

Afgiftemechanisme van tobramycine, colistine en nystatine uit mond pasta voor selectieve decontaminatie van de mondholte

S. Akbarali ^{a*}, R.W. Kalicharan ^{ab} en H. Vromans ^{ab}

^a Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^b Universiteit Utrecht.

* Correspondentie: s.akbarali@live.nl.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Citeer als: Akbarali S, Kalicharan RW, Vromans H. Afgiftemechanisme van tobramycine, colistine en nystatine uit mond pasta voor selectieve decontaminatie van de mondholte. Nederlands Platform voor Farmaceutisch Onderzoek. 2016;1:a1602.

Kernpunten

- De mond pasta die wordt gebruikt voor selectieve decontaminatie van de mond, vertoont een slechte farmaceutische beschikbaarheid.
- De farmaca komen nauwelijks vrij door diffusie; sedimentatie van deeltjes door het grensvlak speelt een grotere rol, die aanzienlijk wordt versterkt door vervorming van de pasta (kauwbewegingen).
- Verhoging van de concentratie hydroxypropylmethylcellulose verbetert de afgifte van de wateroplosbare farmaca tobramycinesulfaat en colistinesulfaat maar heeft geen invloed op het slecht in water oplosbare nystatine.

Inleiding

Patiënten die op de intensive care (IC) mechanisch worden beademd, hebben een verhoogde kans om een longinfectie te ontwikkelen die fataal kan aflopen [1]. In 1983 werd voor het eerst een studie gepubliceerd over selectieve decontaminatie van de mondholte om de incidentie van deze infecties te verlagen [2]. De selectieve orofaryngeale decontaminatie (SOD) bestond uit een mond pasta met de slecht absorbeerbare antibiotica tobramycinesulfaat (TS) en colistinesulfaat (CS) en het antimycoticum amfotericine B. Sinds de introductie van de behandeling is de formulering nauwelijks gewijzigd. De mond pasta wordt vier keer per dag toegediend. Doordat de farmaca niet worden geabsorbeerd werken ze lokaal in de mond [1].

Het nut van selectieve decontaminatie is relatief

ABSTRACT

Mechanism of release of tobramycin, colistin and nystatin from a mouth paste applied to selectively decontaminate the oral cavity

OBJECTIVE

To study the in vitro release of the compounds tobramycin sulphate (TS), colistin sulphate (CS) and nystatin from the oral paste for selective oropharyngeal decontamination.

DESIGN AND METHODS

The release of the active compounds was studied for 2 hours in a medium of phosphate buffer using various methods. Diffusion was studied with the paddle apparatus. Sedimentation was examined by spreading the paste on a filter paper and exposing this to the medium so that the particles could settle. The chewing motion was mimicked with a disintegration apparatus. Finally, the influence of 10, 20, 30 and 40% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) concentrations on drug release was studied.

RESULTS

With the diffusion test the highest release was seen with TS (5.7%) and the lowest with nystatin (0.3%). With sedimentation the release of all three compounds was at least twice as high as with diffusion (TS: 14.0% vs 5.7%; CS: 6.3% vs 2.7%; nystatin: 0.9% vs 0.3%). Chewing motions influenced the release too (TS: 44.6%; CS: 16.4%; nystatin: 2.1%): the release was 2.5-3 times higher than with sedimentation. Increasing the HPMC concentration in the mouth paste improved the release of TS and CS, though it had little effect on nystatin (40% HPMC resulted in release of TS: 70.9%; CS: 37.5%; nystatin: 0.8%).

CONCLUSION

Drug release from the mouth paste by diffusion is incomplete. Chewing motions and increasing HPMC concentrations (along with sedimentation) enhance the release of the active compounds. To improve release of TS and CS, more HPMC should be used in the formulation.

intensief onderzocht [3]. Het is echter opmerkelijk dat er tot nu toe niets is gepubliceerd over de biofarmaceutische parameters van het preparaat; de farmaceutische beschikbaarheden en de concentraties van de farmaca in de mond zijn nooit gemeten. Dit betekent in feite dat de

(bio)farmaceutische onderbouwing van de behandeling nooit is aangetoond, al is dit voor de ontwikkeling van elk geneesmiddel in feite een randvoorwaarde voor klinisch onderzoek. In het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU) is daarom onderzoek uitgevoerd naar de in-vivo-afgifte van de drie farmaca uit de SOD-mondpasta [4]. Hieruit is gebleken dat de afgifte uit het preparaat onvolledig is en verre van constant. Na een initiële piek dalen de concentraties binnen twee uur beneden de minimaal inhiberende concentraties (MIC's).

Het huidige onderzoek had tot doel de oorzaak van deze beperkte afgifte te achterhalen. Hierbij werd bestudeerd in hoeverre de farmaca door passieve diffusie vrijkomen en wat de invloed is van sedimentatie (het uitzakken van deeltjes) en plastische vervorming van de pasta. Ten slotte werd de invloed bestudeerd van het gehalte hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) op de afgifte van de farmaca. Met behulp van deze resultaten kon worden bekeken welke processen de afgifte van de farmaca uit het preparaat bevorderen en wat er gedaan kan worden om een betere formulering te verkrijgen.

Methoden

De SOD-mondpasta die in het UMCU wordt gebruikt, bestaat uit TS (20 mg/g), CS (20 mg/g), nystatine (200.000 IE/g), paraffine dun vloeibaar 60-80 mPa·s (50 mg/g) en hypromellosezalf (witte vaseline met 20% HPMC 4000 mPa·s, ad 1 g). Nystatine vervangt het slecht verkrijgbare amfotericine B. In de eerder aangehaalde studie [4] is aangetoond dat dit gerechtvaardigd is: de gehalten van nystatine in de mond waren altijd beduidend hoger dan die van amfotericine B.

Om de afgifte te onderzoeken werd voor elk experiment 1,0 g van de mondpasta verspreid over een oppervlakte van 25,5 cm² met een dikte van ongeveer 1 mm. Als medium werd een fosfaatbuffer (pH 6,0) gebruikt bij een temperatuur van 37 ± 0,5°C [5, 6]. Er werden monsters genomen van 5 mL en het medium werd telkens met dezelfde hoeveelheid buffer weer aangevuld. Alle monsters werden overgebracht in polypropyleen centrifugebuizen van 15 mL. Om de koolwaterstoffen (vaseline/paraffine) te extraheren werd aan elke buis 5 mL hexaan toegevoegd, 5 minuten geschud en daarna 5 minuten gecentrifugeerd op 2500 omwentelingen per minuut (rpm). Van de waterfase werd 1 mL gebruikt voor de analyse van TS en CS met behulp van HPLC. Het resterende deel werd gebruikt voor analyse van nystatine met behulp van UV/VIS-spectrofotometrie. Alle experimenten zijn in duplo uitgevoerd.

Methode 1: diffusie

Om te onderzoeken hoe snel de farmaca door diffusie uit de mondpasta vrijkomen, werd het *paddle*-dissolutieapparaat gebruikt dat staat beschreven in de Europese Farmacopee (PhEur) [7]. De mondpasta werd uitgesmeerd op een verzwaard petrischaaltje met een diameter van 5,7 cm

dat werd geplaatst op de bodem van een bekersglas met 400 mL medium. De roersnelheid was 75 rpm.

Methode 2: sedimentatie

Om na te gaan wat de invloed is van sedimentatie op de afgifte, werd de pasta uitgesmeerd op een filtreerpapier en daaroverheen werd een tweede filtreerpapier geplaatst. Deze dubbele papierlaag werd aan de bovenkant van een trechter bevestigd, die vervolgens ondersteboven in het medium werd geplaatst, op een zodanige wijze dat het filtreerpapier werd bevochtigd. Het bekersglas bevatte 500 mL bufferoplossing die door middel van een roervlo geroerd werd met 300 rpm.

Methode 3: kauwbewegingen

Wanneer de mondpasta aan de binnenkant van de wang wordt aangebracht en er wordt gekauwd, dan ondergaat de formulering een vormverandering. Om deze plastische vervorming op te leggen aan de pasta werd het desintegratie-apparaat gebruikt dat staat beschreven in de PhEur [8]. Deze opstelling is deels afgeleid van het kauwapparaat waarbij er tevens een op- en neergaande beweging is en dat ook staat beschreven in de PhEur [9]. Bij deze opstelling werd net als in methode 2 de dubbele papierlaag gebruikt waartussen de mondpasta was uitgesmeerd. Het geheel werd diagonaal onder de *basket* vastgemaakt met behulp van een touw, waarbij het papieroppervlak horizontaal werd gepositioneerd. Door de beweging nam het papier beurtelings een bolle en een holle vorm aan. Het bekersglas bevatte 500 mL buffer en de *basket* had een bewegingsfrequentie van 30 per minuut.

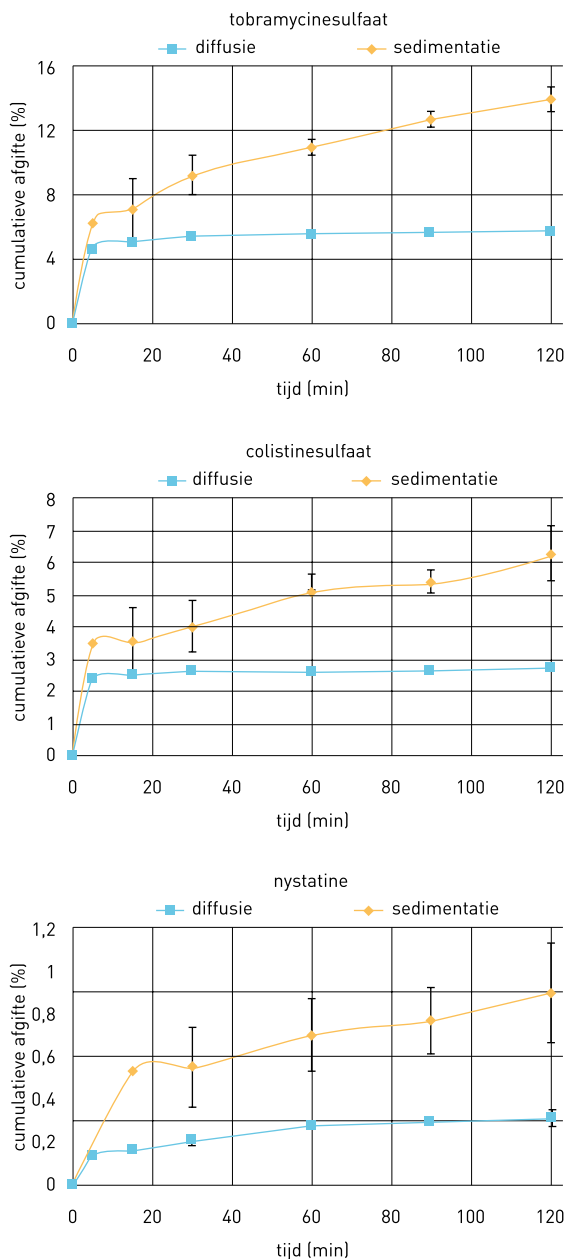
Hydroxypropylmethylcellulose

Om de invloed van HPMC op de afgifte te onderzoeken, werden vier preparaten bereid met verschillende HPMC-concentraties. Methode 2 werd gebruikt om de afgifte te bestuderen.

Analyse

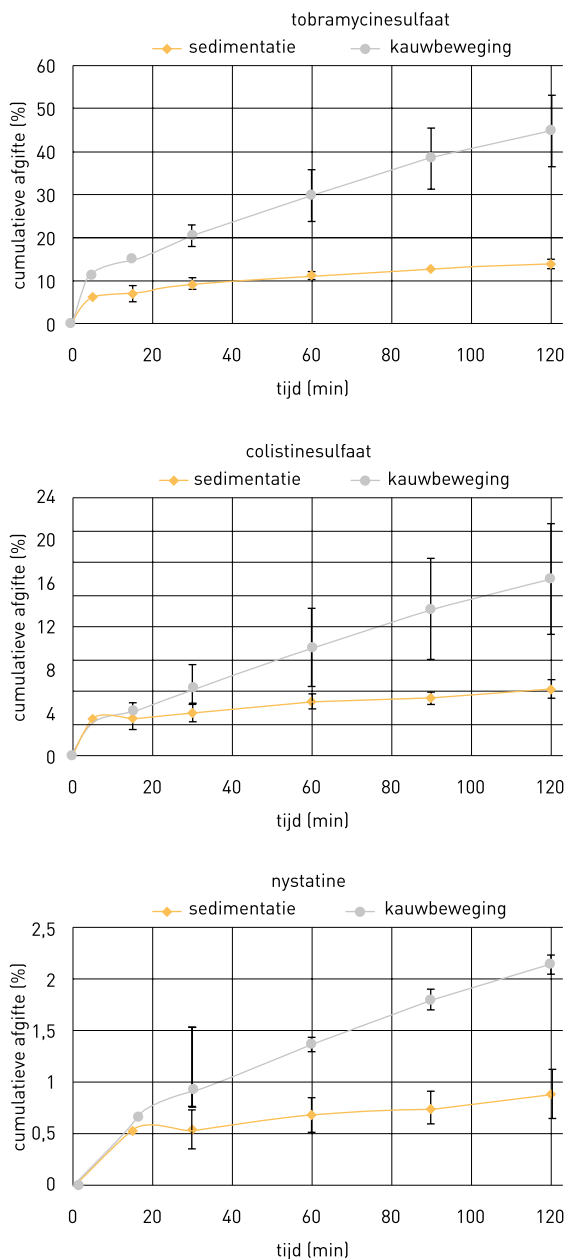
TS en CS werden geanalyseerd na derivatisering met de fluorescerende stof ftaalaldehyde (OPA). Standaarden van TS en CS liepen lineair van 2,5 tot 50 µg/mL (met R² > 0,99 en retentietijden TS = 3,8 en CS = 7,6 minuten). Standaarden werden vers bereid voor elke HPLC-run. De mobiele fase bestond uit fosfaatbuffer pH 6,5 + acetonitril, beginnend met 60 + 40 gedurende 8 minuten, dan 10 + 90 gedurende 2 minuten, daarna terugkerend binnen 6 seconden naar 60 + 40 tot het einde van de run (12,5 minuten). De *flow rate* was 1,5 mL/min, kolomtemperatuur 25°C, injectievolumen monster 5 µL, injectievolumen OPA 2 × 20 µL met een wachttijd van 2 minuten, kolom LiChrospher 100 RP-8,5 µm en HPLC met fluorescentiedetector (Agilent 1100 Series [Agilent, Santa Clara, Verenigde Staten] met Chromeleon 7 software [Dionex, Sunnyvale, Verenigde Staten]). Nystatine werd gekwantificeerd met een spectro-

Figuur 1 Afgifte van actieve stoffen uit de mond pasta: diffusie vergeleken met sedimentatie



De onderzochte mond pasta bevatte hypromellosezalf 20%. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer.

Figuur 2 Afgifte van actieve stoffen uit de mond pasta: sedimentatie vergeleken met gesimuleerde kauwbeweging



De onderzochte mond pasta bevatte hypromellosezalf 20%. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer.

fotometer (WinASPECT, Analytik Jena, Jena, Duitsland). De absorptie werd gemeten bij 307 nm. Er werd een kalibratiecurve gemaakt met vijf standaarden (bereik 2,5-50 IE/mL met $R^2 = 0,994$).

Dit zijn gevalideerde analysemethoden die worden gebruikt in het UMCU.

Alle referentiestoffen en grondstoffen werden gekocht

bij BUFA (Nederland). Acetonitril, hexaan en OPA werden ingekocht bij Sigma-Aldrich (Nederland).

Resultaten

De bijdragen van de verschillende mechanismen aan de afgifte worden duidelijk uit figuur 1. In alle gevallen wordt momentaan een hoeveelheid stof afgegeven. Na deze initiële

hoeveelheid komt echter nauwelijks meer stof beschikbaar door diffusie. Door het uitzakken van de deeltjes (sedimentatie) komt nog een significante afgifte tot stand. De gemeten waarde moet in deze proefopstelling als een onderschatting worden beschouwd omdat het filtreerpapier een extra barrière voor afgifte vertegenwoordigt.

Figuur 2 toont dat het voortdurend vervormen van de mondoplossing leidt tot een additionele afgifte. Het is duidelijk dat beweging de afgifte van de werkzame stoffen uit de mondoplossing bevordert en dat er heel weinig stof vrijkomt door diffusie uit de pasta. De initiële afgifte wordt zeer waarschijnlijk veroorzaakt door de stof die aan het oppervlak van de pasta aanwezig is. De afgifte wordt vervolgens vooral veroorzaakt doordat deeltjes uitzakken.

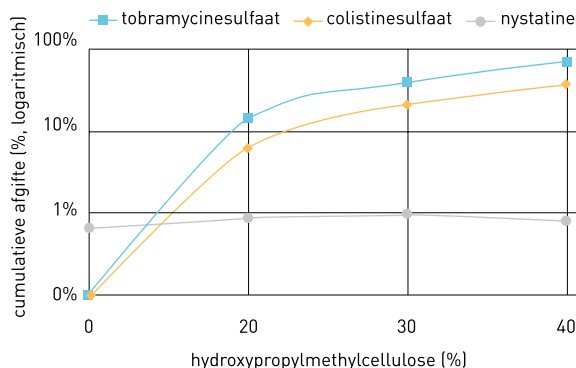
De afgifte van de werkzame stoffen bij vier verschillende HPMC-concentraties wordt vergeleken in figuur 3. De afgifte van TS en CS vanuit het preparaat met 10% HPMC bleef beneden de detectielimiet ($0,5 \mu\text{g/mL}$). Nystatine kon bij dit HPMC-gehalte wel worden gekwantificeerd. Uit de resultaten is op te maken dat verhoging van de HPMC-concentratie invloed heeft op de afgifte van de goed in water oplosbare stoffen TS en CS. De afgifte van het slecht in water oplosbare nystatine wordt nauwelijks beïnvloed door de concentratie HPMC.

Beschouwing

In de in-vitro-experimenten zijn de verschillende mechanismen onderzocht die invloed hebben op de afgifte van de drie farmaca uit de mondoplossing. De verschillende meetmethoden maken onderscheid tussen de mogelijke mechanismen. Omdat de hydrodynamische omstandigheden niet exact hetzelfde gehouden konden worden (volumina en methoden van roeren), werd gecontroleerd of hierdoor verkeerde conclusies getrokken zouden worden. Dit bleek niet het geval, hetgeen overigens ook verwacht was: de snelheidsbepalende stap in de afgifte zit blijkbaar inderdaad in de pasta en niet in de roerloze waterlaag (diffusie-laag) om de pasta heen.

De resultaten in de figuren 1 en 2 tonen dat door diffusie slechts een kleine hoeveelheid van de farmaca vrijkomt uit de formulering. Met sedimentatie en kauwbewegingen vindt er na een initiële afgifte nog nauwelijks afgifte plaats doordat de farmacondeeltjes uitzakken. Dit is te verklaren vanuit de fysisch-chemische eigenschappen van de farmaca. Zowel TS als CS is als sulfaat zout verwerkt in de pasta. Deze twee farmaca zullen vanwege de polariteit nauwelijks in de pasta oplossen (de $\log P$ van TS is $-5,8$ en van CS $-2,4$) [10, 11]. Diffusie is afhankelijk van een concentratiegradiënt en wanneer de genoemde farmaca nauwelijks oplossen, is deze gradiënt dus verwaarloosbaar klein. De enige manier om uit de zalf vrij te komen is door passage van het grensvlak in kristallijne vorm. Als er een zekere mate van vervorming aan de zalf wordt opgelegd, neemt de afgifte toe. Dit is ongetwijfeld het gevolg van de thixotrope eigenschappen van de pasta. Bij een lagere viscositeit

Figuur 3 Invloed van concentratie hydroxypropylmethylcellulose op de afgifte van de farmaca uit de mondoplossing



De afgifte is onderzocht met methode 2 (sedimentatie). Cumulatieve afgiften werden vergeleken na 2 uur. Tobramycinesulfaat en colistinesulfaat waren niet detecteerbaar in het preparaat met hypromellosezalf 10%.

neemt de snelheid van sedimentatie toe en zal de passage door het grensvlak door middel van drainage ook worden versneld.

Verhoging van de HPMC-concentratie in de formulering leidde tot een toename van de afgifte van TS en CS, maar niet van nystatine, zoals is af te lezen in figuur 3. Dit resultaat kan aan de hand van het volgende mechanisme worden verklaard. Een toename in het aandeel HPMC resulteert in een stuggere pasta. Door de HPMC zwelt de pasta op bij aanraking met water. Water wordt in de pasta opgenomen in de hydrofiële HPMC-fase. De farmaca hebben daardoor een kortere sedimentatieweg en komen sneller in contact met water [12]. TS en CS zijn goed oplosbaar in water terwijl nystatine juist slecht in water oplost. Nystatine ($\log P 7,1$) blijft daarom vooral in de vetfase zitten [13] en verhoging van de HPMC-concentratie leidt niet tot een verhoogde afgifte, terwijl dit bij TS en CS wel het geval is. Bij een te laag HPMC-gehalte zijn de cellulosedeeftjes waarschijnlijk niet in staat binnen de pasta een hydrofiel netwerk op te bouwen waardoor water naar binnen kan worden getransporteerd. De deeltjes liggen vermoedelijk gescheiden van elkaar en voegen daardoor niets toe aan de versnelling van de afgifte.

Deze studie toont aan dat de afgifte van de farmaca uit de mondoplossing onvolledig is. Dit is in overeenstemming met in-vivo-onderzoeken [4]. Na verloop van tijd vindt geen afgifte meer plaats. TS komt het beste vrij uit de pasta, terwijl de afgifte van nystatine het laagste is. Tijdens de validatie van de extractiestap bleek dat nystatine niet in de hexaanlaag zat, waardoor een artefact uitgesloten is. Uit dit in-vitro-onderzoek blijkt dus dat nystatine niet makkelijk uit het preparaat vrijkomt.

Hoewel de in-vitro- en in-vivo-experimenten principieel andere omstandigheden vertegenwoordigen, zijn de resultaten vergelijkbaar. De twee in water oplosbare farmaca vertonen een geringe, onvolledige afgifte en bewegingen bevorderen de afgifte. Voor de klinische praktijk is dit van belang: mechanisch beademde patiënten kunnen niet praten of hun mond bewegen. Zij krijgen gedurende hun IC-opname SOD-mondpasta toegediend [14] die suboptimale blootstelling aan antibiotica oplevert [4]. Verhoging van de HPMC-concentratie bevordert de afgifte van TS en CS en het valt dus te overwegen meer HPMC aan de mondoplossing toe te voegen. Nystatine wordt in zeer geringe mate afgegeven. Dit is een directe consequentie van de aard van het materiaal en de gekozen formulering van de pasta. Voor amfotericine B geldt exact hetzelfde en het is dus ook zeer de vraag of toevoeging van deze middelen überhaupt leidt tot effectieve werkzaamheid.

De mondoplossing die in Nederland wordt gebruikt binnen het beleid voor selectieve decontaminatie in de IC, is farmaceutisch gezien nooit geëvalueerd. De biofarmaceutische eigenschappen bleken in een eerdere studie [4] suboptimaal; de farmaceutische beschikbaarheid van dit preparaat laat zeer te wensen over. Opmerkelijk genoeg zijn er reeds omvangrijke klinische evaluatiestudies uitgevoerd. Het is niet onwaarschijnlijk dat de resultaten van deze studies meer overtuigingskracht hadden gehad bij gebruik van adequaat geformuleerde medicatie. Het is opmerkelijk dat in klinische studies SOD even effectief lijkt te zijn als de suspensie voor selectieve decontaminatie van het spijsverteringskanaal (SDD) [1]. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat de SOD-mondoplossing wordt doorgeslikt, waardoor hij waarschijnlijk, net als de SDD-suspensie, werkzaam is in de darmen.

Deze studie legt de onderliggende beperkingen in het concept van de pasta bloot. Aanbevolen wordt een mondoplossing samen te stellen met betere afgiftekarakteristieken, zodat er gedurende de beoogde tijdsduur sprake is van een bacteriedodende antibioticumconcentratie in de mondholte. Verhoging van de HPMC-concentratie kan dit bereiken voor TS en CS. Dit bevordert de afgifte van nystatine echter niet. ■

Literatuur

- 1 de Smet AM, Kluytmans JA, Cooper BS, et al. Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients. *N Engl J Med*. 2009 Jan 1;360(1):20-31.
- 2 Stoutenbeek CP, Van Saene HK, Miranda DR, Zandstra DF. A new technique of infection prevention in the intensive care unit by selective decontamination of the digestive tract. *Acta Anaesthesiol Belg*. 1983 Sep;34(3):209-21.
- 3 de Smet AM, Bonten MJ. Selective decontamination of the digestive tract. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Apr;21(2):179-83.
- 4 Rood J, Nawzad H, Kalicharan R, van Steenberghe M, Vromans H. Drug release from an oromucosal paste for the selective decontamination of the oropharynx (in ICU patients and healthy volunteers). *Eur J Pharm Sci*. 2015 Jun 20;73:88-92.
- 5 Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9.
- 6 5.17. Recommendations on methods for dosage forms testing. In: *European Pharmacopoeia*. 8e ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- 7 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms. In: *European Pharmacopoeia*. 8e ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- 8 2.9.1. Disintegration test for tablets and capsules. In: *European Pharmacopoeia*. 8e ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- 9 2.9.25. Dissolution test for medicated chewing gums. In: *European Pharmacopoeia*. 8e ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- 10 Drugbank 4.2 [internet]. Edmonton: Wishart Lab [geraadpleegd 2015 okt 23]. Tobramycin. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00684>.
- 11 Drugbank 4.2 [internet]. Edmonton: Wishart Lab [geraadpleegd 2015 okt 23]. Colistin. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00803>.
- 12 Siepman J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Jun 11;48(2-3):139-57.
- 13 MedicinesComplete [internet]. London: Pharmaceutical Press [geraadpleegd 2015 okt 23]. Nystatin. <http://www.medicinescomplete.com>.
- 14 Oostdijk EAN, de Jonge E, Kullberg BJ, et al. SWAB-Richtlijn: selectieve decontaminatie bij patiënten op de intensive care. Nijmegen: Stichting Werkgroep Antibioticabeleid; 2014 aug [geraadpleegd 2015 okt 23]. [http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/E6FA609CFB1010C3C1257D4D0031DAD6/\\$FILE/Richtlijn%20SDD%202014.pdf](http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/E6FA609CFB1010C3C1257D4D0031DAD6/$FILE/Richtlijn%20SDD%202014.pdf).