

TRANSPORTFOLYAMATOK IN VITRO VIZSGÁLATA. I. FELSZÍVÓDÁS MODELLEZÉSE HÁROMFÁZISÚ FOLYADÉKHÍD RENDSZERBEN

Kincses Ajtay Mária*, Ferencz L. **, Balázs J.*, Ilie Adriana

Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem

*Toxicológia Tanszék, ** Gyógyszeripar Tanszék

Extravaszkuláris gyógyszerbevitel esetén az oldott hatóanyag felszívódása az első lépés az ADME rendszerben összefoglalt farmakokinetikai folyamatok sorában. A felszívódás membrántranszport révén, azaz adott fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező biológiai membránon történő áthaladás (penetráció) eredményeként valósul meg.

Gyógyszerformulálási szempontból hasznos információt jelent a feldolgozandó farmakon in vitro transzportkinetikai sajátosságának ismerete. Ezek az eredmények in vivo kísérletekkel jól korrelálhatók.

A felszívódóképesség megítélése in vitro a megoszlási tulajdonságok vizsgálata alapján történhet különböző modelltipusokban. Ismeretesek a statikus modellek, melyek a farmakon víz és szerves fázis között kialakuló megoszlási hányadosának mérésén alapulnak, valamint a kinetikus transzportmodellek, melyek az abszorpciót két vizes fázis közé iktatott membrán segítségével vizsgálják. Membránként szolgálhatnak apoláris, vízzel nem elegyedő oldószerek (folyadékhíd modell), mesterségesen előállított impregnált lipid membránok, illetve természetes membránok (pl. izolált vékonybél) (1, 2, 3, 4).

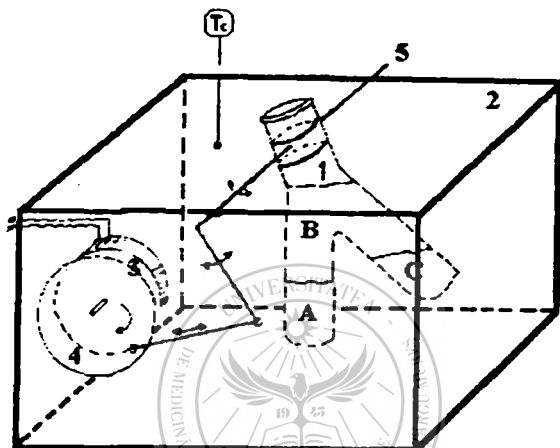
Membrántranszport vizsgálata céljából a Doluisio és Swintosky (1) által javasolt három folyadékteres folyadékhíd modell elvén alapuló módszert dolgoztuk ki, mely jól reprodukálható eredményei következtében mindeztidáig a leggyakrabban használt és leginkább elismert megoldás a szakirodalomban (5).

Kísérleteinkben a szalicilsav és származékainak (nátriumszalicilát, szalicilamid, acetilszalicilsav) transzportját vizsgáltuk megfelelő lipid barnereken keresztül, az erre a célra megtervezett és megépített három folyadékteres modellkészülékben.

A módszer leírása

A felszívódási folyamat in vitro szimulálására alkalmazott megoszláson alapuló készülékek a nem ionos, passzív diffúzió elvét követik, mely szerint az átmenet a külső szakaszból (A rekesz) a belsőbe (C rekesz) egy lipid membrán (B rekesz) legyórást teszi szűkegessé. A folyadékhíd modellekben, a lipid membránt vízzel nem elegyedő oldószér képvíseli.

A készülék központi része egy speciális fordított Y alakú üvegedény, melynek két szárából kiképzett A és C rekeszek gyomor- illetve plazmafolyadéknek megfelelő pH-jú, 25-25 ml térfogatú puffer oldatot tartalmaznak. A két vizes fázist 45 ml szerves oldószerrel felülrétegezzük, mely folytonos membránként szolgál (B rekesz). A tengelyre felfüggesztett edényt egy motor segítségével percnként 10 billenő-bólogató mozgással rázogatójuk. A rendszer 37°C-on tartosztatott (1. ábra).



1. ábra: Három fázisú folyadékmodell.

1= Y alakú edény; 2= termosztatált vízfürdő; 3= motor; 4= mozgatókar,
5= forgástengely; T_c = hőmérő; A,B,C= rekeszek

A vizes fázisok megfelelő pH-ját tompító oldatok segítségével biztosítottuk. Az 1,4 pH-jú tampon oldat 52,6 ml 0,2 M-os KCl oldat és 47,4 ml 0,2 M-os sósav oldat keveréke (A rekesz). A 7,4 pH-jú tompító oldat összetétele: 2,28 g NaH_2PO_4 és 4,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 liter deszillált vízben feloldva (C rekesz).

Folyadék membránként (B rekesz) szénhidrogéneket (benzol, n-hexán, n-heptán, ciklohexán) vagy alkoholt (n-oktanol) használtunk.

A farmakonokat az A rekeszbe juttattuk. Erre a célra $7 \cdot 10^{-3}$ mólos alapoldatokat alkalmaztunk.

A transzport folyamatot a hatóanyag bevitelétől számított 180 perces időintervallumban követtük; a vizsgálati mintákat 30' percnként vettük ki az A és C rekeszekből. A B rekeszben a koncentrációt a megfelelő értékek kivonásával számítottuk ki.

A próbák hatóanyagtartalmát spektrofotometriásan mértük, U.V. tartományban 229 nm, ill. 300 nm-nél, Spektronom 195 D készülékben, 1 cm-es kvarc küvettában.

A kalibrációs görbék egyenleteit az 1. táblázatban adtuk meg.

1. táblázat

Anyag	Egyenlet	r	n
Szalicilsav	$C = 41,494 E$	0,999999	4
Natrium szalicilát pH = 1,4	$C = 51,949 E + 0,728$	0,999960	4
Szalicilamid pH = 1,4	$C = 44,501 E - 0,356$	0,999998	4
Acetilszalicilsav pH = 1,4	$C = 25,383 E + 2,011$	0,999700	4

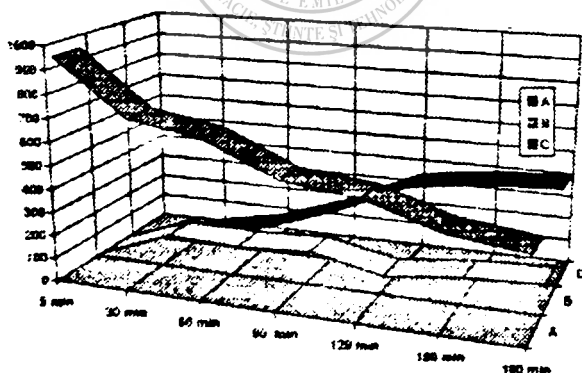
r = korrelációs együttható

n = mérések száma

Eredmények, értékelés

A szalicilsav időbeni koncentráció változását különböző folyadék membránokat alkalmazva a 2. táblázatban tüntettük fel. Vizsgáltuk a farmakonok kémiai szerkezete és a transzportfolyamatok összefüggését. E célból a szalicilsav származékainak átvitelét követtük, lipid-barrierként benzolt alkalmazva. A mérések eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Szemléltetésképpen grafikusán ábrázoltuk a szalicilsav transzportját az A, B, C rekeszekben (membrán: benzol, $t = 37^{\circ}\text{C}$). (2. abra).



2. ábra: A három fázis koncentrációváltozása (µg/l-ben) szalicilsavra benzol-membrán esetében 37°C -on

2. táblázat: Szalicilsav transzportja folyadékhíd modellben

Idő perc	n-hexán		n-heptán		ciklohexán		n-oktanol	
	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml
0	936,10	-	926,16	-	920,51	-	888,90	-
30	779,25	21,10	826,56	17,55	842,74	9,75	224,50	9,17
60	736,93	79,64	768,05	98,34	782,99	53,52	134,44	43,56
90	680,90	144,40	755,60	121,90	719,50	65,97	79,67	54,64
120	663,49	211,62	719,50	189,90	670,95	88,38	56,01	87,18
150	656,02	220,30	665,97	218,37	641,08	110,78	151,86	245,23
180	622,41	270,12	583,82	239,00	588,80	145,64	173,03	160,58

Folyadékmembránok: n-hexán, n-heptán, ciklohexán, n-oktanol; Hőmérséklet: 37°C; Rekeszek: A, C

3. táblázat: Szalicilsav és származékainak transzportja folyadékhíd modellben

Idő perc	Szalicilsav		Nátriumszalicilát		Szalicilamid		Acetil-szalicilsav	
	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml	A µg/ml	C µg/ml
0	944,88	-	1109,1	-	787,66	-	1205,02	-
30	713,28	23,03	659,25	126,25	476,60	19,62	938,50	103,73
60	662,24	92,11	500,29	216,65	374,48	49,39	796,86	190,54
90	521,63	202,90	462,88	356,91	328,42	93,45	639,99	306,29
120	487,97	351,40	370,93	455,09	300,38	121,48	557,75	348,95
150	383,40	393,36	296,13	545,48	278,03	169,55	553,18	394,62
180	343,58	408,30	247,83	676,39	276,00	190,91	432,87	463,92

Folyadékmembrán: benzol; Hőmérséklet: 37°C; Rekeszek: A, C

A farmakontranszportot a folyadékfázis modellben a következő folyamat írja le:



A szalicilsav behatolása az A rekeszből a B rekeszbe oldószertipustól függően változik, ugyanígy különböző sebességgel történik a B rekeszből a C rekeszbe való kilépés is. A szénhidrogén csoportba tartozó 4 oldószer esetében, az első folyamat (A→B) sebessége a következő sorrendben csökken:

benzol > ciklohexán > n-heptán > n-hexán

Az n-oktanol a membrántranszport szempontjából eltérő viselkedést mutat, mivel itt a farmakon penetrációja az első rekeszből a másodikba (A→B) az előzőekben tárgyalt oldószerekhez képest lényegesen gyorsabban megy végbe. A három órás mérési időtartam végére az n-oktanol-membránt tartalmazó rendszerben a szalicilsav kezdeti mennyiségének több mint 80%-a hagyta el az A kompartmentet, míg benzol esetében a farmakon 65%-a; a hexánnál mindössze 33%-a diffundált ki.

Ezzel szemben a második folyamat (B→C) az n-oktanol/víz rendszerben a lelassabb. A kilépés sebességének sorrendje:

n-oktanol < benzol < hexán

Mindez azzal magyarázható, hogy a szalicilsav oldékonysága a membránként alkalmazott n-oktanolban lényegesen nagyobb, mint a többi vizsgált oldószerben és a létrejövő hidrogénhid kötések viszonylag nagy energiája miatt a farmakon a B kompartmentben átmenetileg felhalmozódik. Ebben a rendszerben a gyógyszer felszívódásának teljes (brutto) folyamata lelassul.

Az eredmények értékelésénél figyelemmel kell lennünk arra is, hogy a barrierként szolgáló szerves fázis, viszonylag nagy réteg vastagsága miatt, saját, a szervezetben nem létező szakaszként hathat.

A különböző szalicilsav származékok transzportfolyamatainak vizsgálta során a kémiai szerkezet függvényében, ugyanazon membrán (benzol) alkalmazása esetén, jelentős eltéréseket nem észleltünk.

Irodalom

1. Rácz I.: Gyógyszerformulálás, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1984;
2. Rácz I., Maron Sylvia: Orális alkalmazású gyógyszerek tervezésének biofarmáciai alapjai. Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Budapest, 1991, 66-70
3. Minker I.: Basic Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. Institut of Pharmacodynamics of A. Szent-Györgyi Medical University, Szeged, 1992;
4. Szász Gy., Takácsné Novák Krisztina: A lipofilitás és a protonáltság szerepe a gyógyszertervezésben, SOTE, Budapest, 1990, 127-129;
5. Rácz I. és mtsai: A gyógyszer technológia kémiai, biofarmáciai és farmakokinetikai ellenőrző vizsgálatai. SOTE, Budapest, 1994.

IN VITRO STUDY OF TRANSPORT PROCESSES. I. THE STUDY OF ABSORPTION IN THREE-PHASE "LIQUID-BRIDGE" SYSTEM

Maria Kincses Ajtay, L. Ferencz, J. Balázsi, Adriana Ilie

In studying the "in vitro" transport mechanisms we have used Swintosky's three-phase system. The central part of the model is a specific inversed Y-shaped tube. In one side of Y-tube we introduced artificial gastric juice, pH=2 (compartment A), in the other side the artificial plasma fluid pH=7,4 (compartment C). The two aqueous phases were closed by organic, apolar solvents (compartment B), which serve as continuous lipid membranes. As a membrane we have used the following apolar solvents: n-octanol, benzene, cyclohexan, n-hexane, n-heptane. The whole system was fixed on a shaking machine at a constant temperature of 37°C.

In this system we followed the transport and diffusion processes of salicylic acid and some derivatives from compartment A to compartment C. The results showed that the studied solvents serve as an adequate "in vitro" model for studying transport processes through the biological membrane and there is also a good correlation with the results of the experiments performed in vivo.

A szerkesztőségbe érkezett: 1995. november 1.-én.
