



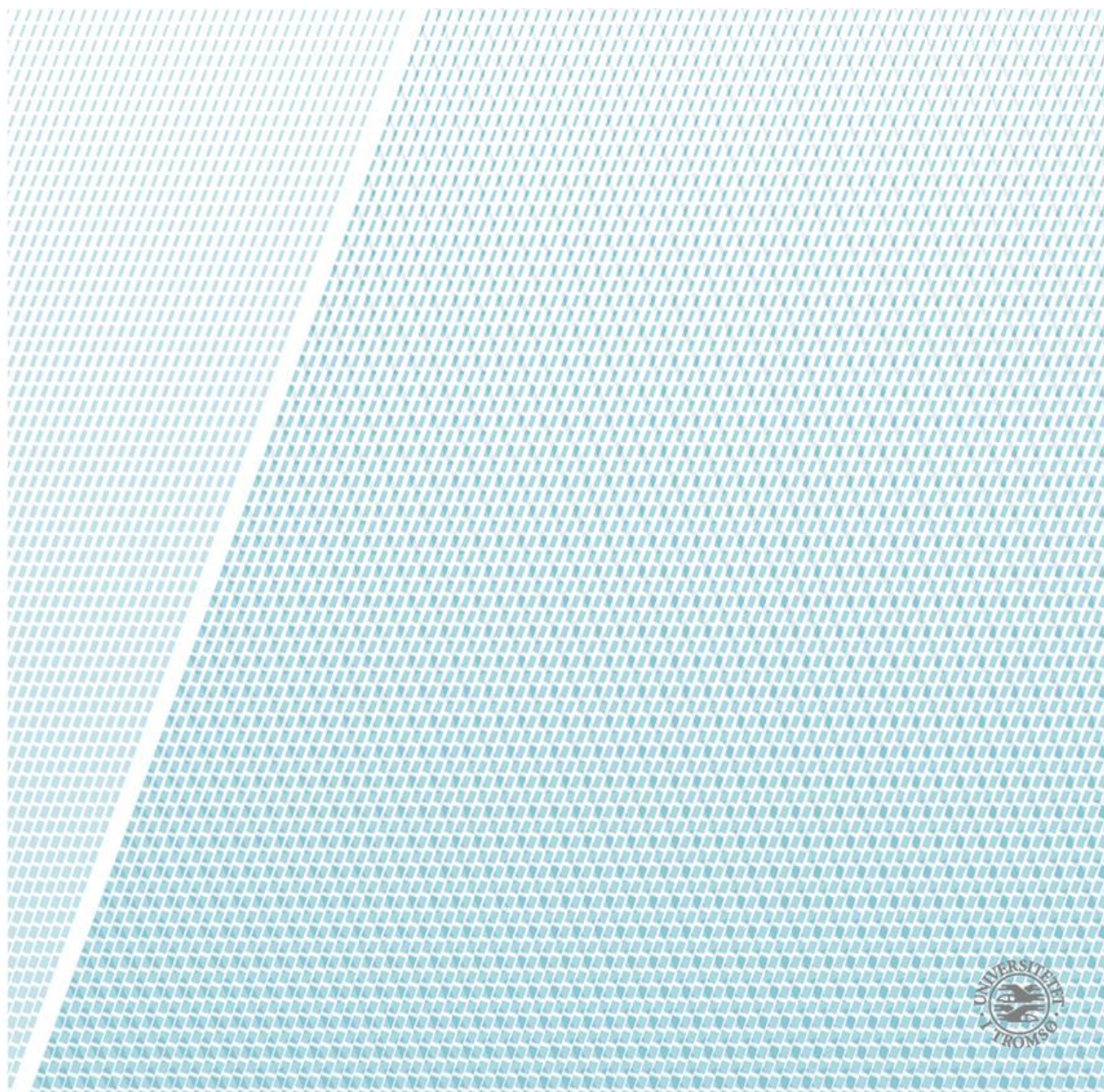
Institutt for farmasi

Konsekvensene av deling og knusing av enteroformuleringer — *Metodeutvikling og evaluering*

Masteroppgave i farmasi - mai 2015

Skrevet av
Hege-Kristine Lorentzen

*Oppgaven er utført ved
Høgskolen i Nord-Trøndelag, avdeling Namsos*



FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Høgskolen i Nord-Trøndelag, avdeling Namsos, i perioden august 2014 til mai 2015. Det har vært et utfordrende år, med mange oppturer og nedturer, men mest av alt så har det vært et lærerikt år, og jeg er mange erfaringer rikere.

Jeg vil gjerne få takke min veileder Daniel Zeiss, for at du åpnet for den muligheten at jeg kunne fullføre mastergraden min i Namsos, plassen der farmasieventyret mitt først startet. Det betydde mye for meg at jeg fikk skrive oppgaven min i Namsos. Jeg vil også takke Gøril Eide Flaten for god veiledning av oppgaveskrivingen min, og for at du alltid kom med raske tilbakemeldinger.

Jeg vil få takke Unn Siri Olsen og resten av lærerstaben i Namsos. Dere har tatt så godt imot meg og jeg har ikke følt meg noe annet enn velkommen hos dere. Ord kan ikke beskrive hvor takknemlig jeg er for alt dere har gjort for meg.

Jeg vil også få takke Madeleine Eckholm for at du har holdt ut med meg i alle disse åra. Du har vært en god støttespiller, som har holdt ut med alle frustrasjoner og gleder som har vært gjennom denne prosessen. Du har alltid støtta meg gjennom tykt og tynt, selv om vi har bodd i hver vår ende av landet.

En siste takk til familien min, som alltid har hatt troen på meg, og Kai-Inge Melkeraaen, for korrekturlesing av masteroppgaven min.

Namsos, mai 2015

Hege-Kristine Lorentzen

SAMMENDRAG

Bakgrunn

Knusing av tabletter viser seg å være et problem i det norske helsevesenet. Dette kan få ulike konsekvenser avhengig av hvilken type tablett det er snakk om. Flere eldre mennesker er avhengig av hjelp til administrering av legemidlene sine, og ofte er det sykepleiere eller hjelpepleiere som står for dette. Sykepleiere står for det siste leddet i utlevering av medisiner, og har ansvar for den siste kvalitetssikringen. De har dårligere farmakologisk og legemiddelteknologisk kunnskap enn farmasøyter, og er ikke alltid klar over konsekvensene det kan medføre å knuse en tablett.

Formål

Formålet med denne studien var å kartlegge frigjøringsprofiler av pantoprazol og diklofenak, markedsført som enterotabletter, i ulik bearbeidet tilstand (hele tabletter, delte tabletter og knuste tabletter). For diklofenak ble det i tillegg undersøkt hvilken innflytelse partikkelstørrelse har på frigjøring. For pantoprazol ble det forsøkt å kvantifisere hvor mye av virkestoffet som ble nedbrutt over tid når tablettene ble delt eller knust.

Metode

Det ble utført in-vitro dissolution tester med padleapparatet av to ulike enterotabletter, Diclofenac® og Somac®. Løsningsmediene som ble brukt var 0,1 M HCl for å simulere magesyre og fosfatbuffer med pH 6,8 for å simulere tarmsaft. I tillegg ble det utviklet to HPLC-UV-analysemetoder for å analysere diklofenak og pantoprazol fra tablettprøvene. For pantoprazol ble det utviklet en HPLC-metode som ga god kromatografisk separasjon av pantoprazol fra dens degraderingsmetabolitter.

Resultat

Knusing og deling av Diclofenac® synes ikke å ha noen stor effekt på frigjøringsprofilen til diklofenak. Dette skyldes at oppløsningsshastigheten er løselighetsbegrenset på grunn av diklofenaks dårlige løselighet i 0,1 M HCl. Oppløsningsshastigheten synes dermed å øke med redusert partikkelstørrelse ved endring av løsningsmediets pH. Diklofenak vil kunne påføre lokal skade i magesekken når enterodrasjeringen brytes, da NSAIDs har en direkte cytotoxisk effekt på cellene i mageslimhinnen. Knusing og deling av Somac® viser seg å ha en stor effekt på frigjøringsprofilen til pantoprazol. Når enterodrasjeringen brytes vil nærmest all pantoprazol nedbrytes etter 2 timer i 0,1 M HCl. Det er derfor svært viktig at disse tablettene svelges hele.

FORKORTELSER

Ph.Eur	European Pharmacopoeia
HCl	Hydrogenklorid (saltsyre)
NaOH	Natriumhydroksid
RPM	Rounds per minute
HPLC	High-performance liquid chromatography
RP-LC	Omvendt-fase væskekromatografi
t_R	Retensjonstid
k	Retensjonsfaktor
α	Separasjonsfaktor
N	Antall teoretiske plater
H	Høydeekvivalenten til en teoretisk plate
R_s	Oppløsningsevne
GI	Gastrointestinal
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
COX	Syklooksygenase
QC	Quality-control
USP	The United States Pharmacopeia
BCS	Biopharmaceutical classification system
FaSSGF	Fasted-state simulated gastric fluid
FeSSIF	Fed-state simulated intestinal fluid

INNHALDSFORTEGNELSE

1.	INNLEDNING.....	1
1.1.	Introduksjon.....	1
1.2.	Fysiologi av gastrointestinaltrakten	2
1.2.1.	Munnhulen, svelget og spiserøret	2
1.2.2.	Magesekken.....	2
1.2.3.	Tynntarmen.....	3
1.2.4.	Tykkarmen	4
1.2.5.	Endetarmen	4
1.3.	Partikkelstørrelsens påvirkning på oppløsningshastighet.....	5
1.4.	Enterotabletter.....	6
1.5.	Diklofenaknatrium.....	7
1.5.1.	Generelt	7
1.5.2.	Farmakokinetikk.....	8
1.5.3.	Virkningsmekanisme	8
1.5.4.	Bivirkninger	8
1.6.	Pantoprazol	10
1.6.1.	Generelt	10
1.6.2.	Farmakokinetikk.....	10
1.6.3.	Virkningsmekanisme	11
1.6.4.	Stabilitetsproblemer	12
1.6.5.	Degraderingsmønster for protonpumpehemmere.....	12
1.7.	Dissolution testing	14
1.7.1.	Padleapparatet.....	14
1.7.2.	Metoder for testing av enterodrasjerte preparater.....	15
1.8.	High-performance liquid chromatography (HPLC).....	16
1.8.1.	UV-deteksjon	16
1.8.2.	Kromatografiske prinsipper	17
1.8.3.	Kromatografiske begreper.....	18
2.	MATERIALER.....	20
3.	METODE	22
3.1.	Dissolution testing for diklofenak	22
3.1.1.	Metode A.....	22
3.1.2.	Behandling av tablettene.....	22
3.1.3.	Utførelse	23
3.1.4.	Prøveuttak.....	23
3.2.	Utvikling av væskechromatografisk metode for diklofenak.....	25
3.2.1.	Utstyr og stasjonærfase	25
3.2.2.	Mobilfase.....	25
3.2.3.	Injeksjonsvolum.....	25
3.2.4.	Kalibrering.....	25
3.2.5.	Metodekritikk.....	26
3.3.	Dissolution testing for pantoprazol	27

3.3.1.	Behandling av tablettene.....	27
3.3.2.	Utførelse	27
3.3.3.	Prøveuttak.....	28
3.4.	Utvikling av væskechromatografisk metode for pantoprazol	28
3.4.1.	Utstyr og stasjonærfase	28
3.4.2.	Mobilfase.....	28
3.4.3.	Injeksjonsvolum.....	29
3.4.4.	Kalibrering.....	29
4.	RESULTATER	30
4.1.	Validering av HPLC-metode for diklofenak.....	30
4.1.1.	Spesifisitet.....	30
4.1.2.	Linearitet	31
4.1.3.	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	32
4.1.4.	Kalibrering.....	32
4.1.5.	Presisjon og nøyaktighet.....	33
4.2.	Frigjøringsprofil for diklofenak	34
4.3.	Validering av HPLC-metode for pantoprazol	35
4.3.1.	Spesifisitet.....	35
4.3.2.	Linearitet	37
4.3.3.	Kalibrering.....	37
4.3.4.	Presisjon og nøyaktighet.....	37
4.4.	Frigjøringsprofil for pantoprazol.....	38
4.5.	Degraderingsprofiler for pantoprazol	38
5.	DISKUSJON	41
5.1.	Knusing av enterotabletter	41
5.2.	Drøfting av Diclofenac® tabletter	42
5.2.1.	Frigjøringsprofil for diklofenak	42
5.2.2.	Begrensninger til metoden	43
5.2.3.	Konsekvenser ved å knuse eller dele Diclofenac®.....	44
5.3.	Drøfting av Somac® tabletter	45
5.3.1.	Frigjøringsprofil for pantoprazol.....	45
5.3.2.	Degraderingsprofiler for pantoprazol	46
5.3.3.	Begrensninger til metoden	48
5.4.	Begrensninger til dissolution-metoden	49
6.	KONKLUSJON.....	50
7.	REFERANSER	51
	VEDLEGG 1	54
	VEDLEGG 2	56
	VEDLEGG 3	57
	VEDLEGG 4	58

1. INNLEDNING

1.1. Introduksjon

Knusing av tabletter gjennomført av helsepersonell på sykehjem har blitt vanlig praksis for å administrere legemidler til pasienter som ikke kan innta faste legemiddelformer. Ofte er det mangel på kunnskap blant helsepersonell om hvilke tabletter som kan knuses og hvilke som ikke burde knuses. Resultater fra en datainnsamling på flere sykehjem i Nord-Trøndelag viste at det knuses depot- og enterotabletter, tablettyper som på ingen måte burde knuses. En slik modifisering av en formulering kan ha flere utfall, avhengig av tablettypene [1].

Enkelte legemidler nedbrytes og mister effekten når de kommer i kontakt med magesyre. For å unngå dette har de en enterodrasjering som først løses i tynntarmen. Dette gjelder blant annet for alle protonpumpehemmerne. Mens andre legemidler skal svelges hele for å redusere risikoen for bivirkninger. For eksempel har mange NSAIDs, som diklofenak, enterodrasjering for å redusere risikoen for slimhinneskader i magen. Knusing av tablettene kan medføre økt lokal irritasjon og mageplager [1].

Undersøkelsen, som ble utført ved 19 sykehjem i Nord-Trøndelag, viste at alle sykehjemmene knuste tabletter i varierende omfang. 42 prosent av sykehjemmene knuste over 20 tabletter daglig. 15 prosent av total mengde knuste tabletter var depot- eller enterotabletter. I studien ble det blant annet funnet at tabletter av både pantoprazol og lansoprazol, begge protonpumpehemmere, ble knust [1].

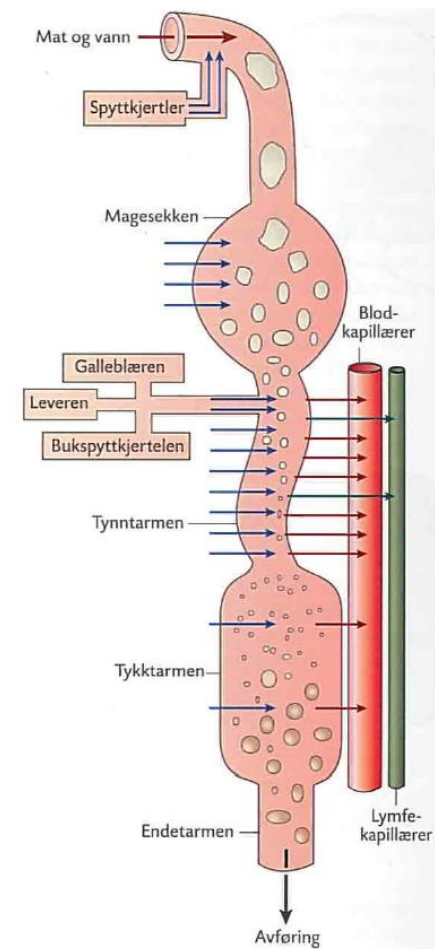
Formålet med dette prosjektet er å kartlegge frigjøringsprofiler av pantoprazol og diklofenaknatrium, markedsført som enterotabletter, i ulike bearbejdet tilstand (hele tabletter, delte tabletter og knuste tabletter). I tillegg ville vi undersøke hvilken innflytelse partikkelstørrelse til knuste tabletter har på frigjøring. For pantoprazol ble det forsøkt å kvantifisere hvor mye av virkestoffet som ble nedbrutt over tid når tablettene ble delt eller knust. En del av prosjektet består i å implementere en HPLC-UV-analysemetode for de to virkestoffene.

1.2. Fysiologi av gastrointestinaltrakten

Gastrointestinaltrakten (GI) består av munnhulen, svelget, spiserøret, magesekken, tynntarmen, tykktarmen og endetarmen [2]. Figur 1 viser en skjematisk oversikt over fordøyelsessystemet.

1.2.1. Munnhulen, svelget og spiserøret

Den mekaniske bearbeidingen av maten starter i munnhulen. Tygging reduserer størrelsen på matbitene slik at enzymene i fordøyelseskanalen kan få en større overflate å virke på. Maten blandes også med spytt som gjør at den lettere kan passere svelget og spiserøret. Spyttet inneholder også en del antistoffer og enzymer som amylase og lipase som hjelper til med fordøyelsen av stivelse og lipider. Maten passerer raskt gjennom svelget og spiserøret og det skjer ikke noe fordøyelse der [2].



Figur 1. Oversikt over fordøyelsessystemet [2].

1.2.2. Magesekken

Den viktigste oppgaven til magesekken er å fungere som et midlertidig lager for maten, men det foregår en viss hydrolyse av proteiner og stivelse her. Her eltes maten ved vekselvise sammentrekkninger slik at maten blandes med magesaften og det dannes en halvflytende blanding. Dette gjør at det skjer en mer effektiv fordøyelse og absorpsjon i tynntarmen. Pyloruskanalen danner en forbindelse mellom magesekken og duodenum, den første delen av tynntarmen. Pylorusringmuskelen er en lukkemuskel og regulerer overføring av matinnhold til tynntarmen.

Slimproduserende celler produserer et seigtflytende slim rikt på hydrogenkarbonat, som beskytter epitelcellene mot mekanisk skade og syreangrep. Parietalceller produserer intrinsisk faktor og saltsyre. Det finnes også endokrine celler som skiller ut hormoner, samt hovedceller som produserer pepsinogen, som omdannes til det proteinspaltende enzymet pepsin.

Når parietalcellene er maksimalt stimulert, skiller de ut sekret med pH på rundt 0,9. Magesekkens pH blir imidlertid aldri så lav, fordi sekretet blandes med andre sekreter, og fordi buffere i maten nøytraliserer en del av protonene. Før måltider er magesekkens saltsyresekresjon lav, men konsentrasjonen av H^+ er allikevel høy fordi mageinnholdet da har liten bufferkapasitet. På fastende mage varierer pH fra 1,3 til 2,5. Ved matinntak så øker pH. Avhengig av matinnhold så kan pH øke til verdier mellom 4,5 til 5,8. Saltsyren har flere viktige funksjoner. Blant annet så dreper den bakterier som kommer ned i magesekken, den bryter ned bindevev og muskelvev og bidrar til å redusere store matklumper, og den aktiverer pepsinogen til pepsin [2, 3].

Tiden det tar for en tablett å passere magesekken er svært variabel. Tømming av innhold i magesekken er avhengig av fysikalsk-kjemiske parametere som pH, temperatur, kaloriinnhold og volum, samt fysiologiske faktorer. Tiden kan variere fra noen få minutter til mange timer avhengig av tablett type (f.eks. entero- eller konvensjonelle tabletter), og om magesekken er tom eller om man nettopp har spist et kaloririkt og fettrikt måltid. Oppholdstiden i magen for solide doseringsformer er avhengig av størrelsen på doseringsformen og om den er tatt med mat eller ikke. Tømningsfrekvensen fra magen er mellom 2 og 4 kcal/min, så tiden det tar å passere magesekken er altså avhengig av kaloriinnholdet i maten. Partikler opp mot 3-4 mm kan enkelt passere pylorus, mens større partikler er avhengig av motilitetssyklusen og kontraksjoner i magesekken for å passere pylorus. For små partikler kan inntak av mat øke oppholdstiden opp mot mer enn to timer, mens hele tabletter påvirkes i mye større grad, helt opp mot 14 timer [3].

1.2.3. Tynntarmen

Tynntarmen er en ca. tre meter lang kanal og deles inn i duodenum, jejunum og ileum. Når mageinnholdet kommer ned i duodenum produseres det rikelig med bukspytt. Det inneholder store mengder Cl^- og HCO_3^- , som nøytraliserer det sure innholdet. I fastende tilstand er pH i den første delen av tynntarmen svært variabel. pH ligger på rundt 6,5 men kan variere helt fra 2 til 7. Bukspyttet inneholder også enzymer som spalter fett, proteiner og karbohydrater. Levercellene produserer galle som er nødvendig for spaltning og absorpsjon av fett. Det meste av den kjemiske nedbrytningen og absorpsjonen av karbohydrater skjer i tynntarmen, og all fordøyelse av fett foregår der. De karbohydratene og proteinene som ikke hydrolyseres i tynntarmen, blir tilgjengelige for mikrobiell omsetning i tykktarmen [2, 3].

I absorpsjonsprosessen transporteres substanser til epiteloverflaten. De transporteres gjennom eller mellom epitelcellene og transporteres videre med blod eller lymfe bort fra tarmen.

Acetylsalisylsyre og andre svake syrer kan forholdsvis lett absorberes i magesekken, da de foreligger i sin ikke-dissosierte form. De fleste andre legemidler absorberes ikke før de når tynntarmen. Det meste av absorpsjonen skjer i tynntarmen på grunn av det store overflatearealet her. Passasjetiden for tabletter gjennom tynntarmen er mye mindre variabel enn i magesekken, og varierer fra tre til fem timer hos et voksent menneske, uavhengig av matinntak og doseringsform [2, 3].

1.2.4. Tykktarmen

De viktigste funksjonene til tykktarmen er absorpsjon av vann og ioner, samt mikrobiell fordøyelse av karbohydrater og proteiner som ikke er blitt fordøyd i tynntarmen. All fordøyelse i tykktarmen utføres av mikrobielle enzymer. Tykktarmsbakteriene produserer også visse vitaminer, som vitamin K og B, som absorberes fra tykktarmen [2].

1.2.5. Endetarmen

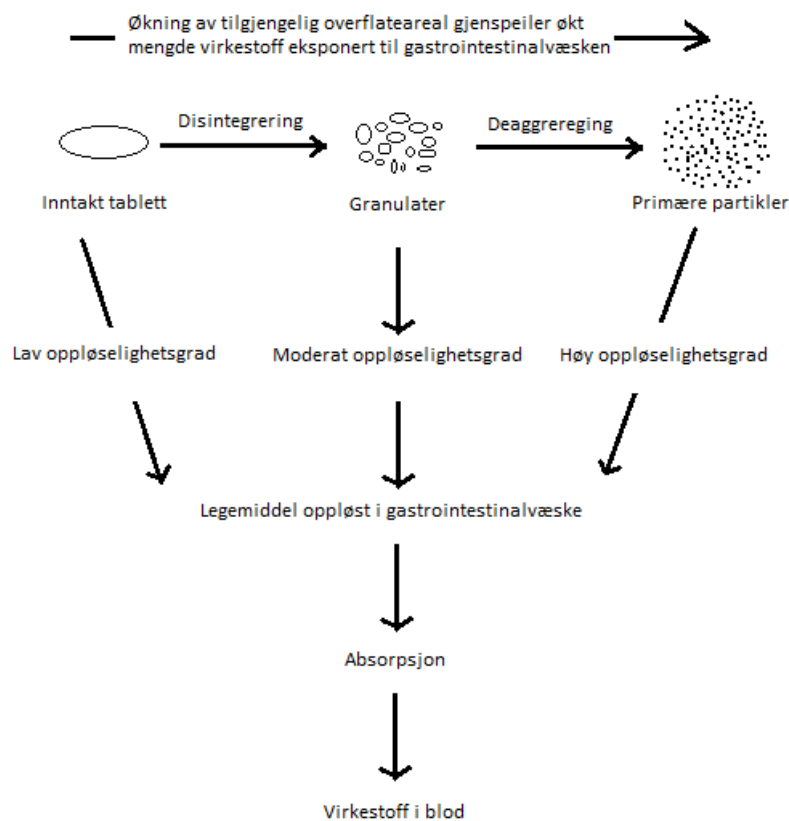
Endetarmen er tom det meste av tiden. Når tarminnhold kommer inn i endetarmen oppstår det etter hvert en trang til å tømme denne. Ved hjelp av den viljestyrte, ytre analringen kan man da la endetarmen tømmes [2].

1.3. Partikkelstørrelsens påvirkning på oppløsningshastighet

Legemidler må være oppløst før de kan absorberes. Virkestoffet må derfor frigis fra legemiddelformen og oppløses før det kan tas opp i kroppen ved absorpsjon. Oppløsning av legemidler kan beskrives ved hjelp av Noyes-Whitney ligningen (Ligning 1), der dC/dt er oppløsningshastigheten til partikkelen, D er diffusjonskoeffisienten til et legemiddel i løsning i gastrointestinalvæsken, A er overflatearealet til partikkelen som er i kontakt med løsningen, h er tykkelsen på diffusjonslaget rundt hver partikkel, C_s er metningskonsentrasjonen til legemidlet i løsning i diffusjonslaget og C er konsentrasjonen av legemidlet i gastrointestinalvæsken [4].

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \cdot A (C_s - C)}{h} \quad (\text{Ligning 1})$$

I følge Ligning 1 vil en endring i overflateareal resultere i økt oppløsningshastighet. Knusing av tablett fører til redusert partikkelstørrelse og økt overflateareal. Derfor vil en redusert partikkelstørrelse i teorien føre til en økt oppløsningshastighet av virkestoffet. Dette kan også sees av Figur 2, som viser at små partikler har en høyere oppløselighetsgrad enn en intakt tablett. Dette støttes av Noyes-Whitney ligningen.



Figur 2. Oversikt over hvordan virkestoffet frigjøres fra en tablett. Adaptert fra [4].

1.4. Enterotabletter

Med enterotabletter har man en forsinket frigjøring av virkestoffet, der frigjøring ikke starter før tabletten når tynntarmen. Det er hovedsakelig to grunner til at man bruker enterodrasjering. Den første er for å beskytte magen mot stoffer som kan virke irriterende mot mageslimhinnen eller som fører til kvalme, som for eksempel acetylsalisylsyre og diklofenak. Den andre grunnen er for å hindre nedbrytning og inaktivering av syre-labile legemidler, som ellers ville blitt ødelagt av magesyren. Protonpumpehemmere er eksempler på slike legemidler [4].

Enterotabletter er designet for å motstå den lave pH'en i magesekken. Polymerer med pH-avhengig oppløsningsegenskaper er mye brukt for målrettet legemiddeltransport til tynntarmen, da de lar tabletten passere det sure miljøet i magesekken intakt, med minimal frigjøring av virkestoffet. Polymerene som brukes har lav løselighet i surt miljø på grunn av frie karboksylsyregrupper på molekylene som forblir uioniserte ved lav pH. Ettersom pH øker, blir syregruppene ioniserte, noe som fører til økt hydrofilisitet og økt løselighet [5].

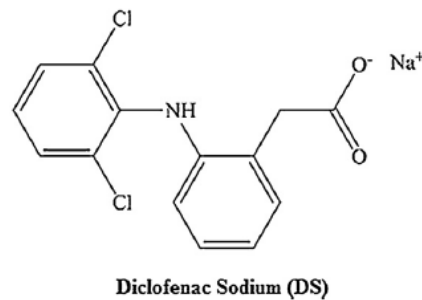
Eksempler på stoffer som brukes i enterodrasjering er polymerer som cellulose acetat phthalat, hydroksypropyl metylcellulose phthalat, noen copolymerer av metakrylsyre og dens estere, og polyvinyl acetat phthalat [4].

En enterodrasjering bør begynne å løse seg opp ved pH 5, for å sikre tilstrekkelig opptak i den proksimale delen av tynntarmen. Den forsinkede frigjøringen fører til en forsinket terapeutisk effekt av legemidlet. Dette er hovedsakelig avhengig av hvor lenge tabletten oppholder seg i magesekken. Her er det stor inter- og intrasubjekt variabilitet, som beskrevet tidligere. Dette skyldes at tabletten forblir intakt i magesekken, i motsetning til konvensjonelle tabletter der henfall starter nesten umiddelbart, og tabletten fraktes porsjonsvis til duodenum [4]. På fastende mage forblir enterotabletter i magesekken rundt 2 timer, mens etter et større måltid kan de faktisk forbli helt opp mot 15 timer [3].

1.5. Diklofenaknatrium

1.5.1. Generelt

I denne studien ble det brukt enterotabletter av typen Diclofenac ® Ratiopharm. Diklofenak forekommer enten som salter av kalium eller natrium. Det brukes natriumsaltet av diklofenak i de enterotablettene som finnes på markedet i Norge i dag. Diklofenak er av typen NSAIDs og brukes blant annet ved revmatoid artritt, artrose og ved akutte betennelsestilstander i muskel- og skjelettsystemet. Det har en uttalt analgetisk effekt, antipyretisk effekt og antiinflammatorisk effekt [6]. Figur 3 viser den molekylære strukturen til diklofenaknatrium, mens Tabell 1 inneholder en oversikt over hjelpestoffene i Diclofenac ®. Videre i oppgaven blir diklofenaknatrium forkortet til diklofenak.



Figur 3. Kjemisk struktur av diklofenaknatrium [7].

Tabell 1. Innholdsliste av hjelpestoffer i Diclofenac ® [6].

Kjerne	Drasjering
Mikrokrystallinsk cellulose	Talkum
Natriumstivelseglykolat	Hypromellose
Kolloidal vannfri silika	Poly(etylakrylat, metakrylsyre)
Talkum	Trietylsitrat
Natriumstearylfumarat	Makrogol 6000
Hypromellose	Titandioksid
	Jernoksid
	Kinolingult

1.5.2. Farmakokinetikk

Diklofenak absorberes raskt og fullstendig, men har en biotilgjengelighet på ca. 50 % på grunn av first-pass metabolisme. Selv om absorpsjonen er rask, kan effekten være forsinket på grunn av tablettens mageresistente drasjeringslag. Maksimum plasmakonsentrasjon oppnås to timer etter inntak av en 50 mg tablett. Inntak sammen med mat har ingen innflytelse på mengden diklofenak som absorberes, men man kan få en forsinket absorpsjon da tablettene passerer langsommere gjennom magen når den tas sammen med mat. 60 % utskilles i urinen som glukuronidkonjugater, mens resten skilles ut gjennom galle i feces, og gjennomgår enterohepatisk sirkulasjon [6].

Diklofenak klassifiseres etter BCS (Biopharmaceutical classification system) som et klasse II legemiddel. Det har en pKa verdi på 4,0. Løseligheten er avhengig av oppløsningsmediets pH. Diklofenak er praktisk talt uløselig i sure medier som magesyre, men det er godt løselig i medier med pH over pKa-verdien, som for eksempel i tarmen. Det har en begrenset løselighet i 0,1 M HCl på 1,2 mg/L, mens løseligheten i fosfatbuffer pH 6,8 er 670 mg/L ved temperaturer på $23 \pm 2^\circ\text{C}$. [8, 9].

1.5.3. Virkningsmekanisme

Virkningsmekanismen til diklofenak og andre NSAIDs er at de hemmer prostaglandinsyntesen. Prostaglandiner er en av hovedmediatorene i inflammasjon, smerte og feber. De dannes av arakidonsyre, en reaksjon som er katalysert av syklooksigenase-enzymene (COX). Diklofenak binder seg til COX og hemmer denne reaksjonen [10].

1.5.4. Bivirkninger

NSAIDs er blant de mest brukte legemidlene verden over. De brukes som smertestillende og betennelsesdempende, men alvorlige gastrointestinale (GI) bivirkninger begrenser langvarig bruk av disse legemidlene. En meta-analyse utført av Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration viste at diklofenak ga en 89 % forhøyet risiko for øvre gastrointestinale komplikasjoner sammenlignet med placebo (RR 1,89, 95 % CI 1,16-3,09). Diklofenak ga også 41 % forhøyet risiko for vaskulære hendelser sammenlignet med placebo (RR 1,41, 95 % CI 1,12-1,78). Studien viste at diklofenak har en lik risikoprofil for vaskulære hendelser på linje med coxiber [11]. Det var en ny felleseuropeisk gjennomgang av blant annet denne studien som gjorde at statens legemiddelverk i 2013 kom med nye retningslinjer for bruk av diklofenak [12].

Gastrointestinale skader er den største begrensningen når det gjelder å bruke denne klassen legemidler [13]. Alder over 65 år er en av risikofaktorene som er assosiert med øvre gastrointestinale hendelser (HR 2,25, 95 % CI 1,84-2,76). Andre risikofaktorer er blant annet bruk av lavdose acetylsalisylsyre, tidligere GI-hendelser og bruk av kortikosteroider [14]. Ulcusprofylakse med for eksempel misoprostol eller protonpumpehemmere bør derfor vurderes hos eldre og utsatte pasienter [6].

Det er hovedsakelig tre mekanismer bak NSAID-induserte GI-komplikasjoner.

Det finnes to isoformer av COX, COX-1 og COX-2. COX-1 er konstitutivt til stede i mange celler og vev, og bidrar blant annet til å beskytte mageslimhinnen. Den syntetiserer prostaglandiner som beskytter mageslimhinnen mot magesyre, vedlikeholder blodstrømmen i slimhinnen og fører til produksjon av slim og bikarbonat. Hemming av COX-1 fører til reduksjon av blodplatenes aggregering, som kan føre til økt blødningstendens, og økt risiko for magesår, GI-blødninger og gastroduodenale perforasjoner. Den andre isoformen, COX-2, oppreguleres ved inflammasjon. De antiinflammatoriske og analgetiske effektene av NSAIDs skyldes hemming av dette enzymet, mens GI-komplikasjoner skyldes hemming av COX-1 [10]. Tradisjonelle NSAIDs hemmer både COX-1 og COX-2 i ulik grad. Diklofenak er litt mer COX-2-selektiv. Selektive COX-2-hemmere gir lavere risiko for magesår, men studier har vist at disse gir økt forekomst av trombotiske kardiovaskulære hendelser [15].

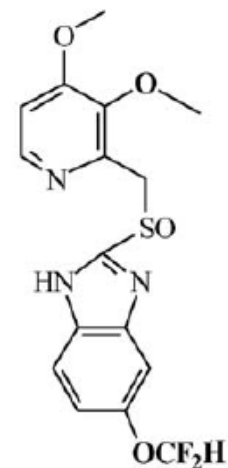
NSAIDs har også en direkte cytotoxisk effekt på cellene i mageslimhinnen. Denne effekten synes å være uavhengig av COX-hemming. De er svake organiske syrer, som i uionisert form kan passere inn i epitelcellene, hvor de blir ionisert og fanget (ion-trapping). På grunn av osmotiske krefter trekkes vann inn i cellene, som fører til svelling og lysing av cellene. NSAIDs er vist å indusere både nekrose og apoptose av epitelceller i mageslimhinnen [10, 16].

Blokkering av prostaglandinsyntesen stimulerer aktivering av lipoksygenase og økt produksjon av leukotriener. Leukotriener fører til inflammasjon og iskemi som kan føre til skade på mageslimhinnen. Det er også en økt produksjon av proinflammatoriske mediatorer som tumornekrosefaktor- α . Dette fører til tetting av mikrovaskulatur som igjen fører til redusert gastrisk blodstrøm og frigjøring av frie oksygenradikaler. Disse reagerer med fettysrene i slimhinnen og fører til lipidperoksidering og vevsskade [10].

1.6. Pantoprazol

1.6.1. Generelt

Pantoprazol finnes i Norge som enterotabletter i 20 og 40 mg, og som pulver til injeksjon. Somac ® fra Takeda Nycomed ble brukt i denne studien. Tablettene inneholder pantoprazol natrium sesquihydrat, saltformen til pantoprazol. Pantoprazol brukes blant annet mot symptomatisk gastroøsofageal reflukssykdom, ventrikel- og duodenalsår, forebygging av gastroduodenal sår induisert av NSAIDs og i behandling av *Helicobacter pylori*-infeksjoner i kombinasjon med antibiotikabehandling [17]. Figur 4 viser den molekylære strukturen til pantoprazol, mens Tabell 2 inneholder en oversikt over hjelpestoffene i Somac ®.



Figur 4. Kjemisk struktur av pantoprazol [18].

Tabell 2. Innholdsliste av hjelpestoffer i Somac ® [17].

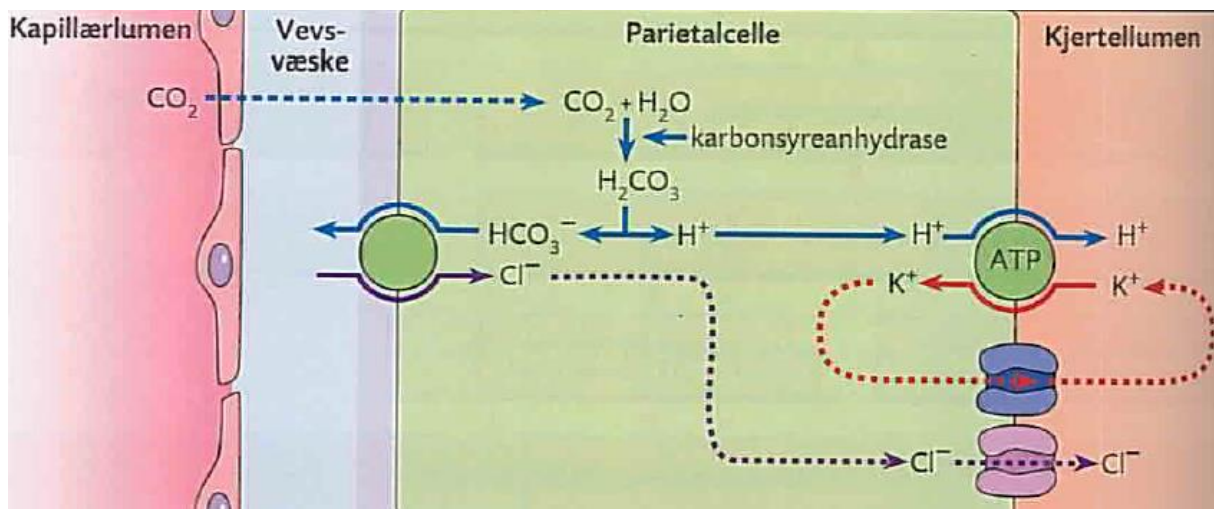
Kjerne	Drasjering	Trykkfarge
Natriumkarbonat	Hypromellose	Skjellakk
Mannitol (E 421)	Povidon K25	Rødt jernoksid (E 172)
Krysspovidon	Titandioksid (E 171)	Svart jernoksid (E 172)
Povidon K90	Gult jernoksid (E 172)	Gult jernoksid (E 172)
Kalsiumstearat	Propylenglykol	Amoniakkopløsning
	Metakrylsyreetylakrylatkopolymer	
	Polysorbat 80	
	Natriumlaurylsulfat	
	Trietylsitrat	

1.6.2. Farmakokinetikk

Pantoprazol absorberes raskt og fullstendig i tynntarmen. Det har en biotilgjengelighet på 77 %. Pantoprazol metaboliseres ved en kombinasjon av fase I og fase II metabolisme. Den metaboliseres nesten utelukkende i lever via cytokrom P-450-systemet, blant annet via CYP 2C19 og CYP 3A4. Ca. 80 % av metabolittene utskilles i urin, resten utskilles i feces. Inntak av mat har ingen påvirkning på mengden som blir absorbert, men det kan føre til en forsinket absorpsjon [17].

1.6.3. Virkningsmekanisme

Protonene som skilles ut i magesekken dannes inne i parietalcellene vet at enzymet karbonsyreanhydrase katalyserer reaksjonen mellom CO_2 og H_2O . Karbonsyren som dannes dissosierer spontant til H^+ og HCO_3^- . Protonpumper (H^+/K^+ -ATPase-pumper) transporterer H^+ gjennom membranen og ut i lumen, mens K^+ pumpes motsatt vei. Parietalcellene stimuleres av acetylkolin, gastrin og histamin [2]. Figur 5 viser mekanismen for hvordan protonene produseres og transporteres ut i magen.



Figur 5. Mekanisme for parietalcellenes saltsyresekresjon [2].

Alle protonpumpehemmerne er substituerte benzimidazolderivater og de er alle prodrugs. De passerer inn i parietalcellene der de aktiveres og omdannes til tetrasykliske sulfenamider. De hemmer både basal og stimulert magesyresekresjon [19, 20]. Parietalcellene har lommer der pH er 1 eller lavere. Fordi protonpumpehemmerne er svake baser så akkumuleres de i parietalcellenes sure miljø hvor de protoneres og blir kjemisk forandret til den aktive inhibatoren, som danner kovalente bindinger med SH-grupper på protonpumpen. De er ikke reaktive ved nøytrale pH-verdier, men aktiveres ved den lave pH-en i parietalcellene, og man oppnår derfor en høy grad av vevsspesifisitet [21-23]. Parietalcellene er de eneste cellene i kroppen som har en pH på mindre enn 4.0 [20]. Selv om de har en relativt kort plasmahalveringstid på rundt en time, så har de en lang farmakodynamisk aktivitet på 48-72 timer. Dette er fordi de binder kovalent og irreversibelt til protonpumpen [19].

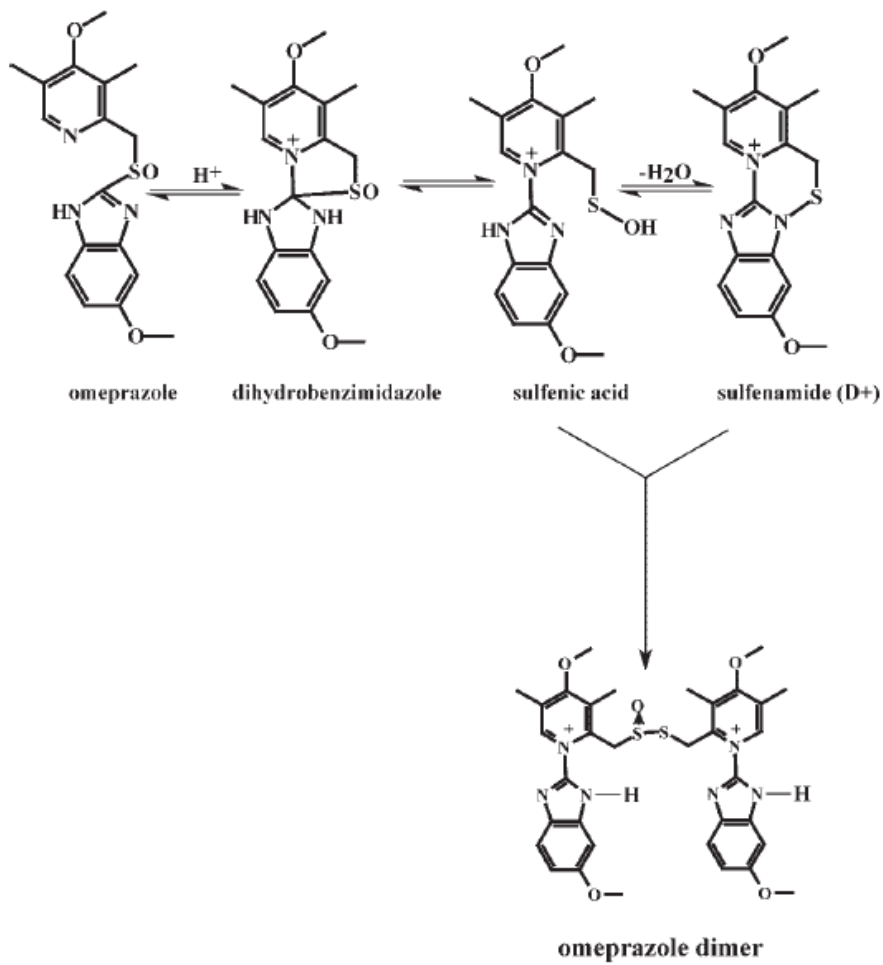
1.6.4. Stabilitetsproblemer

Protonpumpehemmere er ustabile ved lav pH. De formuleres derfor som enterotabletter for å hindre at virkestoffet brytes ned i det sure miljøet i magesekken. Nedbrytningshastigheten av disse legemidlene har en direkte sammenheng med pH [18]. Dess lavere pH, dess fortere skjer nedbrytningen. Pantoprazol er det mest syrestabile av dem. Den høyeste stabiliteten kan oppnås ved pH-verdier over 5,5. El-Sherif et al. fant ut at pantoprazol var fullstendig nedbrutt etter 2,25 timer i 0,1 M HCl, mens det kun tok 1,5 time for omeprazol å nedbrytes fullstendig [24].

1.6.5. Degraderingsmønster for protonpumpehemmere

Degraderingsmønsteret til protonpumpehemmerne kan sees ut av Figur 6. Figuren viser mønsteret for omeprazol, men det er demonstrert eksperimentelt at det samme degraderingsmønsteret også gjelder for pantoprazol [18]. Protonpumpehemmerne brytes ned til to stabile forbindelser, et syklisk sulfenamid (D^+) og en dimer. Det er antatt at den sykliske sulfenamiden er den aktive inhibatoren av protonpumpen, selv om noe data kan tyde på at det er sulfensyren, forløperen til sulfenamid, som faktisk er den aktive inhibatoren [23, 25]. Prosessen er katalysert av H^+ , og kan sees av den pH-avhengige nedbrytningen til disse stoffene. Syrekatalysert degradering av protonpumpehemmere er hovedsakelig avhengig av protonering av nitrogenet på imidazolringen. Etter protonering av nitrogenet, går det elektrofile 2C-karbonet på benzimidazolringen til et nukleofilt angrep på nitrogenet på pyridinringen og det skjer en kjemisk rearrangering av molekylet.

Basisiteten til benzimidazol-nitrogenet virker å være en bestemmende faktor for degraderingshastigheten til protonpumpehemmerne. Benzimidazolringen til pantoprazol er forventet å ha det minst basiske nitrogenet på grunn av den elektrontiltrekkende gruppen $-OCF_2H$. Derfor er pantoprazol også den mest stabile av protonpumpehemmerne, med en pKa verdi på 3,8 [18, 25].



Figur 6. Skjematisk oversikt av degraderingsmønsteret for omeprazol og de andre protonpumpehemmerne [25].

1.7. Dissolution testing

Dissolution test er en in-vitro test som måler hastighet og grad av oppløsning av aktive substanser i solide preparater, som tabletter, kapsler og stikkpiller. De foregår ofte i vandige medium under bestemte betingelser. Flere typer apparater kan brukes til dette formålet. Basketapparatet, padleapparatet, «reciprocating cylinder» og gjennomstrømningscelle beskrives i den Europeiske Farmakopéen (Ph.Eur). I denne oppgaven ble padle-metoden (apparat 2) benyttet [26].

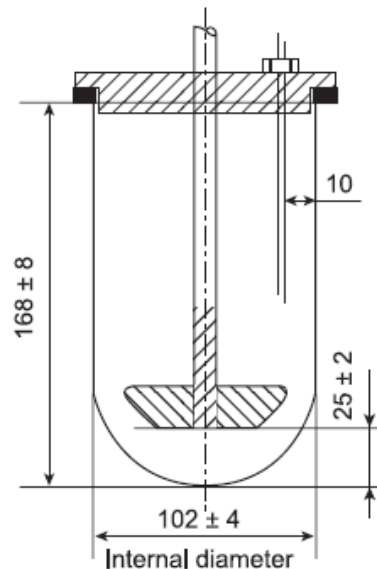
Dissolution test er viktig i kvalitetskontroll av produkter, og de benyttes i stor grad i bioekvivalensstudier. De brukes ofte for monitorering av produktkvalitet og for kontroll under produksjonsprosessen. Spesielt er de viktige i utvikling av formuleringer, da de kan avdekke problemer med formuleringen, noe som igjen kan føre til problemer med biotilgjengelighet. De kan også brukes til å forutsi noe om in-vivo egenskaper, selv om det ikke er mulig å fatte noen gyldige konklusjoner uten in-vivo data [27].

1.7.1. Padleapparatet

I denne oppgaven ble det brukt en SOTAX AT7 maskin med padleapparat, vist i Figur 7. Apparatet består av sylindervermede beholdere med en hemisfærisk bunn som har en kapasitet på 1000 ml. Den runde bunnen minimerer turbulens av oppløsningsmediet. Padlen er koblet til en motor som roterer ved en kontrollert hastighet (vanligvis mellom 50-100 rpm), som også minimerer turbulens på grunn av omrøring. Oppløsningsmediet holder en temperatur på $37 \pm 0,5$ °C. Beholderne står i et vannbad med lokk for å hindre fordamping. Lokket inneholder små hull som tillater bruk av termometer og det gir en mulighet for å ta ut prøver av løsningen. Dimensjonene av beholderen kan ses i Figur 8 og er spesifisert i farmakopéen [26].



Figur 7. Oppsettet av et Sotax AT7 padleapparat.



Figur 8. Padleapparatet med dimensjoner i millimeter.

1.7.2. Metoder for testing av enterodrasjerte preparater

Den Europeiske Farmakopéen nevner to metoder (metode A og metode B) for å teste enterodrasjerte preparater. Preparatet testes først i 0,1M HCl (saltsyre) i 2 timer, og deretter i pH $6,8 \pm 0,05$ buffermedium i 45 minutter eller den tiden som er spesifisert i monografien [26]. I dette forsøket ble metode A brukt.

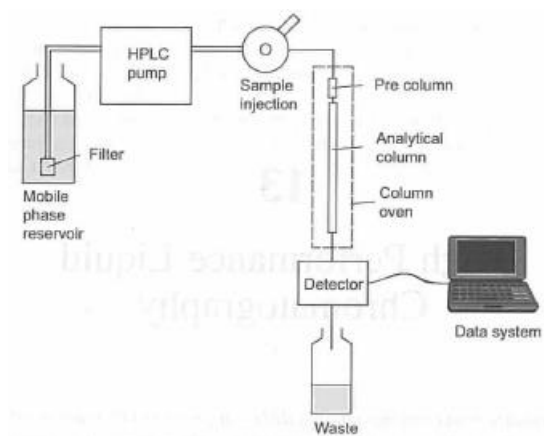
I metode A blir preparatet først testet i 750 ml 0,1 M HCl ved 37 °C i 2 timer, etterfulgt av tilsetning av 250 ml 0,2 M trinatriumfosfat dodecahydrat med pH-ending av mediet til pH $6,8 \pm 0,05$ innen 5 minutter. Gjennomføringen foregår i én operasjon. I metode B testes preparatet først i 1 liter 0,1 M HCl i 2 timer, deretter dreneres det sure mediet ut og det tilsettes 1 liter fosfatbuffer pH 6,8. Denne metoden foregår altså i en to-steps prosess [5, 26].

Det er ment å etterligne passasjen gjennom gastrointestinaltrakten, der tabletten først passerer det sure miljøet i magesekken og deretter transporteres til det mer nøytrale miljøet i tynntarmen. Det har blitt diskutert om disse metodene gir det samme resultatet. Da det i metode A tilsettes buffer til det sure mediet, går man ut ifra at nøytraliseringen av pH skjer relativt raskt, og at det ikke oppstår lommer med høy pH som kan påvirke oppløsningsprosessen. Miller et al. har derimot forsket på dette og fant at begge metodene ga identiske resultater [5].

1.8. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Når en skal se på frisettingsprofilen til et preparat er man avhengig av pålitelige analysemetoder. I denne studien ble HPLC brukt til å analysere prøvene fordi kromatografi ansees som en av de viktigste farmasøytiske analysemetodene.

Kromatografi er et samlenavn på en gruppe separasjonsmetoder som baserer seg på at komponenter transporteres gjennom en stasjonærfase med en mobilfase. Separasjon av stoffene skyldes at de har forskjellige kjemiske og fysikalske egenskaper, som gjør at de fordeler seg ulikt mellom de to fasene. Mobilfasen kan være en gass eller en væske, mens stasjonærfasen kan være et fast stoff, en væske eller en gel [28].



Figur 9. Hovedtrekkene av et væskekromatografisk system [28].

HPLC kalles ofte bare for væskekromatografi. Hovedtrekkene av et væskekromatografisk system kan sees ut av Figur 9. Her er mobilfasen en flytende væske, som pumpes gjennom en kolonne pakket med et solid materiale, stasjonærfasen, som holder igjen analyttene som skal separeres. De analyttene som retarderes av stasjonærfasen vil transporteres langsommere ut av kolonnen enn mobilfasen. Analyttene injiseres til strømmen av mobilfasen rett før kolonnen, hvor de separeres. Kolonnen er koblet til en detektor som detekterer de eluerte analyttene [28].

1.8.1. UV-deteksjon

HPLC koblet til en UV-detektor kan brukes til å kvantifisere aktive substanser i farmasøytiske preparater da det gir nøyaktige og presise resultater. Denne metoden baserer seg på at analyttene absorberer UV-lys. For at de skal kunne absorbere lys må de inneholde et kromofor-system, bestående av dobbeltbindinger eller ledige elektronpar i molekylet. Ved å

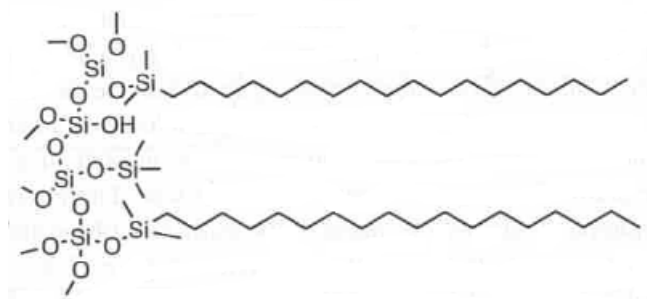
kalibrere apparatet med standardløsninger av kjent konsentrasjon kan man finne mengde analytt i ukjente prøver [28].

Spektrofotometri er raskt og enkelt, og er derfor en av de mest brukte analytiske teknikkene i analyse av legemidler. Hjelpetoffer kan derimot forstyrre målingene, og det kan gi unøyaktige resultater [29]. Fordelen med å bruke HPLC sammen med et UV-apparat er at man får separert substansene i prøven først, slik at man ikke får noen forstyrrelser og eventuelle feil når man skal måle konsentrasjonen av den aktuelle analytten [28].

1.8.2. Kromatografiske prinsipper

Omvendt-fase kromatografi (RP-LC)

Den vanligste separasjonsteknikken innen væskrokromatografi er omvendt-fase kromatografi (RP-LC). Stasjonærfasen er da hydrofob og mobilfasen består av polare midler som vann, blandet med metanol eller acetonitril. Det er i tillegg vanlig å benytte buffer, base eller syre for å regulere pH.



Figur 10. Stasjonærfase av C₁₈-materiale [28].

Det finnes flere typer hydrofobe stasjonærfaser, men de av C₁₈-materialer er uten tvil de mest brukte. Figur 10 viser en typisk stasjonærfase av C₁₈-materiale. Stasjonærfasen består av silikapartikler, hvor hydrofobe grupper bestående av 18 karbonatomer (C₁₈) er bundet til silanolgrupper. Separasjon av analyttene skjer hovedsakelig ved hydrofobe interaksjoner, som van der Waal's krefter. Upolare analytter blir derfor holdt tilbake i større grad enn polare analytter. For substanser med ioniserbare grupper vil retensjonen være avhengig av om disse er ionisert eller ikke. Retensjonen avtar med økende ionisering [28].

Mobilfaser

Mobilfasene for RP-LC består av blandinger av vann og en eller flere organiske løsemidler som er blandbare med vann. Disse endrer styrken på mobilfasen. Økt tilsetning av organiske

Løsemidler øker styrken på mobilfasen og retensjonen av analyttene avtar. Metanol og acetonitril er eksempler på organiske løsemidler. Metanol er billigere og mindre toksisk enn acetonitril, men er mer viskøs og fører til økt trykk i HPLC-systemet. Acetonitril er bedre egnet for UV-deteksjon ved lav bølgelengde og danner ikke viskøse blandinger med vann. pH i mobilfasen kontrolleres ved å tilsette buffere. For å separere syrer og baser kan det å endre pH gjøre store utslag på separasjonsselektiviteten [28].

1.8.3. Kromatografiske begreper

Retensjonstid (t_r)

Retensjonstiden for en substans i et gitt kromatografisk system er karakteristisk for dens fysikalsk-kjemiske egenskaper, og kan derfor brukes som identifikasjon. Retensjonstiden er tiden fra prøven injiseres til systemet og til maksimal detektorrespons oppnås. For å oppnå separasjon av analyttene må retensjonstidene være tilstrekkelig forskjellig, samt toppene i kromatogrammet bør være smale slik at man ikke får overlappende topper. Ved å endre mobilfasesammensetningen kan man endre retensjonstiden til analyttene.

Retensjonsfaktor (k)

Retensjonsfaktoren sier noe om hvordan en substans er distribuert mellom stasjonærfasen og mobilfasen. Fra et kromatogram kan man bestemme k med denne ligningen:

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (\text{Ligning 2})$$

der t_R er retensjonstiden for substansen, og t_M er tiden det tar for mobilfasen å passere kolonnen. $(t_R - t_M)$ er tiden substansen er i stasjonærfasen, og t_M er tiden den er i mobilfasen.

Selektivitet

Separasjonsfaktoren (α) beskriver metodens selektivitet. Den sier noe om den relative retensjonen til to nærliggende topper, og uttrykkes ved:

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (\text{Ligning 3})$$

der k_2 er retensjonsfaktoren for den andre toppen, mens k_1 er retensjonstiden for den første toppen. Hvis α er lik 1, vil de to toppene ha lik retensjonstid og elueres ut samtidig.

Effektivitet (N)

Bredden på toppene uttrykker hvor effektivt en substans transporteres gjennom kolonnen. Hvis molekylene spres i større grad i kolonnen vil toppene i kromatogrammet være brede. Effektiviteten uttrykkes som antall teoretiske plater (N) og kan bestemmes ved:

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad (\text{Ligning 4})$$

der t_R er retensjonstiden og W er toppbredden ved bunnlinjen. Dess smalere topp, dess mer effektiv er kolonnen.

Høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H)

N er proporsjonal med kolonnelengden L . En økning i L fører til en økning i antall teoretiske plater. Dette uttrykkes slik:

$$H = L/N \quad (\text{Ligning 5})$$

Høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H) er et mål på hvor effektiv hver lengdeenhet av kolonnen er til å gi smale topper. H kan brukes blant annet til å sammenligne kolonner med ulik lengde.

Oppløsningsevne (R_s)

Oppløsningen er kolonnens evne til å separere de toppene som er av interesse. Dess bedre eller høyere oppløsning dess lettere er det å oppnå fullstendig separasjon mellom to topper. Oppløsningsevnen påvirkes av effektivitet, selektivitet og retensjon, som vist i ligning 6:

$$R_s = 1/4 \sqrt{N[(\alpha-1)/\alpha][k/(k+1)]} \quad (\text{Ligning 6})$$

Ved å endre noen av disse parameterne kan man bedre oppløsningsevnen. En R_s -verdi på 1,5 gir god separasjon av toppene [28].

2. MATERIALER

Tabell 3. Kjemikalieliste

Kjemikalier	Leverandør	Batch.nr	Utløpsdato
Diclofenac 50 mg®	Ratiopharm Ulm, Tyskland	005259	01.2019
Diklofenaknatrium ≥99 %	Cayman Chemical Ann Arbor, USA	045779	05.2016
Somac 20 mg®	Takeda Nycomed Asker, Norge	268282	05.2017
Pantoprazole sodium sesquihydrate USP-36 99.32 % w/w	Jai Radhe Sales Ahmedabad, India	PPS/E-191/14	09.2018
Metanol	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	K36673108 652	20.04.2007
Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	1753030 440	31.12.2017
Ultrarent vann HPLC grade	Barnstead Smart2Pure vannrensesystem Langenselbold, Ungarn	41609385	-
Tri-sodium phosphate dodecahydrate, reagens Ph.Eur	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	A0613278 434	-
Saltsyre 37 %	VWR International Fontenay-sous-Bois, Frankrike	11H120013	07.2016
Saltsyre 6.0N	Alfa Aesar Karlsruhe, Tyskland	61300962	-
Natriumhydroxid 6.0N	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	ZU101632 337	-
Natriumhydroxid 5N	KPT Kristiansund, Norge	925	-
Natriumhydroxid 0.1 N titrisol	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	HC270001	09.2017
Sodium phosphate monobasic	Sigma-Aldrich Steinheim, Tyskland	BCBC6957V	-
Sodium phosphate dibasic	Fluka Analytical Steinheim, Tyskland	BCBC0966	-
Fosforsyre 85 %	KPT Komet AS Drammen, Norge	1805/8	-
Buffer solution pH 4.00	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	HC260841	31.08.2015
Buffer solution pH 7.00	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland	HC42607406	30.06.2017

Tabell 4. Utstyrliste

	Utstyr		Leverandør
HPLC	1260 Infinity	G1311C 1260 Quat Pump VL Serial No. DEAB807239	Agilent Technologies. Santa Clara, USA
	1260 Infinity	G1329B 1260 ALS Serial No. DEAAC14050	Agilent Technologies. Santa Clara, USA
	1260 Infinity	G1314F 1260 VWD Serial No. DEABB04586	Agilent Technologies. Santa Clara, USA
	Poroshell 120 SB-120 kolonne	4.6 x 100mm 2.7 micron	Agilent Technologies. Santa Clara, USA
	Vials 1.5 ml amber glass + label		VWR International. West Chester, USA
	Screw cap 9mm rub.natur/TEF		VWR International. West Chester, USA
DISSOLUTION	AT7 Dissolution system	Apparatus 2	Sotax. Aesch, Sveits
	pH-meter		Hanna Instruments. Póvoa de Varzim, Portugal
	Magnetmix 2070 magnetrører		Assistent. Sondheim, Tyskland
	Vortex mikser	444-1372(EU)	VWR International West Chester, USA
	Water- and oilbath	WB/OB 7-45	Memmert. Büchenbach, Tyskland
	GHP Acrodisc 25 mm Syringe filter 0,45 µm GHP Membrane		Pall. Hønefoss, Norge
	Plastsprøyte 20 ml		Terumo. Eschborn, Tyskland
Tablettdele		ServoMed. Berlin, Tyskland	
PIPETTER	Finnpipette®F2	0,5-5 ml	Thermo Scientific. Waltham, USA
	Finnpipette®F2	100-1000 µl	Thermo Scientific. Waltham, USA
	Pipettespisser		Brand GMBH, Wertheim, Tyskland
	Pasteurpipette		VWR International. West Chester, USA
	Fullpipette	1 ml	Brand GMBH. Wertheim, Tyskland
VEKT	Sartorius Basic B120S	39110016	Sartorius. Goettingen, Tyskland

3. METODE

3.1. Dissolution testing for diklofenak

3.1.1. Metode A

Den Europeiske Farmakopéen nevner to metoder (metode A og metode B) for å teste enterodrasjerte endosepreparater. Preparatet testes først i 0,1M HCl, og deretter i pH 6,8 ± 0,05 buffermedium. I metode A tilføres buffer til det sure mediet i én operasjon, og man fullfører testen. I metode B fjernes det sure mediet før man tilsettes buffermediet, altså skjer dette i en to-steps prosess [26].

Her var det en utfordring å velge metode, da Sotax AT7, som ble brukt i denne studien, ikke har noen åpning tilpasset til å føre ned et pH-meter i oppløsningsmediet. Det å åpne lokket for å teste pH var også uaktuelt da padlene sluttet å rotere, skulle man brukt metode A. Metode B var heller ikke mulig å gjennomføre med knuste tabletter. I metode B skal tablettene overføres fra det sure mediet til buffermediet, men i og med at jeg testet knuste tabletter lot ikke det seg gjøre. I denne oppgaven ble til slutt metode A og padleapparatet brukt. For å løse problemet med pH-endring ble en liten mengde tatt ut med sprøyte, overført til et lite begerglass, målt med pH-meter, og deretter tilbakeført.

3.1.2. Behandling av tablettene

Det ble totalt utført fire forsøk, der seks paralleller av hele, delte og knuste tabletter med knusningsgrad 1,4 mm og 125 µm ble testet. I forsøket med de delte tablettene ble det brukt en tablettdele for å dele tablettene i to like deler.

100 tabletter ble grovknust og siktet i et Retsch AS200 basic siktetårn i totalt ti minutter, og de ulike fraksjonene ble samlet i ulike beholdere. Siktestørrelsene som ble brukt var 1,4 mm, 710 µm, 355 µm, 180 µm og 125 µm. Knusningsgrad 1,4 mm og 125 µm ble brukt videre. Da drasjeringen ikke ble fullstendig knust, besto knusningsgraden 125 µm mest av tablettkjerne og lite drasjering. Derfor ble ti nye tabletter finknust og siktet kun på sikt med 0,125 µm for å sikre en homogen blanding av denne knusningsgraden. Om knusningsgraden på 1,4 mm var homogen kan ikke sies med sikkerhet. Men da det var mindre drasjering enn kjerne i de andre fraksjonene, kan det tyde på at den sannsynligvis ikke var helt homogen.

For de knuste tablettene ble det veid opp pulver tilsvarende vekt av én tablett på et veieskip. Veieskipet ble så veid på nytt etter at pulveret var overført til maskinen, og mengden som ble tapt ble korrigert for i resten av forsøket.

3.1.3. Utførelse

For hvert forsøk ble 750 ml 0,1 M HCl fylt i seks beholdere og varmet opp til $37 \pm 0,5$ °C. Padlen roterte med en hastighet på 50 RPM i henhold til USPs monografi for diclofenac sodium delayed-release tablets [30]. Her ble USP brukt i stedet for Ph. Eur. da den ikke gir konkrete prosessparametere for ferdigstilte preparater. 250 ml 0,2 M trinatriumfosfat dodecahydrat ble fylt i seks målekolber og satt i vannbad og varmet opp til $37 \pm 0,5$ °C. Tablettene ble sluppet ned med 7 minutters mellomrom, for å ha tid til nødvendig pH justering senere i forsøket. Etter 1 time ble 250 ml trinatriumfosfat dodecahydrat tilsatt og pH ble justert ved hjelp av 2 N NaOH eller 2 N HCl til pH $6,8 \pm 0,05$ innen 5 minutter. pH-målingen ble foretatt ved at en liten mengde ble tatt ut med sprøyte, overført til et lite begerglass og målt med pH-meter, før den ble tilbakeført.

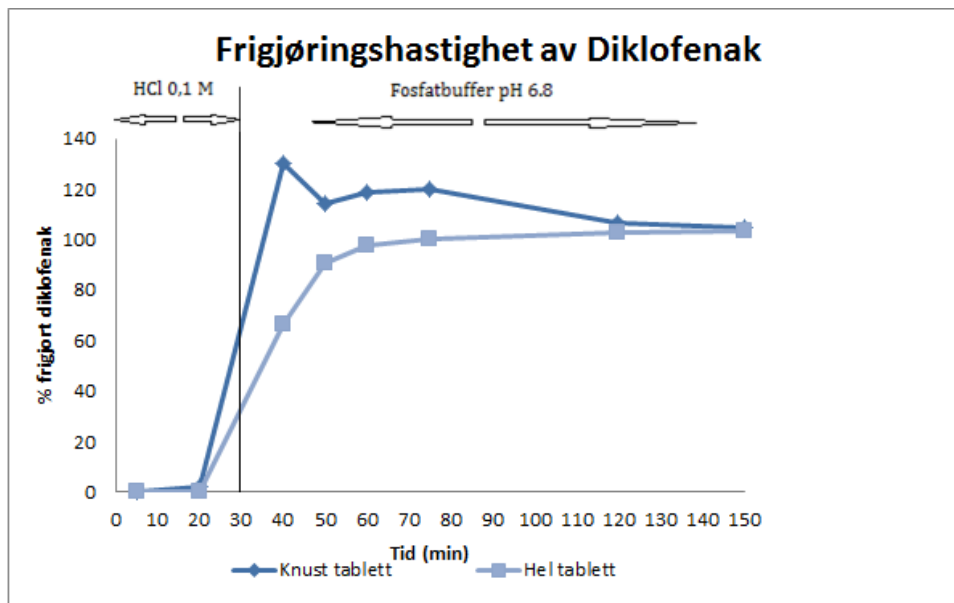
3.1.4. Prøveuttak

Det ble tatt ut prøver etter 5, 15, 30, 60, 70, 80, 100, 120, 150 og 180 minutter. Prøvene fra 5 til 60 minutter ble tatt ut av surt medium, mens prøvene fra 70 til 180 minutter ble tatt ut av buffermedium. For alle prøvene ble en 20 ml sprøyte med slange brukt til å ta ut 10 ml prøver. De ble så filtrert med et 0,45 µm filter og overført til reagensrør. Prøvene som ble tatt ut ble erstattet med tilsvarende volum fersk medium, 0,1 M HCl eller fosfatbuffer pH 6,8, slik at volumet i beholderne forble konstant.

Av prøvene som ble tatt ut av det sure mediet, ble det etterpå tatt ut 7,5 ml med mikropipette og blandet med 2,5 ml 0,2 M trinatriumfosfat dodecahydrat. pH ble så justert med 2 N HCl eller 2 N NaOH til pH $6,8 \pm 0,05$. Dette ble gjort for å ha alle prøvene i samme oppløsningsmedium, slik at de kunne analyseres i HPLC med samme medium som standardprøvene ble målt i.

Siden diklofenak var uløselig i 0,1 M HCl, var det mye uoppløste partikler i beholderne med de delte og knuste tablettene. Når prøvene fra det sure mediet ble filtrert, satt det derfor partikler igjen i filteret. Når prøvene fra bufferløsningen da ble tatt ut og filtrert, ble partiklene i filtrene løst opp og overført i lag med disse prøvene. Dette ga dermed en helt feil oppløsningsprofil når prøvene ble analysert. Dette kan ses ut av Figur 11. Det var et testforsøk der filteret ikke ble byttet på den knuste tablett. Frigjøringen for den knuste tablett viser ikke en reell frisetting, men er et resultat av de faste partiklene i filteret ble oppløst når bufferløsningen ble presset gjennom filteret. Resultatet av dette ble derfor at filtrene ble skiftet ut samtidig som pH-endring ble utført, med visshet om at en liten andel diklofenak lå

igjen i filteret. Et av filterene som ble brukt under testen på tablettene med knusningsgrad 125 μm ble analysert ved å presse gjennom 500 ml bufferløsning. Analysen av denne prøven viste at det satt 0,82 mg diklofenak igjen i filteret.



Figur 11. Frigjøring av diklofenak fra en hel og en knust tablett uten bytte av filter ved pH-endring.

3.2. Utvikling av væskechromatografisk metode for diklofenak

3.2.1. Utstyr og stasjonærfase

Det ble brukt et HPLC-instrument med UV-detektor fra Agilent Technologies. Kolonnen som ble benyttet var Poroshell 120 SB-C18, 4,6 x 100 mm, med 2,7 µm partikler. Software-programmet som ble brukt var Agilent OpenLAB CDS ChemStation, versjon C.01.04. Bølgelengde på UV-detektoren ble satt til 276 nm [30].

3.2.2. Mobilfase

Det ble brukt en mobilfasesammensetning bestående av fosfatbuffer pH 2,5 og acetonitril i mengdeforhold 35:65(v/v). Dette mengdeforholdet ga en passende retensjonstid for diklofenak på 1,6 minutter. På grunn av fare for utfelling av fosfat, ble mengde acetonitril holdt under 70 %. Det ble kjørt en isokratisk eluering, med en flyt-hastighet på 1,5 ml/min. Fosfatbufferen ble laget av like mengder 0,01 M fosforsyre og 0,01 M natriumhydrogenfosfat, og det ble brukt ultrarent vann fra et Smart2pure vannrensesystem. pH ble målt med et pH-meter og justert til nøyaktig pH 2,5. Fersk buffer ble laget hver uke og oppbevart i kjøleskap. Fosfatbufferen til mobilfasen ble byttet annenhver dag etter anbefaling fra produsenten.

3.2.3. Injeksjonsvolum

For prøvene fra forsøkene med de knuste tablettene ble det brukt et injeksjonsvolum på 5 µl. Samme injeksjonsvolum ble brukt for prøvene fra forsøkene med de hele og delte tablettene tatt ut etter pH-endring der man forventet høye konsentrasjoner av frigjort virkestoff. I prøvene tatt ut før pH-endring forventet man lave konsentrasjoner av frigjort virkestoff og injeksjonsvolumet ble derfor økt til 40 µl. Det ble brukt 1,5 ml vialer med lokk og det ble utført nålvask mellom hver injeksjon.

3.2.4. Kalibrering

Da frisetting fra diklofenak enterotabletter ble testet i surt og nøytralt miljø, var forventet konsentrasjonsnivå mellom 0 og 50 mg/L. Det var ikke mulig å lage en kalibreringskurve som var nøyaktig nok over hele konsentrasjonsområdet vi forventet at prøvene ville befinne seg i. Det ble derfor laget to kalibreringskurver for de hele og delte tablettene. Prøvene som ble tatt ut av det sure miljøet ble målt på en lav kalibreringskurve som gikk fra 8040 ng/L og helt ned til kvantifiseringsgrensen 120,6 ng/L. Prøvene som ble tatt ut fra det nøytrale miljøet ble målt på en kalibreringskurve med konsentrasjoner fra 3,216 mg/L til 80,4 mg/L. For de delte

tablettene havnet konsentrasjonene på prøvene midt mellom de to kalibreringskurvene, og de ble derfor fortynnet slik at de kunne måles på den lave kalibreringskurven.

For de knuste tablettene ble det laget en kalibreringskurve fra 0,03126 mg/L til 80,4 mg/L. Her var det ikke nødvendig å ha kalibreringskurven helt ned til kvantifiseringsgrensen, og det var derfor mulig å lage en felles kurve, noe jeg så på som mest optimalt.

Alle standardløsningene ble laget i fosfatbuffer pH 6,8, lik den som ble brukt i dissolution-testen. HPLC-instrumentet ble kalibrert og validert kvelden før forsøkene. Det ble kjørt QC-prøver med kjente konsentrasjoner i lag med prøvene. Disse ble kjørt i starten, midt i og på slutten av hver sekvens. Det ble også kjørt en blank prøve mellom prøvene fra hver tablett.

3.2.5. Metodekritikk

Da metoden endelig var fastsatt og jeg skulle begynne med tablettprøvene, begynte kolonnen gradvis å miste effektivitet etter kjøring av noen tablettprøver. Den tålte plutselig mindre og mindre injeksjonsvolum før toppene fikk uttalt tailing. Dette kan skyldes at upolare hjelpestoffer i tablettene ble liggende igjen i kolonnen, som ikke ble effektivt skyldt ut ved isokratisk eluering. Etter skylling med vann:acetonitril 5:95(v/v) i 15 minutter ble kolonnen som ny igjen. Trykket i kolonnen var konstant over hele tidsforløpet og det ble gjort en utfellingstest med fosfatbuffer og acetonitril 35:65(v/v). Denne ga ingen utfelling, og det var derfor ikke noe som tydet på at kolonnen var tett. Jeg begynte først hovedsakelig med 20 og 40 µl injeksjonsvolum, men dette ble så redusert til 10 µl og deretter til 5 µl. 5 µl ble tilslutt det endelige injeksjonsvolumet på prøvene for å redusere mengden hjelpestoffer i kolonnen. Kolonnen ble så skyldt med 95 % acetonitril mellom hvert forsøk.

3.3. Dissolution testing for pantoprazol

I dette forsøket ble også metode A brukt. Deler av metoden, som rotasjonshastighet og uttak ble utført etter monografien for pantoprazole sodium delayed-release tablets i USP [31].

3.3.1. Behandling av tablettene

Totalt ble det gjort tre forsøk, med henholdsvis hele, delte og knuste tabletter. For hvert forsøk ble det gjort seks paralleller. I forsøket med de delte tablettene ble det brukt en tablettdele for å dele tablettene i to like deler.

I forsøket med knuste tabletter var det meningen å teste to ulike knusningsgrader, men dette lot seg ikke gjøre. Årsaken til dette er at det ikke var mulig å finknuse drasjeringen på Somac-tablettene i morter. Drasjeringen ble liggende igjen som store flak og var i tillegg litt voksaktig i konsistens, noe som gjorde at pulverkjernen av tablettene ble klistret fast i morteren. Da jeg ikke fikk noen homogen blanding, var det ikke mulig å bruke et siktetårn til å skille de ulike fraksjonene, da all drasjeringen ville blitt liggende igjen på toppen, mens kjernen hadde havnet i bunn. Derfor ble én og én tablett grovknust i en liten porselensmorter, med minimal rivning, for å unngå at den klistret seg fast. Tablettene ble veid individuelt før knusing, og pulveret ble overført til et veieskip. Veieskipet ble så veid både før og etter at pulveret var overført til maskinen, og mengden som ble tapt ble korrigert for i resten av forsøket.

3.3.2. Utførelse

For hvert forsøk ble 750 ml 0,1 M HCl fylt i seks beholdere og varmet opp til $37 \pm 0,5$ °C. Padlen roterte med en hastighet på 75 RPM. 250 ml 0,2 M trinatriumfosfat dodecahydrat ble fylt i seks målekolber og satt i vannbad og varmet opp til $37 \pm 0,5$ °C. Tablettene ble sluppet ned i med 7 minutters mellomrom, for å ha tid til nødvendig pH justering senere i forsøket. Etter 2 timer ble 250 ml trinatriumfosfat dodecahydrat tilsatt og pH ble justert ved hjelp av 2 N HCl eller 2 N NaOH til $\text{pH } 6,8 \pm 0,05$ innen 5 minutter. pH-målingen ble foretatt ved at en liten mengde ble tatt ut med sprøyte, overført til et lite begerglass, og målt med pH-meter, før den ble tilbakeført. Dette ble gjentatt inntil korrekt pH ble oppnådd.

3.3.3. Prøveuttak

Det ble tatt ut prøver etter 5, 15, 30, 60, 90, 120, 130, 140, 160 og 180 minutter. Prøvene fra 5 til 120 minutter ble tatt ut av surt medium, mens prøvene fra 130 til 180 minutter ble tatt ut av buffermedium. For alle prøvene ble en 20 ml sprøyte med slange brukt til å ta ut 10 ml prøver. Prøvene som ble tatt ut ble erstattet med tilsvarende volum fersk medium, 0,1 M HCl eller fosfatbuffer pH 6,8, slik at volumet i beholderne forble konstant. Alle prøvene ble overført til reagensrør, og umiddelbart blandet med 1:1 forhold med 0,5 N NaOH i henhold til monografien i USP [31]. Dette ble gjort for å hindre nedbrytning av pantoprazol etter uttak. Prøvene ble så filtrert med et 0,45 µm filter og analysert ved hjelp av HPLC.

3.4. Utvikling av væskechromatografisk metode for pantoprazol

3.4.1. Utstyr og stasjonærfase

Det ble brukt et HPLC-instrument med UV-detektor fra Agilent Technologies. Kolonnen som ble benyttet var Poroshell 120 SB-C18, 4,6 x 100 mm, med 2,7 µm partikler. Software-programmet som ble brukt var Agilent OpenLAB CDS ChemStation, versjon C.01.04. Bølgelengde på UV-detektoren ble satt til 290 nm [31].

3.4.2. Mobilfase

Det ble brukt en mobilfasesammensetning bestående av fosfatbuffer pH 7.0, acetonitril og metanol i mengdeforhold 50:10:40(v/v/v). Det ble kjørt en gradient eluering, med en flyt-hastighet på 0,8 ml/min. Se Tabell 5 for fullstendig gradientsammensetning. Mobilfaser med lav pH var ikke aktuelt å bruke siden pantoprazol er et syrelabilt stoff.

Tabell 5. Gradientsammensetning for pantoprazol

Tid (min)	Fosfatbuffer pH 7.0 (%)	Acetonitril (%)	Metanol (%)	Flyt-hastighet (ml/min)	Maks. trykk (Bar)
0.00	50	10	40	0.800	400.00
1.00	50	10	40	0.800	400.00
2.00	30	40	30	0.800	400.00
3.50	30	40	30	0.800	400.00
3.60	50	10	40	0.800	400.00
6.20	50	10	40	0.800	400.00

Denne gradienten ga en passende retensjonstid for pantoprazol på rundt 2,86 minutter, samtidig som den var fullstendig separert fra dens degraderingsprodukter. For å lage degraderingsprodukter ble 22,55 mg pantoprazol natrium sesquihydrat tilsvarende 20 mg pantoprazol løst i 25 ml 0,1 M HCl og inkubert i 2,5 time. Deretter ble løsningen tilsatt 25 ml 0,5 M NaOH. Etter 2,5 time var praktisk talt all pantoprazol degradert. Degraderingsproduktene ble blandet med en ren prøve pantoprazol, og denne løsningen ble brukt til å finne en passende gradient som kunne separere stoffene.

På grunn av fare for utfelling av fosfat, ble mengde av organisk mobilfase holdt under 70 %. Fosfatbufferen ble laget med 61 deler 0,01 M dinatriumhydrogenfosfat og 39 deler 0,01 M natriumhydrogenfosfat, og det ble brukt ultrarent vann fra et Smart2pure vannrensesystem. pH ble målt med et pH-meter og justert til pH 7.0 med de enkelte komponentene. Fersk buffer ble laget hver uke og oppbevart i kjøleskap. Fosfatbufferen til mobilfasen ble byttet annenhver dag etter anbefaling fra produsenten.

3.4.3. Injeksjonsvolum

Det ble injisert 10 µl av hver prøve. Det ble brukt 1,5 ml vialer med lokk og det ble utført nålvask mellom hver injeksjon.

3.4.4. Kalibrering

Det ble laget en felles kalibreringskurve for alle tre forsøkene. HPLC-maskinen ble kalibrert og validert to dager før forsøkene. 22,55 mg pantoprazol natrium sesquihydrat (432,37 g/mol) tilsvarende 20 mg pantoprazol (383,37 g/mol) ble overført til en 50 ml målekolbe. 30 ml 0,02 M NaOH ble tilsatt og løsningen ble satt i ultralydbad til alt var oppløst. 2 ml acetonitril ble tilsatt og kolben ble fylt opp til streken med 0,02 M NaOH. Bestemte mengder av stamløsningen ble fortynnet med 1:1 fosfatbuffer pH 6,8 og 0,5 M NaOH til standardløsninger med konsentrasjoner fra 0,016 mg/L til 16 mg/L. Dette er utført i henhold til USP [31].

Det ble kjørt QC-prøver med kjente konsentrasjoner i lag med prøvene. Disse ble kjørt i starten, midt i og på slutten av hver sekvens. Det ble også kjørt en blank prøve mellom prøvene fra hver tablett.

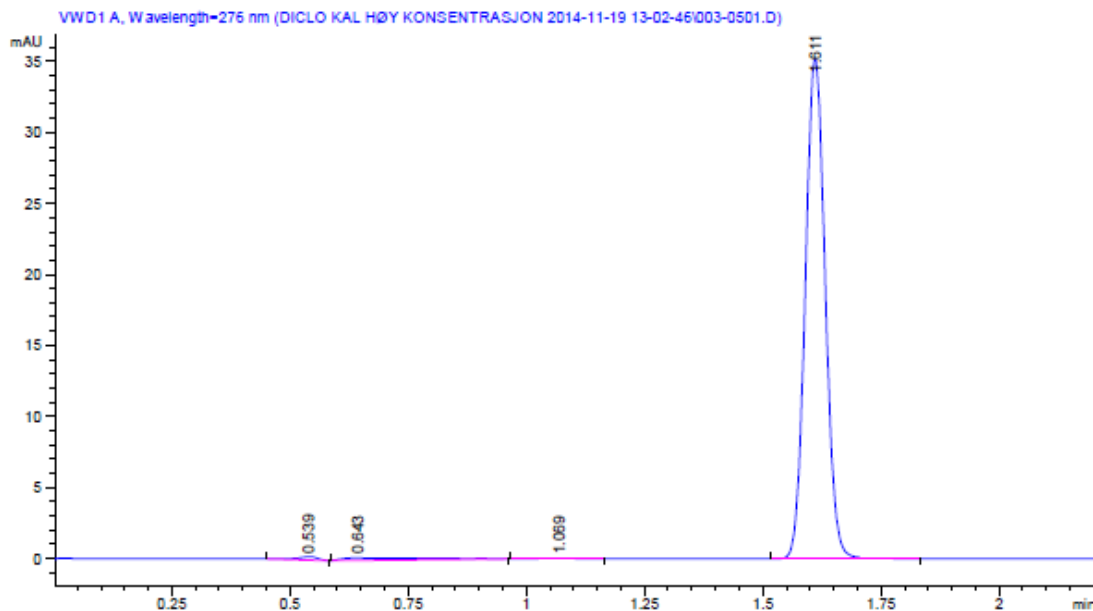
4. RESULTATER

Formålet med denne studien var å se på mulige endringer i frisettingsprofilen fra knuste og delte enterotabletter med diklofenak og pantoprazol. For å kunne gjøre dette var vi avhengige av å etablere validerte analysemetoder for disse to virkestoffene. Dette er to virkestoff som krever ulike HPLC-metoder. Det ble derfor etablert to ulike metoder, en for hvert virkestoff. HPLC-metodene for diklofenak og pantoprazol ble validert etter ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures [32].

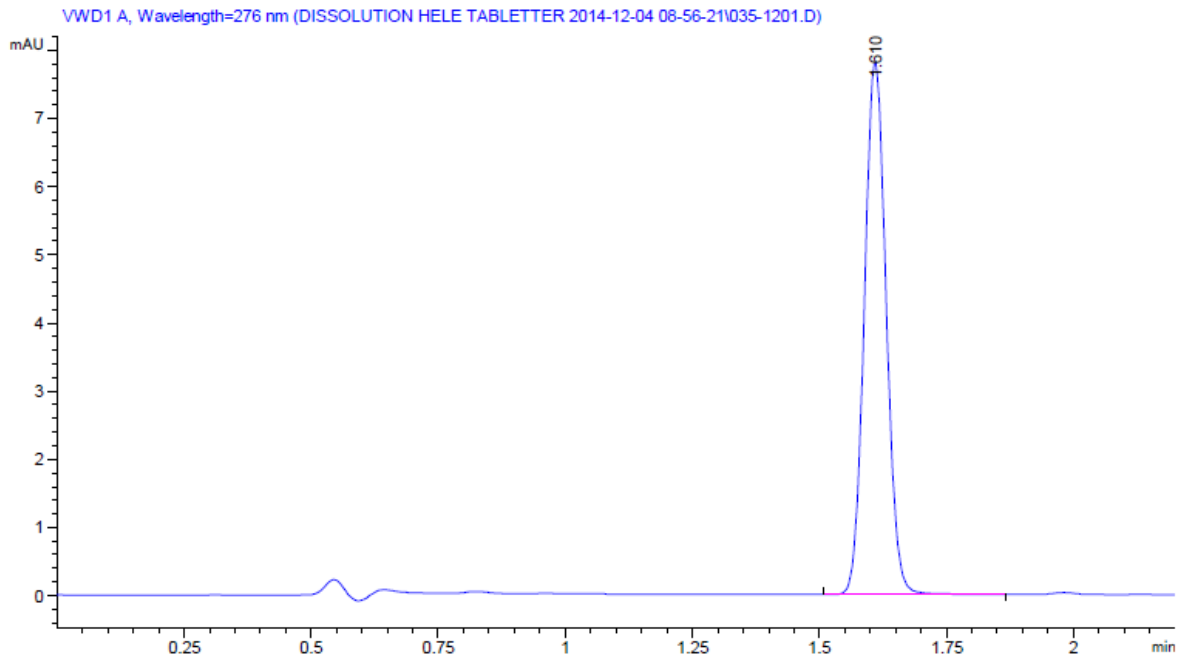
4.1. Validering av HPLC-metode for diklofenak

4.1.1. Spesifisitet

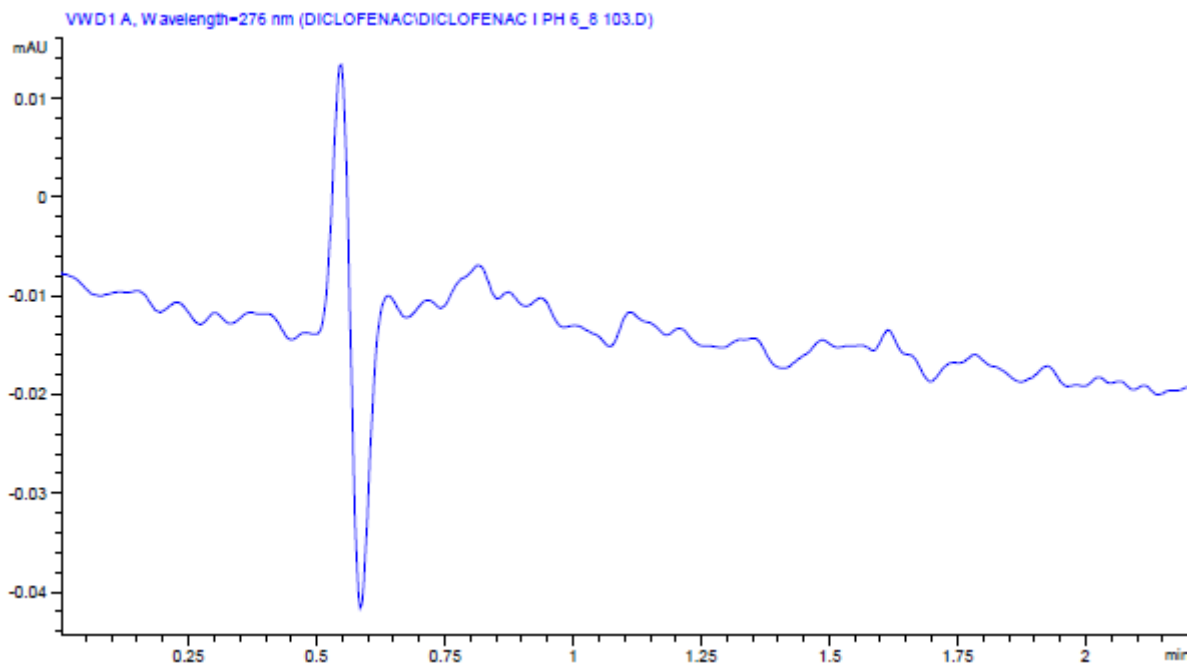
For kromatografiske prosedyrer brukes representative kromatogrammer til å demonstrere spesifisitet. Hvis det er flere topper i et kromatogram, bør disse være fullstendig separert. Figur 12 viser et typisk kromatogram av diklofenak med retensjonstid på 1,61 minutter. Kromatogrammene fra tablettprøvene viste ingen ekstra topper, vist i Figur 13. Det er derfor svært god spesifisitet i denne metoden. Figur 14 viser et kromatogram av en blank prøve, uten diklofenak, for sammenligning.



Figur 12. Et typisk kromatogram av diklofenak. Det er her injisert en prøve med 8,08 mg/L.



Figur 13. Et typisk kromatogram av en tablettprøve med Diclofenac® tabletter.

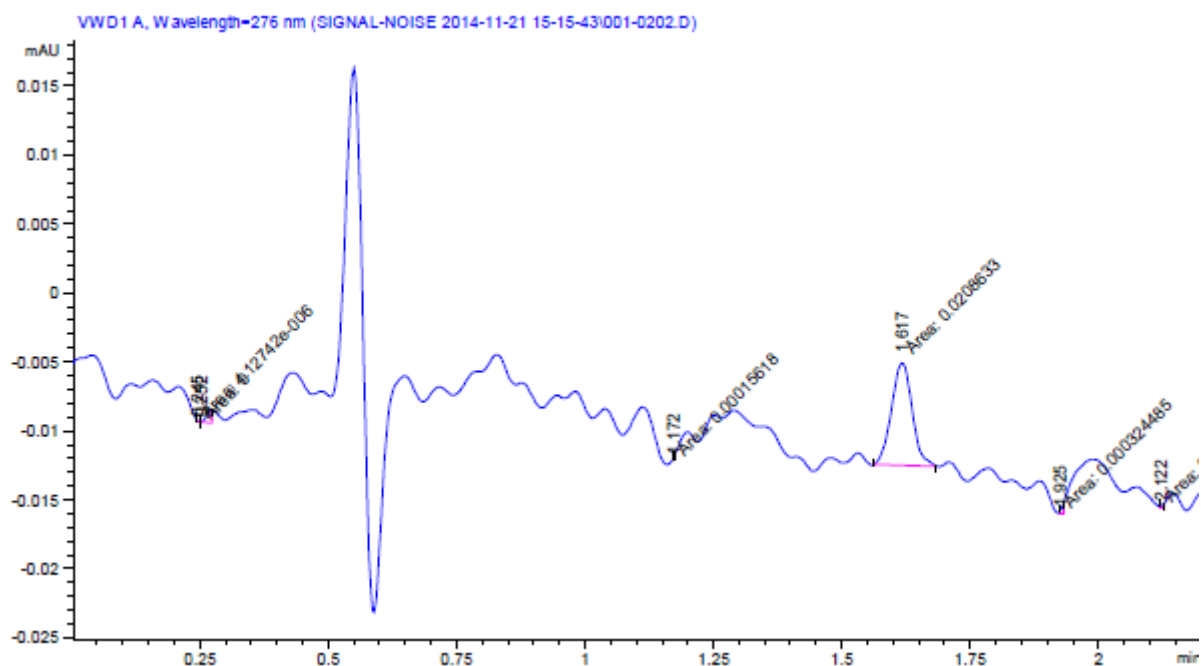


Figur 14. Et kromatogram etter injeksjon av en blank prøve.

4.1.2. Linearitet

Det må være et lineært forhold mellom konsentrasjonen av analytten og arealet på toppene i kromatogrammene. Standardkurvene viste linearitet innenfor de konsentrasjonsområdene som ble valgt. Se Vedlegg 1 for linearitet og tilhørende korrelasjonskoeffisient.

4.1.3. Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense



Figur 15. Injeksjon av 40,4 ng/L diklofenak viser en S/N-ratio 3,318.

For å bestemme deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense ble en prøve, fortynnet ned til 40,4 ng/L, injisert inn i HPLC-maskinen. Kromatogrammet er vist i Figur 15. Diklofenak har en retensjonstid på 1,61 og en toppbredde ved halv høyde ($w_{h1/2}$) på 0,043. Det ble beregnet baseline-noise på et område som tilsvarer +/- 20 ganger $w_{h1/2}$. Ut ifra det ble signal/noise-ratio beregnet til 3,318. Denne konsentrasjonen ble satt til deteksjonsgrense.

Kvantifiseringsgrensen ble også beregnet ut ifra samme prøve. $40,4/3,318 \times 10 = 121,7$ ng/L.

4.1.4. Kalibrering

Tabell 6 inneholder en oversikt over de ulike standardkurvenes konsentrasjonsområde og korrelasjonskoeffisient. Tabeller og figurer for standardkurvene er vedlagt i Vedlegg 1.

Tabell 6. Oversikt over standardkurvenes konsentrasjonsområde og korrelasjonskoeffisient.

Medikament	Konsentrasjonsområdet (mg/L)	R ²
Diclofenac ® hele i 0,1 M HCl	0,0001206 - 0,00804	0,9998
Diclofenac ® delte i 0,1 M HCl	0,0001206 - 0,00804	0,9998
Diclofenac ® hele i fosfatbuffer pH 6,8	3,216 – 80,40	1
Diclofenac ® delte i fosfatbuffer pH 6,8	3,216 – 80,40	1
Diclofenac ® knust 1,4 mm	0,03216 – 80,40	1
Diclofenac ® knust 125 µm	0,03216 – 80,40	1

4.1.5. Presisjon og nøyaktighet

Presisjon og nøyaktighet bør vurderes over minst tre paralleller ved tre ulike konsentrasjoner som ligger ved konsentrasjonsområdet nedre grense, midt i og ved dens øvre grense. Det er her tatt tre paralleller ved fire ulike konsentrasjoner spredt utover konsentrasjonsområdet.

Presisjon og nøyaktighet er beregnet for hver standardkurve som ble benyttet, og kan sees av Tabell 7-9.

Tabell 7. Beregnet gjennomsnittsverdi, presisjon og nøyaktighet av standardkurve som ble brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i surt miljø.

Konsentrasjon (ng/L)	Gjennomsnittsverdi (ng/L)*	Presisjon (RSD %)	Nøyaktighet (%)
120,6	121,9	4,87	101,08
404	415	0,13	102,67
2010	2020	0,35	100,50
8040	8030	0,07	99,92

*Gjennomsnitt av tre paralleller.

Tabell 8. Beregnet gjennomsnittsverdi, presisjon og nøyaktighet av standardkurve som ble brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i nøytralt miljø.

Konsentrasjon (mg/L)	Gjennomsnittsverdi (mg/L)*	Presisjon (RSD %)	Nøyaktighet (%)
3,216	3,226	1,32	100,32
8,04	8,039	0,58	99,98
48,24	48,235	0,19	99,99
80,4	80,372	0,08	99,96

*Gjennomsnitt av tre paralleller.

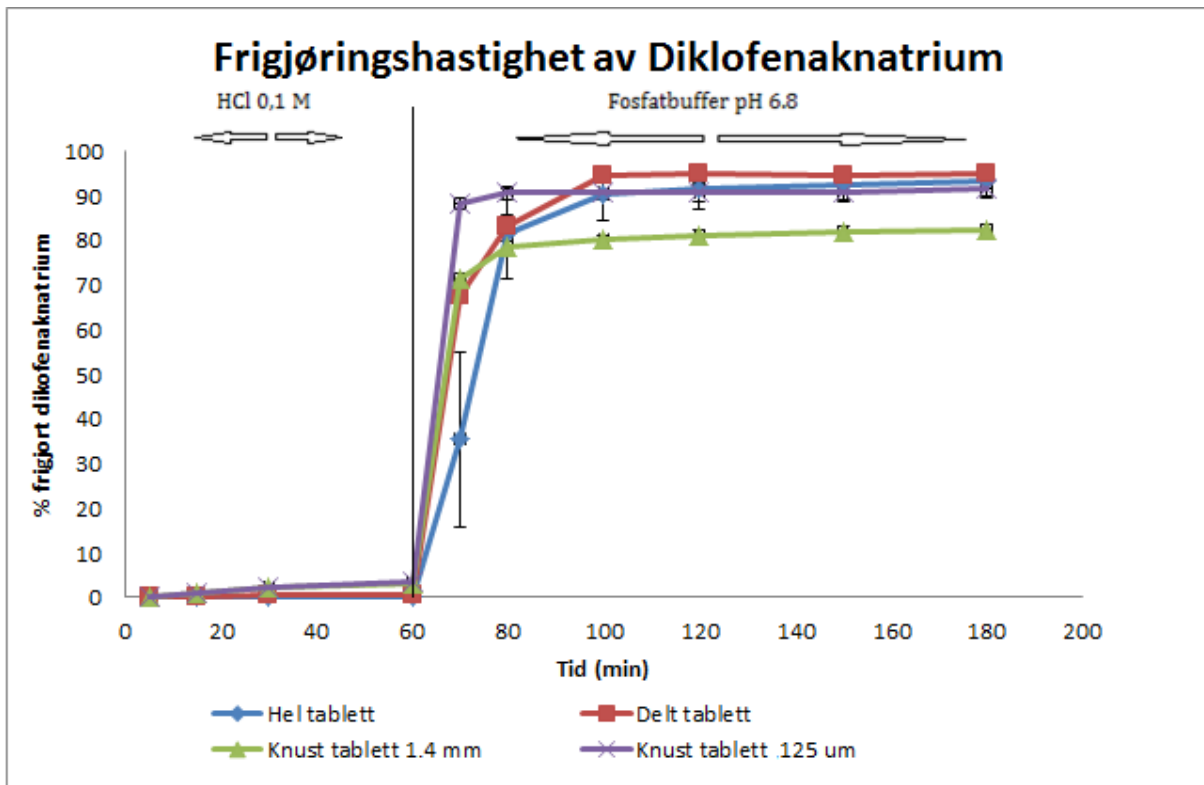
Tabell 9. Beregnet gjennomsnittsverdi, presisjon og nøyaktighet av standardkurve som ble brukt på de knuste tablettene.

Konsentrasjon (mg/L)	Gjennomsnittsverdi (mg/L)*	Presisjon (RSD %)	Nøyaktighet (%)
0,03216	0,03520	1,18	109,44
3,216	3,40570	0,82	105,90
48,24	48,28999	0,11	100,10
80,4	80,21332	0,07	99,77

*Gjennomsnitt av tre paralleller.

4.2. Frigjøringsprofil for diklofenak

Figur 16 viser frigjøringshastigheten av hele, delte og knuste tabletter i 0,1 M HCl og i fosfatbuffer pH 6,8. pH-endring er markert i figuren ved tid 60 minutter. Det er lagt inn gjennomsnittsverdier av seks paralleller med standardavvik.



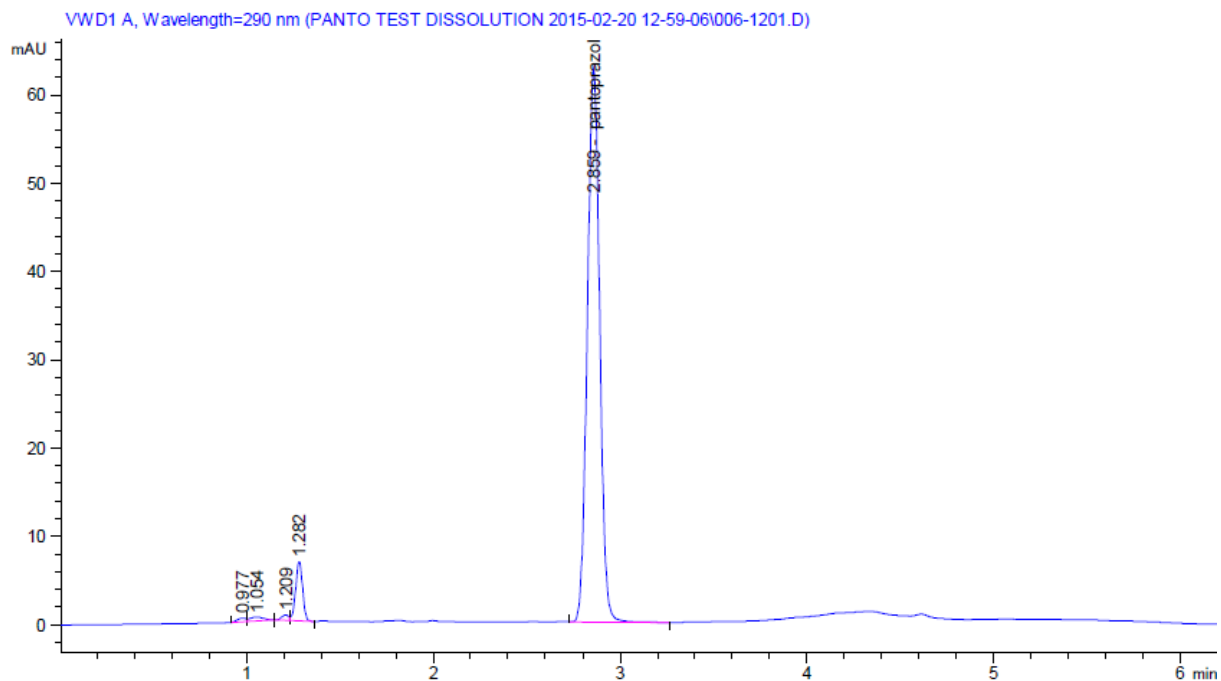
Figur 16. Frigjøringsprofil for diklofenak fra hele, delte og knuste tabletter. Gjennomsnitt av seks paralleller med standardavvik.

4.3. Validering av HPLC-metode for pantoprazol

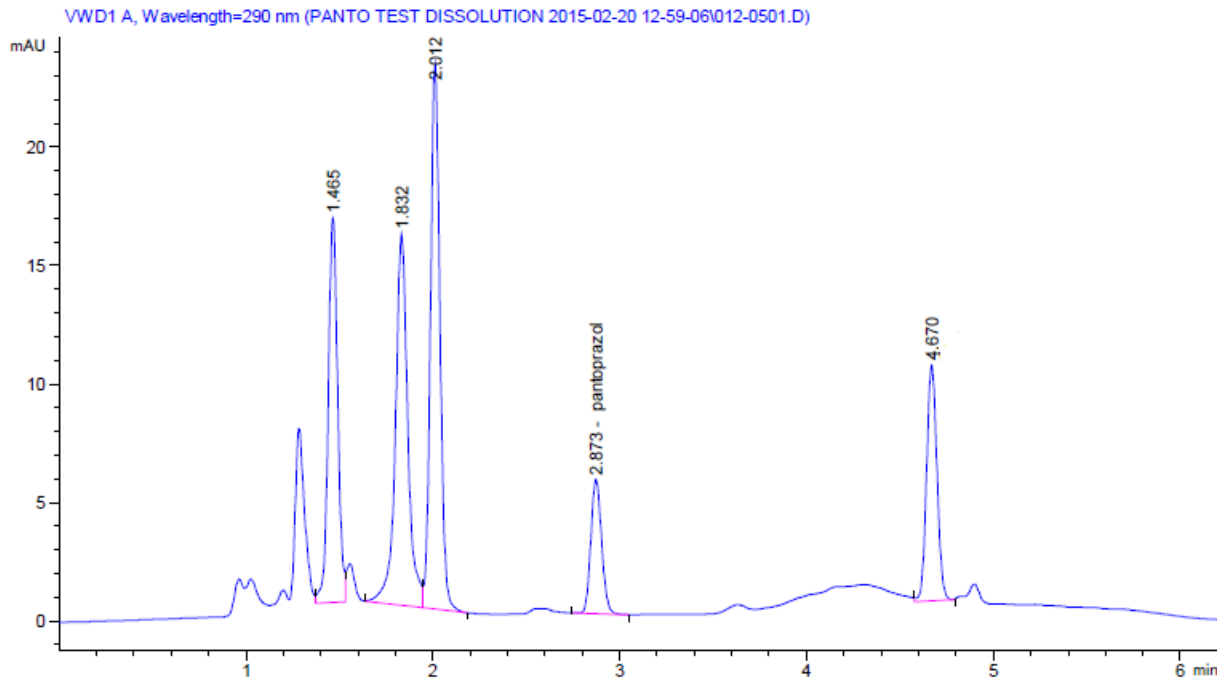
I likhet med diklofenak så ble HPLC-metoden for pantoprazol også validert etter ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures [32].

4.3.1. Spesifisitet

Figur 17 viser et typisk kromatogram av en prøve pantoprazol, med retensjonstid på 2.86 min. Figur 18 viser et typisk kromatogram av pantoprazol sammen med dens degraderingsprodukter. Det er ikke prøvd å skille degraderingsproduktene fra hverandre, da det var pantoprazol som skulle kvantifiseres. Derfor er det kun pantoprazol som er fullstendig separert. Spesifisiteten for pantoprazol er derfor bra, mens spesifisiteten for de ulike degraderingsproduktene er dårlig.

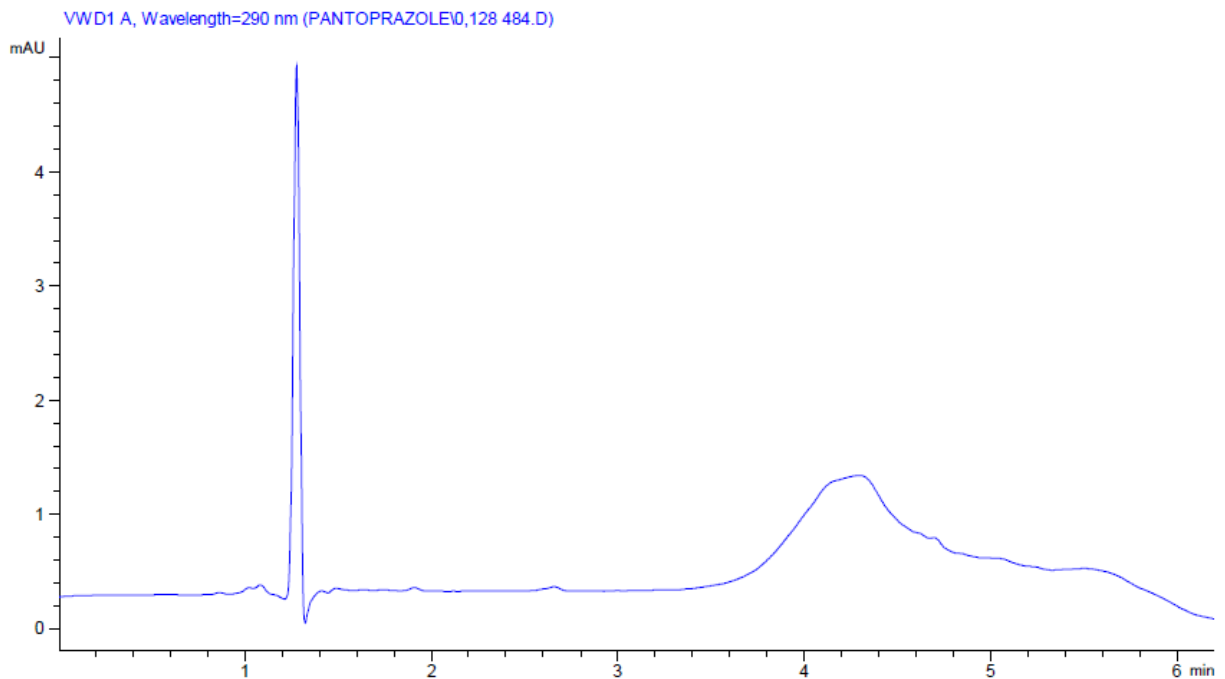


Figur 17. Et typisk kromatogram av pantoprazol. Det er her injisert en prøve med 10 mg/L.



Figur 18. Et typisk kromatogram av pantoprazol med degraderingsprodukter.

Figur 19 viser et kromatogram etter injeksjon av en blank prøve. Etter rundt fire minutter oppstår det en drift i baseline som følge av endring av gradienten ved 3,5 minutt. Dette lot jeg være, fordi driften skjer i god tid etter at pantoprazol er eluert.



Figur 19. Et kromatogram etter injeksjon av en blank prøve.

4.3.2. Linearitet

Standardkurven viste linearitet innenfor det konsentrasjonsområdet som ble valgt. Se Vedlegg 2 for linearitet og tilhørende korrelasjonskoeffisient.

4.3.3. Kalibrering

For Somac ® ble en felles kalibreringskurve laget for alle tablettene. Konsentrasjonsområdet gikk fra 0,016 mg/L til 16 mg/L og korrelasjonskoeffisienten var på 1. Tabell og figur for standardkurven er vedlagt i Vedlegg 2.

4.3.4. Presisjon og nøyaktighet

Presisjon og nøyaktighet er beregnet for standardkurven som ble benyttet, og kan sees av Tabell 10. Det er her tatt tre paralleller ved tre ulike konsentrasjoner spredt utover konsentrasjonsområdet.

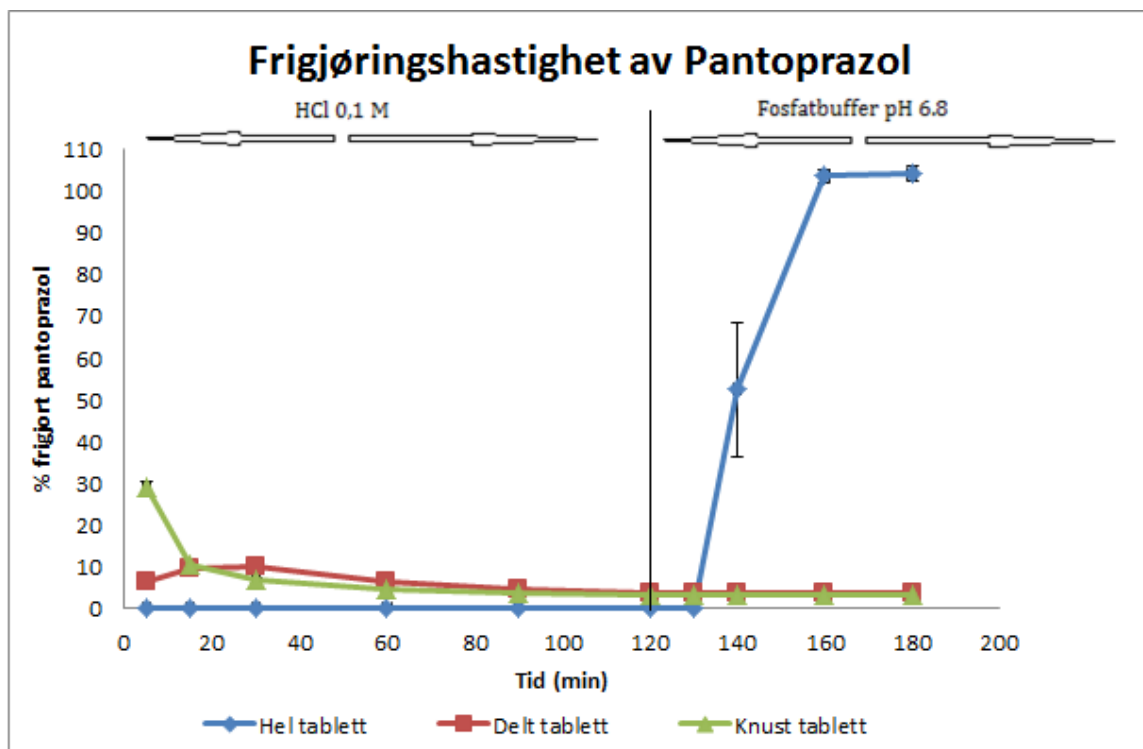
Tabell 10. Beregnet gjennomsnittsverdi, presisjon og nøyaktighet av standardkurve brukt på pantoprazol.

Konsentrasjon (mg/L)	Gjennomsnittsverdi (mg/L)*	Presisjon (RSD %)	Nøyaktighet (%)
0,08	0,090	0,64	113,33
0,8	0,804	0,52	100,58
8	7,976	0,07	99,71

*Gjennomsnitt av tre paralleller.

4.4. Frigjøringsprofil for pantoprazol

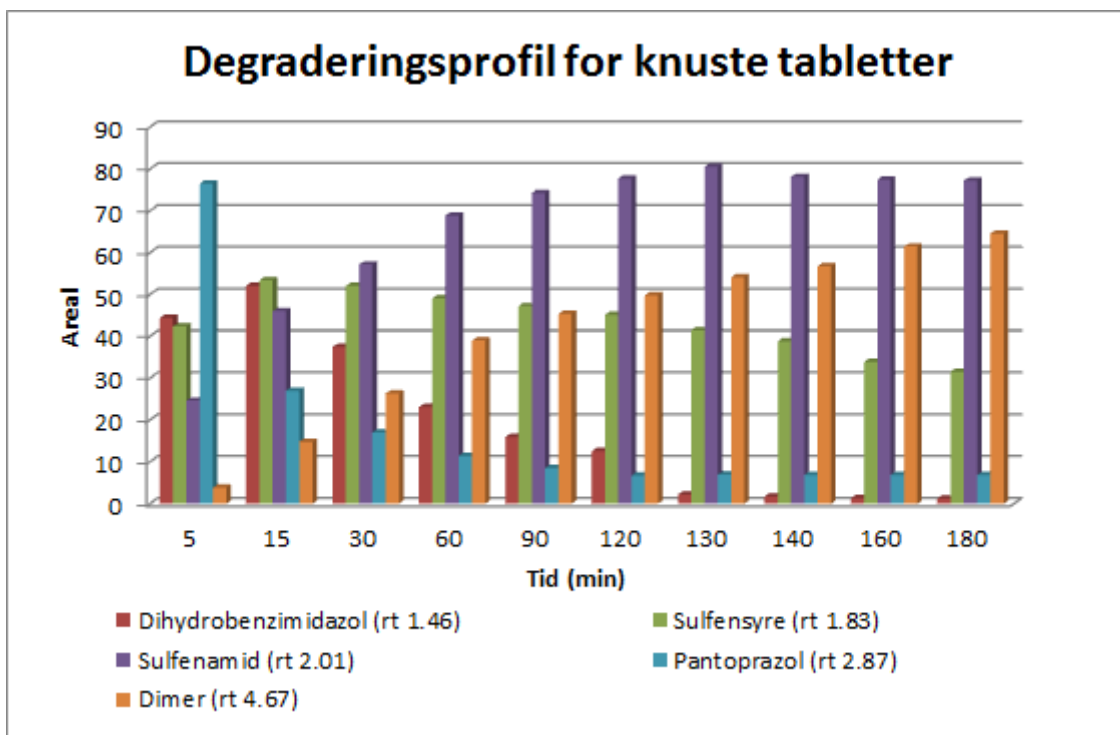
Figur 20 viser frigjøringshastigheten av pantoprazol fra hele, delte og knuste tabletter i 0,1 M HCl og i fosfatbuffer pH 6,8. pH-endring er markert i figuren ved tid 120 minutter. Det er lagt inn gjennomsnittsverdier av seks paralleller med standardavvik. For de delte og knuste tablettene er figuren et resultat av både frigjøring og degradering av pantoprazol, mens for de hele tablettene er figuren kun et resultat av frigjøring, da pantoprazol ikke eksponeres for det sure miljøet.



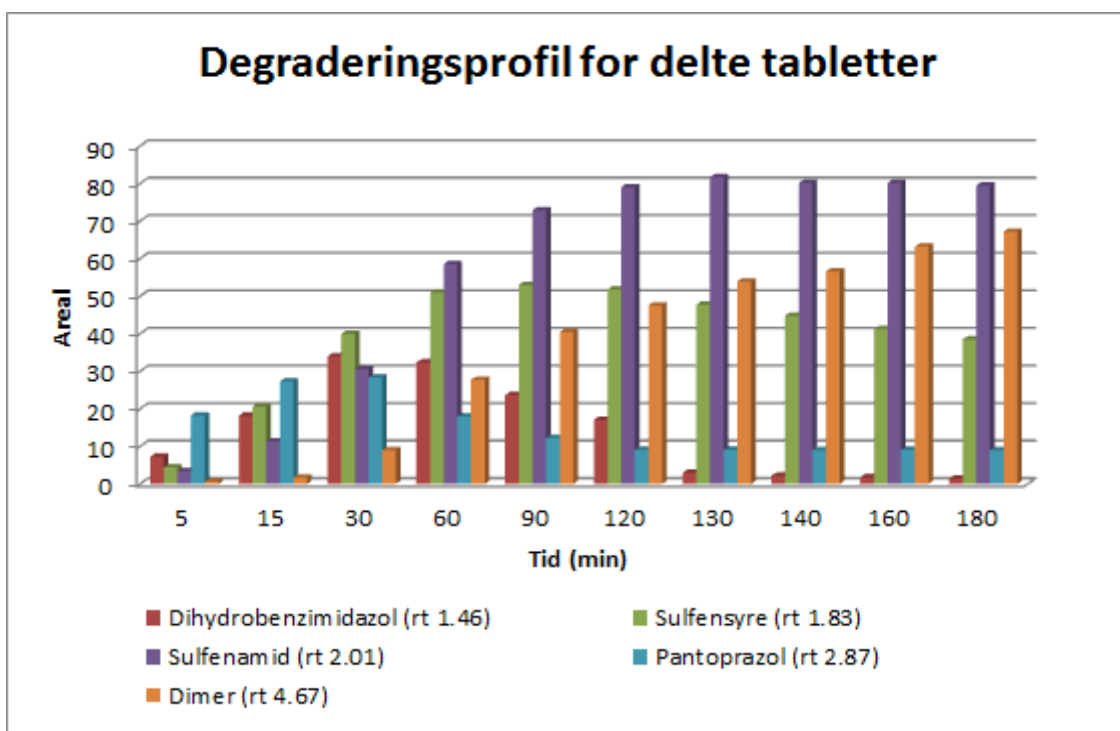
Figur 20. Frigjøringsprofil for pantoprazol fra hele, delte og knuste tabletter. Gjennomsnitt av seks paralleller med standardavvik.

4.5. Degraderingsprofiler for pantoprazol

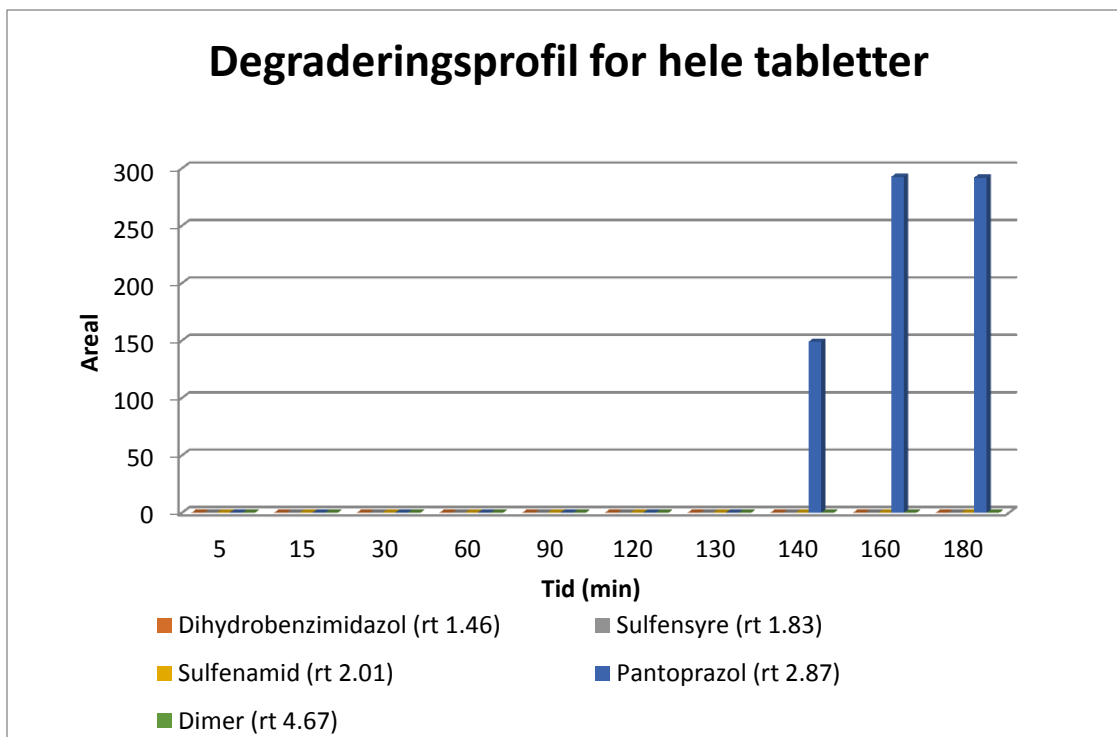
For pantoprazol er degraderingsprofilene til de ulike tablettene tatt med, for å se hvordan metabolittene dannes i takt med at pantoprazol brytes ned. Disse er vist i Figur 21-23. Disse er ment som et supplement til Figur 20, da det ut i fra denne figuren er vanskelig å tyde forskjellen i frigjøring mellom de hele og delte tablettene, da man ikke kan si hvor mye av virkestoffet som er frigjort over tid og hvor mye som er nedbrutt. De ulike metabolittene ble også navngitt i henhold til Figur 6, som viser degraderingsmønsteret til protonpumpehemmerne.



Figur 21. Areal under kurven for pantoprazol og dens degraderingsprodukter fra knuste tabletter. Gjennomsnitt av seks paralleller.



Figur 22. Areal under kurven for pantoprazol og dens degraderingsprodukter fra delte tabletter. Gjennomsnitt av seks paralleller.



Figur 23. Areal under kurven for pantoprazol og dens degraderingsprodukter fra hele tabletter. Gjennomsnitt av seks paralleller.

Figur 21-23 viser degraderingsprofilene for pantoprazol for henholdsvis knuste, delte og hele tabletter. Metabolittene er vist i areal under kurven og ikke i konsentrasjon, da det ikke var mulig å lage standardkurver for metabolittene som ble dannet. Pantoprazol er også derfor satt inn som areal i stedet for konsentrasjon. pH-endring er ikke markert i figurene, men ble foretatt etter 120 minutter.

5. DISKUSJON

5.1. Knusing av enterotabletter

Flere eldre mennesker er avhengig av hjelp til administrering av legemidlene sine, og ofte er det sykepleiere eller hjelpepleiere som står for dette. Sykepleiere står for det siste leddet i utlevering av medisiner, og har ansvar for den siste kvalitetssikringen. De har dårligere farmakologisk og legemiddelteknologisk kunnskap enn farmasøyter, og er ikke alltid klar over konsekvensene det kan medføre ved for eksempel å knuse en tablett.

Risikoen for uheldige bivirkninger er økt hos eldre brukere. Polyfarmasi i kombinasjon med aldersrelaterte farmakokinetiske og farmakodyamiske endringer fører til at de er mer utsatt for bivirkninger. I tillegg kan det være praktiske problemer med å ta legemidler, da pasientene kan ha svelgeproblemer, eller at de ikke vil ta medisinen og spytt den ut [1]. Selv om oppslagsverk, som felleskatalogen, er tilgjengelige for å slå opp om hvilke legemidler som ikke kan deles og knuses, er det likevel registrert store avvik i håndtering ved norske sykehjem [33].

Formålet med denne studien var derfor å se på mulige konsekvenser av å knuse og dele enterotabletter av diklofenak og pantoprazol. Disse to legemidlene ble valgt på bakgrunn av at diklofenak representerer legemidler som er enterodrasjerte for å redusere slimhinneskader i magesekken, mens pantoprazol representerer en gruppe legemidler som er enterodrasjerte fordi de nedbrytes og mister effekten når de kommer i kontakt med magesyre. Konsekvensene ved å knuse eller dele disse tablettene vil derfor være forskjellige.

5.2. Drøfting av Diclofenac® tablett

5.2.1. Frigjøringsprofil for diklofenak

Figur 16 viser frigjøring av diklofenak først i surt miljø, og deretter i nøytralt miljø. Opprinnelig så skulle tablettene være i surt miljø i 2 timer, som spesifisert i farmakopéen. Men på grunn av at diklofenak ikke var løselig i syre, synes jeg ikke det var hensiktsmessig å ha disse tablettene i syre i hele 2 timer, så derfor ble tiden satt til 1 time.

Det kan sees ut av Figur 16 at uavhengig av bearbeidingsgrad, ble det målt svært lite virkestoff den første timen, og dette er på grunn av diklofenaks dårlige løselighet i 0,1 M HCl. Selv om tablettene blir delt eller knust og virkestoffet kommer i kontakt med oppløsningsmediet, er prosessen løselighetsbegrenset. Men en liten forskjell er det likevel. For hele tablett frigjøres det ingenting den første timen. Dette skyldes at enterodrasjeringen forblir intakt og hindrer virkestoffet fra å frigjøres. For de delte tablettene ble svært lite virkestoff oppløst, da det etter 1 time kun var målt i gjennomsnitt 0,57 %, tilsvarende 285 µg av en 50 mg tablett. For begge de ulike knusningsgradene, 1,4 mm og 125 µm, var det i gjennomsnitt oppløst ca. 3 %, tilsvarende 1,5 mg av en 50 mg tablett (se Tabell 15 i Vedlegg 3). Konsentrasjonen målt etter 1 time lå på rundt 2 mg/L for begge knusningsgradene. Dette stemmer relativt godt overens med diklofenaks løselighet i 0,1 M HCl (1,2 mg/L) [9]. Litt høyere er den, men det kan skyldes temperaturforskjeller, da forsøket ble utført ved 37°C, og løseligheten er oppgitt ved 23±2°C.

Figur 16 er markert med pH-endring etter 60 minutter. Det kan da sees at etter 10 minutter, er det i gjennomsnitt frigjort 35 % fra de hele tablettene, 67 % fra de delte tablettene, 71 % fra knusningsgrad 1,4 mm og 88 % fra knusningsgrad 125 µm. Det viser at frigjøringshastigheten øker i takt med redusert partikkelstørrelse. Dess mindre partikkelstørrelse, dess fortere løses diklofenak etter pH-endring, da diklofenak er godt løselig i fosfatbuffer (670 mg/L) [9]. Dette stemmer også godt overens med Figur 2 og Noyes-Whitney ligningen (Ligning 1), som viser at et økt overflateareal vil resultere i økt oppløsningshastighet.

Den siste delen av Figur 16 er noe mer usikker. Den viser store sprik i andel total mengde frigjort virkestoff mellom de ulike bearbeidingsgradene. Det kan sees at etter 180 minutter er det frigjort 93,1 % av de hele tablettene, 94,8 % av de delte tablettene, og bare 82,2 % fra knusningsgrad 1,4 mm, mens det ble frigjort 91,4 % fra knusningsgrad 125 µm (se Tabell 15 i

Vedlegg 3). Dette skyldes nok begrensninger til metoden som ble brukt for dette forsøket, og er sannsynligvis ikke et resultat av den reelle frisettingen.

5.2.2. Begrensninger til metoden

For knusningsgrad 1,4 mm, er mengde frigjort diklofenak betydelig lavere enn for de andre behandlingsgradene. En av årsakene til det er at denne knusningsgraden sannsynligvis ikke var helt homogen. Det ble observert at det var en god del flak av drasjering som ble liggende igjen på sikten, da de var for store til å passere den. Når jeg da i ettertid skulle veie opp mengde pulver tilsvarende én tablett, så tilsvarte det nok i realiteten ikke den rette komposisjonen av én tablett, med rett andel drasjering og kjerne. Dersom det var en større andel drasjering enn det burde være, går dette ut over mengde kjerne som ble veid opp. Det kan derfor tenkes at jeg i realiteten ikke veide opp en mengde tilsvarende 50 mg diklofenak. På grunn av dette, kan det derfor se ut som det ble frigjort mindre diklofenak for denne knusningsgraden.

Det at diklofenak var uløselig i syre skapte en del problemer. Uoppløste partikler fulgte med under prøvetaking, og de ble hengende igjen i filtrene når prøvene ble filtrert. Uoppløste partikler satte seg også fast i og rundt slangen som ble brukt til å ta ut prøvene med. Derfor tapte jeg nok en del diklofenak underveis, som ikke kunne kvantifiseres. En stikkprøve fra et filter som ble brukt under testen på tablettene med knusningsgrad 125 µm ble analysert ved å presse gjennom 500 ml bufferløsning. Analysen av denne prøven viste at det satt 0,82 mg diklofenak igjen i filteret. I tillegg ble nok en del diklofenak tapt som følge av at det hang seg fast på slangene. Dette kan nok ha skylden for litt av variasjonen i total mengde frigjort diklofenak.

Jeg hadde også en del problemer med at upolare hjelpestoffer ikke ble fullstendig eluert ut av kolonnen, siden jeg brukte isokratisk eluering. Dette gikk ut over effektiviteten til kolonnen, og det kan i teorien ha påvirket resultatene mine. Løsningen på problemet var at jeg brukte et mindre injeksjonsvolum, for å begrense mengde hjelpestoffer som ble injisert inn i kolonnen. I tillegg ble kolonnen skyldt godt med 95 % acetonitril mellom hvert forsøk. QC-prøver (se Vedlegg 4) ble tatt både før, under og etter hvert forsøk, og disse endret seg ikke bemerkelsesverdig. Det kan derfor se ut til at kolonnen ikke ble påvirket av hjelpestoffene under forsøkene, og at metoden skal ha vært robust nok.

5.2.3. Konsekvenser ved å knuse eller dele Diclofenac®

Årsaken til at diklofenak er formulert som enterotabletter er for å redusere gastrointestinale bivirkninger. Diklofenak er av typen NSAIDs, som er blant de mest brukte legemidlene verden over, men gastrointestinale skader er den største begrensningen når det gjelder bruk av denne klassen legemidler [11]. De gastrointestinale bivirkningene er hovedsakelig et resultat av selve virkningsmekanismen til diklofenak. Den er en COX-hemmer, og den hemmer både COX-1 og COX-2, selv om den er litt mer COX-2-selektiv. COX-1 bidrar blant annet til å beskytte mageslimhinnen ved at den syntetiserer prostaglandiner som beskytter den mot magesyre. De vedlikeholder også blodstrømmen til slimhinnen og fører til produksjon av slim og bikarbonat [10]. Gastrointestinale bivirkninger, som magesår, er derfor en systemisk bivirkning som er umulig å unngå, og en enterodrasjering vil ikke ha noen innvirkning på disse bivirkningene.

NSAIDs har også en direkte cytotoksisk effekt på cellene i mageslimhinnen, som synes å være uavhengig av COX-hemming. De er vist å inducere både nekrose og apoptose av epitelceller i mageslimhinnen [10, 16]. Dette er en lokal effekt, som faktisk kan reduseres ved å bruke enterodrasjering. Derfor kan man totalt sett redusere bivirkningene i en viss grad ved bruk av enterodrasjering, men de kan ikke elimineres fullstendig, på grunn av den systemiske effekten.

Denne studien viste at selv om enterodrasjeringen ble ødelagt ved at tablettene ble delt eller knust, ble svært lite diklofenak oppløst på grunn av dens dårlige løselighet i syre. En del av virkestoffet kommer likevel i kontakt med mageslimhinnen og kan påføre lokal skade. I denne studien ble det brukt 0,1 M HCl, som har en pH-verdi på 1. Løseligheten til diklofenak er avhengig av oppløsningsmediets pH. Selv om parietalcellene skiller ut sekret med pH på rundt 0,9, vil imidlertid ikke magesekkens pH bli så lav fordi sekretet blandes med andre sekreter, og fordi buffere i maten kan nøytralisere en del av protonene [2]. Magesekkens pH kan dermed variere fra 1,3 til 5,8, avhengig av matinntak [3]. Ofte tas en tilstrekkelig mengde vann med tablettene, og dette kan også påvirke løseligheten til diklofenak i magesekken inntil magesyren reduserer vannets pH-verdi til verdier som reduserer oppløseligheten. Derfor kan ikke resultatene fra denne studien direkte overføres til hva som vil skje med diklofenak i magesekken.

5.3. Drøfting av Somac® tabletter

5.3.1. Frigjøringsprofil for pantoprazol

Figur 20 viser frigjøringsprofilen for pantoprazol. For de hele tablettene forble enterodrasjeringen intakt de første 2 timene, så lenge tablettene var i 0,1 M HCl. Pantoprazol ble derfor ikke eksponert for det sure miljøet og man kan se at etter pH-endring ble utført etter 120 minutter, ble all pantoprazol frigjort. Drasjeringen rundt Somac-tablettene virket å være veldig syreressistent. Selv etter pH-endring var den fremdeles intakt etter 10 minutter, basert på visuell observasjon, samt at det heller ikke ble detektert noe pantoprazol ved dette tidspunktet. Først etter 20 minutter (tid 140 minutter) var frigjøringen startet. Fordi pantoprazol ikke ble eksponert for saltsyren, ble det heller ikke nedbrutt, noe som kan sees ved at all pantoprazol ble frigjort i fosfatbufferen.

For de knuste og delte tablettene derimot, viser ikke figuren en reel frigjøring av pantoprazol. Her eksponeres pantoprazol for et surt miljø som fører til at det brytes ned. For disse tablettene er det derfor et resultat av både frigjøring fra tablettene samt nedbrytning av pantoprazol. Nedbrytningen synes å skje relativt raskt. For de knuste tablettene er det etter 5 minutter bare 29,2 % igjen av pantoprazol, tilsvarende 5,8 mg av totalt 20 mg (se Tabell 16 i Vedlegg 3). Det betyr ikke at 70,8 % av pantoprazol er nedbrutt, da alt virkestoffet nødvendigvis ikke er frigjort ved dette tidspunktet. I løpet av de to første timene reduseres mengden pantoprazol gradvis fra 5,8 mg til 0,6 mg (omregnet fra Tabell 16 i Vedlegg 3). Etter pH-endring forblir mengden pantoprazol relativt konstant på 0,6 mg den resterende timen. Dette er fordi den syrekatalyserte degraderingen av pantoprazol opphører. Det at mengde pantoprazol ikke øker etter pH-endringen tyder også på at all pantoprazol allerede er frigjort. Dersom ikke all pantoprazol var frigjort på dette tidspunktet, ville det ha skjedd en økning i mengde frigjort pantoprazol som følge av at det da ikke ville blitt nedbrutt i fosfatbufferen. Det betyr at det av en knust tablett som inneholder 20 mg pantoprazol, kun gjenstår 0,6 mg igjen etter 2 timer i 0,1 M HCl.

For de delte tablettene skjer det en liten økning i frigjort mengde, fra 6,3 % (1,3 mg) etter 5 minutter til 10,1 % (2 mg) etter 30 minutter (se Tabell 16 i Vedlegg 3). Dette tyder på at det da skjer mer frigjøring av pantoprazol enn nedbrytning. Deretter reduseres mengden gradvis fra 2 mg til 0,7 mg etter 120 minutter. Etter pH-endring forblir mengden pantoprazol relativt konstant på 0,7 mg den resterende timen. I likhet med de knuste tablettene tyder dette også på at all pantoprazol ble frigjort de to første timene i saltsyren. Det betyr at det av en delt tablett

som inneholder 20 mg pantoprazol, kun gjenstår 0,7 mg igjen etter 2 timer i 0,1 M HCl. Det synes derfor ikke å være en stor forskjell på om man knuser eller deler Somac®. Etter 2 timer i 0,1 M saltsyre vil omtrent like mye pantoprazol degraderes, og det er derfor svært viktig at disse tablettene svelges hele. Hvis tablettene ikke tas hele kan det få alvorlige konsekvenser for pasientene, da det kan medføre en økt risiko for magesår og gastrointestinale blødninger, som i verste fall kan være fatale.

Som beskrevet tidligere, vil ikke pH i magesekken være så lav som 1. Degradering av pantoprazol har en direkte sammenheng med pH, og vil derfor være avhengig av den aktuelle pH i magesekken, samt oppholdstid [18]. Partikler som er mindre enn 3-4 mm kan enkelt passere pylorus og en knust tablett vil derfor sannsynligvis ha en kortere oppholdstid i magesekken enn en hel eller delt tablett [3].

5.3.2. Degraderingsprofiler for pantoprazol

Av Figur 20 kommer ikke forskjellen i degradering mellom de delte og knuste tablettene godt frem, da man ikke vet hvor mye pantoprazol som faktisk er frigjort over tid. Derfor var det interessant å se på selve degraderingsprofilen for de ulike tablettene, for å se i hvilken grad de ulike metabolittene ble dannet. For å kunne tolke formasjonen av metabolittene til pantoprazol, måtte de ulike toppene i Figur 18 identifiseres i forhold til degraderingsmønsteret i Figur 6.

Figur 21-23 viser degraderingsprofilene for de knuste, delte og hele tablettene. Det var ikke mulig å kvantifisere de ulike metabolittene da jeg ikke hadde noe standardkurve for disse. Opprinnelig var planen kun å kvantifisere pantoprazol. Derfor var det ikke noe hensikt i å oppnå fullstendig baseline separasjon av metabolittene. I ettertid var det likevel interessant å se på formasjonen av metabolittene, spesielt for å se på forskjell i nedbrytning mellom de delte og knuste tablettene, da dette ikke kom godt frem i figur 20.

Selv om det ikke var fullstendig baseline separasjon mellom metabolittene, kan det sees av Figur 18 at de er noenlunde separert. Derfor ble de manuelt integrert slik at jeg kunne lage et diagram basert på areal for å få et overblikk over degraderingsmønsteret. Hadde dette vært planen helt fra starten av, hadde jeg forsøkt å separere alle toppene fra hverandre slik at arealene hadde blitt helt nøyaktig. Men det gir likevel en pekepinn på hva som skjer med pantoprazol når det kommer i kontakt med det sure miljøet. Arealene i seg selv har ingen betydning uten standardkurver, men det viser likevel hvordan metabolittene formeres.

Basert på retensjonstid, polaritet og degraderingsprofil ble det forsøkt å identifisere hvilke metabolitter som tilhørte de ulike toppene i kromatogrammene. Dimeren er en stabil metabolitt og har en dobbel så stor molekylvekt som de andre metabolittene. Selv om den er ionisert, vil den store molekylvekten påvirke retensjonstiden i stor grad. Det ble derfor antatt at den siste toppen i kromatogrammet, med retensjonstid på 4.67, var dimeren. Av Figur 21 kan det sees at den dannes relativt seint i forhold til de andre metabolittene og det styrker derfor teorien om at dette faktisk er dimeren. Toppen med retensjonstid 2,87 er som kjent pantoprazol, dette bekreftes ved at en ren prøve av pantoprazol, uten degraderingsprodukter, elueres ut etter 2,87 minutter.

Dihydrobenzimidazol, sulfensyre og sulfenamid har alle, i motsetning til pantoprazol, en positiv ladning på pyridinringen. Det er derfor logisk å tenke at disse vil elueres ut før pantoprazol på en omvendt-fase kolonne. I Figur 18 kan det sees at det er tre stoffer som elueres ut før pantoprazol, med retensjonstid 1,46, 1,83 og 2,01. Det er derfor naturlig å anta at disse toppene tilhører disse tre metabolittene. Den første toppen med retensjonstid 1,28 er kun løsemiddelpluggen, og er ikke noen metabolitt. Av de tre metabolittene er sulfenamid den som er mest stabil og minst polar. Derfor ble det antatt at toppen med retensjonstid 2,01 er sulfenamid, på grunn av polariteten. Dette stemmer godt overens med Figur 21, da det ser ut til at denne holder seg stabil lengre enn de to andre metabolittene.

Å bestemme hvilke av de to gjenværende toppene som tilhørte dihydrobenzimidazol og sulfensyre var litt mer utfordrende. Av Figur 21 kan det sees at begge disse dannes relativt raskt, men at mengden av metabolitten med retensjonstid 1.46 reduseres raskere enn den med retensjonstid 1,83. Når pH endres etter 120 minutter derimot, avbrytes den syrekatalyserte nedbrytningen av pantoprazol. Etter 120 minutter forsvinner også så å si all mengde av metabolitten med retensjonstid 1,46. Det kan derfor være sannsynlig at det er denne som er dihydrobenzimidazol, da pH-endringen fører til at det ikke dannes mer av denne. Etter 120 minutter dannes det fortsatt mer av dimeren, som fortsetter å øke gradvis. Denne dannes av sulfensyre og sulfenamid. Hvis metabolitten med retensjonstid 1,46 hadde vært sulfensyre, ville det ikke vært mer igjen av den etter 120 minutter. Da kunne det heller ikke blitt dannet mer dimer, hvilket det likevel gjør. Det er derfor mer sannsynlig at metabolitten med retensjonstid 1,83 er sulfensyre, da denne reduseres gradvis, i takt med at dimeren øker gradvis, selv etter pH-endring.

Figur 23 viser degraderingsprofilen for de hele tablettene. Den viser ingen metabolitter, da tablettene forble intakt i 0,1 M HCl. Pantoprazol ble derfor ikke eksponert for det sure miljøet, og det skjedde derfor ingen degradering.

Figur 21 og 22 viser degraderingsprofilene for de knuste og delte tablettene. For de knuste tablettene synes degraderingsprosessen å være godt i gang allerede etter 5 minutter. Dette er fordi pantoprazol umiddelbart kommer i kontakt med saltsyren. Det kommer tydelig frem i Figur 22 at pantoprazol frigjøres saktere fra de delte tablettene enn de knuste. Etter 5 minutter kan det sees at degraderingsprosessen er i gang, men at det på dette tidspunktet er dannet mye mindre metabolitter enn for de knuste tablettene. Deretter øker dannelsen av metabolitter, sannsynligvis i takt med at pantoprazol frigis fra tablettene. Etter pH-endring, fra 120 minutter og utover synes profilene for begge tablettene å være noenlunde like. Dette virker å stemme godt overens med det som kom frem av Figur 20, at det etter 120 minutter er nedbrutt like mye pantoprazol fra både de knuste og de delte tablettene.

Degraderingsprofilene i dette forsøket virker å stemme godt overens med degraderingsmønsteret for protonpumpehemmere vist i Figur 6. Det ser ut til at dihydrobenzimidazol dannes raskt i større mengder. Deretter øker mengden sulfensyre, før den gradvis reduseres, i takt med at mengden sulfenamid og dimer øker. Dette er fordi sulfensyre omdannes til sulfenamid, og sulfensyre og sulfenamid går så sammen og danner dimeren. Dette gir også en god beskrivelse over selve virkningsmekanismen til pantoprazol inne i parietalcellene. Pantoprazol akkumuleres inne i parietalcellenes sure miljø, hvor det protoneres og blir kjemisk forvandlet til sulfenamid, den aktive inhibitoren [17, 23]. Det dannes så disulfid-bindinger mellom sulfenamid og SH-grupper på protonpumpen, som fører til hemming av denne. Det er det samme som skjer når sulfensyre og sulfenamid går sammen og danner dimeren.

5.3.3. Begrensninger til metoden

UV-deteksjon av protonpumpehemmere og deres degraderingsprodukter alene, gir dårlig sensitivitet, da selve kjernen i den molekylære strukturen hovedsakelig inneholder det samme kromofore systemet. Derfor er man nødt til å bruke HPLC for å separere stoffene i forkant av UV-deteksjon.

I validering av HPLC-metoden mangler det bestemmelse av deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense. Dette burde absolutt vært med, men jeg fikk ikke ut noe estimat på

HPLC-instrumentet. Jeg er usikker på hvorfor, men mulig kan det ha noe med den relativt høye løsemiddelpluggen eller på grunn av den driftende baselinen. Da jeg ikke kom noen vei, måtte forsøkene dessverre gjennomføres uten dette. Da det ikke var noe problem med løselighet i dette forsøket var det heller ikke slik at det oppstod svært lave konsentrasjoner, slik det gjorde for diklofenak. Derfor så jeg ikke på den manglende kvantifiseringsgrensen som særlig kritisk. Sett bort fra dette, synes jeg metoden min fungerte veldig bra, og den holdt seg stabil gjennom alle forsøkene. Det er et litt stort spenn på kalibreringskurven, med en faktor på 1000, men jeg fikk en R^2 på 1, og ved å studere kalibreringskurven nøye lå selv alle punktene i det laveste sjiktet på linjen.

I Excel-behandlingen av data regner man mengde frigjort over tid. I tillegg til å måle den aktuelle konsentrasjonen ved et tidspunkt, så legger man også på den mengden som blir tatt ut ved hvert uttak. I dette tilfelle fører det til en viss unøyaktighet. Jeg la på mengden pantoprazol som ble tatt ut for hvert uttak, men problemet er at hvis denne mengden ikke hadde blitt tatt ut, ville den sannsynligvis blitt nedbrutt. Det å ikke ta med denne mengden ville også ført til unøyaktigheter, da man ikke kan si at alt som ble tatt ut ville blitt fullstendig nedbrutt. Derfor vil det uansett, med en slik invasiv metode, føre til en viss usikkerhet i dette tilfellet.

5.4. Begrensninger til dissolution-metoden

Alle offisielle dissolution-metoder brukt for å karakterisere frigjøring fra preparater med modifisert-frisetting er basert på apparater med enkle vandige oppløsningsmedier. Så selv om de er nyttige for kvalitetskontroller, så reflekterer de ikke mange av aspektene ved gastrointestinal fysiologi [3].

Padleapparatet som ble brukt i denne studien brukes blant annet til kvalitetskontroll. Det har et enkelt design, og av den grunn mangler det ellers en likhet med gastrointestinaltrakten. Dette er en ulempe dersom man skal prøve å simulere in-vivo gastrointestinale tilstander. I tillegg brukes det ofte ufysiologiske store volum, inntil 1000 ml, og hydrodynamikken er ofte ikke fysiologisk relevant. Når man har et slikt enkompartiment system og endrer pH underveis, vil det påvirke hele mediet umiddelbart, mens i virkeligheten vil endringen skje progressivt og er avhengig av overføringshastigheten fra mage til tarm [34].

I denne studien er det ikke gjort noe forsøk på å reflektere de fysiologiske tilstandene i mage-tarm kanalen, og det er derfor ikke mulig å predikere den eksakte frigjøringsprofilen in-vivo. For å få et bedre bilde av in-vivo karakteristikk må man tenke på blant annet pH, osmolalitet, ionestyrke, viskositet, overflatespenning, volum, motilitetsmønster, passasjetid og påvirkning av matinntak. De siste årene er det utviklet biorelevante media som for eksempel FaSSGF (fasted-state simulated gastric fluid), FeSSIF (fed-state simulated intestinal fluid) og mange flere, som på en bedre måte simulerer forholdene i mage og tarm både før og etter måltid [3].

6. KONKLUSJON

Knusing og deling av Diclofenac® synes ikke å ha noen stor effekt på frigjøringsprofilen til diklofenak. Dette skyldes diklofenaks dårlige løselighet i 0,1 M HCl, og oppløsningshastigheten er derfor løselighetsbegrenset i dette tilfelle. Ved endring av oppløsningsmediet, til mer nøytrale verdier, synes oppløsningshastigheten å øke med redusert partikkelstørrelse. Etter 3 timer synes ikke all diklofenak å være frigjort, men dette skyldes sannsynligvis begrensninger til metoden som ble brukt. Når enterodrasjeringen brytes vil diklofenak kunne påføre lokale skader i magesekken, da NSAIDs har en direkte cytotoxisk effekt på cellene i mageslimhinnen, i tillegg til dens systemiske bivirkninger.

Knusing og deling av Somac® viser seg å ha en stor effekt på frigjøringsprofilen til pantoprazol. Når enterodrasjeringen brytes vil pantoprazol degraderes i 0,1 M HCl. Etter 2 timer i saltsyren gjenstår det bare 0,6 mg av en 20 mg knust tablett, og 0,7 mg av en 20 mg delt tablett. Det er derfor svært viktig at disse tablettene svelges hele. Degradering av pantoprazol er pH-avhengig og vil være avhengig av pH i magesekken og oppholdstid. Degraderingsmønsteret som ble observert for pantoprazol i denne studien synes å stemme overens med degraderingsmønsteret som er beskrevet i litteraturen.

Det er viktig at de som har ansvaret for utlevering av legemidler i eldreomsorgen er klar over hvilke konsekvenser det kan medføre hvis man knuser disse. Resultatene fra denne studien kan være med på å gi sykepleiere et overblikk over de vanligste konsekvensene som kan oppstå når man knuser enterotabletter. Spesielt vil resultatene fra forsøket med pantoprazol illustrere en svært alvorlig konsekvens, nemlig at ved å knuse eller dele en tablett, blir nærmest alt virkestoffet nedbrutt. Dette kan få alvorlige konsekvenser for pasienter, da det kan medføre en økt risiko for magesår og gastrointestinale blødninger, som i verste fall kan være fatale.

7. REFERANSER

1. Wannebo, W., *Tablettknusing i sykehjem*. Forskning, 2009. **1**(4): p. 6-15.
2. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 2 ed. 2014: Gyldendal Norsk Forlag AS.
3. Abrahamsson, B., et al., *Oral Drug Absorption, Prediction and Assessment*. 2 ed. Vol. 193. 2010: Informa Healthcare USA, Inc.
4. Aulton, M.E., et al., *Aulton's Pharmaceutics. The design and manufacture of medicines*. 3 ed. 2007: Churchill Livingstone Elsevier.
5. Miller, D.A., et al., *Evaluation of the USP dissolution test method A for enteric-coated articles by planar laser-induced fluorescence*. Int J Pharm, 2007. **330**(1-2): p. 61-72.
6. *Statens Legemiddelverk. Preparatomtale Diklofenak 50 mg enterotabletter (SPC)*. Available from: <http://legemiddelverket.no/layouts/Preparatomtaler/Spc/1999-02268.pdf?id=28032014092118>.
7. Nasir, F., et al., *Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. **879**(30): p. 3434-43.
8. Garbacz, G. and W. Weitschies, *Investigation of dissolution behavior of diclofenac sodium extended release formulations under standard and biorelevant test conditions*. Drug Dev Ind Pharm, 2010. **36**(5): p. 518-30.
9. Chuasuwan, B., et al., *Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium*. J Pharm Sci, 2009. **98**(4): p. 1206-19.
10. Sinha, M., et al., *Current perspectives in NSAID-induced gastropathy*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 258209.
11. Coxib, et al., *Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2013. **382**(9894): p. 769-79.
12. *Nye anbefalinger for diklofenak*. 2013; Available from: <http://legemiddelverket.no/Nyheter/Bivirkninger/Sider/Nye-anbefalinger-for-diklofenak.aspx>.
13. Wallace, J.L., *NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(1): p. 67-74.

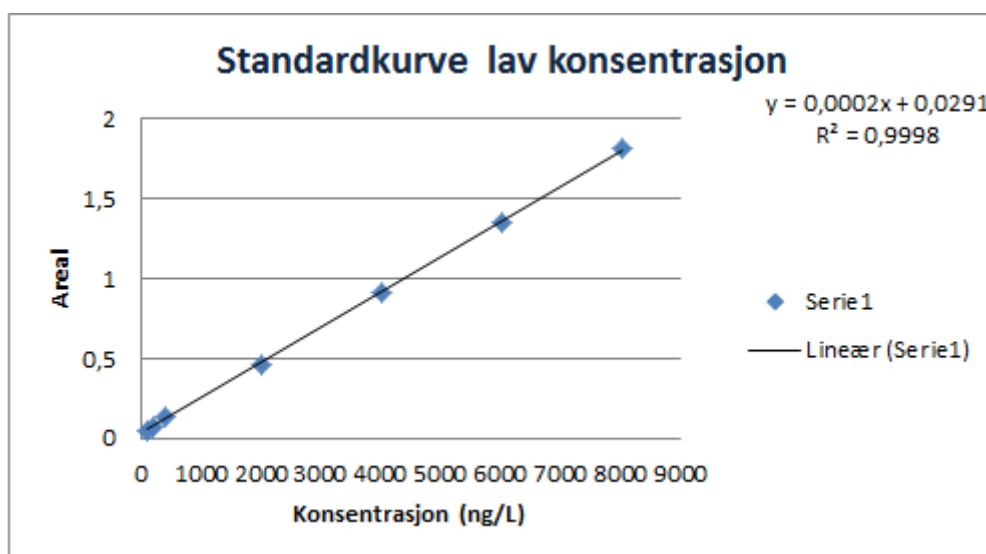
14. Laine, L., et al., *Risk factors for NSAID-associated upper GI clinical events in a long-term prospective study of 34 701 arthritis patients*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **32**(10): p. 1240-8.
15. *Norsk legemiddelhåndbok. L17.1.1 Ikke-steroid antiinflammatoriske midler*. 2013 [cited 2014 02.11.]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/74761?expand=1>.
16. Bastaki, S.M. and J.L. Wallace, *Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy: clues to preventative therapy*. *Can J Gastroenterol*, 1999. **13**(2): p. 123-7.
17. *Statens Legemiddelverk. Preparatomtale Somac 20 mg enterotabletter (SPC)*. Available from: http://slv.no/_layouts/Preparatomtaler/Spc/1999-04148.pdf.
18. Tutunji, M.F., et al., *An in vitro investigation on acid catalyzed reactions of proton pump inhibitors in the absence of an electrophile*. *Int J Pharm*, 2006. **323**(1-2): p. 110-6.
19. Bharathi, D.V., et al., *Simultaneous estimation of four proton pump inhibitors-- lansoprazole, omeprazole, pantoprazole and rabeprazole: development of a novel generic HPLC-UV method and its application to clinical pharmacokinetic study*. *Biomed Chromatogr*, 2009. **23**(7): p. 732-9.
20. Sachs, G., J.M. Shin, and C.W. Howden, *Review article: the clinical pharmacology of proton pump inhibitors*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23 Suppl 2**: p. 2-8.
21. Ramakrishna, N.V., et al., *High-performance liquid chromatography method for the quantification of pantoprazole in human plasma*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005. **822**(1-2): p. 326-9.
22. Kromer, W., et al., *Differences in pH-dependent activation rates of substituted benzimidazoles and biological in vitro correlates*. *Pharmacology*, 1998. **56**(2): p. 57-70.
23. Tutunji, M.F., et al., *Reactions of sulfenic acid with 2-mercaptoethanol: a mechanism for the inhibition of gastric (H⁺-K⁺)-adenosine triphosphatase by omeprazole*. *J Pharm Sci*, 2007. **96**(1): p. 196-208.
24. El-Sherif, Z.A., et al., *Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the determination of lansoprazole, omeprazole and pantoprazole sodium sesquihydrate in presence of their Acid-induced degradation products*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006. **54**(6): p. 814-8.
25. Qaisi, A.M., M.F. Tutunji, and L.F. Tutunji, *Acid decomposition of omeprazole in the absence of thiol: a differential pulse polarographic study at the static mercury drop electrode (SMDE)*. *J Pharm Sci*, 2006. **95**(2): p. 384-91.

26. *European Pharmacopoeia 8.0*. 2013: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM).
27. Shargel, L., S. Wu-Pong, and A. B.C. Yu, *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 5 ed. 2005: The McGraw-Hill Companies.
28. Hansen, S.H., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. 2012: John Wiley & Sons Ltd.
29. Wahbi, A.A., et al., *Spectrophotometric determination of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole in pharmaceutical formulations*. J Pharm Biomed Anal, 2002. **30**(4): p. 1133-42.
30. *US Pharmacopeia: Diclofenac Sodium Delayed-Release Tablets*. 2006, The United States Pharmacopeial Convention.
31. *US Pharmacopeia: Pantoprazole Sodium Delayed-Release Tablets*. 2009: The United States Pharmacopeial Convention.
32. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 1994: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
33. Kirkevold, Ø. and K. Engedal, *Legemiddelhåndtering i norske sykehjem med fokus på knusing av medikamenter*. Forskning, 2010. **1**(5): p. 16-25.
34. Culen, M., et al., *Designing a dynamic dissolution method: a review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine*. J Pharm Sci, 2013. **102**(9): p. 2995-3017.

VEDLEGG 1

Tabell 11. Standardkurve for diklofenak, brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i surt miljø.

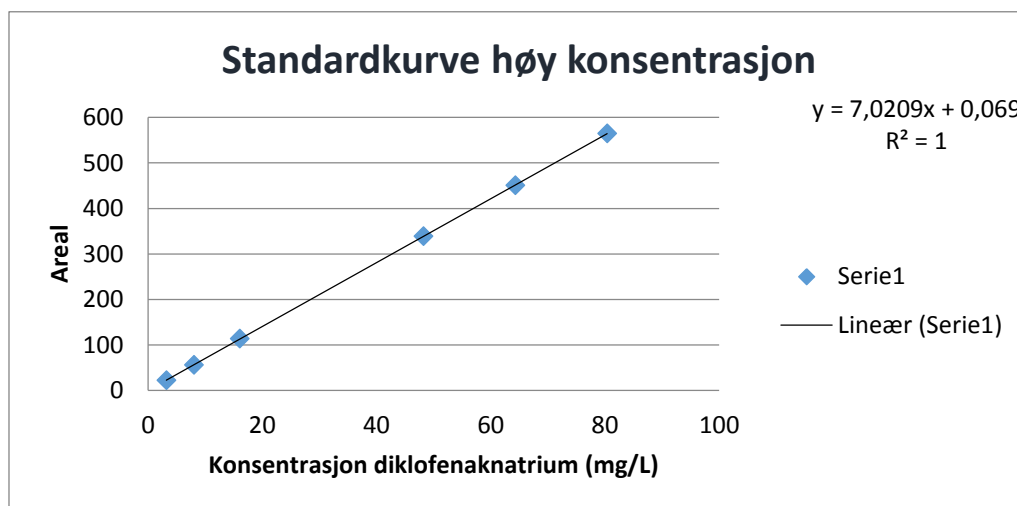
Konsentrasjon	120,6	201	402	2010	4020	6030	8040
	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)
Areal diklofenak	0,051509	0,073621	0,13654	045875	0,91691	1,355	1,816



Figur 24. Standardkurve for diklofenak, brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i surt miljø.

Tabell 12. Standardkurve for diklofenak, brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i nøytralt miljø.

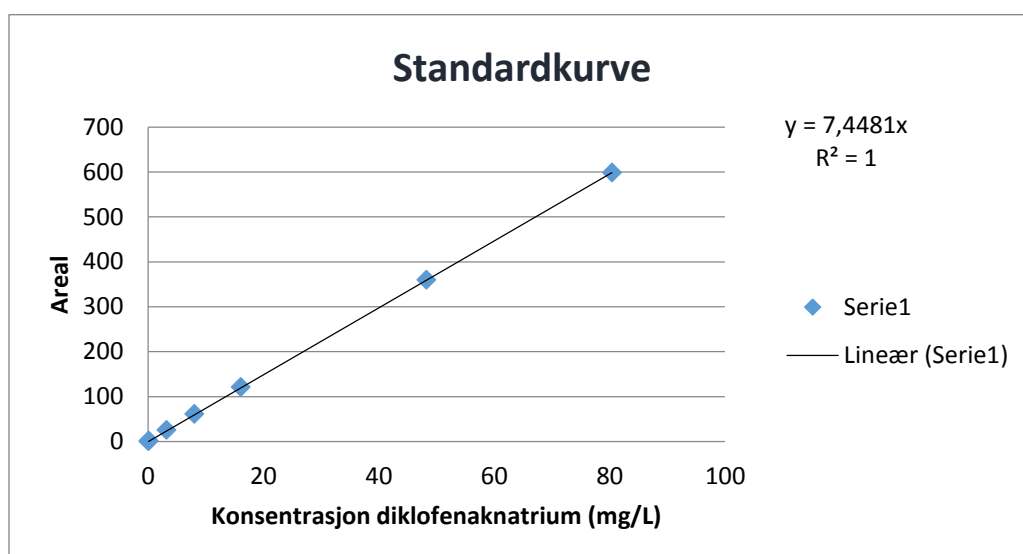
Konsentrasjon	3,216	8,04	16,08	48,24	64,32	80,40
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Areal diklofenak	22,343	55,904	113,96	339,18	451,06	564,65



Figur 25. Standardkurve for diklofenak, brukt på hele og delte tabletter for de prøvene som ble tatt ut i nøytralt miljø.

Tabell 13. Standardkurve for diklofenak, brukt på knuste tabletter.

Konsentrasjon	0,03216	0,1608	3,216	8,04	16,08	48,24	80,40
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Areal diklofenak	0,26922	1,203	25,32	60,638	120,99	359,64	598,25

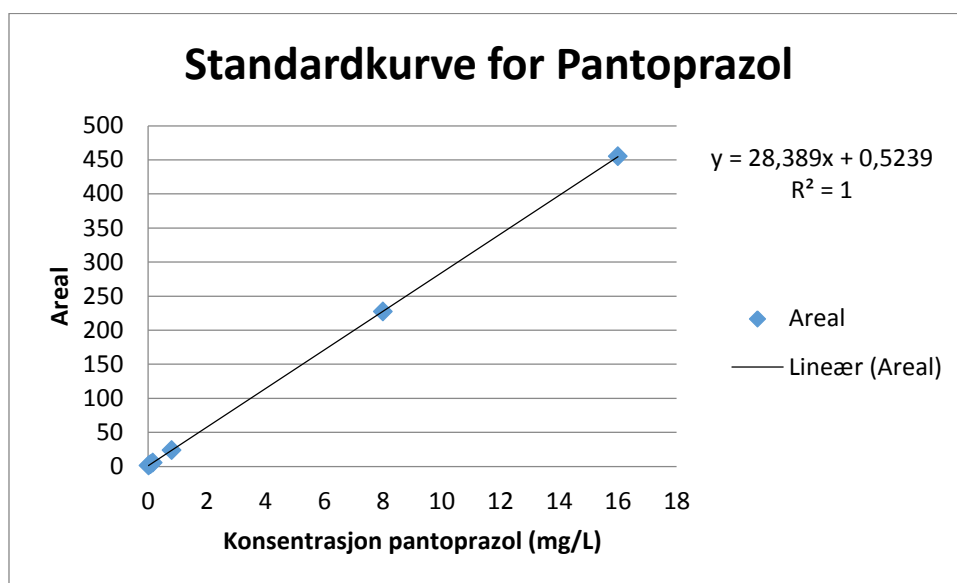


Figur 26. Standardkurve for diklofenak, brukt på knuste tabletter.

VEDLEGG 2

Tabell 14. Standardkurve for pantoprazol

Konsentrasjon	0,016 (mg/L)	0,08 (mg/L)	0,16 (mg/L)	0,8 (mg/L)	8 (mg/L)	16 (mg/L)
Areal pantoprazol	1,01	3,062	5,086	23,28	226,92	455,11



Figur 27. Standardkurve for pantoprazol.

VEDLEGG 3

Tabell 15. Prosent frigjort diklofenak fra hele, delte og knuste tabletter.

Tid (min)	Hele tabletter %	Delte tabletter %	Knuste tabletter 1.4 mm %	Knuste tabletter 125 µm %
5	0	0,01	0,20	0,09
15	0	0,12	0,96	0,76
30	0	0,37	2,33	2,23
60	0	0,57	3,07	3,28
70	35,23	67,37	71,26	88,18
80	81,18	83,12	78,27	90,55
100	89,97	94,35	80,03	90,61
120	91,31	94,64	80,83	90,43
150	92,40	94,50	81,89	90,62
180	93,10	94,79	82,16	91,40

Tabell 16. Prosent frigjort pantoprazol fra hele, delte og knuste tabletter.

Tid (min) %	Hele tabletter %	Delte tabletter %	Knuste tabletter %
5	0	6,33	29,20
15	0	9,60	10,60
30	0	10,08	6,94
60	0	6,58	4,86
90	0	4,68	3,80
120	0	3,56	3,18
130	0	3,58	3,25
140	52,31	3,57	3,21
160	103,37	3,64	3,23
180	104,13	3,65	3,36

VEDLEGG 4

Tabell 17. QC-prøver kjørt under forsøkene for diklofenak hele, delte og knuste tabletter.

Hele tabletter		Delte tabletter		Knuste tabletter 1.4 mm		Knuste tabletter 125 µm	
Kjent	Målt	Kjent	Målt	Kjent	Målt	Kjent	Målt
Før test	(mg/L)	Før test	(mg/L)	Før test	(mg/L)	Før test	(mg/L)
0,0001212	0,0001761	0,0001206	0,0001578	0,03216	0,03769	0,03216	0,03520
0,00202	0,00272	0,00201	0,00205	3,216	3,376	3,216	3,466
0,00808	0,00833	0,00804	0,00807	48,24	48,26	48,24	48,40
3,216	3,39	3,216	3,37				
48,24	48,46	48,24	48,45				
80,4	80,41	80,4	80,20				
Midt i		Midt i		Midt i		Midt i	
48,24	48,48	48,24	48,43	48,24	48,36	48,24	48,44
Etter		Etter		Etter		Etter	
48,24	48,60	48,24	48,42	48,24	48,60	48,24	48,52

Tabell 18. QC-prøver kjørt under forsøkene for pantoprazol hele, delte og knuste tabletter.

Hele tabletter		Delte tabletter		Knuste tabletter	
Kjent	Målt	Kjent	Målt	Kjent	Målt
Før test	(mg/L)	Før test	(mg/L)	Før test	(mg/L)
0,08	0,088	0,08	0,088	0,08	0,085
0,8	0,796	0,8	0,809	0,8	0,79
8	7,92	8	7,92	8	7,9
Midt i		Midt i		Midt i	
0,08	0,084	0,08	0,084	0,08	0,084
0,8	0,799	0,8	0,803	0,8	0,804
8	7,99	8	7,96	8	7,92
Etter		Etter		Etter	
0,08	0,078	0,08	0,076	8	0,084
0,8	0,814	0,8	0,803	0,8	0,806
8	8,04	8	8	8	7,97