

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KASTELIC

**VPLIV IZBRANIH POGOJEV NA OBARJANJE  
DIPYRIDAMOLA IZ PRENASIČENE RAZTOPINE**

**THE INFLUENCE OF SELECTED CONDITIONS ON  
DIPYRIDAMOLE PRECIPITATION FROM  
SUPERSATURATED SOLUTION**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratorijih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. za strokovno vodenje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Tjaši Felicijan, mag. farm. za vso pomoč in praktične nasvete pri laboratorijskem delu ter za usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge.*

*Posebna zahvala gre fantu Žigi za podporo skozi celoten čas študija ter za izrečene vzpodbudne besede v najtežjih trenutkih. Prav tako gre posebna zahvala moji družini, ki mi je študij in bivanje v Ljubljani omogočila ter mi v času študija stala ob strani. **Hvala vam!***

### Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

# VSEBINA

---

POVZETEK.....	III
ABSTRACT .....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1 UVOD.....	1
1.1 Lastnosti dipiridamola.....	1
1.2 Izboljšanje topnosti dipiridamola .....	1
1.3 S spremembo pH pogojeno prenasíčenje.....	2
1.3.1 Vpliv polimerov na prenasíčenje dipiridamola.....	3
1.3.2 Vpliv površinsko aktivnih snovi na prenasíčenje dipiridamola .....	5
1.4 <i>In vitro</i> sistemi za preučevanje prenasíčenja dipiridamola .....	6
1.4.1 Enostavni pretočni sistem.....	7
1.4.2 Več-prostorni pretočni sistem.....	8
1.4.3 Sistem z <i>in vitro-in vivo</i> korelacijo.....	9
2 NAMEN DELA .....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Kemikalije .....	12
3.1.2 Aparature in laboratorijski pribor .....	12
3.2 METODE .....	13
3.2.1 Priprava raztopin .....	13
3.2.2 Mediji, uporabljeni pri spremljanju obarjanja DPL iz prenasíčene raztopine.....	15
3.2.3 Priprava umeritvene premice za DPL.....	16
3.2.4 Priprava razredčin natehte DPL v različnih medijih.....	17
3.2.5 Določanje "orientacijske topnosti" DPL .....	17
3.2.6 Analiza vzorcev preliminarnih poskusov določanja "orientacijske topnosti" DPL.....	18
3.2.7 Izvedba poskusov obarjanja DPL iz raztopine .....	19
3.2.8 Vzorčenje .....	21
3.2.9 Analiza vzorcev .....	22
3.2.10 Izvedba poskusov določanja velikosti delcev DPL z analizatorjem velikosti delcev .....	23

4	REZULTATI .....	25
4.1	Umeritvena premica za DPL v mediju z $\text{Na}_3\text{PO}_4$ s pH 6,8 .....	25
4.1.1	Izračun koncentracij DPL z enačbama obeh umeritvenih premic .....	25
4.2	"Orientacijska topnost" DPL.....	25
4.3	Poskusi obarjanja DPL v delovni čaši .....	27
4.4	Analize porazdelitve velikosti delcev na analizatorju.....	36
4.4.1	Preliminarni poskusi vrednotenja velikosti oborjenih delcev DPL .....	36
4.4.2	Rezultati poskusov z različno koncentracijo uporabljene $\text{Na}_3\text{PO}_4$ in z različno hitrostjo mešanja disperzije 38	
5	RAZPRAVA.....	44
5.1	Umeritvena premica za DPL v mediju z $\text{Na}_3\text{PO}_4$ s pH 6,8 .....	44
5.1.1	Izračun koncentracij DPL.....	45
5.2	"Orientacijska topnost" dipiridamola.....	46
5.3	Spremljanje obarjanja DPL .....	49
5.3.1	Preliminarni poskusi obarjanja DPL v delovni čaši.....	49
5.3.2	Vpliv izhodne koncentracije DPL na obarjanje.....	50
5.3.3	Vpliv koncentracije $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljenega za naalkaljenje raztopine, na obarjanje DPL .....	51
5.3.4	Vpliv oborjenih delcev na vrednosti absorbanc.....	52
5.3.5	Vpliv filtracije vzorcev na vrednosti absorbanc .....	55
5.3.6	Vpliv redčenja vzorcev na rezultate .....	57
5.3.7	Vpliv delovnega sistema na potek obarjanja DPL.....	60
5.3.8	Vpliv hitrosti mešanja disperzije na potek obarjanja DPL .....	62
5.3.9	Vpliv dodanih polimerov na potek obarjanja DPL.....	63
5.4	Porazdelitev velikosti delcev .....	64
5.4.1	Preliminarni testi določanja velikosti delcev DPL na analizatorju velikosti delcev .....	64
5.4.2	Vpliv hitrosti mešanja disperzije na velikost delcev DPL .....	68
5.4.3	Prisotnost nanodelcev .....	70
5.4.4	Vpliv koncentracije $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljenega za dvig pH medija, na velikost delcev .....	71
6	SKLEP .....	72
7	LITERATURA .....	74

## POVZETEK

---

V okviru magistrske naloge smo spremljali vpliv izbranih pogojev na proces obarjanja dipiridamola iz prenasičene raztopine s potopno sondo z optičnimi vlakni. Dipiridamol je šibka baza, dobro topna v medijih z nizkimi pH vrednostmi. Ob zvišanju pH raztopine dipiridamola lahko pride do stanja, v katerem je koncentracija raztopljenega dipiridamola večja od njegove ravnotežne topnosti pri tem pH, posledica tega pa je obarjanje.

Dipiridamol smo raztopili v 0,01 M raztopini HCl, za dvig pH medija do 6,8 pa smo uporabili raztopino fosfata z visoko koncentracijo. Analize vzorcev pri poskusih obarjanja v delovni čaši smo izvedli spektrofotometrično s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni. Velik vpliv na obliko spektrov in vrednosti absorbcanc so imeli prisotni oborjeni delci v disperziji. Njihovemu vplivu na rezultate smo se poskušali izogniti s filtracijo vzorcev.

Preko spreminjanja izhodne koncentracije dipiridamola, hitrosti mešanja disperzije v delovni čaši in dodatkom polimerov, smo poskušali ovrednotiti njihov vpliv na proces obarjanja dipiridamola. Ugotovili smo, da je obarjanje dipiridamola hitrejše v primeru višje izhodne koncentracije. Na večjo hitrost obarjanja dipiridamola lahko vplivamo tudi s hitrejšim mešanjem disperzije. Pri poskusih z dodatkom polimerov smo, nasprotno, pričakovali počasnejše obarjanje dipiridamola. Ob dodatku HPMC smo upočasnitev obarjanja dokazali, kar je v skladu z literaturnimi podatki, nepričakovano smo ob dodatku PVP obarjanje dipiridamola pospešili.

Velikost oborjenih delcev v disperziji smo poskušali določiti z analizatorjem velikosti delcev z lasersko difrakcijo. Spremljali smo spreminjanje velikosti delcev s časom po sprožitvi obarjanja dipiridamola z dvigom pH medija na 6,8. Ugotovili smo, da imamo v prvih nekaj minutah po dvigu pH v disperziji prisotne oborjene delce velikosti 0-2  $\mu\text{m}$ , nato pa se delci zvečajo in večina oborjenih delcev v disperziji zraste do velikosti 30-260  $\mu\text{m}$ .

**Ključne besede:** dipiridamol, obarjanje, prenasičenje, hitrost obarjanja, potopna sonda

## ABSTRACT

---

This master's thesis presents the research of the influence of selected process conditions on dipyrindamole precipitation from the supersaturated solution, which was monitored with a fiber optic dip probe. Dipyrindamole is a weak base, freely soluble in low pH medium. When increasing the pH of the dipyrindamole solution, the concentration of dissolved dipyrindamole can be greater than its equilibrium solubility at this pH, which results in precipitation.

Dipyrindamole was dissolved in 0,01 M HCl solution, and then a high concentration of phosphate was used to increase the pH of the medium to 6.8. For experiments of dipyrindamole precipitation in a beaker, the samples analyses were performed spectrophotometrically with the aid of a fiber optic dip probe. The precipitated particles in the dispersion have had a significant influence on the shape of the spectrum and on the absorbance values. We tried to avoid their influence on the results by filtering the samples. By changing the initial concentration of dipyrindamole, the stirring rate of the dispersion in the beaker and by the addition of polymers, we tried to evaluate their influence on the process of dipyrindamole precipitation. We determined that the precipitation of dipyrindamole is faster when its initial concentration is higher. A higher rate of dipyrindamole precipitation can also be influenced by faster stirring of the dispersion. In the experiments with the addition of polymers a slower precipitation of dipyrindamole was expected. Our expectation was confirmed with the addition of HPMC, which is consistent with the literature data, unexpectedly, the addition of PVP has accelerated dipyrindamole precipitation.

With particle size analyzer we tried to determine the size of precipitated particles in the dispersion, by laser diffraction. The change in particle size with time was monitored, after triggering the dipyrindamole precipitation by increasing the pH of the medium to 6.8. We determined that there are precipitated particles of size 0-2  $\mu\text{m}$  present in dispersion in the first few minutes after raising the pH, then the particle size increases and most of the precipitated particles in dispersion grow to size of 30-260  $\mu\text{m}$ .

**Keywords:** dipyrindamole, precipitation, supersaturation, precipitation rate, fiber optic dip probe

## SEZNAM OKRAJŠAV

---

DMB diluted McIlvaine buffer; redčen McIlvainov pufer

DPL dipiridamol

FT-IR Fourier-transform infrared spectroscopy; Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija

HPMChidroksipropil metilceluloza

PVP polivinilpirolidon

RPM revolutions per minute; število obratov na minuto

RSD relativna standardna deviacija

ZU zdravilna učinkovina

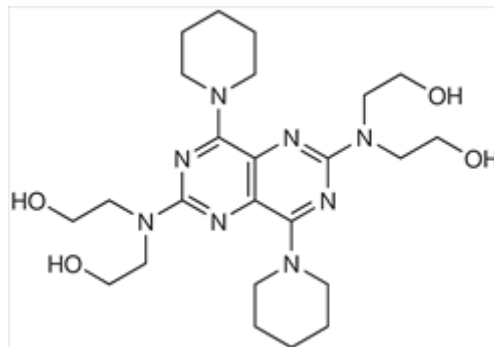
# 1 UVOD

## 1.1 Lastnosti dipiridamola

Dipiridamol (v nadaljevanju DPL) je šibko bazična učinkovina z antitrombotičnim in vazodilatacijskim delovanjem (1).

DPL po biofarmaceutski klasifikaciji zdravil uvrščamo v razred II, med slabo topne in dobro permeabilne učinkovine. Monografija DPL v Evropski farmakopeji navaja, da je DPL v vodi praktično netopen (3), se pa njegova topnost zvišuje z nižanjem pH vrednosti medija. Ključno točko pri topnosti predstavlja pKa vrednost DPL, ki se glede na literaturne podatke giblje okrog 6,4 (4),(5),(6).

Absorpcija DPL poteka v tankem črevesu, kjer je topnost DPL nizka, posledično pa je nizka tudi biološka uporabnost DPL (2).



Slika 1: Strukturna formula dipiridamola

## 1.2 Izboljšanje topnosti dipiridamola

Na večjo biološko uporabnost slabo topnih zdravilnih učinkovin (v nadaljevanju ZU) lahko vplivamo z izboljšanjem topnostnih lastnosti ZU. Z izboljšanjem topnosti ZU, ki dosežejo stanje prenasičenja (podrobneje razloženo v poglavju 1.3 *Spremembo pH pogojeno prenasičenje*), lahko namreč vplivamo na hitrejšo raztapljanje ZU, s tem pa posledično vplivamo na podaljšanje stanja prenasičenja in na povečanje biološke uporabnosti. Izboljšanje topnosti ZU lahko dosežemo s pretvorbo ZU v amorfno obliko, z zmanjšanjem velikosti ZU, s tvorbo soli, s kompleksacijo ZU, z uporabo površinsko aktivnih snovi. V nadaljevanju sta predstavljena dva že znana pristopa izboljšanja topnosti DPL.

Med enostavnejše pristope izboljšanja topnosti uvrščamo pretvorbo DPL iz termodinamsko ugodnejše kristalinične v **amorfno obliko**. Vora in sodelavci so izvedli študijo (6), v kateri so določali topnost kristalinične in amorfne oblike DPL v fosfatnem pufru s pH 6,8. Ugotovili so, da pride v izbranem pufru do pretvorbe DPL iz amorfne v termodinamsko ugodnejšo kristalinično obliko. Zaradi vrednosti pH medija ima DPL namreč veliko tendenco do kristalizacije. Topnost DPL v izbranem mediju je bila zato primerljiva med



obema oblikama DPL, tj. med amorfno in kristalinično obliko. Posledično je stabilizacija amorfnih oblik DPL s pomožnimi snovmi v formulacijah nujna. Vora in sodelavci so delno stabilizacijo dosegli že s pripravo fizikalnih zmesi DPL z različnimi polimeri, vendar pa se je kot uspešnejša izkazala priprava trdnih disperzij DPL s polimeri. Pripravljene trdne disperzije DPL s polimeri hidroksipropil metilcelulozo (HPMC) in polivinilpirolidonom (PVP) različnih molekulskih mas so imele v primerjavi s samo fizikalno zmesjo bistveno boljšo topnost v fosfatnem pufru s  $\text{pH} = 6,8$ . Raziskovalci so boljšo topnost DPL pripisali amorfnih oblik DPL, ki je v trdni disperziji s polimernim matriksom, ki ga tvori HPMC ali PVP, stabilizirana in ne prehaja v kristalinično obliko (6). Odsotnost prehoda iz amorfnih v kristalinično obliko DPL v trdnih disperzijah s polimerom HPMC oziroma PVP ter v kompleksnejših trdnih disperzijah DPL z vodotopnim polimerom hidroksipropil celulozo (HPC-SSL) in z gastrozistentnim polimerom hidroksipropil metilcelulozo acetat sukcinatom (HPMC-AS) so v študijah dokazali tudi s strukturnimi analizami (diferenčno dinamično kalorimetrijo in rentgensko praškovo difrakcijo) (6),(7).

Drugi pristop za izboljšanje topnosti DPL je uporaba **ciklodekstrinov**. Omenjen pristop so opisali v študiji Box in sodelavci (8), ki so s pomočjo CheqSol instrumenta, prvotno namenjenega določanju  $\text{pK}_a$  vrednosti ionizirajočih učinkovin s kislinsko-bazično titracijo, preiskovali vpliv  $\beta$  ciklodekstrinov na intrinzično topnost in obarjanje DPL. DPL so skupaj s ciklodekstrini raztopili v vodnem mediju s kislim  $\text{pH}$ , nato pa ga titrirali z bazo do pojava oborjenih delcev. Ugotovili so, da se intrinzična topnost DPL viša z večanjem deleža ciklodekstrinov v zmesi. Pri visokih koncentracijah ciklodekstrinov v raztopini, tj. 14,9 % masno-volumskega deleža, do obarjanja DPL, z njegovo izhodno koncentracijo 4,0 mM, sploh ni prišlo (8).

### **1.3 S spremembo pH pogojeno prenasičenje**

Prenasičenje ZU predstavlja stanje, v katerem je ZU raztopljena v višji koncentraciji kot je njena ravnotežna topnost v izbranem mediju. V nadaljevanju se bomo osredotočili na prenasičenje ZU, pogojeno s spremembo  $\text{pH}$ . Ta pristop je namreč pomemben za razumevanje obnašanja DPL v prebavnem traktu, saj DPL ob prehodu iz kislega želodčnega medija v tanko črevo z višjo  $\text{pH}$  vrednostjo medija lahko doseže stanje prenasičenja, temu pa sledi obarjanje DPL. Potek prenasičenja v prebavnem traktu je podrobneje predstavljen v nadaljevanju.

Kot smo opisali že v poglavju *1.1 Topnostne lastnosti dipiridamola*, je DPL šibka baza, ki je dobro topna v medijih z nizkimi pH vrednostmi. Za šibke baze je pogosto značilno, da se v želodčnem mediju popolnoma raztopijo, saj so v želodcu prisotne v ionizirani obliki. Ob prehodu v tanko črevo se pH medija drastično zviša, zaradi česar se ionizirana oblika ZU pretvarja v neionizirano (6). Kljub slabši topnosti neionizirane oblike v črevesnem mediju do obarjanja ne pride takoj. Obarjanje je namreč odvisno od hitrosti nukleacije in rasti kristalov. V vmesnem času do začetka obarjanja je raztopina ZU torej v stanju prenasičenja. Po določenem času pride do nastanka nukleacijskih jeder in nadaljnje rasti kristalov (9), kar povzroči izoboritev ZU vse do dosega njene ravnotežne topnosti. To povzroči pomembno zmanjšanje količine raztopljenega ZU v tankem črevesu, namenjene absorpciji. Posledično se zmanjša tudi biološka uporabnost DPL (6). Kljub dejstvu, da opisana lastnost predstavlja oviro pri absorpciji ZU v tankem črevesu, pa lahko hkrati z različnimi pristopi posredno ali neposredno vplivamo na stanje prenasičenja ter ga z njimi podaljšamo. V poglavju *1.2 Izboljšanje topnosti dipiridamola* smo predstavili dva pristopa za izboljšanje topnosti DPL, s katerima lahko posredno vplivamo na stanje prenasičenja, v nadaljevanju pa bomo predstavili še nekaj pristopov za pripravo formulacij DPL z različnimi pomožnimi snovmi.

### 1.3.1 Vpliv polimerov na prenasičenje dipiridamola

**Polimeri**, poleg stabilizacije amorfne oblike ZU, predstavljajo enega izmed najpogostejših pristopov za zaviranje obarjanja oziroma podaljševanje stanja prenasičenja ZU. Preko različnih mehanizmov vplivajo na zaviranje nukleacije in rasti kristalov v raztopini. Mednje uvrščamo interakcije polimerov z ZU, spremenjeno gibljivost molekul in vpliv polimerov na težnjo po rekristalizaciji ZU (11). Izbira ustreznega polimera za zaviranje obarjanja je pogojena z njegovimi lastnostmi, prav tako kot tudi z lastnostmi same ZU.

Posamezni polimeri se med seboj poleg same sestave razlikujejo tudi v molekularni masi, vplivu na viskoznost raztopine, v smislu interakcij pa je najpomembnejša njihova nagnjenost k tvorbi vodikovih vezi z ZU. Zaradi različnih funkcionalnih skupin v strukturi polimerov, sta si HPMC in PVP glede zadnjega povsem različna, kar pomeni boljše ali slabše zaviranje obarjanja v kombinaciji z različnimi ZU. Vpliv prostih hidroksilnih skupin pri HPMC in karbonilnih skupin pri PVP na stabilizacijo prenasičenja DPL so preiskovali Vora in sodelavci (6). Spremljali so binarne sisteme DPL s polimeri ob prehodu iz kislega v bazično okolje s  $\text{pH} = 6,8$ . Pri tem so zaznali signifikantno zaviranje obarjanja DPL ob

kombinaciji s HPMC, medtem ko pri sistemih s PVP niso opazili bistvenih sprememb v primerjavi s samo učinkovino. HPMC ima v svoji strukturi namreč več donorskih skupin, zaradi česar z DPL tvori vodikove vezi, medtem ko zaradi večjega števila akceptorskih skupin v strukturi PVP ne pride do nastanka vodikovih vezi med DPL in PVP. Odsotnost vodikovih vezi v omenjenem sistemu so dodatno dokazali še s primerjavo FT-IR spektrov vseh preiskovanih sistemov.

Nadalje so raziskovalci v isti študiji spremljali tudi vpliv različnih molekulskih mas polimerov HPMC in PVP na dosego sterične oviranosti molekule DPL v fazi nukleacije in rasti kristalov. Polimeri z višjo molekulsko maso imajo v svoji sestavi več daljših verig, med katerimi pride v raztopini do medsebojnega prepletanja, kar posledično zviša viskoznost raztopine. Zaradi omejene gibljivosti molekul ZU je nukleacija ovirana, posledično pa tudi rast kristalov. Pričakovali bi torej, da s polimeri višjih molekulskih mas dosežemo bolj izrazito zaviranje obarjanja DPL v primerjavi z nizkomolekularnimi polimeri, kar pa so dokazali le za primer trdnih disperzij DPL s polimeri HPMC. Nasprotno med trdnimi disperzijami DPL s PVP dveh različnih molekulskih mas niso opazili bistvenih razlik (6).

Poleg enostavnejših formulacij DPL s polimeroma HPMC ali PVP, s katerimi lahko v *in vitro* sistemih delno zavremo obarjanje DPL v mediju s pH 6,8 po predhodnem prenasičenju DPL, pa lahko polimere uporabimo tudi za načrtovanje kompleksnejših formulacij s kombinacijami več vrst polimerov. Izhajamo iz študije (7), v kateri so pripravili formulacije DPL z gastrozistentnim polimerom HPMC-AS oziroma s kombinacijo tega z dodatnim vodotopnim nizko viskoznim polimerom hidroksipropil celulozo (HPC-SSL). S temi formulacijami so želeli preveriti možnost ciljne prenasičenosti DPL v mediju s pH nad 5,5, ki bi lahko pomenila tudi možnost izboljšanja biološke uporabnosti DPL. V omenjeni študiji, v kateri so kot preiskovano ZU uporabili DPL, so uporabili gastrozistenten polimer HPMC-AS, ki je zaradi acetat sukcinatne skupine dobro topen šele pri pH, višjem od 5,5. Pripravili so si amorfne ekstrudate DPL s polimerom v različnih razmerjih. Spremljali so sproščanje DPL ob prehodu iz kislega medija v medij s pH = 5,5 in nadalje v bazični medij s pH 6,8, pri čemer so dokazali veliko razliko v profilih sproščanja v primerjavi s samim DPL. Prisotnost polimera je povzročila počasnejše sproščanje DPL v kislem mediju, z dvigom pH medija pa je prišlo zaradi raztapljanja polimera do tvorbe prenasičene raztopine DPL. Z nadaljnjim dvigom pH medija na vrednost 6,8 se je DPL v formulaciji s polimerom HPMC-AS še dodatno sprostil

in dosegel svoj vrh. Obseg obarjanja DPL, ki je sledil, je bil minimalen in je glede na rezultate odvisen od deleža polimera HPMC-AS v formulaciji z DPL. Obseg prenasíčenja je bil večji v primerjavi s tistim, doseženim s samim DPL, saj so z izbranim polimerom povečali omočenost in hitrost raztapljanja ZU, v tem primeru DPL. Visok delež polimera v ekstrudatu, ki tvori polimerni matriks, pa je poleg vpliva na obseg obarjanja DPL v mediju s pH 6,8 preprečil tudi sproščanje DPL že v želodčnem mediju.

V okviru iste študije so pripravili tudi terciarni sistem DPL z dvema polimeroma, pri čemer je prvi gastrozistenten in drugi pH-neodvisen. Poleg že prej uporabljenega gastrozistentnega polimera HPMC-AS v formulaciji z DPL so uporabili še pH-neodvisen vodotopen polimer HPC-SSL. Opazili so podobno obnašanje trdne disperzije terciarnega sistema v primerjavi s trdno disperzijo binarnega ekstrudata, predstavljenega zgoraj, pri enakem deležu DPL v ekstrudatu. Razlika je bila v vrednosti sproščenega DPL v kislem mediju, ki je bila ob dodatni prisotnosti polimera HPC-SSL v formulaciji z DPL in polimerom HPMC-AS višja kot pri formulaciji DPL samo s polimerom HPMC-AS. Tu je šlo predvsem za vpliv vodotopnega polimera HPC-SSL, ki za razliko od gastrozistentnega polimera HPMC-AS v kislem mediju ne tvori netopnega ogrodja, pač pa se le-ta raztopi skupaj z DPL. Terciarni sistemi z večjim deležem HPC-SSL so v opravljeni študiji v kislem mediju privedli do popolne raztopitve DPL, z zviševanjem pH pa ni prišlo do obarjanja DPL. Predvidevajo, da sta prisotna polimera HPMC-AS in HPC-SSL stabilizirala prenasíčeno stanje DPL. Pri načrtovanju formulacij je torej bistvenega pomena odločitev o razmerju polimerov in DPL, saj s tem bistveno vplivamo na njegovo sproščanje in stanje prenasíčenja (7).

### 1.3.2 Vpliv površinsko aktivnih snovi na prenasíčenje dipiridamola

Poleg polimerov med zaviralce obarjanja ZU uvrščamo tudi **površinsko aktivne snovi**, ki so sicer manj raziskana skupina zaviralcev, vseeno pa se pogosto uporabljajo v formulacijah. Najpogostejša mehanizma, po katerih površinsko aktivne snovi zavirajo obarjanje različnih ZU sta spreminjanje lastnosti medija, natančneje sprememba površinske napetosti in povečanje topnosti ZU. Znanih je še več drugih mehanizmov, kot sta izboljšanje hidratacije molekule ZU in adsorpcija pomožnih snovi na oborjene delce ZU, kar upočasni rast kristalov. V študiji (5) so raziskovalci primerjali vpliv natrijevega lavrilsulfata, poloksamera in polisorbata na zaviranje obarjanja DPL. Posameznega izmed njih so v ločenih poskusih dodali simuliranemu želodčnemu mediju, ki je poleg 0,01 M

HCl vseboval še 0,2 % NaCl. Uporabljena koncentracija vseh površinsko aktivnih snovi je bila pod njihovo kritično micelarno koncentracijo, dodatno pa je bila pri vseh poskusih površinska napetost vzorca enaka tisti v želodčnem mediju na tešče. Z izbranimi površinsko aktivnimi snovmi so v večji ali manjši meri dosegli zaviranje obarjanja DPL. Kot najuspešnejši zaviralec obarjanja se je izkazal natrijev lavrilsulfat. Najverjetneje zaradi adsorpcije na delce DPL in posledičnega elektrostatičnega odboja zunanjih sulfatnih skupin natrijev lavrilsulfat vpliva na zaviranje rasti kristalov DPL (5).

#### **1.4 *In vitro* sistemi za preučevanje prenasičenja dipiridamola**

Spremljanje sproščanja oziroma obarjanja ZU, predvsem tistih, katerih topnost je odvisna od pH, zahteva uporabo kompleksnejših *in vitro* sistemov pri izvedbi poskusov. Zaradi odvisnosti topnosti ZU od pH medija je za pridobitev ustreznih rezultatov ključnega pomena ponazoritev pH gradienta, ki je v *in vivo* sistemu prisoten pri prehodu farmacevtske oblike vzdolž prebavnega trakta. Z enostavnimi *in vitro* testi, kot je na primer farmakopejska metoda za sproščanje farmacevtskih oblik z zakasnjnim sproščanjem (3), dobimo le osnovne podatke o profilih sproščanja ZU. Z njimi namreč lahko le v grobem ponazorimo spremembo pH vzdolž prebavnega trakta, ne moremo pa zraven vključiti tudi ostalih dejavnikov, na primer hidrodinamike medija v prebavnem traktu, pretoka simuliranega želodčnega medija iz želodčnega prostora v črevesni medij in odtoka črevesnega medija iz črevesnega prostora, ki imajo znaten vpliv na obnašanje ZU v *in vivo* pogojih. Zaradi kompleksnosti ZU, z vidika odvisnosti topnosti ZU od pH medija in možnosti dosega stanja prenasičenja, je zato smiselna uporaba večprostornih sistemov, s katerimi se lahko bolj približamo dejanskemu stanju v prebavnem traktu.

Bistvenega pomena pri preučevanju prenasičenja ZU, katerih topnost je močno odvisna od pH, je izbira ustreznega medija. Z ustreznim medijem lahko dobro ponazorimo dejanske razmere v prebavnem traktu in posledično dosežemo ustrezno *in vitro-in vivo* korelacijo (v nadaljevanju IV-IV). Seveda je potreba po kompleksnosti izbranega medija odvisna od samega namena raziskave. Pri pripravi medija moramo upoštevati, da samo izbira pravega pH ni merilo za njegovo ustreznost. Pozornost moramo nameniti tudi pufrski sestavi in kapaciteti, površinski napetosti, prisotnosti žolčnih soli oziroma površinsko aktivnih snovi, volumnu in pretoku medija ter hidrodinamiki tekočine (5),(4),(12). Z mediji, s katerimi dosežemo ustrezno solubilizacijo ZU s tvorbo micelov, na primer, dosežemo bistveno večjo podobnost fiziološkemu mediju v primerjavi z enostavnimi pufrskimi raztopinami

(13), saj so žolčne soli, ki povzročajo solubilizacijo ZU v prebavnem traktu, v manjši ali večji meri vedno prisotne v prebavnem traktu.

V nadaljevanju bomo predstavili različne *in vitro* pretočne sisteme, ki so že bili uporabljeni za namene preučevanja obnašanja DPL ob prehodu iz kislega v nevtralni medij, opisali pomembnejša opažanja in izpostavili njihove pomanjkljivosti.

#### 1.4.1 Enostavni pretočni sistem

Enostavnejši dvo-prostorni pretočni sistem so pripravili Kostewitez in sodelavci (4). Sistem je vseboval prostora s simuliranim želodčnim in s črevesnim medijem ter vmesno peristaltično črpalko. Natančnejši opis poteka študije je predstavljen v nadaljevanju.

DPL v obliki prahu so dodali simuliranemu želodčnemu mediju in počakali, da se je popolnoma raztopil. Kot želodčni medij so uporabili raztopino 0,01 M HCl, v kateri so raztopili NaCl, s končnim pH 2,1. S peristaltično črpalko so nato simulirali različne hitrosti praznjenja želodca oziroma prehoda raztopljenega DPL v črevesni prostor z višjim pH medija. Poskuse so izvedli s hitrostmi pretokov želodčnega medija z DPL v območju od 0,5 do 9 mL/min. Odločili so se tudi za kompleksnejšo sestavo simuliranih črevesnih medijev s simuliranjem komponent žolča. Pri pripravi črevesnega medija so namreč uporabili natrijev tavroholat in lecitin, za katerega so mnogi raziskovalci že dokazali ugoden vpliv na povečanje *in vitro* hitrosti raztapljanja za več ZU (4). Z različnima koncentracijama natrijevega tavroholata in lecitina v fosfatnem pufru s pH 6,5 oziroma v acetatnem pufru s pH 5,0 so ponazorili črevesni medij na tešče in po obroku hrane.

Študijo so zaključili s sledečimi ugotovitvami. Obarjanja v simuliranem črevesnem mediju po obroku hrane niso dosegli, kljub doseženim zelo visokim koncentracijam DPL v raztopini. Količine žolčnih komponent v črevesnem mediju po obroku hrane so, glede na literaturne podatke, namreč že v osnovi višje v primerjavi s črevesnim medijem na tešče, kar so avtorji raziskave tudi upoštevali pri načrtovanju poskusov. Zaradi omenjene razlike pride v mediju po obroku hrane do večje omočenosti in solubilizacije DPL ter posledično ugodnega vpliva na njegovo topnost in raztapljanje. Nasprotno pa je do obarjanja prišlo v simuliranem črevesnem mediju na tešče, pri čemer je bilo le-to hitrejše pri hitrejših pretokih raztopine iz želodčnega prostora. Sklepali so torej, da je od dotoka želodčnega medija v črevesni medij odvisna hitrost obarjanja DPL v simuliranem črevesnem mediju s pH 6,5, ne pa tudi obseg prenasičenja DPL, ki je bil enak pri vseh izbranih pretokih medija.

Glede na definicijo rasti kristalov, so predvidevali, da pri višjih hitrostih pretoka lahko nastane več zametkov kristalov, zato je obarjanje poteklo hitreje (4).

Z omenjeno študijo so torej kljub enostavnosti modela s kompleksnejšo zasnovo medijev pridobili ustrezne podatke, kar potrjuje tudi njihova *in vivo* študija z aplikacijo 100 mg DPL v obliki suspenzije, s katero so dokazali večjo AUC vrednost pri aplikaciji 100 mg DPL 30 minut po obroku hrane glede na aplikacijo suspenzije na tešče (14).

#### 1.4.2 Več-prostorni pretočni sistem

Z dodatnim prostorom v sistemu, s katerim ponazorimo praznjenje črevesnega prostora, se lahko izognemo pretirani oceni obarjanja ZU v tankem črevesu. Primer take študije je študija Mitre in sodelavcev (5), v okviru katere so z dodatnim prostorom v sistemu dosegli veliko prenasičenje DPL v 0,05 M fosfatnem mediju s pH 6,5, ki predstavlja simuliran duodenalni medij, do padca njegove koncentracije na ravnotežno topnost pa je prišlo šele po 120 minutah. Pri tem so za simulacijo želodčnega medija uporabili raztopino HCl z 0,2 % NaCl in 1,75 mM natrijevega lavril sulfata, s končnim pH 2,0. Omenjen sistem je nadgradnja zgoraj opisanega sistema Kostewicza (poglavje *1.4.1 Enostavni pretočni sistem*), ki poleg želodčnega in duodenalnega prostora simulira tudi neprestano izločanje njunih tekočin. Dodatno pa so za dotokom simuliranega želodčnega medija z DPL v duodenalni prostor, v katerem pride nadalje do obarjanja DPL, v sistem vključili tudi praznjenje vsebine duodenalnega prostora. S tem so zamejili kopičenje oborjenega DPL v duodenalnem mediju. Pri načrtovanju sistema so se z izbranimi procesnimi parametri, kot je hitrost praznjenja simuliranega želodčnega medija iz želodčnega v duodenalni prostor, konstantno izločanje simuliranega želodčnega in duodenalnega medija v želodčni in duodenalni prostor ter hitrost praznjenja vsebine simuliranega duodenalnega prostora, želeli čim bolj približati fiziološkim pogojem. Tako so pri določanju hitrosti praznjenja želodčnega medija upoštevali njegovo kompleksnost v *in vivo* pogojih. Praznjenje želodca v teščem stanju naj bi, glede na predhodno opravljene študije drugih raziskovalcev, namreč potekalo po monoeksponentnem vzorcu, vse dokler volumen želodčnega medija ne doseže svoje bazalne vrednosti. Šele od tega trenutka dalje je predpostavka o konstantni hitrosti praznjenja želodca, ki so jo pri načrtovanju študije predpostavljali Kostewicz in sodelavci (4), ustrezna. V nasprotju z ugotovitvami Kostewicza in sodelavcev (poglavje *1.4.1 Enostavni pretočni sistem*) je Mitra s svojimi sodelavci torej ugotovil, da je obarjanje DPL v duodenalnem prostoru hitrejše pri počasnejši hitrosti praznjenja želodčnega medija. To je

posledično pomenilo višjo koncentracijo raztopljenega DPL v duodenalnem prostoru pri hitrejšem praznjenju želodčnega medija glede na koncentracijo raztopljenega DPL pri počasnejšem praznjenju želodčnega medija. Po 75-ih minutah trajanja poskusa pa so opazili zvišanje koncentracije raztopljenega DPL pri počasnejšem praznjenju v primerjavi s hitrejšim praznjenjem. To so si razlagali s spremembo v hitrosti dotoka simuliranega želodčnega medija z DPL v duodenalni prostor, ki je najprej potekal po monoeksponentnem vzorcu, ob dosegu bazalne vrednosti volumna želodčnega medija, tj. 50 mL, pa je nadalje potekal s konstantno hitrostjo 1,7 mL/min. Sprememba v omenjeni hitrosti dotoka simuliranega želodčnega medija z nizkim pH je povzročila tudi spremembo pH v duodenalnem prostoru, preko nje pa so sklepali na spremenjeno kinetiko obarjanja DPL. Z opravljeno študijo so torej sklepali na velik vpliv načina praznjenja želodčnega medija, v smislu upoštevanja monoeksponentnega vzorca praznjenja, in njegove hitrosti na kinetiko obarjanja DPL (5).

#### 1.4.3 Sistem z *in vitro*-*in vivo* korelacijo

Opisan večprostorni sistem v študiji Mirte in sodelavcev (poglavje 1.4.2 *Več-prostorni pretočni sistem*), predvsem zaradi upoštevanja fizioloških pogojev, že zelo dobro ponazarja dejansko stanje v prebavnem traktu. Kljub temu pa bi lahko s povezavo *in vitro* pretočnega sistema z *in vivo* komponento omogočili predvidljivejšo IV-IV korelacijo, kar so raziskovali Tsume in sodelavci (12). Z namenom študije absorpcije DPL v odvisnosti od prenasičenja učinkovine v duodenumu so *in vitro* pretočni sistem s simuliranim želodčnim in duodenalnim prostorom povezali z *in vivo* komponento, ki jo predstavlja mišji jejunum.

Osnovni princip izvajanja poskusov v študiji Tsume in sodelavcev se od študije Mitre, opisane v poglavju 1.4.2 *Več-prostorni pretočni sistem*, ni bistveno razlikoval. Tsume in sodelavci so pri poskusih uporabili enostavnejši želodčni medij, raztopino 0,01 M HCl s pH 2,0, medtem ko je bila sestava duodenalnega medija enaka v obeh študijah. Prav tako so ohranili tudi konstantno izločanje simuliranega želodčnega in duodenalnega medija v želodčni in duodenalni prostor ter praznjenje simuliranega duodenalnega medija z DPL iz duodenalnega prostora. Razliko med poskusi obeh skupin raziskovalcev je predstavljala hitrost praznjenja želodčnega medija z DPL v duodenalni prostor, za katero so Tsume in sodelavci predpostavili konstanten pretok z razpolovnim časom 8 minut, dodatno pa so *in vitro* sistem povezali z *in vivo* komponento. Simuliran duodenalni medij z DPL so v tretji minuti po začetku izvajanja poskusa v pretočnem sistemu injicirali v mišji jejunum in



mišim po 60 minutah vzeli vzorec krvi. Vzorec so analizirali in vrednost plazemske koncentracije DPL primerjali z obsegom prenasičenja DPL v simuliranem duodenalnem mediju v *in vitro* sistemu pred aplikacijo. Z dobljenimi rezultati so prikazali dobro korelacijo prenasičenja DPL v duodenalnem mediju v *in vitro* sistemu z njegovo plazemsko koncentracijo *in vivo*. Z višjo koncentracijo DPL v duodenalnem prostoru so dosegli višje vrednosti plazemskih koncentracij DPL.

Ob načrtovanju študije so se odločili tudi za primerjavo stanja prenasičenja DPL v simuliranem prostoru duodenuma, ki so ga dosegli ob aplikaciji raztopine DPL in ob aplikaciji tablete DPL s takojšnjim sproščanjem v simuliran želodčni prostor. Ugotovili so, da sta koncentraciji DPL v simuliranemu duodenumu primerljivi ne glede na vrsto aplikacije, kljub pričakovanemu večjemu prenasičenju DPL v primeru aplikacije tablete. Z njenim sproščanjem v želodčnem mediju so tam po nekaj minutah namreč dosegli višje koncentracije DPL. Razlog odsotnosti razlik bi lahko bilo dejstvo, da je prenos DPL iz želodčnega v duodenalni medij v primeru aplikacije raztopine potekel hitreje. Pri tem opazimo podobnost s prej opisanimi ugotovitvami Mitre in sodelavcev (poglavje 1.4.2 *Več-prostorni pretočni sistem*), da način in hitrost praznjenja želodčnega medija vplivata na kinetiko obarjanja DPL (5). Vpliv zgoraj naštetih dejavnikov, kot je hitrost raztapljanja DPL, čas zadrževanja DPL v želodčnem mediju in hitrost prehoda DPL iz želodčnega v duodenalni medij, na prisotnost oziroma odsotnost neraztopljenih delcev učinkovine in posledično tudi na hitrost obarjanja so v svoji študiji preučevali tudi Tsume in sodelavci, ki pa ga zaradi neprimerne metode njenega določevanja, niso mogli potrditi. Težavo je namreč predstavljal dinamičen pretočen sistem, skupaj z obarjanjem DPL, zaradi katerega je bil izračun hitrosti obarjanja zelo otežen (12).

## 2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo spremljali potek obarjanja dipiridamola iz prenasičene raztopine s potopno sondo z optičnimi vlakni. Glavni namen izvedbe poskusov je ovrednotiti vpliv izhodne koncentracije dipiridamola, vpliv hitrosti mešanja disperzije in vpliv dodanih polimerov (hidroksiopropil metilceluloze in polivinilpirolidona) na potek obarjanja dipiridamola.

Poskuse obarjanja dipiridamola bomo izvajali v delovni čaši, kamor bomo nalili raztopino dipiridamola v raztopini HCl, njegovo obarjanje pa bomo sprožili z dodatkom koncentrirane raztopine trinatrijevega fosfata, s katerim bomo dvignili pH medija do 6,8. S pomočjo različnih izhodnih koncentracij dipiridamola bomo poskušali ovrednotiti njihov vpliv na hitrost obarjanja dipiridamola iz prenasičene raztopine. Z mešanjem disperzije dipiridamola pri različnih hitrostih bomo preverili vpliv hitrosti mešanja disperzije tako na hitrost obarjanja dipiridamola kot tudi na velikost oborjenih delcev, ki jo bomo okvirno poskusili določiti s filtriranjem vzorcev. Preverili bomo tudi uspešnost različnih polimerov na zaviranje obarjanja dipiridamola.

Za potrebe ovrednotenja zgoraj opisanih vplivov na obarjanje dipiridamola bomo del poskusov posvetili preučevanju možne variabilnosti rezultatov in virov napak, pogojenih z izbiro metode za spektrofotometrično analizo vzorcev. Analize vzorcev bomo namreč izvajali s potopno sondo z optičnimi vlakni, za katero omejitve analiziranja disperzij s prisotnimi trdnimi delci še niso dobro poznane. S pomočjo zbranih podatkov bomo metodo za analizo vzorcev z dipiridamolom tudi optimizirali.

Velikost oborjenih delcev dipiridamola pri obarjanju iz prenasičene raztopine bomo natančneje določili s pomočjo laserske difrakcije s poskusi na analizatorju velikosti delcev. Dobljene rezultate bomo poskusili korelirati z rezultati velikosti oborjenih delcev, določenih s filtriranjem vzorcev pri poskusih v delovni čaši.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Kemikalije

- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo 1 L 1 M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo 1 L 1 M HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- trinatrijev fosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- dinatrijev hidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- citronska kislina monohidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- dipiridamol, p.a., Sigma-Aldrich CO, St. Louis, ZDA;
- hidroksipropil metilceluloza - HPMC, Affinisol® HPMC HME 15LV, Dow Chemical Co. Ltd., Bomlitz, Nemčija;
- polivinilpirolidon – PVP, Kollidon® 17 PF, BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija;
- pufrska raztopina pH = 4,0 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- pufrska raztopina pH = 7,0 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

Čistota uporabljenih kemikalij je bila večja od 95 %.

#### 3.1.2 Aparature in laboratorijski pribor

- UV-Vis spektrofotometer s potopno sondo z optičnimi vlakni z dolžino poti 0,5 cm Agilent Cary 60, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA;
- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453 s kiveto z dolžino stranice 1 cm, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA;
- magnetno mešalo z električnim grelcem IKA® RET control, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- vorteks stresalnik Lab Dancer, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- analizator velikosti delcev z lasersko difrakcijo Mastersizer S long bench z lečo 300 RF, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Anglija;
- termostatiran stresalnik VORTEMP 56 EVC, Tehnica, Železniki, Slovenija;

- centrifuga Centrifuge 5415R, Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija;
- aparat za testiranje sproščanja VanKel VK 7000 Series z veslastim mešalom (USP II), Vankel Technology, ZDA;
- digitalna tehtnica Exacta 300EB, Exacta, Železniki, Slovenija;
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- magnetno mešalo Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Železniki, Slovenija;
- ultrazvočna kopel Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- pH-meter Mettler Toledo Five Easyplus, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- digitalna štoparica Hanhart Stratos 2, Hanhart 1882 GmbH, Gütenbach, Nemčija;
- delovna čaša 150 mL (notranji premer 55 mm), Schott Duran, Nemčija;
- delovni magnet (dolžina 25 mm, premer 8 mm);
- vodna kopel z obodom za čašo iz stiroporja;
- pokrov za čašo z odprtinami iz stiroporja;
- membranski celulozno-acetatni filtri z velikostjo por 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  in 0,8  $\mu\text{m}$ , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija;
- valjasti polietilenski »full flow« filtri z velikostjo por 1,0  $\mu\text{m}$ , Quality Lab Accessories LLC, Telford, Anglija;
- avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- polnilne pipete različnih volumnov, Blaubrand, Nemčija;
- centrifugirke;
- steklovina, magneti, pribor.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Priprava raztopin**

- 1 M HCl

V 1 l merilno bučko smo nalili malo prečiščene vode, nato pa vanjo kvantitativno prenesli standardno raztopino klorovodikove raztopine Titrisol<sup>®</sup>. Bučko smo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,1 M HCl

V 1 l merilno bučko, ki je bila do polovice napolnjena s prečiščeno vodo, smo s polnilno pipeto odmerili 100 mL 1 M HCl. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,01 M HCl

V 2 l merilno bučko, ki je bila do polovice napolnjena s prečiščeno vodo, smo z avtomatsko pipeto odmerili 20 mL 1 M HCl. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,001 M HCl

V 250 mL merilno bučko, ki je bila do polovice napolnjena s prečiščeno vodo, smo z avtomatsko pipeto odmerili 250  $\mu$ L 1 M HCl. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Zatehtali smo 38,02 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O in ga kvantitativno prenesli v 500 mL merilno bučko. Bučko smo do polovice napolnili s prečiščeno vodo ter s pomočjo magnetnega mešala raztopili Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,4 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Zatehtali smo 15,21 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O in ga kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko. Bučko smo do polovice napolnili s prečiščeno vodo ter s pomočjo magnetnega mešala raztopili Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,6 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Zatehtali smo 11,41 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O in ga kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko. Bučko smo do polovice napolnili s prečiščeno vodo ter s pomočjo magnetnega mešala raztopili Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 1 M NaOH

V 1 l merilno bučko smo nalili malo prečiščene vode, nato pa vanjo kvantitativno prenesli standardno raztopino natrijevega hidroksida Titrisol<sup>®</sup>. Bučko smo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 50 mM fosfatni pufer, pH = 6,8

680 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> smo kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko in ga raztopili v prečiščeni vodi. Z avtomatsko pipeto smo dodali 2,2 mL 1 M NaOH ter dodali še toliko prečiščene vode, da je bila merilna bučka napolnjena nekje do vratu. Raztopini smo izmerili pH ter ga uravnali na 6,8 +/- 0,05, nato pa s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Zatehtali smo 3,55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in ga kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko. Bučko smo nekje do polovice napolnili s prečiščeno vodo in raztopili Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- 0,125 M citronska kislina

Zatehtali smo 2,63 g citronske kisline monohidrata in jo kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko. Bučko smo nekje do polovice napolnili s prečiščeno vodo in citrnsko kislino raztopili, nato pa z vodo še dopolnili do oznake.

- redčeni McIlvaineovi pufri

Pripravili smo štirikrat redčene McIlvaineove pufre (v nadaljevanju DMB) iz osnovne raztopine A (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in osnovne raztopine B (0,125 M citronska kislina). Uporabljeni volumni osnovnih raztopin za pripravo posameznega pufra so predstavljeni v preglednici I, pri njihovi določitvi pa smo izhajali iz opisa priprave neredčenih McIlvaineovih pufrov (15). V 100 mL merilno bučko smo s pomočjo avtomatskih pipet odmerili ustrezno količino raztopine A, dodali ustrezno količino raztopine B in skoraj do oznake napolnili s prečiščeno vodo. Tako pripravljene raztopine smo izmerili pH in ga, če je bilo potrebno, s pomočjo nekaj kapljic ene izmed osnovnih raztopin uravnali na želeno vrednost. Dovoljena odstopanja so +/- 0,05 enote. Raztopino smo nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

**Preglednica I:** Potrebne količine osnovne raztopine A, ki predstavlja 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, in osnovne raztopine B, ki predstavlja 0,125 M citrnsko kislino, za pripravo 100 mL štirikrat redčenih McIlvaineovih pufrov z različnimi pH vrednostmi.

pH pufra	V osnovne razt. A (mL)	V osnovne razt. B (mL)
3,0	3,4	16,6
4,0	7,3	12,7
5,0	9,8	10,2
6,0	12,05	7,95
6,8	15,1	4,9
7,5	17,9	2,1

### 3.2.2 Mediji, uporabljeni pri spremljanju obarjanja DPL iz prenasničene raztopine

Za izvajanje poskusov obarjanja DPL smo modificirali medij, povzet iz metode za test sproščanja trdnih farmacevtskih oblik z zakasnjnim sproščanjem iz Evropske farmakopeje (3). Omenjena metoda predstavlja dvostopenjski test, pri katerem analizirano farmacevtsko obliko najprej izpostavimo 0,1 M HCl, nato pa z 0,2 M raztopino trinatrijevega fosfata (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) zvišamo pH medija na 6,8 +/- 0,05. Pri tem sta kislina in bazična komponenta v

končnem mediju v volumskem razmerju 3 + 1. Podobno spremembo pH medija smo želeli ponazoriti tudi sami v zastavljenih poskusih, kjer smo pri izvedbi uporabili raztopine HCl in Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> različnih molarnosti in v različnih volumskih razmerjih. Količino dodanega Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> smo prilagodili glede na želeni končni pH medija, ki je bil 6,8. Dovoljeno odstopanje pH vrednosti smo povzeli iz Evropske farmakopeje in znaša +/- 0,05 enote. Za izvajanje poskusov smo uporabili 4 različne medije, vsi pa so vsebovali raztopini HCl in Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> različnih molarnosti. Sestava medijev je podana v preglednici II.

**Preglednica II:** Sestava medijev, uporabljenih pri poskusih obarjanja DPL, vključno s preliminarnimi poskusi. Končen pH medijev znaša 6,8 +/- 0,05.

medij	0,1 M HCl	0,01 M HCl	0,2 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
A	100 mL		33 mL		
B		100 mL	3 mL		
C		100 mL		1,5 mL	
D		100 mL			1 mL

Za pripravo medijev A-D smo si najprej posebej pripravili osnovni raztopini za pripravo posameznega medija. Pripravljeno raztopino HCl smo hranili za čas uporabe enega tedna. Raztopine Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> smo pripravljali v manjših količinah, v odvisnosti od trenutne porabe. Tako pripravljene raztopine smo uporabljali približno tri dni. Ob vsaki pripravi nove raztopine Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> smo slepemu mediju A-D brez dodanega DPL preverili vrednost pH in v primeru odstopanja od vrednosti 6,8 +/- 0,05 pripravili novo raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

### 3.2.3 Priprava umeritvene premice za DPL

Enačbo za umeritveno premico smo določali v mediju A z volumskim razmerjem 3 + 1 = 0,1 M HCl + 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, s končnim pH = 6,8. Najprej smo si pripravili štiri osnovne raztopine DPL. Natančno smo natehtali približno 40 mg DPL, ga kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko ter z 0,1 M HCl dopolnili nekje do polovice. Raztopine smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel, da se je DPL povsem raztopil. Nato smo z 0,1 M HCl dopolnili do oznake. Iz tako pripravljenih raztopin DPL z znano koncentracijo smo z nadaljnjim redčenjem pripravili 14 raztopin s koncentracijami DPL med 1 - 140 mg/l. Ustrezno količino osnovne raztopine smo z avtomatsko pipeto prenesli v merilno bučko ter ji dodali ustrezno količino 0,1 M HCl, tako, da je skupni volumen kisline v bučki predstavljal 75 % celotnega volumna končne raztopine. Tik pred merjenjem absorbance s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni smo raztopino do oznake dopolnili z 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Absorbanco smo odčitali pri obeh maksimumih za DPL, ki sta, glede na dobljene spektre, pri 292 nm in 416 nm, ter jo skupaj s točno koncentracijo DPL v

raztopini vnesli v graf. S pomočjo linearne regresije smo pri obeh omenjenih valovnih dolžinah izračunali enačbi umeritvenih premic ter kvadrata Pearsonovega koeficienta korelacije.

#### 3.2.4 Priprava razredčin natehte DPL v različnih medijih

Za potrebe poskusov določanja "orientacijske topnosti" DPL (izraz je razložen v poglavju 3.2.5 *Določanje "orientacijske topnosti" DPL*) v različnih medijih smo si pripravili razredčine ene natehte DPL v vseh uporabljenih medijih 1-10, ki so predstavljeni v nadaljevanju v preglednici III.

Za pripravo natehte DPL smo natančno natehtali približno 20 mg DPL, ga kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko ter z 0,001 M HCl dopolnili nekje do polovice. Raztopino smo za nekaj minut izpostavili ultrazvoku, da se je DPL povsem raztopil. Nato smo z 0,001 M HCl dopolnili do oznake. Tako pripravljeno raztopino DPL smo nadalje redčili z mediji 1-10. Z avtomatsko pipeto smo v ločene 50 mL merilne bučke prenesli po 5 mL raztopine DPL in do oznake dopolnili s posameznim medijem 1-5. Prav tako smo v ločene 50 mL merilne bučke z avtomatsko pipeto prenesli po 2,5 mL raztopine DPL in bučke do merilne oznake dopolnili s posameznim medijem 6-10. Tako pripravljenim razredčinam ene natehte DPL v različnih medijih smo izmerili absorbanco z uporabo kivete in z uporabo potopne sonde z optičnimi vlakni.

#### 3.2.5 Določanje "orientacijske topnosti" DPL

Preverjali smo vpliv pH in vpliv sestave medijev na "orientacijsko topnost" DPL. Z izvedenimi poskusi določanja topnosti DPL nismo določili prave ravnotežne topnosti DPL, ampak imajo dobljeni rezultati le orientacijsko vrednost (podrobneje razloženo v poglavju 5.2 *"Orientacijska topnost" dipiridamola*). V sklopu naloge zato za vrednost koncentracije DPL v posameznem mediju po 24- oziroma 48-urnem stresanju vzorcev uporabljamo izraz "orientacijska topnost" DPL.

Za izvedbo poskusov določanja "orientacijske topnosti" DPL smo si pripravili 10 različnih medijev, ki so predstavljeni v preglednici III. Poleg je podan tudi podatek o tem, v kakšni obliki je bil prisoten DPL v vzorcu po končanem stresanju.



**Preglednica III:** Mediji, uporabljeni pri določanju "orientacijske topnosti" DPL.

Oznaka medija	Medij	Približna zatehta DPL	Redčenje po centrifugiranju	Raztopina / Oborina
1	DMB pH = 7,5	1 mg	3×	oborina
2	fosfatni pufer pH = 6,8	1 mg	3×	oborina
3	DMB pH = 6,8	1 mg	3×	oborina
4	DMB pH = 6	1 mg	3×	oborina
5	DMB pH = 5	1 mg	30×	oborina
6	DMB pH = 4	1 mg	30×	oborina
7	DMB pH = 3	3 mg	30×; vzorec po 48 h 60×	raztopina
8	0,001 M HCl (pH približno 3)	2 mg	30×	oborina
9	0,01 M HCl (pH približno 2)	3 mg	30×; vzorec po 48 h 60×	raztopina
10	0,1 M HCl (pH približno 1)	3 mg	30×; vzorec po 48 h 60×	raztopina

V 2 mL mikrocentrifugirke smo natehtali približno 1 mg DPL za medije 1-6, približno 2 mg za medij 8 ter približno 3 mg DPL za ostale uporabljene medije s  $\text{pH} \leq 3$ . Z avtomatsko pipeto smo vanje dodali po 1,5 mL pripravljenega medija. Mikrocentrifugirke smo postavili v predhodno ogret stresalnik na 37 °C. Nastavili smo frekvenco stresanja na 30 rpm ter amplitudo tresenja na 2. Vzorce smo na temperaturi 37 °C stresali 24 h in 48 h. Ob koncu stresanja smo mikrocentrifugirke hitro prenesli v centrifugo, predhodno ogreto na 37 °C. Centrifugirali smo 10 min na 10000 x g. Zaradi želene preprečitve nadaljnega obarjanja oziroma raztapljanja DPL v izbranem mediju, ki bi lahko poteklo še pred analizo vzorcev, smo vzorce takoj po centrifugiranju redčili z istim medijem, kot je bil že uporabljen pri poskusu topnosti. Z avtomatsko pipeto smo v epruvete odmerili po 2 mL medijev 1-4 ter po 4,35 mL medijev 5-10. V tako pripravljene epruvete smo z avtomatsko pipeto takoj po centrifugiranju vzorcev odpipetirali po 1 mL supernatanta v medije 1-4 ter po 0,15 mL supernatanta v medije 5-10 ter jih tako redčili 3-krat oziroma 30-krat. Redčene vzorce smo analizirali spektrofotometrično s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni. Enak postopek redčenja vzorcev smo ponovili tudi po 48-urnem stresanju vzorcev, vendar pa so bile vrednosti absorbanc vzorcev v medijih 7, 9 in 10 visoke, zato smo se odločili za dodatno 2-kratno redčenje vzorcev z istim medijem.

### 3.2.6 Analiza vzorcev preliminarnih poskusov določanja "orientacijske topnosti" DPL

Absorbanco DPL v preliminarnih poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih smo določali spektrofotometrično. Uporabili smo UV-VIS

spektrofotometer Agilent 8453, pred analizo pa smo vzorce prenesli v 4 mL kiveto z dolžino stranice 1 cm. Pred vsako meritvijo absorbance vzorca smo najprej izbrisali ozadje s slepo raztopino, tj. izbran medij brez DPL. Za vsak vzorec smo nato izmerili spekter v območju 200 nm – 600 nm. Koncentracijo DPL v izbranih medijih smo izračunali s pomočjo vrednosti absorbanc pripravljenih razredčin natehte DPL pri izbranih valovnih dolžinah.

### 3.2.7 Izvedba poskusov obarjanja DPL iz raztopine

Priprava raztopin DPL pri izvedbi poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine je potekala po naslednjem postopku. V 100 mL merilni valj smo odmerili 100 mL osnovne raztopine HCl, prenesli približno 90 mL HCl v 150 mL čašo z notranjim premerom 55 mm in vanjo dodali magnet z dolžino 25 mm ter premerom 8 mm. Čašo smo pokrili s pripravljenim stiropornim pokrovom z odprtini in jo namestili na vodno kopel, segreto na 37°C. Pri tem smo čašo v kopel namestili s pomočjo pripravljenega oboda za čašo iz stiropora. Pri vseh poskusih smo uporabili isto 150 mL čašo s stiropornim pokrovom in obodom ter isti magnet. Našteta oprema predstavlja naš delovni sistem, zato v nadaljevanju čašo imenujemo kar delovna čaša. Raztopino HCl v delovni čaši smo mešali pri 100 rpm. Na tehtič smo natehtali ustrezno količino DPL in ga, s pomočjo preostalega HCl v merilnem valju, kvantitativno prenesli v delovno čašo s HCl. Zvišali smo hitrost mešanja na 400 rpm in počakali približno 10 – 15 min, da se je DPL v celoti raztopil. Nato smo hitrost mešanja znižali nazaj na 100 rpm ter pričeli poskus. Z avtomatsko pipeto smo hitro dodali ustrezno količino  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , s katero smo dvignili pH medija na 6,8 in začeli z merjenem časa. Ob časovnih točkah 1, 2,5, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 in 40 min smo v preiskovani disperziji opravili meritev s potopno sondo z optičnimi vlakni oziroma tik pred tem opravili še vzorčenje iz čaše (kot je podrobneje opisano v nadaljevanju v poglavju 3.2.8 *Vzorčenje*).

Shema izvedbe poskusov s predstavljenimi pogoji izvedbe je prikazana v preglednici IV, pri čemer posamezna črkovna oznaka poskusa predstavlja ločen sklop poskusov. Zaradi kompleksnosti zasnove poskusov se je izvedba določenih sklopov poskusov razlikovala glede na zgoraj opisan postopek. Vpeljane spremembe v postopku poskusov so opisane v nadaljevanju tega poglavja.

**Preglednica IV:** Shema izvedbe poskusov, namenjenih analizi obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v odvisnosti od časa ob naalkaljenju medija do pH = 6,8 +/- 0,05. Oznake posameznih poskusov so sistematično določene: Z-začetek, K-koncentracija DPL, D-delci, F-filtracija, R-redčenje, M-mešanje disperzije, P-polimeri, S-sistem. Podroben postopek izvajanja poskusov je opisan v sklopu poglavja 3.2.7 Izvedba poskusov obarjanja DPL iz raztopine.

Oznaka poskusov	Naprava		Koncentracija DPL [mg/L]				Kisla komponenta medija – molarnost HCl in količina [mL]		Bazična komponenta medija – molarnost Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in količina [mL]				Polimer dodan mediju		Hitrost mešanja raztopine [rpm]		Filtracija <sup>2</sup> - velikost por [µm]				Redčenje <sup>2</sup>	
							0,1 M	0,01 M	0,2 M		0,4 M	0,6 M	HPMC	PVP	100	1200	0,2	0,45	0,8	1,0	Z medijem	Z 0,01 M HCl
	100	100	33	3	1,5	1																
Z1a-Z1c <sup>1</sup>	x					x	x		x					x	x					x		
Z2a-Z2c	x					x	x		x					x	x					x		
K1a-K1c	x		50				x		x					x								
K2a-K2b	x			75			x		x					x								
K3a-K3b	x				110		x		x					x								
K4a-K4b	x		65					x		x				x								
K5a-K5c	x			x				x		x				x								
K6a-K6b	x				100			x		x				x								
D1a-D1c	x			x				x			x			x								
F1a-F1c	x					x		x		x				x					x		x	
F2a-F2e	x					x		x			x			x		x					x	
F3a-F3c	x					x		x			x			x			x				x	
F4a-F4c	x					x		x			x			x				x			x	
F5a-F5c	x					x		x			x			x					x		x	
R1a-R1c	x			x				x			x			x			x				x	
R2a-R2c	x			x				x			x			x			x				x	
R3a-R3f	x			x				x			x			x				x			x	
R4a-R4d	x			x				x			x			x				x			brez	
M1a-M1c	x					x		x			x				x		x				x	
M2a-M2c	x					x		x			x				x						x	
P1a-P1c	x			x				x				x						x				
P2a-P2d	x			x				x				x		x								
S1a-S1e	x			x				x						x								
S2a-S2c		x		x				x						x								
S3a-S3c		x		x				x						x								

<sup>1</sup>...poskus brez uporabe stiropornega oboda za delovno čašo

<sup>2</sup>...pri poskusih brez filtracije in redčenja vzorcev smo merjenje s potopno sondo izvajali neposredno v delovni posodi

Pri poskusih z oznako M1-M2 smo spremljali vpliv hitrosti mešanja raztopine disperzije na potek obarjanja DPL. V skladu s tem se je disperzija namesto pri 100 rpm mešala pri 1200 rpm. Z izjemo smo pri poskusih M1-M2 zaradi bolj izrazitega mešanja disperzije uporabili višjo 250 mL čašo z enakim premerom dna.

Prav tako se je potek izvedbe poskusov od zgornjega razlikoval pri poskusih P1-P2, pri katerih smo spremljali spremembo v obarjanju DPL ob prisotnosti polimerov. V raztopino HCl smo pred dodatkom DPL dodali približno enako količino izbranega polimera HPMC oziroma PVP, tako, da sta bila DPL in polimer v končni raztopini v masnem razmerju 1+1. Po nekaj minutnem mešanju pri 400 rpm smo v raztopino dodali še natehtan DPL in poskus nadaljevali po zgornjem opisanem postopku.

Največjo spremembo v izvedbi poskusov pa smo vpeljali pri poskusih S2, pri katerih smo zamenjali celotno delovno napravo. Namesto delovne čaše smo uporabili aparat za sproščanje USP II z vesli. V 1000 mL merilni valj smo odmerili 900 mL 0,01 M HCl. Skoraj celotno količino smo prenesli v posodo. Na tehtič smo natančno natehtali približno 48,5 mg DPL in ga s pomočjo preostalega HCl v merilnem valju kvantitativno prenesli v posodo. Nastavili smo obrate mešanja na 100 rpm in počakali, da se je DPL popolnoma raztopil. Nato smo z avtomatsko pipeto hitro dodali ustrezno količino  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , s katero smo dosegli dvig pH medija na 6,8. Pričeli smo z merjenjem časa in v enakih časovnih točkah, kot pri poskusih v čaši (1, 2,5, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 in 40 min), analizirali vzorce s potopno sondo z optičnimi vlakni. Aparat za sproščanje USP II smo uporabili tudi pri poskusih z oznako S3, pri katerih smo pred dodatkom DPL v raztopino HCl dodali še približno enako količino polimera HPMC. Nato smo poskuse nadaljevali po enakem postopku kot poskuse S2.

### 3.2.8 Vzorčenje

Analizo vzorcev pri določenih poskusih smo izvedli s potopno sondo z optičnimi vlakni neposredno v preiskovani disperziji. Poleg poskusov P1-P2 in S1-S3 smo tak način merjenja uporabili še pri poskusih K1-K6, pri katerih smo spremljali potek obarjanja DPL v odvisnosti od njegove izhodne koncentracije, in pri poskusu D1, s katerim smo želeli preveriti vpliv oborjenih delcev v disperziji na dobljene vrednosti absorbanc.

Nasprotno smo pri ostalih sklopih poskusov pred merjenjem absorbance s potopno sondo z optičnimi vlakni opravili vzorčenje in filtracijo odvzetih vzorcev ter v večini primerov tudi redčenje vzorcev. Vzorčenje in filtracijo vzorcev smo izvajali po naslednjem postopku. Iz

preiskovane disperzije v delovni čaši smo ob časovnih točkah 1, 2,5, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 in 40 min z 2,5 mL brizgo vzorčili približno 1,5 mL vzorca. S pomočjo različnih filtrov smo vzorec nato filtrirali v epruveto, še pred tem pa smo prvi dve kapljici filtriranega vzorca zavržli. Filtracijo odvzetih vzorcev iz delovne čaše v različnih časovnih točkah smo izvajali s pomočjo nastavkov s premerom 13 mm, v katere smo vstavili celulozno-acetatne membranske filtre z velikostjo por 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  ali 0,8  $\mu\text{m}$ . Ti filtri so hidrofilni in kompatibilni z vodnimi raztopinami pH od 4 do 8 (16). Isti filter smo uporabili za filtracijo dveh časovnih točk. Po odstranitvi membranskega filtra smo nastavek za filter sprali s približno 5 mL etanolom in nato še z isto količino uporabljenega medija brez DPL.

Po končani filtraciji je sledilo redčenje vzorcev. Še pred začetkom poskusa smo si pripravili isti medij brez DPL, kot je bil tisti, v katerem smo izvajali poskus. Nato smo v epruvete z avtomatsko pipeto odmerili po 2 mL medija. Vanje smo ob vzorčenju v posamezni časovni točki dodali 0,5 mL filtriranega vzorca. Vzorec smo nato dobro premešali in mu takoj pomerili absorbanco s potopno sondo z optičnimi vlakni. Na tak način je analiza vzorcev potekala pri poskusih z oznako R1 in R3, pri sklopu poskusov z oznako F1-F4, s katerim smo želeli preveriti porazdelitev velikosti oborjenih delcev DPL v raztopini s pomočjo različnih velikosti filtrov in pri sklopu poskusov M1-M2.

Sklop poskusov z oznako R1-R4 je bil namenjen primerjavi dobljenih vrednosti absorbanc pri različnih načinih redčenja filtriranih vzorcev. V skladu s tem smo pri poskusu R2 vzorec namesto z medijem, s katerim smo dosegli končni pH vzorca 6,8, redčili z enako količino 0,01 M HCl, pri čemer je bil končni pH redčenega vzorca 2,48. Z namenom preveritve ustreznosti redčenja vzorca na vrednost rezultatov smo izvedli še poskus R4 brez redčenja vzorca. Tem vzorcem smo takoj po filtraciji pomerili absorbanco s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni.

### 3.2.9 Analiza vzorcev

Za analizo vzorcev smo uporabili spektrofotometer Agilent Cary 60, pri čemer smo meritve izvedli s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni z dolžino poti 0,5 cm. Za merjenje absorbanc vzorcev smo uporabljali program Scan, s katerim smo dobili podatke vrednosti absorbanc v celotnem spektru. Izbrane nastavitve programa so predstavljene v preglednici V.

**Preglednica V:** Nastavitve programa Scan pri merjenju spektra DPL v vzorcih.

Območje spektra	200 – 600 nm
Interval podatkov	2,0 nm
Čas merjenja signala pri eni valovni dolžini (»signal averaging«)	0,150 s
Hitrost snemanja	800 nm/min

Predhodno smo preizkusili več različnih nastavitvev merjenja in ugotovili, da so bili pri zgornjih nastavitvah spektri vzorcev najbolj ustreznih oblik – krivulja je bila najbolj gladka, hitrost snemanja spektrov pa primerna za izvajanje poskusov.

Tako redčene kot neredčene vzorce smo s sondo z optičnimi vlakni analizirali neposredno v epruveti ali v delovni čaši.

Pri poskusih z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l in pri poskusih, pri katerih smo želeli preveriti vpliv redčenja vzorcev na dobljene rezultate smo opravili vzorčenje in filtracijo, s čimer smo se izognili vplivu delcev na rezultate meritev.

Pri analiziranju vzorcev smo pazili, da v režo sonde ni bil ujet kakšen zračni mehurček, ki sicer moti merjenje. Med vsakim merjenjem smo zaradi nabiranja delcev v reži sonde, le-to sprali najprej z etanolom in nato še s prečiščeno vodo. Sondo smo previdno obrisali in nadaljevali z naslednjim vzorcem. Po zaključenih meritvah smo koncentracijo DPL v vzorcih preko dobljenih vrednosti absorbanca izračunali s pomočjo prej pripravljene umeritvene premice. Pri vseh vzorcih je bila skozi celoten spekter merjenja upoštevana tudi vrednost bazne linije, posnete s slepim vzorcem.

### 3.2.10 Izvedba poskusov določanja velikosti delcev DPL z analizatorjem velikosti delcev

Del poskusov je bilo usmerjenih v preučitev porazdelitve velikosti oborjenih delcev DPL ob dvigu pH medija na 6,8. Za pridobitev rezultatov smo uporabili analizator velikosti delcev Mastersizer s celico za majhne volumne tekočih vzorcev. Analizator velikosti delcev s pomočjo laserskega žarka in nadaljnjih kotnih razlik v intenziteti razpršene svetlobe preračuna velikost delcev v vzorcu, ki je izražena z volumskim deležem vseh delcev (17),(18). Le-ti se formirajo v pretočni celici in ves čas krožijo po cevkah. Vzorec se v posodi celoten čas trajanja poskusa meša na zelenih obratih. Premajhni ali preveliki obrati mešanja so lahko vzrok za nastanek zračnih mehurčkov, ki potujejo do vzorčne celice in motijo merjenje. Omejitve predstavlja tudi koncentracija vzorca, ki mora biti zadostna, da dosežemo minimalno vrednost zatemnitve (»obscuration«, OBS), to je približno 10 % (17) (slovenskega termina za angleški izraz »obscuration« ni, zato v okviru

naloge uporabljamo izraz zatemnitev kot prevod iz angleškega jezika). Pri izvedbi poskusov na analizatorju velikosti delcev moramo upoštevati, da omejitev predstavlja tudi zgornja meja vrednosti zatemnitve. Proizvajalci naprave kot najprimernejše vrednosti zatemnitve priporočajo območje med 10 in 30 % (17). Vrednost zatemnitve predstavlja frakcijo izgubljene svetlobe iz žarka, do katere pride zaradi prisotnosti delcev v disperziji (18).

Nastavitve analizatorja velikosti delcev so podane v preglednici VI.

**Preglednica VI:** Nastavitve analizatorja velikosti delcev pri analizi velikosti oborjenih delcev DPL.

Oznaka leče	300RF
Območje snemanja	50 nm – 880 μm
Izbran sistem refrakcijskih indeksov	1,5960; 0,1000; 1,3300
Analiza	polidisperzna
Žarek	2,40 mm
Gostota	1,347 g/cm <sup>3</sup>

Pri pripravi vzorcev smo v tehtič najprej natančno zatehtali količino DPL, s katero smo dosegli želeno izhodno koncentracijo DPL v mediju. Kvantitativno smo ga prenesli v 100 mL merilno bučko, ga raztopili v 0,01 M HCl in bučko dopolnili do oznake. Količina uporabljenega medija za pripravo vzorca je bila enaka kot v primeru priprave vzorcev za spremljanje obarjanja DPL v delovni čaši. Na analizatorju velikosti delcev smo najprej posneli slep vzorec, v našem primeru je bila to prečiščena voda. Nato smo v posodo zlili celotno raztopino DPL v HCl in nastavili obrate mešanja na 1000 rpm ali 1200 rpm. Prepričali smo se, da vsaj v vidnem delu cevk ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov. Z avtomatsko pipeto smo hitro dodali ustrezno količino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter začeli z merjenem časa. Ob časovnih točkah 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27 in 30 min smo opravili meritev porazdelitve velikosti delcev na napravi ter jih nadalje analizirali v programu Excel.

Shema izvedbe poskusov na analizatorju velikosti delcev, skupaj s pogoji izvedbe, je predstavljena v preglednici VII.

**Preglednica VII:** Shema izvedbe poskusov na analizatorju velikosti delcev, namenjenih analizi spremembe velikosti delcev pri obarjanju DPL ob naalkaljenju medija do pH = 6,8 +/- 0,05.

Oznaka poskusa	Bazična komponenta medija			Hitrost mešanja vzorca	
	0,2 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1000 rpm	1200 rpm
<b>A1a-A1e</b>	×				×
<b>A2a-A2h</b>		×			×
<b>A3a-A3f</b>			×		×
<b>A4a-A4f</b>		×		×	

## 4 REZULTATI

### 4.1 Umeritvena premica za DPL v mediju z Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> s pH 6,8

V preglednici VIII sta predstavljeni enačbi umeritvenih premic v mediju s 75 % 0,1 M HCl in 25 % 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Enačbi premic sta določeni za valovni dolžini 292 nm in 416 nm, meritev absorbanca pa smo izvedli s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni.

*Preglednica VIII: Enačbi umeritvenih premic za vrednosti absorbanca pri valovnih dolžinah 292 nm in 416 nm.*

Medij	Valovna dolžina	Enačba umeritvene premice	R <sup>2</sup>	Konc. območje (mg/l)
0,1 M HCl + 0,2 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 3 + 1	292 nm	Enačba 1: $c_{DPL} = \frac{A_{292nm} - 0,012}{0,0237}$	0,9991	1,02 – 71,33
	416 nm	Enačba 2: $c_{DPL} = \frac{A_{416nm} - 0,0006}{0,0068}$	0,9993	1,02 – 60,36

#### 4.1.1 Izračun koncentracij DPL z enačbama obeh umeritvenih premic

V preglednici IX je predstavljena primerjava vrednosti koncentracij DPL v disperziji, izračunanih z vrednostmi izmerjenih absorbanca pri 292 nm in 416 nm s pomočjo obeh enačb umeritvenih premic.

*Preglednica IX: Primerjava vrednosti koncentracij DPL v disperziji pri poskusu F3a. A<sub>292nm</sub> in A<sub>416nm</sub> predstavljata vrednosti absorbanca 5-krat redčenih vzorcev pri 292 nm in 416 nm v izbranih časovnih točkah, c<sub>1</sub> in c<sub>2</sub> pa koncentracijo DPL, izračunano s pomočjo obeh umeritvenih premic.*

t (min)	A <sub>292nm</sub>	C <sub>1</sub> (mg/l)	A <sub>416nm</sub>	C <sub>2</sub> (mg/l)
1	0,336	<b>68,39</b>	0,093	<b>67,93</b>
2	0,330	<b>66,99</b>	0,092	<b>66,91</b>
4	0,328	<b>66,57</b>	0,090	<b>65,55</b>
6	0,216	<b>42,97</b>	0,059	<b>42,80</b>
8	0,150	<b>29,18</b>	0,041	<b>29,40</b>
10	0,130	<b>24,96</b>	0,036	<b>25,99</b>
12	0,119	<b>22,51</b>	0,032	<b>23,39</b>
15	0,104	<b>19,42</b>	0,028	<b>20,09</b>
17	0,098	<b>18,22</b>	0,027	<b>19,23</b>
20	0,099	<b>18,45</b>	0,028	<b>20,25</b>
25	0,086	<b>15,71</b>	0,025	<b>18,20</b>
30	0,089	<b>16,23</b>	0,028	<b>20,08</b>
40	0,075	<b>13,39</b>	0,021	<b>14,63</b>

### 4.2 "Orientacijska topnost" DPL

V preglednicah X in XI so predstavljeni rezultati preliminarnih poskusov določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih. Preglednica X prikazuje rezultate dveh paralel poskusa, pri katerih smo redčenje vzorcev in merjenje absorbanca izvedli po izpostavitvi vzorcev sobni temperaturi, preglednica XI pa rezultate dveh paralel poskusa,



pri katerih so bili vzorci ves čas poskusa do redčenja vzorcev izpostavljeni temperaturi 37 °C. Meritve absorbanc pri izbranih valovnih dolžinah smo opravili na spektrofotometru z uporabo kivete. V preglednicah so prikazani le rezultati vzorcev, v katerih je bila po končanem 24-urnem stresanju prisotna oborina DPL.

**Preglednica X:** Vrednosti koncentracij DPL pri preliminarnih poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih, pri čemer smo vzorce pred redčenjem in meritvijo absorbance izpostavili sobni temperaturi.

<b>IZPOSTAVITEV SOBNI TEMPERATUR</b>					
Medij	koncentracija DPL po 24h stresanja (mg/l)		Povprečje (mg/l)	Stdev	RSD (%)
	paralela 1	paralela 2			
<b>DMB pH = 7,5</b>	6,46	5,30	5,88	0,82	14,00
<b>DMB pH = 6,8</b>	6,08	5,52	5,80	0,40	6,87
<b>fosfatni puffer pH = 6,8</b>	4,68	5,56	5,12	0,62	12,17
<b>DMB pH = 6</b>	10,48	10,43	10,45	0,04	0,36
<b>DMB pH = 5</b>	52,73	61,66	57,20	6,32	11,04
<b>DMB pH = 4</b>	310,01	343,73	326,87	23,85	7,30

**Preglednica XI:** Vrednosti koncentracij DPL pri preliminarnih poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih, pri čemer smo vzorce skozi celoten čas poskusa do redčenja vzorcev ohranjali pri 37° C.

<b>TAKOJŠNJE REDČENJE (T = 37 °C)</b>					
Medij	koncentracija DPL po 24h stresanja (mg/l)		Povprečje (mg/l)	Stdev	RSD (%)
	paralela 1	paralela 2			
<b>DMB pH = 7,5</b>	4,42	4,44	4,43	0,012	0,28
<b>DMB pH = 6,8</b>	5,51	5,18	5,35	0,235	4,39
<b>fosfatni puffer pH = 6,8</b>	5,56	5,78	5,67	0,156	2,75
<b>DMB pH = 6</b>	/*	9,79	/	/	/
<b>DMB pH = 5</b>	59,29	53,60	56,45	4,025	7,13
<b>DMB pH = 4</b>	332,35	341,90	337,12	6,757	2,00
<b>0,001 M HCl</b>	319,41	320,95	320,18	1,090	0,34

\*... napaka pri redčenju

V preglednici XII so predstavljeni rezultati ene paralele poskusa določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih po 24- in 48-urnem stresanju vzorcev na 37 °C ter nadaljnjem centrifugiranju in takojšnjem redčenju supernatantov. Meritve absorbanc pri omenjenem poskusu smo izvajali s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni. V preglednici so prikazani le rezultati vzorcev, v katerih je bila po končanem 24- oziroma 48-urnem stresanju prisotna oborina DPL.

**Preglednica XII:** Rezultati določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih.

Medij	koncentracija DPL po 24h stresanja (mg/l)	koncentracija DPL po 48h stresanja (mg/l)
DMB pH = 7,5	5,39	3,15
DMB pH = 6,8	5,74	4,93
fosfatni pufer pH = 6,8	6,59	4,05
DMB pH = 6	9,59	8,41
DMB pH = 5	56,25	59,99
DMB pH = 4	478,84	482,54
0,001 M HCl	396,77	407,57

### 4.3 Poskusi obarjanja DPL v delovni čaši

V preglednici XIII so predstavljeni rezultati preliminarnih poskusov obarjanja DPL v delovni čaši. Razlika med poskusi Z1 in Z2 je bila uporaba stiropornega oboda za čašo, katerega smo uporabili pri poskusih Z2. Z njim smo omejili premik čaše po magnetnem mešalu. Poskuse Z1 in Z2 z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l smo izvedli v 3 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XIII:** Rezultati preliminarnih poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine.

<b>Brez uporabe stiropornega oboda – poskus Z1</b>						
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	Z1a	Z1b	Z1c	povprečje		
1	43,46	51,19	47,41	47,35	3,865	8,16
2	41,72	50,06	49,52	47,10	4,671	9,92
3	42,99	50,92	48,35	47,42	4,043	8,53
4	42,13	46,65	45,32	44,70	2,325	5,20
6	28,38	39,85	26,33	31,52	7,287	23,12
8	18,21	26,00	20,21	21,47	4,048	18,85
10	15,63	20,82	17,01	17,82	2,690	15,10
15	14,91	13,86	14,47	14,42	0,529	3,67
20	12,38	14,11	12,96	13,15	0,877	6,67
25	10,89	12,65	12,18	11,91	0,912	7,65
30	10,44	13,05	12,13	11,87	1,323	11,14
<b>Z uporabo stiropornega oboda – poskus Z2</b>						
paralela t (min)	Z2a	Z2b	Z2c	povprečje	st. deviacija	RSD (%)
	Z2a	Z2b	Z2c	povprečje		
1	47,04	45,53	47,40	46,66	0,993	2,13
2	47,75	45,19	44,60	45,85	1,676	3,66
3	47,66	48,65	47,41	47,91	0,657	1,37
4	47,38	45,45	38,64	43,82	4,590	10,47
6	37,97	35,06	26,18	33,07	6,138	18,56
8	25,64	24,35	18,16	22,71	4,000	17,61
10	20,11	19,48	17,57	19,05	1,327	6,97
15	14,77	15,14	14,37	14,76	0,384	2,60
20	12,18	12,87	12,22	12,43	0,385	3,10
25	10,36	12,15	10,58	11,03	0,975	8,84
30	10,34	12,20	9,45	10,66	1,406	13,19

V preglednicah XIV in XV so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL v delovni čaši z različnimi izhodnimi koncentracijami DPL (50 – 110 mg/l). Pri poskusih, predstavljenih v preglednici XIV (poskusi K1-K3), smo za raztapljanje DPL uporabili

0,1 M HCl, pri poskusih, predstavljenih v preglednici XV (poskusi K4-K6) pa 0,01 M HCl. Za naalkaljenje raztopine DPL v HCl do pH 6,8 smo pri vseh poskusih uporabili 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Poskuse smo izvedli v 2-3 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XIV:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine pri izhodnih koncentracijah DPL 50 mg/L (poskus K1), 75 mg/l (poskus K2) in 110 mg/l (poskus K3).

<b>Izhodna koncentracija DPL 50 mg/l – poskus K1</b>						
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	K1a	K1b	K1c	povprečje		
0	99,69	97,09	96,49	97,76	1,701	1,74
2	101,34	97,18	96,64	98,38	2,572	2,61
5	101,22	97,80	94,86	97,96	3,181	3,25
10	99,66	96,35	92,20	96,07	3,737	3,89
13	98,08	94,34	86,71	93,05	5,795	6,23
15	97,34	92,85	84,65	91,61	6,431	7,02
17	94,45	89,22	80,71	88,13	6,934	7,87
19	92,62	84,77		88,70	5,553	6,26
20	91,87	81,81	74,69	82,79	8,632	10,43
22	89,95	78,76	70,04	79,58	9,981	12,54
25	84,59	74,60	67,93	75,70	8,383	11,07
27	82,65	69,83	60,39	70,96	11,170	15,74
30	79,75	66,89	55,49	67,38	12,134	18,01
35	74,18	60,66	48,46	61,10	12,863	21,05
40	66,40	53,85	43,87	54,71	11,288	20,63
45	61,32	49,85	40,61	50,59	10,372	20,50
50	54,03	44,39	36,33	44,92	8,864	19,73
60	50,95	39,01	32,09	40,68	9,545	23,46
70	46,67	36,27	29,95	37,63	8,442	22,44
140	34,81	26,18	21,15	27,38	6,912	25,24
<b>Izhodna koncentracija DPL 75 mg/l – poskus K2</b>						
paralela t (min)	K2a	K2b				
0	95,32	98,94		97,13	2,555	2,63
2	81,43	89,23		85,33	5,517	6,47
3	75,10	76,42		75,76	0,933	1,23
4	66,98	66,73		66,86	0,174	0,26
5	63,57	53,28		58,43	7,275	12,45
6	58,80	49,36		54,08	6,675	12,34
8	49,02	46,80		47,91	1,565	3,27
10	44,57	39,11		41,84	3,856	9,22
15	34,33	29,70		32,01	3,275	10,23
20	29,34	28,33		28,84	0,710	2,46
25	24,61	23,69		24,15	0,657	2,72
30	22,61	22,66		22,63	0,036	0,16
40	20,34	20,65		20,50	0,223	1,09
50	18,77	18,48		18,63	0,201	1,08
60	16,83	18,65		17,74	1,284	7,24
70	16,33	17,74		17,03	1,000	5,87
150	14,84					
<b>Izhodna koncentracija DPL 110 mg/l – poskus K3</b>						
paralela t (min)	K3a	K3b				
0	84,65	85,10		84,88	0,321	0,38
2	73,12	75,10		74,11	1,402	1,89
3	59,73	66,01		62,87	4,443	7,07
4	52,21	54,31		53,26	1,489	2,80
5	44,95	48,20		46,58	2,305	4,95
6	44,67	42,07		43,37	1,841	4,25
8	40,72	32,22		36,47	6,007	16,47

paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	K3a	K3b				
10	36,33	26,51		31,42	6,949	22,12
12	32,47	25,20		28,83	5,137	17,82
15	32,44	22,75		27,59	6,852	24,83
17	22,59	20,06		21,32	1,787	8,38
20	23,60	20,17		21,89	2,424	11,08
25	18,17	16,13		17,15	1,441	8,40
30	16,60	15,22		15,91	0,975	6,13
35	15,52	14,57		15,05	0,676	4,49

**Preglednica XV:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine pri izhodnih koncentracijah DPL 65 mg/L (poskus K4), 80 mg/l (poskus K5) in 100 mg/l (poskus K6).

<b>Izhodna koncentracija DPL 65 mg/l – poskus K4</b>						
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	K4a	K4b		povprečje		
0	98,74	98,89		98,82	0,106	0,11
2	99,11	98,44		98,77	0,474	0,48
5	99,31	96,01		97,66	2,335	2,39
10	95,74	92,14		93,94	2,547	2,71
13	92,25	83,34		87,80	6,302	7,18
15	88,39	78,05		83,22	7,310	8,78
17	84,83	74,51		79,67	7,298	9,16
19	81,17	70,82		76,00	7,319	9,63
20	79,55	68,25		73,90	7,990	10,81
22	74,78	62,73		68,76	8,519	12,39
25	68,10	58,00		63,05	7,137	11,32
27	64,20	51,46		57,83	9,008	15,58
30	56,96	46,27		51,62	7,557	14,64
35	49,91	39,88		44,89	7,092	15,80
40	43,92	33,99		38,95	7,024	18,03
45	38,04	32,19		35,11	4,131	11,76
50	34,39	28,16		31,28	4,405	14,08
60	31,55	24,19		27,87	5,205	18,68
70	29,04	22,80		25,92	4,410	17,02
120	23,56	20,19		21,88	2,385	10,90
130	23,11	98,89				

<b>Izhodna koncentracija DPL 80 mg/l – poskus K5</b>						
paralela t (min)	K5a	K5b	K5c			
	1	96,52	96,68	94,87	97,13	2,555
2	92,47	92,25	84,79	85,33	5,517	6,47
4	77,28	76,03	63,22	75,76	0,933	1,23
6	65,19	64,47	53,98	66,86	0,174	0,26
8	55,61	55,35	47,02	58,43	7,275	12,45
10	49,36	50,42	42,03	54,08	6,675	12,34
12	44,98	44,45	37,36	47,91	1,565	3,27
15	38,10	38,94	32,33	41,84	3,856	9,22
17	35,33	36,63	31,04	32,01	3,275	10,23
20	31,60	33,41	28,75	28,84	0,710	2,46
25	28,69	29,37	27,69	24,15	0,657	2,72
30	26,60	27,03	26,44	22,63	0,036	0,16
35	25,49	25,19	25,04	20,50	0,223	1,09
40	24,20	25,64	23,39	18,63	0,201	1,08

<b>Izhodna koncentracija DPL 100 mg/l – poskus K6</b>						
paralela t (min)	K6a	K6b				
	0	93,24	88,37		90,81	3,443
2	76,83	86,91		81,87	7,128	8,71
3	65,51	83,96		74,74	13,046	17,46
4	56,38	76,57		66,47	14,279	21,48
5	50,00	71,46		60,73	15,174	24,99
6	45,83	64,00		54,92	12,847	23,39

paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	K6a	K6b				
7	39,64	56,16		47,90	11,686	24,40
10	34,10	44,92		39,51	7,649	19,36
12	32,79	38,82		35,80	4,263	11,91
15	24,71	33,70		29,20	6,352	21,75
20	23,01	24,03		23,52	0,718	3,05
25	20,23	21,97		21,10	1,230	5,83
30	19,82	20,41		20,12	0,414	2,06
35	18,06	22,40		20,23	3,069	15,17
40	18,33	19,39		18,86	0,748	3,97
45	18,36	17,07		17,72	0,913	5,15
60	16,24					

V preglednici XVI so predstavljeni rezultati poskusa obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l (poskus D1). Poskus D1 se od poskusa K5, prikazanega zgoraj, razlikuje le v molarosti uporabljene raztopine Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pri poskusu D1 smo za dvig pH na 6,8 uporabili 0,4 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Poskus smo izvedli v 3 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XVI:** Rezultati poskusa obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l.

<b>merjenje s sondo neposredno v disperziji – poskus D1</b>						
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	D1a	D1b	D1c	Povprečje		
1	97,30	96,89	96,87	<b>97,02</b>	0,244	0,25
2	92,38	92,67	91,97	<b>92,34</b>	0,348	0,38
4	77,34	78,12	76,01	<b>77,16</b>	1,067	1,38
6	65,77	66,46	63,15	<b>65,13</b>	1,745	2,68
8	56,02	56,67	55,25	<b>55,98</b>	0,709	1,27
10	51,62	51,32	48,05	<b>50,33</b>	1,977	3,93
12	45,74	45,70	42,76	<b>44,73</b>	1,707	3,82
17	38,81	39,04	37,33	<b>38,39</b>	0,926	2,41
20	35,90	35,04	34,68	<b>35,20</b>	0,627	1,78
25	32,44	31,14	31,55	<b>31,71</b>	0,667	2,10
30	29,79	27,48	28,90	<b>28,72</b>	1,167	4,06
35	27,08	25,91	26,80	<b>26,60</b>	0,607	2,28
40	25,84	24,25	26,24	<b>25,44</b>	1,051	4,13

V preglednicah XVII-XIX so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l, pri katerih smo vzorce pred merjenjem absorbance filtrirali skozi različne velikosti filtrov in redčili z medijem. Za filtracijo vzorcev smo uporabili 0,2 µm (poskus F2), 0,45 µm (poskus F3) in 0,8 µm membranske filtre (poskus F1 in F4) ter 1,0 µm valjaste filtre (poskus F5). Poskuse smo izvedli v 3-5 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XVII: Rezultati prvih poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine s filtracijo vzorcev.**

<b>filtracija vzorca skozi 0,8 µm filter – poskus F1</b>						
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
	F1a	F1b	F1c	povprečje		
1	46,88	51,45	51,16	49,83	2,558	5,13
2	49,13	51,12	53,15	51,13	2,011	3,93
3	46,61	51,85	50,86	49,77	2,784	5,59
4	45,62	51,33	46,14	47,70	3,156	6,62
6	26,75	40,01	26,18	30,98	7,825	25,26
8	19,11	25,31	19,68	21,37	3,428	16,04
10	17,10	20,57	17,39	18,36	1,927	10,50
15	14,04	16,26	14,91	15,07	1,123	7,46
20	12,03	14,22	13,24	13,16	1,099	8,35
25	12,23	13,22	12,68	12,71	0,499	3,93
30	10,78	13,31	12,12	12,07	1,261	10,45

**Preglednica XVIII: Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine s filtracijo vzorcev skozi različne velikosti membranskih filtrov: 0,2 µm filter (poskus F2), 0,45 µm filter (poskus F3) oziroma 0,8 µm filter (poskus F4).**

<b>filtracija vzorca skozi 0,2 µm filter – poskus F2</b>								
paralela t (min)	% raztopljenega DPL					st. deviacija	RSD (%)	
	F2a	F2b	F2c	F2d	F2e			povprečje
1	47,28	47,18	43,16	47,22	45,78	<b>46,12</b>	1,772	3,84
2	46,32	47,04	43,14	44,33	46,53	<b>45,47</b>	1,661	3,65
4	46,03	45,16	37,60	39,44	45,75	<b>42,80</b>	3,969	9,27
6	29,71	35,16	20,77	25,19	28,92	<b>27,95</b>	5,365	19,19
8	20,17	22,14	14,73	19,67	20,59	<b>19,46</b>	2,803	14,40
10	17,26	19,23	13,06		17,52	<b>15,78</b>	3,173	20,11
12	15,57	16,51	11,36	11,81	15,47	<b>13,81</b>	2,854	20,67
15	13,43	14,44	10,42	10,14	14,35	<b>12,39</b>	2,377	19,19
17	12,60	13,60	9,65	9,29	13,27	<b>11,60</b>	2,169	18,69
20	12,75	11,88	8,29	8,91	13,31	<b>11,02</b>	2,300	20,88
25	10,86	11,31	7,34	8,85	11,61	<b>9,67</b>	2,191	22,64
30	11,22	10,42	7,08	7,25	10,92	<b>9,02</b>	2,588	28,68
40	9,26	9,51	5,49	5,46	8,57	<b>8,21</b>	1,854	22,59

<b>filtracija vzorca skozi 0,45 µm filter – poskus F3</b>								
paralela t (min)	F3a	F3b	F3c				st. deviacija	RSD (%)
	1	45,05	45,43	45,45				
2,5	43,37	44,63	46,24				1,437	3,21
4	37,60	40,56	42,97				2,689	6,66
6	22,40	25,28	25,19				1,638	6,74
8	17,98	19,30	18,84				0,671	3,59
10	16,87	17,09	16,94				0,108	0,64
12	15,08	15,29	14,82				0,233	1,55
15	13,47	13,61	12,76				0,455	3,43
17	12,91	13,23	12,37				0,431	3,36
20	12,63	13,04	11,73				0,670	5,37
25	11,69	13,03	11,23				0,939	7,84
30	11,18	11,65	11,21				0,269	2,37
40	9,86	10,76	9,43				0,679	6,78

<b>filtracija vzorca skozi 0,8 µm filter – poskus F4</b>								
paralela t (min)	F4a	F4b	F4c				st. deviacija	RSD (%)
	1	53,01	49,59	50,70				
2	49,73	46,90	48,83				1,443	2,98
4	38,89	42,36	41,14				1,762	4,32
6	23,01	24,21	25,55				1,269	5,23
8	18,46	17,25	19,73				1,242	6,72
10	15,59	15,78	16,78				0,636	3,96
12	14,14	13,80	15,23				0,745	5,18

paralela t (min)	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)	
	F4a	F4b	F4c				
15	13,03	12,70	13,91		<b>13,21</b>	0,626	4,74
17	11,87	11,81	13,64		<b>12,44</b>	1,036	8,33
20	11,42	10,40	12,15		<b>11,32</b>	0,876	7,74
25	10,83	10,71	10,63		<b>10,72</b>	0,102	0,96
30	9,92	10,39	10,82		<b>10,38</b>	0,450	4,33
40	7,83	8,80	9,44		<b>8,69</b>	0,815	9,38

**Preglednica XIX:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine s filtracijo vzorcev skozi valjaste filtre z velikostjo por 1,0  $\mu\text{m}$  (poskus F5).

filtracija vzorca skozi 1,0 $\mu\text{m}$ valjasti filter – poskus F5							
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				povprečje	st. deviacija	RSD (%)
	F5a	F5b	F5c				
1	49,30	45,39	48,89		<b>47,86</b>	2,149	4,49
2,5	38,16	29,36	38,14		<b>35,22</b>	5,074	14,40
4	27,72	18,60	17,32		<b>21,22</b>	5,670	26,72
6	14,78	9,55	10,05		<b>11,46</b>	2,885	25,17
8	7,87	5,73	7,29		<b>6,96</b>	1,108	15,91
10	6,99	4,66	4,94		<b>5,53</b>	1,274	23,04
12	6,45	3,06	2,14		<b>3,88</b>	2,273	58,55
17	2,23	2,51	3,00		<b>2,58</b>	0,389	15,05
20	2,47	0,52	2,46		<b>1,82</b>	1,121	61,71
25	2,39	0,17	1,28		<b>1,28</b>	1,110	86,51
30	2,13	-0,19	0,55		<b>0,83</b>	1,182	142,50
40	0,94	-0,77	0,34		<b>0,17</b>	0,870	508,45

V preglednici XX so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, pri katerih smo vzorce po filtraciji skozi 0,2  $\mu\text{m}$  membranski filter 5-krat redčili z medijem, s končnim pH redčenih vzorcev 6,8 (poskus R1), oziroma 5-krat redčili z 0,01 M HCl, pri čemer je bil končni pH redčenih vzorcev 2,48 (poskus R2). V preglednici XXI je predstavljena primerjava rezultatov sicer enakega poskusa z in brez redčenja vzorcev, filtriranih skozi 0,8  $\mu\text{m}$  membranski filter, pri čemer je bil končni pH redčenih (poskus R3) in neredčenih (poskus R4) vzorcev 6,8. Poskuse smo izvedli v 3-6 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XX:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z različnimi uporabljenimi mediji za redčenje vzorcev: redčenje vzorcev z medijem (poskus R1) oziroma z 0,01 M HCl (poskus R2).

redčeno z medijem (pH=6,80) – poskus R1							
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				povprečje	st. deviacija	RSD (%)
	R1a	R1b	R1c				
1	81,35	82,86	82,00		<b>82,07</b>	0,758	0,92
2	80,79	80,14	80,01		<b>80,31</b>	0,420	0,52
4	70,68	69,03	68,37		<b>69,36</b>	1,190	1,72
6	56,78	55,97	56,99		<b>56,58</b>	0,540	0,95
8	48,33	49,54	47,77		<b>48,55</b>	0,907	1,87
10	41,30	42,08	42,92		<b>42,10</b>	0,809	1,92
12	36,72	35,24	38,07		<b>36,68</b>	1,420	3,87
15	31,04	29,42	30,61		<b>30,36</b>	0,837	2,76
17	27,77	26,44	27,04		<b>27,08</b>	0,670	2,48

		% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
paralela t (min)	R1a	R1b	R1c	povprečje			
	20	22,63	22,81	22,49	<b>22,64</b>	0,160	0,71
25	19,39	20,93	20,59	<b>20,30</b>	0,811	4,00	
30	17,55	18,83	17,80	<b>18,06</b>	0,677	3,75	
40	15,65	17,05	15,51	<b>16,07</b>	0,851	5,30	
<b>redčeno s 0,01 M HCl (pH=2,48) – poskus R2</b>							
		% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
paralela t (min)	R2a	R2b	R2c	povprečje			
	1	81,06	82,79	80,26	<b>81,37</b>	1,295	1,59
2	78,30	74,09	78,53	<b>76,98</b>	2,501	3,25	
4	59,96	59,32	64,46	<b>61,25</b>	2,802	4,57	
6	54,45	50,64	57,66	<b>54,25</b>	3,515	6,48	
8	43,39	41,81	46,69	<b>43,96</b>	2,487	5,66	
10	37,98	37,44	41,75	<b>39,06</b>	2,349	6,01	
12	32,15	30,96	33,94	<b>32,35</b>	1,500	4,64	
15	25,70	27,52	29,62	<b>27,61</b>	1,962	7,11	
17	22,24	23,53	25,66	<b>23,81</b>	1,726	7,25	
20	21,26	22,67	23,04	<b>22,33</b>	0,938	4,20	
25	17,69	20,65	19,82	<b>19,39</b>	1,527	7,88	
30	16,55	19,64	18,49	<b>18,23</b>	1,564	8,58	
40	14,85	17,59	15,80	<b>16,08</b>	1,392	8,65	

Preglednica XXI: Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z in brez redčenja vzorcev.

<b>5x redčeno z medijem (pH=6,8) – poskus R3</b>									
		% raztopljenega DPL						st. deviacija	RSD (%)
paralela t (min)	R3a	R3b	R3c	R3d	R3e	R3f	povprečje		
	1	85,62	85,54	81,01	86,70	76,50	87,39	<b>83,79</b>	4,212
2,5				81,70	71,71	76,83	<b>76,75</b>	4,995	6,51
4	68,58	60,65	62,71	69,15	66,08	66,04	<b>65,54</b>	3,311	5,05
6	56,11	50,68	54,54	54,80	56,62	58,62	<b>55,23</b>	2,668	4,83
8	48,11	40,44		48,19	48,06	50,08	<b>46,98</b>	3,752	7,99
10	42,93	36,28	39,09	38,18	38,81	43,75	<b>39,84</b>	2,893	8,05
12	36,75	30,82	32,42	34,93	32,70	34,83	<b>33,74</b>	2,147	6,36
15	31,77	26,41	26,98	29,85	26,04	25,27	<b>27,72</b>	2,531	9,13
17	26,77	23,78	24,40	27,16	22,46	22,83	<b>24,57</b>	1,984	8,07
20	22,94	21,27	22,01	24,06	20,18	20,39	<b>21,81</b>	1,505	6,90
25	8,85	19,20	18,75	19,35	17,51	18,23	<b>18,65</b>	0,683	3,67
30	17,44	17,60	16,56	18,16	17,60	16,59	<b>17,33</b>	0,632	3,65
40	14,72	15,16	15,96	15,59	15,11	14,63	<b>15,19</b>	0,509	3,35
<b>Neredčeno – poskus R4</b>									
paralela t (min)	R4a	R4b	R4c	R4d			povprečje		
	1	87,35	89,00	88,19	87,16			<b>87,92</b>	0,844
2,5	83,34	87,02	87,60	85,94			<b>85,97</b>	1,887	2,19
4	72,02	83,35	80,89	77,27			<b>78,39</b>	4,921	6,28
6	61,32	74,11	72,16	64,90			<b>68,12</b>	6,023	8,84
8	51,21	64,92	61,41	54,19			<b>57,93</b>	6,326	10,92
10	44,31	58,11	54,43	47,47			<b>51,08</b>	6,312	12,36
12	37,00	50,91	47,22	41,82			<b>44,24</b>	6,100	13,79
15	29,30	43,68	39,13	35,54			<b>36,91</b>	6,069	16,44
17	25,44	37,98	34,28	31,43			<b>32,28</b>	5,291	16,39
20	22,83	32,15	29,70	28,20			<b>28,22</b>	3,942	13,97
25	19,87	25,14	23,21	25,31			<b>23,38</b>	2,529	10,81
30	18,70	23,00	21,23	23,55			<b>21,62</b>	2,184	10,10
40	15,78	20,12	18,41	20,93			<b>18,81</b>	2,277	12,11



V preglednici XXII so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l z višjo hitrostjo mešanja disperzije, tj. 1200 rpm. Vzorce smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,45 µm (poskus M1) oziroma 0,8 µm (poskus M2) ter jih 5-krat redčili z medijem. Poskuse smo izvedli v 3 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XXII:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine s hitrostjo mešanja disperzije 1200 rpm.

<b>filtracija vzorca skozi 0,45 µm filter – poskus M1</b>						
	% raztopljenega DPL				st. deviacija	RSD (%)
paralela t (min)	M1a	M1b	M1c	povprečje		
1	52,89	50,07	46,92	<b>49,96</b>	2,985	5,97
2,5	41,28	31,94	28,83	<b>34,02</b>	6,478	19,04
4	21,00	19,80	15,20	<b>18,67</b>	3,059	16,39
6	15,02	14,81	12,67	<b>14,17</b>	1,304	9,20
8	12,27	10,45	11,26	<b>11,33</b>	0,912	8,06
10	11,88	10,12	10,19	<b>10,73</b>	0,999	9,31
12	10,82	8,65	8,78	<b>9,42</b>	1,215	12,90
15	10,14	7,88	7,56	<b>8,53</b>	1,406	16,49
17	8,36	7,61	6,79	<b>7,59</b>	0,786	10,35
20	8,14	6,44	6,34	<b>6,97</b>	1,012	14,52
25	6,52	5,68	5,73	<b>5,98</b>	0,471	7,87
30	5,94	5,60	5,32	<b>5,62</b>	0,310	5,51
40	5,02	5,54	5,34	<b>5,30</b>	0,261	4,93
<b>filtracija vzorca skozi 0,8 µm filter – poskus M2</b>						
paralela t (min)	M2a	M2b	M2c	povprečje		
1	52,01	51,63	49,17	<b>50,93</b>	1,542	3,03
2,5	37,93	40,27	32,27	<b>36,83</b>	4,115	11,17
4	17,62	21,01	17,53	<b>18,72</b>	1,983	10,59
6	13,02	15,67	12,79	<b>13,82</b>	1,599	11,57
8	11,39	13,11	11,12	<b>11,88</b>	1,081	9,10
10	10,87	12,08	10,16	<b>11,04</b>	0,971	8,79
12	9,80	11,65	8,46	<b>9,97</b>	1,603	16,08
15	8,26	10,26	6,60	<b>8,38</b>	1,834	21,90
17	7,66	9,51	6,81	<b>7,99</b>	1,381	17,29
20	6,83	8,76	5,64	<b>7,08</b>	1,572	22,21
25	5,53	8,01	4,77	<b>6,10</b>	1,691	27,70
30	7,09	7,69	4,21	<b>6,33</b>	1,858	29,36
40	4,35	6,95	4,03	<b>5,11</b>	1,602	31,35

V preglednicah XXIII in XXIV so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l in z enako količino dodanega polimera HPMC (poskusa P1 in S3) oziroma PVP (poskus P2). V preglednici XXIII so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v delovni čaši, v preglednici XXIV pa rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v aparatu za sproščanje USP II. Meritve absorbanc smo izvedli s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni neposredno v delovni posodi brez vzorčenja. Poskuse smo izvedli v 3-4 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XXIII:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v delovni čaši ob dodatku polimera v raztopino.

<b>DPL : HPMC = 1 + 1 – poskus P1</b>							
paralela t (min)	% raztopljenega DPL				povprečje	st. deviacija	RSD (%)
	P1a	P1b	P1c				
1	97,93	98,28	98,88		<b>98,37</b>	0,483	0,49
2	98,74	98,29	100,38		<b>99,14</b>	1,102	1,11
4	97,60	97,35	98,25		<b>97,73</b>	0,466	0,48
6	96,48	95,84	95,48		<b>95,93</b>	0,504	0,53
8	93,10	93,04	92,59		<b>92,91</b>	0,275	0,30
10	86,18	88,24	86,71		<b>87,05</b>	1,068	1,23
12	78,66	81,47	80,09		<b>80,07</b>	1,404	1,75
15	67,36	71,86	69,59		<b>69,60</b>	2,250	3,23
17	61,73	66,04	63,59		<b>63,79</b>	2,162	3,39
20	56,09	59,24	56,11		<b>57,15</b>	1,812	3,17
25	49,43	52,02	49,21		<b>50,22</b>	1,563	3,11
30	44,95	47,47	44,39		<b>45,60</b>	1,642	3,60
40	40,58	41,56	39,26		<b>40,47</b>	1,151	2,84
<b>DPL : PVP = 1 + 1 – poskus P2</b>							
paralela t (min)	P2a	P2b	P2c	P2d	povprečje	st. deviacija	RSD (%)
1	95,29	93,26	93,87	95,11	<b>94,38</b>	0,982	1,04
2	87,51	84,66	77,68	84,93	<b>83,70</b>	4,210	5,03
4	61,57	61,30	53,48	56,68	<b>58,26</b>	3,898	6,69
6	50,11	51,53	44,79	46,38	<b>48,20</b>	3,142	6,52
8	44,85	45,18	39,95	41,41	<b>42,85</b>	2,574	6,01
10	41,25	41,45	37,90	38,44	<b>39,76</b>	1,849	4,65
12	37,90	40,67	34,52	35,33	<b>37,11</b>	2,781	7,49
15	35,04	35,58	32,55	32,09	<b>33,81</b>	1,750	5,17
17	33,17	34,06	31,64	30,98	<b>32,46</b>	1,407	4,33
20	30,65	32,24	31,41	28,95	<b>30,81</b>	1,402	4,55
25	30,00	30,35	28,91	28,43	<b>29,42</b>	0,902	3,07
30	27,57	29,66	28,57	27,18	<b>28,24</b>	1,111	3,93
40	26,81	28,06	26,40	25,49	<b>26,69</b>	1,064	3,99

**Preglednica XXIV:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v aparatu USP II ob dodatku HPMC v raztopino.

<b>DPL : HPMC = 1 + 1 (poskusi v USP II) – poskus S3</b>							
paralela t (min)	S3a	S3b	S3c		povprečje	St. deviacija	RSD (%)
1	98,29	99,78	97,93		<b>98,66</b>	0,981	0,99
2	98,67	98,53	99,27		<b>98,82</b>	0,392	0,40
4	98,49	99,05	99,05		<b>98,86</b>	0,321	0,32
6	97,63	99,22	98,04		<b>98,30</b>	0,823	0,84
8	96,05	96,97	96,30		<b>96,44</b>	0,477	0,49
10	93,44	94,85	93,99		<b>94,09</b>	0,711	0,76
12	90,29	91,47	90,23		<b>90,66</b>	0,695	0,77
15	83,73	85,32	84,43		<b>84,49</b>	0,797	0,94
17	78,73	81,39	79,15		<b>79,76</b>	1,429	1,79
20	72,26	74,97	72,69		<b>73,30</b>	1,455	1,99
25	63,14	65,35	63,67		<b>64,05</b>	1,155	1,80
30	55,22	58,67	56,29		<b>56,73</b>	1,762	3,11
40	46,88	48,96	47,71		<b>47,85</b>	1,050	2,19

V preglednici XXV so predstavljeni rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, izvedeni v delovni čaši (poskus S1) oziroma v aparatu za sproščanje USP II (poskus S2). Poskuse smo izvedli v 3-5 paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

**Preglednica XXV:** Rezultati poskusov obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v delovni čaši (poskus S1) oziroma v aparatu za sproščanje USP II (poskus S2).

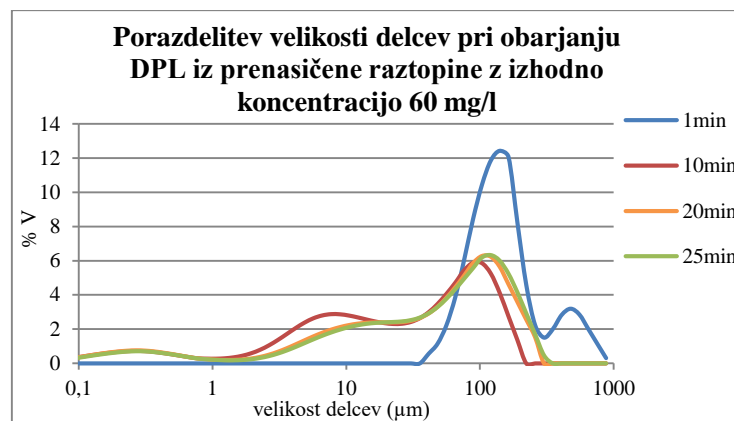
<b>poskusi v delovni čaši – poskus S1</b>									
		% raztopljenega DPL					st. deviacija	RSD (%)	
paralela	t (min)	S1a	S1b	S1c	S1d	S1e	povprečje		
1		90,96	96,05	96,39	93,19	96,57	<b>94,63</b>	2,469	2,61
2		89,15	93,31	93,44	87,17	92,71	<b>91,16</b>	2,836	3,11
4		83,57	84,56	82,53	69,41	76,23	<b>79,26</b>	6,396	8,07
6		75,52	74,20	71,27	58,63	63,34	<b>68,59</b>	7,306	10,65
8		69,02	64,23	61,67	50,25	54,70	<b>59,97</b>	7,504	12,51
10		61,23	57,18	54,37	45,36	48,08	<b>53,25</b>	6,507	12,22
12		55,44	51,53	49,06	42,14	43,06	<b>48,25</b>	5,643	11,70
15		49,38	45,63	43,30	37,12	36,61	<b>42,41</b>	5,506	12,98
17		44,78	40,32	38,35	33,79	33,63	<b>38,17</b>	4,694	12,30
20		40,51	36,03	34,73	30,13	30,75	<b>34,43</b>	4,231	12,29
25		33,90	30,88	29,69	26,90	26,88	<b>29,65</b>	2,949	9,95
30		30,71	28,39	27,79	26,19	25,86	<b>27,79</b>	1,946	7,00
40		26,99	25,29	25,57	24,74	23,41	<b>25,20</b>	1,301	5,16
<b>poskusi v USP II – poskus S2</b>									
paralela	t (min)	S2a	S2b	S2c			povprečje		
1		98,15	98,69	97,47			<b>98,10</b>	0,610	0,62
2		96,52	95,99	95,02			<b>95,84</b>	0,763	0,80
4		87,76	87,12	85,55			<b>86,81</b>	1,133	1,31
6		74,64	75,09	73,51			<b>74,41</b>	0,813	1,09
8		63,75	63,66	63,63			<b>63,68</b>	0,062	0,10
10		54,71	55,20	54,54			<b>54,81</b>	0,342	0,62
12		48,57	48,62	48,36			<b>48,52</b>	0,140	0,29
15		41,48	41,49	41,41			<b>41,46</b>	0,045	0,11
17		37,56	37,82	37,59			<b>37,66</b>	0,142	0,38
20		32,90	32,98	33,08			<b>32,99</b>	0,089	0,27
25		28,12	28,58	28,81			<b>28,50</b>	0,351	1,23
30		25,67	26,22	25,56			<b>25,82</b>	0,353	1,37
40		23,81	24,11	22,61			<b>23,51</b>	0,794	3,38

## 4.4 Analize porazdelitve velikosti delcev na analizatorju

### 4.4.1 Preliminarni poskusi vrednotenja velikosti oborjenih delcev DPL

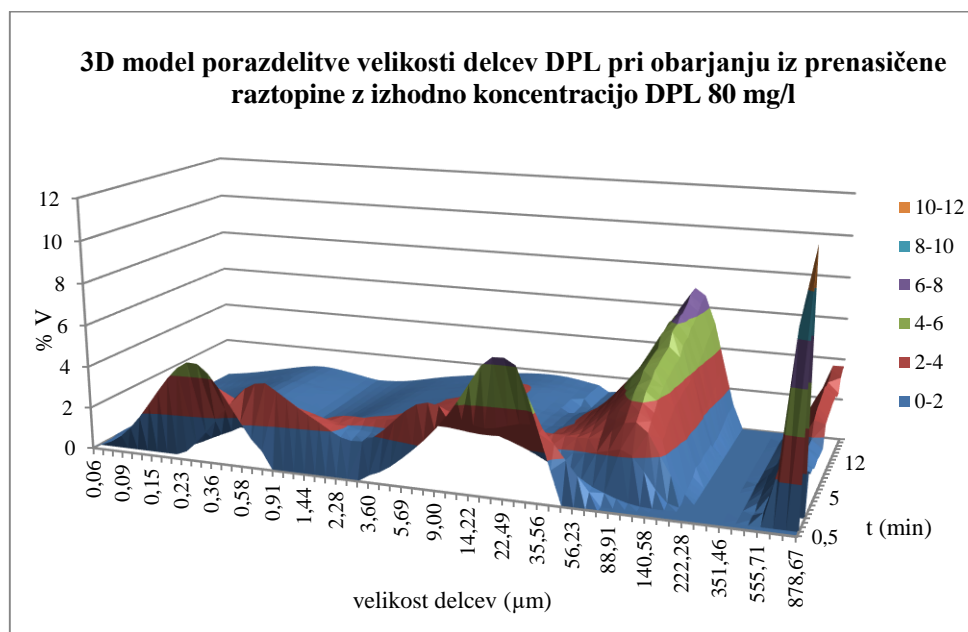
V sklopu preliminarnih poskusov na analizatorju velikosti delcev smo izvedli poskuse z različnimi izhodnimi koncentracijami DPL in preverjali ustreznost izbrane izhodne koncentracije DPL za sprožitev obarjanja.

Na sliki 2 je predstavljena velikostna porazdelitev delcev DPL pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo 60 mg/l. Različne barve krivulj prikazujejo velikost delcev v različnih časovnih točkah po naalkaljenju raztopine DPL.



**Slika 2:** Porazdelitev velikosti delcev pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 60 mg/l in mešanjem raztopine na 1200 rpm.

Na sliki 3 je predstavljen 3D model porazdelitve velikosti delcev DPL v odvisnosti od časa pri poskusu obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo 80 mg/l.



**Slika 3:** 3D model spremembe velikosti delcev pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine v mediju s  $pH = 6,8$  v odvisnosti od časa. Na y osi je prikazan volumski delež posamezne velikosti delcev glede na celoten volumen vseh oborjenih delcev (kar prikazuje tudi legenda), x os predstavlja posamezne velikosti delcev, izražene v  $\mu m$ , z os pa definira časovno komponento. Različne barve na grafu prikazujejo različne volumske deleže določenih velikosti delcev.

#### 4.4.2... Rezultati poskusov z različno koncentracijo uporabljene Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in z različno hitrostjo mešanja disperzije

V spodnjih preglednicah so predstavljeni rezultati porazdelitve velikosti delcev DPL pri obarjanju DPL iz prenasočene raztopine z izhodno koncentracijo 145 mg/l. Rezultat posamezne paralele je prikazan kot volumski delež delcev velikosti 0 – 2 μm in 30 – 260 μm glede na celotno količino delcev v disperziji v posamezni časovni točki. Iz vrednosti rezultatov posameznih paralel smo izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

V preglednici XXVI so predstavljeni rezultati poskusa A1, pri katerem smo za dvig pH uporabili 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pri mešanju disperzije z 1200 rpm.

**Preglednica XXVI: Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A1.**

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A1a	100,00	100,00	84,34	62,81	32,98	23,81	22,21	21,91	21,27	20,83	20,73	20,46	19,58	19,22	19,04	18,82	18,77	18,57
A1b	100,00		100,00	84,05	63,39	38,14	24,34	23,14	21,63	21,10	20,97	20,76	20,52	20,46	20,37	20,20	19,87	19,87	19,99	19,64	19,37
A1c	100,00		100,00	94,46	80,23	54,73	28,25	20,63	18,61	18,43	17,89	17,49	17,11	16,92	16,42	16,36	16,09	15,91	15,57	15,50	15,18
A1d	93,66		93,34	82,75	53,20	30,18	19,50	19,04	18,42	18,26	18,17	17,81	17,90	17,75	17,06	16,98	16,71	16,52	16,66	17,11	16,28
A1e	89,88		90,33	81,79	65,16	33,68	18,06	17,64	17,54	17,15	17,07	16,89	16,97	17,25	17,15	17,20	17,21	17,40	17,04	16,73	16,34
povprečje	96,71		96,73	85,48	64,96	37,94	22,79	20,53	19,62	19,24	18,99	18,74	18,59	18,39	18,04	17,96	17,74	17,69	17,57	17,45	17,03
st. deviacija	4,70		4,60	5,13	9,73	9,81	4,08	2,25	2,00	1,84	1,79	1,86	1,77	1,55	1,67	1,60	1,56	1,62	1,73	1,57	1,65
RSD (%)	4,86		4,75	6,00	14,98	25,85	17,89	10,95	10,21	9,56	9,45	9,95	9,51	8,42	9,28	8,94	8,81	9,17	9,84	9,01	9,68
30 - 260 μm	A1a	0,00	0,00	3,43	15,42	29,13	35,28	36,60	37,54	38,36	38,90	41,40	41,95	43,59	43,75	44,26	44,52	44,76	45,25	45,75	45,90
	A1b	0,00	0,00	6,82	17,72	32,70	42,72	44,49	46,37	49,02	49,06	49,22	49,77	51,77	52,41	52,73	53,41	53,56	53,40	53,83	54,41
	A1c	0,00	0,00	1,72	9,19	22,29	38,55	45,12	44,70	47,46	46,39	47,57	48,15	48,34	49,34	49,88	49,97	49,95	50,58	50,70	51,63
	A1d	6,34	6,66	11,22	27,97	37,11	42,79	42,63	43,29	42,88	43,43	43,90	44,24	43,96	44,03	44,54	45,74	45,92	46,29	46,40	47,08

<i>Ale</i>	10,12	9,67	13,64	21,95	41,35	44,41	44,37	43,89	43,97	44,04	43,63	44,19	43,50	43,66	43,63	44,43	44,53	44,69	45,36	45,77
povprečje	<b>3,29</b>	<b>3,27</b>	<b>7,37</b>	<b>18,45</b>	<b>32,52</b>	<b>40,75</b>	<b>42,64</b>	<b>43,16</b>	<b>44,34</b>	<b>44,36</b>	<b>45,14</b>	<b>45,66</b>	<b>46,23</b>	<b>46,64</b>	<b>47,01</b>	<b>47,61</b>	<b>47,74</b>	<b>48,04</b>	<b>48,41</b>	<b>48,96</b>
st. deviacija	4,70	4,60	5,05	7,04	7,34	3,75	3,50	3,35	4,17	3,77	3,18	3,20	3,70	4,02	4,06	3,95	3,91	3,78	3,71	3,87
RSD (%)	142,84	140,76	68,54	38,16	22,56	9,20	8,21	7,76	9,41	8,51	7,04	7,02	8,00	8,62	8,65	8,30	8,20	7,88	7,66	7,91

V preglednicah XXVII in XXVIII so prikazani rezultati poskusa, pri katerem smo za dvig pH uporabili 0,4 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pri mešanju disperzije z 1200 rpm. Ločeni preglednici prikazujeta rezultate paralel poskusa, izvedenih v prvem oziroma v drugem časovnem obdobju (dodatno razloženo v poglavju 5.4.1 *Preliminarni testi na analizatorju velikosti delcev*).

**Preglednica XXVII:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A2a-A2d, izvedenih v prvem časovnem obdobju. Poskus smo v prvem časovnem obdobju izvedli v štirih paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A2a	100,00	100,00	89,84	77,94	58,74	39,01	30,65	28,66	27,20	26,50	26,13	25,91	25,77	25,51	25,39	25,40	25,23	25,10
A2b	100,00		97,48	87,18	71,99	50,45	33,38	27,64	26,59	25,22	24,88	24,57	23,93	23,76	23,48	23,28	23,10	23,03	22,78	22,66	22,51
A2c	100,00		98,32	89,20	74,55	50,33	31,73	16,18	15,26	26,71	26,26	26,09	26,43	26,33	26,14	25,79	25,50	25,45	25,17	25,13	24,86
A2d	100,00		100,00	88,80	64,01	32,06	23,50	22,92	22,63	21,72	19,33	19,36	19,89	19,69	19,40	19,38	18,27	13,79	13,47	13,37	12,58
Povprečje	<b>100,00</b>		<b>98,95</b>	<b>88,75</b>	<b>72,12</b>	<b>47,90</b>	<b>31,91</b>	<b>24,35</b>	<b>23,29</b>	<b>25,21</b>	<b>24,25</b>	<b>24,04</b>	<b>24,04</b>	<b>23,89</b>	<b>23,63</b>	<b>23,46</b>	<b>23,07</b>	<b>21,88</b>	<b>21,63</b>	<b>21,56</b>	<b>21,28</b>
st. deviacija	0,00		1,26	1,14	5,93	11,27	6,42	6,31	5,91	2,48	3,35	3,21	2,97	3,01	3,04	2,94	3,38	5,50	5,55	5,58	5,92
RSD (%)	0,00		1,27	1,28	8,23	23,53	20,11	25,90	25,36	9,83	13,82	13,33	12,35	12,58	12,88	12,51	14,67	25,14	25,67	25,88	27,80
30 - 260 μm	A2a	0,00	0,00	0,01	0,39	9,43	24,72	31,14	34,97	39,10	40,04	41,39	42,18	42,77	43,20	43,65	43,99	44,43	44,84	44,98	45,20
	A2b	0,00	0,00	3,93	10,75	23,57	34,61	39,60	41,34	43,62	44,53	45,26	46,20	46,87	47,51	47,98	48,76	49,08	49,71	49,92	50,61
	A2c	0,00	0,00	0,31	6,88	19,10	31,48	41,15	43,29	38,43	39,45	40,23	39,49	39,83	40,55	41,33	42,03	42,36	42,82	43,15	43,58
	A2d	0,00	0,00	3,44	15,16	33,12	40,95	42,50	43,07	44,62	46,18	45,55	49,07	49,41	50,12	50,32	48,20	51,08	51,34	51,22	51,39
	Povprečje	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,92</b>	<b>8,28</b>	<b>20,65</b>	<b>31,91</b>	<b>38,00</b>	<b>40,17</b>	<b>41,01</b>	<b>42,33</b>	<b>42,94</b>	<b>44,17</b>	<b>44,61</b>	<b>45,30</b>	<b>45,78</b>	<b>45,72</b>	<b>46,71</b>	<b>47,16</b>	<b>47,30</b>	<b>47,67</b>
	st. deviacija	0,00	0,00	2,05	6,29	10,93	8,51	6,28	4,88	3,64	3,56	2,86	4,28	4,33	4,32	4,10	3,29	4,05	4,02	3,88	3,90
	RSD (%)	0,00	0,00	106,74	76,04	52,92	26,68	16,51	12,15	8,87	8,40	6,65	9,70	9,71	9,52	8,95	7,19	8,68	8,53	8,21	8,19

**Preglednica XXVIII:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A2e-A2h, narejenih v drugem časovnem obdobju. Poskus smo v drugem časovnem obdobju izvedli v štirih paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A2e	100,00	100,00	100,00	95,06	82,31	53,47	21,31	14,09	13,80	12,51	12,06	11,59	10,50	10,72	10,45	9,88	10,09	9,95
A2f	88,26		88,59	87,68	84,13	69,05	42,39	15,34	10,51	10,32	9,73	9,05	8,86	9,08	8,71	9,02	9,06	8,88	8,94	8,27	8,12
A2g	100,00		100,00	100,00	100,00	91,13	71,61	38,26	16,52	12,44	12,01	11,50	11,87	11,56	11,13	10,86	10,61	11,22	11,06	10,94	10,71
A2h	100,00		100,00	100,00	97,21	83,56	56,11	22,29	12,73	11,49	11,22	11,42	11,23	9,24	9,23	9,18	9,42	9,33	8,44	8,38	7,95
Povprečje	<b>97,06</b>		<b>97,15</b>	<b>96,92</b>	<b>94,10</b>	<b>81,51</b>	<b>55,90</b>	<b>24,30</b>	<b>13,46</b>	<b>12,01</b>	<b>11,37</b>	<b>11,01</b>	<b>10,89</b>	<b>10,10</b>	<b>9,94</b>	<b>9,88</b>	<b>9,74</b>	<b>9,88</b>	<b>9,60</b>	<b>9,55</b>	<b>9,07</b>
st. deviacija	5,87		5,71	6,16	6,95	9,18	12,04	9,80	2,52	1,47	1,21	1,34	1,38	1,17	1,16	0,92	0,67	1,02	1,16	1,42	1,29
RSD (%)	6,05		5,87	6,36	7,38	11,26	21,55	40,33	18,68	12,26	10,67	12,16	12,63	11,54	11,66	9,29	6,88	10,34	12,08	14,89	14,27
30 - 260 μm	A2e	0,00	0,00	0,00	3,68	8,92	23,83	42,60	47,47	51,34	55,12	59,09	60,53	62,08	63,18	64,40	63,59	64,63	63,41	63,68	65,66
	A2f	11,74	11,41	12,32	15,87	26,77	45,17	62,14	63,47	63,59	63,77	63,58	65,20	65,33	66,41	66,54	65,69	65,60	66,06	65,41	65,73
	A2g	0,00	0,00	0,00	0,00	2,28	11,05	27,80	43,48	50,60	54,31	59,01	60,24	62,47	64,37	65,42	66,35	66,47	67,09	67,68	68,35
	A2h	0,00	0,00	0,00	1,52	7,05	23,00	42,66	49,51	54,82	57,88	62,57	63,77	62,97	62,74	62,37	63,30	63,27	63,41	63,95	63,72
	Povprečje	<b>2,94</b>	<b>2,85</b>	<b>3,08</b>	<b>5,27</b>	<b>11,26</b>	<b>25,76</b>	<b>43,80</b>	<b>50,98</b>	<b>55,09</b>	<b>57,77</b>	<b>61,06</b>	<b>62,44</b>	<b>63,21</b>	<b>64,17</b>	<b>64,68</b>	<b>64,74</b>	<b>64,99</b>	<b>64,99</b>	<b>65,18</b>	<b>65,87</b>
	st. deviacija	5,87	5,71	6,16	7,23	10,71	14,20	14,08	8,69	5,96	4,28	2,36	2,44	1,46	1,64	1,77	1,52	1,37	1,88	1,83	1,90
	RSD (%)	200,00	200,00	200,00	137,16	95,15	55,10	32,15	17,05	10,82	7,41	3,87	3,91	2,31	2,56	2,74	2,34	2,11	2,89	2,81	2,89

V preglednicah XXIX in XXX so predstavljeni rezultati poskusa, pri katerem smo za dvig pH uporabili 0,6 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pri mešanju disperzije z 1200 rpm. Ločeni preglednici prikazujeta rezultate paralel poskusa, izvedenih v prvem oziroma v drugem časovnem obdobju.

**Preglednica XXIX:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A3a-A3c, narejenih v prvem časovnem obdobju. Poskus smo v prvem časovnem obdobju izvedli v treh paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A3a	100,00	98,12	90,46	73,80	47,75	24,45	21,43	20,54	20,07	19,75	19,40	19,12	19,01	18,04	18,46	18,30	18,19	17,92
A3b	100,00		100,00	88,30	68,52	37,31	22,90	20,81	20,86	20,50	19,96	19,48	19,24	19,11	18,77	18,37	18,33	18,25	18,13	17,90	17,59
A3c	100,00		100,00	94,84	78,60	47,94	32,17	29,92	28,45	26,11	25,51	25,19	23,61	23,32	22,68	23,30	22,82	22,19	21,89	21,74	20,94

	povprečje	100,00	99,37	91,20	73,64	44,33	26,51	24,05	23,29	22,23	21,74	21,36	20,66	20,48	19,83	20,04	19,82	19,54	19,31	19,14	18,78
	st. deviacija	0,00	1,09	3,33	5,04	6,09	4,97	5,09	4,47	3,37	3,27	3,32	2,56	2,46	2,49	2,82	2,60	2,29	2,24	2,25	1,87
	RSD (%)	0,00	1,09	3,65	6,84	13,73	18,74	21,17	19,22	15,17	15,03	15,56	12,40	12,01	12,58	14,08	13,14	11,73	11,57	11,75	9,95
30 - 260 µm	A3a	0,00	1,88	5,27	14,23	28,52	44,05	45,16	46,33	47,41	47,76	48,64	49,59	49,58	50,98	51,60	51,64	52,13	52,59	52,97	53,14
	A3b	0,00	0,00	4,23	13,86	31,44	41,46	44,49	45,36	46,43	47,26	48,34	49,07	49,51	50,31	51,29	51,66	52,20	52,48	52,90	53,51
	A3c	0,00	0,00	0,00	2,41	11,20	19,40	23,07	25,32	28,97	31,47	31,82	33,41	34,08	35,97	35,38	36,84	38,70	39,76	40,46	41,60
	povprečje	0,00	0,63	3,17	10,17	23,72	34,97	37,57	39,00	40,94	42,17	42,93	44,02	44,39	45,75	46,09	46,71	47,67	48,28	48,77	49,42
	st. deviacija	0,00	1,09	2,79	6,72	10,94	13,55	12,56	11,86	10,38	9,26	9,62	9,20	8,93	8,48	9,28	8,55	7,78	7,37	7,20	6,77
	RSD (%)	0,00	173,21	88,14	66,10	46,12	38,74	33,44	30,41	25,35	21,97	22,42	20,89	20,12	18,52	20,13	18,30	16,31	15,27	14,77	13,70

**Preglednica XXX:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A3d-A3f, narejenih v drugem časovnem obdobju. Poskus smo v drugem časovnem obdobju izvedli v treh paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 µm	A3d	100,00	100,00	100,00	100,00	91,33	47,40	6,58	5,56	5,67	5,22	4,61	5,92	5,81	5,55	5,35	5,25	5,25	5,06
A3e	100,00		100,00	100,00	100,00	90,75	58,39	17,60	14,33	12,12	11,49	11,21	11,99	11,84	11,50	10,89	10,74	10,59	10,41	10,43	10,24
A3f	95,51		96,29	95,77	88,76	72,07	37,15	17,34	14,29	13,33	12,42	11,46	11,46	10,78	10,69	11,53	11,32	10,42	10,25	10,08	9,95
povprečje	98,50		98,76	98,59	96,25	84,72	47,65	13,84	11,39	10,37	9,71	9,09	9,79	9,48	9,25	9,26	9,10	8,75	8,57	8,51	8,37
st. deviacija	2,59		2,14	2,44	6,49	10,96	10,62	6,29	5,05	4,12	3,91	3,89	3,36	3,22	3,23	3,40	3,35	3,04	3,04	3,02	2,98
	RSD (%)	2,63	2,17	2,48	6,74	12,94	22,29	45,42	44,31	39,74	40,32	42,72	34,31	33,97	34,90	36,74	36,81	34,69	35,45	35,49	35,62
30 - 260 µm	A3d	0,00	0,00	0,00	0,00	1,03	12,28	32,45	37,90	47,46	51,84	58,50	58,71	59,15	63,39	65,34	66,26	66,26	66,20	66,78	67,75
	A3e	0,00	0,00	0,00	0,00	4,28	18,34	44,79	47,93	53,30	52,68	54,82	59,55	60,75	61,95	63,53	64,28	65,03	66,40	66,68	67,39
	A3f	1,44	1,22	1,62	5,30	13,45	29,76	46,44	51,97	52,74	52,93	54,89	54,89	62,20	62,89	65,72	66,33	67,34	68,19	68,70	68,89
	povprečje	0,48	0,41	0,54	1,77	6,25	20,13	41,23	45,93	51,17	52,48	56,07	57,72	60,70	62,74	64,86	65,62	66,21	66,93	67,39	68,01
	st. deviacija	0,83	0,71	0,93	3,06	6,44	8,87	7,65	7,24	3,22	0,57	2,11	2,49	1,53	0,73	1,17	1,16	1,15	1,09	1,14	0,78
	RSD (%)	173,21	173,21	173,21	173,21	102,99	44,09	18,54	15,77	6,30	1,09	3,76	4,31	2,52	1,16	1,80	1,77	1,74	1,63	1,69	1,15



Za poskus, katerega rezultati so prikazani v preglednicah XXXI in XXXII, smo za dvig pH uporabili 0,4 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pri mešanju disperzije z 1000 rpm. Ločeni preglednici prikazujeta rezultate poskusov izvedenih v prvem oziroma v drugem časovnem obdobju.

**Preglednica XXXI:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A4a-A4c, narejenih v prvem časovnem obdobju. Poskus smo v prvem časovnem obdobju izvedli v treh paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A4a	95,49	88,42	79,73	64,66	45,58	28,47	23,20	22,51	22,38	22,36	22,47	22,53	22,52	22,55	22,50	22,32	22,20	21,92
A4b	90,62		89,55	79,35	63,62	45,86	25,97	21,12	20,48	20,19	20,38	20,40	20,37	20,34	20,24	20,08	19,79	19,87	19,71	19,85	19,63
A4c	100,00		96,63	82,97	67,65	46,41	27,76	22,53	21,88	21,37	22,32	22,06	21,48	21,13	21,16	20,60	20,69	20,54	20,22	20,27	20,22
povprečje	95,37		91,53	80,68	65,31	45,95	27,40	22,28	21,63	21,31	21,68	21,64	21,46	21,33	21,32	21,06	20,93	20,87	20,62	20,67	20,53
st. deviacija	4,69		4,45	1,99	2,09	0,42	1,29	1,06	1,04	1,10	1,13	1,10	1,08	1,11	1,16	1,27	1,28	1,20	1,16	1,08	1,08
RSD (%)	4,92		4,86	2,47	3,21	0,92	4,70	4,76	4,82	5,14	5,21	5,06	5,03	5,18	5,43	6,05	6,12	5,75	5,62	5,22	5,25
30 - 260 μm	A4a	4,51	6,78	12,05	20,28	32,11	42,69	46,87	48,26	49,47	49,43	49,40	49,47	49,70	50,03	50,44	50,85	51,19	51,63	51,78	52,17
	A4b	9,34	10,00	14,13	23,32	34,74	42,82	45,77	46,10	47,18	47,02	47,15	46,43	46,66	46,77	46,94	47,29	47,43	47,69	48,02	48,34
	A4c	0,00	0,00	5,79	17,22	29,43	41,34	45,95	47,45	48,65	48,78	48,95	49,52	50,59	50,46	46,41	46,78	46,88	46,72	46,93	47,02
	povprečje	4,62	5,59	10,66	20,27	32,09	42,28	46,20	47,27	48,44	48,41	48,50	48,47	48,98	49,09	47,93	48,31	48,50	48,68	48,91	49,18
	st. deviacija	4,67	5,10	4,34	3,05	2,65	0,82	0,59	1,09	1,16	1,24	1,19	1,77	2,06	2,02	2,19	2,22	2,35	2,60	2,55	2,68
	RSD (%)	0,00	91,26	40,73	15,04	8,27	1,94	1,27	2,31	2,40	2,57	2,45	3,65	4,20	4,11	4,57	4,59	4,84	5,34	5,21	5,44

**Preglednica XXXII:** Rezultati poskusa porazdelitve velikosti delcev A4d-A4f, narejenih v drugem časovnem obdobju. Poskus smo v drugem časovnem obdobju izvedli v treh paralelah in iz dobljenih vrednosti izračunali povprečje, standardno deviacijo in RSD.

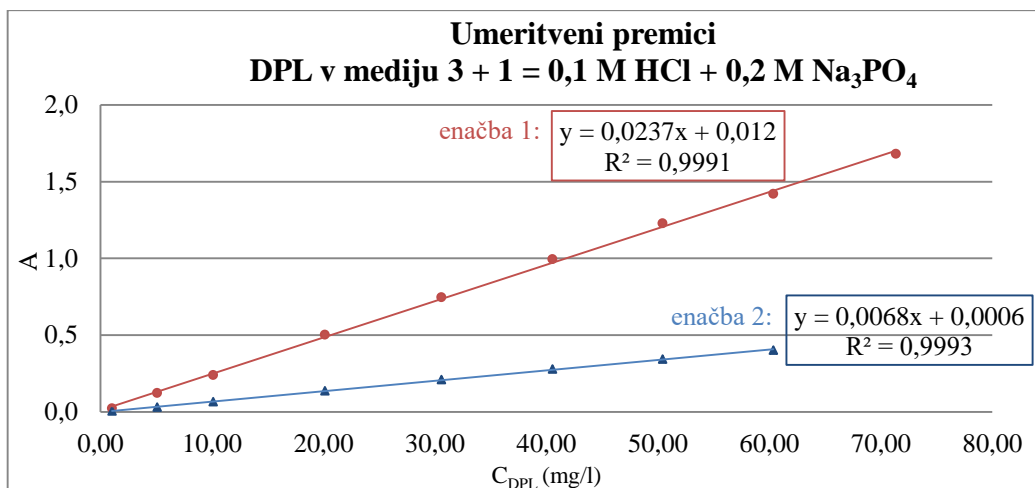
velikost delcev	t (min) paralela	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	10	12	15	17	20	22	25	27	30
		0 - 2 μm	A4d	95,10	95,39	94,65	90,84	76,54	44,03	13,89	9,36	8,84	9,54	9,05	7,97	8,22	7,41	7,64	7,54	7,64	7,58
A4e	100,00		100,00	100,00	100,00	87,00	44,13	18,18	16,46	17,00	17,30	16,61	13,04	9,91	10,15	6,99	6,29	6,95	6,85	5,89	5,31
A4f	100,00		100,00	100,00	97,64	80,98	39,10	15,06	12,86	11,97	12,10	12,70	12,49	12,20	12,32	11,37	11,33	11,17	10,98	10,60	10,42
povprečje	98,37		98,46	98,22	96,16	81,51	42,42	15,71	12,89	12,60	12,98	12,79	11,17	10,11	9,96	8,67	8,39	8,59	8,47	7,97	7,69
st. deviacija	2,83		2,66	3,09	4,75	5,25	2,87	2,22	3,55	4,12	3,95	3,78	2,78	2,00	2,46	2,37	2,63	2,26	2,20	2,40	2,57

	RSD (%)	2,88	2,71	3,14	4,94	6,44	6,77	14,13	27,54	32,66	30,47	29,55	24,90	19,77	24,69	27,31	31,32	26,36	26,01	30,10	33,50
30 - 260 $\mu\text{m}$	A4d	4,90	4,61	5,35	8,61	18,86	45,24	63,74	67,27	71,18	71,07	72,12	74,41	72,02	70,82	71,71	73,54	73,78	74,07	74,29	74,19
	A4e	0,00	0,00	0,00	0,00	3,02	26,11	45,35	48,22	44,80	44,26	48,31	51,77	47,19	53,67	40,00	66,47	73,08	67,64	68,99	67,15
	A4f	0,00	0,00	0,00	1,95	10,55	40,95	56,98	60,40	63,14	63,04	61,69	60,61	60,73	60,04	60,86	61,19	60,59	61,68	62,47	63,12
	povprečje	<b>1,63</b>	<b>1,54</b>	<b>1,78</b>	<b>3,52</b>	<b>10,81</b>	<b>37,43</b>	<b>55,36</b>	<b>58,63</b>	<b>59,71</b>	<b>59,46</b>	<b>60,71</b>	<b>62,26</b>	<b>59,98</b>	<b>61,51</b>	<b>57,52</b>	<b>67,07</b>	<b>69,15</b>	<b>67,80</b>	<b>68,58</b>	<b>68,15</b>
	st. deviacija	2,83	2,66	3,09	4,51	7,92	10,03	9,30	9,65	13,52	13,76	11,93	11,41	12,43	8,67	16,12	6,19	7,42	6,19	5,92	5,60
	RSD (%)	173,21	173,21	173,21	128,25	73,29	26,80	16,80	16,45	22,65	23,14	19,65	18,32	20,72	14,10	28,02	9,24	10,73	9,14	8,63	8,22

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 Umeritvena premica za DPL v mediju z $\text{Na}_3\text{PO}_4$ s pH 6,8

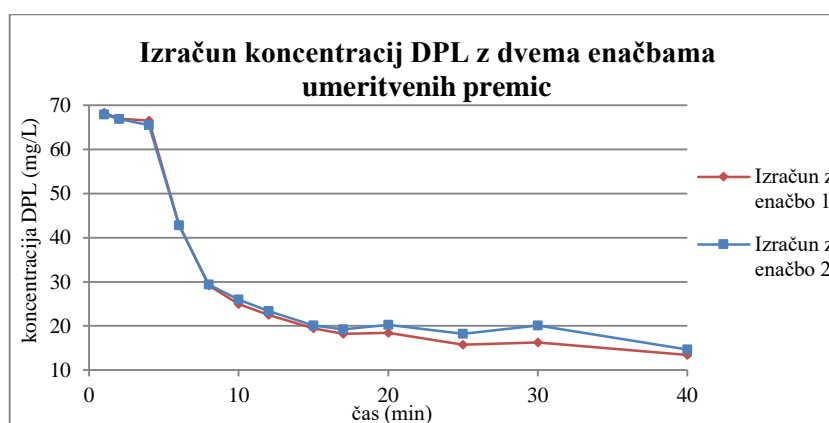
Enačbo za umeritveno premico smo določali v mediju z volumskim razmerjem  $3 + 1 = 0,1 \text{ M HCl} + 0,2 \text{ M Na}_3\text{PO}_4$ , tj. medij z 75 %  $0,1 \text{ M HCl}$  ter 25 %  $0,2 \text{ M Na}_3\text{PO}_4$ , katerega pH je bil  $6,8 \pm 0,05$ . Pripravili smo več raztopin DPL z znanimi različnimi koncentracijami DPL, z najvišjo koncentracijo  $140 \text{ mg/l}$ . Pri tem smo že pri pripravi raztopine s koncentracijo  $80 \text{ mg/l}$  opazili vidno zamotnitev raztopine, njena intenziteta pa se je z naraščanjem koncentracije raztopine večala. Vzrok temu je takojšnje obarjanje DPL ob zvišanju pH medija na 6,8. Vsem pripravljenim raztopinam smo izmerili vrednosti absorbanc, vendar pa smo v nadaljevanju za določitev umeritvene premice upoštevali le vrednosti absorbanc raztopin, pri katerih smo dosegli linearnost rezultatov. To so bile hkrati tudi raztopine, pri katerih ob dvigu pH na 6,8 nismo opazili vidne zamotnitve raztopine. Zgornjo mejo koncentracije DPL, pri kateri smo še dosegli linearnost rezultatov, smo določili s pomočjo grafičnega prikaza absorbanc pri valovni dolžini  $292 \text{ nm}$ , pri kateri spekter DPL izkazuje svoj vrh. Ugotovili smo, da je vrednost absorbance  $1,68$  zadnja, pri kateri smo še dosegli linearnost rezultatov, in predstavlja vrednost absorbance raztopine s koncentracijo DPL  $71,33 \text{ mg/l}$ . Enačbo premice smo zato določili s podatki za območje vrednosti absorbanc pri valovni dolžini  $292 \text{ nm}$  do vrednosti  $1,68$ . Zaradi prisotnosti dveh vrhov v UV-VIS spektru DPL smo določili še enačbo umeritvene premice z vrednostmi absorbanc pri valovni dolžini  $416 \text{ nm}$ . Obe premici, skupaj z enačbo in kvadratom Pearsonovega koeficienta korelacije, sta prikazani na sliki 4.



**Slika 4:** Umeritveni premici DPL v mediju iz 75 % raztopine 0,01 M HCl in 25 % raztopine 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. S pomočjo rdeče premice smo dobili enačbo umeritvene premice za vrednosti absorbcanc pri 292 nm (enačba 1), s pomočjo modre pa enačbo umeritvene premice za vrednosti absorbcanc pri 416 nm (enačba 2).

### 5.1.1 Izračun koncentracij DPL

S pomočjo obeh enačb umeritvenih premic, predstavljenih na sliki 4, smo preračunali rezultate absorbcanc DPL (pri 292 nm in 416 nm) izbranega poskusa v vrednosti koncentracij DPL in jih primerjali med seboj. Uporabili smo rezultate poskusa obarjanja DPL iz prenasičene raztopine, z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l, pri katerem smo vzorce filtrirali skozi 0,2 μm filter in jih redčili (poskus F2a). Primerjava koncentracij DPL, izračunanih z enačbama obeh umeritvenih premic je predstavljena na sliki 5. Pri izračunu z enačbo 1 smo uporabili vrednosti absorbcanc pri 292 nm, z enačbo 2 pa vrednosti absorbcanc pri 416 nm ter za vsako časovno točko dobili dve vrednosti koncentracij DPL.



**Slika 5:** Primerjava preračunanih koncentracij DPL v vzorcih s pomočjo enačbe 1 (vrednosti absorbcanc pri 292 nm) oziroma enačbe 2 (vrednosti absorbcanc pri 416 nm).

Vrednosti preračunanih koncentracij DPL, glede na različni enačbi umeritvenih premic, se med seboj ne razlikujeta bistveno. Dobljeni koncentraciji sta med seboj primerljivi v

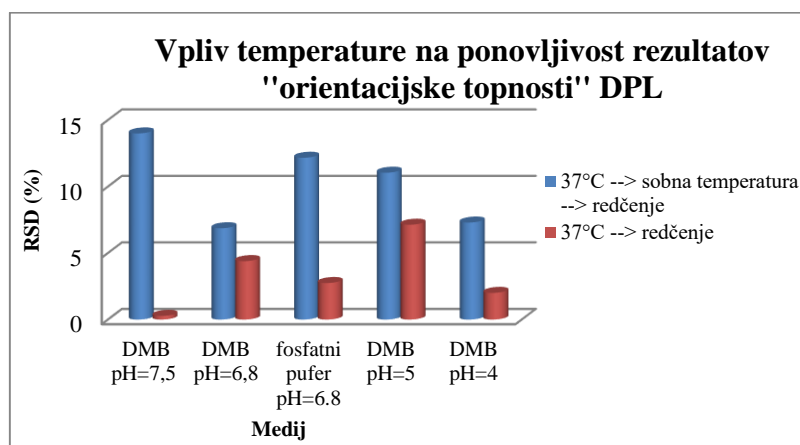
začetnih časovnih točkah, s padanjem absorbanc pa so razlike med koncentracijama večje. Prav tako opazimo tudi večje nihanje vrednosti koncentracij, izračunanih z enačbo 2, predvsem po 20-ih minutah trajanja poskusa. Razlog temu so nižje vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 416 nm v primerjavi z vrednostmi absorbanc pri valovni dolžini 292 nm. Že minimalna napaka v meritvi absorbance, katere vrednost je že tako nizka, namreč zelo vpliva na izračunano vrednost koncentracije DPL.

Zaradi omenjenih težav in izredno nizkih vrednosti absorbanc pri 416 nm, predvsem pri redčenih vzorcih, smo za izračun koncentracij pri vseh nadaljnjih poskusih uporabili enačbo 1, ki upošteva vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 292 nm. Pri izbrani enačbi umeritvene premice smo linearnost rezultatov dokazali le za vrednosti absorbanc do 1,68, kot smo opisali že zgoraj. Kljub temu pa smo jo za izračun koncentracij DPL uporabili tudi pri poskusih, pri katerih so bile vrednosti absorbanc, predvsem v začetnih časovnih točkah, izven območja umeritvene premice. Z nobeno vrednostjo absorbance se nismo bistveno oddaljili od območja umeritvene premice, vseeno pa moramo zaradi omenjenega odstopanja upoštevati možnost napake v rezultatih v začetnih časovnih točkah. Dodatno smo pri poskusih namesto medija s 75 % 0,1 M HCl in 25 % 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> s pH 6,8 uporabili medij z 0,01 M HCl in ustrezno količino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, s katero smo dosegli dvig pH medija na 6,8. Razmerje obeh komponent medija pri poskusih torej ni bilo enako kot pri pripravljenih raztopinah z znano koncentracijo DPL za določitev umeritvene premice, vendar pa smo z dodatno pripravo nateht DPL v medijih, enakih kot pri izvedbi poskusov, potrdili ustreznost umeritvene premice tudi za medij 0,01 M HCl z dodatkom Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

## 5.2 "Orientacijska topnost" dipiridamola

V preliminarnih poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL smo vzorce po koncu 24-urnega stresanja na termostatu in centrifugiranju izpostavili sobni temperaturi oziroma jih do redčenja ohranjali pri temperaturi 37 °C. Na sliki 6 so prikazane RSD vrednosti dveh paralel dveh poskusov, ki se razlikujeta v vrednosti temperatur, katerima so bili izpostavljeni vzorci DPL po končanem centrifugiranju. Pri paralelah, označenih z modro barvo, smo po centrifugiranju v predhodno ogreti centrifugi na 37 °C vzorce za nekaj časa izpostavili sobni temperaturi, nato pa je sledilo redčenje z ustreznim medijem. Čas izpostavitve vzorcev sobni temperaturi je variiral glede na čas, potreben za pripravo opreme za redčenje in analizo vzorcev. Nasprotno smo paralele označene z rdečo celoten čas poskusa od začetka stresanja na segretem termostatu do začetka redčenja z medijem

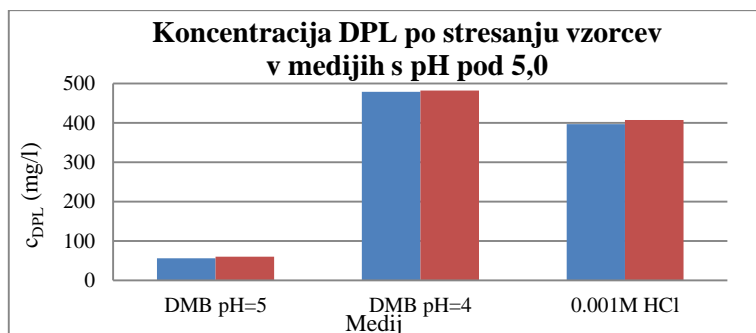
ohranjali pri temperaturi 37 °C, pri čemer ima pomembno vlogo predvsem takojšnje redčenje vzorcev. Na sliki 6 so prikazani le rezultati medijev, v katerih je bila po koncu stresanja v vzorcu prisotna oborina DPL. Rezultate smo pridobili s spektrofotometrom z uporabo kivete.



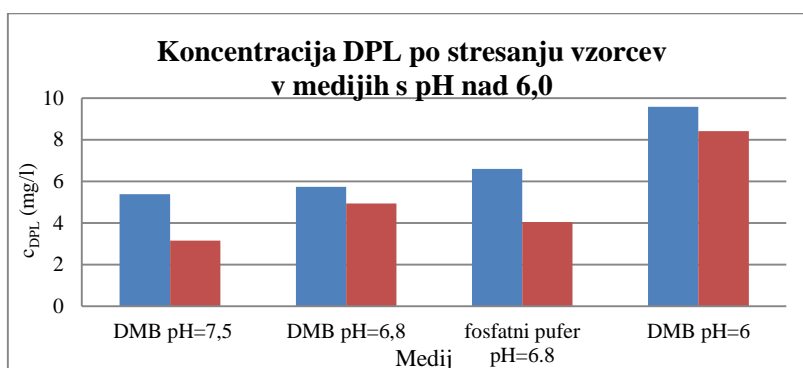
*Slika 6: Vpliv temperature izpostavljenosti vzorcev DPL na ponovljivost dobljenih rezultatov "orientacijske topnosti".*

Rezultati prikazujejo ponavljajoč trend višjih RSD vrednosti, tudi do 14 %, v vseh medijih pri poskusih, pri katerih redčenja vzorcev nismo izvedli takoj po končanem centrifugiranju, ampak smo vzorce za nekaj časa izpostavili sobni temperaturi. Z izvedenimi preliminarnimi poskusi smo torej potrdili vpliv konstantne temperature vzorcev do redčenja na boljšo ponovljivost rezultatov. V skladu s tem smo pri nadaljnjih poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL vzorce po zaključenem centrifugiranju takoj redčili s pripravljenim medijem.

V nadaljevanju smo vrednotili koncentracijo DPL v različnih medijih po 24-ih urah in po 48-ih urah stresanja na termostatu pri 37 °C. Meritve absorbanc smo izvedli s spektrofotometrom s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni. Dobljeni rezultati so prikazani na slikah 7 in 8.



**Slika 7:** Koncentracija DPL ene paralele poskusa po 24-urnem (modri stolpci) in 48-urnem stresanju vzorcev na 37 °C (rdeči stolpci). Na sliki so prikazani rezultati vzorcev, pripravljenih z mediji s pH pod 5,0.



**Slika 8:** Koncentracija DPL ene paralele poskusa po 24-urnem (modri stolpci) in 48-urnem stresanju vzorcev na 37 °C (rdeči stolpci). Na sliki so prikazani rezultati vzorcev, pripravljenih z mediji s pH nad 6,0.

Na slikah so prikazani le rezultati poskusov v medijih, v katerih je bila po končanem 48-urnem stresanju prisotna oborina DPL, kar pomeni, da smo z izbrano natehto DPL dosegli presežek topnosti DPL v izbranem mediju. Kljub višji natehti DPL v vzorcih z mediji 0,1 M, 0,01 M HCl in DMB pH 3,0 se je celotna količina natehtanega DPL v teh vzorcih namreč raztopila, zaradi česar dobljeni rezultati niso ustrezni. Po podatkih iz literature naj bi bila ravnotežna topnost DPL v vodnem mediju s pH 1,0 okrog 53 mg/mL (20). Natehta DPL 3 mg, ki smo jo pri vzorcu za ta medij uporabili v naših poskusih, je bila torej prenizka za doseg ravnotežne topnosti DPL. Glede na dobljene rezultate lahko sicer sklepamo, da obarjanje DPL v medijih s pH nad 6,0 oziroma raztapljanje DPL v medijih s pH pod 5,0 po 24-ih urah še ni zaključeno. Vrednosti koncentracij DPL po 48-ih urah v medijih, s pH višjim od 6,0, so namreč nižje od vrednosti v istih medijih po krajšem času. Predpostavljamo, da se DPL najprej verjetno raztopi v nekoliko višji koncentraciji od svoje ravnotežne topnosti v izbranem mediju, temu pa sledi obarjanje, kar se kaže z znižanjem koncentracije DPL po 48-ih urah stresa vzorcev v medijih s pH nad 6,0. Nasprotno je bilo v medijih s pH pod 5,0 torej pričakovano, da se DPL raztopi v večjem obsegu, zaradi boljše topnosti DPL v medijih z nizko pH vrednostjo. Le-to potrjujemo tudi

z vrednostmi koncentracij DPL v medijih s pH pod 5,0 (slika 7) v primerjavi z vrednostmi koncentracij DPL v medijih s pH nad 6,0 (slika 8). Dobljeni rezultati potrjujejo nadaljnje raztapljanje DPL v medijih s pH pod 5,0, saj so koncentracije DPL po 48-ih urah stresanja v teh medijih malenkost višje, kot po 24-ih urah stresanja. Glede na to in na dejstvo, da poskusov topnosti DPL nismo izvedli pri še daljših časovnih točkah, ne moremo sklepati na točne vrednosti ravnotežnih topnosti DPL v preiskovanih medijih, ampak imajo dobljeni rezultati le orientacijsko vrednost, zaradi česar v poskusih določeno topnost DPL imenujemo "orientacijska topnost".

### 5.3 Spremljanje obarjanja DPL

Uporaba potopne sonde z optičnimi vlakni za meritve absorbc vzorcev ima v primerjavi z merjenjem absorbc z uporabo kivete veliko prednosti, ki bistveno olajšajo delo. Meritve lahko izvedemo brez vzorčenja in posledično izgube vzorca, s konstantno prisotnostjo sonde v preiskovani raztopini lahko koncentracijo določamo bolj pogosto. Z odpravo vzorčenja se izognemo uporabi filtrov in topil, potrebnih za redčenje vzorca. Rezultate s potopno sondo pridobimo hitreje in v realnem času, kar nam nadalje omogoči obsežnejše nabore podatkov za analizo (21).

Zaradi opisanih prednosti smo se pri izvedbi poskusov odločili, da bomo meritve absorbc DPL tudi sami izvedli s pomočjo potopne sonde z optičnimi vlakni. Poleg vseh naštetih prednosti pa so dodatno v naših poskusih tudi preiskovane koncentracije učinkovine v vzorcu teoretično lahko višje (22), saj smo uporabili konico sonde s krajšo dolžino poti merjenja, tj. 0,5 cm.

#### 5.3.1 Preliminarni poskusi obarjanja DPL v delovni čaši

Že v preliminarnih poskusih obarjanja DPL iz prenasičene raztopine v delovni čaši smo ugotovili, da je ponovljivost poskusov slaba. Pri izvedbi poskusov Z1 smo večkrat opazili nehoteni premik delovne čaše po vodni kopeli in s tem tudi po magnetnem mešalu. Pri poskusih smo uporabili magnet manjše velikosti od premera čaše, zato bi premik čaše po magnetnem mešalu lahko vplival tudi na premik magnet v njej. Posledično bi s tem povzročili drugačno mešanje disperzije, kar bi lahko povzročilo tudi drugačno obarjanje DPL iz prenasičene raztopine. Poskuse smo zato optimizirali s stiropornim obodom za delovno čašo, s katerim smo omejili premik čaše po magnetnem mešalu. Skupaj s tem smo se odločili še za uporabo stiropornega pokrova z odprtini za čašo. Odprtine na pokrovu

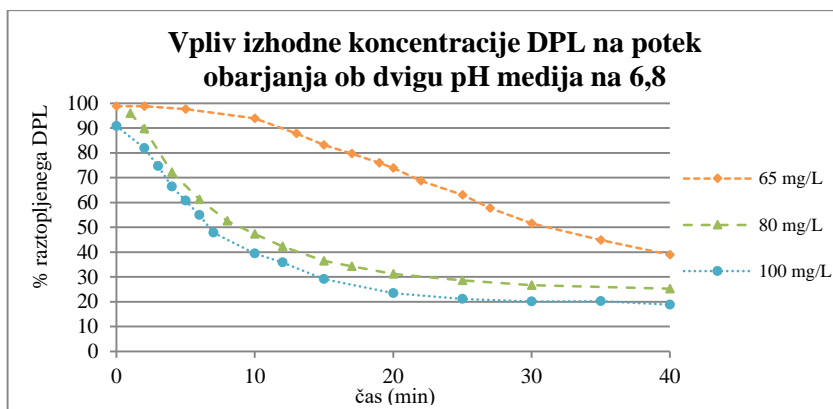


so pripomogle k tem, da smo vzorčenje z brizgo oziroma merjenje absorbance s potopno sondo z optičnimi vlakni neposredno v delovni čaši opravili na vedno enakem mestu v delovni čaši. Z optimiziranimi poskusi Z2 smo izboljšali ponovljivost rezultatov, predvsem v začetnih časovnih točkah, zato smo stiroporni obod za namestitev delovne čaše na vodno kopel uporabili tudi pri vseh nadaljnjih poskusih.

### 5.3.2 Vpliv izhodne koncentracije DPL na obarjanje

V prvih poskusih smo testirali vpliv izhodne koncentracije DPL na obarjanje DPL. Pred začetkom dela smo morali pripraviti načrt poskusov, zato smo prvih nekaj poskusov namenili izbiri ustrezne izhodne koncentracije DPL, primerne za sprožitev obarjanja DPL. Pripravili smo raztopino 0,1 M HCl, v kateri smo raztopili DPL. Za dvig pH medija do pH 6,8, pri katerem smo predvidevali, da bo prišlo do obarjanja DPL, smo uporabili 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Za začetek smo izvedli poskuse z zelo nizkimi izhodnimi koncentracijami DPL, tj. okrog 40 mg/L, vendar obarjanja še po eno-urnem spremljanju raztopine nismo dosegli. Vrednosti absorbanc se namreč skozi celoten čas spremljanja raztopine DPL s potopno sondo neposredno v raztopini niso spremenile. Preučevane koncentracije DPL so se očitno nahajale v območju pod tako imenovano kritično koncentracijo, pod katero zaradi počasne nukleacije ne pride do znatnega obarjanja učinkovine (23). Zato smo se odločili za zvišanje izhodne koncentracije DPL na 50 mg/l (poskus K1). Z izbrano koncentracijo smo obarjanje dosegli, kljub temu pa smo se odločili, da preverimo še obarjanje DPL pri izhodnih koncentracijah DPL 75 mg/l (poskus K2) in 110 mg/l (poskus K3). Že ob izvedbi teh poskusov smo opazili odvisnost poteka obarjanja DPL od izhodne koncentracije DPL.

V nadaljevanju smo podobne poskuse z različnimi izhodnimi koncentracijami DPL izvedli še v drugem mediju. DPL smo raztopili v raztopini 0,01 M HCl, za dvig pH medija pa smo prav tako uporabili 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Z vsako izbrano izhodno koncentracijo DPL smo izvedli 2-3 ponovitve poskusa, potek obarjanja DPL za vsak sklop poskusov pa je prikazan na sliki 9. Oranžna krivulja predstavlja povprečje rezultatov poskusov z izhodno koncentracijo DPL 65 mg/l (poskus K4), zelena povprečje rezultatov poskusov z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l (poskus K5) in modra povprečje rezultatov poskusov z izhodno koncentracijo DPL 100 mg/l (poskus K6).



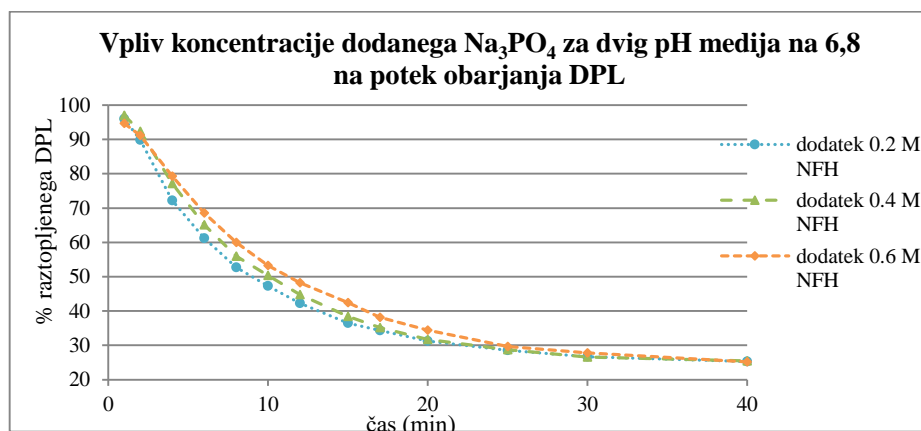
**Slika 9:** Vpliv izhodne koncentracije DPL na potek obarjanja v mediju B (raztopina 0,01 M HCl in 0,2 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) s pH = 6,8.

Kot najnižjo izhodno koncentracijo DPL v drugem sklopu poskusov smo izbrali 65 mg/l (poskus K4), pri kateri je delež raztopljenega DPL v vzorcu padel pod 95 % po desetih minutah po dodatku 0,2 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Takrat je že prišlo tudi do vidnega nastanka delcev v vzorcu. Nasprotno smo pri višji izhodni koncentraciji DPL, tj. 100 mg/l (poskus K6), opazili nastanek delcev in delno zamotnitev vzorca že v prvi minuti po dodatku 0,2 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Kot je vidno na sliki 9 do hitrejšega padca koncentracije DPL oziroma večje hitrosti njegovega obarjanja pride pri poskusih z višjo izhodno koncentracijo DPL. To se sklada tudi z literaturnimi ugotovitvami. Raziskovalci so na primeru indometacina namreč ugotovili, da je hitrost obarjanja pogojena z maksimalnim prenasitčenjem učinkovine v raztopini, le ta pa dobro korelira z odmerkom učinkovine. Z višjim odmerkom dosežemo večje prenasitčenje, ki ima močan vpliv na hitrost nukleacije, dodatno pa tudi na hitrost rasti kristalov (23). S slike 9, na kateri so prikazani rezultati poskusov obarjanja DPL z različnimi izhodnimi koncentracijami, pa lahko vidimo tudi, da se krivulje tudi po 40-ih minutah trajanja poskusa še ne prekrivajo med seboj. Glede na to lahko predvidevamo, da se obarjanje DPL še ni zaključilo in da ravnotežne topnosti DPL po 40-ih minutah še nismo dosegli.

### 5.3.3 Vpliv koncentracije $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljenega za naalkaljenje raztopine, na obarjanje DPL

Tekom izvajanja poskusov smo preverjali tudi vpliv različnih koncentracij  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljenih za dvig pH medija na 6,8, na potek obarjanja DPL. Pri tem smo kot kislo komponento medija v poskusih uporabili 0,01 M HCl. Rezultati poskusov z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, pri katerih smo za naalkaljenje medija do pH 6,8 uporabili

0,2 M (poskus K5), 0,4 M (poskus D1) oziroma 0,6 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (poskus S1) so prikazani na sliki 10.

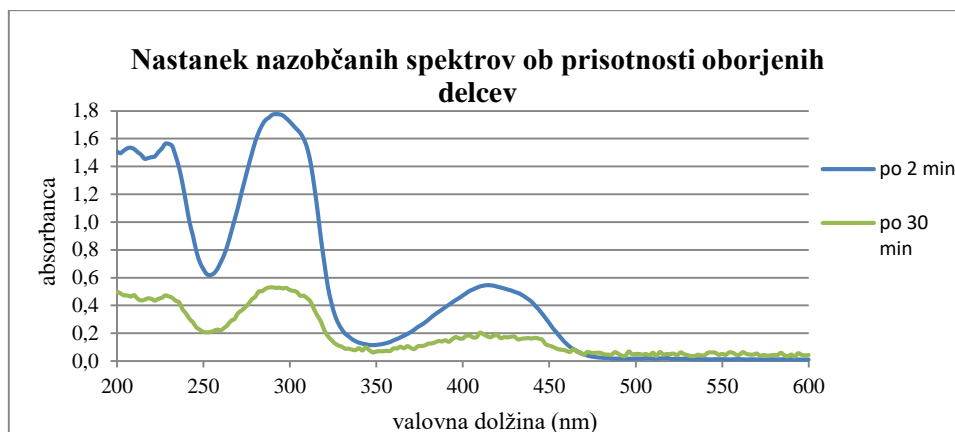


*Slika 10: Vpliv koncentracije  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljene za naalkaljenje raztopine do pH 6,8, na potek obarjanja DPL.*

Rezultati poskusov so med seboj primerljivi, posebnega vpliva uporabljene višje koncentracije bazične komponente na obarjanje DPL pa nismo opazili. V nadaljnjih poskusih smo zato za naalkaljenje medija uporabili eno izmed treh raztopin  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , s koncentracijo 0,2 M, 0,4 M oziroma 0,6 M.

#### 5.3.4 Vpliv oborjenih delcev na vrednosti absorbanc

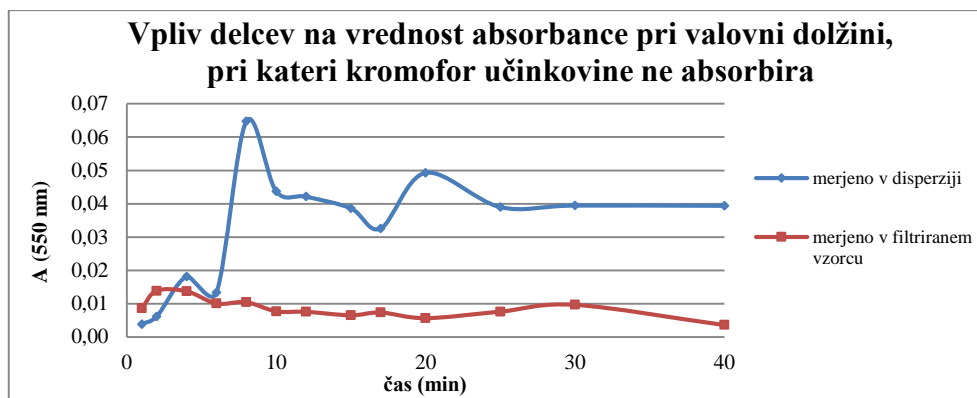
V sklopu poskusov, namenjenih optimizaciji merjenja absorbance s potopno sondo, smo izvedli poskus, pri katerem smo potopno sondo namestili v delovno čašo in jo tam pustili skozi celoten čas trajanja poskusa. Tak način merjenja se ni izkazal kot uspešen, saj so se oborjeni delci DPL iz disperzije nabirali tako na sondi kot v reži njene konice in s tem motili meritve. Odločili smo se za spiranje sonde vsakič pred analizo vzorca s potopno sondo. Sondo smo sprali z etanolom in nato še s prečiščeno vodo, s katero smo odstranili možen zaostanek etanola na sondi. Rezultati tako izvedenih poskusov z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l (poskusi D1) v primerjavi z rezultati poskusa brez spiranja sonde prikazujejo uspešno odstranitev oborjenih delcev DPL iz reže konice sonde. Kljub temu pa oborjeni delci DPL, prisotni v disperziji, v manjšem obsegu vseeno vplivajo na obliko spektrov. S pomočjo slike 11, na kateri je prikazana oblika spektrov vzorca pri poskusu D1c po 2-eh in po 30-ih minutah obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, lahko vidimo, da oborjeni delci povzročijo nazobčanost spektra predvsem v kasnejših časovnih točkah in pri višjih valovnih dolžinah.



**Slika 11:** Primerjava oblike spektrov pred in po vidnem nastanku delcev v vzorcu.

Predvidevamo, da se oborjeni delci DPL, ki krožijo v disperziji, vseeno v manjši meri ujamejo v režo konice potopne sonde, kar se odraža kot rahla nazobčanost spektrov. Vpliv delcev na obliko spektrov oziroma na njihovo nazobčanost je bil še večji pri poskusih z višjo izhodno koncentracijo DPL, kot na primer že pri izhodni koncentraciji DPL 110 mg/l (poskus K3). Zaradi večje nazobčanosti spektrov so bili dobljeni rezultati poskusa K3 irelevantni, zato višjih izhodnih koncentracij DPL pri neposrednem merjenju s potopno sondo v delovni čaši v naših poskusih nismo uporabili. Zaradi prisotnih delcev, ki so motili merjenje, smo morali nekatere poskuse tudi predčasno zaključiti.

Dodatno smo pri opisanih poskusih opazili tudi dvig bazne linije v kasnejših časovnih točkah (slika 11), kar je podrobneje predstavljeno tudi na sliki 12. Na njej so predstavljene vrednosti absorbanc v vzorcu pri valovni dolžini, pri kateri DPL ne absorbira UV-VIS svetlobe. Ustrezno valovno dolžino smo določili sami s pomočjo spektra DPL v raztopini 0,01 M HCl. Odločili smo se za valovno dolžino 550 nm. Primerjali smo rezultate poskusa, pri katerem smo meritev s potopno sondo izvedli neposredno v disperziji brez vzorčenja (poskus D1a) z rezultati poskusa, pri katerem smo vrednosti absorbanc pridobili z meritvijo v vzorcu, predhodno filtriranem skozi 0,8  $\mu\text{m}$  filter (poskus R4a). Izhodna koncentracija DPL je bila 80 mg/l.



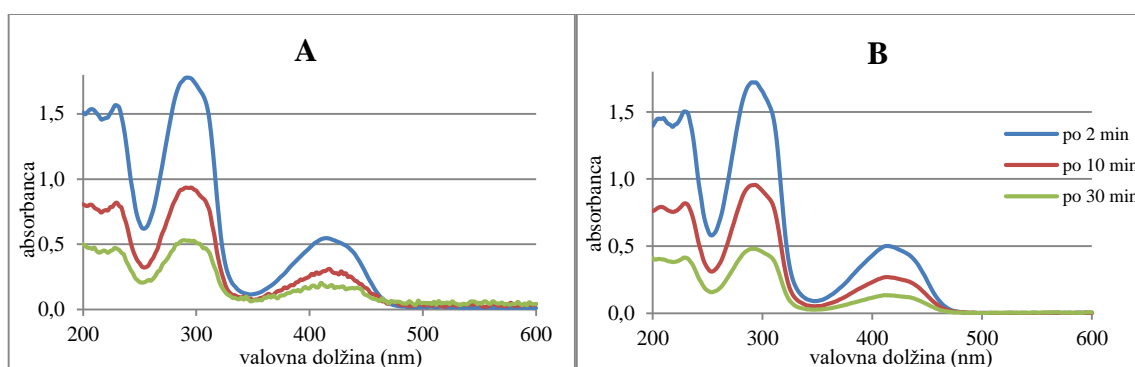
*Slika 12: Dobljena vrednost absorbance pri valovni dolžini 550 nm v odvisnosti od časa po začetku obarjanja.*

Vrednost absorbance vzorca pri izbrani valovni dolžini, tj. 550 nm, bi morala biti, glede na odsotnost kromofora, enaka 0. Vrednost absorbance je bila skozi celoten čas trajanja poskusa konstantna in le malenkost višja od vrednosti 0 pri poskusu, pri katerem smo vzorce predhodno filtrirali skozi 0,8  $\mu\text{m}$  filter. Nasprotno pa je prišlo pri poskusu z merjenjem absorbance neposredno v disperziji v 8-mi minuti po dvigu pH na 6,8 do dviga absorbance. Vrednost absorbance je bila tudi v nadaljevanju poskusa višja od izhodne vrednosti absorbance pri tej valovni dolžini. Glede na teorijo Box-a in sodelavcev bi naša opažanja lahko pomenila prisotnost oborjenih delcev v disperziji med merjenjem. S pomočjo učinkovine imipramina so v raziskavi namreč ugotovili, da se na račun sipanja svetlobe preko delcev v disperziji vrednost absorbance pri valovni dolžini, pri kateri kromofor učinkovine ne absorbira UV-VIS svetlobe, drastično zviša (8). V našem primeru je sprememba absorbance, glede na literaturne podatke pri poskusu z imipraminom (8), minimalna, saj se zviša le za 0,05 enote. Zaradi ponavljajočega trenda omenjenih razlik v vrednostih absorbanc pri 550 nm, tudi pri ostalih poskusih, pa ne izključujemo možnosti, da do razlik pride ravno zaradi prisotnih delcev v vzorcu.

Motnje pri merjenju absorbanc s potopno sondo, ki vplivajo na vrednosti absorbanc in jih lahko lažno zvišajo so sicer preučevali tudi Van Eerdenbrugh in sodelavci, ki so ugotovili, da motnje povzročajo tako topne pomožne snovi v raztopini kot netopni delci pomožnih snovi in tudi oborjeni delci same učinkovine v preiskovani disperziji. Pri tem ne gre le za vpliv sipanja svetlobe preko netopnih delcev na vrednosti absorbanc, ampak tudi za vpliv absorpcije svetlobe s strani topnih pomožnih snovi v raztopini (21).

### 5.3.5 Vpliv filtracije vzorcev na vrednosti absorbanc

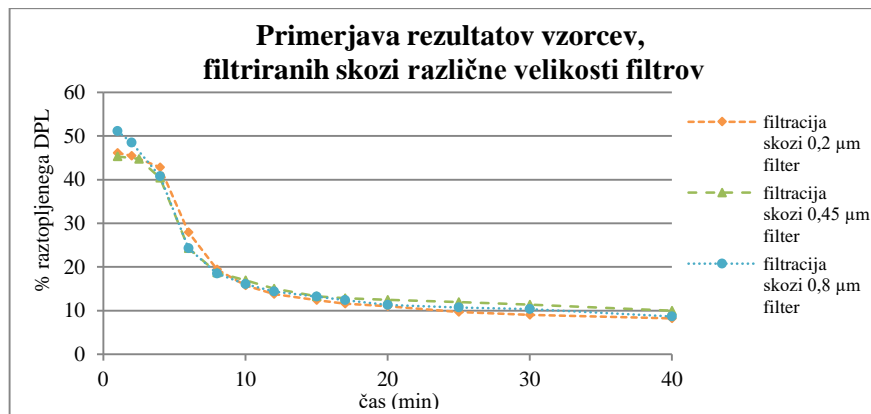
V izogib delcem in njihovemu vplivu na obliko spektrov pri merjenju absorbance s potopno sondo smo se odločili za filtracijo vzorcev. Uporabili smo membranske filtre različnih velikosti por. Na sliki 13 je prikazana razlika v obliki spektrov nefiltriranih in filtriranih vzorcev z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l. Levi graf (z oznako A) prikazuje spektre poskusa D1c, pri katerem smo absorbanco s potopno sondo merili neposredno v disperziji, desni (z oznako B) pa spektre poskusa R4d, pri katerem smo vzorce pred merjenjem absorbance filtrirali skozi 0,8  $\mu\text{m}$  filter.



*Slika 13: Primerjava UV-VIS spektrov vzorcev brez filtracije (graf A) in z filtracijo (graf B) oborjenih delcev DPL.*

S pomočjo zgornje slike vidimo, da spektri po filtraciji vzorcev niso več nazobčani, niti v kasnejših časovnih točkah. S filtracijo vzorcev se torej vsaj v večji meri izognemo vplivu delcev na obliko spektrov in vrednosti absorbanc.

Pri izbiri filtrov za nadaljnje poskuse smo naleteli na vprašanje, katera velikost por filtra je primerna za naše poskuse. S prvimi testi obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l, pri katerih smo naalkaljenje raztopine dosegli z 0,2 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , smo preverili uporabo 0,2  $\mu\text{m}$  (poskus Z1) in 0,8  $\mu\text{m}$  filtrov (poskus F1) ter opazili razliko v dobljenih rezultatih. Izbira velikosti filtrov namreč vpliva na vrednosti absorbanc v začetnih časovnih točkah. S filtracijo skozi različne velikosti filtrov odstranimo določeno število delcev, s čimer posledično vplivamo na vrednosti rezultatov. V nadaljevanju izvedbe poskusov smo zato v večjem obsegu ponovili zgoraj opisana poskusa, s to razliko, da smo naalkaljenje raztopine dosegli z 0,4 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ter da smo za filtracijo uporabili filtre z velikostjo por 0,2  $\mu\text{m}$  (poskus F2), 0,45  $\mu\text{m}$  (poskus F3) oziroma 0,8  $\mu\text{m}$  (poskus F4). Vzorčenje pri vseh poskusih smo opravili v enakih časovnih točkah. Rezultati so med seboj primerljivi, kar je prikazano na sliki 14.

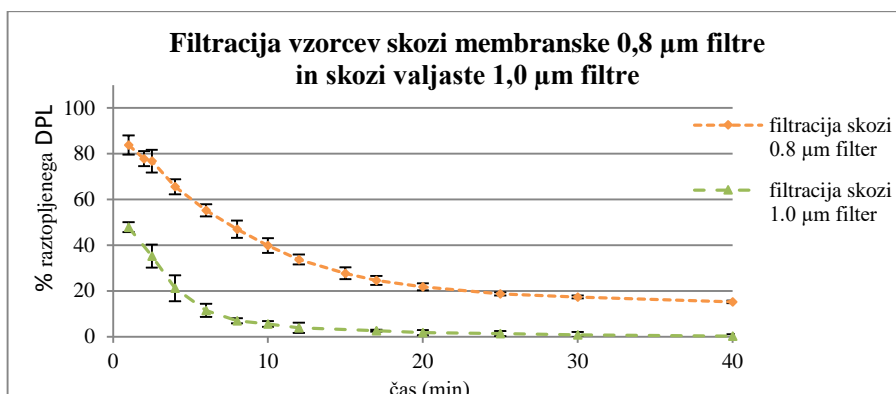


Slika 14: Primerjava povprečij rezultatov vzorcev, filtriranih skozi različne velikosti filtrov.

Kot smo opazili že pri izvedbi prvih poskusov filtriranja vzorcev pri spremljanju obarjanja DPL iz prenasičene raztopine, se vrednosti absorbanc vzorcev po filtraciji z različnimi velikostmi por filtrov razlikujejo le v začetnih časovnih točkah. Pri primerjavi rezultatov vseh treh sklopov poskusov opazimo višje vrednosti absorbanc v prvih dveh minutah po dvigu pH na 6,8 pri vzorcih, ki smo jih filtrirali skozi filter z največjo velikostjo por. K zvišanju absorbance, glede na literaturne podatke, sicer v največji meri prispevajo raztopljena učinkovina in prisotni nanodelci (21), zato bi v našem primeru pričakovali primerljive vrednosti rezultatov med vsemi tremi filtracijami. Prisotnosti nanodelcev v preiskovani disperziji sicer nismo določevali vzporedno s spremljanjem absorbance DPL v vzorcu, zato njihove prisotnosti v disperziji nismo potrdili. Iz omenjenega torej sklepamo, da bi opažene višje vrednosti absorbanc pri filtraciji skozi večje velikosti por filtrov lahko pripisali prisotnim delcem v disperziji, ki vrednosti absorbanc lažno zvišajo, kot smo opisali že v poglavju 5.3.4 *Vpliv oborjenih delcev na vrednosti absorbanc*.

Odločili smo se še za izvedbo poskusov z 1,0 µm filtri (poskus F5). Uporabili smo valjaste filtre, namenjene vzorčenju vzorcev pri testih sproščanja s kanilami oziroma z avtomatskim vzorčevalnikom, vendar pa se ti v našem primeru niso izkazali za najbolj primerne. Že v samem začetku izvedbe poskusov F5 smo sicer pričakovali določena odstopanja od ostalih poskusov filtracije vzorcev. Filtri se razlikujejo v samem mehanizmu filtriranja, površini namenjeni filtraciji in vrsti materiala. Dodatno so se poskusi razlikovali tudi v samem načinu filtriranja vzorcev. Pri membranskih filtrih smo vzorec zajeli s pomočjo brizge in ga nato filtrirali, medtem ko smo pri valjastih vzorec filtrirali že ob vzorčenju v brizgo. Kljub temu dobljeni rezultati niso pričakovani, saj so izmerjene vrednosti absorbanc izredno nizke. Primerjava rezultatov vzorcev, filtriranih skozi

membranski 0,8  $\mu\text{m}$  (poskus F4) in valjasti 1,0  $\mu\text{m}$  filter (poskus F5) je prikazana na sliki 15. Na grafu je poleg povprečja rezultatov prikazana tudi vrednost standardne deviacije.



*Slika 15: Primerjava povprečij treh paralel poskusov s filtracijo vzorcev skozi 0,8  $\mu\text{m}$  membranske filtre in skozi valjaste 1,0  $\mu\text{m}$  filtre. Izhodna koncentracija DPL pri poskusih je bila 145 mg/l.*

V določenih časovnih točkah so koncentracije DPL pri poskusu F5, s filtracijo vzorcev skozi 1,0  $\mu\text{m}$  valjasti filter, dobljene s preračunom, celo negativne. Izbira valjastih filtrov za filtracijo vzorcev pri naših poskusih, glede na opisane razlike med obema vrstama filtrov, torej ni bila ustrezna, zato dobljenih rezultatov nismo primerjali z ostalimi poskusi, prav tako pa valjastih filtrov nismo več uporabili pri nadaljnjih poskusih.

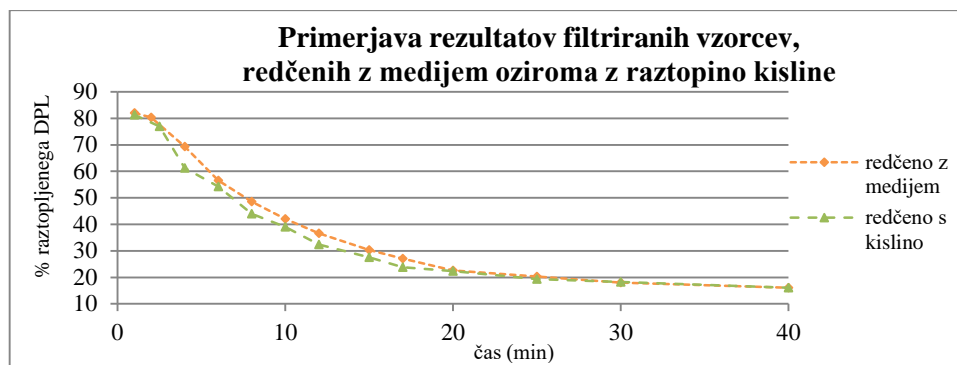
### 5.3.6 Vpliv redčenja vzorcev na rezultate

Pri poskusih, pri katerih meritve absorbanc s potopno sondo ne izvajamo neposredno v disperziji, ampak po filtraciji vzorcev v epruveti, je potrebna stabilizacija teh vzorcev pred analizo. Z uspešno stabilizacijo zavremo nadaljnje obarjanje učinkovine v vzorcu in s tem zagotovimo ustreznost rezultatov. Stabilizacija vzorca je pomembna predvsem pri poskusih, kjer od vzorčenja do analize vzorca mine določen čas. Tako situacijo imamo v primeru izvajanja poskusov na aparatu za sproščanje z avtomatskim vzorčevalnikom, kar je eden pogosteje uporabljenih načinov izvajanja testov raztapljanja. Preučevanje stabilizacije vzorcev že v začetnih poskusih je zato nujno za uspešno delo. Tudi sami smo se odločili za stabilizacijo vzorcev, kljub temu, da smo vzorce naših poskusov obarjanja sicer vzorčili ročno in da je temu sledilo takojšnje merjenje absorbance s potopno sondo z optičnimi vlakni. Stabilizacija vzorcev za daljše časovno obdobje zato ni bila potrebna, vseeno pa smo jih želeli stabilizirati za čas, potreben za analizo vzorcev. Podatke o ugodnem vplivu različnih medijev na zaviranje obarjanja DPL v vzorcu smo poiskali v literaturi. Poročajo o redčenju filtriranih vzorcev (filtracija skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter) z enakimi mediji, kot so



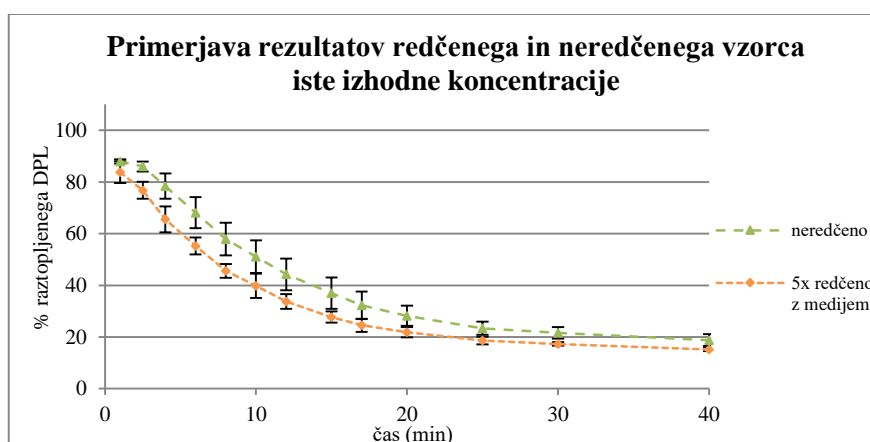
uporabljeni pri poskusih obarjanja (4),(13) in o 20-kratnem redčenju z mobilno fazo, ki je mešanica metanola in pufra  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5). Spet drugi so, zaradi uporabe kompleksnejših medijev, centrifugirane vzorce stabilizirali z enako količino metanola (12). Zaradi spremljanja hitrega dinamičnega procesa obarjanja DPL smo se odločili za filtracijo vzorcev pri poskusih. Za kratkotrajno stabilizacijo filtriranih vzorcev smo uporabili predhodno pripravljen medij, enak tistemu, v katerem smo izvajali poskus v delovni čaši. Tako pripravljen medij iz raztopine HCl in  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  je imel pH 6,8, enak pH pa je imel tudi redčen vzorec. Z namenom preveritve ustreznosti medija za stabilizacijo vzorcev smo spremljali spremembo vrednosti absorbanc tako redčenega vzorca skozi določen čas. Ugotovili smo, da se je vrednost absorbance po dveh urah stanja vzorca spremenila minimalno v primerjavi z začetnimi vrednostmi.

V nadaljevanju smo izvedli poskus, pri katerem smo vzorce z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, filtrirali skozi 0,2  $\mu\text{m}$  filter in 5-krat redčili s predhodno pripravljenim medijem s pH 6,8, ki je bil enak uporabljenemu pri samem poskusu (poskus R1). Z redčenjem smo dosegli znižanje koncentracije DPL v vzorcu. To bi v primeru, ko DPL ni več v prenasičenem stanju, teoretično lahko povzročilo dodatno raztapljanje oborjenega DPL v redčenem vzorcu, vendar pa smo se s predhodno filtracijo vzorcev pri poskusu delno izognili omenjeni težavi. Poleg tega pa je topnost DPL pri tem pH nizka in se glede na literaturo giblje okrog 6,5  $\mu\text{g/mL}$  (6). Odsotnost delcev DPL po filtraciji vzorca smo dodatno preverili s pomočjo poskusa R2 z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, pri katerem smo filtrirane vzorce skozi 0,2  $\mu\text{m}$  filter 5-krat redčili z 0,01 M HCl in s tem dosegli končni pH redčenega vzorca 2,48. Topnost DPL je namreč boljša v kislih medijih, kar smo dokazali tudi v poskusih določanja "orientacijske topnosti" DPL v različnih medijih. V mediju z boljšo topnostjo DPL bi torej, zaradi raztapljanja delcev, manjših od velikosti por filtra, teoretično lahko dosegli višje vrednosti absorbanc in posledično višje vrednosti izračunanih koncentracij raztopljenega DPL. Rezultati, prikazani na sliki 16, kažejo na primerljive rezultate med poskusi, kjer smo vzorce redčili z raztopino 0,01 M HCl in poskuse, kjer smo vzorce redčili z medijem.



Slika 16: Primerjava povprečij treh paralel poskusov (poskus R1 in R2) z različnimi načini redčenja filtriranih vzorcev.

Želeli smo primerjati tudi koncentracije DPL med neredčenimi in redčenimi vzorci, saj so pri poskusih z izhodno nižjo koncentracijo DPL in 5-kratnim redčenjem vzorcev vrednosti absorbanc v končnih časovnih točkah dosegle precej nizke vrednosti (tudi okrog 0,040). Zato smo spremljali primerljivost rezultatov redčenih (poskus R3) in neredčenih vzorcev (poskus R4) pri poskusih z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l. Vrednost pH tako redčenih kot neredčenih vzorcev je bila 6,8. Skrbno smo načrtovali poskuse in se nanje pripravili, da smo jih lahko izvedli v najkrajšem možnem času. Neredčeni vzorci so sicer bolj dovzetni za nadaljnje obarvanje, vendar smo s filtracijo skozi 0,8  $\mu\text{m}$  filter odstranili delce, ki bi lahko predstavljali kristalizacijska jedra za obarvanje DPL. Ob načrtovanju poskusov smo zato pričakovali podobne vrednosti izračunanih deležev raztopljenega DPL med poskusi, z upoštevanjem možnosti vpliva napake pri merjenju na dobljene rezultate. Iz slike 17 pa lahko vidimo, da so dobljeni rezultati višji pri poskusih R4 brez redčenja in so z rezultati redčenih vzorcev poskusov R3 primerljivi le v obliki krivulje. Na sliki je prikazana tudi standardna deviacija poskusov v posamezni časovni točki.

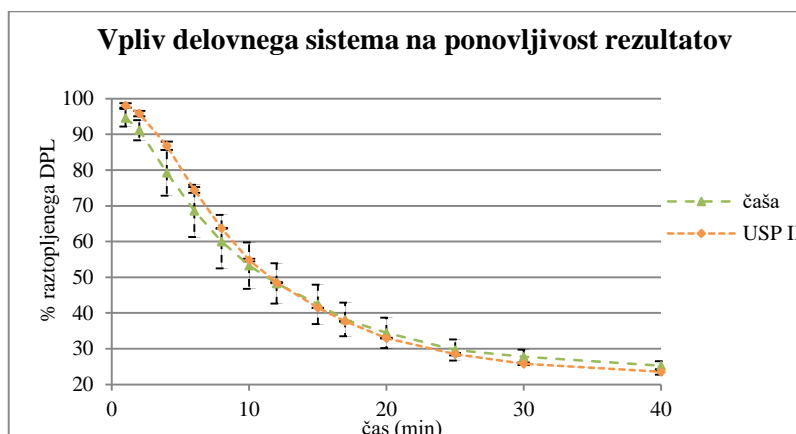


Slika 17: Primerjava povprečij rezultatov 5-krat redčenih (poskus R3) in neredčenih vzorcev (poskus R4).

Predvidevamo, da omenjena razlika v vrednostih koncentracij DPL ni posledica napak v meritvi redčenih vzorcev zaradi nizkih vrednosti absorbanc, saj se krivulji ne prekrijeta v nobeni časovni točki. Zaradi možne prisotnosti manjših oborjenih delcev DPL, ki jih s filtracijo nismo odstranili iz vzorcev, bi lahko sklepali na lažno zvišanje absorbanc neredčenih vzorcev. Dobljeni spektri neredčenih vzorcev sicer niso nazobčani, kljub možni prisotnosti delcev, in so primerljivi z obliko spektrov redčenih vzorcev.

### 5.3.7 Vpliv delovnega sistema na potek obarjanja DPL

V sklopu naših poskusov smo naredili tudi primerjavo med rezultati poskusov obarjanja DPL v delovni čaši in tistimi, pridobljenimi s poskusi obarjanja v aparatu za sproščanje USP II. Enaka poskusa z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l, z mešanjem disperzije na 100 rpm in s konstantno temperaturo disperzije 37 °C smo izvedli tako v aparatu za sproščanje USP II (poskus S2) kot v delovni čaši (poskus S1). Bistvena razlika pri izvedbi poskusov je bila v volumnu medija ter v načinu mešanja disperzije, zaradi različne oblike posode in mešalnega telesa pri obeh sistemih. Merjenje absorbance smo izvajali s potopno sondo neposredno v posodi oziroma čaši v enakih časovnih točkah. Povprečni rezultati poskusov v obeh delovnih sistemih, skupaj z vrednostmi standardnih deviacij, sta prikazani na sliki 18.

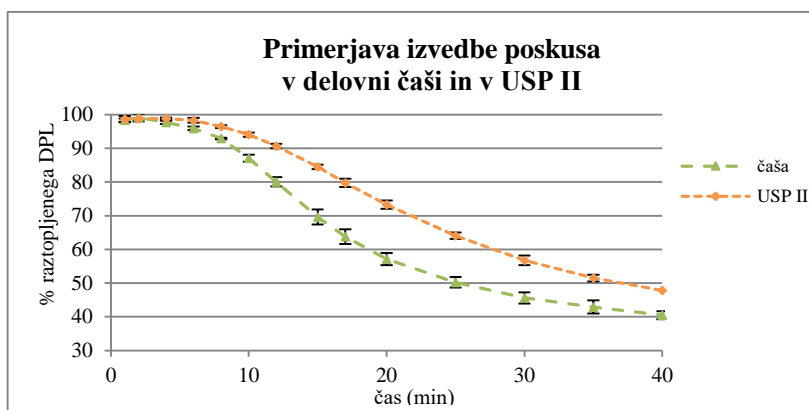


Slika 18: Vpliv delovnega sistema na ponovljivost rezultatov obarjanja DPL.

Opazili smo boljšo ponovljivost poskusov, narejenih z uporabo aparata za sproščanje USP II. Dobljene vrednosti RSD pri poskusi v delovni čaši so namreč višje in kljub petkratni ponovitvi poskusa znašajo tudi do 13 %, medtem ko v USP II RSD vrednosti povprečja treh paralel ne presežejo 4 %. Sklepamo lahko na velik vpliv delovnega sistema za izvedbo poskusa na ponovljivost rezultatov. Največjo težavo pri poskusi v čaši verjetno

predstavlja mešanje disperzije v vedno isti točki v čaši, saj že minimalna nepazljivost povzroči premik vodne kopeli po magnetnem mešalu in s tem tudi čaše. Spremeni se lahko celotna dinamika mešanja disperzije, kar bi lahko vplivalo tudi na ponovljivost rezultatov. Poleg tega vsak poseg v preiskovano disperzijo tekom izvedbe poskusa povzroči določeno spremembo. Tu mislimo predvsem na poseganje v disperzijo s potopno sondo, vendar pa je le-to prisotno pri obeh sklopih poskusov, tako S1 kot S2. Poseganje v disperzijo s potopno sondo v vsaki časovni točki je nujno, zato smo pri delu s sondo stremeli k enakim časovnim točkam merjenja absorbance ter k potopitvi potopne sonde na vedno isto mesto v posodi oziroma čaši.

Poleg slabše ponovljivosti rezultatov so se razlike med rezultati poskusov v obeh sistemih kazale tudi v koncentracijah raztopljenega DPL v vzorcih, predvsem pri poskusih z dodanim HPMC. Velika razlika med izmerjenimi vrednostmi je prikazana na sliki 19, na kateri sta prikazani povprečji rezultatov obarjanja DPL v delovni čaši (poskus P1) in v aparatu za sproščanje USP II (poskus S3) ob prisotnosti polimera HPMC v masnem razmerju z DPL 1 + 1, skupaj z vrednostmi standardnih deviacij.

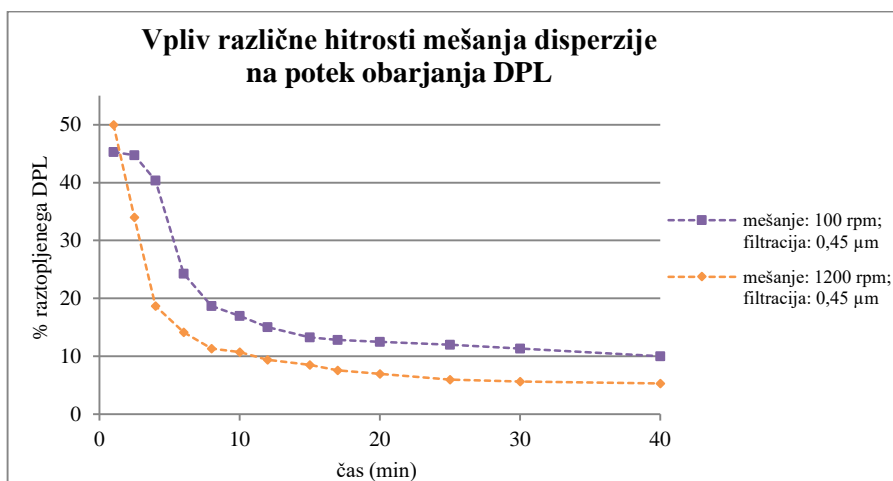


**Slika 19:** Primerjava povprečij poskusov obarjanja DPL v delovni čaši (poskus P1) in v aparatu za sproščanje USP II (poskus S3) ob prisotnosti HPMC v disperziji, v masnem razmerju 1+1.

RSD vrednosti poskusov so tudi v tem primeru višje pri poskusih, izvedenih v delovni čaši. Rezultati sicer kažejo na počasnejši začetek obarjanja pri poskusih v aparatu za sproščanje USP II. Na različen potek obarjanja bi lahko vplival različen način mešanja disperzije. Pri aparatu za sproščanje USP II se mešanje izvaja s pomočjo veslastega mešala, v delovni čaši pa s pomočjo ovalnega magneta. Dodatno se s tem spremeni že sama postavitev mešalnega telesa. Predvidevamo tudi, da kljub istim nastavitvam obratov mešanja, hidrodinamika disperzije med napravama ni primerljiva zaradi različnih volumnov medija, različne velikosti in oblike posode ter različne pozicije mešanja disperzije.

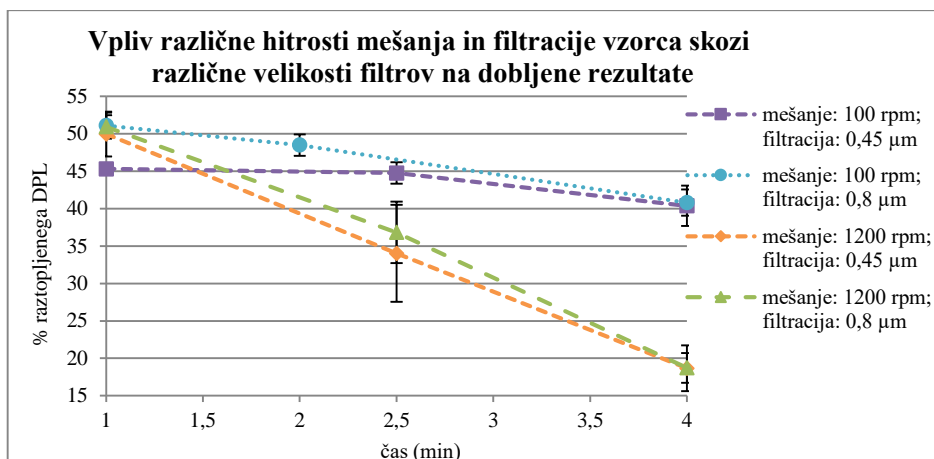
### 5.3.8 Vpliv hitrosti mešanja disperzije na potek obarjanja DPL

V nadaljevanju smo pri poskusih spremljanja obarjanja DPL v delovni čaši hitrost mešanja disperzije v delovni čaši bistveno povečali tako, da je bila le-ta primerljiva s hitrostjo mešanja disperzije na analizatorju velikosti delcev. Poleg lažje primerjave rezultatov velikosti oborjenih delcev, dobljenih z obema metodama, smo s poskusi spremljanja obarjanja DPL v delovni čaši dobili tudi podatek o vplivu hidrodinamike disperzije na potek obarjanja DPL. Primerjava poteka obarjanja DPL z izhodno koncentracijo 145 mg/l pri višji, tj. 1200 rpm (poskus M1), in nižji hitrosti mešanja, tj. 100 rpm (poskus F3), je predstavljena na sliki 20. Pred analizo vzorcev smo le-te filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filtre in redčili.



*Slika 20: Vpliv hitrosti mešanja disperzije na potek obarjanja DPL iz prenasičene raztopine: mešanje disperzije pri 100 rpm (poskus F3) oziroma pri 1200 rpm (poskus M1).*

Zaradi intenzivnejšega mešanja disperzije pri višjih obratih mešanja, je prišlo do hitrejšega začetka obarjanja DPL in posledično hitrejšega padca krivulje v začetnih časovnih točkah. Skladno s tem je razlika med rezultati vzorcev, filtriranih skozi 0,45  $\mu\text{m}$  (poskus F3) in skozi 0,8  $\mu\text{m}$  filter (poskus F4), v primeru mešanja disperzije na nižjih obratih v prvih dveh minutah bolj opazna, kot v primeru hitrejšega mešanja. Omenjena razlika je prikazana na sliki 21.

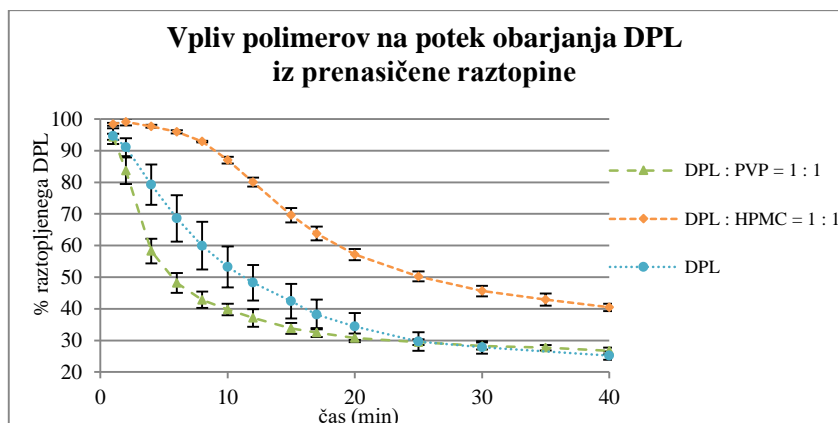


**Slika 21:** Vpliv hitrosti mešanja in filtracije vzorcev skozi 0,45 in 0,8 µm filtre na dobljene rezultate v začetnih časovnih točkah. Na sliki so prikazana povprečja treh paralel poskusov, pri katerih smo disperzijo mešali na 100 rpm in vzorce filtrirali skozi 0,45 µm (poskus F3) oziroma skozi 0,8 µm filtre (poskus F4) in povprečja treh paralel poskusov, pri katerih smo disperzijo mešali na 1200 rpm ter vzorce filtrirali skozi 0,45 µm (poskus M1) oziroma skozi 0,8 µm filtre (poskus M2). Na grafu je prikazana tudi standardna deviacija poskusov v posamezni časovni točki.

Razlik med filtracijo s filtroma različnih velikosti ne opazimo pri poskusu s hitrejšim mešanjem disperzije. To bi lahko pripisali oborjenim delcem DPL, ki so že takoj ob dvigu pH medija na 6,8, večji oziroma manjši od velikosti delcev, katere iz vzorca odstranimo s filtri. Razlika v naklonu krivulj na sliki 21 med poskusi pri obeh hitrostih mešanja dokazuje hitrejšo obarjanje DPL v primeru hitrejšega mešanja disperzije. Večja intenzivnost mešanja torej vpliva na hitrost in na potek obarjanja DPL.

### 5.3.9 Vpliv dodanih polimerov na potek obarjanja DPL

V sklopu poskusov obarjanja DPL smo spremljali tudi vpliv dodanih polimerov v raztopino na njegovo obarjanje. V naših poskusih smo uporabili polimera HPMC HME 15LV ter PVP 17PF, v masnem razmerju z DPL 1 + 1. Uporabljena koncentracija polimerov v raztopinah je bila enaka za HPMC in PVP in je znašala le 0,008 %, zaradi česar smo vpliv viskoznosti na zaviranje obarjanja DPL lahko zanemarili. Zvišanje viskoznosti je sicer eden izmed treh najpomembnejših mehanizmov delovanja polimerov in je od drugega mehanizma, tj. tvorbe molekulskih interakcij med učinkovino in polimerom, močno odvisen (opisano v poglavju 1.3.1 *Vpliv polimerov na prenasičenje dipiridamola*). Vpliv HPMC (poskus P1) in PVP (poskus P2) na zaviranje obarjanja DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 80 mg/l je prikazan na sliki 22. Na sliki je za primerjavo prikazan še poskus obarjanja DPL brez prisotnosti polimera (poskus S1). Posamezna krivulja prikazuje povprečje poskusov skupaj s standardnimi deviacijami.



Slika 22: Vpliv HPMC (poskus P1) in PVP (poskus P2) na obarjanje DPL ob dvigu pH medija na 6,8.

Zaradi predvidenega majhnega vpliva polimera na viskoznost raztopine, predvidevamo, da je učinkovitost polimera odvisna predvsem od njegovih molekulskih interakcij z DPL. Za primer HPMC so Vora in sodelavci s pomočjo rezultatov FT-IR analize ugotovili, da bi med hidroksilno skupino HPMC in C-N skupino DPL lahko prišlo do tvorbe vodikovih vezi (6). Posledično tudi predvidevamo, da je opisana interakcija med DPL in HPMC razlog za upočasnjeno obarjanje DPL v kombinaciji s HPMC glede na hitrost obarjanja samega DPL. Nasprotno pa rezultati poskusov z dodatkom PVP kažejo na hitrejše obarjanje DPL v primerjavi z obarjanjem same učinkovine. Kot smo opisali že v poglavju 1.3.1 Vpliv polimerov na prenasičenje dipiridamola, molekulskih interakcij med PVP in DPL niso zaznali (6), dodatno pa zaradi nizke koncentracije polimera v raztopini z njim tudi nismo vplivali na viskoznost. Pričakovali bi torej enak potek krivulje kot pri samem DPL, vendar pa je v naših poskusih dodatek PVP pospešil obarjanje DPL. Pri nadaljevanju poskusov bi bilo smiselno razmisliti o zvišanju koncentracije PVP v raztopini, saj bi s tem vplivali na viskoznost raztopine, s čimer bi lahko tudi s PVP vplivali na zaviranje obarjanja DPL.

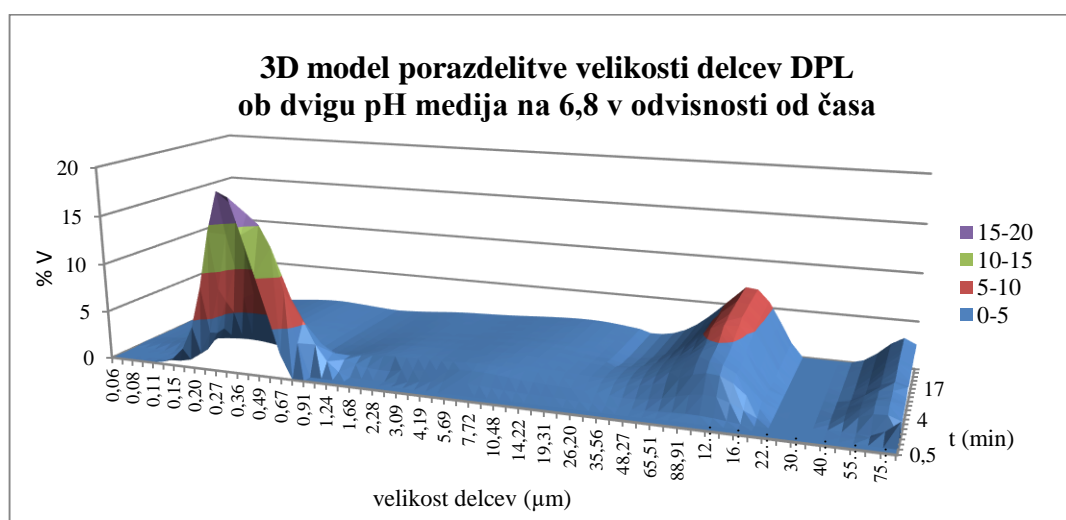
## 5.4 Porazdelitev velikosti delcev

### 5.4.1 Preliminarni testi določanja velikosti delcev DPL na analizatorju velikosti delcev

Z namenom spremljanja spremembe velikosti delcev DPL v disperziji ob dvigu pH raztopine DPL v HCl na 6,8 smo izvedli poskuse na analizatorju velikosti delcev. Že pri poskusih spremljanja vpliva koncentracije DPL na hitrost obarjanja v delovni čaši s sondo smo opazili počasnejše obarjanje v primeru nižjih izhodnih koncentracij DPL, hkrati pa s

pre nizkimi koncentracijami obarjanja nismo dosegli. Pri načrtu poskusov na analizatorju velikosti delcev smo omenjena opažanja upoštevali in se odločili za izvedbo poskusov z rahlo višjo koncentracijo od tiste, pri kateri smo obarjanje že dokazali s poskusi v delovni čaši. Izbrana izhodna koncentracija DPL je bila 60 mg/L. Obarjanje je potekalo zelo počasi, prav tako pa nismo dosegli ustrezne vrednosti faktorja zatemnitve. Aparat meri faktor zatemnitve, na podlagi katerega lahko preverimo ustreznost koncentracije vzorca za merjenje porazdelitve velikosti delcev. Od zatemnitve je namreč odvisna zanesljivost rezultatov. Najprimernejša vrednost faktorja zatemnitve je od 10 do 30 % (17). Pri poskusu z izhodno koncentracijo DPL 60 mg/l je bila vrednost faktorja zatemnitve nižja od 10 %, zato dobljeni rezultati niso relevantni. Odločili smo se za izvedbo novih poskusov z dvigom izhodne koncentracije DPL na 80 mg/L. S tem smo povzročili hitrejše obarjanje DPL v disperziji, vrednosti faktorja zatemnitve pa so bile še vedno nižje od 10 %. Glede na prenizke vrednosti faktorja zatemnitve in glede na dobljene spektre porazdelitve velikosti delcev, ki prikazujejo več vrhov velikosti delcev (slika 3), smo se zato odločili še za dvig izhodne koncentracije DPL na 145 mg/L.

Poleg osnovnega namena izvajanja poskusov smo tekom le-teh zbrali podatke tudi o omejitvah samega analizatorja velikosti delcev. Med izvajanjem poskusov smo pri večjem številu poskusov že v začetnih časovnih točkah opazili dodaten vrh v grafu, velikosti nad 300  $\mu\text{m}$ , le-ta pa je bil prisoten še skozi celoten čas trajanja poskusa. Vrednosti v tem velikostnem razredu predstavljajo ločen vrh na grafu, kot je vidno tudi na sliki 23.



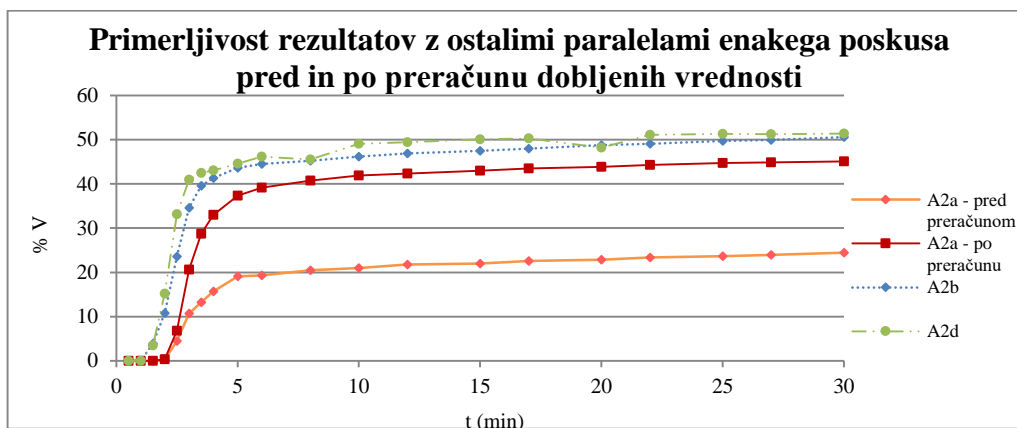
*Slika 23: 3D model spremembe velikosti delcev pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine v mediju s pH = 6,8 v odvisnosti od časa. Izhodna koncentracija DPL je bila 145 mg/l.*

Teoretično je razlogov za dodaten tretji vrh v grafu lahko več. Zaradi prisotnosti vrha že v začetnih časovnih točkah, bi ta teoretično lahko predstavljal še neraztopljene delce DPL,



vendar pa smo pri pripravi raztopine DPL le-to izpostavili tudi ultrazvoku. Posledično predvidevamo, da se je DPL med pripravo raztopine popolnoma raztopil. Prav tako v vzorcu pred izvedbo poskusov ni bilo vidnih delcev. Glede na to predvidevamo, da bi dodaten vrh lahko pripadal zračnim mehurčkom, prisotnim v celici, kjer poteka merjenje vzorca. Na možen pojav zračnih mehurčkov v pretočnem sistemu analizatorja so opozorili že v priročniku za uporabo aparata Mastersizer. Kot možno rešitev so predlagali izpostavitve vzorca ultrazvoku za minuto ali dve in nekaj minutno kroženje vzorca po pretočnem sistemu pred njegovo analizo (17). Pri vzorcih s konstantno velikostjo delcev je tak pristop ustrezen, nasprotno pa pri analizi dinamičnega procesa, kot je obarjanje DPL, z njim ne rešimo omenjene težave. Tretji teoretični razlog za prisotnost dodatnega tretjega vrha v grafu pa bi lahko bili oborjeni delci DPL. Pri tem mislimo predvsem na oborjene delce, ki neželeno zastajajo na steni celice, in na katere bi se sčasoma lahko prilepili dodatni oborjeni delci, ves skupek pa bi v določeni časovni točki pri meritvi lahko videli kot en velik delec v vzorcu. Glede na dejstvo, da ti dodatni neželeni delci v celici predstavljajo ločen vrh na grafu (slika 23), bi se s preračunom dobljenih rezultatov verjetno lahko izognili njihovem vplivu na rezultate. Vrh bi namreč lahko obravnavali kot motnjo, ki jo upoštevamo pri preračunu volumskih vrednosti deležev dejansko oborjenih delcev, saj v nasprotnem primeru prisotnost dodatnega vrha močno spremeni volumske deleže ostalih, predvsem manjših delcev. Opisana težava je izrazito opazna pri poskusu A2a, pri katerem dobimo primerljive rezultate z ostalimi paralelami šele po preračunu dobljenih vrednosti deležev velikosti delcev, kjer smo kot 100 % delež upoštevali le delce do velikosti 160  $\mu\text{m}$ . To velikost delcev smo si za preračun izbrali, saj je v spektru porazdelitve velikosti delcev pri poskusu A2a nad velikostjo 160  $\mu\text{m}$  skozi celoten čas poskusa viden ločen tretji vrh. Na sliki 24 so prikazane vrednosti, dobljene direktno z analizatorjem velikosti delcev (oranžna krivulja) ter vrednosti po preračunu (rdeča krivulja). Dodatno so za primerjavo prikazani še rezultati dveh paralel enakega poskusa (zelena in modra krivulja). Na grafu so za vse predstavljene paralele, razen za paralelo A2a dobljeno po preračunu, prikazani deleži delcev velikosti 30 - 260  $\mu\text{m}$ . Ta velikostni razred smo namreč uporabili pri analizi rezultatov tudi pri vseh nadaljnjih poskusih, saj je v večini primerov vrednost 260  $\mu\text{m}$  predstavljala največjo velikost oborjenih delcev DPL oziroma vrednost, pri kateri se je končal drugi vrh v spektru. Zaradi omenjene razlike v velikostnih razredih prikazanih rezultatov je vrednost deleža delcev velikosti 30 – 160  $\mu\text{m}$  pri paraleli A2a po preračunu, prikazana tudi na sliki 24, verjetno rahlo nižja od dejanske, kljub temu pa se z

izračunanimi vrednostmi bolj približamo vrednostim ostalih paralel poskusa (na sliki sta zaradi boljše preglednosti prikazani le paraleli A2b in A2d). Krivulja vrednosti brez preračuna se namreč bistveno razlikuje od ostalih paralel, pri katerih v večini ni bilo prisotnega dodatnega večjega vrha v spektru.



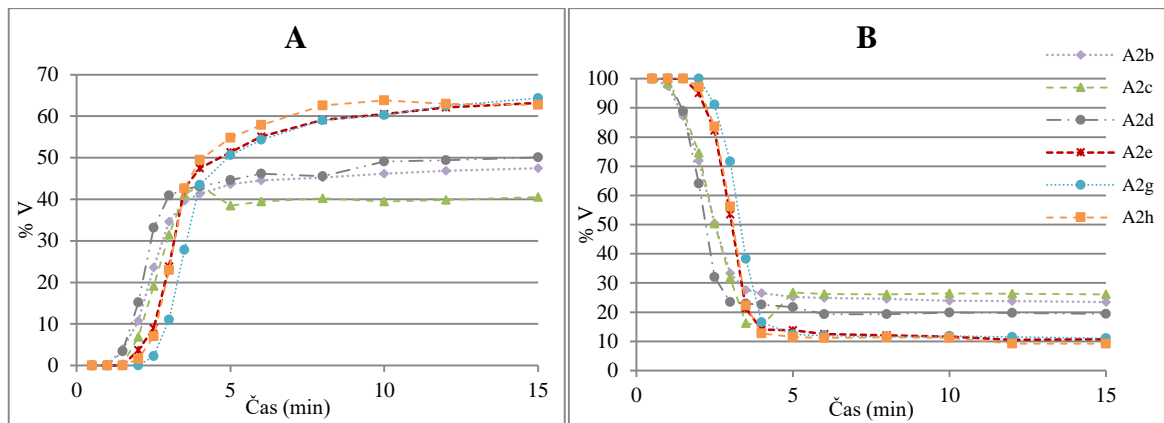
**Slika 24:** Slika prikazuje primerljivost rezultatov paralele A2a z ostalimi paralelami enakega poskusa pred in po preračunu dobljenih vrednosti. V odvisnosti od časa je prikazana sprememba volumskih deležev delcev velikosti 30 – 260  $\mu\text{m}$ , izraženih glede na celotno količino delcev v disperziji DPL, za paralelo A2a po preračunu pa so prikazani volumski deleži delcev velikosti 30 – 160  $\mu\text{m}$ .

Težavo, ki smo jo opazili med izvedbo poskusov, pa nam je predstavljala tudi ponovljivost rezultatov paralel poskusov med dvema časovnim obdobjema. Več paralel enakega poskusa smo namreč izvajali v dveh krajših časovnih obdobjih, s približno mesečnim razmikom. Natančnejši prikaz izvajanja poskusov je prikazan v preglednici XXXIII.

**Preglednica XXXIII:** Časovnica izvajanja poskusov porazdelitve velikosti delcev DPL na analizatorju velikosti delcev. Poskuse smo izvajali v dveh časovnih obdobjih, s 3-4 tedenskim razmikom.

Oznaka poskusa	Paralele izvedene v 1. časovnem obdobju	Paralele izvedene v 2. časovnem obdobju
A1	A1a-A1e	/
A2	A2a-A2d	A2e-A2h
A3	A3a-A3c	A3d-A3f
A4	A4a-A4c	A4d-A4f

Pričakovali smo primerljive vrednosti dobljenih rezultatov med paralelami, kljub časovnemu razmiku, vendar pa so med trendi krivulj opazne razlike, kar je prikazano tudi na sliki 25. Prikazani so rezultati izbranih paralel poskusa določanja velikosti delcev (poskus A2) pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine z izhodno koncentracijo DPL 145 mg/l. Za dvig pH medija na 6,8 smo uporabili 0,4 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , disperzija pa se je v celici mešala s hitrostjo 1200 rpm.



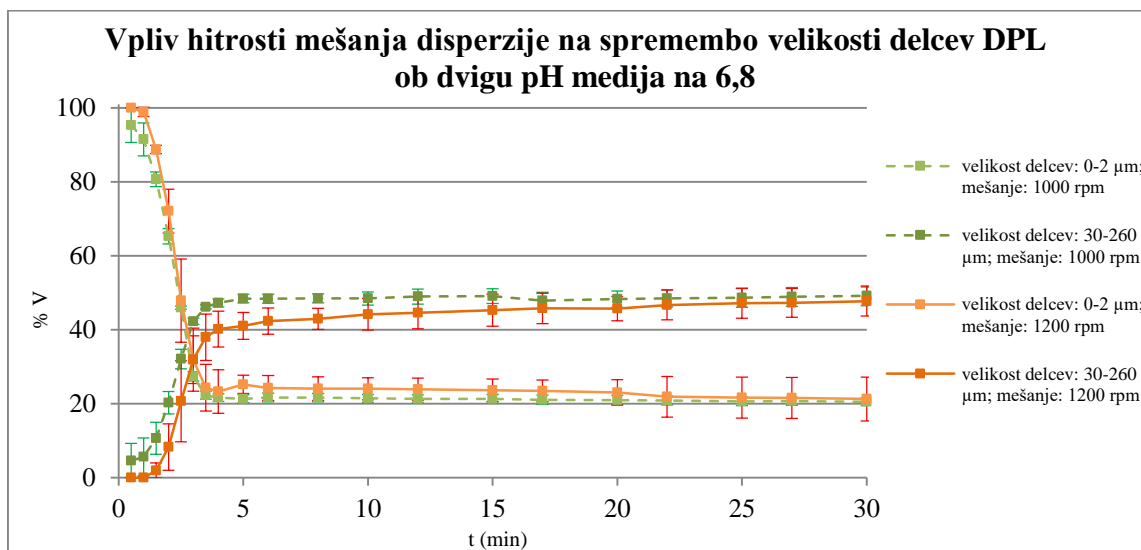
**Slika 25:** Ponovljivost rezultatov poskusa določanja velikosti delcev A2. Na grafu A je prikazana sprememba volumskih deležev delcev velikosti 30 – 260  $\mu\text{m}$ , izraženih glede na celotno količino delcev v disperziji DPL in na grafu B sprememba volumskih deležev delcev velikosti 0 – 2  $\mu\text{m}$ .

Rezultati paralel, narejenih v 2. časovnem obdobju, odstopajo od rezultatov paralel, narejenih v 1. časovnem obdobju. Iz slike 25 je vidno, da je delež večjih delcev, tj. 30 – 260  $\mu\text{m}$ , višji pri paralelah, narejenih z eno-mesečnim zamikom, nasprotno pa je delež manjših delcev, tj. 0 – 2  $\mu\text{m}$ , nižji. Zaradi omenjene razlike v rezultatih paralel enakega poskusa, izvedenih v dveh časovnih obdobjih, smo pri izračunu povprečja paralel, standardne deviacije in RSD, ki so prikazani na slikah v nadaljevanju naloge, upoštevali le rezultate paralel, narejenih v prvem časovnem obdobju. Podobne trende rezultatov sicer dobimo tudi s primerjavo poskusov, narejenih v drugem časovnem obdobju. Delno lahko neprimerljivost rezultatov razložimo z izmerjeno vrednostjo faktorja zatemnitve. Kot smo zapisali že zgoraj, je najprimernejša vrednost faktorja zatemnitve med 10 in 30 % (17), kar smo s paralelami, narejenimi v prvem časovnem obdobju brez težav dosegali skozi celoten čas poskusov. Vrednosti faktorja zatemnitve so se pri teh poskusih v začetnih časovnih točkah namreč gibale med 9 – 28 %. Pri paralelah, narejenih kasneje, pa so bile vrednosti faktorja zatemnitve med 5 – 10 %, kljub enaki izhodni koncentraciji in načinu izvajanja poskusa. Glede na to bi lahko sklepali na manjšo zanesljivost dobljenih rezultatov. Kljub temu pa nam vrednosti povprečij, standardnih deviacij in RSD vrednosti za paralele poskusov, izvedenih v drugem časovnem obdobju, prikazujejo podobno ponovljivost rezultatov kot smo jo dosegli s poskusi v prvem časovnem obdobju.

#### 5.4.2 Vpliv hitrosti mešanja disperzije na velikost delcev DPL

S poskusi na analizatorju velikosti delcev smo preverjali vpliv hitrosti mešanja disperzije na spremembo velikosti oborjenih delcev DPL v mediju s pH = 6,8. Pri tem smo uporabili hitrosti mešanja 1200 in 1000 rpm. Hitrost mešanja disperzije 1000 rpm predstavlja

najnižjo hitrost mešanja medija, pri kateri nismo opazili prisotnih zračnih mehurčkov v cevkah. Rezultati poskusov mešanja disperzije pri 1000 rpm (poskus A4) oziroma 1200 rpm (poskus A2) so prikazani na sliki 26.



*Slika 26: Rezultati povprečij porazdelitve velikosti delcev pri poskusu z mešanjem disperzije pri 1200 rpm (poskus A2) in pri 1000 rpm (poskus A4).*

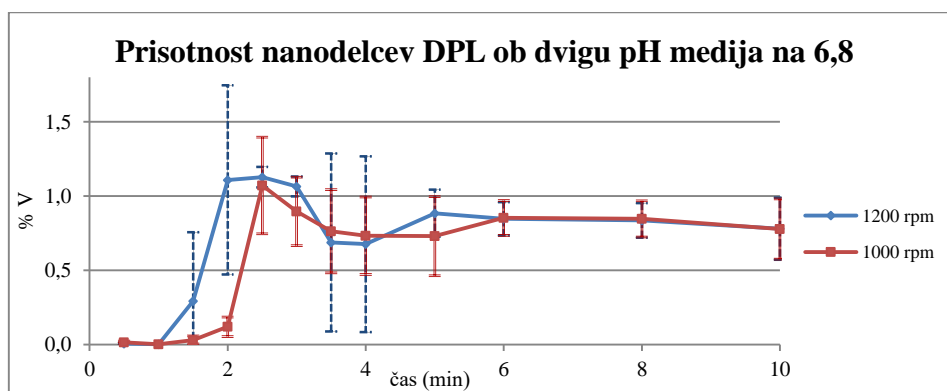
Rezultati poskusov kažejo na določeno razliko v velikosti delcev pri obeh hitrostih mešanja. Delež delcev velikosti 0 – 2 µm pri počasnejšem mešanju disperzije je manjši v primerjavi s tistim pri hitrejšem, posledično pa je delež delcev velikosti 30 - 260 µm večji. Glede na vrednosti RSD je ponovljivost rezultatov poskusov A4 z mešanjem disperzije pri 1000 rpm boljša v primerjavi s ponovljivostjo rezultatov poskusov A2 z mešanjem disperzije pri 1200 rpm.

Na analizatorju velikosti delcev so visoke hitrosti mešanja sicer nujne za ustrezen pretok vzorca skozi celico, v kateri poteka merjenje, medtem ko pri mešanju z magnetnimi mešali (kot v primeru spremljanja obarjanja v čaši) tako visokih obratov mešanja ponavadi ne uporabljamo. Kot smo že predstavili v nalogi (poglavje 5.3.8 *Vpliv hitrosti mešanja disperzije na potek obarjanja DPL*), pa smo zaradi želje po korelaciji rezultatov poskusov obarjanja DPL v delovni čaši z rezultati, dobljenimi z analizatorjem velikosti delcev, tudi poskuse v delovni čaši izvedli pri hitrosti mešanja 1200 rpm. Ugotovili smo, da obarjanje DPL pri višjih hitrostih mešanja poteka prehitro za še bolj pogosto vzorčenje vzorca iz delovne čaše, filtracijo in redčenje, s katerim bi dobili rezultate v enakih časovnih točkah, v katerih smo izvajali meritve na analizatorju velikosti delcev. Korelacija med obema izvedenima metodama je zato otežena.

### 5.4.3 Prisotnost nanodelcev

Poleg določitve velikosti delcev DPL z analizatorjem delcev pri spremljanju obarjanja iz prenasičene raztopine smo pri analizi rezultatov želeli preveriti tudi morebiten nastanek nanodelcev DPL v disperziji ob dvigu pH na 6,8. Uporabljena leča analizatorja zaznava delce velikosti od 50 nm do 880  $\mu\text{m}$ , kar predstavlja zelo široko območje velikosti delcev. To smo pri izvedbi naših poskusov tudi želeli, saj smo spremljali velikost delcev pri obarjanju DPL in smo želeli pri meritvah zajeti čim večje območje velikosti delcev.

Glede na rezultate poskusov, dobljene z analizatorjem velikosti delcev z izbrano lečo, pride do nastanka nanodelcev, z velikostjo 50 – 100 nm, po minuti in pol mešanja vzorca v mediju s pH = 6,8. Do takrat torej delcev v vzorcu ni oziroma so premajhni, da bi jih analizator zaznal. Dodatno smo pri analizi rezultatov primerjali nastanek nanodelcev DPL med poskusi z različno hitrostjo mešanja disperzije v celici. Glede na spodnjo sliko 27 predvidevamo, da bi hitrost mešanja disperzije lahko imela vpliv na nastanek nanodelcev, predvsem na njegov potek v začetnih časovnih točkah. Določena razlika med vzorci, ki so se mešali s hitrostjo 1000 rpm (poskus A4) in tistimi, ki so se mešali s hitrostjo 1200 rpm (poskus A2), se namreč opazi v drugi minuti ob dvigu pH medija na 6,8, kjer so volumski deleži nanodelcev v disperziji s počasnejšim mešanjem nižji.



*Slika 27: Primerjava povprečij volumskih deležev delcev DPL, velikosti 50 – 100 nm, pri obarjanju DPL ob dvigu pH medija na 6,8 v odvisnosti od časa pri dveh hitrostih mešanja disperzije.*

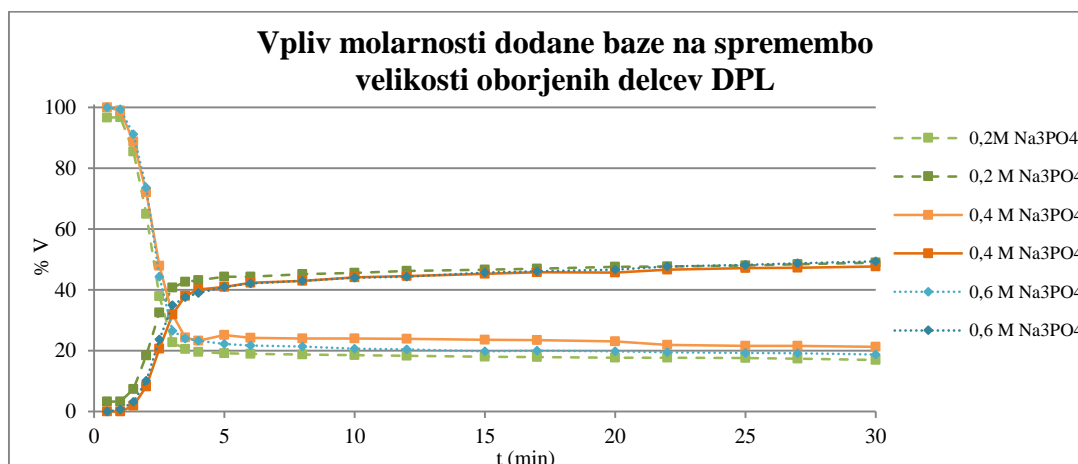
Vsekakor pa se moramo zavedati, da vsaka napaka pri opravljeni meritvi lahko pomeni veliko spremembo v vrednosti deležev nanodelcev, saj so le-ti v območju 0,5 - 1,2 % vseh delcev. Prisotnost večjih delcev namreč zelo zniža izračunan delež manjših delcev, saj govorimo o volumskem in ne o številčnem deležu delcev. V primeru, ko imamo v vzorcu enako število manjših in velikih delcev, bo volumski rezultat kazal v prid večjim delcem, medtem ko bo delež manjših delcev minimalen. S tem bi si lahko razlagali tudi visoke

RSD vrednosti povprečij poskusov mešanja disperzije pri različnih hitrostih, prikazanih na sliki 27.

#### 5.4.4 Vpliv koncentracije $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , uporabljenega za dvig pH medija, na velikost delcev

Drugi sklop poskusov na analizatorju velikosti delcev smo izvedli z namenom preverjanja vpliva različnih koncentracij dodane baze na velikost oborjenih delcev DPL. Uporabili smo 0,2 M (poskus A1), 0,4 M (poskus A2) in 0,6 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (poskus A3), pri čemer smo z vsemi dosegli končni pH raztopine 6,8.

Razlik med poskusi z različnimi koncentracijami uporabljenega  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  nismo opazili, kar je prikazano tudi na sliki 28. Moramo pa se zavedati, da so RSD vrednosti znotraj posameznih sklopov poskusov v določenih točkah zelo visoke (zaradi večje preglednosti RSD vrednosti na sliki 28 niso prikazane, zbrane so v preglednicah XXVI, XXVII in XXIX). Zaradi omenjenega ne moremo povzemati trdnih zaključkov glede vpliva koncentracije dodanega  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  na velikost delcev DPL pri obarjanju iz prenasočene raztopine, saj bi bila za to potrebna izvedba dodatnih paralel poskusov.



**Slika 28:** Vpliv koncentracije dodanega  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  na velikost oborjenih delcev DPL. V odvisnosti od časa je prikazan potek spremembe volumskih deležev delcev velikosti 0 – 2  $\mu\text{m}$  in 30 – 260  $\mu\text{m}$ , izraženih glede na celotno količino delcev v disperziji DPL z izhodno koncentracijo 145 mg/L.

## 6 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil spremljati proces obarjanja dipiridamola iz prenasičene raztopine s potopno sondo z optičnimi vlakni.

V prvem delu naloge smo proučevali omejitve analiziranja disperzij s potopno sondo z optičnimi vlakni.

Ugotovili smo, da:

- Oborjeni delci v vzorcu lahko vplivajo na nazobčanost UV-VIS spektrov in/ali na dvig bazne linije, s čimer lažno zvišajo vrednosti izmerjenih absorbanc.
- S filtracijo vzorcev pred analizo se izognemo vplivu oborjenih delcev, večjih od velikosti por izbranega filtra, na vrednosti absorbanc. Glede na rezultate poskusov predvidevamo, da odstranitve najmanjših delcev, ki bi lahko vplivali na rezultate v začetnih časovnih točkah, s filtracijo vseeno ne dosežemo.
- Filtrirane vzorce smo petkrat redčili z različnima medijema, pri čemer so imeli redčeni vzorci končni pH 6,8 oziroma 2,48. Predvidevamo, da je kljub različni topnosti DPL v mediju s pH 6,8 oziroma v mediju s pH 2,48, redčitev vzorcev z izbranimi medijema ustrezna, saj ob primerjavi rezultatov poskusov redčenja z obema medijema nismo opazili razlik med vrednostmi koncentracij DPL v posameznih časovnih točkah.

V nadaljevanju smo poskušali ovrednotiti, kako koncentracija izhodne raztopine DPL, hitrost mešanja disperzije in dodatek nekaterih polimerov vplivajo na obarjanje DPL:

- Z izhodno koncentracijo DPL vplivamo na hitrost njegovega obarjanja. Z višjo izhodno koncentracijo DPL namreč dosežemo hitrejše obarjanje DPL.
- Na hitrost obarjanja DPL lahko vplivamo tudi s hitrostjo mešanja disperzije. Hitrejše obarjanje DPL dosežemo s hitrejšim mešanjem disperzije.
- Z dodanim polimerom HPMC v medij smo povzročili upočasnitev obarjanja DPL, kar v skladu z literaturnimi podatki pripisujemo prisotnosti molekulskih interakcij med polimerom in DPL. Nasprotno prikazujejo rezultati z dodanim PVP v medij hitrejše obarjanje DPL v primerjavi z obarjanjem same učinkovine brez dodanega polimera.

Velikost delcev pri obarjanju DPL iz prenasičene raztopine smo določili s pomočjo laserske difrakcije. Pri poskusih smo opazili dve težavi:

- Vrednost faktorja zatemnitve ni dosegala minimalne želene vrednosti pri vseh poskusih. Na zanesljivost dobljenih rezultatov teh poskusov torej ne moremo sklepati.
- Na grafu porazdelitve velikosti delcev smo pri nekaterih poskusih opazili dodaten tretji vrh. Predvidevamo, da njegovo prisotnost povzročijo prisotni zračni mehurčki oziroma večji delci v pretočnem sistemu aparata. Ti bi lahko povzročili lažno zvišanje vrednosti delcev večjih velikosti in bistveno vplivali na izračunan volumski delež manjših delcev.

Dobljene rezultate poskusov določanja velikosti delcev na analizatorju velikosti delcev pri različnih hitrostih mešanja disperzije smo nadalje primerjali z rezultati, dobljenimi spektrofotometrično in prišli do naslednjih ugotovitev:

- Glede na dobljene rezultate na analizatorju velikosti delcev, pride ob dvigu pH na 6,8 do nastanka manjših oborjenih delcev DPL, v velikosti  $0 - 2 \mu\text{m}$ . Njihov delež v disperziji pri različnih hitrostih mešanja disperzije je višji pri hitrejšem mešanju disperzije. Delci se nato zvečajo in večina oborjenih delcev v disperziji, ne glede na hitrost njenega mešanja, zraste do velikosti  $30 - 260 \mu\text{m}$ .
- Primerjava rezultatov poskusov obarjanja DPL v čaši z rezultati analizatorja velikosti delcev je otežena, predvsem zaradi potrebe po uporabi visokih izhodnih koncentracijah DPL in visokih hitrosti mešanja disperzije pri izvedbi poskusov na analizatorju velikosti delcev.



## 7 LITERATURA

- (1) Dipyridamole.  
[https://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a382830.htm?q=dipyridamole&t=search&ss=text&tot=23&p=1#\\_hit](https://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a382830.htm?q=dipyridamole&t=search&ss=text&tot=23&p=1#_hit) (dostop 30.1.2018).
- (2) Terhaag B, Donath F, Le Petit G, Feller K: The absolute and relative bioavailability of dipyridamole from different preparation and the in vitro-in vivo comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1986; 24: 298-302.
- (3) European Pharmacopoeia 8th Edition, European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg 2014.
- (4) Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB: Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *J Pharm Pharmacol*, 2004; 56: 43-51.
- (5) Mitra A, Fadda HM: Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Mol Pharm*, 2014; 11: 2835-44.
- (6) Vora C, Patadia R, Mittal K, Mashru R: Preparation and characterization of dipyridamole solid dispersions for stabilization of supersaturation: effect of precipitation inhibitors type and molecular weight. *Pharm Dev Technol*, 2016; 21: 847-855.
- (7) Zecevic DE, Meier R, Daniels R, Wagner KG: Site specific solubility improvement using solid dispersions of HPMC-AS/HPC SSL--mixtures. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014; 87: 264-70.
- (8) Box K, Corner JE, Gravestock T, Stuart M: New ideas about the solubility of drugs. *Chem Biodivers*, 2009; 6: 1767-88.
- (9) Mettler Toledo: Supersaturation and crystallization for nucleation and growth - The driving force for crystal nucleation and growth.
- (10) [https://www.mt.com/gb/en/home/applications/L1\\_AutoChem\\_Applications/L2\\_Crystallization/Supersaturation\\_Application.html](https://www.mt.com/gb/en/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_Crystallization/Supersaturation_Application.html) (dostop 5.2.2018).
- (11) Chavan RB, Thipparaboina R, Kumar D, Shastri NR: Evaluation of the inhibitory potential of HPMC, PVP and HPC polymers on nucleation and crystal growth. *RSC Advances*, 2016; 6: 77569-77576.
- (12) Tsume Y, Matsui K, Searls AL, Takeuchi S, Amidon GE, Sun D, Amidon GL: The impact of supersaturation level for oral absorption of BCS class IIb drugs, dipyridamole and ketoconazole, using in vivo predictive dissolution system: Gastrointestinal Simulator (GIS). *Eur J Pharm Sci*, 2017; 102: 126-139.
- (13) Arnold YE, Imanidis G, Kuentz MT: Advancing in-vitro drug precipitation testing: new process monitoring tools and a kinetic nucleation and growth model. *J Pharm Pharmacol*, 2011; 63: 333-41.
- (14) Kostewicz ES, Brauns U, Becker R, Dressman JB: Forecasting the oral absorption behaviour of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. *Pharm Res*, 2002; 19: 345-349.

- (15) McIlvaine TC: A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem*, 1921; 183-186.
- (16) Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG: Laboratory Filtration Products, 2017.
- (17) Malvern Instruments Ltd.: Mastersizer – Getting started, MAN 0101, Worcestershire, 1997.
- (18) Entegris – Particle sizing systems: Light obscuration.
- (19) <http://pssnicomp.com/definitions/light-obscuration/> (dostop 8.3.2018).
- (20) Frank KJ, Locher K, Zecevic DE, Fleth J, Wagner KG: In vivo predictive mini-scale dissolution for weak bases: Advantages of pH-shift in combination with an absorptive compartment. *Eur J Pharm Sci*, 2014; 61: 32-9.
- (21) 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.
- (22) Agilent Technologies: Agilent Cary 60 UV-VIS, Guaranteed specifications, ZDA, 2011.
- (23) Han YR, Lee PI: Effect of Extent of Supersaturation on the Evolution of Kinetic Solubility Profiles. *Mol Pharm*, 2017; 14: 206-220.