

Administración transbucal del sulfato de salbutamol: Determinación in vitro de las rutas de transporte bucal

Transbuccal delivery of salbutamol sulphate: In vitro determination of routes of buccal transport

SUTARIYA VB*, MASHRU RC, SANKALIA MG Y SANKALIA JM

Pharmacy Department. Center of relevance and excellence in NDDS. G.H. Patel building. The M.S. University of Baroda. Kalabhavan, Vadodara – 390002. Gujarat, India
Correo electrónico: vsutariya@yahoo.co.in * Autor de contacto.

RESUMEN

Se estudió la influencia de la concentración de fármaco, el pH del compartimento dador y el coeficiente de partición 1-octanol/tampón en la permeación transbucal del sulfato de salbutamol ($pK_{a1} = 9,3$; $pK_{a2} = 10,3$) a través de mucosa bucal porcina utilizando una célula de difusión de Franz en línea a 37 °C. El pH se ajustó a varios valores y la solubilidad del fármaco se midió en distintos pH. La solubilidad del sulfato de salbutamol descendió al aumentar el pH. Se evaluó la permeabilidad del fármaco a diferentes concentraciones de fármaco y pH dador. Se calculó la permeabilidad de especies ionizadas (P_i) y no ionizadas (P_u) del fármaco. El flujo de estado estable aumentó de forma lineal con la concentración dadora ($r^2=0,9683$) con pH 7,4. El coeficiente de partición y permeabilidad aumentaron al aumentar el pH. Los valores de P_u y P_i del sulfato de salbutamol fueron $8,89 \cdot 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ y $2,49 \cdot 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. El coeficiente de permeabilidad total aumentó al aumentar la fracción de la forma no ionizada del fármaco. El fármaco penetró a través de la mucosa bucal mediante un proceso de difusión pasivo. El coeficiente de partición y la dependencia del pH de la permeabilidad del fármaco indicaron que el sulfato de salbutamol se transportó principalmente a través de la ruta paracelular mediante un mecanismo de partición.

PALABRAS CLAVE: Permeabilidad. Membrana mucosa. Especies ionizadas. Especies no ionizadas.

ABSTRACT

The influence of drug concentration, pH in donor chamber, and 1-octanol/buffer partition coefficient on transbuccal permeation of salbutamol sulphate ($pK_{a1} = 9.3$, $pK_{a2} = 10.3$) across porcine buccal mucosa was studied by using in-line franz type diffusion cell at 37°C. The pH was adjusted to several values, and the solubility of the drug in different pH was measured. Solubility of salbutamol sulphate decreased with increasing the pH. The permeability of the drug was evaluated at different donor pH and drug concentrations. Permeability of unionized (P_u) and ionized (P_i) species of drug was calculated. The steady state flux increased linearly with the donor concentration ($r^2=0.9683$) at pH 7.4. The permeability and the partition coefficient increased with increasing pH. The value of P_u and P_i of salbutamol sulphate were $8.89 \cdot 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ and $2.49 \cdot 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ respectively. The total permeability coefficient increased with increasing the fraction of unionized form of the drug. The drug permeated through buccal mucosa by a passive diffusion process. The partition coefficient and pH dependency of drug permeability indicated that salbutamol sulphate was transported mainly via the paracellular route by a partition mechanism.

KEY WORDS: Permeability. Mucous membrane. Ionized species. Unionized species.

INTRODUCCIÓN

La administración de fármacos a través de la mucosa oral ofrece ciertas ventajas frente a la administración oral, especialmente para aquellos fármacos con baja solubilidad, baja biodisponibilidad y/o aquellos fármacos que sufren un amplio metabolismo de primer paso en el hígado. Como se puede imaginar, los sistemas de administración bucal pueden proporcionar una administración sencilla con muy poca o ninguna irritación y de este modo aumentar el cumplimiento de las pautas por parte del paciente. También se evita la degradación mediada por enzimas digestivas o ácido gástrico en el tracto gastrointestinal. Además, la posible variación de la tasa de vaciado gástrico o la presencia de alimentos no afecta a la absorción después de la administración a través de la mucosa oral¹⁻⁷.

Las bases y los ácidos débiles están sometidos a la ionización dependiente del pH. Se asume que las especies ionizadas penetran con mayor dificultad a través de la mucosa oral en comparación con las especies no ionizadas. Es probable que un aumento en la cantidad de fármaco no ionizado aumente la permeabilidad del fármaco a través de una barrera epitelial. Esto se puede conseguir mediante una modificación del pH del sistema de administración del fármaco. Se ha demostrado que el pH afecta a la permeación bucal del fármaco a través de la mucosa oral⁸⁻¹⁵. Estudios anteriores relacionados con la absorción de fármacos han demostrado que la absorción bucal a través de la mucosa oral de fármacos como, por ejemplo, el sulfato de morfina⁸, la nicotina^{9,10}, la flecainida¹¹, el sotalol¹¹, el propanolol¹², entre otros¹³⁻¹⁵, cambió con la modificación del pH.

El examen de la ruta de penetración para la administración transbucal de fármacos es importante porque es básica para seleccionar el potenciador de la capacidad de penetración adecuado que mejore la permeabilidad del fármaco. Las rutas de transporte del fármaco se visualizaron directamente a través de microscopía electrónica de barrido, autorradiografía y microscopía de barrido con láser¹⁵. El estudio de la permeación *in vitro* es una forma indirecta de examinar las rutas de transporte de fármacos a través de la mucosa bu-

INTRODUCTION

The drug delivery through oral mucosa offers a number of advantages over oral delivery, especially for those drugs that have poor solubility, poor bioavailability, and/or those drugs that suffer from extensive first pass metabolism in the liver. Conceivably, buccal delivery systems may provide for easy administration with little or no irritation, thereby increasing patient compliance. In addition, gastric acid- or digestive enzyme-mediated degradation in the gastrointestinal tract is also avoided. Moreover, absorption following oral mucosal administration is not influenced by the potential variation in the gastric-emptying rate or the presence of food¹⁻⁷.

Weak acids and weak bases are subject to pH-dependent ionization. It is presumed that ionized species penetrate poorly through the oral mucosa compared with non-ionized species. An increase in the amount of non-ionized drug is likely to increase the permeability of the drug across an epithelial barrier, and this may be achieved by a change of pH of the drug delivery system. It has been reported that pH has effect on the buccal permeation of drug through oral mucosa⁸⁻¹⁵. Previous drug absorption studies have demonstrated that buccal absorption through oral mucosa for drugs such as morphine sulphate⁸, nicotine^{9,10}, flecainide¹¹, sotalol¹¹, propanolol¹² and others¹³⁻¹⁵ changed with change in pH.

The examination of penetration route for transbuccal drug delivery is important because it is fundamental to select the proper penetration enhancer to improve the drug permeability. The routes of drug transport have been visualized directly by scanning electron microscopy, autoradiography and confocal laser scanning microscopy¹⁵. An indirect way to examine the routes of drug transport across buccal mucosa is to study permeation *in vitro*. Previous drug absorption studies have demonstrated that oral mucosal absorption of amines and acids at constant concentration is proportional to their partition coefficients^{16,17}. Similar dependencies on partition coefficients were obtained for acyclovir¹⁵, β -adrenoceptor blocking agents¹⁸, tetramethylpyrazine¹⁹, substituted acetanilide²⁰ and others^{16,17}.

cal. Estudios anteriores relacionados con la absorción de fármacos han demostrado que la absorción a través de la mucosa oral de las aminas y los ácidos a una concentración constante es proporcional a sus coeficientes de partición^{16,17}. Se obtuvieron dependencias similares en los coeficientes de partición del aciclovir¹⁵, los agentes de bloqueo del β-adrenoceptor¹⁸, la tetrametilpirazina¹⁹, la acetanilida sustituida²⁰, entre otros^{16,17}.

En función de la estructura celular de la mucosa oral, las dos posibles rutas para el transporte de fármacos pasivo son las siguientes: la ruta paracelular y la ruta transcelular. Las propiedades fisicoquímicas del medio de dispersión determinan la ruta dominante. En el caso de los compuestos lipofílicos, la ruta transcelular es la ruta principal. En el caso de los compuestos hidrofílicos, la ruta principal es el transporte paracelular²¹⁻²³.

El flujo de fármaco a través de la membrana en condición de medio de disolución de la ruta paracelular se puede redactar con la siguiente fórmula^{15,19,24}:

$$J_p = \frac{D_p \varepsilon}{h_p} C_d \quad (1)$$

Donde, D_p = coeficiente de difusión del permeado de los espacios intercelulares, h_p = longitud de la ruta paracelular, ε = fracción de área de la ruta paracelular y C_d = concentración de fármaco dadora.

El flujo de fármaco a través de la membrana en condición de medio de disolución de la ruta transcelular se puede redactar con la siguiente fórmula^{15,19,24}:

$$J_c = \frac{(1-\varepsilon)D_c K_c}{h_c} C_d \quad (2)$$

Donde, K_c = coeficiente de partición entre la fase acuosa y la membrana de la célula lipofílica, D_c = coeficiente de difusión del fármaco de los espacios transcelulares y h_c = longitud de la ruta transcelular.

El sulfato de salbutamol, (RS)-1-(4-hidroxi-3-hidroxi-metil fenil)-2-(tert-butilamino) sulfato de etanol, un agonista del receptor β₂ es el agente simpatomimético utilizado de forma más

Based on the cellular structure of the oral mucosa, there are two possible pathways for passive drug transportation – the paracellular route and the transcellular route. The physicochemical properties of the diffusant determine the dominant route. For lipophilic compounds, the transcellular pathway is the main route. For hydrophilic compounds, paracellular transport is the primary route²¹⁻²³.

The flux of drug through the membrane under sink condition for paracellular route can be written as^{15,19,24}:

$$J_p = \frac{D_p \varepsilon}{h_p} C_d \quad (1)$$

Where, D_p = diffusion coefficient of the permeate in the intercellular spaces, h_p = path length of the paracellular route, ε = area fraction of the paracellular route and C_d = donor drug concentration.

The flux of drug through the membrane under sink condition for transcellular route can be written as the following equation^{15,19,24}:

$$J_c = \frac{(1-\varepsilon)D_c K_c}{h_c} C_d \quad (2)$$

Where, K_c = partition coefficient between lipophilic cell membrane and the aqueous phase, D_c = diffusion coefficient of the drug in the transcellular spaces and h_c = pathlength of the transcellular route.

Salbutamol sulphate, (RS)-1-(4-hydroxy-3-hydroxy-methyl phenyl)-2-(tert-butylamino) ethanol sulphate, a β₂ receptor agonist is most widely used sympathomimetics for the treatment of acute as well as chronic asthma. Generally, it is given through inhalation route but is also effective after oral administration. Despite the fact that salbutamol sulphate is well absorbed, its systemic bioavailability is only 50% due to extensive presystemic metabolism in the gastrointestinal tract (GIT) and liver. Hence, the oral administration of salbutamol sulphate shows marginal and slow onset of action. The metabolite possesses little or no β-adrenergic activity^{25,26}.

The present study is to examine the effects of drug concentration at pH 7.4, pH in donor chamber, and 1-octanol/buffer partition coefficient on transbuccal permeation and the pos-

generalizada para el tratamiento de asma crónico y agudo. Por lo general, se administra a través de ruta inhalatoria, pero también es eficaz tras su administración oral. A pesar de que el sulfato de salbutamol se absorbe correctamente, su biodisponibilidad sistémica es sólo del 50% debido a un amplio metabolismo presistémico en el tracto gastrointestinal (TGI) y el hígado. Por ello, la administración oral del sulfato de salbutamol muestra un inicio de la acción lento y marginal. El metabolito posee poca o ninguna actividad β -adrenérgica^{25,26}.

El presente estudio va a examinar los efectos de la concentración de fármaco con pH 7,4, el pH del compartimento dador y el coeficiente de partición de 1-octanol/tampón en la permeación transbucal y la posible ruta de transporte *in vitro* de ambos fármacos a través de mucosa bucal porcina. Se midió la permeabilidad del sulfato de salbutamol con distintos valores de pH a través de la mucosa de un cerdo de Guinea como membrana modelo para comparar la permeabilidad de especies ionizadas y no ionizadas.

MATERIALES

La muestra de sulfato de salbutamol fue proporcionada de forma gratuita por Relax Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (Baroda, India). El ácido fosfórico y el fosfato dihidrógeno de potasio se adquirieron a S. D. Fine Chem. (Mumbai, India). El resto de reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional.

MÉTODOS

Medición de la solubilidad

La solubilidad del salbutamol se determinó con distintos pH 6,0, 7,4, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0. Se agregó un exceso de sulfato de salbutamol a 10 ml de soluciones tampón Mcllvaine en cada nivel. Las muestras se agitaron en un matraz cónico durante 24 horas a 37 °C. Se comprobó el pH de las muestras y se ajustó el pH con 0,1 M de ácido cítrico según fue necesario. Las suspensiones se filtraron con un papel de filtro Whatman de 0,45 mi-

sible *in-vitro* transport route of both drugs across porcine buccal mucosa. The permeability of salbutamol sulphate at several pH values through guinea pig mucosa as a model membrane were measured to compare the permeability of ionized and nonionized species

MATERIALS

Salbutamol sulphate was as gift sample from Relax Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (Baroda, India). Potassium dihydrogen phosphate and phosphoric acid were purchased from S. D. Fine Chem. (Mumbai, India). Other reagents used were of analytical grade and were used without additional purification.

METHODS

Solubility measurement

Solubility of salbutamol sulphate was determined at several pH 6.0, 7.4, 8.0, 9.0, 10.0 and 11.0. Excess of salbutamol sulphate was added to 10 ml of Mcllvaine buffer solutions at each level. The samples were stirred in a conical flask for 24 hour at 37 °C. The pH of the samples was checked, adjusting the pH with 0.1 M citric acid as necessary. The suspensions were filtered using a 0.45 micron whatman filter paper. The concentration of salbutamol sulphate in the filtrate was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 276 nm²⁷.

Determination of partition coefficient

1-Octanol was used to represent the bio-membrane. The partition coefficients between 1-octanol and Mcllvaine buffer solutions at different pH (from 6.0 to 11.0) at 37°C were determined by shake-flask method²⁷. 1-octanol and buffer solution were co-saturated with each other for 24 hr at 37°C before use. 1-Octanol (5 ml) was shaken with 5 ml buffer solution containing salbutamol sulphate (10 mg/ml) for 8 hrs at 37 °C. The mixture was then centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes and the concentration of drug in each phase

cras. La concentración de sulfato de salbutamol del filtrado se determinó de forma espectrofotométrica mediante la medición de la absorbencia a 276 nm²⁷.

Determinación del coeficiente de partición

Se utilizó 1-octanol para representar la biomembrana. Se determinaron los coeficientes de partición entre las soluciones tampón McIlvaine y 1-octanol con distintos pH (entre 6,0 y 11,0) a 37 °C con el procedimiento de agitación del matraz (27). Las soluciones tampón y 1-octanol se saturaron mutuamente durante 24 horas a 37 °C antes de su uso. Se agitaron 5 ml de 1-octanol con 5 ml de solución tampón que contenía sulfato de salbutamol (10 mg/ml) durante 8 horas a 37 °C. A continuación, se centrifugó la mezcla a 2000 rpm durante 10 minutos y se determinó de forma espectrofotométrica la concentración de fármaco en cada fase mediante la medición de la absorbencia a 276 nm en fase acuosa. El coeficiente de partición (K_p) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{C_2} \quad (3)$$

Donde C_1 es la concentración original de fármaco en fase acuosa y C_2 es la concentración final de fármaco en fase acuosa.

Obtención y preparación del tejido bucal

Se seleccionó el tejido bucal de un cerdo de Guinea, porque su morfología no queratinizada es bastante similar al epitelio bucal humano^{1,11}. El tejido bucal se extrajo tras el sacrificio del animal, se almacenó en un tampón Krebs pH 7,4 y se transportó inmediatamente a las instalaciones donde se iba a realizar el experimento. Las membranas mucosas bucales se separaron mediante la extracción de los tejidos conjuntivos subyacentes con unas tijeras quirúrgicas, asegurándose de no retirar la membrana basal²⁸⁻³⁰. El grosor de los fragmentos osciló entre 500-600 μ m. Dichos fragmentos se colocaron entre los compartimentos receptores y dadores de las células de

was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 276 nm in aqueous phase. The partition coefficient (K_p) was calculated from the following equation:

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{C_2} \quad (3)$$

Where C_1 is the original concentration of drug in aqueous phase and C_2 is the final concentration of drug in aqueous phase.

Collection and preparation of buccal tissue

Guinea pig buccal tissue was chosen, because its non-keratinized morphology is quite similar to human buccal epithelium^{1,11}. Buccal tissue was removed after sacrificing the animal and was stored in Krebs buffer pH 7.4 and was immediately transported to the experimental set-up. The buccal mucosa membranes were separated by removing the underlying connective tissues using surgical scissors, making, sure that the basal membrane was still present²⁸⁻³⁰. Slice thickness was ranged from 500-600 μ m and mounted between donor and receiver chambers of the diffusion cells for permeation studies.

In vitro permeation study through buccal mucosa

The prepared buccal mucosa membranes with an approximate area of 4.00 cm² were mounted between the donor and receiver chambers of Franz type diffusion cells with an available diffusion area of 1.76 cm². The receiver chambers were filled with 10 ml of McIlvaine buffer solution at pH 7.4 and the donor chambers were filled with 5 ml solution of salbutamol sulphate of different concentration at McIlvaine buffer pH 7.4 or solution of salbutamol sulphate (0.4 mg/ml) in McIlvaine buffer solutions of different pH (6.0, 7.4, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0). Samples (0.3 ml) were withdrawn from receptor compartment at predetermined time interval (10, 30, 60, 90, 120, 180 minutes) replaced with the same volume of fresh medium and subsequently assayed by HPLC method. The amount of drug pre-

difusión para realizar los estudios de permeación.

Estudio de permeación in vitro a través de la mucosa bucal

Las membranas mucosas bucales preparadas con un área aproximada de 4,00 cm² se montaron entre los compartimentos receptores y dadores de las células de difusión Franz con un área de difusión disponible de 1,76 cm². Los compartimentos receptores se rellenaron con 10 ml de solución tampón McIlvaine pH 7,4 y las cámaras dadoras se rellenaron con 5 ml de solución de sulfato de salbutamol de distinta concentración en tampón McIlvaine pH 7,4 o solución de sulfato de salbutamol (0,4 mg/ml) en soluciones tampón McIlvaine con distintos pH (6,0, 7,4, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0). Las muestras (0,3 ml) se transfirieron desde el compartimento receptor a intervalos de tiempo predeterminados (10, 30, 60, 90, 120, 180 minutos), se sustituyeron por el mismo volumen de medio y posteriormente se sometieron a ensayo mediante el método HPLC. Se determinó la cantidad de fármaco presente en el compartimento dador y se trazó como una ecuación de tiempo. Los coeficientes de permeabilidad (P) se calcularon a partir de la parte lineal de las curvas, tal como se muestra a continuación¹⁹:

$$P = \frac{dQ/dt}{AC_d} \quad (4)$$

Donde, A = área de superficie de difusión, dQ/dt = cantidad de fármaco penetrada por unidad de tiempo en estado estable y C_d = concentración de fármaco dadora.

La permeabilidad del sulfato de salbutamol se evaluó con distintos pH (entre 6,0 y 11,0). Se calculó el flujo de estado estable (J_{ss} = P x C_d) del fármaco con pH 7,4 a distintas concentraciones de fármaco. También se calcularon los coeficientes de permeabilidad de especies ionizadas (P_i) y no ionizadas de sulfato de salbutamol con distintos pH.

sent in donor compartment was determined and was plotted as a function of time. The permeability coefficients (P) were calculated from the linear part of the curves as follows (19):

$$P = \frac{dQ/dt}{AC_d} \quad (4)$$

Where, A = the surface area of diffusion, dQ/dt = amount of drug permeated per unit time at steady state and C_d = donor drug concentration.

The permeability of salbutamol sulphate was evaluated at different pH (from 6.0 to 11.0). The steady state flux (J_{ss} = P x C_d) of the drug at pH 7.4 was calculated at different drug concentration. Permeability coefficients of unionized (P_u) and ionized species (P_i) of salbutamol sulphate at different pH were also calculated.

Drug retention in mucosa

The mucosa was separated from the diffusion cell after the permeation run of donor solution containing 0.4 mg/ml salbutamol sulphate at various pH and was homogenized using a mortar and pestle and extracted three times with 10 ml methanol. The organic layer was centrifuged at 7000 rpm for 10 min to separate the cellular components. The extract was diluted suitably and was analyzed by HPLC method.

HPLC method

The HPLC system consisted of an LC 290 pump (Model LC 290, Perkin-Elmer, Inc., MA, USA) with UV detector (Model 290, Perkin Elmer, Inc., MA, USA) set at 276 nm, PE Nelson 1020 integrator and PE Nelson 1020 computer system. The samples were injected manually using a Rheodyne injector (Model 7125, Rheodyne, Cotati, California, USA) with a 20-μl loop. HPLC column (250 x 4.6 mm) was a 5 micron C₁₈ column (Hypersil, BDS, Reverse phase) from Thermo Electron Corporation, USA. The Mobile phase consisted of water (70 %), methanol (20 %) and acetonitri-

Retención del fármaco en la mucosa

La mucosa se separó de la célula de difusión tras la permeación de la solución dadora que contenía 0,4 mg/ml de sulfato de salbutamol con distintos pH, se homogeneizó mediante un mortero y una mano de mortero y se extrajo tres veces con 10 ml de metanol. La capa orgánica se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min para separar los componentes celulares. El extracto se diluyó adecuadamente y se analizó mediante el método HPLC.

Método HPLC

EL sistema HPLC consta de una bomba LC 290 (modelo LC 290, Perkin-Elmer, Inc., MA, EE.UU.) con detector de UV (modelo 290, Perkin Elmer, Inc., MA, EE.UU.) fijado en 276 nm, y un integrador y un sistema informático PE Nelson 1020. Las muestras se inyectaron manualmente con un inyector Rheodyne (modelo 7125, Rheodyne, Cotati, California, EE.UU.) con un volumen de inyección de 20- μ l. La columna HPLC (250 x 4,6 mm) era una columna de C₁₈ de 5 micras (Hypersil, BDS, fase inversa) de Thermo Electron Corporation, EE.UU. La fase móvil consistió en agua (70%), metanol (20%) y acetonitrilo (10%) y se filtró a través de un papel de filtro Whatman de 0,45 micras antes de su uso. La cromatografía se realizó isocráticamente con una velocidad de flujo de 1,2 ml/min a temperatura ambiente (aproximadamente 29 °C) y se obtuvo un tiempo de retención de 3,5 minutos. La cantidad de sulfato de salbutamol presente en la muestra se calculó a partir de la curva de calibración estándar preparada con un valor de coeficiente de correlación superior a 0,9996. El gráfico de calibración fue lineal en el rango de concentración de 0,2-2,0 μ g/ml. La precisión y la exactitud del método se situaron entre 0,96-2,28% y 98,71-100,83%, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH en la solubilidad

La solubilidad de la solución tampón de sulfato de salbutamol con distintos pH des-

le (10 %) and was filtered through a 0.45-micron whatman filter paper before use. The chromatography was performed isocratically at a flow rate of 1.2 ml/min at room temperature (approximately 29 °C) and retention time of 3.5 min was obtained. The amount of salbutamol sulphate present in sample was calculated from prepared standard calibration curve having correlation coefficient value more than 0.9996. The calibration graph was linear in the concentration range of 0.2-2.0 μ g/ml. The precision and accuracy of the method was between 0.96-2.28 % and 98.71-100.83 %, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of pH on solubility

The solubility of salbutamol sulphate at different pH buffer solution decreased with increasing pH. The solubility of the drug at pH 11.0 was about five times lesser than that of at pH 6.0. The results are shown in Table 1.

cedió al aumentar el pH. La solubilidad del fármaco con pH 11,0 fue aproximadamente tres veces inferior a la obtenida con el pH 6,0. Los resultados aparecen en la Tabla 1.

TABLA 1. Solubilidad del sulfato de salbutamol con distintos pH.
TABLE 1. Solubility of salbutamol sulphate at different pH.

pH	6,0	7,4	8,0	9,0	10,0	11,0
Solubilidad (mg/ml) <i>Solubility</i>	409,58	328,74	298,20	210,17	129,34	82,63

Parámetros de permeación

Los perfiles de permeación del sulfato de salbutamol en solución tampón Mcllvaine (10 mg/ml) con distintos valores de pH aparecen en la Figura 1. La permeación del fármaco fue superior con pH 11,0 que con el resto de pH estudiados. La cantidad de fármaco penetrada aumentó de forma lineal después de una hora en cada valor de pH. Los parámetros de permeación como, por ejemplo, el coeficiente de permeabilidad y la velocidad de flujo de estado estable aparecen en la Tabla 2. La velocidad de flujo del fármaco aumentó a medida que aumentaba el valor del pH de la solución dadora, y el flujo total con pH 11,0 fue aproximadamente 3,5 veces superior a aquel con pH 6,0. El coeficiente de permeabilidad aumentó al aumentar el valor de pH.

Permeation parameters

The permeation profiles of salbutamol sulphate in Mcllvaine buffer solution (10 mg/ml) having different pH values are shown in Figure 1. Permeation of the drug was highest at pH 11.0 than that of the other pH studied. The permeated amount of drug increased linearly after 1 hr at each pH value. The permeated parameters such as steady state flux rate and permeability coefficient are given in Table 2. The flux rate of the drug increased as the pH value of the donor solution increased, and the total flux at pH 11.0 was approximately 3.5 times higher than that of it at pH 6.0. The permeability coefficient increased with increasing the pH value.

FIGURA 1. Los perfiles de permeación del sulfato de salbutamol a través de la mucosa bucal porcina: (□%) pH 6,0, (■%) pH 7,4, (▲%) pH 8,0, (○%) pH 9,0, (△) pH 10,0, (●%) pH 11,0. Cada punto representa la media ± D. E. de cinco experimentos.

FIGURE 1. Permeation profiles of salbutamol sulphate through porcine buccal mucosa: (□%) pH 6.0, (■%) pH 7.4, (▲%) pH 8.0, (○%) pH 9.0, (△) pH 10.0, (●%) pH 11.0. Each point represents the mean ± S. D. of five experiments.

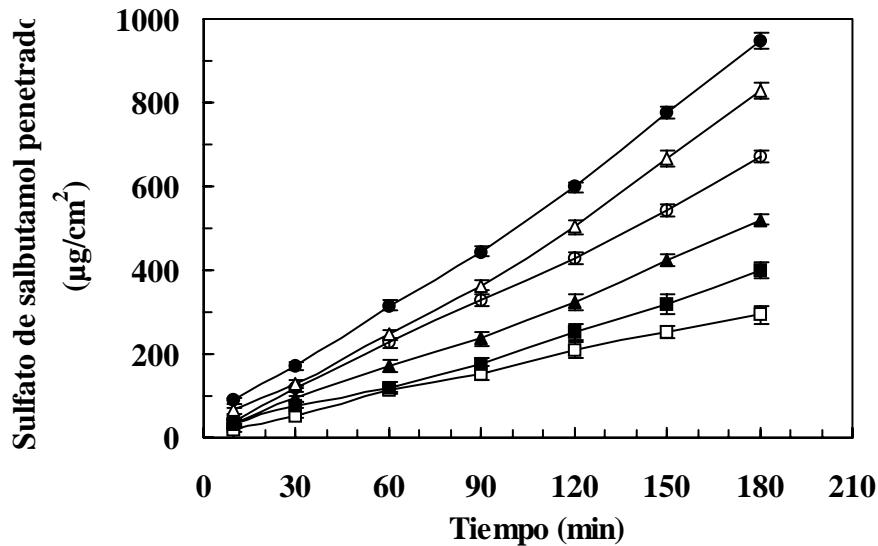


TABLA 2. Parámetros de permeación del sulfato de salbutamol (concentración del compartimento dador: 10 mg/ml).

TABLE 2. Permeation parameters of salbutamol sulphate (Donor Compartment Concentration-10 mg/ml).

pH	$J^b \times 10^{-2}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{seg.}$)	$P^b \times 10^{-5}$ (cm/seg.)
6,0	$4,39 \pm 0,36$	$0,25 \pm 0,02$
7,4	$6,79 \pm 0,48$	$0,38 \pm 0,02$
8,0	$8,52 \pm 0,62$	$0,48 \pm 0,04$
9,0	$10,85 \pm 0,81$	$0,61 \pm 0,05$
10,0	$14,29 \pm 0,94$	$0,81 \pm 0,07$
11,0	$15,43 \pm 0,87$	$0,87 \pm 0,13$

^bLos valores de flujo de estado estable (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{seg.}$) y el coeficiente de permeabilidad (P , cm/seg.) se calcularon a partir de la línea recta obtenida mediante la determinación de la cantidad de fármaco penetrada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (seg.). Cada valor representa la media ± D. E. ($n=5$).

^bThe values of steady state flux (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sec}$) and permeability coefficient (P , cm/sec) were calculated from the straight line obtained by plotting the permeated amount of drug ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus time (sec). Each value represents the mean ± S. D. ($n=5$).

El flujo de estado estable del sulfato de salbutamol con pH 7,4 aumentó de $4,8 \pm 0,18 \times 10^{-5}$ a $31,36 \pm 0,42 \times 10^{-5}$ mg/cm²/seg. mientras que la concentración de fármaco del compartimento dador aumentó de 5,0 a 25,0 mg/ml. El efecto de la concentración dadora del fármaco en flujo de estado estable con pH 7,4 aparece en la Figura 2. Se observó una relación lineal entre el flujo y la concentra-

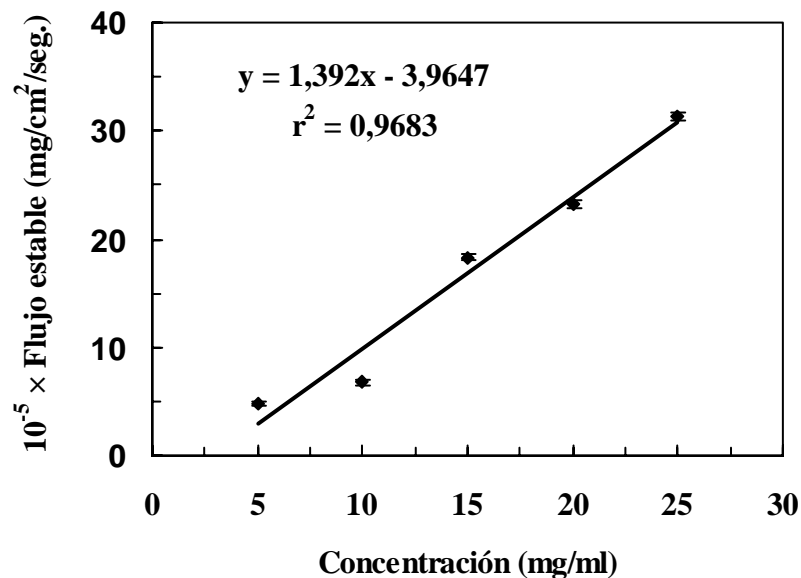
The steady state flux of salbutamol sulphate at pH 7.4 increased from $4.8 \pm 0.18 \times 10^{-5}$ to $31.36 \pm 0.42 \times 10^{-5}$ mg/cm²/sec as the drug concentration in donor compartment was increased from 5.0 to 25.0 mg/ml. The effect of donor concentration of the drug on steady state flux at pH 7.4 is shown in Figure 2. A linear relationship was observed between the flux and drug concentration ($r^2=0.9683$) whi-

ción de fármaco ($r^2=0,9683$), que demostró que el transporte del fármaco a través de la mucosa bucal en el rango de concentraciones investigado fue un proceso de difusión pasivo.

ch showed that the transport of drug through buccal mucosa over the range of concentrations investigated was a passive diffusion process.

FIGURA 2. Efecto de la concentración dadora de sulfato de salbutamol en flujo de estado estable con pH 7,4. Cada punto representa la media \pm D. E. de cinco experimentos.

FIGURE 2. Effect of donor concentration of salbutamol sulphate on steady state flux at pH 7.4. Each point represents the mean \pm S. D. of five experiments.



Efecto del pH en el coeficiente de partición y la permeabilidad

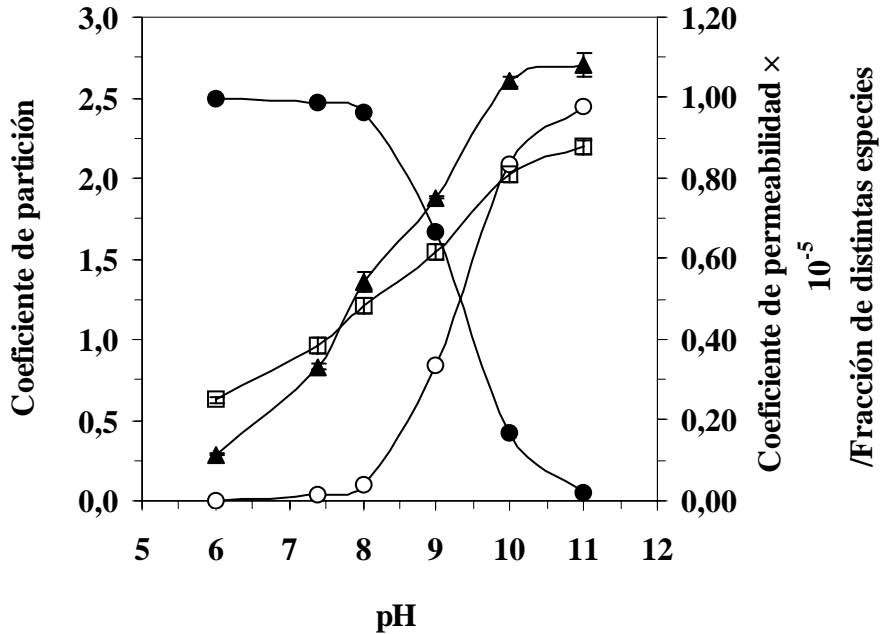
Tanto el coeficiente de partición de la solución 1-octanol/tampón como el coeficiente de permeabilidad aumentaron al aumentar el pH de la solución tampón de 6,0 a 11,0 del compartimento dador. El efecto del pH sobre el coeficiente de permeabilidad y el coeficiente de partición del fármaco aparece en la Figura 3. El coeficiente de partición y el coeficiente de permeabilidad total aumentaron al aumentar el pH y al aumentar la fracción de la forma no ionizada. El coeficiente de permeabilidad total con pH 11,0 fue 3,5 veces superior que el obtenido con pH 6,0. El aumento estadísticamente significativo de la permeación a través de la mucosa bucal porcina se pudo deber al aumento de la lipofilicidad con el pH 11,0 en comparación con el pH 6,0.

Effect of pH on partition coefficient and permeability

Both the apparent 1-octanol/buffer solution partition coefficient and the permeability coefficient increased with increasing the pH of buffer solution from 6.0 to 11.0 in the donor compartment. The effect of pH on permeability coefficient and partition coefficient of the drug is shown in Figure 3. The partition coefficient and the total permeability coefficient increased with increasing the pH and with increasing the fraction of unionized form. The total permeability coefficient at pH 11.0 was 3.5 times higher than that of at pH 6.0. The statistically significant increased in permeation across porcine buccal mucosa may be due to the increased lipophilicity at pH 11.0 as compared with pH 6.0

FIGURA 3. Efecto del pH sobre el coeficiente de permeabilidad y el coeficiente de partición del sulfato de salbutamol: (□%) Coeficiente de permeabilidad x 10⁻⁵, (▲%) Coeficiente de partición, (●%) Fracción de especies ionizadas, (○%) Fracción de especies no ionizadas. Cada punto representa las medias ± D. E. de cinco experimentos.

FIGURE 3. Effect of pH on permeability coefficient and partition coefficient of salbutamol sulphate: (□%) Permeability coefficient x 10⁻⁵, (▲%) Partition coefficient, (●%) Fraction of ionized species, (○%) Fraction of unionized species. Each point represents the means ± S. D. of five experiments.



De acuerdo con las ecuaciones mencionadas anteriormente y el supuesto de que el fármaco tendrá la misma tendencia de partición en 1-octanol y la biomembrana, la permeabilidad del fármaco no debería afectar al coeficiente de partición si pasa a través de la ruta paracelular (Ecuación 1), mientras que la permeabilidad debería variar con el coeficiente de partición si el fármaco se transporta a través de la ruta transcelular (Ecuación 2). Por tanto, la ruta de transporte de permeación del fármaco puede afectar ya que el coeficiente de partición depende del pH. En nuestro estudio, las permeabilidades del fármaco fueron proporcionales a los coeficientes de partición y aumentaron al aumentar lentamente el pH (Figura 3), lo que demostró que una ruta paracelular era la ruta principal de la permeación bucal del fármaco. Para proporcionar más explicaciones sobre los resultados de este experimento, asumimos que la forma no ionizada pasa principalmente a través de la ruta transcelular y la forma ionizada se transporta a través de la ruta paracelular. El flujo de

According to equations mentioned above and the assumption that drug will have the same partition tendency at 1-octanol and the biomembrane, the permeability of drug should have nothing to do with the partition coefficient if it goes through the paracellular route (Eq. 1), while the permeability shall vary with the partition coefficient if the drug was transported via the transcellular route (Eq. 2). Therefore, the transport route of drug permeation can be reflected since partition coefficient is pH dependent. In our study, the permeabilities of drug was proportional to the partition coefficients and increased with increasing pH (Fig. 3) slowly, which showed a paracellular route to be the main pathway for the buccal permeation of the drug. To further explain our experimental results, we assume that unionized form mainly goes through transcellular route and the ionized form transports via the paracellular route, the steady state flux can be expressed by the following equation¹⁹:

$$J_t = P_t C_t = J_u + J_i = P_u C_u + P_i C_i \quad (5)$$

estado estable se puede expresar mediante la siguiente ecuación¹⁹:

$$J_t = P_t C_t = J_u + J_i = P_u C_u + P_i C_i \quad (5)$$

Donde,

J_t = flujo total de fármaco, J_u = flujo transcelular, J_i = flujo paracelular, C_u = concentración de especies no ionizadas, C_i = concentración de especies ionizadas, C_t = concentración total de fármaco, P_t = permeabilidad total del fármaco

Por lo que,

$$P_t = P_u \frac{C_u}{C_t} + P_i \frac{C_i}{C_t} \quad (6)$$

El sulfato de salbutamol es un fármaco básico con dos pKa de 9,3 y 10,3. Se calculó el porcentaje de especies distintas con un pH determinado mediante el ajuste del valor pKa de 9,3 en la ecuación Henderson-Hasselbalch.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{unionized}]}{[\text{ionized}]} \quad (7)$$

P_u y P_i se calcularon mediante el ajuste de P_t , C_u/C_t y C_i/C_t con distintos pH con la ecuación (6). El valor calculado para P_u fue $8,89 \times 10^{-6}$ cm/seg., aproximadamente cuatro veces superior al valor de P_i , $2,49 \times 10^{-6}$ cm/seg. El coeficiente de permeabilidad calculado (P_{cal}) se determinó con el coeficiente de permeabilidad observado con diversos pH (Figura 4). Se observó una buena linealidad ($r^2 = 0,9489$) entre el coeficiente de permeabilidad observado y el coeficiente de permeabilidad calculado con diversos pH, lo que indica la fiabilidad del modelo matemático utilizado para el cálculo de P_i y P_u .

Where,

J_t = total flux of drug, J_u = transcellular flux, J_i = paracellular flux, C_u = concentration of unionized species, C_i = concentration of ionized species, C_t = total drug concentration, P_t = total drug permeability

So,

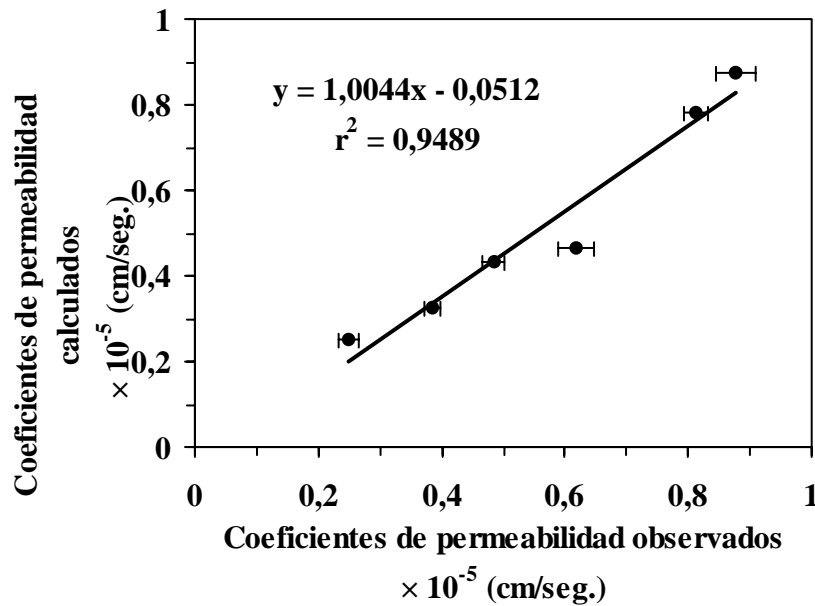
$$P_t = P_u \frac{C_u}{C_t} + P_i \frac{C_i}{C_t} \quad (6)$$

Salbutamol sulphate is a basic drug with two pKa of 9.3 and 10.3. The percentage of different species at a given pH was calculated by using fitting the pKa value of 9.3 in the Henderson-Hasselbalch equation.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{unionized}]}{[\text{ionized}]} \quad (7)$$

P_u and P_i were calculated by fitting P_t , C_u/C_t and C_i/C_t at different pH to Eq. (6). The calculated value for P_u was 8.89×10^{-6} cm/sec which is about four times higher than P_i , 2.49×10^{-6} cm/sec. The calculated permeability coefficient (P_{cal}) was plotted with the observed permeability coefficient at various pH which is shown in Figure 4. Good linearity ($r^2 = 0.9489$) was observed between the observed permeability coefficient and the calculated permeability coefficient at various pH which indicates the reliability of the mathematical model used for the calculation of P_i and P_u .

FIGURA 4. Correlación entre el coeficiente de permeabilidad observado y el coeficiente de permeabilidad calculado. Cada punto representa las medias \pm D. E. de cinco experimentos.
FIGURE 4. Correlation between observed permeability coefficient and calculated permeability coefficient. Each point represents the means \pm S. D. of five experiments.



El coeficiente de permeabilidad total y el coeficiente de partición del sulfato de salbutamol aumentaron lentamente con la fracción de la forma no ionizada (Figura 3). Estos resultados sugirieron que el sulfato de salbutamol se transporta a través de la ruta paracelular de acuerdo con nuestro supuesto. La ruta de transporte del fármaco depende de la lipofilidad del fármaco. Los compuestos hidrofílicos atraviesan principalmente la mucosa bucal a través de la ruta paracelular mientras que la ruta transcelular es la ruta de transporte principal de los compuestos lipofílicos¹¹. El sulfato de salbutamol es una pequeña molécula hidrofílica con un peso molecular de 576,70³¹. Por tanto, la ruta paracelular es probablemente la ruta dominante. Se determinó un coeficiente de partición máximo (1-octanol/agua) de 2,7 con un pH 11,0, mientras que el coeficiente de partición con un pH 6,0 fue de 0,29. En este punto, el aumento de la lipofilidad con un pH 11,0 en comparación con un pH 6,0 dio lugar a un aumento estadísticamente significativo de la permeación a través de la mucosa bucal porcina. Por tanto, el aumento de la hidrofiliidad consiguió que la ruta paracelular jugara un papel

The total permeability coefficient and the partition coefficient of salbutamol sulphate increased with the fraction of unionized form slowly (Fig. 3). These results suggested that salbutamol sulphate transports via paracellular route based on our assumption. The transport pathway of drug depends on the lipophilicity of the drug. Hydrophilic compounds mainly cross the buccal mucosa via the paracellular route while the transcellular pathway is their main transport route for lipophilic compounds¹¹. Salbutamol sulphate is a small hydrophilic molecule with a molecular weight of 576.70³¹. Therefore, the paracellular route is most likely the dominant pathway. A maximum partition coefficient (1-octanol/water) of 2.7 was found at pH 11.0, while the partition coefficient at pH 6.0 was 0.29. Here increased lipophilicity at pH 11.0 as compared with pH 6.0 resulted in a statistically significant increase in permeation across porcine buccal mucosa. Thus the increase in hydrophilicity made the paracellular pathway to play a significant role in the permeation of salbutamol sulphate.

fundamental en la permeación del sulfato de salbutamol.

Contenido de fármaco en la mucosa

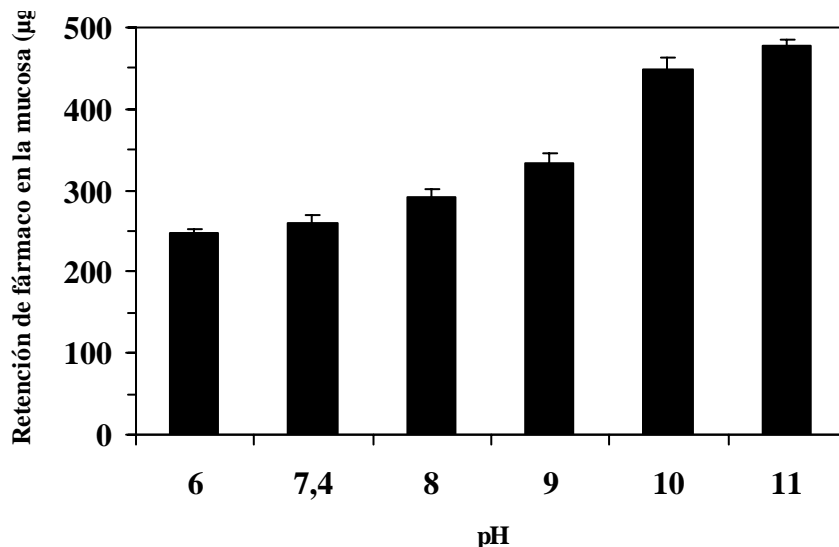
Los resultados relacionados con la cantidad de fármaco retenida en la mucosa después de distintos análisis con diversos pH aparece en la Figura 5. La retención de fármaco en la mucosa con pH 11,0 fue aproximadamente dos veces superior a la obtenida con pH 6,0. El valor de contenido de fármaco en la mucosa aumentó al aumentar el pH de 6,0 a pH 11,0. El aumento de contenido de fármaco con un pH más elevado se puede deber al aumento del coeficiente de partición con un pH más elevado.

Drug content in mucosa

Results of drug remained in mucosa after different run at various pH is shown in Figure 5. The drug retention of mucosa at pH 11.0 was approximately two times higher than that of pH 6.0. The value of drug content in mucosa increased with increasing pH from 6.0 to pH 11.0. The increase in drug content at higher pH may be due to higher partition coefficient at higher pH.

FIGURA 5. Contenido de sulfato de salbutamol (μg) en la mucosa después de análisis con distintos pH. Cada punto representa las medias \pm D. E. de cinco experimentos.

FIGURE 5. Content of salbutamol sulphate (μg) in mucosa after run at various pH. Each point represents the means \pm S. D. of five experiments.



CONCLUSIÓN

El sulfato de salbutamol penetró a través de la mucosa bucal mediante un proceso de difusión pasivo en los rangos de concentraciones examinados. Los coeficientes de permeabilidad y el flujo de estado estable del sulfato de salbutamol a través de la mucosa bucal porcina aumentaron al aumentar los valores de pH. El coeficiente de partición de

CONCLUSION

Salbutamol sulphate permeated through the buccal mucosa by passive diffusion over the range of concentrations examined. Permeability coefficient and steady state flux of salbutamol sulphate across porcine buccal mucosa increased with increasing pH values. The 1-octanol/buffer partition coefficient of the drug also increased with increasing pH. The per-

1-octanol/tampón del fármaco también aumentó al aumentar el pH. El coeficiente de permeabilidad de las especies no ionizadas fue superior al de las especies ionizadas, lo que indicó que las especies no ionizadas de sulfato de salbutamol penetraron correctamente a través de la mucosa bucal porcina y que la permeación está basada en el pH. Los resultados del presente estudio indican que el sulfato de salbutamol penetró correctamente a través de la mucosa bucal porcina, posiblemente gracias a la permeación a través de la ruta paracelular. La administración transbucal ha demostrado ser una posible ruta para la administración de sulfato de salbutamol.

RECONOCIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a las distintas agencias que aparecen en la sección de materiales por proporcionar las muestras gratuitas. También desean manifestar su agradecimiento al Dr. Mr. A. J. Thakker por la ayuda aportada al presente estudio.

meability coefficient of unionized species was greater than that of ionized species which indicated that the nonionized species of salbutamol sulphate penetrated well through porcine buccal mucosa and the permeation was a function of pH. The results of this study indicate that the salbutamol sulphate penetrated well through porcine buccal mucosa this might be due to the paracellular route of permeation. Transbuccal delivery has been shown to be a potential route for the administration of salbutamol sulphate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the various agencies shown in the materials section for providing gift samples. The authors are grateful to Dr. Mr. A. J. Thakker for his help in this study.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Gandhi RB, Robinson JR. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1994; 13: 43-74.
2. Patterson KW, Keane PW. Use of the buccal route for the administration of an antiemetic. *Pharm Res* 1989; 6: 160-166.
3. Rathbone MJ, Hasgraft J. Absorption of drugs from the human oral cavity. *Int J Pharm* 1991; 71: 9-24.
4. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 48: 173-193.
5. Senel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Contr Rel* 2001; 72: 133-144.
6. Junginger HE, Hoogstraate JA, Verhoef JC. Recent advances in buccal drug delivery and absorption—in vitro and in vivo studies. *J Contr Rel* 1999; 62: 149-159.
7. Chen LL, Chetty DJ, Chien YW. A mechanistic analysis to characterize oramucosal permeation properties. *Int J Pharm* 1999; 184: 63-72.
8. Al-sayed-omar O, Johnson A, Turner P. Influence of pH on the buccal absorption of morphine sulphate and its major metabolite, morphine-3-glucuronide. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39: 934-935.
9. Nair MK, Chetty DJ, Ho H, Chien YW. Biomembrane permeation of nicotine: mechanistic studies with porcine mucosa and skin. *J Pharm Sci* 1997; 86: 257-262.
10. Nielson MN, Rassing MR. Nicotine permeability across the buccal TR 146 cell culture model and porcine mucosa in vitro: effect of pH and concentration. *Eur J Pharm Sci* 2002; 16: 151-157.
11. Deneer VH, Drese GB, Roemele PE, Verhoef JC, Lie-A-Huen L, Kingma JH, Brouwers JR, Junginger HE. Buccal transport of flecainide and sotalol: effect of a bile salt and ionization state. *Int J Pharm* 2002; 241: 127-134.
12. Coutel-Egros A, Maitani Y, Veillard M, Machida Y, Nagai T. Combined effects of pH, cosolvent and penetration enhancers on the in vitro buccal absorption of propranolol through excised hamster cheek pouch. *Int J Pharm* 1992; 84: 117-128.
13. Nielsen HM, Rassing MR. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: III. Permeability enhancement by different pH value, different osmolarity value, and bile salts. *Int J Pharm* 1999; 185: 215-225.
14. Gandhi RB, Robinson JR. Mechanisms of penetration enhancement for transbuccal delivery of salicylic acid. *Int J Pharm* 1992; 85: 129-140.
15. Shojaei AH, Berner B, Li X. Transbuccal delivery of acyclovir: I. in vitro determination of buccal transport. *Pharm Res* 1998; 15: 1182-1188.

16. Beckett AH, Moffat AC. Correlation of partition coefficients in n-heptane –aqueous systems with buccal absorption data for a series of amines and acids. *J Pharm Pharmacol* 1969; 21: Suppl 144S-150S.
17. Beckett AH, Triggs EJ. Buccal absorption of basic drugs and its application as an in vivo model passive drug transfer through lipid membrane. *J Pharm Pharmacol* 1967; 19: Suppl 31S-41S.
18. Le Brun PPH, Fox PLA, De Vries ME, Bodde HE. In vitro penetration of some α -adrenoreceptor blocking drugs through porcine buccal mucosa. *Int J Pharm* 1989; 49: 141-145.
19. Chen L, Hui-Nan X, Xiao-Ling L. In vitro permeation of tetramethylpyrazine across porcine buccal mucosa. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 792-796.
20. Garren KW, Repta AJ. Buccal drug absorption-II. In vitro diffusion across the hamster cheek pouch. *J Pharm Sci* 1989; 78: 160-164.
21. Chettu DJ, Chen LL, Chien YW. Characterization of captopril sublingual permeation: determination of routes and mechanisms. *J Pharm Sci* 2001; 90: 1868-1877.
22. Ishizawa T, Hayashi M, Awazu S. Paracellular and transcellular permeabilities of fosfomycin across small intestinal membrane of rat and rabbit by voltage-clamp method. *J Pharmacobiodyn* 1991; 14: 583-589.
23. Toropainen E, Ranta V, Vellonen K, Palmgren J, Tavitie A, Laavola M, Suhonen P, Hamalainen KM, Auriola S, Urtti A. Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *Eur J Pharm Sci* 2003; 20: 99-106.
24. Zhang H, Robinson JR. In Vitro Methods for Measuring Permeability of the Oral Mucosa, in Swarbrick, J; Boylan, JC, (eds), *Oral Mucosal Drug Delivery*. 1st ed., Vol 74, Marcel Dekker, INC, New York, NY, pp 85-100, 1996.
25. Morgan DJ, Paull JD, Richmond BH, Wilsen-Evered E, Ziccone SP. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulfate conjugate. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 22: 587-593.
26. Sweetman SC. *Martindale: The complete drug reference*, 33th Edn, 2002, Pub. By Pharmaceutical press, London, 770-773.
27. Takahashi K, Sakano H, Rytting HJ, Numata N, Kuroda S. Influence of pH on the permeability of p- toluidine and aminopyrine through shed snake skin as a model membrane. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27: 159-164.
28. Hoogstraate AJ, Senel S, Cellander C, Verhoef JC, Junginger HE, Bodde HE. Effects of bile salts on transport routes and routes of FITC-labelled compounds across porcine buccal epithelium in vitro. *J Contr Rel* 1996; 40: 211-221.
29. Tsutsumi K, Obata Y, Nagai T, Loftsson T, Takayama K. Buccal absorption of ergotamine tartrate using the bioadhesive tablet system in guinea pigs. *Int J Pharm* 2002; 238: 161-170.
30. Cui Z., Mumper RJ. Buccal transmucosal delivery of calcitonin in rabbits using thin-film composite. *Anesth Analg* 1992; 74: 937-938.
31. Jeppson AB, Johanson K, Waldeck B. Steric aspect of agonism and antagonism at beta-adrenoreceptors: experiments with the enantiomers of terbutaline. *Acta Pharmacol Toxicol* 1984; 54: 285-291.
32. 1984; 54: 285-291.