

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA MARKOJA

**VPLIV IONSKE MOČI NA PRENASIČENJE IN VELIKOST OBORJENIH
DELCEV DIKLOFENAKA MED SPROŠČANJEM IZ TABLET S
POLIVINILPIROLIDONOM**

**THE INFLUENCE OF IONIC STRENGTH ON SUPERSATURATION AND SIZE
OF PRECIPITATED DICLOFENAC PARTICLES DURING RELEASE FROM
POLYVINYLPIRROLIDONE TABLETS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm., za strokovno vodenje in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem Tjaši Felicijan, mag. farm., in Greti Cof, dipl. ing. kem. tehn., za pomoč in praktične nasvete.

Velika zahvala gre moji družini, fantu ter prijateljem za spodbudo in podporo tekom študija.

Izjava

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

Monika Markoja

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 Prenasičenje.....	1
1.2 Vzpostavitev in vzdrževanje stanja prenasičenja	2
1.2.1 »Skok«.....	3
1.2.2 »Padalo«.....	4
1.3 Stabilizacija prenasičenja preko zaviranja obarjanja.....	5
1.3.1 Intermolekularne vodikove vezi.....	5
1.3.2 Viskoznost raztopine	6
1.3.3 Hidrofobne interakcije in rigidnost polimera	6
1.3.4 Molekularna masa polimera in sterična oviranost.....	7
1.4 Nekateri zaviralci obarjanja	7
1.4.1 Polimeri	8
1.4.2 Površinsko aktivne snovi.....	9
1.4.3 Ciklodekstrini	10
2 NAMEN DELA.....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 Aparature in pribor	12
3.2 Materiali	13
3.3 Preverjanje ustreznosti pipet	13
3.4 Priprava raztopin in pufrov	14
3.4.1 Priprava medijev z različnimi ionskimi močmi.....	14
3.5 Tabletiranje	15
3.6 Stabilizacija vzorcev	16
3.7 Umeritvene premice	16
3.8 Testi sproščanja	17
3.8.1 Sproščanje na pretočnem sistemu.....	17
3.8.2 Sproščanje v čaši	19
3.8.3 Sproščanje v USP II aparatu z vesli	19
3.8.4 Določanje velikosti oborjenih delcev	21
3.9 Analiza vzorcev.....	22
3.9.1 UV/VIS spektroskopija	22
3.9.2 HPLC kromatografija	23
3.10 Določanje ravnotežne topnosti	23

4	REZULTATI	24
4.1	Preliminarni poskusi.....	24
4.1.1	Preverjanje ustreznosti pipet	24
4.1.2	Umeritvene premice	24
4.1.3	Stabilizacija vzorca	25
4.1.4	Nastavitev ustreznega pretoka na pretočnem sistemu	25
4.2	Sproščanje na pretočnem sistemu	25
4.3	Sproščanje v čaši brez pretočnega sistema.....	26
4.4	Sproščanje v sistemu z vesli (USP II)	27
4.4.1	Primerjava avtomatskega in ročnega vzorčenja	27
4.4.2	Primerjava različnih hitrosti vrtenja mešala	28
4.4.3	Primerjava dveh različnih medijev z isto vrednostjo pH.....	29
4.5	Vpliv ionske moči	29
4.6	Določanje velikosti oborjenih delcev	31
4.7	Ravnotežna topnost natrijevega diklofenakata.....	35
5	RAZPRAVA	36
5.1	Stabilizacija vzorca	36
5.2	Sproščanje na pretočnem sistemu	36
5.3	Sproščanje v čaši brez pretočnega sistema.....	37
5.4	Sproščanje v sistemu z vesli (USP II)	38
5.4.1	Primerjava avtomatskega in ročnega vzorčenja	38
5.4.2	Izbira hitrosti mešanja	39
5.4.3	Izbira pH in medija za sproščanje	41
5.5	Vpliv ionske moči	44
5.5.1	Vpliv povečanja ionske moči pri sproščanju v 0,001 M HCl.....	44
5.5.2	Vpliv povečanja ionske moči pri sproščanju v DMB s pH 3	46
5.5.3	Vpliv biorelevantnega medija z različnimi ionskimi močmi.....	47
5.6	Določanje velikosti oborjenih delcev	49
5.6.1	Velikost oborjenih delcev diklofenaka v 0,001 M HCl.....	51
5.6.2	Velikost oborjenih delcev diklofenaka v 0,001 M HCl z različno ionsko močjo	51
5.6.3	Velikost oborjenih delcev diklofenaka v DMB s pH 3	52
5.7	Ravnotežna topnost natrijevega diklofenakata.....	53
6	ZAKLJUČEK.....	55
7	LITERATURA	57

POVZETEK

Eden izmed načinov za rešitev problema slabe topnosti učinkovin in s tem tudi nizke biološke uporabnosti, je uporaba dostavnih sistemov, ki omogočajo vzpostavitev stanja prenasičenja. V magistrski nalogi smo vrednotili sproščanje natrijevega diklofenakata (NaDIF) iz tablet, ki so poleg učinkovine in polnila vsebovale še polimer polivinilpirolidon (PVP), za katerega je bilo v nekaterih raziskavah dokazano, da lahko poveča topnost učinkovine in podaljša stanje prenasičenja. Osredotočili smo se predvsem na vpliv ionske moči medija na prenasičenje diklofenaka (DIF) med procesom sproščanja. Večino testov sproščanja smo izvedli na USP II napravi z vesli ter jih poskušali s spreminjanjem hitrosti vrtenja mešala ter vrste medija optimizirati tako, da bi bili relativni odkloni med posameznimi paralelami čim manjši. Poskuse smo izvedli pri hitrosti vrtenja mešala 75 in 100 rpm, v treh različnih medijih, štirikrat redčenem McIlvainovem pufu (DMB) s pH-vrednostjo 3 in 4 ter v 0,001 M klorovodikovi kislini (HCl). Ugotovili smo, da se pri sproščanju v DMB zmanjša maksimalno prenasičenje in da pride do zmanjšane hitrosti obarjanja v primerjavi z 0,001 M HCl. Zaradi te razlike smo želeli preveriti vpliv ionske moči na sproščanje diklofenaka tako, da smo v oba medija dodali natrijev klorid (NaCl) do ionske moči 0,15 M in 0,52 M. Večja ionska moč je zmanjšala stopnjo prenasičenja in hitrost obarjanja diklofenaka v 0,001 M HCl. Rezultati, ki smo jih dobili ob povečanju ionske moči DMB na 0,15 M in 0,52 M, niso bili zanesljivi, saj so bile koncentracije in s tem izmerjene absorbance prenizke. Z naknadnim filtriranjem s filtri z velikostjo por 0,2; 0,45 in 0,8 μm smo nato odkrili, da so se v filtratih nahajali tudi delci, ki so manjši od por filtra z velikostjo 10 μm , ki smo ga imeli nastavljenega na kanilah za vzorčenje. Določeno navidezno maksimalno prenasičenje v 0,001 M HCl se je z manjšanjem velikosti por filtra, zmanjšalo v večji meri kot pri filtraciji vzorcev iz DMB. Vendar so v določenem maksimalnem prenasičenju že lahko zajeti tudi oborjeni ali neraztopljeni delci ali pa je prišlo do obarjanja diklofenaka v času med odvzemom vzorca in redčenjem z natrijevim hidroksidom (NaOH). Na koncu smo želeli določiti ravnotežno topnost NaDIF (brez polimera PVP) v medijih, v katerih smo izvedli sproščanja. Pri določanju ravnotežne topnosti v DMB z vrednostjo pH 3 smo kot topnost definirali koncentracijo, ki smo jo izmerili po 48 urah, saj se ravnotežno stanje vzpostavi po daljšem času, ko se koncentracije s časom ne spreminjajo več. Koncentracija je bila nekoliko nižja

od tiste, ki smo jo dobili na koncu sproščanja v USP II aparatu, kar lahko nakazuje na inhibitorni učinek PVP na obarjanje diklofenaka.

Ključne besede: natrijev diklofenakat, polivinilpirolidon, testi sproščanja, obarjanje, ionska moč, prenasičenje

ABSTRACT

One of the ways to solve the problem of poor solubility of active substances, and with it low bioavailability, is to use drug delivery systems, which utilize the method of supersaturation. In this Master's thesis we investigated the release of diclofenac sodium (NaDIF) from tablets, that along with the active substance also contained polymer polyvinylpyrrolidon, which was shown to increase the solubility of the active substance and to prolong the state of supersaturation. We focused on the influence of ionic strength of the medium, on supersaturation of diclofenac during the release process. We tested the release of the active substance mostly using USP II paddle apparatus and further optimized our experiments with changing of stirring rate and dissolution media, to minimize the relative deviations between parallels. We performed release experiments at mixing speed 75 in 100 rpm and three different medium, in four times diluted McIlvain buffer (DMB) with the pH values of 3 and 4 and in 0,001 M HCl. We found that maximal supersaturation concentrations are lower in DMB, and we get a lower precipitation rate as compared to 0,001 M HCl. Considering this result, we wanted to investigate the effect of ionic strength on the release of NaDIF, by adding sodium chloride (NaCl) up to the ionic strength of 0,15 M and 0,52 M. The solution with higher ionic strength decreased the degree of supersaturation and the rate of precipitation of NaDIF in 0,001 M HCl. On the other hand, when we increased the ionic strength of DMB up to 0,15 and 0,52 M the results were not reliable, since the concentrations and with it absorbances, were too low to be measured accurately. By additional filtration with filters with pore sizes 0,2, 0,45 and 0,8 μm we found that filtered solutions contained precipitated particles smaller than the 10 μm . Using a smaller pore filter lowered the determined maximum supersaturation concentration in 0,001 M HCl more than in DMB. However, it is important to note that the determined supersaturation state might already contain precipitated particles or diclofenac might have precipitated between the time of sampling and the time of dilution with NaOH. Finally, we also wanted to determine the equilibrium solubility of NaDIF (without PVP polymer) in the media in which we performed the release of active substance in previous experiments. When determining the equilibrium solubility in DMB pH 3, we defined solubility as the concentration measured at 48 hours. This was because solubility equilibrium takes a certain amount of time to establish. Our obtained concentration was slightly lower than the

one obtained after the end of release process in the USP II apparatus, which could be due to the inhibitory effect of PVP on diclofenac precipitation.

Keywords: diclofenac sodium, ionic strength, supersaturation, precipitation

SEZNAM OKRAJŠAV

NaDIF – natrijev diklofenakat

DIF – diklofenak

BU – biološka uporabnost

DMB – redčen McIlvainov pufer (ang. diluted McIlvaine Buffer)

FO – farmacevtska oblika

HPMC – hidroksipropil metilceluloza, hipromeloza

HPMCAS – hidroksipropil metilceluloza acetat sukcinat

PEG – polietilenglikol

PAS – površinsko aktivna snov

PS – pomožna snov

PVP – polivinilpirolidon

RPM – število obratov na minuto (ang. revolutions per minute)

SD – standardni odklon

KV – koeficient variacije

USP – Farmakopeja Združenih držav Amerike (ang. the United States Pharmacopeia)

PI – polimerni inhibitorji

BCS – Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (ang. biopharmaceutical Classification System)

TPGS – D- α -tokoferil polietilen glikol 1000 sukcinat

SDDS – dostavni sistemi, ki omogočajo nastanek prenasičenja (ang. supersaturating drug delivery systems)

SEDDS – samoemulgirajoči sistemi (ang. self-emulsifying drug delivery systems)

SIF - simulirana črevesna tekočina (ang. simulated intestinal fluid)

1 UVOD

Z razvojem na področju, ki se ukvarja z iskanjem novih učinkovin, se vse pogosteje srečujemo s kandidati, ki kažejo visoko afiniteto do tarče, vendar imajo neželene fizikalno-kemijske lastnosti, kot sta visoka hidrofobnost in slaba topnost. Učinkovine s slabo topnostjo trenutno predstavljajo velik izziv na področju razvoja peroralnih farmacevtskih oblik, ki predstavljajo najbolj zaželeno aplikacijo zdravila. Fizikalno-kemijske lastnosti, kot sta topnost in permeabilnost, so namreč ključne za absorpcijo učinkovine, od katere je odvisna biološka uporabnost. Ta je definirana kot merilo hitrosti absorpcije in deleža učinkovine, ki v nespremenjeni obliki doseže krvni sistemski obtok. Učinkovine, ki imajo slabo topnost in visoko permeabilnost, uvrščamo v skupino II v biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu (BCS, ang. Biopharmaceutics Classification System). Gre za klasifikacijo učinkovin na podlagi vodotopnosti in permeabilnosti. Absorpcija učinkovin iz skupine BCS II je omejena z njihovo topnostjo, za izboljšanje katere obstaja že veliko pristopov: zmanjševanje velikosti delcev, uporaba različnih polimorfov, kompleksacija s ciklodekstrini, solubilizacija, uporaba trdnih disperzij, predzdravila, tvorba soli ... Eden izmed pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti slabo topnih učinkovin je tudi uporaba formulacij, ki omogočajo vzpostavitev prenasičenega stanja (1, 2).

1.1 Prenasičenje

Prenasičenje je eden izmed možnih pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti učinkovin, ki se uporabljajo v peroralnih formulacijah in so slabo topne. V stanju prenasičenja je koncentracija učinkovine v raztopini nad njeno ravnotežno topnostjo, kar pomeni, da če je učinkovina dobro permeabilna, se na ta način lahko poveča absorpcija (3).

Stopnja prenasičenja (S) (Enačba 1) je definirana kot razmerje med koncentracijo učinkovine, ki jo izmerimo med poskusom v določeni časovni točki (C), ter ravnotežno topnostjo učinkovine (C_{rav}) v enakem mediju. Raztopina je nasičena, če je stopnja prenasičenja enaka 1. Če je manjša od 1, govorimo o nenasičenih raztopinah, pri stopnji prenasičenja večji od 1 pa o stanju prenasičenja (4, 5).

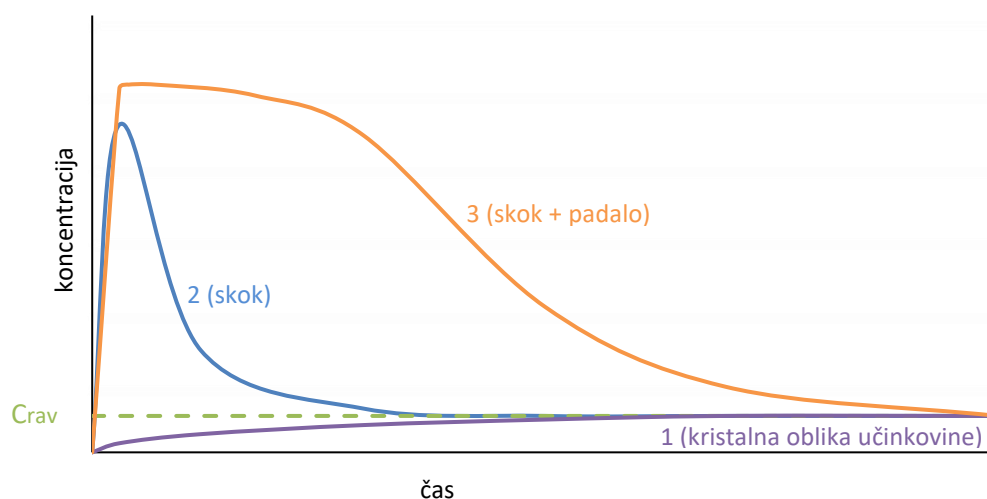
$$S = \frac{C}{C_{rav}}$$

Enačba 1 (4)

V nasprotju s solubilizacijo se v stanju prenasíčenja poveča koncentracija raztopljene učinkovine, kar ji omogoča prehajanje skozi epitelij. Prenasičenje je termodinamično nestabilno stanje, vendar če ga lahko vzdržujemo dalj časa v metastabilnem stanju, je to učinkovitejše za povečanje biološke uporabnosti kot sama solubilizacija. Uporaba površinsko aktivnih snovi ali kompleksov s ciklodekstrini lahko namreč zmanjša obseg absorpcije zaradi zmanjšanja permeabilnosti učinkovine (6).

1.2 Vzpostavitev in vzdrževanje stanja prenasíčenja

Prenasičeno termodinamično nestabilno stanje učinkovine mora biti vzpostavljeno in vzdrževano toliko časa, da se lahko učinkovina absorbira v želenem časovnem okvirju. Guzman in sodelavci (7) so za koncept vzpostavitve in vzdrževanja stanja prenasíčenja uporabili izraza »skok« (ang. spring) in »padalo« (ang. parachute), kar je prikazano na Sliki 1.



Slika 1 – Krivulje, ki prikazujejo koncentracijo učinkovine v odvisnosti od časa, ter ponazoritev »skoka« in »padala«. Vijolična krivulja prikazuje raztapljanje termodinamično najbolj stabilne faze – kristalne oblike učinkovine. Modra krivulja prikazuje raztapljanje visoko energijske oblike učinkovine »skoka« v odsotnosti polimerov. Oranžna krivulja prikazuje raztapljanje visoko energijske oblike učinkovine »skoka« v prisotnosti inhibitorjev obarjanja, ki povzročijo nastanek »padala«. Zelena črta prikazuje ravnotežno topnost učinkovine (Crav)(4).

Prenasičenje se lahko vzpostavi v fizioloških pogojih s prehodom šibko bazičnih učinkovin iz želodca v tanko črevesje zaradi pH-gradienta. Drugi način je razvoj posebnih dostavnih sistemov, ki omogočajo nastanek prenasíčenja (SDDS, supersaturating drug delivery systems) (3). Pri razvoju teh formulacij je poleg vzpostavitve prenasíčenja pomembno to, da se zamakne obarjanje učinkovine in se dalj časa vzdržujejo koncentracije nad ravnotežno topnostjo. Prenasičenje je namreč termodinamično nestabilno stanje, ki teži k

obarjanju, dokler ne doseže ravnotežnega stanja učinkovine, ki ima najnižji kemijski potencial (4).

1.2.1 »Skok«

Vzpostavitev termodinamično nestabilnega prenasičenega stanja v raztopini imenujemo »skok«, ki je na Sliki 1 prikazan z modro krivuljo. Prenasičenje se lahko vzpostavi pri raztapljanju učinkovine, ki ima višjo energijsko obliko (npr. amorfna oblika), v primerjavi s kristalno obliko učinkovine, ki je stabilnejša in ima nižjo energijo. Na hitrost raztapljanja lahko vplivamo tudi s spremembo velikosti delcev ali močljivosti učinkovine. Drugi način za vzpostavitev prenasičenega stanja so še sistemi, ki omogočajo nastanek visoko koncentriranih raztopin (sotopila, formulacije z lipidi). Primeri visoko koncentriranih oblik raztopin, dostavnih sistemov z visoko energijo so navedeni v Preglednici I (4, 5).

Preglednica I – Primeri formulacij, ki omogočajo nastanek prenasičenja (4)

Prenasičenje	Možnosti za nastanek prenasičenja	Primeri
Vzpostavljanje (»skok«)	visoko koncentrirana raztopina	uporaba sotopil
		formulacije z lipidi
		samoemulgirajoči sistemi
	sistemi z visoko energijo, ki omogočajo hitro raztapljanje in višjo navidezno topnost	amorfne oblike
		nanodelci
		kristalinične soli
		kokristali
Vzdrževanje (»padalo«)	zaviranje obarjanja	polimeri
		surfaktanti
		ciklodekstrini

Trdne disperzije se pogosto uporabljajo za izboljšanje biološke uporabnosti slabo topnih učinkovin. Za njih je značilno, da je učinkovina dispergirana v nosilcu, za katere se danes najbolj pogosto uporabljajo različni polimeri ter površinsko aktivne snovi. Učinkovina je lahko v nosilcu dispergirana na različne načine, lahko je popolnoma raztopljena ali pa v obliki kristala ali amorfa suspendirana v nosilcu. Amorfnе učinkovine imajo višjo topnost kot kristalne oblike, kar vodi do izboljšanja absorpcije slabo topnih učinkovin po peroralni

aplikaciji. Hidrofilni nosilci igrajo pomembno vlogo pri povečanju močljivosti in površine za raztapljanje ter pri stabiliziranju metastabilnega stanja. Tako lahko z uporabo trdnih disperzij/raztopin s pravo izbiro polimera pride do vzpostavitve prenasičenih koncentracij *in vivo*, ko so farmacevtske oblike (FO) izpostavljene tekočinam v gastrointestinalnem traktu (GIT), in tudi do upočasnitve obarjanja (4, 5).

Formulacije z lipidi, pri katerih se učinkovina popolnoma raztopi v različnih oljih, kot so trigliceridi in mešani gliceridi, se tudi pogosto uporabljajo za doseganje prenasičenih koncentracij. Z izpostavitvijo FO gastrointestinalnemu okolju se vzpostavi prenasičeno stanje in se zaradi prisotnosti lipidov vzdržuje v gastrointestinalnem traktu dalj časa (4, 5).

1.2.2 »Padalo«

Pojav prenasičenega stanja oz. »skoka« še ne pomeni povečanja biološke uporabnosti, saj mora učinkovina biti v prenasičenem stanju dovolj časa, da pride do absorpcije. To lahko dosežemo s pomočjo zaviralcev obarjanja, ki začasno podaljšajo stanje prenasičenja. Hitrost obarjanja je odvisna od stopnje prenasičenja; višja kot je, hitreje pride do obarjanja učinkovine. Veliko snovi je že bilo raziskanih z namenom ugotavljanja vpliva na zaustavitev ali vsaj upočasnitev procesa obarjanja učinkovin preko vpliva na nukleacijo ali kristalno rast. To so večinoma polimerni inhibitorji (PI), kot so celulozni polimeri, vinil polimeri in pa tudi surfaktanti, ciklodekstrini (4, 5).

Pri razvoju in načrtovanju formulacij, ki omogočajo prenasičenje, je cilj najti optimalno kombinacijo »skoka« in »padala« (4). Značilen primer takšne kombinacije je bil prikazan pri uporabi novih trdnih peroralnih oblik za izboljšanje absorpcije celekoksiba. Kombinacija kristalne soli, ki omogoča nastanek »skoka«, z zaviralci obarjanja, ki podaljšajo čas prenasičenja in povzročijo nastanek »padala«, je izboljšala profil raztapljanja in povečala biološko uporabnost (BU). V članku so dokazali, da natrijeva sol celekoksiba skupaj s hidroksipropil celulozo (HPC) in v kombinaciji s surfaktantom D- α -tokoferil polietilen glikol 1000 sukcinatom (TPGS) v trdni disperziji zagotovi 100 % biološko uporabnost pri psih, medtem ko tržni izdelek pri ljudeh zagotavlja le 40 % biološko uporabnost (7).

1.3 Stabilizacija prenasičenja preko zaviranja obarjanja

Obarjanje učinkovine je sestavljeno iz dveh stopenj: nukleacije in rasti kristalov. V prvi stopnji se raztopljene molekule znotraj raztopine zberejo v dvo- ali tridimenzionalne skupke. Ti skupki rastejo, dokler ne presežejo kritične velikosti. Sledi sekundarna stopnja – kristalna rast, kjer se molekule periodično razporejajo in tvorijo kristalno strukturo (5).

Zaviranje obarjanja učinkovine je odvisno od lastnosti inhibitorja, učinkovine in medija. Doseže se lahko na termodinamičen ali kinetičen način. Termodinamičen način zaviranja obarjanja učinkovine je dosežen preko povečanja topnosti učinkovine in s tem zmanjšanja stopnje prenasičenja, hitrosti nukleacije in kristalne rasti. Primer termodinamičnega načina zmanjšanja obsega obarjanja je uporaba PAS (površinsko aktivne snovi), sotopil in ciklodekstrinov. Kinetičen način zaviranja obarjanja je dosežen preko zaustavljanja ali upočasnjevanja obarjanja v prenasičenem stanju. Polimeri, ki se uporabljajo za zaviranje obarjanja učinkovine, večinoma delujejo preko kinetičnega načina inhibicije, lahko pa vplivajo tudi na nukleacijo kristalov oz. njihovo rast preko interakcij z molekulami učinkovine ali s spreminjanjem lastnosti medija. Zaustavljanje nukleacije učinkovin naj bi bilo proporcionalno koncentraciji polimernega inhibitorja (4, 5). V nekaterih primerih pa se polimer adsorbira na površino kristala in blokira dostop molekule na kristalno površino, kar preprečuje nadaljnjo rast kristala. V eni izmed raziskav (8) so preiskovali vpliv polimera polivinilpirolidona (PVP) na proces kristalizacije bikalutamida v dostavnem sistemu, ki omogočajo nastanek prenasičenja (SDDS, ang. supersaturating drug delivery systems). Ugotovili so, da se je PVP absorbiral na kristale v raztopini in oblikoval fizično bariero, ki je preprečila molekulam učinkovine, da bi oblikovale kristalno mrežo. S tem so dokazali, da PVP signifikantno zmanjša kristalno rast, medtem ko na proces nukleacije ni vplival.

1.3.1 Intermolekularne vodikove vezi

Nastanek kristalizacijskih jeder oz. nukleacija je prvi korak pri kristalizaciji učinkovine. Tvorba vodikovih vezi med učinkovino in polimerom povzroči zakasnitev nukleacije. Na ta način zavirajo tudi obarjanje učinkovine. Nekateri študije so pokazale, da zaviranje obarjanja učinkovine z nekaterimi polimeri lahko prisodimo prav zaustavljanju procesa nukleacije (4, 5). Raghavan (9) je preiskoval proces kristalizacije hidrokortizonijevega acetata in vpliv dodatka polimerov hidroksipropil metilceluloze (HPMC),

polivinilpirolidona (PVP) in polietilenglikola (PEG 400). Izmerjeni so bili časi kristalizacije, definirani kot točke, kjer so pod mikroskopom prvič opazili kristal. Ugotovili so, da kateri koli od teh polimerov zaustavi nukleacijo učinkovine, medtem ko v odsotnosti polimerov pride do spontane nukleacije. V študiji so dokazali, da je HPMC bolj učinkovit pri zaviranju kristalizacije hidrokortizonijevega acetata kot PVP in PEG 400. Poleg tega se čas, preden pride do tvorbe kristalizacijskih jeder, podaljša s povečanjem koncentracije HPMC, kar nakazuje, da je obarjanje učinkovine odvisno od koncentracije dodanega polimera. Hidrokortizonijev acetat ima tri akceptorske skupine in dve donorski skupini. HPMC ima v primerjavi s PVP več donorskih skupin in je zmožen tvorbe več vodikovih vezi. Zato je v tem primeru učinkovitejši kot PVP.

Za učinkovine, ki imajo veliko število donorjev vodikovih vezi, je polimer, ki ima akceptorsko skupino, kot je npr. PVP, bolj učinkovit pri tvorbi vodikovih vezi z učinkovino in zaviranju obarjanja kot HPMC, ki ima več donorskih skupin. Polimeri, ki imajo več donorjev, kot so derivati celuloze, pa so bolj primerni za učinkovine, ki imajo v strukturi več akceptorjev vodikove vezi. Vodikove vezi so samo ene izmed številnih interakcij, ki se pojavijo med učinkovino in polimerom. Drugi faktorji, kot so hidrofobne interakcije, sterična oviranost strukture in lokacije funkcionalnih skupin imajo tudi značilen vpliv na obarjanje učinkovine (4, 5).

1.3.2 Viskoznost raztopine

Stopnja kristalne rasti je direktno sorazmerna s hitrostjo difuzije določene učinkovine v danem mediju. Povečanje viskoznosti raztopine upočasni difuzijo in s tem kristalizacijo (5). V članku (10) so opisali, da je ob prisotnosti mikrokristalne celuloze (MC) v mediju prišlo do podaljšanja prenasičenega stanja ibuprofena zaradi povečane viskoznosti raztopine.

1.3.3 Hidrofobne interakcije in rigidnost polimera

V nekaterih člankih so opisani poskusi z uporabo hidrofobnih interakcij za razlago zaustavitve obarjanja. V eni izmed raziskav (11) so testirali več polimerov z različno hidrofobnostjo in njihovo zmožnost zaviranja obarjanja ritonavira. Testirali so sintetične polimere in celulozne derivate z različnimi hidrofobnimi skupinami. Celulozni polimeri z zmerno hidrofobnostjo so bili v primerjavi s hidrofilnimi polimeri in visoko hidrofobnimi

polimeri bolj učinkoviti zaviralci kristalne rasti. Hidrofilni polimeri rajši interagirajo z molekulami topila, visoko hidrofobni polimeri pa med sabo (4). Poleg hidrofobnosti lahko tudi rigidnost polimera vpliva na adsorpcijo polimera na kristalne površine učinkovine. Gao in sodelavci (12) so ugotovili, da je HPMC učinkovit zaviralec nukleacije oz. obarjanja, medtem ko PVP K30 ni pokazal nobenih sposobnosti zaviranja obarjanja v samoemulgirajočem sistemu (SEDDS) z učinkovino AMG 517. Verige polimera HPMC, ki je bolj rigiden, se učinkovito vmešajo v spontano nukleacijo v AMG 517 v visoko prenasičenem stanju. S tem HPMC zavre nukleacijo oz. obarjanje učinkovine in dalj časa vzdržuje visoke koncentracije učinkovine.

1.3.4 Molekularna masa polimera in sterična oviranost

Molekularna masa in sterična oviranost polimera imata pomembno vlogo pri adsorpciji polimera na kristale in preprečevanju kristalne rasti. V eni izmed študij (13) so prikazali, da sta PVP 10000 in PVP 50000 bolj učinkovita pri zaustavljanju kristalne rasti paracetamola kot PVP 2000. V drugi študiji (14) so prav tako preučevali vpliv molekulske mase polimera in ugotovili, da PVP K90 bolj izrazito zavira kristalizacijo felodipina v primerjavi s polimerom PVP K12, ki ima nižjo molekulsko maso. Do povečanega zaviranja obarjanja učinkovine s polimeri z višjo molekulsko maso pride zaradi povečanega števila dostopnih funkcionalnih skupin na verigi polimera, kar poveča število interakcij polimera s kristalnimi površinami. Pride do boljše pokritosti kristalne površine s polimeri in večjega števila interakcij med molekulami učinkovine ter polimerom, kar se kaže v učinkovitejšem upočasnjevanju ali ustavitvi kristalne rasti. Na podlagi tega so sklepali, da so polimeri z visoko molekulsko maso v primerjavi s polimeri z nižjo molekularno maso bolj učinkoviti pri vzdrževanju prenasičenosti (5).

1.4 Nekateri zaviralci obarjanja

Namen uporabe zaviralcev obarjanja je podaljšanje časa prenasičenja oz. vzdrževanje visoke koncentracije učinkovine nad ravnotežno topnostjo, kar lahko značilno izboljša absorpcijo ter biološko uporabnost *in vivo*. Zaviralci obarjanja, ki se uporabljajo kot pomožne snovi v formulacijah za slabo topne učinkovine, so polimeri, površinsko aktivne snovi (PAS) in ciklodekstrini. Največ se uporabljajo celulozni derivati, kot so HPMC, hidroksipropil metilceluloza acetat sukcinat (HPMCAS), mikrokristalna celuloza (MC), hidroksipropil celuloza (HPC) ter polimeri vinila, kot so PVP, polivinil alkohol (PVA),

polivinilpirolidon vinil acetat (PVPVA). Nekatere izmed formulacij z zaviralci obarjanja so navedene v Preglednici II.

Preglednica II: Nekateri primeri formulacij z zaviralci obarjanja, ki omogočajo prenasičenje in podaljšajo čas prenasičenja. Prikazane so učinkovine, oblike formulacij (ki omogočajo nastanek »skoka«), vrste inhibitorjev (ki omogočajo nastanek »padala«).

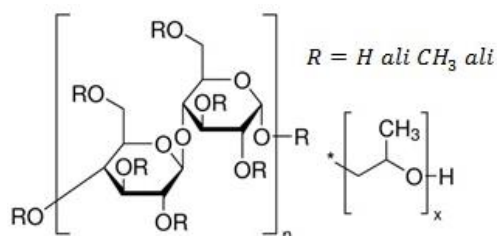
Učinkovina	Pojav »skoka« (oblika formulacije)	Pojav »padala« (vrsta inhibitorja obarjanja)	Referenca
Takrolimus	trdna disperzija	HPMC	15
AMG 517	SEDDS	HPMC	12
Celekoksib	kristalna sol	surfaktant (TPGS) + HPC	7
Itrakonazol	trdna disperzija	HPMC	19
Paklitaksel	SEDDS	HPMC	16
Indirubin	SEDDS	PVP	18
Ibuprofen	kristalna sol	HPMC	10

1.4.1 Polimeri

Hidroksipropil metil celuloza (HPMC) se je izkazal kot učinkovit zaviralec obarjanja tako v trdnih disperzijah kot tudi v lipidnih formulacijah. Tvori lahko vodikove vezi, saj ima veliko število hidroksilnih skupin. Tvorba vodikovih vezi med HPMC in učinkovino zmanjša aktivacijsko energijo nukleacije, hkrati pa omogoča HPMC, da se adsorbira na površino kristala in s tem prepreči dostop molekulam učinkovine ter zmanjša kristalno rast (5). Yamashita (15) je preučeval sproščanje takrolimusa iz trdnih disperzij, ki so vsebovale PEG 6000, PVP in HPMC. Raziskave *in vitro* so pokazale, da se po raztapljanju vseh formulacij s polimeri vzpostavijo prenasočene koncentracije učinkovine 50 µg/l, kar je dosti višje od 1–2 µg/mL brez dodanih polimerov. Le pri formulaciji s HPMC se je stanje prenasočena vzdrževalo preko 24 ur, pri drugih dveh uporabljenih polimerih se je učinkovina hitro oborila.

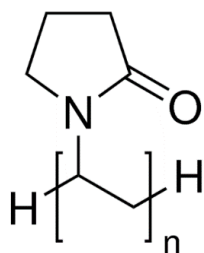
HPMC je bil učinkovit tudi pri zaviranju obarjanja paklitaksela v samoemulgirajočem dostavnem sistemu (SEDDS). Z študijo *in vitro* so dokazali, da je formulacija s HPMC podaljšala prenasočeno stanje za 2 uri v primerjavi s formulacijo brez HPMC, kjer je prišlo do hitrega obarjanja (16).

Tudi v drugi izmed študij (10) so ugotovili enak vpliv HPMC. Topna natrijeva sol ibuprofena je med raztapljanjem omogočila visoko stopnjo prenasičenja, medtem ko je HPMC upočasnila nukleacijo in kristalno rast.



Slika 2: Struktura hidroksipropil metil celuloze (20)

Polivinilpirolidon (PVP) je najbolj pogosto uporabljen polimer za pripravo amorfnih trdnih disperzij. Primeren je kot nosilec, saj je amorfen, biokompatibilen in vodotopen. Ima akceptorske skupine, ki lahko tvorijo vodikove vezi z drugimi donorji (17). V eni izmed raziskav (18) so ugotovili, da je samoemulgirajoči dostavni sistem (SEDDS), ki je vseboval 0,5 % PVP K17 upočasnil obarjanje in vzdrževal visoke koncentracije indirubina za približno 2 uri. Biološka uporabnost iste formulacije se je v primerjavi s formulacijo brez polimera povečala za 1,3 x pri študijah na podganah. Za PVP je značilno, da bolj zaustavlja kristalno rast kot nukleacijo, tako da se adsorbira na kristal in s tem upočasnjuje kristalno rast. Za PVP polimere z višjo molekularno maso je bilo dokazano, da so boljši zaviralci kristalne rasti indometacina kot tisti z manjšo molekularno maso (4, 5).



Slika 3: Struktura polivinilpirolidona (21)

1.4.2 Površinsko aktivne snovi

Površinsko aktivne snovi (PAS) so znane po tem, da imajo zmožnost povečanja topnosti učinkovin (termodinamičen način), lahko pa tudi zavrejo obarjanje pri prenasičenih raztopinah. To dosežejo s povečanjem ravnotežne topnosti učinkovine, kar vodi v zmanjšanje obsega nukleacije in kristalne rasti. Če PAS dodamo v prenasičeno raztopino v

koncentracijah, ki so nad kritično micelarno koncentracijo, pride zaradi povišanja topnosti in znižanja stopnje prenasíčenja do zmanjšane hitrosti nukleacije in kristalne rasti (4). V eni izmed študij (19) so testirali tri PAS (Tween 20, TPGS, Cremophor RH 40) in njihov vpliv na vzdrževanje prenasíčenja itrakonazola v kislem mediju. Dokazano je bilo, da PAS lahko povečajo stabilnost prenasíčenega stanja itrakonazola oz. vzdržujejo koncentracije učinkovine nad ravnotežno topnostjo. V odsotnosti surfaktantov je namreč prišlo do takojšnjega obarjanja itrakonazola.

1.4.3 Ciklodekstrini

Ciklodekstrini so dobro poznani po zmožnosti solubilizacije in se široko uporabljajo za povečanje biološke uporabnosti. Tvorijo komplekse s številnimi hidrofobnimi učinkovinami in tako povečajo njihovo solubilizacijo ter zmanjšajo stopnjo prenasíčenja. To vodi k zmanjšanju hitrosti nukleacije in kristalne rasti. Študije so pokazale, da poleg povečanja solubilizacije, ciklodekstrini povečajo stabilnost prenasíčenih raztopin (4, 5). Brewster in sodelavci (19) so dokazali, da ciklodekstrina HP β CD in SBE β CD izboljšata stabilnost prenasíčene raztopine itrakonazola z zaustavljanjem nukleacije in z upočasnitvijo kristalne rasti. Ob prisotnosti ciklodekstrinov je bilo prenasíčeno stanje vzdrževano najmanj 2 uri, kar dokazuje, da imajo ciklodekstrini vpliv na pojav »skoka« in pa tudi »padala«.

2 NAMEN DELA

V magistrskem delu želimo proučiti sproščanje in pojav prenasičenja natrijevega diklofenakata (NaDIF), soli slabo topne učinkovine iz tablet s polivinilpirolidonom (PVP), še posebej z vidika vpliva ionske moči medija.

Pred pričetkom poskusov bomo zagotovili pogoje, v katerih bo koncentracija učinkovine ob času odvzema vzorca ostala enaka do takrat, ko bomo vzorcu merili absorbanco.

Najprej bomo sproščanje izvedli na pretočnem sistemu, saj ta naprava dobro posnema fiziološke pogoje zaradi majhnega volumna medija in vzpostavljenega pretoka.

Sproščanje bomo izvedli tudi v aparatu USP II (ang. The United States Pharmacopeia) z vesli in poskus optimizirali tako, da bomo dosegli čim boljše ponovljivost med posameznimi paralelkami. Najprej bomo primerjali avtomatsko vzorčenje z ročnim. Spreminjali bomo tudi hitrost vrtenja mešala in medije ter preučevali vplive obeh na prenasičenje.

Pripravili bomo medije z različnimi ionskimi močmi in ugotavljali vpliv ionske moči na sproščanje in prenasičenje NaDIF. S pomočjo filtrov z različno velikostjo por 10; 0,8; 0,45 in 0,2 μm bomo okvirno poskusili določiti porazdelitev velikosti oborjenih delcev.

Določili bomo ravnotežno topnost NaDIF v medijih, v katerih bomo izvedli sproščanje. Koncentracije, ki jih bomo dobili pri poskusih določanja topnosti, bomo nato primerjali s koncentracijami, ki smo jih dobili po koncu sproščanja na USP II aparatu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Aparature in pribor

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in pribor:

- digitalna tehtnica Exacta 300 EB, Železniki, Slovenija,
- analitska tehtnica Mettler Toledo AG 245, Scwarzenbach, Švica,
- pH meter Mettler Toledo MP 220, Schwarzenbach, Švica,
- UV/VIS Spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA,
- tekočinski kromatograf z visoko ločljivostjo (HPLC), Agilent Technologies 1100 Series, Cary, NC, ZDA,
- HPLC kolona Kromasil C 18 (150 x 4,6 mm; 5 µm),
- tabletirka na udarec, Killian SP 300, KILLIAN Tableting GmbH, Cologne Nemčija,
- avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija,
- centrifuga, Centrifuge 5415 R, Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija,
- naprava za testiranje sproščanja VanKel VK 7000 Series, Vankel Technology, ZDA,
- peristaltična črpalka PA-SK4 control, IKA WERKE, Nemčija,
- grelec in magnetno mešalo IKA WERKE, Nemčija,
- pretočne cevke iz silikona z notranjim premerom 1,52 mm, IKA, Nemčija,
- avtomatski vzorčevalnik Varian VK 8000,
- membranski filtri iz regenerirane celuloze z velikostjo por 0,45 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija,
- celulozno-acetatni filtri z velikostjo por 0,2 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija,
- celulozno-acetatni filtri z velikostjo por 0,45 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija,
- celulozno-acetatni filtri z velikostjo por 0,8 µm, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija,
- filtri »full flow«, z velikostjo odprtin 10 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA.
- nastavki za filtriranje, brizge, injekcijske igle, epruvete,

- steklene pipete, bučke, čaše, tehtalni čolniček.

3.2 Materiali

Pri delu smo uporabljali naslednje materiale:

- natrijev diklofenakat (NaDIF) p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija,
- natrijev dihidrogenfosfat, NaH_2PO_4 , Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- citronska kislina monohidrat p. a., Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- natrijev hidroksid, NaOH, Tritisol® za pripravo 1 M NaOH, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- klorovodikova kislina, HCl, Tritisol® za pripravo 1 M HCl, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- pufrska raztopina pH 4 ($\pm 0,02$; 20 °C), Merck KGaA, Darmstadt Nemčija,
- natrijev klorid, NaCl, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija,
- Mg-sterarat, Lex, d. o. o., Koper, Slovenija,
- Polivinilpirolidon (PVP), Kollidon® 17PF, BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija,
- mikrokristalna celuloza (MC), Avicel PH 200 FMC Biopolymer Philadelphia, PA, ZDA,
- deionizirana voda,
- acetonitril,
- SIF prašek ©, Biorelevant Ltd, Velika Britanija.

3.3 Preverjanje ustreznosti pipet

Ustreznost avtomatskih pipet smo preverili tako, da smo s pipeto večkrat odvzeli določeni volumen vode in odpipetirali v čašo, ki smo jo predhodno tarirali na analitski tehtnici. Iz teh vrednosti smo nato izračunali relativni standardni odklon in odstopanje določene vrednosti od deklarirane. Poskuse smo izvedli pri sobni temperaturi.

3.4 Priprava raztopin in pufrov

- Fosfatni pufer s pH 6,8 smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali 6,8 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v bučko, dodali nekaj deionizirane vode ter 22 mL 1 M NaOH in nato do oznake dopolnili z deionizirano vodo.
- 1 L 0,250 M Na_2HPO_4 smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali 35,49 g brezvodnega Na_2HPO_4 , ga kvantitativno prenesli v bučko in jo do oznake dopolnili z deionizirano vodo.
- 1 L 0,125 M citronske kisline smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali 26,27 g citronske kisline monohidrata, jo kvantitativno prenesli v bučko in jo do oznake dopolnili z deionizirano vodo.
- 4 x redčeni McIlvaineovi pufri (DMB): pripravili smo jih iz 0,250 M Na_2HPO_4 in iz 0,125 M citronske kisline. Za pripravo pufrs s pH 4 smo zmešali 73 mL 0,250 M Na_2HPO_4 in 127 mL 0,125 M citronske kisline v bučki z volumnom 1 l in jo do oznake dopolnili z deionizirano vodo. Za pripravo pufrs s pH 3 smo zmešali 34 mL 0,250 M Na_2HPO_4 in 166 mL 0,125 M citronske kisline v bučki z volumnom 1 l in jo do oznake dopolnili z deionizirano vodo. Preden smo bučko do oznake dopolnili z vodo, smo vsem pufrom izmerili pH z ustrezno umerjenim pH metrom in nato, če je bilo potrebno, pH ustrezno uravnali z nekaj kapljicami 0,125 M citronske kisline ali 0,250 M Na_2HPO_4 .
- 0,001 M HCl smo pripravili tako, da smo v 1 l bučko, kjer je bilo že malo deionizirane vode, dali 1 mL 1 M HCl in do oznake dopolnili z deionizirano vodo.
- Biorelevanten medij (v 0,001 M HCl) smo pripravili tako, da smo na tehtalni čolniček natehtali 60 mg SIF praška in ga kvantitativno prenesli v 1 l vnaprej pripravljene 0,001 M HCl ter dobro premešali, da se je ves raztopil.

3.4.1 Priprava medijev z različnimi ionskimi močmi

Medije z različnimi ionskimi močmi smo pripravili tako, da smo najprej izračunali ionsko moč medijev (DMB s pH 3 in 0,001 M HCl) z Enačbo 2. Ionsko moč medija, ki smo jo izračunali, smo odšteli od zelene ionske moči (0,15 M in 0,52 M). Razliko smo nato vstavili v Enačbo 2 in nato izračunali koncentracijo in nato še maso NaCl, ki ga je potrebno dodati.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_1^n C_i Z_i^2 \quad (\text{Enačba 2})$$

μ – ionska moč (M)

C_i – molarna koncentracija iona v raztopini (M)

Z_i – valenca iona

- Medij 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M smo pripravili tako, da smo 30,3 g NaCl raztopili v 1 l 0,001 M HCl. Medij z ionsko močjo 0,15 M smo pripravili tako, da smo 8,72 g NaCl raztopili v 1 l 0,001 M HCl.
- Medij DMB z ionsko močjo 0,52 M smo pripravili tako, da smo 29,4 g NaCl raztopili v 1 l DMB s pH 3
- Biorelevanten medij (v 0,001 M HCl) s povečano ionsko močjo smo pripravili tako, da smo v 1 l 0,001 M HCl najprej raztopili 30,3 g NaCl (za 0,52 M) ter 8,72 g (za 0,15 M). Nato smo dodali 60 mg SIF praška ter dobro premešali, dokler se prašek ni raztopil.

3.5 Tabletiranje

Vse tablete, ki smo jih uporabili pri poskusih, smo izdelali sami na katedri za Farmacevtsko tehnologijo. Potrebne substance smo natehtali v pateno po pravilu rastočih mas, jih rahlo zmešali s pestilom in nato zmes še bolj homogenizirali s stresanjem v plastični vrečki. Na tehtič smo nato ročno natehtali približno maso tablete, ki je bila okrog 400 mg, ter maso prenesli v vdolbino matrice tabletirke. Izmerili smo tudi trdnost tabletam, pri katerih je bila sila na zgornjem pečatu največja ali najnižja. Podatki o tabletiranju so navedeni v Preglednici III. Tablete smo stiskali dvakrat, sestava tablet je v obeh primerih bila enaka: NaDIF 12,5 %, mikrokrystalna celuloza (Avicel PH 200) 77,5 %, PVP (Kollidon 17PF) 10 %, Mg stearat 0,5 % (na celotno maso).

Preglednica III: Podatki o tabletiranju. Preglednica prikazuje nastavitve tabletirke med tabletiranjem in trdnost tablet.

Oznaka tablet	Nastavitev zgornjega pečata (mm)	Nastavitev spodnjega pečata (mm)	Sila stiskanja na zgornjem pečatu (kN)	Trdnost tablet (N)
Ts1	9,35	12	6,5–7,4	106,5–113,8
Ts2	9,4	12	8,4–9,4	102–114,3

3.6 Stabilizacija vzorcev

Zaradi hitrega obarjanja diklofenaka smo morali vzorec pri poskusu sproščanja stabilizirati oz. zagotoviti, da se vzorec po odvzemu več ne obarja in da so koncentracije v vzorcu ves čas konstantne. Vzorce smo stabilizirali tako, da smo prefiltrirani vzorec takoj redčili z 0,1 M NaOH v razmerju 1 : 2. S takšnim redčenjem vzorca z 0,1 M NaOH smo dvignili pH na vrednost okrog 12. Ustreznost stabilizacije smo preverili tako, da smo odvzeli vzorce po 20, 40 in 60 in 120 minutah poskusa sproščanja. Vzorce smo nato redčili z 0,1 M NaOH v razmerju 1 : 2 ter tem redčenim vzorcem izmerili absorbanco po določenih časih (takoj po odvzemu, po 1, 2 in 3 urah). Ob vseh časih smo morali dobiti enako absorbanco vzorcev.

3.7 Umeritvene premice

Za izračun koncentracij sproščene učinkovine, ki smo jih dobili s testi sproščanja, smo izdelali umeritvene premice v medijih, ki smo jih uporabili pri testih sproščanja. Pripravili smo tri standardne raztopine znanih koncentracij NaDIF v mešanici medija z 0,1 M NaOH 1 : 2, za kar smo trikrat natančno natehtali približno 10 mg učinkovine in jih kvantitativno prenesli v tri 50 mL bučke ter do oznake dopolnili z zgoraj omenjeno mešanico. Raztopine smo redčili tako, kot je prikazano v Preglednici V. Nato smo redčenim raztopinam s standardnimi koncentracijami NaDIF izmerili absorbanco pri 276 nm, narisali umeritveno krivuljo in izračunali enačbo premice. Za vsako premico smo določili tudi Pearsonov koeficient korelacije (R^2). V spodnjih preglednicah je primer priprave raztopin standardnih koncentracij.

Preglednica IV: Natehte standarda natrijevega diklofenakata za pripravo standardnih raztopin A, B, C in njihove koncentracije

Standardna raztopina	m (NaDIF) (mg)	V (standardne raztopine) (mL)	C (standardne raztopine) (mg/l)
A	9,94	50	198,8
B	11,86	50	237,2
C	11,08	50	221,6

Preglednica V: Postopek priprave devetih redčitev standardnih raztopin A, B, C

Standardna razt.	Redčenje	V (standardne razt.) (mL)	V (redčene stand. razt. NaDIF) (mL)	konc. NaDIF (mg/l)
A	100 x	0,1	10	1,99
B	40 x	0,25	10	5,93
C	20 x	0,5	10	11,08
A	13,3 x	0,75	10	14,91
B	10 x	1	10	23,72
C	8 x	1,25	10	27,70
A	6,67 x	1,5	10	29,82
B	5,71 x	1,75	10	41,51
C	5 x	2	10	44,32

3.8 Testi sproščanja

Teste sproščanja smo izvedli na pretočnem sistemu in v aparatu z veslastim mešalom (USP aparat II). V Preglednicah VI in VII so navedeni vsi poskusi, ki smo jih izvedli, ter parametri, ki smo jih med sproščanjem spreminjali.

3.8.1 Sproščanje na pretočnem sistemu

Teste sproščanja na pretočnem sistemu smo izvedli v DMB s pH 4 in v fosfatnem pufru s pH 6,8. V delovno čašo smo dali 25 g steklenih kroglic s premerom 1 mm in magnetno palčko. Nato smo dodali 40 mL medija, označili nivo medija na čaši ter nastavili gretje na 37 °C in hitrost mešanja na 50 rpm. Na koncu cevke, ki je odvajala vzorec iz delovne čaše, je bil nastavljen filter z velikostjo por 0,7 µm. Ob času 0 smo dali tableto v čašo in zagnali pretok, takrat smo pričeli z zbiranjem vzorcev v intervalih po 10 minut (volumen vzorca je bil 20 mL), v valj, v katerem je bilo 40 mL 0,1 M NaOH. Vzorec z NaOH smo pred analizo z UV/VIS spektrofotometrom prefiltrirali še skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µm. Če so bile absorbance previsoke, smo vzorec še dodatno redčili z mešanico NaOH in medija, v razmerju 2 : 1 in izmerili absorbanco.

Pred izvedbo poskusa na pretočnem sistemu smo najprej določili hitrost pretoka skozi obe cevki, tako da smo na analitski tehtnici stehali vodo, ki se je zbrala v valju po določenem času. Od mase, ki smo jo dobili, smo odšteli maso praznega valja ter tako dobili maso vode. Maso, za katero smo predpostavili, da je enaka volumnu, smo delili s časom, v

katerem se je vzorec zbral ter dobili hitrost pretoka (mL/min). Na podlagi teh rezultatov smo nato uravnali hitrost pretoka, ki mora biti 2 mL/min.

Koncentracijo raztopljene učinkovine smo izračunali s pomočjo umeritvene premice in izmerjene absorbanca vzorca.

Enačba umeritvene premice:

$$A = k * c + b \quad (\text{Enačba 3})$$

A – izmerjena absorbanca merjenega vzorca

b – presečišče umeritvene premice z ordinatno osjo

k – naklon umeritvene premice

c (mg/L) – koncentracija raztopljene učinkovine v vzorcu v določeni časovni točki odvzema vzorca

Iz enačbe umeritvene premice (enačba 1) smo izrazili koncentracijo učinkovine v določeni časovni točki.

$$c = \frac{A-b}{k} \quad (\text{Enačba 4})$$

Maso raztopljene učinkovine smo izračunali tako, da smo koncentracijo pomnožili s skupnim volumnom (vzorec + 0,1 M NaOH v razmerju 1 : 2) v valju ter faktorjem redčitve, če je ta bila potrebna. Mase smo nato kumulativno sešteli.

$$mn = cn * V(* Fr) \quad (\text{Enačba 5})$$

mn – masa raztopljene učinkovine, ki se je zbrala v valju (mg)

V – skupni volumen vzorca z 0,1 M NaOH (mL)

cn – koncentracija raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca (mg/l)

Fr – faktor redčitve

Na koncu je sledil še izračun deleža raztopljene učinkovine. Maso raztopljene učinkovine smo delili z vrednostjo, ki smo jo dobili z zmnožkom mase tablete z deležem učinkovine v tableti (odmerek).

$$\% = \frac{mn}{D} * 100 \quad (\text{Enačba 6})$$

D – odmerek natrijevega diklofenakata v tableti (mg)

mn – masa raztopljene učinkovine (mg)

3.8.2 Sproščanje v čaši

Sproščanje smo zaradi težav na pretočnem sistemu izvedli tudi samo v čaši (brez vzpostavljenega pretoka medija) s 40 mL medija, ki je bil v tem primeru DMB pufer s pH 4. V čašo smo dali magnetno palčko ter 25 g steklenih kroglic s premerom 1 mm in hitrost mešanja nastavili na 50 rpm. Tableto smo ob času 0 dali v čašo z medijem ter pričeli s poskusom. Vzorec smo odvzeli z brizgo vsakih 5 minut, in sicer približno 0,5 mL. Najprej smo stehali epruvete, v katere smo dali 1 mL 0,1 M NaOH. Nato smo odvzeti vzorec prefiltrirali v iste epruvete skozi filter z velikostjo por 0,8 µm, s pomočjo nastavka za filtriranje, ki smo ga pritrdili na brizgo. Točen volumen odvzetega vzorca smo določili s tehtanjem. Maso epruvete z 1 mL 0,1 M NaOH smo odšteli od vrednosti, ki smo jo dobili, ko smo stehali epruveto z dodanim filtriranim vzorcem odvzetim z brizgo. Način izračuna deleža sproščene učinkovine je bil enak kot pri USP II (Enačbe 1–5).

Preglednica VI: V preglednici so prikazani uporabljen sistem za sproščanje, serija tablet, velikost por uporabljenega filtra, vrsta in volumen medija ter oznaka poskusa.

Sistem za sproščanje	Serija tablet	Velikost filtra (µm)	Hitrost mešanja (rpm)	Vrsta medija	Volumen medija (mL)	Oznaka poskusa
Pretočni sistem	Ts1	0,7 + 0,45 (naknadna filtracija)	50	DMB pH 4	40	POSKUS 1
			50	fosfatni pufer pH 6,8	40	POSKUS 2
Sproščanje v čaši	Ts1	0,8	50	DMB pH 4	40	POSKUS 3

3.8.3 Sproščanje v USP II aparatu z vesli

Za sproščanje v USP II smo najprej izbrali nastavitve programa, s katerim smo želeli izvajati poskus. Izbrali smo časovne točke vzorčenja (5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 120, 180 in 240 minut), volumen odvzetega vzorca (4 mL) ter hitrost vrtenja mešala (75 ali 100 rpm). Z valjem smo v posodo za sproščanje točno odmerili volumen medija (900 mL). Preden smo začeli s poskusom, je temperatura medija morala biti enaka 37 °C. Vsako tableto smo pred izvedbo poskusa stehali in nato podatke preračunali glede na dejansko maso. Tablete smo dali v posode z medijem in pričeli s poskusom. Na kanilah za avtomatsko vzorčenje smo imeli nastavljen filter z velikostjo por 10 µm. Takoj po avtomatskem vzorčenju v vsaki časovni točki smo od 4 mL vzorca, ki smo ga dobili, s pipeto odmerili 1 mL v že vnaprej pripravljene centrifugirke z 2 mL 0,1 M NaOH. Vzorce smo pred analizo z

UV/VIS spektrofotometrom dobro pomešali. V Preglednici VII so naštetni vsi poskusi, ki smo jih izvedli v USP II aparatu z vesli.

Najprej smo primerjali % sproščene učinkovine pri ročnem vzorčenju z avtomatskim vzorčenjem. Z ročnim vzorčenjem smo simulirali postopek avtomatskega vzorčenja tako, da smo vzorec odvzeli z brizgo, na kateri je bil nastavek za filter s filtrom z velikostjo por 0,8 µm. Najprej smo stehali epruveto, v katero smo prej odmerili 1 mL 0,1 M NaOH. Nato smo še stehali epruveto z dodanim vzorcem ter od te vrednosti odšteli maso epruvete z 0,1 M NaOH. Tako smo dobili točen volumen vzorca, ki smo ga odvzeli. Avtomatsko vzorčenje je potekalo istočasno kot ročno vzorčenje.

Koncentracijo učinkovine v raztopljenem stanju smo izračunali s pomočjo umeritvene premice in izmerjene absorbance vzorca. Upoštevali smo redčenje vzorcev zaradi dodanega 0,1 M NaOH in zmanjšanje volumna v posodi zaradi odvzetega vzorca.

Iz enačbe umeritvene premice (Enačba 3) smo izrazili koncentracijo učinkovine v določeni časovni točki in upoštevali tudi redčenje vzorca (pomnožili smo s 3, saj je razmerje vzorec: 0,1 M NaOH 1 : 2).

$$c = 3 * \frac{A-b}{k} \quad (\text{Enačba 7})$$

Po odvzemu vzorca odvzetega volumna nismo nadomeščali s svežim medijem, zato smo k enačbi dodali še popravek, s katerim upoštevamo zmanjševanje volumna medija v posodi za sproščanje.

$$V_n = V_m - V_{vz}(n - 1) \quad (\text{Enačba 8})$$

V_m – začetni volumen medija (l)

V_{vz} – volumen odvzetega vzorca (0,004 l)

V_n – volumen medija po (n – 1) – tem odvzemu vzorca (l)

n – zaporedni odvzem vzorca

Maso raztopljene učinkovine v določeni časovni točki smo izračunali po naslednji enačbi:

$$m_n = c_n * V_n + V_{vz}(c_1 + c_2 + c_3 + \dots + c_{(n - 1)}) \quad (\text{Enačba 9})$$

m_n – masa raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca n (mg)

c_n – koncentracija raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca (mg/l)

$c_1, c_2, c_3 \dots$ – izračunane koncentracije učinkovine v posodi za sproščanje v določenih časovnih točkah (mg/l)

Na koncu je sledil še izračun deleža sproščene učinkovine (%) oz. učinkovine, ki se ob času odvzema vzorca nahaja v raztopljenem stanju.

$$\% = \frac{mn}{D} * 100 \quad (\text{Enačba 10})$$

D – odmerek natrijevega diklofenakata v tableti (mg)

mn – masa raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca (mg)

3.8.4 Določanje velikosti oborjenih delcev

Na USP II aparatu smo imeli na kanilah za vzorčenje nastavljen 10 µm filter. Da bi dobili približno porazdelitev velikosti oborjenih delcev diklofenaka, smo vzorce še dodatno filtrirali skozi manjše filtre z velikostmi por 0,8; 0,45 in 0,2 µm. Vzorec, ki se je zbral v epruveti, smo takoj prelili v brizgo in namestili ustrezen filter. Približno 1 mL vzorca smo zavrgli, preostanek pa filtrirali v epruveto. Filter smo po vsaki uporabi zavrgli in za drugi vzorec uporabili novega. S pipeto smo nato odmerili točen volumen dodatno filtriranega vzorca v že vnaprej pripravljeno epruveto z ustreznim volumnom 0,1 M NaOH v enakem razmerju kot pri ostalih poskusih. Tem vzorcem smo nato izmerili absorbanco z UV/VIS sprektrofotometrom ter izračunali koncentracije učinkovine.

Preglednica VII: Poskusi, ki smo jih izvedli v napravi USP II z vesli. Prikazani so serija tablet, velikost por uporabljenega filtra, vrsta in volumen medija ter oznaka poskusa.

Serijska tableta	Velikost filtra na kanilah (µm)	Velikost filtra pri dodatni filtraciji (µm)	Hitrost mešanja (rpm)	Vrsta medija	Volumen medija (mL)	Oznaka poskusa
Ts1	10	dodatne filtracije ni bilo	75	DMB pH 4	900	POSKUS 4
			100	DMB pH 4		POSKUS 5
				DMB pH 3		POSKUS 6
				0,001 M HCl		POSKUS 7
				0,001 M HCl z ionsko močjo 0,15 M		POSKUS 8
				0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52M		POSKUS 9
Ts2	10	dodatne filtracije ni bilo	100	0,001 M HCl	900	POSKUS 10
				0,001 M HCl z ionsko močjo 0,15 M		POSKUS 11

			0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52M		POSKUS 12
	10	0,8	0,001 M HCl		POSKUS 13
	10	0,45			POSKUS 14
	10	0,2			POSKUS 15
	10	0,8	0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52M		POSKUS 16
	10	0,45			POSKUS 17
	10	0,2			POSKUS 18
	10	0,8			POSKUS 19
	10	0,45	DMB pH 3		POSKUS 20
	10	0,2			POSKUS 21

3.9 Analiza vzorcev

Vzorci smo analizirali z UV/VIS spektroskopijo. Vzorec iz medija 0,001 M HCl z dodanim praškom SIF (ang. simulated intestinal fluid), smo še dodatno analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ter nato primerjali z rezultati dobljenimi z UV/VIS spektroskopijo.

3.9.1 UV/VIS spektroskopija

Pri analizi vzorcev z UV/VIS spektrofotometrom učinkovine smo koncentracijo učinkovine določili z merjenjem absorbanca raztopine NaDIF v mešanici z 0,1 M NaOH (1 : 2). Spekter smo posneli v območju valovne dolžine 200–400 nm, diklofenak ima namreč absorpcijski maksimum pri 276 nm. Preverjali smo tudi absorbanco pri 400 nm, ki je morala biti čim manjša. Večje vrednosti absorbanca pri 400 nm lahko nakazujejo, da je vzorec moten. Pri vsakem merjenju smo najprej izbrisali ozadje z medijem brez učinkovine, ki je bil pripravljen v enakem razmerju z 0,1 M NaOH kot vzorci.

3.9.2 HPLC kromatografija

S HPLC metodo smo preverili ustreznost meritev rezultatov z UV/VIS spektrofotometrijo pri sproščanju v mediju 0,001 M HCl z dodanim praškom SIF. V Preglednici VIII so predstavljeni parametri uporabljene metode.

Preglednica VIII: Preglednica prikazuje parametre, ki smo jih uporabili pri analizi vzorcev s HPLC. Prikazani so vrsta kolone, mobilne faze, volumen injiciranja, pretok, temperatura kolone, valovna dolžina in retencijski čas.

Kolona	Kromasil C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m)
Mobilna faza	razmerje A : B 60 : 40 A: 50 mM fosfatni pufer s pH 6,5 (6,8g KH ₂ PO ₄ + 14 mL 1 M NaOH/1 bidestilirane vode) B (organska faza) – acetonitril
Volumen injiciranja	10 μ l
Pretok	1,2 mL/min
Temperatura kolone	40 °C
Valovna dolžina	276 nm
Retencijski čas	2 minuti

3.10 Določanje ravnotežne topnosti

V centrifugirke smo natehtali 0,8–1 mg učinkovine, dodali 1,5 mL medija ter dali na stresalnik. Stresali smo pri temperaturi 37 °C, 30 rpm in pri amplitudi stresanja 2. Ob različnih časih (30', 60', 90', 6 h, 24 h, 48 h) smo stresalnik ustavili, vzeli ven centrifugirke z želeno paralelko in ostale vzorce naprej stresali. Nato smo izbrani vzorec centrifugirali 10 minut pri 10000 x g in 37 °C. Supernatant smo po koncu centrifugiranja odpipetirali in ga redčili z 0,1 M NaOH v enakem razmerju kot pri ostalih poskusih 1 : 2. S spektrofotometrom smo pomerili absorbance vzorcev in nato izračunali koncentracijo raztopljene učinkovine ob določenih časih.

4 REZULTATI

4.1 Preliminarni poskusi

4.1.1 Preverjanje ustreznosti pipet

Preden smo začeli s poskusi, smo določili relativni standardni odklon in odstopanje določene vrednosti avtomatskih pipet od deklarirane. S tehtanjem odvzetega volumna smo izračunali naslednje parametre (Preglednica IX).

Preglednica IX: Preglednica prikazuje vrsto pipete, volumen vode, ki smo ga odvzeli s pipeto, ter izračunano povprečje, natančnost in točnost pipet.

Pipeta	20–200 μ l	500–5000 μ l	100–1000 μ l
Volumen (μ l)	200	2500	1000
Povprečje odvzetih volumnov (μ l)	198,46	2496,95	997,22
RSD	0,35 %	0,13 %	0,14 %
Odstopanje od deklarirane vrednosti	0,77 %	0,12 %	0,28 %

4.1.2 Umeritvene premice

Na osnovi rezultatov, ki smo jih dobili s pomočjo standardnih raztopin NaDIF, smo z linearno regresijo izračunali enačbo premice, ki podaja odvisnost absorbance (y) raztopine natrijevega diklofenakata od njene koncentracije (x). Podan je tudi Pearsonov koeficient korelacije (R^2). Rezultati so podani v Preglednici X.

Preglednica X: Enačbe umeritvenih premic natrijevega diklofenakata v medijih, ki smo jih uporabili pri testiranjih. Prikazane so enačbe premic raztopin natrijevega diklofenakata, kjer je y absorbanca učinkovine in x koncentracija (mg/l) in Pearsonov koeficient korelacije (R^2). Dolžina stranice kivete je bila v vseh primerih 10 mm.

Medij (v razmerju z 0,1 M NaOH 1 : 2)	Enačba premice	Pearsonov koeficient korelacije R^2
DMB pH 4 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0314 x + 0,0087$	0,9999
DMB pH 4 + 0,1 M NaOH (1 : 2) (kiveta z manjšim volumnom)	$y = 0,0324 x + 0,0087$	0,9992
DMB pH 3 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0315 x + 0,01$	0,9994
0,001M HCl + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0308 x + 0,003$	0,9997
0,001M HCl z dodanim NaCl do ionske moči 0,15 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,032 x + 0,0068$	0,9999
0,001M HCl z dodanim NaCl do ionske moči 0,52 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0318 x + 0,0076$	0,9999
DMB pH 3 z dodanim NaCl do ionske moči 0,15 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0319 x + 0,0059$	0,9996
DMB pH 3 z dodanim NaCl do ionske moči 0,52 + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0315 x + 0,01$	0,9991
FaSSGF + 0,1 M NaOH (1 : 2)	$y = 0,0317 x + 0,0087$	0,9996

4.1.3 Stabilizacija vzorca

Preden smo začeli s poskusi, smo želeli dokazati, da se vzorec po odvzemu in redčenju z 0,1 M NaOH v razmerju 1 : 2 ne obarja več. To smo dokazali z merjenjem absorbanc istih vzorcev ob različnih časih. Rezultati so predstavljeni v Preglednici XI.

Preglednica XI: Preglednica prikazuje izmerjeno absorbanco istih vzorcev odvzetih ob različnih časih od začetka poskusa – 20 min, 40 min, 60 min in 120 min analiziranih takoj po odvzemu, po 1 uri, 2 urah in 3 urah. Prikazana sta tudi standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV).

Čas analize vzorca	A (20 min)	A (40 min)	A (60 min)	A (120 min)
takoj po odvzemu	0,389	0,315	0,192	0,078
po 1 uri	0,390	0,313	0,193	0,080
po 2 urah	0,389	0,314	0,193	0,079
po 3 urah	0,391	0,313	0,193	0,079
SD	0,001	0,001	0,001	0,001
KV (%)	0,246	0,305	0,259	1,034

4.1.4 Nastavitev ustreznega pretoka na pretočnem sistemu

Pred izvedbo poskusa na pretočnem sistemu smo najprej določili hitrost pretoka, ki je moral biti čim bližje 2 mL/min. S tehtanjem vode, ki se je zbrala v valju po določenem času, smo izračunali hitrost pretoka medija (Preglednica XII).

Preglednica XII: Hitrost pretoka na pretočnem sistemu, na katerem smo izvajali testiranja. Preglednica prikazuje maso vode v valju, ki je enaka volumnu vode (upoštevali smo, da je gostota vode 1 g/l), čas zbiranja vode, izračunan pretok ter stopnja hitrosti vrtenja rotorja na črpalki.

Masa zbrane vode v valju (g)	Čas (min)	Pretok (mL/min)	Stopnja na črpalki, ki uravnava hitrost vrtenja rotorja
10,97	5	2,19	8
11,07	5	2,19	8
10,92	5	2,18	8
10,87	5	2,17	8
18,76	10	1,88	7
18,67	10	1,87	7
43,70	20	2,19	8
43,50	20	2,18	8

4.2 Sproščanje na pretočnem sistemu

Na pretočnem sistemu smo sproščali NaDIF v dveh različnih medijih, v fosfatnem pufru s pH 6,8 in DMB pufru s pH 4. Rezultati sproščanja so prikazani v Preglednicah XIII in XIV.

Preglednica XIII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s PVP (1. serija tablet) na pretočnem sistemu v DMB pufri s pH 4. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 1						
Čas (min)	% sproščene učinkovine			Povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,02	3,06	2,57	2,55	0,52	20,32
10	11,79	15,98	13,41	13,73	2,11	15,37
15	24,97	31,86	29,75	28,86	3,53	12,23
20	37,97	45,13	45,25	42,78	4,17	9,75
25	46,42	54,15	56,01	52,19	5,09	9,75
30	52,16	60,28	63,12	58,52	5,69	9,71
35	56,86	65,52	67,87	63,42	5,80	9,14
40	60,31	69,08	71,38	66,92	5,84	8,73
45	62,93	71,58	73,73	69,41	5,72	8,24
50	65,19	74,05	75,35	71,53	5,53	7,73
55	66,95	76,90	76,47	73,44	5,62	7,66
60	68,62	78,55	77,29	74,82	5,40	7,22
65	69,41	80,09	77,86	75,79	5,63	7,43
70	70,18	81,85	78,30	76,78	5,98	7,79
75	70,83	82,38	78,66	77,29	5,90	7,63
80	71,35	82,98	79,06	77,80	5,91	7,60
85	71,87	83,61	79,32	78,27	5,94	7,59
90	72,17	84,16	79,55	78,62	6,05	7,69

Preglednica XIV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s PVP (1. serija tablet) na pretočnem sistemu v fosfatnem pufri s pH 6,8. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 2						
Čas (min)	% sproščene učinkovine			Povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,11	5,21	4,66	4,66	0,78	16,70
10	18,27	20,94	19,61	19,61	1,88	9,60
15	37,33	41,37	39,35	39,35	2,86	7,26
20	57,27	62,41	59,84	59,84	3,64	6,08
25	70,73	76,21	73,47	73,47	3,87	5,27
30	79,13	84,11	81,62	81,62	3,52	4,31
35	83,95	88,71	86,33	86,33	3,37	3,90
40	86,88	91,68	89,28	89,28	3,40	3,80
45	88,62	93,47	91,04	91,04	3,43	3,77
50	89,67	94,54	92,10	92,10	3,45	3,74
55	90,29	95,18	92,74	92,74	3,45	3,72
60	90,65	95,55	93,10	93,10	3,46	3,72
65	90,86	95,78	93,32	93,32	3,48	3,73
70	90,98	95,94	93,46	93,46	3,51	3,75
75	91,03	96,03	93,53	93,53	3,53	3,78
80	91,06	96,09	93,58	93,58	3,55	3,80

4.3 Sproščanje v čaši brez pretočnega sistema

Zaradi težav z zamašitvijo cevk na pretočnem sistemu smo sproščanje izvedli tudi v čaši, v katero smo dali magnetno mešalo in z brizgo ročno jemali vzorce ob določenih časovnih točkah. Testiranje smo izvedli v mediju DMB s pH 4. V Preglednici XV so prikazani rezultati poskusa.

Preglednica XV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s PVP (1. serija tablet) v DMB pufru s pH 4 ob določenih časovnih točkah pri sproščanju v čaši z ročnim jemanjem vzorcev pri 50 rpm in 40 mL medija. V preglednici so ob določenih časih podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 3						
Čas (min)	% sproščene učinkovine			Povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,00	1,90	1,89	1,93	0,06	3,26
10	1,39	0,74	0,74	0,96	0,38	39,45
15	1,28	1,04	1,04	1,12	0,13	12,02
20	0,77	0,74	0,74	0,75	0,02	2,33
25	0,86	0,62	0,72	0,73	0,12	16,34
30	0,69	0,72	0,68	0,70	0,02	2,90
35	0,83	0,73	0,84	0,80	0,06	7,28
40	0,92	0,77	0,67	0,79	0,12	15,80
45	1,20	0,70	0,70	0,86	0,29	33,70
50	0,69	0,67	0,67	0,68	0,01	2,15
55	0,66	0,70	0,70	0,69	0,02	3,13
60	0,59	0,67	0,67	0,64	0,04	6,79
65	0,66	0,84	0,85	0,78	0,11	13,45
70	0,68	0,64	0,64	0,65	0,02	3,24
75	0,70	0,89	0,89	0,83	0,11	13,41
80	1,35	0,83	0,83	1,00	0,30	30,25
85	0,76	0,86	0,85	0,82	0,05	6,32
90	1,57	1,51	1,51	1,53	0,03	2,18

4.4 Sproščanje v sistemu z vesli (USP II)

V naslednjih preglednicah so predstavljeni rezultati sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet v USP II aparatu. Naredili smo 3–9 paralelk, ki so označene z oznakami 1P–9P. Na podlagi rezultatov smo izračunali povprečje, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV).

4.4.1 Primerjava avtomatskega in ročnega vzorčenja

Najprej smo v USP II aparatu z vesli v mediju DMB s pH 4 pri 100 rpm in v 900 mL medija primerjali % sproščene učinkovine pri ročnem vzorčenju z avtomatskim vzorčenjem. Test smo izvedli v treh paralelkah, ročno in avtomatsko smo vzorčili iz iste posode ob enakem času. Rezultati so prikazani v Preglednicah XVI in XVII.

Preglednica XVI: Avtomatsko vzorčenje v USP II aparatu s filtrom z velikostjo por 10 μ m. Prikazan je delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) ob določenih časovnih točkah. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

Avtomatsko vzorčenje						
Čas (min)	1P	2P	3P	Povprečje	SD	KV (%)
20	65,28	76,96	65,26	69,17	6,75	9,76
40	49,80	58,00	55,10	54,30	4,16	7,66
60	25,06	33,93	33,78	30,93	5,08	16,42

Preglednica XVII: Ročno vzorčenje v USP II aparatu s filtrom z velikostjo por 0,8 μ m. Prikazan je delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) ob določenih časovnih točkah. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

Ročno vzorčenje						
Čas (min)	1P	2P	3P	Povprečje	SD	KV (%)
20	64,07	58,45	68,47	63,66	5,02	7,89
40	53,39	41,78	55,19	50,12	7,28	14,53
60	22,47	24,86	20,60	22,65	2,14	9,43

4.4.2 Primerjava različnih hitrosti vrtenja mešala

V USP II aparatu smo primerjali sproščanje v DMB pufru s pH 4 pri obratih vrtenja 75 in 100 rpm, z namenom, da bi ugotovili, pri katerih pogojih so rezultati najbolj ponovljivi in kakšen vpliv ima hitrost mešanja na prenasajenje in obarjanje DIF. Volumen je bil v obeh primerih enak 900 mL. V Preglednicah XVIII in XIX so predstavljeni rezultati, posamezne paralelke so označene z 1P–6P.

Preglednica XVIII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v DMB pufru s pH 4 ob določenih časovnih točkah pri sproščanju v USP II pri 75 rpm. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 4									
Čas (min)	% sproščene učinkovine						Povprečje	SD	KV (%)
	1P	2P	3P	4P	5P	6P			
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,88	17,94	30,08	13,01	19,42	18,62	19,16	5,83	30,41
10	46,02	59,28	74,06	41,23	52,35	50,27	53,87	11,61	21,54
15	61,37	74,97	76,04	49,39	64,23	63,39	64,90	9,81	15,12
20	55,46	74,03	75,18	47,29	61,02	60,68	62,28	10,77	17,29
30	36,97	64,57	64,27	38,41	45,20	46,16	49,26	12,28	24,93
40	23,76	49,61	54,77	27,09	28,11	30,19	35,59	13,13	36,89
60	13,77	25,34	30,10	15,99	15,10	16,97	19,54	6,59	33,74
120	10,79	12,51	13,11	11,13	10,61	11,81	11,66	1	8,57
180	9,96	10,35	11,11	9,96	9,79	10,32	10,25	0,47	4,63
240	8,98	9,59	10,11	9,30	9,46	9,82	9,54	0,4	4,16

Preglednica XIX: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v DMB pufru s pH 4 ob določenih časovnih točkah pri sproščanju v USP II pri 100 rpm. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 5									
Čas (min)	% sproščene učinkovine						Povprečje	SD	KV (%)
	1P	2P	3P	4P	5P	6P			
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	25,41	25,86	20,73	24,97	29,08	42,69	28,12	7,62	27,09
10	67,20	67,22	58,50	70,95	81,23	83,76	71,48	9,5	13,29
15	75,86	79,59	73,58	72,67	83,62	83,42	78,12	4,81	6,16
20	70,79	74,36	68,69	65,16	76,84	78,14	72,33	5,00	6,92
30	54,80	59,58	53,08	46,64	62,16	66,27	57,09	7,03	12,31
40	38,55	42,37	35,53	30,90	43,85	50,57	40,30	6,88	17,07
60	22,21	20,99	18,06	16,08	24,13	28,23	21,62	4,33	20,06
120	11,92	10,97	10,78	10,55	13,48	14,51	12,03	1,62	13,48
180	10,51	9,65	9,62	9,55	11,82	12,35	10,58	1,23	11,58
240	10,02	9,32	8,48	8,72	11,00	11,36	9,81	1,19	12,09

4.4.3 Primerjava dveh različnih medijev z isto vrednostjo pH

V spodnjih Preglednicah XX in XXI so prikazani rezultati sproščanja v USP II pri 100 rpm v 900 mL medija 0,001 M HCl in DMB s pH 3. Posamezne paralelke so označene z 1P–9P.

Preglednica XX: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v DMB pufru s pH 3 ob določenih časovnih točkah pri sproščanju na USP II pri 100 rpm in 900 mL medija. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 6												
Čas (min)	% sproščene učinkovine										SD	KV %
	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P	9P	Povprečje		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	17,87	19,77	13,63	23,15	16,84	19,44	15,28	14,23	22,19	18,04	7,08	18,72
10	54,29	51,49	49,76	65,13	49,01	57,12	45,38	45,59	58,65	52,93	10,04	12,31
15	56,98	53,69	48,57	70,74	71,93	64,80	61,87	59,69	57,63	60,66	2,47	12,58
20	51,78	49,65	40,84	64,31	66,56	59,20	54,83	52,84	54,07	54,90	3,47	14,15
30	38,91	34,76	24,61	48,48	51,02	42,80	45,33	40,53	41,40	40,87	4,86	19,16
40	25,10	21,59	14,12	27,70	29,57	26,49	29,39	25,79	27,78	25,28	1,64	19,14
60	12,02	10,15	6,98	13,01	13,02	12,92	14,01	13,09	13,72	12,10	1,46	18,38
120	6,91	6,35	5,66	7,86	7,91	7,92	7,93	7,35	7,55	7,27	1,34	11,15
180	5,76	5,36	4,84	6,70	6,76	6,76	6,62	6,37	6,56	6,19	1,4	11,34
240	5,43	5,04	4,84	6,54	6,44	6,59	6,45	6,05	6,06	5,94	1,48	11,3

Preglednica XXI: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v 0,001 M HCl ob določenih časovnih točkah pri sproščanju na USP II pri 100 rpm in 900 mL medija. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 7												
Čas (min)	% sproščene učinkovine										SD	KV %
	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P	9P	Povprečje		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	34,40	39,99	34,29	34,92	43,76	26,19	27,33	23,88	24,39	32,13	7,08	22,04
10	81,16	75,78	76,82	78,43	78,62	52,95	73,33	63,56	58,90	71,06	10,04	14,13
15	80,98	73,35	75,08	77,04	73,13	74,77	75,08	73,31	76,16	75,43	2,47	3,27
20	70,82	66,25	64,32	69,07	61,85	63,82	68,46	60,31	67,05	65,78	3,47	5,28
30	44,92	41,79	36,69	48,39	37,99	38,61	47,51	34,79	43,78	41,61	4,86	11,69
40	19,66	22,76	19,84	24,36	22,10	23,01	23,54	21,23	23,26	22,19	1,64	7,4
60	12,01	12,17	12,48	13,26	14,97	15,93	12,90	15,41	13,60	13,64	1,46	10,68
120	10,15	9,45	10,44	10,88	11,85	12,56	11,53	13,71	10,30	11,21	1,34	11,95
180	9,98	8,78	10,44	9,86	10,99	12,56	10,51	13,21	9,80	10,68	1,4	13,1
240	9,48	8,95	11,62	9,19	10,48	12,56	10,00	13,04	9,97	10,59	1,48	14,01

4.5 Vpliv ionske moči

Z dodatkom NaCl smo medijema 0,001 M HCl in DMB s pH 3 povišali ionsko moč na 0,15 in 0,52 M ter preučevali vpliv na prenasičenje in obarjanje NaDIF. V spodnjih Preglednicah XXII in XXIII so prikazani rezultati sproščanja v USP II pri 100 rpm v 900 mL. Posamezne paralelke so označene z 1P–9P. Nekatere poskuse smo izvedli z 2. serijo tablet, ki so imele enako sestavo, vendar je prišlo do manjših razlik v profilih.

1) 1. serija tablet

Preglednica XXII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v 0,001 HCl z ionsko močjo 0,52 M. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 8								
% sproščene učinkovine								
Čas (min)	1P	2P	3P	4P	5P	povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	34,26	28,71	37,74	34,75	24,58	32,01	5,28	16,49
10	56,78	57,74	56,15	55,36	53,36	55,88	1,65	2,96
15	51,05	50,05	52,11	50,91	48,17	50,46	1,48	2,92
20	45,68	45,40	46,59	46,49	46,67	46,16	0,58	1,26
30	41,00	41,92	37,92	39,03	41,85	40,35	1,79	4,43
40	34,52	37,80	26,97	23,85	34,91	31,61	5,90	18,68
60	13,32	17,14	12,44	11,61	14,01	13,70	2,12	15,49
120	6,73	7,34	6,68	6,57	6,64	6,79	0,31	4,58
180	5,58	6,37	5,87	5,58	5,66	5,81	0,33	5,72
240	5,25	5,72	5,21	5,41	5,17	5,35	0,22	4,16

Preglednica XXIII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (1. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,15 M. V preglednici so ob določenih časih podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 9							
% sproščene učinkovine							
Čas (min)	1P	2P	3P	4P	povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	24,28	37,46	27,40	31,58	30,18	5,70	18,89
10	57,53	70,68	63,30	65,98	64,37	5,48	8,52
15	68,46	67,65	67,86	70,50	68,62	1,30	1,89
20	58,25	58,46	56,35	59,94	58,25	1,47	2,53
30	34,44	37,17	29,95	32,55	33,53	3,05	9,09
40	19,35	20,45	18,55	19,00	19,34	0,81	4,20
60	10,93	15,83	13,21	12,34	13,08	2,06	15,76
120	7,16	7,46	8,42	8,60	7,91	0,71	8,94
180	6,50	6,65	6,54	7,24	6,73	0,35	5,14
240	6,34	6,32	6,20	6,74	6,40	0,23	3,66

2) 2. serija tablet

Preglednica XXIV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 10						
% sproščene učinkovine						
Čas (min)	1P	2P	3P	povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,08	17,77	19,01	16,93	1,19	7,05
10	39,23	36,33	43,38	37,78	2,05	5,43
15	59,15	61,36	67,81	60,26	1,56	2,6
20	76,74	77,52	82,75	77,13	0,55	0,71
30	63,52	61,78	70,65	62,65	1,23	1,97
40	41,47	39,12	44,99	40,30	1,66	4,12
60	18,16	18,61	20,32	18,39	0,31	1,7
120	10,54	13,88	22,70	12,21	2,36	19,32
180	9,53	14,05	20,84	11,79	3,19	27,08
240	8,69	12,88	/	10,78	2,96	27,43

Preglednica XXV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,15 M. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 11						
% sproščene učinkovine						
Čas (min)	1P	2P	3P	povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	12,63	17,91	11,74	14,09	3,34	23,67
10	30,18	41,25	27,23	32,89	7,39	22,48
15	51,98	66,33	52,60	56,97	8,11	14,24
20	69,54	70,49	69,11	69,71	0,71	1,01
30	63,11	58,73	61,55	61,13	2,22	3,63
40	50,14	39,93	43,39	44,49	5,19	11,67
60	18,27	15,96	16,69	16,97	1,18	6,96
120	6,56	7,95	10,85	8,45	2,19	25,94
180	5,26	6,81	6,66	6,24	0,85	13,69
240	5,10	6,16	6,34	5,87	0,67	11,42

Preglednica XXVI: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 12						
% sproščene učinkovine						
Čas (min)	1P	2P	3P	povprečje	SD	KV (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	11,81	12,78	21,68	15,43	5,44	35,26
10	26,52	30,67	44,39	33,86	9,35	27,63
15	53,96	54,19	58,67	55,61	2,66	4,78
20	49,49	51,18	52,07	50,92	1,31	2,58
30	42,57	43,86	46,35	44,26	1,92	4,34
40	38,14	39,88	43,66	40,56	2,82	6,96
60	23,76	27,83	34,81	28,80	5,59	19,40
120	5,39	7,63	8,06	7,03	1,43	20,4
180	7,65	6,00	6,40	6,68	0,86	12,94
240	4,92	5,34	5,91	5,39	0,5	9,23

4.6 Določanje velikosti oborjenih delcev

S tremi filtri z različno velikostjo por (0,8 μm , 0,45 μm , 0,2 μm) smo naknadno po avtomatskem odvzemu vzorca filtrirali vzorce iz medijev DMB s pH 3 in 0,001 M HCl. Pri obeh smo tudi povečali ionsko moč (0,15 M in 0,52 M) in ugotavljali vpliv na velikost delcev. Rezultati so prikazani v Preglednicah XXVII–XXXV.

Preglednica XXVII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,8 μm . V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 13						
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)
	1P	2P	3P	povprečje	SD	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,07	15,02	15,46	15,18	0,24	1,58
10	35,93	34,82	36,90	35,88	1,04	2,90
15	56,88	57,02	62,37	58,76	3,13	5,33
20	65,25	67,98	63,23	65,49	2,39	3,64
30	47,05	51,27	47,88	48,73	2,24	4,59
40	22,83	28,69	25,46	25,66	2,93	11,43
60	6,64	8,57	9,15	8,12	1,31	16,14
120	6,64	6,38	6,88	6,64	0,25	3,71
180	6,14	5,88	6,63	6,22	0,38	6,06

Preglednica XXVIII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,45 μm . V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 14						
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)
	1P	2P	3P	povprečje	SD	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,53	10,99	14,24	13,92	2,79	20,03
10	41,74	28,69	33,43	34,62	6,61	19,09
15	67,78	50,47	52,53	56,92	9,46	16,61
20	65,45	64,06	60,75	63,42	2,41	3,80
30	43,00	50,01	50,52	47,84	4,20	8,78
40	28,44	32,62	30,14	30,40	2,10	6,91
60	8,16	9,37	8,34	8,62	0,65	7,58
120	5,68	5,91	5,48	5,69	0,21	3,74
180	4,94	5,56	5,15	5,21	0,31	6,02

Preglednica XXIX: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,2 μm . V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 15						
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)
	1P	2P	3P	Povprečje	SD	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	12,36	9,56	11,11	11,01	1,40	12,73
10	29,60	23,07	27,96	26,88	3,40	12,65
15	52,58	43,41	49,28	48,42	4,65	9,59
20	52,75	50,44	49,11	50,77	1,84	3,63
30	38,95	36,26	37,85	37,69	1,35	3,58
40	17,26	16,71	16,47	16,82	0,41	2,41
60	4,89	4,37	5,32	4,86	0,47	9,74
120	3,27	2,92	3,27	3,15	0,20	6,36
180	2,59	2,50	3,44	2,84	0,52	18,18

Preglednica XXX: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,8 µm. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 16								
Čas (min)	% sproščene učinkovine						SD	KV (%)
	1P	2P	3P	4P	5P	Povprečje		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	12,15	11,40	12,66	14,36	14,40	12,99	1,26	9,69
10	33,32	26,21	24,01	34,35	34,41	30,46	4,71	15,47
15	35,01	34,47	34,30	36,55	36,42	35,35	1,05	2,98
20	34,00	35,31	33,79	36,71	35,25	35,01	1,04	2,97
30	31,33	33,80	31,62	33,87	33,25	32,78	0,92	2,82
40	29,00	30,81	31,45	30,54	30,60	30,48	0,40	1,30
60	14,09	20,87	26,65	17,13	18,05	19,36	3,76	19,43
120	4,37	4,55	5,22	4,27	4,25	4,53	0,39	8,65
180	3,71	3,65	4,07	3,45	3,11	3,60	0,35	9,70

Preglednica XXXI: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,45 µm. V preglednici so ob določenih časih podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 17								
Čas (min)	% sproščene učinkovine						SD	KV (%)
	1P	2P	3P	4P	5P	Povprečje		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	9,60	9,26	12,02	9,60	16,55	11,40	2,92	25,58
10	23,66	25,01	31,07	25,35	33,04	27,62	3,54	12,80
15	59,58	31,42	32,42	30,75	32,60	37,35	2,60	6,95
20	33,39	32,09	32,93	32,09	32,11	32,52	0,37	1,15
30	31,38	31,92	32,43	31,42	31,11	31,65	0,50	1,58
40	28,39	28,60	29,75	28,76	28,29	28,76	0,55	1,92
60	15,80	11,37	14,46	13,19	14,73	13,91	1,34	9,66
120	3,27	3,79	3,87	3,96	3,37	3,65	0,23	6,27
180	3,43	2,31	2,83	2,98	2,72	2,85	0,26	8,95

Preglednica XXXII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,2 µm. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 18								
Čas (min)	% sproščene učinkovine						SD	KV (%)
	1P	2P	3P	4P	Povprečje			
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	5,50	9,87	3,95	4,08	5,68	5,68	2,40	42,25
10	18,50	25,17	16,20	13,07	16,59	16,59	4,50	27,14
15	21,70	23,83	18,71	19,54	19,76	19,76	2,06	10,43
20	23,37	26,16	22,21	23,83	23,11	23,11	1,48	6,40
30	24,87	19,53	20,88	21,69	23,39	23,39	2,10	8,97
40	20,56	21,67	19,73	20,71	24,53	24,53	1,86	7,59
60	3,22	10,82	8,07	10,78	18,58	18,58	5,57	29,99
120	1,08	0,76	0,62	1,54	24,80	24,80	10,65	42,94
180	0,79	0,32	0,46	1,22	36,56	36,56	16,04	43,88

Preglednica XXXIII: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v DMB s pH 3. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,8 µm. V preglednici so podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 19						
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)
	1P	2P	3P	povprečje	SD	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	9,87	10,96	7,91	9,58	1,55	16,14
10	24,45	30,92	24,84	26,73	3,63	13,57
15	47,39	57,74	47,86	51,00	5,84	11,46
20	52,60	52,67	51,51	52,26	0,65	1,25
30	39,39	37,70	38,95	38,68	0,88	2,27
40	21,58	20,78	21,99	21,45	0,62	2,88
60	9,40	8,77	9,22	9,13	0,32	3,54
120	4,87	3,63	4,49	4,33	0,63	14,65
180	4,05	3,13	5,46	4,21	1,17	27,82

Preglednica XXXIV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v DMB s pH 3. Vzorci so bili naknadno filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,45 µm. V preglednici so ob določenih časih podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 20							
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)	
	1P	2P	3P	4P	Povprečje		SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
5	10,63	8,39	8,47	6,30	8,45	1,77	20,95
10	26,68	30,89	23,98	24,26	26,45	3,20	12,08
15	47,75	50,07	36,58	39,95	43,59	6,37	14,62
20	49,95	47,03	47,94	47,17	48,02	1,35	2,81
30	38,84	37,27	32,80	37,81	36,68	2,67	7,27
40	19,39	21,20	16,73	21,33	19,66	2,14	10,91
60	8,04	7,87	7,01	7,41	7,58	0,46	6,13
120	4,05	2,23	3,23	3,29	3,20	0,75	23,38
180	3,22	3,05	4,05	3,29	3,40	0,44	12,97

Preglednica XXXV: Delež sproščene učinkovine NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom (2. serija tablet) v DMB s pH 3. Vzorci so bili filtrirani s filtrom z velikostjo por 0,2 µm. V preglednici so ob določenih časih podani še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV).

POSKUS 21						
Čas (min)	% sproščene učinkovine					KV (%)
	1P	2P	3P	Povprečje	SD	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	7,21	6,68	6,67	6,85	0,31	4,51
10	25,49	20,14	24,04	23,22	2,77	11,92
15	39,61	40,50	41,16	40,42	0,78	1,93
20	39,44	40,83	40,48	40,25	0,73	1,81
30	33,71	30,91	30,24	31,62	1,84	5,82
40	17,60	17,86	15,69	17,05	1,19	6,96
60	6,07	5,86	5,20	5,71	0,46	7,98
120	4,08	1,55	1,72	2,45	1,41	57,63
180	1,59	1,55	1,72	1,62	0,09	5,38

4.7 Ravnotežna topnost natrijevega diklofenakata

Ravnotežno topnost natrijevega diklofenakata smo želeli določiti tako, da smo prebitno količino natrijevega diklofenakata raztopili v medijih, v katerih smo izvajali poskuse sproščanja, v 0,001 M HCl in DMB-ju s pH 3. Določili smo koncentracije po določenem času stresanja, nato smo izračunali še povprečje, standardni odklon in koeficient variacije (Preglednica XXXVI).

Preglednica XXXVI: Koncentracije natrijevega diklofenakata po določenem času stresanja v DMB s pH 3 pri 37 °C, 30 rpm in amplitudi stresanja 2. V preglednici so še prikazani povprečje koncentracij ter izračunana standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) pri različnih časovnih točkah. Zatehta NaDIF je bila približno 0,8–1mg.

	Koncentracija NaDIF (mg/l) po določenem času stresanja v DMB pH 3							
	30	60	90	120	4 h	6 h	24 h	48 h
	9,30	5,87	3,70	2,59	3,04	3,90	3,28	2,48
	7,59	3,60	5,69	5,06	4,82	2,67	3,10	2,46
	7,72	7,62	8,49	5,62	/	1,85	3,96	2,09
	4,52	7,28	8,67	7,22	/	/	2,63	/
	3,42	7,29	4,58	7,12	/	/	3,50	/
Povprečje	6,51	6,33	6,23	5,52	3,93	2,81	3,30	2,34
SD	2,44	1,67	2,26	1,89	1,26	1,04	0,49	0,22
KV (%)	37,54	26,36	36,31	34,20	32,06	36,90	14,92	9,39

5 RAZPRAVA

Pri načrtovanju testov *in vitro* za proučevanje sistemov, ki omogočajo vzpostavitev prenasičenega stanja, moramo biti pozorni na številne eksperimentalne pogoje, ki lahko vplivajo na rezultate poskusa. Pomembna sta vrsta in volumen medija, v katerem bomo izvajali sproščanje, ter tudi hidrodinamika medija med poskusom. Za proučevanje mehanizma prenasičenja in obarjanja se bolj priporočajo biorelevantni mediji in »non sink« pogoji (4). V nalogi smo želeli poiskati ustrezno metodo za vrednotenje prenasičenja ter preveriti vpliv nekaterih pogojev na prenasičenje.

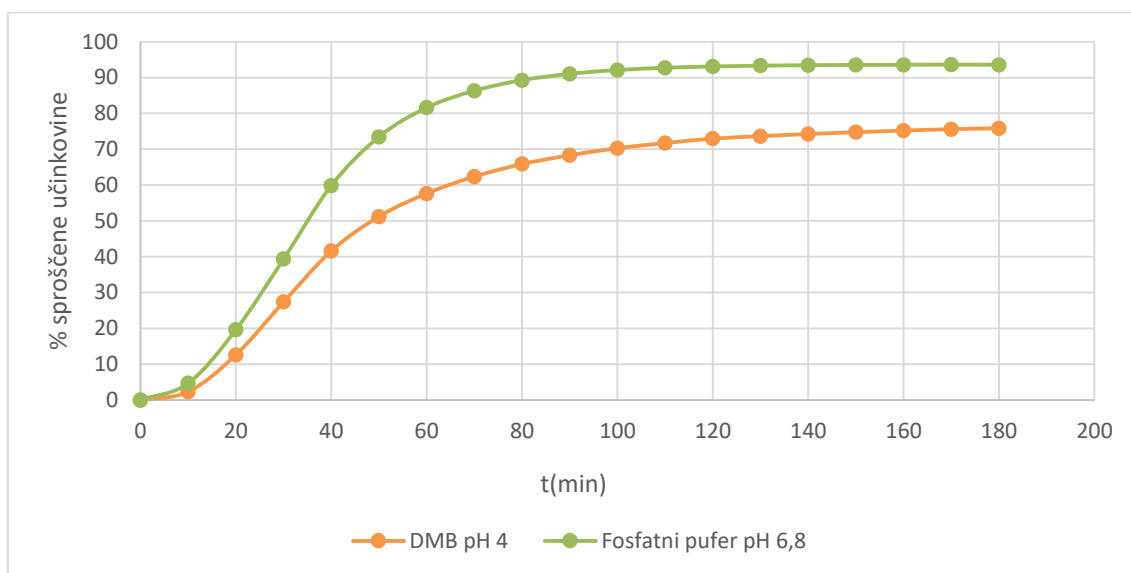
5.1 Stabilizacija vzorca

Pred začetkom poskusov moramo najprej zagotoviti, da je vzorec stabilen v smislu, da se po odvzemu vzorca učinkovina ne obarja več. Natrijev diklofenakat se je iz naših tablet ob stiku z mediji, ki smo jih izbrali, takoj raztopil in tvoril stanje prenasičenja. Stanje, ko so koncentracije nad ravnotežno topnostjo učinkovine, je nestabilno in učinkovina se obarja celoten čas poskusa. Zato moramo zagotoviti pogoje, pri katerih bo koncentracija odvzetega vzorca ostala enaka do merjenja absorbance tega vzorca. To smo dosegli z redčenjem vzorca z 0,1 M NaOH v razmerju 1 : 2 (vzorec: 0,1 M NaOH). Stabilizacija vzorca je bila na tak način dosežena že v predhodni magistrski nalogi (22). Vendar smo vseeno preverili, če se vzorec v mešanici z NaOH res ne obarja. pH-vrednost se je zaradi dodanega NaOH zvišala na približno 12. DIF se tukaj ni več obarjal, ker je pri višjih pH dobro topen. Da je vzorec stabilen, smo dokazali z merjenjem absorbance vzorcev odvzetih ob določenih časovnih točkah. Absorbance smo istemu vzorcu izmerili večkrat, takoj po odvzemu in po 1, 2 in 3 urah. Med izmerjenimi absorbancami ni bilo večje razlike. Zaradi tega smo za redčenje izbrali 0,1 M NaOH, ki zagotavlja stabilnost vzorca v smislu preprečevanja obarjanja celoten čas od odvzema vzorca do merjenja absorbance vzorca.

5.2 Sproščanje na pretočnem sistemu

Eden izmed načinov za nastanek prenasičenja je tudi pH gradient, ki bi ga lahko dosegli z zamenjavo medijev z različno vrednostjo pH. Zaradi spremembe v topnostnih parametrih lahko namreč pride do povečanja koncentracije učinkovine nad njihovo ravnotežno topnostjo. Sproščanje smo želeli izvesti v pretočnem sistemu, ki omogoča lažjo menjavo medijev, s katero bi lahko ponazorili ta prehod v kasnejših poskusih. Testiranje smo

najprej izvedli samo v enem mediju, DMB s pH 4. Diklofenak se je raztopil, ker je v obliki soli, vendar se je zaradi nižjega pH nato pričel obarjati v obliki kisline. To smo opazili tako, da je medij z učinkovino postajal vse bolj moten. Ker smo pri izračunu upoštevali kumulativne vrednosti, koncentracije niso padale, kljub temu da je do obarjanja učinkovine prišlo. S Slike 4 lahko razberemo, da ima pH velik vpliv na topnost NaDIF. V DMB s pH 4 lahko vidimo, da se na koncu poskusa sprosti za vsaj 15 % manj NaDIF kot v fosfatnem pufru s pH 6,8. Na cevkah, ki so dovajale vzorec, smo imeli nastavljen filter velikosti 0,7 μm , ki je zadržal oborjene delce DIF. Vzorec smo zbirali v 0,1 M NaOH in s tem dosegli, da se učinkovina po odvzemu vzorca ni več obarjala. Na pretočnem sistemu smo imeli težave z nabiranjem pomožnih snovi oz. učinkovine v cevkah in med kroglicami. Pri nekaterih poskusih so se cevke zamašile že na začetku, zaradi česar poskusov nismo mogli izpeljati do konca.

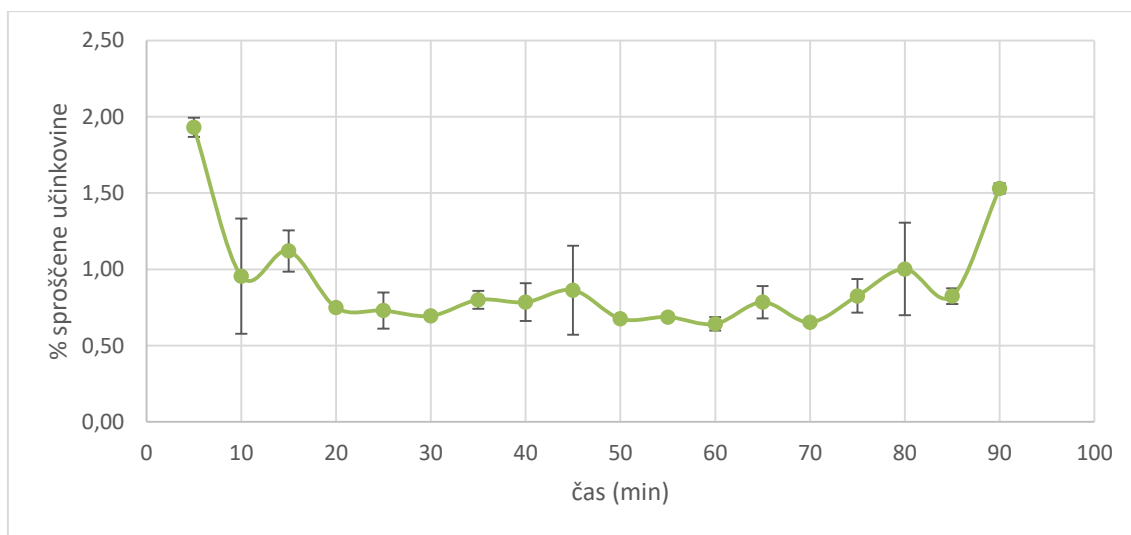


Slika 4: Primerjava deležev sproščene učinkovine ob različnih časih v pufru DMB s pH 4 in v fosfatnem pufru s pH 6,8 na pretočnem sistemu z volumnom medija 40 mL in hitrostjo mešanja 50 rpm.

5.3 Sproščanje v čaši brez pretočnega sistema

Zaradi zamašitve cevk na pretočnem sistemu, smo se odločili sproščanje izvesti v čaši brez vzpostavljenega pretoka medija in z ročnim jemanjem vzorcev. Zaradi slabe topnosti učinkovine v mediju z nizko vrednostjo pH so bile koncentracije diklofenaka zelo nizke in so med posameznimi meritvami bila večja odstopanja, kot je razvidno s Slike 5. Sproščanje smo izvedli v 40 mL medija, brez pretočnega sistema, zato se je po vsakem odvzemu vzorca volumen medija še dodatno zmanjšal in zaradi tega je lahko prišlo še do večjega

obsega obarjanja učinkovine. Delež raztopljene učinkovine je bil celoten čas poskusa večinoma enak, vendar, ker nimamo podatkov o topnosti, ne moremo trditi, da do prenasičenja v tem primeru ni prišlo. Izmerjene absorbance so bile precej nizke (tudi pod 0,1). Zaradi napake spektrofotometra lahko v teh primerih pride do večje variabilnosti rezultatov. Vzorčili smo ročno, zato je lahko prišlo do večjih odstopanj tudi zaradi tega, ker vzorca nismo vedno vzeli z enakega mesta.



Slika 5: Povprečen delež sproščene učinkovine treh paralelek ob različnih časih v pufru DMB s pH 4 v čaši brez pretočnega sistema z volumnom medijo 40 mL in pri hitrosti mešanja 50 rpm.

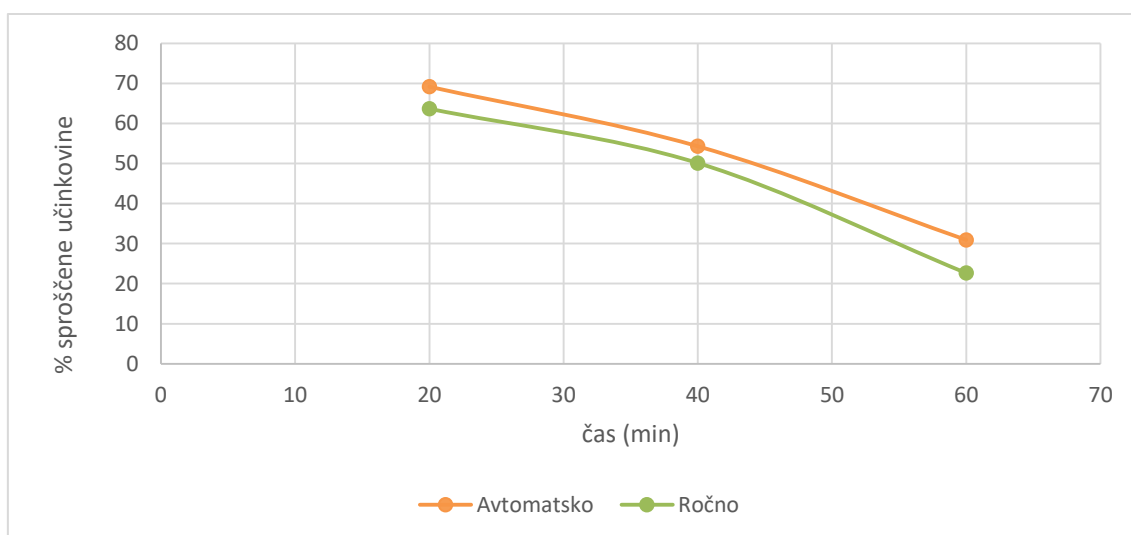
5.4 Sproščanje v sistemu z vesli (USP II)

Zaradi težav s pretočnim sistemom in tudi zaradi oblik profilov sproščanja, ki smo jih dobili iz rezultatov na pretočnem sistemu, smo sproščanje izvedli v sistemu z vesli (USP II), ki se pogosto uporablja za vrednotenje prenasičenja.

5.4.1 Primerjava avtomatskega in ročnega vzorčenja

Pri sistemih s prenasičenjem je zelo pomemben čim hitrejši odvzem vzorca in procesiranje vzorca. Učinkovina se namreč hitro obarja in zato mora biti čas, ob katerem vzorčimo paralelke, vedno enak ter čim krajši, drugače lahko pride do večjih odstopanj. Pri avtomatskem vzorčenju v USP II imamo na kanili za vzorčenje filter velikosti 10 μm , ki zadrži oborjene delce v posodi. Skozi lahko gredo edino oborjeni delci, ki so manjši od 10 μm . Vzorec pa, preden pride do epruvet, potuje po dolgih cevkah približno minuto in se tam lahko že obarja ter moti analize. Zato bi bilo boljše, če bi vzorce odvzeli ročno, zaradi krajšega časa vzorčenja. Vendar je tu pri izvedbi več paralelek sočasno težje izvesti

vzorčenje ob enakem času. Kot razberemo s Slike 6, ni bilo večje razlike med avtomatskim in ročnim vzorčenjem. Pri ročnem vzorčenju smo uporabili filter velikosti 0,8 μm . Delež sproščene učinkovine pri ročnem vzorčenju je bil malo manjši kot pri avtomatskem vzorčenju, kar je lahko zaradi različne velikosti uporabljenega filtra. Pri filtru z velikostjo 10 μm lahko gredo iz posode manjši oborjeni delci, ki jih načeloma ne bi smeli določiti, ker med poskusom niso raztopljeni. Če pa se delci oborijo med potjo do epruvete, pa to ne vpliva na meritve, saj se ti oborjeni delci nato v mešanici vzorca z 0,1 M NaOH zaradi višje vrednosti pH raztopijo. V nadaljevanju smo se odločili za avtomatsko vzorčenje tudi zaradi tega, ker pri ročnem vzorčenju težje odvzamemo vzorec na enakem mestu, medtem ko pri avtomatskem vzorčenju naprava vedno vzorči na enakem mestu.

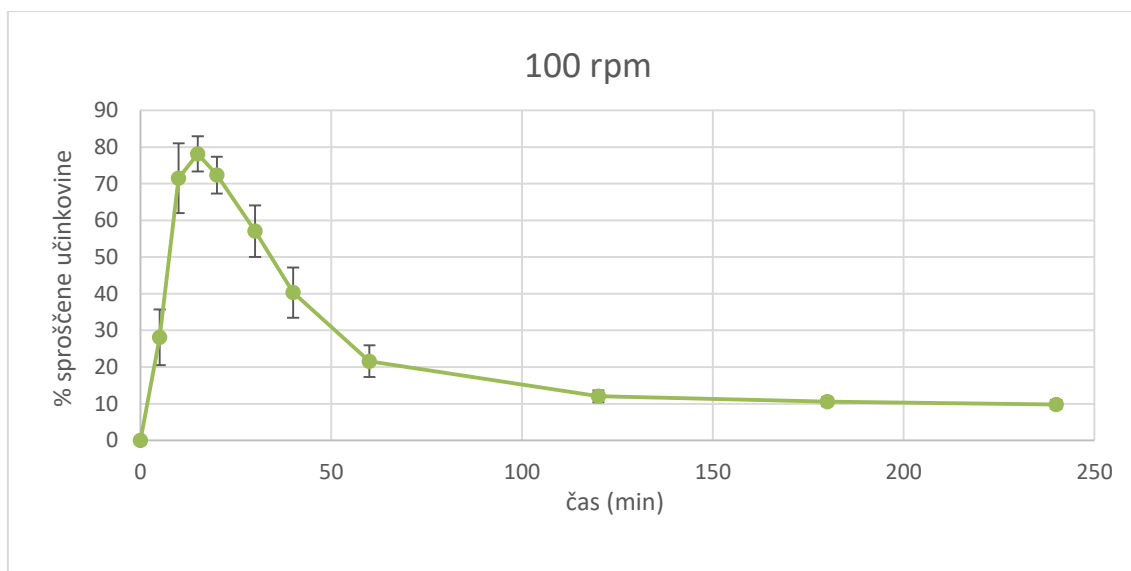


Slika 6: Primerjava avtomatskega in ročnega vzorčenja pri uporabi naprave USP II. V grafu so prikazani povprečni deleži sproščene učinkovine (3 paralelke) ob treh različnih časovnih točkah pri 100 rpm in volumnu 900 mL.

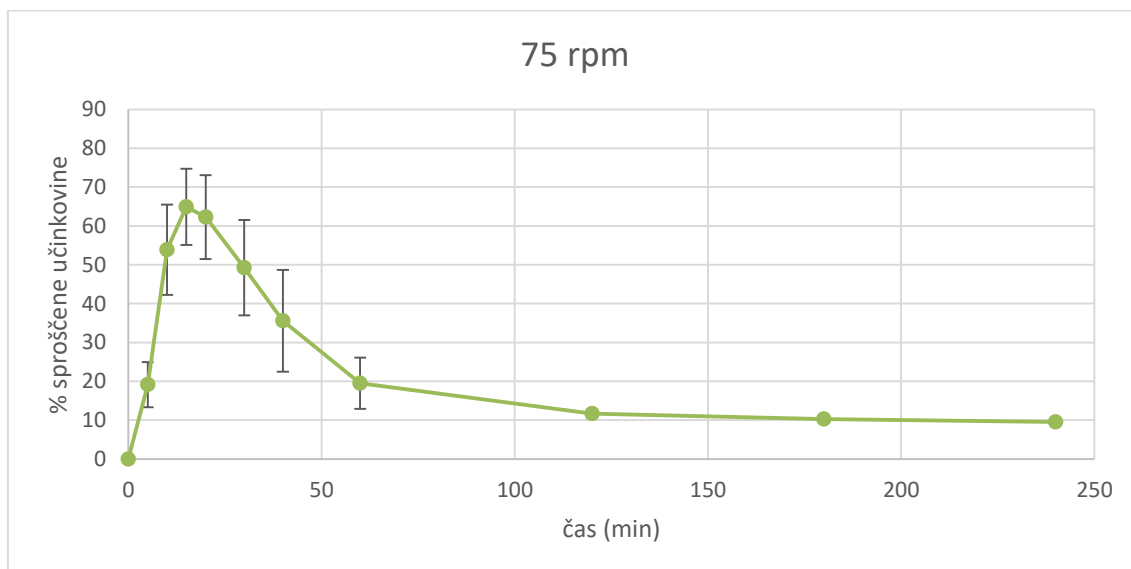
5.4.2 Izbira hitrosti mešanja

Hidrodinamika v prebavnem traktu lahko vpliva na obarjanje učinkovine *in vivo*. Prisotnost gibanja namreč lahko poveča hitrost nukleacije in kristalno rast (4). Z našimi poskusi smo želeli preveriti, kako različne hitrosti mešanja vplivajo na prenasičenje. Pri večji hitrosti vrtenja mešala (100 rpm) so bile razlike v deležih sproščene učinkovine med posameznimi paralelkami manjše v primerjavi s sproščanjem pri nižji hitrosti vrtenja (Slika 7 in 8), vendar pa se je učinkovina hitreje oborila. Razlog za manjše variiranje rezultatov pri večji hitrosti vrtenja je verjetno boljša homogenizacija medija. Pride tudi do hitrejšega sproščanja učinkovine iz tablet, saj pri večjih hitrostih vrtenja lahko pride do večjega gibanja tablete po dnu posode in posledično do mehanskih poškodb in hitrejšega razpada.

Sproščanja pri nižjih hitrostih vrtenja od 75 rpm nismo izvajali, saj bi verjetno prišlo še do večjih razlik med paralelkami zaradi neenakomernega raztapljanja, ker se tokovi ne razporedijo enako po vsej posodi. Tableta v našem primeru sicer ob stiku z medijem začne takoj razpadati, vendar je s Slike IX razvidno, da višja hitrost vrtenja povzroči še hitrejšo raztapljanje učinkovine, saj je pri 100 rpm ob času 5 minut delež sproščene učinkovine za približno 10 % višji kot pri hitrosti vrtenja 75 rpm ob enakem času.

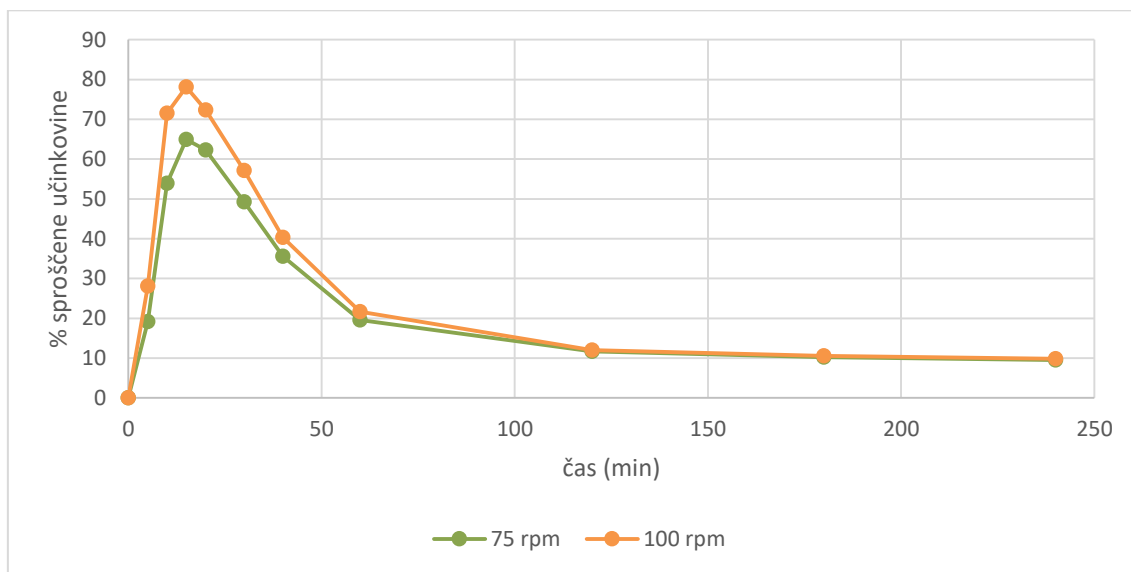


Slika 7: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom v DMB s pH 4 pri hitrosti vrtenja mešala 100 rpm. Prikazana so povprečja 6 paralelek in standardni odkloni pri posameznih časovnih točkah.



Slika 8: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom v DMB s pH 4 pri hitrosti vrtenja mešala 75 rpm. Prikazana so povprečja 6 paralelek in standardni odkloni pri posameznih časovnih točkah.

Hitrejša vrtenja mešala je povzročilo hitrejša sproščanje učinkovine in višje maksimalno prenasičenje (Slika 9). Vidi se, da je pri času 10 minut delež sproščene učinkovine pri 100 rpm veliko višji v primerjavi s sproščanjem pri 75 rpm. Pri nižji hitrosti pa pride do počasnejšega obarjanja, saj so deleži pri 30 in 40 minutah poskusa podobni kot ob istih časih pri hitrosti vrtenja 100 rpm kljub nižjim koncentracijam pri 75 rpm v začetnih točkah poskusa. Večja hitrost vrtenja mešala poveča stopnjo prenasičenja, kar vodi v hitrejša obarjanje učinkovine.

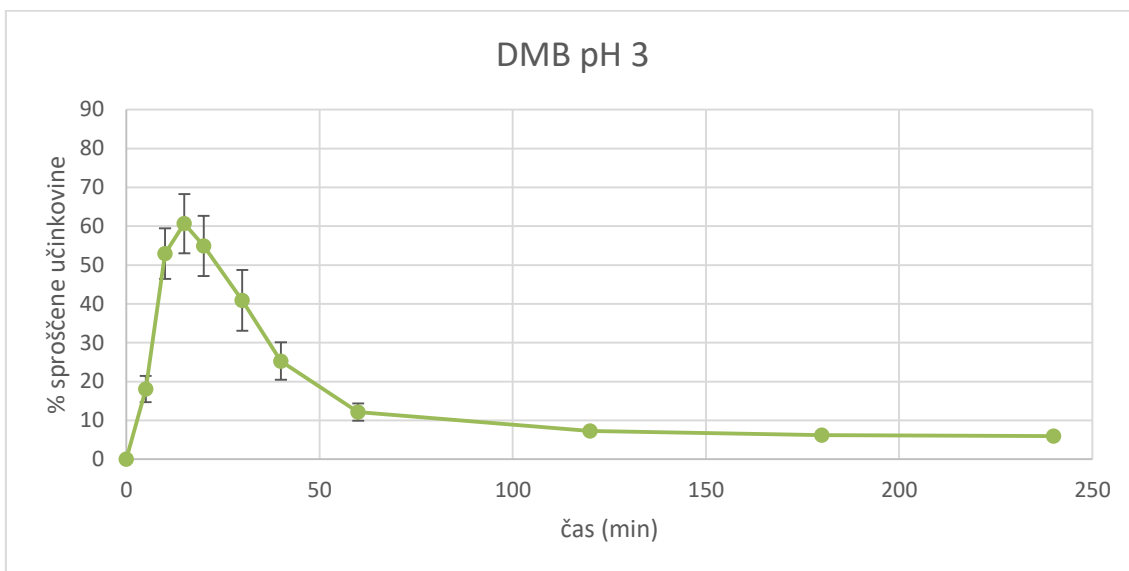


Slika 9: Graf, ki prikazuje delež sproščene natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirolidonom v DMB s pH 4 pri različnih hitrostih vrtenja 75 in 100 rpm.

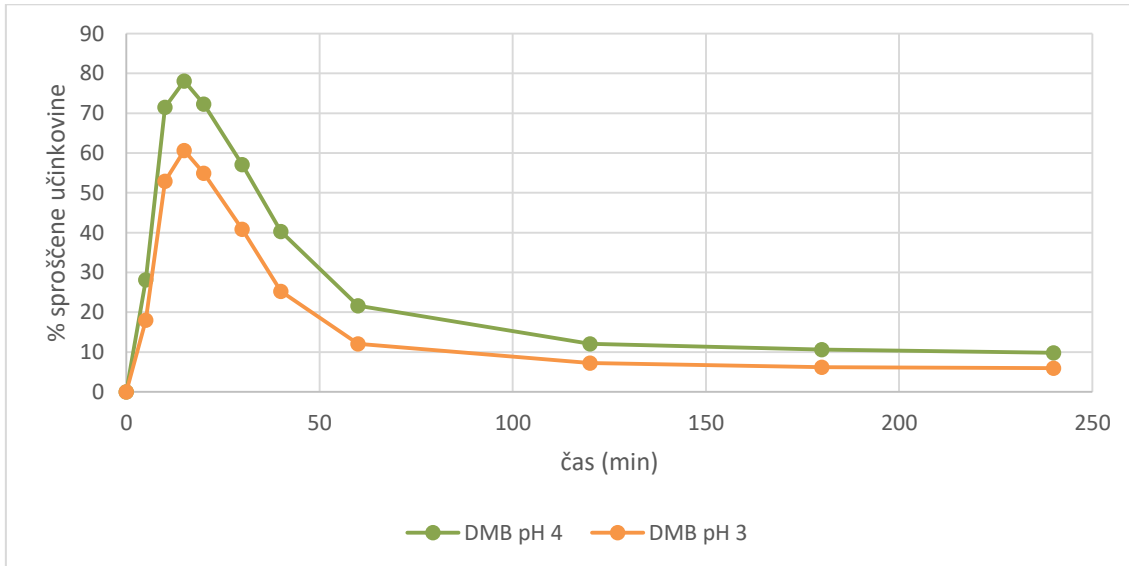
5.4.3 Izbira pH in medija za sproščanje

Natrijev diklofenakat je sol šibke kisline z močno bazo. Topna natrijeva sol diklofenaka v kombinaciji s polimerom PVP omogoči visoko stopnjo prenasičenja med raztapljanjem, vendar nato pride do hitrega obarjanja. Zaviranje obarjanja oz. pojav »padala« je lahko posledica dodanih pomožnih snovi, ki vplivajo na nukleacijo ali kristalno rast. To je odvisno od fizikalno-kemijskih interakcij med učinkovino in pomožno snovjo, na katere lahko vplivajo tudi pH, temperatura, molekulska masa pomožne snovi in drugi parametri (10). Diklofenak ima pKa okrog 4 (23). Pri slabo topnih šibko kislih učinkovinah je topnost nizka v želodcu, predvsem na tešče, ko je pH še nižji. Poskuse smo najprej izvedli pri pH 4, nato pa še pri nižji vrednosti pH 3, kjer je topnost NaDIF še nižja in primerjali, kako ponovljivi so rezultati pri tem pH. Na Sliki 11 vidimo, da ima sprememba pH-ja DMB za samo enoto velik vpliv na sproščanje NaDIF, saj je pri 15 minutah delež

sproščene učinkovine v mediju s pH 4 80 %, v mediju s pH 3 pa 60 %. Če primerjamo s Slikama 7 in 10, lahko vidimo, da smo pri pH 4 sicer dobili nekoliko boljšo ponovljivost v primerjavi s pH 3 pri enaki hitrosti vrtenja (100 rpm). Povprečen RSD med paralelkami v pH 4 je bil 12,7 %, v DMB s pH 3 je ta znašal 13,5 %.



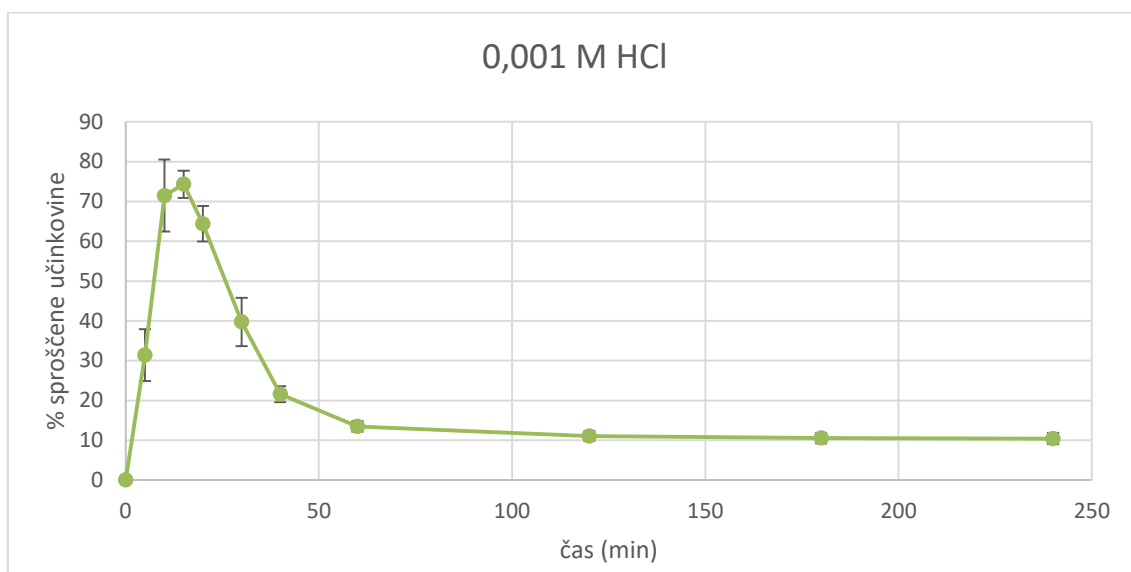
Slika 10: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirolidonom v DMB s pH 3. Prikazana so povprečja 9 paralelek in standardni odkloni pri posameznih časovnih točkah.



Slika 11: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirolidonom v DMB s pH 3 in 4.

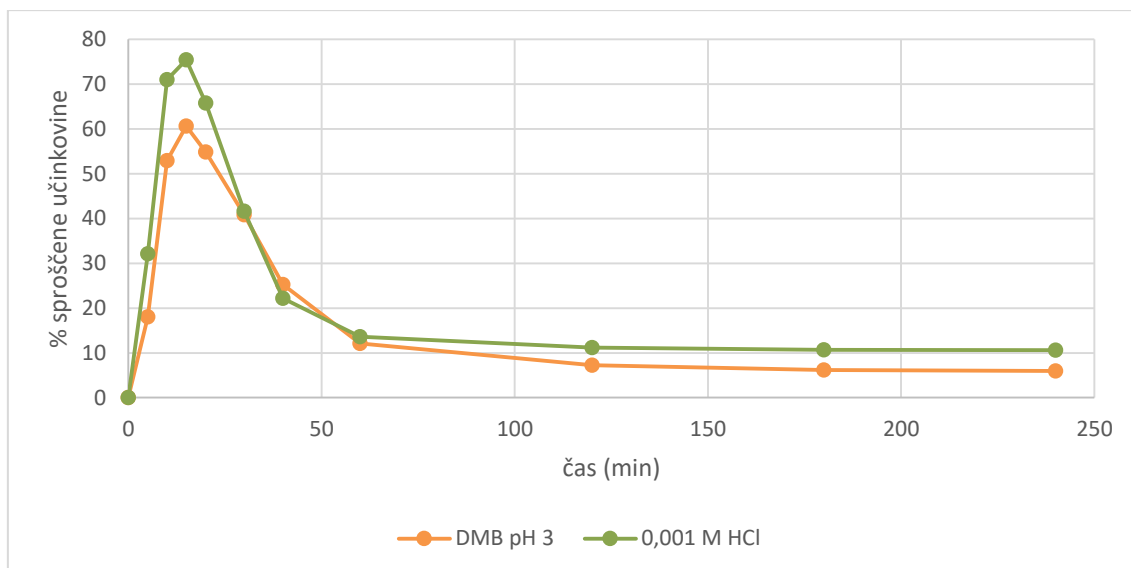
Pri sproščanju v DMB s pH 3 je bilo nekoliko več variabilnosti med paralelkami, vendar smo kljub temu za sproščanje izbrali medij z nižjim pH, ker je tukaj topnost DIF še nižja kot v pH 4. Za primerjavo smo pripravili še dva medija s približno istim pH ter primerjali ponovljivost rezultatov. 0,001 M HCl ima na osnovi koncentracij izračunano pH-vrednost

3, DMB pa smo uravnali na pH 3. Na Sliki 12 in 13 vidimo, da je pri sproščanju v 0,001 M HCl prišlo do manjših variacij med paralelkami v primerjavi z DMB (povprečen RSD je bil 13,5 % v primerjavi z 10,3 % v 0,001 M HCl).



Slika 12: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom v 0,001 M HCl. Prikazana so povprečja 9 paralelek in standardni odkloni pri posameznih časovnih točkah.

Ugotovili smo, da ima izbira medija vpliv na prenasíčenje na podlagi razlik v profilih sproščanja. V 0,001 M HCl se je sprostilo 10 %–20 % več učinkovine ob enakih časih kot v DMB s pH 3. Lahko, da je to posledica malo višjega pH 0,001 M HCl ali manjše pufirske kapacitete 0,001 M HCl v primerjavi z DMB. Zaradi tega bi lahko prišlo do spremembe pH po dodatku tablete v medij. Vendar smo 0,001 M HCl vrednost pH izmerili pred vsakim poskusom in tudi po poskusu in je bil pH le za 0,10 enote višji kot brez NaDIF. Vrednost pH DMB se je od začetka do konca poskusa znižala za 0,05 enote. Razlika med obema profiloma je tudi v maksimalni koncentraciji ter počasnejšem upadu koncentracij DIF v DMB (Slika 13). Pri 30 min so koncentracije DIF v DMB in 0,001 M HCl skoraj enake, kar nakazuje na to, da manjša stopnja prenasíčenja vodi v počasnejše obarjanje (Slika 13). Koncentracije sproščene učinkovine namreč ne upadajo tako strmo kot v 0,001 M HCl. DMB sestavljata citronska kislina in dinatrijev hidrogen fosfat, zaradi tega pa je možno, da katera izmed sestavin interagira s polimerom in učinkovino in zmanjša obseg prenasíčenja in tako zakasni obarjanje. Eden izmed razlogov za manjše prenasíčenje je tukaj lahko tudi različna ionska moč medijev. DMB ima namreč višjo ionsko moč kot 0,001 M HCl.



Slika 13: Grafa, ki prikazujeta delež sproščene natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirolidonom v 0,001 M HCl in DMB s pH 3.

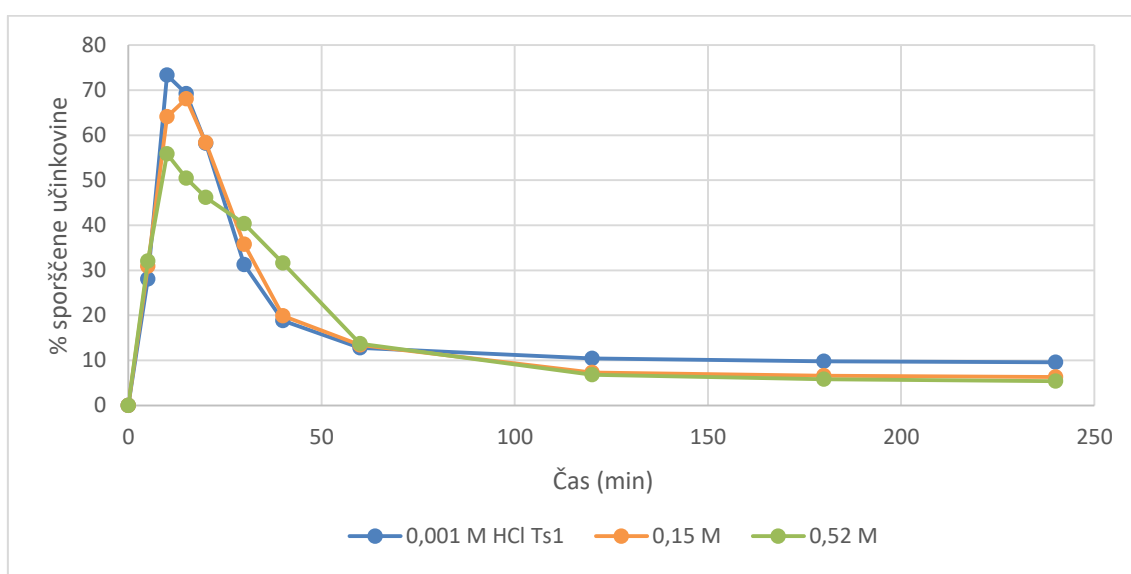
5.5 Vpliv ionske moči

Glede na pojav različnih profilov sproščanja v medijih s približno isto pH-vrednostjo smo želeli ugotoviti, ali ima mogoče ionska moč značilen vpliv na sproščanje NaDIF iz tablet s polivinilpirolidonom. Uravnavali smo jo z dodatkom NaCl. Glede na medij 0,001 M HCl in DMB s pH 3, smo izračunali potrebne količine dodatka NaCl za ionsko moč 0,15 M in 0,52 M. Testiranje smo izvedli v napravi USP II, pri volumnu medija 900 mL in pri hitrosti mešanja 100 rpm. Pri preliminarnih testiranjih smo namreč ugotovili, da je pri teh parametrih testiranja najmanj odstopanj med posameznimi meritvami. Čeprav smo ugotovili, da so rezultati dobljeni s sproščanjem v 0,001 M HCl manj variabilni, smo vpliv ionske moči preučevali tudi v pufru DMB, zaradi tega, ker smo ugotovili, da se stanje prenasíčenja vzdržuje dalj časa kot 0,001 M HCl.

5.5.1 Vpliv povečanja ionske moči pri sproščanju v 0,001 M HCl

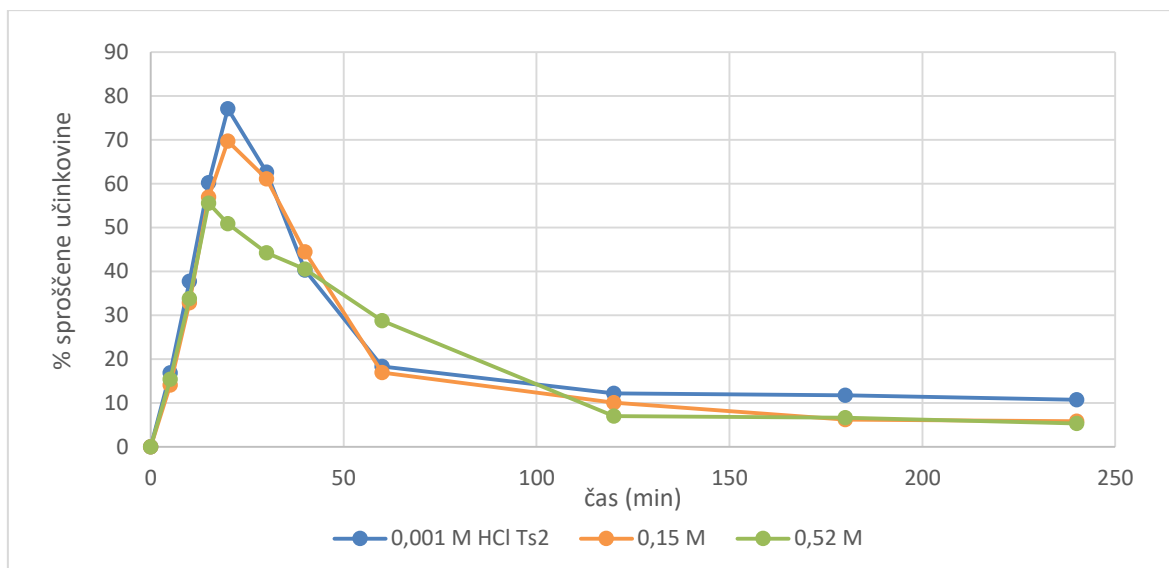
Iz profilov sproščanja smo opazili, da manjše povečanje ionske moči (0,15 M) v 0,001 M HCl nima večjega vpliva na sproščanje NaDIF in pojav prenasíčenja glede na sproščanje v 0,001 M HCl brez dodanega NaCl. Pri večji ionski moči (0,52 M) se opazi, da je maksimalni delež sproščene učinkovine in prenasíčenje na začetku manjše kot pri nižji ionski moči (Slika 14), vendar do obarjanja ne pride tako hitro kot pri nižji ionski moči ali pri samo 0,001 M HCl. Pride do pojava »padala« in tudi oblika krivulje je drugačna od oblike krivulje pri nižji ionski moči ali pri 0,001 M HCl. Po 40 minutah poskusa je namreč

delež sproščene učinkovine za 10 % višji kot pri sproščanju v 0,001 M HCl. Mehanizem vpliva ionske moči na sproščanje nam ni znan, možno je, da polimer ob višji koncentraciji ionov v raztopini izgublja vodo za hidratacijo in se ne raztopi tako hitro. Visoke koncentracije ionov lahko zmanjšajo količino vode za raztapljanje učinkovine. Večja ionska moč lahko zaradi tega zmanjša obseg prenasičenja. Na grafu je to vidno tako, da je vrh nižji in ni tako oster. Tableta sicer hitro razpade in koncentracija je maksimalna ob približno enakem času kot pri ostalih poskusih z manjšo ionsko močjo. Potek obarjanja pa je različen in maksimalno prenasičenje je manjše. Stopnja prenasičenja se ob povečani ionski moči zmanjša, zato se lahko zmanjša tendenca učinkovine k obarjanju.

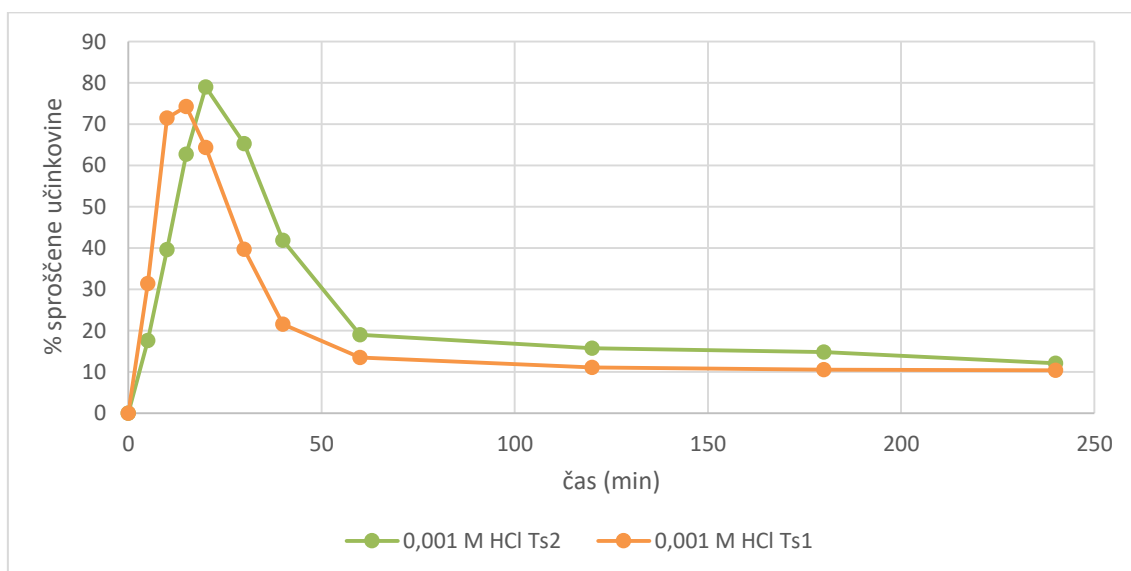


Slika 14: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom, izdelanih v prvi seriji v 0,001 M HCl, z ionsko močjo 0,15 in 0,52 M.

Teste sproščanja smo izvedli z dvema serijama tablet enake sestave, ki so bile sicer tudi izdelane na enak način, vendar so se pojavile razlike v profilih sproščanja med obema serijama. Tudi pri drugi seriji tablet so izsledki enaki kot pri prvi seriji tablet (Slika 15), prenasičenje je nižje pri višji ionski moči, torej je stopnja prenasičenja nižja in posledično je obarjanje počasnejše. Vendar je bila trdnost pri drugi seriji tablet malo večja, kar se vidi tudi na grafu na Sliki 16, saj je zaradi počasnejšega razpada tablete največji delež učinkovine sproščen malo kasneje kot pri prvi seriji. Po dodatku NaCl v 0,001 M HCl se je izmerjen pH medija, ki je bil okrog 3,2, vedno znižal za približno 0,2–0,3.



Slika 15: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom, izdelanih v drugi seriji v 0,001 M HCl brez dodatka NaCl in s spremenjeno ionsko močjo na 0,15 in 0,52 M.

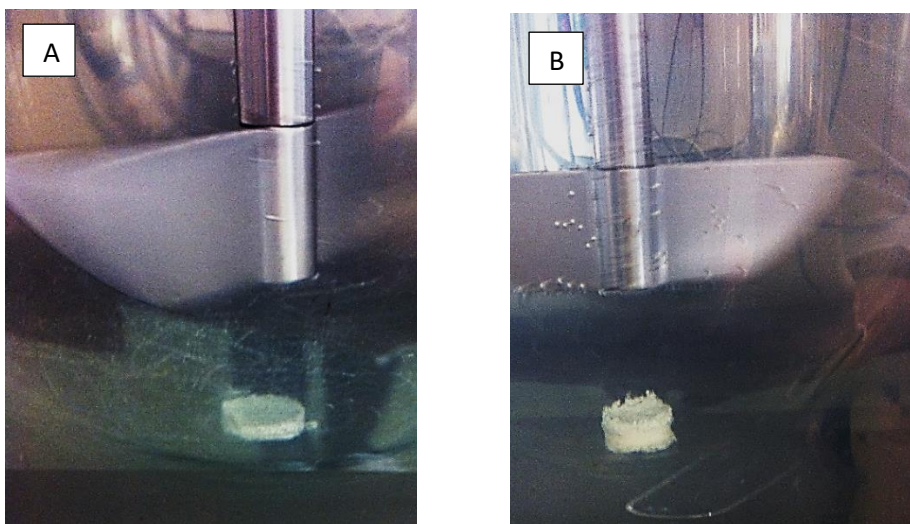


Slika 16: Grafa, ki prikazujeta delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom izdelanih v dveh serijah. Temno zelena krivulja predstavlja tablete iz 1. serije, svetlo zelena pa tablete iz 2. serije, ki so trše.

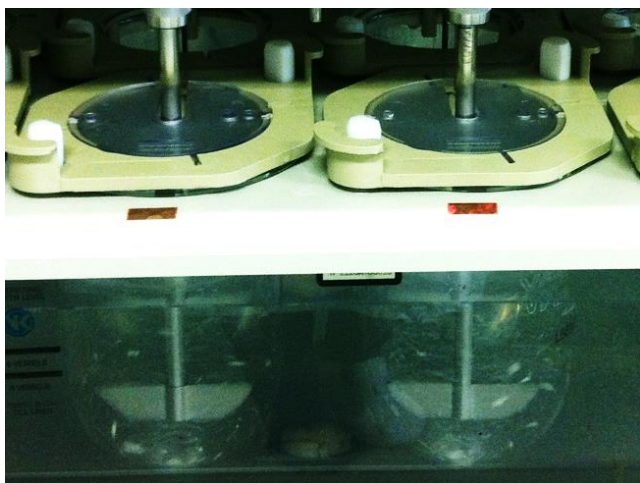
5.5.2 Vpliv povečanja ionske moči pri sproščanju v DMB s pH 3

Pri dodatku NaCl v DMB do ionske moči 0,52 M se je izmerjeni pH medija s 3,01 znižal na 2,7. Pri poskusih sproščanja tablete pri povišani ionski moči (0,52 M) niso takoj razpadle kot pri ostalih poskusih, ampak so nabreknile in razpadle komaj po 17–20 minutah poskusa. Razpadle so na večje koščke, ki se niso povsem raztopili v celotnem času poskusa. Absorbance, ki smo jih dobili, so bile prenizke, da bi se lahko zanesli na te rezultate. V začetnih točkah so bile sicer višje kot na koncu poskusa, kar pomeni, da je do

prenasičenega stanja vseeno prišlo. Po dodatku manjše količine NaCl do ionske moči 0,15 M se je pH medija znižal iz 3,04 na 2,87. Tudi tukaj so tablete nabrekli in razpadle komaj po 8–15 minutah. Koncentracije so bile v primerjavi z DMB brez dodanega NaCl zelo nizke, vendar malo višje v primerjavi z ionsko močjo 0,52 M. Razlog za nabrekanje tablet in za drugačno sproščanje v primerjavi z ostalimi poskusi je pufer v kombinaciji z NaCl.



Slika 17: Na sliki A je prikazano sproščanje v 0,001 M HCl po približno 5 minutah testiranja. Na sliki B je prikazano sproščanje v DMB pufru s povečano ionsko močjo 0,15 M po približno 5 minutah testiranja.

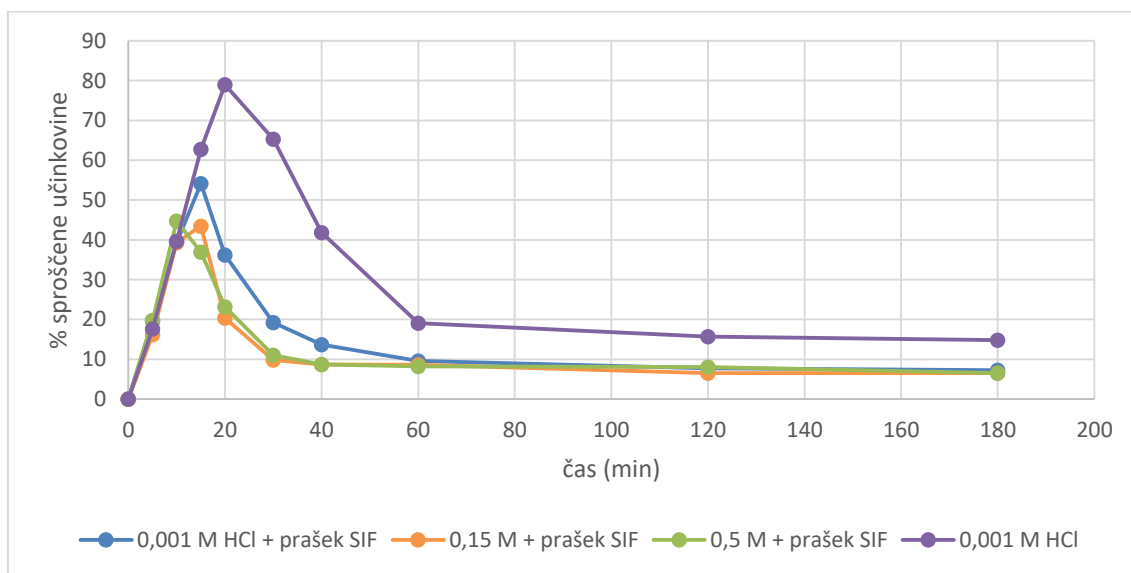


Slika 18: Prikazano je sproščanje NaDIF v dveh posodah po 30 minutah v DMB s pH 3 z ionsko močjo 0,15 M. V obeh posodah je viden razpad tablet na večje delce.

5.5.3 Vpliv biorelevantnega medija z različnimi ionskimi močmi

Komponente, ki sestavljajo sokove v prebavnem traktu in različni razgradni produkti hranil, lahko spremenijo topnost učinkovin, kar pomeni, da lahko vplivajo tudi na stopnjo

prenasičenja in tudi na hitrost obarjanja. V eni izmed študij so preučevali obnašanje treh bazičnih učinkovin v sistemu *in vitro* ob prisotnosti žolčnih soli in fosfolipidov v medijih FaSSIF in FeSSIF. Dokazali so, da prisotnost fosfolipidov in žolčnih soli v mediju vpliva na sproščanje, saj je prišlo do povišanih koncentracij in obsega prenasičenja v primerjavi s sproščanjem v navadnih pufrih. Dokazali so tudi, da so intermolekularne interakcije med natrijevim tauroholatom in karbamazepinom pokazale zmožnost zaustavljanja rasti kristala in obarjanja učinkovine. Žolčne soli so namreč površinsko aktivne snovi, ki lahko zavrejo obarjanje učinkovine (4). Z namenom boljšega posnemanja pogojev v gastrointestinalnem traktu smo sproščanje izvedli še v 0,001 M HCl z dodatkom praška SIF, ki ga sestavljajo nizke količine naravno prisotnih surfaktantov v tekočinah GIT, lecitina (fosfolipid) in natrijevega tauroholata (žolčne soli). Na hitrost obarjanja lahko namreč vpliva tudi sestava medija, v katerem izvajamo testiranje. V našem primeru se rezultati niso ujemali z literaturo, saj dodatek praška za simulacijo naravnega medija ni povečal maksimalnega prenasičenja NaDIF. Delež sproščene učinkovine v maksimalni točki prenasičenja in obseg prenasičenja je bil veliko manjši kot pri samem sproščanju v 0,001 M HCl (Slika 19). Razlog za to nam ni znan. Smiselne bi bile nadaljnje raziskave, ki bi potrdile oz. ovrgle trditve, da naravne PAS zavrejo obarjanje učinkovine.



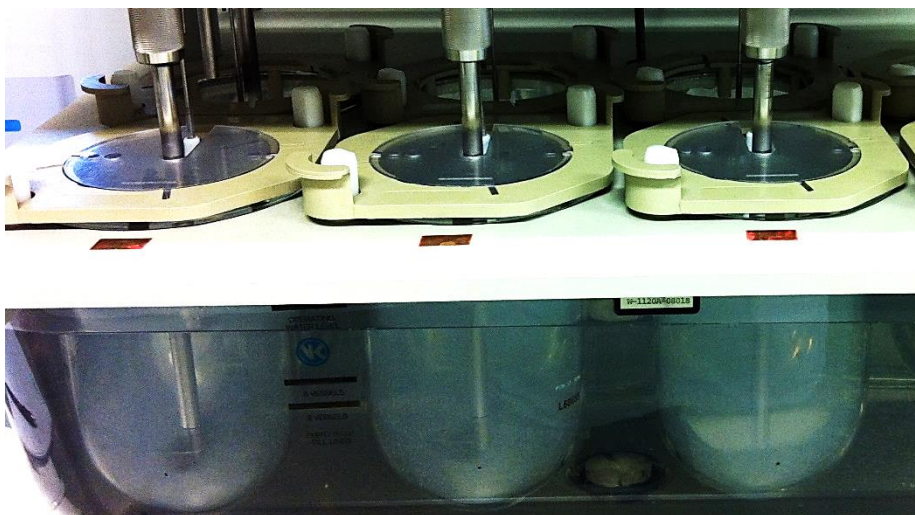
Slika 19: Graf, ki prikazuje delež sproščene natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom v 0,001 M HCl z in brez dodanega SIF praška ter 0,001 M HCl z dodatkom SIF praška in NaCl do ionske moči 0,15 in 0,52 pri hitrosti vrtenja 100 rpm in 900 mL medija.

Čeprav smo vzorec iz medija 0,001 M HCl z dodatkom praška SIF (brez NaCl) najprej vzporedno analizirali še s tekočinsko kromatografijo in so bili rezultati primerljivi z

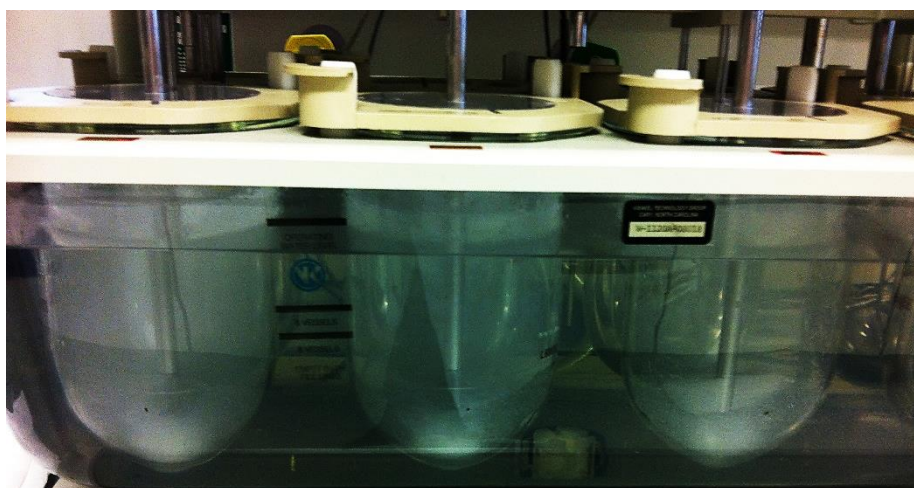
UV/VIS spektrofotometrijo, smo imeli tukaj nekaj težav. Po dodatku NaCl v ta medij so se pojavile težave z merjenjem absorbanca vzorcev z UV/VIS spektrofotometrom. Pri vseh paralelkah ob odvzetih vzorcih ob času 20 min in 30 min, ko je bil delež sproščene učinkovine najvišji, je bila absorbanca pri 400 nm višja od 0,01. To lahko pomeni, da se je nekaj učinkovine naknadno oborilo, da je nekaj oborjenih delcev šlo skozi filter ali pa so bile prisotne druge nečistoče v vzorcu, ki lahko motijo analizo. Da se vzorec po odvzemu v mešanici z NaOH ne obarja več, smo namreč preverili samo za vzorce, ki so se sproščali v DMB s pH 4. Možno je, da se je učinkovina v vzorcu ob dodatku praška SIF in NaCl v mešanici z NaOH obarjala. Čeprav ujemanje HPLC in UV/VIS kaže na pravilno določene koncentracije. Povišanje ionske moči medija z dodanim praškom SIF drugače ni imelo večjega vpliva na prenasičenje NaDIF, ker so deleži sproščenih učinkovin pri obeh ionskih močeh skoraj enaki kot pri mediju brez dodanega NaCl (Slika 19).

5.6 Določanje velikosti oborjenih delcev

Začetek obarjanja diklofenaka smo lahko tudi vizualno ocenili, saj je medij, v katerem smo sproščali, pomotnel. Čim večji delež DIF se je oboril, bolj moten je postajal medij. Poskuse smo na USP II aparatu izvajali 3–4 ure, po 3 urah je bil medij že čisto moten. Na Slikah 20 in 21 so prikazani poskusi sproščanja v treh posodah. V prvi posodi je medij 0,001 M HCl, v drugi 0,001 M HCl z dodanim NaCl do ionske moči 0,15 M ter v tretji z dodatkom NaCl do ionske moči 0,52 M. Pri sproščanju pri različnih ionskih močeh lahko vidimo, da je na začetku sproščanja (po 15 minutah) najbolj moten medij z višjo ionsko močjo, saj se nekaj učinkovine že takoj obori. Po 30 minutah sproščanja pa pride do obratnega stanja. Takrat bolj pomotni medij 0,001 M HCl brez dodanega NaCl, v katerem je dosežena višja maksimalna koncentracija (višja stopnja prenasičenja), vendar se učinkovina začne hitreje obarjati kot v mediju z ionsko močjo 0,15 in 0,52 M.



Slika 20: Prikazano je sproščanje po 15 minutah v treh različnih medijih, v 0,001 M HCl in medijih z ionsko močjo 0,15 in 0,52 M. V prvi posodi z leve je 0,001 M HCl, v drugi posodi je 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,15 M in v tretji je medij z ionsko močjo 0,52 M.



Slika 21: Prikazano je sproščanje po 30 minutah v treh različnih medijih, v 0,001 M HCl in medijema z ionsko močjo 0,15 in 0,52 M. V prvi posodi z leve je 0,001 M HCl, v drugi posodi je medij z ionsko močjo 0,15 M in v tretji je medij z ionsko močjo 0,52 M.

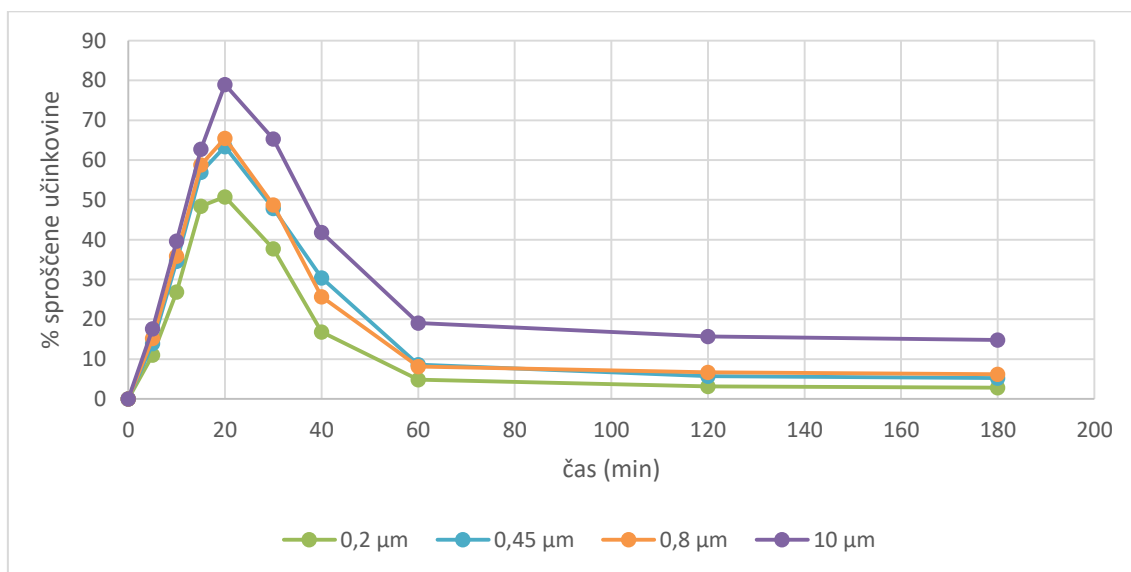
Pri nekaterih sproščanjih v enakih medijih smo opazili, da mediji niso postajali motni ob enakem času, čeprav smo tablete dali v posodo istočasno. Zato smo želeli preveriti, če je vzrok za različno motnost mogoče različna velikost oborjenih delcev.

S filtriranjem ločimo oborjeni del učinkovine od raztopljenega in s tem preprečimo, da bi se oborjeni del po redčenju z 0,1 M NaOH raztopil in nam dal lažne rezultate. Možno je, da so nekateri oborjeni delci manjši od 10 μm , kot je velikost por filtra, ki je bil nastavljen na kanili vzorčevalnika. Zato smo s tremi filtri z manjšo velikostjo por naknadno filtrirali vzorce pri sproščanju v 0,001 M HCl in DMB. Povečali smo tudi ionsko moč obeh medijev in ugotavljali, kako to vpliva na velikost oborjenih delcev. Rezultati so bili

zanesljivi samo pri 0,001 M HCl, saj so bile zaradi dodatka NaCl v DMB absorbance prenizke zaradi premalo sproščene učinkovine.

5.6.1 Velikost oborjenih delcev diklofenaka v 0,001 M HCl

Na Sliki 22 vidimo, da je z naknadno filtracijo padal določen maksimalni delež sproščene učinkovine, iz česar smo lahko sklepali, da so nekateri delci manjši od 10 μm , torej od velikosti por filtra, ki smo ga imeli nastavljenega na kanili za avtomatsko vzorčenje. Pri filtraciji s filtrom z velikostjo por 0,2 μm lahko vidimo malo drugačen profil sproščanja, saj nimajo tako izrazitega maksimuma prenasičenja. S to filtracijo smo opazili, da se določeno maksimalno prenasičenje zmanjšuje z manjšanjem velikosti por filtra, tako lahko predvidevamo, da je nekaj delcev res bilo oborjenih in jih prej načeloma ne bi smeli določiti, ker niso raztopljeni in so se naknadno raztopili v mešanici z NaOH ter tako povzročili lažno višje rezultate. Lažno previsok rezultat smo torej dobili v primeru, če so bili delci oborjeni že v posodi in so prešli filter. Če pa je bil odvzet vzorec bister in je prišlo do obarjanja v času odvzema pa do redčitve z 0,1 M NaOH, so rezultati v redu.

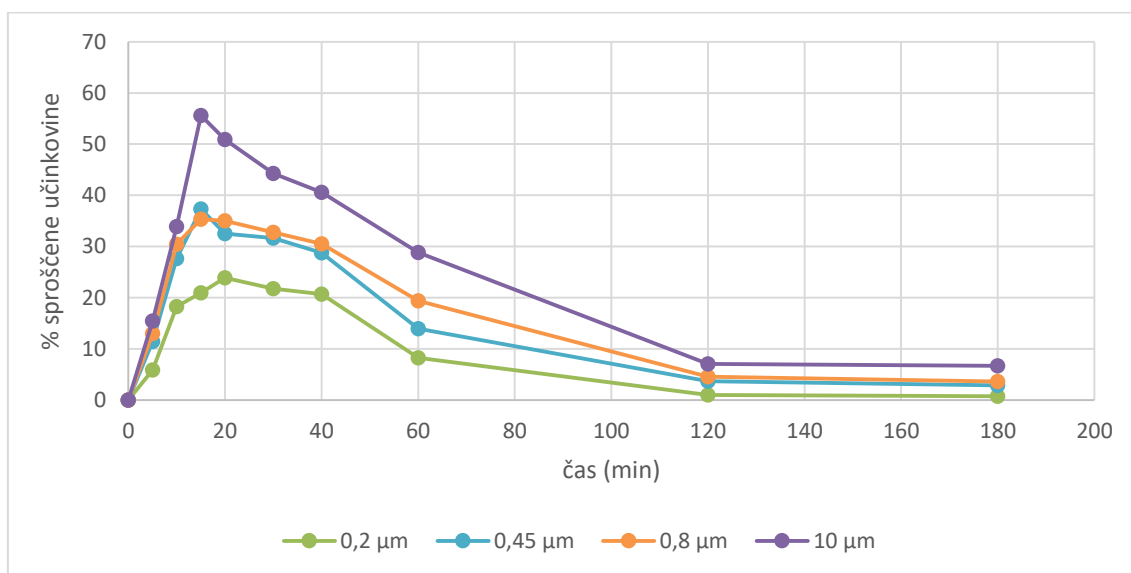


Slika 22: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivilnilpirolidonom v 0,001 M HCl, vzorcev filtriranih s 10 μm in nato naknadno s filtri z različno velikostjo por (0,2 μm , 0,45 μm , 0,8 μm) pri hitrosti vrtenja mešala 100 rpm in v 900 mL medija.

5.6.2 Velikost oborjenih delcev diklofenaka v 0,001 M HCl z različno ionsko močjo

Ob povečanju ionske moči medija in naknadne filtracije vzorca s filtri z različnimi velikostmi por, je razvidno, da si profili na Sliki 23 niso čisto podobni. Različna oblika profilov pomeni, da se distribucija oborjenih delcev spreminja s časom od začetka

sproščanja oziroma obarjanja. Maksimalno prenasíčenje pri 15 minutah smo določili tako, da smo skozi filter z velikostjo por 10 μm , spustili oborjene delce, ki so manjši od 10 μm . Pri filtraciji skozi filter z 0,2 μm porami vidimo, da do prenasíčenja sicer pride, vendar je vrh nižji in to vodi v manjšo stopnjo prenasíčenja in se zaradi tega učinkovina nato 40 minut počasi obarja. Tudi pri filtraciji z velikostjo filtra 0,8 μm in 0,45 μm pride do podobnega profila sproščanja. Tudi tu je vidno prenasíčenje, vendar ni tako izrazitega maksimuma kot tam, kjer ni bilo prisotne dodatne filtracije. Do obarjanja pride, vendar je počasnejše kot pri vzorcu, ki je filtriran samo s filtrom z velikostjo por 10 μm . Vidimo lahko, da so še oborjeni delci manjši od 10 μm prisotni tudi po daljšem času sproščanja (po 2, 3 urah). Rezultati, ki smo jih dobili s filtriranjem vzorca s filtrom z velikostjo por 10 μm , so lažni v primeru, če so se delci oborili že v mediju. V primeru, da so se oborili med procesom vzorčenja in redčenja z 0,1 M NaOH, so zanesljivi.

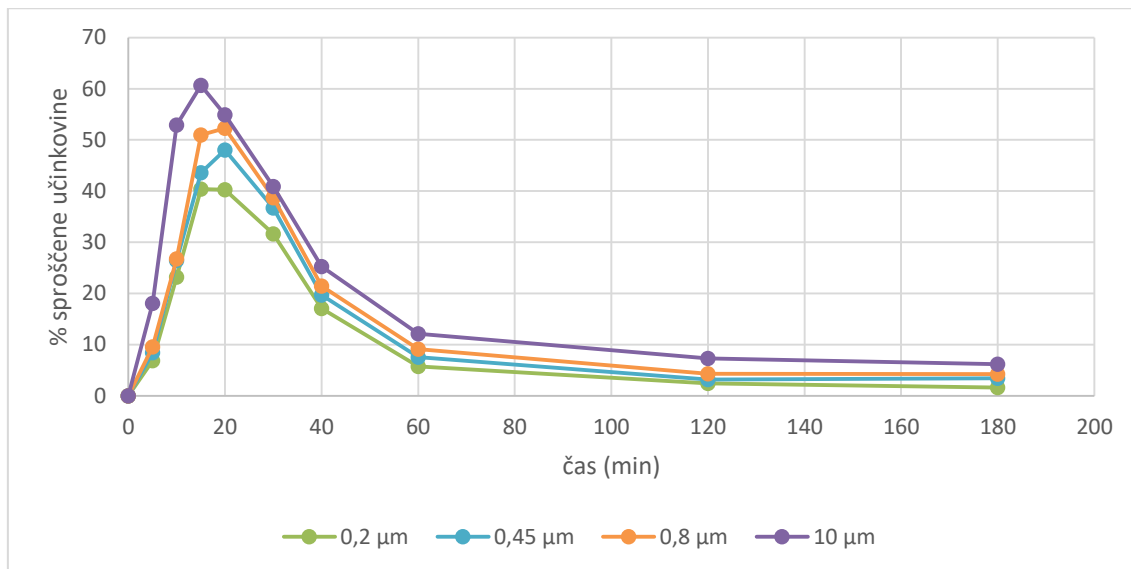


Slika 23: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirrolidonom v 0,001 M HCl z ionsko močjo 0,52 M, vzorcev filtriranih s štirimi različnimi velikostmi filtrov, pri hitrosti vrtenja 100 rpm in 900 mL medija.

5.6.3 Velikost oborjenih delcev diklofenaka v DMB s pH 3

Pri naknadnem filtriranju vzorcev pri sproščanju v mediju DMB s pH 3 lahko s Slike 24 vidimo, da je oblika profilov sproščanja podobna pri vseh štirih velikostih por filtrov. V primerjavi s filtriranjem delcev iz 0,001 M HCl tu ni tako velike razlike med oblikami grafov. Razlika med maksimalno koncentracijo pri 0,8 μm in 10 μm je še vedno prisotna, enako kot pri HCl. Viden je tudi trend padanja maksimalnih koncentracij z manjšanjem velikosti por filtra. Pri DMB je maksimalna koncentracija nižja glede na HCl tudi brez

naknadne filtracije. Na Sliki 24 je opazno, da je še vseeno nekaj delcev med 0,8 μm in 10 μm , krivulje med 0,8 μm in 0,45 μm pa so bližje skupaj.



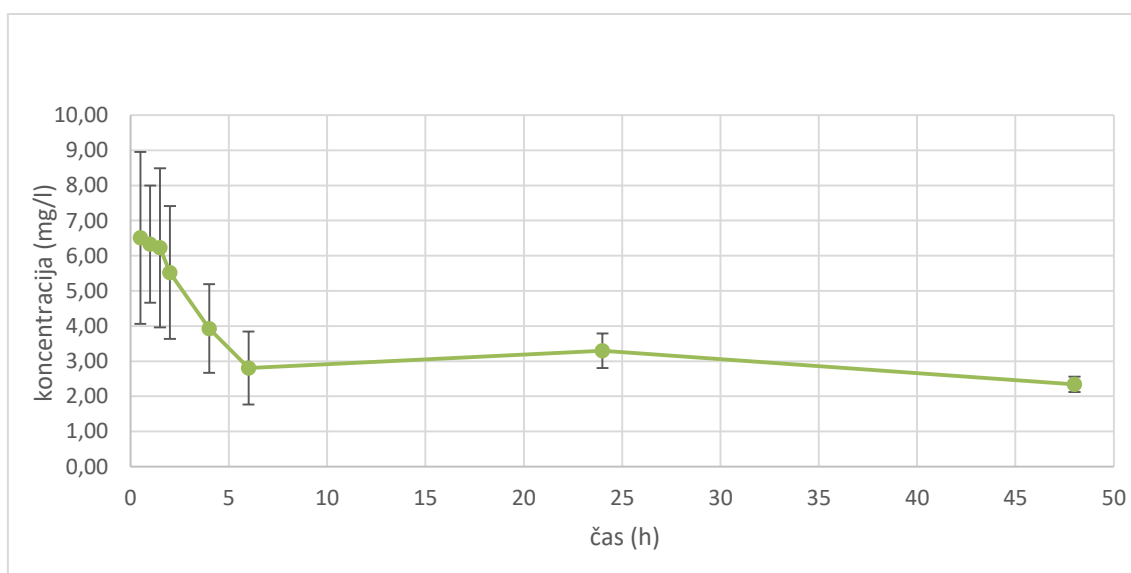
Slika 24: Graf, ki prikazuje delež sproščenega natrijevega diklofenakata iz tablet s polivinilpirolidonom v DMB s pH 3, filtriranih s štirimi različnimi velikostmi filtrov, pri hitrosti vrtenja 100 rpm in 900 mL medija.

5.7 Ravnotežna topnost natrijevega diklofenakata

Za določanje ravnotežne topnosti moramo izbrati ustrezno metodo, saj lahko na določanje vpliva več različnih faktorjev. Eden izmed njih je velikost delcev, manjši delci se raztopijo hitreje kot večji, zato se ravnotežna topnost pri manjših tudi hitreje vzpostavi. Čas za določanje topnosti je odvisen tudi od tega, ali je učinkovina kristalna ali amorfna, saj se amorfne učinkovine zaradi nižjega kemijskega potenciala hitreje raztopijo. Zaradi tega je čas, ki ga izberemo za doseganje topnosti, zelo pomemben. Pri določanju časa ravnotežne topnosti je pomembno tudi to, da je učinkovina v tem časovnem intervalu stabilna. Dodatek učinkovine v medij, v katerem bomo določali topnost, ne sme spremeniti pH medija, saj nam to lahko da lažne rezultate (24).

Eden izmed načinov za določanje ravnotežne topnosti je dodatek prebitne količine učinkovine v medij, v katerem želimo preveriti topnost. Mi smo želeli določiti ravnotežno topnost v medijih, v katerih smo izvajali sproščanje ter čas vzpostavitve ravnotežne topnosti. Prebitno količino NaDIF smo dali v majhen volumen medija in po določenem času stresanja izmerili absorbance vzorcev. V grafu na Sliki 25 lahko vidimo, da so koncentracije izmerjene do 6 ur stresanja, skoraj dvakrat višje kot koncentracije izmerjene po daljšem času stresanja vzorca, kar nakazuje na to, da je tudi tukaj prišlo do prenasičenja.

Zato je čas, ki ga izberemo za določanje topnosti, zelo pomemben faktor. Odstopanja med posameznimi meritvami pri enakem času so kar visoka, vendar je opazno, da se po daljšem času stresanja, po 24-ih in 48-ih urah koeficient variacije zmanjša na polovico in znaša 9,39 %. Topnost smo določili ob času, ko koncentracija učinkovine ni več padala. Ravnotežna topnost 2,34 mg/l, ki smo jo dobili po 48-ih urah stresanja v mediju DMB s pH-vrednostjo 3, je malo manjša od koncentracije, ki smo jo dobili pri sproščanju na USP II v istem mediju po 3 urah (2,74 mg/l). Tu se lahko kaže vpliv PVP v tabletah, ki v manjši meri zavre obarjanje učinkovine oziroma poveča topnost. Zaradi nizkih koncentracij pa je možno, da je napaka. Na koncu smo s pH-lističi izmerili tudi pH vzorca, ki je tukaj ostal enak 3.



Slika 25: Graf, ki prikazuje koncentracijo raztopljenega natrijevega diklofenakata brez dodanega polivinilpirolidona v DMB s pH 3 po določenem času stresanja. Prikazane so tudi standardne deviacije pri posameznih časovnih točkah.

Ravnotežno topnost smo želeli določiti tudi v 0,001 M HCl. Tukaj smo imeli težave, saj se je zaradi dodanega NaDIF v majhen volumen medija dvignil pH, zaradi česar se je posledično raztopilo več učinkovine. Najprej smo natehtali približno 0,8–1 mg učinkovine na 1,5 mL medija, nato smo poskusili tudi z večjo količino, vendar se je pH še bolj povečal in posledično se raztopilo še več učinkovine. pH-vrednost 0,001 M HCl se je ob dodatku večje količine NaDIF (3–5 mg) povečala iz pH 3 tudi na 5–6. Tudi 3–5 mg učinkovine ni bilo prebitnih, ampak se je zaradi povišanega pH vse raztopilo. Topnosti v 0,001 M HCl tako nismo mogli določiti, saj je sama učinkovina preveč spremenila pogoje določanja. Pri sproščanju v USP II v 0,001 M HCl do tega ni prišlo, saj smo po vsakem sproščanju izmerili pH in le-ta se je povečal le za največ 0,10 enote.

6 ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo proučevali vplive na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet, ki so vsebovale še polimer PVP. Tablete s takšno sestavo so v našem primeru učinkovini omogočile vzpostavitev stanja prenasičenosti, kar je eden izmed načinov za rešitev problema slabe topnosti slabo topnih učinkovin. Najprej smo poiskali ustrezno metodo za sproščanje, ki nam je dala najbolj zanesljive rezultate. Ugotovili smo, da pretočni sistem ni primeren za testiranje sproščanja NaDIF v tabletah s tako sestavo, saj prihaja do zamašitve cevk zaradi obarjanja učinkovine. S pretočnim sistemom bi sicer lahko ponazorili prehod učinkovine skozi GIT in pH-gradient, ki je lahko tudi eden izmed vzrokov za nastanek prenasičenega stanja. Aparat USP II z vesli se je izkazal kot najbolj primeren za vrednotenje prenasičenja. Pri večji hitrosti vrtenja veslastega mešala so rezultati zaradi boljše homogenizacije medija manj variirali med posameznimi paralelkami kot pri manjši hitrosti vrtenja. Večja hitrost poveča tudi maksimalno koncentracijo sproščene učinkovine, vendar vodi v hitrejšo obarjanje zaradi višje stopnje prenasičenja. Povečanje ionske moči medija zmanjša maksimalno prenasičenje učinkovine v primerjavi z medijem brez dodanih soli, vendar pride do zmanjšane hitrosti obarjanja, kar se na profilih kaže v počasnejšem padcu koncentracije učinkovine.

S pomočjo filtrov različnih velikosti por 10; 0,8; 0,45 in 0,2 μm smo nato v istih medijih ugotovili, da so nekateri oborjeni delci manjši od 10 μm , od velikosti filtra, ki smo ga imeli nastavljenega na kanilah za vzorčenje. Večja razlika v velikosti oborjenih delcev NaDIF je v 0,001 M HCl, medtem ko pri sproščanju v DMB ni bilo tako velike razlike med velikostjo oborjenih delcev. Delci so lahko bili oborjeni že v mediju in so prešli filter, ker so bili manjši od por filtra. V tem primeru smo dobili lažno previsoke rezultate. Če pa so se delci oborili komaj po odvzemu oziroma v času odvzema vzorca, so rezultati v redu. Iz rezultatov, ki smo jih dobili, ne moremo narediti jasnih zaključkov o spreminjanju velikosti oborjenih delcev, bi pa bilo v okviru nadaljnjih raziskav smiselno spremljati časovno odvisnost velikosti oborjenih delcev z drugo metodo.

Ravnotežno topnost NaDIF smo določili le v DMB s pH-vrednostjo 3. Pri določanju v 0,001 M HCl smo imeli težave, saj se je zaradi dodatka učinkovine v obliki soli v medij pH dvignil in nismo imeli več osnovnega medija. Določena ravnotežna topnost NaDIF v DMB s pH 3 je malo nižja kot izmerjena koncentracija pri testih sproščanja po 4 urah, kar lahko nakazuje na manjši zaviralni učinek polimera PVP na obarjanje DIF.

Teste sproščanja bi morali izvajati v manjših volumnih, da bi se bolj približali fiziološkim volumnom in tudi lažje preučili mehanizem prenasičenja. Enostavne vodne pufne raztopine bi lahko zamenjali z mediji, ki se bolj približajo fiziološkim pogojem. Ti ne posnemajo samo fiziološke pH vrednosti, ampak tudi njihovo sestavo. V nekaterih raziskavah je bilo namreč dokazano, da tudi fiziološke komponente vplivajo na prenasičenje. Za filtracijo vzorcev bi morali izbrati filtre z manjšimi velikostmi por, saj so nekateri oborjeni delci zelo majhni in nam lahko dajejo lažne rezultate, če so prisotni že v mediju.

7 LITERATURA

1. Yamashita T, Kokubo T, Zhao C, Ohki Y: Antiprecipitant screening system for basic model compounds using bio-relevant media. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 2010; 15: 306–312.
2. Sarode LA, Wang P, Obara S, Worthen RD: Supersaturation, nucleation, and crystal growth during single- and biphasic dissolution of amorphous solid dispersion: Polymer effect and implications for oral bioavailability enhancement of poorly water soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2014; 86: 351–360.
3. Bevernage J, Brouwers J, Annaert P, Augustijns P: Drug precipitation–permeation interplay: Supersaturation in an absorptive environment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 82: 424–428.
4. Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P: Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98: 2549–2572.
5. Xu S, Dai WG: Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 453: 36–43.
6. Bevernage J, Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P: Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 453: 25–35.
7. Guzman HR, Tawa M, Zhang Z, Ratanabanangkoon P, Shaw P, Gardner CR, Chen H, Moreau JP, Almarsson O, Remenar JF: Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96: 2686–2702.
8. Lindfors L, Forssen S, Westergren J, Olsson U: Nucleation and crystal growth in supersaturated solutions of a model drug. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008; 325: 404–413.
9. Raghvan SL, Trividic A, Davis AF, Hadgraft J: Crystalization of hydrocortisone acetate: Influence of polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 212: 213–221.

10. Terebetski J, Michniak-Kohn B: Combining ibuprofen sodium with cellulosic polymers: A deep dive into mechanisms of prolonged supersaturation. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 475: 536–546.
11. Ilevbare AG, Liu H, Edgar JK, Taylor SL: Understanding polymer properties important for crystal growth inhibition-impact of chemically diverse polymers on solution crystal growth of ritonavir. *Crystal Growth Design* 2012; 12: 3133–3143.
12. Gao P, Akrami A, Alvarez F, Hu J, Li L, Ma C, Surapaneni S: Characterization and optimization of AMG 517 supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS) for improved oral absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98: 516–528.
13. Garekani HA, Ford JL, Rubinstein MH, Rajabi-Siahboomi AR: Highly compressible paracetamol. I. Crystallization and characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 208: 87–99.
14. Kestur US, Lee H, Santiago D, Rinaldi C, Won Y, Taylor SL: Effects of the molecular weight and concentration of polymer additives, and temperature on the melt crystallization kinetics of a small drug molecule. *Crystal growth and design* 2010; 10: 3585–3595.
15. Yamashita K, Nakate T, Okimoto K, Ohike A, Tokunaga Y, Ibuki R, Higaki K, Kimura T: Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 267: 79–91.
16. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich Q, Kuo MS, Hageman MJ: Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 92: 2386–2398.
17. Wang B, Wang D, Zhao S, Huang X, Lc Y, Liu X, Lv G, Ma X: Evaluate the ability of PVP to inhibit crystallization of amorphous solid dispersions by density functional theory and experimental verify, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017; 96: 45–42.
18. Chen ZQ, Liu Y, Zhao JH, Wang L, Feng NP: Improved oral bioavailability of poorly water-soluble indirubin by a supersaturable self-microemulsifying supersaturable drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7: 1115–1125.

19. Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T: Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 34: 94–103.
20. Hydroxypropylmethyl cellulose,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/hydroxypropylmethylcellulose12345900465311?lang=en®ion=SI>, dostopano 1. 9. 2017.
21. Polyvinylpyrrolidone,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Polyvinylpyrrolidone&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=SI&focus=product>, dostopano 1. 9. 2017.
22. Lapuh M: Vpliv izbranih pogojev na prenasičenje in sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s takojšnjim sproščanjem. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2016.
23. Diclofenac, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00586>, dostopano 1. 9. 2017.
24. Kawakami K, Miyoshi K, Ida Y: Impact of the amount of excess solids on apparent solubility. *Pharmaceutical Research* 2005; 22: 1537–1543.