

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ENEJ BOLE

**USTREZNOST POTOPNE SONDE Z OPTIČNIMI VLAKNI ZA DOLOČANJE
KONCENTRACIJE PRENASIČENE RAZTOPINE NATRIJEVEGA
DIKLOFENAKATA MED TESTOM SPROŠČANJA**

**SUITABILITY OF THE FIBER OPTIC DIP PROBE FOR DETERMINATION OF
DICLOFENAC SODIUM CONCENTRATION IN SUPERSATURATED
SOLUTION DURING DISSOLUTION TESTING**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljaj na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj.

Zahvala

Mentorici prof. dr. Mariji Bogataj se zahvaljujem za odlično sodelovanje vse od začetnih faz izdelave naloge do zagovora. Za vso pomoč in izredno prijetno vzdušje v laboratoriju se zahvaljujem tudi Greti Cof in Tjaši Felicijan. Hvala tudi doc. dr. Iliji Iliću za pomoč pri meritvah velikosti delcev.

Svoji družini se zahvaljujem za vso podporo in za možnost študija v Ljubljani. Hvaležen sem, da sem lahko odraščal v okolju, ki je vedno cenilo in spodbujalo mojo ljubezen do naravoslovja.

Prijateljem, tako farmacevtskim kot tudi vsem ostalim, se zahvaljujem za vse lepe trenutke, ki smo jih tekom študija doživeli.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj.

Enej Bole

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 Prenasičenje	1
1.1.1 Prenasičenje v farmaciji.....	1
1.2 Testi sproščanja.....	2
1.2.1 Testiranje sproščanja iz FOp	2
1.2.2 Določanje koncentracije učinkovine <i>in situ</i>	3
2 NAMEN DELA	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 Materiali in aparature	10
3.2 Priprava raztopin in medijev	11
3.3 Tabletiranje	12
3.4 Določanje koncentracij učinkovin	13
3.4.1 Umeritvene premice	13
3.5 Testi sproščanja.....	15
3.5.1 Priprava vzorcev na meritev absorbance v kivetih.....	16
3.5.2 Izračun profilov sproščanja	16
3.6 Vpliv motnosti na meritve s sondo	17
3.6.1 Vpliv delcev MCC na meritve s sondo.....	17
3.6.2 Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo.....	18
3.7 Določanje velikosti delcev	18
3.7.1 Določanje velikosti delcev MCC.....	19

3.7.2	Določanje velikost delcev oborjenega diklofenaka	19
4	REZULTATI	20
4.1	Umeritvene premice	20
4.2	Testi sproščanja	20
4.3	Vpliv motnosti na meritve s sondo	27
4.3.1	Vpliv delcev MCC na meritve s sondo	27
4.3.2	Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo	29
4.4	Določanje velikost delcev	37
4.4.1	Določanje velikost delcev MCC	37
4.4.2	Določanje velikost delcev oborjenega diklofenaka	38
5	RAZPRAVA	43
5.1	Optimizacija uporabe sonde z ozirom na potencialne vire napak	43
5.2	Umeritvene premice	44
5.3	Testi sproščanja	44
5.3.1	Tablete s paracetamolom	44
5.3.2	Tablete z Na-DF in PVP	45
5.3.3	Tablete z Na-DF in drugimi polimeri	49
5.3.4	Tablete z Na-DF in PVP v mediju z dodanim PVP	51
5.4	Vpliv motnosti na meritve s sondo	51
5.4.1	Vpliv delcev MCC na meritve s sondo	52
5.4.2	Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo	54
6	SKLEP	60
7	LITERATURA	62

POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo preiskali možnost uporabe potopne sonde z optičnimi vlakni kot alternative klasičnemu UV spektrofotometričnemu določanju koncentracije v testih sproščanja iz farmacevtskih oblik, ki temeljijo na doseganju prenasičenja. Meritve s sondo imajo pri testiranju takih farmacevtskih oblik to prednost, da potekajo *in situ* in se z njimi izognemo koraku vzorčenja, tekom katerega se koncentracija zaradi težnje k obarjanju učinkovine lahko zniža, kar pomeni lažno nižje rezultate.

Teste sproščanja smo izvajali v napravi z vesli, opisani v ameriški farmakopeji. Kot modelni učinkovini sta služila paracetamol in natrijev diklofenakat. Tablete smo stisnili sami. Uporabili smo dva različna medija: 0,001 M HCl in 4-krat redčen McIlvainov pufer s pH vrednostjo 4. Čeprav so nas zanimali prenasičeni sistemi, smo najprej izvajali teste sproščanja paracetamola iz tablet s podaljšanim sproščanjem, kjer koncentracije učinkovine niso presegale topnosti. Šele nato smo se lotili testov sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet, ki omogočajo doseganje prenasičenja. Koncentracije smo v istih časovnih točkah določali tako s sondo kot s klasično UV-Vis spektrofotometrično analizo in primerjali dobljene profile sproščanja. Delci mikrokristalne celuloze (sestavina nekaterih tablet) in delci oborjenega diklofenaka vplivajo na meritve s sondo. Ta vpliv smo ovrednotili s snemanjem absorpcijskih spektrov in določanjem velikosti delcev z lasersko difrakcijo.

Korelacija med profili, pridobljenimi z obema načinoma meritev, je bila v testih sproščanja paracetamola zelo dobra. Enako ne velja za rezultate sproščanja natrijevega diklofenakata, kjer so se profili sonde močno razlikovali od profilov, pridobljenih s klasično metodo določanja koncentracije. Razlik nismo uspeli odpraviti niti z odštevanjem absorbance pri valovni dolžini 400 nm, kjer diklofenak ne absorbira. Vzrok je motnost zaradi oborjenega diklofenaka, saj smo dokazali, da je možno vpliv motnosti zaradi delcev mikrokristalne celuloze uspešno odpraviti z omenjenim načinom korekcije (odštevanje absorbance pri 400 nm). Diklofenak se je v posodah nahajal tudi v obliki nanodelcev, kar smo potrdili s poskusi določanja velikosti delcev. Za nanodelce je v splošnem značilno od valovne dolžine odvisno sipanje svetlobe, kar podpirajo tudi rezultati poskusov snemanja absorpcijskih spektrov. Iz oblike profilov sproščanja je bilo razvidno, da so naše tablete z natrijevim diklofenakatom in PVP uspele zagotoviti prenasičeno stanje. Začetnemu porastu koncentracije je namreč sledil padec, hitrost katerega je bila odvisna od polimera v tabletah in medija sproščanja. Ugotovili smo tudi, da PVP in HPMC zavirata obarjanje diklofenaka, medtem ko pri HPC te sposobnosti nismo opazili.

Ključne besede: prenasičenje, obarjanje, testiranje sproščanja, UV-Vis spektroskopija, sonda z optičnimi vlakni

ABSTRACT

The thesis researches the possibility of using a fiber optic dip probe as an alternative to concentration determination with UV spectrophotometry during dissolution testing of supersaturating dosage forms. The advantage of using a probe when testing this kind of dosage forms stands in the *in situ* nature of the measuring process. It allows us to circumvent sampling, during which the tendency towards precipitation can cause the concentration to diminish, leading to falsely lower values.

We conducted our dissolution testing in the paddle apparatus described in the American pharmacopeia. Paracetamol and diclofenac sodium served as model compounds. We made the tablets ourselves. We used two different media: 0,001 M HCl and diluted (4 times) McIlvaine buffer with a pH value of 4. Even though we were interested in supersaturated systems we started by testing prolonged-release tablets containing paracetamol where concentrations did not exceed solubility. Only then we moved to dissolution testing of supersaturating dosage forms with diclofenac sodium. We determined the concentrations in the same time points both with the probe and by UV-Vis spectrophotometric analysis. We then compared the acquired dissolution profiles. Microcrystalline cellulose (an ingredient in some tablets) particles and precipitated diclofenac particles have an influence on probe measurements. We evaluated this influence by acquiring absorption spectra and by particle size determination using laser diffraction.

In the case of paracetamol tablets correlation between dissolution profiles, generated by both ways of concentration determination, was very good. The same does not apply to dissolution profiles of supersaturating dosage forms with sodium diclofenac. We did not even manage to eliminate the differences between sets of profiles by subtracting the absorbance at 400 nm where diclofenac does not absorb. Since we proved that this type of correction is able to eliminate the influence of microcrystalline cellulose, the persistent differences must be due to precipitated diclofenac particles. Particle size determination suggested the presence of diclofenac nanoparticles in dissolution vessels. Nanoparticles, in general, lead to wavelength dependent scattering of light, which was supported by our absorption spectra-generating experiments. The shape of the dissolution profiles indicated that our tablets with diclofenac sodium and PVP did, in fact, cause supersaturation. The initial rise in concentration was followed by a fall which was faster or slower, depending on the polymer in the tablets and on the dissolution media. We also learned that PVP and HPMC inhibit diclofenac precipitation while HPC did not display such an ability in our experiments.

Keywords: supersaturation, precipitation, dissolution testing, UV-Vis spectroscopy, fiber optic dip probe

SEZNAM OKRAJŠAV

A_x – absorbanca pri valovni dolžini x nm

DMB – redčen McIlvainov pufer

FOp – farmacevtske oblike, ki temeljijo na doseganju prenasičenja

FP – fosfatni pufer

GIT – gastrointestinalni trakt

HPC – hidroksipropil celuloza

HPMC – hidroksipropil metilceluloza

LM – laktoza monohidrat

MCC – mikrokristalna celuloza

Na-DF – natrijev diklofenakat

PS – pomožna snov

PVP – polivinilpirolidon

RSD – relativni standardni odklon

uč. – učinkovina

USP – ameriška farmakopeja

1 UVOD

1.1 Prenasičenje

Prenasičenje oziroma prenasničeno stanje nastopi, ko koncentracija topljenca preseže njegovo topnost v dotičnem mediju. Gre za termodinamsko nestabilno stanje, ki teži k obarjanju topljenca. Ta težnja je odvisna od stopnje prenasičenja, definirane z Enačbo 1, v kateri predstavlja c koncentracijo topljenca, c_{eq} pa njegovo ravnotežno topnost v istem mediju. Z višanjem stopnje prenasičenja narašča tudi nestabilnost sistema [1].

$$\text{stopnja prenasičenja} = \frac{c}{c_{eq}} \quad \text{Enačba 1}$$

1.1.1 Prenasičenje v farmaciji

Za veliko na novo odkritih učinkovin velja, da so zelo slabo topne. To lahko vodi v težave pri zagotavljanju ustreznega sproščanja iz farmacevtske oblike, ki je predpogoj za absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta (GIT). Raziskovalci se, da bi tovrstne težave obšli, tekom razvoja peroralnih zdravil poslužujejo različnih strategij, med katerimi je tudi oblikovanje farmacevtskih oblik, ki temeljijo na doseganju prenasičenja (FOp) [1]. Če je učinkovina dobro permeabilna, predstavlja visoka koncentracija raztopljenе učinkovine gonilno silo za njeno absorpcijo kljub temu, da stanje ni termodinamsko stabilno. Ker se molekule v prenasičeni raztopini nahajajo v prosti obliki, se lahko učinkovina absorbira celo lažje, kot če bi jo z dodatkom pomožne snovi (PS) solubilizirali in tako trajno povišali njeno topnost [2]. Ugoden vpliv FOp na obseg absorpcije so, pod pogojem, da se prenasičeno stanje ohrani dovolj dolgo, potrdile tudi mnoge *in vivo* študije [3].

FOp običajno vsebujejo učinkovino v eni izmed visoko energijskih ali hitro raztapljajočih se oblik (na primer amorfna snov, sol, nanodelci, kokristali) [4]. Tipični predstavniki FOp so t. i. trdne amorfne disperzije. Gre za amorfno obliko učinkovine, vgrajeno v nosilec, ki je običajno dobro topen polimer: na primer polivinilpirolidon (PVP), hidroksipropil metilceluloza (HPMC) ali hidroksipropil metilcelulozni acetat sukcinat (HPMCAS). Polimer se v stiku s tekočinami v GIT hitro raztopi in tako povzroči sunkovit porast koncentracije učinkovine. Hkrati lahko odigra tudi vlogo zaviralca obarjanja in tako omogoči ustrezen obseg absorpcije [3]. Druga strategija, s katero lahko dosežemo daljšo ohranitev prenasičenja, je oblikovanje FOp z nekoliko počasnejšim sproščanjem. To sicer privede do nižje maksimalne koncentracije učinkovine, kot v primeru sunkovitega

sproščanja, vendar je posledično nižja tudi gonilna sila za obarjanje in s tem hitrost padca koncentracije učinkovine [1, 3].

1.2 Testi sproščanja

Testiranje sproščanja je v farmacevtski industriji zelo razširjeno, saj nudi koristne podatke sodelavcem na več različnih področjih dela. Že v najbolj zgodnjih fazah razvoja si raziskovalci z rezultati sproščanja pomagajo pri izbiri primernih PS in pri izbiri najboljše izmed razvitih formulacij. Strokovnjaki za sproščanje lahko, sploh če se namesto farmakopejsko predpisanih poslužujejo bolj biorelevantnih pogojev, razvijajo modele *in vitro/in vivo* korelacije, kar omogoča opustitev določenih kliničnih študij oziroma njihovo izvedbo v zmanjšanem obsegu. Nenazadnje se testi sproščanja uporabljajo tudi z namenom kontrole kakovosti, na primer za ugotavljanje ponovljivosti med proizvedenimi serijami ali spremljanje ustreznosti zdravila tekom celotnega obdobja uporabnosti [5].

Rezultati testov sproščanja predstavljajo ključen del registracijske dokumentacije novega zdravila. Zahtevajo jih regulatorne agencije po celem svetu [5].

1.2.1 Testiranje sproščanja iz FOp

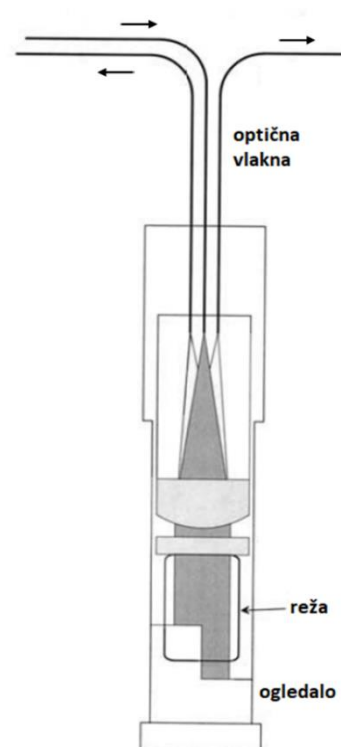
Vrednotenje prenasičenja, obarjanja in potencialnega zaviranja obarjanja je ključnega pomena za učinkovit razvoj FOp. Temu namenu lahko služi tudi testiranje sproščanja, pogosto izvajano kar z uporabo preprostih enoprostornih sistemov, opisanih v ameriški farmakopeji (*United States Pharmacopeia* – USP): naprava s košaricami (USP I) in naprava z vesli (USP II) [6]. Kot pa velja za običajne trdne farmacevtske oblike, lahko z vpeljavo biorelevantnih pogojev tudi v primeru FOp dobimo *in vitro* teste, ki bolje napovedujejo *in vivo* obnašanje. Medij, ki simulira želodčno ali črevesno okolje in vključitev akceptorskega prostora, ki simulira absorpcijo učinkovine iz GIT, sta le dva primera možnih izboljšav napovedne moči *in vitro* testov [2]. Posebnega pomena pa je uporaba *non-sink* pogojev, saj se *sink* pogoji in prenasičenje, ki je ključna lastnost FOp, medsebojno izključujejo [1].

Kvantitativno vrednotenje prenasičenja in obarjanja mora vključevati proces ločitve neraztopljenih delcev učinkovine od raztopljene frakcije, kar dosežemo s filtracijo ali (ultra)centrifugiranjem. Če imamo na voljo dovoljšno količino vzorca, je filtracija boljša izbira, saj omogoča hitrejšo ločitev frakcij. Slediti mora redčenje, da preprečimo nadaljnje obarjanje. Kljub previdnosti ne moremo pri nobeni od omenjenih tehnik z gotovostjo izključiti prisotnosti nanodelcev [2].

1.2.2 Določanje koncentracije učinkovine *in situ*

Testiranje sproščanja najpogosteje obsega določeno število posod z ogrevanim medijem, v katerih razpadajo oziroma se raztapljajo tablete ali kapsule [7]. Običajno vključuje ročno ali avtomatizirano vzorčenje medija v vnaprej določenih časovnih točkah, filtracijo in kvantitativno ovrednotenje s spektrofotometrično ali kromatografsko analizo [8]. Tak način izvedbe zahteva veliko časa in dela. Sistemi z avtomatiziranim vzorčenjem operaterjem res prihranijo precej dela med samim poskusom in so zato še posebej dobrodošli pri testiranju farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem, kjer lahko časi spremljanja dosežejo tudi 24 ur, vendar so zahtevni za vzdrževanje in terjajo precej dolge priprave pred začetkom poskusa. Vsebujejo veliko komponent, zaradi česar lahko pride do raznih napak: puščanje cevk, zamašitev filtrov, težave z mehurčki, kontaminacija vzorca, adsorpcija učinkovine na plastične komponente ... Po drugi strani je ročno vzorčenje podvrženo napakam zaradi razlik v izvedbi testov. Težko bi dosegli, da bi vsi operaterji vedno vzorčili v isti točki in vzorčenje zaključili z enakim časovnim zamikom, saj gre namreč za ročno delo [9].

Z uvedbo določanja koncentracije *in situ* pa postane vzorčenje nepotrebno, kar teste sproščanja zelo poenostavi in izključi večino zgoraj omenjenih virov napak [8, 9]. *In situ* določanje koncentracije nam omogočajo posebne sonde, ki jih potopimo neposredno v posode za sproščanje. Njihov učinek je tak, kot da bi v posodo potopili sam spektrofotometer [8], saj so sonde z njim povezane z optičnimi vlakni. Ta prenesejo svetlobo vse od vira do reže sonde. Tam svetloba vstopi v medij in potuje do ogledalca, ki jo odbije nazaj do optičnih vlaken, po katerih se prenese nazaj do spektrofotometra, kjer detektor izmeri njeno intenziteto in omogoča izračun absorbanca [10]. Na Sliki 1 je prikazan primer sonde, ki so jo razvili Johansson in sodelavci [7]. V tem primeru je ogledalce razdeljeno na dva dela, od katerih je en nameščen nižje od drugega, oba pa sta nekoliko nagnjena, da se svetloba od vsakega odbije proti ustreznemu od dveh »odvodnih« optičnih vlaken. Svetloba tako opravi dve različno dolgi poti skozi medij, kar razširi območje linearnosti [7]. Redčenja se pri tem postopku



Slika 1: Primer potopne sonde. Svetloba se prenese do sonde po sredinskem optičnem vlaknu, potuje skozi režo, napolnjeno z medijem, in se od ogledalca odbije proti enemu od dveh »odvodnih« optičnih vlaken. Prirejeno po [7].

namreč ne moremo poslužiti, saj meritev poteka *in situ*. Bolj pogosta rešitev je sonda z enim »odvodnim« vlaknom, ki pa omogoča namestitvev konic z različnimi velikostmi rež, kar posledično pomeni različne dolžine poti svetlobe [8, 9, 10].

Uporaba tehnologije optičnih vlaken na področju testiranja sproščanja že desetletja privlači pozornost raziskovalcev. Prve raziskave so bile objavljene leta 1988. Že takrat so znali s potopno sondo izmeriti koncentracijo v motni raztopini brez predhodne filtracije [11]. Leta 1993 so tehnologijo prvič dejansko uporabili za spremljanje sproščanja. Kmalu so se pojavili sistemi, ki so omogočali določanje koncentracije v več posodah hkrati, leta 1999 pa so bile podobne naprave že dostopne na tržišču [8]. Kljub starosti tehnologije in dejstvu, da omogoča optimizacijo časa in stroškov, v farmacevtski industriji še vedno velja zgolj za obetavno [12]. Uporaba je omejena predvsem na raziskave in razvoj [10, 13]. Počasnost podjetji pri zamenjavi uveljavljene metodologije na področju preizkušanja končnih produktov je verjetno posledica restriktivne regulacije s strani regulatornih agencij [8], pa tudi pomanjkanja jasnih navodil za validacijo sistemov z optičnimi vlakni [13].

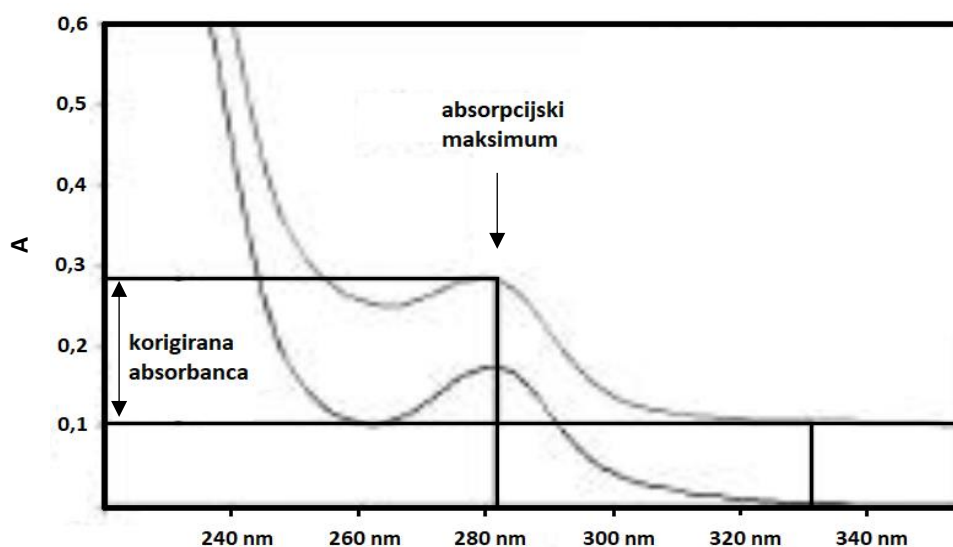
Smernice mednarodne konference o usklajevanju (*International Conference on Harmonisation*) za sisteme za testiranje sproščanja predvidevajo validacijo linearnosti, točnosti, natančnosti in specifičnosti. Mirza in sodelavci v svojem članku [13] predstavljajo validacijo naštetih parametrov in robustnosti (z ozirom na orientacijo reže sonde in globino izvajanja meritev) na primeru testiranja tablet s takojšnjim sproščanjem. Ugotovili so, da je metoda z meritvami *in situ* ekvivalentna obstoječi metodi z ročnim vzorčenjem, tudi ko jo izvajajo različni operaterji ob različnih dnevih. Prav tako so uporabo sistemov z optičnimi vlakni za testiranje sproščanja uspešno implementirale mnoge druge skupine raziskovalcev [8, 9, 14, 15, 16].

Glavna prednost uporabe sond z optičnimi vlakni je torej odstranitev potrebe po vzorčenju. To pa ne pomeni samo manj vloženega truda s strani operaterja, nižjih stroškov potrošnega materiala (cevke, filtri, brizge) [8] in manj potencialnih virov napak [12, 14]. Ker je posamezna meritev s sondo tako hitra in nezahtevna, jih lahko izvajamo veliko bolj pogosto, kot to omogočajo klasične metode. Teoretično bi absorbanco lahko spremljali tudi kontinuirano [14]. Na tak način dobimo veliko boljši vpogled v kinetiko sproščanja, sploh v primeru takojšnjega sproščanja, kjer se procesi odvijajo zelo hitro. Večja gostota meritev izboljša tudi možnost ločevanja med formulacijami, ki bi ob uporabi klasičnih metod

določanja koncentracije generirale enake profile sproščanja (diskriminativnost metode) [8]. Seveda pa ima tudi ta tehnologija svoje slabosti.

Največja ovira pri meritvah koncentracije *in situ* so motnje zaradi prisotnosti pomožnih snovi. Absorpcija svetlobe s strani topnih PS je redko problem, saj večina ne absorbira v območju med 250 nm in 300 nm, kjer merimo absorbanco velikemu številu učinkovin. Pogosto pa je problematično sipanje svetlobe zaradi neraztopljenih delcev [9]. Ker meritve potekajo neposredno v posodi za sproščanje, se jim ne moremo izogniti.

Ločimo dve vrsti sipanja svetlobe. Od valovne dolžine neodvisno sipanje je bolj pogosto in se izrazi v enakem povečanju absorbanco širom celotnega UV/Vis spektra. Lahko ga opišemo kot dvig bazne linije. Ravno zato, ker je sipanje neodvisno od valovne dolžine, raziskovalci motnje uspešno korigirajo tako, da od absorbanco v absorpcijskem maksimumu učinkovine odštejejo absorbanco pri višji valovni dolžini, kjer preiskovana učinkovina ne absorbira [9, 10, 13, 14]. Princip je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Korekcija absorbanco zaradi zvišanja bazne linije. Povzeto po [9].

V koloidnih suspenzijah, ki jih tvorijo zelo majhni delci, pa se srečamo s sipanjem svetlobe, za katerega je značilno naraščanje absorbanco s krajšanjem valovne dolžine. Tudi tovrstne motnje se dajo praviloma uspešno korigirati, potrebne so le nekoliko kompleksnejše matematične operacije. Tudi če bi predhodno posneli absorpcijski spekter preiskovane formulacije brez učinkovine, odštevanje absorbanco ne bi prišlo v poštev zaradi neponovljive intenzitete sipanja. Najpogosteje se avtorji poslužujejo dvakratnega odvajanja absorpcijskih spektrov [9, 10]. Seveda so korekcije obeh vrst sipanja možne le, če to, v primerjavi z

absorpcijo učinkovine, prispeva dovolj majhen delež k ekstinkciji svetlobe. Koncentracij v zelo motnih suspenzijah torej ne moremo kvantificirati [12], vendar je motnost med testi sproščanja običajno daleč od kritične.

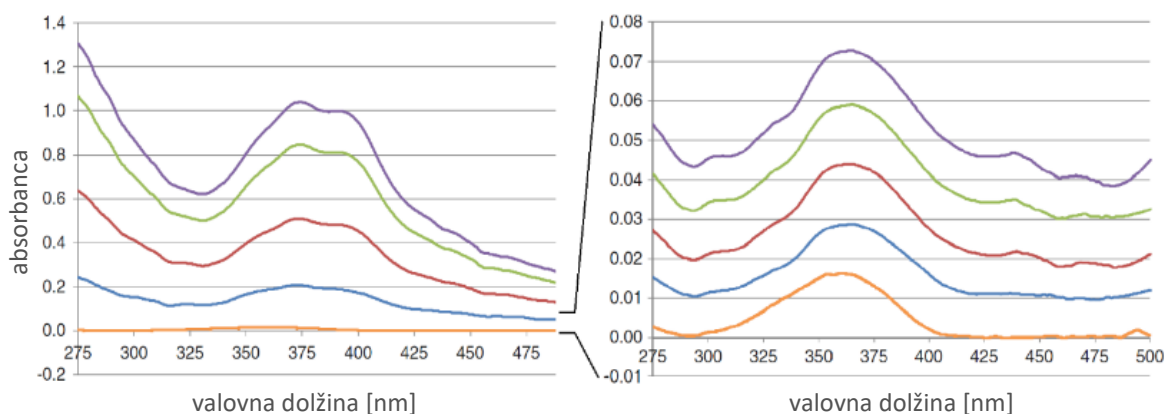
Liu in sodelavci [10] so ovrednotili vpliv netopnih delcev PS na linearnost, točnost in natančnost meritev s sondo z optičnimi vlakni. Kot modelno učinkovino so uporabili hidralazin. Preučili so 30 PS, 4 vrste (praznih) kapsul in eno mešanico PS. Uporabili so take količine, kot bi bile, glede na različne vloge uporabljenih snovi, prisotne v enoti zdravila (ena 500 mg tableta ali ena kapsula). Ugotovili so, da velika večina pogosto uporabljenih PS povzroča ravno od valovne dolžine neodvisno sipanje svetlobe (v območju od 240 nm do 400 nm). Po uporabi preprostega algoritma za korekcijo bazne linije niso opazili signifikantnega vpliva na linearnost in točnost. Le v poskusih s škrobom, kjer je bilo sipanje najbolj intenzivno (do $A = 0,7$), se je zgornja meja linearnosti nekoliko znižala. Šum zaradi sipanja je povzročil tudi rahel dvig spodnje meje kvantifikacije (LOQ), in sicer z $A = 0,03$ na $A = 0,05$.

Praktični napotki za uporabo sonde z optičnimi vlakni

Delci, ki se gibljejo skozi režo sonde, se lahko tam (na ogledalcu) tudi nalagajo, kar še dodatno vpliva na meritve [7, 8, 10]. Če sondo obrnemo tako, da je reža izpostavljena tokovom medija zaradi mešanja, je nalaganje manj intenzivno. V primerjavi s položajem, v katerem je reža »zaščitena« pred tokovi, je lahko šum manjši za faktor 2–3 [10]. Prav tako je šum manjši, če poskuse izvajamo v napravi USP II (v primerjavi z USP I) in pri višjih hitrostih mešanja. Proizvajalci ponujajo tudi sisteme, ki sonde do mesta meritve spustijo le takrat, ko je predvidena meritev, preostanek časa pa so nameščene tik pod gladino medija, kjer je delcev manj. Ta položaj zmanjša tudi vpliv sonde na hidrodinamiko v posodi za sproščanje [8]. Vsaj v primeru tablet s prednizonom so namreč opazili, da konstantna prisotnost sonde v posodi povzroči nekoliko hitrejše sproščanje. Razlike, o katerih poročajo, so merljive, a navadno dovolj majhne, da so profili vseeno znotraj meja sprejemljivosti po USP [8, 15]. Veliko avtorjev opozarja tudi na težave z mehurčki, ki lahko spektre s svojo prisotnostjo v reži sonde popačijo na tak način, da so meritve neuporabe [14]. Priporočajo uporabo razplinjenih medijev. To pa še ne pomeni, da je previdnost odveč, saj se lahko mehurčki ustvarijo tudi pri potapljanju sonde [8, 10].

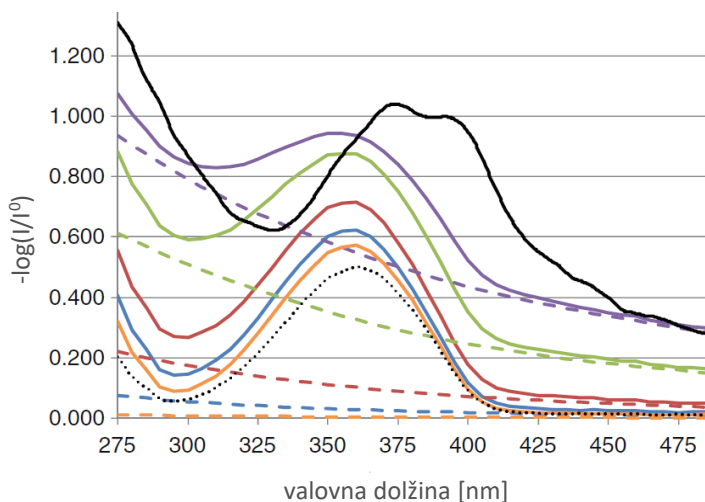
Vpliv nanodelcev na meritve s potopnimi sondami

Znanje s tega zaenkrat slabo raziskanega področja bi bilo zelo koristno pri preizkušanju FOp,



Slika 3: Modra, rdeča, zelena in vijolična krivulja predstavljajo absorpcijske spektre suspenzij z naraščajočimi celokupnimi koncentracijami felodipina: 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ in 50 $\mu\text{g/mL}$ v enakem vrstnem redu. Na levem grafu so prikazani spektri nanosuspenzij ($d_{(v, 50\%)} = 0,38 \mu\text{m}$), na desnem pa suspenzij mikrometrskih delcev ($d_{(v, 50\%)} = 10,19 \mu\text{m}$). Medij je vodna raztopina PVP (1 g/L). Oranžna krivulja na obeh grafih predstavlja iste podatke, in sicer absorpcijski spekter metanolne raztopine felodipina (0,81 $\mu\text{g/mL}$), ki ne vsebuje neraztopljenih delcev. Ordinatna os desnega grafa predstavlja razširjen izsek ordinatne osi levega grafa. Povzeto po [17].

kjer lahko med obarjanjem nastajajo nanodelci učinkovine. Kolikor nam je znano, so se s to tematiko ukvarjali le Van Eerdenbrugh in sodelavci, ki so preučevali absorpcijske spektre suspenzij felodipina in svoja opazanja podkrepili s teoretičnimi izračuni [17].



Slika 4: Na grafu so prikazani **teoretični absorpcijski spektri** suspenzij z delci velikosti od 30 nm (oranžna) do 300 nm (vijolična). Polne krivulje predstavljajo delce z absorpcijskimi lastnostmi felodipina, črtkane krivulje pa delce, ki svetlobe sploh ne absorbirajo. **Polna črna krivulja je eksperimentalno pridobljen absorpcijski spekter nanosuspenzije felodipina s koncentracijo 50 $\mu\text{g/mL}$.** V vijolični barvi je prisoten že na levi polovici Slike 3. Povzeto po [17].

absorpcijskem maksimumu relativno neodvisne od celokupne koncentracije (raztopljenega in neraztopljenega) felodipina. To je v skladu z dejstvom, da je bila koncentracija raztopljenega felodipina v vseh suspenzijah enaka njegovi ravnotežni topnosti (0,81 $\mu\text{g/mL}$

Primerjali so absorpcijske spektre suspenzij nanodelcev in suspenzij mikrometrskih delcev felodipina, prikazane na Sliki 3, in opazili ključne razlike. Dvig absorbance zaradi sipanja svetlobe je v primeru mikrometrskih delcev relativno neodvisen od valovne dolžine in zelo nizek v primerjavi z intenzivnim sipanjem, opaženim pri nanosuspenzijah. Ko so spektre suspenzij mikrometrskih delcev korigirali z metodo dvakratnega odvajanja, so bile absorbance v

pri sobni temperaturi). V primeru nanosuspenzij pa absorbanca z večanjem celokupne koncentracije felodipina narašča kljub korekciji z dvakratnim odvajanjem. Do tedaj je vsa literatura o vplivu delcev na določanje koncentracije *in situ* predpostavljala, da delci meritve motijo izključno zaradi sipanja svetlobe. Posledično bi lahko mislili, da je naraščanje absorbance nanosuspenzij posledica izboljšane topnosti felodipina, vendar so to možnost ovrgli s pomočjo jedrske magnetne resonance. Poskusi so pokazali, da v nanosuspenzijah ni raztopljenega več felodipina kot v suspenzijah mikrometrskih delcev. Avtorji so zato posumili, da nanodelci felodipina svetlobo tudi absorbirajo, podobno kot proste molekule [17].

Hipotezo podpirajo tudi njihovi izračuni v okviru Mieje teorije. Ta opisuje interakcijo elektromagnetnega valovanja s sferičnim delcem in omogoča izračun relativnih deležev, ki ju k ekstinkciji prispevata sipanje in absorpcija. Manjši kot so delci, bolj je razmerje nagnjeno v prid absorpcije. Slednja je, glede na napovedi (Slika 4), pri delcih felodipina velikosti 300 nm že manjša od sipanja, še zdaleč pa ne zanemarljiva. To postane šele pri velikostih okrog 1500–2000 nm [17].

Dobro ujemanje črne in vijolične krivulje (eksperimentalnega in izračunanega absorpcijskega spektra) na Sliki 4, vsaj v velikosti ekstinkcije, je dokaz ustreznosti uporabljenega modela. Maksimuma obeh spektrov sta verjetno zamaknjena zato, ker je bil lomni količnik, uporabljen v izračunih, pridobljen z meritvami amorfnih filmov felodipina, realno suspenzijo pa tvoji kristalinični delci. Tako eksperimentalna opažanja kot teoretični izračuni torej nakazujejo, da je ekstinkcija svetlobe, ki potuje skozi suspenzije majhnih (submikronskih) delcev, sestavljena iz sipanja, absorpcije raztopljenih molekul in absorpcije neraztopljenih delcev. Avtorji se omejijo zgolj na svetovanje previdnosti pri uporabi sond z optičnimi vlakni v takih sistemih. Ne ponudijo načina, s katerim bi lahko ločili med obema absorpcijama, kar bi nam omogočilo izračun koncentracije raztopljene frakcije učinkovine [17].

2 NAMEN DELA

Cilj magistrske naloge je raziskati ustreznost potopne sonde z optičnimi vlakni za spremljanje koncentracije natrijevega diklofenakata (Na-DF) med testi sproščanja iz FOp. Taki dostavni sistemi so bili do sedaj v našem laboratoriju preiskovani zgolj s testi sproščanja s tradicionalnim načinom določanja koncentracije, ki zahteva v uvodu omenjeno problematično ločevanje oborjene in raztopljene frakcije. Nanodelci se ob vzorčenju ne smejo znajti v vzorcu, saj bi bila izmerjena koncentracija v takem primeru lažno povišana. Po drugi strani se učinkovina zaradi termodinamske nestabilnosti lahko obarja v cevkah med vzorčenjem in tudi po končanem vzorčenju, kar posledično pomeni lažno nižje izmerjene vrednosti. Z uvajanjem nove tehnologije se želimo tem težavam izogniti.

Za začetek bomo ovrednotili območje linearne odvisnosti absorbanca, izmerjene s sondo, od koncentracije paracetamola in Na-DF. Nato bomo za obe učinkovini pripravili umeritvene premice v medijih, v katerih bomo njuni koncentraciji določali v okviru testov sproščanja. Sondo bomo najprej preizkusili v testih sproščanja iz preprostejših sistemov – to je farmacevtskih oblik (s paracetamolom), ki ne povzročajo prenasičenja in obarjanja. Šele nato bomo sondo preizkusili v testih sproščanja Na-DF iz FOp. V obeh primerih bomo teste izvajali v farmakopejski napravi USP II. Tablete različnih sestav, ki jih bomo uporabili v testih sproščanja, bomo stisnili sami. V istih časovnih točkah bomo koncentracijo določali tako s sondo kot tudi s tradicionalno UV-Vis spektrofotometrično analizo ter primerjali dobljene profile sproščanja.

Pričakujemo, da bodo največji izziv predstavljale napake zaradi prisotnosti neraztopljenih delcev, ki so v literaturi o tehnologiji *in situ* določanja koncentracije obsežno opisane. Vpliv delcev na naše rezultate bomo zato poskusili ovrednotiti z merjenjem absorpcijskih spektrov in z uporabo aparature za vrednotenje velikosti delcev z lasersko difrakcijo. Če bomo sondo uspešno implementirali, bomo meritve lahko izvajali neposredno v posodah in tako dobili veliko bolj zanesljive rezultate.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali in aparature

Materiali:

- natrijev diklofenakat (Na-DF), p.a., Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA;
- paracetamol, p.a., Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA;
- PVP (Kollidon[®] 17 PF), BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija;
- laktoza monohidrat (LM), Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Nemčija;
- mikrokristalna celuloza (MCC) (Avicel[®] PH-200), FMC, Philadelphia, ZDA;
- HPMC (Metolose 90SH-100.000SR), Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- HPMC (Affinisol HPMC HME 15LV), Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Nemčija;
- HPC (SL FP), Nippon Soda Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- HPC (SSL SFP), Nippon Soda Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- magnezijev stearat, Lex d.o.o., Koper, Slovenija;
- citronska kislina monohidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- dinatrijev hidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- standardni raztopini za pripravo 1 L 1 M NaOH ali 1 M HCl (Titrisol[®]), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- pufrni raztopini (pH=4 in pH=7), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- deionizirana voda.

Aparature in druga laboratorijska oprema:

- analizna tehtnica AG245, Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Švica;
- precizna tehtnica Exacta 300 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija;
- tabletirka na udarec SP300, Kilian Tableting GmbH, Köln, Nemčija;
- naprava za določanje trdnosti tablet Vanderkamp, VanKel Industries, Edison, ZDA;
- aparatura za testiranje sproščanja VK 7000 z avtomatskim vzorčevalnikom in veslastimi mešali (USP II), Vankel Technology, Cary, ZDA;
- filtri »Full Flow« z velikostjo por 10 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA;
- žičnati uteževalci, narejeni na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani;

- stresalnik Lab Dancer, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA;
- UV-Vis spektrofotometer Cary 60 s potopno sondo z optičnimi vlakni z dolžino poti 0,5 cm, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA;
- magnetno mešalo z možnostjo gretja RCT basic, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- aparatura za vrednotenje velikosti delcev z lasersko difrakcijo Mastersizer S, Malvern Instruments, Worcestershire, Velika Britanija;
- pH meter MP220, Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Švica;
- membranski filtri iz regenerirane celuloze z velikostjo por 0,45 μm , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija;
- avtomatske pipete z različnimi razponi volumnov, Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- steklovina (merilne bučke, polnilne pipete, čaše, merilni valji, tehtiči, epruvete, centrifugirke);
- ostali pribor (tehtiči, spatule, žličke, kapalke, žogice za pipetiranje, magneti, patene, brizge, štoparica, termometer).

3.2 Priprava raztopin in medijev

0,250 M Na₂HPO₄: V 500 mL merilno bučko smo kvantitativno prenesli 17,74 g Na₂HPO₄, dodali nekaj deionizirane vode ter vsebino mešali na magnetnem mešalu. Ko se je Na₂HPO₄ raztopil, smo bučko z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

0,127 M citronska kislina: V 500 mL merilno bučko z nekaj deionizirane vode smo kvantitativno prenesli 13,33 g citronske kisline monohidrata, ki se je med rahlim mešanjem hitro raztopil. Bučko smo nato z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

4-krat redčen McIlvainov pufer, pH=4 (DMB): V 2 L merilno bučko smo odmerili 146 mL 0,250 M Na₂HPO₄ in 250 mL 0,127 M citronske kisline ter jo z deionizirano vodo dopolnili skoraj do oznake. S pH metrom, ki smo ga predhodno umerili na pH=4, smo izmerili pH vrednost in jo v primeru odstopanja za več kot 0,05 enote ustrezno popravili z dodatkom Na₂HPO₄ ali citronske kisline. Bučko smo nato z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

1 M NaOH/HCl: V 1 L merilno bučko smo kvantitativno prenesli vsebino vsebnika s standardno raztopino (Titrisol[®]) bodisi NaOH ali HCl. Bučko smo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

0,001 M HCl: V 2 L merilno bučko smo odmerili 2 mL 1 M HCl in jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

50 mM fosfatni pufer, pH=6,80 (FP): Z merilnim valjem smo odmerili 22 mL 1 M NaOH. Natehtali smo 6,8 g KH₂PO₄. Oboje smo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko in jo z deionizirano vodo dopolnili skoraj do oznake. S pH metrom, ki smo ga predhodno umerili na pH=7, smo izmerili pH vrednost in jo v primeru odstopanja za več kot 0,05 enote ustrezno popravili z dodatkom NaOH ali KH₂PO₄. Bučko smo nato z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

0,1 M NaOH: S polnilno pipeto smo v 200 mL merilno bučko odmerili 20 mL 1 M NaOH in jo z deionizirano vodo dopolnili do oznake.

3.3 Tabletiranje

Tablete, ki smo jih uporabljali v testih sproščanja, smo s pomočjo tabletirke na udarec stisnili sami. Stisnili smo več serij tablet. Njihova sestava je predstavljena v Preglednici I, pogoji stiskanja pa v Preglednici II. Vsebnost magnezijevega stearata je v vseh serijah enaka 0,5 % celokupne mase ostalih sestavin.

Preglednica I: Sestava stisnjenih tablet

oznaka serije	sestava tablet			
	učinkovina	pomožne snovi		
P1	paracetamol (25 %)	HPMC (Metolose 90SH-100.000SR) (35 %)	MCC (40 %)	Mg-stearat
P2			LM (40 %)	
D1	Na-DF (12,5 %)	PVP (10 %)	MCC (77,5 %)	
D2			LM (77,5%)	
D3		HPC (SL FP) (10 %)		
D4		HPC (SSL SFP) (10 %)		
D5		HPMC (Affinisol HPMC HME 15LV) (10 %)		

Preglednica II: Pogoji stiskanja tablet

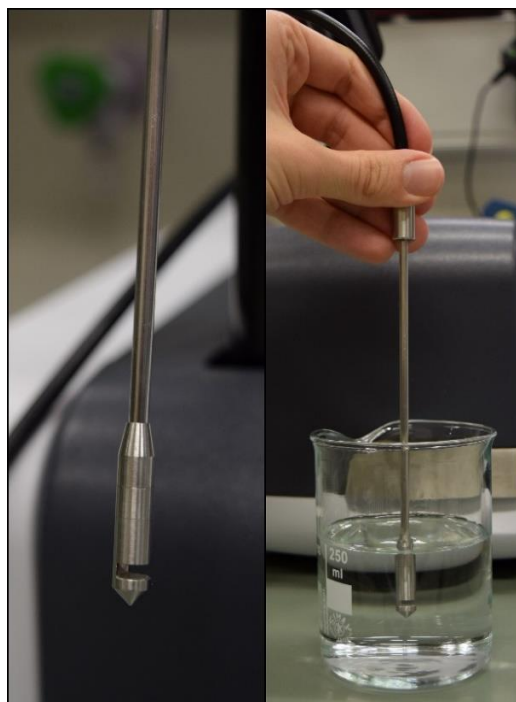
oznaka serije	odmik spodnjega pečata [mm]	odmik zgornjega pečata [mm]	silastiskanja [kN]	trdnost [N]
P1	12,8	10,5	12,5–13,2	95–110
P2	12,3	10,5	26,4–28,5	105–110
D1	12,0	9,5	8,6–9,1	90–100
D2	8,6	7,0	23,5–25,0	75–90
D3	8,5	7,0	~ 20	~ 75
D4	8,5	7,0	~ 17	~ 80
D5	8,5	7,0	~ 23	~ 55

Vse sestavine smo, upoštevajoč pravilo rastočih mas, najprej zmešali v pateni, nato pa še s stresanjem v plastični vrečki. Za izdelavo vsake tablete smo natehtali približno 400 mg homogene zmesi prahov in jo ročno prenesli v matrično vdolbino tabletirke. Uporabili smo pečat z ravnimi robovi in premerom 12 mm.

3.4 Določanje koncentracij učinkovin

V poskusih, ki so zahtevali določitev koncentracije učinkovine, smo to storili z UV/Vis spektroskopijo. Meritve absorbance, iz katere smo s pomočjo umeritvenih premic računali koncentracije, smo izvajali pri absorpcijskem maksimumu posamezne učinkovine. Ta je v primeru paracetamola pri valovni dolžini 242 nm, v primeru diklofenaka pa pri 276 nm. Kot slepo raztopino smo vedno uporabili medij, v katerem smo določali koncentracijo učinkovine.

Uporabljali smo dva različna spektrofotometra. En od teh omogoča priključitev potopne sonde z optičnimi vlakni (Slika 5), tako da smo meritve lahko izvajali *in situ*. Sondo smo med meritvami spirali z deionizirano vodo. Poleg tega smo meritve izvajali tudi na uveljavljen način, tako da smo vzorce z drugim spektrofotometrom analizirali v kiveti iz kvarčnega stekla z notranjo dolžino stranice 1 cm.



Slika 5: Sonda v stanju pripravljenosti (levo) in med uporabo (desno)

3.4.1 Umeritvene premice

Pripravili smo umeritvene premice v FP ter v medijih, v katerih smo izvajali spektrofotometrične meritve v okviru testov sproščanja. Podatki o posameznih premicah (medij, način merjenja) so predstavljeni v Preglednici III.

Umeritvene premice za Na-DF v FP in v medijih z NaOH ter za paracetamol

Priprave smo se v večini primerov lotili tako, da smo na analitski tehtnici natančno natehtali približno 10 mg standarda učinkovine in ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko, kjer smo ga raztopili v ustreznem mediju in bučko z enakim medijem dopolnili do oznake. Da smo se izognili morebitnim napakam pri tehtanju, smo po enakem postopku pripravili še dve osnovni raztopini. Pri umeritveni premici za Na-DF v FP je bila zveza med absorbanco in

koncentracijo znotraj koncentracijskega območja osnovnih raztopin še vedno linearna, zato smo naknadno pripravili še eno osnovno raztopino s približno štirikrat višjo koncentracijo (400 mg/L). Iz tako pripravljenih osnovnih raztopin smo z uporabo polnilnih pipet in enakega medija pripravili različne redčitve, katerih koncentracije so bile enakomerno razporejene po ciljnem koncentracijskem območju. Raztopinam smo nato, odvisno od medija, izmerili absorbanco z enim ali obema spektrofotometroma (Preglednica III).

Umeritvene premice za Na-DF v 0,001 M HCl in v DMB (pH=4)

Ker pride v 0,001 M HCl in v DMB do obarjanja diklofenaka, smo morali k pripravi umeritvenih premic za Na-DF v omenjenih medijih pristopiti drugače. Odločili smo se osnovne raztopine Na-DF pripraviti v deionizirani vodi in jih pri pripravi redčitev z ustreznim medijem (0,001 M HCl ali DMB) redčiti vsaj 20-krat. Da bi dosegli ustrezno koncentracijsko območje redčenih raztopin, je morala biti koncentracija osnovnih raztopin mnogo višja – približno 1 g/L. Ker nismo želeli porabiti prevelikih količin standarda, smo osnovne raztopine pripravili v 50 mL bučkah. Nato smo posamezno redčitev pripravili tako, da smo merilno bučko skoraj do vrha napolnili z medijem, z avtomatsko pipeto dodali ustrezen volumen osnovne raztopine, bučko z medijem dopolnili do oznake in jo zaprto dvakrat obrnili na glavo, da se je vsebina premešala. Nato smo vsebino čim prej prelili v čašo, da smo s sondo izmerili absorbanco še pred začetkom obarjanja oziroma ko se je oborila še zanemarljiva količina diklofenaka. Sorodnih umeritvenih premic za meritve v kivetu nismo potrebovali, saj smo med testi sproščanja vzorce takoj po vzorčenju redčili z 0,1 M NaOH in se poslužili umeritvenih premic, pripravljenih v medijih, ki so tako nastali.

Meritve smo upoštevali, če je bila izmerjena absorbanca pri kontrolni valovni dolžini 400 nm (A_{400}) nižja od 0,01. V Excelu smo narisali grafe odvisnosti absorbance (v absorpcijskem maksimumu) od koncentracije učinkovine in jim z linearno regresijo izračunali naklon, odsek na ordinati in kvadrat Pearsonovega koeficienta (R^2). Zadovoljili smo se s premicami, katerih R^2 ni bil nižji od 0,999.

Preglednica III: Podatki o umeritvenih premicah (medij, način merjenja)

način merjenja	paracetamol	Na-DF
	medij	
klasični (kiveta)	FP	FP
	0,001 M HCl	0,001 M HCl : 0,1 M NaOH = 1 : 2
	DMB	DMB : 0,1 M NaOH = 1 : 2
in situ (sonda)	FP	FP
	0,001 M HCl	0,001 M HCl
	DMB	DMB

3.5 Testi sproščanja

Teste sproščanja smo izvajali z napravo USP II. Na cevke za avtomatično vzorčenje smo naredili filtre z velikostjo por 10 µm. V posode smo z merilnim valjem odmerili 900 mL medija za sproščanje in počakali, da je dosegel delovno temperaturo (37 °C). Pri nekaterih poskusih smo v mediju raztopili določeno količino PVP. Nato smo v posode dodali predhodno stehtane tablete in poskus zagnali. Tablete s paracetamolom smo pred tem vstavili v žičnate uteževalce. Avtomatski vzorčevalnik je v vnaprej določenih časovnih točkah (pri poskusih s paracetamolom po 0, 30, 60, 90, 120, 180 in 240 minutah, pri poskusih z Na-DF pa po 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 120, 180 in 240 minutah) iz posamezne posode odvzel 3 mL vzorca, s katerim smo nadalje ravnali na način, opisan v podpoglavju 3.5.1. V istih časovnih točkah smo izvajali tudi meritve s sondo. Ker smo lahko s sondo merili absorbanco samo v eni posodi naenkrat, smo v vsakem poskusu sproščanja uporabili samo tri od osmih posod aparature, da ne bi prišlo do prevelikega časovnega zamika med hkrati izvedenimi poskusi. Poleg tega bi, zaradi njihovega položaja, do nekaterih posod s sondo zelo težko dostopali.

Preglednica IV: Pogoji izvedenih poskusov sproščanja

oznaka pogojev	serija tablet	medij	število paralelek
P1/HCl	P1	0,001 M HCl	3
P1/DMB	P1	DMB	3
P2/HCl	P2	0,001 M HCl	3
P2/DMB	P2	DMB	3
D1/HCl	D1	0,001 M HCl	6
D1/DMB	D1	DMB	6
D2/HCl	D2	0,001 M HCl	6
D2/DMB	D2	DMB	6
D3/HCl	D3	0,001 M HCl	3
D4/HCl	D4	0,001 M HCl	3
D5/HCl	D5	0,001 M HCl	3
D2/PVP1	D2	0,001 M HCl + 35 mg PVP ¹	3
D2/PVP2	D2	0,001 M HCl + 230 mg PVP ¹	3

Poskusi so se med seboj, z izjemo časov vzorčenja in uporabe uteževalcev, razlikovali samo po mediju in sestavi uporabljenih tablet (Preglednica IV). Hitrost mešanja je bila pri vseh poskusih 100 obratov na minuto. Pri vseh pogojih sproščanja izvirajo paralelke iz vsaj dveh ločenih poskusov sproščanja, ki nista bila izvedena istega dne.

¹ Koncentracijo učinkovine smo izračunali z uporabo umeritvene premice za 0,001 M HCl brez dodatka PVP.

3.5.1 Priprava vzorcev na meritev absorbance v kiveti

Pri testih sproščanja s paracetamolom smo absorbanco v kiveti merili neposredno vzorcu. Če smo pri tem presegli območje linearnosti, smo vzorec 5-krat redčili tako, da smo v čisto centrifugirko odpipetirali 600 μL vzorca, dodali 2400 μL čistega medija in dobro premešali. Nato smo meritev absorbance ponovili.

Pri testih sproščanja z Na-DF smo takoj po avtomatskem vzorčenju iz vsake epruvete odpipetirali 1 mL vzorca in ga prenesli v eno od centrifugirk z 2 mL 0,1 M NaOH, ki smo jih pripravili pred začetkom poskusa. Opisani način stabilizacije je bil v našem laboratoriju spoznan za najboljšega izmed sedmih načinov stabilizacije prenasičene raztopine Na-DF, preizkušenih v okviru predhodno izdelane magistrske naloge [18]. V kiveti smo torej merili absorbanco stabiliziranih vzorcev. Ker smo s procesom stabilizacije vzorec tudi 3-krat razredčili, nadaljnje redčenje ni bilo potrebno. Meritve smo smatrali za sprejemljive, če A_{400} ni presegala 0,01. V nasprotnem primeru smo meritev absorbance ponovili.

3.5.2 Izračun profilov sproščanja

S pomočjo enačb umeritvenih premic smo izmerjene vrednosti absorbance najprej pretvorili v koncentracije učinkovine. Pri tem smo upoštevali morebitno redčenje vzorca.

Enačba 2: V posamezni časovni točki smo maso že sproščene učinkovine izračunali tako, da smo koncentracijo množili z volumnom medija. Pri tem smo upoštevali, da se je ta po vsakem vzorčenju zmanjšal za 3 mL. To velja tako za meritve s sondo, kot tudi za meritve v kiveti, saj smo z obema metodama določali koncentracijo v istih posodah. Prišteli smo tudi maso učinkovine, ki smo jo z vzorčenjem do tedaj odstranili iz sistema.

$$m_n = c_n * (V_z - V_{vz} * (n - 1)) + V_{vz} * \sum_{i=1}^{n-1} c_i \quad \text{Enačba 2}$$

Enačba 3: Delež sproščene učinkovine smo dobili z deljenjem mase sproščene učinkovine s celokupno maso učinkovine v tableti.

$$\text{delež sproščene učinkovine} = \frac{m_n}{m_{tab} * w_{uč}} * 100 \% \quad \text{Enačba 3}$$

Uporabljeni simboli:

m_n – masa sproščene učinkovine ob n-tem vzorčenju

c_n – koncentracija učinkovine v posodi ob n-tem vzorčenju

V_z – začetni volumen medija (0,9 L)

V_{vz} – volumen vzorčenja (0,003 L)

n – zaporedni odvzem vzorca

m_{tab} – masa tablete

$w_{uč}$ – masni delež učinkovine v tabletah

3.6 Vpliv motnosti na meritve s sondo

3.6.1 Vpliv delcev MCC na meritve s sondo

Pripravili smo dve osnovni raztopini Na-DF v FP, iz katerih smo z redčenjem s FP pripravili šest raztopin z različnimi koncentracijami Na-DF. V 250 mL čašo z notranjim premerom približno 5,5 cm smo s polnilno pipeto prenesli 75 mL ene od raztopin, dodali magnet, dolg 4,9 cm, in čašo postavili na magnetno mešalo. Hitrost mešanja je bila tekom celotnega poskusa 100 obratov na minuto. V čašo smo s tremi zaporednimi dodatki vnesli najprej približno 20 mg MCC, nato še približno 20 mg MCC, za konec pa še približno 40 mg MCC. S sondo smo po vsakem od treh dodatkov MCC trikrat izmerili A_{276} , A_{400} in A_{600} . Posamezna meritev pri vsaki valovni dolžini je trajala 2 sekundi. Kot slepo raztopino smo uporabili FP. Postopek smo ponovili še s preostalimi petimi raztopinami Na-DF. Da bi ovrednotili vpliv še večje količine MCC, smo pripravili še eno osnovno raztopino Na-DF v FP, iz katere smo pripravili pet raztopin z različnimi koncentracijami. Poskuse smo izvedli na enak način kot prej, le da smo MCC dodali samo enkrat, in sicer smo v čašo s 75 mL raztopine dodali približno 250 mg MCC. Pri vsaki meritvi, ne glede na količino dodane MCC, smo od A_{276} odšteli A_{400} in preverili prileganje tako dobljenih točk (koncentracija Na-DF, korigirana absorbanca) na umeritveno premico Na-DF v FP. Enako smo naredili z razlikami med A_{276} in A_{600} .

Poleg tega smo v čisto čašo prenesli novih 75 mL raztopine z najvišjo koncentracijo Na-DF (izmed zgoraj omenjenih), dodali magnet in čašo postavili na magnetno mešalo. Hitrost mešanja smo nastavili na 100 obratov na minuto. S sondo smo posneli absorpcijski spekter raztopine v območju valovnih dolžin od 200 nm do 800 nm (s korakom 4 nm in hitrostjo snemanja 480 nm/min). V čašo smo nato dodali približno 30 mg MCC in spekter posneli še enkrat.

3.6.2 Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo

Vpliv nastajajočih delcev oborjenega diklofenaka na absorbanco smo spremljali v odvisnosti od časa. Uporabljali smo testne raztopine različnih sestav (Preglednica V). Pripravljali smo jih v 100 mL merilnih bučkah, in sicer z raztapljanjem suhih snovi, katerih ustrezno količino smo natehtali s pomočjo analitske tehtnice, v deionizirani vodi.

Pred začetkom poskusa se je vsa učinkovina nahajala v raztopljenem stanju. Obarvanje smo sprožili tako, da smo v bučko dodali 100 μ L 1 M HCl. Bučko smo nato zaprli in dvakrat obrnili na glavo ter vsebino nato čim prej prelili v ozko 250 mL čašo, v kateri se je že vrtel magnet s hitrostjo 100 obratov na minuto. S sondo smo nato v različnih časovnih točkah posneli absorpcijske spektre v območju valovnih dolžin od 200 nm do 800 nm (s korakom 2 nm in hitrostjo snemanja 800 nm/min).

Preglednica V: Sestava izhodnih testnih raztopin, uporabljenih v poskusih obarvanja diklofenaka (podpoglavji 3.6.2 in 3.7.2). Kot medij smo uporabili deionizirano vodo.

oznaka	konc. Na-DF [mg/L]	vrsta polimera	konc. polimera [mg/L]	št. ponovitev (vpliv na merjenje absorbance)	št. ponovitev (določanje velikosti delcev)
D ₆₀	60			2	
D ₂₀₀	200			3	3
D ₂₀₀ /PVP1		PVP	1000	3	3
D ₂₀₀ /PVP2			300	4	4
D ₂₀₀ /PVP3			30	3	3
D ₂₀₀ /HPC1		HPC (SL FP)	1000	3	2
D ₂₀₀ /HPC2			300	3	2
D ₂₀₀ /HPC*		HPC (SSL SFP)	1000	2	1
D ₂₀₀ /HPMC		HPMC (Affinisol)	1000	2	1

3.7 Določanje velikosti delcev

Želeli smo pridobiti tudi podatke o velikosti delcev (MCC in oborjenega diklofenaka), saj je lahko njihov vpliv na absorbanco bistveno odvisen od tega parametra [17]. To smo dosegli z uporabo *Mastersizerja* – aparature za vrednotenje velikosti delcev z lasersko difrakcijo. Ohranili smo prednastavljene vrednosti lomnih količnikov: trdne snovi (1,596), trdne snovi v vodi (0,100) in vode (1,330). Uporabljali smo lečo z oznako 300RF in merili (polidisperzno) porazdelitev velikosti delcev v območju 0,05–900 μ m. Mešalo v disperzni celici aparature se je pri vseh poskusih vrtelo s hitrostjo 1200 obratov na minuto. Za meritve ozadja smo uporabljali deionizirano vodo.

3.7.1 Določanje velikost delcev MCC

V računalniški program smo za gostoto delcev vnesli vrednost 1,6 g/mL. V disperzno celico smo nalili 100 mL deionizirane vode in dodali 120 mg MCC. Na tak način smo kasneje pripravili še dve enaki suspenziji. V vsaki od tako pripravljenih suspenzij smo porazdelitev velikosti delcev izmerili v treh paralelkah. Skupaj smo tako opravili devet meritev.

3.7.2 Določanje velikost delcev oborjenega diklofenaka

Pripravljali smo enake raztopine kot v poskusih določanja vpliva delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo (Preglednica V). V računalniški program smo za gostoto delcev vnesli vrednost 1,4 g/mL. Proces obarjanja smo tudi pri izvedbi teh poskusov sprožili z dodatkom 100 μ L 1 M HCl v bučko, vsebino premešali z obračanjem in jo nato čim prej prelili v disperzno celico aparature. Meritev porazdelitve velikosti delcev nismo izvajali v vnaprej izbranih časovnih točkah, temveč smo gostoto meritev prilagajali dinamiki procesov, ki so se odvijali v našem sistemu. Ko so bile spremembe hitre, smo meritve izvajali bolj pogosto, in obratno. Programska oprema namreč tekom celotnega poskusa prikazuje približno porazdelitev velikosti delcev ter tako omogoča spremljanje trenutnega stanja. V disperzno celico smo po vsakem poskusu nalili FP in pustili, da nekaj minut kroži po sistemu ter tako raztopi ostanke diklofenaka. Pred naslednjim poskusom smo sistem dobro sprali z deionizirano vodo.

4 REZULTATI

4.1 Umeritvene premice

Preglednica VI vsebuje enačbe umeritvenih premic (A – absorbanca, c – koncentracija [mg/L]), pripadajoče vrednosti R^2 in koncentracijska območja, v katerih so se nahajale meritve, ki smo jih uporabili.

Preglednica VI: Umeritvene premice s pripadajočimi podatki (A – absorbanca, c – koncentracija [mg/L])

paracetamol				
način merjenja	medij	enačba premice	R^2	konc. območje [mg/L]
klasični (kiveta)	FP	$A = 0,0632 \cdot c + 0,0171$	0,9995	0,94–40,52
	0,001 M HCl	$A = 0,0637 \cdot c + 0,0138$	0,9997	1,01–29,04
	DMB	$A = 0,0647 \cdot c + 0,0034$	0,9999	0,50–28,47
<i>in situ</i> (sonda)	FP	$A = 0,0275 \cdot c + 0,0178$	0,9995	0,94–70,91
	0,001 M HCl	$A = 0,0283 \cdot c + 0,0125$	0,9998	1,01–76,88
	DMB	$A = 0,0276 \cdot c + 0,0274$	0,9996	1,01–72,24
Na-DF				
način merjenja	medij	enačba premice	R^2	konc. območje [mg/L]
klasični (kiveta)	FP	$A = 0,0310 \cdot c + 0,0119$	0,9990	1,13–92,8
	0,001 M HCl : 0,1 M NaOH = 1 : 2	$A = 0,0315 \cdot c + 0,0076$	0,9994	1,09–38,26
	DMB : 0,1 M NaOH = 1 : 2	$A = 0,0316 \cdot c + 0,0016$	0,9999	0,97–37,91
<i>in situ</i> (sonda)	FP	$A = 0,0141 \cdot c + 0,0124$	0,9998	1,13–119,43
	0,001 M HCl	$A = 0,0134 \cdot c + 0,0060$	0,9992	0,97–45,09
	DMB	$A = 0,0140 \cdot c + 0,0028$	0,9999	1,17–51,25

4.2 Testi sproščanja

Profili sproščanja so predstavljeni v Preglednicah VII–XIX. Vsaka preglednica vsebuje profile posameznih paralelk (črke a–f) pri določenih pogojih sproščanja, njihovo povprečje ter relativne standardne odklone (RSD) v posameznih časovnih točkah. V zgornjem delu vsake preglednice (nad krepko črto) so podatki, pridobljeni z meritvami v kiveti, v spodnjem delu pa podatki, pridobljeni z meritvami s sondo. Pogoji poskusov so zajeti v Preglednici IV v poglavju o metodah.

Preglednica VII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **P1/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	a	b	c	povprečje	
0	0	0	0	0	
30	15,73	17,00	17,07	16,60	4,55
60	26,47	29,25	27,24	27,65	5,18
90	34,07	38,54	36,10	36,24	6,17
120	41,44	46,88	44,51	44,27	6,16
180	54,37	60,26	58,66	57,76	5,28
240	69,13	71,49	70,66	70,43	1,70
<hr/>					
0	0	0	0	0	
30	16,22	17,31	17,31	16,95	3,71
60	26,28	30,57	28,98	28,61	7,58
90	35,21	40,33	37,65	37,73	6,79
120	42,61	48,23	45,56	45,46	6,18
180	55,64	61,35	59,73	58,91	5,00
240	65,66	71,92	70,52	69,37	4,74

Preglednica VIII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **P1/DMB**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	a	b	c	povprečje	
0	0	0	0	0	
30	16,62	16,86	16,21	16,56	1,98
60	28,07	26,13	25,59	26,60	4,92
90	34,98	33,79	33,82	34,20	1,98
120	43,01	41,49	41,47	41,99	2,11
180	53,40	54,17	54,99	54,19	1,47
240	67,61	65,03	65,98	66,21	1,97
<hr/>					
0	0	0	0	0	
30	17,25	17,24	16,39	16,96	2,93
60	27,86	27,19	26,37	27,14	2,76
90	36,58	35,35	35,04	35,66	2,28
120	44,78	43,09	42,62	43,50	2,62
180	58,20	55,81	55,95	56,66	2,37
240	68,97	67,06	66,41	67,48	1,97

Preglednica IX: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **P2/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	a	b	c	povprečje	
0	0	0	0	0	
30	19,64	19,17	18,38	19,06	3,32
60	33,19	30,53	29,74	31,15	5,81
90	42,58	40,86	39,43	40,96	3,86
120	52,16	50,94	49,01	50,70	3,13
180	67,67	67,24	67,99	67,63	0,56
240	85,37	80,96	76,48	80,94	5,49
<hr/>					
0	0	0	0	0	
30	20,29	19,42	18,83	19,52	3,75
60	32,99	31,50	30,77	31,75	3,56
90	43,45	41,57	41,10	42,04	2,96
120	52,71	51,77	50,02	51,50	2,65
180	67,96	67,07	64,82	66,62	2,43
240	77,52	76,86	74,97	76,45	1,73

Preglednica X: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **P2/DMB**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	a	b	c	povprečje	
0	0	0	0	0	
30	23,13	23,07	21,10	22,43	5,16
60	36,76	37,75	33,52	36,01	6,14
90	48,63	50,05	43,69	47,46	7,03
120	57,80	60,28	53,54	57,21	5,96
180	73,08	75,89	68,44	72,47	5,19
240	86,78	84,60	80,38	83,92	3,88
0	0	0	0	0	
30	24,07	23,72	22,05	23,28	4,65
60	38,06	38,77	35,00	37,28	5,37
90	50,11	51,50	45,71	49,11	6,15
120	59,48	60,67	55,46	58,54	4,66
180	71,21	71,88	70,09	71,06	1,28
240	77,11	77,52	80,12	78,25	2,09

Preglednica XI: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **DI/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]							RSD [%]
	a	b	c	d	e	f	povp.	
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	35,30	46,79	37,26	42,94	42,86	51,62	42,80	14,04
10	69,92	75,38	68,13	73,31	75,06	75,76	72,93	4,37
15	74,42	76,40	77,66	75,02	77,45	78,34	76,55	2,04
20	72,59	73,34	77,49	74,16	75,92	77,14	75,11	2,71
30	51,40	49,62	51,42	54,29	59,47	52,39	53,10	6,54
40	22,70	19,72	18,98	21,79	25,51	21,60	21,72	10,66
60	12,83	12,15	10,57	11,33	14,73	12,62	12,37	11,55
120	11,68	9,46	8,93	9,31	10,70	10,08	10,03	10,20
180	10,87	8,79	8,27	8,31	10,37	9,58	9,36	11,64
240	9,89	9,13	8,11	7,97	10,70	9,07	9,15	11,39
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	56,29	75,43	61,59	63,66	64,16	76,09	66,20	11,95
10	110,15	113,08	106,33	106,14	108,93	111,84	109,41	2,59
15	112,93	112,43	119,42	106,87	109,54	114,85	112,67	3,85
20	113,42	113,46	117,24	107,46	110,10	112,57	112,37	2,96
30	72,82	71,74	73,39	78,96	88,20	76,11	76,87	7,98
40	36,12	38,75	38,05	34,98	39,48	36,22	37,26	4,70
60	24,71	28,67	28,94	23,32	25,71	27,53	26,48	8,56
120	26,96	30,67	33,89	22,08	24,39	26,59	27,43	15,55
180	24,35	21,57	24,76	18,99	20,74	18,39	21,47	12,38
240	22,27	22,51	24,59	17,13	20,35	29,29	22,69	18,03

Preglednica XII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D1/DMB**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetih, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]							RSD [%]
	a	b	c	d	e	f	povp.	
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	47,34	40,42	40,33	37,16	47,48	35,68	41,40	12,08
10	81,99	84,54	76,93	81,08	85,18	83,28	82,17	3,63
15	85,48	87,92	88,14	83,45	87,05	85,96	86,33	2,04
20	86,07	89,44	89,31	82,95	85,86	84,63	86,38	2,98
30	82,52	86,25	86,82	71,03	76,91	77,80	80,22	7,61
40	71,41	77,04	77,54	46,43	51,84	54,73	63,17	21,78
60	39,02	43,67	42,71	23,75	24,83	24,80	33,13	29,07
120	15,10	14,74	15,56	13,95	15,47	14,74	14,93	3,97
180	11,93	12,25	11,79	13,04	14,19	12,31	12,59	7,12
240	10,93	11,92	12,94	12,30	12,81	12,12	12,17	5,93
<hr/>								
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	64,01	55,11	54,25	51,66	64,08	51,78	56,81	10,14
10	98,13	100,11	94,67	98,57	104,31	101,00	99,47	3,24
15	102,63	102,09	103,06	98,83	101,76	101,95	101,72	1,47
20	101,10	103,49	105,24	100,65	102,95	103,83	102,88	1,68
30	97,09	101,42	102,81	86,16	90,38	96,04	95,65	6,69
40	85,16	90,10	91,96	54,24	61,42	68,72	75,27	21,20
60	50,07	53,23	52,38	28,94	31,07	32,11	41,30	28,32
120	21,20	20,64	22,36	23,95	24,32	23,01	22,58	6,50
180	20,63	25,03	22,11	20,39	22,22	22,43	22,13	7,51
240	17,53	21,46	21,57	22,24	22,71	23,83	21,56	10,00

Preglednica XIII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D2/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetih, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]							RSD [%]
	a	b	c	d	e	f	povp.	
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	35,14	34,58	35,04	34,87	33,06	34,32	34,50	2,23
10	55,51	56,44	55,48	55,62	56,62	54,57	55,71	1,33
15	65,92	68,43	66,17	64,77	67,43	66,76	66,58	1,91
20	72,50	75,33	74,99	71,86	75,84	74,65	74,20	2,19
30	65,94	76,17	71,84	67,82	73,16	70,56	70,91	5,20
40	29,33	42,07	33,82	32,84	39,72	32,23	35,00	13,89
60	13,85	15,91	14,54	16,04	15,56	14,18	15,01	6,26
120	10,45	10,76	10,27	10,21	10,91	10,46	10,51	2,60
180	9,48	9,77	9,13	8,72	10,24	9,33	9,44	5,58
240	8,02	8,78	8,15	8,22	9,58	8,36	8,52	6,84
<hr/>								
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	49,23	50,00	50,61	52,82	50,26	50,38	50,55	2,39
10	77,85	78,49	77,69	75,43	78,71	77,74	77,65	1,50
15	94,78	96,86	99,26	91,30	99,45	97,85	96,58	3,22
20	103,66	109,32	113,03	106,70	111,68	113,75	109,69	3,58
30	96,58	111,81	107,42	101,39	108,17	106,69	105,34	5,17
40	44,93	64,03	55,59	49,48	62,48	54,45	55,16	13,32
60	33,14	33,25	31,56	24,93	31,34	37,77	32,00	13,02
120	19,10	18,29	24,68	19,37	27,23	27,44	22,68	18,75
180	22,53	21,48	22,38	20,56	27,06	26,85	23,48	11,86
240	19,83	19,02	20,80	22,00	27,65	34,61	23,99	25,18

Preglednica XIV: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D2/DMB**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]							RSD [%]
	a	b	c	d	e	f	povp.	
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	33,90	29,15	28,65	31,24	33,08	35,88	31,98	8,82
10	58,85	49,24	49,00	51,47	53,52	60,66	53,78	9,17
15	75,87	65,48	64,09	66,54	68,10	77,13	69,53	8,00
20	84,12	76,28	77,35	76,01	78,17	85,83	79,63	5,33
30	85,44	85,57	83,47	82,20	86,06	86,81	84,92	2,04
40	83,80	84,27	83,31	74,57	84,75	78,00	81,45	5,12
60	64,69	77,63	76,59	37,88	45,86	40,96	57,27	31,38
120	20,90	27,93	21,24	21,13	17,69	18,30	21,20	17,16
180	12,63	13,14	12,81	15,18	13,96	14,59	13,72	7,51
240	11,66	11,70	11,07	12,78	11,70	10,57	11,58	6,43
<hr/>								
0	0	0	0	0	0	0	0	
5	43,62	39,97	40,54	38,81	40,42	45,85	41,53	6,38
10	73,35	63,75	64,87	59,62	61,00	71,10	65,61	8,38
15	90,97	81,31	81,11	76,42	77,02	87,94	82,46	7,11
20	100,88	94,31	94,17	88,04	88,55	99,98	94,32	5,76
30	101,60	103,24	104,01	102,33	103,07	106,08	103,39	1,50
40	101,07	103,20	103,87	95,40	100,26	99,02	100,47	3,06
60	87,03	102,20	103,38	46,34	58,10	51,33	74,73	34,67
120	28,58	37,52	35,03	28,62	27,68	27,75	30,86	13,87
180	19,86	25,41	24,17	24,55	22,76	21,89	23,10	8,80
240	19,51	21,36	21,17	20,46	20,48	19,02	20,33	4,50

Preglednica XV: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D3/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	D3/HCl/a	D3/HCl/b	D3/HCl/c	povprečje	
0	0	0	0	0	
5	15,73	15,30	17,50	16,18	7,22
10	29,44	28,06	31,40	29,64	5,66
15	42,94	39,24	42,65	41,61	4,95
20	50,10	47,80	50,94	49,61	3,27
30	47,55	44,22	51,28	47,68	7,41
40	37,91	28,90	38,77	35,19	15,53
60	31,33	20,42	27,50	26,42	20,95
120	28,98	17,04	24,43	23,48	25,66
180	27,98	18,73	25,11	23,94	19,78
240	28,81	20,24	26,29	25,11	17,55
<hr/>					
0	0	0	0	0	
5	21,04	20,42	24,87	22,11	10,90
10	40,73	35,84	42,77	39,78	8,95
15	53,20	49,29	57,06	53,18	7,31
20	65,51	61,41	67,36	64,76	4,71
30	35,59	58,95	74,28	56,27	34,62
40	25,39	34,61	31,84	30,61	15,45
60	18,63	20,39	21,01	20,01	6,17
120	15,84	16,92	16,13	16,30	3,45
180	14,91	15,66	17,42	15,99	8,05
240	15,17	15,18	16,50	15,62	4,90

Preglednica XVI: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D4/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	D4/HCl/a	D4/HCl/b	D4/HCl/c	povprečje	
0	0	0	0	0	
5	21,39	21,61	19,90	20,97	4,44
10	38,87	38,10	35,71	37,56	4,38
15	52,19	52,65	44,79	49,88	8,84
20	50,49	56,92	37,79	48,40	20,11
30	34,03	37,53	27,41	32,99	15,58
40	22,71	25,84	20,80	23,12	11,01
60	17,65	20,44	18,43	18,84	7,63
120	16,64	20,27	18,27	18,39	9,87
180	16,64	21,11	21,12	19,62	13,15
240	15,14	22,11	21,29	19,51	19,51
<hr/>					
0	0	0	0	0	
5	29,48	29,10	28,78	29,12	1,19
10	52,53	50,45	49,38	50,79	3,16
15	68,30	68,65	61,97	66,31	5,67
20	74,87	80,62	50,01	68,50	23,75
30	28,72	32,43	27,25	29,47	9,05
40	22,80	23,83	20,95	22,53	6,49
60	18,43	18,06	17,10	17,86	3,86
120	16,08	16,26	15,33	15,89	3,10
180	15,08	15,15	15,14	15,13	0,27
240	15,08	14,75	15,13	14,99	1,39

Preglednica XVII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih **D5/HCl**. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	D5/HCl/a	D5/HCl/b	D5/HCl/c	povprečje	
0	0	0	0	0	
5	27,26	21,59	20,76	23,20	15,25
10	39,25	32,06	31,41	34,24	12,71
15	49,99	43,69	40,66	44,78	10,63
20	58,44	52,56	47,99	53,00	9,88
30	66,70	64,28	54,80	61,92	10,16
40	64,30	70,38	52,42	62,37	14,64
60	42,43	59,75	33,17	45,11	29,91
120	22,34	24,26	22,56	23,06	4,56
180	19,80	21,41	20,38	20,53	3,98
240	18,45	21,08	19,04	19,52	7,07
<hr/>					
0	0	0	0	0	
5	36,81	28,27	30,30	31,79	14,04
10	55,20	43,52	44,85	47,86	13,36
15	69,30	58,32	58,69	62,10	10,04
20	82,16	72,34	70,66	75,05	8,28
30	96,42	89,42	78,53	88,12	10,23
40	101,85	101,91	61,50	88,42	26,36
60	57,12	74,36	37,39	56,29	32,87
120	25,31	26,20	25,57	25,69	1,79
180	22,23	22,75	24,17	23,05	4,37
240	21,72	21,65	23,61	22,33	4,98

Preglednica XVIII: Rezultati testov sproščanja pri pogojih D2/PVP1. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	D2/PVP1/a	D2/PVP1/b	D2/PVP1/c	povprečje	
0	0	0	0	0	
5	35,11	33,21	32,42	33,58	4,12
10	54,76	54,95	52,10	53,94	2,95
15	66,81	68,76	63,94	66,50	3,65
20	74,82	77,60	67,82	73,41	6,87
30	68,33	72,86	40,94	60,71	28,45
40	28,41	34,87	16,16	26,48	35,88
60	12,56	14,00	9,49	12,02	19,18
120	9,43	10,65	6,99	9,02	20,61
180	9,10	10,48	6,66	8,75	22,12
240	7,79	9,31	6,47	7,86	18,08
—————					
0	0	0	0	0	
5	47,21	46,63	49,60	47,81	3,30
10	73,26	75,47	78,42	75,72	3,41
15	90,39	94,30	101,07	95,25	5,67
20	102,44	106,89	102,35	103,89	2,50
30	95,97	101,07	70,91	89,32	18,07
40	47,34	54,57	37,20	46,37	18,82
60	24,26	25,46	25,30	25,01	2,61
120	17,48	17,15	21,77	18,80	13,72
180	19,07	18,15	19,43	18,88	3,51
240	16,80	16,96	18,27	17,34	4,64

Preglednica XIX: Rezultati testov sproščanja pri pogojih D2/PVP2. Podani so deleži sproščene učinkovine (paralelke, povprečje) in RSD. Podatki nad krepko črto so bili pridobljeni z meritvami v kivetu, pod črto pa s sondo.

čas [min]	delež sproščene učinkovine [%]				RSD [%]
	D2/PVP2/a	D2/PVP2/b	D2/PVP2/c	povprečje	
0	0	0	0	0	
5	35,41	36,62	37,61	36,55	3,01
10	55,81	56,27	57,25	56,44	1,31
15	67,90	65,90	69,07	67,62	2,37
20	73,43	74,31	74,95	74,23	1,03
30	44,56	64,08	54,34	54,33	17,96
40	19,45	24,13	22,93	22,17	10,96
60	11,66	10,97	13,78	12,14	12,04
120	9,35	8,65	10,29	9,43	8,76
180	8,86	8,31	8,80	8,66	3,49
240	7,68	7,63	7,98	7,76	2,46
—————					
0	0	0	0	0	
5	57,59	55,17	60,21	57,66	4,37
10	83,31	81,53	83,32	82,72	1,25
15	106,15	104,27	102,59	104,34	1,71
20	106,61	109,34	111,75	109,23	2,35
30	75,33	98,21	85,75	86,43	13,25
40	41,19	49,00	41,49	43,89	10,08
60	28,71	27,33	23,76	26,60	9,61
120	24,69	20,99	17,64	21,10	16,71
180	22,77	19,11	16,81	19,56	15,36
240	20,94	19,16	16,41	18,84	12,13

4.3 Vpliv motnosti na meritve s sondo

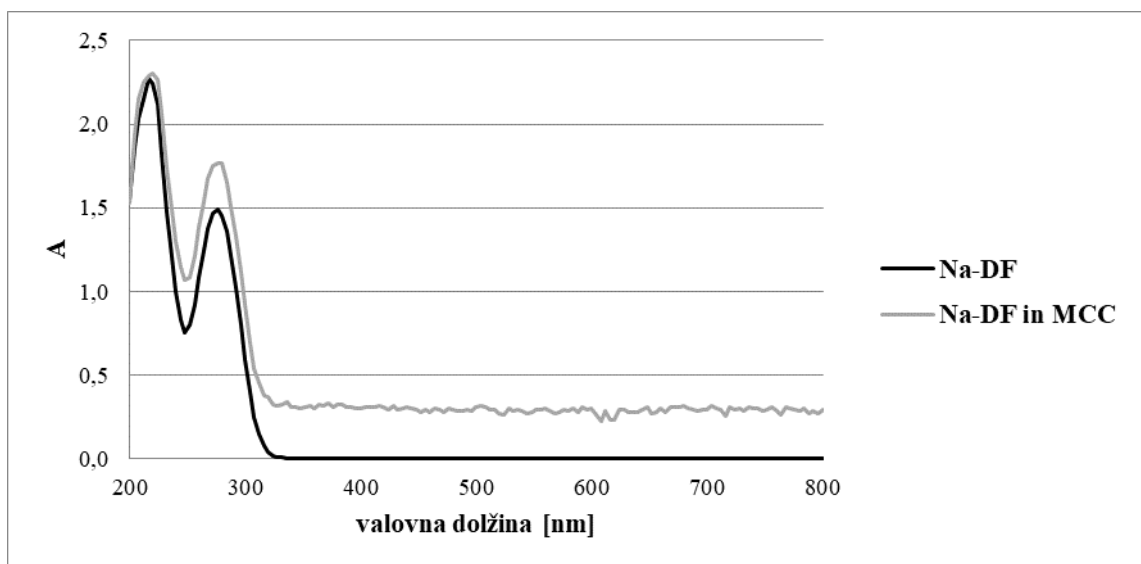
4.3.1 Vpliv delcev MCC na meritve s sondo

Preglednica XX vsebuje vrednosti A_{276} , A_{400} in A_{600} , izmerjene v raztopinah Na-DF v FP po dodatku različnih količin MCC, kot smo opisali v podpoglavju 3.6.1. Dodane so tudi izračunane razlike med A_{276} in A_{400} ter med A_{276} in A_{600} . Na Sliki 6 so predstavljeni rezultati snemanja absorpcijskih spektrov, opisanega v istem podpoglavju.

Preglednica XX: Izmerjene in korigirane absorbance raztopin Na-DF v FP ($V = 75 \text{ mL}$) z dodanim MCC

koncentracija Na-DF [mg/L]	količina MCC v čaši [mg]	A_{276}	A_{400}	A_{600}	$A_{276} - A_{400}$	$A_{276} - A_{600}$
5,13	~ 20	0,105	0,031	0,029	0,074	0,076
		0,106	0,031	0,030	0,075	0,076
		0,107	0,033	0,031	0,074	0,076
	~ 40	0,117	0,043	0,044	0,074	0,073
		0,118	0,045	0,049	0,073	0,069
		0,126	0,052	0,055	0,074	0,071
	~ 80	0,163	0,089	0,096	0,075	0,068
		0,169	0,095	0,097	0,074	0,072
		0,164	0,098	0,098	0,066	0,066
11,76	~ 20	0,211	0,035	0,037	0,175	0,173
		0,214	0,040	0,041	0,174	0,173
		0,214	0,043	0,040	0,171	0,174
	~ 40	0,231	0,060	0,059	0,172	0,172
		0,240	0,066	0,066	0,174	0,173
		0,245	0,072	0,072	0,173	0,173
	~ 80	0,272	0,095	0,099	0,177	0,174
		0,281	0,111	0,112	0,170	0,169
		0,289	0,113	0,117	0,176	0,172
15,74	~ 250	0,424	0,199	0,210	0,225	0,214
		0,443	0,223	0,231	0,220	0,212
		0,479	0,240	0,252	0,239	0,227
23,52	~ 20	0,391	0,045	0,044	0,346	0,348
		0,382	0,038	0,040	0,344	0,343
		0,386	0,042	0,041	0,344	0,344
	~ 40	0,395	0,048	0,051	0,347	0,344
		0,408	0,065	0,066	0,343	0,342
		0,416	0,070	0,071	0,346	0,345
	~ 80	0,444	0,103	0,101	0,341	0,342
		0,451	0,111	0,115	0,340	0,336
		0,462	0,116	0,122	0,346	0,340
30,78	~ 20	0,480	0,037	0,037	0,443	0,443
		0,481	0,036	0,039	0,445	0,442
		0,483	0,036	0,038	0,447	0,445
	~ 40	0,498	0,055	0,056	0,443	0,442
		0,504	0,061	0,062	0,443	0,442
		0,505	0,062	0,065	0,443	0,439
	~ 80	0,533	0,088	0,094	0,446	0,439
		0,537	0,100	0,102	0,437	0,435
		0,547	0,112	0,108	0,435	0,439

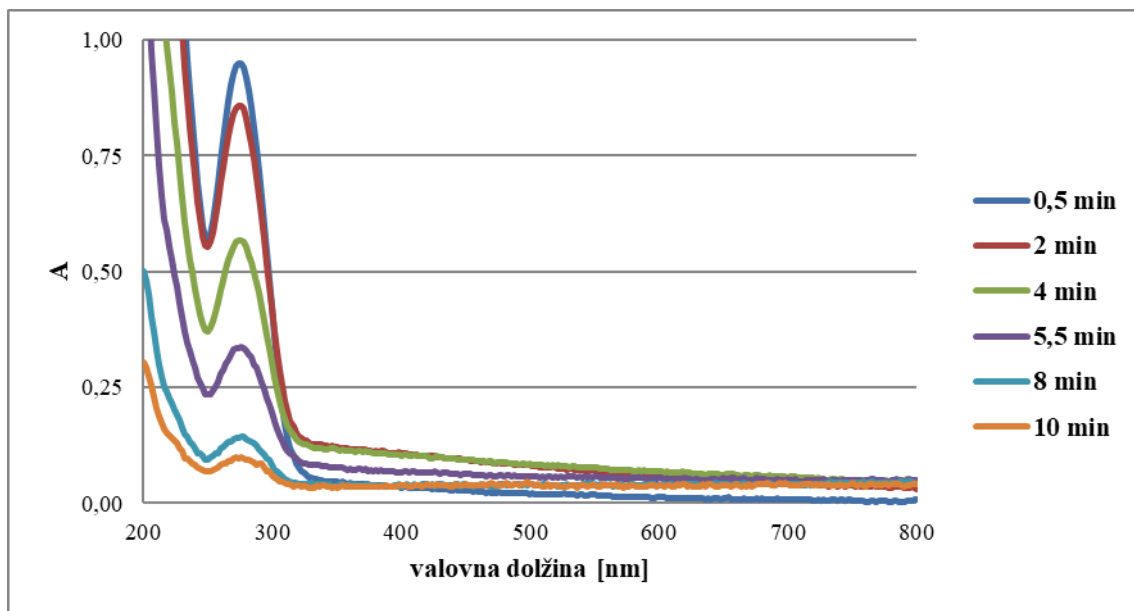
39,20	~ 20	0,617	0,046	0,046	0,571	0,572
		0,619	0,051	0,050	0,568	0,569
		0,620	0,048	0,049	0,573	0,572
	~ 40	0,623	0,052	0,052	0,571	0,570
		0,624	0,057	0,055	0,567	0,569
		0,628	0,057	0,061	0,571	0,566
	~ 80	0,706	0,141	0,146	0,565	0,560
		0,709	0,143	0,150	0,567	0,559
		0,709	0,140	0,148	0,569	0,561
47,21	~ 250	0,874	0,205	0,211	0,669	0,663
		0,884	0,221	0,219	0,663	0,665
		0,907	0,225	0,247	0,683	0,660
51,30	~ 20	0,772	0,034	0,036	0,738	0,736
		0,773	0,034	0,035	0,739	0,738
		0,774	0,038	0,037	0,736	0,737
	~ 40	0,786	0,052	0,052	0,735	0,734
		0,787	0,049	0,053	0,738	0,734
		0,786	0,047	0,047	0,739	0,739
	~ 80	0,821	0,090	0,097	0,731	0,725
		0,822	0,090	0,094	0,732	0,729
		0,831	0,098	0,098	0,733	0,733
78,68	~ 250	1,314	0,221	0,221	1,094	1,094
		1,333	0,238	0,241	1,095	1,092
		1,350	0,235	0,248	1,114	1,102
89,17	~ 250	1,473	0,232	0,237	1,240	1,236
		1,491	0,235	0,239	1,257	1,253
		1,503	0,247	0,260	1,256	1,244
104,90	~ 250	1,680	0,237	0,246	1,443	1,434
		1,689	0,248	0,262	1,442	1,427
		1,704	0,276	0,283	1,428	1,421



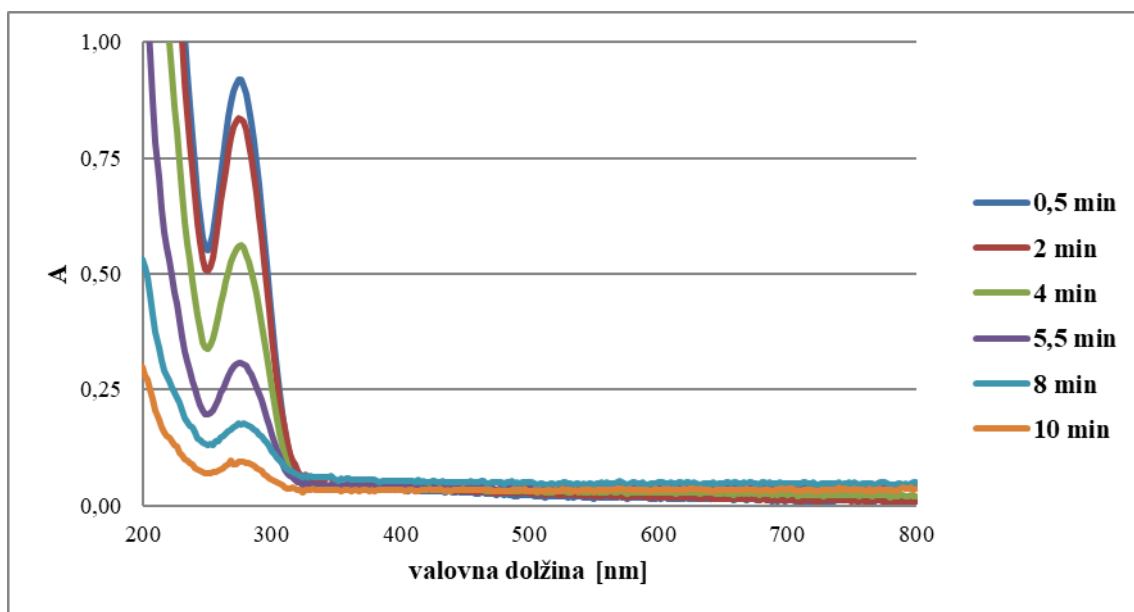
Slika 6: Absorpcijski spekter raztopine Na-DF v FP s koncentracijo 104,90 mg/L (ena paralelka) in absorpcijski spekter iste raztopine po dodatku približno 30 mg MCC (ena paralelka)

4.3.2 Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo

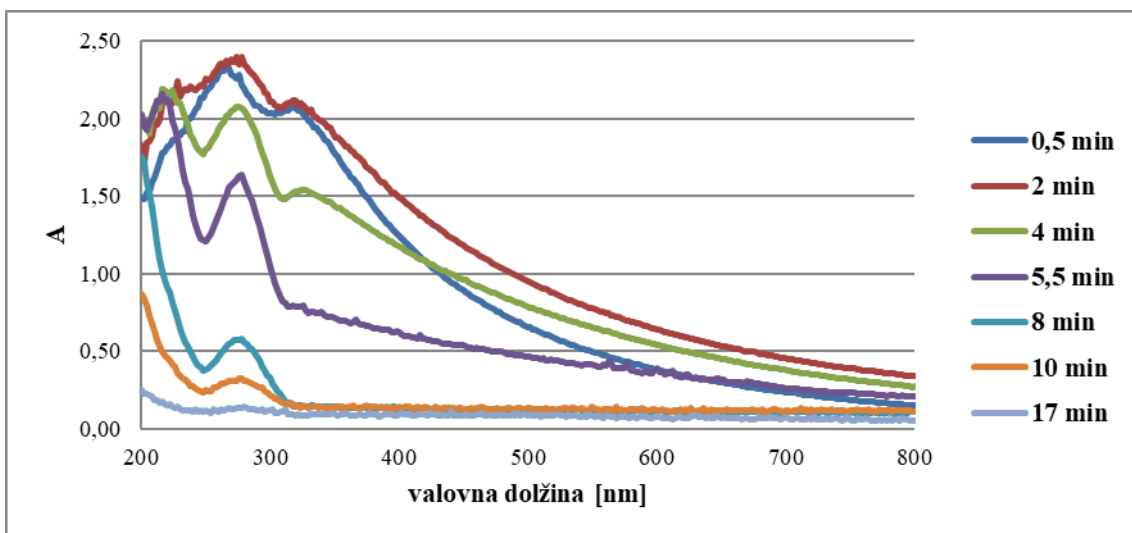
Sledijo rezultati snemanja absorpcijskih spektrov, opisanega v podpoglavju 3.6.2, s katerim smo hoteli preučiti vpliv nastajajočih delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo. Zaradi preglednosti grafov nismo prikazali absorpcijskih spektrov v vseh časovnih točkah.



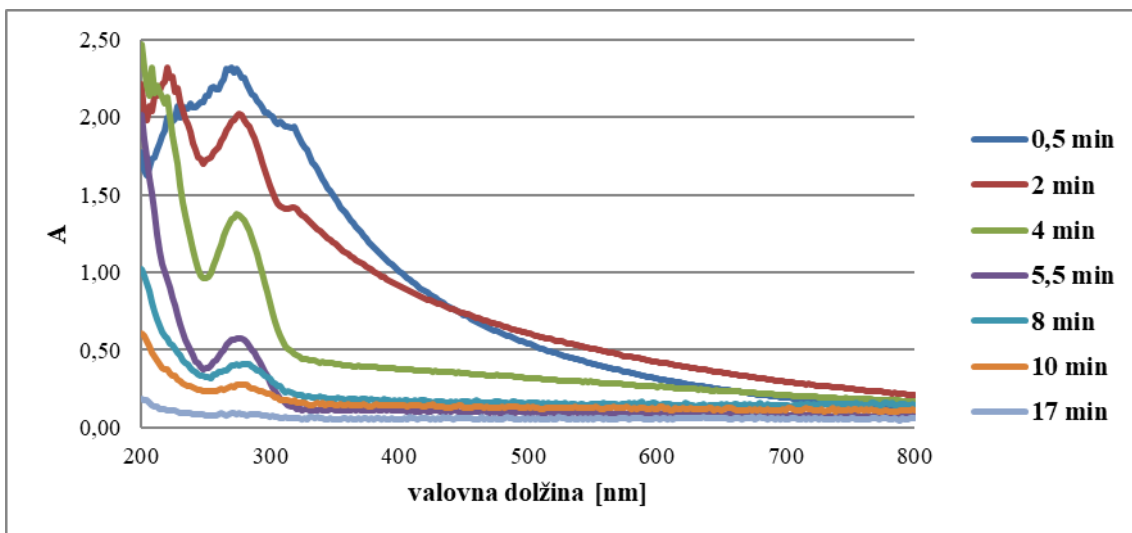
Slika 7: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{60} (prva ponovitev)



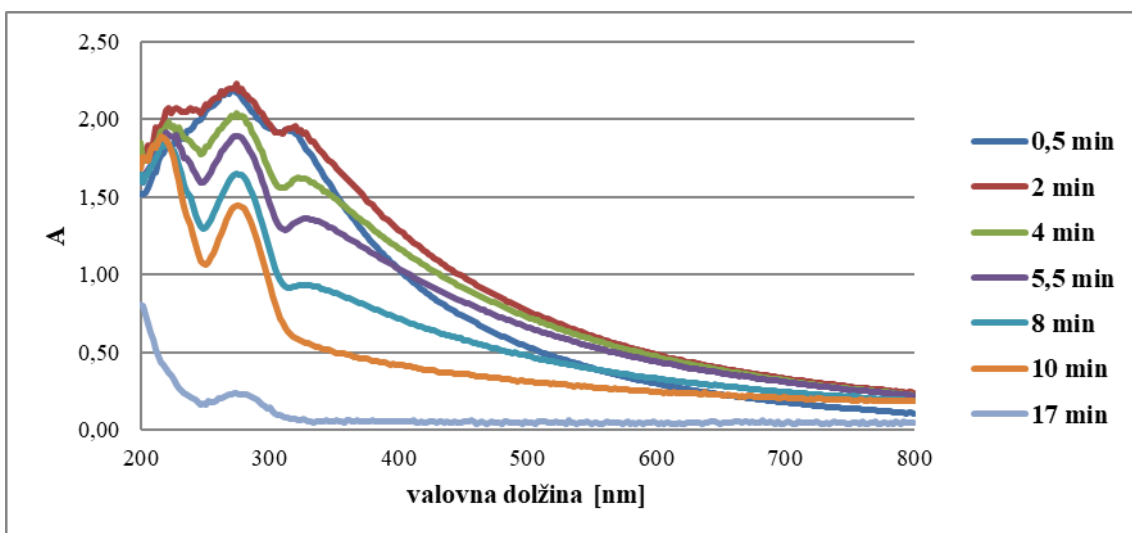
Slika 8: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{60} (druga ponovitev)



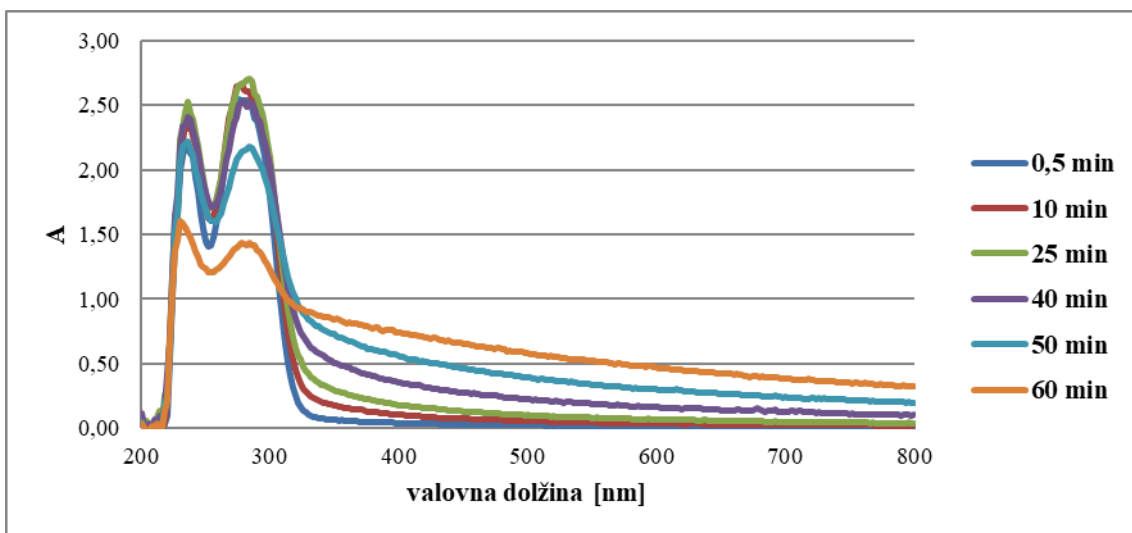
Slika 9: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{200} (prva ponovitev)



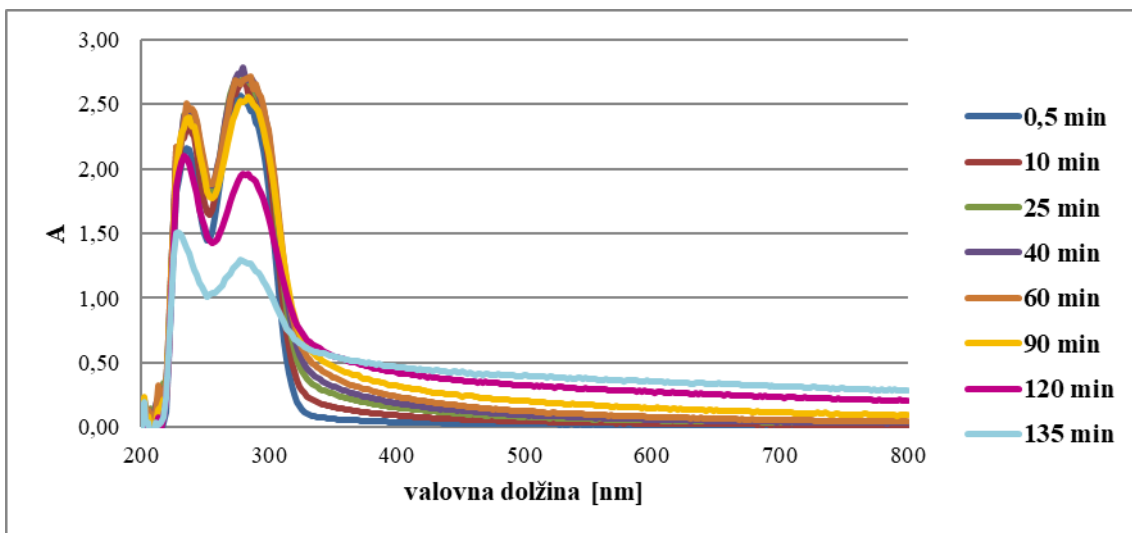
Slika 10: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{200} (druga ponovitev)



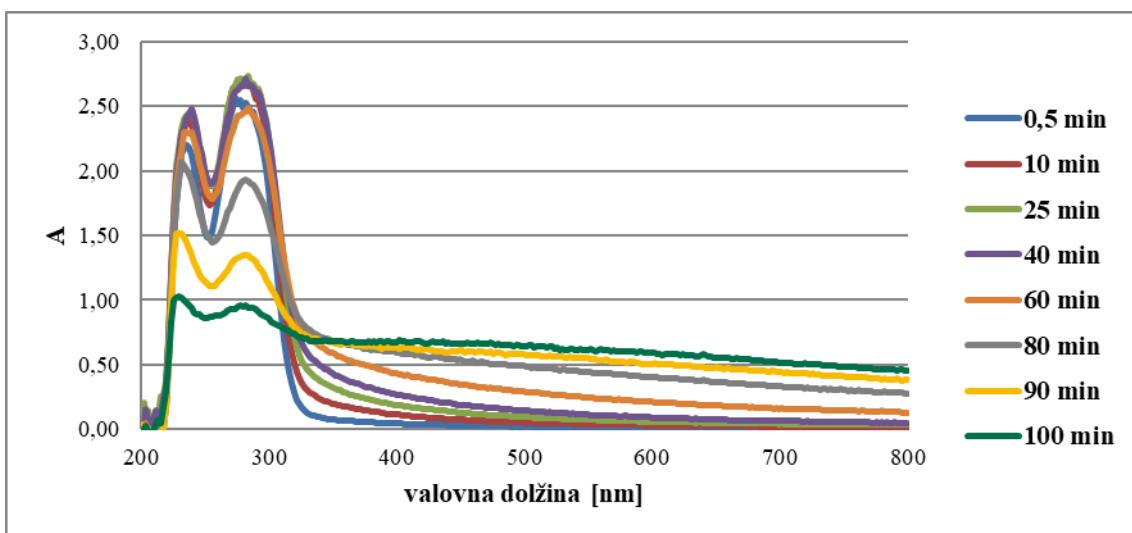
Slika 11: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{200} (tretja ponovitev)



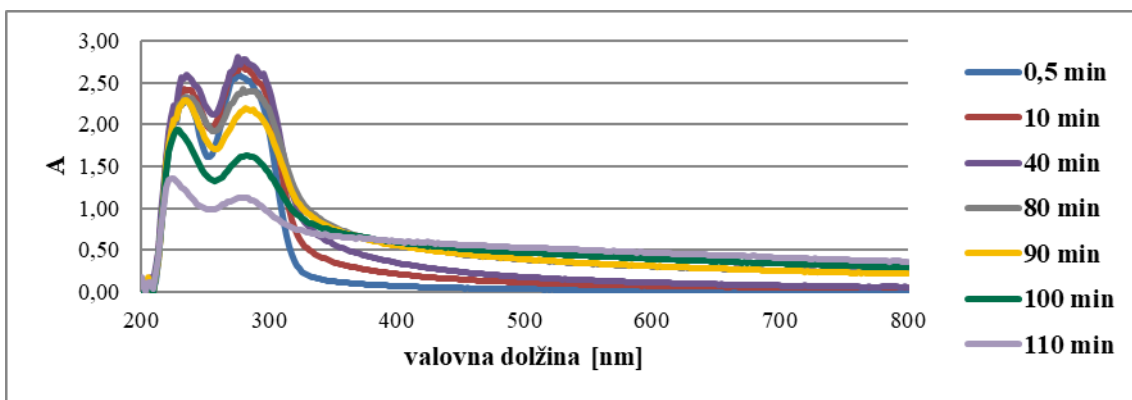
Slika 12: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVPI$ (prva ponovitev)



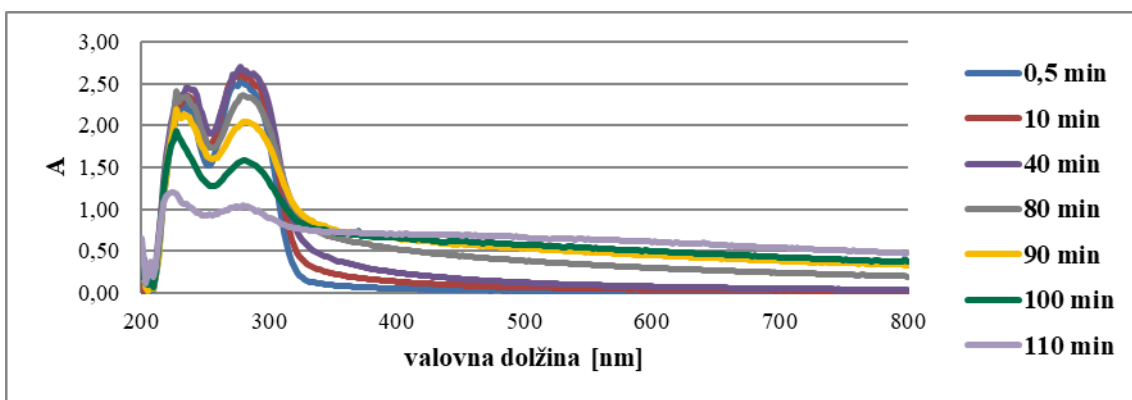
Slika 13: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVPI$ (druga ponovitev)



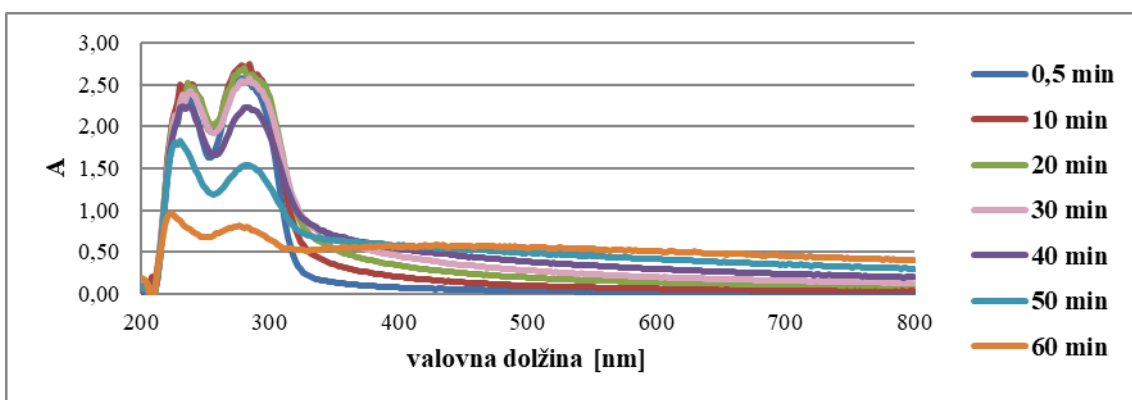
Slika 14: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVPI$ (tretja ponovitev)



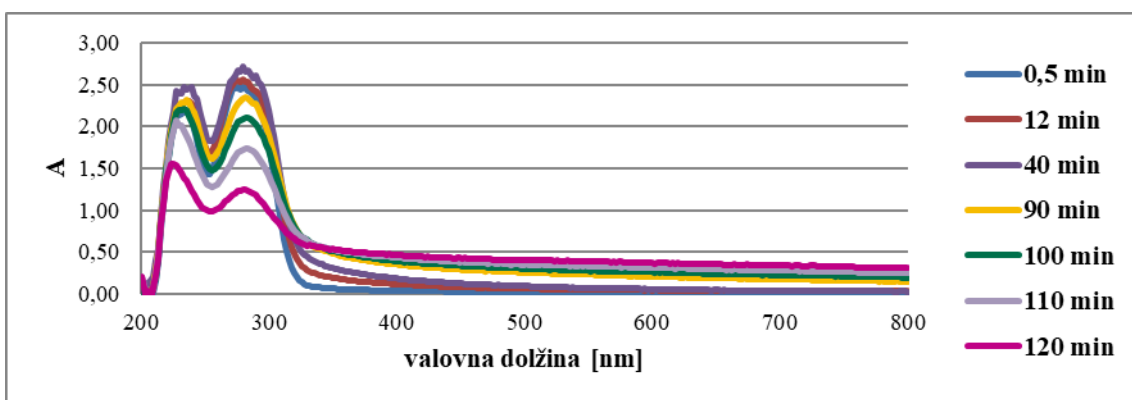
Slika 15: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$ (prva ponovitev)



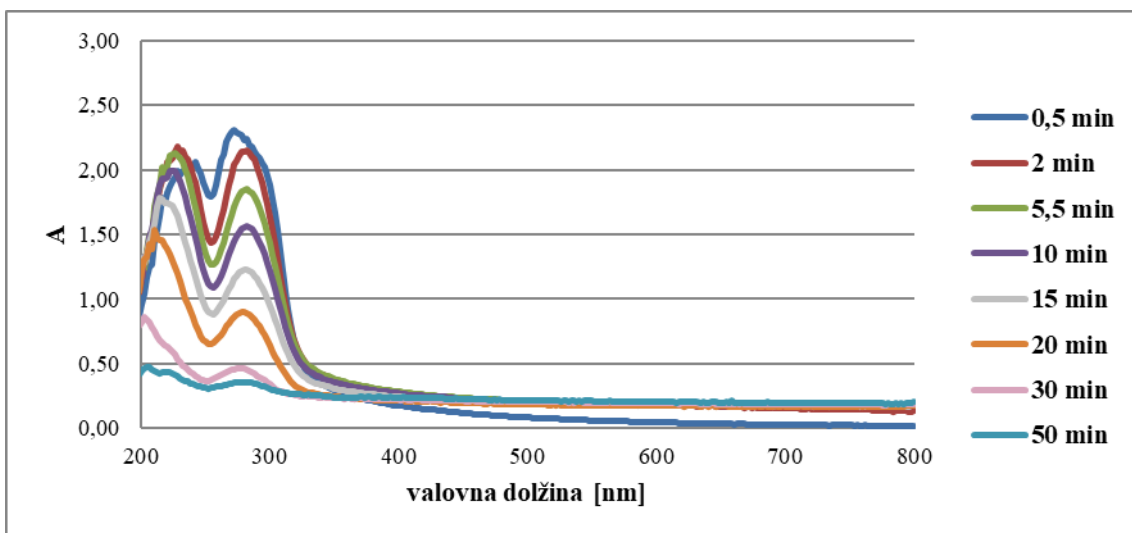
Slika 16: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$ (druga ponovitev)



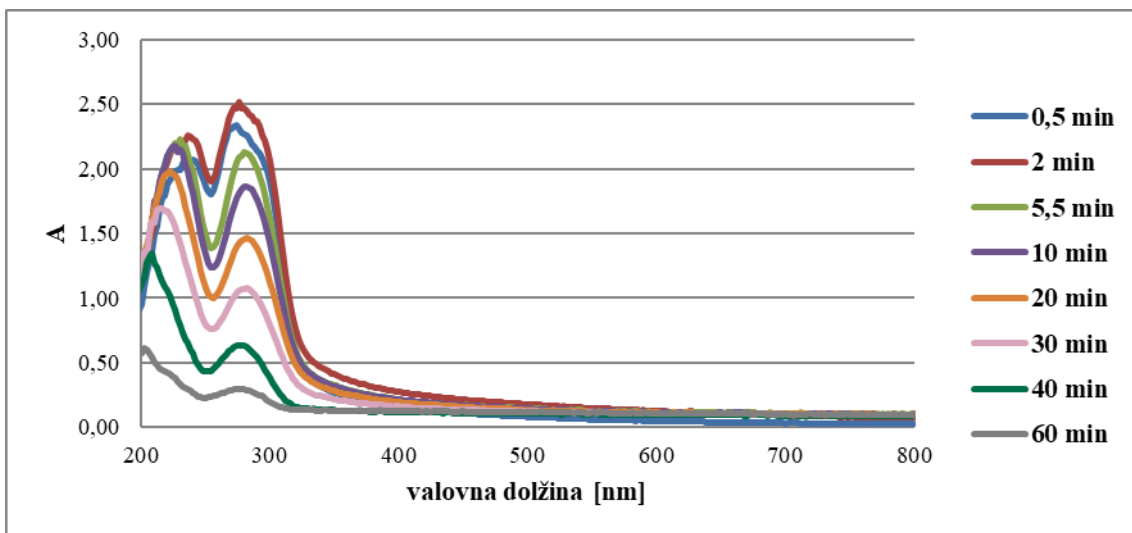
Slika 17: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$ (tretja ponovitev)



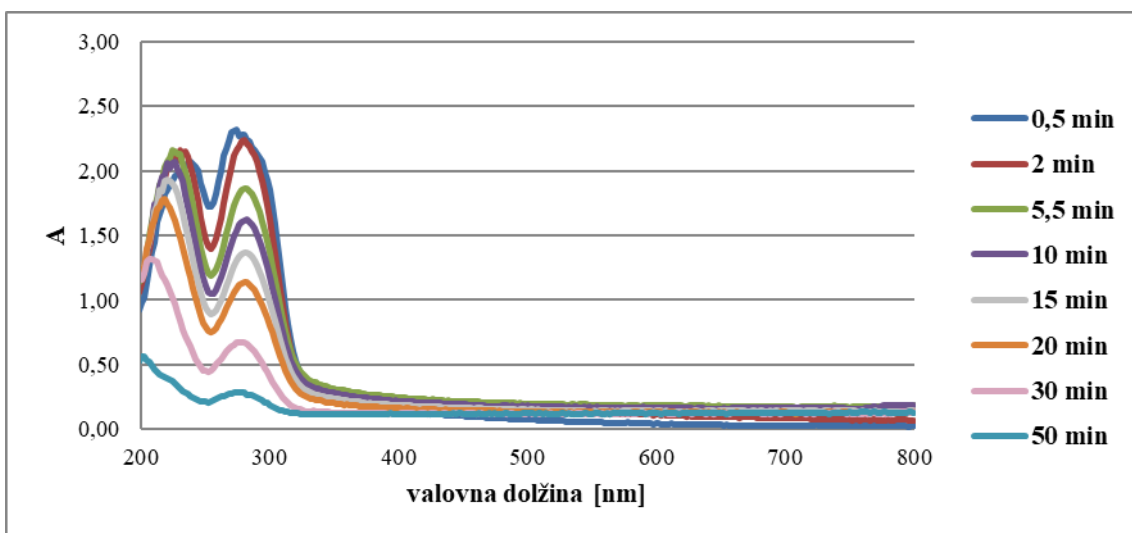
Slika 18: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$ (četrti ponovitev)



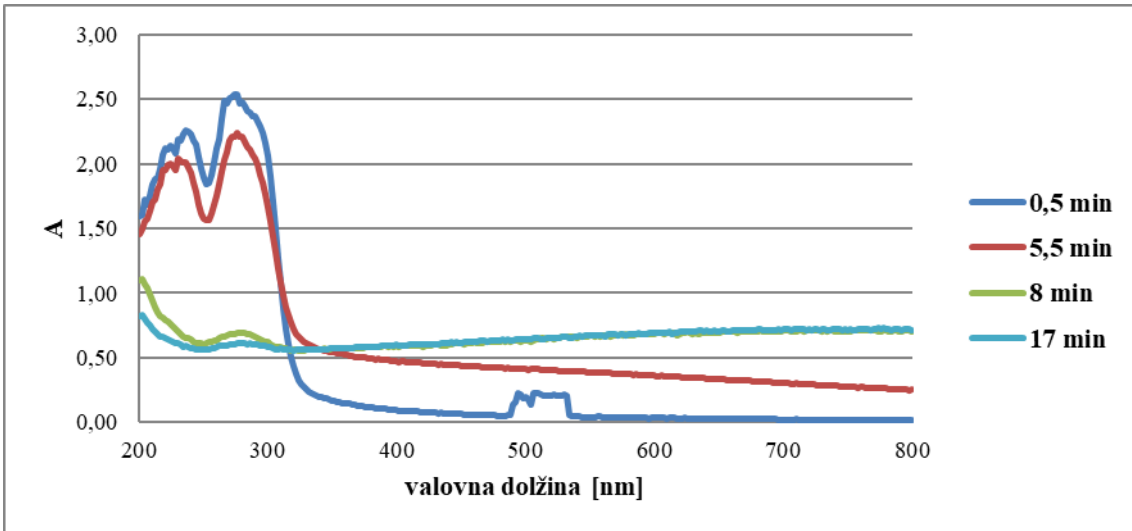
Slika 19: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP3$ (prva ponovitev)



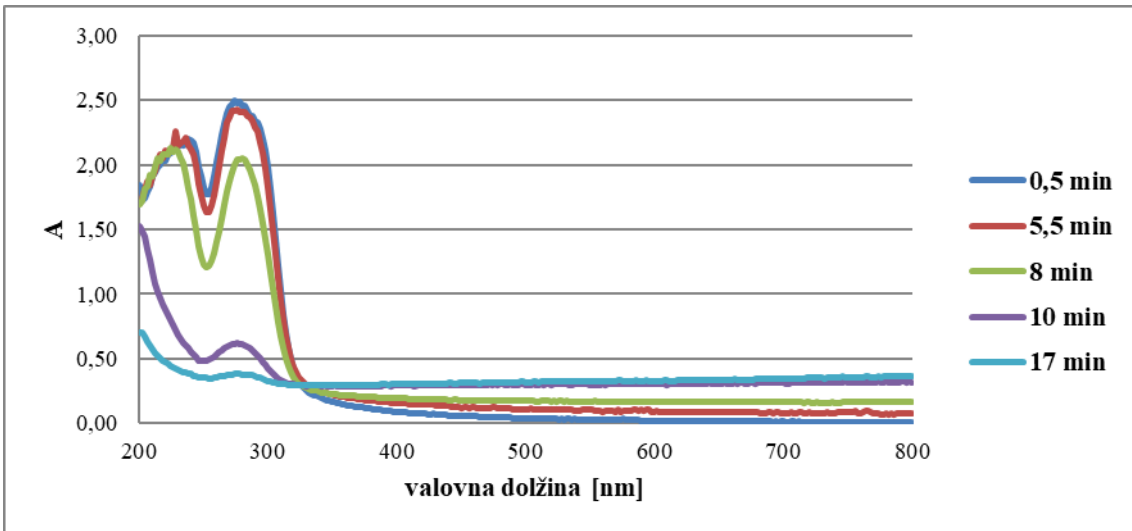
Slika 20: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP3$ (druga ponovitev)



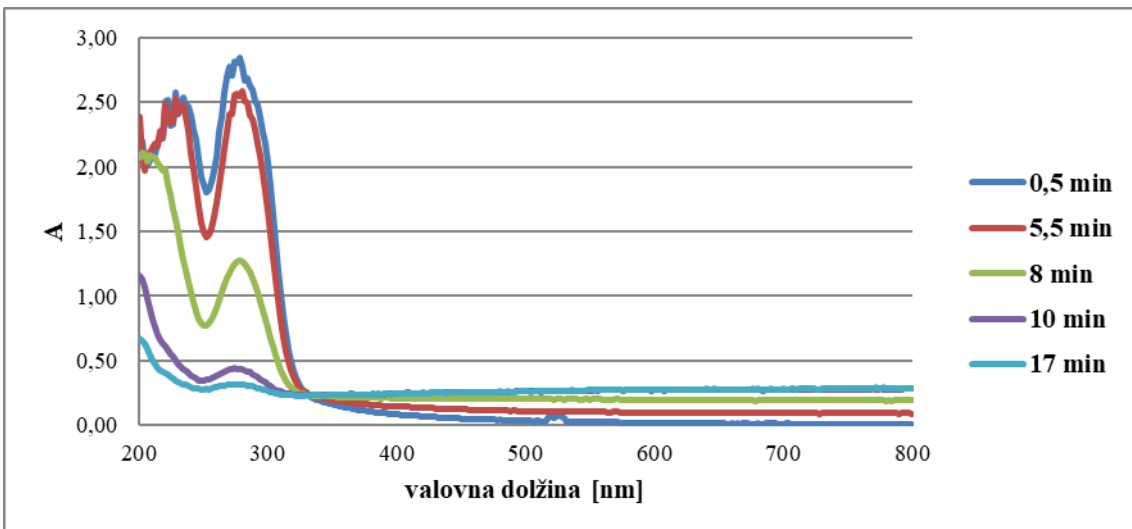
Slika 21: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP3$ (tretja ponovitev)



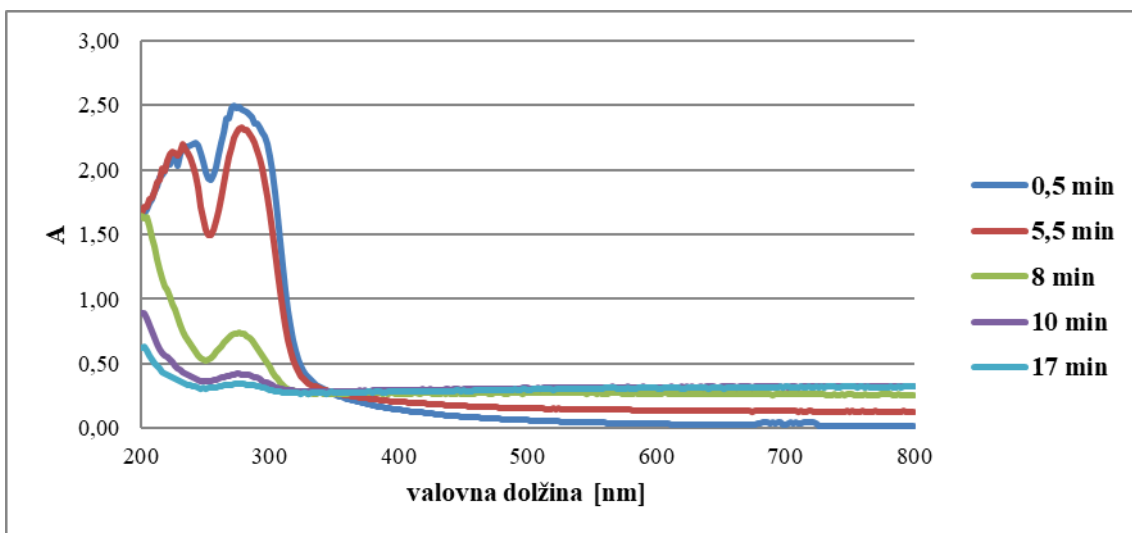
Slika 22: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPCI (prva ponovitev)



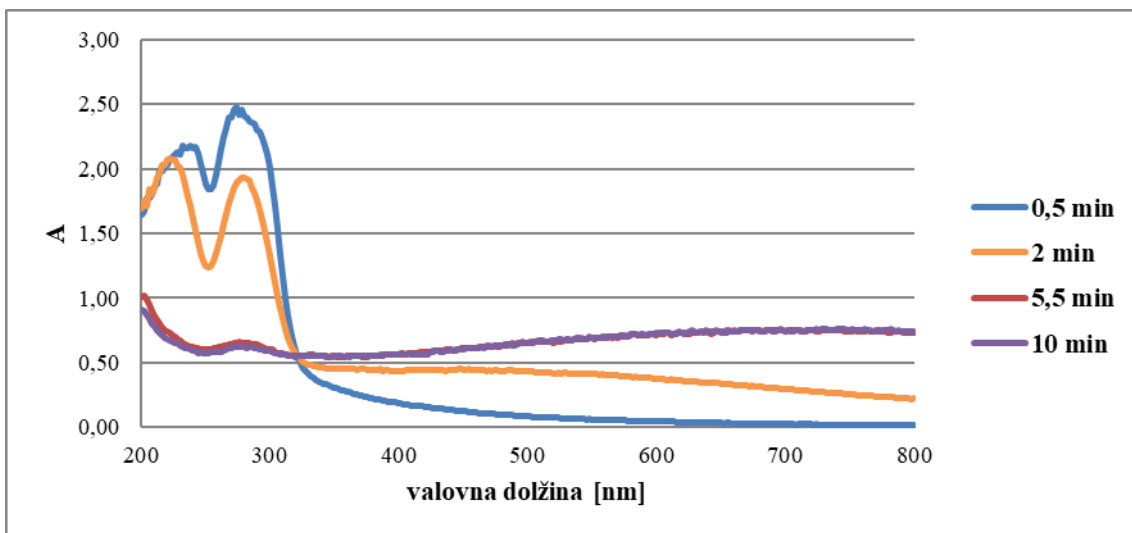
Slika 23: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPCI (druga ponovitev)



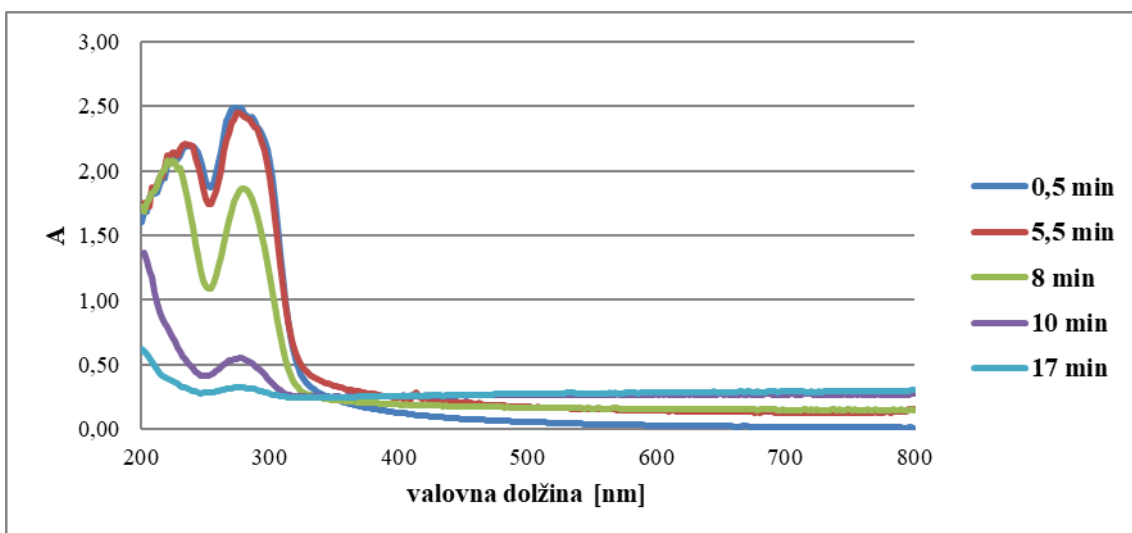
Slika 24: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPCI (tretja ponovitev)



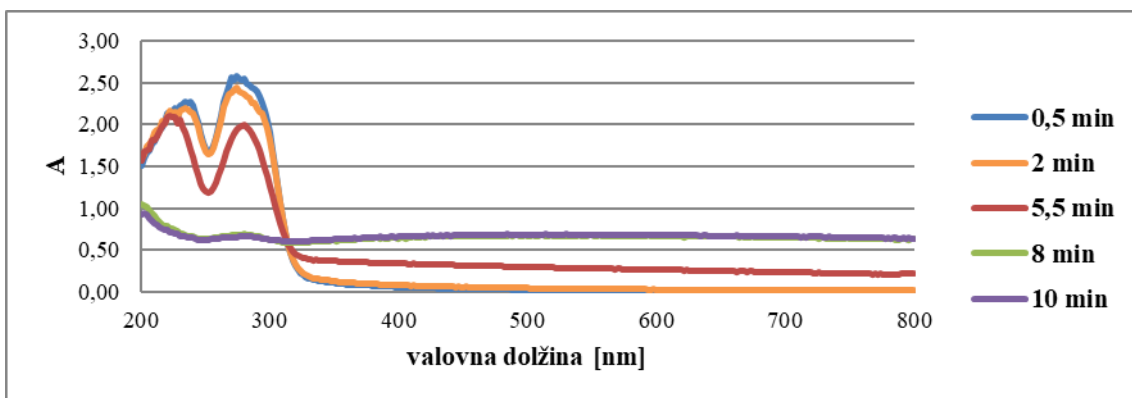
Slika 25: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPC2$ (prva ponovitev)



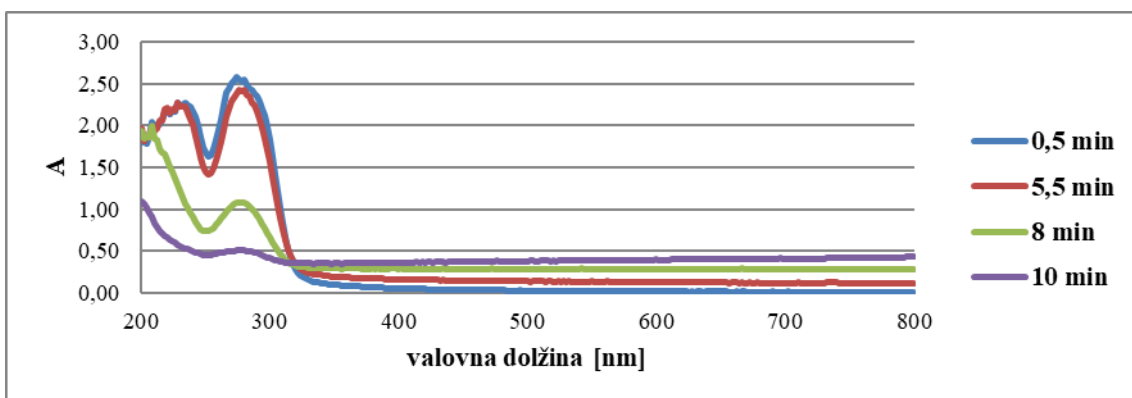
Slika 26: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPC2$ (druga ponovitev)



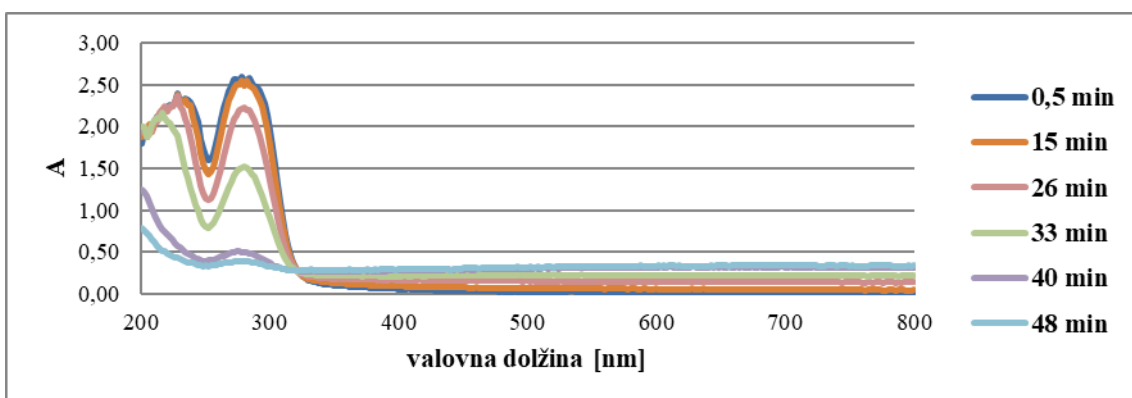
Slika 27: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPC2$ (tretja ponovitev)



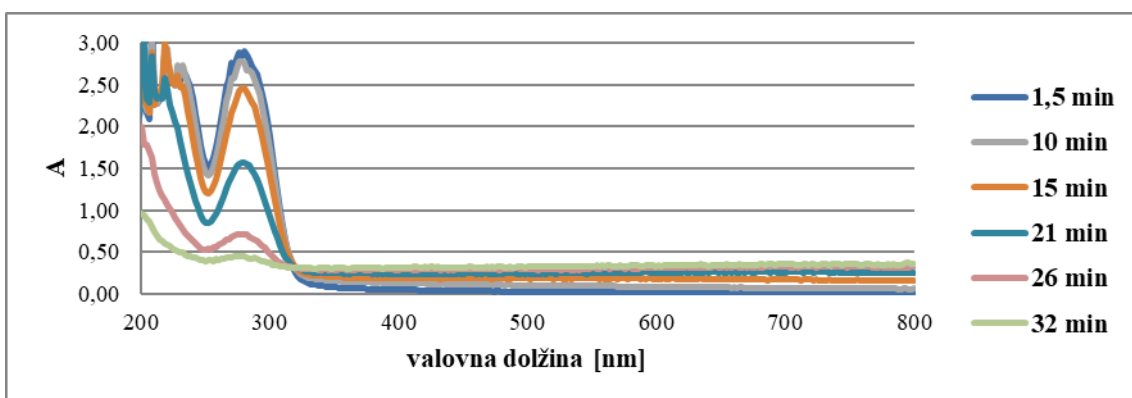
Slika 28: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPC* (prva ponovitev)



Slika 29: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPC* (druga ponovitev)



Slika 30: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPMC (prva ponovitev)



Slika 31: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPMC (druga ponovitev)

4.4 Določanje velikost delcev

4.4.1 Določanje velikost delcev MCC

V Preglednici XXI so podani rezultati vseh devetih meritev velikosti delcev MCC z lasersko difrakcijo. Volumski delež v posamezni celici se nanaša na velikostno frakcijo delcev, omejeno z velikostma, navedenima v levem stolpcu.

Preglednica XXI: Meritve velikost delcev MCC z lasersko difrakcijo (po 3 paralelke za vsako suspenzijo)

velikost delcev [μm]	volumski delež velikostne frakcije [%]								
	prva suspenzija			druga suspenzija			tretja suspenzija		
0,05–0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,06–0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,07–0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
0,08–0,09	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
0,09–0,11	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
0,11–0,13	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03
0,13–0,15	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
0,15–0,17	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07
0,17–0,20	0,12	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,10	0,09	0,10
0,20–0,23	0,16	0,17	0,16	0,15	0,16	0,14	0,15	0,14	0,15
0,23–0,27	0,21	0,22	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
0,27–0,31	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24
0,31–0,36	0,23	0,24	0,24	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23
0,36–0,42	0,21	0,21	0,21	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20
0,42–0,49	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
0,49–0,58	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
0,58–0,67	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11
0,67–0,78	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,78–0,91	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
0,91–1,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
1,06–1,24	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1,24–1,44	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1,44–1,68	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05
1,68–1,95	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
1,95–2,28	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
2,28–2,65	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
2,65–3,09	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
3,09–3,60	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
3,60–4,19	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
4,19–4,88	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
4,88–5,69	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
5,69–6,63	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
6,63–7,72	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12
7,72–9,00	0,17	0,18	0,18	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17
9,00–10,48	0,24	0,24	0,25	0,23	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24
10,48–12,21	0,33	0,33	0,33	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,32
12,21–14,22	0,43	0,43	0,43	0,41	0,40	0,40	0,41	0,42	0,42
14,22–16,57	0,54	0,55	0,55	0,52	0,52	0,51	0,53	0,53	0,54
16,57–19,31	0,68	0,69	0,69	0,65	0,64	0,63	0,66	0,66	0,66
19,31–22,49	0,84	0,85	0,85	0,79	0,79	0,76	0,80	0,80	0,81
22,49–26,20	1,05	1,06	1,06	0,96	0,96	0,93	0,98	0,98	0,98

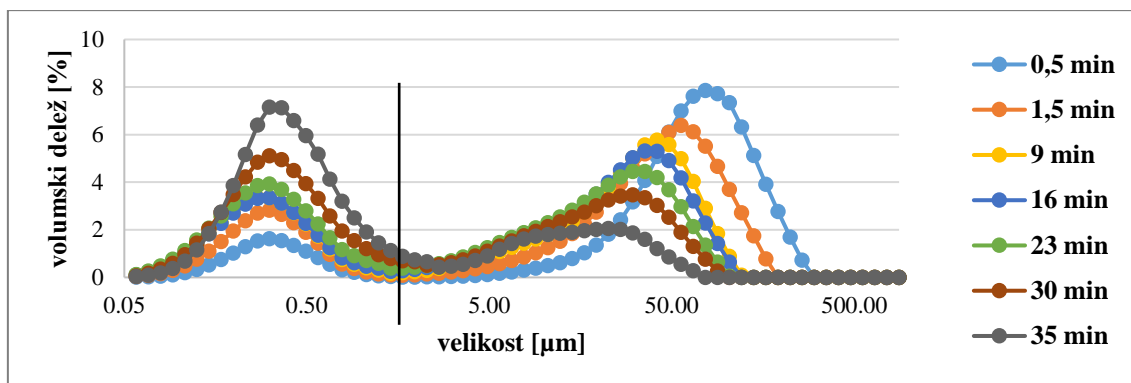
26,20–30,53	1,33	1,34	1,34	1,18	1,18	1,14	1,22	1,21	1,21
30,53–35,56	1,70	1,71	1,71	1,48	1,49	1,44	1,53	1,52	1,53
35,56–41,43	2,21	2,22	2,22	1,92	1,91	1,86	1,97	1,96	1,97
41,43–48,27	2,87	2,89	2,88	2,52	2,50	2,44	2,58	2,56	2,58
48,27–56,23	3,70	3,74	3,72	3,32	3,27	3,22	3,38	3,36	3,38
56,23–65,51	4,70	4,76	4,71	4,33	4,23	4,20	4,37	4,36	4,38
65,51–76,32	5,80	5,88	5,82	5,50	5,34	5,34	5,53	5,52	5,54
76,32–88,91	6,94	7,06	6,96	6,77	6,55	6,58	6,78	6,79	6,79
88,91–103,58	8,06	8,20	8,08	8,04	7,76	7,84	8,02	8,05	8,02
103,58–120,67	9,09	9,24	9,11	9,16	8,84	8,98	9,12	9,18	9,10
120,67–140,58	9,97	10,13	10,00	9,98	9,69	9,87	9,92	10,01	9,88
140,58–163,77	9,76	9,86	9,77	10,47	10,28	10,47	10,40	10,50	10,36
163,77–190,80	8,82	8,83	8,82	9,53	9,55	9,70	9,48	9,52	9,43
190,80–222,28	7,30	7,20	7,26	7,89	8,11	8,18	7,83	7,82	7,80
222,28–258,95	5,45	5,24	5,39	5,85	6,24	6,23	5,80	5,76	5,79
258,95–301,68	3,60	3,29	3,52	3,81	4,21	4,13	3,76	3,70	3,78
301,68–351,46	1,75	1,34	1,64	1,77	2,19	2,04	1,72	1,64	1,77
351,46–409,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00
409,45–477,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
477,01–555,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
555,71–647,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
647,41–754,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
754,23–878,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

4.4.2 Določanje velikost delcev oborjenega diklofenaka

V vseh poskusih z raztopinami samega Na-DF in raztopinami kombinacije Na-DF in PVP je bila porazdelitev velikosti delcev bimodalna. Primer je podan na Sliki 32, ki prikazuje volumske deleže delcev vseh izmerjenih velikosti v različnih časovnih točkah. Ker porazdelitev tudi v ostalih primerih ni bila bistveno drugačna, smo se odločili rezultate podati v obliki volumskih deležev dveh frakcij: manjših delcev (<1,7 μm) in večjih delcev (>1,7 μm). Rezultati so podani v Preglednicah XXII–XXV.

Preglednica XXII: Volumska deleža manjših delcev (<1,7 μm) in večjih delcev (>1,7 μm) med obarjanjem diklofenaka iz raztopine D_{200}

raztopina D_{200}													
	t [min]	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	10	15	20
prva ponovitev	delež manjših delcev [%]	86,4	72,8	39,1	9,8	9,4	9,1	9,5	11,5	12,7	13,3	13,7	14,2
	delež večjih delcev [%]	13,6	27,2	60,9	90,2	90,6	90,9	90,5	88,5	87,3	86,7	86,3	85,8
druga ponovitev	t [min]	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	10	15	
	delež manjših delcev [%]	100	93,5	72,7	25,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
tretja ponovitev	delež večjih delcev [%]	0,0	6,5	27,3	74,7	99,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	
	t [min]	0,67	1	1,5	2	2,5	3	5	10	15			
tretja ponovitev	delež manjših delcev [%]	90,3	82,8	59,7	26,9	9,8	8,7	8,7	10,9	11,1			
	delež večjih delcev [%]	9,7	17,2	40,3	73,1	90,2	91,3	91,3	89,1	88,9			



Slika 32: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$

Preglednica XXIII: Volumska deleža manjših delcev ($<1,7 \mu\text{m}$) in večjih delcev ($>1,7 \mu\text{m}$) med obarjanjem diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP1$

raztopina $D_{200}/PVP1$													
prva ponovitev	t [min]	0,67	2	5	10	20	25	27,5	30	32,5	37,5	50	60
	delež manjših delcev [%]	0,3	0,4	7,6	10,0	22,6	33,1	41,3	46,0	45,2	44,1	46,4	47,8
	delež večjih delcev [%]	99,7	99,6	92,4	90,0	77,4	66,9	58,7	54,0	54,8	55,9	53,6	52,2
druga ponovitev	t [min]	0,5	2	4	9	16	24	27,5	32	35	40	45	50
	delež manjših delcev [%]	7,7	12,7	14,1	15,9	18,3	25,2	29,4	42,2	62,1	67,7	70,6	71,8
	delež večjih delcev [%]	92,3	87,3	85,9	84,1	81,7	74,8	70,6	57,8	37,9	32,3	29,4	28,2
tretja ponovitev	t [min]	0,5	2,5	7,5	15	20	22	24	27	30	35	42	50
	delež manjših delcev [%]	0,3	0,9	8,9	13,9	19,3	22,4	27,3	34,4	43,1	52,0	51,3	48,2
	delež večjih delcev [%]	99,7	99,1	91,1	86,1	80,7	77,6	72,7	65,6	56,9	48,0	48,7	51,8

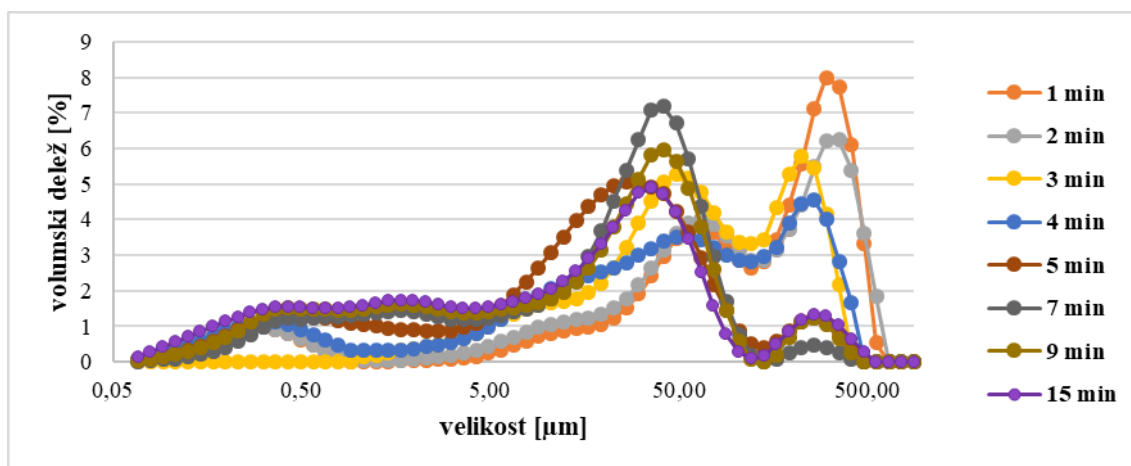
Preglednica XXIV: Volumska deleža manjših delcev ($<1,7 \mu\text{m}$) in večjih delcev ($>1,7 \mu\text{m}$) med obarjanjem diklofenaka iz raztopine $D_{200}/PVP2$

raztopina $D_{200}/PVP2$													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1	2	3	5	10	15	20	30	35	40	50
	delež manjših delcev [%]	0,1	8,7	12,0	13,1	15,4	17,7	21,2	27,4	68,6	71,9	73,8	76,5
	delež večjih delcev [%]	99,9	91,3	88,0	86,9	84,6	82,3	78,8	72,6	31,4	28,1	26,2	23,5
druga ponovitev	t [min]	0,5	1,5	4	9	16	23	26,5	30	35	40		
	delež manjših delcev [%]	13,6	25,0	32,3	33,9	34,3	41,2	44,3	52,4	69,7	72,2		
	delež večjih delcev [%]	86,4	75,0	67,7	66,1	65,7	58,8	55,7	47,6	30,3	27,8		
tretja ponovitev	t [min]	0,5	2	5	10	20	25	31	38,5	48			
	delež manjših delcev [%]	15,0	26,1	30,1	32,2	33,0	34,9	37,3	45,5	42,4			
	delež večjih delcev [%]	85,0	73,9	69,9	67,8	67,0	65,1	62,7	54,5	57,6			
četrti ponovitev	t [min]	0,5	2	4	8	15	20	23,3	26,7	30	35	45	50
	delež manjših delcev [%]	11,9	19,2	22,7	24,3	25,7	28,1	32,0	37,2	49,5	54,2	57,2	58,0
	delež večjih delcev [%]	88,1	80,8	77,3	75,7	74,3	71,9	68,0	62,8	50,5	45,8	42,8	42,0

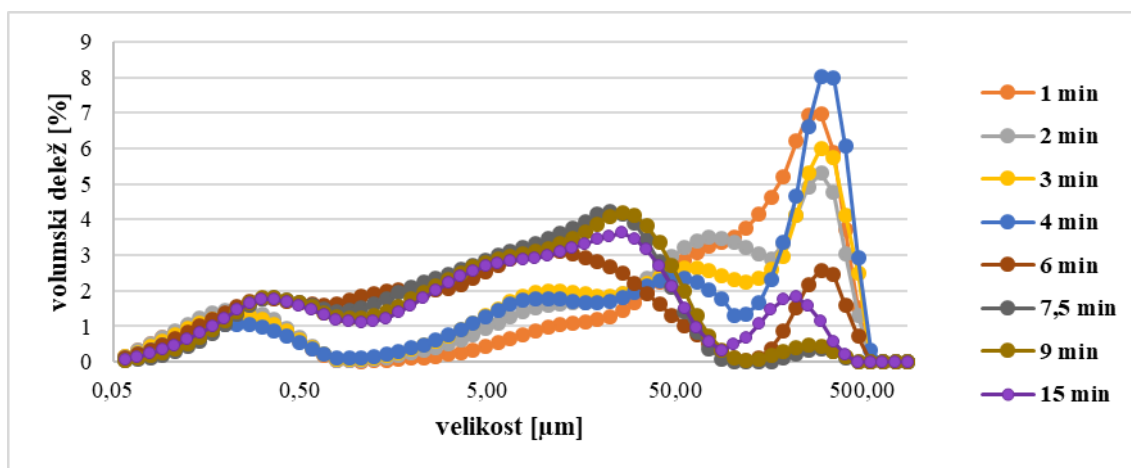
Preglednica XXV: Volumska deleža manjših delcev (<1,7 μm) in večjih delcev (>1,7 μm) med obarjanjem diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/PVP3

raztopina D ₂₀₀ /PVP3													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1,5	3	4	4,5	5	6	7	9	12		
	delež manjših delcev [%]	5,9	8,7	24,6	37,7	34,8	30,8	29,3	30,1	30,1	30,1		
	delež večjih delcev [%]	94,1	91,3	75,4	62,3	65,2	69,2	70,7	69,9	69,9	69,9		
druga ponovitev	t [min]	0,5	1,5	1,75	2	3	5	9	13	20			
	delež manjših delcev [%]	32,8	43,4	40,0	39,1	37,7	36,5	38,7	42,3	45,0			
	delež večjih delcev [%]	67,2	56,6	60,0	60,9	62,3	63,5	61,3	57,7	55,0			
tretja ponovitev	t [min]	0,5	1,5	2	2,5	3,5	5	10	15	20	30	40	60
	delež manjših delcev [%]	32,1	40,3	38,2	37,6	37,7	37,9	40,6	45,5	47,4	48,4	49,5	49,6
	delež večjih delcev [%]	67,9	59,7	61,8	62,4	62,3	62,1	59,4	54,5	52,6	51,6	50,5	50,4

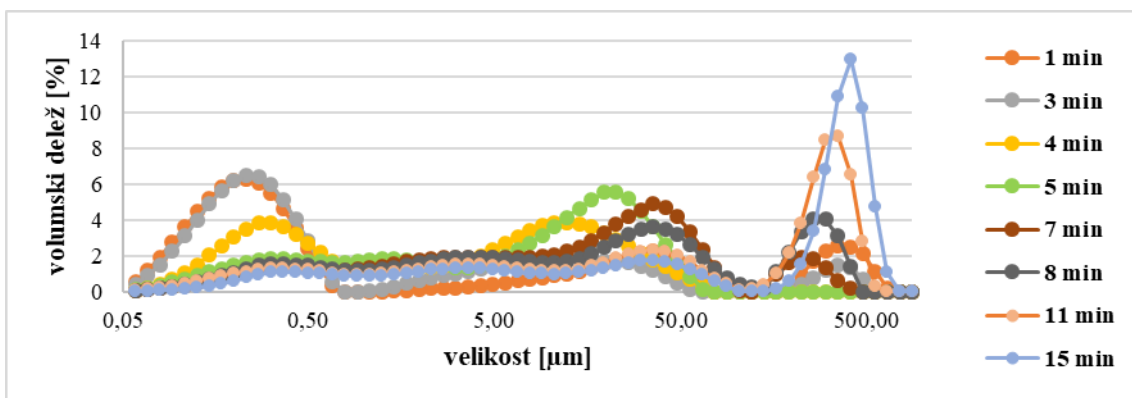
Kot rezultate poskusov s HPC in HPMC podajamo le krivulje porazdelitve velikosti delcev. Vrhovi večinoma niso jasno ločeni, zato delcev nismo razvrščali v velikostne skupine. Slike 33–38 ponazarjajo spreminjanje porazdelitve velikosti delcev s časom.



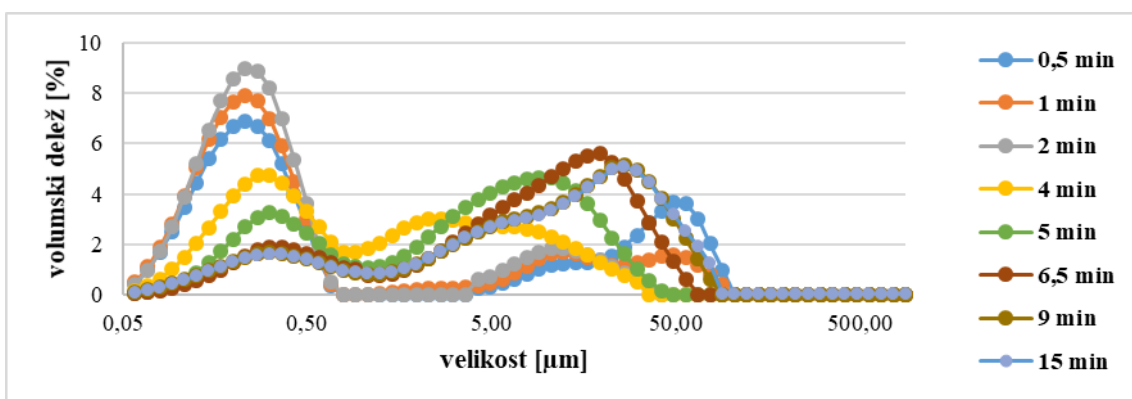
Slika 33: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPCI (prva ponovitev)



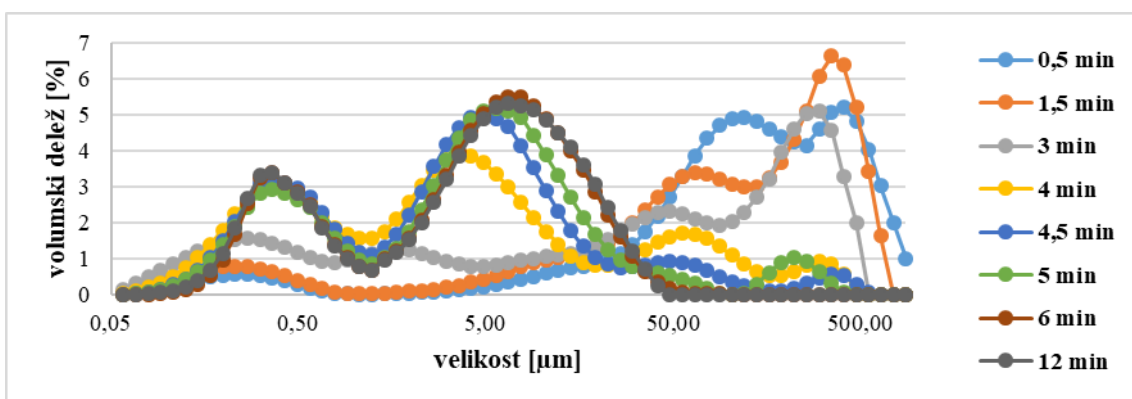
Slika 34: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPCI (druga ponovitev)



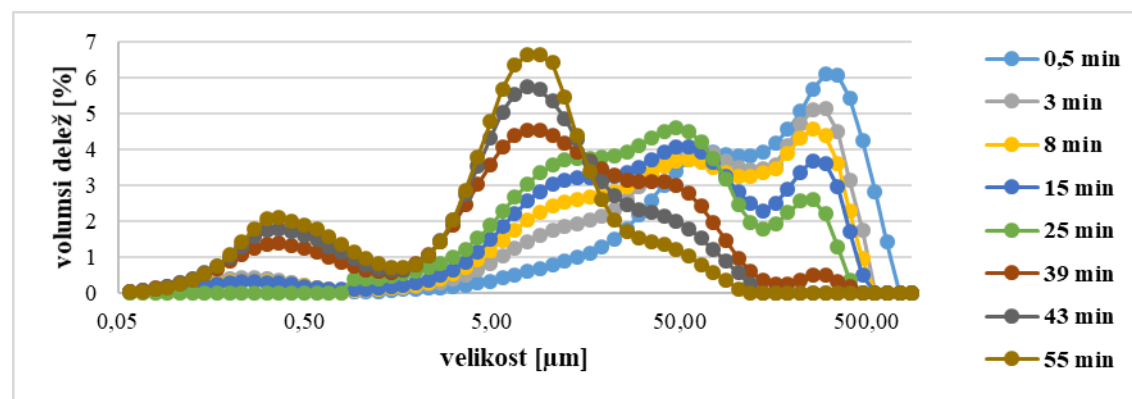
Slika 35: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPC2$ (prva ponovitev)



Slika 36: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPC2$ (druga ponovitev)



Slika 37: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{200}/HPC^*



Slika 38: Porazdelitev velikosti delcev tekom obarjanja diklofenaka iz raztopine $D_{200}/HPMC$

Preglednica XXVI vsebuje podatke o motnosti (*obscuration*) med meritvami z *Mastersizerjem*.

Preglednica XXVI: Podatki o motnosti med vsako meritvijo poskusov določanja velikosti delcev

raztopina D₂₀₀													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	10	15	20
	motnost [%]	19,6	23,7	18,1	12,3	16,4	17,3	18,1	18,4	18,1	17,4	16,1	14,4
druga ponovitev	t [min]	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	10	15	
	motnost [%]	32,6	31,1	23,0	10,3	9,3	10,8	10,8	10,5	10,5	10,2	9,3	
tretja ponovitev	t [min]	0,67	1	1,5	2	2,5	3	5	10	15			
	motnost [%]	26,5	28,2	25,7	17,4	14,9	17,1	17,5	15,8	13,9			
raztopina D₂₀₀/PVP1													
prva ponovitev	t [min]	0,67	2	5	10	20	25	27,5	30	32,5	37,5	50	60
	motnost [%]	1,6	2,4	4,2	6,6	14,6	23,7	26,6	27,0	27,7	27,4	26,0	25,1
druga ponovitev	t [min]	0,5	2	4	9	16	24	27,5	32	35	40	45	50
	motnost [%]	1,7	2,6	3,5	5,2	6,6	8,7	10,1	11,2	11,8	12,8	13,3	13,4
tretja ponovitev	t [min]	0,5	2,5	7,5	15	20	22	24	27	30	35	42	50
	motnost [%]	1,4	2,1	4,0	6,5	9,0	10,0	11,8	13,9	15,1	14,6	13,7	12,2
raztopina D₂₀₀/PVP2													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1	2	3	5	10	15	20	30	35	40	50
	motnost [%]	2,5	2,7	3,5	4,2	5,5	8,2	10,7	13,8	18,4	19,2	18,9	18,3
druga ponovitev	t [min]	0,5	1,5	4	9	16	23	26,5	30	35	40		
	motnost [%]	2,4	3,6	5,3	7,1	8,6	10,1	10,9	11,4	13,2	13,3		
tretja ponovitev	t [min]	0,5	2	5	10	20	25	31	38,5	48			
	motnost [%]	2,7	4,1	6,0	7,7	9,0	10,0	10,6	11,6	11,9			
četrti ponovitev	t [min]	0,5	2	4	8	15	20	23,3	26,7	30	35	45	50
	motnost [%]	2,5	3,8	5,2	6,7	8,3	10,3	12,7	15,8	19,3	21,1	20,9	20,5
raztopina D₂₀₀/PVP3													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1,5	3	4	4,5	5	6	7	9	12		
	motnost [%]	1,0	0,8	2,4	7,7	12,5	18,3	29,6	32,9	33,6	33,6		
druga ponovitev	t [min]	0,5	1,5	1,75	2	3	5	9	13	20			
	motnost [%]	0,0	3,4	8,9	11,1	11,4	11,9	14,0	17,5	19,1			
tretja ponovitev	t [min]	0,5	1,5	2	2,5	3,5	5	10	15	20	30	40	60
	motnost [%]	0,0	12,6	14,6	15,0	15,3	15,8	18,6	21,9	22,5	22,1	21,8	21,4
raztopina D₂₀₀/HPC1													
prva ponovitev	t [min]	1	2	3	4	5	7	9	15				
	motnost [%]	1,5	1,7	1,9	3,0	8,1	35,6	45,6	44,1				
druga ponovitev	t [min]	1	2	3	4	6	7,5	9	15				
	motnost [%]	1,8	1,9	2,0	2,3	9,0	22,5	29,7	29,9				
raztopina D₂₀₀/HPC2													
prva ponovitev	t [min]	1	3	4	5	7	8	11	15				
	motnost [%]	2,0	2,2	3,6	8,5	22,9	28,2	27,3	25,5				
druga ponovitev	t [min]	0,5	1	2	4	5	6,5	9	15				
	motnost [%]	1,8	1,7	1,8	3,6	7,3	15,6	23,6	22,3				
raztopina D₂₀₀/HPC*													
prva ponovitev	t [min]	0,5	1,5	3	4	4,5	5	6	12				
	motnost [%]	1,0	0,8	2,4	7,7	12,5	18,2	29,6	33,6				
raztopina D₂₀₀/HPMC													
prva ponovitev	t [min]	0,5	3	8	15	25	39	43	55				
	motnost [%]	2,1	2,6	3,2	3,6	4,6	8,7	10,4	13,5				

5 RAZPRAVA

Cilj magistrske naloge je bil raziskati ustreznost potopne sonde z optičnimi vlakni za uporabo v testih sproščanja iz farmacevtskih oblik, ki temeljijo na doseganju prenasičenja. Sonda je v našem laboratoriju prišla v uporabo šele z začetkom raziskovalnega dela za to nalogo, zato nismo imeli izkušenj z merskimi napakami, ki jih prinaša neustrezno rokovanje.

5.1 Optimizacija uporabe sonde z ozirom na potencialne vire napak

Preglednica XXVII: Potencialni viri merskih napak pri uporabi sonde

vir merskih napak	rešitev
zračni mehurček v reži sonde	Sondo je potrebno stresati, da mehurček zapusti režo.
obarjanje diklofenaka na ogledalcu v reži sonde	Pri poskusih, kjer prihaja do obarjanja diklofenaka, je potrebno med meritvami s sondo nekaj sekund krožiti po čaši s FP.
razredčenje zaradi ostankov deionizirane vode v reži	Pred meritvijo je treba s sondo nekajkrat zaokrožiti po posodi, da z režo zajamemo reprezentativen vzorec.
prekoračitev območja linearnosti	Pred začetkom poskusa je treba na sondo namestiti konico z velikostjo reže, ki omogoča ustrezno dolžino poti svetlobe skozi medij za merjenje predvidenih koncentracij učinkovine v vzorcu.

Med izvajanjem poskusov s sondo smo se srečali z različnimi viri napak, ki vplivajo na meritve absorbance. Predstavljeni so v Preglednici XXVII, kjer so podane tudi njihove rešitve. Ko smo sredi izdelave umeritvenih premic poskusili izmeriti absorbanco slepe raztopine, ki smo jo na začetku uporabili za nastavitev ozadja, smo dobili vrednosti, višje od 0. Posumili smo, da je to posledica oborjenega diklofenaka, ki se nalaga na ogledalcu sonde in tako moti meritve. To je potrdilo dejstvo, da so težave izginile, ko smo sondo med meritvami začeli namakati v FP, v katerem je diklofenak dobro topen. Seveda smo jo pred vsako naslednjo meritvijo sprali še z deionizirano vodo. Ugotovili smo tudi, da moramo biti pozorni na mehurčke v reži sonde, ki prav tako vodijo v previsoke izmerjene vrednosti absorbance. Poleg tega smo že v uvodu omenili pomembnost izbire konice sonde z ozirom na pričakovane koncentracije preiskovane spojine. Če te prekoračijo območje linearne povezave med koncentracijo in izmerjeno absorbanco, je edina rešitev skrajšanje poti svetlobe skozi medij, kar dosežemo z zamenjavo konice. To smo sami občutili pri testiranju sproščanja iz tablet s paracetamolom. Pri izdelavi umeritvenih premic smo spoznali, da sega

območje linearnosti, znotraj katerega lahko z našo sondo določamo koncentracijo paracetamola, do približno 80 mg/L. Iz meritev v kivetih, kjer smo zaradi možnosti redčenja vseeno lahko določili realno koncentracijo paracetamola, je bilo očitno, da so koncentracije v testih sproščanja narasle celo nad 90 mg/L. Konice žal nismo mogli zamenjati, saj smo imeli samo eno.

5.2 Umeritvene premice

Pri pripravi umeritvenih premic smo upoštevali le meritve, kjer je bila A_{400} nižja od 0,01. Gre za absorbance pri kontrolni valovni dolžini, ki služi kot indikator prisotnosti delcev, saj naši učinkovini tam ne absorbirata. Pri večini premic so pogoju zadostile vse opravljene meritve, v primeru umeritvenih premic, izdelanih s sondo, za določanje Na-DF v 0,001 M HCl in v DMB (pH=4), kjer prihaja do obarjanja, pa smo imeli s tem več težav. Pogoja smo se vseeno držali in se s tem prepričali, da smo vključili le rezultate tistih redčitev, kjer se je pred meritvijo oborila še zanemarljiva količina diklofenaka. Meritve nam je uspelo dovolj hitro izvesti pri raztopinah s koncentracijo Na-DF do približno 50 mg/L. Iz sorodne premice za FP, v katerem je diklofenak dobro topen, je razvidno precej širše območje linearnosti. Kljub tveganju, da v izračune tako vnesemo določeno napako, smo se odločili tudi premici za DMB in 0,001 M HCl ekstrapolirati oziroma uporabljati tudi pri višjih vrednosti absorbance.

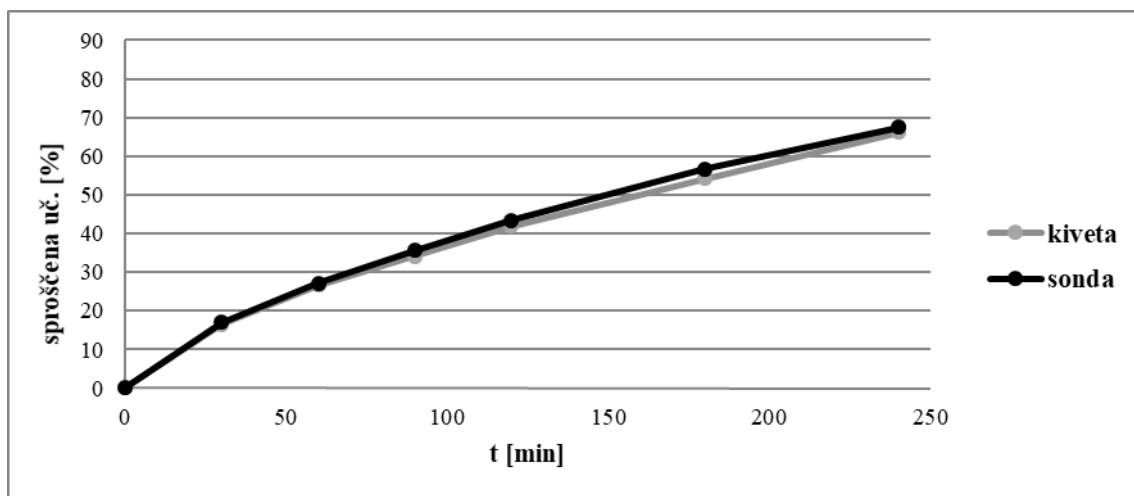
5.3 Testi sproščanja

5.3.1 Tablete s paracetamolom

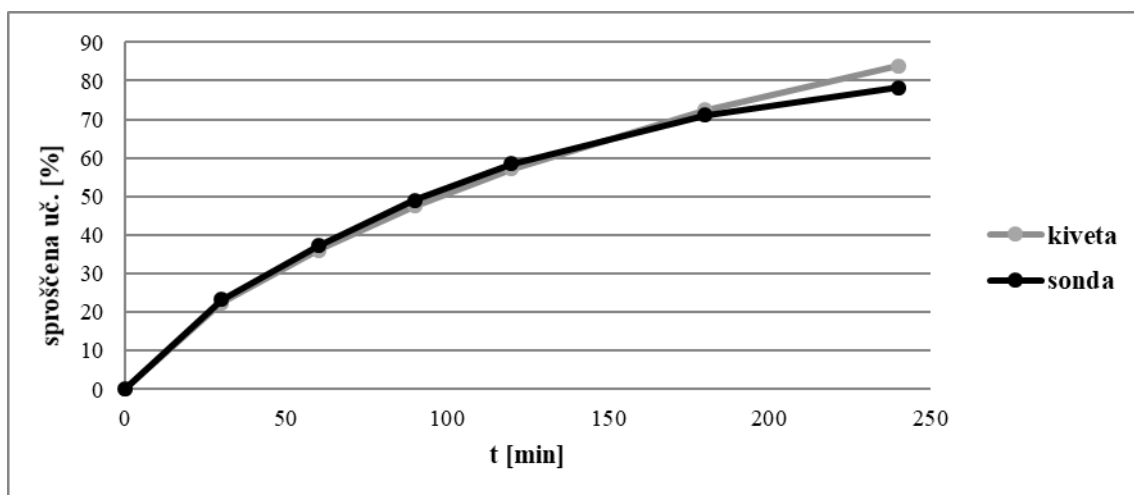
Pred izvedbo testov z Na-DF, kjer smo pričakovali prenasičenje in obarjanje, nas je zanimalo obnašanje sonde v relativno preprostih sistemih. Najprej smo zato testirali tablete s paracetamolom, ki je dobro topen v vodnih medijih ne glede na pH. Sliki 39 in 40 prikazujeta povprečne profile sproščanja pri pogojih P1/DMB (tablete z MCC) in P2/DMB (tablete z laktozo), pridobljene z obema načinoma merjenja absorbance. Profili enakih tablet v 0,001 M HCl niso bistveno različni.

Vidimo, da sta si profila na posamezni sliki zelo podobna, kar pomeni dobro korelacijo med rezultati, pridobljenimi z obema načinoma merjenja absorbance. Pri tabletah z MCC (Slika 39) se je s časom izrazilo manjše odstopanje med profiloma. Absolutna razlika je pri 180 min znašala 2,47 % in je verjetno posledica naraščajoče motnosti v posodi. Ker smo uporabili tablete s podaljšanim sproščanjem, je tudi količina MCC v mediju naraščala

postopoma. V zadnji časovni točki na Sliki 40 opazimo večjo razliko med profiloma, ki pa je lahko posledica prej omenjene prekoračitve območja linearnosti. Obe omenjeni odstopanji sta lahko tudi posledica eksperimentalnih napak.



Slika 39: Povprečna profila sproščanja pri pogojih **P1/DMB** (po 3 paralelke). Črna krivulja predstavlja rezultate, pridobljene z meritvami v kiveti, siva pa rezultate meritev s sondo.



Slika 40: Povprečna profila sproščanja pri pogojih **P2/DMB** (po 3 paralelke). Črna krivulja predstavlja rezultate, pridobljene z meritvami v kiveti, siva pa rezultate meritev s sondo.

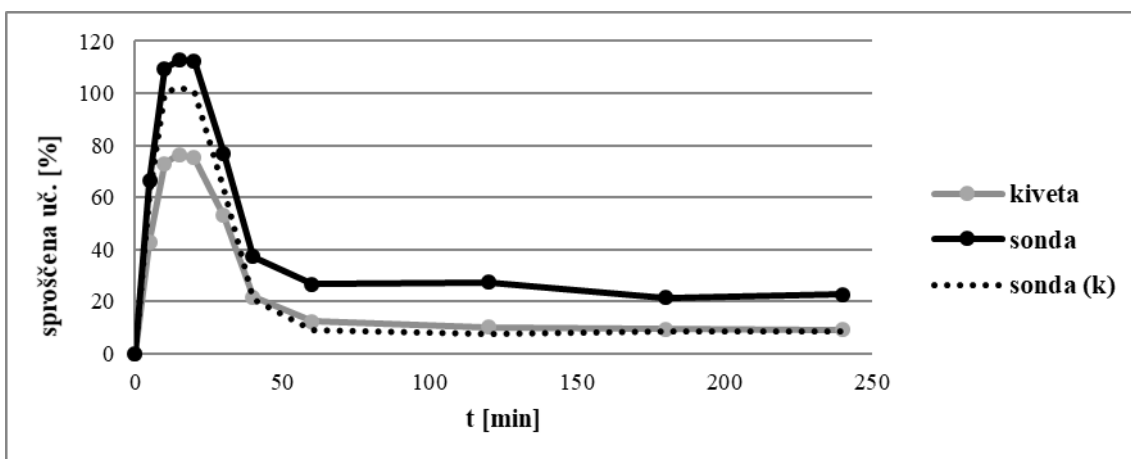
5.3.2 Tablete z Na-DF in PVP

V farmacevtske oblike, ki temeljijo na doseganju prenasičenja, je smiselno vgrajevati slabo topne učinkovine. Kot modelno učinkovino smo izbrali diklofenak, ki je slabo topen v kislih medijih, saj je prvi postanek peroralno zaužitih zdravil ravno v kislem okolju želodca. To smo želeli posnemati tako, da smo sproščanje izvajali v medijih z nizkim pH.

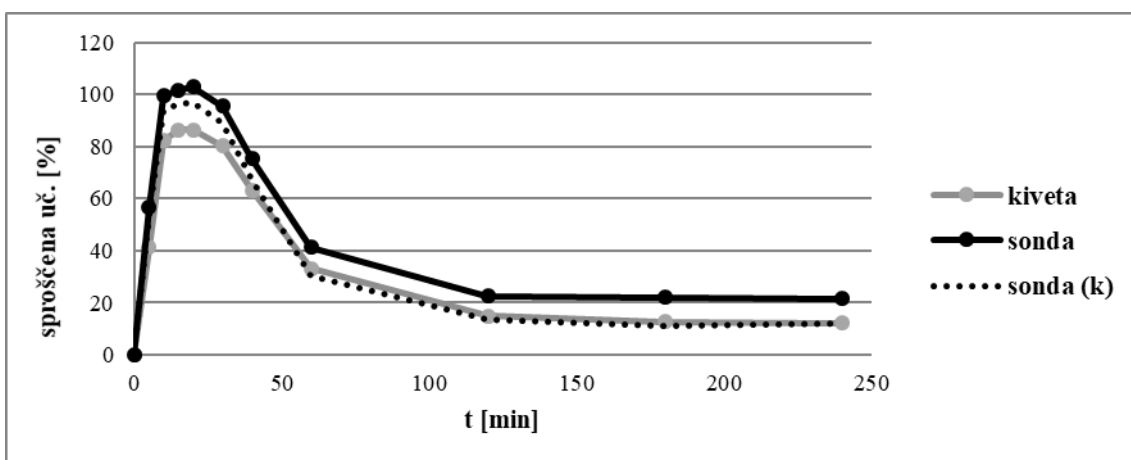
Tablete z Na-DF in PVP so, zaradi hidrofilnosti PVP, po stiku z medijem razpadle v roku 20–25 min. Hkrati je potekalo raztapljanje učinkovine (v obliki Na-DF). Hiter porast koncentracije učinkovine je močno presegel njeno topnost v medijih z nizkim pH, zato se je začela obarjati. Posledično smo pri vseh poskusih sproščanja z Na-DF dobili neobičajne

oblike profilov. Iz izkušenj s profili sproščanja smo namreč navajeni naraščanja deleža sproščene učinkovine, kot v poskusih s paracetamolom (Sliki 39 in 40), v našem primeru pa začetnemu porastu sledita padec koncentracije učinkovine zaradi obarjanja in njeno približevanje ravnotežni topnosti. Na Slikah 41–44 so prikazani povprečni profili sproščanja pri posameznih pogojih (D1 – tablete z MCC, D2 – tablete z LM).

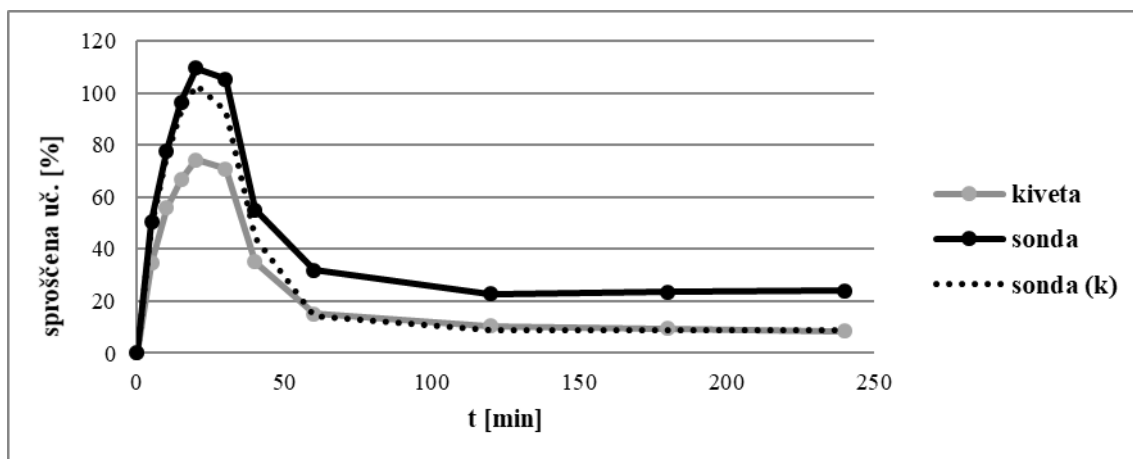
V nasprotju z analizo v kivetu, kjer so meritve ustrezale našemu pogoju glede višine izmerjene absorbance pri kontrolni valovni dolžini ($A_{400} < 0,01$), si pri meritvah s sondo, ki potekajo neposredno v nefiltrirani vsebini posode, nismo mogli privoščiti take strogosti. Vrednosti A_{400} so bile občutno višje od 0,01. Na rezultate smo zato poskusili aplicirati korekcijo bazne linije: v vsaki časovni točki smo od absorbance, izmerjene v absorpcijskem maksimumu učinkovine, odšteli A_{400} . Tovrstna korekcija predpostavlja, da je sipanje svetlobe neodvisno od valovne dolžine, ustreznost česar je komentirana v nadaljevanju. Na slikah so prisotni, v obliki prekinjenih črt, tudi korigirani profili sonde.



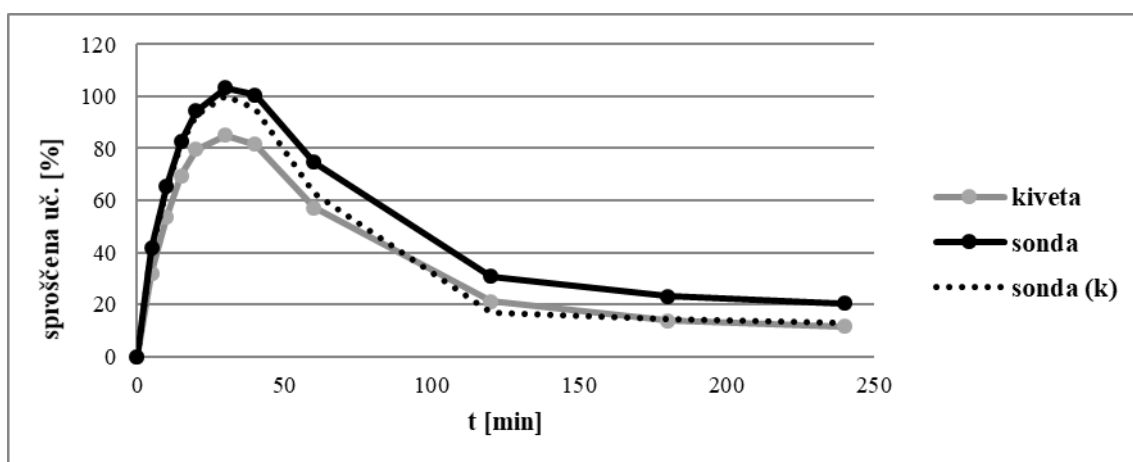
Slika 41: Povprečni profili sproščanja pri pogojih **D1/HCl** (po 6 paralelk). Siva krivulja predstavlja rezultate meritev v kivetu, polna črna pa rezultate sonde. Pikčasta krivulja je povprečje korigiranih profilov sonde.



Slika 42: Povprečni profili sproščanja pri pogojih **D1/DMB** (po 6 paralelk). Siva krivulja predstavlja rezultate meritev v kivetu, polna črna pa rezultate sonde. Pikčasta krivulja je povprečje korigiranih profilov sonde.



Slika 43: Povprečni profili sproščanja pri pogojih D2/HCl (po 6 paralelk). Siva krivulja predstavlja rezultate meritev v kivetu, polna črna pa rezultate sonde. Pikčasta krivulja je povprečje korigiranih profilov sonde.



Slika 44: Povprečni profili sproščanja pri pogojih D2/DMB (po 6 paralelk). Siva krivulja predstavlja rezultate meritev v kivetu, polna črna pa rezultate sonde. Pikčasta krivulja je povprečje korigiranih profilov sonde.

Vidimo, da je padec koncentracije učinkovine v DMB (pH=4) bolj položen kot v 0,001 M HCl (pH~3). Verjetno je to posledica nekoliko boljše topnosti diklofenaka zaradi višjega pH. Po drugi strani je bil padec v DMB manj ponovljiv, kar lahko vidimo iz vrednosti RSD v območju 40–120 minut (Preglednice XI–XIV). Te segajo za 0,001 M HCl do 18,75 %, za DMB pa celo do 34,67 %. Nas pa je bolj zanimala sama primerjava rezultatov med obema načinoma analize.

Razlike med rezultati, pridobljenimi z obema načinoma analize, ki opisujejo iste poskuse, so neprimerljivo večje kot pri sproščanju iz tablet s paracetamolom. Absolutna razlika med deležema sproščene učinkovine, izračunanima iz absorbanc, izmerjenih v kivetu in s sondo, v nekaterih časovnih točkah presega 35 %. Če se omejimo na območje linearnosti, je bila največja razlika v primeru paracetamola 2,47 %. Kljub temu, da so tablete D1 (z Na-DF) vsebovale nekoliko več MCC kot P1 (s paracetamolom), to ne more pojasniti tako velikih

odstopanj, sploh pa ne za tablete D2, ki MCC sploh ne vsebujejo. Razlog za tako velike razlike med rezultati, pripadajočimi različnima analitskima metodama, je treba zagotovo iskati drugje.

Meritve s sondo so lahko lažno povišane, k čemur prispeva motnost zaradi neraztopljenih delcev, medtem ko potencialnih vzrokov za lažno nižje vrednosti absorbance nismo zasledili. Klasični način vzorčenja je v našem primeru nagnjen k izgubam učinkovine, saj se njeno obarjanje lahko nadaljuje tudi med vzorčenjem, vse dokler vzorca ne stabiliziramo z dodatkom NaOH, ki dvigne pH in proces obarjanja ustavi. Posledica so lahko lažno nižji rezultati. Rezultati pa bi lahko bili tudi lažno povišani. Manjši delci oborjenega diklofenaka bi se lahko prebili skozi filter, katerega pore merijo kar 10 μm , in se po dodatku NaOH ponovno raztopili. Glede na velike razlike med pari profilov, pridobljenimi z obema metodama, bi lahko sklepali, da je pri klasičnem vzorčenju prevladalo lažno znižanje rezultatov. Če bi bili rezultati pri obeh načinih merjenja lažno povišani, razlike verjetno ne bi bile tako velike, v kar pa seveda ne moremo biti prepričani.

Omejena je tudi pomoč, ki nam jo pri interpretaciji rezultatov nudijo korigirani profili sonde. Ti se v prvi fazi sproščanja, ko koncentracija hitro narašča, dobro prilegajo nekorigiranim profilom sonde, saj so izmerjene vrednosti A_{400} nizke. Vpliv korekcije začne nato naraščati: korigirani profili se v fazi padca koncentracije učinkovine začnejo postopoma oddaljevati od nekorigiranih in se približujejo profilom, pridobljenim z meritvami v kivetih, s katerimi se v zadnjih časovnih točkah izenačijo.

Dejstvo, da nekorigirana in korigirana verzija profilov sonde v fazi naraščanja koncentracije učinkovine sovpadata, pomeni odsotnost sipanja svetlobe (A_{400} blizu 0). To bi nas lahko napeljalo k mišljenju, da je količina delcev takrat še zanemarljiva. Če bi to držalo, bi sovpadajoča profila hkrati predstavljala tudi resnični delež sproščene učinkovine. Glede na ugotovitve, do katerih so prišli Van Eerdenbrugh in sodelavci, pa to ni samoumevno. Odkrili so, da lahko nanodelci felodipina absorbirajo svetlobo na podoben način kot proste molekule. Njihovi teoretični izračuni so pokazali, da je od njihove velikosti odvisno, če hkrati povzročajo tudi sipanje svetlobe ali ne (Slika 4) [17]. Ne moremo ovreči možnosti, da bi se na podoben način obnašali tudi nanodelci diklofenaka.

Največ potencialnih virov napak lahko naštejemo v fazi padca koncentracije učinkovine. Razlika med nekorigiranimi in korigiranimi profili sonde je odraz sipanja svetlobe. To je

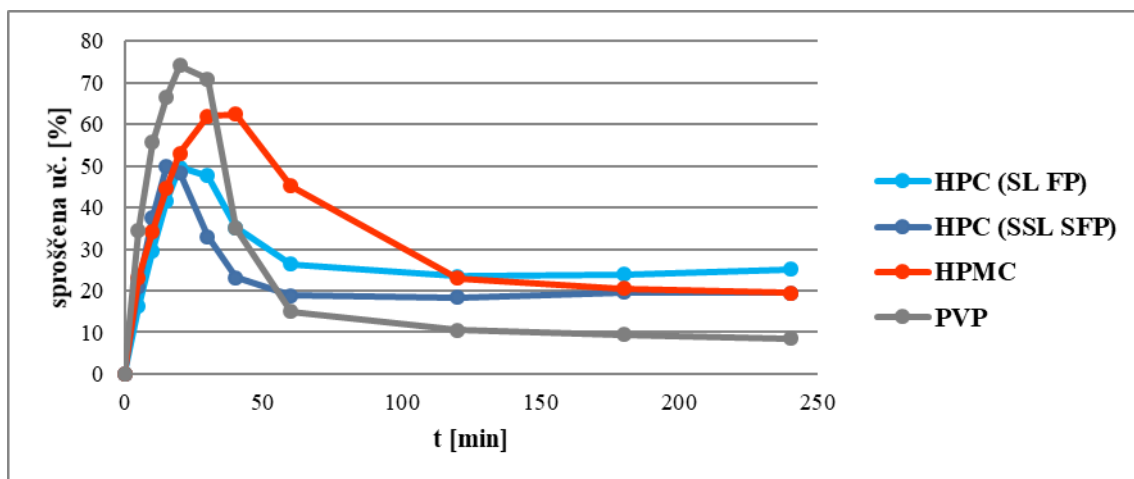
lahko odvisno ali neodvisno od valovne dolžine. Razlika med korigiranimi profili sonde in profili klasičnega določanja koncentracije je verjetno posledica izgub učinkovine med vzorčenjem (obarjanje v cevkah in epruvetah do izvedbe stabilizacije) in/ali absorpcije svetlobe s strani nanodelcev, ki lahko vplivajo na meritve s sondo.

Realno stanje v zadnji, položni fazi sproščanja najverjetneje dobro opišejo sovpadajoči rezultati analize v kiveti in korigirani rezultati *in situ* analize. Koncentracija diklofenaka je takrat že tako nizka, da je obarjanje med klasičnim vzorčenjem verjetno zanemarljivo. Tudi verjetnost absorpcije svetlobe s strani nanodelcev je v tej fazi nizka. Znak njihove zanemarljivosti je to, da korigirani profili sonde v položni fazi sploh sovpadajo z rezultati, pridobljenimi z analizo v kiveti. V primeru od valovne dolžine odvisnega sipanja, ki ga povzročajo ravno zelo majhni delci, bi bili korigirani profili sonde nad profili klasičnega vzorčenja.

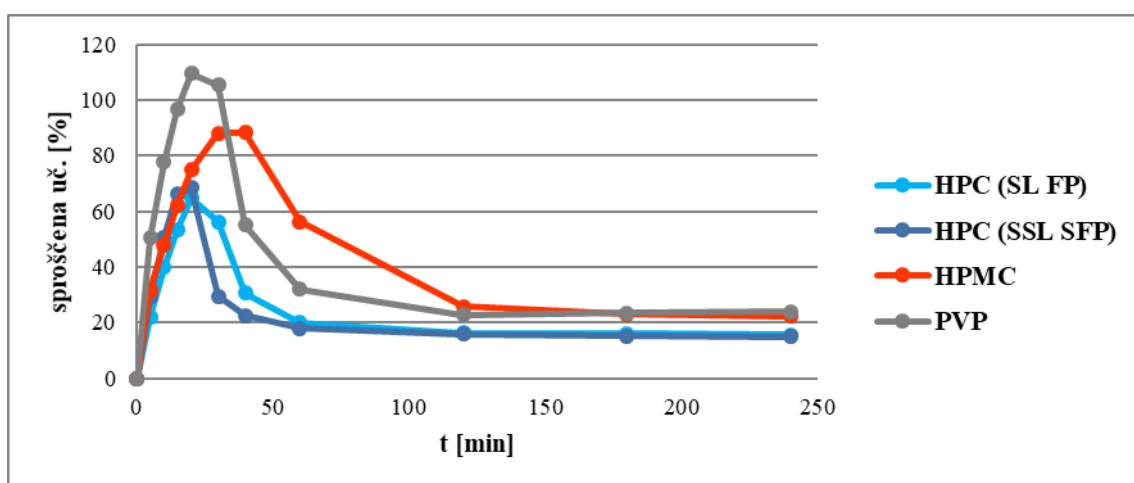
5.3.3 Tablete z Na-DF in drugimi polimeri

Ker nas je zanimalo, kako na profil sproščanja vpliva vrsta polimera v tabletah, smo stisnili tri serije tablet (D3, D4, D5), ki so po sestavi enake tabletam D2, le da namesto PVP vsebujejo bodisi HPC (SL FP), HPC (SSL SFP) ali HPMC (Affinisol HPMC HME 15LV). Kot medij smo izbrali 0,001 M HCl, saj so testi sproščanja iz tablet D1 in D2 ob njegovi uporabi dali bolj ponovljive rezultate kot ob uporabi DMB. Tudi tokrat je bilo iz oblike profilov moč sklepati, da ne gre za običajne farmacevtske oblike, saj je jasno viden proces obarjanja. Profili so prikazani na Slikah 45 in 46. Za primerjavo sta na slikah dodana tudi profila pri pogojih D2/HCl (tablete s PVP).

Polimer na obliko profila sproščanja vpliva na dva načina. Najprej določa hitrost vzpostavitve visoke koncentracije učinkovine. Tableta, ki vsebuje hitreje raztapljajoči se polimer, bo prej razpadla in Na-DF bo prej na voljo za raztapljanje. V naših poskusih se je za najhitreje raztapljajočega se izkazal PVP, medtem ko je koncentracija učinkovine v primeru tablet s HPMC najvišjo vrednost dosegla nekoliko kasneje. Ko se v raztopljenem stanju nahajata tako molekula učinkovine kot molekula polimera, lahko slednja deluje kot zaviralec obarjanja učinkovine in proces tako upočasni. Iz profilov je moč razbrati, da sta se pri ohranjanju prenasičenega stanja najslabše odrezala oba tipa HPC, saj se je delež sproščene učinkovine najhitreje znižal. Rezultati so bili bolj ugodni v primeru tablet s HPMC, kjer opazimo počasnejši upad koncentracije.

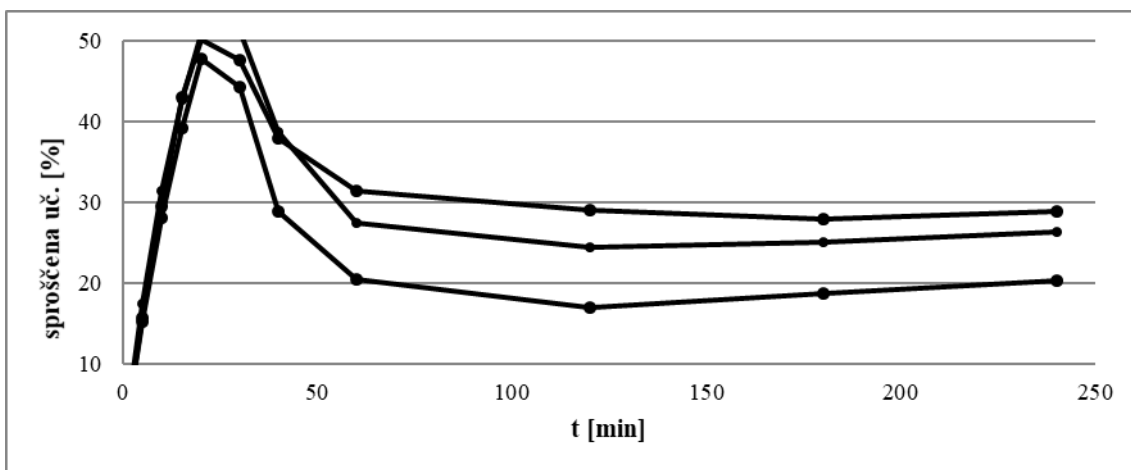


Slika 45: Povprečni profili sproščanja iz tablet D3 (HPC (SL FP)), D4 (HPC (SSL SFP)), D5 (HPMC) (po 3 paralelke) in D2 (PVP) (6 paralelk) v 0,001 M HCl (meritve v kivetu)



Slika 46: Povprečni profili sproščanja iz tablet D3 (HPC (SL FP)), D4 (HPC (SSL SFP)), D5 (HPMC) (po 3 paralelke) in D2 (PVP) (6 paralelk) v 0,001 M HCl (meritve s sondo)

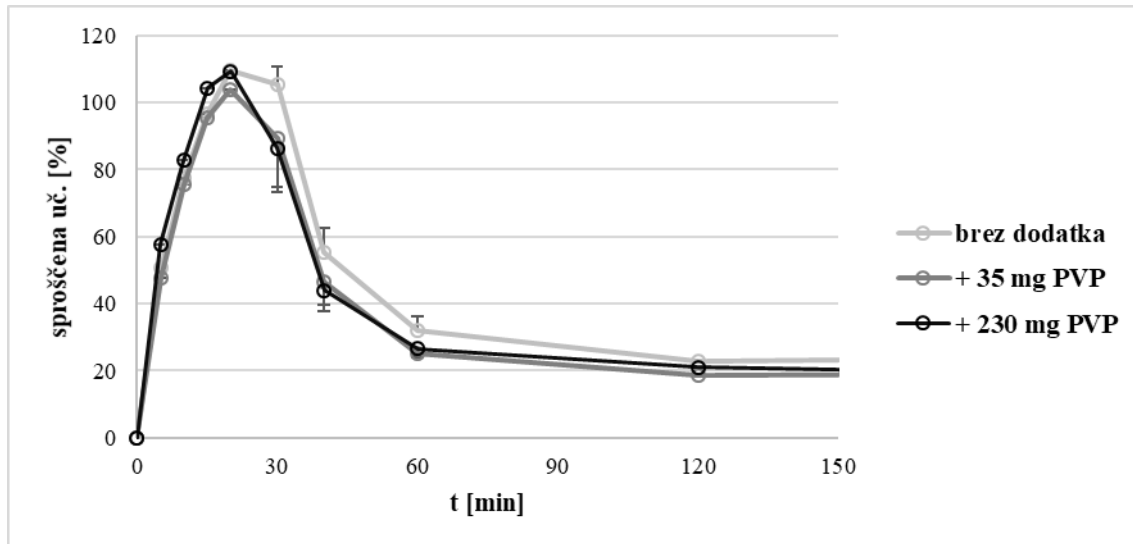
Presenetila nas je neponovljivost končnega dela profilov sproščanja iz tablet s HPC (meritve v kivetu). Vsak od treh profilov na Sliki 47 izvira iz ločenega poskusa sproščanja, ki smo jih izvajali ob različnih dnevih. Izmerjene vrednosti v zadnjih štirih časovnih točkah posameznega profila so si med seboj podobne, kar nakazuje, da je koncentracija v vseh ponovitvah dosegla ravnovesno topnost. Ker gre v našem primeru za tri paralelke, izvedene v enakem mediju s tabletami iz iste serije, bi se morali profili v končnem delu med seboj ujemati. Razlike so pri sproščanju iz tablet z drugim tipom HPC nekoliko manjše, pri tabletah s HPMC pa položni deli profilov medsebojno sovpadajo. Slednje velja tudi za poskuse s tabletami s PVP. Pri profilih, izračunanih iz meritev *in situ*, nismo opazili omembe vrednih odstopanj pri nobeni vrsti tablet. Ravno zato, ker nas je v okviru te naloge bolj kot klasični način določanja koncentracije zanimalo obnašanje sonde, se v večje podrobnosti nismo spuščali.



Slika 47: Rezultati posameznih paralelk sproščanja pri pogojih D3/HCl (meritve v kiveti)

5.3.4 Tablete z Na-DF in PVP v mediju z dodanim PVP

Hoteli smo preveriti tudi vpliv višjih koncentracij PVP na profile sproščanja. V mediju za sproščanje znotraj vsake posode smo, pred zagonom poskusa, raztopili bodisi 35 mg ali 230 mg PVP. Povprečna profila sproščanja v mediju z dodanim polimerom praktično sovpadata. Do padca koncentracije ni prišlo nič kasneje kot pri sproščanju v mediju brez dodanega PVP. Iz Slike 48 bi prej sklepali obratno, saj se povprečen profil sproščanja pri pogojih D2/HCl (medij brez dodatka PVP) nahaja nekoliko višje od ostalih dveh.



Slika 48: Povprečni profili sproščanja, izračunani iz meritev s sondo, pri pogojih D2/HCl (brez dodatka PVP) (6 paralelk), D2/PVP1 (dodatek 35 mg PVP) in D2/PVP2 (dodatek 230 mg PVP) (po 3 paralelke)

5.4 Vpliv motnosti na meritve s sondo

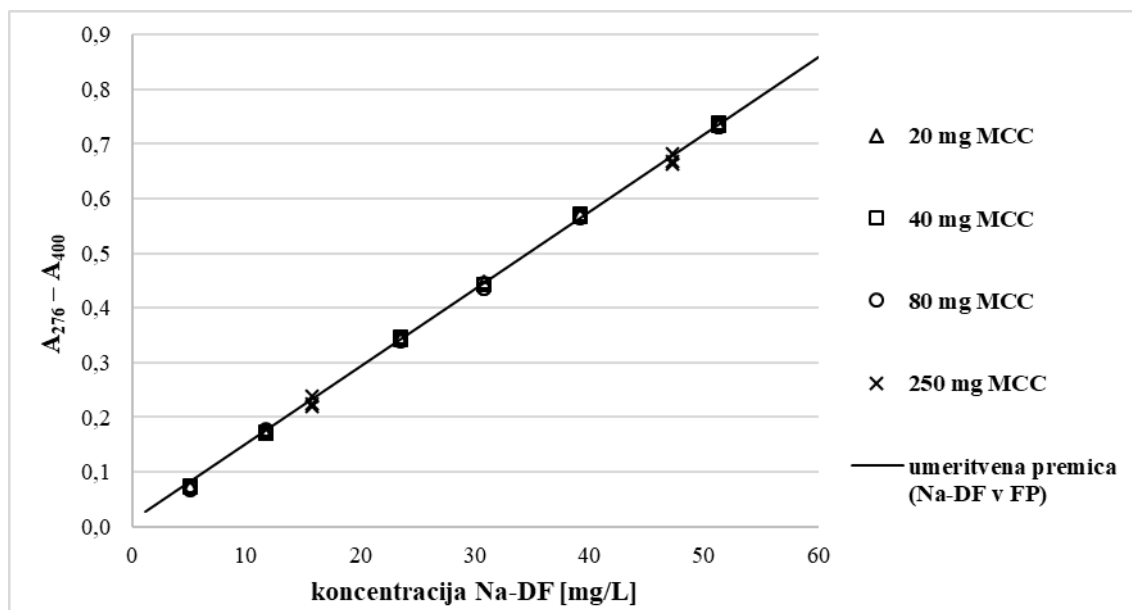
Pri poskusih sproščanja iz tablet z Na-DF je v posodah vedno prišlo do motnosti. Predvidevali smo, da je to posledica dveh vrst delcev: delcev MCC (v primeru tablet, v katerih nastopa kot PS) in delcev diklofenaka. Ker smo meritve s sondo izvajali neposredno

v nefiltrirani vsebini posod, nas je zanimal vpliv obeh vrst delcev na izmerjene vrednosti absorbance. Da bi preučili vpliv delcev MCC, smo s sondo izvajali meritve (tako pri posameznih valovnih dolžinah kot celotnih absorpcijskih spektrov) raztopin Na-DF z dodanim MCC, medtem ko smo vpliv delcev oborjenega diklofenaka preučevali s snemanjem absorpcijskih spektrov raztopin Na-DF v različnih časovnih točkah po nakisanju medija, ki je sprožilo obarjanje. Ker je vpliv delcev na meritve absorbance odvisen tudi od njihove velikosti [17], smo ta parameter ovrednotili z uporabo laserske difrakcije.

5.4.1 Vpliv delcev MCC na meritve s sondo

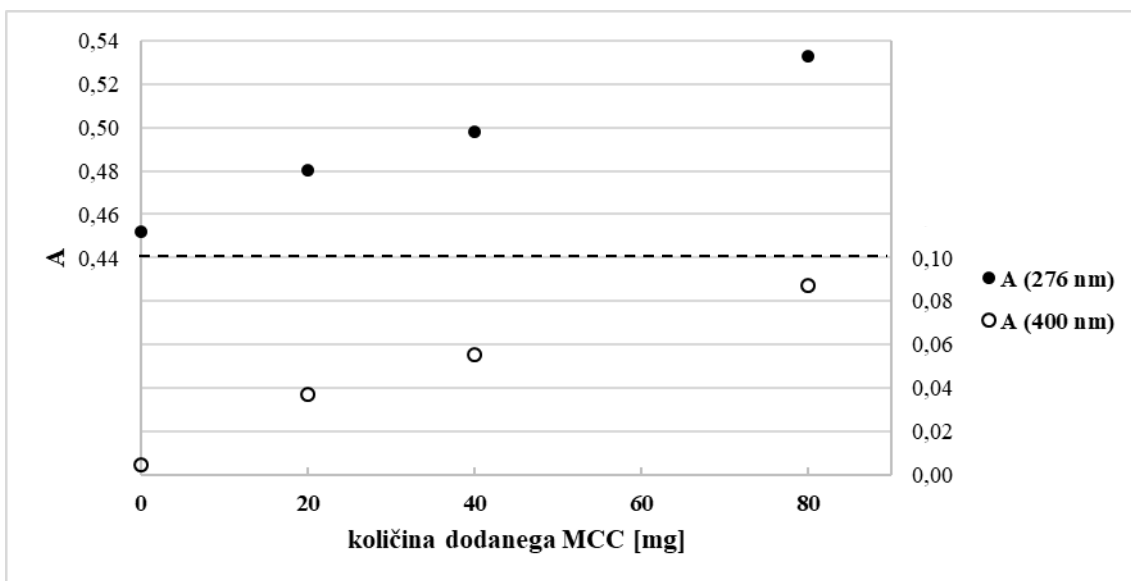
Ker smo hoteli zaznati le vpliv delcev MCC, smo poskuse s sondo izvajali v raztopinah Na-DF v FP, kjer ne pride do obarjanja diklofenaka. Vrednosti A_{276} , izmerjene v raztopinah z različnimi koncentracijami Na-DF z dodanim MCC, od katerih smo odšteli absorbanco pri kontrolni valovni dolžini (bodisi A_{400} ali A_{600}), smo nanesti na graf z umeritveno premico za Na-DF v FP. Prikazujemo le rezultate odštevanja A_{400} (Slika 49), saj so rezultati odštevanja A_{600} izredno podobni. V primeru manjše mase dodatkov MCC (prazni krogi) opazimo zelo dobro prileganje korigiranih meritev. Pri meritvah po dodatku večje količine MCC (250 mg) opazimo že nekoliko slabšo ponovljivost, vendar so odstopanja od premice relativno majhna. Količina MCC v naših testih sproščanja bi se, upoštevajoč razliko v volumnu medija, prevedla v dodatek približno 25 mg MCC.

Dobro ujemanje korigiranih meritev z umeritveno premico v enakem mediju brez dodanega MCC je znak, da MCC povzroča sipanje svetlobe, ki je od valovne dolžine neodvisno.

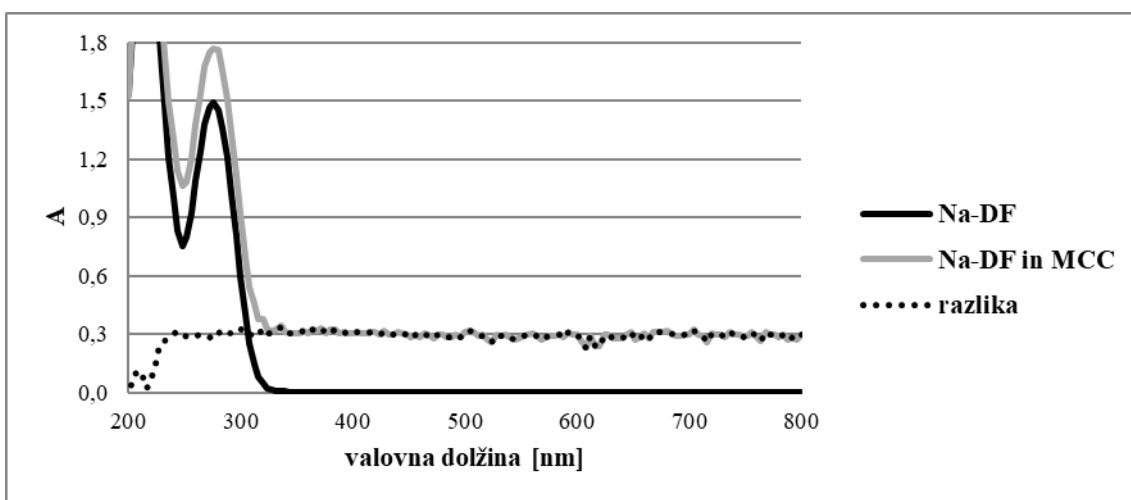


Slika 49: Prileganje korigiranih meritev absorbance raztopin Na-DF z različnimi količinami dodanega MCC na umeritveno premico za Na-DF v FP (prikazana kot črta)

Primer na Sliki 50 to prikazuje na bolj nazoren način. Ob vsakem dodatku MCC je bil dvig A_{400} enak dvigu v absorpcijskem maksimumu (276 nm). Enako so se obnašale tudi vrednosti A_{600} . Še bolj jasno to postane ob pogledu na Sliko 51, na kateri je poleg absorpcijskih spektrov raztopine Na-DF pred in po dodatku MCC, ki smo ju prikazali že v poglavju z rezultati, tudi razlika med obema spektroma. Vzporednost te razlike z absciso (pri valovnih dolžinah nad približno 250 nm) pomeni, da je sipanje svetlobe res enako širom celotnega območja, relevantnega pri spektrofotometričnem določanju koncentracije.



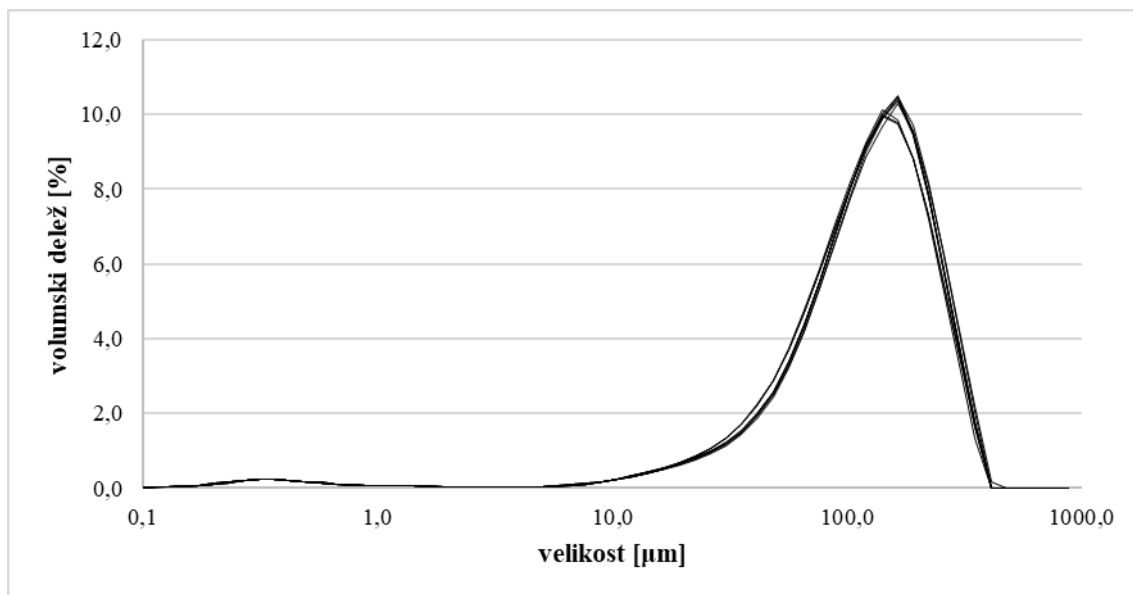
Slika 50: Absorbanca raztopine Na-DF s koncentracijo 30,78 mg/L pri valovnih dolžinah 276 nm (črne oznake) in 400 nm (bele oznake) v odvisnosti od količine dodanega MCC



Slika 51: Absorpcijski spekter raztopine Na-DF v FP s koncentracijo 104,90 mg/L (črna), absorpcijski spekter iste raztopine po dodatku približno 30 mg MCC (siva) in razlika med obema spektroma (pikčasta krivulja)

Rezultati določanja velikosti delcev MCC so podani na Sliki 52 v obliki volumskih deležev posameznih velikostnih frakcij. Pokazali so, da je delež delcev MCC, ki so manjši od 10 μm , zanemarljiv. To še dodatno podpira naše opažanje, da je vpliv delcev MCC na absorbanco

neodvisen od valovne dolžine, saj je to splošno značilno za delce mikrometrskih velikosti [17]. Iz vsega napisanega sledi, da samo prisotnost delcev MCC v naših testih sproščanja ne bi smela ovirati zamenjave uveljavljenih metod z *in situ* določanjem koncentracije. Napake, ki izhajajo iz prisotnosti MCC, lahko namreč odpravimo s korekcijo zaradi dviga bazne linije.

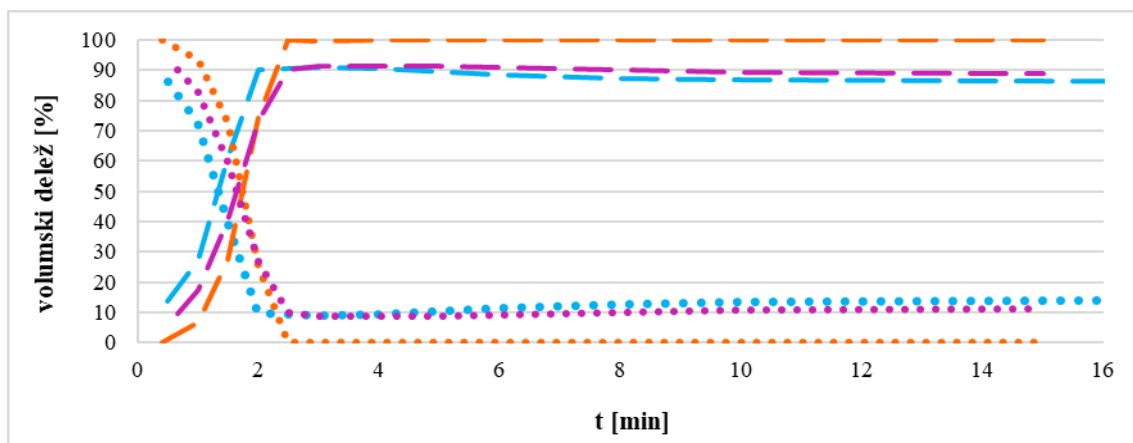


Slika 52: Rezultati vseh devetih meritev porazdelitve velikosti delcev MCC

5.4.2 Vpliv delcev oborjenega diklofenaka na meritve s sondo

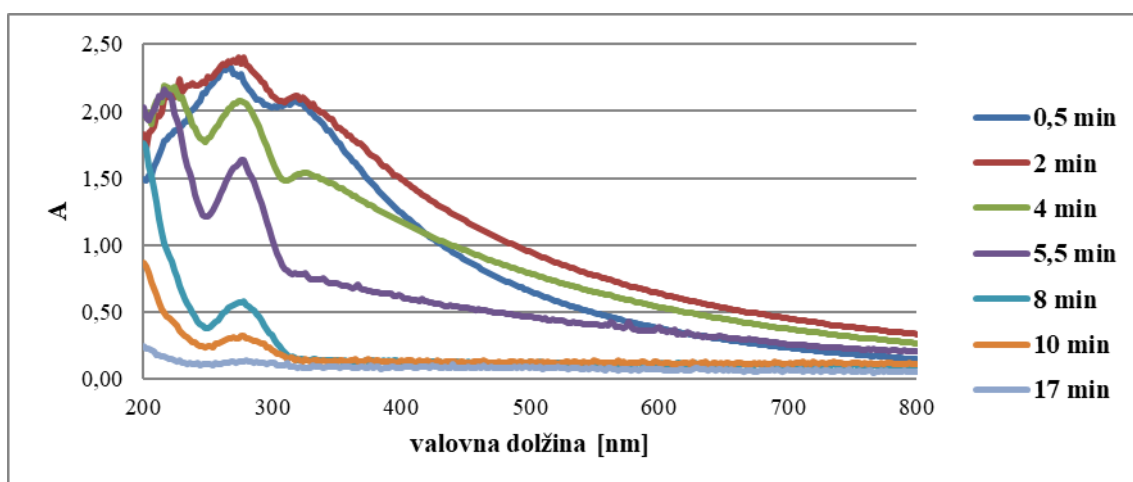
Izvajali smo dva tipa poskusov: poskuse snemanja absorpcijskih spektrov med obarjanjem diklofenaka in poskuse določanja velikosti delcev, ki pri tem nastajajo. V obeh primerih smo za izhodišče vzeli prenasičene raztopine Na-DF z enakimi sestavami. Večina je vsebovala tudi določeno koncentracijo izbranega polimera. Predvsem smo se osredotočili na vpliv PVP. Obarjanje smo sprožili z dodatkom HCl. Opazovali smo vrednosti A_{276} , ki so nam služile kot groba ocena količine raztopljenega Na-DF, intenzivnost sipanja svetlobe (vrednosti absorbance pri višjih valovnih dolžinah, kjer učinkovina ne absorbira) in porazdelitev velikosti delcev ter njeno spreminjanje s časom. Rezultati določanja velikosti delcev z lasersko difrakcijo so prikazani na slikah v nadaljevanju, kjer vsaka barva predstavlja eno paralelko. Pikčaste krivulje prikazujejo volumski delež manjših ($<1,7 \mu\text{m}$), črtkane krivulje pa večjih ($>1,7 \mu\text{m}$) delcev.

Ko smo nakisali raztopino Na-DF brez polimera (raztopina D₂₀₀), je proces obarjanja potekel hitro. To je bilo jasno že ob pogledu na vsebino čaše pri meritvah s sondo. Ob dodatku HCl je raztopina takoj postala zelo motna. Po nekaj minutah se je vsebina, zdaj že suspenzija, začela bistriti in bila kmalu bistra, le da je vsebovala kosme bele barve. Rezultati določanja

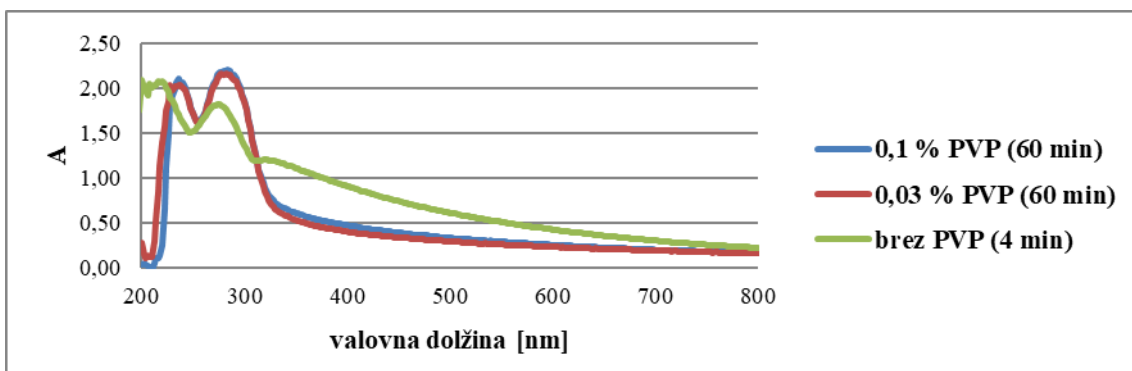


Slika 53: Spreminjanje porazdelitve velikosti delcev oborjenega diklofenaka po nakisanju raztopine D_{200} (brez PVP). Pikčaste krivulje predstavljajo delež manjših ($<1,7 \mu\text{m}$), črtkane pa večjih delcev ($>1,7 \mu\text{m}$).

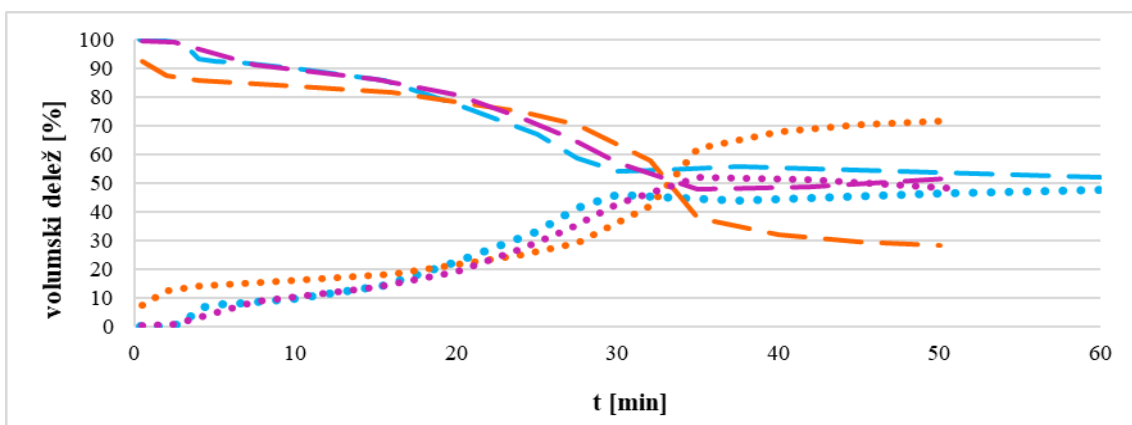
velikosti delcev po nakisanju enake raztopine (Slika 53) so pokazali, da na začetku nastajajo delci nanometrskih velikosti, v roku treh minut pa se porazdelitev velikosti močno ali popolnoma prevesi v prid večjih delcev, verjetno zaradi kombinacije nadaljnje kristalizacije in medsebojnega povezovanja delcev. Ta zaključek podpirajo tudi absorpcijski spektri, posneti po nakisanju raztopine D_{200} . Primer je prikazan na Sliki 54, kjer opazimo za manjše delce značilen neenakomeren dvig bazne linije, ki pa je precej kratkoživ. Še en indikator hitro zaključenega obarjanja je to, da je bila A_{276} v dveh od treh ponovitvah že po 10 minutah, v tretji ponovitvi pa po 17 minutah, komaj večja od absorbance pri višjih valovnih dolžinah, ki je posledica sipanja svetlobe. Absorpcijski spektri raztopine D_{60} , katere koncentracija je zelo podobna celokupni koncentraciji učinkovine v testih sproščanja, kažejo podobne trende, le da je sipanje veliko manj intenzivno. Razlike v časovnem poteku obarjanja med obema tipoma poskusov (snemanje spektrov, določanje velikosti delcev) je verjetno povzročila predvsem razlika v hitrosti mešanja.



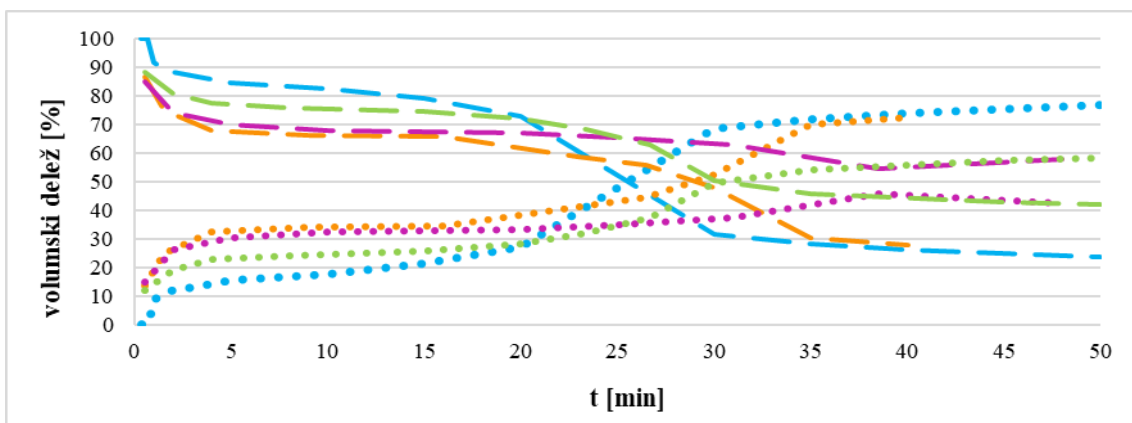
Slika 54: Absorpcijski spektri med prvo ponovitvijo poskusa obarjanja diklofenaka iz raztopine D_{200} (brez PVP)



Slika 55: Povprečni absorpcijski spektri raztopine $D_{200}/PVP1$ (3 paralelke) in $D_{200}/PVP2$ (4 paralelke) 60 minut po dodatku HCl in raztopine D_{200} (3 paralelke) 4 minute po dodatku HCl



Slika 56: Spreminjanje porazdelitve velikosti delcev oborjenega diklofenaka po nakisanju raztopine $D_{200}/PVP1$ (0,1 % PVP). Pikčaste krivulje predstavljajo delež manjših (<1,7 μm), črtkane pa večjih delcev (>1,7 μm).

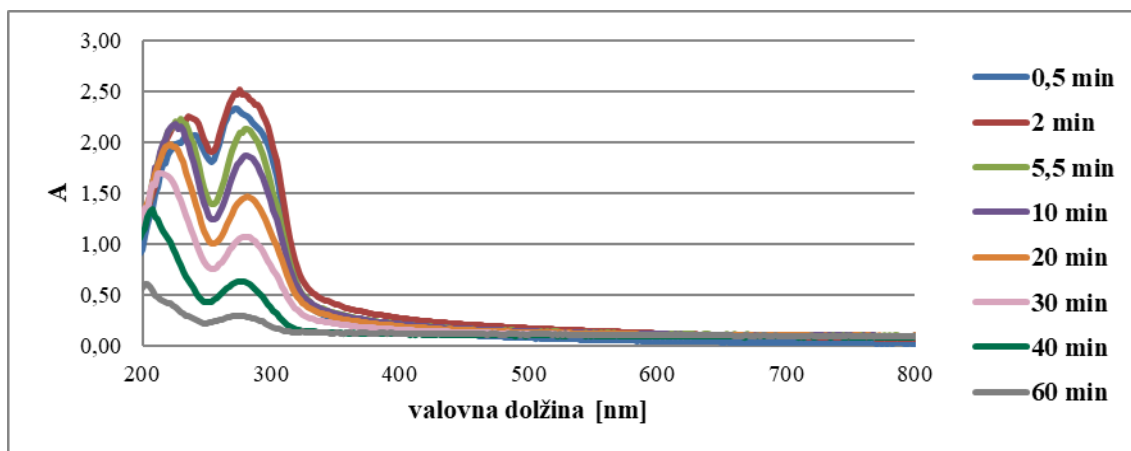


Slika 57: Spreminjanje porazdelitve velikosti delcev oborjenega diklofenaka po nakisanju raztopine $D_{200}/PVP2$ (0,03 % PVP). Pikčaste krivulje predstavljajo delež manjših (<1,7 μm), črtkane pa večjih delcev (>1,7 μm).

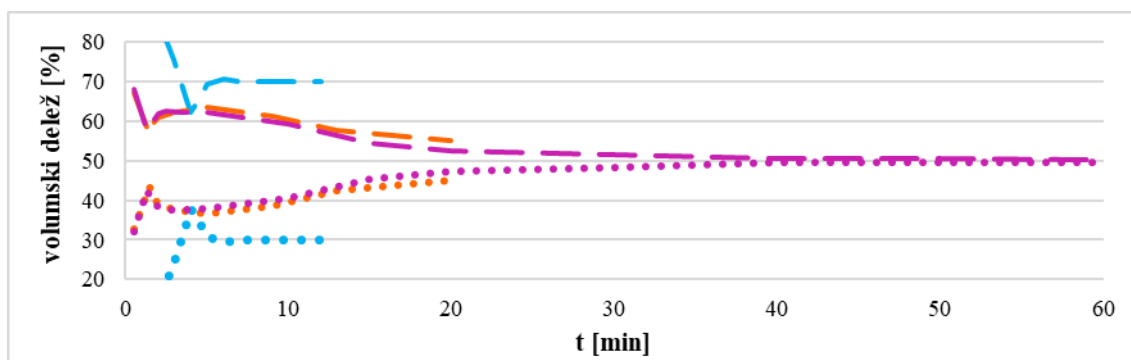
Rezultati poskusov z raztopinama $D_{200}/PVP1$ (0,1 % PVP) in $D_{200}/PVP2$ (0,03 % PVP) so si bili, približno trikratni razliki v koncentraciji polimera navkljub, podobni. Na Sliki 55 podajamo povprečna absorpcijska spektra obeh raztopin po 60 minutah od dodatka HCl. Ker raztopine D_{200} (brez PVP) nismo spremljali tako dolgo, podajamo za primerjavo povprečni absorpcijski spekter raztopine D_{200} po 4 minutah od dodatka HCl. Vidimo lahko, da je A_{276} v raztopini brez PVP že po 4 minutah občutno nižja kot v dveh raztopinah z dodanim PVP

po eni uri. PVP je očitno uspešno opravil nalogo zaviralca obarjanja, saj se je prenasičeno stanje obdržalo veliko dlje kot v odsotnosti polimera. V eni od ponovitev poskusa z raztopino D₂₀₀/PVP1 je bila A₂₇₆ še po 90 minutah skoraj enaka kot na začetku. Nanodelci diklofenaka so vseeno nastajali, vendar ne naenkrat ob nakisanju, temveč postopoma (Sliki 56 in 57). Poleg tega jim je PVP verjetno onemogočal nadaljnjo rast oziroma združevanje, saj je njihov volumski delež naraščal. Posledično je s časom naraščala, ne padala, tudi intenzivnost sipanja svetlobe, kar opazimo iz delov absorpcijskih spektrov, posnetih pri valovnih dolžinah nad približno 350 nm (Slike 12–18).

V primeru raztopine D₂₀₀/PVP3 je bila koncentracija polimera (0,003 %) očitno že dovolj nizka, da je bil učinek PVP manjši kot v dveh raztopinah z višjo koncentracijo polimera. Padec A₂₇₆ se je zgodil prej (primer na Sliki 58), a vseeno kasneje kot v raztopini D₂₀₀, ki ni vsebovala PVP (primer na Sliki 54). Absorbanca pri valovnih dolžinah, višjih od približno 350 nm, je bila neprimerljivo manjša kot v raztopini brez PVP. Tudi pri določanju velikosti delcev je sistem, v primerjavi z raztopinami z višjo koncentracijo PVP, hitreje dosegel ustaljeno stanje (Slika 59).



Slika 58: Absorpcijski spektri med drugo ponovitvijo poskusa obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/PVP3 (0,003 % PVP)



Slika 59: Spreminjanje porazdelitve velikosti delcev oborjenega diklofenaka po nakisanju raztopine D₂₀₀/PVP3 (0,003 % PVP). Pikčaste krivulje predstavljajo delež manjših (<1,7 μm), črtkane pa večjih delcev (>1,7 μm).

Koncentracija PVP je bila ravno v raztopini D₂₀₀/PVP3 najbolj podobna koncentraciji med testi sproščanja (0,004 %). Zato nas še toliko bolj preseneča dejstvo, da dodatek PVP v medij ni pripomogel k podaljšanju prenasičenja v testih sproščanja (Slika 48), medtem ko se je prenasičenje v raztopinah z višjima koncentracijama PVP v poskusih, kjer smo obarjanje sprožili z dodatkom HCl, ohranilo bistveno dlje kot v raztopinah z nižjo koncentracijo PVP. Seveda pa je treba upoštevati, da so se pogoji med poskusi precej razlikovali.

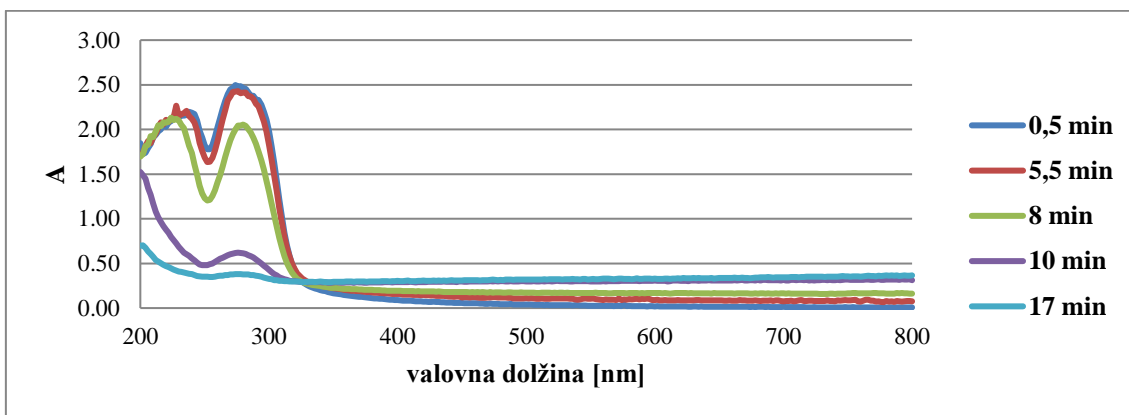
Nekaj poskusov merjenja absorpcijskih spektrov med obarjanjem diklofenaka po dodatku HCl smo naredili tudi s polimeri, iz katerih smo stisnili tablete D3, D4 in D5: HPC (SL FP), HPC (SSL SFP) ali HPMC (Affinisol HPMC HME 15LV). Učinkovina je bila, za razliko od testov sproščanja, v raztopljeni obliki že ob začetku poskusa, tako da hitrost vzpostavitve prenasičenosti ni igrala vloge. Polimere smo zato lahko ovrednotili glede na sposobnost zaviranja obarjanja diklofenaka.

Preglednica XXVIII: Grobe ocene časov po nakisanju raztopin, uporabljenih v poskusih snemanja absorpcijskih spektrov in v poskusih določanja velikosti delcev, ko se obarjanje zaključi in sistem preide v stabilno stanje

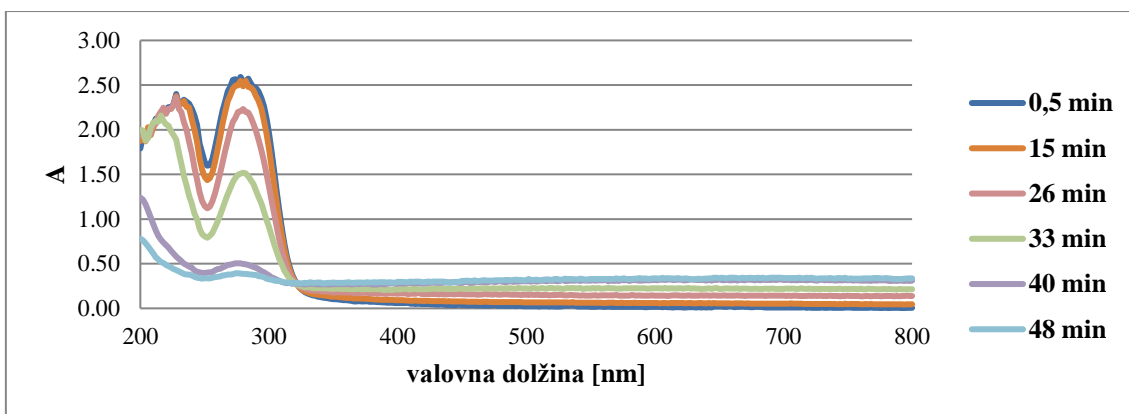
oznaka izhodne raztopine	vrsta polimera	konc. polimera [mg/L]	čas do stabilizacije (snemanje absorpcijskih spektrov)	čas do stabilizacije (določanje velikosti delcev)
D ₆₀			> 10 min	
D ₂₀₀			> 10 min	3 min
D ₂₀₀ /PVP1	PVP	1000	> 60 min	> 30 min
D ₂₀₀ /PVP2		300	> 60 min	> 30 min
D ₂₀₀ /PVP3		30	> 30 min	10 min
D ₂₀₀ /HPC1	HPC (SL FP)	1000	> 8 min	Poskusa smo prekinili pred stabilizacijo.
D ₂₀₀ /HPC2		300	> 2 min	10 min
D ₂₀₀ /HPC*	HPC (SSL SFP)	1000	> 5 min	6 min
D ₂₀₀ /HPMC	HPMC (Affinisol)	1000	> 25 min	Poskus smo prekinili pred stabilizacijo.

Preglednica XXVIII vsebuje grobe ocene časov po nakisanju raztopin, uporabljenih v obeh vrstah poskusov, ko se obarjanje zaključi in sistem preide v stabilno stanje. Če izvzamemo dejstvo, da smo poskus določanja velikosti delcev med obarjanjem diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPMC (Slika 38) prekinili pred stabilizacijo sistema, kažejo rezultati obeh tipov poskusov podobna razmerja sposobnosti preiskovanih polimerov za stabilizacijo prenasičenega stanja. HPC ga ni uspela ohraniti bistveno dlje (primer na Sliki 60), kot se je

ohranilo v odsotnosti polimera (primer na Sliki 54). Bolje se je izkazala HPMC: raztopina D₂₀₀/HPMC je bila, glede časa ohranitve prenasičenega stanja (primer na Sliki 61), primerljiva z raztopino D₂₀₀/PVP3. Seveda ne smemo pozabiti, da je koncentracija polimera v raztopini D₂₀₀/PVP3 30-krat nižja kot v raztopini D₂₀₀/HPMC. Zaradi tega, in ker so bili časi ohranitve prenasičenega stanja v primeru višjih koncentracij PVP še daljši, verjamemo, da je PVP bolj primeren zaviralec kristalizacije diklofenaka.



Slika 60: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPC1 (druga ponovitev)



Slika 61: Absorpcijski spektri med procesom obarjanja diklofenaka iz raztopine D₂₀₀/HPMC (prva ponovitev)

6 SKLEP

Naš cilj je bil raziskati, če bi koncentracijo Na-DF v testih sproščanja iz farmacevtskih oblik, ki temeljijo na doseganju prenasičenja, namesto z uveljavljeno metodologijo lahko določali s potopno sondo z optičnimi vlakni. Tekom raziskovalnega dela smo pridobili praktične izkušnje z njeno uporabo. Ugotovili smo, da se med poskusi na sondi nabira plast oborjenega diklofenaka, ki vpliva na meritve, in da se temu izognemo tako, da sondo med meritvami namakamo v FP. Poleg tega se je treba pred vsako meritvijo prepričati, da v reži sonde ni nobenega mehurčka. Zelo pomembno je tudi, da izberemo konico z ustrezno velikostjo reže, saj tako določimo območje linearnosti sonde.

Rezultati, ki smo jih s sondo dobili v preliminarnih poskusih (tablete s paracetamolom), so bili zelo obetavni. Skladanje z rezultati klasične metode je bilo praktično popolno, z izjemo minimalnega sipanja zaradi prisotnosti delcev MCC, katerih vpliv bi brez težav odpravili s korekcijo z odštevanjem absorbance pri višji valovni dolžini. Dokazali smo namreč, da MCC pri valovnih dolžinah, višjih od približno 250 nm, povzroča od valovne dolžine neodvisno sipanje svetlobe.

Rezultati sproščanja Na-DF iz FOp so pokazali bistveno večje razlike med profili, pridobljenimi z obema načinoma določanja koncentracije. Pri interpretaciji rezultatov smo si pomagali tudi s korigiranimi profili sproščanja (odštevanje A_{400}). V fazi naraščanja koncentracije učinkovine so korigirani in nekorigirani profili sonde sovpadali, medtem ko so profili, izračunani iz meritev v kivetu, kazali nižje deleže sproščene učinkovine. Razlike so verjetno posledica izgub učinkovine zaradi obarjanja med klasičnim vzorčenjem, možna pa je tudi absorpcija svetlobe s strani nanodelcev diklofenaka. V fazi padca koncentracije učinkovine so se začeli korigirani profili sonde oddaljevati od nekorigiranih, kar je odraz sipanja svetlobe zaradi prisotnosti delcev, predvsem oborjenega diklofenaka. Prav tako sta še vedno prisotna vzroka iz prve faze (izgube med vzorčenjem, absorbiranje svetlobe s strani nanodelcev). Realno stanje v zadnji, položni fazi sproščanja najverjetneje dobro opišejo sovpadajoči profili, izračunani iz meritev v kivetu, in korigirani profili sonde. Koncentracija učinkovine je takrat že tako nizka, da je obarjanje med klasičnim vzorčenjem verjetno zanemarljivo.

S poskusi z lasersko difrakcijo smo uspeli dokazati, da pri obarjanju diklofenaka iz prenasičene raztopine nastajajo nanodelci. Zanje je značilen bolj kompleksen vpliv na

meritve absorbance, kar je verjetno glavni razlog, da preprosta korekcija z odštevanjem A_{400} ni omogočila pridobitve točnih profilov sproščanja Na-DF iz naših tablet. Tekom nadaljnega vrednotenja ustreznosti sonde bi morali posneti spektre suspenzij nanodelcev diklofenaka, v katerih koncentracija raztopljenih frakcij ne bi presegala ravnotežne topnosti. Take delce bi lahko pripravili z mletjem.

S poskusi snemanja absorpcijskih spektrov in določanja velikosti delcev smo dokazali, da lahko prisotnost polimera drastično stabilizira stanje prenasičenja. To je seveda močno odvisno od vrste polimera. V obeh tipih poskusov je stanje prenasičenja daleč najdlje uspel ohraniti PVP. Žal ugotovitve nismo uspeli prenesti na področje testiranja sproščanja. Izvedli smo nekaj dodatnih testov sproščanja, kjer smo v medij dodali PVP, vendar so bili rezultati primerljivi s sproščanjem v mediju brez dodanega PVP. Odnos med koncentracijo PVP in njegovim učinkom bi bilo zato potrebno dodatno preučiti.

Tudi HPMC (Affinisol HPMC HME 15LV) je v naših poskusih izkazala sposobnost stabilizacije prenasičene koncentracije Na-DF. Pri sproščanju Na-DF iz tablet s HPMC je koncentracija učinkovine začela upadati kasneje kot v poskusih s sorodnimi tabletami s PVP. V poskusih snemanja absorpcijskih spektrov pa je bila, za učinek, primerljiv s PVP, potrebna veliko višja koncentracija HPMC. V poskusih s HPC nismo opazili omembe vredne stabilizacije.

7 LITERATURA

1. Augustijns P, Brewster ME: Supersaturating drug delivery systems: Fast is not necessarily good enough. *J Pharm Sci* 2012; 101: 7–9.
2. Bevernage J, Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P: Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. *Int J Pharm* 2013; 453: 25–35.
3. Sun DD, Ping IL: Evolution of supersaturation of amorphous pharmaceuticals: The effect of rate of supersaturation generation. *Mol Pharm* 2013; 10: 4330–46.
4. Xu S, Dai WG: Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *Int J Pharm* 2013; 453: 36–43.
5. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP: Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998; 15: 11–22.
6. The United States Pharmacopeia: USP 39. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2016.
7. Johansson J, Cauchi M, Sundgren M: Multiple fiber-optic dual-beam UV/Vis system with application to dissolution testing. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 29: 469–76.
8. Lu X, Lozano R, Shah P: *In-situ* dissolution testing using different UV fiber optic probes and instruments. *Dissolut Technol* 2003; 10: 6–15.
9. Bynum K, Roinestad K, Kassis A, Pocreva J, Gehriein L, Cheng F, Palermo P: Analytical performance of a fiber optic probe dissolution system. *Dissolut Technol* 2001; 8: 13–22.
10. Liu L, Fitzgerald G, Embry M, Cantu R, Pack B: Technical evaluation of a fiber-optic probe dissolution system. *Dissolut Technol* 2008; 15: 10–20.
11. Josefson M, Johansson E, Torstensson A: Optical fiber spectrometry in turbid solutions by multivariate calibration applied to tablet dissolution testing. *Anal Chem* 1988; 60: 2666–71.
12. Guillot A, Limberger M, Krämer J, Lehr CM: *In situ* drug release monitoring with a fiber-optic system: Overcoming matrix interferences using derivative spectrophotometry. *Dissolut Technol* 2013; 20: 15–19.
13. Mirza T, Liu QJ, Vivilecchia R, Joshi Y: Comprehensive validation scheme for *in situ* fiber optics dissolution method for pharmaceutical drug product testing. *J Pharm Sci* 2009; 98: 1086–94.

14. Wunderlich M, Way T, Dressman JB: Practical considerations when using fiber optics for dissolution testing. *Dissolut Technol* 2003; 10: 17–19.
15. Zhang Y, Bredael G, Armenante PM: Dissolution of prednisolone tablets in the presence of an arch-shaped fiber optic probe in a dissolution testing apparatus 2. *J Pharm Sci* 2013; 102: 2718–29.
16. Aldridge PK, Melvin DW, Williams BA, Bratin K, Kostek LJ, Sekulic SS: A robotic dissolution system with on-line fiber-optic UV analysis. *J Pharm Sci* 1995; 84: 909–14.
17. Van Eerdenbrugh B, Alonzo DE, Taylor LS: Influence of particle size on the ultraviolet spectrum of particulate-containing solutions: Implications for *in-situ* concentration monitoring using UV/Vis fiber-optic probes. *Pharm Res* 2011; 28: 1643–52.
18. Lapuh M: Vpliv izbranih pogojev na prenasičenje in sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s takojšnjim sproščanjem: Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016.