

# POLYMORFI

2006

**Fysikaalisen farmasian XVII  
vuosittainen symposium:**

**VESI FARMASIASSA**

**\*tutkimuksen ja tuotekehityksen\*  
näkökulmia**

1988

**Turku 26.1.2006**

**ISSN: 1236-4002  
1458-5820 (pdf)**

---

Fysikaalisen farmasian XVII vuosittainen symposium:

**VESI FARMASIASSA – TUTKIMUKSEN JA  
TUOTEKEHITYKSEN NÄKÖKULMIA**

Turku, Forum Marinum, 26.1.2006

**OHJELMA**

---

9.30		ILMOITTAUTUMINEN ja KAHVI
10.15	Samuli Hyvönen (FFY, Helsingin yliopisto)	Symposiumin avaus
10.30	Jan Lundell (Helsingin yliopisto)	<i>Vesi - vuorovaikutusten mestari</i>
11.15	Kirsti Saarnivaara (Orion Pharma)	<i>Veden rooli lääkkeenvalmistusprosesseissa - teollisuuden näkökulmia</i>
12.00		Posterisittelyt
12.30		LOUNAS
13.45	Erja Katainen (Kuopion yliopisto)	<i>Raman kosteuden aiheuttaman rakennemuutoksen tutkimuksessa</i>
14.15	Jari Pajander (Kuopion yliopisto)	<i>Liuosrintaman kulkeutuminen tablettiin</i>
14.45	Karin Kogermann (Helsingin yliopisto)	<i>Quantitative model construction for hydrate/anhydrate systems - benefits and possible pitfalls</i>
15.15		KAHVI
15.45	Anna Shevchenko (Orion Pharma)	<i>Role of water in preformulation studies - a case study</i>
16.15	Ossi Korhonen (Kuopion yliopisto)	<i>Vesi, amorfia ja proteiinit</i>
16.45	Samuli Hyvönen (FFY, Helsingin yliopisto)	Symposiumin päätös
16.50		FYSIKAALISEN FARMASIAN YHDISTYKSEN VUOSIKOKOUS Tutustumista Forum Marinumin näyttelyihin
18.25		Parhaan posterin palkitseminen
18.30		ILLALLISBUFFET

FYSIKAALISEN FARMASIAN YHDISTYKSEN JÄSENLEHTI

---

<b>XVII symposiumin ohjelma</b> .....	2
<b>Sisällys</b> .....	3
<b>Päätoimittajan kynästä</b> .....	5
<b>Esitysabstraktit</b> .....	6
Water – Skilled Master of intermolecular interactions.....	7
The role of water in Pharmaceutical processes – industrial perspective .....	9
Water vapour sorption by pharmaceutical sugars: Simultaneous analysis by Raman spectroscopy and HMA .....	11
Effect of liquid penetration on tablet structure and drug release .....	12
Quantitative model construction for hydrate/anhydrate systems – benefits and possible pitfalls .....	15
Role of water in preformulation studies - Case study: Hydrate formation study of a new drug substance .....	19
Proteins, water and amorphicity .....	21
<b>Posteriabstraktit</b> .....	23
Combining the potential of near infrared (NIR) and Raman spectroscopies in polymorph screening .....	24
Mesoporous TCPSI, MCM-41 and SBA-15 microparticles as API carriers for oral drug delivery: Drug loading and quantification .....	25
Calorimetric determination of pore size distribution using thermoporometry .....	26
Dry powder agglomeration of starch acetate with different model drugs .....	27
Grazing incidence X-ray diffraction studies of pharmaceutical tablets .....	28
<b>Väitöskirjojen tiivistelmät</b> .....	29
Intracellular metabolism of bisphosphonates – impact on the molecular mechanism of action and side-effects.....	30
Molecular field-based activity predictions and virtual screening in computer-aided drug design .....	31
Ocular delivery of peptides and $\beta$ -blocking agents: development of analytical, cell culture and computational study methods.....	32
Role of excipients in moisture sorption and physical stability of solid pharmaceutical formulations .....	34
Studies on a cholesterol-lowering microcrystalline phytosterol suspension in oil .....	35
Water-soluble prodrugs of cannabinoids .....	36
<b>Lisensiaattitöiden tiivistelmät</b> .....	38
Evaluation of intestinal absorption properties of clodronate using Caco-2 cell culture model .....	39

<b>Gradujen tiivistelmät</b> .....	40
Amorfisen aineen kvantitointi.....	41
Biohajoavien mikropartikkelien valmistus .....	42
$\beta$ -sitosterolin hydraattien säilyvyys erilaisissa suhteellisissa ilmankosteuksissa .....	43
Cultured stratum corneum compared to human stratum corneum using FTIR technique.....	44
Fysikokemiallisten ominaisuuksien ja imeytymisen edistäjien vaikutus lääkeaineiden permeabiliteettiin ihon läpi .....	45
In silico prediction of affinity to the PEPT1 carrier system using inhibition data of Gly-Sar uptake in CHO cells.....	46
Kalorimetrinen tutkimus huokoisen piin käyttäytymisestä simuloitussa kehonesteissä .....	47
Kationiset liposomit geeninsiirtovektoreina .....	48
Lämpötilan ja suhteellisen kosteuden vaikutus isotermisellä mikrokalorimetrillä tehtäviin amorfisuusmäärittäisiin.....	49
Lääkeaineen vapautuminen yksittäisistä pelleteistä .....	50
Lääkeaineen vapautumista matriisirakenteisista valmisteista kuvaavat matemaattiset mallit.....	51
Mechanical strength parameters and disintegration of some tablet excipients (diluent) containing super disintegrants. Development of magnetic monitoring system for quantitative disintegration assessment.....	52
Nisäkässolujen säilyminen polymeerisissa biomateriaaleissa kylmäkuivaamalla .....	53
Peroraalilääkinnässä käytettävien lääkeaineiden liukoisuus ja sen parantaminen .....	54
Per oraaliset kontrolloidusti lääkeainetta vapauttavat moniyksikkövalmisteet .....	55
Skin hydration and natural moisturising factor .....	56
Suussa hajoavat valmisteet .....	57
Uudella sumutusmenetelmällä valmistettujen vapaiden kalvojen tutkiminen.....	58
Vesiliuokoisuuden vaikutus lääkeaineen vapautumiseen tärkkelysasettaattitabletista .....	59
Värillisten lämpö- ja kosteusindikaattoreiden värin muutosominaisuuksien tutkiminen lääkevalmistuksen yksikköprosesseissa.....	60
<b>Ristikko</b> .....	62
<b>Osallistujat</b> .....	63

---

**Päätoimittaja:** Mika Pulkkinen, Kuopion yliopisto  
Mika.Pulkkinen@uku.fi

**Julkaisija:** Fysikaalisen farmasian yhdistys ry

---

---

# PÄÄTOIMITTAJAN KYNÄSTÄ

---

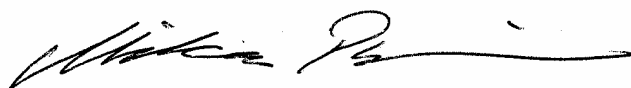
Tervehdys,

Tämänvuotinen fysikaalisen farmasian XVII symposium järjestetään Turussa Forum Marinumin hulpeissa tiloissa. Kerran vuodessa järjestetyssä yhdistyksen symposiumissa on perinteisesti käsitelty jotain tärkeää ja ajankohtaista fysikaalisen farmasian teemaa. Koska yhdistys on päässyt täysikäisyyden kynnykselle, mielenkiintoisten ja täysin uusien aiheiden keksiminen on yhä vaikeampaa. Tämän vuoden symposiumin aiheeksi valittiin vesi, sillä teollisuuden ja tutkimuksen näkökulmasta veden rooli on noussut vuosi vuodelta merkittävämmäksi. Vaikka vesi on ollut symposiumin teemana aiemminkin, tällä kerralla ohjelma on varsin erilainen ja symposiumissa riittää varmasti uutta opittavaa kaikille, niin vanhoille kuin uusille yhdistyksen jäsenille. Lisäksi symposiumin yhteydessä on mahdollista tutustua Forum Marinumin tarjoamiin näyttelyihin, jotka liittyvät hieman myös symposiumin teemaan.

Parhaillaan hypistelemäsi Polymorfi on säilyttänyt viimevuotiset elementit. Esitelmä- ja posteritilavistelmien lisäksi lehteen on koottu tärkeimpiä fysikaalisen farmasian alaan liittyviä väitöskirja-, lisensointityö- ja gradutiivistelmiä, joiden avulla voi tehdä nopean katsauksen alalla tehtyyn tutkimukseen. Myös yhdistyksen jäsenten pyyntöihin on vastattu, sillä Polymorfin lopusta löytyy pientä aivopähkinää ristikon muodossa – ehkäpä saatte ratkaistua siitä teemaan liittyvän totuudenkin.

Nauttikaa mielenkiintoisista esityksistä ja mukavasta yhdessäolosta!

Kuopiossa 20.1.2006



Mika Pulkinen

---

## **ESITYSABSTRAKTIT**

---

---

# WATER – SKILLED MASTER OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS

**Jan Lundell**

Department of Chemistry, University of Helsinki, P.O.Box 55 (A.I.Virtasen aukio 1), 00014,  
University of Helsinki

---

Water (dihydrogen oxide, H<sub>2</sub>O) could be called the most important molecule creating and maintaining life-favouring conditions on the Earth. Water protects us from drastic temperature changes and stabilizes the climate allowing life even beyond the Polar circle. The molecule has a crucial role as a solvent for biological processes and it helps in molecular recognition. Water is needed and used in everyday life in many forms and sometimes that small triatomic species even paints the skies with rainbows or halos.

The diversity of phenomena based on water and its physical properties have been enthralled people and scientist alike for ages. How a small molecule like water can behave so strangely, produce so many unbelievable observations and even physical anomalies? In fact, water has been said to possess at least 41 anomalies [1], which include such common observations as a high boiling point as liquid, high surface tension, being more dense as a liquid than as a solid, and appearing in three different phases within the temperature range found on the Earth. And there are still many aspects of water that keeps scientists on their toes: for example, there is an active debate going on about the local structure of liquid water [2]. The key to the properties and behaviour of water can be traced to the small size and polarity of the molecule (see Figure 1).

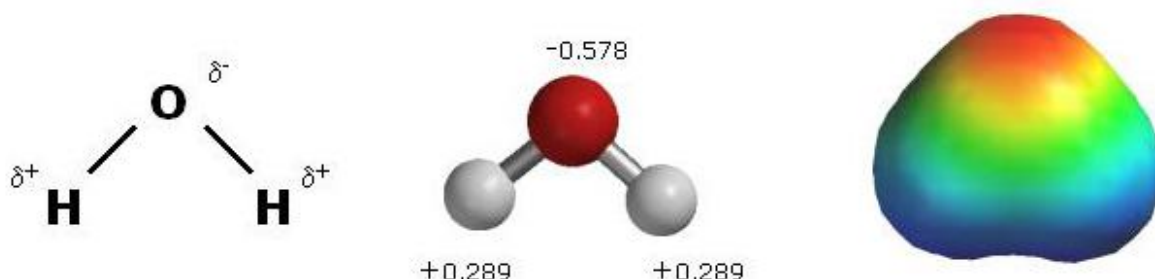


Figure 1. A quantum chemist's view on water molecule: The computed partial charges on each atom as well as a colour-coded electron density map (on the right).

The small size of the molecule means that it can snuggle close to the other molecules. The polarity of the molecule allows it to have an extremely sensitive hand-shaking mechanism with other molecules. The polar nature allows the molecule to orient itself according to its surroundings and the ability to direct the hand-shakes produces long-distance order that affects the physical properties of the substance. These hand-shakes are more commonly known as hydrogen-bonds – directed, mostly electrostatic interactions involving a covalently bonded hydrogen atom, which interacts with an electron-rich molecular entity. Such an interaction is pictured in Figure 2 between two water molecules.

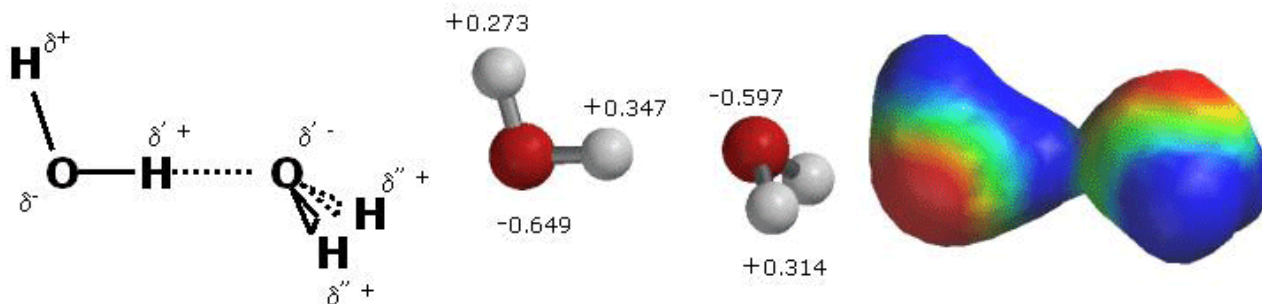


Figure 2. The theoretical guinea-pig of hydrogen bonding, the water dimer.

A single water molecule is known to be capable to form up to four hydrogen bonds simultaneously – a situation that is common in normal ice ( $I_h$ ). The hydrogen bond is the most profound way of molecular interaction being stronger than a typical van der Waals interaction but being weaker than standard covalent chemical bonds. The hydrogen-mediated interaction is responsible, for example, for the twisting of DNA and water transport in and out of the cell [3]. Along with the directional greeting network mediated by hydrogen bonds, such ensembles are easily structurally modified, since breaking of a hydrogen bond requires less energy than breaking a covalent and strong chemical bond. Hydrogen-bonded networks adapt easily to the changes in their surrounding, be it solvation of an ion, forming a hydrophobic pocket around a molecule or liquid water adapting to increasing external pressure. The latter leads us to the fourth “phase” of water, the supercritical water used in analytic techniques, as well as to the numerous known structures of ice.

In this talk, I will address the basic questions underlying the hydrogen bond and its consequences for the behaviour of water in atmospheric chemistry and with biological molecules. Also, an overview of recent advances in the field of hydrogen-bond research is given.

## References

- [1] Information of all anomalies and their explanations can be found at <http://www.lsbu.ac.uk/water>
- [2] Ph.Wernet, D.Nordlund, U.Bergmann, M.Cavalleri, M.Odelius, H. Ogasawara, L.Å.Näslund, T.K.Hirsch, L.Ojamäe, P.Glatzel, L.G.M.Pettersson, A.Nilsson: The structure of the first coordination shell in liquid water, *Science* 304, 2004, 995-999.
- [3] D.Kozono, M.Yasui, L.S.King, P.Agre: Aquaporin Water Channels: Atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine, *J. Clinical Investigation* 109, 2002, 1395-1399.



---

# THE ROLE OF WATER IN PHARMACEUTICAL PROCESSES – INDUSTRIAL PERSPECTIVE

**Kirsti Saarnivaara and Tanja Lipsanen**

Orion Pharma

---

Water interacts with pharmaceutical solids at virtually all stages of manufacture. Therefore, water-powder interaction is a major factor in the formulation, processing, and performance of solid dosage forms.

Water is one of the most used excipient in the manufacturing of pharmaceuticals. Also, environmental water plays an important role in the form of atmospheric water vapour (relative humidity) as well as water contained in drug substances and excipients.

Water is able to interact with crystalline solids in three major ways; adsorption of water vapour to the solid-air interface; crystal hydrate formation; and deliquescence. Crystal hydrates are characterized by the penetration of water molecules into the crystal lattice, most often, but not always, in a well-defined molecular position within the unit cell, and hydrogen bonded to certain groups with a specific stoichiometry. Water in amorphous solids can exist in both a “bound” and a “solvent-like” state, with, perhaps, two types of “bound” states.

In solid dosage forms (tablets, capsules, powder) water can be used as a solvent for the binding agent in the granulation process. This water does not remain in the final composition but will be evaporated during the drying process. In fluid bed granulation, a finely divided binder is sprayed onto fluidised particles. As a result of collisions and coalescence between the surface-wetted powder particles, liquid bridges are formed and nucleation of particles occurs leading to the growth of granules. Whether or not the liquid binder spreads on the granule surface, evaporates, or is imbibed into the porous powder structure, as well as its ability to migrate to the surface upon collision with other granules, will greatly impact the granulation mechanism and the granule growth profile.

A solid to be dried may be porous or nonporous. It can also be hygroscopic or nonhygroscopic. The structure of solid determines the mechanism for which internal liquid flow may occur. The general case is that wet solid loses moisture first by evaporation from a saturated surface on the solid, followed in turn by a period of evaporation from a saturated surface of gradually decreasing area, and, finally, when the latter evaporates, in the interior of the solid. Periods of drying can be illustrated by rate curves.

The forces acting to remove water from the crystalline solids are gravitation and capillary forces. Periods of constant rate predominate in their drying curves. Internal water transfers are slower in amorphous solids. The liquid diffuses through structural obstacles caused by the molecular configuration. The drying rate curves of these amorphous materials are characterized by a short constant rate period. Their drying is not an easy process and they retain high residual humidity.

During the manufacturing process and storage there might be water related changes and interactions affecting to the properties of the drug product. The amount of moisture adsorbed by drugs and excipients affects the flow, compression characteristic, and hardness of granules and tablets. The reduction in powder bulk density is attributed to the presence of interparticle liquid bridges, which keep particles further apart and produce a more open structure than if the particles were noncohesive. As the moisture content of pharmaceutical substances increases, the tablets' tensile strength increases (specifically at low moisture contents), reaches a maximum, and then decreases (specifically at higher moisture content). Moisture increases the compact strength by increasing the tensile strength of the powder bed, by decreasing the density variation within the tablet, and by recrystallization. A decrease in tensile strength can be result of the formation of water multilayers or the pre-

cence of free water at the surfaces. Such water may then disturb or reduce intermolecular attraction forces and thereby reduce tablet strength.

Both the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients in the formulation have different moisture sorption properties. Equilibrium moisture content of a solid is particularly important in drying because it represents the limiting moisture content for given conditions of humidity and temperature. If the material is dried to a moisture content less than it normally possesses in equilibrium with atmospheric air, it will return to its equilibrium value on storage unless special precautions are taken. Moisture sorption isotherms of excipients are useful in predicting solid-state stability, interactions at early stages of formulation development, and effects of moisture on physicochemical properties of the final dosage forms. Equilibrium moisture content depends greatly on the nature of the solid. For nonporous, i.e., nonhygroscopic materials, the equilibrium moisture content is essentially zero at all temperatures and humidities.

Moisture sorption isotherms characterize the amount of vapour adsorbed or desorbed at different equilibrium concentrations in the gas phase. The amount of water that is sorbed is dependent on the chemical properties and polarity of the compound, as well as on the RH, temperature, and particle-size distribution, specific surface area, and deliquescence, structure of the sorbent surface, and porosity of the material. The more amorphous excipient is used in the formulation the more water is absorbed into the structure of excipient.

In semisolid dosage forms (creams and gels), water might be the main component. In oral solutions, water is the main component. When water is used as an excipient, as in the two previously mentioned cases, several other excipients (e.g. preservatives, antioxidants, pH adjusters) are required to guarantee the good quality and stability of the drug product.

The quality of water used in the manufacture of pharmaceuticals is specified in pharmacopoeias. For sterile products "Water for injection" must be used and for other pharmaceuticals "Water, purified" is satisfactory. The manufacturing of specific pharmaceutical water needs special technique, equipment and strict control. Therefore, the whole manufacturing and storage process will be quite expensive.

Water/moisture affects the stability of the drug products. In the case of hygroscopic or water sensitive drug substance, special attention must be paid to choosing the correct composition, manufacturing method and package for the drug product. Water is a good environment for microbial growth, therefore by eliminating the water content one can help eliminate contamination.

---

# WATER VAPOUR SORPTION BY PHARMACEUTICAL SUGARS: SIMULTANEOUS ANALYSIS BY RAMAN SPECTROSCOPY AND HMA

Erja Katainen<sup>1</sup>, Kristiina Järvinen<sup>1</sup>, Pentti Niemelä<sup>2</sup>, Janne Suhonen<sup>2</sup>,  
Eero Suihko<sup>1</sup>

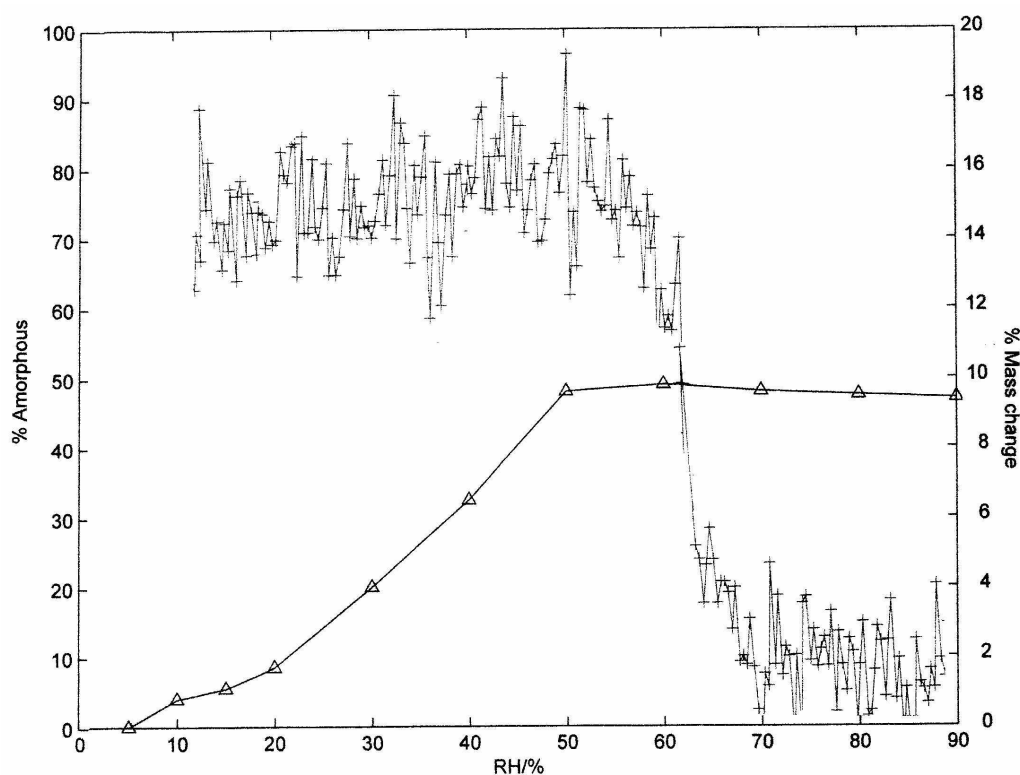
<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, University of Kuopio, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland  
<sup>2</sup>VTT Electronics, Oulu

---

Sugars are commonly used excipients in pharmaceutical dosage forms because they are safe, easily available and their physicochemical properties can be modified. Sugars are typically used as sweeteners and preservatives. In addition, they may improve processability and pharmaceutical properties of various dosage forms.

Sugars are generally hydrophilic and tend to sorb a significant amount of water. The sorbed water vapour can markedly change the physical and chemical properties and thus can have a significant impact upon their use and function in pharmaceutical dosage forms. For example, the sorbed water vapour can accelerate hydrolytic degradation, isomerization and crystallization processes of the sugar. Water vapour concentration in air can be enough to cause these changes in formulations.

In this study, the Raman spectrometer and HMA (*hygroscopic measurement apparatus*) were used simultaneously to analyse moisture induced changes in crystal structure and mass, respectively, of a sample (figure 1). Three pharmaceutical sugars, lactose, trehalose and sucrose, were studied. During the lecture, results will be presented.



**Figure 1.** Changes in crystallinity and mass of trehalose when exposed to moisture.

---

# EFFECT OF LIQUID PENETRATION ON TABLET STRUCTURE AND DRUG RELEASE

Jari Pajander<sup>a</sup>, Anne-Marie Soikkeli<sup>a</sup>, Bert van Veen<sup>b</sup>, Ossi Korhonen<sup>a</sup>, Reijo Lappalainen<sup>c</sup> and Jarkko Ketolainen<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutics, University of Kuopio, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland

<sup>b</sup>Orion Pharma, P.O. Box 425, FI-20101, Turku, Finland

<sup>c</sup>BioMater Center, University of Kuopio, Kuopio, Finland

---

## Summary

The main aim of this work was to study the liquid penetration into hydrophobic starch acetate (DS 2.7) matrix tablet and its effect on tablet structure and drug release. The other aim was to determine by fourier transform infrared imaging the phenomena which take place in the hydrophobic matrix tablet during dissolution test. Two drug compounds were used as model agents: anhydrous caffeine and riboflavin sodium salt.

## Introduction

The most widely used solid dosage forms for controlled drug release purposes are tablets and they can be divided roughly into matrix and reservoir systems. According to the Higuchi equation [1] for the release of a solid drug from a controlled release matrix tablet structure, the dissolution rate of the drug depends on many factors, including the exposed surface area and porosity of the matrix, and the tortuosity of the capillary system. The dissolution of the drug compound, and furthermore, its subsequent release from the dosage form are related to the liquid penetration into the tablet.

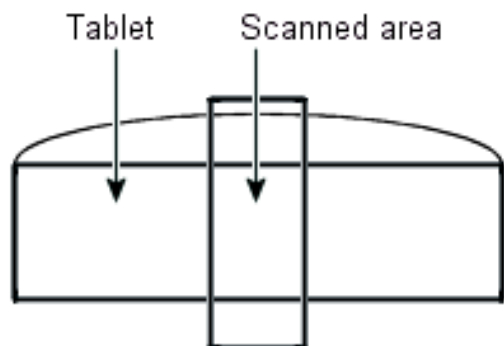
The *in vitro* release rate of solid dosage form can be determined by different tests described e.g. in United States Pharmacopoeia. However, the *in vitro* setups do not provide detailed information on the phenomena, i.e. liquid boundary movements and tablet structure changes, which take place inside the tablet during the test. It can be stated, that there is a great need for techniques, which can produce more information on tablets' internal phenomena during dissolution. Techniques proposed for visual observation include optical microscopy and image analysis [2 – 4], coloured medium measurements [5, 6] and Fourier transform infrared imaging [7, 8]. They all enable gathering the information on the phenomena inside the tablet, when they are used on an innovative way.

Starch acetates (SA) are novel modified starches that are produced by acetylating the native starch [9]. The modification converts starch into a more hydrophobic derivative, and the average degree of substitution (DS) can vary from 0 up to 3.0. Starch acetate is suitable for controlled drug release excipient for tablets when DS is greater than 2.1 [10].

## Experimental Methods

Tablets contained caffeine (22 % V/V) and phenol red (0.5 % m/m) for liquid boundary movement studies and either caffeine (22 % V/V) or riboflavin sodium salt (20 % V/V) for fourier transform infrared imaging studies. Tablets (flat-faced, cylindrical, 500 mg, 13 mm in diameter) were compressed using approximately 260 MPa as compaction pressure in order to produce low porosity tablets. The dissolution tests were carried out in the dissolution path (USP paddle method 2, 75 rpm, 37 °C) using phosphate buffer (pH 6.8) for liquid boundary movement studies and purified water as dissolution medium for fourier transform infrared imaging studies. At pre-selected time points, the tablets were removed from the dissolution bath and immediately frozen at -70 °C to stop the water

front movement. After freeze-drying, tablets were axially cut in two pieces and the axial side of the tablet was photographed or scanned (fig. 1) in attenuated total reflection mode (germanium crystal,  $100 \mu\text{m}^2$ ), which was dependent on the test on the question. Wavelengths from  $600 \text{ cm}^{-1}$  to  $2\,000 \text{ cm}^{-1}$  were used and area of  $18\,000 \mu\text{m}^2$  was scanned.



**Fig 1.** Scheme of scanned area of tablet.

## Results and discussion

The liquid penetration into the tablet is a prerequisite for the dissolution of the drug compound and its consequent release. The penetrating liquid weakened internal bonds and this caused initial tablet expansion which was then transformed as a function of time into cracking. The cracking increased the drug release rate by shortening the length of the diffusion path, increasing the effective surface area and lowering the degree of tortuosity.

Fourier transform infrared imaging is suitable method for obtaining information on drug release process and phenomena occurring during dissolution. The results indicate that the properties drug compound, i.e. particle size and solubility, effect strongly on its release behavior. Fourier transform infrared imaging is also a potential tool for evaluation of the structure, e.g. homogeneity of the matrix or uniformity of the film of coated tablets, and functionality of the controlled release systems by imaging the life-span of the drug compound during the dissolution test.

## References

- [1] T. Higuchi, Mechanism of Sustained-action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145 – 114
- [2] I.S. Moussa and L.H. Cartilier, Characterization of Moving Fronts in Cross-linked Amylose Matrices by Image Analysis, *J. Controll. Rel.* 42 (1996) 41 – 55
- [3] I.S. Moussa, V. Lenaerts, L.H. Cartilier, Image Analysis Studies of Water Transport and Dimensional Changes Occurring in the Early Stages of Hydration in Cross-linked Amylose Matrices, *J. Controll. Rel.* 52 (1998) 63 – 70

- [4] P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, A. De Ascentiis, N.A. Peppas, Analysis of the Swelling and Release Mechanisms from Drug Delivery Systems with Emphasis on Drug Solubility and Water Transport, *J. Controll. Rel.* 39 (1996) 231 – 237
- [5] C. Ferrero, A. Muñoz-Ruiz, M.R. Jiménez-Castellanos, Fronts Movement as a Useful Tool for Hydrophilic Matrix Release Mechanism Elucidation, *Int. J. Pharm.* 202 (2000) 21 – 28
- [6] C. Ferrero, I. Bravo, M.R. Jiménez-Castellanos, Drug Release Kinetics and Fronts Movement Studies from Methyl Methacrylate (MMA) Copolymer Matrix Tablets: Effect of Copolymer Type and Matrix Porosity, *J. Controll. Rel.* 92 (2003) 69 – 82
- [7] C.A. Coutts-Lendon, N.A. Wright, E.V. Mieso, J.L. Koenig, The Use of FT-IR Imaging as an Analytical Tool for the Characterization of Drug Delivery Systems. *J. Controll. Rel.* 93 (2003) 223 – 248
- [8] J. van der Weerd, S.G. Kazarian, Combined Approach of FTIR Imaging and Conventional Dissolution Tests Applied to Drug Release, *J. Controll. Rel.* 98 (2004) 295 – 305
- [9] S. Pohja, E. Suihko, M. Vidgren, P. Paronen, J. Ketolainen, Starch Acetate as a Tablet Matrix for Sustained Drug Release, *J. Controll. Rel.* 94 (2004) 293 – 302
- [10] O. Korhonen, P. Raatikainen, P. Harjunen, J. Nakari, E. Suihko, M. Vidgren, P. Paronen, Starch acetates – Multifunctional Direct Compression Excipients, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1138 – 1143

---

# QUANTITATIVE MODEL CONSTRUCTION FOR HYDRATE/ANHYDRATE SYSTEMS- BENEFITS AND POSSIBLE PITFALLS

K. Kogermann<sup>1,2</sup>, J. Aaltonen<sup>1,3</sup>, C. Strachan<sup>1,3</sup>, P. Veski<sup>2</sup>, J. Heinämäki<sup>1</sup>, J. Yliruusi<sup>1,3</sup>, J. Rantanen<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Division of Pharmaceutical Technology, University of Helsinki, Finland

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, University of Tartu, Estonia

<sup>3</sup>Drug Discovery and Development Technology Centre, University of Helsinki, Finland,

<sup>4</sup>Department of Pharmaceutics and Analytical Chemistry, The Danish University of Pharmaceutical sciences, Denmark

---

## INTRODUCTION

It has been estimated that every third active pharmaceutical compound may crystallise with water molecule(s) as part of their crystal structure<sup>1</sup>. When these compounds are exposed to water, e.g. during pharmaceutical manufacture, there is a very high possibility that hydrate formation will occur.

Conversely, mechanical and thermal stress on a system during processing may induce the dehydration of hydrates and alter the physicochemical properties of a solid form. Although, the primary function of drying is stabilization of the state of the drug, the process itself may cause structural damage (e.g. in proteins) or formation of a new solid-state<sup>2</sup>. Furthermore, those solid state transformations (hydrate formation/ dehydration) may influence the final product quality and performance.

Pharmaceutical hydrates are known to have different crystal structures and have been divided into three classes according to the arrangement of water molecules<sup>3</sup>: 1) channel hydrates, 2) isolated site hydrates, and 3) ion associated hydrates (Fig.1).

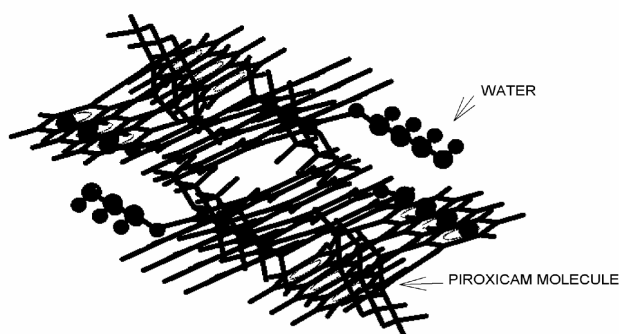


Figure 1. Crystal structure of a channel hydrate, piroxicam monohydrate (CSD<sup>4</sup> refcode CIDYAP).

Multivariate analyses have been used to reduce the amount of collected spectral data and to gather the useful qualitative and quantitative information<sup>5</sup>. However, the constructed model should also be suitable for future measurements, otherwise prediction errors may occur. Thereby, the real value of the quantitative model depends on its credibility after getting unexpected results<sup>6</sup>.

Common methods for the study of phase transitions include: DSC (differential scanning calorimetry), TGA (thermogravimetric analysis), hot stage microscopy and XRPD (X-ray powder diffraction). Recently, the use of spectroscopic tools for in-line and on-line monitoring of pharmaceu-

tical unit operations has been increasing. Near-infrared and Raman spectroscopy both are suitable methods to detect different polymorphs and pseudopolymorphs. Furthermore, they can be used when making real time measurements.

The objective of the study was to demonstrate the utility of spectroscopic methods for quantitative analysis of model drugs during fluidization and dissolution processes.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

Theophylline and piroxicam were used as model compounds. Hydrates of those pharmaceuticals were prepared by crystallization from hot saturated aqueous solutions. Theophylline monohydrate granules were used in fluidization experiments and dissolution tests were performed with anhydrous piroxicam tablets.

### **Methods**

The dehydration mechanisms were investigated with both model drugs using DSC (TA Instruments Inc., New Castle, DE, USA), TGA (Mettler Toledo TGA 850 system, Mettler Toledo International Inc.) and variable temperature XRPD (VT-XRPD; Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany). The crystal forms of the samples were verified by comparing the experimental XRPD patterns to the theoretical patterns in the Cambridge Crystallographic Database (CSD)<sup>3</sup>. The water content of dehydrated materials was verified by Karl Fischer titrimetry (Mettler DL 35, Switzerland).

Drying experiments were carried out in a multichamber microscale fluid bed dryer (MMFD, Ariacon Oy, Turku, Finland)<sup>2</sup> modified with a quartz sight glass window for NIR and Raman spectroscopic analysis. Measurements were carried out using fiber optic probes (Control Development Inc., South Bend, IN, USA).

In the dissolution experiment, UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden) operating at a wavelength of 230 nm and with a flow-through cuvette was used for measuring solution concentration. The dissolution tests were performed in a dissolution vessel equipped with a sample holder and a quartz sight glass over the tablet for the collection of the Raman spectra.

### **Construction of quantitative models**

Multivariate spectral analysis was performed with partial least squares (PLS) regression. Models were constructed using software programme Simca-P 10.5 (Umetrics AB, Umeå, Sweden).

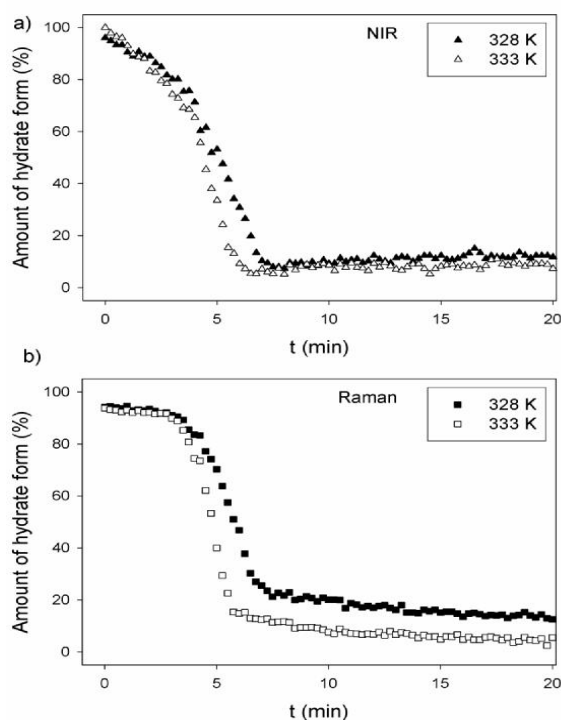
Several pre-treatment methods were tested including standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC), and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> derivative calculations. Furthermore, different scaling methods (unit variance (UV), mean centering, and no scaling), several numbers of latent variables and various spectral areas were trialled in model construction.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Quantitative spectral analysis and PLS regression plots depended largely on pre-processing and scaling methods used in model construction. There were also dissimilar results when different spectral areas were used. The selection of appropriate model parameters affected the final results considerably.



Furthermore, when models were constructed, only two solid state forms were included in the model, hydrate and anhydrous forms, respectively. Therefore, after inserting the real process data into the model, the data did not always fit the model and predictions showed major variations. Accordingly, hydrate systems may have different dehydration kinetics to the one predicted by the quantitative model, which may be due to possible formation of a new solid state (e.g. meta-stable polymorph, amorphous form) during dehydration. During dehydration of theophylline monohydrate (Fig.2), the model showed variation that could be explained by the formation of a meta-stable polymorph. This elucidation is consistent with VT-XRPD dehydration data.



**Figure 2. Dehydration profiles of theophylline monohydrate during fluidisation. a) NIR and b) Raman spectroscopy combined with PLS regression.**

Dissolution process is known to depend on the solubilities of the forms, volume of solvent, and the dissolution rate<sup>7</sup>. The changes in dissolution rates may also be associated with solid-state transformations.

Hydrate formation during dissolution could be monitored with spectroscopic methods and the concentration of a new solid-state could be predicted when using chemometric modelling. The concentration of the dissolution medium and the predicted amount of hydrate showed similarly increasing profiles. The latter would prove that different processes may be happening during dissolution and the solid-state observation allows possible phase transitions during processes to be detected.

## CONCLUSIONS

Spectroscopic methods in combination with multivariate modelling enabled transitions between crystal forms to be studied. The construction of such models for hydrate/anhydrate systems may have various pitfalls and the appropriate method needs to be selected. Special considerations should be made for sampling conditions; and any differences minimised.

The use of spectroscopic techniques should include chemometrics and a reference method. Together these help us to understand hydrate/anhydrate systems and expound the mechanisms of their phase transitions.

This study shows that when quantitative models are well constructed and possible sources of errors minimised, they can play a valuable contribution in understanding and quantifying process induced solid state transitions.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The Academy of Finland and the Finnish Cultural Foundation (Elli Turunen fund) are acknowledged for financial support.

## **REFERENCES**

- [1] Datta, S., Grant, D. J. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **3**(1), 42-57, 2004.
- [2] Räsänen, E., Rantanen, J., Mannermaa, J-P., Yliruusi, Vuorela, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **92**(10), 2003.
- [3] Morris, K. R. In Brittain, H.G. (ed): *Polymorphism in Pharmaceutical Solids.* Marcel Dekker, Inc., NY, USA:125-181, 1999.
- [4] Allen, F. H. *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising.* *Acta Crystallogr.*, **B58**, 380-388, 2002.
- [5] Beebe, K. R., Pell, R.J., Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics A Practical Guide.* John Wiley & Sons. Inc. New York. p.348.
- [6] Pelletier, M. .J. *Applied Spectroscopy.* **57**(1), 20A-42A, 2003.
- [7] Morris, K.R., Griesser, U.J., Craig, J., Stowell, E., Stowell, J.G., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **48**(1), 2001.

# ROLE OF WATER IN PREFORMULATION STUDIES

## CASE STUDY: HYDRATE FORMATION STUDY OF A NEW DRUG SUBSTANCE

**Anna Shevchenko, Saara Tiittanen, Kirsi Salomäki, Tero Närvänen, Veli-Pekka Tanninen**

Orion Pharma

At the early phase of preformulation process there is need for molecular optimization support to help medical chemists improve the selection process for the final form of a new drug compound [1]. Nowadays the miniaturized techniques allow to perform batch-to-batch solid state physical characterization of the synthesized batches of a new drug compound, which is necessary to support early pharmacokinetics and toxicology studies. Unstable solid state properties of a new drug substance (DS) in some cases can cause major interpretation problems of the study results. Especially hydrate formation can cause challenges as far as the aqueous solubility and dissolution rate of a hydrate is always lower than of an anhydrate. Below we are giving an example of such instability revealed in a new DS named further in text as ORM.

A new drug substance ORM, which is a base, has been neutralized with a counter ion A. As a result a salt ORM-A was obtained. Physical characterization of the newly synthesized batches by dynamic vapor sorption (DVS), x-ray powder diffraction (XRPD), different scanning calorimetry (DSC), thermal gravimetry (TGA), and scanning electron microscopy (SEM) has been performed.

The first XRPD analysis of the initial batches showed that the material is almost completely amorphous. Content of the amorphous phase slightly varied from batch-to batch. The water sorption technique DVS revealed a crystallization event took place in the amorphous phase at  $T=25^{\circ}\text{C}$  and relative humidity  $\text{RH}=55\%$  (fig.1). The simple comparison of the XRPD patterns of the ORM-A salt before and after DVS run confirmed the fact of the crystallization

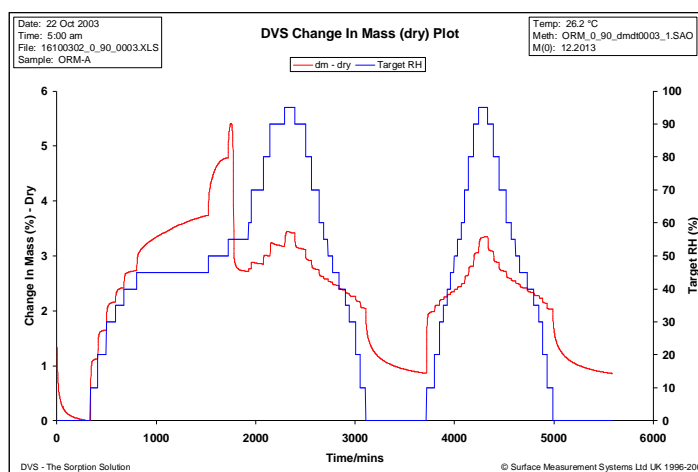


Fig 1. Mass change of the ORM-A with the relative humidity. Relative humidity (blue curve) has been changed in steps from 0 to 95% and backward. Two cycles has been run. The crystallization is seen as the negative water uptake peak that takes place during the first RH cycle at 55% of the relative humidity. The curve is typical for all ORM-A batches synthesized at the beginning of development with one difference for the height of the peak which is related to the amorphous phase content.

The TGA study (weight loss at heating) gave us the strong evidence of a hemihydrate formation of the ORM-A salt:  $\text{ORM-A} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ .

Several anhydrous crystalline forms of the ORM-A were obtained during further development of the crystallization process. However, the DVS investigations followed by XRPD showed that all anhydrous forms transform to the same hemihydrate ORM-A\*1/2H<sub>2</sub>O at higher relative humidity (fig 3).

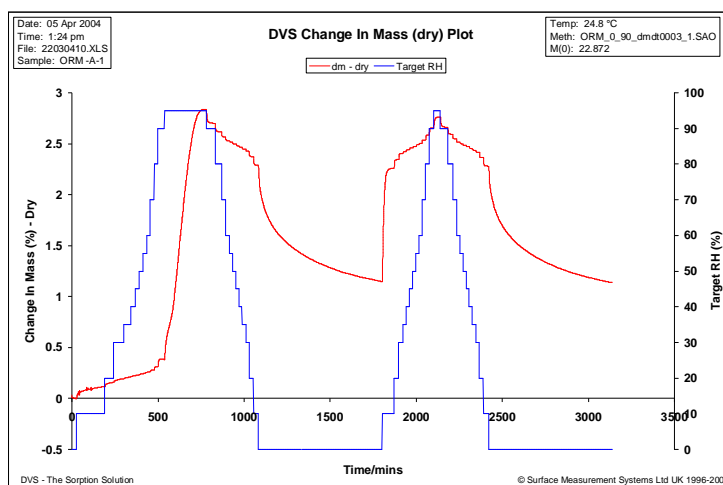


Fig 3. Example of the ORM-A hemihydrate formation revealed by DVS analysis. Initially anhydrous crystalline sample peak up water at high relative humidity and revert into the hemihydrate. XRPD patterns of the hemihydrate ORM-A and the sample after DVS run are identical.

Fortunately, DSC, TGA and DVS studies showed that the crystallized hemihydrate has considerably higher physical stability than the initial amorphous sample. It was advised to adjust the synthetic process and to start producing of the ORM-A hemihydrate. The only sensitive disadvantage of the hemihydrate was the acicular shape of the particles that caused challenges for the oral product formulators.

Later, the rational polymorph screening study involved up to 750 crystallizations from different solvents at different crystallization conditions showed that the hemihydrate form is both the most stable and the most often occurring (86%) crystalline phase of the ORM-A salt. The fact could be explained by the crystal structure of the ORM-A molecule obtained with an aid of single-crystal x-ray diffraction. All found anhydrous forms of ORM-A demonstrated a tendency to pick up a half of water molecule sooner or later.

Similar investigation of the other salt of the same molecule ORM-B was started later. The sample demonstrated low water uptake tendency typical for the crystalline materials. No hydrate formation was revealed at the studied conditions. Further wide scale investigations of polymorphism tendency have not revealed other crystalline forms or hydrate formation in case of the salt ORM-B. Based on the study the ORM-B salt is recommended for later development.

[1] Pharmacopeal Reviews, Parmacopeial Forum Vol, 26(6) [Nov.-Dec.2000] <1175> Preformulation Guidelines by Dr. C. Okeke.

---

# PROTEINS, WATER AND AMORPHICITY

**Ossi Korhonen**

Department of Pharmaceutics, University of Kuopio, P.O.Box 1627, 70211, Finland

---

In human body, the natural environment of protein is water. Their half life is relatively short, but long enough to achieve the desired biological function. This extreme label behavior makes them very challenging candidates for drug products, since the shelf-life of drug product should be at least couple of years, instead of couple hours. Since the stability of proteins is considerably short in aqueous medium, the most protein formulations are solid dosage form.

## **Protein stabilization hypotheses**

There exist two main theories of stabilization of proteins in solid form. The first one is “water substitute hypothesis” (1) and the second one is “glass dynamic hypothesis” (2). The first case based on the fact that the surface residue amino acids of protein form hydrogen bonds with water. Thus, by adding suitable additives (such as disaccharides) protein forms hydrogen bonds with them instead of water and the native structure will be stabilized. In the case of "glass dynamics hypothesis" a good stabilizers forms a rigid, inert matrix into which the protein is molecularly dispersed. Dilution of proteins in the glass matrix separates the protein molecules, and limited mobility in the glass minimizes bimolecular interactions (3). Recent results pointed out that both hypotheses are important in the stabilization phenomenon (3). However, since the properties of glassy state are still incompletely understand and the hydrogen bonding tendency measured by FT-IR reveals a secondary structure (tertiary structure determines biological activity), the exact contribution of each hypothesis remains open.

## **Water in freeze-drying process**

Freeze-drying is the most common method to produce dry and solid protein formulations (4). In this section, the phases of water have been described. Freeze-drying consists of following stages: freezing, annealing, primary drying and secondary drying. In the freezing stage, the most of water is converted to crystalline by decreasing temperature gradually to -40°C. During freezing, all solute components concentrate, which might change for example ionic strength and pH. At the end of freezing, normally there is still about 20%(w/w) unfrozen water. Annealing is simply holding the product at a temperature (-20°C) above the freezing temperature for a defined period to crystallize the potential crystalline components (bulking agent). Annealing above the glass transition temperature of Tg' causes growth of ice crystals. At the primary drying stage, a vacuum (100mTorr) is applied to drying chamber to remove the water from ice crystals by sublimation. Normally, after the primary drying stage, there is still about 20%(w/w) water in the product, thus, only crystalline water has removed but the unfrozen water remains in the product. To remove that final fraction of water, one needs to carry on secondary drying. During secondary drying, more energy (heat) is imported to the system to remove the final fraction of water.

## **Conclusions**

Challenge of stabilization of protein formulation remains still open. More studies need to be carried out in the field of amorphicity, interactions between protein, water and stabilizers, crystallization of amorphous systems, and different drying procedures. Many of these problems are still incompletely understand even in the pure systems. So, how to deal with multicomponent systems?

1. Crowe J, Crowe L, Carpenter J. Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis. Part 1. *BioPharm.* 6:28-29, 32-33, 1993.
2. Franks F, Hatley R, Mathias S. Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *BioPharm.* 4:38, 40-42, 1991.
3. Chang L, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant K, Tang X, Pikal M. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix. *J. Pharm. Sci.* 94, 1427-1444, 2005.
4. Tang X, Pikal M. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharm. Res.* 21:2, 191-200, 2004.

---

## **POSTERIABSTRAKTIT**

---

---

# COMBINING THE POTENTIAL OF NEAR INFRARED (NIR) AND RAMAN SPECTROSCOPIES IN POLYMORPH SCREENING

**Jaakko Aaltonen, Jukka Rantanen**

Division of Pharmaceutical Technology, Drug Discovery and Development Technology Centre, University of Helsinki

---

The aim of the study was to combine two spectroscopic techniques in order to achieve a more reliable method for polymorph screening.

**Crystallizations:** Polymorphs of the model substance, nitrofurantoin (NF), were crystallized from mixed acetone-water solvents (acetone content varying from 0 % to 100 %, v/v). **Methods of analysis:** Near infrared spectroscopy (NIR; Control Development Inc., South Bend, IN), Raman spectroscopy (Control Development Inc., South Bend, IN) and X-ray powder diffraction (XRPD; Bruker AXS D8 Advance, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany). **Multivariate modeling:** The NIR and Raman spectra of each sample were merged into one array, and thereafter, a principal component analysis (PCA, Simca-P software v. 10.5, Umetrics AB, Umeå, Sweden) was performed in order to classify the spectra of different crystal forms into separate clusters. The effect of different spectral filters and multivariate scaling methods to the clustering were tested. **Structure verification:** The crystal forms of the samples were verified by comparing the experimental XRPD patterns to the theoretical patterns in the Cambridge Crystallographic Database (CSD; Mercury software v.1.3, CCDC, Cambridge, UK).

Three crystal forms of NF were crystallized in the polymorph screen: NF monohydrate and two anhydrous forms (CSD refcodes HAXBUD, LABJON01 and LABJON02, respectively). The scores of the merged spectra of different polymorphs were separated clearly in the PCA score plot.

The different characteristics of NIR and Raman spectroscopies make the combination a powerful and reliable polymorph screening tool. NIR provides information about the interactions between the molecules in the crystal lattice whereas Raman is more sensitive to the variations in the molecular skeleton. NIR is also extremely sensitive to water, which is important in classification of hydrates.



# MESOPOROUS TCPSI, MCM-41 AND SBA-15 MICROPARTICLES AS API CARRIERS FOR ORAL DRUG DELIVERY: DRUG LOADING AND QUANTIFICATION

T. Heikkilä<sup>1, 2</sup>, J. Salonen<sup>2</sup>, J. Tuura<sup>2</sup>, J. Riikonen<sup>2</sup>, V-P. Lehto<sup>2</sup>, N. Kumar<sup>3</sup>, D.Yu. Murzin<sup>3</sup>, T. Salmi<sup>3</sup>, L. Laitinen<sup>4</sup>, A. M. Kaukonen<sup>4</sup> and J. Hirvonen<sup>4, 5</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Materials Research, Turku, Finland

<sup>2</sup> Laboratory of Industrial Physics, Department of Physics, University of Turku, FI-20014 Turku, Finland

<sup>3</sup> Laboratory of Industrial Chemistry, Process Chemistry Centre, Åbo Akademi University, FI-20500 Åbo, Finland

<sup>4</sup> Viikki Drug Discovery and Development Technology Center, University of Helsinki, Finland

<sup>5</sup> Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, FI-00014 Helsinki, Finland

Poor biopharmaceutical properties are a major cause of failure of newly developed active pharmaceutical ingredients (APIs). Hence, there is a growing interest in the development of new, advanced drug delivery systems to improve the dissolution and permeability (bioavailability) of poorly soluble APIs as well as provide controlled and/or targeted release.

Recently several reports have emerged on the application of mesoporous silica matrices as API carriers for drug delivery purposes. So far one of the most used carrier matrix has been the ordered mesoporous molecular sieve MCM-41, synthesized using a templating mechanism and featuring a pore diameter of 2.9 nm with a very narrow pore size distribution (PSD). In the present study the feasibility of also two other mesoporous silica/silicon based materials as oral drug delivery vehicles was comparatively explored. SBA-15, also synthesized using templates, features a narrow PSD with a pore diameter of nearly 3 times larger than MCM-41. Finally, porous silicon (PSi), produced by anodizing Si(100) wafers, features the largest mean pore diameter (15.4 nm) with the widest PSD (3-30 nm) of the studied mesoporous solids. Herein, the stable, hydrophilic thermally-carbonized variant, TCPSi was used. Ibuprofen, a well-known BCS (Biopharmaceutics Classification System) class 2 analgesic with high permeability and low solubility was used as the model API. Ibuprofen was loaded into the carrier mesopores via saturated ethanol solutions after which the microparticles were filtered, dried and characterized.

One of the feasibility criteria of a specific carrier for drug delivery is its capacity for a sufficiently high drug load. The total API contents of the loaded mesoporous solids were determined by dissolution with HPLC analysis as well as by TG. In addition DSC was used to quantify the drug load on the mesoporous particle surfaces. The structures and stabilities of the pure and drug loaded matrices were certified using XRPD. Gas penetration methods (N<sub>2</sub> sorption and He-pycnometry) were also used to calculate directly the ibuprofen mesopore load degrees for comparison, however with these methods the results vary due to pore blockage and other effects. The carrier drug load quantification results are summarized in Table I. The results indicate that mesoporous carriers can carry high drug loads in the mesopores, thus facilitating practical doses. Additionally, in the poster results on the effect of the mesoporous carrier on the dissolution rate of the loaded API is presented.

**Table I.** API load results in weight-%.

Method	TCPSi	MCM-41	SBA-15
TG	30.8	47.5	53.6
HPLC dissolution	28.2	45.1	56.7
DSC (surface) <sup>a</sup>	0.2	12.9	8.2
He-pycnometry	33.0	51.7	65.3
N <sub>2</sub> sorption	27.4	47.3	50.4
API in pores <sup>b</sup>	<b>28.0</b>	<b>34.6</b>	<b>45.4</b>

<sup>a</sup> unloaded API found on the surface of the microparticles

<sup>b</sup> loaded API in the pores of the microparticles

# CALORIMETRIC DETERMINATION OF PORE SIZE DISTRIBUTION USING THERMOPOROMETRY

J. Riikonen, J. Salonen and V-P. Lehto

Laboratory of Industrial Physics, Department of Physics, University of Turku, FI-20014 Turku, Finland

There has been a lot of interest in mesoporous materials due to their ability to function, e.g., as catalysts, sensors and drug carriers. The porous properties, such as pore volume and pore size distribution, of these materials are essential for all these applications. Widely used methods to determine the properties are gas adsorption and liquid intrusion. Less known is the calorimetric method known as thermoporometry or thermoporosimetry [1].

Thermoporometry is based on the fact that the phase transition temperature between solid and liquid phase ( $T$ ) is related to the radius of the pore ( $R_p$ ) where the substance is confined. Generally, the smaller  $R_p$  is the more  $T$  decreases compared to the phase transition temperature of the bulk substance ( $T_0$ ). Due to the absence of the direct methods for finding the parameters in the theoretical equation that relates  $R_p$  and  $T$ , it is a common procedure to use pore size data obtained with gas adsorption to find an experimental “calibration equation”.

To utilize thermoporometry as the method to determine the pore size distribution, we have determined the calibration equation using nitrogen adsorption and calorimetric measurements for freezing of water in the pores of three mesoporous materials: MCM-41, SBA-15 and thermally oxidized porous silicon (TOPSi). To obtain the calorimetric data we have used two types of DSC measurements: conventional scans with linear cooling rates and step scans with alternating cooling and isothermal steps.

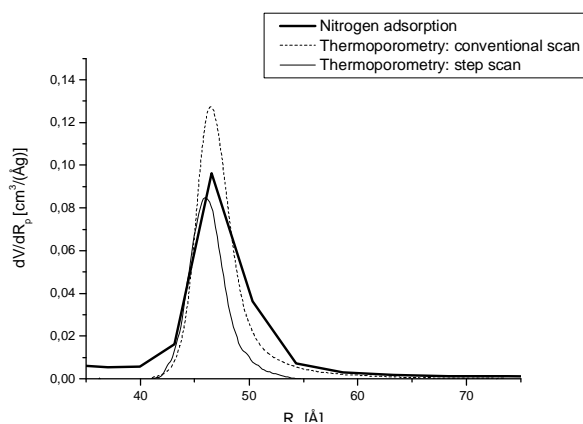
The calibration equations obtained were

$$R_p = -2,71 \text{ \AA} / \ln(T / T_0) + 2,63 \text{ \AA}$$

and

$$R_p = -2,53 \text{ \AA} / \ln(T / T_0) + 3,51 \text{ \AA}$$

for the conventional and the step scan measurements, respectively. The pore size distributions for SBA-15 calculated from nitrogen adsorption and calorimetric measurements are presented in Figure 1.



**Figure 1.** Calculated pore size distributions for SBA-15

[1] M. Brun, A. Lallemand, J.-F. Quinson and C. Eyraud, *Thermochim. Acta* **21** (1977), p. 59

---

# DRY POWDER AGGLOMERATION OF STARCH ACETATE WITH DIFFERENT MODEL DRUGS

**Riikka Mäki<sup>a</sup>, Eero Suihko<sup>a</sup>, Susanne Rost<sup>a,b</sup>, Minna Heiskanen<sup>a</sup>, Matti Murtomaa<sup>c</sup>, Vesa-Pekka Lehto<sup>c</sup> and Jarkko Ketolainen<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutics, University of Kuopio, P.O. Box 1627, FI-70211 Kuopio

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Martin Luther University of Halle, 06099 Halle, Germany

<sup>c</sup> Laboratory of Industrial Physics, University of Turku, FI-20014 Turku

---

In this study three model drugs (N-acetyl-D-glucosamine (NAG), anhydrous caffeine and propranolol hydrochloride) were agglomerated with starch acetate (SA, particle size fraction < 53  $\mu\text{m}$ ) by inducing electric charging during mixing of the binary powders on a rustless steel (RST) plate. These agglomerates, mixed with different amounts of disintegrant, were then compressed into tablets whose dissolution characteristics were determined. Triboelectric measurements were used to study charging of powders in contact with different materials. These measurements showed that SA and propranolol HCl charged positively and caffeine and NAG negatively in contact with RST indicating that SA might agglomerate with caffeine and NAG.

SEM imaging was used for visual characterization of the prepared dry powder agglomerates. The SEM micrographs showed that smaller caffeine particles ( $d(0.5)=46\ \mu\text{m}$ ), in spite of their larger negative charge, agglomerated less efficiently with SA than larger NAG particles ( $d(0.5)=141\ \mu\text{m}$ ), which indicated that particle size difference between the particles affects their agglomeration significantly. Propranolol HCl did not form agglomerates since its particle size and charge are similar to SA. Tensile strength and drug release properties of the tablets were found to be dependent on the material adhered on the surface of the agglomerates. NAG released slower and caffeine faster from the agglomerated formulations, and the release rate was almost constant. In conclusion, SA tablet properties can be modified by preparing dry powder agglomerates of suitable drug and SA that are compressed into tablets.

# GRAZING INCIDENCE X-RAY DIFFRACTION STUDIES OF PHARMACEUTICAL TABLETS

Mikko Koivisto and Vesa-Pekka Lehto

Laboratory of Industrial Physics, University of Turku

Grazing incidence diffraction (GID) is a technique not yet being used in the field of pharmaceutical physics widely. However, GID is a very potential alternative to the other surface sensitive techniques, e.g. various spectroscopic methods, used in the pharmaceutical materials analysis. With GID it is possible to monitor phase transitions on the surface of tablet as a function of time and depth, for example.

In the present study GID has been utilized to study the disorder of the tablet surface after the compaction. Three active pharmaceutical ingredients, namely tolbutamide, carbamazepine and chlorpropamide, were chosen to act as model tablet compounds. Several tablets were compacted using different compaction pressures. The prepared tablets were then analysed with GID with various incident angles in order to depth profile the surface disorder and possible pressure induced phase transitions.

The results indicate that all of the studied compounds were changed due to the compression. The GID analysis shows that the surface regions of the compacted tolbutamide, carbamazepine and chlorpropamide tablets were disordered. The manifestations of the disordering in the diffractographs are the increased peak intensity and height and the decreased peak width. Moreover, a polymorphic phase transition was observed in chlorpropamide tablets (Figure). The biggest changes took place at the very surface of the tablets. The transitions were also dependent on the used compaction pressure.

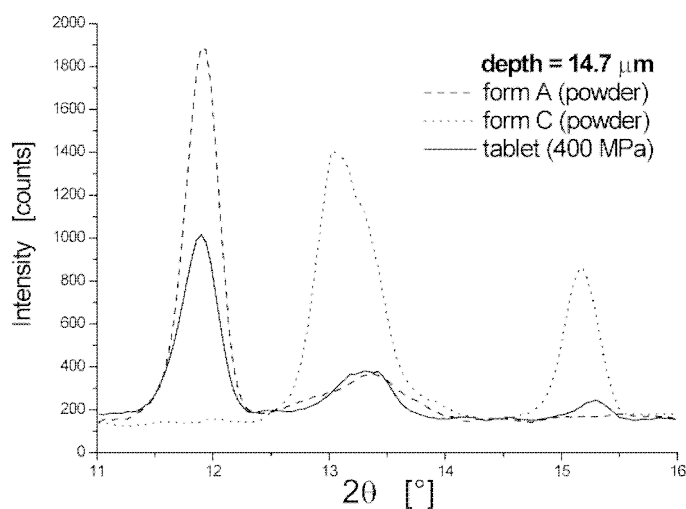


Figure. The phase transition due to the compression was observed in the chlorpropamide tablets. The diffractographs of pure chlorpropamide A and C powder are drawn as reference.

---

## **VÄITÖSKIRJOJEN TIIVISTELMÄT**

---

---

# INTRACELLULAR METABOLISM OF BISPHOSPHONATES - IMPACT ON THE MOLECULAR MECHANISM OF ACTION AND SIDE-EFFECTS

**Hannu Mönkkönen**

Kuopio University Publications A. Pharmaceutical Sciences 85. 2005. 63 p.

---

Bisphosphonates are a class of drugs developed for the treatment of metabolic bone diseases that are associated with increased bone resorption. Nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs), such as alendronate and zoledronate, inhibit enzymes of the intracellular mevalonate pathway, thereby preventing the modification of important signalling proteins with isoprenoid lipids. Loss of prenylated proteins causes loss of cell function and, consequently, indirect apoptotic cell death. The less potent non-nitrogen-containing bisphosphonates (non-N-BPs), such as clodronate, do not inhibit isoprenylation but are metabolised into a cytotoxic analog of adenosine triphosphate (ATP), which accumulates in the cell cytoplasm and evokes directly apoptosis. The non-N-BPs have also specific anti-inflammatory actions.

The purpose of this study was to clarify the intracellular metabolism of bisphosphonates and how this impacts the molecular mechanism of action and the potential side-effects. The specific aims were (a) to develop an analytical method for the quantitation of the adenine nucleotide containing metabolites of bisphosphonates in cell extracts, (b) to study the cellular uptake of clodronate (a non-N-BP) and the kinetics of its metabolism into AppCCl2p in macrophages, (c) to investigate the cellular uptake and metabolism of clodronate and its derivatives in Caco-2 epithelial cells in order to explore the mechanism of gastrointestinal side-effects, and (d) to characterise the N-BP-induced accumulation of a new ATP analog (ApppI) and its role in the molecular mechanism of action of N-BPs in macrophages and osteoclasts.

The results from this work show that ion-pairing HPLC-ESI-MS is a sensitive method to study the metabolism of bisphosphonates. Furthermore, acetonitrile extraction of cells was very suitable for HPLC analysis. Results from cellular uptake and clodronate metabolism studies supported the view that the clodronate metabolite (AppCCi2p) is responsible for the cellular actions, such as the anti-inflammatory properties and apoptosis, of this bisphosphonate, indicating that non-N-BPs act via AppCp-type metabolites. Additionally, clodronate can probably be metabolised into a cytotoxic AppCCl2p by any cell type capable of internalising the drug. However, the cytotoxic effect depends on the degree of uptake of clodronate, and thus, the amount of the metabolite. Therefore, when lipophilic derivatives of clodronate are developed to improve their bioavailability, the possibility for a simultaneous increase in gastrointestinal side effects should be taken into account. The results further indicate that in addition to causing indirect apoptosis by preventing protein prenylation, N-BP-induced inhibition of FPP synthase leads to the formation of a novel endogenous ATP analog (ApppI). This compound inhibits mitochondrial ADP/ATP translocase, which then evokes direct apoptosis in osteoclasts. This finding provides a new plausible mechanism for the action of N-BPs.

In conclusion, the present study demonstrates the significance of the metabolism of bisphosphonates and how this impacts their molecular mechanism of action and potential side effects. This data could also be of particular interest for assessing new indications of BPs, such as for treatment of arthritis and cancer.

**Medical Subject Headings:** diphosphonates/metabolism; molecular mechanisms of action; diphosphonates/adverse effects; cells, cultured; Caco-2 cells; liposomes; macrophages; osteoclasts; adenosine triphosphate/analogs & derivatives; spectrometry, mass, electrospray ionization; chromatography, high pressure liquid

---

# MOLECULAR FIELD-BASED ACTIVITY PREDICTIONS AND VIRTUAL SCREENING IN COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN

**Anu Johanna Tervo**

CSC — Scientific Computing Ltd., Espoo 2005, CSC Research Report R01/05

---

The present work investigates molecular fields and their applications in molecular design experiments in the drug discovery process. Many properties of chemical compounds, e.g., their biological activity towards a target protein, are fundamentally related to the electron density surrounding the atomic nuclei of the molecule. Therefore, two structurally dissimilar molecules may have similar biological properties if their charge distributions and shapes are similar. Molecular fields represent one way to model molecular properties important for biological activity as measured potentials that surround a molecule. Steric and electrostatic molecular fields can be used in modeling overall shape and charge distribution of a molecule, respectively. In addition, molecular fields can describe other interactions related to ligand binding, such as hydrogen bonding or hydrophobicity, or interactions between a molecule and a certain functional group. Common methodologies in drug design that utilize information derived from molecular fields include three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) analyses and virtual screening (VS). In this work, these methods were applied in distinct drug design experiments with diverse molecular field types. By means of 3D QSAR analyses, important structural features were detected for the inhibitory activity of distinct compound sets towards catechol- O-methyltransferase or human immunodeficiency virus protease enzymes. Molecular fields also enhanced the VS experiment of inhibitors for the human sirtuin type 2 enzyme. Molecular field-based *BRUTUS* algorithm, intended for molecular superposition and similarity searching, was evaluated in experiments appropriate for both purposes. *BRUTUS* was found to be a fast and efficient method that can be used in aligning molecules and in VS of large molecular databases in drug design experiments.

---

# OCULAR DELIVERY OF PEPTIDES AND $\beta$ -BLOCKING AGENTS: DEVELOPMENT OF ANALYTICAL, CELL CULTURE AND COMPUTATIONAL STUDY METHODS

**Veli-Pekka Ranta**

Kuopio University Publications A. Pharmaceutical Sciences 79. 2005. 73 p.

---

Ocular absorption of topically applied drugs is usually minimal due to the multiple protective mechanisms of the eye. *In vitro* permeability studies with excised ocular membranes are often used to evaluate the barriers in the ocular delivery of drugs and biopharmaceuticals. The value and information content of *in vitro* studies can be improved by proper analytical methods that enable metabolite analysis or cassette dosing. It is also important to develop ocular cell culture models in order to reduce the number of animal experiments. Furthermore, the integration of *in vitro* permeability data with computer-based pharmacokinetic modeling may improve the predictive power of *in vitro* studies.

The objectives of this study were to develop new analytical, cell culture and computational tools for ocular drug research, and to study the physical and metabolic barriers in the anterior ocular membranes for the delivery of peptide drugs. The specific aims were (a) to develop analytical methods that allow an efficient use of excised animal tissues and cultured cell models in permeation studies, b) to develop a new method for the early pharmacokinetic evaluation by combining corneal epithelial cell culture studies with pharmacokinetic modeling using  $\beta$ -blockers as model compounds, and c) to characterise different ocular permeation routes for the ocular delivery of an enkephalin analogue, [D-A1a2]-methionine enkephalinamide (DAMEA), using excised rabbit tissues.

A gradient high-performance liquid chromatography (HPLC) with combined ultraviolet (UV) and electrochemical detection was a sensitive and selective method for the simultaneous determination of DAMEA, its major metabolites and several enzyme inhibitors. A gradient HPLC method with combined UV and fluorescence detection was an excellent method for the simultaneous determination of eight  $\beta$ -blockers.

The absorption and desorption rates of six  $\beta$ -blockers were determined using a human corneal epithelial (HCE) cell culture model. These *in vitro* parameters and several previously published *in vivo* parameters were integrated into a kinetic model to simulate the ocular pharmacokinetics of the drug in rabbits after topical application. In the model, the cornea was treated both as a barrier and a drug reservoir which mimics the kinetic events *in vivo*. The model gave a reasonable estimate of the ocular pharmacokinetics of timolol in several topical formulations.

DAMEA was extensively metabolized by peptidases in rabbit cornea and conjunctiva, and to a lesser extent in sclera. A combination of an aminopeptidase inhibitor (bestatin) and an enkephalinase inhibitor (SCH 39370) blocked the metabolism effectively and improved the corneal and conjunctival permeability of DAMEA by 15 and 6 times, respectively. In the presence of inhibitors, the conjunctiva was 42 times and sclera 25 times more permeable to DAMEA than the cornea which indicated that the physical barrier of the conjunctiva and sclera was low compared to cornea.

In conclusion, gradient HPLC with a suitable combination of detectors is an excellent method for a multicomponent analysis in permeability studies. The integration of permeation experiments in HCE cell culture model with pharmacokinetic modeling is a promising method for the early pharmacokinetic evaluation of ocular drugs. Permeation via the conjunctiva and sclera may be the most viable route in the ocular delivery of peptides.



**Medical Subject Headings:** drug administration routes; drug delivery systems; ophthalmic solutions; peptides; adrenergic beta-antagonists; enkephalin, methionine / analogs & derivatives; cell culture; eye; cornea; conjunctiva; sclera; pharmacokinetics; permeability; chromatography, high pressure liquid; rabbits

---

# ROLE OF EXCIPIENTS IN MOISTURE SORPTION AND PHYSICAL STABILITY OF SOLID PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

**Sari Airaksinen**

Helsinki University Printing House, University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, 2005, 57 p.

---

The interaction of moisture with pharmaceutical solids is crucial to an understanding of water-based processes, e.g. manufacturing processes or prediction of solid dosage form stability and shelf life. Sorbed moisture of either the active pharmaceutical ingredient (API) or excipients in the pharmaceutical formulation can result in unexpected processing-induced phase transformations (PITs). Phase transformations in formulations can lead to instability in physicochemical, biopharmaceutical, and processing properties of products. Thus correct selection of excipients helps to control PIT and can improve the storage stability of the final formulations. The aim of this thesis was to study the effect of water in different excipients and explain the water-excipient interactions with special regard to the formulation and manufacturing of solid forms.

This study examines the moisture sorption properties of several excipients with different degree of crystallinity after storage at various levels of humidity. This facilitates comparison of excipients regarding to preformulation stage, and thus helps predict the solid-state stability and interactions of the final formulations. The degree of crystallinity of excipients had a significant effect on the stability of formulation. The crystallinity of excipients was correlated with the ability of the excipients to inhibit hydrate formation of two model APIs. Only amorphous, hygroscopic excipient in the formulation was able to inhibit hydrate formation of API at relatively high water contents during wet granulation. Slightly hygroscopic partially crystalline excipient hindered hydrate formation of API at low water contents. Non-hygroscopic crystalline excipient could even enhance the hydrate formation of API. In general, the more amorphous the excipient, the more water was absorbed into its structure and the slower was the rate of API hydrate formation. With low water contents, a spectroscopic approach enabled phase transformations in the formulation to be identified even though there were excipients in the formulation. Finally, the effect of temperature changes on the dehydration behaviour of formulations and solid-state properties of excipients was evaluated. Process temperature and excipients used in the formulation had a significant influence on phase transitions.

---

# STUDIES ON A CHOLESTEROL-LOWERING MICROCRYSTALLINE PHYTOSTEROL SUSPENSION IN OIL

**Anna von Bonsdorff-Nikander**

Helsinki University Printing House, University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, 2005, 55 p.

---

Some cholesterol-lowering drugs have lately caused severe side-effects in humans and the potential use of phytosterols as an optional method of lowering serum cholesterol has been given considerable attention. Although the positive effect of phytosterols has been known for decades, their unpleasant gritty texture and the poor solubility has prevented their widespread use.

In the present study, an oral phytosterol suspension was prepared by adding water to a supersaturated sterol in oil solution. The addition of water decreased the solubility in oil and microsized sterol crystals were formed. By changing the amount of sterol and/or water it was possible to control the crystal form, habit and size distribution. In the presence of water phytosterol recrystallised as needle-shaped hemihydrate or monohydrate crystals. Without added water, anhydrous plate-like crystals were achieved. Higher sterol concentrations resulted, due to supersaturation, in the formation of small crystals. By optimised process

parameters, i.e. cooling temperature and stirring, it was also possible to achieve the desired crystal size for a so-called creamy suspension. Hardly any changes in crystal habit, size distribution or form were observed during storage of these suspensions for four months. Incorporation of the suspension into cholesterol-lowering products includes heating and thus the knowledge of structural and mechanical changes of the suspension during heating is of importance. Dehydration of phytosterol crystals in an oil suspension was, similarly to plain crystals, a two-phased process. The suspension became less elastic and the crystals started to dissolve at relatively low temperatures.

A clinical study performed earlier using a similar microcrystalline suspension revealed a significant reduction of serum cholesterol levels. A dynamic *in vitro* study was performed to understand the mechanism by which phytosterols can inhibit cholesterol absorption in the small intestine. In addition to phytosterol, the choice of lipid in the suspensions was observed to have a significant effect on the solubilisation of sterols into the mixed micelles. The *in vitro* studies, in which medium chain length (MCT) and long chain length (LCT) lipids were compared, showed that phytosterols formulated in MCT efficiently displaced cholesterol from mixed micelles. Solubilisation into intestinal mixed micelles is a prerequisite for sterols to reach the site of absorption and thus cholesterol absorption is decreased.

---

# WATER-SOLUBLE PRODRUGS OF CANNABINOIDS

Juha Juntunen

Kuopio University Publications A. Pharmaceutical Sciences 86, 2005, 100p.

---

Modern drug development techniques optimize drug-receptor interactions identifying lipophilic compounds that possess good affinity for the receptor *in vitro*. However, these compounds may fail later in the drug development process because of their poor physicochemical properties, such as low aqueous solubility which may prevent the drug molecule from reaching its site of action. Various formulation strategies such as the use of cosolvents, surfactants and cyclodextrins have been used to overcome this problem. Development of more soluble analogs may prove to be difficult, since the receptor binding is also affected when irreversible changes are made to the active molecule structure.

Reversible structural changes are also possible by using the prodrug strategy. Prodrugs are molecules which must undergo chemical or enzymatical transformation within the body before exerting their pharmacological effects. Two different prodrug strategies can be used in order to improve the aqueous solubility: (1) by decreasing the melting point or (2) by introducing polar, ionizable or permanently charged group to the molecule.

Cannabinoids are compounds that interfere with the cannabinoid receptors of the body. Endocannabinoids, such as anandamide (AEA), are endogenous compounds that bind to cannabinoid receptors. There are many potential therapeutical applications for cannabinoids including control of pain, regulation of immune response, antitumor properties, control of appetite, treatment of glaucoma as well as applications in various neurological disorders. However, the pharmaceutical usefulness of cannabinoids is severely limited by their extremely poor aqueous solubilities.

In the present study, several water-soluble prodrugs of endocannabinoids and R-methanandamide were designed, synthesized and their properties were evaluated *in vitro*. The usefulness of prodrugs in ophthalmic applications was evaluated in an *in vitro* corneal permeation study and some of the prodrugs were also tested *in vivo* for their ability to reduce intraocular pressure after their topical administration.

Phosphate esters of anandamide, R-methanandamide and noladin ether increased the aqueous solubility of parent compounds considerably. The phosphate esters were chemically relatively stable and rapidly released the parent compound after enzymatic hydrolysis.

Tertiary and quaternary methylpiperazine prodrugs of anandamide were more water-soluble than anandamide. Since the  $pK_a$  values of tertiary prodrugs were around 7.4, the solubility is strongly pH-dependent near the physiological pH. In contrast, the aqueous solubility of quaternary prodrugs is pH-independent, which is one of their greatest advantages, ensuring good aqueous solubility at all pH values. Some of the tertiary and quaternary prodrugs were not enzymatically cleaved possibly due to steric reasons. However, tertiary prodrug 12 and quaternary prodrug 14 readily released AEA after enzymatic hydrolysis.

The fluxes of phosphate ester prodrugs in the cornea permeation study were smaller than the fluxes of the parent compounds solubilized with cyclodextrin. However, as an example, the flux of noladin ether prodrug was much better than the flux of noladin ether suspension without cyclodextrin. The prodrugs released the parent compound just before or during the absorption, since only the parent compound was detected on the receiver side.

Topically administered phosphate esters of R-methanandamide and noladin ether decreased intraocular pressure in normotensive rabbits, this effect was comparable to the parent compounds in a cyclodextrin formulation.

In conclusion, the present results suggest that the prodrug approach is a feasible method for improving water solubility of cannabinoids and other poorly soluble compounds. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies show that the phosphate prodrug approach is suitable for ocular applications.

**Medical Subject Headings:** prodrugs/chemical synthesis; drug design; cannabinoids; endocannabinoids; solubility; water; esters; phosphates; hydrolysis; permeability; cornea; intraocular pressure; administration, topical; ophthalmic solutions

---

## **LISENSIAATTITÖIDEN TIIVISTELMÄT**

---

---

# EVALUATION OF INTESTINAL ABSORPTION PROPERTIES OF CLODRONATE USING CACO-2 CELL CULTURE MODEL

**Lea Johanna Raiman**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmasian tiedekunta, Kuopion yliopisto  
Licentiate Thesis in Pharmacy, 2005, 73 p

---

The oral route is the most important and preferred route of administration of conventional drugs. The poor oral bioavailability may result from a variety of reasons including poor solubility, poor membrane permeation, and excessive first-pass metabolism. The absorption of orally administered drugs occurs mainly in the small intestine where a single layer of intestinal epithelial cells is the most significant barrier to the drug absorption. The transport of drugs across the epithelial cells may occur by passive transcellular and paracellular routes, the carrier-mediated route, and by transcytosis. Small lipophilic drugs are absorbed by the transcellular route, whereas small hydrophilic and charged drugs are supposed to be absorbed paracellularly through the intercellular spaces. Drugs which are structurally similar to various nutrients may utilize active transporters for their absorption. The significance of transcytosis as a drug absorption mechanism is negligible.

Clodronate belongs to the group of bisphosphonates, which are used, due to their antiresorptive activity, for the treatment of various metabolic bone diseases. Orally administered bisphosphonates are, however, very poorly absorbed from the small intestine: the oral bioavailability of clodronate is only ~1-2%.

In the present work, the intestinal absorption of clodronate was studied using human intestinal epithelial Caco-2 cell culture model. The specific transport mechanism of clodronate across epithelial barrier was determined and by performing the transport experiments both in a conventional and in a minimum-calcium Caco-2 model the significance of the extracellular calcium in the restriction of clodronate's transport was assessed. The permeation of more lipophilic phenyl ester derivatives of clodronate across Caco-2 cells and the effects of four different absorption enhancers (palmitoyl-DL-carnitine chloride, N-trimethyl chitosan chloride, sodium caprate, and EGTA) on the transport of clodronate were also studied.

The permeation of clodronate (1 and 10 mM) through Caco-2 cells was low indicating paracellular transport mechanism for clodronate. In the absence of apical calcium, the transport rate of clodronate was remarkably enhanced. The permeabilities obtained for mono- and diphenyl esters of clodronate did not significantly differ from that obtained for clodronate. The transport rate of triphenyl ester was, however, 17-fold higher than the transport rate of parent clodronate (1 mM) suggesting that triphenyl ester employs transcellular route for permeation. The absorption enhancers resulted in a 2- to even 190-fold increase in clodronate's absorption; EGTA being the most efficient enhancer.

In conclusion, the transport of clodronate across intestinal epithelium is restricted mainly to the paracellular route and calcium strongly decreases the transport probably by complexation of clodronate into a non-absorbable form. By more lipophilic phenyl esters, the transport route of clodronate could be changed from paracellular to transcellular but this needs the substitution of at least three phosphate hydroxyl groups before the change is realised. The permeation of clodronate through Caco-2 cells could be significantly promoted by the absorption enhancers, which cause widening of tight junctions and, thus, increase the permeability of the paracellular route.

---

## **GRADUJEN TIIVISTELMÄT**

---



---

# AMORFISEN AINEEN KVANTITOINTI

Outi Pajamo

Farmasian teknologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto

---

Polymorfialla on suuri merkitys lääketeollisuudessa. Eri polymorfeilla voi olla hyvinkin erilaiset fysikaaliset ominaisuudet (mm. erilainen liukoisuus, hygroskooppisuus, stabiilisuus ja puristuvuus). Nämä erot voivat vaikuttaa sekä biologiseen hyväksikäytettävyyteen että prosessoitavuuteen. Ei riitä, että lähtöaineen polymorfia tunnetaan, sillä lääkkeenvalmistusprosessin aikana polymorfia voi tapahtua muutoksia. Kiteisyysasteella on havaittu olevan merkitystä lääkeaineen käytettävyyden kannalta. Vaikka amorfista ainetta usein muodostuukin prosessin aikana kohtuullisen vähän verrattuna kiteisen aineen määrään, voi sen merkitys olla suuri. Amorfisen aineen määrän merkitys on havaittu viimevuosikymmeninä ja sen kvantitointiin on käytetty useita analyysitekniikoita. Ongelmana on ollut pienten määrien (alle 10%) luotettavaan kvantitointiin soveltuvien menetelmien löytäminen. Käytetyt menetelmät voidaan jakaa ryhmiin: termiset, gravimetriset ja spektroskopiset menetelmät sekä jauheröntgendiffraktometria.

Termisiä amorfisen aineen kvantitointimenetelmiä ovat erotteleva pyyhkäisy kalorimetri (DSC), Hyper-DSC, isoterminen mikrokaloimetri (IMC) ja liuoskalorimetri. Näille kaikille menetelmille on yhteistä se, että ne mittaavat näytteessä tapahtuvia entalpian muutoksia. Toisin sanoen ne mittaavat näytteessä tapahtuvia lämpöenergian muutoksia ja niiden suuruutta. Gravimetriset menetelmät mittaavat tietyn reaktion seurauksena tapahtuvia massan muutoksia tutkittavassa näytteessä. Gravimetrisia amorfisen aineen kvantitointimenetelmiä ovat dynaaminen vesihöyryn sorptio ja vesihöyryn sorptio. Amorfisen aineen osuuden kvantitointiin voidaan käyttää useita spektroskopisia menetelmiä. Käytetyt spektroskopiset menetelmät eroavat toisistaan huomattavasti niin toimintaperiaatteiltaan, laitteiltaan kuin kvantitointiperiaatteiltaan. Yhteistä näille menetelmille on jonkinlaisen säteilyn käyttö. Käytettyjä säteilyjä ovat röntgen-, lähi-infrapuna-, laser- ja ydinmagneettisäteily.

Työn tavoitteena oli aikaansaada kvantitointimalli PLS- monimuuttujamenetelmää apuna käyttäen spektrometrisilla menetelmillä (XRPD, NIR ja Raman) eri amorfisuusasteisille laktoosi- ja trehaloosinäytteille. Tavoitteena oli myös seurata kahta eri prosessia; laktoosin kuulamylyllä jauhamista ja laktoosin, trehaloosin sekä näiden seoksen kiteytymistä 85 % suhteellisessa kosteudessa.

Kuulamylyllä jauhettaessa amorfisuusasteen havaittiin kasvavan jyrkästi jo ensimmäisen tunnin aikana. Erot kvantitointoiduissa amorfisuusasteissa olivat suuret eri menetelmien (NIR, Raman ja XRPD) välillä. Jauhamisen prosessin aikainen seuranta on kuitenkin mahdollista sekä NIR:llä että Ramanilla. Amorfisuusasteen kasvamista pystytään seuraamaan spektrin muutoksesta selvästi. Näitä menetelmiä apuna käyttäen on siis mahdollista kvantitoida kiteisyysastetta prosessin aikana. Sopivan kvantitointimallin löytäminen on kuitenkin haasteellista. Myös kiteytymisen seuraaminen onnistui NIR:llä ja Ramanilla. Amorfisen laktoosin havaittiin kiteytyvän ensin  $\alpha$ -laktoosimonohydraatiksi ja sen jälkeen vielä osittain  $\beta$ -monohydraatiksi. Amorfisen trehaloosin puolestaan kiteytyi kokeissa vain trehaloosidihydraatiksi. Amorfisen laktoosin ja trehaloosin seos puolestaan näytti NIR:llä tehdyissä kiteytyskokeissa kiteytyvän  $\alpha$ -laktoosimonohydraatin ja trehaloosidihydraatin seokseksi Ramanilla tehdyissä kokeissa lopputuotteessa oli näiden lisäksi vielä  $\beta$ -laktoosin läsnäolo. Laktoosin ja trehaloosin seos kiteytyi selvästi hitaammin kuin yksittäiset laktoosi ja trehaloosi. Avainsanat: polymorfia, amorfinen, kvantitointi, NIR, Raman, XRPD

---

# BIOHAJOAVIEN MIKROPARTIKKELIEN VALMISTUS

**Satu Pohjolainen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Elimistössä hajoavien polymeerien eli biohajoavien polymeerien käyttö mikropartikkelien valmistukseen on tarjonnut uusia mahdollisuuksia pitkävaikutteisten lääkkeiden valmistukseen. Erityisen mielenkiinnon kohteena on useissa tutkimuksissa ollut peptidien ja proteiinien lääkinnällinen käyttö, jota muutoin rajoittaa kyseisten aineiden herkkyys ruuansulatuskanavan olosuhteille sekä lyhyt puoliintumisaika elimistössä. Biohajoaviin mikropartikkeleihin kapseloiminen on varteenotettava vaihtoehto myös monille muille lääkeaineille, kuten esimerkiksi syöpälääkkeille. Mikropartikkeli voi suojata sekä lääkeainetta elimistön olosuhteilta että myös elimistöä lääkeaineelta kohdentamalla lääkeaine haluttuun kudokseen.

Biohajoavien mikropartikkelien erilaisia valmistusmenetelmiä on kehitetty useita: emulsiomenetelmät, ylikriittiset uuttomenetelmät, faasierotus-, sumukuivaus-, leijupetipäällystys- sekä sulatusmenetelmä. Lopputulokseen, eli valmiiden mikropartikkelien ominaisuuksiin, voidaan vaikuttaa kunkin menetelmän valmistusolosuhteita muokkaamalla. Valmistusmenetelmän valintaan vaikuttavat sekä lääkeaineen että polymeerin fysikaaliskemialliset ominaisuudet.

Kokeellisessa osassa tutkittiin kahden uuden polymeerin, oksatsoliimilla linkatun poly(laktidi)n (PEA) ja oksatsoliinilla linkatun poly( $\epsilon$ -kaprolaktoni)n (PCL-O), soveltuvuutta lääkeainetta sisältävien mikropartikkelien valmistukseen v/ö/v -emulsiomenetelmällä. Lisäksi tutkittiin malliaineen (FITC-dekstraani, mp 4 400) vapautumista valmistetuista mikropartikkeleista ja polymeerien oksatsoliinilinkkauksen vaikutusta FITC-dekstraanin (mp 4400) vapautumisprofiliin. Uudet polymeerit hajosivat linkkaamattomia polymeerejä nopeammin ja siten tarjoavat mielenkiintoisia mahdollisuuksia uudenlaisten polymeerien kehitystyöhön.

Avainsanat: biohajoava, polymeeri, mikropartikkeli, oksatsoliinilinkkaus

---

# β-SITOSTEROLIN HYDRAATTIEN SÄILYVYYS ERILAISISSA SUHTEELLISISSA ILMANKOSTEUKSISSA

**Timo Väistö**

Farmasian teknologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto

---

Useilla lääkeaineilla on taipumus reagoida esimerkiksi valmistuksen tai säilytyksen aikana joko veden tai muiden liuottimien kanssa ja muodostaa hydraatteja tai solvaatteja eli pseudopolymorfeja. Koska eri pseudopolymorfien monet fysikaaliset ominaisuudet (esim. liukoisuus, sulamispiste, tiheys, lujuus, dissoluutionopeus) poikkeavat toisistaan, myös niiden säilyvyys, biologinen hyväksikäytettävyys ja niistä valmistettujen lääkevalmisteiden tehot voivat olla huomattavan erilaiset. Nykyiset viranomaisohjeet edellyttävätkin sekä lääkeaineiden että -valmisteiden osalta tarkkaa seuranta valmistuksen ja säilytyksen aikana.

Kasvisteroleihin kuuluva β-sitosteroli on kiteinen yhdiste, jolla tiedetään olevan vedettömän anhydraatin lisäksi kaksi hydratoitunutta muotoa, hemihydraatti ja monohydraatti. β - Sitosterolin käyttö hyperkolesterolemiassa perustuu sen aiheuttamaan kolesterolin imeytymisen pienenemiseen ruuansulatuskanavasta alentamalla kolesterolin liukoisuutta. Vaikutustavasta johtuen β-sitosterolin pseudopolymorfisella muodolla on todennäköisesti vaikutusta sen tehoon hyperkolesterolemiassa.

Tässä pro gradu -tutkielmassa tutkittiin β-sitosterolin pseudopolymorfisten muotojen säilyvyyttä erilaisissa ilman suhteellisissa kosteuspitoisuuksissa. Lähtöaineina käytettyjen β-sitosterolin eri muotojen (kiteisyydeltään kaksi erilaista anhydraattia, amorfinen muoto, kiteisyydeltään kaksi erilaista hemihydraattia sekä monohydraatti) säilyvyyttä seurattiin 21 vuorokauden ajan eksikkaattoreissa erilaisissa suhteellisissa kosteuspitoisuuksissa (RH) huoneen lämpötilassa. Veden sorptiota/desorptiota seurattiin näytteiden massoja punnitsemalla seurannan aikana ja sen päätyttyä. Mittausjakson päätyttyä kaikista näytteistä tutkittiin massojen lisäksi niiden rakenne (XRPD) ja niiden sisältämä kokonaisvesipitoisuus (KF). Säilytyskokeiden lisäksi suoritettiin kullakin β-sitosterolin pseudopolymorfilla kokeita jauheröntgen-diffraktometrillä (XRPD) erilaisissa lämpötiloissa ja ilman suhteellisissa kosteuspitoisuuksissa. Näistä mittauksista saatiin suoraa tietoa eri hydraattien muutoksista toisikseen.

Tulosten perusteella β-sitosterolin hemihydraatti on stabiilein muoto, kun RH on 33-58%. Alemmillä RH-pitoisuuksilla stabiilein muoto on anhydraatti ja ylemmillä monohydraatti. Lisäksi monohydraatin havaittiin olevan erittäin epästabiili ja muutos hemihydraatiksi tapahtuu nopeasti alemmilla RH-pitoisuuksilla. XRPD:lla suoritetuista kokeista ilmeni, että faasimuutokset tapahtuvat järjestyksessä anhydraatti ↔ hemihydraatti ↔ monohydraatti. Suoritettujen isotermisten säilytyskokeiden perusteella hemihydraatin ja monohydraatin kokonaisvesimäärät poikkeavat aina toisistaan. Molemmilla hydratoituneilla muodoilla havaittiin myös hystereesiä, joka voi olla seurausta kanavoituneesta kidehilan rakenteesta.

Avainsanat: β-sitosteroli, faasimuutos, hystereesi, pseudopolymorfia, suhteellinen ilmankosteus

---

# CULTURED STRATUM CORNEUM COMPARED TO HUMAN STRATUM CORNEUM USING FTIR TECHNIQUE

**Johanna Kahma**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

The organotypic culture model from newborn rat skin (ROC) has been developed for transdermal drug delivery studies. Stratum corneum is the most important forming the permeability barrier of the skin, and more detailed the intercellular lipids in stratum corneum. The aim of this study was to obtain more information of this reconstructed stratum corneum and of intercellular lipids. The results were compared to result from human stratum corneum. Fourier transform infrared spectroscopy was used in this study; because it offers many advantages to exam the lipids and the measurements were possible to carry out with increasing temperature to see the phase transitions. FTIR provides detailed information of mobility and lateral organisation of the lipids in stratum corneum and even small differences were possible to evaluate. The wavenumbers that were informative are from the hydrophilic alkyl chains in stratum comeum lipids, they were stretching vibrations, scissoring mode and rocking mode.

In the results, the orthorhombic and hexagonal lateral packing of the lipids in cultured stratum corneum (ROC) were observed, but in difference to human stratum corneum, the lipids were mainly in hexagonal phase. This explains the results of former permeability studies with ROC-model; the looser hexagonal lipid organisation correlates to impaired barrier function. In conclusion, in cultured (ROC) stratum corneum lipids exist already in room temperature in hexagonal, orthorhombic and liquid phase. The similarities in results with human stratum corneum were a shift in phase transitions along the temperature and the effect of hydration.

Keywords: Stratum corneum, Fourier transform infrared spectroscopy, Cultured skin

---

# FYSIKOKEMIAALLISTEN OMINAISUUKSIEN JA IMEYTYMISEN EDISTÄJIEN VAIKUTUS LÄÄKEAINEIDEN PERMEABILITEETTIIN IHON LÄPI

**Sanna Vanhatalo**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Vain muutamat lääkeaineet soveltuvat ihon kautta annosteltaviksi transdermaalivalmisteiksi ihon ainutkertaisen imeytymisestä, stratum corneumin eli sarveiskerroksen, takia. Tieto lääkeaineiden ominaisuuksien ja ihon rakenteen vaikutuksesta imeytymiseen karttuu kasvavalla vauhdilla. Monissa transdermaalitutkimuksissa painopisteenä onkin nykyään permeabiliteetin ennustaminen ihon läpi jo lääkeaineen molekyyliarakenteen perusteella. Tavoitteena tutkijoilla on löytää luotettava ja käytännöllinen matemaattinen malli, joka arvioi yhdisteen farmakokineettisiä ominaisuuksia jo varhaisessa tuotekehityksen vaiheessa säästämällä kokeellisissa tutkimuksissa kuluva aikaa ja rahaa. Mekanistisista malleista johdetuilla kvantitatiivisilla rakenne—permeabiliteetti suhde (QSPR) -analyysillä ja -malleilla on saatu hyviä korrelaatioita olemassa olevan kokeellisesti määritetyn permeabiliteettiaineiston kanssa. QSPR-tutkimukset osoittavat fysikokemiallisista ominaisuuksista rasvaliukoisuuden ja molekyylikoon olevan päätekijöitä ihon läpi imeytymisen ennustamisessa, mutta oma painoarvonsa on myös vetysidoskapasiteetilla. Ongelmia mallien kehittämiseksi tuottavat kokeellisen permeabiliteettiaineiston luotettavuus, yhtälön parametrien rinnakkaisuus sekä suurimolekyyliainepainoisten ja vesiliukoisten lääkeaineiden imeytymisen ennustaminen. Lisätutkimuksia vaaditaan, jotta tulevaisuudessa voidaan nopeasti ja luotettavasti seuloa potentiaalisia lääkeainekandidaatteja ihon kautta tapahtuvaan lääkintään yhdisteen molekyyliarakenteen perusteella.

Tutkielman kokeellisessa osassa vertailtiin kahden eri imeytymisen ediste -parin (SDS:PP ja MP:DPC) eri yhdistelmien vaikutusta vesiliukoisen sakkaroosin ja rasvaliukoisen kortikosteronin läpäisyyn ihmisen eristetyn ihon ja rotan epidermiksen keratinosyyteistä kasvatetun REK-solumallin läpi. Tutkimuksessa selvitettiin myös, voidaanko impedanssimittausten perusteella arvioida yhdistelmien tehokkuutta imeytymisen edistämisessä. REK-soluja viljeltiin 6-kuoppalevyillä kollageenialustalla ilma/neste - rajapinnassa kolme viikkoa, jonka aikana ihon kaltainen imeytymisestä muodostui solukon pinnalle. Permeabiliteettikokeet (94 h) suoritettiin “side-by-side” -diffuusiokammioilla ja näytteet analysoitiin nestetuikelaskurilla. Tulosten perusteella imeytymisen edisteistä SDS:PP oli tehokkaampi yhdistelmä kuin MP:DPC. Yhdistelmien teho oli eri lääkeaineille erilainen riippuen yhdistelmien vaikutusmekanismista ja lääkeaineiden ominaisuuksista. REK-solukon ja eristetyn ihon välisen korrelaation mukaan solumallilla voidaan saada luotettavia arvioita etenkin rasvaliukoisen lääkeaineen imeytymisestä. Impedanssin puolestaan todettiin kuvaavan melko hyvin edisteiden tehoa soluilla, mutta iholla ei vastaavaa korrelaatiota havaittu ihojen välisten suurten erojen takia. Rinnakkaisten kokeiden määrän tulisi kuitenkin olla suurempi luotettavampien tulosten aikaansaamiseksi.

**AVAINSANAT:** permeabiliteetti, fysikokemialliset ominaisuudet, QSPR-analyysi, REK-solumalli, imeytymisen ediste

---

# IN SILICO PREDICTION OF AFFINITY TO THE PEPT1 CARRIER SYSTEM USING INHIBITION DATA OF GLY-SAR UPTAKE IN CHO CELLS

Marko Kaija

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki

---

**Purpose.** To develop a scintillation proximity assay to obtain hPepT1 inhibition data, and to use the data obtained to build a computational model capable of predicting affinity to the human H<sup>+</sup>/oligopeptide co-transporter, hPepT1.

**Background.** The hPepT1 carrier protein is a high capacity and low affinity transporter responsible for absorption of dietary di- and tripeptides. It is an attractive target for drug delivery of pharmaceuticals, because of its wide substrate specificity, including drug compounds, such as  $\beta$ -lactam antibiotics and ACE inhibitors. An affinity screening tool is required for designing compounds targeted to this transporter.

**Methods.** Interaction with the hPepT1 was studied using CHO-hPepT1 and CHO-K1 cells. Uptake kinetics of [<sup>3</sup>H]GLy-Sar in these cells was determined by development of a scintillation proximity assay using the Cytostar-T 96 well plates. The uptake kinetics of Gly-Sar were monitored under several passages. Inhibition of [<sup>3</sup>H]GLy-Sar uptake was then determined for 27 structurally diverse compounds. ALMOND program was used to generate molecular descriptors for the test compounds and to build an 3D-QSAR model for prediction of hPepT1 affinity.

**Results.** Depending on passage, K<sub>m</sub> values between 0.51 and 0.84 mM were obtained in the GLy-Sar uptake assays. V<sub>max</sub> of the GLy-Sar transport in the CHO-hPepT1 cell Line was observed to decrease from 23 pmol/h to 11 pmol/h between passages 10 and 17. K<sub>i</sub> values ranging from 0.03 to 154 mM were obtained for the 27 test compounds in the inhibition assay. A preliminary *in silico* model with r<sup>2</sup>=0.89 and q<sup>2</sup><sub>LOO</sub>=0.71 was obtained.

**Conclusions.** The CHO-hPepT1 cell line is a suitable tool to investigate interactions with the peptide transporter. Due to the decreasing transport capacity of the hPepT1, it is not recommended to perform transport experiments after the 15th passage. The scintillation proximity assay using the Cytostar-T technology can be used for producing [<sup>3</sup>H]GLy-Sar uptake and inhibition data with the CHO-hPepT1 cell line. A preliminary *in silico* model capable of predicting affinities to the hPepT1 transporter and discriminating potent inhibitors from other compounds was obtained.

Keywords: PepT1; CHO cells; GLy-Sar; Cytostar-T; inhibition of uptake; molecular modelling; GRIND descriptors

---

# KALORIMETRINEN TUTKIMUS HUOKOISEN PIIN KÄYTTÄYTYMISESTÄ SIMULOIDUISSA KEHONESTEISSÄ

**Tommi Pesonen**

Teollisuusfysiikan laboratorio, Fysiikan laitos, Turun yliopisto

---

Tutkielmassa on perehdytty huokoisen piin käyttäytymiseen kehon sisäisissä olosuhteissa, joita mallinnettiin erilaisilla simuloituilla kehonesteillä. Työn teoriaosuudessa on käsitelty huokoista piitä, sen bioyhteensopivuutta, ruuansulatusjärjestelmää sekä lääkeaineiden annostelumenetelmiä. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää miten huokoisen piin kalvot ja mikropartikkelit käyttäytyisivät ruuansulatusjärjestelmässä sekä ihonalaisissa olosuhteissa. Tutkielman lopuksi tarkasteltiin saatujen tulosten perusteella huokoisen piin soveltumista lääkeaineiden annosteluun.

Tutkimuksessa käytettiin isotermistä mikrokalorimetriä (2277 TAM), jonka avulla tarkkailtiin näytteissä tapahtuvien reaktioiden lämpövirtoja eri liuoksissa. Käytetyt liuokset olivat keinotekoinen kudosteneste (SBF, Simulated Body Fluid), keinotekoinen mahaneste (SGF, Simulated Gastric Fluid) sekä keinotekoinen suolistoneste (SIF, Simulated Intestinal Fluid). Lämpövirtamittauksien lisäksi huokoisen piin kalvoja pidettiin koeputkissa eri liuoksissa tarkkaillen niiden massojen muutoksia eri aikaväleihin. Tutkimuksessa käytettiin sekä käsittelemättömiä että jälkikäsiteltyjä huokoisen piin näytteitä. Jälkikäsitellyt näytteet olivat termisesti oksidoituja, termisesti karbidoituja tai hydrosilyloituja.

Huokoisen piin liukenemisen havaittiin etenevän oksidoitumisen kautta ja termisesti oksidoidut näytteet liukenivatkin selvästi kaikki muita näytemuotoja nopeammin. Yleisesti ottaen näytteissä havaittua liukenemisprosessia karakterisoi näytteen pinnan oksidoitumisesta johtuva suhteellisen nopea massan kasvu, mitä seuraa massan pieneneminen oksidoituneen kerroksen liuetessa. Oksidoitumisen estävät jälkikäsitelyt, kuten terminen karbidointi ja hydrosilylointi, estivät tulosten mukaan myös liukenemisprosessin alkamisen. Lämpövirtamittauksilla havaittiin kuitenkin termisen karbidoinnin epäonnistuneen tässä tutkimuksessa käytettyjen huokoisen piin partikkelien tapauksissa.

Keinotekoisien mahanesteen ei havaittu vaikuttavan merkittävästi huokoiseen piihin. Sen sijaan keinotekoinen kudosten- ja suolistoneste liuottivat käsittelemättömiä huokoista piitä. Keinotekoinen kudosteneste ei kuitenkaan liuottanut pienen huokoisuuden omaavia näytteitä. Lääkeaineiden annostelumenetelmiin liittyvien jatkotutkimusten kannalta mielenkiintoisimmiksi huokoisen piin näytetyiksi osoittautuivat termisesti oksidoidut sekä termisesti karbidoidut näytteet. Termisesti oksidoidut näytteet havaittiin biohajoaviksi ja termisesti karbidoidut kalvot erittäin stabiileiksi.

Asiasanat: Huokoinen pii, liukeneminen, lääkeaineiden annostelu, oksidoituminen

---

# KATIONISET LIPOSOMIT GEENINSIIRTOVEKTOREINA

**Sanna Huttunen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Geeniterapialla pyritään parantamaan geenivirheistä tai jonkun proteiinin virheellisestä tuotannosta soluissa aiheutuvia sairauksia. Haluttua proteiinia koodaava geeni siirretään soluihin, jonka jälkeen geeni alkaa tuottaa puuttunutta tai liian vähän tuotettua proteiinia. Geeni voidaan siirtää eli transfektoida soluihin useilla eri menetelmillä, Vektoreina voidaan käyttää mm. viruksia, kationisia liposomeja, kationisia polymeerejä, proteiineja ja peptidejä. Eniten käytettyjä ja tutkittuja geeninsiirtovektoreita ovat virukset. Ne ovat tehokkaita, mutta niiden tuotantoon ja turvallisuuteen liittyy ongelmia.

Ei-virusvälitteiset geeninsiirtovektorit ovat melko turvallisia ja helppoja tuottaa, mutta suurin ongelma on niiden tehottomuus. Ei-virusvälitteisessä geeniterapiassa käytetään useimmiten plasmidi DNA:ta, joka on kaksisäikeisestä DNA:sta koostuva rengasrakenteinen molekyyli. Plasmidi DNA ei negatiivisen varauksensa ja suuren kokonsa takia läpäise tehokkaasti biologisia esteitä, kuten solukalvoja.

Kationiset, positiivisesti varautuneet, liposomit sitovat negatiivisesti varautunutta DNA:ta samalla tiivistäen sen ja muodostaen kantaja/DNA kompleksin. Negatiivisesti varautuneen solukalvon ja positiivisesti varautuneen kompleksin interaktion uskotaan johtavan endosytoosiin, jolloin solu ottaa kompleksin sisäänsä ja alkaa onnistuneen transfektion seurauksena tuottaa haluttua terapeutista proteiinia.

Työn tarkoituksena oli parantaa ja selvittää kantaja/DNA kompleksien ominaisuuksia. Ensimmäisessä osassa tutkittiin, miten polylysiinin määrä vaikuttaa kantaja/DNA kompleksien kokoon ja transfektio-ominaisuuksiin. Toisessa osassa pyrittiin valmistamaan stabiileja kantaja/DNA komplekseja dialyysin avulla ja kolmannessa osassa tutkittiin miten kahden viikon säilytys vaikuttaa käytettyjen kantaja/DNA kompleksien kokoon ja transfektio-ominaisuuksiin. Kantajien geeninsiirtotehokkuus määritettiin ONPG-menetelmällä, kantajien toksisuus soluille MTT-menetelmällä ja kantaja/DNA kompleksien koko valonsirontaan perustuvalla Nicomp-menetelmällä. DNA:n sitoutumista kantajiin tutkittiin agarosigeelielektroforeesilla.

Polylysiini paransi kantajien transfektio-ominaisuuksia, pienensi kantaja/DNA kompleksien kokoa sekä paransi DNA:n sitoutumista kantajiin. Dialyysillä valmistettujen kompleksien valmistus osittain epäonnistui, eikä transfektio-ominaisuuksien säilymistä voitu todeta. Kahden viikon säilyvyyskoeksissa saatiin lupaavia tuloksia joillakin kantajilla. Kompleksien transfektio-ominaisuuden säilyvyys tulisi kuitenkin testata useammilla rinnakkaismäärityksillä, jotta tuloksista voitaisiin olla varmoja.

Avainsanat: geeniterapia, plasmidi, kationinen liposomi, transfektio



---

# LÄMPÖTILAN JA SUHTEELLISEN KOSTEUDEN VAIKUTUS ISOTHERMISELLÄ MIKROKALORIMETRILLÄ TEHTÄVIIN AMORFISUUSMÄÄRITYKSIIN

**Susanna Olli**

Teollisuusfysiikan laboratorio, Fysiikan laitos, Turun yliopisto

---

IMC-mittaukset suoritettiin seitsemällä erilaisella laktoosijauheella. Mittaukset tehtiin kuudessa eri suhteellisessa kosteudessa 25 °C:n lämpötilassa. Tämän lisäksi tutkittiin lämpötilan vaikutusta amorfisuusasteen määrittämiseen 25 °C:ssa, 50 °C:ssa ja 75 °C:ssa. Jokaisessa lämpötilassa mittaukset tehtiin käyttäen useampaa kosteuspitoisuutta. Laktoosinäytteiden amorfisuusaste määritettiin myös röntgendifraktiolla (XRD) ja hygroskooppisuuden määrittämlaitteella (HMA).

Uudelleenkiteytymisen alkamiseen tarvittavan ajan havaittiin vähenevän suhteellisen kosteuden ja mittauslämpötilan kasvaessa. Uudelleenkiteytyminen näkyi IMC:n lämpövirtasignaalin eksotermisinä piikkeinä, joiden pinta-alan perusteella määritettiin laktoosin kiteytymisprosessiin liittyvä energia. Tämä energia näytti kasvavan, kun mittauslämpötila nousi tai suhteellinen kosteus pieneni. Kiteytymisprosessiin liittyvän energian ja aineen amorfisuusasteen pitäisi olla suhteellisesta kosteudesta riippumattomia, mutta korkean suhteellisen kosteuden nopeuttaessa reaktiota varsinaisen uudelleenkiteytymisreaktion erottaminen veden höyrystymiseen ja absorboitumiseen liittyvistä reaktioista oli vaikeaa, jolloin oikean tulkinnan tekeminen vaikeutui. Korkeissa lämpötiloissa riittää pienempi vesimäärä uudelleenkiteyttämään laktoosinäytteen, jolloin myös veden desorptio näytteestä pienenee. Tällöin uudelleenkiteytymiseen liittyvä kokonaisenergia jää suuremmaksi kuin matalammissa mittauslämpötiloissa.

IMC:n RH-yksiköllä tehtyjen mittausten mukaan mitä korkeampi mittauslämpötila on, sitä alhaisemmassa kosteuspitoisuudessa uudelleenkiteytyminen alkaa. Lisäksi amorfisen aineen lasisiirtymälämpötila pienenee Gordon-Taylor-yhtälön ennustamalla tavalla suhteellisen kosteuden lisääntyessä.

IMC:lla pystyttiin mittaamaan alle 3 %:n amorfisuuksia, mutta, koska IMC antaa vasteen kaikille sen näytetilassa tapahtuville reaktioille, erityistä huomiota oli kiinnitettävä näytteenkäsittelyyn ja tulosten tulkintaan. IMC:n rinnalla kannattaakin käyttää muita analyysimenetelmiä tulosten tulkitsemiseksi luotettavasti. IMC:n eri parametrien tutkiminen on laaja aihe, joten jatkotutkimusten tekeminen on suositeltavaa yksityiskohtaisemman tiedon saamiseksi laktoosin käyttäytymisestä.

Asiasanat: isoterminen, mikrokalorimetria, amorfinen, laktoosi, lasisiirtymä, kiteytyminen

---

# LÄÄKEAINEEN VAPAUTUMINEN YKSITTÄISISTÄ PELLETEISTÄ

**Marko Kuosmanen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Kokeellisen osan tarkoituksena on esitellä vaihtoionivirtaan (alternating ionic current, AIC) perustuva menetelmä, jolla voidaan tutkia lääkeaineen vapautumista yksittäisistä pelleteistä. AIC menetelmän käyttökelpoisuus osoitettiin tutkimalla kahden erilaisen liukoisuuden omaavan lääkeaineen (natriumkloridi tai salisyylihappo) vapautumista yksittäisistä, mikrokiteisestä selluloosasta koostuvista, pelleteistä. Erikoistyö sisälsi myös tutkittavien pellettien valmistamisen ja karakterisoinnin. Tutkittavat pelletit olivat huokoisuudeltaan kahdenlaisia. Koesysteemissä lääkeaine vapautuu systeemissä kiertävään väliaineeseen, mikä ohjataan mittauksia varten johtokykykennoon. Johtokykykennossa mitataan lääkeaineen sähkönjohtokyky, jonka avulla vapautuneen lääkeaineen pitoisuus ja määrä voidaan laskea. Väliaineen kierrätysnopeudet mittaussysteemissä olivat kahdenlaisia. Lääkeaineen vapautumisnopeus määritettiin parametrin  $t_{50\%}$  avulla, jolloin puolet alkuperäisestä pelletin sisältämästä lääkeainemäärästä on vapautunut. Näihin arvoihin vertaamalla suoritettiin varianssi-analyysi (ANOVA), jossa kolmen tekijän (huokoisuus, liukoisuus ja väliaineen kierrätysnopeus) vaikutusta tarkasteltiin kahdella arvotasolla (suuri/pieni).

Vaikka lääkeainemäärät yksittäisissä pelleteissä olivat pieniä (noin 30  $\mu\text{g}$ /pelletti), AIC menetelmän avulla saadaan riittävän laadukkaita tuloksia tarkoituksenmukaisten johtopäätösten tekemiseen. Tulosten perusteella lääkeaineen vesiliukoisuus vaikuttaa lääkeaineen vapautumiseen yksittäisestä pelletistä ( $p < 0.001$ ). Huonosti liukenevaa lääkeainetta sisältävillä pelleteillä myös pelletin huokoisuus vaikuttaa lääkeaineen vapautumiseen, mitä ei havaita lääkeaineen vesiliukoisuuden ollessa hyvä. Väliaineen kierrätysnopeudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta lääkeaineen vapautumiseen. Tulokset osoittavat, että AIC menetelmän avulla voidaan määrittää lääkeaineen vapautumista erilaisista yksittäisistä pelleteistä, mutta lisätutkimuksia tarvitaan väliaineen kierrätysnopeuden vaikutusten selvittämiseksi.

Avainsanat: vaihtoionivirta, sähkönjohtokyky, lääkeaineen vapautuminen, yksittäiset pelletit

---

# LÄÄKEAINEEN VAPAUTUMISTA MATRIISIRAKENTEISISTA VALMISTEISTA KUVAAVAT MATEMAATTISET MALLIT

**Marko Kuosmanen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Lääkeaineen vapautumisen matemaattinen mallintaminen on tärkeä osa säädellysti lääkeainetta vapauttavien matriisirakenteisten polymeerijärjestelmien suunnittelu- ja tuotekehitystyötä. Matemaattisen mallintamisen avulla saadaan nopeasti informaatiota vapautumistapahtumasta ja parhaimmillaan se on helpottanut merkittävästi lääkeaineen vapautumisen optimointia sekä uusien lääkevalmisteiden kehittämistä. Lääkeaineen vapautumista, erityisesti matriisirakenteisista polymeerijärjestelmistä, kuvaavia matemaattisia malleja ja teorioita on kehitetty useita.

Useimmat lääkeaineen vapautumista kuvaavat mallit perustuvat Fickin laeista johdettuihin diffuusioyhtälöihin, sillä aineen siirtyminen polymeerimatriisissa tapahtuu diffuusiolla. Lääkeaineen vapautumista polymeerirakenteisista matriisivalmisteista kuvaavat matemaattiset mallit voidaan jaotella vapautumismekanismien mukaisesti. Nämä ovat lääkeaineen diffuusio polymeerimatriisin läpi, polymeerin hajoamisesta johtuva eroosio sekä polymeerimatriisin turpoaminen tai turpoaminen ja liukeneminen yhdessä. Lääkeaineen vapautuminen ei ole kuitenkaan aina pelkästään aineen siirtymistä, eikä aineen siirtyminen puhdasta diffuusiota. Diffuusioyhtälöiden soveltaminen matemaattiseen malliin ja mallin antamien tulosten oikea tulkinta riippuvat aina itse vapautumismekanismista, lääkevalmisteesta sekä olosuhteista vapautumisen aikana.

Avainsanat: lääkeaineen säädelty vapautuminen, matriisirakenteiset systeemit, vapautumismekanismit, matemaattiset mallit, diffuusioyhtälöt

---

# MECHANICAL STRENGTH PARAMETERS AND DISINTEGRATION OF SOME TABLET EXCIPIENTS (DILUENTS) CONTAINING SUPER DISINTEGRANTS. DEVELOPMENT OF MAGNETIC MONITORING SYSTEM FOR QUANTITATIVE DISINTEGRATION ASSESSMENT

**Jenni Suometsä**

Farmasian teknologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto

---

Työn tarkoituksena oli selvittää tablettien hajoamista ja mekaanista lujuutta eri täyte- ja hajotusaine yhdistelmillä. Pyrkimyksenä oli myös kehittää uusi magneettinen tarkkailulaite disintegraation kvantitatiiviseen arviointiin. Samankaltaista magneettilaitetta on aiemmin käytetty menestyksellisesti hajoamisprosessin arvioinnissa sekä hajoamismekanismien selvittämisessä.

Tabletit valmistettiin suorapuristusmenetelmällä. Valmistukseen käytettiin kuutta eri täyteainetta: kolmea erilaista laktoosia (laktoosimonohydraattia, sumukuivattua laktoosimonohydraattia sekä vedetöntä laktoosia), sorbitolia, kalsiumvetyfosfaattia sekä hydrattua kasviöljyä. Hajotusaineita oli neljä: natriumkarboksimeetyyliselluloosa ja sen ristosidottu johdos (Ac-Di-Sol), ristosidottu polyvinyylipyrrolidoni ja tärkkelysjohdannainen (Primojel). Jokaisesta täyteaineesta tehtiin jokaisen hajotusaineen kanssa sekoitus kolmella eri pitoisuustasolla: 98 / 2 %, 96,5 / 3,5 % sekä 95 / 5 %. Lisäksi tablettien huokoisuutta muutettiin kolmella tasolla.

Hajoamisaika testattiin USP -menetelmällä vedessä, 37 asteen lämpötilassa. Uutta menetelmää kehitettiin ja myös käytettiin hajoamisen mittaukseen. Tablettien mekaaninen lujuus määritettiin radiaalilla puristustestillä.

Täyteaine valinta vaikutti selvästi tablettien hajoamiseen. Suurta eroa liukoisuudeltaan poikkeavien täyteaineiden välillä ei ollut, mutta hygroskooppisuuden ja hydrofobisuuden negatiivinen vaikutus oli selvästi havaittavissa. Myös huokoisuuden muutoksella oli suuri vaikutus tablettien hajoamisnopeuteen. Hajotusaineen pitoisuuden lisäys nopeutti tablettien hajoamista, vaikka se useimpien täyteaineiden osalla oli erittäin nopeaa jo pienimmällä kahden prosentin pitoisuudella. Hajotusaineiden välillä ei ollut suuria tehoeroja huolimatta niiden erilaisista ominaisuuksista. Vain natriumkarboksimeetyyliselluloosa oli teholtaan selvästi muita heikompi. Tärkeimmät hajotusaineiden ominaisuudet olivat voimakas hydrofiilisyyden ja vedenottokyky. Turpoaminen ei ole välttämätön ominaisuus tehokkaalle hajotusaineelle.

Täyteaine valinta vaikutti myös tablettien lujuuteen. Lujuus heikkeni seuraavassa järjestyksessä kalsiumvetyfosfaatti > sorbitoli > laktoosi > hydrattu kasviöljy. Huokoisuuden muutos vaikuttaa erittäin voimakkaasti lujuuteen, kaikkien tablettien lujuus kasvoi voimakkaasti huokoisuuden vähetessä. Hajotusainevalinnalla tai -pitoisuudella ei ollut selvää vaikutusta. Korkein pitoisuus näytti hieinan heikentävän lujuutta. Muista parametreista arvioitiin tablettien deformaatio-ominaisuuksia. Sorbitoli muotoutuu pääasiassa plastisesti, Emcompress ja laktoosit plastisesti sekä fragmentoitumalla.

Magneettimenetelmä näyttää lupaavalta, mutta kaipaavaa vielä kehittämistä. Kaikkia saatuja tuloksia ei pystytty arvioimaan ja mittauksia ei tähän mennessä ole suoritettu tarpeeksi.

Avainsanat: Tablet, disintegration, mechanical properties, diluents, disintegrants, magnet monitoring

---

# NISÄKÄSSOLUJEN SÄILÖMINEN POLYMEERISISSA BIOMATERIAALEISSA KYLMÄKUIVAAMALLA

**Johanna Kuokkanen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Kudosteknologia on tällä hetkellä yksi haastavimmista terapia-alueista, joka vaatii useiden eri tieteen ja tekniikan alojen yhteistyötä, kuten esimerkiksi polymeerikemiaa, soluviljely- ja elinsiirto-tekniikkaa. Kudosteknologian tavoitteena on kehittää biologisia korvikkeita vahingoittuneelle kudokselle, jotka säilyttävät tai parantavat sen toimintaa.

Kylmäkuivaus on yleisesti käytetty menetelmä biomateriaalien säilömiseen. Kylmäkuivauksessa liuotin sublimoituu jäädytetystä näytteestä. Loput näytteeseen jääneestä vedestä haihdutetaan loppukuivauksen aikana, jolloin syntyy kuiva ja huokoinen materiaali. Laatu, stabiilius sekä muut kylmäkuivattavan materiaalin ominaisuudet ovat riippuvaisia kylmäkuivausprosessin onnistumisesta.

Kirjallisuusosuudessa on kerätty tietoa asioista, joita tulee huomioida suunniteltaessa eläviä nisäkässoluja sisältävien biomateriaalien kylmäkuivausprosessia. On erityisen tärkeää, että solujen elävyys saadaan säilytettyä sekä polymeerisen biomateriaalin ominaisuudet palautettua myös kylmäkuivauksen jälkeen. Jotta ihanteellinen kylmäkuivausprosessi voidaan suunnitella ja toteuttaa, täytyy kuivattavan formulaation kriittiset ominaisuudet tietää, sekä osata soveltaa tätä tietoa prosessin suunnittelussa.

Tutkielman kokeellisessa osuudessa kapseloitiin eri molekyylipainoisia fluoreseiiniisotiosyanaatilla (FITC) leimattuja dekstraaneja sekä alkaalista fosfataasia erittäviä ihmisen pigmenttiepiteelisoluja biohajoavaan alginaattigeeliin. Kapselit päällystettiin poly-L-lysiinillä tai kationoidulla tärkkelyksellä. Kylmäkuivattujen ja elvytettyjen kapseleiden ominaisuuksia tutkittiin elektronimikroskopiolla sekä konfokaali-kuvantamisella. FITC-dekstraanien vapautumista kapselista seurattiin ennen kylmäkuivausta ja sen jälkeen. Kapseloitujen solujen elävyyttä tutkittiin fluoresenssiin perustuvien värjäysmenetelmien avulla sekä seuraamalla solujen SEAP-tuotantoa.

Tuloksena havaittiin FITC-dekstraani malliaineen vapautumisen hidastuminen kylmäkuivauksen jälkeen. Fluoresenssiin pohjautuvien värjäysten perusteella kylmäkuivatut kapseloidut solut elpyivät hyvin sekä elävyys säilyi suhteellisen hyvänä myös pitkäaikaisen säilytyksen jälkeen. Kuivattujen kapselisolujen SEAP-tuotannon havaittiin vähenevän huomattavasti verrattaessa kontrolli kapselisolujen proteiinituotantoon.

Tehokkaamman säilömismenetelmän kehittäminen on tärkeä teknologian osa-alue, kun soluja sisältäviä materiaaleja halutaan saada markkinoille. Suunnittelemalla hyvin optimoitu kylmäkuivausprosessi ja toteuttamalla se onnistuneesti, biomateriaalien säilytys- sekä varastointiongelmien ratkaisuksi.

Avainsanat: kudosteknologia, kylmäkuivaus, biomateriaalit, kapselointi, säilöminen

---

# PERORAALILÄÄKINNÄSSÄ KÄYTETTÄVIEN LÄÄKEAINEIDEN LIUKOISUUS JA SEN PARANTAMINEN

**Eeva-Leena Ryyänen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään suun kautta annosteltavien lääkeaineiden liukoisuutta ja sen parantamista. Huono vesiliukoisuus on uusilla lääkeainekandidaateilla yhä yleisempää, koska nykyisillä lääkekehitysteknologioilla saadaan aikaan rasvaliukoisia yhdisteitä. Ongelmaan on löydettävä ratkaisu, koska vain liennut lääke voi imeytyä ruoansulatuskanavasta.

Niukkaliukoisten lääkeaineiden liukoisuutta voidaan parantaa Noyes - Whitneyyn yhtälön mukaan joko lisäämällä liukenevan aineen pinta-alaa ( $A$ ) tai sen liukoisuutta ( $C_s$ ). Lääkeaineen liukoisuutta voidaan parantaa muuttamalla sen kemiallisia tai fysikaalisia ominaisuuksia, valitsemalla lääkevalmisteeseen liukoisuutta edistäviä apuaineita sekä formuloinnin avulla.

Kemiallisia liukoisuuden edistämismenetelmiä ovat suolamuodostus ja aihiolääketeknologia. Fysikaalis-kemialliseen muotoon voidaan vaikuttaa muuttamalla lääkeaineen kidemuotoa (polymorfia, pseudopolymorfia, amorfia). Fysikaalisen olomuodon, esimerkiksi hiukkaskoon, muuttamiseen on olemassa useita menetelmiä. Liukoisuuden parantamisessa voidaan hyödyntää lääkeaineen ja apuaineen välisiä vuorovaikutuksia. Kiinteässä dispersiossa niukkaliukoinen lääkeaine dispergoidaan vesiliukoisen apuaineen muodostamaan matriisiin. Tällä voidaan vaikuttaa lääkeaineen hiukkaskoon, kostumiseen, aggregoitumisen estoon ja kidemuotoon. Huonosti veteen liukeneva lääkeaine voidaan solubilisoida usealla tavalla. Syklodekstriini muodostaa lääkeaineen kanssa inkluusiokompleksin, jolloin lääkeaine liukenee paremmin, sen kostuvuus paranee sekä kiteisyysaste voi muuttua. Solubilisoiivia apuaineita ovat myös pinta-aktiiviset aineet, lipidit ja keraliuttimet.

Paras liukoisuuden edistämiskeino on kiteisen lääkeaineen muuttaminen amorfiseksi. Amorfisen muodon liukoisuusominaisuudet ovat ylivertaiset kiteiseen muotoon verrattuna. Kiteinen lääkeaine voidaan muuttaa amorfiseksi tavallisilla farmaseuttisilla valmistus- ja formulaatiomenetelmillä. Metastabiili amorfinen muoto on kuitenkin stabiloitava. Kiinteä dispersio on tehokas liukoisuuden edistämismenetelmä, jolla kiteisestä lääkeaineesta saadaan helposti aikaan stabiloitu amorfinen lääkeaine.

Avainsanat: niukkaliukoisuus, aihiolääke, amorfisuus, hiukkaskoko, kiinteä dispersio, syklodekstriini

---

# PER ORAAISET KONTROLLOIDUSTI LÄÄKEAINETTA VAPAUTTAVAT MONIYKSIKKÖVALMISTEET

**Minna Heiskanen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Per oraaliset kontrolloidusti lääkeainetta vapauttavat moniyksikkövalmisteet ovat viime vuosien aikana olleet kiinnostuksen kohteena, koska ne tarjoavat uusia mahdollisuuksia esimerkiksi sekä mahassa hajoavien että niukkaliukoisten lääkeaineiden formulointiin. Moniyksikkövalmisteet koostuvat perusvalmisteista, joita ovat rakeet, pelletit, mikropartikkelit ja minitabletit. Valmisteet jaetaan käyttötarkoituksen perusteella pitkävaikutteisiin ja paikkaspesifisiin valmisteisiin. Pitkävaikutteisista valmisteista tyypillisin on rakeita tai pellettejä sisältävä kapseli. Tabletit kapselissa -valmisteet kilpailevat suosiosta rakeiden ja pellettien kanssa, koska muun muassa minitablettien päällystämisen on yksinkertaisempaa. Suurempi kiinnostus kohdistuu kuitenkin paikkaspesifisiin valmisteisiin, joita ovat mahassa kelluvat sekä ohut- ja paksusuoleen kohdenneet valmisteet.

Moniyksikkövalmisteissa käytettäviä tärkeimpiä apuaineryhmiä ovat täyte- ja hajotusaineet sekä polymeerit. Täyteaineilla valmisteen koko optimoidaan potilasta tai tabletointiprosessia varten sopivaksi, kun taas hajotusaineet edesauttavat tabletin tai kapselin hajoamista, jotta niiden sisältämät perusvalmisteet vapautuvat itsenäisiksi lääkeainetta vapauttaviksi yksiköiksi. Polymeerejä käytetään lääkeaineen vapautumisen säätelyyn. Apuaineilla onkin suun vaikutus lopullisen valmisteen ominaisuuksiin.

Kokeellisen osan tavoitteena oli kehittää säädellyllä nopeudella kontrolloidusti erodoituva tärkkelysasetaatista valmistettu matriisitabletti, josta lääkeaine vapautuu 0. kertaluvun kinetiikkaa noudattaen. Lääkeaineen, N-asetyyli-D-glukosamiinin (NAG), vapautumista fysikaalisista jauheseoksista puristetuista tableteista pyrittiin linearisoimaan hajotusaineena käytetyn crosprovidonin avulla. Tabletit eivät kuitenkaan erodoituneet toivotulla tavalla, eikä malliaineen vapautuminen noudattanut selkeästi 0. kertaluvun kinetiikkaa. Tasaisempi vapautuminen pyrittiin aikaansaamaan agglomeroimalla lääke- ja apuaine keskenään, minkä jälkeen muodostuneiden agglomeraattien pinnalle lisättiin vielä hajotusaine ennen tabletointia. Tämän tarkoituksena oli, että agglomeraattien pinnalla oleva hajotusaine aikaansaisi tabletin hajoamisen ja agglomeraattien dispergoitumisen ja siten lääkeaineen tasaisen vapautumisen. Kokeiden tulokset olivatkin osittain lupaavia. NAG:n vapautuminen hidastui agglomeroinnin seurauksena ja lääkeaineen vapautuminen noudatti 0. kertaluvun kinetiikkaa aina kolmeen tuntiin saakka. Tabletit myös erodoituivat pinnalta. Tuloksia ei kuitenkaan onnistuttu toistamaan toisella lääkeaineella, mikronoidulla nitsatidiinilla, koska vapautumiskokeissa käytetyt formulaatiot erodoituivat liian nopeasti johtuen liian suurista hajotusainepitoisuuksista.

Avainsanat: Moniyksikkövalmiste, kontrolloitu vapautuminen, matriisitabletti, hajotusaine, agglomerointi

---

# SKIN HYDRATION AND NATURAL MOISTURISING FACTOR

**Johanna Kahma**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

The natural moisturising factor is important for water-binding property of the stratum comeum, while the lipids are influenced to water-holding property. Both are in crucial role holding the normal barrier function. The water content in stratum corneum is approximately 15 %, it maintains softness and flexibility of the skin. The lower water content increases molecular rigidity and the greater water content facilitates the removal of natural moisturising factor and may increase stratum comeum permeability.

In skin three different kind of water exists, tightly bound water (up to 10 %) is bounded to the polar sites of the proteins in the inner compartments of the comeocytes. The secondary bound water (10 — 35 %) is hydrogen bonded around the protein bound water. And the third class of water (above 35 %) is free water, forming water pools where the water molecules are bound together forming tetrahedron structure.

A low environmental humidity, stress, age and some diseases can involve to altered skin conditions. Moisturisers are used to smooth the skin, but the effect is short-lived and they only can protect skin, not repair damages. New methods have been developed to repair damaged skin: the mixture of physiological lipids, protease inhibitors, salts and internal products.

Avainsanat: Skin, natural moisturising factor, skin hydration, dry skin



---

# SUUSSA HAJOAVAT VALMISTEET

**Katja Klemetti**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Tavallisin tapa annostella lääkeaineita on per os annostelu. Perinteisiin tablettivalmisteisiin verrattuna suussa hajoavien valmisteiden etuna on, että niiden annostelussa ei tarvita vettä. Tästä on hyötyä monille potilasryhmille. Markkinoilla on useita suussa hajoavia valmisteita, jotka poikkeavat toisistaan ominaisuuksien, kuten liukenemisnopeuden ja lujuuden, suhteen. Erot johtuvat erilaisista valmistusteknologioista ja valmisteissa käytetyistä erilaisista apuainekoostumuksista. Keskeisimmät valmistusteknologiat ovat kylmäkuivaus ja suorapuristus. Kylmäkuivauksella tehdyt valmisteet liukenevat yleensä hyvin nopeasti, mutta menetelmän heikkoutena on valmistusprosessin kalleus. Käytettäessä suorapuristusta suussa hajoavien valmisteiden valmistukseen sopivan apuainekoostumuksen löytäminen on ratkaisevaa, jotta valmisteet saavuttavat toivotut ominaisuudet eli nopean hajoamisen ja riittävän lujuuden. Suussa hajoavien valmisteiden biofarmaseuttiset ominaisuudet voivat poiketa perinteisistä tableteista, joista lääkeaine imeytyy mahasta ja suolistosta. Suussa hajoavista valmisteista lääkeaine voi imeytyä jo suuontelosta, jolloin se ohittaa ensikierron metabolian päätyen suoraan systeemiseen verenkiertoon, tällöin voidaan saavuttaa suurempi hyötyosuus ja nopeammin alkava vaikutus.

Opinnäytetyöni kokeellisessa osiossa tutkin päällystämisen ja puristuspaineen vaikutusta lääkeaineen vapautumiseen tablettivalmisteesta. Lisäksi tutkittiin päällysteen vaikutusta lääkeaineen säilyvyyteen kiihdytetyissä stressiolosuhteissa. Lääkeaineena oli pseudoefedriini, joka päällystettiin polyvinyylialkoholi pohjaisella Opadry® II high performance-valmisteella. Päällystäminen suoritettiin leijupetimenetelmällä. Päällystetyistä rakeista ja mikrokiteisestä selluloosasta puristettiin tabletteja viidellä eri puristuspaineella, 30-280 MPa. Lääkeaineen vapautumista tableteista tutkittiin dissoluutiomenetelmällä. Päällystäminen ei vaikuttanut lääkeaineen vapautumiseen, mutta puristuspaineen nostaminen hidasti vapautumista. Päällyste näyttäisi suojaavaan lääkeainetta tablettimatriisin hajoamiselta.

Avainsanat: suussa hajoava, valmistusteknologia, tabletti, kylmäkuivaus, päällystäminen, maun peittäminen

---

# UUDELLA SUMUTUSMENETELMÄLLÄ VALMISTETTUJEN VAPAIEN KALVOJEN TUTKIMINEN

**Hanna Maria Kalliomäki**

Farmasian teknologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto

---

Kalvopäällystys on olennainen osa lääkevalmistusprosessia. Siinä kiinteä valmisteydin peitetään ohuella, yleensä 20-100 µm paksulla polymeerikalvolla. Kalvopäällysteellä voidaan peittää lääkeaineen makua, hajua tai väriä. Se muodostaa fysikaalisen ja kemiallisen suojan tablettiytimelle. Kalvopäällysteen avulla voidaan myös säädellä lääkeaineen vapautumista.

Päällystekalvoja valmistetaan liuottamalla kalvonmuodostajapolymeeri liuottimeen, tai mikäli kalvopolymeeri ei liukene käytettyyn liuottimeen, valmistetaan dispersio. Kalvo muodostuu polymeeriliuoksesta, kun liuottimen haihtuessa viskositeetti kasvaa ja polymeeriketjut asettuvat lähekkäin. Koheesiovoimat muodostavat sidoksia polymeerimolekyylien välille ja syntyy yhtenäinen kalvo. Polymeeridisversiosta kalvonmuodostus on monimutkaisempaa, koska veteen dispergoitujen polymeeripartikkelien on sulauduttava toisiinsa yhtenevän kalvon aikaansaamiseksi.

Kalvopäällysteiden tutkimiseen käytetään ns. vapaita kalvoja. Niitä voidaan valmistaa joko sumutus- tai valamistekniikalla. Kalvoista tutkitaan yleensä paksuus, mekaaninen kestävyys, läpäisyominaisuudet sekä mahdolliset kiteisyysmuutokset. Kalvopäällysteen muodostumiseen ja ominaisuuksiin vaikuttavat päällystysnesteen koostumus, prosessimuuttujat, olosuhteet, käytettävä laitteisto sekä tablettiydin. Uudella sumutukseen perustuvalla kalvopäällystysmenetelmällä voidaan samanaikaisesti valmistaa sekä vapaita kalvoja että päällystekalvoja tablettiytimen pinnalle. Työn tavoitteena oli tutkia uudella menetelmällä valmistettuja vapaita kalvoja sekä testata menetelmän toimivuutta.

Kalvopäällystyslaitteisto koostuu moottorista, moottorin säätimestä, moottorin pyörittämästä Teflon®-muotista, peristalttisesta pumpusta, pneumaattisesta suuttimesta ja lämpökuivaimesta. Muotissa on neljä paikkaa vapaille kalvoille ja 20 paikkaa päällystettävälle tableteille. Päällystysliuos pumpataan pumpulla säilytysastiasta letkun kautta suuttimelle, josta se sumutetaan paineilman avulla muottipöydälle.

Esikokeilla haettiin parhaita prosessimuuttujia ja päällystysnestekoostumusta menetelmään. Esikokeiden perusteella varsinaisiin kokeisiin valittiin 10 % (m/m) hydroksipropyylimetyyliselluloosaliuos (HPMC), joka sisälsi pehmitteenä glyserolia. Varsinaisessa kokeessa tutkittiin suutinkorkeuden ja muottipöydän pyörimisnopeuden vaikutuksia kalvojen paksuuteen, mekaaniseen kestävyteen ja pinnankarkeuteen. Havaittiin, että suutin-korkeudella on kaikkiin vasteisiin tilastollisesti merkitsevä vaikutus. Pyörimisnopeuden vaikutus ei ollut kaikissa vasteissa tilastollisesti merkitsevä. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että parhaimmat kalvot saatiin suutinkorkeudella n. 22,2 cm pyörimisnopeuden ollessa n. 3 kierr/min. Menetelmää testattiin myös käyttämällä uusia heraproteiiniliuoksia.

Menetelmällä voitiin samanaikaisesti valmistaa sekä vapaita kalvoja että päällystekalvoja tablettiytimen pinnalle, jolloin tutkittaviksi saatiin samoissa olosuhteissa valmistettuja vapaita kalvoja ja päällystettyjä tablettiytirniä. Laitteisto vaatii vielä kehittämistä, mutta jo nykyiselläänkin se osoittaa menetelmän toimivuuden.

Avainsanat: kalvopäällystys, vapaa kalvo, sumutusmenetelmä, HPMC, heraproteiini

---

# VESILIUKOISUUDEN VAIKUTUS LÄÄKEAINEEN VAPAUTUMISEEN TÄRKKELYSASETAATTITABLETISTA

**Eeva-Leena Ryyänen**

Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopion yliopisto

---

Tärkkelysasettaatti on uusi tablettien valmistuksessa käytetty apuaine. Sen avulla pystytään säätämään lääkeaineen vapautumista valmisteista. Tärkkelysasettaatin ominaisuuksia vapautumisen säätelyssä on tutkittu, mutta lääkeaineen ominaisuuksien vaikutus vapautumiseen on jäänyt vähemmälle huomiolle.

Erikoistyön tarkoituksena oli selvittää vesiliukoisuuden vaikutus lääkeaineen vapautumiseen tärkkelysasettaattimatriisista. Erikoistyön koeasetelmassa vesiliukoisuuden vaikutus pyrittiin saamaan esiin muuttamalla tabletin huokoisuutta tai käyttämällä tabletin valmistuksessa tärkkelysasettaatin eri hiukkaskokoluokkia. Mallilääkeaineet diklofenaakki, parasetamoli, propranololi ja teofylliini valittiin tutkimukseen log P- arvojen perusteella.

Tämän erikoistyön perusteella lääkeaineen ominaisuuksista vesiliukoisuus on merkittävin tekijä lääkeaineen vapautumisessa tärkkelysasettaattimatriisitabletista. Mitä vesiliukoisempi lääkeaine on, sitä nopeammin se vapautuu matriisista. Lääkeaineen vesiliukoisuuden vaikutus vapautumiskinetiikkaan näyttäisi vähenevän huokoisuuden kasvaessa. Tärkkelysasettaatin partikkelikoon muuttuessa lääkeaineen vapautumiskinetiikkaan vaikutti pääasiassa lääkeaineen vesiliukoisuus, koska koeasetelmassa huokoisuus oli hiukkaskokoa merkittävämpi tekijä. Lisää tutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta kantokyvyn vaikutus vapautumiskinetiikkaan saadaan selville. Tablettimatriisi näyttäisi kuitenkin vaikuttavan vapautumiskinetiikkaan, kun kantokyky on lähellä nollaa. Kantokyvyn kasvaessa lääkeaineen vesiliukoisuus näyttäisi alkavan vaikuttaa vapautumiskinetiikassa.

Lääkeaineet oli valittu tutkimukseen log P - arvojen perusteella, mutta niillä ei havaittu vaikutusta tässä koeasetelmassa. Lääkeaineiden valintakriteerinä tulisi käyttää in vitro tutkimuksessa mieluummin vesiliukoisuutta, koska log P -arvo kuvaa lääkeaineen imeytymisominaisuuksia in vivo.

Avainsanat: vesiliukoisuus, lääkeaineen vapautuminen, kantokyky, hydrofobinen matriisitabletti

---

# VÄRILLISTEN LÄMPÖ- JA KOSTEUSINDIKAATTOREIDEN VÄRIN MUUTOSOMINAISUUKSIEN TUTKIMINEN LÄÄKEVALMISTUKSEN YKSIKKÖPROSESSEISSA

**Satu Virtanen**

Farmasian teknologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto

---

Lämpö- ja kosteuserkkien kiinteiden lääkevalmisteiden formulointi on suuri haaste lääketeollisuudelle. Yleisimmät valmistusprosessit, kuten rakeistus ja tabletointi, aiheuttavat niin kemiallisia kuin fysikaalisiakin muutoksia valmisteessa olosuhteidensa vuoksi. Kemiallisista muutoksista merkittävimmät ovat hydrolyysi ja hapettuminen. Fysikaaliset muutoksista tärkeimpiä ovat polymorfiset muutokset. Kiinteiden valmisteiden suunnittelu amorfisista aineista, proteiineista ja bakteereista, on erittäin haastavaa niiden herkän luonteen takia. Proteiinien ja bakteerien aktiivisuus laskee herkästi. Yleisimmät proteiinijauheiden valmistusmenetelmiä ovat erilaiset kuivaukset, kuten kylmäkuivaus, sumukuivaus ja sumukylmäkuivaus, sekä uudemmat saostusmenetelmät, kuten superkriittisten nesteiden käyttö antiliumottimena. Myös rakeistusprosessi on haastava helposti hajoavilla aineilla. Kostearakeistus on yleisin käytetty aggregointitapa, mutta se soveltuu vain harvoin kosteuserkille lääkeaineille. Kuivarakeistuksen eri menetelmät ovatkin kiinnostavampia tässä suhteessa. Myös tabletointi tuo ongelmia formuloinnissa. Siinä lämpötila voi nousta korkealle, vaikkakin vain hetkellisesti, ja lisäksi tabletoitavaan aineeseen kohdistuu suuri mekaaninen stressi. Lämpötilan tai kosteuden muutosta voidaan tutkia myös väri-indikaattoriaineilla. Lämpötilan tai kosteuden noustessa tai laskiessa tietyn arvon yli, muuttuu indikaattoriaineen väri. Muutos on silmin havaittavissa ja nopea. Tarkemmin värin muutosta voidaan arvioida värianalysointorin avulla. Värejä voidaan määrittää useilla eri keinoilla, joista yleisimpiä ovat RGB- ja Lab-väriavaruudet.

Tutkimuksen lähtökohtana oli luoda kosteus- ja lämpöindikaattoreita farmaseuttisiin yksikköprosesseihin. Indikaattorien värin muutosta voidaan seurata värianalysointorin avulla. Jos indikaattorin väri muuttuu, ovat prosessiolosuhteet joko liian kuumat tai kosteat. Kosteusindikaattorina tutkittiin kobolttikloridia ja lämpöindikaattorina ChromaZone®-jauheita. Kobolttikloridista ja ChromaZone®-jauheista rakeistettiin rakeita ja lisäksi ChromaZone®-jauheilla päällystettiin pellettejä. Kosteusindikaattorin ominaisuuksia tutkittiin eri ilmankosteuksissa olevilla eksikaattoreilla ja lämpöherkkiä indikaattoreita vesihaudetutkimuksilla ja leijukerroskuivaimessa. Lisäksi tutkittiin valmistettujen lämpöindikaattorien kosteuspitoisuuksia ja tiheyksiä.

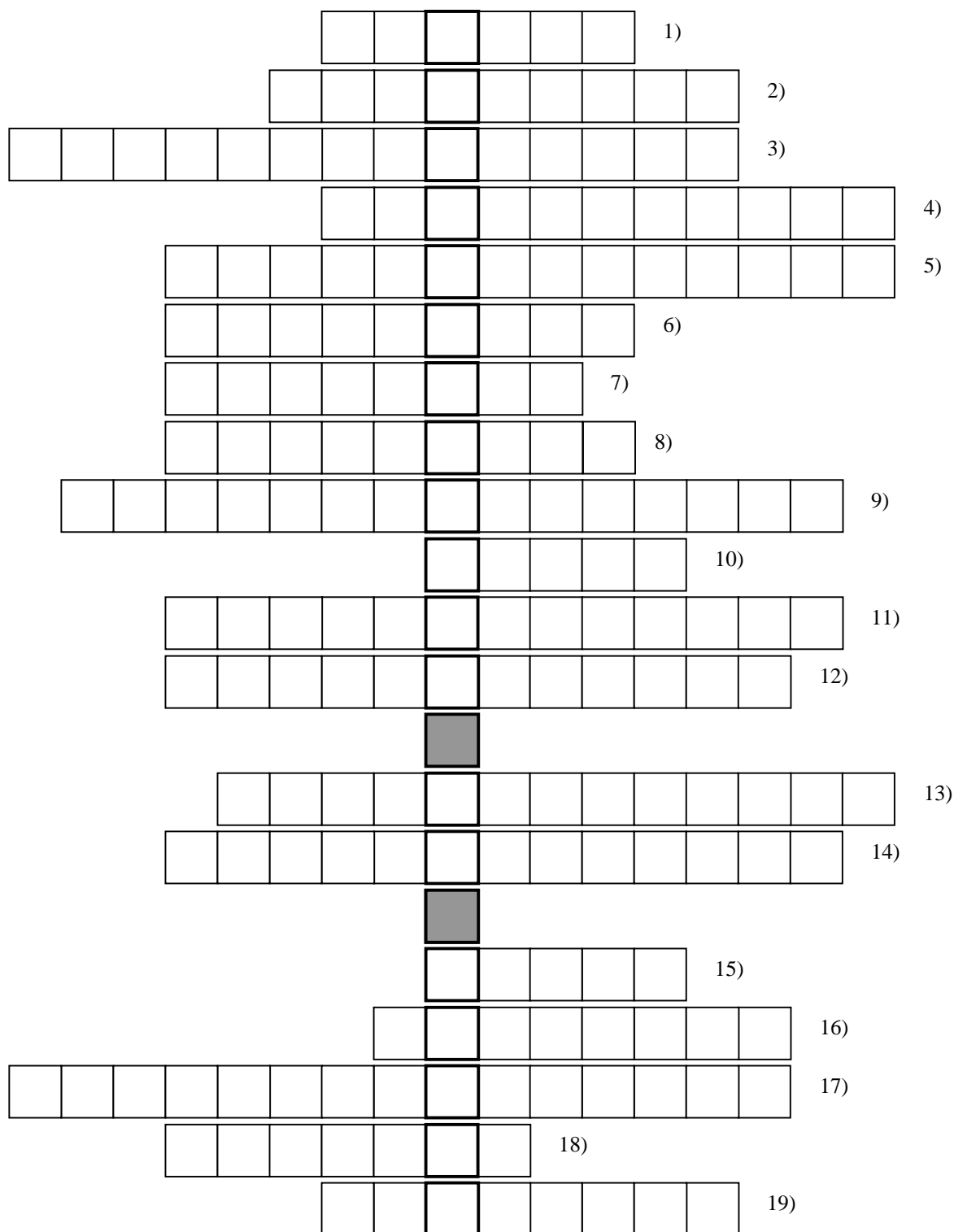
Valmistetut rakeet leijuivat hyvin leijukerroskuivaimessa. Lisäksi niiden väri muuttui toivotulla tavalla. Niiden leijunta muuttui ilmavirtauksen nopeuden muuttuessa. Eri fraktioiden leijunta oli erilaista keskenään. Parhaiten leijui suurimmat fraktiot. Niiden avulla pystyi tutkimaan hyvin indikaattoriaineiden lämpökäyttämistä leijutustilanteessa. Pellettien tiheys on huomattavasti suurempi kuin rakeiden, joten ne vaativat suuremman ilmavirran nopeuden leijutuksessa. Muutenkin niiden leijunta käyttäytyminen oli erilaista kuin rakeiden.

Kobolttikloridin käyttö kosteusindikaattorina on haastavaa. Yhdiste muuttaa väriään kosteissa olosuhteissa aina, kyse on vain kuluvasta ajasta. Tutkimuksessa yritettiin löytää tapoja, joilla kobolttikloridista saisi toimivan kosteusindikaattorin lääkevalmistuksen yksikköprosesseihin. Tarkoituksena oli saada värinmuutos pysäytettyä tiettyyn kohtaan tiettyssä kosteudessa. Lisäksi muutoksen pitää tapahtua nopeasti. Kobolttikloridia ja sen kosteuskäyttämistä täytyy tutkia vielä paljon lisää, jotta sen potentiaali indikaattorina farmaseuttisissa prosesseissa saataisiin selville.

Väri-indikaattoriaineiden käyttö lääkevalmistuksen yksikköprosesseissa vaikuttaa lupaavalta. Varsinkin lämpöindikaattorit toimivat hyvin tutkimuksessa käytetyissä muodoissaan. Lämpöindikaattoreita voisi käyttää monenlaisissa muissakin yksikköprosesseissa kuin leijutuksessa. Saatuja tuloksia ei voida verrata kirjallisuudessa julkaistuihin tuloksiin, koska vastaavia tutkimuksia ei ole tehty aikaisemmin.

Avainsanat: Lämpötila, kosteus, lämpöindikaattoriaine, kosteusindikaattoriaine, värin analysointi, L\*a\*b\*-väriavaruus, farmaseuttinen yksikköprosessi, leijukerroskuivaus

# RISTIKKO



Vihjeet: 1) paino jaettuna tilavuudella, 2) kidemuoto ja lehti, 3) hapettumista vastaan, 4) valmiste, 5) nm kokoinen, 6) vaikuttava osa, 7) yleisin lääkekuoto, 8) koostuu monomeereistä, 9) kiinteästä kaasuksi, 10) kiinteää ainetta pohjalla, 11) nesteen kyky vastustaa virtausta, 12) stabiloi emulsion, 13) vesihakuinen, 14) kiinteä aine pienemmäksi, 15) siveltävä valmiste, 16) tutkii nesteen virtausta, 17) tarttuvat toisiinsa, 18) kapselien ja jälkiruokien materiaali, 19) \_\_\_ vapautuminen

---

## Fysikaalisen farmasian XVII symposium

### OSALLISTUJAT

---

Jaakko Aaltonen	Helsingin yliopisto
Sari Airaksinen	Helsingin yliopisto
Mikko Björkqvist	Turun yliopisto
Henna Friman	Orion Pharma
Noora Gisselberg	Orion Pharma
Leena-Maija Harju	Orion Pharma
Teemu Heikkilä	Turun yliopisto
Johanna Husman	Orion Pharma
Paula Heinänen	Orion Pharma
Jouni Hirvonen	Helsingin yliopisto
Pekka Hoppu	Helsingin yliopisto
Samuli Hyvönen	Helsingin yliopisto
Olli-Pekka Hämäläinen	Turun yliopisto
Kristiina Järvinen	Kuopion yliopisto
Laura Kainu	Orion Pharma
Amie Kaukonen	Helsingin yliopisto
Esko Kekäläinen	Cemic Oy
Elina Kemppainen	Orion Pharma
Erja Katainen	Kuopion yliopisto
Jarkko Ketolainen	Kuopion yliopisto
Niina Kivikero	Helsingin yliopisto
Mikko Koivisto	Turun yliopisto
Karin Kogermann	Helsingin yliopisto
Ossi Korhonen	Kuopion yliopisto
Marko Kuosmanen	Kuopion yliopisto
Jenni Lehtisalo	Biotie Therapies Oyj
Vesa-Pekka Lehto	Turun yliopisto
Maritta Lehtonen	Orion Pharma
Kari Linsaari	Orion Pharma
Juha Lintunen	Orion Pharma
Tanja Lipsanen	Orion Pharma
Jan Lundell	Helsingin yliopisto
Petteri Lyytinen	Orion Pharma
Saara Mahlamäki	Orion Pharma
Sanni Matero	Kuopion yliopisto
Matti Murtomaa	Turun yliopisto
Kaisa Mäkelä	Orion Pharma
Riikka Mäki	Kuopion yliopisto
Pia Nelimarkka	Orion Pharma
Tero Närvänen	Orion Pharma
Elina Näsi	Kuopion yliopisto
Jari Pajander	Kuopion yliopisto
Leena Peltonen	Helsingin yliopisto
Juhani Posti	Schering Oy
Mika Pulkkinen	Kuopion yliopisto

Maria Rantala	Orion Pharma
Joakim Riikonen	Turun yliopisto
Heli Rita	Orion Pharma
Kirsti Saarnivaara	Orion Pharma
Tuula Sainio	Orion Pharma
Henri Salokangas	Orion Pharma
Kirsi Salomäki	Orion Pharma
Marja Savolainen	Helsingin yliopisto
Anna Shevchenko	Orion Pharma
Clare Strachan	Helsingin yliopisto
Krista Taipale	Vitabalans Oy
Veli-Pekka Tanninen	Orion Pharma
Saara Tiittanen	Orion Pharma
Jaana Vartiainen	Orion Pharma
Bert van Veen	Orion Pharma
Satu Virtanen	Helsingin yliopisto