjadrujú 95% interval spoľahlivosti pre uvedenú hodnotu). K stanoveniu farmakokinetických parametrov, bola vytvorená a validovaná jednoduchá izokratická HPLC metóda vhodná na priame stanovenie CPX a jeho metabolitu v krvnej plazme. Z validačných parametrov bola hodnotená linearita, rozsah, precíznosť (medziľahlá precíznosť a opakovateľnosť), pravdivosť, selektivita, medza stanovenia a medza detekcie.

Použitá analytická metóda bola založená na extrakcii CPX do organickej fáze. Ako interný štandard bol použitý 6-cyclohexyl-4-methyl-2H-pyran-2-ón (interný štandard, IS). Kalibračná krivka vyjadrovala závislosť pomeru plôch píku CPX a IS na koncentrácii CPX. Kalibračná krivka bola lineárna ($R^2 > 0,99$) v rozsahu koncentrácií 0,25 – 10 µg/ml. Medziľahlá precíznosť bola stanovená opakovanou analýzou kalibračných vzoriek v priebehu viacerých dní s jedným opakovaním každý deň. Precíznosť vyjadrená ako opakovateľnosť bola stanovená opakovanou analýzou kalibračných vzoriek v stanovený deň. Medziľahlá precíznosť a opakovateľnosť boli vyjadrené ako RSD v %. Ich hodnoty boli 3,1 – 14,7 % a 3,3 – 8,0 %. Pravdivosť metódy bola stanovená porovnaním stanoveného obsahu CPX so skutočnou koncentráciou v analyzovaných

vzorkách. Pravdivosť metódy, vyjadrená ako % výťažnosti, bola 88,5 – 104,6 % a 89,5 – 99,7 % pre stanovenia v rozličný deň a v priebehu jedného dňa v uvedenom poradí. Precíznosť a pravdivosť, boli v rámci celého koncentračného rozsahu v súlade s ICH Guideline [348]. Špecifita metódy bola dokázaná porovnaním chromatogramu endogénneho materiálu králičej plazmy a plazmy po pridaní známeho množstva CPX ($c = 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a IS ($c = 3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Použitá metóda bola selektívna, nakoľko v celom rozsahu analytického času 8 minút, nedochádzalo k interferencii medzi CPX, prípadne IS a endogénnymi súčasťami plazmy (Obrázok 9).



Obrázok 9. Chromatogramy vzoriek králičej plazmy; čistá plazma (—) a plazma s prídavkom CPX ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a interného štandardu (IS; $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); (- -).

Stanovenie medze stanovenia (QL) bolo uskutočnené porovnaním pomeru signál-šum porovnaním nameraných signálov vzoriek so známou nízkou koncentráciou analytu so signálom čistých vzoriek (blank) a určením najnižšej koncentrácie, pri ktorej bolo možné analyt spoľahlivo kvantifikovať. Pomer signál-šum bol 10:1 a hodnota QL bola $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Medza detekcie bola vypočítaná ako QL/3 a jej hodnota bola $0,007 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Plazmatické koncentrácie CPX v plazme králika boli stanovené v čase 0, 1, 2, 4, 6, 8 a 12 hodín po aplikácii 4 filmov na bukálnu sliznicu. Boli stanovené hladiny celkového (metabolizované + nemetabolizované liečivo) a nemetabolizovaného CPX. Stanovenie celkového CPX zahŕňalo pridanie enzýmu β -glukuronidázy k odobratým vzorkám plazmy. Množstvo liečiva bolo stanovené pomocou HPLC. Pre výpočet farmakokinetiky bol použitý program Kinetica 4.4 software (Thermo Electron).

Čas potrebný na dosiahnutie maximálnej plazmatickej koncentrácie bol 1,67 (1,12; 2,21) hodín po podaní, s maximálnou plazmatickou koncentráciou 5,73 (4,18; 7,28) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

pre celkový CPX a 2,13 (1,69; 2,57) pre nemetabolizovaný CPX. Podľa literatúry t_{\max} po i.v. a vaginálnom podaní u kráľika v dávke 15 mg.kg^{-1} bol 0,167 h a 1 h po aplikácii v uvedenom poradí [326]. Mierne dlhší t_{\max} pri bukálnom podaní CPX, môže byť v dôsledku použitej liekovej formy, ktorou je mukoadhezívny film, ktorý predlžuje uvoľňovanie liečiva. Predĺžené uvoľňovanie CPX potvrdili tiež výsledky *in vitro* uvoľňovania CPX z filmov pomocou pádlovej disolučnej metódy, kde bolo dokázané, že 50 % CPX sa z liekovej formy uvoľní po 103 minútach, čo je v zhode s uvoľnením CPX v *in vivo* štúdií. Na základe výsledkov $AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml.min}$), bola zistená výrazne vyššia biodostupnosť účinnej látky po bukálnom podaní v porovnaní s vaginálnym podaním ($AUC_{0-\infty}$ pre celkový CPX 2731 vs. $64,4 \mu\text{g/ml.min}$ [326]). Na základe zistených dát, žiaľ nie je možné predpovedať celkovú biologickú dostupnosť, nakoľko extrapolovaná c_0 po bukálnom podaní reálne neodráža hodnotu c_0 po i.v. podaní. Pri porovnaní hodnôt $AUC_{0-\infty}$ pre celkový a nemetabolizovaný CPX po bukálnom podaní sú viditeľné výrazne vyššie hodnoty celkového CPX, čo je možné vysvetliť relatívne rýchlou metabolizáciou CPX na glukuronid. Rýchla glukuronidácia CPX vyplýva tiež zo vzájomného pomeru nemetabolizovaného a celkového CPX. Ich vzájomný pomer je 40 % v prvých odberových časoch po aplikácii a okolo 7 – 20 % medzi 4. – 12. hodinou po podaní. Táto skutočnosť je tiež v súlade s publikovanou literatúrou po podaní 15 mg.kg^{-1} CPX, kde je pomer po i.v. podaní ca. 50 % v čase 0,167 h po podaní a okolo 15 – 20 % po 4 hodinách; po intravaginálnom podaní je pomer vždy okolo 15 – 20 % [326]. Uvedené dáta svedčia o tom, že v organizme dochádza k veľmi rýchlej transformácii CPX na glukuronidový derivát. Zistená hodnota retransformovaného priemeru pre zdánlivý distribučný objem (V_d/F) u celkového CPX bola 11 L (6; 33). Výrazne vyššia hodnota V_d/F pre voľný CPX 59 (30; 120) L je v zhode s vyššou lipofilitou nemetabolizovaného liečiva v porovnaní s jeho glukuronidovým metabolitom. Eliminačný polčas bol 3,8 (1,9; 10,8) hodín.

Transformácia dát bola použitá na stanovenie $t_{1/2}$ a MRT pre celkový CPX; a tiež k stanoveniu Cl/F a MRT pre nemetabolizovaný CPX. Hodnoty $t_{1/2}$ pre celkový CPX boli 3,8 (1,9; 10,8) h, k_{el} 0,21 (0,04; 0,38) h^{-1} , MRT 374 (289; 708) h a Cl/F 34 (23; 45) ml.min^{-1} preukázali predĺženie účinku antitykotika k liečbe lokálnych a systémových infekcií. Po vaginálnom podaní boli hodnoty $t_{1/2}$ celkového CPX 2,22 (2,07; 2,37) h, MRT 3,27 (2,75; 3,78) h a Cl/F 10,92 (9,96; 11,88) ml.min^{-1} [326]. Biologický polčas $t_{1/2}$ pre celkový CPX bol 3,68 (1,84; 5,52) h, k_{el} 0,22 (0,12; 0,32) h^{-1} , MRT 222 (207; 288) h a Cl/F 201 (146; 293) ml.min^{-1} . Namerané plazmatické

koncentrácie a následne aj zistené farmakokinetické parametre vykazujú vysokú variabilitu, a to aj napriek tomu, že k testovaniu bol použitý vysoko homogénny súbor. Pozorovaná variabilita v nameraných koncentráciách dokladá, že pri mukoadhezívnom podaní je absorbovaná dávka liečiva vysoko variabilná. To je v súlade s očakávaním pri hodnotení bukálnej formy podania, kedy je možné predvídať napríklad rôznu kvalitu adhézie filmu ku sliznici u rôznych jedincov alebo postupnou eróziou matrice a následnou degradáciou mukoadhezívneho filmu v závislosti na frekvencii príjmu tekutín a potravy. Vzhľadom k vyššie uvedenému bola použitá k odhadom stredných hodnôt transformácia dát a v opodstatnených dôvodoch boli uvádzané hodnoty retransformovaných priemerov, ktoré boli vypočítané s využitím exponenciálnej transformácie dát v programe QC-Expert 3.2. (TriloByte).

Z prezentovaných dát sa zdá, že pri zapracovaní CPX do inak neošetrených mukoadhezívnych filmov sa nejedná o klasické bolusové podanie. Účinná látka sa z filmu vstrebávala dlhší čas; $t_{1/2}$ je dlhší než v referenčnom článku, hodnoty MRT a Cl/F sú významne vyššie ako po vaginálnom podaní [326]. Z farmakokinetických dát sa zdá, že po príprave medikovaných jednovrstvových filmov zložených z sodnej soli karmelózy a glycerolu, dochádza bez akejkoľvek úpravy a pridania ďalších látok k predĺženému uvoľňovaniu, čo je z hľadiska liečby mykotických infekcií žiaduce.

Štúdia bola podporená Ministerstvom zdravotníctva Českej republiky (číslo projektu: NT14477). Klinické hodnotenie bolo uskutočnené podľa princípov Helsinskej deklarácie. Zvieratá boli chované so súhlasom Odboru živočíšnych komodít Ministerstva pôdohospodárstva Českej republiky a *in vivo* štúdia bola schválená projektom č. S1-2012.

3. ZÁVER

Predkladaná dizertačná práca je výsledkom výskumnej a publikačnej činnosti študentky PharmDr. Ivany Lukášovej. Teoretická časť práce priniesla prehľad problémov vznikajúcich počas lisovania tabliet, so zameraním na problematiku obsahovej rovnorodosti pevných liekových foriem s obsahom účinnej látky s úzkym terapeutickým indexom a na problematiku lepenia účinnej látky k povrchu razidiel v priebehu lisovacieho procesu. Teória bola zameraná aj na hodnotenie tabliet s obsahom liečiva vo forme slabej kyseliny pomocou skúšky disolúcie a v poslednej časti sa venovala mukoadhezívnym filmom so zameraním na ich charakteristiku, prípravu, hodnotenie a využitie k liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej.

U experimentov, kde bola ako modelová látka použitá sodná soľ warfarínu vo forme kryštalického klatrátu s izopropanolom sa podarilo posúdiť vplyv veľkosti častíc plniva, veľkosti častíc API, koncentrácie API a čas prídavku klziva na obsahovú rovnorodosť tabletových zmesí a tabliet. Najlepšie výsledky obsahovej rovnorodosti a minimalizácia chyby vzorkovania, vďaka zníženiu elektrostatického náboja zmesi, boli dosiahnuté pri použití väčších častíc plniva fosforečnanu vápenatého ($d_{50} = 152,3 \mu\text{m}$) a menších častíc API ($d_{50} = 10,3 \mu\text{m}$) s koncentráciou 2 % a s použitím technológie miesenia (10 + 5 minút), kedy boli všetky zložky zmesi miesené 10 minút bez magnéziom stearátu (klzivo) a po jeho pridaní bola zmes miesená ešte 5 minút. Zmesi a tablety uvedeného zloženia vyhoveli liekopisným požiadavkám aj prísnejším požiadavkám výrobcu firmy DuPont a vďaka vyhovujúcim hodnotám Cpk indexu a Bergumovej metódy je u tejto technológie a postupu zabezpečené, že aj všetky následne vyrobené šarže vyhovujú na zvolenej hladine štatistickej významnosti stanoveným kritériám. V nadväzujúcich experimentoch bola potvrdená robustnosť uvedeného postupu prípravy a to prípravou tabletových zmesí s obsahom 96, 100 alebo 104 % API (*worst case*), z ktorých boli nalisované tablety v terapeuticky používanej škále 1 – 10 mg. Tablety s warfarínom boli ďalej použité pri skúške disolúcie. Kvôli zlej rozpustnosti warfarínu v kyslom pH, nebolo pri disolúcii možné použiť médium s pH 1,2. Z tohto dôvodu boli hľadané podmienky, za ktorých by bolo možné skúšku previesť a zároveň by bolo možné porovnanie disolučných profilov, čo je dôležité napr. pri bioekvivalenčných štúdiách alebo pri testovaní stability. Podarilo sa navrhnúť bifázickú disolučnú skúšku (oktanol/0,1 M HCl) s rozlišujúcim charakterom za pomoci výpočtu faktora podobnosti (f_2)

a rozdielnosti (f_1). Daná metóda bola rozlišujúca s ohľadom na obsah účinnej látky v tablete (1 a 10 mg). Bifázická disolučná skúška, však nie je kvôli technickej a časovej náročnosti vhodná pre rutinnú kontrolu, preto boli navrhnuté ďalšie disolučné metódy, ktoré sú vhodné pre porovnanie disolučných profilov. Vhodným disolučným prostredím môže byť napr. voda pri otáčkach pádiel 25 rpm, kedy má metóda rozlišujúci charakter vzhľadom na obsah API v tablete (1, 5 a 10 mg) a umožňuje vzájomné porovnanie disolučných kriviek na základe výpočtu faktora podobnosti (f_2) a rozdielnosti (f_1). Alternatívne je možné použiť fosfátový pufoer s pH 6,8 pri otáčkach pádla 50 rpm, kedy je taktiež možné hodnotiť disolučné profily na základe výpočtu f_2 a f_1 (obsah API v tablete 10 mg). Ďalšie kvalitatívne vlastnosti tabliet (napr. veľkosť častíc API, radiálna pevnosť tabliet) nemajú za uvedených podmienok významný vplyv na disolučné profily.

Častým problémom pri výrobe tabliet je lepenie API k povrchu razidiel pri lisovaní, ktoré môže vyústiť napr. k problémom s dosiahnutím obsahovej rovnorodosti alebo môže spôsobiť finančné problémy a viesť k strate investovaného času. V experimentoch zameraných na lepenie ibuprofenu k razidlám tabletovacieho lisu sa podarilo určiť a analyzovať kritické faktory ovplyvňujúce lepenie a zvoliť najvhodnejšie klzivo, lisovaciu silu a povrch razidla, u ktorých bolo lepenie najnižšie. Za najvhodnejšie klzivo bol zvolený natrium-stearyl-fumarát, najlepšia lisovacia sila je 19 kN a za najlepší poťahový materiál razidla bol zvolený chróm nitrit, u ktorého ani pri rutinnou používaní nedochádza k zhoršeniu lepenia.

V ďalšom experimente bola na základe výpočtu farmakokinetických parametrov posúdená vhodnosť aplikácie mukoadhezívnej bukálnej liekovej formy s obsahom ciklopiroxolamínu k liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej. Pre tento účel bola vyvinutá a validovaná analytická metóda využívajúca interný štandard. Množstvo absorbovaného liečiva po podaní bukálneho filmu bolo stanovené z plazmy kráľika. Na základe vypočítaných farmakokinetických parametrov sa zistilo, že po bukálnej aplikácii ciklopiroxolamínu vo forme filmu došlo k predĺženiu uvoľňovania API z liekovej formy v porovnaní s literárnymi údajmi, kedy bol CPX podaný vaginálne vo forme 8% laváže. Zistená bola tiež rýchla metabolizácia liečiva na glukuronid. Výsledky ukazujú, že hodnotená lieková forma predlžuje pôsobenie API v dutine ústnej, čo je pri liečbe mykotických ochorení dutiny ústnej žiaduce.

4. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

1. Jivraj, M., Martini, L.G. a Thomson, C.M. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2000, **3**(2):58-63. doi: 10.1016/S1461-5347(99)00237-0.
2. Ahmat, N., Ugail, H. a Castro, G.G. Method of modelling the compaction behaviour of cylindrical pharmaceutical tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **405**(1-2):113-121. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.006.
3. Fell, J.T., Rowe, R.C. a Newton, J.M. The mechanical strength of film-coated tablets. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1979, **31**(2):69-72. doi: 10.1111/j.2042-7158.1979.tb13434.x.
4. Sohi, H., Sultana, Y. a Khar, R.K. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2004, **30**(5):429-448. doi: 10.1081/DDC-120037477.
5. Fites, A.L., Banker, G.S. a Smolen, V.F. Controlled drug release through polymeric films. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1970, **59**(5):610-613. doi: 10.1002/jps.2600590507.
6. Oztur, S.S., Palsson, B.O., Donohoe, B. a Dressman, J.B. Kinetics of release from enteric-coated tablets. *Pharmaceutical Research*. 1988, **5**(9): 550-565. doi: 10.1023/A:1015937912504.
7. Mullarney, M.P. a Hancock, B.C. Mechanical property anisotropy of pharmaceutical excipient compacts. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, **314**(1):9-14. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.052.
8. Saha, S. a Shahiwala, A.F. Multifunctional coprocessed excipients for improved tableting performance. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009, **6**(2):197-208. doi: 10.1517/17425240802708978.
9. Gohel, M.C. a Jogani, P.D. A review of co-processed directly compressible excipients. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2005, **8**(1):76-93.
10. Patel, S. a Bansal, A.K. Prediction of mechanical properties of compacted binary mixtures containing high-dose poorly compressible drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **403**(1-2):109-114. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.039.
11. Wu, C.Y., Best, S.M., Bentham, A.C., Hancock, B.C. a Bonfield, W. Predicting the tensile strength of compacted multi-component mixtures of pharmaceutical powders. *Pharmaceutical Research*. 2006, **23**(8):1898-1905. doi: 10.1007/s11095-006-9005-6.

12. De Boer, A.H., Bolhuis, G.K. a Lerk, C.F. Bonding characteristics by scanning electron microscopy of powder mixed with magnesium stearate. *Powder Technology*. 1978, **20**(1):75-82. doi: 10.1016/0032-5910(78)80011-4.
13. Zuurman, K., Maarschalk, K.V. a Bolhuis, G.K. Effect of magnesium stearate on bonding and porosity expansion of tablets produced from materials with different consolidation properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, **179**(1):107-115. doi: 10.1016/S0378-5173(98)00389-5.
14. Vromans, H. a Lerk, C.F. Densification properties and compactibility of mixtures of pharmaceutical excipients with and without magnesium stearate. *International Journal of Pharmaceutics*. 1988, **46**(3):183-192. doi: 10.1016/0378-5173(88)90076-2.
15. Wu, C.Y., Best, S.M., Bentham, A.C., Hancock, B.C. a Bonfield, W. A simple predictive model for the tensile strength of binary tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **25**(2-3):331-336. doi: 10.1016/j.ejps.2005.03.004.
16. Chaudry, I.A. a King, R.E. Migration of potent drugs in wet granulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1972, **61**(7):1121-1125. doi: 10.1002/jps.2600610718.
17. Paul, S., Taylor, L.J., Murphy, B., Krzyzaniak, J., Dawson, N., Mullarney, M.P., Meenan, P. a Sun, C.C. Mechanism and kinetics of punch sticking of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **106**(1):151-158. doi: 10.1016/j.xphs.2016.07.015.
18. Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P. a Crison, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995, **12**(3):413-420. doi: 10.1023/A:1016212804288.
19. Lipinski, C. *Poor aqueous solubility-an industry wide problem in drug discovery*. American Pharmaceutical Review. [Online prezentácia]. 2002, **5**:82-85. [cit. 2017-07-06]. Dostupné z: <http://www.spotfire.co.kr/userconference/2002/Poor%20Aqueous%20Solubility%20-%20an%20Industry-Wide%20Problem%20in%20ADME%20Screening.pdf>.
20. Gowthamarajan, K., Singh, S.K. Dissolution testing for poorly soluble drugs: A continuing perspective. *Dissolution Technologies*. 2010, **17**(3):24-32. doi: 10.14227/DT170310P24.
21. Rohrs, B.R. Dissolution method development of poorly soluble compounds. *Dissolution Technologies*. 2001, **8**(3):1-5. doi: 10.14227/DT080301P6.
22. Swarbrick, J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Informa Healthcare, 2007, s. 1171. ISBN: 0849393949.

23. Franc, A., Muselík, J., Máslová, R. a Hadrabová, J. Content uniformity of warfarin-containing mixtures and tablets. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2013, **62**(4):177-181.
24. Mohan, P., Sharma, N., Gupta, M.K., Khinchi, M.P., Agrawal, D. a Kabra, M.P. A review on validation of solid dosages form. *Journal of Scientific Research in Pharmacy*. 2012, **1**(2):18-22.
25. Muselík, J. a Franc, A. Evaluation of content uniformity of tablets with a low content of the active ingredient with a narrow therapeutic index. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2012, **61**(6):271-275.
26. Bolhuis, G.K., Lerk, C.F., Zijlstra, H.T. a De Boer, A.H. Film formation by magnesium stearate during mixing and its effect on tableting. *Pharmaceutisch Weekblad*. 1975, **110**(16):317-325.
27. Perrault, M., Bertrand, F. a Chaouki, J. An investigation of magnesium stearate mixing in a V-blender through gamma-ray detection. *Powder Technology*. 2010, **200**(3):234-245. doi: 10.1016/j.powtec.2010.02.030.
28. Muselík, J., Franc, A., Štarková, J. a Matějková, Z. Optimization of technological processes for the preparation of tablets with a low content of warfarin by direct compression. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2014, **63**(5):217-221.
29. Muselík, J., Franc, A., Doležel, P., Goněc, R., Krondlová, A. a Lukášová, I. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharmaceutica*. 2014, **64**(3):355-367. doi: 10.2478/acph-2014-0022.
30. Lukášová, I., Muselík, J., Franc, A., Goněc, R., Míka, F. a Vetchý, D. Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active ingredient. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **109**:541-547. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.017.
31. Singhai, S.K., Chopra, V.S., Nagar, M., Jain, N. a Trivedi, P. Scale Up factor determination of V Blender: An overview. *Der Pharmacia Lettre*. 2010, **2**(2):408-433.
32. *How to select a ribbon blender* [Online]. 2016. [cit. 2017-08-03]. Dostupné z: <http://www.powderbulksolids.com/article/How-to-Select-a-Ribbon-Blender-01-15-2016>.
33. Deweswaran, R., Bharath, S., Basavaraj, B.V., Abraham, S., Furtado, S. a Madhavan, V. Concepts and techniques of pharmaceutical powder mixing process: A current update. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2009, **2**(2):245-249.

34. Bhoite, K., Kakandikar, G.M. a Nandedkar, V.M. Schatz mechanism with 3D-motion mixer - A Review. *Materials Today*. 2015, **2**(4-5):1700-1706. doi: 10.1016/j.matpr.2015.07.003.
35. Scheibelhofer, O., Balak, N., Wahl, P.R., Koller, D.M., Glasser, B.J. a Khinast, J. Monitoring blending of pharmaceutical powders with multipoint INR spectroscopy. *AAPS PharmSciTech*. 2013, **14**(1): 234-244. doi: 10.1208/s12249-012-9910-4.
36. Muzzio, F.J. a Alexander, A.W. Scale Up of Powder-Blending Operations. *Pharmaceutical Technology Scaling Up Manufacturing* [Online]. 2005, s. 34-44 [cit. 2017-08-03]. Dostupné z: http://alfresco.ubm-us.net/alfresco_images/pharma/2014/08/22/c3495c71-6c68-44d2-926b-1be1fe5b3bbf/article-150852.pdf.
37. Boehm, G., Clark, J., Dietrick, J., Foust, L., Garcia, T., Gavini, M., Geoffroy, J.M., Jimenez, P., Mergen, G., Muzzio, F., Planchard, J., Prescott, J., Timmermans, J., Takiar, N. a Whiteman, D. Results of statistical analysis of blend and dosage unit content uniformity data obtained from the Product Quality Research Institute Blend Uniformity Working Group data-mining effort. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2004, **58**(2):62-74.
38. Berman, J., Elinski, D.E., Gonzales, C.R., Jimenez, P.J., Planchard, J.A., Tlachac, R.J. a Vogel, P.F. Blend uniformity analysis: validation and in-process testing. Technical Report No. 25. PDA. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 1997, **51**(3:i-iii):S1-99.
39. Franc, A., Rabišková, M. a Goněc, R. Impregnation: a progressive method in the production of solid dosage forms with low content of poorly soluble drugs. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. 2011, **16**(3):85-93.
40. Am Ende, M.T., Moses, S.K., Carella, A.J., Gadkari, R.A., Graul, T.W., Otano, A.L. a Timpano, R.J. Improving the content uniformity of a low-dose tablet formulation through roller compaction optimization. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2007, **12**(4):391-404. doi: 10.1080/10837450701369253.
41. Parikh, D.M. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. New York: CRC Press, 2010, s. 676. ISBN: 9781439807897.
42. Rahman, Z., Korang-Yeboah, M., Siddiqui, A., Mohammad, A. a Khan, M.A. Understanding effect of formulation and manufacturing variables on the critical quality attributes of warfarin sodium product. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, **495**(1):19-30. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.065.

43. Amann, A.H. Effect of formulation on dissolution of sodium warfarin tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1973, **62**(9): 1573-1574. doi: 10.1002/jps.2600620950.
44. Mackin, L., Sartnurak, S., Thomas, I. a Moore, S. The impact of low levels of amorphous material (<5%) on the blending characteristics of a direct compression formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **231**(2):213-226. doi: 10.1016/S0378-5173(01)00880-8.
45. Gao, D. a Maurin, M.B. Physical chemical stability of warfarin sodium. *AAPS PharmSciTech*. 2001, **3**(1):18-25. doi: 10.1208/ps030103.
46. Wu, C.Y., Hancock, B.C., Mills, A., Bentham, A.C., Best, S.M. a Elliott, J.A. Numerical and experimental investigation of capping mechanisms during pharmaceutical tablet compaction. *Powder Technology*. 2008, **181**(2):121-129. doi: 10.1016/j.powtec.2006.12.017.
47. 4202: Compaction and compression [Online]. 2016. [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://pharmacydocs.blogspot.cz/2016/10/4202-compaction-and-compression.html>.
48. Dévay, A. The Theory and practice of pharmaceutical technology [Online]. 2013. [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016_01_the_theory_and_practise_of_pharmaceutical_technology/ch24.html.
49. Banker, G.S. a Rhodes, C.T.. *Modern Pharmaceutics*. New York: CRC Press, 2002, s. 860. ISBN:978-0-8247-4469-4.
50. Wray, P.E. The physics of tablet compaction revisited. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1992, **18**:627-658. doi: 10.3109/03639049209058556.
51. Hiestand, E.N., Wells, J.E., Peot, C.B. a Ochs, J.F. Physical processes of tableting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1977, **66**(4):510-519.
52. Van der Voort Maarschalk, K.V., Zuurman, K., Vromans, H., Bolhuis, G.K. a Lerk, C.F. Stress relaxation of compacts produced from viscoelastic materials. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, **151**(1):27-34. doi: 10.1016/S0378-5173(97)04889-8.
53. Hwang, R.C., Peck, G.R., Besserman, D.M., Friedrich, C.E. a Gemoules, M.K. Tablet relaxation and physicommechanical stability of lactose, microcrystalline cellulose, and dibasic calcium phosphate. *Pharmaceutical Technology*. 2001, **25**(11):54-81.
54. Picker, K.M. Time dependence of elastic recovery for characterization of tableting materials. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2001, **6**(1):61-70. doi: 10.1081/PDT-10000014.

55. Haware, R.V., Tho, I. a Bauer-Brandl, A. Evaluation of a rapid approximation method for the elastic recovery of tablets. *Powder Technology*. 2010, **202**(1-3):71-77. doi: 10.1016/j.powtec.2010.04.012.
56. *Tabletting: the issues facing today's manufacturers*. [Online]. 2010. [cit. 2017-08-03]. Dostupné z: <http://www.pharmtech.com/tabletting-issues-facing-todays-manufacturers>.
57. *Český lékopis 2009*. 1. vydanie. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 3968. ISBN 978-80-247-2994-7.
58. *<905>Uniformity of dosage units* [Online]. 2003 [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c905.html#usp29nf24s0_c905.
59. *Guidance for Industry ANDAs: Blend Uniformity Analysis* [Online]. 1999. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/992635gd.pdf>.
60. Yu, L.X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharmaceutical Research*. 2008, **25**(4):781-791. doi: 10.1007/s11095-007-9511-1.
61. Perez-Wilson, M. *Machine/Process Capability Study*. Scottsdale: Advanced Systems Consultants, 2014, s. 358. ISBN 1-883237-10-6.
62. Pearn, W.L. a Shu, M.H. Manufacturing capability control for multiple power-distribution switch processes based on modified Cpk MPPAC. *Microelectronics Reliability*. 2003, **43**(6):963-975. doi: 10.1016/S0026-2714(03)00096-9.
63. Bergum, J.S. a Li, H. Acceptance limits for the new ICH USP 29 content-uniformity test. *Pharmaceutical Technology*. 2007, **31**(10):90-100.
64. Benet, L.Z. a Goyan, J.E. Bioequivalence and narrow therapeutic index drugs. *Pharmacotherapy*. 1995, **15**(4):433-440.
65. Tadros, R. a Shakib, S. Warfarin: Indications, risks and drug interactions. *Australian Family Physician*. 2010, **39**(7):476-479.
66. *Warfarin*. PubChem Open Chemistry Database [Online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/warfarin#section=Top>.
67. Vercaigne, L.M. a Zhanel, G.G. Clinical significance of bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: Focus on warfarins. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 1998, **1**(3):92-94.
68. Wittkowsky, A.K. Generic warfarin: implications for patient care. *Pharmacotherapy*. 1997, **17**(4): 640-643. doi: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03741.x.

69. Jaffer, A. a Bragg, L. Practical tips for warfarin dosing and monitoring. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2003, **70**(4):361-371.
70. Richton-Hewett, S., Foster, E. a Apstein, C.S. Medical and economic consequences of a blinded oral anticoagulant brand change at a municipal hospital. *Archives of Internal Medicine*. 1988, **148**(4):806-808. doi: 10.1001/archinte.1988.00380040046010.
71. Haines, S.T. Substituting warfarin products: what's the source of the problem? *The Annals of Pharmacotherapy*. 2011, **45**(6):807-809. doi: 10.1345/aph.1Q063.
72. Blix, H.S., Viktil, K.K., Moger, T.A. a Reikvam, A. Drugs with narrow therapeutic index as indicators in the risk management of hospitalised patients. *Pharmacy Practice* (Granada). 2010, **8**(1):50-55. doi: 10.4321/S1886-36552010000100006.
73. *Criteria and evidence to assess actual or potential bioequivalence problems*. [Online]. 2016. [cit. 2017-01-31]. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=320.33>.
74. Liang, B.A., Mackey, T.K. a Lovett, K.M. Illegal "No prescription" internet access to narrow therapeutic index drugs. *Clinical Therapeutics*. 2013, **35**(5):694-700. doi: 10.1016/j.clinthera.2013.03.019.
75. Kaminski, L.S. a Zhang, Z.Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997, **73**(1):67-74. doi: 10.1016/S0163-7258(96)00140-4.
76. Mullokandov, E., Ahn, J., Szalkiewicz, A. a Babayeva, M. Protein binding drug-drug interaction between warfarin and tizoxanide in human plasma. *Austin Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2014, **2**(7):1-3.
77. Mittmann, N., Oh, P.I., Walker, S.E. a Bartle, W.R. Warfarin in the secondary prevention of thromboembolism in atrial fibrillation. Impact of bioavailability on costs and outcomes. *Pharmacoeconomics*. 2004, **22**(10):671-683.
78. Burns, M. Management of Narrow Therapeutic Index Drugs. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 1999, **7**(2):137-143.
79. *Warfarin Sodium Tablets*. USP29 [Online]. [cit. 2017-02-13]. Dostupné z: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m88790.html.
80. Sawoniak, A.E., Shalansky, K.F., Zed, P.J. a Sunderji, R. Formulary Considerations Related to Warfarin Interchangeability. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*. 2002, **55**(3):215-218. doi: 10.4214/cjhp.v55i3.578.

81. *Interchangeability of warfarin sodium preparations* [Online]. 2000 [cit. 2017-05-04]. Alberta Blue Cross, 2000. Dostupné z: <https://www.ab.bluecross.ca/dbl/pdfs/dblreportdec00update.pdf>.
82. Cundiff, D.K. Insufficient evidence supporting low-intensity warfarin for venous thromboembolism (VTE) prophylaxis. *Medscape General Medicine*. 2003, **5**(3):2.
83. *In Re: Warfarin sodium antitrust litigation*. [Online]. 2003 [cit. 2017-07-10]. Dostupné z: <http://www2.ca3.uscourts.gov/opinarch/023603p.pdf>.
84. Vraníková, B. a Gajdziok, J. Bioavailability and factors influencing its rate. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2015, **64**(1-2):7-13.
85. *Report C: Report on bioavailability of oral dosage formulations, not in modified release form, of drugs used for systemic effects, having complicated or variable pharmacokinetics* [Online]. 1992 [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://faculty.ksu.edu.sa/64448/Documents/Guideline%20BA%20-%20BE%20Part%20C.pdf>.
86. *Guideline on the investigation of bioequivalence*. [Online]. 2010 [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf.
87. Ruedy, J., Davies, R.O., Gagnon, M.A., McLean, W.M., Thompson, W.G., Vitti, T.G. a Wilson, T.W. Letter: Drug bioavailability. *Canadian Medical Association Journal*. 1976, **115**(2):105. doi: 10.1007/BF03287622.
88. Lawrence, X.Y. *Quality and bioequivalence standards for narrow therapeutic index drug*. [Online prezentácia]. 2011 [cit. 2017-07-10]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/abbreviatednewdrugapplicationandagenerics/ucm292676.pdf>.
89. Hellfritsch, M., Rathe, J., Bjerregaard Stage, T., Thirstrup, S., Grove, E.L., Damkier, P. a Pottegard, A. Generic switching of warfarin and risk of excessive anticoagulation: a Danish nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 2016, **25**(3):336-343. doi: 10.1002/pds.3942.
90. Elbl, J., Muselík, J., Franc, A., Mikušová, J., Dolejší, Z. a Vetchý, D. Influence of drug concentration and blending technology on the content uniformity of mixture for low dose warfarin tablets. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2016, **65**(6):211-215.
91. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, A. Franc, J. Muselík. Způsob přípravy pevné lékové formy se sodnou solí warfarínu ve formě klathrátu izopropanolu. Czech Republic. Patent CZ 304136, 2013.

92. Soppela, I., Airaksinen, S., Murtomaa, M., Tenho, M., Hatara, J., Rääkkönen, H., Yliruusi, J. a Sandler, N. Investigation of the powder flow behaviour of binary mixtures of microcrystalline celluloses and paracetamol. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. 2010, **1**(1):55-67.
93. Doelker, E. Comparative compaction properties of various microcrystalline cellulose types and generic products. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1993, **19**(17-18):2399-2471. doi: 10.3109/03639049309047196.
94. Doelker, E., Massuelle, D., Veuillez, F. a Humbert-Droz, P. Morphological, packing, flow and tableting properties of new Avicel types. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1995, **21**(6):643-661. doi: 10.3109/03639049509048132.
95. Lahdenpää, E., Niskanen, M. a Yliruusia, J. Crushing strength, disintegration time and weight variation of tablets compressed from three Avicel PH grades and their mixtures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1997, **43**(3):315-322. doi: 10.1016/S0939-6411(97)00053-2.
96. Ohta, K.M., Fuji, M. a Chikazawa, M. Effect of geometric structure of flow promoting agents on the flow properties of pharmaceutical powder mixture. *Pharmaceutical Research*. 2003, **20**(5):804-809. doi: 10.1023/A:1023497922211.
97. Meeus, L. Direct compression versus granulation. *Pharmaceutical Technology Europe* [Online]. 2011, 23(3) [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: <http://www.pharmtech.com/direct-compression-versus-granulation>.
98. Rowe, R.C., Sheskey, P.J. a Quinn, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: The Pharmaceutical Press, 2010, s. 900. ISBN: 978-1582121352.
99. Lowenthal, W. Disintegration of tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1972, **61**(11):1695-1711. doi: 10.1002/jps.2600611102.
100. Chowhan, Z.T. a Chi, L.H. Drug-excipient interactions resulting from powder mixing IV: role of lubricants and their effect on *in vitro* dissolution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1986, **75**(6):542-545. doi: 10.1002/jps.2600750604.
101. Al-Karawi, C., Lukášová, I., Sakmann, A. a Leopold, C.S. Novel aspects on the direct compaction of ibuprofen with special focus on sticking. *Powder Technology*. 2017, **317**:370-380. doi: 10.1016/j.powtec.2017.05.014.
102. Li, J. a Wu, Y. Lubricants in pharmaceutical solid dosage forms. *Lubricants*. 2014, **2**(1):21-43. doi:10.3390/lubricants2010021.

103. Hölzer, A.W. a Sjögren, J. Evaluation of sodium stearyl fumarate as a tablet lubricant. *International Journal of Pharmaceutics*. 1979, **2**(3-4):145-153. doi: 10.1016/0378-5173(79)90015-2.
104. Saniocki, I., Sakmann, A. a Leopold, C.S. Evaluation of the suitability of various lubricants for direct compaction of sorbitol tablet formulations. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. 2013, **4**(4):169-182.
105. Nokhodchi, A., Homayouni, A., Araya, R., Kaialy, W., Obeidat, W. a Asare-Addo, K. Crystal engineering of ibuprofen using starch derivatives in crystallization medium to produce promising ibuprofen with improved pharmaceutical performance. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2015, **5**:46119-46131. doi: 10.1039/c5ra06183k.
106. Rasenack, N. a Müller, B.W. Ibuprofen crystals with optimized properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **245**(1-2):9-24. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00294-6.
107. Rasenack, N. a Müller, B.W. Properties of ibuprofen crystallized under various conditions: A comparative study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002, **28**(9):1077-1089. doi: 10.1081/DDC-120014575.
108. Adolfsson, A.; Nyström, C. Tablet strength, porosity, elasticity and solid state structure of tablets compressed at high loads. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996, **132**(1-2):95-106. doi: 10.1016/0378-5173(95)04336-5.
109. David, S.T. a Augsburger, L.L. Plastic flow during compression of directly compressible fillers and its effect on tablet strength. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1977, **66**(2):155-159. doi: 10.1002/jps.2600660205.
110. Ruegger, C.E. a Celik, M. The effect of compression and decompression speed on the mechanical strength of compacts. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2000, **5**(4):485-494. doi: 10.1081/PDT-100102032.
111. Van der Voort Maarschalk, K.V., Vromans, H., Bolhuis, G.K. a Lerk, C.F. The effect of viscoelasticity and tableting speed on consolidation and relaxation of a viscoelastic material. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1996, **42**(1):49-55.
112. Malamataris, S. a Rees, J.E. Viscoelastic properties of some pharmaceutical powders compared using creep compliance, extended Heckel analysis and tablet strength measurements. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993, **92**(1-2):123-135. doi: 10.1016/0378-5173(93)90271-G.
113. Rees, J.E. a Rue, P.J. Time-dependent deformation of some direct compression excipients. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1978, **30**(1):601-607. doi: 10.1111/j.2042-7158.1978.tb13340.x.

114. Rana, A.S. a Kumar, S.L.H. Manufacturing defects of tablets - a review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2013, **3**(6):200-206.
115. Garr, J.S.M. a Rubinstein, M.H. An investigation into capping of paracetamol at increasing speeds of compression. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991, **72**(2):117-122. doi: 10.1016/0378-5173(91)90049-T.
116. Kuppaswamy, R., Anderson, S.R. Augsburger, L.L. a Hoag, S.W. Estimation of capping incidence by indentation fracture tests. *AAPS PharmSci*. 2001, **3**(1):54-65. doi: 10.1208/ps030105.
117. Ebba, F., Piccerelle, P., Prinderre, P., Opota, D. a Joachim, J. Stress relaxation studies of granules as a function of different lubricants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001, **52**(2):211-220. doi: 10.1016/S0939-6411(01)00171-0.
118. Tanino, T., Aoki, Y., Furuya, Y., Sato, K., Takeda, T. a Mizuta, T. Occurrence of capping due to insufficient air escape during tablet compression and a method to prevent it. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1995, **43**(10):1772-1779. doi: 10.1248/cpb.43.1772.
119. Takasaki, H., Yonemochi, E., Ito, M., Wada, K. a Terada, K. The importance of binder moisture content in Metformin HCL high-dose formulations prepared by moist aqueous granulation (MAG). *Results in Pharma Sciences*. 2015, **5**:1-7. doi: 10.1016/j.rinphs.2015.09.001.
120. Saniocki, I., Sakmann, A. a Leopold, C.S. How suitable is the measurement of take-off forces for detection of sticking during direct compression of various ibuprofen tablet formulations? *Pharmaceutical Development and Technology*. 2013, **18**(1):257-265. doi: 10.3109/10837450.2012.712538.
121. Waimer, F., Krumme, M., Danz, P., Tenter, U. a Schmidt, P.C. A novel method for the detection of sticking of tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 1999, **4**(3):359-367. doi: 10.1081/PDT-100101371.
122. Roberts, M., Ford, J.L., MacLeod, G.S., Fell, J.T., Smith, G.W. a Rowe, P.H. Effects of surface roughness and chrome plating of punch tips on the sticking tendencies of model ibuprofen formulations. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2003, **55**(9):1223-1228. doi: 10.1211/0022357021684.
123. Wang, J.J., Li, T., Bateman, S.D., Erck, R. a Morris, K.R. Modeling of adhesion in tablet compression-I. Atomic force microscopy and molecular simulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003, **92**(4):798-814. doi: 10.1002/jps.10339.
124. Miller, T.A. a York, P. Pharmaceutical tablet lubrication. *International Journal of Pharmaceutics*. 1988, **41**(1-2):1-19. doi: 10.1016/0378-5173(88)90130-5.

125. Lee, J. Intrinsic adhesion force of lubricants to steel surface. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004, **93**(9):2310-2318. doi: 10.1002/jps.20124.
126. Kikuta, J.I. a Kitamori, N. Effect of mixing time on the lubricating properties of magnesium stearate and the final characteristics of the compressed tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **20**(3):343-355. doi: 10.3109/03639049409050187.
127. Roberts, M., Ford, J.L., MacLeod, G.S., Fell, J.T., Smith, G.W., Rowe, P.H. a Dyas, A.M. Effect of lubricant type and concentration on the punch tip adherence of model ibuprofen formulations. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004, **56**(3):299-305. doi: 10.1211/0022357022827.
128. Gordon, R.E., VanKoeveering, C.L. a Reits, D.J. Utilization of differential scanning calorimetry in the compatibility screening of ibuprofen with the stearate lubricants and construction of phase diagrams. *International Journal of Pharmaceutics*. 1984, **21**(1):99-105. doi: 10.1016/0378-5173(84)90206-0.
129. Gold, G. a Palermo, B.T. Hopper flow electrostatics of tableting material I: Instrumentation and acetaminophen formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1965, **54**(2):310-312. doi: 10.1002/jps. 2600540233.
130. Gold, G. a Palermo, B.T. Hopper flow electrostatics of tableting material II. Tablet lubricants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1965, **54**(10):1517-1519. doi: 10.1002/jps. 2600541026.
131. Weber, D., Pu, Y. a Cooney, C.L. Quantification of lubricant activity of magnesium stearate by atomic force microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **34**(10):1097-1099. doi: 10.1080/03639 040801965061.
132. Mužíková, J. a Muchová, S. A study of a co-processed dry binder composed of microcrystalline cellulose and glycerol monostearate. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2012, **61**(5):229-233.
133. Gerhardt, A.H. Compression tooling surface treatments-options for resolving corrosion, wear, filming and tablets defects. *Journal of GXP Compliance*. 2009, **13**:68-74.
134. Dekempeneer, E., Van Acker, K., Vercammen, K., Meneve, J., Neerinc, D., Eufinger, S., Pappaert, W., Sercu, M. a Smeets, J. Abrasion resistant low friction diamond-like multilayers. *Surface and Coatings Technology*. 2001, **142-144**:669-673. doi: 10.1016/S0257-8972(01)01141-0.
135. Sun, C.C., Lee, S.C., Hwang, W.C., Hwang, J.S., Tang, I.T. a Fu, Y.S. Surface free energy of alloy nitride coatings deposited using closed field unbalanced magnetron sputter ion plating. *Materials Transactions*. 2006, **47**(10):2533-2539. doi: 10.2320/matertrans.47.2533.

136. Bunker, M., Zhang, J., Blanchard, R. a Roberts, C.J. Characterising the surface adhesive behavior of tablet tooling components by atomic force microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011, **37**(8):875-885. doi: 10.3109/03639045.2010.546402.
137. Schumann, S. a Searle, G.D. The effects of chromium nitride ION bombardment treatment of tablet tooling on tablet adherence. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1992, **18**(10):1037-1061. doi: 10.3109/03639049209069314.
138. Hoornaert, T., Hua, Z.K. a Zhang, J.H. Hard wear-resistant coatings: A review. In: Luo, J. (Ed.) *Advanced Tribology*. Springer: Berlin, London, 2009, s. 774-779. ISBN: 978-3-642-03653-8.
139. König, W., Fritsch, R. a Kammermeier, D. Physically vapor deposited coatings on tools: Performance and wear phenomena. *Surface and Coatings Technology*. 1991, **49**(1-3):316-324. doi: 10.1016/0257-8972(91)90076-9.
140. Navinšek, B., Panjan, P. a Milošev, I. PVD coatings as an environmentally clean alternative to electroplating and electroless processes. *Surface and Coatings Technology*. 1999, **116-119**:476-487. doi: 10.1016/S0257-8972(99)00145-0.
141. Costa, M.Y.P., Cioffi, M.O.H., Voorwald, H.J.C. a Guimarães, V.A. An investigation on sliding wear behavior of PVD coatings. *Tribology International*. 2010, **43**(11):2196-2202. doi: 10.1016/j.triboint.2010.07.002.
142. Navinšek, B., Panjan, P. a Milošev, I. Industrial applications of CrN (PVD) coatings, deposited at high and low temperatures. *Surface and Coatings Technology*. 1997, **97**(1-3):182-191. doi: 10.1016/S0257-8972(97)00393-9.
143. Brandl, W. a Gending, C. Corrosion behaviour of hybrid coatings. *Thin Solid Films*. 1996, **290-291**:343-347. doi: 10.1016/S0040-6090(96)09183-3.
144. Kappl, M. a Butt, H.J. The colloidal probe technique and its application to adhesion force measurements. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2002, **19**(3):129-143. doi:10.1002/1521-4117(200207)19:3<129::AID-PPSC129>3.0.CO;2-G.
145. Leite, F.L., Riul, A. a Herrmann, P.S.P. Mapping of adhesion forces on soil minerals in air and water by atomic force spectroscopy (AFS). *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2003, **17**:2141-2156. doi: 10.1163/156856103772150751.
146. Sirghi, L., Nakagiri, N., Sugisaki, K., Sugimura, H. a Takai, O. Effect of sample topography on adhesive force in atomic force spectroscopy measurements in air. *Langmuir*. 2000, **16**(20):7796-7800. doi: 10.1021/la000392n.

147. Leite, F.L., Paterno, L.G., Borato, C.E., Herrmann, P.S.P., Oliveira, O.N. a Mattoso, L.H.C. Study on the adsorption of poly (o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. *Polymer*. 2005, **46**(26):12503-12510. doi: 10.1016/j.polymer.2005.07.108.
148. Mosiewicki, M.A., Schroeder, W.F., Leite, F.L., Herrmann, P.S.P., Curvelo, A.A.S., Aranguren, M.I. a Borrajo, J. AFM fracture surface study of vinyl ester and unsaturated polyester based thermosets. *Journal of Materials Science*. 2006, **41**(18):6154-6158. doi: 10.1007/s10853-006-0163-z.
149. Paul, S., Taylor, L.J., Murphy, B., Krzyzaniak, J.F., Dawson, N., Mullarney, M.P., Meenan, P. a Sun, C.C. Powder properties and compaction parameters that influence punch sticking propensity of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, **521**(1-2):374-383. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.053.
150. Oliary, J., Tod, M., Nicolas, P., Petitjean, O. a Caillé, G. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers after single and repeated doses in man. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 1992, **13**(5):337-344. doi: 10.1002/bdd.2510130505.
151. Geisslinger, G., Schuster, O., Stock, K.P., Loew, D., Bach, G.L. a Brune, K. Pharmacokinetics of S(+)- and R(-)-ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1990, **38**(5):493-497. doi: 10.1007/BF02336690.
152. Potthast, H., Dressman, J.B., Junginger, H.E., Midha, K.K., Oeser, H., Shah, V.P., Vogelpoel, H. a Barends, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ibuprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **94**(10):2121-2131. doi 10.1002/jps.20444.
153. Ulbrich, H. a Dannhardt, G. A heterogeneous drug class. NSAID: classification and spectrum of action. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2002, **31**(2):146-154. doi: 10.1002/1615-1003(200203)31:2<146::AID-PAUZ146>3.0.CO;2-O.
154. Davies, N.M. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clinical Pharmacokinetics*. 1998, **34**(2):101-154. doi: 10.2165/00003088-199834020-00002.
155. Paliwal, J.K., Smith, D.E., Cox, S.R., Berardi, R.R., Dunn-Kucharski, V.A. a Elta, G.H. Stereoselective, competitive, and nonlinear plasma protein binding of ibuprofen enantiomers as determined *in vivo* in healthy subjects. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1993, **21**(2):145-161. doi: 10.1007/BF 01059767.

156. Smith, D.E., Paliwal, J.K., Cox, S.R., Berardi, R.R., Dunn-Kucharski, V.A. a Elta, G.H. The effect of competitive and non-linear plasma protein binding on the stereoselective disposition and metabolic inversion of ibuprofen in healthy subjects. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 1994, **15**(7):545-561.
157. Higgins, J.D., Gilmour, T.P., Martellucci, S.A. a Bruce, R.D. In: Brittain H.G. (Ed.). *Analytical profiles of drug substances and excipients*. Academic Press: San Diego, London, 2001, s. 265-330. ISBN: 978-0-12-260829-2.
158. Aoki, S. a Danjo, K. Effect of tableting conditions on the sticking of tablet using ibuprofen. *Journal of the Pharmaceutical Society in Japan*. 1998, **118**(11):511-518.
159. Bechard, S.R. a Down, G.R.B. Infrared imaging of pharmaceutical materials undergoing compaction. *Pharmaceutical Research*. 1992, **9**(4):521-528. doi: 10.1023/A:1015896414765.
160. Cespi, M., Bonacucina, G., Casettari, L., Ronchi, S. a Palmieri, G.F. Effect of temperature increase during the tableting of pharmaceutical materials. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **448**(1):320-326. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.014.
161. Pilpel, N., Britten, J.R., Onyekweli, A.O. a Esezobo, S. Compression and tableting of pharmaceutical powders at elevated temperatures. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991, **70**(3):241-249. doi: 10.1016/0378-5173(91)90288-Y.
162. Jbilou, M., Ettabia, A., Guyot-Hermann, A.M. a Guyot, J.C. Ibuprofen agglomerates preparation by phase separation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1999, **25**(3):297-305. doi: 10.1081/DDC-100102174.
163. Saniocci, I., Sakmann, A. a Leopold, C.S. Direct compression of ibuprofen-containing powder blends influence of the ibuprofen grade on the flow and compaction properties of an ibuprofen tablet formulation. *Pharmazeutische Industrie*. 2012, **74**:1842-1852.
164. Rasenack, N. a Müller, B.W. Crystal habit and tableting behavior. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **244**(1-2):45-57. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00296-X.
165. Seton, L., Roberts, M. a Ur-Rehman, F. Compaction of recrystallised ibuprofen. *Chemical Engineering Journal*. 2010, **164**(1-2):449-452. doi: 10.1016/j.cej.2009.10.037.
166. Danjo, K., Kamiya, K. a Otsuka, A. Effect of temperature on the sticking of low melting point materials. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1993, **41**(8):1423-1427. doi: 10.1248/cpb.41.1423.

167. Pitt, K.G., Newton, J.M. a Stanley, P. Tensile fracture of doubly-convex cylindrical discs under diametral loading. *Journal of Materials Science*. 1988, **23**(8):2723-2728. doi: 10.1007/BF00547442.
168. Desai, P.M., Liew, C.V. a Heng, P.W.S. Review of disintegrants and the disintegration phenomena. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **105**(9):2545-2555. doi: 10.1016/j.xphs.2015.12.019.
169. Rainsford, K.D. *Ibuprofen: A critical bibliographic review*. London, Philadelphia: CRC Press, 1999, s. 595. ISBN: 978-0748406944.
170. Tong, C., Lozano, R., Mao, Y., Mirza, T., Löbenberg, R., Nickerson, B., Gray, V. a Wang, Q. The value of *in vitro* dissolution in drug development. A position paper from the AAPS *In vitro* release and dissolution focus group. *Pharmaceutical Technology*. 2009, **33**(4):52-64.
171. *Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. Analysis* [Online]. 1997. [cit. 2017-08-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070640.pdf>.
172. Moore, W.J. a Flanner, H.H. Mathematical comparison of curves with an emphasis on *in vitro* dissolution profiles. *Pharmaceutical Technology*. 1996, **20**(6):64-74.
173. *Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms* [Online]. 1997. [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>.
174. Parakh, D.R. a Patil, M.P. Comparison of *in vitro* dissolution profiles of marketed dicyclomine hydrochloride tablets. *An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2014, **5**(3):2109-2119.
175. Xie, F., Ji, S. a Cheng, Z. *In vitro* dissolution similarity factor (f_2) and *in vivo* bioequivalence criteria, how and when do they match? Using a BCS class II drug as a Simulation example. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, **66**:163-172. doi: 10.1016/j.ejps.2014.10.002.
176. Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y. a Iga, T. Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1985, **13**(5):477-492. doi: 10.1007/BF01059331.
177. Dhingra, G., Sreelesh, B., Nagpal, M., Rakha, P. a Nagori, B.P. *In vitro* dissolution testing of ibuprofen using compendial and biorelevant dissolution media. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2010, **3**(3):1-4.

178. Benet, L.Z. Warfarin class II-the role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **102**(1):34-42. doi: 10.1002/jps.23359.
179. Lachman, L. a Roemer, W.C. Pharmaceutical properties of drugs and dosage forms affecting physiological availability. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 1972, **12**(5):215-224. doi: 10.1016/S0003-0465(16)32208-X.
180. Nguyenpho, A., Ciavarella, A.B., Siddiqui, A., Rahman, Z., Akhtar, S., Hunt, R., Korang-Yeboah, M. a Khan, M.A. Evaluation of in-use stability of anticoagulant drug products: Warfarin sodium. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, **104**(12):4232-4240. doi: 10.1002/jps.24657.
181. Ali, S.L. a Krämer, J. Pharmaceutical quality of warfarin sodium tablets, A multinational postmarket comparative study. *Die Pharmaceutische Industrie*. 1999, **61**(4): 363-368.
182. O'Reilly, R.A., Nelson, E. a Levy, G. Physicochemical and physiologic factors affecting the absorption of warfarin in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996, **55**(4):435-437. doi: 10.1002/jps.2600550420.
183. Stella, V.J., Mooney, K.G. a Pipkin, J.D. Dissolution and ionization of warfarin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984, **73**(7):946-948. doi: 10.1002/jps.2600730721.
184. Qureshi, S.A. Choice of rotation speed (rpm) for bio-relevant drug dissolution testing using a crescent-shaped spindle. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004, **23**(3):271-275. doi: 10.1016/j.ejps.2004.08.001.
185. Wagner, J.G., Welling, P.G., Lee, K.P. a Walker, J.E. *In vivo* and *in vitro* availability of commercial warfarin tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1971, **60**(5):666-677. doi: 10.1002/jps.2600600503.
186. Franc, A., Muselík, J., Goněc, R. a Vetchý, D. Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts. *Acta Pharmaceutica*. 2016, **66**(1):139-145. doi: 10.1515/acph-2016-0010.
187. McCormick, T.J., Gibson, A.B. a Diana, F.J. Development and validation of a dissolution method for warfarin sodium and aspirin combination tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997, **15**(12):1881-1891. doi: 10.1016/S0731-7085(96)01891-2.
188. Zhang, X., Wen, H., Fan, J., Vince, B., Li, T., Gao, W., Kinjo, M., Brown, J., Sun, W., Jiang, W. a Lionberger, R. Integrating *in vitro*, modeling, and *in vivo* approaches to investigate warfarin bioequivalence. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2017, **6**(8):523-531. doi: 10.1002/psp4.12198.

189. Serajuddin, A.T., Sheen, P.C. a Augustine, M.A. Common ion effect on solubility and dissolution rate of the sodium salt of anorganic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1987, **39**(8):587-591. doi: 10.1111/j. 2042-7158.1987.tb03434.x.
190. Anderson, N.H., Bauer, M., Boussac, N., Khan-Malek, R., Munden, P. a Sardaro, M. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of *in vitro* dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998, **17**(4-5),811-822. doi: 10.1016/S0731-7085(98)00011-9.
191. *Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms* [Online]. 1995. [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070636.pdf>.
192. Ghosh, L.K., Ghosh, N.C., Chatterjee, M. a Gupta, B.K. Product development studies on the tablet formulation of ibuprofen to improve bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998, **24**(5):473-477. doi: 10.3109/03639049809085645.
193. Ibuprofen Tablets. USP29 [Online]. [cit. 2017-08-09]. Dostupné z: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m39890.html.
194. Stead, J.A., Freeman, M., John, E.G., Ward, G.T. a Whiting, B. Ibuprofen tablets: dissolution and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983, **14**(1):59-72. doi: 10.1016/0378-5173(83)90114-X.
195. Fini, A., Bergamante, V., Ceschel, G.C., Ronchi, C. a Fonseca de Morales, C.A. Fast dispersible/slow releasing ibuprofen tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, **69**(1):335-341. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.11.011.
196. Potthast, H., Winter, S. a Möller, H. Biopharmazeutische Bewertung von Ibuprofen Präparaten. *Pharmazeutische Zeitung*. 2002, **147**:2086-2090.
197. Romero, A.J., Grady, L.T. a Rhodes, C.T. Dissolution testing of ibuprofen tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1988, **14**(11):1549-1586. doi: 10.3109/03639048809151949.
198. Marques, M. Dissolution media simulating fasted and fed states. *Dissolution Technologies*. 2004, **186**:16. doi: 10.14227/DT110204P16.
199. Rivera-Leyva, J.C., García-Flores, M., Valladares-Méndez, A., Orozco-Castellanos, L.M. a Martínez-Alfaro, M. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **74**(4):312-318. doi: 10.4103/0250-474X.107062.

200. Alvarez, C., Núñez, I., Torrado, J.J., Gordon, J., Potthast, H. a García-Arieta, A. Investigation on the possibility of biowaivers for ibuprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, **100**(6):2343-2349. doi: 10.1002/jps.22472.
201. *Gellan gum based ph induced in situ gels containing ciclopirox olamine for oral thrush against candida strains*. Kumar, K.J.R., Jayachandran, E., Umadevi, S.K., Mallikarjuna, Ch., Basha, S.G. a Jameel, B.R. [Poster prezentácia]. One day National Seminar On Recent Advances in Pharmaceutical Research. doi: 10.13140/2.1.1035.7768.
202. Paderni, C. Compilato, D., Giannola, L.I. a Campisi, G. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2012, **114**(3):e25-e34. doi:10.1016/j.oooo.2012.02.016.
203. Joshi, M. a Patravale, V. Formulation and evaluation of nanostructured lipod carrier (NLC)-based gel of valecoxib. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2006, **32**(8):911-918. doi: 10.1080/03639040600 814676.
204. Sveinsson, S.J. a Holbrook, P.W. Oral mucosal adhesive ointment containing liposomal corticosteroid. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993, **95**(1-3):105-109. doi: 10.1016/0378-5173(93)90396-W.
205. Nafee, N., Ismail, F., Boraie, N. a Mortada, L. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: *in vitro/in vivo* performance and effect of ageing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, **264**(1-2):1-14. doi: 10.1016/S0378-5173(03)00371-5.
206. Donnelly, R.F, McCarron, P.A., Tunney, M.M. a Woolfson, D. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2007, **86**(1):59-69. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.07.011.
207. Khanna, R., Agarwal, S.P. a Ahuja, A. Preparation and evaluation of mucoadhesive buccal films of clotrimazole for oral candida infections. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997, **59**(6):299-305.
208. Repka, M., Prodduturi, S. a Stodghill, S. Production and characterization of hot melt extruded films containing clotrimazole. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003, **29**(7):7757-765. doi: 10.1081/DDC-120021775.
209. Şenel, S., İkinici, G., Kaş, S., Yousefi-Rad, A., Sargon, M.F. a Hincal, A.A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000, **193**(2):197-203. doi: 10.1016/S0378-5173(99)00334-8.

210. Singh, S., Jain, S., Muthu, M.S., Tiwari, S. a Tilak, R. Preparation and evaluation of buccal bioadhesive films containing clotrimazole. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2008, **9**(2):660-667. doi: 10.1208/s12249-008-9083-3.
211. Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J. a Edwards, J.E. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*. 2004, **38**(2):161-189. doi: 10.1086/380796.
212. Khanna, R., Agarwal, S.P. a Ahuja, A. Mucoadhesive buccal drug delivery: a potential alternative to conventional therapy. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998, **60**(1):1-11.
213. Vetchý, D., Landová, H., Gajdziok, J., Doležel, P., Daněk, Z. a Štembírek, J. Determination of dependencies among *in vitro* and *in vivo* properties of prepared mucoadhesive buccal films using multivariate data analysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014, **86**(3):498-506. doi: 10.1016/j.ejpb. 2013.12.002.
214. Averineni, R.K., Sunderajan, S.G., Mutalik, S., Nayak, U., Shavi, G., Armugam, K., Meka, S.R., Pandey, S. a Nayanabhirama, U. Development of mucoadhesive buccal films for the treatment of oral sub-mucous fibrosis: a preliminary study. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2009, **14**(2):199-207. doi: 10.1080/10837450802498928.
215. Gandhi, R.B. a Robinson, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1994, **13**(1-2):43-74. doi: 10.1016/0169-409X(94)90026-4.
216. Alur, H.H., Johnston, T.P. a Mitra, A.K. Peptides and proteins: buccal absorption. *In: Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 2001, **20**(3):193-218. ISBN: 0849393949.
217. Collins, L.M.C. a Dawes, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *Journal of Dental Research*. 1987, **66**:1300-1302.
218. Lee, J.W., Park, J.H. a Robinson, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000, **89**(7):850-866. doi: 10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G.
219. Thakkar, P.P., Soni, A.M., Chaudhari, M.J., Bandy, D.P. a Modi, D.A. Mucoadhesive buccal drug delivery system. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*. 2012, **1**(2):360-369.
220. Şenel, S. a Hlincal, A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *Journal of Controlled Release*. 2001, **72**(1-3):133-144. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00269-3.

221. Barnhart, S. Thin film oral dosage forms. In: *Modified-release Drug Delivery Technology*. 2008, s. 209-216. ISBN: 978-1-4200-4435-5.
222. Dixit, R. a Puthli, S. Oral strip technology: overview and future potential. *Journal of Controlled Release*. 2009, **139**(2):94-107. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.06.014.
223. Hoffmann, E.M., Breitenbach, A. a Breitskreutz, J. Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011, **8**(3):299-316. doi: 10.1517/17425247.2011.553217.
224. Morales, J.O. a McConville, J.T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, **77**(2):187-199. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.023.
225. Mollan, M. Historical overview. In: *Pharmaceutical Extrusion Technology*. 2003, s. 69-98. ISBN: 9780824755201.
226. Repka, M.A., Battu, S.K., Upadhye, S.B., Thumma, S., Crowley, M.M., Zhang, F., Martin, C. a McGinity, J.W. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: Part II. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2007, **33**(10):1043-1057. doi: 10.1080/03639040701525627.
227. Cilurzo, F., Cupone, I.E., Minghetti, P., Selmin, F. a Montanari, L. Fast dissolving films made of maltodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, **70**(3):895-900. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.032.
228. Genina, N., Janßen, E.M., Breitenbach, A., Breitskreutz, J. a Sandler, N. Evaluation of different substrates for inkjet printing of rasagiline mesylate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, **85**(3):1075-1083. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.03.017.
229. Borges, A.F., Silva, C., Coelho, J.F. a Simões S. Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*. 2015, **206**:1-19. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.006.
230. Arya, A., Chandra, A., Sharma, V. a Pathak, K. Fast dissolving oral films: An innovative drug delivery system and dosage form. *International Journal of ChemTech Research*. 2010, **2**(1):576-583.
231. Janßen, E.M., Schliephacke, R., Breitenbach, A. a Breitskreutz, J. Drug-printing by flexographic printing technology - a new manufacturing process for orodispersible films. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **441**(1-2):818-825. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.12.023.

232. Nair, A.B., Kumria, R., Harsha, S., Attimarad, M., Al-Dhubiab, B.E. a Alhaider, I.A. *In vitro* techniques to evaluate buccal films. *Journal of Controlled Release*. 2013, **166**(1):10-21. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.019.
233. Sudhakar, Y., Kuotsu, K. a Bandyopadhyay, A.K. Buccal bioadhesive drug delivery - a promising option for orally less efficient drugs. *Journal of Controlled Release*. 2006, **114**(1):15-40. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.012.
234. Parmar, H.G., Jain, J.J., Patel, T.K. a Patel, V.M. Buccal patch: A technical note. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010, **4**:178-182.
235. Satheesh, M.N.V., Semwal, R., Semwal, D.K. a Semwal, R.B. Recent trends in oral transmucosal drug delivery systems: an emphasis on the soft palatal route. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012, **9**(6):629-647. doi: 10.1517/17425247.2012.679260.
236. Reddy, P.C., Chaitanya, K.S.C. a Rao, Y.M. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, **19**(6):385-403.
237. Kumar, V., Aggarwal, G., Zakir, F. a Choudhary, A. Buccal bioadhesive drug delivery - A novel technique. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2011, **1**(3):129-144-102.
238. Sievens-Figueroa, L., Bhakay, A. a Jerez-Rozo, J.I., Pandya, N., Romañach, R.J., Michniak-Kohn, B., Igbal, Z., Bilgili, E. a Davé, R.N. Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS Class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **423**(2):496-508. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.001.
239. Patel, V., Prajapati, B. a Patel, M. Effect of hydrophilic polymers on buccoadhesive Eudragit patches of propranolol hydrochloride using factorial design. *AAPS PharmSciTech*. 2007, **8**(2):E119-E126. doi: 10.1208/pt0802045.
240. Vasantha, P.V., Puratchikody, A., Mathew, S.T. a Balaraman, A.K. Development and characterization of Eudragit based mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulfate. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2011, **19**(4):207-214. doi: 10.1016/j.jsps.2011.07.003.
241. Murray, O.J., Dang, W. a Bergstrom, D. Using an electronic tongue to optimize taste-masking in a lyophilized orally disintegrating tablet formulation. *Pharmaceutical Technology*. 2004, **28**:42-52.
242. Smart, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**(11):1556-1568. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.001.

243. Salamat-Miller, N., Chittchang, M. a Johnston, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**(11):1666-1691. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.003.
244. Dodou, D., Breedveld, P. a Wieringa, P.A. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, **60**(1):1-16. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.01.007.
245. Thirawong, N., Nunthanid, J. Puttipipatkachorn, S. a Sriamornsak, P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an *in vitro* evaluation using texture analyzer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, **67**(1):132-140. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.01.010.
246. Deshmane, S.V., Channawar, M.A., Chandewar, A.V., Joshi, U.M. a Biyani, K.R. Chitosan based sustained release mucoadhesive buccal patches containing Verapamil HCl. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2009, **1**(1):216-229.
247. Shojaei, A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 1998, **1**(1):15-30.
248. Rathbone, M.J., Senel, M. a Pather, S. *Oral mucosal drug delivery and therapy*. New York: Springer, 2015. s. 279. ISBN: 978-1489975577.
249. Patel, V.F., Liu, F. a Brown, M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2011, **153**(2):106-16. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.01.027.
250. Baliga, S., Muglikar, S. a Kale, R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013, **17**(4), 461-465. doi: 10.4103/0972-124X.118317.
251. Marsh, P.D. a Martin, M. *Oral Microbiology*. London: Churchill Livingstone. s. 232. ISBN: 978-0443101 441.
252. Ništiar, F. *Ústna dutina ako charakteristický ekosystém*. [Online]. [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://pat.fyz.medic.upjs.sk/SSTUDMAT/ORALPAFYEKOSYST.pdf>.
253. Gandhi, R.B. a Robinson, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1994, **13**(1-2):43-74. doi: 10.1016/0169-409X(94)90026-4.
254. Veuillez, F., Kalia, Y.N., Jacques, Y., Deshusses, J. a Buri, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001, **51**(2):93-109. doi: 10.1016/S0939-6411(00)00144-2.
255. Jay, S., Fountain, W., Cui, Z. a Mumper, R.J. Transmucosal delivery of testosterone in rabbits using novel bi-layer mucoadhesive wax-film composite disks. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, **91**(9):2016-2025. doi: 10.1002/jps.10198.

256. Galey, W.R., Lonsdale, H.K. a Nacht, S. The *in vitro* permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1976, **67**(6):713-717.
257. Wertz, P.W. a Squier, C.A. Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1991, **8**(3):237-269.
258. Squier, C.A. a Lesch, C.A. Penetration pathways different compounds through epidermis and oral epithelia. *Journal of Oral Pathology*. 1988, **17**(9-10):512-516.
259. Dowty, M.E., Knuth, K.E., Irons, B.K. a Robinson, J.R. Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa *in vitro*. *Pharmaceutical Research*. 1992, **9**(9):1113-1122.
260. Squier, C.A. a Wertz, P.W. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery. *In: Oral Mucosal Drug Delivery*. 1996, s. 1-26.
261. Diaz-Del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H. a Falson, F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Archives of Oral Biology*. 2005, **50**(12):981-987. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.04.008.
262. Utoguchi, N., Watanabe, Y., Suzuki, T., Maehara, J., Matsumoto, Y. a Matsumoto, M. Carrier-mediated transport of monocarboxylic acids in primary cultured epithelial cells from rabbit oral mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1997, **14**(3):320-324.
263. Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J.D., Patterson, J.E., Rangel-Frausto, S., Wiblin, R.T., Blumberg, H.M., Pfaller, M., Rinaldi, M., Edwards, J.E., Wenzel, R.P. a Jarvis, W. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2001, **20**(12):1119-1124.
264. American Thoracic Society. Fungal infection in HIV-infected persons. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1995, **152**(2):816-822. doi: 10.1164/ajrccm.152.2.7633749.
265. Clarkson, J.E., Worthington, H.V. a Eden, O.B. Interventions for treating oral candidiasis for patients with cancer receiving treatment. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2004, (1):CD001972.
266. Powderly, W.G., Gallant, J.E., Ghannoum, M.A., Mayer, K.H., Navarro, E.E. a Perfect, J.R. Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggested guidelines for therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1999, **15**(18):1619-1623. doi: 10.1089/088922299309658.

267. Rex, J.H., Walsh, T.J., Sobel, J.D., Filler, S.G., Pappas, P.G., Dismukes, W.E. a Edwards, J.E. Practice guidelines for the treatment of candidosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2000, **30**(4):662-678. doi: 10.1086/313749.
268. Samaranayake, L.P. a Holmstrup, P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1989, **18**(10):554-564. doi: 10.1111/j.1600-0714.1989.tb01552.x.
269. Sweetman, S.C. *Martindale: The Complete Drug Reference*. London: Pharmaceutical Press. 2005, s. 2784. ISBN: 978-0853695509.
270. Koks, C., Meenhorst, P.L., Hillebrand, M.J., Bult, A. a Beijnen, J.H. Pharmacokinetics of fluconazole in saliva and plasma after administration of an oral suspension and capsules. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, **40**(8):1935-1937.
271. Yhia, S.A., El-Gazayerly, O.N. a Basalious, E.B. Fluconazole mucoadhesive buccal films: *In vitro/In vivo* Performance. *Current Drug Delivery*. 2009, **6**(1):17-27.
272. Martindale, W. a Westcoot, W. *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. London: Pharmaceutical Press. 2007, s. 488.1-488.2. ISBN: 978-0-85369-826-5.
273. Rasool, B.A. a Khan, S.A. *In vitro* evaluation of miconazole mucoadhesive buccal films. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2010, **2**(4):23-26.
274. Cardot, J.M., Chaumont, C., Dubray, C., Costantini, D. a Aiache, J.M. Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2004, **58**(4):345-351. doi: 10.1111/j.1365-2125.2004.02154.x.
275. Collins, A.E. a Deasy, P.B. Bioadhesive lozenge for the improved delivery of cetylpyridinium chloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1990, **79**(2):116-119. doi: 10.1002/jps.2600790208.
276. Bouckaert, S., Lefebvre, R.A. a Remon, J.P. *In vitro/in vivo* correlation of the bioadhesive properties of a buccal bioadhesive miconazole slow-release tablet. *Pharmaceutical Research*. 1993, **10**(6):853-856.
277. Owens, T.S., Dansereau, R.J. a Sakr, A. Development and evaluation of extended release bioadhesive sodium fluoride tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, **288**(1):109-122. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.017.

278. Van Roey, J., Haxaire, M., Kanya, M., Lwanga, I. a Katabira, E. Comparative efficacy of topical therapy with a slow release mucoadhesive buccal tablet containing miconazole nitrate versus systemic therapy with ketoconazole in HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2004, **35**(2):144-150.
279. *Breakyl 400mcg buccal film*. [Online]. [cit. 2017-07-06]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/28360>.
280. Katz, H.I. Possible drug interactions in oral treatment of onychomycosis. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 1997, **87**(12):571-574. doi: 10.7547/87507315-87-12-571.
281. Vandeputte, P., Ferrari, S. a Coste, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*. 2012, p. 1-26. doi: 10.1155/2012/713687.
282. Leroy, O., Gangneux, J.P., Montravers, P., Mira, J.P., Gouin, F., Sollet, J.P., Carlet, J., Reynes, J., Rosenheim, M., Regnier, B. a Lortholary, O. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Critical Care Medicine*. 2009, **37**(5):1612-1618. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819efac0.
283. Basalious, B., Soad, A. a Omaira, N. Fluconazole mucoadhesive buccal films: *In vitro*/*In vivo* performance. *Current Drug Delivery*. 2009, **6**:17-27.
284. Yehia, S., El-Gazayerly, O.N. a Basalious, E.B. Design and *in vitro*/*in vivo* evaluation of novel mucoadhesive buccal discs of an antifungal drug: relationship between swelling, erosion, and drug release. *AAPS PharmSciTech*. 2008, **9**(4):1207-1217. doi: 10.1208/s12249-008-9166-1.
285. Ahuja, A., Khar, R.K. a Ali, J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1997, **23**:489-515. doi: 10.3109/03639049709148498.
286. BahriNajafi, R., Eghbali, M., Peykanpour, M. a Mirzaei, H.R. Preparation and physicochemical evaluation of nystatine mucoadhesive buccal film. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. 2013, **2**(3):25-31.
287. Juliano, C., Cossu, M., Pigozzi, P., Rasso, G. a Giunchedi, P. Preparation, *in vitro* characterization and preliminary *in vivo* evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. *AAPS PharmSciTech*. 2008, **9**(4):1153-1158. doi: 10.1208/s12249-008-9153-6.

288. Kuna, M. a Rabišková, M. Mucoadhesive tablets for oral administration of ciclopiroxolamine. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2007, **56**(5):243-248.
289. Manescu, O., Lupuleasa, D., Miron, D.S., Budura, E.A. a Radulescu, F.S. *In vitro* drug release from topical antifungal pharmaceutical formulations. *Farmacia*. 2011, **59**(1):15-23.
290. Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M., Schaller, M., Korting, H.C. a Hube, B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, **47**(6):1805-1817. doi: 10.1128/AAC.47.6.1805-1817. 2003.
291. Bohn, M. a Kraemer, K.T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000, **43**(4 Suppl):S57-69.
292. Gupta, A.K. Ciclopirox: an overview. *International Journal of Dermatology*. 2001, **40**(5):305-310.
293. Gupta, A.K. a Plott, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. *International Journal of Dermatology*. 2004, **43**(1):3-8.
294. Minden, M.D., Hogge, D.E., Weir, S.J., Kasper, J., Webster, D.A., Patton, L., Jitkova, Y., Hurren, R., Gronda, M., Goard, C.A., Rajewski, L.G., Haslam, J.L., Heppert, K.E., Schorno, K., Chang, H., Brandwein, J.M., Gupta, V., Schuh, A.C., Trudel, S., Yee, K.W., Reed, G.A. a Schimmer, A.D. Oral ciclopirox olamine displays biological activity in a phase I study in patients with advanced hematologic malignancies. *American Journal of Hematology*. 2014, **89**(4):363-368. doi: 10.1002/ajh.23640.
295. Kim, Y., Schmidt, M., Endo, T., Lu, D., Carson, D. a Schmidt-Wolf, I.G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway with the antifungal agent ciclopirox olamine in a murine myeloma model. *In vivo*. 2011, **25**(6):887-893.
296. Ma, T.C., Langley, B., Ko, B., Wei, N., Gazaryan, I.G., Zareen, N., Yamashiro, D.J., Willis, D.E. a Ratan, R.R. A screen for inducers of p21(waf1/cip1) identifies HIF prolyl hydroxylase inhibitors as neuroprotective agents with antitumor properties. *Neurobiology of Disease*. 2013, **49**:13-21. doi: 10.1016/j.nbd.2012.08.016.
297. Song, S., Christova, T., Perusini, S., Alizadeh, S., Bao, R.Y., Miller, B.W., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Isaac, M., Joseph, B., Subramaniam, R., Aman, A., Chau, A., Hogge, D.E., Weir, S.J., Kasper, J., Schimmer, A.D., Al-awar, R., Wrana, J.L. a Attisano, L. Wnt inhibitor screen reveals iron dependence of beta-catenin signaling in cancers. *Cancer Research*. 2011, **71**(24):7628-7639. doi: 10.1158/0008-5472.

298. Hoffman, B.D., Hanauske-Abel, H.M., Flint, A. a Lalande, M. A new class of reversible cell cycle inhibitors. *Cytometry*. 1991, **12**(1):26-32. doi: 10.1002/cyto.990120105.
299. Clement, P.M., Hanauske-Abel, H.M., Wolff, E.C., Kleinman, H.K. a Park, M.H. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis *in vitro*. *International Journal of Cancer*. 2002, **100**(4):491-498. doi: 10.1002/ijc.10515.
300. Schmidt, M., Sievers, E., Endo, T., Lu, D., Carson, D. a Schmidt-Wolf, I.G. Targeting Wnt pathway in lymphoma and myeloma cells. *British Journal of Haematology*. 2008, **144**(5):796-798. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07503.x.
301. Zhou, H., Shen, T., Luo, Y., Liu, L., Chen, W., Xu, B., Han, X., Pang, J., Rivera, C.A. a Huang, S. The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. *International Journal of Cancer*. 2010, **127**(10):2467-2477. doi: 10.1002/ijc.25255.
302. Eberhard, Y., McDermott, S.P., Wang, X., Gronda, M., Venugopal, A., Wood, T.E., Hurren, R., Datti, A., Batey, R.A., Wrana, J., Antholine, W.E., Dick, J.E. a Schimmer, A.D. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood*. 2009, **114**(14):3064-3073. doi: 10.1182/blood-2009-03-209965.
303. Balabanov, S., Gontarewicz, A., Ziegler, P., Hartmann, U., Kammer, W., Copland, M., Brassat, U., Priemer, M., Hauber, I., Wilhelm, T., Schwarz, G., Kanz, L., Bokemeyer, C., Hauber, J., Holyoake, T.L., Nordheim, A. a Brümmendorf, T.H. Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): A novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood*. 2007, **109**(4):1701-1711. doi: 10.1182/blood-2005-03-037648.
304. Sen, S., Hassane, D.C., Corbett, C., Becker, M.W., Jordan, C.T. a Guzman, M.L. Novel mTOR inhibitory activity of ciclopirox enhances parthenolide antileukemia activity. *Experimental Hematology*. 2013, **41**(9):799-807. doi: 10.1016/j.exphem.2013.04.012.
305. Ko, S.H., Nauta, A., Morrison, S.D., Zhou, H., Zimmermann, A., Gurtner, G.C., Ding, S. a Longaker, M.T. Antimycotic ciclopirox olamine in the diabetic environment promotes angiogenesis and enhances wound healing. *PLoS One*. 2011, **6**(11): e27844. doi: 10.1371/journal.pone.0027844.
306. Linden, T., Katschinski, D.M., Eckhardt, K., Scheid, A., Pagel, H. a Wenger, R.H. The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1 α stability, VEGF expression and angiogenesis. *FASEB Journal*. 2003, **17**(6):761-763. doi: 10.1096/fj.02-0586fje.

307. Korting, H.C. a Grundmann-Kollmann, M. The hydroxypyridones: A class of antimycotics of its own. *Mycoses*. 1997, **40**(7-8):243-247. doi: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00227.x.
308. Gupta, A.K. a Lynch, L.E. Management of onychomycosis: Examining the role of monotherapy and dual, triple, or quadruple therapies. *Cutis*. 2004, **74**(1 Suppl):5-9.
309. Hänel, H., Raether, W. a Dittmar, W. Evaluation of fungicidal action *in vitro* and in a skin model considering the influence of penetration kinetics of various standard antimycotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988, **544**:329-337. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb40417.x.
310. *Physician's Desk Reference, prescribing information*. [Online databáza liečiv]. [cit. 2017-06-15]. Dostupné z: <http://www.pdr.net/>.
311. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online databáza liečiv]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: www.sukl.cz.
312. Subissi, A., Monti, D., Togni, G. a Mailland, F. Ciclopirox: Recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs*. 2010, **70**(16):2133-2152. doi: 10.2165/11538110-000000000-00000.
313. Kellner, H.M., Arnold, C., Christ, O.E., Eckert, H.G., Herok, J., Hornke, I. a Rupp, W. Studies on pharmacokinetics and biotransformation of the antimycotic drug ciclopiroxolamine in animals and man after topical and systemic administration. *Arzneimittelforschung*. 1981, **31**(8A):1337-1353.
314. FDA. [Online databáza]. [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/spl/data/dbd4f19e-c345-4862-9d92-831d052d02bf/dbd4f19e-c345-4862-9d92-831d052d02bf.xml>.
315. Sakurai, K., Sakaguchi, T., Yamaguchi, H. a Iwata, K. Mode of action of 6-cyclohexyl-4-methyl-2(1H)-pyridone ethanolamine salt (HOE 296). *Chemotherapy*. 1978, **24**(2):68-76.
316. Abrams, B.B., Hänel, H. a Hoehler, T. Ciclopirox Olamine: A hydroxypyridone antifungal agent. *Clinics in Dermatology*. 1991, **9**(4):471-477. doi: 10.1016/0738-081X(91)90075-V.
317. Iwata, K. a Yamaguchi, H. Studies on the mechanism of antifungal action of ciclopiroxolamine/inhibition of transmembrane transport of amino acid, K⁺ and phosphate in *Candida albicans* cells. *Arzneimittelforschung*. 1981, **31**(8A):1323-1327.
318. Polak, A. Mode of action studies. In: *Chemotherapy of fungal diseases*. Springer: Berlin, Heidelberg, 1990, s. 153-182.

319. Gasparini, G., Conti, D., Torti, A., Guidarelli, C., Lasagni, A. a Caputo, R. The effect of ciclopiroxolamine investigated by means of the freeze-fracture technique. *Mycoses*. 1986, **29**(11):539-544. doi: 10.1111/j.1439-0507.1986.tb03956.x.
320. Del Palacio-Hernanz, A., Guarro-Artigas, J., Figueras-Salvat, M.J., Esteban-Moreno, J. a Lopez-Gomez, S. Changes in fungal ultrastructure after short-course ciclopiroxolamine therapy in pityriasis versicolor. *Clinical and Experimental Dermatology*. 1990, **15**(2):95-100. doi: 10.1111/j.1365-2230.1990.tb02040.x.
321. Chan, D.A., Sutphin, P.D., Yen, S.E. a Giaccia, A.J. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, **25**(15):6415-6426. doi: 10.1128/MCB.25.15.6415-6426.2005.
322. Markus, A. Hydroxy-pyridones: outstanding biological properties. In: *Hydroxy-pyridones as antifungal agents with special emphasis on onychomycosis*. Springer: Berlin, 1999, s. 1-10.
323. Klener, P. a Klener, P. *Principy systémovej protinádorové léčby*. Praha: Grada Publishing, 2013, s. 200. ISBN: 978-80-247-8842-5.
324. Braga, P.C., Piatti, G., Conti, E. a Vignali, F. Effects of subinhibitory concentrations of ciclopirox in the adherence of *Candida albicans* to human buccal and vaginal epithelial cells. *Arzneimittelforschung*. 1992, **42**(11):1368-11371.
325. Braga, P.C., Maci, S., Dal Sasso, M. a Bohn, M. Experimental evidences for a role of subinhibitory concentrations of rilopirox, nystatin and fluconazole on adherence of *Candida spp.* to vaginal epithelial cells. *Chemotherapy*. 1996, **42**(4):259-265.
326. Coppi, G. a Silingardi, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. *Farmaco*. 1992, **47**(5 Suppl):779-786.
327. Belliardo, F., Bertolino, A., Brandolo, G. a Lucarelli, C. Micro-liquid chromatography method for the determination of ciclopiroxolamine after pre-column derivatization in topical formulations. *Journal of Chromatography*. 1991, **553**(1-2):41-45. doi: 10.1016/S0021-9673(01)88470-3.
328. Escarrone, A.L.V., Bittencourt, C.F., Laporta, L.V., Dos Santos, M.R., Primel, E.G. a Caldas, S.S. LC-UV method with pre-column derivatization for the determination of ciclopirox olamine in raw material and topical solution. *Chromatographia*. 2008, **67**(11-12):967-971. doi: 10.1365/s10337-008-0623-5.

329. Chouhan, P. a Saini, T.R. Development and validation of a HPLC method for direct estimation of ciclopirox olamine in *ex-vivo* transungual permeation studies. *Indian Drugs*. 2016, **53**(3):32-39.
330. Satani, B.H., Patel, J.V., Gami, R.B. a Patel, C.N. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for estimation of ciclopirox olamine in bulk drug and cream formulation. *BioMedRx*. 2013, **1**(1):102-108.
331. Bisceglia, K. J., Yu, J. T., Coelhan, M., Bouwer, E. J. a Roberts, A.L. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(4):558-564. doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.062.
332. Kuriki, T., Tsujiyama, T., Gurniak, R., a Suzuki, N. Study on the thin-layer chromatography of 1-hydroxy-4-methyl-6-cyclohexyl-2-pyridine ethanolamine salt. *Bunseki Kagaku*. 1976, **25**(6):406-408.
333. Li, J., Jiang, Y., Sun, T. a Ren, S. Fast and simple method for assay of ciclopirox olamine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, **47**(4-5):929-933. doi: 10.1016/j.jpba.2008.02.023.
334. Nacaratte, F., Toral, M.I. a Soto C. Development of a kinetic spectrophotometry method for the determination of ciclopirox olamine in pharmaceutical sample. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2016, **61**(3):3102-3107. doi: 10.4067/S0717-97072016000300019.
335. Ibrahim, F. a El-Enany, N. Anodic polarographic determination of ciclopirox olamine in pure and certain pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, **32**(2):353-359. doi: 10.1016/S0731-7085(02)00709-4.
336. Bu, W., Fan, X., Sexton, H. a Heyman, I. A direct LC/MS/MS method for the determination of ciclopirox penetration across human nail plate in *in vitro* penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(1):230-235. doi: 10.1016/j.jpba.2009.08.019.
337. Lehr, K.H. a Damm, P. Quantification of ciclopirox by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. An example of efficient clean-up using silica-bonded cyano phases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1985, **339**:451-456. doi: 10.1016/S0378-4347(00)84680-0.
338. Chouhan, P. a Saini, T.R. Hydration of nail plate: a novel screening model for transungual drug permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **436**(1-2):179-182. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.020.

339. *United States Pharmacopoeia USP 31-NF 26*. The United States Pharmacopoeia and National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2008.
340. Lukášová, I., Muselík, J., Vetchý, D., Gajdziok, J., Gajdošová, M., Juřica, J., Knotek, Z., Hauptman, K. a Jekl, V. Pharmacokinetics of ciclopirox olamine after buccal administration in rabbits. *Current Drug Delivery*. 2017, **14**(1):99-108. doi: 10.2174/1567201813666160502142856.
341. Gagliardi, L., Multari, G., Cavazzutti, G., De Orsi, D. a Tonelli, D. HPLC determination of ciclopirox, octopirox and pyriithiones in pharmaceuticals and antidandruff preparations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 1998, **21**(15):2365-2373. doi: 10.1080/10826079808000544.
342. Felix, F.S., do Lago, C.L. a Angnes, L. Determination of ciclopirox olamine in pharmaceutical products by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. 2011, **32**(8):900-905. doi: 10.1002/elps.201000612.
343. Blanes, L., Saito, R.M., Genta, F.A., Donegá, J., Terra, W.R., Ferreira, C. a do Lago, C.L. Direct detection of underivatized chitooligosaccharides produced through chitinase action using capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2008, **373**(1):99-103. doi: 10.1016/j.ab.2007.08.042.
344. Rocha, F.R., Coelho, L.H., Lopes, M.L., Carvalho, L.R., Da Silva, J.A., do Lago, C.L. a Gutz, I.G. Environmental formaldehyde analysis by active diffusive sampling with a bundle of polypropylene porous capillaries followed by capillary zone electrophoretic separation and contactless conductivity detection. *Talanta*. 2008, **76**(2):271-275. doi: 10.1016/j.talanta.2008.02.037.
345. Nogueira, T. a do Lago, C.L. Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2009, **32**(20):3507-3511. doi: 10.1002/jssc.200900357.
346. Muñoz, R.A.A., Richter, E.M., de Jesus, D.P., do Lago, C.L. a Angnes, L. Determination of inorganic ions in ethanol fuel by capillary electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2004, **15**:523-526. doi: 10.1590/S0103-50532004000400013.
347. Walsh, M.I., Rizk, M.S., Eid, M.I. a Fathy, M.S. Spectrofluorimetric determination of ciclopirox olamine via ternary complex with Tb(III) and EDTA. *Acta Pharmaceutica*. 2006, **56**(4):431-440.
348. Guideline, I.H.T. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. [Online]. 2005. [cit. 2017-08-15]. Dostupné z: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

349. FDA. *Guidance for industry: Bioanalytical method validation Draft Guidance*. [Online]. 2013. [cit. 2017-08-15]. Dostupné z: https://www.google.sk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi58_WmxPVAhVMXhQKHQknD5kQFggrMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2Fdrugs%2Fguidances%2Fucm368107.pdf&usg=AFQjCNFqttv66Czzpw72TEJP1NSdorWNLw.
350. Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonisation. *Journal of Chromatography A*. 2003, **987**(1-2):57-66. doi: 10.1016/S0021-9673(02)01536-4.
351. Center for Drug Evaluation and Research. *Validation of chromatographic methods*. [Online]. 1994. [cit. 2017-08-01]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.
352. Ellison, S.L.R. a Williams, A. *Quantifying uncertainty in analytical measurements*. [Online]. 2012, s. 133. London: Eurachem. [cit. 2017-08-15]. ISBN 978-0-948926-30-3. Dostupné z: www.eurachem.org.
353. Huber, L. *Validation of analytical methods*. [Online]. 2010. [cit. 2017-08-01]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.
354. Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, **689**(1):175-180. doi: 10.1016/S0378-4347(96)00297-6.
355. Smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov. [Online]. 2002. [cit. 2017-08-17]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/ALL/?uri=CELEX%3A32002D0657>.
356. STU v Bratislave. Texty k úlohám na laboratórne cvičenia pre cyklus separačných metód – chromatografia a elektroforéza laboratórium č. 472. [Online]. [cit. 2017-08-17]. Dostupné z: http://www.chtf.stuba.sk/kalch/education/Lab_pomocka%20AC2%20separacie.pdf.

5. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AFM	atómová silová mikroskopia (atomic force microscopy)
API	účinná látka (active pharmaceutical ingredient)
AUC _{0-∞}	plocha pod krivkou plazmatických koncentrácií v čase 0-∞
BCS	biofarmaceutický klasifikačný systém (Biopharmaceutics Classification System)
c ₀	iniciálna koncentrácia
CB	spoločná zmes (common blend)
CI	interval spoľahlivosti (confidence interval)
Cl/F	zdanlivá clearance
c _{max}	maximálna plazmatická koncentrácia
Cp	karbopol
Cpk	index spôsobilosti procesu (capability index)
CPX	ciklopiroxolamín
CrN	chróm nitrit
CU	obsahová rovnorodosť (content uniformity)
čl.	liekopisný článok
ČL	Český liekopis 2009
D.E.	účinnosť disolúcie (Dissolution Efficiency)
d ₅₀	hraničný limit (μm), do ktorého svojou veľkosťou spadá 50 % nameraných častíc
Di-cafos	hydrogénfosforečnan vápenatý dihydrát
DL	medza detekcie (detection limit)
DSC	diferenciálna skenovacia kalorimetria (differential scanning calorimetry)
EMA	Európska lieková agentúra (European Medicines Agency)
F	biologická dostupnosť

FaSSIF	roztok napodobňujúci tekutinu tenkého čreva nalačno (Fasted State Simulated Intestinal Fluid)
FeSSIF	roztok napodobňujúci tekutinu tenkého čreva po najedení (Fed State Simulated Intestinal Fluid)
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (The U.S. Food and Drug Administration)
GMS	glycerolmonostearát
HCr	tvrdý chróm
HEC	hydroxyetylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid chromatography)
HPMC	hydroxypropylmetylcelulóza
INR	medzinárodný normalizovaný pomer (international normalised ratio)
IS	interný štandard (internal standard)
k_{el}	eliminačná konštanta
LQL	dolná medza stanovenia (lower limit of quantification)
MCC	mikrokryštalická celulóza
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia (minimum inhibitory concentration)
MRT	priemerná doba zdržania
MS	magnézium stearát
NADH	koenzým oxidačno-redukčných reakcií v bunke
NSAIDs	nesteroidné protizápalové liečivá (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
NTI	úzky terapeutický index (narrow therapeutics index)
Ph.Eur.	Európsky liekopis (European Pharmacopoeia)
PLS	analýza čiastočných najmenších štvorcov (partial least square analysis)
PVD	fyzikálna depozícia z plynnej fázy (physical vapor deposition)
QL	medza stanovenia (quantitation limit)

R	korelačný koeficient
R ²	koeficient determinácie
RH	relatívna vlhkosť (relative humidity)
ROS	reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)
RSD	relatívna smerodajná odchýlka (relative standard deviation)
SALG	alginát sodný
SCMC	sodná soľ karboxymetylcelulózy
SSF	nátrium-stearyl-fumarát
t _{1/2}	biologický polčas
TiN	titán nitrit
t _{max}	čas potrebný k dosiahnutiu maximálnej plazmatickej koncentrácie (c _{max})
U	razidlo bez poľahu
USP	Liekopis Spojených štátov amerických (United States Pharmacopeia)
Vd/F	zdanlivý distribučný objem

6. PREHLAD PUBLIKAČNEJ ČINNOSTI

6.1 Experimentálne články

MUSELÍK, J., FRANC, A., DOLEŽEL, P., GONĚC, R., KRONDLOVÁ, A., a LUKÁŠOVÁ, I. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharmaceutica*. 2014, **64**(3):355-367. doi: 10.2478/acph-2014-0022. (IF₂₀₁₃ = 1,025).

Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP

JAN MUŠELÍK¹
ALEŠ FRANČ²
PETR DOLEŽEL¹
ROMAN GONĚC²
ANNA KRONDLOVÁ¹
IVANA LUKÁŠOVÁ¹

¹ Department of Pharmaceutics
Faculty of Pharmacy
University of Veterinary
and Pharmaceutical Sciences
612 42 Brno, Czech Republic

² Masaryk Memorial Cancer Institute
61242 Brno, Czech Republic

The article describes the development and production of tablets using direct compression of powder mixtures. The aim was to describe the impact of filler particle size and the time of lubricant addition during mixing on content uniformity according to the Good Manufacturing Practice (GMP) process validation requirements. Processes are regulated by complex directives, forcing the producers to validate, using sophisticated methods, the content uniformity of intermediates as well as final products. Cutting down of production time and material, shortening of analyses, and fast and reliable statistic evaluation of results can reduce the final price without affecting product quality. The manufacturing process of directly compressed tablets containing the low dose active pharmaceutical ingredient (API) warfarin, with content uniformity passing validation criteria, is used as a model example. Statistic methods have proved that the manufacturing process is reproducible. Methods suitable for elucidation of various properties of the final blend, e.g., measurement of electrostatic charge by Faraday pail and evaluation of mutual influences of researched variables by partial least square (PLS) regression, were used. Using these methods, it was proved that the filler with higher particle size increased the content uniformity of both blends and the ensuing tablets. Addition of the lubricant, magnesium stearate, during the blending process improved the content uniformity of blends containing the filler with larger particles. This seems to be caused by reduced sampling error due to the suppression of electrostatic charge.

Keywords: content uniformity, warfarin, validation, narrow therapeutic index, Faraday pail, PLS regression

Accepted April 2, 2014

Development of dosage forms demands pharmacological and technological aspects, including suitably chosen statistic provability, to be taken into account from the very beginning. In narrow therapeutic index drugs, content uniformity is a critical parameter.

* Correspondence; e-mail: franca@vfu.cz

J. Muselik et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

Strict Good Manufacturing Practice (GMP) requirements concerning process validation of content uniformity to be met when transferring the production to the industrial scale should be followed as early as during laboratory development.

Pharmacological aspects of tablet blend content uniformity

Warfarin is used either as sodium salt or sodium salt isopropanol clathrate. Developed initially as rat poison, warfarin is still used as a first-line drug for thrombosis prevention in the USA, where tablets containing warfarin sodium salt have been marketed as Coumadine by DuPont Pharma since the 1950s. Patent protection expired by 1962; however, the narrow therapeutic index of warfarin prevented the production of generic substitutes. In 1980, switch to generic warfarin in the Boston City Hospital led to increased risk of mortality and health complications including acute bleeding (1). Wittkowsky suggests that extensive content uniformity limits may cause such complications. For example, a generic warfarin tablet labeled as containing 10 mg of drug might contain 8.50–11.50 mg according to EP 2.9.6 specification (85.0–115.0 %). The impact of this overlap is significant considering that when warfarin dosage is adjusted in response to alterations in therapy intensity, the dosage is typically increased or decreased by only 5–15 % of the daily dose. The original producer DuPont Pharma used the internal limit for content uniformity of 92.5–107.5 % with relative standard deviation (RSD) no more than 3 %, while the generic producer met the United States Pharmacopoeia (USP) limits of 85–115 % with RSD no more than 6 % (2). On the other hand, Jaffer and Bragg argued that the generic product contained amorphous warfarin, whereas the original product contained the salt in crystalline form. Amorphous warfarin could not be used in warfarin tablets in the USA any more (3). Until 1996, DuPont remained the sole producer of warfarin tablets in the USA. In September 1997, Food and Drug Administration (FDA) approved generic warfarin containing warfarin sodium salt clathrate, marketed by Barr Pharmaceuticals (now Teva). DuPont tried to stop the oncoming generic product and in 1996 asked the FDA to establish stricter limits in bioequivalence testing and to adopt its internal content uniformity limit as the USP standard. FDA declined both suggestions (4). Studies by Halkin (2003) (5) and Swenson (2005) (6) proved that the existing bioequivalence testing of generic substitutes was sufficient. Nevertheless, two important generic producers of warfarin tablets – Taro Pharmaceuticals and Apotex – introduced stricter internal limits for both bioequivalence and content uniformity, *i.e.*, AUC and c_{max} within 0.8–1.25 with a confidence level 0.95 instead of 0.90, content uniformity within 92.5–107.5 % of the average and RSD not more than 3 % (7). In 2006, Barr Pharmaceuticals acquired the Croatian pharmaceutical producer Pliva Zagreb, together with its patent for warfarin tablets marketed in the USA. Content uniformity of these tablets was high, the content in all strengths ranged within 97–103 % of the average and RSD was not more than 2 %. The patent granted to the Croatian producer Pliva described warfarin tablets with possibly the highest content uniformity achieved so far (8). The procedure was based on the carrier impregnated with aqueous solution of warfarin sodium salt clathrate. Regardless of being crystalline or amorphous, the structure of warfarin used did not change after drying and further processing (9). It is clear that content uniformity remains an important issue when formulating solid dosage forms of drugs with a narrow therapeutic index. Similarly, Benet claims that complications during the treatment with narrow therapeutic index drugs API are mainly caused by inter-individual variability in drug quality (10).

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

Current GMP legislation concerning content uniformity

Regardless of how strict are the corporate internal limits for content uniformity, the quality of the product has to be tested in regular production according to the GMP. In fact, current legislation was inspired by Barr Laboratories, because in early 1990s FDA investigation in this company detected problems in content uniformity testing of solid dosage forms (11). In 1993, this resulted in an arbitrary court decision, ordering content uniformity testing of blends irrespective of validation process adequacy (12). Before that time, USP required content uniformity of 10 samples to fall within 85–115 % of the average and RSD not more than 6 %; this was narrowed to 90–110 % and RSD not more than 5 %. Sample mass should not exceed more than three times that of the final dosage form (12). These limits were listed in the FDA guidance (13). The decision was criticized, since there was no suitable sampling method that would eliminate sampling error. Parenteral Drug Association (PDA) reacted by issuing its Technical Report No. 25, suggesting a »holistic approach« to general analysis of the product. Under defined conditions, the error of failed content uniformity of the blend could be reconstructed from the error of passed content uniformity of the final product. However, the average content of the blend and the final product have to be statistically similar. More samples are required, both from one sampling place and from several sampling places (sample stratification). The error of blend content uniformity is equal to the sum of errors within one sampling place and product error within several sampling places (12). Following the discussion between the Product Quality Research Institute (PQRI), PDA and FDA, the latter issued a draft of new guidance (14), including a commentary (15), containing a more extensive description of the original limits based on stratified sampling. The FDA guidance documents were issued as the final guidance for industry and represent FDA's current thinking on the topics covered. However, FDA's guidance documents are not compulsory for either industry or the FDA. FDA accepts alternative approaches to those described in guidance documents, as long as the chosen approach is in accord with the applicable statute or regulation. On the other hand, USP monographs, harmonized with European Pharmacopoeia (EP) monographs, are obligatory.

Content uniformity validation

In the course of validation, the product has to meet defined requirements and specifications at a statistically significant confidence level. Validation covers also the stage of development, *i.e.*, selection of excipients, procedure, and process parameters, including manufacturing process control, intermediates, final product and sampling. Content uniformity is a key parameter (16). Statistic methods offer several sophisticated models to evaluate the significance of the process (*e.g.* ANOVA). Nevertheless, experience suggests that complex equations demand professional statisticians. There are several simpler models where values are checked against tabulated data or are calculated easily. Use of capability indices K , C_p and C_{pk} enables the personnel to assess the correctness and precision of the process based on simple parameters demanded by the pharmacopoeia: average, maximum, minimum, and standard deviation (17). C_{pk} index is defined as the lower value of upper and lower indices.

$$\widehat{C}_{pk} = \min \left[\frac{USL - \bar{x}_i}{3s}, \frac{\bar{x}_i - LSL}{3s} \right] \quad \text{i(1)}$$

USL – upper specified limit, LSL – lower specified limit, \bar{x}_i – average, s – standard deviation.

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

If the result is not less than 1.0, at least 99.73 % of batches produced by this process will pass the applied acceptability criterion. This limit is suitable for content uniformity validation. Other simple methods include standard deviation predilection interval (SDPI) or Bergum division adapted to suit the USP monograph »uniformity of dosage units« <905> and its harmonized European counterpart (2.9.40). Bergum criterion is based on tabulated RSD value which guarantees, with 90.0 % certainty, that at least 95.0 % of samples tested for content uniformity will pass the <905> USP test (18).

Impact of composition and procedure on content uniformity

To reach uniform content of a low dose drug in the final dosage form while keeping the production costs low, a suitable tablet composition and procedure have to be chosen. The easiest method for tablet production is direct compression, where all constituents are weighed and mixed in a single container. Turbula is a reliable and efficient 3D mixing device that can be used not only in the development but also in scale-up production (19). With this device, final content uniformity is influenced by the ratio of constituents and the active ingredient, electrostatic charge, particle density, shape and size. Significant procedural parameters include the mixing order of individual components, mixing time and speed, container shape and container load (20). The highest degree of content uniformity can be reached if the shape, size and density of mixed particles are as similar as possible; spherical shape is preferred. The ratio of active substance and excipients should be equal and there should not be any electrostatic charge (21). If the mixing time is too short, the blend is not mixed properly; on the other hand, if the mixing time is too long, »overmixing« can occur and the constituents will separate in dependence on their differing properties. The results are almost impossible to estimate in advance and the above mentioned recommendations cannot be fulfilled. Particle size, shape and density are usually dissimilar and electrostatic charge changes in the course of the manufacturing process (22). Applied composition is thus a compromise between general recommendations and real requirements.

Experiment design and hypothesis

The goal was to assess the impact of particle size distribution of the filler, in this case calcium hydrogen phosphate, on content uniformity of the blend in relation to the addition of magnesium stearate at various stages of the mixing process. The composition is based on previous experiments (23); the procedure of »common blend« was used where tablets of various strengths (1 to 10 mg) were compressed from the same blend by changing the tablet mass (approximately 50 to 500 mg). A single validated blend containing 2 % of warfarin sodium salt clathrate was used for the production of tablets of all strengths.

Content uniformity of the tableting blend had to meet EP (2.9.6) and FDA requirements and the results were evaluated using the C_{pk} index. Final product content uniformity had to meet USP (<905>) and EP (2.9.6, 2.9.40) requirements and the results were evaluated using the C_{pk} index and Bergum division. Tablets had to meet also internal DuPont requirements of 92.5–107.5 % of the labeled drug strength, and RSD not more than 3 %.

We planned to find out if demixing of the blend during the process could be caused by electrostatic charge forming in the blend during blending.

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

Partial least squares (PLS) regression was used to fully evaluate the impact of studied variables on content uniformity.

EXPERIMENTAL

Tableting blend and tablets

Blend composition and some of its physicochemical properties are listed in Table I. All constituents were sieved through a 250 μm sieve and mixed for 15 minutes (procedure A) or all constituents, without magnesium stearate, were mixed for 10 minutes, then magnesium stearate was added and another 5 minutes of mixing followed (procedure B). A Turbula homogenizer (T2C, Switzerland) was used, speed 40 rpm. Mass of one batch was 500.0 g. Four blends were prepared (2 compositions, 2 procedures). Flat tablets with a diameter of 7 mm, mass about 200 mg, and hardness about 70 N were produced using an eccentric press (Korsch EKO, Germany). Two batches were produced for every procedure/composition combination. An additional third batch was produced using the composition and procedure that showed the best results.

Sampling and warfarin content measurement

Tableting blend was placed in a cylindrical vessel of 25 cm diameter and was leveled to a height of about 2 cm by slight horizontal movement. The area was then divided evenly into 10 parts; out of each of these parts, a sample weighing approximately three times more than the tablet was taken with a small spoon. Samples were weighed with 0.1 mg

Table I. Composition of the blend and physical properties of individual constituents

Component	Producer	Density [kg m^{-3}]	Particle size (μm) ^a			Content (%)	
			D_{10}	D_{50}	D_{90}	I	II
Warfarin	Pliva (Croatia)	1312.8	2.5	10.3	72.4	2.0	2.0
Di-cafos 92-12	Budenheim KG (Germany)	2881.5	36.1	61.1	96.0	70.0	–
Di-cafos 92-14	Budenheim KG (Germany)	2937.9	2.4	152.3	309.8	–	70.0
Avicel pH 101	FMC BioPolymer (USA)	1572.4	14.7	46.3	110.7	25.0	25.0
Ac-Di-Sol	FMC BioPolymer (USA)	1611.5	12.2	33.1	86.7	2.0	2.0
Magnesium stearate	Peter Greven (Germany)	1085.9	2.6	10.2	23.1	1.0	1.0

^a D_x = x % of measured particles smaller than this size (μm); Di-cafos – calcium hydrogen phosphate; Avicel PH 101 – microcrystalline cellulose; Ac-Di-Sol – sodium croscarmellose

J. Muselik *et al.*: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

precision, transferred quantitatively to 100 mL flasks and water was added. Tablets were sampled during the tableting process so that 10 tablets from each batch were taken at regular intervals. Tablets were weighed, put into flasks and let to dissolve for 12 hours in a mixture of water and methanol (9:1, *V/V*). From both the blend and tablet samples, insoluble excipients were removed by a centrifuge for 10 minutes and at 15000 rpm (SIGMA Laborzentrifugen 2K15, Germany) and samples were analyzed by HPLC. Warfarin content was measured using the calibration curve.

We used a high performance liquid chromatograph YL 9100 (Young Lin Instrument, Korea) with a quaternary pump, automatic sampler and diode array detector. The separation column was BDS HYPERSIL C18 (150 × 4.6 mm; particle size 5 μm). Analysis conditions: mobile phase methanol (64 %) and formic acid (0.04 mol L⁻¹, 36 %), flow rate 1.4 mL min⁻¹, column temperature 25 °C, analysis wavelength 280 nm, sample size 20 μL, analysis time 7 minutes.

Charge measurement

The charge was measured in individually prepared model mixtures. Their composition was designed so as to find out the impact of the carrier particle size along with addition of magnesium stearate on the final electrostatic charge. For the preparation of model mixtures, an identical procedure was applied as in the preparation of tableting blends. Fillers alone (Di-cafos 92–12, Di-cafos 92–14), their mixtures with warfarin and their mixtures with warfarin and magnesium stearate were used as model samples. Fillers alone and their mixtures with warfarin were mixed for 10 minutes; when magnesium stearate was added, additional 5 minutes of mixing followed.

Electrostatic charge was measured using a Faraday pail of standard construction, consisting of the outer insulating and inner measurement pail (24). The sample transfers its charge to the inner pail and voltage change between the inner pail and the ground is measured. Complete volume of the model mixture weighing 80 g (measurement repeated three times) was poured directly from the glass homogenization vessel to the inner cup of 250 mL volume and the measured charge was calculated to correspond to 1 g of sample.

Statistical data analysis

Results of individual samples ($n = 10$) from each batch were recalculated according to the theoretical warfarin content in the blend. Average content, standard deviation and relative standard deviation were calculated for every batch. Statistical evaluation of variance for both compositions and both procedures was performed using the *F*-test of equality of variances (QC.Expert 3.2., TriloByte). To evaluate the impact of procedure variables (filler particle size, time of magnesium stearate addition) and their interaction with response variables (RSD, *C_pk* of EP 2.9.6 criteria, *C_pk* of FDA criteria), PLS regression was used, including the Martens uncertainty test (25). Prior to modeling, response variables were automatically adjusted by autoscaling, which uses mean-centering followed by the dividing of each variable by its standard deviation. Design evaluation was performed with Unscrambler X (v. 10.3, Camo software).

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

RESULTS AND DISCUSSION

Blends and tablets that were manufactured differed in the filler particle size distribution and in the time when lubricant was added in the mixing process. Mixing time of 15 minutes was chosen on the basis of previous experiments with similar composition where the impact of mixing time, different types of fillers and different particle size distribution of warfarin on content uniformity were tested (23, 26). Magnesium stearate was added either at the beginning of mixing or after 10 minutes. The results show that the chosen variables affected warfarin content uniformity of the tableting blend (Table II). If the filler with larger particle size ($D_{50} = 152 \mu\text{m}$) was used, content uniformity was better than in the case of smaller particle size ($D_{50} = 61 \mu\text{m}$). Results for both procedures and compositions were compared by the F-test of equality of variances ($p \leq 0.05$). Statistical evaluation proved a significantly smaller variance of the measured content in blends prepared with fillers of larger particle size (Di-cafos 92-14; $D_{50} = 152 \mu\text{m}$). This applies to both procedures, which differed in the time when lubricant was added. The influence of the procedure used on the final variance of warfarin content was also evaluated by the F-test of equality of variances. The test did not reveal any statistically significant difference in the variance of warfarin content in blends prepared by procedures A and B (Table II). This applied to blends with both larger and smaller filler particle size. This points to the conclusion that when using either procedure, the critical parameter for reaching the required content uniformity is the filler particle size distribution.

The time when lubricant was added did not have a statistically significant impact on the measured variance of warfarin content in manufactured blends. Physical bonds between magnesium stearate and lubricated particles were weaker than in the absence of lubricant (27). Magnesium stearate may influence the intensity of physical bonds, *i.e.*, elec-

Table II. Average content and content uniformity parameters of blends

Batch ^a	\bar{x} ^b (%)	RSD	EP ^c (2.9.6)	FDA ^c	C_{pk} ^d (2.9.6)	C_{pk} ^d (FDA)
1_A_D61	103.0	6.24	+	-	0.62	0.36
2_A_D61	100.3	5.53	+	-	0.88	0.58
1_A_D152	98.0	3.06	+	+	1.45	0.89
2_A_D152	100.1	2.58	+	+	1.92	1.27
1_B_D61	103.3	3.41	+	+	1.07	0.62
2_B_D61	102.3	7.18	-	-	0.56	0.34
1_B_D152	100.5	1.37	+	+	3.50	2.29
2_B_D152	99.3	1.76	+	+	2.72	1.77
3_B_D152	102.2	2.06	+	+	2.04	1.24

^a Batch label: batch number_procedure_filler particle size D_{50} ; (50 % of particles smaller either than 61 or 152 μm); ^b average of 10 samples from a particular batch; ^c (+) passed, (-) failed; ^d C_{pk} values calculated according to Equation 1.

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

Table III. Total electrostatic charges of model blends

Components ^a	Electrostatic charge (nC g ⁻¹) ^d
D61 ^a	0.042 ± 0.031
D61 + W ^b	0.083 ± 0.014
Blend with D61 ^c	-0.165 ± 0.041
D152 ^a	0.042 ± 0.007
D152 + W ^b	0.083 ± 0.019
Blend with D152 ^c	-0.054 ± 0.007

^a Di-cafos only (D61 or D152 according to particle size); ^b blend of Di-Cafos with warfarin (W); ^c tableting blend prepared by procedure B (i.e. magnesium stearate was added after 10 minutes of blending); ^d average of three measurements ± standard deviation.

trostatic bonds and Van der Waals bonds, which can have an impact on content uniformity by decreasing the electrostatic charge of blended part.

Electrostatic charge was measured to try to explain the observed impact of filler particle size on content uniformity. The impact of added magnesium stearate on the magnitude of electrostatic charge was measured with the Faraday pail in model blends containing the active substance only (warfarin sodium salt clathrate) and filler (calcium hydrogen phosphate) of various particle sizes (Table III). The composition of these model mixtures was chosen so as to eliminate the impact of other excipients (Avicel and Ac-Di-Sol) on the final electrostatic charge.

Measurements showed that neither filler itself nor its blends with warfarin differed in charge in a statistically significant way. However, when magnesium stearate was added, statistically significant changes in electrostatic charge occurred. When the filler of larger particle size was used, the change in electrostatic charge was lower than in the filler of smaller particle size. When magnesium stearate was added, the value of electric charge changed its polarity. This influence of magnesium stearate was already described (27). These results may explain better uniformity of blends containing the filler of larger particle size because the electrostatic charge was reduced. Charge can have a negative impact on uniformity or increase the possibility of sampling error. Experience shows that if the blend has lower content uniformity than tablets and there is no further homogenization during compression, there has to be an error in blend sampling (12). As the difference in uniformity of individual blends was higher than in uniformity of tablets produced from them (see Table II and V), this was probably a sampling error (e.g., adhesion of blend components to the sampler surface caused by electrostatic charge). Particle size of mixed constituents has an impact on uniformity by itself (e.g., movement of particles) or in connection with some other commonly used excipients, e.g. magnesium stearate, which influences physical bonds between particles with respect to their size.

Although experimentation was run on a laboratory scale, tableting blends were evaluated according to validation criteria used in production transfer on a larger scale, corresponding to GMP requirements for validation. We used criteria from EP 2.9.6, which states

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

Table IV. PLS-ANOVA summary table. P-values of the effects of particular procedural variables, and their interactions with response variables. Values with $p < 0.1$ are in bold

	RSD	Cpk (EP 2.9.6)	Cpk (FDA)
A	0.322	0.355	0.358
B	0.322	0.355	0.358
D61	0.005	0.011	0.010
D152	0.005	0.011	0.010
A*D61	0.084	0.076	0.079
A*D152	0.702	0.636	0.635
B*D61	0.259	0.307	0.302
B*D152	0.031	0.096	0.094

Table V. Average content and content uniformity parameters of tablets

Batch ^a	\bar{x} ^b (%)	RSD	EP ^c (2.9.6)	EP ^c (2.9.40)	Cpk ^d (2.9.6)	DuPont ^c specification	Bergum division ^c
1_A_D61	101.4	3.57	+	+	1.26	-	-
2_A_D61	102.0	5.06	+	+	0.84	-	-
1_A_D152	101.7	2.58	+	+	1.67	+	+
2_A_D152	101.0	2.62	+	+	1.77	+	+
1_B_D61	100.1	3.20	+	+	1.55	-	-
2_B_D61	103.2	1.62	+	+	2.36	+	+
1_B_D152	102.3	2.52	+	+	1.64	+	+
2_B_D152	99.9	1.67	+	+	2.96	+	+
3_B_D152	102.2	2.54	+	+	1.65	+	+

^a Batch label: batch number_procedure_filler particle size D_{50} ; (50 % of particles smaller either than 61 μm or 152 μm); ^b average of 10 samples from a particular batch; ^c (+) passed, (-) failed; ^d Cpk values calculated according to Equation 1.

that the content of active substance in each of 10 samples has to be within 85–115 % of average content as well as criteria from FDA guidance which states that each sample has to contain 90–110 % of average content and RSD has to be lower than 5 %. Cpk indices were calculated for both EP and FDA limits: for validation of solid dosage forms, Cpk must not be less than 1.0. Tableting blends prepared from the filler of larger particle size met all validation criteria, which is consistent with the above mentioned facts. The time when magnesium stearate was added to the blend was found to be significant; only batches where magnesium stearate was added in the course of mixing met the FDA requirement,

J. Muselík et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

confirmed at the required statistical significance level $Cpk \geq 1$ (Table II). Although the current FDA guidance no longer considers the use of traditional three-batch validation appropriate, it does not prescribe the number of validation batches for a prospective validation protocol (28). A third batch based on this procedure and composition was prepared and expected to strengthen statistical data and help scale up the production. This third batch also met all validation criteria. PLS regression was used to fully describe the impact of studied technological variables (filler particle size, time of lubricant addition) on response variables (RSD, Cpk pursuant to EP 2.9.6 criteria, Cpk pursuant to FDA criteria) of prepared blends. One of the PLS model outputs is the PLS-ANOVA summary table, which shows p -values of the effects of respective procedural variables and their interactions with response variables. If the p -value of effect is not higher than 5 %, the effect is considered to be significant. If the value ranges between 5 and 10 %, the effect is marginally significant. Design evaluation by PLS regression is suitable because there is no limit to the number of experiments. Co-variance between response variables is taken into account, which enables a study of their mutual dependence. Graphic simplification of dependence between procedural and response variables is usually presented as a correlation loading plot, where significant correlations ($R^2 > 0.5$) are marked by Hotelling's ellipse. An advantage is the possibility of using un-controlled response variables in the experiment and finding out if they have an impact on the quality of the model. On the other hand, it must be said that it is not possible to get real p -values but only their estimation (29, 30).

The developed PLS model describes quantitatively the dependence between the matrix of X procedural variables (filler particle size, time lubricant addition) and the matrix

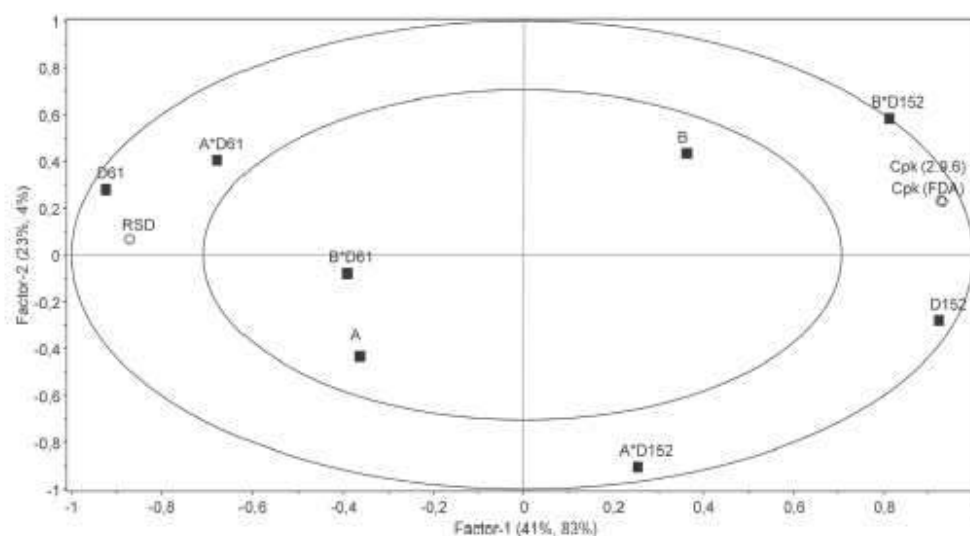


Fig. 1. Correlation-loading plot showing relationships between the procedural variables and their interactions of X -matrix (boxes) and responses of Y -matrix (circles). Technological variables labeled in the form of the applied procedure (A or B), filler particle size (D61 or D152) and their interactions (A*D61; A*D152; B*D61; B*D152). Response variables labeled in the form of RSD, Cpk for EP 2.9.6 criteria and Cpk for FDA criteria.

J. Muselik et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

of Y response variables (RSD, Cpk pursuant to EP 2.9.6 criteria, Cpk pursuant to FDA criteria). The resulting correlation loading plot (Fig. 1) describes, using the first two components, 63 and 87 % of total variability of matrices X and Y, respectively. The distribution of variables in the outer area of Hotelling's ellipse suggests a significant impact ($p < 0.05$) of particle size (D61; D152) on all response variables, which is quantitatively shown in Table IV. The results also show a significant impact ($p < 0.05$) of interaction procedure B vs. larger particles (B*D152) on RSD value. It is possible to claim that the use of procedure B in combination with larger particles caused a significant decrease in RSD and a potentially significant increase ($0.05 \leq p < 0.1$) in both Cpk values. This is the reason why this combination of procedure B and larger filler particle size (B*D152) can be considered more suitable for attaining good content uniformity than the combination of procedure A and smaller filler particle size (A*D61). There is a potentially significant impact ($0.05 \leq p < 0.1$) on increased RSD and decreased Cpk . Figure 1 shows a narrow correlation between both Cpk values, which is also clear from the minimum difference between p -values in Table I. These findings confirm the uniformity results according to validation criteria, when all criteria were met only by blends prepared by procedure B from the filler with larger particle size.

Blends were processed into tablets, in which warfarin content was measured, evaluated statistically and according to validation criteria similarly to the tableting blend (Table V). The results obtained from tablets originating from fillers of different particle size (procedure A or B) were compared by the F -test of equality of variances ($p \leq 0.05$). For procedure A, this statistical evaluation proved a significantly lower variance of the measured content of active substance in tablets when the filler of larger particle size was used. For procedure B, no statistically significant impact was found. As there was a statistically significant difference between tableting blends and tablets from the same batches, it seems probable that content uniformity was correct but there was a sampling error. This claim corresponds to the measured growth of overall electrostatic charge in blends prepared from the filler of smaller particle size (Table III). Electrostatic charge can have a negative impact on sampling, which was probably the main cause of poorer content uniformity of these blends. Similarly to the blend, there was no statistically significant difference in the measured contents in tablets (F -test of equality of variances) between procedures A and B, i.e., the time when lubricant was added to the blend. Tablets were evaluated according to validation criteria (Table V) common for the production of solid dosage forms. EP monographs 2.9.6 and 2.9.40, Cpk index for 2.9.6 monograph limits (85–115 %) and Bergum division were used. Bergum division offers tabulated RSD values that ensure, on a 90 % confidence level with 95 % probability, that subsequently produced batches will pass EP monograph 2.9.40. Validation criteria were met only in tablets manufactured with the filler of larger particle size.

CONCLUSIONS

The paper describes the methods used in process validation of solid dosage form manufacture. A model dosage form, tablets with low API content, containing warfarin, was used to evaluate the impact of particle size distribution of the used filler and the time when lubricant was added on blend and tablet content uniformity. Content uniformity was evaluated according to validation and pharmacopoeial criteria. The results show that both evaluated variables (filler particle size and time of lubricant addition) had an impact on

J. Muselik et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

content uniformity. The highest content uniformity of blend and tablets was found for the filler of particle size $D_{50} = 152 \mu\text{m}$ combined with magnesium stearate added later in the blending process (technology B). *Cpk* index and Bergum division proved that this blend and tablets meet pharmacopoeial criteria as well as FDA GMP scale-up content uniformity criteria at a statistically high level. Differences between blends and tablets manufactured from them ($D_{50} = 61 \mu\text{m}$, technology B) are probably caused by the blend sampling error. Electrostatic charge formed during the blending may play a major role in this error. Electrostatic charge measurements of model mixtures are in accord with the assumption that a higher electrostatic charge of the mixture may cause a blend sampling error (e.g., adherence of material to sampler surface). This experience should contribute to the future development of safe drugs containing a small amount of highly efficient APIs manufactured by direct compression.

Abbreviations. – API – active pharmaceutical ingredient, EP – European Pharmacopoeia, FDA – Food and Drug Administration, GMP – good manufacturing practice, NTI – narrow therapeutics index, PDA – parenteral drug association, PLS – partial least square, PQRI – product quality research Institute, RSD – relative standard deviation, SDPI – standard deviation predilection interval, USP – United States Pharmacopoeia, WHO – World Health Organization.

Acknowledgements. – This work was supported by Project IGA VFU Brno 39/2011/FaF.

REFERENCES

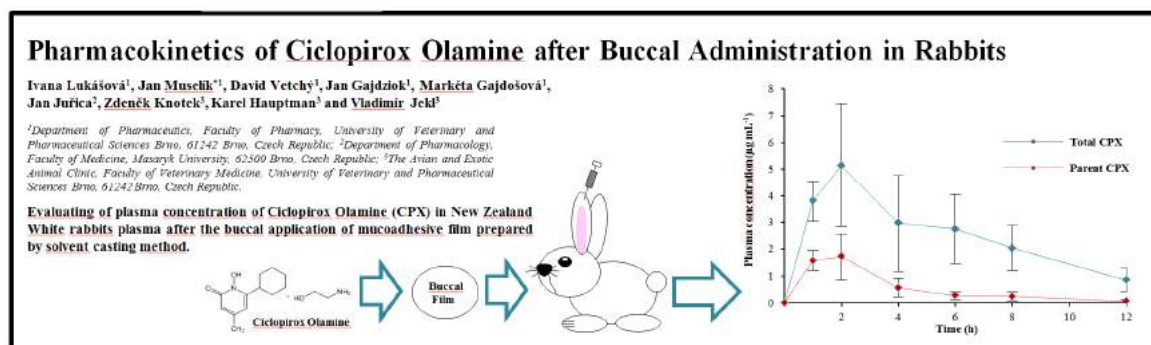
1. L. M. Vercaigni and G. G. Zhanel, Clinical significance of bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: Focus on warfarins, *J. Pharm. PharmSci.* 1 (1998) 92–94.
2. A. K. Wittkowsky, Generic warfarin: Implications for patient care, *Pharmacotherapy* 17 (1997) 640–643; DOI: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03741.x.
3. A. Jaffer and L. Bragg, Practical tips for Warfarin dosing and monitoring, *Clev. Clin. J. Med.* 70 (2003) 361–371; DOI: 10.3949/ccjm.70.4.361.
4. United States Court of Appeals, Third Circuit. Court decision in re: Warfarin sodium antitrust litigation, 391 F.3d 516, December 2004; <https://bulk.resource.org/courts.gov/c/F3/391/391.F3d.516.02-3758.02-3757.02-3755.02-3603.html>; access date October 15, 2013.
5. H. Halkin, A. Shapiro, D. Kurnik, R. Loebstein, V. Shalev and E. Kokia, Increased warfarin doses and decreased international normalized ratio response after nationwide generic switching, *Clin. Pharmacol. Ther.* 74 (2003) 215–221; DOI: 10.1016/S0009-9236(03)00166-8.
6. C. N. Swenson and G. Fundak, Observational cohort study of switching warfarin sodium products in a managed care organization, *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 57 (2000) 452–455.
7. A. E. Sawoniak, A. F. Shalansky, P. J. Zed and R. Sundreji, Formulary considerations related to warfarin interchangeability, *Can. J. Hosp. Pharm.* 55 (2002) 215–218.
8. A. Franc, B. Žaludek, R. Goněc, M. Maleček, H. Tkadlečková and A. Petrovičová, *Method of Producing Dosage Units of a Solid Drug Form Containing Warfarin Sodium Salts as Active Component*, WO Pat. 2005034919 17 October 2003.
9. A. Franc, M. Rabišková and R. Goněc, Impregnation: a progressive method in the production of solid dosage forms with low content of poorly soluble drugs, *Eur. J. Parent Pharm. Sci.* 16 (2011) 85–93.
10. L. Z. Benet and J. E. Goyan, Bioequivalence and narrow therapeutic index drug, *Pharmacotherapy* 15 (1995) 433–440; DOI: 10.1002/j.1875-9114.1995.tb04379.x.
11. *The »Barr Laboratories« Court decision*, United States District Court for the District of New Jersey, Civil action No. 92-1744, January 2004; <http://www.navigategmp.com/pdf/BarrLabs.pdf>; access date October 19, 2013.

J. Muselik et al.: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP, *Acta Pharm.* 64 (2014) 355–367.

12. J. Berman, D. E. Elinski, C. R. Gonzales, J. D. Hofer, P. J. Jimenez, J. A. Planchard, R. J. Tlachac and P. F. Vogel, Blend uniformity analysis: Validation and in-process testing. Technical Report No. 25. PDA (Parenteral Drug Association), *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997) S1-99.
13. FDA Guidance for industry, *ANDAs: Blend Uniformity Analysis*, Draft guidance, August 1999; <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/992635gd.pdf>; access date October 19, 2013.
14. FDA Guidance for industry, *Powder Blends and Finished Dosage Units – Stratified In-process Dosage Unit Sampling and Assessment*, Draft guidance, October 2003; <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/03d-0493-gdl0001.pdf>; access date October 19, 2013.
15. FDA Guidance for industry, *Powder Blends and Finished Dosage Units – In-process Blend and Dosage Unit Inspection (Sampling and Evaluation) for Content Uniformity*, Revised draft guidance, January 2004; http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/jan04/013004/03D-0493_emc-000003-01.pdf; access date October 19, 2013.
16. FDA reference material, *Oral Solid Dosage Forms Pre/post Approval Issues (1/94)*, Guide to inspections of oral solid dosage forms, pre/post approval issues for development and validation, January 1994. <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074928.htm>; access date 19 October, 2013.
17. P. Cholayudth, Establishing acceptance limits for probability of passing multiple stage tests in process validation through a process capability approach, *J. Valid. Tech.* 15 (2009) 77–90.
18. J. S. Bergum and H. Li, Acceptance limits for the new ICH USP 29 content-uniformity test, *Pharm. Tech.* 31 (2007) 90–100.
19. J. Kushner, Incorporating Turbula mixers into a blending scale-up model for evaluating the effect of magnesium stearate on tablet tensile strength and bulk specific volume, *Int. J. Pharm.* 429 (2012) 1–11; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.02.040.
20. J. Zheng, *Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products*, John Wiley & Sons, New Jersey 2009, pp. 169–196.
21. J. Hilden, M. Schrad, J. Kuehne-Willmore and J. Sloan, A first-principles model for prediction of product dose uniformity based on drug substance particle size distribution, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2364–2371; DOI: 10.1002/jps.23130.
22. Y. Pu, M. Mazumder and C. Cooney, Effects of electrostatic charging on pharmaceutical powder blending homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2412–2421; DOI: 10.1002/jps.21595.
23. J. Muselik and A. Franc, Evaluation of content uniformity of tablets with a low content of the active ingredient with a narrow therapeutic index, *Ces. Slov. Farm.* 61 (2012) 271–275.
24. D. M. Taylor, Measuring techniques for electrostatics, *Electrostatics* 51-52 (2001) 502–508.
25. H. Martens and M. Martens, Modified jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modeling by partial least squares regression (PLSR), *Food Qual. Prefer.* 11 (2000) 5–16; DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(99\)00039-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00039-7).
26. A. Franc, J. Muselik, R. Máslová and J. Hadrabová, Content uniformity of warfarin-containing mixtures and tablets, *Ces. Slov. Farm.* 62 (2013) 177–181.
27. M. Perrault, F. Bertrand and J. Chaouki, An investigation of magnesium stearate mixing in a V-blender through gamma-ray detection, *Powder Technol.* 200 (2010) 234–245.
28. H. Yang, How many batches are needed for process validation under the new FDA Guidance?, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 67 (2013) 53–62; DOI: 10.5731/pdajpst.2013.00902.
29. Camo software website, Classical DoE methods and PLS-ANOVA, Specific methods for analyzing designed data; <http://www.camo.com/resources/classical-doe-methods-pls-anova.html>; access date October 19, 2013.
30. Camo software. User's manual to Unscrambler X software, v.1.3.

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., GAJDOŠOVÁ, M., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K., a JEKL, V. Pharmacokinetics of ciclopirox olamine after buccal administration in rabbits. *Current Drug Delivery*. 2017, **14**(1):99-108. doi: 10.2174/1567201813666160502142856. (IF₂₀₁₇ = 1,446).

Grafický abstrakt



RESEARCH ARTICLE



Pharmacokinetics of Ciclopirox Olamine after Buccal Administration in Rabbits



Ivana Lukášová¹, Jan Muselík^{1*}, David Vetchý¹, Jan Gajdziok¹, Markéta Gajdošová¹, Jan Juřica², Zdeněk Knotek³, Karel Hauptman³ and Vladimír Jekl³

¹Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, 61242 Brno, Czech Republic; ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 62500 Brno, Czech Republic; ³The Avian and Exotic Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, 61242 Brno, Czech Republic

Abstract: *Background:* Prevalence of oral mucosal fungal infections increases with the frequent administration of antibiotics, corticosteroids and immunosuppressive drugs. Therapeutically used antifungals are usually associated with a variety of drug interactions. Furthermore, there has been a noticeable increase in microorganisms resistant to these preparations. Mucoadhesive buccal films represent a modern therapeutic system for the treatment of oral mucosal fungal infection paired with a high degree of patient compliance. Ciclopirox olamine applied directly onto the oral mucosa offers an attractive alternative to treatment with systemic antifungals thanks to its low incidence of resistance and side effects.

Objective: The aim of this work was to evaluate the pharmacokinetic parameters of ciclopirox olamine after the buccal application of mucoadhesive film prepared by the solvent casting method.

Method: A chromatographic method using an internal standard was developed and validated for evaluation of ciclopirox olamine plasma concentrations. Method accuracy was 88.5-104.6% and 89.5-99.7% for interday and intraday assays, respectively.

Results: The pharmacokinetic properties of ciclopirox olamine were studied in New Zealand White rabbits. The mucoadhesive films containing ciclopirox olamine in a total dose of 34.4 (33.0; 35.9) mg kg⁻¹ were applied to all the rabbits. Plasma ciclopirox olamine concentrations were determined during the 12 h following application. The time taken to reach maximum plasma concentration was 1.7 (1.1; 2.2) h after the drug administration with c_{max} 5.73 (4.18; 7.28) µg mL⁻¹. Overall elimination half-life was 3.8 (1.9; 10.8) h.

Conclusion: The experiment suggests that oral mucoadhesive film may be a valuable alternative ciclopirox olamine administration.

ARTICLE HISTORY

Received: December 16, 2015

Revised: March 25, 2016

Accepted: April 19, 2016

DOI:

10.2174/15672018136661403021428

56

Keywords: Buccal application, ciclopirox olamine, isocratic chromatographic method, mucoadhesive buccal films, pharmacokinetics, rabbits.

1. INTRODUCTION

Oral mucosal diseases affect nearly every individual during his or her lifetime. Candidiasis, ulcerative diseases (aphthae), erosive viral diseases, and problems associated with other systemic diseases are among the most common examples of oral mucosal diseases. Candidiasis is a very frequent fungal infection and is caused by the yeast of the *Candida* species, mostly *Candida albicans* in humans [1, 2]. *C. albicans* is a constituent of oral microflora, gastrointestinal tract, and vagina. It can also be found in the epidermis and nails [2]. Mucocutaneous and even systemic diseases can develop

in the event of an imbalance between *Candida* and other microorganisms [3-5]. The common triggering factors include impaired cellular immunity, nutritional factors, impaired salivary gland function, denture use, a high carbohydrate diet, Diabetes mellitus, Cushing's syndrome, immunosuppression or HIV infection, and suppression of the normal mucosal microflora by the administration of broad-spectrum antibiotics, inhaled corticosteroids, or tricyclic antidepressants [1, 6-8].

According to the available guidelines, oropharyngeal and esophageal *Candida* infections are commonly treated with clotrimazole, nystatin, fluconazole or echinocandin, caspofungin, itraconazole, posaconazole, micafungin, voriconazole, and amphotericin B, or their combinations [9]. These active ingredients are usually administered systemically, as there are only few commercially available antifungals for the

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; Tel: +420 54156 2865; E-mail: muselikj@vfu.cz

local treatment of oral candidiasis. Oral suspensions and lozenges containing nystatin, or powder, denture ointment, and lozenges containing clotrimazole are applied locally [1]. Hydroxylated pyridone ciclopirox olamine (CPX) is a potentially effective antifungal for the local treatment of oral candidiasis. Even low doses of CPX can prevent the mucosal adhesion of pathogens (1/16 MIC in the mouth, 1/18 MIC in the vagina), effectively reducing colonization tendency in ongoing symptomatic and asymptomatic infections [10]. Besides yeast infections, CPX is used in the treatment of dermatophyte and mold infections. It is also effective against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria, mycoplasmas, chlamydiae, and trichomonads [11, 12]. CPX affects both proliferating and non-proliferating fungal cells [13]. In addition to antifungal and antibacterial activity, it was proved that CPX acts also as an anti-inflammatory agent due to its ability to block the synthesis of pro-inflammatory proteins, namely prostaglandins and leukotrienes, in human polymorphonuclear granulocytes [14]. Additional advantages of CPX include activity in a wide pH range independent of protein concentration, which set it apart from other conventional antimycotics, e.g. azole antifungals oxiconazole and isoconazole, which are very sensitive to these parameters. *In vitro* studies proved that CPX has higher fungicidal activity than econazole, miconazole, and oxiconazole, when used in the same indications [15, 16]. The active mechanism of CPX has not been fully explained yet. However, it includes the uptake of CPX from the environment into the fungal cell, irreversible binding to certain cell structures and organelles, and increased cell wall permeability associated with reduced intake and increased secretion of nutrients essential for the cell [17]. CPX has a high affinity to trivalent metal cations such as Fe^{3+} , which causes the inhibition of cytochromes and thus mitochondrial electron transport processes. Additionally, the activity of peroxidase and catalase is also inhibited, resulting in the loss of cell antioxidant protection [18]. CPX decreases the activity of DNA polymerase α and consequently blocks the cell cycle at the early S phase or G1/S phase boundary [19]. So far, there is no evidence of metabolism of CPX in the fungal cell. Leakage of folinic substances from fungal cells was observed in higher concentrations of CPX as a result of altering cell membrane integrity [20]. The accumulation of CPX in the cell environment is responsible for growth inhibition and ultimately leads to fungal degradation (mycolytic effect). CPX is not metabolized by cytochrome P 450 in humans and its interaction potential is therefore low [21]. This makes CPX suitable for large groups of patients. However, its extensive plasma protein binding (94–98%) can result in increased plasma levels of concomitantly administered drugs with high plasma protein affinity [22]. Elimination of ciclopirox olamine occurs mainly *via* renal excretion in the form of glucuronide (98%).

On the European market, CPX is available as a 1% cream, a skin solution, vaginal cream, vaginal suppositories, 2% vaginal lavage, gel, 1% dusting powder, shampoo, or 8% nail lacquer. None of these products has been approved for the treatment of oral candidiasis. Mucoadhesive buccal films, modern therapeutic systems used for the local treatment of oral cavity diseases, could be suitable for this indication. Compared to conventional oral solutions, lavages, and semi-

solid preparations, this dosage form possesses the ability to prolong drug residence time and distribution at the application site (buccal mucosa) [23, 24]. The drug can be released locally into the oral cavity or pass into systemic circulation. Buccal absorption decreased exponentially with molecular weights above 300 Da [25]. Molecular weight of CPX is 268.35 Da. CPX is sufficiently lipophilic and has approximately neutral pKa [26]. This is why CPX is suitable for buccal administration. Coating (protective) characteristics of the buccal film are also used in local treatment of oral mucosa, as they reduce pain at the affected site and thus increase the efficiency of the therapy [27]. During the application period, the film does not cause mouth discomfort or irritation and the patient is not limited in commonplace activities, such as speaking or food and liquid intake. Due to their high flexibility, small size and thickness, buccal films represent a modern dosage form with high patient compliance [28, 29].

Few studies have been conducted to determine the pharmacokinetic parameters of CPX. Authors focus more on studying the active compound concentration at the application site, but not on the amount of the drug absorbed into the systemic circulation and CPX pharmacokinetic parameters. Penetration after a single application of 8% CPX nail lacquer through the stratum corneum of pig skin, the keratin of cow horn, sheep/bovine hooves, and a human toenail model was assessed *in vitro* [30–33]. *In vivo* pharmacokinetic studies of CPX were carried out in rabbits after a single intravenous or vaginal administration of 15 mg kg^{-1} of CPX [34]; in rabbits and dogs after a topical application of 2–5 mg kg^{-1} and 2 mg kg^{-1} , respectively; in dogs and rats after a peroral administration of 10–15 mg kg^{-1} and 1 mg kg^{-1} , respectively; in dogs after an intravenous administration of 15 mg kg^{-1} ; in beagle bitches after a vaginal administration of 1 mg kg^{-1} of 1% vaginal cream; in humans after a dermal application of 36–37 mg of 1% cream [22]; and in healthy volunteers after a daily application of 1% nail lacquer on toenails [35]. Pharmacokinetic parameters after oral administration of CPX have not been described so far, even though CPX exhibits advantageous properties for the local treatment of oral cavity infections (low resistance rate, suitable safety profile).

The aim of this study was to assess the pharmacokinetics of CPX after the buccal administration of mucoadhesive film prepared using the solvent casting method and thus contribute to the development of a new and modern therapeutic system intended for the local treatment of oral candidiasis. The mucoadhesive film is intended for local action and the released CPX passes into the gastrointestinal tract after ingestion. However, the drug can be released locally into the oral cavity or pass into systemic circulation. No data are published about the CPX penetration through the buccal mucosa and its absorption. The systemic concentration data may help to explain the behaviour of CPX after mucoadhesive administration. Moreover, an HPLC method suitable for determination of CPX (Fig. 1a) and its derivative in blood plasma was developed and validated as a part of the experiment. The employed analytical method is based on the extraction of CPX into the organic phase. 6-cyclohexyl-4-methyl-2H-pyran-2-on was used as an internal standard (IS, Fig. 1b). Considering validation parameters, linearity and range, accu-

racy, precision, specificity, detection limit, and quantification limit were determined.

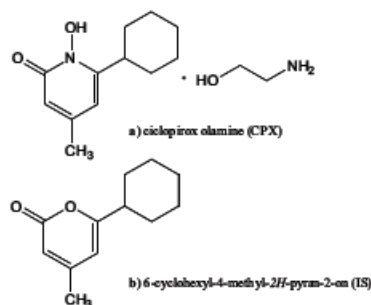


Fig. (1). Chemical structures of (a) ciclopirox olamine and (b) 6-cyclohexyl-4-methyl-2H-pyran-2-on (IS).

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Materials/Chemicals and Reagents

Ciclopirox olamine (Sanofi Aventis Deutschland GmbH), an internal standard (6-cyclohexyl-4-methyl-2H-pyran-2-on; a reference standard according to European Pharmacopoeia; Sigma-Aldrich), β -glucuronidase from *Helix pomatia* (Merck Millipore), carboxymethylcellulose sodium (CMC, Blanose type 7LF-PH, Ashland Aqualon Functional Ingredients). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.2. Preparation of Mucoadhesive Oral Films

Mucoadhesive oral films were prepared using the solvent casting method. The composition of the dispersion prepared for casting was 1.8% CPX, 4% carmellose sodium (CMC) and 3% glycerol. Purified water was used as a solvent (ad 100%). CPX was dissolved in a mixture of water and glycerol and CMC was added to the drug suspension. The dispersion was mixed using a paddle stirrer (RZR 2021, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Germany) at 500 rpm for 2 h and was allowed to swell for another 72 h. Afterwards, the mixture was homogenized prior to casting via the paddle stirrer for 30 min and then by Ultra-turrax® (type T 25 basic, IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany) at 13000 rpm for 2 min. Using an automatic pipette (Transerpette S, range 1 to 10 mL, Brand, United Kingdom), 18 mL of the prepared uniform dispersion was cast into a round plastic mold (63 mm in diameter) and solvent was left to evaporate at room temperature for approximately 48 hours. Subsequently, an additional 9 mL of homogenized dispersion was added to the same molds and dried at room temperature. After drying, three different shapes of samples (25x25 mm, 10x40 mm and 15 mm in diameter) were punched from the prepared films for *in vitro* testing. Mucoadhesive oral films of the following parameters were used for *in vivo* testing: diameter 15 mm; drug content 20.95 (20.46; 21.44) mg of CPX, weight 120.3 (117.6; 123.0) mg, thickness 506 (457; 555) μ m.

2.3. In vitro Release Study

CPX dissolution rate was evaluated at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using a paddle apparatus (SOTAX AT 7, SOTAX, Aesch, Switzerland) at 50 rpm and software for dissolution measurement (WinSOTAX plus, SOTAX, Aesch, Switzerland). Phosphate buffer of pH 6.8 was employed as a dissolution medium in a volume of 500 mL. Amount of released drug was measured online (via a pump which sample subsequently returned back into the medium) in 15 min intervals using UV/VIS spectrophotometer (Lambda 25, PerkinElmer®, Waltham, USA) at 310 nm and the dissolution rate of CPX was evaluated.

2.4. Treatments of Animals

Six clinically normal 6-month-old outbred New Zealand White SPF rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), strain HsdI: NZW, Harlan Laboratories Inc., Belton, UK) were included in the study. Males were included in the experiment to exclude the hormonal and immune changes during estrus and subsequent possibility of result biasing. The average weight of the rabbit was 2.44 (2.34; 2.54) kg. The rabbits were housed in the accredited experimental facility of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, under controlled conditions (temperature $20.0\text{--}21.5^\circ\text{C}$, humidity 55-60%, 14 hours of light and 10 hours of darkness). Rabbits were fed a timothy-based pelleted diet and meadow hay. Water was available ad libitum. The rabbits were acclimated to the facility for 6 weeks after their arrival and were habituated to handling prior to the initiation of the study. All rabbits were clinically examined, including a detailed oral cavity examination. The rabbits were healthy without any yeast infection present. The animals were housed under the agreement of the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and *in vivo* studies were approved by project No. SI-2012.

2.5. Blood Sampling and CPX Administration

Four mucoadhesive films were applied orally under inhalation anesthesia. Time interval for each mucoadhesive film application varied from 10-20 s. All four patches were attached on oral mucosa within 60 s. The patches were attached with rabbit buccal mucosa along the blood sample process. The blood samples from *a. auricularis centralis* in a volume of 2.0 mL were collected into tubes containing 0.1 mL of heparin using a 25 gauge needle at 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h after film application. The blood samples were immediately centrifuged (10 minutes, 4000 g) and stored at -20°C until analysis, performed within 48 hours of extraction. The animals were allowed to eat and drink during the experiment.

2.6. Assay Procedure for Plasma Levels

To determine the plasma concentration of total CPX (sum of parent CPX and glucuronide derivative), 1.0 mL of 0.5 M phosphate buffer of pH 4.7 and 15 μ L of β -glucuronidase (30 U mL^{-1}) were added to the 1.0 mL of plasma. The mixture was incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. A solution of IS in methanol at a concentration of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ was prepared and 1200 μ L of this solution was added into the samples. The samples were vortexed and left to stand for 5 min. CPX was extracted via two-step extraction using 2×3 mL

of hexane. 5.0 mL of the organic phase was evaporated to dryness in a vacuum dryer at 40°C. The dried residue was dissolved in 500 µL of the mobile phase. The samples were then analyzed by HPLC. The procedure for the determination of parent CPX did not include a step of hydrolysis with β-glucuronidase.

2.7. Chromatographic Conditions

An Agilent HP 1260 high-performance liquid chromatograph (Agilent Technologies) equipped with a quaternary pump, an autosampler, and a diode array detector was used for the assessment. A Purospher® RP-18 endcapped column (4.6x250 mm; 5 µm) with a guard column (Merck) was utilized. The mobile phase contained a mixture of acetonitrile and 20 mM phosphoric acid with 500 µM EDTA (68:32; v/v). The flow rate and injection volume were 1 mL min⁻¹ and 20 µL, respectively. All analyses were performed at 30°C and the spectra were taken at a wavelength of 304 nm. Before the analysis, the column was prewashed with mobile phase for 2.5 h to avoid the interaction of N-hydroxypyridone group of CPX with the stationary phase. The determination of CPX in the samples was performed using a calibration curve of the dependency of the CPX to IS area ratio on the CPX concentration.

2.8. Statistical Analyses

Data were ordered into the spreadsheets of MS Excel 2007 (Microsoft, WA) for the estimation of the pharmacokinetic parameters by non-compartmental analysis. For calculation of descriptive statistics, values lower than the limit of quantification (LOQ) were replaced by ½ LOQ. This rule was not applied to the first sampling point (these values have been replaced by zero). Values lower than LOQ were not used for the calculation of pharmacokinetic parameters. Pharmacokinetic parameters: maximum drug plasma concentration (c_{max}), time to reach c_{max} (t_{max}), elimination half-life ($t_{1/2}$), area under the plasma concentration-time curve area from time 0 to the last measured concentration above the LOQ (AUC_{0-t}), area under the plasma concentration-time curve from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$), terminal elimination rate constant (k_d), apparent clearance (Cl/F), apparent volume of distribution (V_d/F), mean residence time (MRT) were calculated for CPX after the administration of the tested mucoadhesive film with CPX at an average dose of 34.4 mg kg⁻¹. The c_{max} and t_{max} after administration were derived directly from the raw concentration-time data. The pharmacokinetic parameters ($t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} , k_d , Cl/F V_d/F , MRT) were calculated by non-compartmental analysis using Kinetica 4.4. (Thermo Electron). The area under the concentration-time curve (AUC_{0-t}) was calculated by the linear trapezoidal rule from time zero to the last sampling which exceeded the limit of quantification (LOQ). The AUC from time zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was calculated as $AUC_{0-t} + AUC_{extra}$, the extrapolated value from time of the last sampling point until infinity. The calculation is based on the linear regression of logarithmic transformation of the last data points of the curve. The elimination rate constant (k_d) was calculated by regression analysis of log-transformed terminal plasma concentration data over time. The half-life of elimination ($t_{1/2}$) was calculated as $\ln(2)/k_d$. The mean residence time (MRT) was calculated as $AUMC/AUC$, where AUMC is the area

under the first moment curve calculated by the linear trapezoidal rule.

Descriptive statistics for CPX concentrations and pharmacokinetic parameters (arithmetic mean and its confidence interval CI, standard deviation SD, relative standard deviation RSD, median, retransformed mean and its CI, maximum, minimum) were calculated. All statistical parameters were evaluated for a level of significance of $p = 0.05$ and a number of samples $N = 6$. The results are given as an arithmetic or retransformed mean (lower limit of CI; upper limit of CI). The retransformed mean was calculated using exponential data transformation for each variable. Transformation is suitable for the distribution of data, which differs from a normal one. In this case, a retransformed mean is a better measure of central tendency than arithmetic mean. Statistical evaluation of data was carried out using QC-Expert 3.2. (TriLoByte).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

The aim of the study was to determine pharmacokinetic parameters after the application of newly developed mucoadhesive films containing CPX as an active ingredient.

To evaluate the pharmacokinetic parameters, a simple isocratic chromatographic method for CPX determination in blood plasma using IS was developed and validated. The calibration curve was expressed as a dependence of the peak area ratio of CPX to IS on the concentration of CPX. The calibration curve was linear over the 0.25-10 µg mL⁻¹ concentration range, $R^2 > 0.99$. The results of method validation are summarized in Tables 1 and 2. Interday precision was determined by repeating the analysis of the calibration samples on various days with one repetition each day. The precision of the method, based on the intraday variability, was expressed as a repeated analysis of the calibration samples in the given day. Interday and intraday precisions were given as a relative standard deviation (RSD) in %. The values of interday and intraday precision were 3.1-14.7% and 3.3-8.0%, respectively. Accuracy of the method was determined by comparing the assessed concentration of CPX with the nominal concentration of CPX in analyzed samples. Accuracy of the method, expressed as a percentage of recovery, was 88.5-104.6% and 89.5-99.7% for interday and intraday assays, respectively. Precision and accuracy values were acceptable in accordance with ICH Guidelines in the entire concentration range [36].

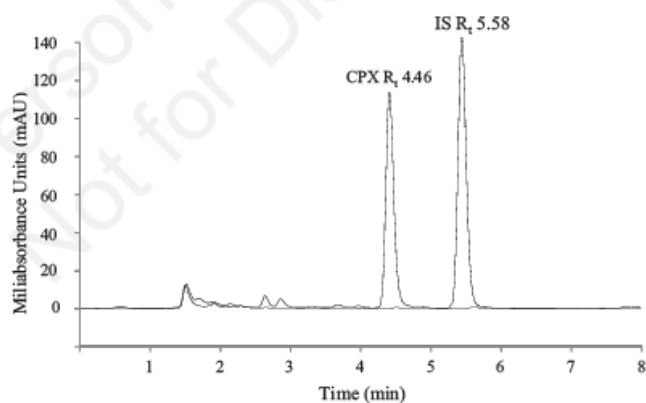
The selectivity of the method was proved by comparing the chromatogram of endogenous rabbit plasma and plasma with a known addition of CPX ($c = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and IS ($c = 3 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2). No interference between CPX ($R_t = 4.46$) or IS ($R_t = 5.58$) and endogenous plasma components was observed during the analysis (8 min). The determination of the quantification limit (LOQ) was based on a signal-to-noise approach, by comparing measured signals from the samples with known low concentrations of analyte with those of the blank samples and by establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably quantified. Signal-to-noise ratio was 10:1 and the LOQ value was 0.02 µg mL⁻¹. Detection limit was assessed as LOQ/3 and its value was 0.007 µg mL⁻¹.

Table 1. Validation parameter calculation for interday assay (N = 5).

Nominal Value ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovered Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Recovery (%)
0.25	0.22	0.033	14.7	88.5
0.5	0.48	0.056	11.8	95.0
1	0.99	0.098	9.9	98.3
2	1.95	0.103	5.3	97.3
3	2.88	0.157	5.5	95.8
5	4.89	0.205	4.2	97.4
8	8.39	0.261	3.1	104.6
10	10.33	0.683	6.6	102.9

Table 2. Validation parameter calculation for intraday assay (N = 5).

Nominal Value ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovered Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Recovery (%)
0.5	0.45	0.015	3.3	89.5
2	1.95	0.074	3.8	97.0
5	4.74	0.379	8.0	94.8
8	8.04	0.308	3.8	99.7

Fig. (2). Chromatograms of the rabbits' plasma samples; blank plasma (—) and plasma after the addition of CPX ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and internal standard (IS; $3 \mu\text{g mL}^{-1}$); (---).

Following the method validation, the pharmacokinetic parameters of CPX were calculated in 6 New Zealand White SPF rabbits after the buccal application of four mucoadhesive films prepared *via* solvent casting method. Rabbits are useful as human models for buccal delivery and have been used for intraoral delivery of several drugs (e.g. fenretidine, cyclosporin A, verapamil) [37-39]. Each film contained 20.95 (20.46; 21.44) mg of CPX and the total administered dose was 34.4 (33.0; 35.9) mg kg^{-1} . The plasma values of total and parent CPX, determined after 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h

after film application, are presented in Tables 3 and 4. The obtained pharmacokinetic parameters are shown in Tables 5 and 6. With respect to topical administration, which is mostly used in clinical practice, detailed pharmacokinetic parameters of CPX remain to be determined. Mucoadhesive films were placed onto the buccal mucosa. Oral cavity examination was regularly monitored for the film displacement and film dissolution. All the films dissolved continuously to the gelatinous form and then dissolve completely. None of the films were swallowed. Salivary drainage was not avoided

Table 3. Descriptive statistics of total ciclopirox olamine plasma concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in 6 healthy New Zealand White rabbits at selected time points following single CPX administration (34.4 mg kg^{-1}).

Total CPX	Time (h)	N	Arithm. Mean	95% Confidence Interval		SD	RSD (%)	Median	Retransformed Mean	Min	Max
	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	3.80	3.00	4.59	0.76	20.0	3.97	3.86	2.82	4.75	
2	6	5.14	2.72	7.55	2.30	44.8	5.77	5.45	2.37	7.48	
4	6	2.97	1.08	4.86	1.80	60.7	2.92	2.93	1.02	4.95	
6	6	2.76	1.40	4.11	1.29	46.8	2.93	2.78	1.30	4.39	
8	6	2.05	1.17	2.93	0.84	40.9	1.89	1.89	1.27	3.47	
12	6	0.85	0.40	1.30	0.43	50.6	0.84	0.86	0.21	1.44	

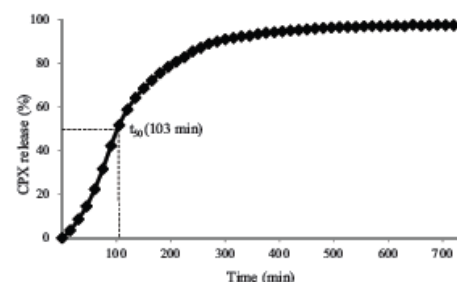
Table 4. Descriptive statistics of parent ciclopirox olamine plasma concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in 6 healthy New Zealand White rabbits at selected time points following single CPX administration (34.4 mg kg^{-1}).

Parent CPX	Time (h)	N	Arithm. Mean	95% Confidence Interval		SD	RSD (%)	Median	Retransformed Mean	Min	Max
	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	1.58	1.20	1.97	0.37	23.2	1.51	1.53	1.13	2.23	
2	6	1.71	0.79	2.63	0.87	51.2	1.94	1.74	0.66	2.89	
4	6	0.56	0.19	0.93	0.35	63.4	0.50	0.50	0.15	1.19	
6	6	0.26	0.10	0.42	0.15	57.7	0.23	0.23	0.12	0.54	
8	6	0.24	0.07	0.41	0.16	67.4	0.21	0.20	0.08	0.53	
12	6	0.06	-0.01	0.14	0.07	117.7	0.03	0.04	0.01	0.17	

as it could adversely affect the rabbit health. The mucoadhesive films possessed parameters of currently used films thus obtained pharmacokinetic parameters reflect an actual reality.

So far only scarce data for the pharmacokinetic parameters of CPX is available in literature. Moreover, these data were mostly obtained from studies on different species, dosage forms, routes of administration, and doses than in the presented work. Thus, the direct comparison of the pharmacokinetic parameters is problematic.

The experiment demonstrated that time to reach the maximum plasma concentration (t_{max}) in buccal administration of $34.4 (33.0; 35.9) \text{ mg kg}^{-1}$ of CPX was 1.7 (1.1; 2.2) h. Maximum plasma concentration c_{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) CPX in rabbit plasma reached $5.73 (4.18; 7.28) \mu\text{g mL}^{-1}$ and $2.13 (1.69; 2.57) \mu\text{g mL}^{-1}$ for total and parent CPX, respectively. According to the literature, t_{max} after the intravenous and vaginal administration of 15 mg kg^{-1} of CPX is 0.167 h and 1 h, respectively [34]. The slightly longer t_{max} after buccal application can be caused by the dosage form itself, as the mucoadhesive film prolongs drug release. Prolonged release of CPX was also confirmed by *in vitro* determination of CPX release from mucoadhesive films using a paddle dissolution apparatus (Fig. 3). The results showed that 50% of CPX is released from the dosage form after 103 min, which is consistent with the results of *in vivo* study.

**Fig. (3).** *In vitro* release of CPX from mucoadhesive oral films.

After the buccal administration of 34 mg kg^{-1} of CPX, $\text{AUC}_{0-\infty}$ detected for total and parent CPX was $2731 (1663; 3799) \mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}$ and $430 (281; 578) \mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}$, respectively. $\text{AUC}_{0-\infty}$ for total CPX was $64.4 (59.3; 69.4) \mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}$ after the vaginal administration of 15 mg kg^{-1} [34]. The bioavailability of the active ingredient seems to be considerably higher after the buccal administration, considering the determined value of $\text{AUC}_{0-\infty}$. Unfortunately, absolute bioavailability cannot be approximated from our data, since

Table 5. Total cyclopirox olamine Pharmacokinetic Parameters.

Animal	c_{max} ($\mu\text{g mL}^{-3}$)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-4} ($\mu\text{g mL}^{-2} \text{min}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g mL}^{-2} \text{min}$)	k_{el} (h^{-1})	Cl/F (mL/min)	V_d/F (L)	MRT (min)
Rabbit 1	6.55	2	1.4	2273	2298	0.50	37	4	278
Rabbit 2	4.99	2	3.6	2582	3084	0.19	28	9	422
Rabbit 3	4.31	1	34.3	1121	4603	0.02	18	54	2976
Rabbit 4	4.02	1	7.2	1162	1713	0.10	49	31	625
Rabbit 5	7.04	2	3.2	2239	2457	0.22	34	9	336
Rabbit 6	7.48	2	2.8	2085	2232	0.24	38	9	299
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Arithmetic mean	5.73	1.7	8.8	1910	2731	0.21	34	19	822
95% CI	4.18	1.1	4.5	1263	1663	0.04	23	-1	-292
	7.28	2.2	22.1	2558	3799	0.38	45	40	1937
SD	1.48	0.5	12.7	617	1018	0.16	10	19	1063
RSD (%)	26	31	145	32	37	77	31	99	129
Median	5.77	2.0	3.4	2162	2378	0.21	35	9	379
Retransformed mean	5.75	1.9	3.8	2067	2465	0.18	34	11	374
95% CI	4.17	1.2	1.9	1255	1888	0.06	23	6	289
	7.28	2.1	10.8	2476	3694	0.38	45	33	708
Minimum	4.02	1.0	1.4	1121	1713	0.02	18	4	278
Maximum	7.48	2.0	34.3	2582	4603	0.50	49	54	2976

Legend: c_{max} , maximum drug plasma concentration; t_{max} , time to reach maximum drug concentration; $t_{1/2}$, half-life of the drug; AUC_{0-4} , area under the concentration-time curve to the last sampling point; $AUC_{0-\infty}$, area under the concentration-time curve from 0 to infinity; k_{el} , terminal elimination rate constant; Cl/F, apparent clearance; V_d/F , apparent volume of distribution; MRT, mean residence time.

extrapolated c_0 after buccal administration does not truly reflect c_0 after intravenous administration. Comparing the values of $AUC_{0-\infty}$ for total and parent CPX, values for total CPX are considerably higher. This can be explained by the relatively rapid metabolism of CPX to glucuronide. Rapid glucuronidation of CPX after buccal administration is also apparent from the proportion of the concentrations of parent to total CPX. This is about 40% in 0-4 hours after administration and about 7-20% between 4 and 12 h after administration. This fact is also consistent with published literature, where the proportion of the concentrations of parent to total CPX was 50% after 0.167 h and about 15-20% at the fourth hour after the intravenous administration of 15 mg kg^{-1} of CPX. The proportion of parent CPX to total CPX was always about 15-20% after vaginal administration [34]. The above-stated data confirm that cyclopirox olamine is rapidly transformed into its glucuronide derivatives. Although the buccal route of administration bypasses first pass elimination, the significant amount of drug may be swallowed and thus enter liver. For this reason, glucuronide metabolites may be formed and present in plasma. Nevertheless, even if some amount of drug would be absorbed from oral cavity, the drug enters the liver then and phase II metabolites (including glucuronides) may be also present in the blood.

The retransformed mean value for apparent volume of distribution (V_d/F) detected for total CPX was 11 (6; 33) L. A significantly higher value of V_d/F was obtained for parent CPX - 59 (30; 120) L, in accordance with higher lipophilicity of non-metabolized CPX when compared to its glucuronide derivative. Exponential data transformation was used for the statistical evaluation of $t_{1/2}$ and MRT for total CPX. The values of $t_{1/2}$, k_{el} , MRT and Cl/F for total CPX were 3.8 (1.9; 10.8) h, 0.21 (0.04; 0.38) h^{-1} , 374 (289; 708) min, and 34 (23; 45) mL min^{-1} , respectively. These results suggest sustained release of CPX from mucoadhesive oral films and therefore sustained plasmatic concentration. This could imply for longer effect and convenient dosing schedule. After vaginal administration of CPX to rabbits at the dose 15 mg kg^{-1} , the values of $t_{1/2}$, MRT and Cl/F for total CPX were 2.22 (2.07; 2.37) h, 196 (165; 227) min and 10.92 (9.96; 11.88) mL min^{-1} , respectively [34]. The exponential data transformation was also used for the statistical evaluation of Cl/F and MRT for parent CPX. Values of $t_{1/2}$, k_{el} , MRT and Cl/F for parent CPX were 3.7 (1.8; 5.5) h, 0.22 (0.12; 0.32) h^{-1} , 222 (207; 288) min and 201 (146; 293) mL min^{-1} , respectively.

The obtained plasma concentration and the consequently determined pharmacokinetic parameters exhibit a high level

Table 6. Parent ciclopirox olamine Pharmacokinetic Parameters.

Animal	c_{max} ($\mu\text{g mL}^{-3}$)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{min}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{min}$)	k_e (h^{-1})	Cl/F (mL/min)	V_d/F (L)	MRT (min)
Rabbit 1	2.89	2	2.4	647	673	0.29	125	26	259
Rabbit 2	1.99	2	2.6	363	399	0.26	210	48	204
Rabbit 3	2.23	1	6.7	340	438	0.10	192	110	462
Rabbit 4	1.67	1	4.4	200	231	0.16	364	139	224
Rabbit 5	1.89	2	2.0	378	422	0.36	199	34	211
Rabbit 6	2.13	2	4.1	395	416	0.17	202	71	218
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Arithmetic mean	2.13	1.7	3.7	387	430	0.22	215	71	263
95% CI	1.69	1.1	1.8	235	281	0.12	132	24	158
	2.57	2.2	5.5	539	578	0.32	298	119	367
SD	0.42	0.5	1.8	145	141	0.10	79	45	100
RSD (%)	20	31	48	37	33	43	37	63	38
Median	2.06	2.0	3.3	370	419	0.22	201	60	221
Retransformed mean	2.04	1.9	3.2	367	418	0.22	201	59	222
95% CI	1.78	1.2	2.1	248	288	0.12	146	30	207
	2.55	2.1	5.5	538	579	0.33	293	120	288
Minimum	1.67	1.0	2.0	200	231	0.10	125	26	204
Maximum	2.89	2.0	6.7	647	673	0.36	364	139	462

Legend: c_{max} , maximum drug plasma concentration; t_{max} , time to reach maximum drug concentration; $t_{1/2}$, half-life of the drug; AUC_{0-t} , area under the concentration-time curve to the last sampling point; $AUC_{0-\infty}$, area under the concentration-time curve from 0 to infinity; k_e , terminal elimination rate constant; Cl/F, apparent clearance; V_d/F , apparent volume of distribution; MRT, mean residence time.

of variability, even though a highly homogenous set of animals was used for the experiment. The variability observed in measured concentrations signifies that the absorbed dose of the drug is considerably variable. This corresponds with the expectations of the buccal route of administration, as there is a possibility of interindividual variability in the quality of film adhesion to oral mucosa. Moreover, gradual erosion of the matrix and subsequent degradation of the mucoadhesive film can occur, depending on the frequency of food and water intake. Considering the above-stated information, data transformation was used to estimate the mean values. The retransformed mean values were given in substantiated cases.

The presented results show that the incorporation of CPX into the mucoadhesive films does not represent common bolus administration. The active ingredient was absorbed over a longer period and the values of mean residence time and apparent clearance were significantly higher than after vaginal application [34]. Considering the pharmacokinetic data, it can be assumed that the application of medicated single-layer mucoadhesive films composed of carmellose sodium and glycerol leads to the prolonged release of the drug without any further adjustments or additional substances. This effect is desired in the treatment of fungal infections.

4. STANDARD PROTOCOL ON APPROVALS, REGISTRATIONS, PATIENT CONSENTS & ANIMAL PROTECTION

The clinical investigation was conducted according to the declaration of the Helsinki principles. The animals were housed under the agreement of the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and *in vivo* studies were approved by project No. S1-2012.

CONCLUSION

The pharmacokinetic study performed after yet unpublished oral administration of CPX in the form of the mucoadhesive films proved the significantly prolonged drug release compared to vaginal application. This effect is beneficial for the treatment of fungal infections and is a result of administration of sustained release drug dosage form. The bioavailability of buccally applied CPX seems to be higher compared to vaginal administration. However, high interindividual variability was observed, probably as a result of the oral route of administration itself. Moreover, it is much more difficult to ensure the correct fixation of the film on the oral mucosa in experimental animals than in humans. Despite this,

the experiment suggests that oral mucoadhesive film may be a valuable alternative ciclopirox olamine administration.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (research project No. NT14477).

PATIENT CONSENT

Declared none.

REFERENCES

- Regezi, J.A.; Sciubba, J.J.; Jordan, R.C.K. Oral pathology: clinical pathologic correlations, 6th ed.; Elsevier Health Sciences: St. Louis, 2012.
- Arzmi, M.H.; Alshwaimi, E.; Wan Harun, W.H.A.; Razak, F.A.; Farina, F.; McCullough, M.I.; Cirillo, N. Gaining more insight into the determinants of candida species pathogenicity in the oral cavity. *Eur. J. Inflam.*, 2014, 12(2), 227-235.
- Cannon, R.D.; Holmes, A.R.; Mason, A.B.; Monk, B.C. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *J. Dent. Res.*, 1995, 74(5), 1152-1161.
- Samaranayake, L.P.; Keung Leung, W.; Jin, L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology*, 2009, 49(1), 39-59.
- Marsh, P.D.; Martin, M.; Lewis, M.; Williams, D. Oral Microbiology, 5th ed.; Churchill Livingstone Elsevier: Oxford, 2009.
- Scardina, G.A.; Fuca, G.; Ruggieri, A.; Carini, F.; Cacioppo, A.; Valenza, V.; Messina, P. Oral Candidiasis and Oral Hyperplastic Candidiasis: Clinical Presentation. *Res. J. Biol. Sci.*, 2007, 2(4), 408-412.
- Marsh, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 2006, 6(Suppl 1), S14.
- Jornet, P.L.; Camacho-Alonso, F.; Andujar-Mateos, P.; Sánchez-Siles, M.; Gómez-García, F. Burning mouth syndrome: Update. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 2010, 15(4), e562-568.
- Pappas, P.G.; Kauffman, C.A.; Andes, D.; Benjamin, D.K.; Calandra, T.F.; Edwards, J.E.; Filler, S.G.; Fisher, J.F.; Kullberg, B.-J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Reboli, A.C.; Rex, J.H.; Walsh, T.J.; Sobel, J.D. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, 48(5), 503-537.
- Braga, P.C.; Piatti, G.; Conti, E.; Vignali F. Effects of subinhibitory concentrations of ciclopirox on the adherence of *Candida albicans* to human buccal and vaginal epithelial cells. *Arzneimittel-Forschung*, 1992, 42(11), 1368-1371.
- Gupta, A.K.; Skinner, A.R. Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: a review. *Intern. J. Dermatol.*, 2010, 42(S1), 3-9.
- Cislo, M. Cyklopiroks-właściwości farmakologiczne i zastosowanie kliniczne. *Mikrologia Lekarska*, 2000, 7, 165-169.
- Plomer-Niezgodna, E.; Maj, I.; Hrynciewicz-Gwóźdź, A.; Czarnecka, A. Cyklopiroksolamina - nowe spojrzenie na mechanizm działania. Skuteczność działania. *Mikrologia Lekarska*, 2006, 13, 149-152.
- Gupta, A.K.; Plott, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. *Intern. J. Dermatol.*, 2004, 43(S1), 3-8.
- Hänel, H.; Raether, W.; Dittmar, W. Evaluation of fungicidal action *in vitro* and in a skin model considering the influence of penetration kinetics of various standard antimicrobials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988, 544(1), 329-337.
- Wolverton, S.E. *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*, 3rd ed.; Saunders Elsevier: Edinburgh, 2013.
- Felix, F.S.; do Lago, C.L.; Angnes, L. Determination of ciclopirox olamine in pharmaceutical products by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 2011, 32(8), 900-905.
- Makus, A. In: *Hydroxy-Pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis*; Shuster, S., Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1999; pp. 1-10.
- Hoffman, B.D.; Hanauke-Abel, H.M.; Flint, A.; Lalande, M.A. A new class of reversible cell cycle inhibitors. *Cytometry*, 1991, 12(1), 26-32.
- Sakurai, K.; Sakaguchi, T.; Yamaguchi, H.; Iwata, K. Mode of action of 6-cyclohexyl-4-methyl-2(1H)-pyridone ethanolsaline salt (HOE 296). *Chemotherapy*, 1978, 24(2), 68-76.
- Schalka, S.; Nunes, S.; Gomes Neto, A. Comparative clinical evaluation of efficacy and safety of a formulation containing ciclopirox 8% in the form of a therapeutic nail lacquer in two different posologies for the treatment of onychomycosis of the toes. *An. Bras. Dermatol.*, 2012, 87(1), 19-25.
- Kellner, H.M.; Arnold, C.; Christ, O.E.; Eckert, H.G.; Herok, J.; Hornke, I.; Rupp, W. Studies on pharmacokinetics and biotransformation of the antimycotic drug ciclopiroxolamine in animals and man after topical and systemic administration. *Arzneimittel-Forschung*, 1980, 31(8A), 1337-1353.
- Semalty, M.; Semalty, A.; Kumar, G. Formulation and characterization of mucoadhesive buccal films of glipizide. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2008, 70(1), 43-48.
- Thakkar, P.P.; Soni, A.M.; Chaudhari, M.J.; Pandya, D.P.; Modi, D.A. Mucoadhesive buccal drug delivery system. *IJPRS*, 2012, 1(2), 360-369.
- Veullez, F.; Kalia, Y.N.; Jacques, Y.; Deshusses, J.; Buri, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2001, 51(2), 93-109.
- Neubert, R.H.H.; Gensbügel, C.; Jäckel, A.; Wartewig, S. Different physicochemical properties of antimycotic agents are relevant for penetration into and through human nails. *Pharmazie*, 2006, 61(7), 604-607.
- Nafee, N.A.; Ismail, F.A.; Boraie, N.A.; Mortada, L.M. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: *in vitro/in vivo* performance and effect of ageing. *Int. J. Pharm.*, 2003, 264(1), 1-14.
- Morales, J.O.; McConville, J.T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, 77(2), 187-199.
- Najafi, R.B.; Eghbali, M.; Peykanpour, M.; Mirzaei, H. Preparation and physicochemical evaluation of Nystatine mucoadhesive buccal film. *J. Rep. Pharm. Sci.*, 2013, 2(1), 25-31.
- Ceschin-Roques, C.G.; Hänel, H.; Pruja-Bougaret, S.M.; Luc, J.; Vandermader, I.; Michel, G. Ciclopirox nail lacquer 8%: *in vivo* penetration into and through nails and *in vitro* effect on pig skin. *Skin Pharmacol. Phys.*, 1991, 4(2), 89-94.
- Yang, D.; Chaumont, J.P.; Makki, S.; Millet-Clerc, I. Un nouveau modèle de simulation pour étudier la pénétration topique d'antifongiques en kératine dure *in vitro*. *J. Mycol. Med.*, 1997, 7(4), 195-198.
- Mertin, D.; Lippold, B.C. In-vitro Permeability of the Human Nail and of a Keratin Membrane from Bovine Hooves: Prediction of the Penetration Rate of Antimicrobials through the Nail Plate and their Efficacy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1997, 49(9), 866-872.
- Bayerl, T.M. In: *Hydroxy-Pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis*; Shuster, S., Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1999; pp. 36-38.
- Coppi, G.; Silingardi, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. *Farmaco.*, 1992, 47(5 Suppl), 779-786.
- Bohn, M.; Kraemer, K.T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2000, 43(4), S57-S69.
- Guideline, I.H.T. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). [http://www.ich.org/fileadmin/ Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) (Accessed March 29, 2016).
- Holpuch, A.S.; Phelps, M.P.; Desai, K.G.H.; Chen, W.; Koutras, G.M.; Han, B.B.; Warner, B.M.; Pei, P.; Seghi, G.A.; Tong, M.

108 *Current Drug Delivery*, 2017, Vol 14, No. 1

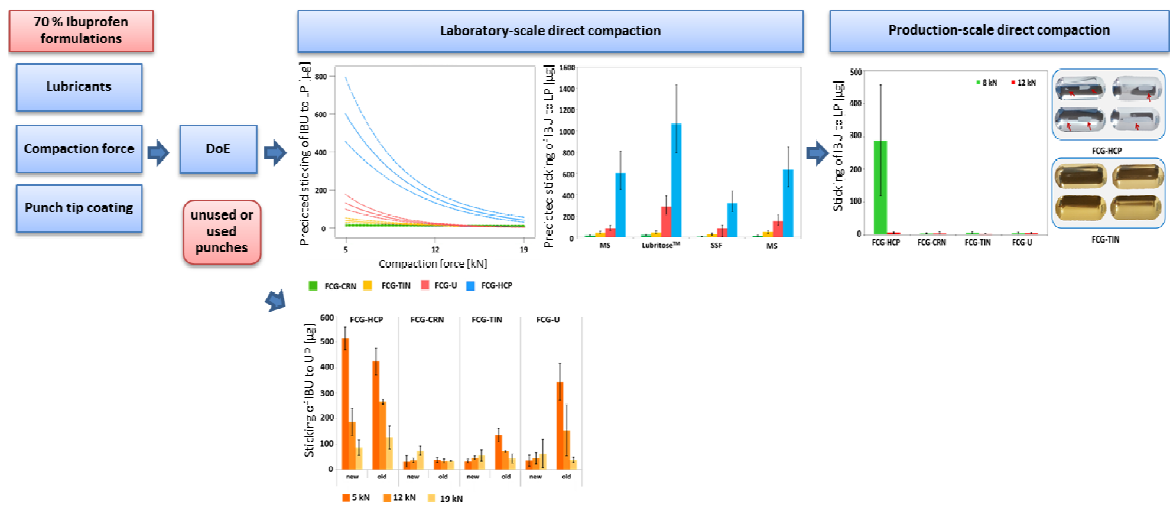
Lukášová et al.

- Border, M.B.; Fields, H.W.; Stoner, G.D.; Larsen, P.E.; Lu, Z.; Schwendeman, S.P.; Mallery, S.R. Evaluation of a mucoadhesive fenretinide patch for local intraoral delivery: a strategy to reintroduce fenretinide for oral cancer chemoprevention. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5), 1098-1105.
- [38] Mannila, J.; Järvinen, K.; Holappa, I.; Mätiläinen, L.; Auriola, S.; Jarho, P. Cyclodextrins and chitosan derivatives in sublingual delivery of low solubility peptides: A study using cyclosporin A, α -cyclodextrin and quaternary chitosan N-betainate. *Int. J. Pharm.*, 2009, 381(1), 19-24.
- [39] Dalí, M.M.; Moench, P.A.; Mathias, N.R.; Stetako, P.I.; Heran, C.L.; Smith, R.L. A rabbit model for sublingual drug delivery: Comparison with human pharmacokinetic studies of propranolol, verapamil and captopril. *J. Pharm. Sci.*, 2006, 95(1), 37-44.

Personal Use Only
Not for Distribution

AL-KARAWI, C., LUKÁŠOVÁ, I., SAKMANN, A. a LEOPOLD, C.S. Novel aspects on the direct compaction of ibuprofen with special focus on sticking. *Powder Technology*. 2017, **317**:370-380. doi: 10.1016/j.powtec.2017.05.014. (IF₂₀₁₅ = 2,759).

Grafický abstrakt





Contents lists available at ScienceDirect

Powder Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/powtec

Novel aspects on the direct compaction of ibuprofen with special focus on sticking



Claudia Al-Karawi^a, Ivana Lukášová^{a,b}, Albrecht Sakmann^a, Claudia S. Leopold^{a,*}

^a Division of Pharmaceutical Technology, University of Hamburg, Bundesstr. 45, 20146 Hamburg, Germany

^b Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2017

Received in revised form 28 April 2017

Accepted 6 May 2017

Available online 8 May 2017

Keywords:

Tableting

Ibuprofen

Sticking

Lubricants

Punch tip coating

Design of experiments

ABSTRACT

Tableting of sticking active pharmaceutical ingredients (APIs) may cause time-consuming and costly complications. Therefore, the aim of this study was to identify and to analyze critical factors influencing sticking of ibuprofen during direct compaction with a laboratory tableting set-up and to find the optimum settings for sticking reduction using a design of experiments (DoE) approach. Moreover, the influence of the tablet punch wear on the sticking tendency was evaluated. In addition, the applicability of the small-scale experiments to production-scale tablet manufacture was investigated. The results of the DoE revealed that "compaction force", "punch tip coating" and their interaction had the strongest impact on ibuprofen sticking to the punch tips. Furthermore, the wear of the punches had a pronounced influence on the anti-sticking properties of the different punch tip coatings. An additional minor influencing factor turned out to be the selection of the lubricant where as the lubricants had a significant effect on the disintegration time of the tablets. This observation was in contrast to the expectations resulting from the lubricant hydrophobicity. The findings of the laboratory-scale tableting experiments were confirmed by the experiments conducted on the production scale.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the most common and serious complications observed during tablet manufacture is the sticking of tablet formulations to the punch tip surfaces. Usually, sticking leads to a layer of material adhering to the punch tip surfaces. As a consequence, tablet production often has to be terminated and the resulting tablets, most of them characterized by rough surfaces and incomplete engravings, have to be discarded. In some extreme cases, the whole tablet may stick to the upper punch resulting in an unwanted second compaction of this tablet together with the next filling of the die. In other extreme cases, sticking of the whole tablet to the lower punch may lead to high take-off forces, which can either destroy the tablet or may push parts of the tablet or even the whole tablet over the sweep-off blade back to the filling station. In either case, serious damages to the tablet tooling and tablet press may be the consequence [1–3].

Often, complications in tableting of new active pharmaceutical ingredients (APIs) become apparent at the end of the drug development process, when tableting runs are conducted for the first time [4]. Yet, even with drugs that have already been on the market for a long time severe sticking issues may still be encountered, for example if slight adjustments during tablet manufacturing have to be made. Ibuprofen is a

widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), which is administered mainly orally in the form of tablets. The tableting of ibuprofen, however, is challenging because of its poor flowability and poor compactibility as well as its high sticking tendency to tablet tooling [1, 5, 6]. One of the assumed causes for its sticking tendency is its low melting point of 75–78 °C [1]. It is suggested that the interparticulate friction during compaction results in localized high temperature spots at the newly formed tablet surface in which melting of powder components with a low melting point is induced at the newly formed tablet surface. The subsequent rapid recrystallization resulting from the decrease of the compaction force after the punches pass the compression rolls is assumed to cause adhesion to the tablet tooling [7,8]. As a consequence of the poor tableting properties, granulation of ibuprofen powder formulations is often necessary [9–11]. To maintain and to improve the economic efficiency of the manufacturer however, direct compaction is preferred over an additional time- and energy-consuming granulation step [11,12].

To reduce or even avoid the sticking lubricants may be added to the tablet formulation to act as an anti-adherent [13,14]. Magnesium stearate is the most frequently used lubricant because of its efficient friction and sticking reducing properties and cost efficiency [13–15]. However, it is also known for its negative effects regarding tablet strength as well as its prolonging effect on tablet disintegration and drug release [14]. These complications become even more pronounced with prolonged powder blending time [16]. Moreover, magnesium stearate

* Corresponding author.

E-mail address: Claudia.leopold@uni-hamburg.de (C.S. Leopold).

is known to form eutectics with ibuprofen, consequently lowering its melting point and increasing its sticking tendency [8,17]. Sodium stearyl fumarate is often suggested as a good but expensive alternative to magnesium stearate because it exhibits similar lubrication properties with less chemical incompatibilities and a less pronounced prolonging effect on tablet disintegration [18]. Co-processed excipients such as Lubritose™ MCC, which consists of a dry binder and a lubricant, are becoming increasingly popular in the direct compaction of tablets because their blending time sensitivity is reduced and less processing steps are needed [19]. However, these relatively novel excipients have not yet been examined as thorough as traditional excipients and their benefits still need to be further investigated.

The use of punches with applied coatings represents another option to reduce sticking phenomena with additional benefits with regard to wear and corrosion resistance of the tooling [20–24]. The selection of the appropriate tooling for tableting a certain formulation can be difficult as coated tools are regarded as complex structured compound materials and their interaction with the material to be tableted is therefore difficult to predict [25,26]. There is a wide range of different punch coatings available on the market but only few have been systematically examined with regard to the reduction of sticking and wear. Costly trial-and-error tests are the result [4,23]. The most commonly used coating is hard-chromium (HCr), a low-cost coating produced by electroplating [27–29]. The anti-sticking properties of HCr punches, however, have been reported to be similar to or even worse than uncoated punches [3,24]. Alternatively, coatings applied by physical vapor deposition (PVD) such as titanium nitride (TiN) or chromium nitride (CrN) can be used [22,27,30]. The most prevalent PVD coating is TiN [31–33]. However, investigations showed that CrN may be a better option as coating material for industrial tooling than both TiN and HCr [27,31,34]. Especially the resistance against different types of tooling wear such as abrasion and corrosion plays a significant role in the designated application of the respective coating and has been subject of many studies [25,26,30,31]. However, the suitability of the coating materials for the specific requirements of tablet punches with respect to wear phenomena and their resulting effect on sticking has not yet been investigated.

Other attempts to reduce sticking of ibuprofen formulations involved the adjustment of tableting parameters. For example, the study by Aoki and Danjo showed that the reduction of the compaction speed and the increase of the compaction force reduces sticking of ibuprofen to tablet punches [35].

However, none of the mentioned influencing factors on API sticking have been investigated in combination with each other. Recently, Paul et al. developed an equation describing and predicting sticking kinetics for 24 different compounds including ibuprofen [36]. This equation is similar to the Hill equation and gives insight into the sticking kinetics and may help to predict the extent of sticking but is valid only for a certain formulation, compacted at a defined compaction force with preselected tooling and under preselected tableting conditions. In another recent study conducted by Paul et al., sticking of 24 compounds including ibuprofen was correlated with the surface area and particle size of the powders, tablet tensile strength, ejection force and take-off force [37]. It was found that the chemical diversity of the compounds may conceal the effects of most of these factors when considered individually. A partial least square (PLS) model, however, combining all these factors could be established to identify significant effects of these combined factors. Nonetheless, the study did not deal with the influence of different lubricants or punch tip coatings on punch tip sticking.

Therefore, the aim of the present study was to assess the effect of the above mentioned critical influencing factors on the sticking tendency of ibuprofen formulations during direct compaction and to look for possible synergistic effects of these factors. Three critical influencing factors were chosen for the investigation: the lubricant, the coating material of the punches and the applied compaction force. To identify possible

factor interactions, all factors had to be varied in relation to each other. To study the influences simultaneously while conducting a manageable amount of trials, a design of experiments (DoE) approach was applied. The wear resistance of the punch coatings and the respective impact on tablet formulation sticking was evaluated to detect the most suitable coating material for long-term use. To avoid costly and material-intensive trial-and-error runs on production rotary presses, the results of the small-scale laboratory experiments were evaluated for their applicability to production-scale tableting.

The objective of the study was to investigate the factors compaction force, lubricant, punch tip coating, punch tip wear and production-scale tableting on ibuprofen compaction with special focus on sticking.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ibuprofen 50 USP (IBU) was kindly donated by BASF (Germany), fumed silica (Aerosil® 200) by Evonik (Germany) and microcrystalline cellulose (MCC, Avicel® PH-102) by FMC BioPolymer (USA). Sodium stearyl fumarate (SSF, Lubripham® SSF) and Lubritose™ MCC (Lubritose™, a co-processed excipient produced by spray-drying, containing 98% MCC and 2% [w/w] glyceryl monostearate) were kindly provided by Lehmann & Voss (Germany). Glyceryl monostearate (GMS) was obtained from Alfa Aesar (USA) and magnesium stearate (MS) from Fagron (Germany).

An IBU powder formulation optimized for direct compaction was donated by BASF and was used for all production-scale tableting experiments. It was composed of 70% [w/w] IBU together with 0.5% MS as lubricant and MCC as dry binder. To meet the requirements for direct compaction, additional ingredients, which cannot be specified because of the confidentiality agreement with BASF, served as formulation optimizers.

Deminerallized water was used for tablet disintegration testing. In addition, to exclude differences in wettability caused by the different lubricants of the produced tablets, a 0.3% [w/v] surfactant solution containing polysorbate 80 from Caelo (Germany) was used for tablet disintegration testing. For HPLC analysis, acetonitrile of HPLC grade from VWR (USA), phosphoric acid 85% from Carl Roth (Germany) and Milli-Q® water from Merck Millipore (Germany) were used. HPLC grade methanol from VWR (USA) was selected to collect samples of IBU that was sticking to the punches.

2.2. Preparation of powder blends for direct compaction

All prepared powder blends contained 70% [w/w] of sieved (1000 µm mesh) IBU as the active pharmaceutical ingredient (API) and 0.5% [w/w] of sieved (315 µm mesh) Aerosil® 200.

For tablet manufacture, MS is usually used at concentrations between 0.25% and 5.0% [w/w] and SSF at concentrations between 0.5% and 2.0% [w/w] [38]. The concentration levels of the lubricants used in this study were chosen based on these commonly used concentration ranges. Additionally, to allow an accurate comparison between the lubricants, equal concentrations of the different lubricants in the formulations had to be applied. Because of the fixed composition of Lubritose™ (composed of 98% MCC and 2% GMS), formulations 1–3 (Table 1) consisted of 28.91% MCC [w/w] and 0.59% [w/w] of either GMS, MS or SSF. Formulation 4 contained 29.5% [w/w] Lubritose™ as dry binder and lubricant, which corresponded to a composition of 28.91% [w/w] MCC and 0.59% [w/w] GMS. MCC and GMS were chosen as excipients in formulation 3 to provide a physical mixture of its co-processed equivalent Lubritose™ in formulation 4 for comparative purposes. The composition of the powder blends to be compacted is displayed in Table 1. All formulation components were mixed in a Turbula blender (TZF equipped with a 2 l container, Willy A. Bachofen, Switzerland) at 72 rpm for 10 min, sieved (1120 µm mesh) to remove agglomerates

Table 1
Composition of the powder blends.

Formulation	Dry binder (% [w/w])	Lubricant (% [w/w])	Glidant (% [w/w])	API (% [w/w])
Formulation 1	28.91% Avicel® PH-102	0.59% MS	0.5% Aerosil® 200	70% ibuprofen 50
Formulation 2	28.91% Avicel® PH-102	0.59% SSF	0.5% Aerosil® 200	70% ibuprofen 50
Formulation 3	28.91% Avicel® PH-102	0.59% GMS	0.5% Aerosil® 200	70% ibuprofen 50
Formulation 4	29.5% Lubritose™ (co-processed excipient with a corresponding composition of 28.91% MCC and 0.59% GMS)		0.5% Aerosil® 200	70% ibuprofen 50

and mixed again for additional 14 min. Batch sizes of 1.5 kg were prepared.

Prior to tableting, the powder blends were stored in an air-conditioned room at a temperature of 21 °C and a relative humidity (RH) of 45% for at least 72 h.

50 kg of the IBU formulation optimized by BASF for direct compaction was delivered ready to use so that no further processing before tableting was needed.

2.3. Determination of bulk density and flow properties

The Hausner ratio, angle of repose and the flow rate through an orifice of 10 mm diameter (BEP2 flowability tester, Gopley Scientific, UK) were determined according to the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), chapter 2.9.36 "Powder Flow", to characterize the flow properties for the investigated powder blends. The Hausner ratio was calculated as the quotient of bulk and tapped volume. Bulk and tapped volumes were determined according to the Ph. Eur., chapter 2.9.34 "Bulk Density and Tapped Density of Powders", with a jolting volumeter (STAV 2003, J. Engelsmann, Germany). Prior the experiments, the temperature and the RH of each formulation was measured with a thermohygrometer (HygroClip HC2-HP28 equipped with a HygroPalm HP23, Rotronic Instruments, UK). The determinations of the powder properties were repeated four times.

2.4. Influence of lubricants on ibuprofen melting

The melting point of IBU and the influence of the lubricants on its melting point were determined by differential scanning calorimetry (DSC) with a DSC 1 (Mettler-Toledo, USA). Plain IBU and IBU together with 0.83% [w/w] of each lubricant were tested. Samples containing Lubritose™ consisted of IBU and 41.67% [w/w] Lubritose™ to ensure the same lubricant concentration. The samples (7 mg, $n = 5$) were heated at scan rates of 3 K/min in aluminum pans under nitrogen atmosphere. The onset of melting was determined using the STAR® evaluation software (Mettler-Toledo, USA).

2.5. Direct compaction on a laboratory scale

Tableting of formulation 1 was performed in single punch mode on an instrumented rotary tablet press (FETTE 102i, FETTE Compacting, Germany) in an air-conditioned room (21 °C and 45% RH) using round concave punches (FETTE Compacting, Germany) of 10 mm diameter (maximum recommended compaction force of 24.5 kN). The investigated punch tip coatings were chromium nitride (FCG-CRN), titanium nitride (FCG-TIN) and hard chromium (FCG-HCP). Uncoated punches (FCG-U) served as reference. All selected punches were new and unused. The Fill-O-Matic fill shoe was set to 50 rpm and the compaction speed to 30 rpm (dwell time = 21.83 ms). Compaction runs of 27 tablets each were performed. The first and the last tablet of each run were discarded. Tablet weight was set to 300 mg. Compaction force was adjusted to 5 kN, 12 kN and 19 kN, respectively. Each compaction run was performed in triplicate. After each compaction run, the upper (UP) and lower punches (LP) were removed from the tablet press to collect samples of sticking IBU from the respective punch surfaces. After

sampling, each punch was thoroughly cleaned from any remaining formulation residues for following compaction runs.

Additional tableting runs of formulations 1–4 were conducted under the same conditions three years after the initial experiments described above. The same punches as from the first experiments were selected except for the fact that over three years the punches were used for various other tableting trials. All punches were equally used for the same amount of compaction runs and mainly for the compaction of IBU formulations. The selection of the punch tip coating and the formulation as well as the adjustment of the compaction force to 5 kN, 12 kN (center point) and 19 kN, respectively, was conducted according to the DoE Design described below.

2.6. Direct compaction on a production scale

The IBU formulation optimized by BASF for direct compaction was tableted on an instrumented production-scale rotary tablet press (FE55, FETTE Compacting, Germany) with 60 punch stations using oblong 18 × 7 mm concave punches (maximum recommended compaction force of 69.1 kN). The investigated punch tip coatings were the same as described above. Compaction speed was set to 60,000 tablets/h (dwell time = 19.96 ms), pre-compaction force to 2 kN and tablet weight to 571 mg. Two compaction runs of 30,000 tablets each were performed. The main compaction force was adjusted to 8 kN or 12 kN, respectively. Because initial tableting runs already caused high sticking, the die table was kept constant at 21 °C by external cooling (ProfiCool Novus PCNO 10, National Lab, Germany), which was confirmed by infrared temperature measurements of the die table.

2.7. Quantification of ibuprofen sticking

To quantify the amount of sticking API to the punch surface, the stem of the punches was carefully cleaned and sticking IBU was collected by rinsing the surface with 10 ml methanol for HPLC analysis.

For the experiments on a laboratory scale, this procedure was repeated after each compaction run and both the UP and LP surfaces were rinsed to quantify the sticking IBU. For the experiments on a production scale, four UPs per coating were randomly selected after each compaction run. Prior to rinsing the surfaces, photographic images of the four selected punches were taken with a camera (8 megapixel Olympus E-300, Olympus K. K., Japan). However, rather bad images were captured with this camera. Therefore, the camera of the smartphone Samsung Galaxy S6 (16 megapixel Samsung Galaxy S6 camera, Samsung, South Korea), which provided higher quality images, was used to take the tablet tooling images.

The HPLC system (Chromaster, USA) was equipped with a LiChrospher® RP-18e (125 mm length × 4 mm width, 5 µm particle size) column (Merck, Germany). The mobile phase consisted of 60% acetonitrile and 40% Milli-Q® water adjusted to pH 2.0 with phosphoric acid. The flow rate was set to 2 ml/min and the injected sample volume was 20 µl. UV detection of IBU was performed at 214 nm. Validation of the HPLC method was conducted in-house. The limit of quantification was 0.01 µg/ml with a signal-to-noise ratio of 12:1 ($n = 6$). Absorbance was linear in the working concentration range between 0.3 µg/ml and 43 µg/ml ($R^2 = 0.9998$) tested with 5 freshly prepared IBU solutions

Table 2
Categorical and numerical factor levels (12 kN = center point).

Factor	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
A (Compaction force)	5 kN	19 kN	–	–
B (Punch tip coating)	Hard-chromium (FGC-HCP)	Uncoated (FGC-U)	Titanium nitride (FGC-TiN)	Chromium nitride (FGC-CrN)
C (Lubricant)	Glyceryl monostearate (GMS)	Sodium stearyl fumarate (SSF)	Magnesium stearate (MS)	Lubritose™ MCC (Lubritose™)

of different concentrations ($n = 3$). The specificity was tested with a plain IBU solution ($n = 3$), IBU solution ($n = 3$) with the used excipients (matrix) at the same ratio as illustrated in Table 1 with 5 dilutions within the linear concentration range of 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and a plain matrix solution. No significant peaks were detected with the plain matrix solution. The recovery of IBU calculated for the investigated concentration range was $99.21\% \pm 2.7\%$ for the plain IBU solution and $100.30\% \pm 3.40\%$ for the IBU solution with excipients (matrix). The variability of the HPLC method was examined with three sets of freshly prepared IBU solutions with added matrix at 5 different dilutions within the concentration range of 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 43 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The accuracy was within 95 and 105%, the precision for all concentrations was $<3.5\%$.

2.8. Characterization of the tablets

At least 24 h after compaction, tablet disintegration of 6 tablets per compaction run was examined with a disintegration tester (ZT 72, Erweka, Germany) according to the conditions of the Ph. Eur. for uncoated tablets in chapter 07 "Dosage Forms" and subchapter "Tablets". Additional disintegration tests were run using a 0.3% polysorbate 80

aqueous solution under the same conditions. The crushing strength, diameter and thickness of 5 tablets per compaction run were determined using a hardness tester (TBH 525 WTD, Erweka, Germany). The tablets were weighed (Mettler AT400, Mettler Toledo, USA) before determination of the crushing strength.

Tablet tensile strength was calculated using the equation for biconvex tablets published by Pitt et al. [39]:

$$\sigma_t = 10P / (\pi D^2) (2.84(t/D) - 0.126(t/W) + 3.15(W/D) + 0.01)^{-1} \quad (1)$$

where σ_t is the tablet tensile strength (N/m^2), P the crushing strength (N), D the tablet diameter (m), t the tablet thickness (m) and W the tablet central cylinder thickness (m).

The true density of 3 tablets compacted at 5 kN and 19 kN, respectively, and lubricated with either MS or SSF was determined with a helium pycnometer (AccuPyc 1330, Micromeritics Instrument Corp., USA). The tablet porosity was calculated using the following equation:

$$\text{Porosity} = 1 - \text{solid fraction} \\ = 1 - \text{apparent tablet density} / \text{true tablet density} \quad (2)$$

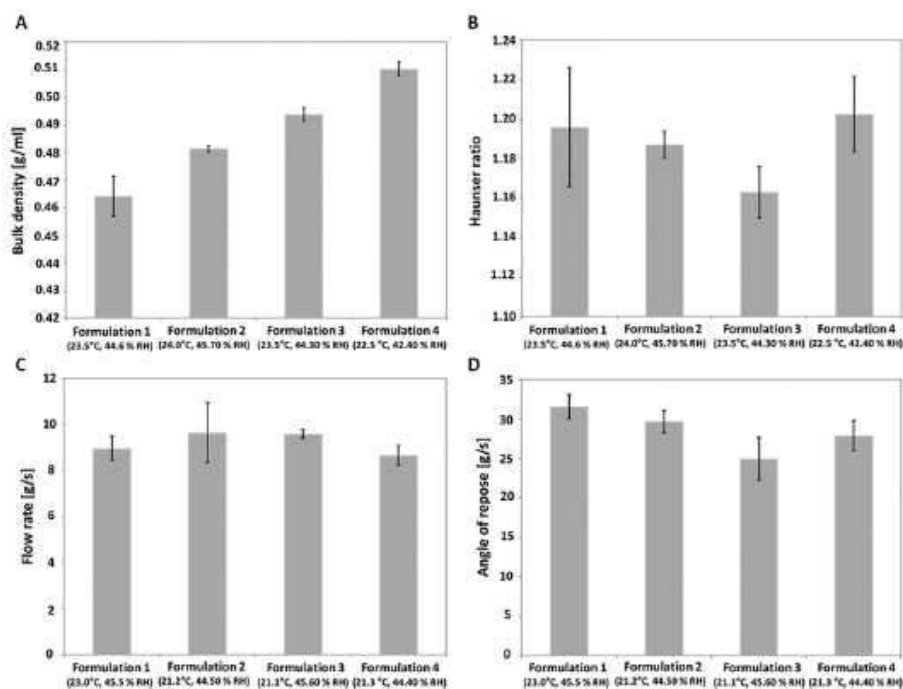


Fig. 1. (A) Bulk density, (B) Hausner ratio, (C) flow rate and (D) angle of repose for each laboratory-scale formulation at the respective bulk temperature and RH (means \pm SD, $n = 4$).

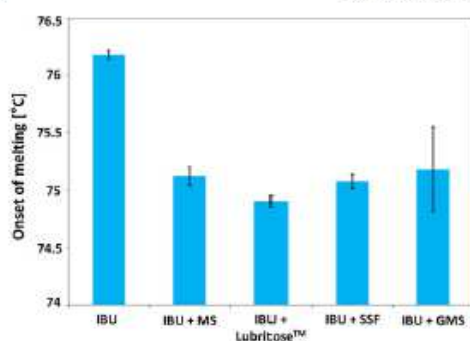


Fig. 2. Onset of melting of plain IBU and IBU together with 0.83% [w/w] of each lubricant (mean \pm SD, $n = 5$).

2.9. Design of experiments (DoE)

The statistical and factorial analysis was performed with the Design Expert® software (version 8.0.7.1; Stat-Ease, USA). For laboratory scale tableting of formulations 1–4, a D-optimal design was used to analyze the effects of the numerical factor compaction force and the two categorical factors punch tip coating and lubricant. The chosen factor levels for the design can be found in Table 2. A D-optimal design is a response surface method used as a tool for DoE where the computer-generated design is based on the D-optimality criterion to maximize the determinant of the Fisher Information Matrix (XX) [40,41]. D-optimal designs are commonly used when both categorical and numerical factors have to be combined in the DoE [40,41]. A combination of the point exchange and coordinate exchange algorithm were used to find the optimum design points. As a result, the design included 112 tests consisting of 80 vertex and 32 center points. Up to three different punches with the same coating were used for each compaction run to eliminate systematic errors.

Sticking to the UP and the LP surfaces, disintegration time and tensile strength were selected as responses. The IBU amount sticking to the punches was quantified after 27 tablets were produced by each punch. Because the first and the last tablet of each run was discarded, 25 tablets per compaction run were gathered for tablet characterization. From these 25 tablets per compaction run, 6 tablets were randomly chosen for tablet disintegration and 5 for the determination of the tensile strength. The mean of each response was calculated and used as the respective response for each of the 112 design points. The least significant differences (LSD) and the confidence intervals were calculated for the mean predictions.

Table 3
ANOVA of the DoE models based on the Box-Cox plot recommendation.

Model	Sticking to LP p-values	Sticking to IP p-values	Disintegration time p-values	Tensile strength p-values
Transformation	Square root	Natural logarithm	Natural logarithm	None
Model	Significant	Significant	Significant	Significant
A (Compaction force)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0019
B (Punch tip coating)	0.0001	0.0001	Nonsignificant	0.0009
C (Lubricant)	0.0038	0.0001	0.0001	0.0008
Interaction AB	0.0001	0.0001	Nonsignificant	Nonsignificant
Interaction AC	Nonsignificant	Nonsignificant	0.0001	Nonsignificant
Interaction BC	0.032	0.0136	Nonsignificant	Nonsignificant
A ²	Nonsignificant	Nonsignificant	0.0001	0.0001
Lack of fit	Nonsignificant	Significant	Nonsignificant	Nonsignificant
R ²	0.9230	0.9265	0.9482	0.4359
Adjusted R ²	0.9071	0.9113	0.9442	0.3921
Predicted R ²	0.8866	0.8916	0.9382	0.3336
Adequate precision	26.238	31.508	48.806	13.025

3. Results and discussion

3.1. Bulk density and flow properties of the differently lubricated powder blends

The measured properties of the powder formulations were similar to each other (Fig. 1). The maximum difference between the bulk density means of each formulation was 0.046 g/ml (difference between formulation 1 and 4). The Hausner ratios varied between the Ph. Eur. classifications of "good" (1.12–1.18) and "fair" (1.19–1.25) and therefore fulfilled the requirements for direct compaction. The flow rate was similar with all formulations and, according to the Ph. Eur. classification, the angles of repose indicated "good" to "excellent" flow properties. The different formulations were therefore considered to be suitable for direct compaction and to be comparable to each other with regard to the compaction-relevant properties.

3.2. Influence of lubricants on ibuprofen melting

The results of the DSC measurements are depicted in Fig. 2. The mean melting point of plain IBU was 76.18 °C as expected for racemic IBU [42]. The melting point of IBU was reduced when mixed the lubricants and the extent of melting point reduction was similar for all lubricants. IBU is known to form low-melting eutectic mixtures with stearate lubricants such as MS, calcium stearate, stearic acid and stearyl alcohol [17] which may lead to an increased sticking tendency [8]. Therefore, it is assumed that MS, GMS and SSF also reduced the melting point of IBU due to the formation of eutectic. The co-processing procedure of GMS with MCC in Lubritose™ did not significantly affect the melting point reduction of IBU caused by GMS.

3.3. Design of experiments model evaluation

Models for each response of the DoE were statistically evaluated and chosen based on an analysis of variance (ANOVA). The ANOVA was tested for significance of model, lack of fit (LOF), R², adjusted R² and predicted R². Non-significant model terms were excluded. Additionally, power transformations of the data were conducted according to the Box-Cox plot recommendation. If data transformation had to be carried out according to this recommendation, the ANOVA of the resulting model was tested again as described above. The ANOVA of the final response models are presented in Table 3.

3.4. Influence of the selected factors on ibuprofen sticking to the punch tips

The ANOVA of the responses sticking to the UP and IP tip revealed a significant model (Table 3). Furthermore, the models had high R²,

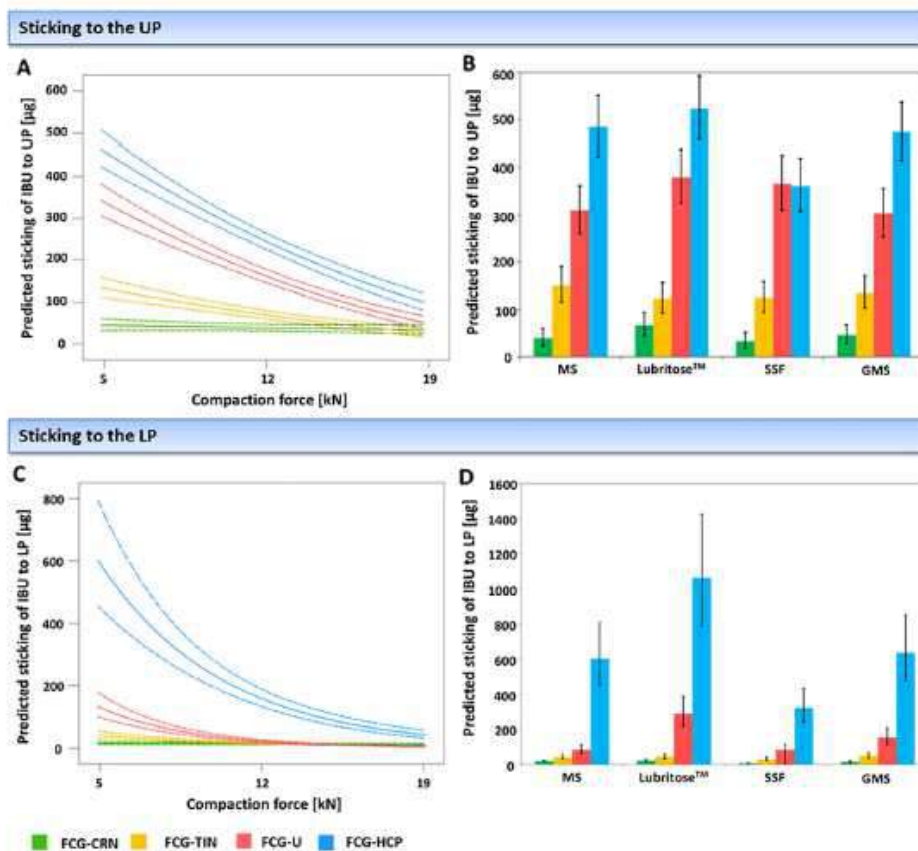


Fig. 3. (A, C) Two-factor interaction plots of the factor "compaction force" and "coating material" for the response "sticking IBU to the UP" and "sticking IBU to the LP", displayed with confidence bands. (B, D) Two-factor interaction plots of the factors "coating material" and "lubricant" at 5 kN compaction force for the response "sticking IBU to the UP" and "sticking IBU to the LP", displayed with LSD bars.

adjusted R^2 and predicted R^2 values as well as a high adequate precision value indicating good models for correlation analysis.

The lack of fit was not significant for the response sticking to the UP. Therefore, this model could be used for precise predictions as well. However, the lack of fit was significant for sticking to the LP indicating that the model did not fit the data sufficiently. This may be due to third-order effects of the factors, which could be detectable with additional experiments. This model is not suitable for precise predictions. However, the other statistical values establish its suitability for detection and explanation of the influences affecting sticking to the LP.

Sticking to the UP and LP tip depended on all selected factors. A significant two factor interaction was found between the compaction force and punch tip coating (AB) (Fig. 3A and C). At the lowest compaction force the amount of sticking IBU to the differently coated punches increased in the following order: FCG-CRN < FCG-TIN < FCG-U < FCG-HCP. The FCG-CRN punches had the lowest overall amount of sticking API and no adhering formulation was visibly observed. With increased compaction force, sticking was overall reduced and the differences in the sticking tendency of the coatings were strikingly decreased. It is known that high compaction forces may induce an increase of the temperature during compaction [7], which may locally exceed the melting

point of low-melting materials and thus affect the sticking tendency [43]. However, it has also been reported that a temperature increase during compaction may cause an elevated tablet tensile strength [7,44, 45]. The reduction in IBU sticking with increased compaction force has been observed in other studies as well [1,35,46] and has been explained by the increase of cohesion forces within the tablet exceeding the adhesion forces between the tablet and the punch surface [1,43,46]. The results of the present study were therefore explained by the increased cohesion forces within the tablet. These high cohesion forces even exceeded the presumably also increased adhesion forces between tablet and punch surface caused by the elevation of the temperature resulting in localized IBU melting. The amount of sticking IBU to the FCG-CRN punches was not affected by compaction force, which was attributed to extremely low adhesion forces between the FCG-CRN coating and the tablet. Even at the lowest compaction force, the cohesion within the tablet still exceeded the adhesion force of the tablet's surface to the FCG-CRN.

Another two factor interaction was detected between the punch tip coating and lubricant (BC) (Fig. 3B and D). The amount of sticking API was mostly influenced by the selected coating of the punches and the compaction force as described above. However, especially the lower

FCG-HCP punches were also affected by the choice of lubricant. The highest amount of sticking was detected for the blend lubricated with Lubritose™, followed by GMS and MS. The blend with SSF as lubricant caused the least amount of sticking. Overall, SSF had the best anti-sticking properties of all examined lubricants. The effect of the lubricants on sticking was less important for the UP. This observation is presumably related to the different detachment directions of the tablet from the UP and LP. The authors tried to explain this observation by the following hypothesis: The tablet is detached from the UP by the pull up movement of the punch. In this case, the contact time between the tablet and punch surface is relatively short and the lubricant can only reduce adhesion forces on limited spots. In the case of the LP, the tablet is slid over the punch surface over an extended time period allowing the lubricant to reduce friction and adhesion forces over a longer distance. Thus, the anti-adherent effect of the lubricant becomes more apparent with the LP. It would be interesting to investigate how an increased tableting speed would influence this effect. Further research to clarify this influence and to explore effects of increased tableting speed should be conducted.

3.5. Influence of the selected factors on tablet disintegration

A significant model was detected by the ANOVA for the response “disintegration time” (Table 3). The model fitted the original data well, as the lack of fit was non-significant. Additionally, high R^2 , adjusted R^2 and predicted R^2 values as well as a high adequate precision value indicated a good model for correlation and prediction.

The disintegration time depended on the compaction force, selected lubricant and their respective interaction (AC) (Fig. 4A): The disintegration time increased with increasing compaction force from 5 kN to 12 kN (center point) but decreased again at 19 kN. In general, with increasing compaction force tablet cohesion forces become stronger resulting in prolonged disintegration times [47]. At higher compaction forces, however, elastic deformation of the powder during compaction increases while plastic deformation remains almost constant. As a result, tablets compacted at high compaction forces exhibit a higher elastic recovery. It is assumed that the bonding forces within the tablets compacted at 19 kN and consequently their disintegration times were reduced by this effect [48].

The disintegration time was also highly influenced by the added lubricant. The addition of lubricants to a tablet formulation is known to potentially prolong the tablet disintegration time due to an increase in tablet hydrophobicity [47]. In the present study, the disintegration

time was increased by the selected lubricants in the following order: MS < Lubritose™ < SSF < GMS. Only at the lowest compaction force, the disintegration time of the formulations containing GMS and SSF were similar.

Interestingly, tablets lubricated with the co-processed Lubritose™ disintegrated faster than tablets lubricated with the physical mixture of MCC and GMS. In the study by Mužíková and Muchová, the disintegration times of plain Lubritose™ tablets were compared to tablets produced from the physical mixture of MCC and GMS without any other ingredients [19]. In contrast to the findings in the present study, they reported only minor differences in the disintegration times between the two formulations. However, the mixing time for the powder blends was only 2.5 min and tablets were produced with a texture analyzer without a filling device. The differences in the disintegration times between the IBU containing MCC/GMS formulations in the present study can be explained by the longer blending time and the additional mixing by the paddle movements of the Fil-O-Matic. Previous studies have already shown that lubricants can extend the disintegration time with prolonged blending [14,16,47,49]. Unlike its physical mixture, the co-processed Lubritose™ is insensitive to the mixing time and therefore, disintegration is not prolonged with these tablets.

The results of the tablets lubricated with MS and SSF were surprising because SSF is known as an excellent lubricant leading to lower disintegration times in comparison to MS because of its lower hydrophobicity and lesser mixing sensitivity [19,50–52]. It was therefore assumed that the lubricants interacted with the IBU in the formulation. Yet, no distinguishing interaction between IBU and the selected lubricants could be detected by the DSC analysis. However, IBU is known to be very hydrophobic [5,6,9]. It is therefore assumed that the high IBU content of the tablets masked the water-repelling effect of the added lubricant and led to disintegration times independent of the hydrophobicity of the lubricants. Thus, other factors than wettability may have influenced the differences in the disintegration times of these tablets such as porosity, swelling or moisture absorption [47]. To verify this hypothesis, additional disintegration tests were run with a 0.3% surfactant solution as disintegration medium (Fig. 4B). The tablets chosen for these additional experiments were compacted at the lowest (5 kN) and the highest (19 kN) level of the factor “compaction force” to cover the whole range of the design space. The role of the added surfactant was to prevent differences in the wettability resulting from the differently lubricated tablets. Thus, possible differences in the disintegration times must be caused by other factors. The reduction of the surface tension of water by the surfactant caused an overall decrease in the

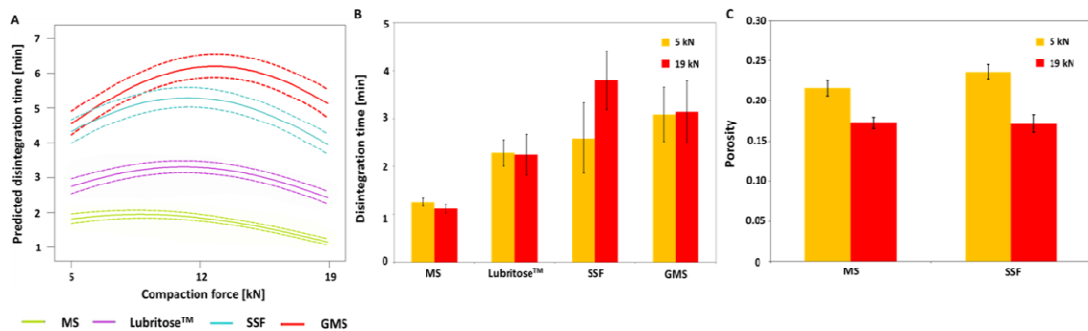


Fig. 4: (A) Two-factor interaction plot of the factors “compaction force” and “lubricant” on the response “disintegration time” displayed with confidence bands. (B) The disintegration time of tablets compacted at 5 kN and 19 kN, respectively, in 0.3 % polysorbate 80 solution (means \pm SD, $n = 6$). (C) The porosity of tablets lubricated with either MS or SSF compacted at 5 kN and 19 kN, respectively (means \pm SD, $n = 3$).

disintegration times of all tablets, especially if GMS and SSF were used as lubricants. Still, the order of the disintegration times in the surfactant-containing medium was the same as in plain water. This supports the hypothesis that other factors than wettability are likely to influence the disintegration of tablets containing a high IBU amount. Furthermore, the influence of the tablet porosity was determined using the tablets lubricated with MS and SSF, respectively, because the results of the disintegration time experiments were unexpected (Fig. 4C). However, no correlation between the disintegration times and the porosity was observed. Further studies should be conducted to understand the underlying mechanisms leading to these unexpected results.

The disintegration time of tablets may give further insight into the cohesion forces and excipient interaction in a tablet, which may be helpful to understand the mechanisms of tablet sticking. However, no direct correlation between the disintegration time and tablet sticking could be derived from the present data.

3.6. Influence of the selected design factors on tablet tensile strength

For the response "tablet tensile strength" a significant model was identified by the ANOVA (Table 3). The lack of fit was non-significant, indicating a sufficient fit of the model with the original data. The R^2 , adjusted R^2 and predicted R^2 values as well as the adequate precision are sufficient, but higher values would have been desirable. These values indicate that additional factors, which were not included in the model, might have had an influence on the tensile strength.

All selected factors (compaction force, punch tip coating and lubricant) had a significant influence on the tensile strength. No two-factor interactions were detected for the response "tablet tensile strength". The tensile strength of all tablets was above 1.8 N/m², indicating a sufficient mechanical strength of the tablets (Fig. 5). Similar to the disintegration time, the tensile strength increased with the compaction force from 5 kN to 12 kN and decreased at compaction forces up to 19 kN (Fig. 5A). This behavior has already been described for IBU tablets and is associated with a higher elastic recovery of the tablets at high compaction forces [5,53]. The coating of the punches also had an influence on the tensile strength (Fig. 5B). This might be caused by minor differences in the lengths of the punches resulting in slightly higher tablet weights and thus compaction forces. To examine this presumption, the weights of the tablets resulting from each compaction run ($n = 5$ per compaction run) were evaluated by the DoE but no correlation to the punch tip coating could be found. The mean tablet weight resulting from all compaction runs was 300.63 mg \pm 1.53 mg, $n = 560$. As a result, no distinct reason for the correlation between tensile strength and punch tip coating could be provided. Considering the only slight differences in the tensile strengths and the R^2 values of the model, further investigations are needed.

The choice of the added lubricants also affected the tablet tensile strength (Fig. 5C). Lubricants are known to reduce the mechanical strength of tablets [14]. In the present study, the tablet tensile strength was reduced by SSF, MS and Lubritose™ to a similar extent, while tablets lubricated with GMS led to slightly higher tensile strengths.

The tensile strength is a measure for the mechanical strength of the tablets and may therefore provide reasons for tablet sticking. However, similar to the disintegration time the tensile strength in the present study did not give sufficient information on the sticking of the tablet formulations.

3.7. Comparison of ibuprofen sticking to unused and used upper and lower punches

In Fig. 6 the amount of sticking IBU to differently coated unused punches at varying compaction forces is shown in comparison to the amount of sticking IBU to the same punches after three years of usage. For the UP and LP, no significant differences in sticking behavior were observed with FCG-HCP and FCG-CRN coatings before and after three

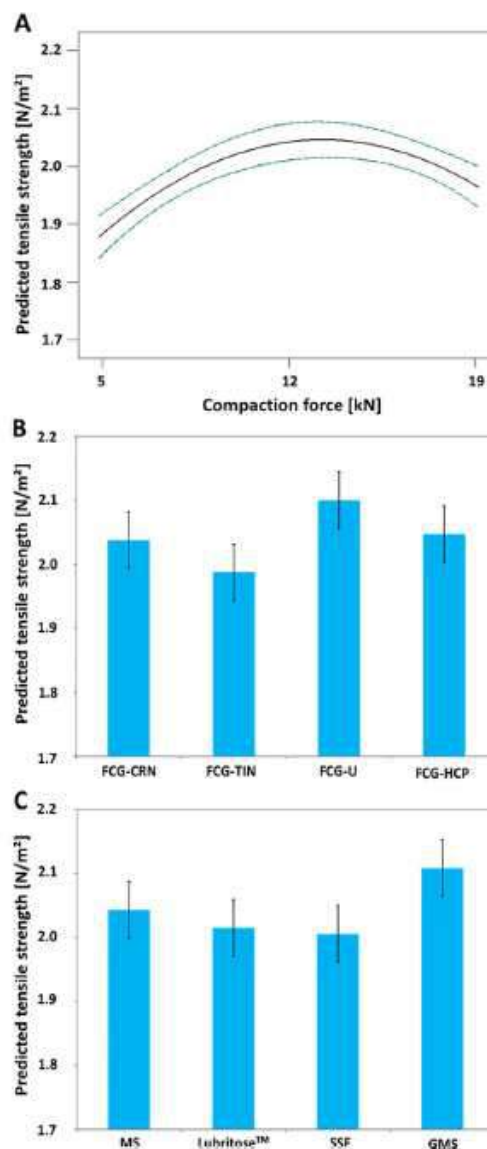


Fig. 5. Main effect plots of (A) "compaction force" (predicted tensile strength displayed with confidence bands), (B) "punch tip coating" at 5 kN compaction force and (C) "lubricant" at 5 kN for the response "tablet tensile strength" (predicted tensile strength \pm 1SD bars).

years of usage. Over the investigated three years, adhesion of IBU to FCG-HCP remained high and was dependent on the compaction force whereas with FCG-CRN adhesion remained low and independent on the compaction force. The adhesion tendency of IBU to both unused FCG-TIN coated and uncoated (FCG-U) punches was very low and independent of the compaction force. However, over the course of three

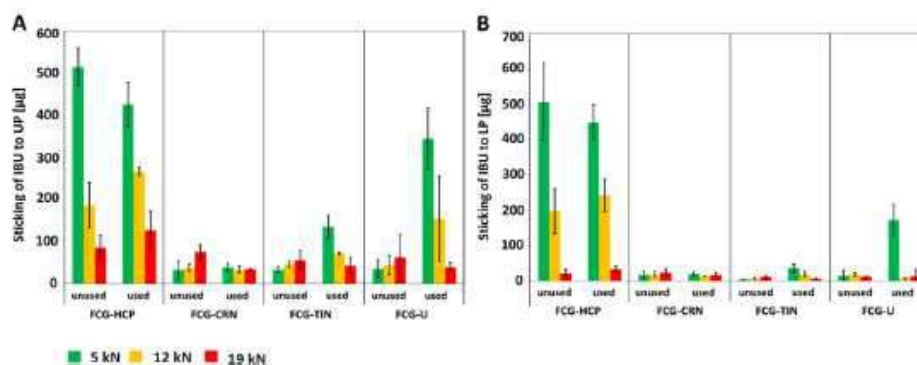


Fig. 6. Comparison of the amount of sticking IBU to unused and used, differently coated (A) LP and (B) LP at 5, 12 and 19 kN compaction force, respectively (means \pm SD, $n = 3$).

years the sticking tendency increased with both FCG-TIN and FCG-U punches especially at low compaction forces. The FCG-U punches were particularly sensitive to wear over time as they exhibited remarkably higher API sticking in comparison to their unused state. In contrast to the results in the present study, Roberts et al. found that less sticking occurs to "old" FCG-U punches than to "new" ones [3]. However, the classification "old" or "new" punch was conducted based only on the surface quality of the punches. It remains unclear, if the punches were already of different surface quality when purchased, if they were purchased from different suppliers or if the supplier changed the surface finish method over time.

Different reasons for wear of tablet tooling have been described in the literature [54]. According to this study, the predominant reasons for tablet tooling wear are abrasion and corrosion. Abrasive wear is highly correlated to material hardness. Of the selected coatings, FCG-TIN commonly shows the highest hardness, followed by FCG-CRN and then FCG-HCP [21]. Because FCG-TIN turned out to be more sensitive to sticking than FCG-CRN over the three years, abrasion is unlikely to be the main cause of the wear phenomenon in this case. Corrosive wear on the other hand is another cause that needs to be considered as the punches were mainly used for tableting of IBU, which is a weak acid that can cause corrosion of steel surfaces. Several studies have shown that FCG-CRN demonstrate a higher corrosive resistance than FCG-TIN most likely due to its denser microstructure [31,34,55]. Therefore, corrosive wear is assumed to be the major cause of increasing

sticking to the punches. Consequently, corrosive wear resistance should be a main criterion in the selection of a suitable punch coating for the prevention of sticking. However, further investigations are needed to confirm the causes for these phenomena.

All investigated coatings applied to the LPs (Fig. 6A) as well as to the LPs (Fig. 6B) showed similar sticking tendencies, while in general sticking was less pronounced with the LPs. This observation may be result from the strong tangential detachment forces between tablet and LP resulting from the momentum of the take-off bar. In contrast, vertical detachment forces between tablet and UP resulted only from the vertical withdrawal of the UP. In all cases, sticking to the FCG-HCP punches was most pronounced among all coatings.

So far, the present study is the first to compare the performance of the same punches with different coatings after three years of identical usage. The results of the present study revealed that wear of the punches affected sticking negatively. Punch tip coating may reduce these wear phenomena. FCG-CRN coatings displayed the best anti-sticking properties over time.

3.8. Comparison of ibuprofen sticking to coated punches on a laboratory vs. production scale

The results of the sticking experiments on the production rotary press under production conditions (Fig. 7) were similar to the findings under laboratory conditions. The highest amount of sticking IBU was

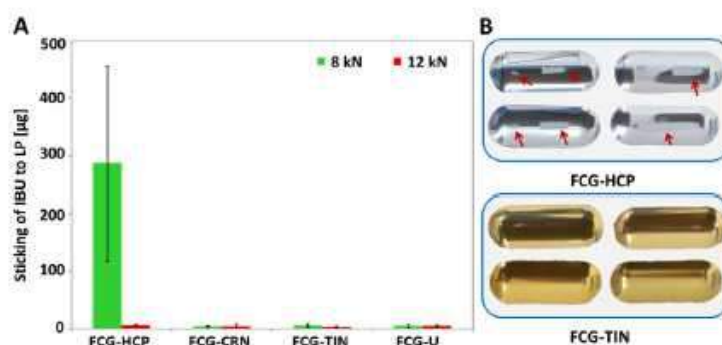


Fig. 7. Sticking amount of IBU to differently coated LPs after tableting on a production rotary press. (A) Amount of sticking IBU to each punch tip coating at 2 kN pre-compaction force and either 8 kN or 12 kN main compaction force (means \pm SD, $n = 4$). (B) Photos of the 4 selected UP tip surfaces of the FCG-HCP and FCG-TIN coated punches after compaction at 8 kN main compaction force; visible adhering IBU stains are marked with an arrow.

found on FCG-HCP punches at the low main compaction force of 8 kN (Fig. 7A). The high standard deviation reflects the inhomogeneity of the adhering residues on the FCG-HCP punch surfaces which are depicted in Fig. 7B. No visible sticking was observed on the other investigated punches, which was confirmed by HPLC analysis where only negligible IBU amounts were detected. An example of punch surfaces with no visible sticking API is shown in Fig. 7B (FCG-TIN). It should be noted that 500 compression events per punch were recorded and the sticking amount might most likely increase at all punches with a higher number of compaction runs closer to commercial production. In previous studies, it was found that the amount of IBU sticking may reach a plateau after even < 500 compaction runs [36]. However, the predictability of this plateau may change depending on the API concentration level [56]. The anti-sticking tendencies of the examined punches matched the afore-mentioned laboratory scale examinations performed with unused punches: FCG-U, FCG-TIN coated and FCG-CRN coated punches all exhibited a similar low sticking tendency while FCG-HCP punches showed a high amount of sticking API. At the highest compaction force of 12 kN no sticking was observed with any of the examined punches, which is also consistent with the results of the laboratory scale experiments.

It has to be emphasized that the production scale experiments were conducted to investigate if the correlations found on the laboratory scale also apply to the larger production scale. They were not conducted as scale-up experiments and should not be interpreted as such. The production scale experiments were conducted under the following differences in the production conditions, mostly to approximate the real manufacturing conditions as close as possible. The first notable difference was the variable composition of the IBU formulations. The formulation used for the laboratory scale experiments was not optimized with regard to the transferability to larger tableting presses. It was formulated with as little additional excipients as possible to enable an unbiased evaluation of the investigated factors leading to IBU sticking. The only optimization that was performed was the addition of Aerosil® 200 to meet the minimum requirements needed to carry out the laboratory scale experiments. In contrast, the formulation used for the production scale experiments was optimized by BASF for production scale tableting with additional and non-disclosed excipients. However, as the formulations were both composed mostly of IBU, MCC and MS, they were still chosen for general comparison. Another difference between production scale and laboratory scale tableting was the shape of the selected punches. It is well known that the shape of the punch affects the particle movement in the compact during compaction and consequently the density distribution of the tablet [57–59], which also affects the sticking tendency of IBU tablets [60]. As the density distribution also differs between oblong and round tablets [61], sticking tendency is not comparable between the two different punch shapes either. However, a comparison between the performances of the coatings was possible, because the same coatings were used for each examination. The last difference was the choice of the tableting parameters. The chosen dwell times differed only slightly (laboratory scale: 19.96 ms; production scale: 21.83 ms) but the chosen “low” and “high” compaction forces were significantly different. The selected compaction forces resulted from the different punch shape and the composition of the formulation. A compaction force not less than 8 kN lead to strong enough tablets (hardness: $31 \text{ N} \pm 4 \text{ N}$, $n = 10$) while higher compaction forces than 12 kN did not result in an increase of the tablet hardness (hardness: $67 \text{ N} \pm 5 \text{ N}$, $n = 10$).

Despite all the described differences, the data of the production scale experiments still confirmed the outcome of the laboratory scale single-punch examinations. These results suggest that screening investigations of the most suitable punch tip coatings for a specific API formulation may be conducted on a cost-efficient and material-sparing laboratory scale. However, corrosive wear phenomena need to be taken into consideration which can change the performance of the chosen coating dramatically over time as shown in the laboratory scale trials.

4. Conclusion

This work demonstrates that various factors affecting adhesion of ibuprofen to punches can be detected in an economical way with a laboratory scale set-up. However, the results of this work are specific to ibuprofen. Additional studies of APIs with different sticking properties and higher melting points should be conducted in the future for a more profound insight to the reasons leading to sticking. Especially in combination with a design of experiments, several factors and their interactions could be investigated in-depth. It was shown that the main factors affecting ibuprofen sticking are the compaction force and the punch tip coating. Furthermore, an interaction between punch tip coating and selected lubricant was detected which turned out to be more relevant for sticking of ibuprofen to the lower punch tip. Moreover, the selection of the lubricant had a major impact on the disintegration time of the resulting tablets. Surprisingly, the mechanism behind the variation of the disintegration times was not the difference between the wettability of the resulting tablets and needs further investigation. These results may also be obtained under production-scale tableting conditions. Furthermore, it was demonstrated that the application of the appropriate punch tip coating can improve sticking and wear problems simultaneously. Overall, chromium nitride coated punches provided the best results with regard to these complications and are therefore recommended to be used for overcoming sticking and wear problems during ibuprofen tableting.

Acknowledgements

The authors would like to thank Gerhard Wassmann from Lehmann & Voss for the fruitful discussions and for kindly supplying sodium stearyl fumarate and Lubritose™ MCC, Thorsten Cech and Florian Bang from BASF for the donation of ibuprofen and FMC BioPolymer for supplying Avicel® PH-102. Special thanks go to Thomas Heinrich, Martin Schoeler, Janis Herrmann and Marten Klukkert from Fette Compacting for the valuable discussions and the provision of the FETTE 102i, FE55 and the tablet tooling. The authors would also like to thank Kai Braunschweig for the experimental assistance in obtaining the HPLC data.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.05.014>.

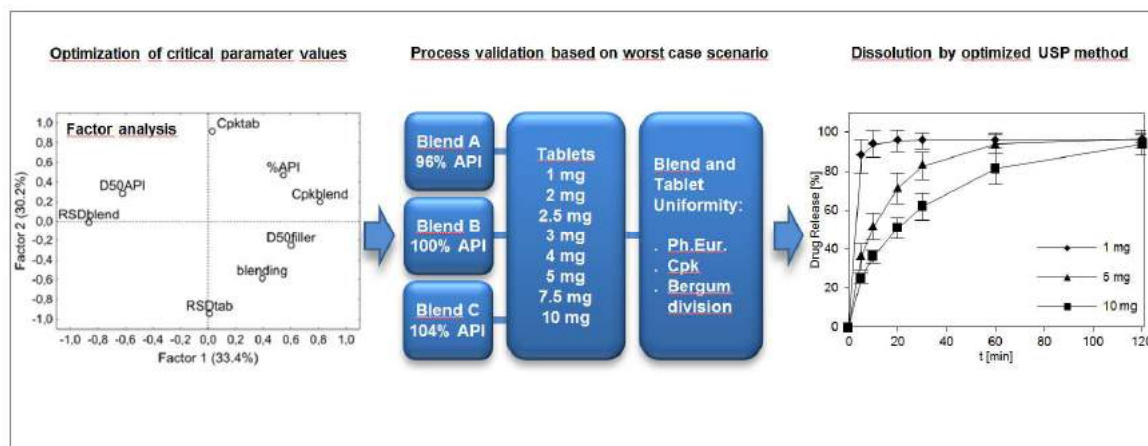
References

- [1] I. Saniócki, A. Salmann, C.S. Leopold, How suitable is the measurement of take-off forces for detection of sticking during direct compression of various ibuprofen tablet formulations? *Pharm. Dev. Technol.* 18 (2013) 257–265.
- [2] F. Walmer, M. Krumme, P. Danz, U. Tenzer, P.C. Schmidt, A novel method for the detection of sticking of tablets, *Pharm. Dev. Technol.* 4 (1999) 359–367.
- [3] M. Roberts, J.L. Ford, C.S. MacLeod, J.T. Fell, G.W. Smith, P.H. Rowe, Effects of surface roughness and chrome plating of punch tips on the sticking tendencies of model ibuprofen formulations, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1223–1228.
- [4] J.J. Wang, T. Li, S.D. Bateman, R. Erick, K.R. Morris, Modeling of adhesion in tablet compression-I. Atomic force microscopy and molecular simulation, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 798–814.
- [5] A. Nekhodchi, A. Homayouni, R. Araya, W. Kaisy, W. Obeidar, K. Asare-Addo, Crystallization of ibuprofen using starch derivatives in crystallization medium to produce promising ibuprofen with improved pharmaceutical performance, *RSC Adv.* 5 (2015) 46119–46131.
- [6] N. Rasenack, B.W. Müller, Ibuprofen crystals with optimized properties, *Int. J. Pharm.* 245 (2002) 9–24.
- [7] S.R. Bechar, C.R.B. Down, Infrared imaging of pharmaceutical materials undergoing compaction, *Pharm. Res.* 9 (1992) 521–528.
- [8] M. Roberts, J.L. Ford, C.S. MacLeod, J.T. Fell, G.W. Smith, P.H. Rowe, A.M. Dyas, Effect of lubricant type and concentration on the punch tip adherence of model ibuprofen formulations, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 299–305.
- [9] N. Rasenack, B.W. Müller, Properties of ibuprofen crystallized under various conditions: a comparative study, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 1077–1089.
- [10] M. Jbilou, A. Elrabia, A.M. Guyot-Hermann, J.C. Guyot, Ibuprofen agglomerates preparation by phase separation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 297–305.
- [11] I. Saniócki, A. Salmann, C.S. Leopold, Direct compression of ibuprofen-containing powder blends influence of the ibuprofen grade on the flow and compaction properties of an ibuprofen tablet formulation, *Pharmind* 74 (2012) 1842–1852.

- [12] N. Raszczak, B.W. Müller, Crystal habit and tableting behavior, *Int. J. Pharm.* 244 (2002) 45–57.
- [13] K. Zuurman, K. van der Voort Maarschalk, C.K. Bolhuis, Effect of magnesium stearate on bonding and porosity expansion of tablets produced from materials with different consolidation properties, *Int. J. Pharm.* 179 (1999) 107–115.
- [14] T.A. Miller, P. York, Pharmaceutical tablet lubrication, *Int. J. Pharm.* 41 (1988) 1–19.
- [15] J. Lee, Intrinsic adhesion force of lubricants to steel surface, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2310–2318.
- [16] J.-I. Kikuta, N. Kitano, Effect of mixing time on the lubricating properties of magnesium stearate and the final characteristics of the compressed tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (2008) 343–355.
- [17] R.E. Gordon, C.L. Van Koesering, D.J. Reits, Utilization of differential scanning calorimetry in the compatibility screening of ibuprofen with the stearate lubricants and construction of phase diagrams, *Int. J. Pharm.* 21 (1984) 99–105.
- [18] J. Li, Y. Wu, Lubricants in pharmaceutical solid dosage forms, *Lubricants* 2 (2014) 21–43.
- [19] J. Muziková, S. Machová, A study of a co-processed dry binder composed of microcrystalline cellulose and glycerol monoacetate, *Česka Slov. Farm.* 61 (2012) 229–233.
- [20] A.H. Gerhardt, Compression tooling surface treatments—options for reducing corrosion, wear, filming and tablet defects, *J. GMP Compliance* 13 (2009) 68–74.
- [21] E. Dekempeneer, K. van Acker, K. Vercauteren, J. Meneve, D. Neerincx, S. Eufinger, W. Pappaert, M. Sercu, J. Smeets, Abrasion resistant low friction diamond-like multilayers, *Surf. Coat. Technol.* 142 (2001) 669–672.
- [22] C.-C. Sun, S.-C. Lee, W.-C. Hwang, J.-S. Hwang, L.-T. Yang, Y.-S. Fu, Surface free energy of alloy nitride coatings deposited using closed field unbalanced magnetron sputtering, *Mater. Trans.* 47 (2016) 2523–2529.
- [23] M. Bunker, J. Zhang, R. Blanchard, C.J. Roberts, Characterising the surface adhesive behavior of tablet tooling components by atomic force microscopy, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37 (2011) 875–885.
- [24] S. Schumann, G.D. Searle, The effects of chromium nitride ION bombardment treatment of tablet tooling on tablet adherence, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (1992) 1037–1061.
- [25] T. Hoornaert, Z.K. Hua, J.H. Zhang, Hard wear-resistant coatings: a review, in: J. Luo (Ed.), *Advanced Tribology*, Springer, Berlin, London 2009, pp. 774–779.
- [26] W. König, R. Fritsch, D. Kammermeier, Physically vapor deposited coatings on tools: performance and wear phenomena, *Surf. Coat. Technol.* 49 (1991) 316–324.
- [27] B. Navrátník, P. Panjan, I. Milošev, PVD coatings as an environmentally clean alternative to electroplating and electrodeless processes, *Surf. Coat. Technol.* 116 (1999) 476–487.
- [28] P. Hones, R. Consiglio, N. Randall, F. Iacovetty, Mechanical properties of hard chromium tungsten nitride coatings, *Surf. Coat. Technol.* 125 (2000) 179–184.
- [29] F. Meng, N. Chen, Z. Chen, Hard chromium coating effects on tribological performances for non lubricated and lubricated spindle of cotton picker, *Proc. Inst. Mech. Eng. L: Mater. Des. Appl.* 230 (2016) 446–453.
- [30] M. Costa, M. Goffi, H. Voorwald, V.A. Guimarães, An investigation on sliding wear behavior of PVD coatings, *Tribol. Int.* 43 (2010) 2196–2202.
- [31] B. Navrátník, P. Panjan, I. Milošev, Industrial applications of CrN (PVD) coatings, deposited at high and low temperatures, *Surf. Coat. Technol.* 97 (1997) 182–191.
- [32] E.J. Brienk, H. Reitz, N.J. Mikolajsen, Wear and friction properties of hard PVD coatings, *Surf. Coat. Technol.* 76–77 (1995) 475–480.
- [33] Y.Z. Chin, X.Z. Ding, X.T. Jeng, S. Zhang, Oxidation resistance of TiN, CrN, TiAlN and CrAlN coatings deposited by lateral rotating cathode arc, *Thin Solid Films* 517 (2009) 4845–4848.
- [34] W. Brandl, C. Gendig, Corrosion behaviour of hybrid coatings, *Thin Solid Films* 290–291 (1996) 343–347.
- [35] S. Aoki, K. Danjo, Effect of tableting conditions on the sticking of tablet using ibuprofen, *Yakugaku Zasshi* 118 (1998) 511–518.
- [36] S. Paul, L.J. Taylor, B. Murphy, J. Krzyżaniak, N. Dawson, M.P. Mullarney, P. Meenan, C.C. Sun, Mechanism and kinetics of punch sticking of pharmaceuticals, *J. Pharm. Sci.* 106 (2017) 151–158.
- [37] S. Paul, L.J. Taylor, B. Murphy, J.F. Krzyżaniak, N. Dawson, M.P. Mullarney, P. Meenan, C.C. Sun, Powder properties and compaction parameters that influence punch sticking propensity of pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 521 (2017) 374–386.
- [38] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, sixth ed. The Pharmaceutical Press, London, 2010.
- [39] K.C. Pitt, J.M. Newton, P. Stanley, Tensile fracture of doubly-convex cylindrical discs under diametral loading, *J. Mater. Sci.* 23 (1988) 2723–2728.
- [40] E. Kuram, B. Özcelik, M. Bayramoğlu, E. Demirbaş, B.T. Simsek, Optimization of cutting fluids and cutting parameters during end milling by using D-optimal design of experiments, *J. Clean. Prod.* 47 (2013) 159–166.
- [41] M.J. Anderson, P.J. Whitcomb, *DOE Simplified: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiments*, Productivity Press, New York, NY, 2005.
- [42] S. Ierodiachanaporn, D. Dollimore, A thermal analysis study of ibuprofen, *J. Therm. Anal.* 49 (1997) 879–886.
- [43] K. Danjo, K. Kamiya, A. Otsuka, Effect of temperature on the sticking of low melting point materials, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 1425–1427.
- [44] M. Cespi, G. Bonaccini, L. Casenari, S. Ronchi, G.F. Palmieri, Influence of temperature on the compaction and strength of some pharmaceutical excipients, effect of temperature increase during the tableting of pharmaceutical materials, *Int. J. Pharm.* 448 (2013) 320–326.
- [45] N. Püppel, J.R. Britten, A.D. Onyeloweli, S. Ewaeb, Compression and tableting of pharmaceutical powders at elevated temperatures, *Int. J. Pharm.* 70 (1991) 241–248.
- [46] L. Serin, M. Roberts, F. Ur-Wehman, Compaction of recrystallised ibuprofen, *Chem. Eng. J.* 164 (2010) 449–452.
- [47] W. Lowenthal, Disintegration of tablets, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 1695–1711.
- [48] P.M. Desai, C.V. Lew, P.W.S. Heng, Review of disintegration and the disintegration phenomenon, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 2545–2555.
- [49] A.C. Shah, A.R. Miodożeniec, Mechanism of surface lubrication: influence of duration of lubricant–excipient mixing on processing characteristics of powders properties of compressed tablets, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1377–1382.
- [50] Z.T. Chowhan, L.-H. Chi, Drug excipient interactions resulting from powder mixing IV: role of lubricants and their effect on in vitro dissolution, *J. Pharm. Sci.* 25 (1986) 542–545.
- [51] A.W. Hölder, J. Sjögren, Evaluation of sodium stearyl fumarate as a tablet lubricant, *Int. J. Pharm.* 2 (1979) 145–153.
- [52] I. Saniocki, A. Sakmann, C.S. Leopold, Evaluation of the suitability of various lubricants for direct compaction of sorbitol tablet formulations, *J. Excip. Food Chem.* 4 (2013) 169–182.
- [53] K.D. Rainford, *Ibuprofen: A Critical Bibliographic Review*, Taylor & Francis, London, Philadelphia, 1998.
- [54] V.A. Alimov, An investigation of the matrix of the press tool in the tableting of drugs, *Pharm. Chem. J.* 9 (1975) 450–452.
- [55] K. Bobzin, E. Lugscheider, R. Nickel, P. Imrich, (Cr1-x)AlxN a review about a multi-purpose coating system, *Materwiss. Werkstofftech* 37 (2006) 833–841.
- [56] M.P. Mullarney, Bruce C. Macdonald, Allan Hutchins, Assessing tablet-sticking propensity, *Pharm. Technol.* 36 (2012) 57–62.
- [57] D. Sixsmith, Punch tip geometry effects on powder compression, *J. Pharm. Pharmacol.* 32 (1980) 854–856.
- [58] D. Sixsmith, D. McCluskey, The effect of punch tip geometry on powder movement during the tableting process, *J. Pharm. Pharmacol.* 33 (1981) 79–81.
- [59] B. Eliazadeh, K. Pitt, B. Biscoe, Effects of punch geometry on powder movement during pharmaceutical tableting processes, *Int. J. Solids Struct.* 41 (2004) 5967–5977.
- [60] M. Roberts, J.L. Ford, G.S. MacLeod, J.T. Fell, G.W. Smith, P.H. Rowe, A.M. Dwyer, Effect of punch tip geometry and embossment on the punch tip adherence of a model ibuprofen formulation, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 947–950.
- [61] A. Djemai, L.C. Sinick, NMR imaging of density distributions in tablets, *Int. J. Pharm.* 319 (2006) 55–62.

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A., GONĚC, R., MIKA, F. a VETCHÝ, D. Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active substance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **109**:541-547. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.017. (IF₂₀₁₆ = 3,756).

Grafický abstrakt





Factor analysis in optimization of formulation of high content uniformity tablets containing low dose active substance



Ivana Lukášová^a, Jan Muselík^{a,*}, Aleš Franc^a, Roman Goněc^a, Filip Mika^b, David Vetchý^a

^a Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic
^b Institute of Scientific Instruments of the CAS, Kralovopolska 147, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
Factor analysis
Process optimization
Sampling error
Content uniformity
Common blend
Worst case
Dissolution method

ABSTRACT

Warfarin is intensively discussed drug with narrow therapeutic range. There have been cases of bleeding attributed to varying content or altered quality of the active substance. Factor analysis is useful for finding suitable technological parameters leading to high content uniformity of tablets containing low amount of active substance. The composition of tableting blend and technological procedure were set with respect to factor analysis of previously published results. The correctness of set parameters was checked by manufacturing and evaluation of tablets containing 1–10 mg of warfarin sodium. The robustness of suggested technology was checked by using “worst case scenario” and statistical evaluation of European Pharmacopoeia (EP) content uniformity limits with respect to Bergum division and process capability index (Cpk). To evaluate the quality of active substance and tablets, dissolution method was developed (water; EP apparatus II; 25 rpm), allowing for statistical comparison of dissolution profiles. Obtained results prove the suitability of factor analysis to optimize the composition with respect to batches manufactured previously and thus the use of metaanalysis under industrial conditions is feasible.

1. Introduction

Warfarin has been used since 1950s to prevent thrombosis and embolism (Tadros and Shakib, 2010). According to EP, the active substance is available either as amorphous or crystalline form, the latter existing as sodium salt clathrate, with 2-propanole trapped in the crystalline structure in ratio 2:1 (Gao and Maurin, 2001). Warfarin has low therapeutic index (Benet and Goyan, 1995) and when titrating the dose it is typically increased or decreased by only 5–15% of the daily dose (Wittkowsky, 1997). Content uniformity (CU) is an important parameter of warfarin tablets (Muselík et al., 2014a), however, its evaluation on purely pharmacopoeial basis cannot be sufficient. Important producers (e.g. DuPont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex) hence introduced stricter limits: content uniformity within 92.5–107.5% of the average and relative standard deviation (RSD) not > 3% (Sawoniak et al., 2002).

In the past, the substitution of original product (Coumadine®) with generic product (Panwarfarine®) was identified as a cause of bleeding (Vercaigne and Zhanel, 1998). According to literature, this was caused probably by failed content uniformity (Wittkowsky, 1997), however, using amorphous form of the active pharmaceutical ingredient (in Panwarfarine) instead of crystalline form (in Coumadine) was also

discussed (Jaffer and Bragg, 2003). Although the cause remains unclear (Richton-Hewett et al., 1988) and tablets could not have been considered to be therapeutically equivalent (Haines, 2011), quality assurance demands monitoring both content uniformity and the quality of API. The question of generic substitution (Haines, 2011), content uniformity (Arruabarrena et al., 2014), dissolution testing parameters (Rahman et al., 2015a), API quality (Rahman et al., 2015b) and its changes during shelf-life (Fan et al., 2015; Nguyenpho et al., 2015) have been researched intensively. Quality assurance of warfarin tablets thus demands optimal manufacturing parameters leading to required content uniformity as well as corresponding suitable dissolution method.

In commercially produced tablets, the content of API is low (1–10 mg), which has impact on any problems with content uniformity (Carstensen and Dali, 1996). Granulation technology is used widely in the production of warfarin tablets (Nguyenpho et al., 2015) as it improves CU. However, it is time-consuming and increased temperature during drying can have negative impact on stability (Parikh, 2010). In wet granulation, there is a risk of migration of warfarine sodium during drying, which deteriorates CU (Chaudry and King, 1972). Because this substance is soluble in aqueous wetting agent and there may be residual moisture in the final product (Rahman et al., 2015a), a change in

* Corresponding author.
E-mail address: muselikj@vfu.cz (J. Muselík).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.017>

Received 14 March 2017; Received in revised form 1 September 2017; Accepted 8 September 2017

Available online 11 September 2017

0928-0987/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

quality of active substance and formulation can have impact on dissolution profile (Amann, 1973). Therefore, direct compression remains suitable and used technology, requiring the preferred use of crystalline form (Mackin et al., 2002). With the absence of increased temperature or the API dissolving in the wetting agent or residual moisture, there is no risk of transition to the amorphous phase (Gao and Maurin, 2001). On the other hand, there is a risk of segregation during blending, blend transfer or because of tableting press vibrations, which has negative impact on CU (Am Ende et al., 2007). Thus, an optimization of critical process parameters is essential.

The goal was to assess the suitability of factor analysis in the optimization of critical process parameters, allowing for the production of tablets of all strengths (1–10 mg) with required CU. The choice of qualitative parameters of raw material and process parameters was based on metaanalysis using factor analysis of previously published results of content uniformity of blends and tablets with similar formulation. These papers dealt with the impact of particle size of API and excipients, blending time, addition of lubricant at various phases of blending, and different API concentration on CU of warfarin blends and tablets (Muselík et al., 2014a; Muselík and Franc, 2012; Franc et al., 2013; Muselík et al., 2014b; Franc and Muselík, 2013; Eibl et al., 2016). This analysis based on results of previously manufactured batches can be used in the industry both in the development of dosage form and in optimization of existing process. The producer is allowed some manoeuvring space in process parameters while having to adhere to declared composition and technology (Commission regulation, 2003; U.S. Food and Drug Administration, 1995).

To assess the results of factor analysis, optimized process was used to manufacture tableting blends and compressing them in tablets by direct compression. The technology of common blend for all strengths was used because it is convenient for easier blend CU validation (Muselík et al., 2014b), bioequivalence study that can be usually performed on highest strength only (U.S. Food and Drug Administration, 2003), and stability tests that are usually run on outlying strengths (U.S. Food and Drug Administration, 2013). Tablets contained warfarin sodium clathrate and particular strengths differed in the weight of manufactured tablets. To evaluate the robustness of content uniformity, three batches were produced, with two of them representing worst case scenarios, simulating average warfarin content of 96% and 104% of declared content. This is in line with the philosophy of requirements on qualification and validation of dosage forms (European Commission, 2015). Content uniformity of blends was expected to meet FDA requirements (90–110%; RSD ≤ 5%) and capability index based on EP content uniformity limits (EP 2.9.6: 85–115%). Content uniformity of tablets was expected to meet internal limits of commercial producers (Du-Pont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex) (Sawoniak et al., 2002) and was evaluated by Bergum division based on EP 2.9.40 and capability index based on EP 2.9.6 (85–115%) (Muselík et al., 2014a; Berman et al., 1997). The quality assurance of manufactured tablets also demanded the development of easy and fast dissolution method, allowing for statistical comparison of dissolution profiles using similarity and difference factors.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Raw materials used to manufacture tablets, their particle size, and true density are listed in Table 1. All other materials were of analytical grade and were used without further purification.

2.2. Manufacturing of tablets from common blend

All constituents from Table 1, without magnesium stearate, were sieved through a 250 µm sieve and mixed for 10 min. Then, magnesium stearate was added and another 5 min of mixing followed. Turbula

Table 1
Composition of blends. Physical properties of their components.

Component	Density [kg m ⁻³]	Particle size [µm] ^a			Content [%] ^b
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
Warfarin sodium clathrate	1312.8	2.5	10.3	72.4	2
Di-cafos 92-14	2937.9	2.4	152.3	309.8	70
Avicel PH 101	1572.4	14.7	46.3	110.7	25
Ac-Di-Sol	1611.5	12.2	33.1	86.7	2
Magnesium stearate	1085.9	2.6	10.2	23.1	1

Di-cafos – calcium hydrogen phosphate (Budenheim, Germany); magnesium stearate (Peter Greven, Germany); Avicel PH101 – microcrystalline cellulose (FMC BioPolymer, Belgium), Ac-Di-Sol – sodium crosscarmellose (FMC BioPolymer, Belgium).

^a D_x = x% of measured particles smaller than this size [µm]; warfarin sodium clathrate (Pliva, Croatia).

^b Theoretical composition of blends was the same in all batches; in batches A and C, the content of API was increased, respectively decreased by 4% of theoretical content.

homogenizer (T2C, Switzerland) was used at speed 40 rpm. Mass of one batch was 500.0 g. Batch A contained 96% of theoretical API content, batch C contained 104% of theoretical content, and batch B corresponded with theoretical content. Tablets were compressed with exocentric tablet press (Korsch EKO, Germany). Theoretical weight of tablets was 54.2–542.0 mg, with respect to theoretical content of 1–10 mg of warfarin sodium.

2.3. Physical testing of blends and tablets

True density and particle size of API and excipients are listed in Table 1. True density was measured according to EP 2.9.23, using Pycnomatic-ATC helium pycnometer (Porotec, Germany). Particle size was measured by laser diffraction, using HELOS KR (Symptec, Germany); samples were analysed on dry basis, with compressed air (2 bar) used for deagglomeration. Density and tapped density of tableting blend were measured according to EP 2.9.15 and EP 2.9.34, using SVM 102 (Erweka, Germany). Flowability was measured according to EP 2.9.16 with Flowability Tester (Medipo-ZT, Czech Republic). Tablet height, diameter, radial hardness, and weight (n = 20 tablets) were measured automatically on Pharmatest WHT-1 (Pharmatest, Germany). Weight uniformity was evaluated according to EP 2.9.5 and resistance to crushing of tablets was performed according to EP 2.9.8. Friability was tested according to EP 2.9.7, using TAR 10 (Erweka, Germany). Disintegration was tested according to EP 2.9.1, using ZT 4 (Erweka, Germany).

2.4. Model blend and its analysis by SEM and EDX

Raw materials listed in Table 1 were used to manufacture model blend. 13.7 g of warfarin sodium clathrate and 479.5 g of Di-cafos 92-14 were sieved through 250 µm sieve and mixed for 10 min. Then, 6.8 g of magnesium stearate was added and another 5 min of mixing followed. Turbula homogenizer (T2C, Switzerland) was used at speed 40 rpm. The ratio of used materials and the manufacturing process were the same as when manufacturing tableting blends. The mixture was placed on a 0.080 µm sieve and vibrated at amplitude 60 (equipment setting) for 1 min, using AS 200 basic (Retsch & Co., Germany). This mechanical stress was applied so as to separate those particles that are not held together by physical interaction. Then, a sample for further analysis, weighing approximately 500 mg, was taken by laboratory spoon from the surface from the mixture.

Extremely high-resolution scanning electron microscope (SEM) with subnanometer resolution down to 1 keV (Magellan 400, FEI, Czech Republic) was used for the analysis. The SEM is equipped with through-the-lens and side-attached electron detectors. One of them is four-channel retractable back-scattered electron detector (BSE) which shows morphology and the material contrast of the powder. The BSE images

were taken in standard vacuum conditions at 10^{-4} Pa at 15 keV. The chemical composition of the model mixture was also proved by energy dispersive spectrometry of X-rays (EDX) at 15 keV (EDAX, Apollo X). The point and area EDX analysis from different places of the mixture was performed. The mapping which shows the phase distribution of elements in an area with several grains of the blend was also performed.

2.5. Sampling and warfarin content measurement

Tabletting blend was placed in cylindrical vessel with diameter of 25 cm and levelled to a height of about 2 cm by slight horizontal movement. The area was then divided evenly into 10 geometrically equal parts. Approximately 500 mg sample was taken with a small laboratory spoon from each one of these parts. For content uniformity of tablets, 10 tablets (batch B) or 20 tablets (batches A and C) were taken at regular intervals in the course of compressing process. Analysis of content by HPLC, including sample treatment, is described in detail in previous paper (Muselík et al., 2014a).

2.6. Dissolution testing

For dissolution testing, SOTAX (AT7 Donau Lab, Switzerland) was used. With respect to the USP monograph Warfarin Sodium Tablets, water was as dissolution medium. Furthermore, EP phosphate buffer (pH 6.8) was used. The volume of dissolution medium was 900 mL, its temperature was maintained at 37.0 ± 0.5 °C. The test was run using EP 2.9.3 Apparatus II (paddles, 50 rpm) as well as modified method at 25 rpm. 6 tablets containing 1, 5, or 10 mg of warfarin sodium (batch B) were used for the test. Dissolved amount of active substance was measured by HPLC at timepoints as follows: 5, 10, 20, 30, 60, and 120 min.

2.7. Statistical evaluation of results

For evaluation of procedure variables (API and filler quantity and particle size, lubrication time) and their interaction with response variables (RSD, Cpk for EP 2.9.6 limits), factor analysis was used, including rotation of factors (Varimax normalized). Prior to modelling, response variables were automatically adjusted by autoscaling. Design evaluation was performed with Statistica 12 (StatSoft, USA).

From contents found in samples of tabletting blends, respectively tablets, for each batch, average content, RSD, and Cpk with respect to EP 2.9.6 limits (85–115%) were calculated. Moreover, the blends were expected to meet FDA requirements (90–110%; RSD not > 5%). Tablets were evaluated according to EP 2.9.40, Bergum division and content uniformity limits defined by key manufacturers (content within 92.5–107.5% of the average and RSD not > 3%). Dissolution profiles were compared using difference factor (f_1) and similarity factor (f_2).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of technological parameters by factor analysis (FA)

Based on data in literature (Table 2), the impact of formulation and process parameters (particle size distribution of API and filler, content of API, duration of mixing after the addition of lubricant) on content uniformity of blend and tablets were evaluated. Data pack of 32 samples with variable RSD and Cpk of tabletting blends, respectively tablets was evaluated using factor analysis so as to find optimal technological parameters. Supposedly, content uniformity is improved with decreasing RSD values and increasing Cpk values.

In factor load graph (Fig. 1), the first factor is explained by blend content uniformity and the second factor is explained by content uniformity of tablets. It is clear that blend content uniformity does not correlate with content uniformity of final dosage forms. This can be attributed to sampling error in blend sampling. Blend segregation

Table 2

Content uniformity of blends and tablets containing particular amount of warfarin sodium, manufactured under particular formulation and process parameters (Muselík et al., 2014a; Muselík and Franc, 2012; Franc et al., 2013; Muselík et al., 2014b; Franc and Muselík, 2013; Elbl et al., 2016).

Batch ^a	x _i blend [%] ^b	RSD blend [%] ^c	Cpk blend ^d	x _i tbl [%] ^b	RSD tbl [%] ^c	Cpk tbl ^d
2%,W10,D61,2min	106.8	4.59	0.56	105.2	3.70	0.84
2%,W10,D61,2min	111.7	9.77	0.10	102.8	2.16	1.84
2%,W10,D61,5min	103.3	3.41	1.07	100.1	3.20	1.55
2%,W10,D61,5min	102.3	7.18	0.56	103.2	1.62	2.36
2%,W83,D61,5min	103.5	10.57	0.35	100.0	3.03	1.65
2%,W83,D61,5min	104.7	10.59	0.30	100.0	2.92	1.70
2%,W10,D152,5min	100.5	1.37	3.50	102.3	2.52	1.64
2%,W10,D152,5min	99.3	1.76	2.72	99.9	1.67	2.96
2%,W83,D152,2min	99.1	13.61	0.35	99.5	2.49	2.08
2%,W83,D152,2min	103.9	2.38	1.55	105.5	2.91	1.04
2%,W83,D152,5min	100.7	2.62	1.80	100.1	2.54	1.96
2%,W83,D152,5min	105.0	16.38	0.19	103.3	2.42	1.61
0.5%,W10,D152,5min	96.7	6.06	0.66	98.4	2.99	1.52
0.5%,W10,D152,5min	95.3	3.69	0.98	97.4	8.09	0.52
0.5%,W10,D152,10min	99.0	8.33	0.57	96.7	5.76	0.70
0.5%,W10,D152,10min	94.8	6.53	0.52	100.8	8.30	0.63
0.5%,W10,D152,15min	101.1	10.65	0.43	94.4	5.65	0.59
0.5%,W10,D152,15min	100.2	3.43	1.44	95.2	8.24	0.43
5.5%,W10,D152,5min	98.5	1.95	2.34	96.2	1.36	2.85
5.5%,W10,D152,5min	97.2	4.80	0.87	100.8	2.27	2.07
5.5%,W10,D152,10min	100.4	1.48	3.29	98.1	3.42	1.30
5.5%,W10,D152,10min	96.1	4.66	0.83	101.3	2.34	1.93
5.5%,W10,D152,15min	105.5	3.42	0.88	99.2	3.46	1.38
5.5%,W10,D152,15min	109.4	2.66	0.64	95.2	3.53	1.01
2.7%,W10,D152,2min	97.3	3.60	1.17	100.3	2.35	2.08
2.7%,W10,D152,2min	98.1	3.29	1.35	103.0	6.18	0.65
2.7%,W10,D152,5min	95.0	1.64	2.15	96.5	2.75	1.44
2.7%,W10,D152,5min	97.4	2.00	2.17	99.9	2.83	1.76
2.7%,W10,D152,10min	100.1	1.97	2.51	99.0	5.07	0.93
2.7%,W10,D152,10min	101.0	2.54	1.83	100.3	3.14	1.55
2.7%,W10,D152,15min	98.5	2.81	1.63	99.4	5.20	0.93
2.7%,W10,D152,15min	100.0	3.44	1.45	96.9	3.94	1.04

x – warfarin sodium content in %; y – D₅₀ of warfarin; z – D₅₀ of Di-caño; D₅₀ – 50% of measured particles are smaller than this size [µm].

^a Batch label: x%,W_y,D_z,mixing time with magnesium stearate in minutes.

^b Average content of 10 samples from a particular batch.

^c Relative standard deviation of 10 samples from a particular batch.

^d Process capability indexes for EP 2.9.6 limits.

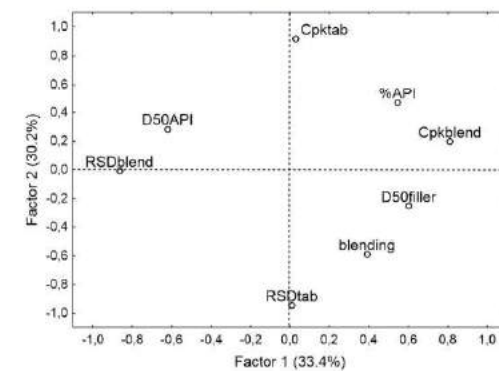


Fig. 1. Factor loads.

during sampling is possible (Muselík et al., 2014a; Berman et al., 1997). In factor load graph (Fig. 1), there are correlations, firstly, between particle size of used filler and blend content uniformity represented by Cpk, and secondly, between API particle size and blend content

uniformity represented by RSD. These results show that better blend content uniformity was achieved when combining filler with larger particle size ($D_{50} = 152 \mu\text{m}$) and API with smaller particle size ($D_{50} = 10 \mu\text{m}$). This finding corresponds to date in literature; model blend of warfarin sodium with filler (Di-cafos) and magnesium stearate is known to have higher electrostatic charge when using filler with smaller particle size than with larger particle size (Muselík et al., 2014a). Electrostatic charge can increase blend sampling error; if it is reduced there is positive impact on final uniformity of tableting blend. Particle size of both API and filler does not correlate significantly with content uniformity of tablets (Fig. 1). This means particle size distribution does influence blend sampling error and has no impact on content uniformity of tablets.

Factor analysis was also used to evaluate mixing duration after the addition of lubricant ("blending" variable). Blending variable correlates partially with blend Cpk; however, there is also some correlation with content uniformity RSD of tablets. Possible explanation suggests that homogeneity of a mixture does not increase proportionally to the duration of mixing and that after some time the mixture becomes overblended. Optimal duration of mixing with lubricant is obvious in factor score graph (Fig. 2). The best results were achieved with mixing for 5 min. On the other hand, blends mixed for shorter time (2 min) or longer time (10 or 15 min) had deteriorated content uniformity both of blend and tablets. The factor score graph (Fig. 2) suggests that API concentration of 0.5% correlates significantly with content uniformity RSD in tablets, with negative impact on content uniformity. API concentration in range of 2–5.5% does not have significant impact on content uniformity of blend or tablets. The best results were achieved with API concentration of 2, 2.7, or 5%, with duration of mixing after the addition of lubricant 5 min, and when using API of small particle size ($D_{50} = 10 \mu\text{m}$) and filler of large particle size ($D_{50} = 152 \mu\text{m}$). Based on factor analysis, raw materials of this particle size distribution and duration of mixing for 5 min were chosen for further experiments. API concentration of 2% was chosen because at this concentration both manufactured batches had suitable content uniformity. This concentration also allows for the manufacture of tablets of all therapeutic strengths (1–10 mg) by common blend technology because in whole range of strengths, the tablets have reasonable dimensions and weight.

3.2. Manufacturing of tablets from common blend

Three batches were manufactured from common blend to check the output of factor analysis and to evaluate the robustness of proposed technology. Two of these batches represented worst case scenario. Theoretical composition of tablets is shown in Table 1. Batch A contained 96% and batch C 104% of theoretical warfarin content,

Table 3
Evaluation of blends.

Batch	D_b	D_t	CI	HR	α	F_w^a
	[g/cm ³]	[g/cm ³]	[%]		[°]	[g/s]
A	0.62	0.73	15.06	1.18	28.0	2.51 ± 0.14
B	0.62	0.71	12.67	1.15	29.0	2.46 ± 0.18
C	0.59	0.72	18.06	1.22	30.0	2.57 ± 0.11

D_b , bulk density; D_t , tapped density; CI, compressibility index; HR, Hausner ratio; α , angle of repose; F_w , flow rate.

^a Values expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

Table 4
Evaluation of tablets.

Batch ^a	Rh	Fr	Ds	He	We	Di
	[N]	[%]	[s]	[mm]	[mg]	[mm]
1,A	36.7 ± 2.6	0.67	32	2.83 ± 0.05	54.2 ± 0.7	5.05 ± 0.01
1,B	35.1 ± 5.0	0.64	35	2.91 ± 0.04	53.9 ± 1.1	5.01 ± 0.07
1,C	32.2 ± 4.8	0.61	30	2.79 ± 0.06	53.8 ± 0.8	5.01 ± 0.01
2,A	45.8 ± 1.9	0.55	38	3.49 ± 0.03	108.3 ± 1.6	5.50 ± 0.00
2,B	50.5 ± 12.5	0.47	44	3.58 ± 0.06	108.4 ± 0.9	5.51 ± 0.00
2,C	75.2 ± 9.9	0.36	54	3.37 ± 0.04	108.2 ± 0.7	5.50 ± 0.01
2.5,A	80.9 ± 5.4	0.36	64	4.03 ± 0.03	133.5 ± 2.2	5.50 ± 0.00
2.5,B	70.2 ± 8.3	0.48	56	4.21 ± 0.06	135.2 ± 1.1	5.51 ± 0.00
2.5,C	64.1 ± 9.3	0.55	48	4.16 ± 0.04	135.4 ± 0.9	5.50 ± 0.00
3,A	61.8 ± 18.5	0.51	55	2.86 ± 0.08	160.1 ± 5.3	6.99 ± 0.01
3,B	52.2 ± 6.3	0.57	60	2.79 ± 0.07	162.5 ± 1.3	7.01 ± 0.00
3,C	33.1 ± 9.2	0.69	35	2.89 ± 0.09	163.1 ± 1.5	7.03 ± 0.11
4,A	93.2 ± 4.1	0.23	75	3.38 ± 0.03	213.7 ± 4.8	7.00 ± 0.01
4,B	74.2 ± 8.7	0.37	62	3.47 ± 0.05	215.9 ± 1.7	7.01 ± 0.00
4,C	64.1 ± 9.7	0.42	50	3.56 ± 0.04	216.3 ± 1.1	7.00 ± 0.00
5,A	44.3 ± 16.6	0.59	38	2.21 ± 0.02	268.6 ± 5.6	10.02 ± 0.01
5,B	50.3 ± 8.1	0.60	45	2.29 ± 0.07	271.5 ± 1.9	10.04 ± 0.00
5,C	45.7 ± 11.4	0.52	41	2.31 ± 0.03	270.1 ± 2.1	10.02 ± 0.01
6,A	56.2 ± 2.7	0.58	45	2.75 ± 0.04	320.4 ± 7.9	10.02 ± 0.00
6,B	60.1 ± 17.1	0.53	50	2.71 ± 0.09	325.5 ± 1.5	10.04 ± 0.00
6,C	57.2 ± 14.2	0.58	48	2.67 ± 0.11	324.3 ± 2.8	10.02 ± 0.00
7.5,A	64.1 ± 8.5	0.41	58	3.43 ± 0.02	400.3 ± 5.1	10.03 ± 0.01
7.5,B	71.2 ± 15.6	0.45	65	3.33 ± 0.08	407.2 ± 2.2	10.04 ± 0.00
7.5,C	76.5 ± 31.1	0.36	60	3.26 ± 0.08	403.6 ± 1.8	10.02 ± 0.00
10,A	43.7 ± 21.1	0.64	40	2.76 ± 0.04	541.9 ± 4.8	13.08 ± 0.01
10,B	55.5 ± 10.0	0.57	60	2.85 ± 0.06	543.2 ± 0.9	13.09 ± 0.01
10,C	60.7 ± 8.7	0.52	55	2.87 ± 0.07	536.8 ± 3.1	13.10 ± 0.02

Rh – radial hardness; Fr – friability; Ds – disintegration time; He – height; We – weight; Di – diameter. Radial hardness, height, and weight expressed as mean ± standard deviation (n = 20).

^a Batch label: API content_batch.

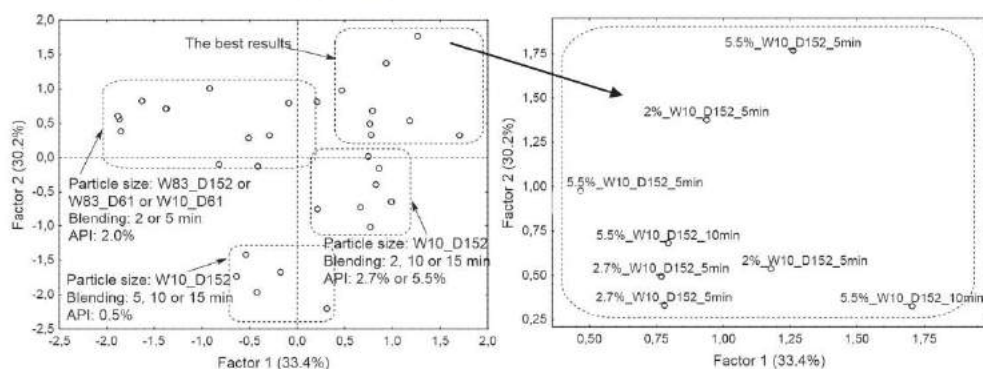


Fig. 2. Factor score.

Table 5
Content uniformity of blends.

Batch	x_i [%] ^a	RSD [%]	Cpk ^b
A	96.2	2.76	1.40
B	98.6	3.61	1.27
C	106.8	1.82	1.40

^a Average content of 20 (Batch A and C) or 10 (Batch B) samples.

^b Process capability index for EP 2.9.6 limits.

approaching pharmacopoeial limits by “Warfarin Sodium Tablets USP” that require content within 95–105% (The United States Pharmacopoeia-National Formulary, 2016). The content of warfarin in batch B corresponded with theoretical value: 100%. Physical properties of blends - density, tapped density, and flow properties were very similar (see Table 3). Physical properties of tablets - radial hardness, friability, disintegration, and weight uniformity - were also similar and met pharmacopoeial limits. Height and diameter of tablets were similar, as well. See Table 4. This proves that the manufacturing process of tablets is robust.

3.3. Validation of content uniformity of blends and tablets

The results of evaluation of content uniformity of blends manufactured with respect to the output of factor analysis are shown in Table 5. All blends met EP 2.9.6 and FDA requirements. Cpk ≥ 1 for EP 2.9.6 limits ensures that 99.7% of subsequently manufactured batches with average content within limit (96–104% of theoretical API content) will meet pharmacopoeial limit on content uniformity.

Because the results of factor analysis showed the impact of particle size of API and filler (Di-Cafos) on blend content uniformity, model mixture of warfarin sodium, filler, and magnesium stearate was analysed by scanning electron microscopy and by energy dispersive spectrometry of X-rays. The goal was to elucidate plausible formation of “interactive powder blend” between API and filler. Fig. 3 shows a larger particle of warfarin sodium (black – sodium phase) and filler particles (dark grey – calcium and phosphorus phases). Other warfarin sodium particles (black) are dispersed among filler particles, but they are not present on their surface. Obtain results do not confirm the presence of interactive powder mixture between API and filler particles. The influence of API and filler particle size on blend content uniformity, respectively on the suppression of sampling error when sampling the blend, depends possibly only on changes in electrostatic charge of the blend (Muselík et al., 2014a) with absence of interactive powder mixture.

Tablets containing 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7.5, and 10 mg of warfarin sodium were manufactured from the blends, with the amount of API in

Table 6
Content uniformity of tablets.

Batch ^a	x_i^b [%]	RSD	Cpk (2.9.6)	Bergum division ^c	DuPont specification ^c
1,A	98.4	2.88	1.57	+	+
1,B	100.9	4.68	1.00	–	–
1,C	104.3	3.28	1.04	–	–
2,A	98.2	2.37	1.89	+	+
2,B	101.3	1.67	2.71	+	+
2,C	102.5	2.31	1.76	+	+
2.5,A	96.0	2.14	1.89	+	+
2.5,B	97.4	1.59	2.66	+	+
2.5,C	103.0	1.97	1.96	+	+
3,A	96.5	1.97	2.02	+	+
3,B	99.1	2.80	1.70	+	+
3,C	103.5	1.23	3.02	+	+
4,A	96.9	1.21	3.39	+	+
4,B	98.7	2.30	2.01	+	+
4,C	102.1	1.37	3.08	+	+
5,A	95.7	1.41	2.62	+	+
5,B	101.4	2.63	1.69	+	+
5,C	103.7	2.50	1.45	+	+
6,A	95.5	1.26	2.91	+	+
6,B	97.5	2.63	1.62	+	+
6,C	102.2	1.92	2.18	+	+
7.5,A	95.0	1.34	2.63	+	+
7.5,B	98.8	1.97	2.35	+	+
7.5,C	103.4	2.69	1.40	+	+
10,A	98.2	1.54	2.91	+	+
10,B	98.5	1.27	3.60	+	+
10,C	105.4	1.93	1.58	+	+

^a Batch label: API content_batch.

^b Average content of 20 (Batch A and C) or 10 tablets (Batch B).

^c (+) passed; (–) failed.

tablet set by the weight of the tablet (Table 4).

The results of evaluation of content uniformity of tablets are listed in Table 6. Tablets of all strengths produced from common blends (batches A, B, and C) met pharmacopoeial requirements as defined by EP 2.9.6 and EP 2.9.40 (harmonized with USP). Cpk values for EP 2.9.6 were not lower than 1.0, thus ensuring that 99.7% of subsequently produced batches with average content within limits will meet pharmacopoeial limit for content uniformity. Similarly, meeting of Bergum criteria ensures with 90% assurance, that at least 95.0% of subsequently manufactured batches will meet EP 2.9.40 limits. Only batches B and C containing 1 mg of warfarin sodium failed Bergum division, which corresponds to the fact that these batches also failed internal limits by commercial producers (Du-Pont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex) (Sawoniak et al., 2002). 1 mg tablets failed probably because of their low weight as this was the only parameter where there was any difference from other strengths. The weight of sample has impact on the total error of measurement.

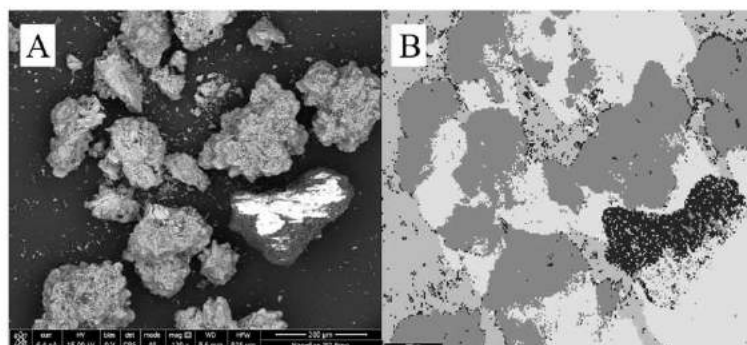


Fig. 3. Model mixture containing warfarin sodium: BSE high-resolution SEM image (A) and EDX phase map image (B): (■) – sodium phase (corresponding to warfarin sodium); (■) – calcium and phosphorus phase (corresponding to Di-cafos filler); (■) – carbon phase (corresponding to carbon table).

Table 7
Difference factor and similarity factor. Modified USP dissolution method (apparatus II; 25 rpm).

Dissolution medium	Sample	Reference	f_2	f_1
Water	1_B	5_B	26.5	23.6
Water	5_B	10_B	42.8	17.3
Water	10_B	1_B	19.3	36.7
pH 6.8	1_B	5_B	58.2	13.5
pH 6.8	5_B	10_B	90.9	2.3
pH 6.8	10_B	1_B	61.9	11.5

Certainly, technological parameters chosen with respect to the results of factor analysis lead to tablets that meet pharmacopoeial requirements on content uniformity (EP 2.9.6, EP 2.9.40) on statistically significant level. This is valid also for batches containing deliberately altered amount of API (worst case scenario). Only tablets containing 1 mg of API did not meet the strictest requirement – Bergum division, which was probably caused by low tablet weight.

3.4. Development of dissolution method for quality assurance

For quality assurance of produced tablets, there has to exist a dissolution method that is suitable for statistical comparison using f_1 and f_2 factors. USP, respectively FDA method using water as medium is neither discriminatory (Nguyenpho et al., 2015; Ali and Krämer, 1999) nor biorelevant (O'Reilly et al., 1966). Medium with pH 1.2, which is usually used in immediate release tablets, is unsuitable because of poor solubility of API in acidic environment (Stella et al., 1984). Similarly, at pH 4.5 the amount of dissolved API is too low (tested on 5 mg tablets) and the standard limit for immediate release dosage forms is reached only in some cases (Nguyenpho et al., 2015; Qureshi, 2004). In 10 mg tablets, further deceleration of dissolution is expected, as at this pH, the majority of API will be present in unionized form (Nguyenpho et al., 2015). Dissolution at pH 6.8 differed not significantly from the USP method (Nguyenpho et al., 2015), although it is offered as alternative method (McCormick et al., 1997). There are biorelevant methods: medium with pH 1.2 can be used, followed by switching to pH 7.4 (Wagner et al., 1971) or biphasic method using 1-octanol as second phase (Franc et al., 2016). However, these methods are demanding on equipment and time and not suitable for routine control. Only those

dissolution methods that use neutral or slightly alkaline media are able to dissolve higher amounts of warfarin sodium, i.e. strength 5 mg and higher. Nevertheless, API is dissolved so quickly that any statistical comparison of dissolution profiles is out of question.

All above mentioned methods use paddles with rotation of at least 50 rpm, which is recommended speed for immediate release dosage forms (U.S. Food and Drug Administration, 1997), although some recent papers suggest that in immediate release dosage forms slower rotation speed can be used if the API is well soluble (Qureshi, 2004).

Marginal and central strengths (1 mg, 5 mg, and 10 mg) of tablets manufactured by direct compression from common blend were used to find suitable dissolution conditions. Water and buffer with pH 6.8 were used as dissolution media. When using USP method, at least 85% of API was found to dissolve within 15 min. This was valid in all strengths and is in line with previous findings, excluding any statistical evaluation. Similarly, when using buffer with pH 6.8 and keeping to the other USP conditions, at least 85% of API was dissolved within 20 min, which is also too fast. With respect to literature, rotation speed was decreased to 25 rpm (Qureshi, 2004).

At pH 6.8, the decrease of rotation speed to 25 rpm caused all tested strengths to liberate < 75% of API within 120 min. Dissolution profiles of particular strengths were similar (Table 7). When using USP method and reducing the speed to 25 rpm, > 80% of API was dissolved within 60 min and almost all API was dissolved within 120 min, with particular strengths yielding different dissolution profiles (Fig. 4). Because phosphate buffer contains sodium ions, lower dissolution rate in the buffer can be caused by common ion effect on the solubility of warfarin sodium (Serajuddin et al., 1987).

Altering USP method by reducing rotation speed (water; apparatus II; 25 rpm) resulted in dissolution method that meets requirements on statistical evaluation of dissolution profiles, particularly the calculation of difference and similarity factors. Such comparison of dissolution profiles is essential for the evaluation of stability and shelf-life, for the evaluation of quality after optimization of technological parameters, or for the evaluation of batches with deviations from prescribed procedure during their production (U.S. Food and Drug Administration, 2014).

4. Conclusion

Thanks to factor analysis, optimal values of critical parameters in the production of warfarin sodium tablets were identified. Optimized

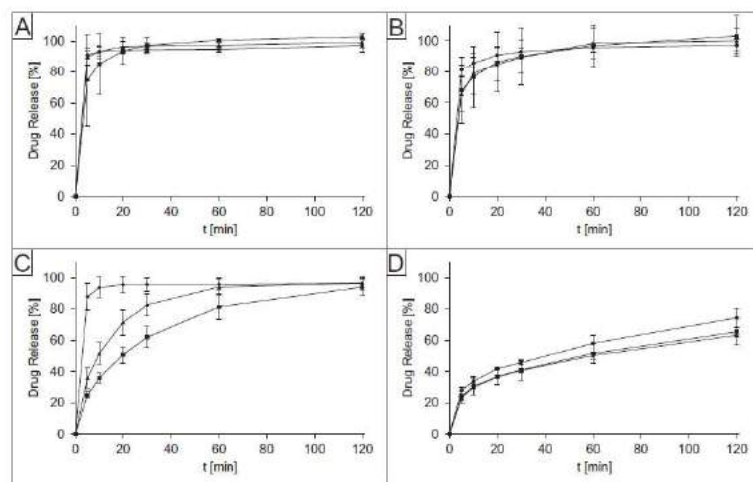


Fig. 4. Dissolution profiles of warfarin sodium tablets: A – water, 50 rpm; B – phosphate buffer pH 6.8, 50 rpm; C – water, 25 rpm; D – phosphate buffer pH 6.8, 25 rpm; (○) 1_B, (▲) 5_B, (■) 10_B; (mean ± standard deviation; n = 6).

technology was used to manufacture tablets by direct compression from common blend, ensuring blend content uniformity and resulting in the production of tablets of whole therapeutic range (1–10 mg) with content uniformity meeting EP requirements. Worst case scenario was used to evaluate the robustness of the process. In two out of three batches of common blend, the content of active substance was deliberately altered to 96%, respectively to 104%. Bergum division and process capability index were used in statistical evaluation of EP content uniformity limits. Modified pharmacopoeial dissolution method, based on decreasing the rotation from 50 rpm to 25 rpm, was found to be suitable for statistical comparison of dissolution profiles of warfarin sodium tablets. Optimization of technological parameters with help of factor analysis seems to be a suitable statistical tool that can be put in practice also by commercial manufacturers to optimize production following the outputs of produced and released batches.

Acknowledgments

The work is supported by the MEYS CR (LO1212), its infrastructure by MEYS CR and EC (CZ.1.05/2.1.00/01.0017) and by CAS (RVO:68081731).

Conflict of interest

None.

References

- Alli, S.L., Krämer, J., 1999. Pharmaceutical quality of warfarin sodium tablets, a multinational postmarket comparative study. *Die Pharmaceutische Industrie* 61, 363–368.
- Am Ende, M.T., et al., 2007. Improving the content uniformity of a low-dose tablet formulation through roller compaction optimization. *Pharm. Dev. Technol.* 12, 391–404.
- Amann, A.H., 1973. Effect of formulation on dissolution of sodium warfarin tablets. *J. Pharm. Sci.* 62, 1573–1574.
- Arruabarrena, J., et al., 2014. Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets. *Int. J. Pharm.* 465, 299–305.
- Benet, L.Z., Goyan, J.E., 1995. Bioequivalence and narrow therapeutic index drugs. *Pharmacotherapy* 15, 433–440.
- Berman, J., et al., 1997. Blend uniformity analysis: validation and in-process testing. Technical report no. 25. PDA (Parenteral Drug Association). *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51, S1–99.
- Carstensen, J.T., Dall, M.V., 1996. Blending validation and content uniformity of low-content, noncohesive powder blends. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, 285–290.
- Chaudry, I.A., King, R.E., 1972. Migration of potent drugs in wet granulations. *J. Pharm. Sci.* 61, 1121–1125.
- Commission regulation (EC) No 1085/2003, 2003. http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_2003_1085/reg_2003_10_85_en.pdf, Accessed date: 2 June 2017.
- Eibl, J., et al., 2016. Influence of drug concentration and blending technology on the content uniformity of mixture for low dose warfarin tablets. *Ceska Slov. Farm.* 65, 211–215.
- European Commission, 2015. Annex 15: Qualification and Validation. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2015_10_annex15.pdf, Accessed date: 2 February 2017.
- Fan, J., et al., 2015. Impact of altered in vitro dissolution profile on warfarin in vivo pharmacokinetics performance-population physiologically based pharmacokinetic (PBPK) simulation. In: Conference Paper in Clinical Pharmacology & Therapeutics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97 (S44).
- Franc, A., Muselík, J., 2013. Process for preparing solid drug form with warfarin sodium salt in the form of isopropanol clathrate, Czech Republic, Patent CZ 304136 B6.
- Franc, A., et al., 2013. Content uniformity of warfarin-containing mixtures and tablets. *Ceska Slov. Farm.* 62, 177–181.
- Franc, A., et al., 2016. Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts. *Acta Pharm.* 66, 139–145.
- Gao, D., Maurin, M.B., 2001. Physical chemical stability of warfarin sodium. *AAPS PharmSci.* 3, 18–25.
- Haines, S.T., 2011. Substituting warfarin products: what's the source of the problem? *Ann. Pharmacother.* 45, 807–809.
- Jaffer, A., Bragg, L., 2003. Practical tips for warfarin dosing and monitoring. *Cleve. Clin. J. Med.* 70, 361–371.
- Mackin, L., et al., 2002. The impact of low levels of amorphous material (< 5%) on the blending characteristics of a direct compression formulation. *Int. J. Pharm.* 231, 213–226.
- McCormick, T.J., et al., 1997. Development and validation of a dissolution method for warfarin sodium and aspirin combination tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1881–1891.
- Muselík, J., Franc, A., 2012. Evaluation of content uniformity of tablets with a low content of the active ingredient with a narrow therapeutic index. *Ceska Slov. Farm.* 61, 271–275.
- Muselík, J., et al., 2014a. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharm.* 64, 355–367.
- Muselík, J., et al., 2014b. Optimization of technological processes for the preparation of tablets with a low content of warfarin by direct compression. *Ceska Slov. Farm.* 63, 217–221.
- Nguyenpho, A., et al., 2015. Evaluation of in-use stability of anticoagulant drug products: warfarin sodium. *J. Pharm. Sci.* 104, 4232–4240.
- O'Reilly, et al., 1966. Physicochemical and physiologic factors affecting the absorption of warfarin in man. *J. Pharm. Sci.* 55, 435–437.
- Parikh, D.M., 2010. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. CRC Press, New York.
- Qureshi, S.A., 2004. Choice of rotation speed (rpm) for bio-relevant drug dissolution testing using a crescent-shaped spindle. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23, 271–275.
- Rahman, Z., et al., 2015a. Understanding effect of formulation and manufacturing variables on the critical quality attributes of warfarin sodium product. *Int. J. Pharm.* 495, 19–30.
- Rahman, Z., et al., 2015b. Chemometric model development and comparison of Raman and ¹³C solid-state nuclear magnetic resonance-chemometric methods for quantification of crystalline/amorphous warfarin sodium fraction in the formulations. *J. Pharm. Sci.* 104, 2550–2558.
- Reichton-Hewett, S., et al., 1988. Medical and economic consequences of a blinded oral anticoagulant brand change at a municipal hospital. *Arch. Intern. Med.* 148, 806–808.
- Sawoniak, A.E., et al., 2002. Formulary considerations related to warfarin interchangeability. *Can. J. Hosp. Pharm.* 55, 215–218.
- Serajuddin, A.T., et al., 1987. Common ion effect on solubility and dissolution rate of the sodium salt of an organic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 587–591.
- Stella, V.J., et al., 1984. Dissolution and ionization of warfarin. *J. Pharm. Sci.* 73, 946–948.
- Tadros, R., Shakib, S., 2010. Warfarin: indications, risks and drug interactions. *Aust. Fam. Physician* 39, 476–479.
- The United States Pharmacopeia-National Formulary, 2015. USP 39-NF 34. (Rockville, MD).
- U.S. Food and Drug Administration, 1995. *Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation*. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070636.pdf>, Accessed date: 2 January 2017.
- U.S. Food and Drug Administration, 1997. *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070237.pdf>, Accessed date: 17 January 2017.
- U.S. Food and Drug Administration, 2003. *Guidance for Industry: Bioavailability And Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations*. http://www.fda.gov/ohrtms/dockets/ac/03/briefing/399581_07_GFI-BioAvail-BioEquiv.pdf, Accessed date: 16 January 2017.
- U.S. Food and Drug Administration, 2013. *Stability Guidance & Draft Q&A Guidance-Considerations*. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/smallbusinessassistance/ucm373234.pdf>, Accessed date: 16 January 2017.
- U.S. Food and Drug Administration, 2014. *Guidance for Industry CMC Postapproval Manufacturing Changes to be Documented in Annual Reports*. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm217043.pdf>, Accessed date: 2 January 2017.
- Vercaigne, L.M., Zhanel, G.G., 1998. Clinical significance of bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: focus on warfarins. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1, 92–94.
- Wagner, J.G., et al., 1971. In vivo and in vitro availability of commercial warfarin tablets. *J. Pharm. Sci.* 60, 666–677.
- Wittkowsky, A.K., 1997. Generic warfarin: implications for patient care. *Pharmacotherapy* 17, 640–643.

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J. a FRANC, A. Vývoj disolučnej metódy pre tablety s obsahom warfarínu sodného. *Česká a slovenská farmacie*. 6/2017. (N35-2017; *in print*).



Česká a slovenská **FARMACIE**

Czech and Slovak Pharmacy

ČASOPIS ČESKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI
JOURNAL OF THE CZECH PHARMACEUTICAL SOCIETY
AND THE SLOVAK PHARMACEUTICAL SOCIETY

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

Česká farmaceutická společnost ČLS JEP
Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého 1, 612 42, Brno

POTVRZENÍ

oznamuji Vám, že rukopis N35-2017 autorů: Ivana Lukášová, Jan Muselík, Aleš Franc s názvem *Vývoj disoluční metody pro tablety s obsahem warfarinu sodného* byl 24. 11. 2017 přijat k publikaci do časopisu ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE (ISSN 1210-7816) a bude publikován dle publikačního plánu v čísle 6/2017 (právě v tisku).

S pozdravem

V Brně 5. 12. 2017


Doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph.D.
Vedoucí redaktor

Vývoj disolučnej metódy pre tablety s obsahom warfarínu sodného

Development of dissolution method for warfarin sodium tablets

Ivana Lukášová • Jan Muselík • Aleš Franc

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, e-mail: ivana.lukasova@gmail.com

Súhrn

Warfarín je stále rozsiahle diskutovaným liečivom s úzkym terapeutickým indexom. Jeho generické náhrady boli v minulosti príčinou krvácavosti. Ako príčina boli diskutované kvalita substancie a miera obsahovej rovnorodosti. Kvalitu substancie je možné posúdiť vhodnou disolučnou metódou. Doteraz existuje pre tablety s obsahom warfarínu oficiálna miešadlová disolučná metóda s vodným médiom, ktorá nemá rozlišujúci charakter. V priebehu prvých 15 minút u nej dochádza k takmer úplnému uvoľneniu účinnej látky z liekovej formy, čím je znemožnené vzájomné porovnanie tabliet od rôznych výrobcov alebo sledovanie prípadných zmien v priebehu stabilitných testov. Z literatúry je známa aj metóda s médiom s pH 6,8, ktorá sa odporúča ako vhodná alternatíva. Cieľom tejto práce bolo vyskúšať, či táto metóda, pri dvoch rýchlostiach otáčok (50 a 25 rpm) bude vhodná k výpočtom faktorov podobnosti a rozdielnosti, a prípadne bude mať rozlišujúci charakter vzhľadom k veľkosti častíc účinnej látky a pevnosti tabliet. Za týmto účelom boli vyrobené tablety s obsahom 10 mg sodnej soli warfarínu vo forme kryštalického klathrátu s izopropanolom. Pripravené tablety sa líšili veľkosťou častíc účinnej látky ($d_{50} = 4,8$, resp. $22,5 \mu\text{m}$) a ich radiálnou pevnosťou (30, resp. 100 N). Obsahová rovnorodosť tabliet, bola overená pomocou indexu spôsobilosti procesu (Cpk) a Bergumovej metódy. Bolo potvrdené, že disolučné médium s pH 6,8 umožňuje vzájomné porovnanie disolučných profilov pomocou výpočtov faktorov podobnosti a rozdielnosti, no za daných podmienok nemá rozlišujúci charakter.

Kľúčové slová: warfarín • disolučná metóda • distribúcia veľkosti častíc • radiálna pevnosť • faktor podobnosti • faktor rozdielnosti

Summary

Warfarin is intensively discussed drug with narrow therapeutic range. In the past, its generic substitution was identified as a cause of bleeding. Discussed was altered quality of the active substance or varying drug content. The substance quality can be achieved with adequate dissolution method. There is an official dissolution method with aqueous medium, which is non-discriminatory. In the first 15 minutes is the whole amount of the active pharmaceutical ingredient released from a tested drug form, which disables comparison between tablets from different producers and tracking the changes in drug stability. In the literature, there is a well known method using buffer pH 6.8, which seems to be a good alternative to water. The aim of this study was to proof, if this alternative medium, when using two speeds for dissolution (50 or 25 rpm), will be suitable for calculation of similarity and difference factor and if it will be discriminatory by particle size and radial hardness. For this purpose we prepared tablets with 10 mg of warfarin. Tablets differ by particle size of active pharmaceutical ingredient ($d_{50} = 4.8$, resp. $d_{50} = 22.5 \mu\text{m}$) or by radial hardness (30, resp. 100 N). The content uniformity of the tablets was determined using process capability index (Cpk) and Bergum method. It was confirmed that the dissolution medium with pH of 6.8 allows comparison of dissolution profiles by calculating of similarity and difference factors but under this conditions is not discriminatory.

Key words: warfarin • dissolution method • particle size distribution • radial hardness • similarity factor • difference factor

Úvod

Warfarín sodný, či už vo forme kryštálu alebo amorfu, patrí medzi liečivá s úzkym terapeutickým indexom ¹⁾. Z chemického hľadiska sa jedná o soľ slabšej kyseliny a silnej zásady s hodnotou pKa 5,05 ²⁾. Rozpustnosť tejto účinnej látky závisí od stupňa ionizácie molekuly a úzko súvisí s pH okolitého prostredia. K rýchlemu rozpusteniu sodnej soli warfarínu dochádza vo vode. K spomaleniu rozpúšťania dochádza v kyslom prostredí. V zásaditom prostredí sa rozpustnosť warfarínu zvyšuje vplyvom ionizácie molekúl. Z hľadiska biofarmaceutického klasifikačného systému (BCS) patrí warfarín do II. triedy, pre ktorú je typická nízka rozpustnosť a vysoká permeabilita ³⁾.

Skúška disolúcie je jedným zo základných testov pri zabezpečovaní kvality liekovej formy. Táto liekopisná skúška sa využíva tiež na sledovanie zmien liberácie v priebehu skladovania a u bioekvivalenčných štúdií. Pri bioekvivalenčných a stabilitných štúdiách sa obvykle testujú tablety s najvyšším obsahom účinnej látky (*active pharmaceutical ingredient*, API), čo v prípade warfarínu zodpovedá tabletám s obsahom 10 mg liečiva. Ak sa bioekvivalencia potvrdí na najvyššej terapeutickej sile, je výsledky často možné aplikovať aj na ostatné sily⁴⁾. U stabilitných štúdií, môžu byť ostatné sily redukované metódami matrixingu a bracketingu⁵⁾. Toto riešenie je pre výrobcov ekonomicky a časovo výhodné.

Rôzne prípravky s rovnakou účinnou látkou, môžu mať odlišné kvalitatívne vlastnosti (napr. veľkosť častíc API), môžu obsahovať rôzne pomocné látky, či môžu byť vyrobené rôznymi technologickými postupmi, čo môže ovplyvňovať rýchlosť a množstvo uvoľnenej API. Ku zmenám kvality prípravku môže dôjsť aj v dôsledku variability výroby alebo v priebehu testovania stability prípravku, ktorý má už dané zloženie a technológiu výroby. U liečivých látok s úzkym terapeutickým indexom, kde uvoľňovanie účinnej látky môže vo zvýšenej miere ovplyvniť odpoveď organizmu, je preto vhodné nájsť takú disolučnú metódu, ktorá umožní vzájomné porovnanie disolučných profilov pomocou výpočtu faktora podobnosti f_2 a faktora rozdielnosti f_1 .

USP, resp. FDA metóda, ktoré pre tablety s obsahom sodnej soli warfarínu používajú vodné médium pri otáčkach 50 rpm (prístroj s lopatkovým miešadlom) nemá rozlišujúcu schopnosť^{6,7,8)}, nie je biorelevantná a neumožňuje spravidla výpočet f_1 a f_2 ⁹⁾. Použitie média s pH 1,2, ktoré sa používa u tabliet s okamžitým uvoľňovaním, je nevhodné z dôvodu nízkej rozpustnosti warfarínu v kyslom prostredí¹⁰⁾. Pri testoch s médium s pH 4,5 sa zistilo nedostatočné množstvo uvoľneného warfarínu (testované na tabletách s obsahom 5 mg API). Pri tomto pH je štandardný limit pre liekové formy s okamžitým uvoľňovaním dosiahnutý len v niektorých prípadoch^{7,11)}. Pri obsahu 10 mg warfarínu, sa dá preto predpokladať ďalšie zníženie uvoľneného množstva, lebo väčšina jeho molekúl sa pri pH 4,5 nachádza v neionizovanej forme. Existujú aj biorelevantné metódy, ako je kombinácia média s pH 1,2, buď s následným zvýšením na pH 7,4¹²⁾ alebo s n-oktanolom metódou bifázickej disolúcie¹³⁾. Uvedené metódy sú však pre rutinnú kontrolu technicky aj časovo náročné. Dá sa skonštatovať, že iba disolučné metódy s použitím neutrálnych a mierne bázičných médií, v ktorých je warfarín dobre rozpustný, sú vhodné pre disolúciu tabliet s najvyšším terapeutickým obsahom 10 mg warfarínu. Ako alternatíva k liekopisnej metóde využívajúcej vodu býva preto ponúkané médium

s pH 6,8^{2, 14)}. Pri použití tohto média sa predpokladá veľmi dobrá rozpustnosť warfarínu, čo vyplýva z jeho chemickej povahy. Vplyvom výskytu spoločného iónu sodíka v pufrí a v molekule warfarínu, môže pri disolúcii však paradoxne dochádzať k spomaleniu rozpúšťania warfarínu a celkovo disolúcie¹⁵⁾. Vďaka spomaleniu rozpúšťania by toto médium mohlo byť použité pre výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti a umožniť rozlíšenie medzi prípravkami s rozličnými kvalitatívnymi vlastnosťami, ktoré môžu byť ovplyvnené variabilitou výroby.

Všetky tieto spomenuté metódy používajú otáčky lopatkového miešadla nie menej ako 50 rpm, čo je doporučená rýchlosť pre lieky s okamžitým uvoľňovaním¹⁶⁾. Niektoré súčasné práce naznačujú, že pre okamžité uvoľňovanie s dobre rozpustnou API je možné použiť aj nižšie otáčky, čo by mohlo mať rozlišujúci účinok¹¹⁾.

Cieľom práce bolo overiť vhodnosť média s pH 6,8 pre disolúciu warfarínu na základe výpočtov faktorov podobnosti a rozdielnosti a overenie rozlišujúcej schopnosti použitého média s ohľadom na kvalitu použitej substancie a liekovej formy. K tomuto účelu boli pripravené tablety s obsahom 10 mg warfarínu vo forme kryštalického klathrátu s izopropanolom, ktoré sa líšili veľkosťou častíc warfarínu ($d_{50} = 4,8$, resp. $22,5 \mu\text{m}$) a ich radiálnou pevnosťou (30, resp. 100 N). Vyrobené tablety boli podrobené disolučnej skúške pri liekopisom stanovených otáčkach (50 rpm) a znížených otáčkach (25 rpm).

Pokusná časť

Príprava tabliet

Zloženie zmesí a základné fyzikálno-chemické vlastnosti jednotlivých zložiek sú uvedené v tab. 1. Zvolenými premennými bola veľkosť častíc warfarínu. Celkovo boli pripravené 2 šarže zmesí. Všetky suroviny okrem warfarínu boli preosiate cez sito s veľkosťou ôk $500 \mu\text{m}$. Približne 50,0 g warfarínu bolo preosiatych sústavou 2 sít umiestnených nad sebou (väčšie hore), ktorých veľkosť ôk bola 250 a $80 \mu\text{m}$. Sítá boli umiestnené do sitovacieho zariadenia Retch AS 200 Basic (Nemecko). Sústava sa nechala vibrovať 10 minút pri amplitúde 60 (podľa stupnice prístroja). Frakcia zachytená na site o veľkosti ôk $250 \mu\text{m}$, bola použitá pri príprave šarže II a frakcia zachytená pod sitom o veľkosti ôk $80 \mu\text{m}$ sa použila k príprave šarže I. Zmesi boli pripravené patentovanou technológiou¹⁷⁾. Veľkosť jednej šarže bola 500,0 g. Z pripravených zmesí (šarža I a II), bolo odobratých 10 vzoriek postupom prevzatým z experimentu¹⁸⁾, u ktorých bol stanovený obsah. Pred lisovaním bola každá zmes podrobená testovaniu fyzikálnych

vlastností podľa ČL 2009¹⁹⁾ (viď fyzikálne hodnotenie zmesí a tabliet). Zvyšná zmes bola vylisovaná výstredníkovým tabletovacím lisom Korsch EK0 (Nemecko) do tabliet s použitím plochých razidiel s priemerom 13 mm. Z každej zmesi boli pripravené tablety s obsahom 10 mg warfarínu o rôznej distribúcii veľkosti častíc warfarínu (šarža I a II), ktorých teoretická hmotnosť bola 542,0 mg. Nastavenie lisovacej sily sa v priebehu lisovania menilo tak, aby tablety dosiahli 2 cieľové radiálne pevnosti ~ 30 a 100 N. V priebehu lisovania bolo v pravidelných časových intervaloch odobratých 10 vzoriek pre kontrolu obsahovej rovnorodosti a zvyšné tablety boli použité k hodnoteniu podľa ČL 2009.

Fyzikálne hodnotenie zmesí a tabliet

U zmesí bol stanovený sypný uhol, index stlačiteľnosti, Hausnerov pomer a rýchlosť vytekania otvorom. Sypná a zhustená hustota bola stanovená podľa čl. 2.9.15 a 2.9.34 s použitím zariadenia SVM 102 (Erweka, Nemecko). Rýchlosť vytekania otvorom bola stanovená podľa čl. 2.9.16 ČL s použitím násypky s uzatvoreným spodným koncom od firmy Medipo (ZT, Česká republika).

U tabliet bola hodnotená mechanická odolnosť – pevnosť, oder, výška, rozpad a hmotnostná rovnorodosť. Pevnosť, výška a hmotnosť tabliet (n = 20) bola stanovená pomocou zariadenia Pharmatest WHT-1 (Pharmatest, Nemecko). Hmotnostná rovnorodosť bola stanovená podľa čl. 2.9.5 a pevnosť tabliet podľa čl. 2.9.8. Oder bol hodnotený podľa čl. 2.9.7 pomocou friabilitátora TAR 10 (Erweka, Nemecko). Rozpad bol stanovený podľa čl. 2.9.1 s použitím ZT 4 (Erweka, Nemecko).

Stanovenie obsahu warfarínu

Obsah warfarínu v pripravených zmesiach a tabletách bol stanovený pomocou HPLC. Postup prípravy vzoriek a priebeh analytického stanovenia bol prevzatý z literatúry¹⁸⁾.

Skúška disolúcie

Pripravené tablety (12 tabliet z každej šarže) boli hodnotené miešadlovou disolučnou metódou na prístroji Sotax (AT 7 Donau Lab, Švajčiarsko). Na základe tejto skúšky bolo stanovené množstvo uvoľnenej účinnej látky v čase. Ako disolučné médium bol použitý fosfátový pufer s pH 6,8 pripravený podľa ČL 2009¹⁹⁾. Objem pufru

bol 900 ml. Rýchlosť otáčania lopatkových miešadiel bola nastavená na 50, resp. 25 rpm. V priebehu skúšky bola v systéme udržiavaná teplota $37 \pm 0,5$ °C. V čase 5, 10, 20, 30, 60 a 120 minút boli z disolučných nádob pomocou 2 ml pipety ručne odobraté vzorky, ktoré boli analyzované metódou HPLC za rovnakých podmienok, za akých bola analyzovaná zmes a tablety pri stanovení obsahu. Pre každý odberový bod bolo vypočítané relatívne množstvo uvoľneného liečiva a smerodajná odchýlka.

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky stanovenia obsahu jednotlivých vzoriek zmesí a tabliet z každej šarže ($n = 10$) boli prepočítané relatívne voči teoretickému obsahu warfarínu. Z týchto hodnôt bol pre každú pripravenú šaržu vypočítaný priemerný obsah, RSD a Cpk index pre limity ČL 2009 čl. 2.9.6 (85 – 115 %). Zmesi boli hodnotené aj podľa kritérií FDA, podľa ktorých je limit pre obsahovú rovnorodosť 90 – 110 % a $RSD < 5\%$ ²⁰⁾. Tablety boli navyše hodnotené tiež podľa čl. 2.9.40 ČL 2009 ¹⁹⁾. Získané hodnoty RSD tabliet boli porovnané s tabelovanými hodnotami Bergumovej metódy.

Pre porovnanie disolučných profilov tabliet bol vypočítaný faktor podobnosti f_2 a faktor rozdielnosti f_1 ²¹⁾ a ďalej účinnosť disolúcie (D.E.) vypočítaná na základe plochy pod disolučnou krivkou ²²⁾. Obidva faktory boli vypočítané z priemerného relatívneho množstva uvoľneného liečiva vo všetkých odberových bodoch (5 – 120 minút).

Výsledky a diskusia

V tejto experimentálnej práci bola testovaná vhodnosť použitia alternatívneho disolučného média s pH 6,8 pre výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti disolučných kriviek uvoľňovania warfarínu pri otáčkach 50 a 25 rpm (prístroj s lopatkovým miešadlom). Za týmto účelom boli pripravené tablety s teoretickým obsahom 10 mg warfarínu sodného (zloženie v tab. 1), ktoré sa líšili veľkosťou častíc warfarínu (šarža I s $d_{50} = 4,8$ a šarža II s $d_{50} = 22,5$ μm) a ich radiálnou pevnosťou (30 a 100 N) z dôvodu simulácie variability výroby. Výsledky hodnotenia tokových vlastností pripravených zmesí sú uvedené v tab. 2. Na základe indexu stlačiteľnosti a Hausnerovho pomeru bol tok zmesí vyhodnotený ako primeraný. Podľa stanoveného sypného uhla bol charakter toku výborný. Dobré tokové vlastnosti je možné pripísať plnivu Di-cafos, ktorého zastúpenie v zmesi činí 70 % a vyznačuje sa veľmi dobrými tokovými vlastnosťami ²³⁾. Zmesi boli následne vylisované do tabliet.

Fyzikálno-chemické vlastnosti tabliet s teoretickým obsahom 10 mg warfarínu sú zhrnuté v tab. 3. Rozpad tabliet všetkých šarží vyhovuje požiadavkám liekopisu a to bez ohľadu na veľkosť častíc, či pevnosť. Čas rozpadu tabliet s radiálnou pevnosťou 100 N bol v porovnaní s tabletami s pevnosťou 30 N dlhší. Predĺženie času rozpadu so vzrastajúcou pevnosťou je v zhode s očakávaním, nakoľko čím vyššia lisovacia sila sa pri lisovaní použije, tým pevnejšie sú aj hotové výlisky a tým pomalší je rozpad. Oder tabliet bol nepatrne vyšší u tabliet s pevnosťou 30 N, čo zodpovedá všeobecným zákonitostiam. Všetky tablety vyhovelí skúške oderu. Na základe výsledkov hodnotenia tabletových zmesí a tabliet sa zistilo, že zvolený technologický postup vedie k výrobe štandardných tabliet. Tablety majú vyhovujúce liekopisné vlastnosti a medzi šaržami neboli zistené významné rozdiely, ktoré by mohli negatívne skresliť výsledky disolučnej skúšky.

Vyhodnotenie obsahovej rovnorodosti zmesí a tabliet s obsahom 10 mg warfarínu

Zmesi a tablety boli podrobené tiež skúške obsahovej rovnorodosti, nakoľko nevyhovujúca obsahová rovnorodosť by mohla negatívne ovplyvniť výsledky disolučnej skúšky. Pre zabezpečenie obsahovej rovnorodosti, s ohľadom na úzky terapeutický index warfarínu, používajú viacerí výrobcovia prísnejší limit obsahovej rovnorodosti pre tablety v porovnaní s liekopisnými limitmi. Konkrétne sa jedná o limit firmy DuPont Pharma, ktoré postupne prebrali aj ďalší generickí výrobcovia (Apotex, Taro Pharmaceuticals)^{24, 25)}. Podľa tohto limitu, musí obsah desiatich testovaných jednotiek spadať do intervalu 92,5 – 107,5 % a RSD musí byť do 3 %²⁶⁾. Pre zabezpečenie, že nie len testovaná šarža, ale aj všetky nasledujúce splnia predpísané limity, sa používajú rôzne štatistické nástroje. Jedná sa napr. o index spôsobilosti procesu Cpk^{27, 28)} a Bergumovu metódu²⁹⁾, ktoré na danej štatistickej hladine významnosti zabezpečujú, že aj ďalšie vyrobené šarže splnia liekopisné požiadavky na obsahovú rovnorodosť. Výsledky obsahovej rovnorodosti tabletových zmesí a tabliet sú zhrnuté v tab. 4 a 5 a sú pre všetky testované zmesi a tablety vyhovujúce, čím je zabezpečené, že výsledky disolučnej skúšky nebudú negatívne ovplyvnené kolísaním obsahu liečiva v tabletách. Tablety spĺňajú tiež limit výrobcu DuPont.

Vyhodnotenie skúšky disolúcie s médiom s pH 6,8

Vyrobené tablety boli následne podrobené skúške disolúcie v prostredí pufru s pH 6,8. Vplyvom výskytu spoločného iónu sodíka v puFRE a v molekule warfarínu sa očakávalo spomalenie uvoľňovania warfarínu oproti vode, na základe ktorého bude

možné vzájomné porovnanie disolučných profilov, a prípadne tak bude možné rozlíšiť tiež kvalitu tabliet (veľkosť častíc warfarínu a pevnosť tabliet).

Na obr. 1 resp. 2 sú vyobrazené disolučné krivky pri 50 rpm resp. 25 rpm. Obe metódy umožňujú výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti, no nemajú tu rozlišujúci charakter (tab. 10, resp. 11). Pri otáčkach 25 rpm dochádza k zníženiu rýchlosti uvoľňovania v porovnaní s otáčkami 50 rpm a ani po 120 minútach nedôjde k uvoľneniu 80 % warfarínu. Na základe výpočtov faktorov podobnosti a rozdielnosti (tab. 11) sa zistilo, že niektoré podobné krivky podľa f_2 (54,55 resp. 54,62) sú zároveň rozdielne podľa f_1 (19,16 resp. 16,75). Nesúlad medzi f_1 a f_2 je dobre známy aj z literatúry,^{13, 22)} no pre legislatívne účely je rozhodujúci faktor podobnosti f_2 ³⁰⁾. Vzhľadom k nejednotnosti záverov na základe výpočtov f_1 a f_2 boli disolučné profily porovnané taktiež pomocou výpočtu D.E. (tab. 10 a tab. 11). Literatúra uvádza, že pokiaľ je zmena D.E. medzi hodnotenými profilmi menšia ako 10, je možné profily považovať za podobné²²⁾. Pretože absolútna hodnota maximálnej zmeny D.E. medzi hodnotenými profilmi nepresiahla hodnotu 7, je možné na základe tohto parametra považovať profily za podobné. Zníženie otáčok teda nielen že nevedie k rozlišujúcemu charakteru, no nejaví sa ako vhodné ani z hľadiska nedostatočného množstva uvoľnenej látky. Je teda možné konštatovať, že disolučné médium s pH 6,8 umožní porovnanie disolučných kriviek na základe výpočtov f_1 a f_2 , ale za daných podmienok bez rozlišujúceho charakteru. Len otáčky 50 rpm sa javia ako relevantné, pretože umožňujú splniť obvyklý liekopisný limit Q limitu (75 % + 5 %) ¹⁹⁾.

Záver

V tejto práci bolo pomocou disolučnej skúšky hodnotené uvoľňovanie sodnej soli warfarínu z tabliet s teoretickým obsahom 10 mg. Pri skúške disolúcie bolo použité médium s pH 6,8, ktoré sa používa ako alternatíva k liekopisnej metóde používajúcej vodu, ktorá nie je vhodná pre výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti. Zvolená miešadlová disolučná metóda pri otáčkach 50 rpm nemá rozlišujúci charakter s ohľadom na použitú veľkosť častíc warfarínu a pevnosť. Tvarom disolučnej krivky sa však umožní výpočet faktorov podobnosti a rozdielnosti a teda porovnanie kriviek, čo je dôležité v priemysle napríklad pri transfere technológií alebo v hodnotení stabilitných štúdií.

Zoznam skratiek

API	- účinná látka
Cpk	- index spôsobilosti procesu
ČL 2009	- Český liekopis 2009
D.E.	- efektivita disolúcie
FDA	- Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
rpm	- počet otáčok za minútu
RSD	- relatívna smerodajná odchýlka

Stret záujmov: žiaden

Literatúra

1. **Benet, L.Z., Goyan, J.E.** Bioequivalence and narrow therapeutic index drugs. *Pharmacotherapy*. 1995; 15, 433-440.
2. **Zhang, X., Wen, H., Fan, J., Vince, B., Li, T., Gao, W., Kinjo, M., Brown, J., Sun, W., Jiang, W., Lionberger, R.** Integrating *in vitro*, modeling, and *in vivo* approaches to investigate warfarin bioequivalence. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2017; 6, 523-531.
3. **Benet, L.Z.** The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. *J. Pharm. Sci.* 2013; 102, 34-42.
4. EMEA. Guideline on the investigation of bioequivalence (2010). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (25.10.2017).
5. EMEA. ICH Topic Q 1 D; Bracketing and matrixing designs for stability testing of drug substances and drug products (2002). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002652.pdf (20.10.2017).
6. U.S. Pharmacopeia. USP 29 Warfarin sodium tablets. http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m88790.html (18.10.2017).

7. **Nguyenpho, A., Ciavarella, A.B., Siddiqui, A., Rahman, Z., Akhtar, S., Hunt, R., Korang-Yeboah, M., Khan, M.A.** Evaluation of in-use stability of anticoagulant drug products: Warfarin sodium. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104, 4232-4240.
8. **Ali, S.L., Krämer, J.** Pharmaceutical quality of warfarin sodium tablets: A multinational postmarket comparative study. *Pharm. Ind.* 1999; 61, 363-368.
9. **O'Reilly, R.A., Nelson, E., Levy, G.** Physicochemical and physiologic factors affecting the absorption of warfarin in man. *J. Pharm. Sci.* 1966; 55, 435-437.
10. **Stella, V.J., Mooney, K.G., Pipkin, J.D.** Dissolution and ionization of warfarin. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73, 946-948.
11. **Quereshi, S.A.** Choice of rotation speed (rpm) for bio-relevant drug dissolution testing using a crescent-shaped spindle. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 23, 271-275.
12. **Wagner, J.G., Welling, P.G., Lee, K.P., Walker, J.E.** *In vivo* and *in vitro* availability of commercial warfarin tablets. *J. Pharm. Sci.* 1971; 60, 666-677.
13. **Franc, A., Muselík, J., Goněc, R., Vetchý, D.** Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts. *Acta Pharm.* 2016; 66, 139-145.
14. **McCormick, T.J., Gibson, A.B., Diana, F.J.** Development and validation of a dissolution method for warfarin sodium and aspirin combination tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997; 15, 1881-1891.
15. **Serajuddin, A.T., Sheen, P.C., Augustine, M.A.** Common ion effect on solubility and dissolution rate of the sodium salt of an organic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987; 39, 587-591.
16. FDA. Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms (1997). <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf> (18.10.2017).
17. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Franc, A., Muselík, J. Způsob přípravy pevné lékové formy se sodnou solí warfarínu ve formě klathrátu izopropanolu. Patent CZ 304136 Czech Republic, 2013.
18. **Muselík, J., Franc, A., Doležel, P., Goněc, R., Krondlová, A., Lukášová, I.** Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharm.* 2014; 64, 355-367.
19. Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing 2009; 3968 s.

20. FDA. Guidance for industry. ANDAs: Blend uniformity analysis (1999). <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/992635gd.pdf> (20.10.2017).
21. **Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Williams, R.L.** Dissolution profile comparison using similarity factor, f_2 . <http://www.dissolutiontech.com/DTresour/899Art/DissProfile.html> (18.10.2017).
22. **Anderson, N.H., Bauer, M., Boussac, N., Khan-Malek, R., Munden, P., Sardaro, M.** An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of *in vitro* dissolution profiles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 17, 811-822.
23. **Ondrejček, P., Svačinová, P., Vraníková, B., Holas, O., Rabišková, M., Škubalová, Z.** Compaction equation and its use in the determination of compressibility of pharmaceutical materials. Poster. 2016.
24. **Sawoniak, A.E., Shalansky, K.F., Zed, P.J., Sunderji, R.** Formulary considerations related to warfarin interchangeability. *Can. J. Hosp. Pharm.* 2002; 55, 215-218. <http://cjhp-online.ca/index.php/cjhp/article/viewFile/578/679>.
25. Interchangeability of warfarin sodium preparations. <https://www.ab.bluecross.ca/dbl/pdfs/dblreportdec00update.pdf> (13.10.2017).
26. **Wittkowsky, A.K.** Generic warfarin: implications for patient care. *Pharmacotherapy.* 1997; 17, 640-643.
27. **Perez-Wilson, M.** Machine/Process Capability Study. A five stage methodology for optimizing manufacturing processes. 6th ed. Arizona: Advanced Systems Consultants. 2014; s. 357.
28. **Pearn, W.L., Shu, M.H.** Manufacturing capability control for multiple power-distribution switch processes based on modified Cpk MPPAC. *Microelectron. Reliab.* 2003; 43, 963-975.
29. **Bergum, J.S., Li, H.** Acceptance limits for the new ICH USP 29 content-uniformity test. *Pharm. Technol.* 2007; 31, 90-100.
30. FDA. Guidance for industry. Immediate release solid oral dosage forms (1995). <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070636.pdf> (22.10.2017).

Korešpondenčný autor*:

PharmDr. Ivana Lukášová

Ústav technológie léků

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

e-mail: ivana.lukasova@gmail.com

Tab. 1. Zloženie tabletových zmesí a fyzikálno-chemické vlastnosti jednotlivých zložiek

Komponenta	Výrobca	Veľkosť častíc [μm] ^a			Obsah v %		Obsah v g
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Šarža I	Šarža II	
Warfarin sodný	Pliva	0,9	4,8	10,3	2	-	10
		2,7	22,5	234,3	-	2	
Di-cafos 92-14	Budenheim KG	2,4	152,3	309,8		70	350
Avicel pH 101	FMC BioPolymer	14,7	46,3	110,7		25	125
Ac-Di-Sol	FMC BioPolymer	12,2	33,1	86,7		2	10
Stearan horečnatý	Peter Greven	2,6	10,2	23,1		1	5

^aD_x = x % meraných častíc má veľkosť menšiu než uvedená veľkosť v μm ; Di-cafos – hydrogénfosforečnan vápenatý dihydrát; Avicel pH 101 – mikrokryštalická celulóza; Ac-Di-Sol – sodná soľ kroskarmelózy.

Tab. 2. Hodnotenie tokových vlastností zmesí

Šarža	Sypný uhol [°]	Sypnosť ^a [100 g.s ⁻¹]	Index stlačiteľnosti [%]	Hausnerov pomer	Charakter toku
I	30	2,51 ± 0,09	15,71	1,19	primeraný
II	28	2,35 ± 0,12	16,67	1,20	primeraný

^a priemerná hodnota z troch meraní rýchlosti vytekania otvorom ± smerodajná odchýlka.

Tab. 3. Hodnotenie tablet

Šarža	Obsah warfarínu	Teoretická pevnosť tbl. [N]	Rozpad [s]	Oder [%]	Pevnosť ^a [N]	Hmotnosť tbl. ^a [mg]
I	10 mg	30 N	5	0,699	28 ± 0,76	542,51 ± 0,62
		100 N	31	0,631	99 ± 0,83	543,11 ± 0,51
II	10 mg	30 N	6	0,742	32 ± 1,12	543,22 ± 1,28
		100 N	28	0,509	101 ± 0,82	544,19 ± 1,33

^a priemerná hodnota z 20 meraní ± smerodajná odchýlka.

Tab. 4. Hodnotenie obsahovej rovnorodosti tabletových zmesí

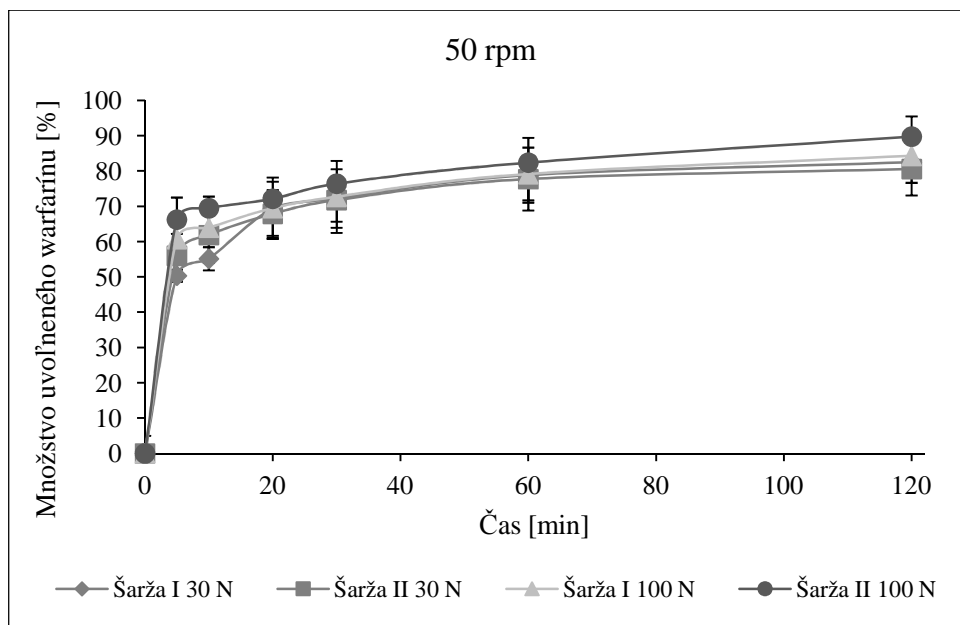
Šarža	x_i^a [%]	RSD	ČL 2009 (čl. 2.9.6) ^b	FDA ^c	Cpk (čl. 2.9.6) ^d
I	100,5	3,6	+	+	1,3
II	100,4	3,6	+	+	1,3

^a priemerná hodnota obsahu z desiatich vzoriek danej šarže; ^b limity ČL 2009 85 – 115 %; ^c limity FDA (90 - 110 %, RSD < 5 %); ^d Cpk index pre limity čl. 2.9.6, (+) vyhovuje (-) nevyhovuje.

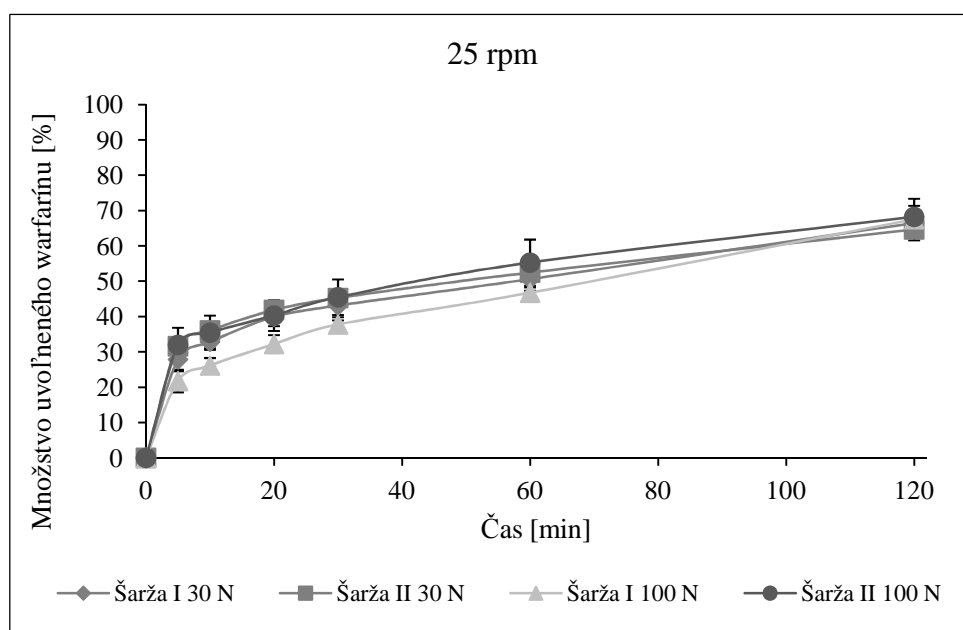
Tab.5. Hodnotenie obsahovej rovnorodosti tablet s teoretickým obsahom 10 mg warfarínu

Pevnosť tbl. [N]	Šarža	x_i^a [%]	RSD	ČL 2009 (čl. 2.9.6) ^b	Cpk (čl. 2.9.6) ^c	ČL 2009 (čl. 2.9.40)	Bergumova metóda
30 N	I	96,3	1,6	+	2,1	+	+
	II	100,7	1,5	+	3,1	+	+
100 N	I	97,8	0,5	+	8,1	+	+
	II	98,2	1,3	+	3,3	+	+

^a priemerná hodnota obsahu z desiatich vzoriek danej šarže; ^b limity ČL 2009 85 – 115 %; ^c Cpk index pre limity čl. 2.9.6. (+) vyhovuje (-) nevyhovuje.



Obr 1. Skúška disolúcie tablet s obsahom 10 mg warfarínu pri 50 rpm v pufri s pH 6,8



Obr 2. Skúška disolúcie tablet s obsahom 10 mg warfarínu pri 25 rpm v pufri s pH 6,8

Tab. 10. Porovnanie disolučných profilov v pufri s pH 6,8 pri 50 rpm na základe výpočtov f_1 , f_2 a $\Delta D.E.$

Hodnotená vzorka / porovnávacía vzorka	Faktor podobnosti f_2	Faktor rozdielnosti f_1	$ \Delta D.E. $
Šarža I 30 N / Šarža II 30 N	70,58	4,25	0,4
Šarža I 100 N / Šarža II 100 N	66,66	6,10	4,0
Šarža I 30 N / Šarža I 100 N	62,26	5,35	1,7
Šarža II 30 N / Šarža II 100 N	56,96	9,80	6,1
Šarža I 30 N / Šarža II 100 N	50,84	11,78	5,7
Šarža II 30 N / Šarža I 100 N	76,58	3,48	2,1

Tab. 11. Porovnanie disolučných profilov v pufri s pH 6,8 pri 25 rpm na základe výpočtov f_1 , f_2 a $\Delta D.E.$

Hodnotená vzorka / porovnávacía vzorka	Faktor podobnosti f_2	Faktor rozdielnosti f_1	$ \Delta D.E. $
Šarža I 30 N / Šarža II 30 N	78,03	5,63	1,1
Šarža I 100 N / Šarža II 100 N	54,55	19,16	6,3
Šarža I 30 N / Šarža I 100 N	62,34	11,83	3,4
Šarža II 30 N / Šarža II 100 N	82,70	3,35	1,9
Šarža I 30 N / Šarža II 100 N	75,00	6,07	3,0
Šarža II 30 N / Šarža I 100 N	54,62	16,75	4,5

6.2 Ďalšie príspevky a grantové projekty

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K. a JEKL, V. *In vivo* evaluation of mucoadhesive buccal films with ciclopirox olamine in rabbits. Poster. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 1st to 7th April 2016 | SECC, Glasgow, United Kingdom.



IN VIVO EVALUATION OF MUCOADHESIVE BUCCAL FILMS WITH CICLOPIROX OLAMINE IN RABBITS

I. Lukášová¹, J. Muselík^{2*}, D. Vetchý³, J. Gajdzlok¹, J. Juřica¹, Z. Knotek¹, K. Hauptman¹, V. Jekl¹¹University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Department of Pharmaceutics, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, Czech Republic, muselikj@vfu.cz²Masaryk University, Department of Pharmacology, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic³University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Avian & Exotic Animal Clinic, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, Czech Republic

INTRODUCTION

Mucoadhesive buccal films represent a modern therapeutic system for an oral mucosal fungal infections treatment with high patient compliance. Prevalence of oral fungal infections increases with the administration of antibiotics, corticosteroids and immunosuppressive drugs. Oral medication may provide substantial efficacy associated with drug interactions and adverse events that can sometimes be of a serious nature. To avoid these risks, topical therapy applied directly onto oral mucosa offers an attractive alternative approach to treatment with systemic antifungals.

Ciclopirox olamine (CPX) seems to be an advantageous drug for buccal application due to its low resistance and adverse effect incidence. CPX is used for the treatment of yeast, dermatophyte and mold infections and is effective against a broad spectrum of Gram positive and Gram negative bacteria (Grupta et al., 2010). Additional advantages include activity in wide pH range independently on the protein concentration, which is different from other conventional antimicrobials.

The aim of this study was to assess the pharmacokinetics of CPX after the buccal administration of mucoadhesive film prepared using the solvent casting method and thus contribute to the development of a new and modern therapeutic system intended for the local treatment of oral candidiasis.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials

Ciclopirox olamine (Sanofi Aventis), internal standard (6 cyclohexyl-4-methyl-2H-pyran-2-one, Sigma-Aldrich), β -glucuronidase from *Helix pomatia* (Merck), carboxymethylcellulose sodium (CMC, Blanose type 7LF PH, Aqualon). All materials were of analytical grade and used without further purification.

Preparation of mucoadhesive oral films

Mucoadhesive oral films were prepared by solvent casting method. The composition of the dispersion prepared for casting was 1.8 % of CPX, 4 % of CMC and 3 % of glycerol. Purified water was used as a solvent (ad 100 %). CPX was dissolved in a mixture of water and glycerol and CMC was added into the drug suspension. The dispersion was mixed by a paddle stirrer (RZR 2021, Heidolph Instruments) at 500 rpm for 2 h and was allowed to swell for another 72 h. Afterwards, the mixture was homogenized prior to casting by the paddle stirrer for 30 min and then by Ultra-turrax[®] (type T 25 basic, IKA) at 13000 rpm for 2 min. The uniform dispersion was cast into a round plastic mold and a solvent was left to evaporate at the room temperature. The mucoadhesive oral films with following parameters were used for in vivo testing: diameter 15 mm; drug content 20.95 (20.46; 21.44) mg of CPX, weight 120.3 (117.6; 123.0) mg, thickness 506 (457; 555) μ m.

Treatments of animals

Six clinically normal 6-months-old outbred New Zealand White SPF rabbits (*Oryctolagus cuniculus*, strain Hsd:1/NZW, Harlan Laboratories Inc., UK) were included in the study. The average weight of the rabbit was 2.44 (2.34; 2.54) kg. The rabbits were situated in an accredited experimental facility of VFU Brno with controlled conditions. The rabbits were fed a timothy-based pelleted diet and meadow hay. Water was available ad libitum. All rabbits were clinically examined including a detailed oral cavity examination. The rabbits were healthy without any yeast infection present. The animals were housed under the agreement of the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and the in vivo studies were approved by the project No. S1-2012.

Blood sampling and CPX determination

Four mucoadhesive films were applied orally under inhalation anesthesia. 2.0 mL of blood samples from *a. auricularis centralis* were collected into the tubes containing 0.1 mL of heparin in 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h after the film application. The plasma samples were immediately centrifuged (10 minutes, 4000 g) after each collection and stored at -20 °C until analysis, which was performed within next 48 hours. Plasma concentration of total CPX (parent CPX and glucuronide derivative) were determined by modified chromatographic method (Coppi et al., 1992) using an internal standard. A Purospher[®] RP-18 endcapped column (4.6x250 mm; 5 μ m) was utilized. The mobile phase contained a mixture of acetonitrile and 20 mM phosphoric acid with 500 μ M EDTA (68:32; v/v); flow rate was 1.0 mL min⁻¹.

Assay procedure for plasma levels

To determine the plasma concentration of total CPX (sum of parent CPX and glucuronide derivative), 1.0 mL of 0.5 M phosphate buffer of pH 4.7 and 15 μ L of β -glucuronidase (30 U mL⁻¹) were added to the 1.0 mL of plasma. The mixture was incubated at 37 °C for 24 h. A solution of IS in methanol at a concentration of 2.5 μ g mL⁻¹ was prepared and 1200 μ L of this solution was added into the samples. The samples were vortexed and left to stand for 5 min. CPX was extracted via two-step extraction using 2x3 mL of hexane. 5.0 mL of the organic phase was evaporated to dryness in a vacuum dryer at 40 °C. The dried residue was dissolved in 500 μ L of the mobile phase. The samples were then analyzed by HPLC (HP 1260, Agilent Technologies).

Statistical analyses

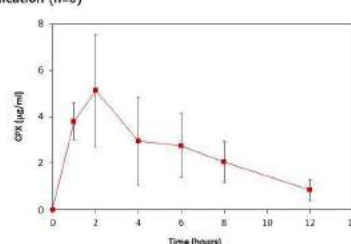
The pharmacokinetic parameters ($t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, Cl/F, Vd/F, MRT) were calculated by noncompartmental analysis using Kinetica 4.4 software (Thermo Electron). Statistical data evaluation was carried out using QC-Expert 3.2. (TriloByte). Descriptive statistics for CPX concentrations and pharmacokinetic parameters were calculated. All statistical parameters were evaluated for a level of significance $\alpha = 0.05$ and number of samples $n = 6$. The results are stated as a retransformed mean (lower limit of CI; upper limit of CI) using Exponential data transformation.

Table 1. Ciclopirox olamine pharmacokinetic parameters after the mucoadhesive films application (n=6)

	C_{max} (μ g/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ (μ g/mL min)	Cl/F (mL/min)	Vd/F (L)	MRT (min)
\bar{X}_n	5.75	1.9	3.8	2465	34	11	374
CI ($\alpha=0.05$)	4.17	1.2	1.9	1888	23	6	289
	7.28	2.1	10.8	3694	45	33	708
Min.	4.02	1.0	1.4	1713	18	4	278
Max.	7.48	2.0	34.3	4603	49	54	2976

Legend: C_{max} maximum drug plasma concentration; t_{max} time at the maximum drug concentration; $t_{1/2}$ half-life of the drug; $AUC_{0-\infty}$ area under the concentration-time curve from 0 to infinity; Cl/F, apparent clearance; Vd/F apparent volume of distribution; MRT, mean residence time; CI, confidence interval; \bar{X}_n , retransformed mean.

Figure 1. Ciclopirox olamine plasma concentration after the mucoadhesive films application (n=6)



RESULTS AND DISCUSSION

Pharmacokinetic parameters of CPX were calculated in 6 New Zealand White SPF rabbits after the buccal application of four mucoadhesive films. The total administered dose was 34.4 (33.0; 35.9) mg kg⁻¹, plasma concentrations of CPX were determined in 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h after the application of the films (Figure 1). The obtained pharmacokinetic parameters are shown in the Table 1.

The maximum plasma concentration (C_{max}) of 5.75 (4.17; 7.28) μ g mL⁻¹ was achieved. The time taken to reach the maximum plasma concentration (t_{max}) was 1.9 (1.2; 2.1) h. According to Coppi et al. (1992), t_{max} of 1 h was obtained after the vaginal administration of CPX to rabbits in a dose 15 mg kg⁻¹. $AUC_{0-\infty}$ for total CPX was 2465 (1888; 3694) μ g mL⁻¹ min. Bioavailability of buccally applied CPX seems to be higher comparing to vaginal administration. However, high interindividual variability was observed probably due to the oral absorption of the drug incorporated in the mucoadhesive film. Moreover, it is much more difficult to ensure the correct fixation of the film on the oral mucosa in experimental animals than in humans.

After the buccal application, the values of $t_{1/2}$, MRT and Cl/F were 3.8 (1.9; 10.8) h, 374 (289; 708) h and 34 (23; 45) mL min⁻¹, respectively. After the vaginal application, these values were 2.22 (2.07; 2.37) h, 3.27 (2.75; 3.78) h and 10.92 (9.96; 11.88) mL min⁻¹, respectively (Coppi et al., 1992). The results show that the incorporation of CPX into the mucoadhesive films does not represent the common bolus administration. The active ingredient was absorbed over a longer period - $t_{1/2}$ was longer than in the reference article. The values of mean residence time and apparent clearance were significantly higher than in the vaginal application. Considering these pharmacokinetic data, it can be concluded that the application of the mucoadhesive films consisting of carboxymethylcellulose sodium and glycerol leads into the prolonged release of ciclopirox olamine, which is a desired effect in fungal infection treatment.

CONCLUSION

The pharmacokinetic parameters of ciclopirox olamine incorporated in the mucoadhesive buccal films were analyzed. The study showed that CPX administered buccally has a longer effect comparing to vaginal application, which is very valuable in the treatment of fungal infections. The experiment suggests that the oral mucoadhesive films may be a valuable alternative of CPX administration.

REFERENCES

- Grupta, A.K. and Skinner, A.R. Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: a review. *Int. J. Dermatol.* 49, 3-9 (2010).
- Coppi, G. and Silingardi, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. *Farmacol.* 47, 779-786 (1992).

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., FRANC, A. a GONĚC, R. Quality assurance of tablets containing warfarín. Poster. 2nd European Conference on Pharmaceutics: Novel Dosage Forms, Innovative Technologies, 3rd to 4th April 2017 | Krakow, Poland.



QUALITY ASSURANCE OF TABLETS CONTAINING WARFARIN

Ivana Lukášová, Jan Muselík, Aleš Franc, Roman Goněc



University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Department of Pharmaceutics, Palackého tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic. Tel. +420 541562865, email: muselik@vfu.cz

INTRODUCTION

Warfarin is an intensively discussed drug with narrow therapeutic index (NTI). Content uniformity of tablets (CU) is one of the most important parameters in NTI drugs [1], however its pharmacopoeial evaluation may be insufficient. Therefore, important manufacturers of warfarin tablets (for example, DuPont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex) introduced stricter limits: content within 92.5 - 107.5 % of the average and RSD not more than 3 % [2]. In marketed warfarin tablets, the content of active pharmaceutical ingredient (API) is low (0.5 - 10 mg per tablet), which increases the risk of failed CU. Direct compression of common blend (CB) is a suitable method to manufacture warfarin tablets. This procedure is convenient because of simpler validation of blend CU, bioequivalence studies, and stability testing that can be performed in selected strengths only.

The goal was to manufacture tablets of all therapeutically used strengths (1 to 10 mg) with satisfactory CU and to find suitable discriminatory dissolution method. The robustness of content was verified by 'worst case' method with respect to the philosophy of recent European requirements for qualification and validation of drug production process [3].

EXPERIMENTAL METHODS

Materials

Raw materials used to manufacture CB tablets, their particle size, and true density are listed in Table 1. All other materials were of analytical grade and were used without further purification. To compare dissolution profiles of intermediate strength 5 mg, a product marketed in the EU was used (Product EU).

Manufacturing of tablets

All CB constituents, without magnesium stearate, were sieved through a 250 µm sieve and mixed for 10 minutes. Then, magnesium stearate was added and another 5 minutes of mixing followed. A Turbula homogenizer (T2C, Switzerland) was used at speed 40 rpm. The weight of one batch was 500.0 g. The batch CB1 contained 96.0 % and the batch CB2 104.0 % of theoretical value of warfarin sodium. All batches were produced using eccentric press (Korsch EK0, Germany). Tablets containing 1 mg of API weighed 54.2 mg, with diameter 5 mm and radial hardness about 35 N. Tablets containing 10 mg of API weighed 542.0 mg, with diameter 10 mm and radial hardness about 53 N.

Sampling and warfarin content measurement

CB was placed in a cylindrical vessel with diameter 25 cm and was leveled to a height of about 2 cm by slight horizontal movement. The area was then divided evenly into 10 geometrically equal parts; a sample weighing approximately 0.5 g was taken with a small laboratory spoon. To measure the content of API in tablets, 20 tablets out of each batch were sampled in the course of the compression process at regular intervals. The HPLC method for the measurement of content and the treatment of samples were described in detail before [1].

Dissolution test

For dissolution testing, SOTAX AT7 Smart was used (USP Apparatus II, 25 rpm, 900 mL of purified water, temperature 37 ± 0.5 °C). Dissolved drug was analyzed by HPLC [1]. For sampling points, see Figure 1. At each sampling point, mean and standard deviation were calculated from 6 measurements.

Table 1. Composition of the blends.

Component	Density [kg m ⁻³]	D ₅₀ [µm]	Content [%]
Warfarin Sodium Clathrate	1312.8	8	2
Di-calfos	2937.9	152	70
Avicel PH 101	1572.4	46	25
Ac-Di-Sol	1611.5	33	2
Magnesium stearate	1065.9	10	1

D₅₀ = 50 % of measured particles are smaller than this size [µm]. Warfarin sodium clathrate (Pliva); Di-calfos - calcium hydrogen phosphate (Budenheim KG); Magnesium stearate (Peter Greven); Avicel PH101 - microcrystalline cellulose (FMC BioPolymer); Ac-Di-Sol - sodium crosscarmellose (FMC BioPolymer); * in batches CB1 and CB2, the content of API was increased, respectively decreased by 4 %.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, warfarin sodium tablets were chosen as a model drug for CB composition containing 96.0 %, respectively 104.0 % of API, thus representing worst case scenarios. Both the blend and tablets CU were evaluated with respect to manufacturers' internal limits (DuPont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex: content within 92.5 - 107.5 % of the average and RSD not more than 3 % [2]) and verified by capability index with respect to limits set by EP 2.9.6 (95 - 115 %). Tablets were also verified by Bergum distribution.

On average, blend CB1 contained 96.18 % of warfarin sodium; CB2 contained 106.81 %. Both blends met the CU requirements by 2.9.6 EP, met the limits set by DuPont, Taro Pharmaceuticals, and Apotex, and met the requirements for blend CU validation by EP (Cpk > 1).

Table 2. Average content and content uniformity of tablets.

Batch ^a	x ^P [%]	RSD	Cpk (EP 2.9.6) ^b
1_CB1	98.35	2.88	1.57
1_CB2	104.31	3.28	1.04
2_CB1	98.24	2.37	1.89
2_CB2	102.50	2.31	1.76
2.5_CB1	95.95	2.14	1.89
2.5_CB2	103.02	1.97	1.96
3_CB1	96.50	1.97	2.02
3_CB2	103.50	1.23	3.02
4_CB1	96.87	1.21	3.39
4_CB2	102.12	1.37	3.08
5_CB1	95.65	1.41	2.62
5_CB2	103.74	2.50	1.45
6_CB1	95.46	1.26	2.91
6_CB2	102.18	1.92	2.18
7.5_CB1	95.00	1.34	2.63
7.5_CB2	103.35	2.69	1.40
10_CB1	98.20	1.54	2.91
10_CB2	105.39	1.93	1.58

^aBatch label: tablet strength, CB1 (96.0 % of warfarin sodium) or CB2 (104.0 % of warfarin sodium); ^baverage of 20 samples from a particular batch; ^cCpk values defined as the lower value of upper and lower indices; EP - European Pharmacopoeia.

The results of tablet CU are listed in Table 2. Tablets manufactured from the blends met CU requirements by EP (2.9.6 and 2.9.40), in all batches, Cpk ≥ 1. With the exception of 1_CB2 batch, the batches met Bergum criteria and internal limits by DuPont. Bergum method determines the probability of meeting the standard in the future. With respect to GMP requirements [3] it can be stated that 95 % of batches of tested strength range (1 - 10 mg) manufactured in the future even with marginally sufficient content of API (96 - 104%) will meet pharmacopoeial CU requirements with 90% probability. USP dissolution method (Apparatus II, 50 rpm, 900 mL of water, 37 °C) is not discriminatory for strengths 1 and 10 mg [4]. Therefore, the method was modified by decreasing rotation rate to 25 rpm. Thus, the method is able to discern 1 mg and 10 mg strength, while proving similarity (f₂ = 50.75) between marketed product and developed formulation in intermediate strength (5 mg). In dissolution profile, the content corresponding to the declared content of warfarin sodium is listed.

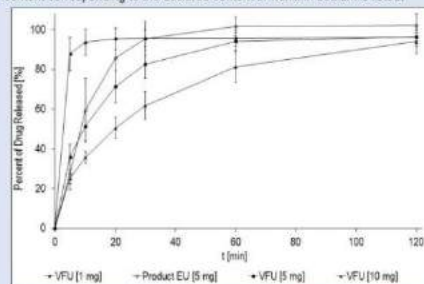


Figure 1: Dissolution profiles of warfarin sodium tablets.

CONCLUSION

Therapeutic range of tablets containing warfarin sodium was manufactured by direct compression of common blend. With respect to recent legislature concerning GMP that stresses 'worst case' scenarios in the course of process validation, the robustness of the method was validated on borderline content of active substance - 96.0 and 104.0 %. Critical parameter of content uniformity was verified by Bergum distribution and process capability index Cpk. Suggested manufacturing process was verified to be able to lead to, with 90% probability, at least 95 % batches containing declared content (1 - 10 mg) of active substance in one tablet. USP dissolution method, modified by decreasing rotation rate to 25 rpm, is discriminatory for strengths 1 - 10 mg.

REFERENCES

- [1] J. Muselík, A. Franc, P. Doležel, R. Goněc, A. Krončová, I. Lukášová: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharm.* 64, 365-367 (2014).
- [2] A. E. Sawoniak, A. F. Shalansky, P. J. Zed, R. Sundreji: Formulary considerations related to warfarin interchangeability. *Can. J. Hosp. P.* 55, 215-218 (2002).
- [3] Annex 15: Qualification and Validation [Internet] [cited 2016 October 19]. Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol4/2015-10_annex15.pdf
- [4] A. Franc, J. Muselík, R. Goněc, D. Vetchý: Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts. *Acta Pharm.* 66, 139-145 (2016).

MUSELÍK, J., LUKÁŠOVÁ, I., FRANC, A., SABADKOVÁ, D., MAJERČÍKOVÁ, D. a ĎUROVCOVÁ, V. Tvorba biorelevantní disoluční metody pro kontrolu kvality tablet s obsahem warfarínu: Príspevok zo zborníka. 2014. IGA VFU Brno č. 55/2014/FaF.

TVORBA BIORELEVANTNÍ DISOLUČNÍ METODY PRO KONTROLU KVALITY TABLET S OBSAHEM WARFARINU

(Příspěvek do sborníku)

Jan Muselík, Aleš Franc, Daniela Majerčíková, Veronika Ďurovcová, Ivana Lukášová,
Dana Sabadková

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita

Úvod

Byla navržena rozlišující a biorelevantní disoluční metoda pro hodnocení léků s okamžitým uvolňováním léčivé látky ve formě solí slabých kyselin, které z hlediska jejich špatné rozpustnosti obvykle nelze testovat v kyselém žaludečním prostředí. Jedná se o bifázickou metodu, skládající se ze spodní vrstvy, simulující kyselé žaludeční prostředí, a vrchní oktanolové vrstvy, simulující membránové lipidy. Na tabletách s rozdílnou koncentrací modelového léčiva klatrátu sodné soli warfarinu (1 mg a 10 mg) s odlišnou distribucí velikosti částic, se za použití faktoru podobnosti f_2 a rozdílnosti f_1 , podařilo prokázat statisticky významný vliv těchto parametrů na disoluční profil. Tím se potvrdil i rozlišující charakter metody. Popsaná bifázická disoluční metoda je využitelná při vývoji lékové formy včetně odhadu IVIVC (*In vivo* – *In vitro* Correlation), při klinickém hodnocení šarží a při rutinním hodnocení v rámci QC (Quality Control).

Materiál a metodika

Příprava tablet

Za účelem vývoje biorelevantní disoluční metody byly ze společné směsi připraveny metodou přímého lisování tablety s obsahem API 1 mg a 10 mg. Od každé síly tablet byly připraveny dvě šarže, které se lišily rozdílnou distribucí velikosti částic API, a to šarže s obsahem API 1 mg nebo 10 mg a úzkou distribucí částic (šarže W1A a W10A) nebo širokou distribucí velikosti částic (šarže W1B a W10B). Složení tabletových směsí a postup přípravy vychází z patentu VFU Brno [1], a literárních zdrojů [2].

Složení tabletových směsí v procentech bylo: 70 % hydrogenfosforečnanu vápenatého (Di-cafos; Budenheim KG), 25 % mikrokrystalické celulosy (Avicel PH 101; FMC BioPolymer), 2 % sodné soli kroskarmelosy (Ac-Di-Sol; FMC BioPolymer), 1 % stearanu hořečnatého (Peter Greven) a 2 % warfarinu sodné soli klatrátu ($d_{90}=10,3 \mu\text{m}$ nebo

$d_{90}=234,3 \mu\text{m}$). Jednotlivé látky byly přesítovány sítím o velikosti oka 250 mikronů a míseny 10 minut bez stearanu hořečnatého, který bylo přidán následně a mísení pokračovalo dalších 5 minut. Mísení probíhalo v homogenizačním zařízení Turbula (T2C, Switzerland) rychlostí 40 ot./min. Hmotnost jedné šarže byla 500,0 g.

Tablety s obsahem 1 mg měly hmotnost 54,2 mg, byly ploché o průměru 5 mm, tvrdost byla okolo 100 N. Tablety s obsahem 10 mg měly hmotnost 542,0 mg, byly ploché o průměru 10 mm, tvrdost byla okolo 100 N. Všechny šarže byly vyrobeny s využitím ekcentrického lisu EK0 (Korsch EK0, Germany).

Podmínky zkoušky disoluce

Disoluce probíhaly na zařízení SOTAX (AT 7 Donau Lab, Switzerland). Bifázická disoluce byla provedena s použitím 900 ml 0,1 M HCl a 70,0 g 1-oktanolu při teplotě $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, s využitím pádel při 50 ot./min. Disoluční médium (organická fáze) bylo odebíráno po 1, 2, 4 a 8 hodinách. Vzorky z disolučních testů byly zfiltrány přes membránový filtr o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$ a následně analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Výsledky jsou udávány jako průměr a směrodatná odchylka z 6 tablet každé šarže.

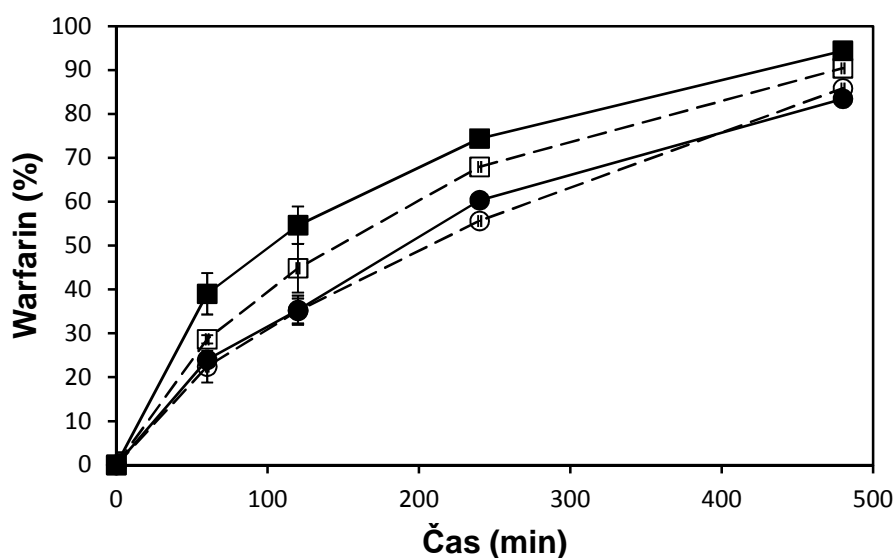
Výsledky

Za účelem vývoje rozlišující a biorelevantní disoluční metody, vhodné zejména k hodnocení léčiv charakteru solí slabých kyselin, byly připraveny tablety s obsahem klathrátu sodné soli warfarinu o nejnižší a nejvyšší koncentraci účinné látky, v níž se komerčně vyskytuje (1 mg nebo 10 mg). Vzhledem k tomu, že fyzikální charakter API může ovlivnit farmakokinetiku léčiva, byla jako kvalitativní parametr zvolena rozdílná distribuce velikosti částic účinné látky ($d_{90} = 10,3 \mu\text{m}$ nebo $234,3 \mu\text{m}$). Tyto proměnné byly zvoleny s ohledem na to, že optimální disoluční metoda by měla postihnout změny v kvalitě přípravku a zároveň být použitelná pro celou škálu jeho sil.

U léčiv ve formě solí slabých kyselin, jejichž kyselá forma je špatně rozpustná ve vodě, se jeví jako optimální využití bifázické disoluční metody, přičemž podmínky zkoušky by měly co nejvíce simulovat reálné podmínky v gastrointestinálním traktu. Z tohoto důvodu byla zvolena jako vodná fáze 0,1 M HCl (simulace prostředí žaludku) a jako organická fáze 1-oktanol (simulace prostupu přes biologické bariéry). Další podmínky zkoušky disoluce jako objem vodné fáze, teplota nebo rychlost otáček pádel byly převzaty z článku USP pro disoluce sodné soli warfarinu ve vodě (USP <29>). Objem organické

fáze byl zvolen co nejmenší, tak aby tloušťka organické vrstvy umožňovala bezproblémový odběr vzorků a aby byly v průběhu zkoušky disoluce splněny „sink podmínky“ pro všechny síly testovaných tablet.

Při pohledu na disoluční křivky pořízené bifázickou metodou lze pozorovat, že disoluční profily se navzájem liší. Při použití faktoru podobnosti f_2 a rozdílnosti f_1 ke statistickému posouzení rozdílnosti těchto disolučních profilů bylo zjištěno, že statisticky významně se liší disoluční profily tablet s rozdílným obsahem účinné látky, pokud obsahují API s širokou distribucí velikosti částic ($f_2 = 40,9$; $f_1 = 29,3$). Disoluční profily tablet s rozdílným obsahem účinné látky, ale s obsahem API s úzkou distribucí velikosti částic jsou statisticky odlišné na základě srovnání vypočtené hodnoty f_1 ($f_1 = 16,5$). Na základě výpočtu f_2 nebyla statisticky významná odlišnost těchto profilů prokázána, hodnota f_2 se však blíží kritické hodnotě 50. Z uvedeného vyplývá, že za zvolených podmínek bifázické zkoušky disoluce má tato metoda rozlišující charakter s ohledem na obsah účinné látky v tabletě. Při statistickém porovnání disolučních profilů tablet se stejným obsahem API a s rozdílnou distribucí velikosti částic léčiva byla na základě vypočtených hodnot f_2 a f_1 zjištěna podobnost těchto disolučních profilů. Nicméně z číselných hodnot f_2 a f_1 lze pozorovat, že vliv distribuce velikosti částic na disoluční profil má větší efekt u tablet s vyšším obsahem API ($f_2 = 54,5$; $f_1 = 11,7$), než u tablet s nižším obsahem API ($f_2 = 76,7$; $f_1 = 4,3$). Z uvedeného vyplývá, že rozdílný obsah API v jednotlivých tabletách vede k větším rozdílům v disoluci než kvalita resp. velikost částic použité substance.



Obrázek 1. Disoluční profily tablet s obsahem warfarinu v biorelevantním médiu; (□) W10A, (○) W1A, (■) W10B, (●) W1B

SEZNAM LITERATURY:

1. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. Způsob přípravy pevné lékové formy se sodnou solí warfarinu ve formě klathrátu izopropanolu. Vynálezci: Aleš FRANC a Jan Muselík. Česká republika. Patentový spis CZ 304136 B6. 2.10.2013.
2. MUSELÍK, Jan, FRANC, Aleš, DOLEŽEL, Petr, GONĚC, Roman, KRONDLOVÁ, Anna, LUKÁŠOVÁ, Ivana. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharmaceutica*. 2014, **64**(3), 355-367. ISSN 1846-9558.