UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BERNARDA BRAVC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BERNARDA BRAVC

SIMULACIJA POVPREČNEGA PROFILA pH PREBAVNEGA TRAKTA NA PRETOČNEM SISTEMU S KROGLICAMI IN VPLIV NA SPROŠČANJE NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA IZ OGRODNIH TABLET

SIMULATION OF THE AVERAGE GASTROINTESTINAL pH PROFILE IN GLASS BEAD FLOW-THROUGH SYSTEM AND THE IMPACT ON THE RELEASE OF DICLOFENAC SODIUM FROM MATRIX TABLETS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Greti Cof, dipl. ing. kem. tehn. za prijetno vzdušje v laboratoriju in pomoč pri praktičnem delu naloge.

Hvala tudi vsem mojim bližnjim za čudovita študentska leta in vso izkazano podporo pri študiju.

Izjava

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

Bernarda Bravc

VSEBINA

VSEBINA I
POVZETEK III
SEZNAM OKRAJŠAV VI
1 UVOD 1
1.1 PREBAVNI TRAKT 1
1.1.1 ANATOMIJA PREBAVNEGA TRAKTA 1
1.1.2 FIZIOLOŠKE VREDNOSTI V PREBAVNEM TRAKTU NA TEŠČE 1
1.1.2.1 ŽELODEC IN TANKO ČREVO 1
1.1.2.2 KOLON 2
1.1.2.3 HIDRODINAMIKA IN PRETOKI TEKOČIN V PREBAVNEM TRAKTU 3
1.1.2.4 ABSORPCIJA SNOVI VZDOLŽ PREBAVNEGA TRAKTA 3
1.1.3 PRIDOBIVANJE PODATKOV O POGOJIH V PREBAVNEM TRAKTU »*IN VIVO*«: PREGLED LITERATURE 4
1.2 TESTI SPROŠČANJA 7
1.2.1 BCS KLASIFIKACIJA 7
1.3 NESTEROIDNE PROTIVNETNE UČINKOVINE 8
1.3.1 DIKLOFENAK 8
2 NAMEN 11
3 MATERIALI IN METODE 12
3.1 OBDELAVA LITERATURNIH PODATKOV 12
3.1.1 METODE 12
3.1.1.1 PROGRAM ENGAUGE 12
3.1.1.2 PROGRAM EXCEL 12
3.2 LABORATORIJSKI DEL 12
3.2.1 APARATURE 12
3.2.2 MATERIALI 13
3.2.3 METODE 14
3.2.3.1 KISLINE, BAZE IN RAZTOPINE SOLI 14
3.2.3.2 FOSFATNI PUFRI 15
3.2.3.3 REDČENI CITRATNO-FOSFATNI PUFRI 15
3.2.3.4 ANALIZA VZORCEV Z UČINKOVINO 17
3.2.3.5 IZDELAVA UMERITVENIH PREMIC 17
3.2.3.6 POSTOPEK DOLOČANJA PUFRSKE KAPACITETE 19
3.2.3.7 SIMULACIJA pH PROFILOV NA PRETOČNEM SISTEMU 20
3.2.3.8 IZDELAVA OGRODNIH TABLET 24

3.2.3.9 TESTI SPROŠČANJA NA PRETOČNEM SISTEMU 25
4 REZULTATI 28
4.1 ANALIZA LITERATURNIH PODATKOV 28
4.2 UMERITVENE PREMICE 30
4.3 PUFRSKE KAPACITETE MEDIJEV ZA SIMULACIJO TANKEGA ČREVESA 32
4.4 SIMULACIJA HITREGA NARAŠČANJA pH OB PREHODU IZ ŽELODCA V DUODENUM 34
4.5 SIMULACIJA POČASNEGA NARAŠČANJA pH VZDOLŽ TANKEGA ČREVESA 35
4.6 SIMULACIJA HITREGA PADCA pH OB PREHODU IZ TANKEGA V DEBELO ČREVO 37
4.7 SIMULIRANI pH PROFILI 39
4.8 TESTI SPROŠČANJA 44
5 RAZPRAVA 49
5.1 OBLIKOVANJE pH PROFILOV PO LITERATURNIH VIRIH 49
5.2 SIMULACIJA HITREGA NARAŠČANJA pH OB PREHODU IZ ŽELODCA V DUODENUM 51
5.3 SIMULACIJA POČASNEGA NARAŠČANJA pH VZDOLŽ TANKEGA ČREVESA 53
5.4 SIMULACIJA HITREGA PADCA pH OB PREHODU IZ TANKEGA V DEBELO ČREVO 54
5.5 TESTI SPROŠČANJA 56
5.5.1 VPLIV LOVLJENJA VZORCEV V RAZTOPINO NaOH NA REZULTATE SPROŠČANJA 56
5.5.2 GRAFI SPROŠČANJA 58
5.6 PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA ZA NATRIJEV DIKLOFENAKAT IN IBUPROFEN 62
6 SKLEPI 64
7 VIRI 65

POVZETEK

V magistrskem delu smo zbrali literaturne podatke o fiziološkem spreminjanju pH vzdolž tankega črevesa v pogojih na tešče. Izračunali smo pH profil prebavnega trakta od želodca do začetnega dela debelega črevesa in povprečen čas, ko je FO v okolju z določenim pH: zadrževanju v kislem okolju želodca sledi hitri dvig pH v duodenumu, nato sledi prvi pH plato, počasno naraščanje pH vzdolž tankega črevesa do drugega pH platoja v terminalnem delu pred ileocekalno zaklopko in hiter padec pH ob prehodu v cekum. Zastavili smo si 3 različne pH profile v okviru fizioloških vrednosti: povprečnega, ter nižjega in višjega.

Spremembe pH v odvisnosti od časa smo želeli simulirati v *»in vitro«* sistemu, na pretočnem sistemu s kroglicami. Z zaporednimi menjavami medijev smo simulirali pH okolja *»in vivo«,* od želodca do debelega črevesa. Medij v delovni čaši je imel konstanten volumen 40 mL, v čašo smo natehtali steklene kroglice in dodali magnet, čašo postavili na vodno kopel na električni grelnik, z vgrajenim magnetnim mešalom. Tako smo zagotavljali temperaturo medija v čaši 37ºC in konstantno mešanje. Silikonski cevki sta dovajali svež medij v čašo in odvajali medij iz čaše s konstantnim pretokom. Za simulacijo želodčnega medija smo uporabili 0,01 M klorovodikovo kislino. Za hiter dvig pH smo uporabili raztopino Na_3PO_4. Za simuliranje črevesnih medijev smo uporabili sestavljene citratno-fosfatne pufre, ki so nam omogočili pripravo pufrov s pH med 6 in 8. Sestavljali sta jih osnovni raztopini Na_2HPO_4 in citronske kisline, ki smo ju dodatno redčili, glede na želeno pufrsko kapaciteto. Za oster padec pH med simulacijo prehoda terminalnega dela tankega črevesa v cekum smo uporabili raztopino H_3PO_4. Za simulacijo kolonskega medija smo prav tako uporabili citratno-fosfatni pufer. Ker se v sedanji praksi kot simuliran medij za tanko črevo uporablja fosfatni pufer s pH 6,8 po USP (umetni črevesni sok), smo simulirali pH profil, kjer po ostrem dvigu pH do konca poskusa dovajamo omenjeni fosfatni pufer.

Vse štiri omenjene pH profile smo simulirali na pretočnem sistemu ter izvedli sproščanje Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet s HPMC. Topnost Na-diklofenakata se spreminja s pH in že manjše spremembe pH v simuliranem okolju tankega črevesa so se odražale tudi na odstotku sproščene učinkovine. Ob primerjavi povprečnih profilov sproščanja v skladu s štirimi pH profili opazimo ob dvigu pH porast hitrosti sproščanja iz tablete in ob vzdrževanju pH na višjem platoju višji odstotek sproščene učinkovine.

Ključne besede: prebavni trakt, simulacija pH profilov, pretočni sistem, citratno-fosfatni pufri, testi sproščanja, natrijev diklofenakat.

ABSTRACT

Within the scope of the master's thesis we evaluated literature data on physiological pH values along the small intestine in fasting conditions. We calculated mean pH values of the gastrointestinal tract with mean time that a dosage form spends at a certain pH: an acidic environment in the stomach is followed by a sharp rise in pH in the duodenum; then followed by the first pH plateau and the gradual increase in pH along the small intestine, followed by the second pH plateau, illustrating the terminal part of the small intestine and retention of the pharmaceutical form before the ileocaecal valve. The pH plateau is followed by a drop in pH at the transition to caecum. We have set three different pH profiles: an average profile as well as a lower and a higher pH profile.

Our intention was to simulate these differences in the pH values *»in vitro«*, in a glass bead flow-through system. With a consecutive change of media we simulated the pH environment *»in vivo«* from the stomach to the colon. The volume of media in the beaker was 40 mL, containing glass beads and a magnetic stir bar. The beaker was placed in the water bath, on an electric heater with a built-in magnetic stirrer. Therefore we provided a constant media temperature of 37ºC and a constant stirring rate. Two silicon tubes were placed, one to pump fresh media into the beaker and the second to pump out the media from the beaker with a constant flow rate. In order to simulate gastric media, we used 0.01 M hydrochloric acid, while a solution of Na_3PO_4 was used to raise the pH, simulating transit to duodenum. Intestinal media were simulated using citrate-phosphate buffers, which were used to prepare buffers with pH between 6 and 8. Stock solutions of Na_2HPO_4 and citric acid were diluted to achieve the desired buffer capacity. To mimic a sharp drop in pH, simulating the transit from terminal part of the small intestine to the caecum, a solution of H_3PO_4 was used. For simulated colonic media diluted citrate-phosphate buffers were also used. Since it is an accepted practice to use USP phosphate buffer with a pH of 6.8 (simulated small intestinal fluid), we performed the experiment, in which after the sharp increase in the pH values USP phosphate buffer (pH 6.8) was used until the end of the experiment.

All four of the above-mentioned pH profiles were carried out using the flow-through system, followed by the investigation of the release of the diclofenac sodium from the HPMC matrix tablets. The solubility of diclofenac sodium is pH-dependent, and even minor changes in pH of a simulated environment of small intestine were reflected in the percentage of the released substance. Thus, when comparing the average release profiles

using all four pH profiles, we noticed that with increasing pH, the amount of the API released from the tablet at given time also increased. Additionally, maintaining a higher pH plateau reflected in the higher percentage of API being released.
Key words: gastrointestinal tract, simulation of pH profiles, flow through system, citrate-phosphate buffers, dissolution tests, diclofenac sodium.

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS- biofarmacevtska klasifikacija (angl. biopharmaceutics clasification scheme)

FO- farmacevtska oblika

GIT- gastrointestinalni trakt

HPMC- hidroksipropilmetil celuloza

MMC- motorični migracijski kompleks

NSAID- nesteroidne protivnetne učinkovine (angl. nonsteroidal anti-inflammatory drugs)

PAS- površinsko aktivne snovi

rpm- število obratov na minuto (angl. revolutions per minute)

RSD- relativna standardna deviacija

RTC- radiotelemetrična kapsula (angl. radiotelemetry capsule)

SD- standardna deviacija

USP- Ameriška farmakopeja (angl. United States Pharmacopoeia)

1 UVOD

1.1 PREBAVNI TRAKT

Prebavna cev in prebavne žleze tvorijo prebavni trakt. Glavni deli prebavne cevi so ustna votlina, žrelo, požiralnik, želodec ter tanko in debelo črevo, ki se zaključi z danko in zadnjikom. Namen prebave je zaužite snovi razgraditi na enostavnejše molekule, ki se lahko absorbirajo v krvni in mezgovni obtok. Ustne slinavke, jetra in trebušna slinavka so prebavne žleze, ki sodelujejo pri prebavi s svojimi izločki (1, 2).

1.1.1 ANATOMIJA PREBAVNEGA TRAKTA

Prebavni trakt se začne z ustno votlino. Nadaljuje se v žrelo, ki v dolžino meri 12-15 cm. Požiralnik povezuje žrelo z želodcem. Dolžina požiralnika je 25 cm in je mišičasta cev, po kateri preidejo zaužite snovi v želodec. Želodec je najširši del prebavnega trakta, kjer se zbere zaužita hrana. Začne se s sfinktrom, razširi v fundus (zgornji del želodca), korpus (telo), antrum in konča s pilorusom (vratarjem). Prostornina medija v praznem želodcu je okoli 50 mL (20-30 mL (3)), polnega pa do 1,5 L. Pilorus je mišica na koncu želodca, ki odpira piloríčno odprtino, ter tako spusti vsebino želodca naprej v duodenum. Duodenum oziroma dvanajstnik je začetni del tankega črevesa in meri v dolžino 20-30 cm. V zgornjo tretjino dvanajstnika se izliva skupno izvodilo iz trebušne slinavke in žolčnika. Sok trebušne slinavke je alkalna tekočina, v kateri so različni encimi, kot so amilaza, lipaza, tripsin, kimotripsin in karboksipeptidaza, žolč pa sestavljajo žolčne soli, bilirubin in elektroliti. Duodenumu sledi jejunum, oziroma tešče črevo. Sluznica tankega črevesa ima veliko površino, saj je nagubana in ima številne resice, ter limfne folikle. Jejunumu sledi ileum oziroma vito črevo, ki je zadnji del tankega črevesa. Sluznica jejunuma je bolj nagubana in ima več resic, kot sluznica ileuma. Jejunum in ileum skupaj zajemata najdaljši odsek prebavnega trakta, približno 6 metrov. Tanko črevo se zaključi z ileocekalno zaklopko (sfinktrom), skozi katero vsebina črevesa prehaja v debelo črevo. Debelo črevo meri v dolžino 1,5-1,8 m. Razdelimo ga na slepo črevo, kolon ter danko. Kolon lahko podrobneje razdelimo na ascendentni (navzgornji) kolon, transverzalni (prečni) kolon, descendentni (navzdolnji) ter sigmoidni (esasti) kolon. Prebavni trakt se zaključi z danko (rektum), oziroma zadnjikom (anus) (1, 2, 3).

1.1.2 FIZIOLOŠKE VREDNOSTI V PREBAVNEM TRAKTU NA TEŠČE

1.1.2.1 Želodec in tanko črevo

V želodcu je pH na tešče običajno med 1 in 3, volumen tekočine pa med 10 in 50 mL, z nizko pufrsko kapaciteto (4, 5). V članku Dressmanove in sodelavcev navajajo vrednosti

pH za želodec na tešče med 1,5 in 2, za volumen medija v praznem želodcu pa 20 do 30 mL (3). V želodčnem soku najdemo pepsin, encim, ki spada med eksopeptidaze (3).

Ob prehodu v duodenum pH ostro naraste zaradi izločanja alkalnega bikarbonata iz trebušne slinavke, ter žolča. Iz literature je razvidno, da pH vrednost iz 6 v proksimalnem delu tankega črevesa naraste do 7-8 v terminalnem delu ileuma (4, 6). V študiji Evansa in sodelavcev poročajo o povprečni vrednosti pH 6,6 za proksimalni del tankega črevesa (prva ura oddajanja signalov po prehodu radiotelemetrične kapsule v duodenum) in 7,5 za terminalni del ileuma (5). Tudi v preglednem članku Dressmanove in sodelavcev (3) navajajo pH gradient v tankem črevesu, in sicer pH od 4,9 do 6,4 za duodenum, 4,4 do 6,6 za jejunum in 6,5 do 8,0 za ileum (3). Čas prehoda za tanko črevo je povprečno med 3 in 6 urami, čeprav poročajo tudi o večjih nihanjih (3). Začetni del duodenuma sprejema endogene sekrete iz para-gastrointestinalnih organov: žlez slinavk (iz ustne votline), jeter in trebušne slinavke, pa tudi izločke iz želodca. Ti sekreti skupno merijo približno 6 L tekočine na dan. Od tega je približno 1-2 L soka trebušne slinavke na dan. Vsebuje encime lipaze, amilaze in proteaze (3). Glede na podatke iz preglednega članka Dressmanove in sodelavcev (3), je volumen tekočine v jejunumu in ileumu v povprečju med 120 in 350 mL.

V študiji Ibekwe in sodelavcev (6) so preverili intraindividualno variabilnost pH profila v prebavnem traktu. Enemu prostovoljcu so v razmaku enega tedna dvakrat na tešče merili pH ter čas prehoda kapsule vzdolž prebavnega trakta (z Bravo® kapsulo). Ob prvem merjenju je prišlo do praznjenja želodca že po pol ure, čas prehoda tankega črevesa je bil 6 ur, ob drugem merjenju pa se je želodec izpraznil po 3 urah in čas prehoda tankega črevesa je bil 10 ur (6). Vse to kaže na veliko heterogenost *»in vivo«* okolja znotraj posameznika.

V distalnem ileumu in kolonu so prisotne tudi bakterije, ki izločajo veliko različnih encimov (različne reduktaze in hidrogenaze) (3).

Zanimale pa so nas tudi vrednosti pufrskih kapacitet vzdolž tankega črevesa. V predhodni magistrski nalogi (7) je bil narejen pregled literaturnih podatkov o pufrskih kapacitetah *»in vivo«*, ki kaže, da v duodenumu vrednosti na tešče nihajo, so pa večinoma okrog 4 mmol/L/ΔpH. Nato vzdolž tankega črevesa naraščajo do 6 mmol/L/ΔpH v ileumu (7).

1.1.2.2 Kolon

Ob prihodu v kolonski del črevesa v literaturi poročajo o padcu pH za 1,35-1,7, oziroma povprečno za 1,45±0,2 pH enote (aritmetična sredina±SD), kar pripisujejo fermentacijskim procesom mikroorganizmov v tem predelu (8), pregled vrednosti v (9). V študiji Evansa in

sodelavcev poročajo o povprečnem padcu pH za 1,1 enote; iz pH 7,5 v terminalnem ileumu na pH 6,4 v začetnem delu kolona (5). Vendar pa v študiji Ibekwe in sodelavcev (6) pri meritvah niso opazili ostrega padca ob prehodu v cekum, temveč včasih opaznega padca pH sploh ni bilo, ali pa je bil bolj postopen (6).

Pufrske kapacitete v kolonu so višje kot v tankem črevesu, vse do 30-40 mmol/L/ΔpH, pregled v (7).

1.1.2.3 Hidrodinamika in pretoki tekočin v prebavnem traktu

Hidrodinamika v prebavnem traktu omogoča mešanje snovi, prisotnih v lumnu. V zgornjem delu prebavnega trakta lahko vzorce gibanja razdelimo na 4 različne; to so: obdobja brez aktivnosti, segmentalni gibi, propagativno gibanje (kratkega in dolgega razpona) in tonični krči (3). V želodcu na tešče se na vsaki 2 uri pojavijo krči, ki postopoma postajajo močnejši in pogostejši, dokler ne postanejo tako aktivni, da sčistijo vsebino želodca v tanko črevo (tako imenovana faza III). To je del MMC (motorični migracijski kompleks) gibanja (3). MMC cikel se začne v proksimalnem želodcu in se pomika proti ileumu, vsakih 60-120 minut se začne nov, sestavljajo pa ga 4 faze (3, 4).

Veliki, ne-raztapljajoči objekti (večji od 1 mm), kot so radiotelemetrične kapsule, se ponavadi izpraznijo iz želodca z močno peristaltiko, ki je prisotna v pozni fazi II ali fazi III MMC (3, 4).

Pretoki v različnih predelih tankega črevesa, opisani v preglednem članku Dressmanove in sodelavcev v stanju na tešče, so večinoma med 0 in 2 mL/min, s povprečjem 0,73 mL/min za jejunum in 0,43 mL/min za ileum (3).

1.1.2.4 Absorpcija snovi vzdolž prebavnega trakta

Absorpcija snovi (tudi učinkovin) je nizka v želodcu, saj ta služi kot zbirni prostor za zaužite snovi, kjer se prične razgradnja s pomočjo encimov in kisline (3). Absorpcija snovi poteka predvsem v tankem črevesu (4). To omogočajo črevesne gube, resice in ščetkasti obrobek. Vendar pa absorpcija posamezne snovi ni enako dobra vzdolž tankega črevesa, ampak se razlikuje, glede na prisotnost specifičnih transporterjev v steni, ter glede na površino določenega predela črevesa (3). V proksimalnem delu debelega črevesa je absorpcija še možna, vendar so mehanizmi aktivnega transporta tu omejeni predvsem na transport elektrolitov preko membrane. Tudi tesni stiki med celicami so tu tesnejši in omejujejo prehod mnogim molekulam preko para-celične poti. V distalnem predelu kolona pa absorpcije praktično več ni, saj ta del služi predvsem za oblikovanje in shranjevanje iztrebka in absorpcijo vode iz lumna (3).

Po peroralni aplikaciji trdne farmacevtske oblike so štirje možni vzroki za nepopolno absorpcijo iz prebavnega trakta:

- učinkovina se ni sprostila iz FO v primernem času, ko se je nahajala na predelih GIT, kjer se dobro absorbira;
- učinkovina je razpadla ali se je tvoril kompleks, ki se ni mogel absorbirati;
- učinkovina ni prešla učinkovito poti čez steno prebavnega trakta;
- učinkovina je zapadla metabolizmu *»en route«* (na poti) v sistemsko cirkulacijo (3).

1.1.3 PRIDOBIVANJE PODATKOV O POGOJIH V PREBAVNEM TRAKTU *»IN VIVO«*: PREGLED LITERATURE

Karakterizacija pogojev v prebavnem traktu je pomembna za razumevanje procesov sproščanja in absorpcije iz farmacevtskih oblik, apliciranih *»per os«*. Predvsem so vrednosti pH pomembne za učinkovine, katerih topnost je odvisna od pH. Takih učinkovin pa je kar veliko (3). Na sproščanje in absorpcijo učinkovine iz *»per os«* aplicirane FO vplivajo fizikalno-kemijski faktorji prebavnega trakta: pH vrednost, kapaciteta pufrov, osmolalnost; encimski faktorji ter mehanični faktorji, kot sta tlak in gibanje mišic v prebavnem traktu (4).

Skozi ustno votlino in požiralnik gre farmacevtska oblika, ki jo apliciramo *»per os«*, tako hitro, da običajno štejemo želodec za prvi del prebavnega trakta, kjer pride do zadrževanja, začetka razpada FO in raztapljanja snovi (4). Zato nas pri peroralni aplikaciji FO zanimajo podatki za prebavni trakt od vključno želodca naprej.

Za spremljanje nekaterih parametrov, kot je pH vrednost v prebavnem traktu, obstaja več tehnik. Uporablja se aspiracija iz želodca. Težava te tehnike je predvsem relativna nedostopnost drugih predelov prebavnega trakta (5). Poleg tega poznamo endoskopske metode (kot so nazogastrične cevke) in telemetrične kapsule (4).

Med telemetrične kapsule spada IntelliCap® sistem, ki je telemetrična naprava za dostavo učinkovin, ki hkrati omogoča tudi določanje časa praznjenja želodca in čas prehoda kapsule čez prebavni trakt (od želodca do debelega črevesa, oziroma izločitve iz telesa). Kapsula meri 27 x 11 mm in jo sestavlja predelek, kjer je zbrana učinkovina, ter elektronsko telo iz biokompatibilnih polimerov. V elektronskem telesu so senzor za pH in temperaturo, brezžični oddajnik, baterija in črpalka, ki izloča učinkovino iz kapsule pod nadzorom mikroprocesorja. Kapsula je za enkratno uporabo. Poleg dostavljanja učinkovin lahko služi tudi kot uporabno diagnostično sredstvo za določanje prehodov FO, saj lahko v realnem času prikazuje vrednosti pH in spremlja temperaturo vzdolž prebavnega trakta (4).

Brezžični oddajnik vsakih 10 sekund sporoči podatek o izmerjeni temperaturi in pH vrednosti. V študiji Kozioleka in sodelavcev (4) sta bili opazovani dve skupini po 10 preiskovancev prvih 10 ur po zaužitju IntelliCap® kapsule in podatki so se v realnem času (»real-time data«) prenašali neposredno na računalnik. Po desetih urah pa so preiskovanci nosili prenosni sprejemnik podatkov blizu telesa in so lahko zapustili stavbo. Po izločitvi kapsule z blatom, so preiskovanci vrnili sprejemnik in takrat so tudi preostale podatke prenesli na računalnik (4).

Posameznemu preiskovancu so določili gastrointestinalni pH profil in temperaturni profil. Po celonočnem postu so preiskovanci pogoltnili IntelliCap® kapsulo z 200 mL vode sobne temperature. V naslednjih 4 urah niso smeli zaužiti nobenih dodatnih tekočin ali hrane. V drugi skupini so izjemoma popili 20 mL ledeno hladne vode, kar je služilo za preverjanje praznjenja želodca (če so zaznali padec temperature, so sklepali, da je bila kapsula še v želodcu) (4).

Povprečna izmerjena pH vrednost v želodcu je bila 2,7±0,8 (aritmetična sredina±SD). Začetne izmerjene vrednosti v želodcu so nihale med pH 1 in 8; visoke vrednosti bi lahko pojasnili z vodo, zaužito z IntelliCap® kapsulo, ter s sekreti iz ust (slino). Kasnejša nihanja izmerjenega pH v želodcu pa so verjetno posledica refluksa manjših količin vsebine iz duodenuma, ki vsebujejo alkalen bikarbonat. Ker ima želodčna vsebina na tešče majhen volumen in nizko pufrsko kapaciteto, pride hitro do omenjenih nihanj. Mediana časa praznjenja želodca (to je čas od aplikacije pa do nenadnega porasta pH ob prihodu v duodenum) je bila 30 minut, minimalen čas 7 in maksimalen čas 202 minuti (4).

V proksimalnih delih tankega črevesa je pH vrednost narastla na 5,9-6,3 (aritmetična sredina±SD: 6,0±0,2), nakar je tekom prehoda proti terminalnemu delu naraščala, tako da so bile na koncu ileuma vrednosti med 7,4 in 7,8 (aritmetična sredina±SD: 7,7±0,15). Tukaj so nihanja izmerjenih vrednosti manjša kot v želodcu. Razpon časov, ki jih je kapsula potrebovala za prehod tankega črevesa (od prihoda v duodenum do padca pH ob prehodu v cekum) je bil od 67 do 532 minut, z mediano 247 minut. V kolonu so zaznali zelo raznolike pH vrednosti med 5 in 8, s povprečjem 6,5±0,3 (aritmetična sredina±SD). Padec vrednosti pH v cekumu je posledica tvorbe kratkoverižnih maščobnih kislin, ki nastajajo z bakterijsko fermentacijo. Zaradi različne regionalne razporeditve mikrobiote v kolonu in kompleksnih vzorcev gibanja mišic, ter mešanja vsebine, pride do večjih razlik v izmerjenem pH. Čas prihoda kapsule v cekum (čas od aplikacije kapsule pa do prihoda v

cekum) je bil od 74 do 578 minut, z mediano 272 minut. Poročajo torej o precejšnjih interindividualnih nihanjih (4).

V študiji Ibekwe in sodelavcev (6) pa so uporabili Bravo® kapsulo, radiooznačeno z indijem 111, ki je merila pH vrednosti med želodcem in ascendentnim kolonom. Merili so tudi čas prehoda FO. Bravo® kapsula je radiotelemetričen sistem za spremljanje pH, velika je 5 x 6 x 25 mm, tehta 1,50 g, je neprebavljiva in za enkratno uporabo. Spremlja lahko pH v intervalu od 0,5 do 9,0. Raziskava je potekala na osmih zdravih preiskovancih. Le-ti so kapsulo pogoltnili in signale je oddajala vsakih 6 sekund. Signale je beležil sprejemnik, ki so ga preiskovanci nosili pripetega okrog pasu. Bravo® kapsule so aplicirali skupaj z radiooznačenimi (Tc 99m) tabletami, prekritimi s polimerom Eudragit S. Glavni cilj študije je bil namreč preučiti razmerje med gastrointestinalnim pH, časom prehoda GIT, ter časi zadrževanja na določenem mestu, za FO, prekrite z Eudragitom S. Poudarek je bil na času zadrževanju pred ileocekalno zaklopko, saj ima ta predel najvišji pH vzdolž prebavnega trakta. Tu bi naj prišlo do raztapljanja Eudragita S, ki se prične raztapljati pri pH 7. Prehod tablet Bravo® kapsul skozi prebavni trakt so spremljali z gama scintigrafijo (6).

V skupini osmih preiskovancev (6) je bilo povprečje izmerjenih pH vrednosti v želodcu na tešče 1,4±0,4 (aritmetična sredina±SD). Bravo® kapsula je v povprečju prešla iz želodca v duodenum po 62±21 minutah. V začetnem delu tankega črevesa (brez zadrževanja pred ileocekalnim sfinktrom) je bila tableta 225±100 minut, pH pa je bil v proksimalnem delu tankega črevesa 6,8±0,3, nato se je v srednjem delu povzpel na 6,8±0,3. V distalnem tankem črevesu, vključno z ileocekalnim sfinktrom, se je pH nato zvišal na 7,2±0,4, kapsula pa se je tam zadrževala v povprečju 122±107 minut. Kapsula je prispela v cekum po povprečno 381±154 minutah, izmerjeni pH v ascendentnem cekumu pa je bil v povprečju 6,5±0,8. Zaključili so, da je čas prehoda kapsule od zaužitja pa do prihoda v cekum znatno variabilen, prav tako tudi pH (6).

V študiji Evansa in sodelavcev (5) so 72 prostovoljcem, starim povprečno 26 let, aplicirali na pH občutljivo radiotelemetrično kapsulo RTC (Radiotelemetry Capsule). Kapsulo sestavljata steklena elektroda, z vgrajeno referenčno kapico, in baterija. Preiskovanci so jo pogoltnili z malo vode. Je nerazgradljiva, neinvazivna in signale oddaja vsakih 12 sekund. Meritve je lahko izvajala do 48 ur, kar je ponavadi zadostovalo za meritve od želodca pa do rektuma. Signale so shranjevali na prenosnem detektorju, ki so ga preiskovanci nosili privezanega okrog pasu. Lokacijo kapsule v prebavnem traktu so določali preko zaznavanja radiotelemetričnega signala, ki ga je oddajala kapsula, s prenosnim

detektorjem, prehod v duodenum pa so potrdili tudi s hitrim dvigom pH iz kislega na vrednosti pH nad 5. Položaj kapsule je bil določen glede na mesto na površini trebuha, kjer je bila moč signala največja. Trebušni predel so razdelili na 9 predelkov. Položaj kapsule do določali na 2-4 ure in ga primerjali z izmerjenim pH ob istem času. Ko so zaznali prehod kapsule v duodenum, je bilo preiskovancem dovoljeno piti in jesti, prej so bili tešči (5).

V tej študiji so spremljali predvsem čase prehoda in pH v tankem in debelem črevesu. Za želodčni pH navajajo vrednosti med 1,0 in 2,5. Tanko črevo so razdelili na proksimalno (prva ura meritev po dvigu pH ob prehodu v duodenum) in distalno (zadnja ura meritev pred padcem pH ob prehodu v cekum). Vmesni del zajema srednje tanko črevo. V proksimalnem delu tankega črevesa je bil povprečni izmerjen pH 6,6±0,5 (aritmetična sredina±SD), v srednjem 7,4±0,5 in v distalnem 7,5±0,5. Najmanjša nihanja v izmerjenih vrednostih so bila v distalnem delu, kjer se je kapsula zadrževala pred ileocekalnim sfinktrom (5).

Debelo črevo so razdelili na desni kolon (4 ure po prihodu v cekum), levi kolon (4 ure pred prihodom kapsule v rektum) in srednji kolon (vmesno obdobje). V desnem kolonu so izmerili povprečni pH 6,4±0,6 (aritmetična sredina±SD), in poročali o več nihanjih. Srednji kolon je imel v povprečju pH 6,6±0,8 in levi 7,0±0,7 (5).

1.2 TESTI SPROŠČANJA

Pomembna in aktualna je napoved *»in vivo«* dogajanja s testi sproščanja, ki je tem boljša, čim bolje uspemo čim več parametrov iz prebavnega trakta dovolj dobro simulirati v *»in vitro«* sistemu sproščanja. Boljšo simulacijo pa dosežemo s premišljeno sestavo uporabljenih medijev, z ustreznim volumnom medijev, pretoki, vzorci mešanja medijev ter časom trajanja poskusov (3).

1.2.1 BCS KLASIFIKACIJA

Za odločitev, kdaj lahko testi sproščanja pomenijo dobro napoved *»in vivo«* obnašanja učinkovine, moramo dobro poznati fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin. Pri odločanju, kdaj nam bodo testi sproščanja v pomoč pri načrtovanju in ocenjevanju *»per os«* apliciranih FO nam lahko pomaga BCS klasifikacija (»Biopharmaceutics Clasification Scheme«). BCS klasifikacija nudi kategorizacijo zdravilnih učinkovin v štiri razrede, z ozirom na njihove topnostne lastnosti ter zmožnosti prehajanja mukoze v prebavnem traktu

(3). BCS klasifikacija torej obravnava dva možna vidika omejitve biološke uporabnosti po *»per os«* aplikaciji zdravila.

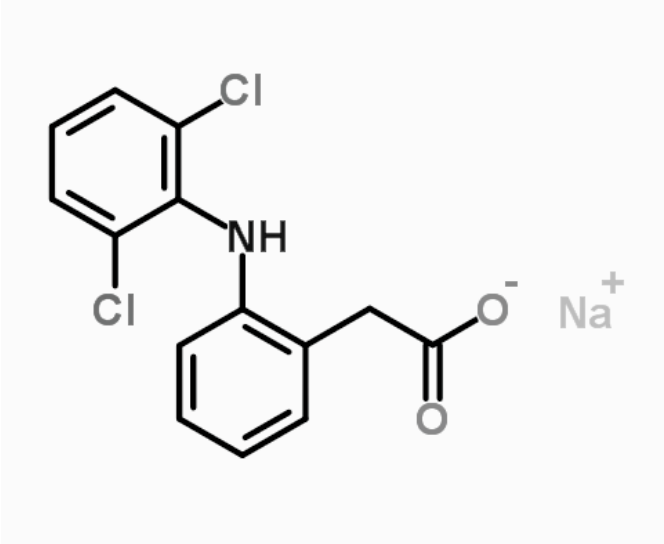
V razred I spadajo ZU z dobro topnostjo in dobro permeabilnostjo. V razredu II najdemo učinkovine z nizko topnostjo in dobro permeabilnostjo. Za razred II je tako hitrost raztapljanja oziroma sproščanja učinkovine iz FO glavna omejitev za absorpcijo, in možno je določiti močno povezavo med rezultati testov sproščanja, ter hitrostjo absorpcije *»in vivo«*. V razredu III najdemo ZU, ki so dobro topne in slabo permeabilne, v razredu IV pa sta tako topnost kot permeabilnost slabi. (3). Zaradi njihovega vpliva na topnost in na sproščanje morajo biti parametri, kot so pH, ionska moč, prisotne površinsko aktivne snovi (PAS), pufrska kapaciteta in volumen medija pri poskusih sproščanja čim bolj podobni fiziološkim pogojem. Vse omenjeno je smiselno vzeti v obzir pri načrtovanju medijev za teste.

1.3 NESTEROIDNE PROTIVNETNE UČINKOVINE

Nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID) so zdravilne učinkovine, ki po kemijski strukturi niso steroidi, ter imajo izraženo protibolečinsko, protivnetno in antipiretično delovanje (10). So ena od bolj uporabljanih skupin zdravilnih učinkovin, uporabljajo se predvsem za zdravljenje revmatoidnih bolezni. Mednje spadajo ibuprofen, ketoprofen, naproksen, indometacin, diklofenak in drugi. Nesteroidne protivnetne učinkovine delujejo tako, da inhibirajo COX izoencime (ciklooksigenaze) (10, 11).

1.3.1 DIKLOFENAK

Diklofenak je pogosto uporabljana učinkovina, ki spada v razred nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID). Je derivat aminofenilocetne kisline (10).



Slika 1: Strukturna formula natrijevega diklofenakata (12).

Diklofenak se uporablja predvsem za zdravljenje osteoartritisa, revmatoidnega artritisa in ankilozirajočega spondilitisa (10). Uporaba diklofenaka poveča tveganje za krvavitve v GIT in kardiovaskularne stranske učinke. (10, 11).

Zaradi boljše topnosti se diklofenak uporablja v obliki soli, predvsem natrijeve in kalijeve (10). Strukturna formula natrijevega diklofenakata je prikazana na Sliki 1. Natrijev diklofenakat je bledorumene do svetlo bež barve, rahlo higroskopen prašek brez vonja (11).

Na poskusih na miših so dokazali, da ima diklofenak 6-krat močnejše analgetično delovanje kot indometacin in 40-krat močnejše kot acetilsalicilna kislina (11). Kot antipiretik je dvakrat močnejši od indometacina in več kot 350-krat močnejši od acetilsalicilne kisline, kot so pokazali s poskusi na podganah (11). Ima tri potencialne mehanizme delovanja: inhibicija ciklooksigenaze, kar se kaže kot zmanjšano nastanjanje prostaglandinov in tromboksanov; inhibicija lipooksigenazne poti, kar se kaže kot zmanjšano nastajanje predvsem provnetnega levkotriena B4; inhibicija sproščanja arahidonske kisline in zmanjšanje njene uporabnosti (11).

Absorpcija po *»per os«* aplikaciji je hitra in popolna, največja plazemska koncentracija je dosežena po 1,5 do 2,5 urah. V veliki meri se veže na serumske proteine, predvsem na albumin. Zaradi metabolizma prvega prehoda v jetrih je biološka uporabnost samo 50-60% zaužite doze (10).

Po BCS klasifikaciji se diklofenak uvršča v razred II učinkovin, z dobro permeabilnostjo in slabo topnostjo (10). Topnost diklofenaka pa je močno odvisna od medija za raztapljanje. V kislih medijih je zelo slabo topen, z višanjem pH medijev pa se topnost izboljšuje (13). V literaturi najdemo podatke za topnost natrijevega diklofenakata: 0,0017 mg/mL v 0,01 N HCl in 1,36 mg/mL v fosfatnem pufru s pH 7 (pri 23±2ºC) (10).

pH medija na topnost vplivata tudi ionska moč in sestava medija, vendar je njun vpliv na topnost manjši, kot vpliv pH. V medijih z višjo ionsko močjo je njegova topnost nižja kot v medijih z nižjo ionsko močjo pri enakem pH (14). Opazili so tudi, da je topnost v medijih, ki vsebujejo NaCl, nekoliko nižja v primerjavi z mediji, ki vsebujejo KCl. Razlog za to je verjetno vpliv skupnih natrijevih ionov (14).

Ne najdemo ga v obliki polimorfizmov, obstaja pa v obliki hidratov, predvsem tri- in tetrahidrata, vendar se v farmakopejskih farmacevtskih izdelkih kot učinkovina uporablja

le brezvodna oblika (anhidrat). Njegov porazdelitveni koeficient logP za sistem n-oktanol/vodni pufer je 1,4 pri pH 6,8. pKa vrednost je 3,80, pri temperaturi 25ºC (10).

Na trgu so registrirane trdne peroralne FO s 12,5 mg, 25 mg ali 50 mg natrijeve soli diklofenaka s takojšnjim sproščanjem. Obstajajo tudi FO z večjo vsebnostjo učinkovine, vendar s podaljšanim sproščanjem (10).

2 NAMEN

Rezultati sodobnih študij kažejo na to, da sedanja praksa simulacij stanja na tešče v prebavnem traktu ne ponazarja dejanskega stanja v fizioloških pogojih pri odraslem človeku. Konstantna sestava uporabljenih medijev, konstanten pH in prevelik volumen medijev so glavni razlogi za to. S to nalogo bomo določili odstotek sproščene učinkovine iz ogrodne tablete v odvisnosti od časa, v modelnem sistemu, ki ponazarja fiziološke pH profile vzdolž prebavnega trakta od želodca do kolona.

Za eksperimentalni del naloge bomo uporabili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko razvit pretočni sistem s kroglicami. Po podrobni študiji literaturnih virov bomo izvedli postopek zaporedne menjave medijev, s katerim bomo ponazorili povprečni pH profil, ki bo podrobneje sledil spremembam pH tekom prebavnega trakta, od želodca pa do prehoda v debelo črevo. Poleg povprečnega profila bomo z zaporedno menjavo medijev izvedli še višji in nižji pH profil, oba v okviru fizioloških vrednosti, opisanih v literaturnih virih.

Zvezno spreminjanje pH po pH profilih bomo izvedli z uporabo citratno-fosfatnih pufrov, ki omogočajo izdelavo pufrov s pH v širšem območju med 3 in 8. Za simulacijo začetnega kislega želodčnega okolja bomo uporabili vodno raztopino klorovodikove kisline. Za skoke in padce pH bomo uporabili močno bazično raztopino Na_3PO_4 in kislo raztopino ortofosforne kisline, različnih koncentracij. Za primerjavo bomo simulirali tudi pH profil, kjer je prvi del profila (simulacija kislega želodčnega okolja) enak ostalim, nadaljevali pa bomo s pogosto uporabljanim fosfatnim pufrom s pH 6,8 po ameriški farmakopeji.

Zanimali nas bodo še profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet v zaporedno uporabljenih medijih v skladu s štirimi omenjenimi pH profili, ter morebitne razlike v hitrosti in celokupni količini sproščene učinkovine. Za primerjavo bomo v medijih, s katerimi bomo simulirali pH profil s fosfatnim pufrom (simuliran črevesni medij po USP, pH 6,8), sproščali tudi ogrodne tablete z ibuprofenom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OBDELAVA LITERATURNIH PODATKOV

3.1.1 METODE

3.1.1.1 Program Engauge

Engauge je računalniški program, v katerem lahko sliki določimo tri začetne točke- izhodišče (0,0) ter najvišji vrednosti na obeh oseh: (0, y) ter (x, 0). Tako dobimo koordinatni sistem. Nato lahko krivuljam odčitamo vrednosti v vseh točkah.

S pomočjo tega programa smo odčitali vrednosti neposredno iz grafov, ki so prikazovali individualne pH profile preiskovancev v odvisnosti od časa iz literature (4, 5, 6).

3.1.1.2 Program Excel

Ko smo s programom Engauge pridobili točke v koordinatnem sistemu, smo znova narisali graf individualnih pH profilov v programu Excel. Iz teh grafov smo lahko odčitali vrednosti, ki so nas zanimale, in oblikovali tabelo (Rezultati, Preglednica XIII). To nam je služilo kot osnova za načrtovanje eksperimentalnega dela; za načrtovanje pH profilov, ki smo jih v nadaljevanju želeli simulirati.

3.2 LABORATORIJSKI DEL

3.2.1 APARATURE

Pretočni sistem s kroglicami sestavljajo:

- peristaltični črpalki IKA® -WERKE ISM817, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija (interni oznaki B1 in B2);
- silikonske pretočne cevke (debelina silikona 1,6 mm, notranji premer 3,2 mm, zunanji premer 6,4 mm, dolžina 62 cm), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemčija;
- kovinska mrežica (premer odprtin 500 µm);
- stojali za peristaltični črpalki;
- magnetni mešali z električnima grelcema IKA®-RET CV, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- dve vodni kopeli;
- delovni čaši 150 mL (notranji premer 55 mm), Schott Duran, Nemčija;
- magneta dolžine 50 mm;
- polipropilenski pokrovi za čaše z več odprtinami;

- digitalni štoparici Hanhart 06A03, Hanhart 1882 GmbH, Gütenbach, Nemčija;
- pH meter Mettler Toledo MP220, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- elektroda Mettler Toledo InLab®Expert Pro, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- Steklene kroglice (premer 1 mm).

Druge aparature:

- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA;
- digitalna tehtnica Exacta 300 EB, Exacta, Železniki, Slovenija;
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- avtomatske pipete 100-1000 µL, 500-5000 µL in 1-10 mL, Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- ultrazvočna kopel Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- ultrazvočna kopel Bandelin Sonorex RK514BH, Bandelin electronic, Berlin, Nemčija;
- tabletirka na udarec, Killian SP 300, Killian and Co GmbH, Nemčija.

Laboratorijska steklovina in pribor:

- čaše 25 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL;
- polnilne bučke 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL;
- merilni valji 50 mL, 100 mL, 250mL, 1000 mL;
- polnilne pipete 1mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, Blaubrand, Nemčija;
- centrifugirke 10 mL;
- spatule, žličke;
- plastične brizge 5 mL;
- membranski filtri za brizge Sartorius RC 0,45 µm
- čolnički, tehtiči;
- steklene in plastične kapalke.

3.2.2 MATERIALI

- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo 1 L 1 M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo 1 L 1 M HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- ortofosforna kislina 85%, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- dinatrijev hidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- trinatrijev fosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- citronska kislina brezvodna, p.a., Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Nemčija;
- natrijev diklofenakat, p.a., Sigma-Aldrich CO, St. Louis, ZDA;
- ibuprofen, p.a., Sigma-Aldrich CO, St. Louis, ZDA;
- Metolose 90SH 4000SR, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- pufrska raztopina s pH = 7,00 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;

3.2.3 METODE

3.2.3.1 Kisline, baze in raztopine soli

- **10 mM HCl;** v 1000 mL bučko, v katero smo prej nalili nekaj prečiščene vode, smo z avtomatsko pipeto prenesli 10 mL 1 M HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake,
- **100 mM NaOH;** v 2000 mL bučko, v katero smo prej nalili nekaj prečiščene vode, smo z merilnim valjem dolili 200 mL 1 M NaOH in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake,
- **55 mM Na_3PO_4;** v 50 mL bučko smo kvantitativno prenesli 1,0455 g $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **100 mM Na_3PO_4;** v 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 3,8018 g $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **0,425 % H_3PO_4**; v 100 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo z avtomatsko pipeto odmerili 0,5 mL 85% H_3PO_4 in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **0,85 % H_3PO_4;** v 100 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo z avtomatsko pipeto odmerili 1,0 mL 85% H_3PO_4 in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- **0,200 M Na_2HPO_4;** 28,392 g Na_2HPO_4 smo kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko, približno do treh četrtin nalili prečiščeno vodo, dobro pretresli in s pomočjo ultrazvoka raztopili preostalo neraztopljeno substanco 10-20 minut. Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake,
- **0,109 M citronska kislina;** 4,203 g brezvodne citronske kisline smo kvantitativno prenesli v 200 mL bučko in raztopili v prečiščeni vodi ter dopolnili do oznake.

3.2.3.2 Fosfatni pufri

Fosfatni pufer smo pripravili z zatehto ustrezne količine KH_2PO_4, ki smo jo kvantitativno prenesli v bučko. Potem smo dolili prečiščeno vodo približno do polovice bučke, raztopili KH_2PO_4 na ultrazvočni kopeli, nato dolili še ustrezni volumen NaOH, ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

- **Fosfatni pufer 50 mM, pH = 6,8:** v 2000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 13,6 g KH_2PO_4, ga raztopili v prečiščeni vodi, dodali 44 mL 1 M NaOH, ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

3.2.3.3 Redčeni citratno-fosfatni pufri

Citratno-fosfatne pufre smo pripravljali iz osnovnih raztopin: 0,200 M Na_2HPO_4 (raztopina A) in 0,109 M citronske kisline (raztopina B) in jih nato dodatno redčili. Glede na želeni končni pH smo vzeli kot osnovo določeno razmerje volumnov obeh osnovnih raztopin, ki smo ga odčitali iz tabele za pripravo koncentriranih McIlvainovih pufrov (Preglednica I). Ker se naši pufri razlikujejo v koncentraciji osnovne raztopine citronske kisline, v nadaljevanju ne bomo uporabljali poimenovanja McIlvainovi pufri, temveč citratno-fosfatni pufri.

Preglednica I: Podatki za pripravo koncentriranih McIlvainovih pufrov s končnim volumnom 20 mL. Osnovni raztopini sta 0,2 M raztopina Na_2HPO_4 in 0,1 M raztopina citronske kisline, ki ju zmešamo v volumskem razmerju za določen pH, kot je navedeno v tabeli (15).

Končni pH pufra	V 0,2 M Na_2HPO_4 [mL]	V 0,1 M citronske kisline [mL]
2,2	0,40	19,60
2,4	1,24	18,76
2,6	2,18	17,82
2,8	3,17	16,83
3,0	4,11	15,89
3,2	4,94	15,06
3,4	5,70	14,30

3,6	6,44	13,56
3,8	7,10	12,90
4,0	7,71	12,29
4,2	8,28	11,72
4,4	8,82	11,18
4,6	9,35	10,65
4,8	9,86	10,14
5,0	10,30	9,70
5,2	10,72	9,28
5,4	11,15	8,85
5,6	11,60	8,40
5,8	12,09	7,91
6,0	12,63	7,37
6,2	13.22	6,78
6,4	13,85	6,15
6,6	14,55	5,45
6,8	15,45	4,55
7,0	16,47	3,53
7,2	17,39	2,61
7,4	18,17	1,83
7,6	18,73	1,27
7,8	19,15	0,85
8,0	19,45	0,55

Redčenje osnovnih raztopin

Glede na želeno končno redčitev smo osnovni raztopini v ustreznem razmerju odpipetirali v bučke različnih volumnov in nato dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Potem smo s pH metrom preverili pH, ki je lahko od ciljne vrednosti odstopal za največ 0,05 enote v obe smeri. Nato smo tako dobljenemu pufru določili še pufrsko kapaciteto, po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.6. Glede na izmerjeno pufrsko kapaciteto pripravljenega pufra smo nato povečali ali zmanjšali redčitve pufra (povečali ali zmanjšali smo količino vode, ki smo jo dodali osnovnima raztopinama). Ob določenem pH raztopine, smo želeli tudi, da je izmerjena pufrska kapaciteta v območju med 4 in 6 mmol/L/ΔpH za medije, ki so simulirali tanko črevo, za simuliran medij za kolon pa višje od tega, pregled podatkov v (7). Podatki o recepturah za vse uporabljene citratno-fosfatne pufre so zbrani v Preglednici II.

Preglednica II: Volumna obeh osnovnih raztopin: 0,200 M Na_2HPO_4 (raztopina A) in 0,109 M citronske kisline (raztopina B), za ustrezno redčen pufer želene pH vrednosti in pufrske kapacitete. Vsi pufri simulirajo medije za tanko črevo, razen zadnjega s pH 6,2, ki simulira kolonski medij.

pH pufra	V(raztopina A) [mL]	V(raztopina B) [mL]	V redčene raztopine [mL]	Pufrska kapacieta pufra [mmol /L/ΔpH]
5,8	19,10	14,24	500,0	3,19
6,4	21,625	11,715	500,0	4,00
6,6	22,80	10,50	500,0	5,1
7,3	28,20	5,10	500,0	6,17
7,7	30,75	2,63	500,0	4,77
8,0	32,10	1,20	500,0	3,4
6,2	78,75	46,27	500,0	13,9

3.2.3.4 Analiza vzorcev z učinkovino

Za določitev koncentracije diklofenakata v vzorcih smo uporabili spektrofotometrično metodo. Uporabili smo UV spektrofotometer in stekleno kiveto. Dolžina, ki jo prepotuje žarek čez kiveto je 1 cm.

Merili smo absorbanco učinkovine v vzorcu. Diklofenak ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 276 nm, ibuprofen pa pri 221 nm, zato smo snemali spektre med 200 in 400 nm. 400 nm je bila kontrolna valovna dolžina.

S pomočjo umeritvenih premic smo iz izmerjene absorbance nato določili koncentracijo učinkovine v raztopinah vzorcev.

Za slepo raztopino smo vedno uporabili enak pufer v razmerju z NaOH, kot v posameznem vzorcu.

3.2.3.5 Izdelava umeritvenih premic

Postopek izdelave umeritvene premice smo začeli s tehtanjem 10 mg učinkovine na čolniček na analitski tehtnici. Natančno zatehtano maso smo si zapisali in učinkovino nato kvantitativno prenesli v 100 mL bučko. Na podlagi dejansko zatehtane mase smo izračunali natančno koncentracijo osnovne raztopine.

Za poskuse, pri katerih smo vzorce zbirali v 0,1 M NaOH, smo osnovno raztopino za umeritvene premice pripravili v 0,1 M NaOH. Zatehtano učinkovino v bučki smo raztopili v 0,1 M NaOH in dopolnili do oznake.

Za poskuse, pri katerih pa vzorcev nismo zbirali v 0,1 M NaOH, smo osnovno raztopino z učinkovino pripravili v prečiščeni vodi, po enakem postopku (komentar v Razpravi 5.5.1).

Redčenje osnovne raztopine

Iz osnovne raztopine smo s polnilnimi oziroma avtomatskimi pipetami jemali različne volumne alikvotov, jih nato prenesli v čiste bučke, in jih do oznake dopolnili z ustrezno raztopino.

Pri poskusih, pri katerih smo vzorce zbirali v merilne valje z 0,1 M NaOH, smo v bučko, v katero smo prenesli alikvot osnovne raztopine, s pomočjo merilnega valja do polovice volumna dopolnili z 0,1 M NaOH, nato pa do oznake z ustreznim pufrom.

Za umeritvene premice za poskuse brez NaOH (take so bile štiri, za pufre s pH 6,2, 6,4, 7,7 ter fosfatni pufer s pH 6,8) smo v bučko prenesli alikvot osnovne raztopine in nato dopolnili z ustreznim pufrom do oznake.

Z umeritvenimi premicami smo želeli ustrezno pokriti pH območje, v katerih smo se gibali tekom izdelave naloge. Glede na manjšo topnost diklofenakata v kislem, smo si izbrali razpon koncentracij v 0,01 M HCl med 0,5 in 10 mg/L. Pri višjih pH fosfatnega in citratno-fosfatnih pufrov, pa smo zaobjeli območje vsaj med 1 in 40 mg/L.

Za izdelavo umeritvenih premic smo torej izmerili absorbance raztopinam z že znano koncentracijo natrijevega diklofenakata v pufrih različnih pH. Iz tega smo določili linearno zvezo med izmerjeno absorbanco in koncentracijo učinkovine v raztopinah vzorcev, drži Beer-Lambertova zveza:

$$\mathbf{A = \varepsilon \cdot c \cdot l}$$

A= absorbanca [nm]

l= dolžina, ki jo prepotuje žarek [cm]

c= koncentracija [mol/L]

ε= molarni absorpcijski koeficient [L/mol/cm].

S pomočjo linearne regresije smo določili tudi Pearsonov koeficient korelacije, r^2. Velja, da bližje kot je 1, bolj linearna je povezava. Podatki o postopku določitve umeritvenih premic so zbrani v Preglednicah III in IV.

Preglednica III: Tri osnovne raztopine Na-diklofenakata, zatehte učinkovine in njihove koncentracije za umeritvene premice.

Osnovna raztopina v 0,1 M NaOH	m (Na-diklofenakat) [mg]	V (osnovne razt.) [mL]	Konc. osnovne razt. [mg/mL]	Umeritvene premice, kjer smo uporabili osn. razt.
A	10,19	100	0,102	0,01 M HCl Fosfatni pufer 6,8 Citratno fosfatni pufer 6,4 Citratno fosfatni pufer 7,7

				Vsi z 0,1 M NaOH; 1:1
B	10,97	100	0,110	0,01 M HCl Fosfatni pufer 6,8 Citratno fosfatni pufer 6,4 Citratno fosfatni pufer 7,7 Vsi z 0,1 M NaOH; 1:1
C	10,44	100	0,104	0,01 M HCl Fosfatni pufer 6,8 Citratno fosfatni pufer 6,4 Citratno fosfatni pufer 7,7 Citratno fosfatni pufer 6,2 Vsi z 0,1 M NaOH; 1:1

Preglednica IV: Primer izdelave umeritvene premice za Na-diklofenakat v fosfatnem pufru s pH=6,8; v razmerju 1:1 z 0,1 M NaOH. Navedene so redčitve osnovnih raztopin (kolikokrat smo redčili osnovno raztopino), koncentracije in izmerjene absorbance.

Redčenje	Osn. razt.	Konc. ZU [mg/L]	A [/]
100	*A*	1,019	0,0403
20	*B*	5,485	0,1818
10	*C*	10,44	0,33215
6,66	*A*	15,285	0,5185
5	*B*	21,94	0,7041
4	*C*	26,1	0,8358
3,33	*A*	30,57	1,0179
2,5	*B*	43,88	1,393
2	*C*	52,2	1,6465

3.2.3.6 Postopek določanja pufrske kapacitete

Pufrsko kapaciteto smo sproti določali vsem pripravljenim pufrom. pH-meter smo uravnali (umerili) na 7,00. Nato smo 40 mL pufra, ki smo mu želeli določiti kapaciteto, odmerili v manjšo čašo in jo postavili v vodno kopel (37ºC) na magnetno mešalo. Nato smo počakali 2-3 minute, da se je pufer ogrel, ter pričeli z dodajanjem kisline. Z avtomatskimi pipetami smo postopoma dodajali 0,1 M HCl v čašo s pufrom, pri tem pa ves čas merili pH v čaši. Odčitali smo začetni pH in si ga zapisali. Najprej smo dodajali manjše količine HCl, po 50 µL, nato pa glede na spremembe pH tudi večje količine, vse do 200 µL naenkrat. Ko se je

pH pufra spremenil za 0,3 enote (natančno podano v Rezultatih v Preglednici XV), smo poskus zaključili. Na podlagi količine dodane kisline in natančne spremembe pH, smo izračunali kapaciteto. Formula:

β= c/ ΔpH

β= pufrska kapaciteta [mmol/L/ΔpH]

c= koncentracija kisline [mmol/L]

ΔpH= sprememba pH [/]

Koncentracijo kisline smo dobili tako, da smo množino dodane kisline delili s celokupnim volumnom medija.

Če smo želeli določiti kapaciteto v čaši pretočnega sistema tekom poskusa izdelave pH profila, smo poskus ob določenem času prekinili in nato 40 mL vzorca v čaši direktno dodajali 0,1 M HCl, ter ves čas merili pH in nato izračunali kapaciteto.

3.2.3.7 Simulacija pH profilov na pretočnem sistemu

Pretočni sistem smo sestavili iz delov, navedenih v poglavju 3.2.1. Najprej smo v stekleno čašo natehtali 25 g steklenih kroglic in dodali magnet. Čašo smo s pomočjo pokrova iz stiropora namestili v vodno kopel, ki je vzdrževala stalno temperaturo 37ºC, s pomočjo električnega grelca, na katerega smo jo postavili. V grelec je vgrajeno tudi magnetno mešalo, ki je zagotavljalo stalno mešanje vsebine čaše z izbranimi 50 rpm. Volumen medija v čaši je bil vedno 40 mL.

Stalen pretok skozi čašo je zagotavljala peristaltična črpalka s hkratnim pretokom skozi dve cevki, dovodno in odvodno. Pretok skozi obe je bil enak, zato se volumen raztopine v čaši tekom poskusa ni spreminjal. Dovodna cevka je v sistem dovajala svež pufer, odvodna cevka pa je odvajala vzorec iz čaše v merilni valj. Pretok smo želeli čim bolj približati 2 mL/min. To smo preverili s poskusnim črpanjem vode iz čaše v dva stehtana merilna valja, v enega smo črpali vodo z dovodno cevko in v drugega z odvodno. Po točno 20 minutnem črpanju smo črpalko ustavili in primerjali maso prečrpane vode v valjih. Po potrebi smo privili ali odvili zunanji vijak vpenjalnih parov vijakov, s katerimi lahko stisnemo ali razširimo silikonski cevki. Prav tako smo lahko nadzorovali pretok tekom samih poskusov s spremljanjem volumnov vzorcev v zbirnih merilnih valjih in nato po potrebi spreminjali hitrost črpanja na črpalki. Na sistemu B1 smo tako preklapljali večinoma med hitrostjo črpanja 8 in 9, na sistemu B2 pa med 7 in 8, saj bi bila idealna hitrost črpanja nekje vmes.

Pri simulaciji pH profilov smo pH ves čas poskusa preverjali s pH metrom. Le-tega smo prej vedno umerili na enak pH (7,00) s pomočjo osnovnega pufra. Elektrodo pH metra smo

že pred začetkom poskusa potopili v čašo. Za vsakega izmed postavljenih pH profilov pa smo izvedli tudi po eno paralelko, ko smo elektrodo potopili v čašo šele nekoliko kasneje, ko je bil pH raztopine v čaši nad 5,5.
Čas poskusa smo ves čaš merili s pomočjo štoparice.
Vsi navedeni parametri so bili izbrani z namenom čim večje ekvivalence z *»in vivo«* pogoji.
Vse simulacije pH profilov so trajale točno 400 minut.
Pri načrtovanju izvedbe pH profilov smo si pomagali z diplomsko nalogo, ki se je predhodno ukvarjala s tem področjem (9).

pH profili z redčenimi citratno-fosfatnimi pufri: povprečni, višji in nižji pH profil
Za kisel želodčni medij smo uporabili 0,01 M HCl. Za črevesne medije (za tanko in debelo črevo) pa smo izbrali citratno-fosfatne pufre, saj zaradi dveh komponent, ki jih sestavljata, bolje pokrijejo širše pH območje, kot pa preprostejši fosfatni pufer, ki se običajno uporablja za simuliranje črevesnega soka.
Pufer 1 je citratno-fosfatni pufer, katerega pH ustreza pH prvega platoja simuliranega tankega črevesa (se razlikuje v pH glede na posamezni pH profil).
Pufer 2 pa ustreza drugemu pH platoju simuliranega tankega črevesa (se prav tako razlikuje v pH glede na posamezni pH profil).
Za oster padec pH smo uporabili H_3PO_4, nadaljevali pa s citratno-fosfatnim pufrom s pH 6,2 kot simuliranim medijem za kolon.

pH profil s fosfatnim pufrom s pH 6,8 (simulirani črevesni medij po USP):
Za primerjavo smo izvedli tudi pH profil, kjer smo uporabili fosfatni pufer. Začetni del, 45 minut v 0,01 M HCl, je bil enak kot pri zgoraj opisanih poskusih s citratno-fosfatnimi pufri. Po ostrem porastu pH z Na_3PO_4, pa smo nato uvajali 20 mM fosfatni pufer s pH = 6,8 do konca poskusa.

Opisani podatki o pH profilih in oznake vseh izvedenih poskusov, razen sproščanj, so pregledno zbrane v Preglednicah V in VI . Imena poskusov so sestavljena iz črk: M na začetku pomeni citratno-fosfatne pufre, F fosfatni pufer po USP; Mp povprečni profil, Mv višji pH profil in Mn nižji pH profil. Številka pomeni zaporedno izvedeno paralelko

poskusa. Črka S pred številko pomeni poskus hitrega dviga pH (skok), črka n na koncu pa neustrezno izveden hiter padec pH.

Preglednica V: Podatki o prvih poskusih hitrega dviga in padca pH za povprečni pH profil. Čas 0 pod simuliranim želodčnim medijem pomeni, da smo poskus začeli s 40 mL HCl v čaši in ob času 0 začeli dovajati Na_3PO_4.

Oznaka poskusa	Zaporedje medijev, ki smo jih črpali v delovno čašo					
	1. Simuliran želodčni medij	**2. Hiter dvig pH**	**3. Simuliran črevesni medij: pufer 1**	**4. Simuliran črevesni medij: pufer 2**	**5. Hiter padec pH**	**6. Simuliran kolonski medij**
MpS1	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,27	/	/	/
	0 min	50 s	6 min			
MpS2	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,27	/	/	/
	0 min	85 s	15 min			
MpS3	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,27	/	/	/
	0 min	95 s	90 min			
MpS4	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,27	/	/	/
	0 min	72 s	5 min			
MpS5	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,27	/	/	/
	0 min	62 s	7,5 min			
MpS6	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,39	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,58	/	/
	0 min	58 s	90 min	80 min		
MpS7	0,01 M HCl	100 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,25	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,72	0,425% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,17
	0 min	58 s	90 min	80 min	21 s	28 min
Mp1n	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,32	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,70	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,18
	0 min	105 s	90 min	225 min	27 s	55 min

Preglednica VI: Podatki o izvedbi štirih pH profilov: zaporedno dovajani mediji, njihov pH in čas dovajanja posameznega medija. Volumen v delovni čaši je bil vedno 40 mL, pretok 2 mL/min, obrati pa 50 obr./min. Vsi poskusi so trajali 400 minut.

Oznaka poskusa	**Izvedene paralelke**	**Zaporedje medijev, ki smo jih črpali v delovno čašo**								
		1. Simuliran želodčni medij	**2. Hiter dvig pH**	**3. Simuliran črevesni medij: pufer 1**	**4. Počasen dvig pH; mešanica pufra 1 in pufra 2 v razmerju:**			**5. Simuliran črevesni medij: pufer 2**	**6. Hiter padec pH**	**7. Simuliran kolonski medij**
Mp (povprečni profil)	Mp1, Mp2, Mp3, Mp4, Mp5, Mp6*	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,4	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,7	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	105 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	45 s	40 min
Mn (nižji profil)	Mn1, Mn2, Mn3, Mn4, Mn5*	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 5,8	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,3	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	96 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	43 s	40 min
Mv (višji profil)	Mv1, Mv2, Mv3, Mv4*	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,6	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 8,0	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	105 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	57 s	40 min
F (profil s fosfatom)	F1, F2, F3, F4*	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Fosfatni pufer, pH = 6,8						
		45 min	105 s	355 min						

*elektrodo za merjenje pH potopimo v čašo, ko je pH raztopine nad 5,5

3.2.3.8 Izdelava ogrodnih tablet

Za teste sproščanja smo izdelali ogrodne tablete, ki so vsebovale učinkovino natrijev diklofenakat. Kot ogrodni polimer smo uporabili HPMC (hidroksipropilmetil celulozo) Metolose 90SH 4000SR. V stiku z vodo tvori visoko viskozno raztopino. Uporabljamo jo za izdelavo ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem.

Preračunani količini HPMC in učinkovine smo natehtali, prenesli v plastično vrečko in zmes ročno temeljito pretresli, da sta se prahova dobro premešala. Nato smo za vsako tableto posebej ročno natehtali 400 mg homogene zmesi na čolniček na tehtnici, in jo tudi ročno prenesli na matrico tabletirke. Uporabili smo tabletirko na udarec.

Vse poskuse sproščanja, razen poskusov F1spmD in F1spmI, smo izvedli s 400 mg tabletami s 25% deležem natrijevega diklofenakata. Za omenjena poskusa pa smo izdelali tablete z manjšim pečatom (250 mg), iz enakih sestavin in z enakim deležem učinkovine (25%). Parametri izdelave obeh vrst tablet so navedeni v preglednici (Preglednica VII).

Poleg že omenjenih smo izdelali še serijo tablet z manjšim pečatom (250 mg), ki je vsebovala 25% ibuprofena. Uporabljeni pečat in nastavitve zgornjega in spodnjega pečata ustrezajo tistim za tablete z diklofenakatom, ki so prav tako narejene z manjšim pečatom (Preglednica VII), razlikujejo se le v trdnosti in sili na zgornjem pečatu.

Preglednica VII: Parametri za izdelavo ogrodnih tablet iz HPMC s 25% vsebnostjo Na-diklofenakata, oziroma ibuprofena.

Tablete	Učinkovina	Premer [mm]	Robovi	Masa tablete [mg]	Zgornji pečat [mm]	Spodnji pečat [mm]	Trdnost [N]	Sila na zg. pečatu [kN]
Večji pečat, 1. serija	Natrijev diklofenakat	12	Ravni	400	10,0	12,3	99-110	9,0-10,0
Večji pečat, 2. serija	Natrijev diklofenakat	12	Ravni	400	10,0	12,2	100-110	10,1-11,0
Manjši pečat	Natrijev diklofenakat	10	Prirezani	250	8,5	9,5	85-90	9,0-9,3
Manjši pečat	Ibuprofen	10	Prirezani	250	8,5	9,5	53-63	9,6-10,3

3.2.3.9 Testi sproščanja na pretočnem sistemu

Teste sproščanja smo izvajali s simuliranimi pH profili, kot je opisano v poglavju 3.2.3.7. V čašo pretočnega sistema smo natehtali 25 g steklenih kroglic, dodali magnet in 40 mL 0,01 M HCl, ter vse skupaj postavili v vodno kopel, nastavljeno na 37ºC. Počakali smo nekaj minut, da se je tudi vsebina čaše ogrela na to temperaturo, nato smo vanjo previdno stresli tableto in zagnali črpalko ter hkrati sprožili štoparico. Tablete smo pred začetkom testa vedno stehtali.

Nato smo izvajali želeni pH profil z zaporednim dovajanjem različnih pufrov v čašo pretočnega sistema. Iz čaše smo črpali vzorec v merilni valj, v katerega smo prej odmerili 40 mL 0,1 M NaOH. V 20-ih minutah poskusa je celokupen volumen v merilnem valju dosegel 80 mL, takrat smo ga zamenjali z novim valjem z NaOH, polnega pa smo prelili v čašo in vzorec filtrirali v centrifugirko. Primerjalno smo izvedli tudi nekaj poskusov, kjer vzorca po 140. minuti poskusa nismo več zbirali v NaOH (poskusi F2spB, F3spB, Mp1spB, Mp2spB).

Vzorce sproščanja smo zbirali v merilnem valju v razmerju 1:1 z 0,1 M NaOH, kar je zagotavljalo, da je bil praktično ves diklofenak v vzorcu v ionizirani obliki (raztopljen). Vzorec smo iz merilnega valja prelili v čašo in jih premešali. Nato smo s 5 mL plastično brizgo zajeli vzorec iz čaše, nataknili filter z odprtinami s premerom 0,45 μm, ter filtrirani vzorec zbrali v označeno centrifugirko. Iz centrifugirke smo filtrirani vzorec prelili v kiveto, dobro obrisali in izmerili absorbanco. Če je absorbanca presegla vrednost okoli 1,4, smo vzorec 5x redčili. To smo storili tako, da smo 0,6 mL vzorca z avtomatsko pipeto odpipetirali v 2,4 mL slepe raztopine, ki je ustrezala temu vzorcu. To smo izvedli v čisti centrifugirki. Nato smo razredčen vzorec prenesli v kiveto in izmerili novo absorbanco. Redčenje smo nato upoštevali pri izračunu koncentracije diklofenaka v začetnem vzorcu.

Vsi poskusi so trajali 400 minut, tako da smo vedno zbrali 20 vzorcev. Analizirali smo jih, kot je opisano v poglavju 3.2.3.5.

V Preglednici VIII so zbrani podatki o pH profilih in oznake vseh izvedenih poskusov sproščanj. Imena poskusov so sestavljena iz črk: M na začetku pomeni citratno-fosfatne pufre, F fosfatni pufer po USP; Mp povprečni profil, Mv višji pH profil in Mn nižji pH profil. Številka pomeni zaporedno paralelko poskusa, sp na koncu pa, da je šlo za sproščanje. Poskusa F1spmD, F1spmI sta bila izvedena s tabletami, stisnjenimi z manjšim pečatom (250 mg tablete), črki D oziroma I na koncu pa označujeta, da vsebuje tableta

učinkovino natrijev diklofenakat oziroma ibuprofen. Črka B na koncu pa pomeni, da po 140. minuti poskusa vzorcev več nismo zbirali v 01, M NaOH.

Preglednica VIII: Podatki o sproščanjih v medijih v skladu s štirimi pH profili: oznake izvedenih paralelk sproščanja, zaporedno dovajani mediji, njihov pH in čas dovajanja posameznega medija. Volumen v delovni čaši je bil vedno 40 mL, pretok 2 mL/min, obrati pa 50 obr./min. Vsi poskusi so trajali 400 minut.

Oznaka poskusa	**Izvedene paralelke**	**Zaporedje medijev, ki smo jih črpali v delovno čašo**								
		1. Simuliran želodčni medij	**2. Hiter dvig pH**	**3. Simuliran črevesni medij: pufer 1**	**4. Počasen dvig pH; mešanica pufra 1 in pufra 2 v razmerju:**			**5. Simuliran črevesni medij: pufer 2**	**6. Hiter padec pH**	**7. Simuliran kolonski medij**
Mp (povprečni profil)	Mp1sp, Mp2sp, Mp3sp, Mp4sp, Mp1spB, Mp2spB	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,4	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,7	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	105 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	45 s	40 min
Mn (nižji profil)	Mn1sp, Mn2sp, Mn3sp, Mn4sp, Mn5sp, Mn6sp, Mn7sp, Mn8sp	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 5,8	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 7,3	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	96 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	43 s	40 min
Mv (višji profil)	Mv1sp, Mv3sp, Mv4sp, Mv5sp	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,6	3:1	1:1	1:3	Citratno-fosf. pufer, pH = 8,0	0,85% H_3PO_4	Citratno-fosf. pufer, pH = 6,2
		45 min	105 s	90 min	15 min	15 min	15 min	180 min	57 s	40 min
F (profil s fosfatom)	F1sp, F3sp, F4sp, F5sp, F8sp, F9sp, F1spmD, F1spmI, F2spB, F3spB	0,01 M HCl	55 mM Na_3PO_4	Fosfatni pufer, pH = 6,8						
		45 min	105 s	355 min						

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA LITERATURNIH PODATKOV

V Preglednici IX so zbrani podatki, pridobljeni iz grafov študije Kozioleka in sodelavcev (4). Pod referenco 6 so zbrani podatki iz študije Ibekwe in sodelavcev (6), pod referenco 5 pa graf iz študije Evansa in sodelavcev (5). Grafe smo obdelali s programoma Engauge in Excel, kot je to opisano v poglavju 3.1.1.

Iz individualnih grafov, ki prikazujejo pH profile preiskovancev, smo odčitali čas v želodcu: čas od zaužitja radiotelemetrične kapsule do hitrega dviga pH (nad 5). Povprečen čas, ki smo ga določili glede na 3 preučevane študije (4, 5, 6), je bil 45 minut. Nato smo glede na tipično obliko grafov določili najprej čas trajanja prvega pH platoja v proksimalnem delu tankega črevesa, in povprečno vrednost pH za prvi plato. Ugotovili smo, da prvi pH plato traja povprečno 90 minut pri vrednosti pH 6,3. Študija Kozioleka in sodelavcev (4) je razdeljena na dva sklopa po 10 preiskovancev. Za primer 10 v prvem sklopu preiskovanih grafov (Preglednica IX) prvega pH platoja nismo mogli odčitati, saj pH pada od 398 do 486 minute iz pH 7,4 na 6,3. Podoben primer je preiskovanec 8 v drugem sklopu iste študije (4), kjer prvi pH plato prav tako ni bil razviden. Preiskovancu 2 v drugem sklopu nismo pravilno odčitali pH vrednosti, zato smo ga izvzeli iz nadaljnjega dela. Nato smo tipično določili čas naraščanja pH med prvim in drugim pH platojem in dobili rezultat približno 80 minut. Drugi pH plato predstavlja terminalni del tankega črevesa, oziroma predvsem čas zadrževanja FO pred ileocekalno zaklopko, pred prehodom v cekum. Traja najdlje, približno 135 minut pri pH povprečno 7,7. Za vsak primer smo določili tudi spremembo pH med prvim in drugim pH platojem in ugotovili, da pH v povprečju naraste za 1,5 pH enote (4, 5, 6). Podatki so pregledno zbrani v Preglednici IX.

Preglednica IX: Podatki iz treh člankov (4, 5, 6); iz grafov odčitane individualne vrednosti, izmerjene v fizioloških pogojih na tešče pri zdravih preiskovancih.

Referenca	Metoda	Število preiskovancev	Spol		Starost [leta]	Preiskovanec	Čas v želodcu čas [min]	Prvi plato v TČ		Naraščanje pH (min)	Drugi plato v TČ		Celotno TČ	
			M	Ž				čas [min]	pH		čas [min]	pH	čas [min]	ΔpH
4	IntelliCap® System	10	3	7	19-25	**1**	38	88	6,2	177	130	7,5	395	1,3
						2	128	110	6,3	53	191	7,8	313	1,5
						3	40	143	6,3	101	102	7,8	346	1,5
						4	15	103	6,3	179	223	7,6	505	1,3
						5	8	60	6,2	96	56	7,7	212	1,5
						6	15	52	6	150	114	7,8	316	1,8
						7	36	75	6	56	101	7,5	232	1,5
						8	22	53	6,2	90	100	7,7	243	1,5
						9	15	52	6,2	51	134	7,8	237	1,6
						10	10			26	39	7,8	75	
4	IntelliCap® System	10	3	7	19-25	**1**	40	32	6	68	130	7,9	230	1,9
						3	30	56	6,4	81	82	8	222	1,6
						4	33	58	6,4	53	130	7,8	241	1,4
						5	22	83	6,2	24	84	7,8	195	1,6
						6	35	68	6,4	48	397	7,5	513	1,1
						7	70	52	6,3	58	10	7,7	120	1,4
						8	73			134	191	7,3	413	
						9	30	22	5,8	233	190	8,3	363	2,5
						10	208	534	6,3	40	98	7,8	192	1,5
6	RTC Bravo®	2	2	/	22-34	**1**	69	73	6,6	44	182	7,8	299	1,2
						2	20	92	6,5	53	59	7,5	204	1
5	RTC	1	Ni podatka	Ni podatka		**1**	32	57	6,3	69	215	7,9	351	1,6
POVPREČJA							44,95	93,15	6,25	85,64	134,45	7,74	282,59	1,515

4.2 UMERITVENE PREMICE

V Preglednicah X, XI, XII in XIII so zbrane izračunane koncentracije različnih redčitev osnovne raztopine diklofenakata v vodi in izmerjene absorbance za umeritvene premice brez NaOH.

Preglednica X: Določanje umeritvene premice v fosfatnem pufru pH=6,8 (simulirani črevesni medij po USP), brez NaOH; m (zatehtane uč.)= 10,40 mg, c (osnovne razt.)= 0,1040 g/L.

Konc. ZU [mg/L]	A [/]
1,04	0,0302
5,2	0,162
10,4	0,324
15,6	0,499
20,8	0,647
31,2	0,990
41,6	1,319
52,0	1,636

Preglednica XI: Določanje umeritvene premice v redčenem citratno-fosfatnem pufru s pH=6,4, brez NaOH; m (zatehtane uč.)= 9,89 mg, c (osnovne razt.)= 0,0989 g/L.

Konc. ZU [mg/L]	A [/]
0,989	0,0322
4,945	0,156
9,89	0,319
19,78	0,631
29,67	0,945
39,56	1,27

Preglednica XII: Določanje umeritvene premice v redčenem citratno-fosfatnem pufru s pH=7,7, brez NaOH; m (zatehtane uč.)= 9,89 mg, c (osnovne razt.)= 0,0989 g/L.

Konc. ZU [mg/L]	A [/]
0,989	0,0288
4,945	0,150
9,89	0,307
19,78	0,623
29,67	0,925
39,56	1,245

Preglednica XIII: Umeritvena premica v redčenem citratno-fosfatnem pufru s pH=6,2, brez NaOH; m (zatehtane uč.)= 9,89 mg, c (osnovne razt.)= 0,0989 g/L.

Konc. ZU [mg/L]	A [/]
0,989	0,0297
4,945	0,158
14,834	0,483

Redčitve osnovnih raztopin, koncentracije in izmerjene absorbance umeritvenih premic z NaOH pa so zbrane v Preglednici IV (Metode).

Za vsakega izmed uporabljenih pufrov smo torej določili enačbo umeritvene premice (območje koncentracij raztopin med 1 in 40 mg/L, za HCl med 0,5 in 8 mg/L). Podane so v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Enačbe umeritvenih premic, izračunane z linearno regresijo, ter koeficienti korelacij. c = koncentracija učinkovine v raztopini [mg/L]; A = izmerjena absorbanca.

pH raztopine	Osnovna raztopina	Učinkovina	Enačba premice c [mg/L]	Koeficient korelacije r^2	Valovna dolžina [nm]
5,8	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,0009)/ 0,0322	1	276
6,4	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,004)/ 0,0317	0,9986	276
6,6	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,0089)/ 0,0309	0,9997	276
7,3	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,006)/ 0,0318	0,9996	276
7,7	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,0157)/ 0,033	0,9982	276
8,0	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,0031)/ 0,0314	1	276
6,2	Citratno-fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A-0,0068)/ 0,032	0,9995	276
2	0,01 M HCl in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,0087)/ 0,0316	0,9986	276
6,8	Fosfatni pufer in	Na-	c= (A-0,0162)/	0,9990	276

	0,1 M NaOH v razmerju 1:1	diklofenakat	0,0315		
2	0,01 M HCl in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Ibuprofen	c= (A-0,0106)/ 0,0432	0,9978	221
6,8	Fosfatni pufer in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1	Ibuprofen	c= (A-0,0308)/ 0,0419	0,9967	221
6,8	Fosfatni pufer	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,0019)/ 0,0316	0,9999	276
6,4	Citratno-fosfatni pufer	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,0007)/ 0,032	1	276
7,7	Citratno-fosfatni pufer	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,004)/ 0,0315	0,9999	276
6,2	Citratno-fosfatni pufer	Na-diklofenakat	c= (A+ 0,0032)/ 0,0328	1	276

4.3 PUFRSKE KAPACITETE MEDIJEV ZA SIMULACIJO TANKEGA ČREVESA

V Preglednici XV so zbrane vse meritve pufrskih kapacitet. Izmerili smo jih citratno-fosfatnim pufrom različnih koncentracij in vsebinam čaše, ko smo ustavili simulacijo poskusnih pH profilov ob različnih časih. Eksperimentalno smo določili pufrsko kapaciteto, po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.6.

Vse v spodnji tabeli navedene pufre sta sestavljali dve osnovni raztopini, ki smo ju nato redčili:

A: 0,200 M Na_2HPO_4,

B: 0,109 M citronska kislina.

Preglednica XV: Določanje pufrske kapacitete različno redčenim citratno-fosfatnim pufrom in odvzetim vzorcem po preliminarnih poskusih simulacije pH profilov z uporabo teh pufrov. V vseh primerih smo določali kapaciteto 40 mL vzorca, dodajali pa 0,1 M HCl.

Čisti pufer/ ustavljen poskus	**Redčenje osnovne raztopine/ potek poskusa**	**Izmerjen začetni pH pufra**	**ΔpH po dodatku HCl**	**V [µL] dodane 0,1 M HCl**	**β [mmol/L/ΔpH]**
Čisti pufer	11,5 mL A+ 1,0 mL B, do 1000 mL	7,52	0,29	170	1,41
Čisti pufer	30,0 mL A+ 20,0 mL B, do 200 mL	5,95	0,28	1550	12,43
Ustavljen poskus po 15 min	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM Na_3PO_4 100s, nato pufer (11,5 mL A+ 1,0 mL B, do 1000 mL)	6,78	0,29	200	1,72
Čisti pufer	23,0 mL A+ 2,0 mL B, do 1000 mL	7,55	0,27	260	2,4
Čisti pufer	23,0 mL A+ 2,0 mL B, do 500 mL	7,59	0,26	400	3,8
Čisti pufer	46,0 mL A+ 5,0 mL B, do 500 mL	7,48	0,29	800	6,76

Ustavljen poskus po 15 min	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM $Na_3PO_4$4 100s, nato pufer (46,0 mL A+ 5,0 mL B, do 500 mL)	7,24	0,30	600	4,93
Po 60 minutah poskusa odvzet vzorec	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM Na_3PO_4 100s, nato pufer (46,0 mL A+ 5,0 mL B, do 500 mL), pri 180. min uvajali 0,425% H_3PO_4 27 s, nato pufer (30,0 mL A+ 20,0 mL B, do 200 mL)	7,42	0,30	820	6,70
Po 80 minutah poskusa odvzet vzorec		7,45	0,27	740	6,74
Po 100 minutah poskusa odvzet vzorec		7,46	0,29	800	6,74
Ustavljen poskus po 193 min		6,51	0,26	1000	9,38
Čisti pufer	34,5 mL A+ 3,75 mL B, do 500 mL	7,50	0,29	700	5,93
Čisti pufer	33,5 mL A+ 4,0 mL B, do 500 mL	7,55	0,26	600	5,68
Po 30 minutah poskusa odvzet vzorec	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM Na_3PO_4 100s, nato pufer (33,5 mL A+ 4,0 mL B, do 500 mL), pri 180. min uvajali 0,425% H_3PO_4 27 s, nato pufer (31,0 mL A+ 19,0 mL B, do 200 mL)	7,40	0,26	600	5,76
po 75 minutah poskusa odvzet vzorec		7,53	0,33	800	5,94
po 180 minutah poskusa odvzet vzorec		7,50	0,33	800	5,94
po 195 minutah poskusa odvzet vzorec		6,30	0,27	1200	10,78
Ustavljen poskus po 226 min		6,11	0,29	1200	10,04
Čisti pufer	31,0 mL A+ 19,0 mL B, do 200 mL	6,01	0,24	1400	14,09
Čisti pufer	16,25 mL A+ 2,5 mL B, do 500 mL	7,35	0,30	400	3,3
Čisti pufer	17,25 mL A+ 1,5 mL B, do 500 mL	7,65	0,31	400	3,2
Ustavljen poskus po 50 min	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM Na_3PO_4 100s, nato pufer (17,25 mL A+ 1,5 mL B, do 500 mL)	7,55	0,33	400	3,00
Čisti pufer	11,5 mL A+ 1,0 mL B, do 500 mL	7,67	0,46	400	2,11
Po 40 minutah poskusa odvzet vzorec	V 0,01 M HCl uvajamo 55 mM Na_3PO_4 100s, nato pufer (11,5 mL A+ 1,0 mL B, do 500 mL), pri 130. min uvajali 0,425% H_3PO_4 27 s, nato pufer (31,0 mL A+ 19,0 mL B, do 200 mL)	7,40	0,33	300	2,25
po 100 minutah poskusa odvzet vzorec		7,60	0,32	300	2,33
po 215 minutah poskusa odvzet vzorec		6,08	0,25	1000	9,76
Ustavljen poskus po 240 min		6,06	0,24	1000	10,16

V Preglednici XVI so posebej zbrane recepture in izmerjene pufrske kapacitete za citratno-fosfatne pufre s posameznim pH, ki smo jih uporabili za nadaljnje delo (zato se ponovijo nekateri podatki iz tabele XV).

Preglednica XVI: Različne izvedbe citratno-fosfatnih pufrov, ki smo jih nato uporabili za simuliranje pH profilov in njihove pufrske kapacitete.

Redčenje osnovne raztopine	Izmerjeni začetni pH [/]	ΔpH po dodatku HCl	V [µL] dodane 0,1 M HCl	β [mmol/L/ΔpH]
21,625 mL A+ 11,715 mL B, do 500 mL	6,40	0,37	600	4,00
30,75 mL A+ 2,63 mL B, do 500 mL	7,64	0,31	600	4,77
22,80 mL A+ 10,50 mL B, do 500 mL	6,60	0,29	600	5,10
32,10 mL A+ 1,20 mL B, do 500 mL	7,98	0,38	500	3,4
19,10 mL A+ 14,24 mL B, do 500 mL	5,78	0,31	400	3,19
28,20 mL A+ 5,19 mL B, do 500 mL	7,26	0,24	600	6,17
78,75 mL A+ 46,27 mL B, do 500 mL	6,17	0,31	1800	13,9

4.4 SIMULACIJA HITREGA NARAŠČANJA pH OB PREHODU IZ ŽELODCA V DUODENUM

Za ustrezno ponazarjanje pH na prehodu iz želodca v duodenum, oziroma začetnega dela tankega črevesa, smo morali izvesti dovolj hiter dvig vrednosti pH. Želeli smo, da s pomočjo visoke koncentracije raztopine Na_3PO_4 naraščanje poteče v nekaj minutah in nato doseže prvi pH plato, ter ga ne preseže. Podatki so zbrani v Preglednici XVII.

Kislega pH na začetku poskusa nismo vzdrževali 45 minut, ampak smo z začetkom poskusa kar pričeli z dovajanjem Na_3PO_4.

Z nekaterimi poskusi smo po uspešnem hitrem dvigu pH in prvem pH platoju izvajali še počasen dvig pH na drugi pH plato in/ali hiter padec pH, zato se v nadaljevanju nekateri podatki o meritvah podvajajo.

Preglednica XVII: Naraščanje pH v čaši pretočnega sistema glede na dodatke raztopine 100 mM Na_3PO_4 v 0,01 M HCl (poskusi MpS1-MpS7). Ob času 0 smo začeli v čašo s 40 mL HCl dovajali Na_3PO_4, nato pa redčeni citratno-fosfatni pufer.

Oznaka poskusa	MpS1	MpS2	MpS3	MpS4	MpS5	MpS6	MpS7

Čas dovajanja Na_3PO_4	50 s	85 s	95 s	72 s	62 s	58 s	58 s
pH pufra, dovajanega po dodatku Na_3PO_4	6,27	6,27	6,27	6,27	6,27	6,39	6,25
Čas [min]	pH						
1	2,22	2,22	2,24	2,24	2,25	2,24	2,21
1,5	2,22	2,22	2,24	2,24	2,25	/	/
2	2,26	2,25	2,24	2,24	2,28	2,28	2,28
2,5	2,43	2,43	2,27	2,52	2,65	/	2,51
3	2,55	2,73	2,51	/	3,81	3,76	3,22
3,5	2,6	3,36	/	3,33	6,24	5,76	5,81
4	2,62	3,45	7,51	6,65	6,28	5,97	5,59
4,5	2,67	3,52	7,56	/	/	6,02	6,01
5	2,7	3,67		6,77	6,29	6,07	6,07
5,5	2,73	3,84			6,30	/	6,10
6	2,78	4,11			6,30	6,12	6,12
6,5		4,38			6,30	/	/
7		4,56			6,30	6,17	/
7,5		4,77			6,30	/	/
8		4,99				6,21	/
8,5		5,17				/	6,18
9		5,34				6,23	/
10		5,55				6,25	6,20
11		5,65				6,27	/
12		5,75				6,29	/
13		5,83				6,30	6,23
14		5,89				/	6,24
15		5,93				6,35	6,25

4.5 SIMULACIJA POČASNEGA NARAŠČANJA pH VZDOLŽ TANKEGA ČREVESA

Ko smo določili primerno količino Na_3PO_4 za hiter dvig pH iz simuliranega kislega želodčnega medija na višji pH 6,3 (simulacija začetka tankega črevesa) je sledil konstanten pH; prvi plato smo vzdrževali do 90. minute. Nato smo želeli počasen dvig pH do drugega platoja s pH 7,7.

Kislega pH na začetku poskusa nismo vzdrževali 45 minut, ampak smo z začetkom poskusa kar pričeli z dovajanjem Na_3PO_4.

Pufer 1 je pufer za simulacijo začetnega dela tankega črevesa (pH prvega platoja v tankem črevesu), pufer 2 pa za simulacijo končnega dela (pH drugega platoja v tankem črevesu).

Meritve pH ob izvedbi poskusov MpS6, MpS7, Mp1n in Mp1 so podane v Preglednici XVIII. Uspešen enakomeren dvig pH smo dosegli s poskusom Mp1.

Začetek dovajanja novega medija označujejo odebeljene črte.

Preglednica XVIII: Poskusi enakomernega počasnega dviga pH iz prvega na drugi pH plato simuliranega tankega črevesa. Do 90. minute poskusa so vsi poskusi potekali enako: v čaši smo imeli 40 mL 0,01 M HCl in ob času 0 smo začeli v čašo začeli dovajali Na_3PO_4, nato pa pufer 1. Pri poskusih MpS6, MpS7 in Mp1n smo ob 90. minuti začeli z dovajanjem pufra 2.

Oznaka poskusa	**MpS6**	**MpS7**	**Mp1n**	**Mp1**	
Čas dovajanja in konc. Na_3PO_4	**58 s (100 mM)**	**58 s (100 mM)**	**105 s (55 mM)**	**105 s (55 mM)**	
pH pufra 1, dovajanega po dodatku Na_3PO_4	**6,39**	**6,25**	**6,32**	**6,38**	
pH pufra 2	**7,58**	**7,72**	**7,70**	**7,68**	
Čas [min]	**pH**				
1	2,24	2,21	2,25	2,27	
2	2,28	2,28	2,25	2,30	
2,5	/	2,51	2,38	2,39	
3	3,76	3,22	2,63	2,61	
3,5	/	5,81	/	2,90	
4	5,97	5,59	5,83	5,57	
4,5	6,02	6,01	6,20	6,27	
5	6,07	6,07	6,20	6,30	
5,5	6,07	6,10	6,22	6,31	
6	6,12	6,12	6,24	6,33	
7	6,17	/	6,24	6,34	
10	6,25	6,20	6,26	6,37	
15	6,32	6,25	6,29	6,39	
20	6,35	6,27	6,30	6,40	
25	6,36	6,29	/	6,41	
30	6,38	6,29	6,32	6,41	
35	/	6,30	/	6,42	
40	6,39	6,30	6,33	6,42	
50	/	6,30	6,33	6,42	
60	6,39	/	6,33	6,42	
70	6,39	6,30	6,33	6,42	
90	6,39	6,30	6,33	6,42	
92	/	/	6,34	6,43	Dovajanje mešanice pufra 1 in 2 v razmerju 3:1
93	/	6,39	6,41	6,44	
94	/	/	/	6,45	
95	6,57	6,52	6,58	6,47	
97	/	/	/	6,51	
100	6,82	6,76	6,88	6,56	
103	/	/	/	6,60	
105	7,01	6,95	7,05	6,62	
108	/	/	/	6,67	Dovajanje mešanice
110	7,12	7,09	7,20	6,72	

115	7,22	7,22	7,32	6,81	pufra 1 in 2 v razmerju 1:1
120	7,30	7,34	7,40	6,89	
122	/	/	/	6,92	Dovajanje mešanice pufra 1 in 2 v razmerju 1:3
125	/	/	7,47	6,98	
130	7,38	7,49	7,52	/	
131	/	/	/	7,07	
135	7,42	/	/	7,12	
137	/	7,57	/	7,15	
140	7,45	7,59	7,59	7,22	
145	/	/	/	7,33	
150	7,50	7,66	7,63	7,41	
155	/	7,68	/	7,47	
160	7,55	7,70	7,69	/	
165	/	7,71	/	7,56	
170	7,58	7,72	7,70	7,60	

4.6 SIMULACIJA HITREGA PADCA pH OB PREHODU IZ TANKEGA V DEBELO ČREVO

Drugemu pH platoju je sledil oster padec pH za približno 1,5 pH enote. Padec smo izvajali z dovajanjem 0,425% ali 0,85 % H_3PO_4. Poskusi, kjer smo določali primeren čas dovajanja kisline za želeni padec, so zbrani v Preglednici XIX.

Kislega pH na začetku poskusa nismo vzdrževali 45 minut, ampak smo z začetkom poskusa kar pričeli z dovajanjem Na_3PO_4, nato dosegli prvi in drugi pH plato, ter izvedli padec.

Odebeljene črte v tabeli označujejo menjavo medija, ki ga dovajamo v čašo. Krepki tisk poudarja meritve pH po začetku dovajanja H_3PO_4.

Preglednica XIX: Poskusi hitrega padca pH ob simulaciji prehoda iz tankega črevesa v kolon. Začeli smo v 0,01 M HCl, dovajali Na_3PO_4, sledita pH platoja (poglavji 4.4 in 4.5). Z dovajanjem H_3PO_4 smo pri poskusu MpS7 začeli v 170. minuti, pri Mp1n in Mp1 pa v 315. minuti.

Oznaka poskusa	**MpS7**	**Mp1n**	**Mp1**
Čas dovajanja in konc. Na_3PO_4	**58 s (100 mM)**	**105 s (55 mM)**	**105 s (55 mM)**
pH pufra 1	**6,25**	**6,32**	**6,38**
pH pufra 2	**7,72**	**7,70**	**7,68**
Čas dovajanja in konc. H_3PO_4	**21 s (0,425%) začeli v 170.**	**27 s (0,85%) začeli v 315. minuti**	**45 s (0,85%) začeli v 315. minuti**

	minuti		
pH pufra 3	**6,17**	**6,18**	**6,21**
Čas [min]	**pH**		
1	2,21	2,25	2,27
2	2,28	2,25	2,30
2,5	2,51	2,38	2,39
3	3,22	2,63	2,61
3,5	5,81	/	2,90
4	5,59	5,83	5,57
4,5	6,01	6,20	6,27
5	6,07	6,20	6,30
5,5	6,10	6,22	6,31
6	6,12	6,22	6,33
7	/	6,24	6,34
10	6,20	6,26	6,37
15	6,25	6,29	6,39
20	6,27	6,30	6,40
25	6,29	/	6,41
30	6,29	6,32	6,41
35	6,30	/	6,42
40	6,30	6,33	6,42
50	6,30	6,33	6,42
60	6,30	6,33	6,42
70	6,30	6,33	6,42
90	6,30	6,33	6,42
92	/	6,34	6,43
93	6,39	6,41	6,44
94	/	/	6,45
95	6,52	6,58	6,47
97	/	/	6,51
100	6,76	6,88	6,56
103	/	/	6,60
105	6,95	7,05	6,62
108	/	/	6,67
110	7,09	7,20	6,72
115	7,22	7,32	6,81
120	7,34	7,40	6,89
122	/	/	6,92
125	/	7,47	6,98
130	7,49	7,52	/
131	/	/	7,07
135	/	/	7,12
137	7,57	/	7,15
140	7,59	7,59	7,22
145	/	/	7,33
150	7,66	7,63	7,41
155	7,68	/	7,47
160	7,70	7,69	/
165	7,71	/	7,56
170	7,72	7,70	7,60
171	**7,72**	/	7,60

172	**7,70**	/	/
172,5	**7,52**	/	/
173	**7,15**	/	/
174	**7,01**	/	/
175	**6,88**	/	7,62
176	**6,80**	/	/
177	**6,73**	/	/
178	**6,68**	/	/
179	**6,63**	/	/
180	**6,59**	/	/
185	**6,45**	/	7,65
190	**6,35**	/	7,66
198	**6,27**	/	/
200		/	7,67
230		7,70	7,67
260		7,70	7,67
290		7,70	7,67
315		7,70	7,67
316		**7,69**	**7,67**
317		**7,69**	**7,67**
318		**6,91**	**6,67**
318,5		**6,85**	**6,23**
319		**6,76**	**6,24**
320		**6,75**	**6,24**
325		**6,58**	**6,24**
328		**6,48**	/
330		**6,44**	**6,23**
335		**6,36**	**6,22**
340		**6,30**	**6,22**
345		**6,26**	
350		**6,24**	
355		**6,22**	
360		**6,20**	
365		**6,19**	
370		**6,19**	

4.7 SIMULIRANI pH PROFILI

V tej nalogi smo izdelali štiri pH profile in opravili meritve pH v odvisnosti od časa v več paralelkah za vsak posamezni pH profil. Postopki za simuliranje vseh štirih pH profilov so zbrani v Preglednici VI (Metode).

Vsi profili se začnejo z dovajanjem 0,01 M HCl prvih 45 minut poskusa, vendar tega pri praktičnem delu nismo izvajali, temveč smo v čašo odmerili 40 mL 0,01 M HCl, ogreli na 37°C, izmerili pH, nato pa hkrati zagnali štoparico in začeli dovajati 55 mM Na_3PO_4.

Odebeljene črte v tabeli označujejo začetek dovajanja drugega medija.

V Preglednici XX so zbrane meritve za pH profil, kjer smo uporabili fosfatni pufer s pH 6,8 po USP.

Preglednica XX: pH profil s fosfatnim pufrom po USP, pH=6,8. Začeli smo v 0,01 M HCl, nato smo uvajali 55 mM Na_3PO_4 105 s. Potem smo do konca uvajali fosfatni pufer, pH=6,8. Pri poskusu F2 črpalka dlje časa na 8 kot na 9, zato je naraščanje pH nekoliko počasnejše. Pri poskusu F5 smo potopili elektrodo kasneje v čašo.

Čas [min]	pH				
	F1	F2	F3	F4	F5
45	2,21	2,22	2,22	2,22	/
46	2,21	2,22	2,22	2,23	/
47	2.21	2,22	2,23	2,23	/
47,5	2,36	2,30	2,32	2,30	/
48	2,65	2,46	2,52	2,48	/
48,5	3,10	2,72	2,88	2,79	/
49	4,69	3,02	3,56	5,02	5,14
49,5	6,41	4,06	5,84	5,88	6,36
50	6,60	5,86	6,25	6,19	6,48
50,5	6,69	6,19	6,51	6,34	6,55
51	6,74	6,33	/	6,50	6,62
51,5	6,76	6,42	/	/	/
52	6,77	6,51	/	6,54	6,66
53	6,80	6,57	6,67	/	6,69
54	6,80	/	6,73	6,64	6,73
55	6,80	6,67	6,74	6,67	6,75
60	6,81	6,74	6,76	6,73	6,80
80	6,81	6,76	6,77	6,75	6,80
100	6,81	6,77	6,78	6,77	6,80
150	6,81	6,78	6,79	6,79	6,80
200	6,81	6,80	6,80	6,80	6,80
250	6,81	6,80	6,80	6,80	6,80
300	6,81	6,80	6,80	6,80	6,80
350	6,81	6,80	6,80	6,80	6,80
400	6,81	6,80	6,80	6,80	6,80

V Preglednici XXI so zbrane paralelke poskusov z nižjim pH profilom, v Preglednici XXII s povprečnim pH profilom in v Preglednici XXIII z višjim pH profilom. Začetek dovajanja novega medija označujejo odebeljene črte.

Preglednica XXI: Nižji pH profil z redčenimi citratno-fosfatnimi pufri. Pri poskusu Mn1 smo 4 s dlje dovajali Na_3PO_4 (100 s namesto 96 s), vendar se meritve ne razlikujejo od ostalih izvedenih paralelk. Pri poskusu Mn5 smo potopili elektrodo kasneje v čašo.

Čas [min]	pH				
	Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	Mn5
45	2,26	2,26	2,25	2,23	/
46	2,26	2,25	2,24	2,23	/
47	2,28	2,25	2,25	2,23	/
47,5	2,35	2,38	2,36	2,38	/
48	2,53	2,6	2,61	2,61	/
48,5	2,81	3,1	3,12	3,15	/
49	3,43	4,05	4,88	5,21	/
49,5	3,93	5,31	5,61	5,68	5,55
50	4,52	5,65	5,65	5,79	5,67

51	5,21	5,74	5,72	5,85	5,77
52	5,42	5,76	5,75	5,85	5,79
54	/	5,78	5,78	5,85	5,79
55	5,58	5,79	5,79	5,85	5,79
60	5,72	5,81	5,81	5,85	5,79
65	5,78	5,81	5,81	5,85	5,79
90	5,78	5,81	5,81	5,85	5,79
135	5,78	5,81	5,81	5,85	5,79
137	5,78	5,82	5,82	5,87	/
139	5,86	5,89	5,85	/	/
140	/	5,94	5,93	5,96	5,91
141	5,94	5,98	/	/	/
145	6,06	6,08	6,07	6,10	6,03
150	6,16	6,17	6,16	6,18	6,14
152	6,18	6,20	6,19	6,21	/
153	6,20	6,22	6,22	6,23	/
155	6,27	6,28	6,28	6,30	6,28
157	6,34	6,35	/	/	
160	6,41	6,42	6,41	6,42	6,42
165	6,49	6,50	6,50	6,52	6,51
168	/	6,55	6,56	6,58	/
170	6,59	6,60	6,61	6,62	6,61
175	6,71	6,72	6,72	6,74	6,73
180	6,79	6,79	6,80	6,82	6,81
185	6,87	6,87	6,89	6,92	6,91
190	/	6,98	6,99	7,00	7,01
193	7,02	7,02	/	/	/
195	/	7,05	7,05	7,08	
200	7,11	7,15	7,10	/	
202	/	/	/	7,15	
205	7,15	7,18	7,12	7,18	
210	/	7,21	7,17	7,20	
215	/	7,23	7,20	7,23	
220	7,18	7,25	7,22	7,25	
225	7,20	7,26	7,24	7,27	
230	7,23	7,28	7,26	7,29	
235	7,25	7,28	7,27	7,30	
240	7,26	7,28	7,27	7,30	
247	7,25	7,28	7,27	7,30	
250	7,25	7,28	7,27	7,30	
255	7,26	7,28	7,27	7,30	
260	7,26	7,28	7,27	7,30	
295	7,25	7,28	7,27	7,30	
345	7,26	7,28	7,27	7,30	
360	7,26	7,28	7,27	7,30	
361	7,25	7,28	7,26	7,30	
362	7,16	7,27	7,26	7,25	
362,5	6,73	7,05	6,83	6,70	
363	6,41	6,57	6,58	6,28	
364	6,26	6,26	6,27	6,26	
366	6,24	6,25	6,26	6,24	
367	6,23	6,24	/	/	
370	6,22	6,24	6,25	6,23	
400	6,21	6,24	6,24	6,21	

Preglednica XXII: Povprečni pH profil z redčenimi citratno-fosfatnimi pufri. Pri poskusu Mp6 smo potopili elektrodo kasneje v čašo.

Čas [min]	pH					
	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5	Mp6
45	2,27	2,26	2,24	2,26	2,26	/
46	2,27	2,26	2,24	2,26	2,26	/
47	2,30	2,27	2,25	2,26	2,26	/
48	2,61	2,49	2,63	2,53	2,59	/
48,5	2,90	2,78	3,03	2,84	2,96	/
49	5,57	3,41	5,98	3,51	5,55	5,46
49,5	6,27	6,11	6,37	6,23	6,27	6,12
50	6,30	6,28	6,38	6,28	6,40	6,28
50,5	6,31	6,31	/	/	6,45	6,31
51	6,33	6,33	6,41	6,31	6,48	6,35
52	6,34	/	6,42	6,34	6,49	6,39
53	/	6,36	6,43	6,35	6,49	6,42
54	/	6,37	6,44	6,36	6,49	6,43
55	6,39	6,37	6,44	6,38	6,49	6,43
56	6,40	/	6,44	6,37	6,49	6,43
57	6,41	6,39	6,44	6,39	6,49	6,43
58	6,41	/	6,44	/	6,48	6,43
59	6,41	/	6,44	6,40	6,48	6,43
60	6,42	6,39	6,44	6,41	6,48	6,43
90	6,42	6,40	6,44	6,44	6,48	6,43
135	6,42	6,40	6,44	6,44	6,48	6,43
137	6,43	6,41	6,45	6,45	6,49	/
140	/	/	/	/	/	6,48
145	/	/	/	/	/	6,56
148	6,60	/	6,61	6,63	6,65	/
150	6,62	6,63	6,63	6,65	6,67	6,64
160	6,81	6,81	6,82	6,84	6,85	6,78
165	6,89	6,88	6,89	6,90	6,92	6,85
170	6,98	6,96	6,98	7,00	7,00	6,94
180	7,13	7,12	7,12	7,16	7,14	7,10
190	7,33	7,33	7,32	7,34	7,33	7,28
195	/	/	/	/	/	7,38
200	7,47	7,51	7,46	7,48	7,48	/
205	/	/	/	/	/	7,50
215	7,60	7,61	/	7,60	7,65	7,54
235	/	7,65	7,65	7,66	/	7,61
360	7,67	7,66	7,66	7,67	7,67	7,65
362	7,67	7,66	7,47	7,67	7,68	7,65
363	6,67	6,68	6,26	6,81	6,54	6,81
365	6,24	6,31	6,22	6,18	6,23	6,25
377	6,22	6,25	6,22	6,18	6,21	6,20
400	6,22	6,22	6,22	6,18	6,20	6,20

Preglednica XXIII: Višji pH profil z redčenimi citratno-fosfatnimi pufri. Pri poskusu Mv4 smo potopili elektrodo kasneje v čašo.

Čas [min]	pH			
	Mv1	Mv2	Mv3	Mv4
45	2,22	2,27	2,26	/
46	2,22	2,27	2,26	/
47	2,23	2,27	2,26	/

47,5	2,41	2,40	2,43	/
48	2,71	2,61	2,64	/
49	3,71	3,33	4,81	/
49,5	6,30	4,40	5,71	/
50	6,45	5,49	6,08	5,34
50,5	6,51	5,97	6,18	5,65
51	6,54	6,30	6,28	5,91
52	6,56	6,39	/	6,18
53	/	/	6,46	6,37
55	6,59	6,56	6,54	6,55
58	/	/	6,57	6,60
60	6,59	6,60	6,60	6,60
70	6,60	6,60	6,60	6,60
90	6,60	6,60	6,60	6,60
135	6,60	6,60	6,60	6,60
138	6,62	6,63	6,63	/
138,5	6,63	/	/	/
139	6,64	6,65	/	/
140	6,66	6,67	/	6,65
141	/	/	6,70	/
142	6,69	/	/	/
143	6,71	6,73	/	/
145	6,73	6,76	6,76	6,74
148	6,76	/	/	/
150	6,78	6,81	6,82	6,80
152	6,80	6,84	6,84	/
153	6,82	6,86	/	/
155	6,86	6,90	6,90	6,87
158	6,91	6,97	6,95	/
160	6,94	6,99	6,98	6,97
162	6,97	7,02	7,00	/
165	7,01	7,04	7,03	7,03
167	7,02	7,07	7,05	/
170	7,08	7,12	7,12	7,11
175	7,17	7,20	7,20	7,20
178	7,21	7,24	7,24	/
180	7,24	7,27	7,28	7,28
182	7,27	/	/	/
183	/	7,32	7,31	/
184	7,30	/	/	/
185	7,32	/	7,36	7,36
186	7,34	/	/	/
188	/	7,43	7,42	/
190	/	/	7,46	7,46
192	/	/	7,50	/
195	/	7,57	/	/
197	/	7	7,59	/
200	/	7,64	7,63	/
204	7,64	7,69	7,68	/
205	7,65	7,70		7,71
207	/	/	7,74	/
210	/	7,76	/	/
211	/	/	/	7,79
214	/	/	7,79	/
215	/			7,82
216	/	7,81	/	/

219	7,77	/	/	/
220	7,79	/	7,83	/
225	7,81	/	7,86	7,89
226	/	7,92	/	/
228	/	7,94	/	/
230	7,84	/	7,90	/
235	7,86	/	7,91	7,90
240	7,87	/	7,93	/
245	7,92	/	/	7,93
250	7,94	7,96	/	7,95
260	7,95	/	/	/
280	/	7,97	7,95	/
295	7,96	7,97	7,95	7,98
345	7,96	7,97	7,95	7,98
360	7,97	7,97	7,95	7,98
361	7,96	7,95	7,94	7,98
362	7,73	7,68	7,93	7,68
362,5	7,13	7,07	7,71	7,09
363	6,70	6,70	7,11	6,67
364	6,61	6,56	6,54	6,52
365	6,53	6,51	6,47	6,49
366	6,48	6,48	6,42	/
367	6,45	/	6,40	/
368	/	6,44	/	/
370	/	/	/	6,44
372	6,41	6,38	6,33	/
380	/	7	6,25	6,35
400	6,21	6,21	6,21	/

4.8 TESTI SPROŠČANJA

V zaporedno dovajanih medijih, ki ustrezajo pH profilom, opisanim v poglavjih 3.2.3.7 in 4.7, smo izvedli sproščanje natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet (poglavje 3.2.3.8). Zanimal nas je vpliv zveznega spreminjanja pH na sproščanje učinkovine iz tablete.

Postopki izvedbe posameznega pH profila so zbrani v Preglednici VI (Metode).

Preglednice XXIV do XXVII prikazujejo odstotek sproščenega Na-diklofenakata za posamezno paralelko, povprečje sproščene učinkovine za posamezni profil sproščanja in relativno standardno deviacijo.

Preglednici XXVIII in XXIX prikazujeta odstotek sproščenega Na-diklofenakata, povprečje sproščene učinkovine in relativno standardno deviacijo za pH profil s fosfatnim pufrom s pH 6,8 oziroma za povprečni pH profil, ko vzorcev po 140. minuti poskusa več nismo zbirali v 0,1 M NaOH. Kjer manjkajo zaporedne paralelke poskusov (npr. F2sp), zaradi eksperimentalne napake pri delu rezultati niso bili upoštevani.

Preglednica XXIV: Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu s pH profilom s fosfatnim pufrom pH 6.8.

Čas [min]	F1sp	F3sp	F4sp	F5sp	F8sp	F9sp	Povprečje	RSD [%]
	[% sprošč. uč.]							
0	0	0	0	0	0	0	**0,00**	**0,00**
20	0,12	0,12	0,13	0,14	0,10	0,14	**0,12**	**12,60**
40	0,35	0,34	0,38	0,43	0,28	0,42	**0,36**	**13,60**
60	1,04	0,92	1,12	1,17	0,88	1,28	**1,05**	**13,72**
80	3,79	3,98	4,69	4,56	4,00	4,72	**4,26**	**9,02**
100	7,12	7,95	9,10	8,82	8,17	8,82	**8,27**	**8,34**
120	10,36	11,36	13,00	12,75	11,89	12,26	**11,85**	**7,71**
140	13,27	14,37	16,36	16,58	15,19	15,32	**15,07**	**7,73**
160	15,85	17,32	19,56	19,82	18,27	18,21	**18,05**	**7,62**
180	18,42	20,59	22,79	22,78	21,13	20,83	**20,96**	**7,27**
200	20,63	23,32	25,63	25,45	23,90	23,32	**23,59**	**7,17**
220	23,13	25,82	28,24	27,89	26,61	25,76	**26,15**	**6,49**
240	25,97	28,16	30,33	30,19	29,47	28,09	**28,60**	**5,35**
260	28,73	30,29	32,35	32,53	32,23	30,32	**30,96**	**4,62**
280	31,45	32,38	34,27	34,54	34,54	32,60	**33,19**	**3,73**
300	34,12	34,47	36,17	36,69	36,90	34,86	**35,43**	**3,19**
320	36,64	36,47	37,97	38,71	39,14	37,08	**37,57**	**2,80**
340	38,94	38,41	39,90	40,59	41,24	39,13	**39,61**	**2,56**
360	41,01	40,38	41,77	42,47	43,28	41,02	**41,57**	**2,41**
380	42,93	42,23	43,38	44,43	45,32	42,83	**43,43**	**2,47**
400	44,85	43,90	44,80	46,25	47,18	44,51	**45,18**	**2,50**

Preglednica XXV: Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu z nižjim pH profilom.

*Pri poskusu Mn6sp smo opazili, da je tableta splavala po približno 4 urah poskusa, in ostala na gladini do konca.

Čas [min]	Mn1sp	Mn2sp	Mn3sp	Mn4sp	Mn5sp	Mn6sp*	Mn7sp	Mn8sp	Povprečje	RSD [%]
	[% sprošč. uč.]									
0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0,00**	**0,00**
20	0,08	0,08	0,07	0,08	0,04	0,09	0,09	0,06	**0,08**	**22,43**
40	0,27	0,27	0,26	0,26	0,22	0,27	0,26	0,23	**0,26**	**7,99**
60	0,86	0,77	0,79	0,86	0,78	0,88	0,86	0,63	**0,80**	**10,20**
80	3,14	2,88	2,98	3,16	3,16	3,17	2,79	2,76	**3,00**	**5,80**
100	6,19	5,83	6,03	6,31	6,43	6,20	5,51	5,82	**6,04**	**5,02**
120	9,28	8,79	9,36	9,76	9,79	9,32	8,40	9,02	**9,22**	**5,09**
140	12,33	11,66	12,72	13,06	12,89	12,16	11,27	12,11	**12,27**	**4,99**
160	15,36	14,55	16,10	16,30	16,04	14,87	14,09	15,21	**15,32**	**5,20**
180	18,74	17,93	19,86	19,93	19,50	17,97	17,18	18,62	**18,72**	**5,32**

200	22,63	21,74	23,90	24,09	23,26	21,25	21,02	22,81	**22,59**	**5,14**
220	26,58	25,30	28,18	28,30	27,11	24,77	25,39	26,63	**26,53**	**4,96**
240	30,19	28,85	31,99	31,94	30,63	28,19	29,87	30,73	**30,30**	**4,42**
260	33,31	31,92	35,31	35,09	33,73	31,19	33,86	34,30	**33,59**	**4,27**
280	35,89	34,82	38,39	38,01	36,61	33,89	37,30	37,69	**36,58**	**4,37**
300	38,20	37,44	41,23	40,70	39,38	36,49	40,28	40,84	**39,32**	**4,46**
320	40,49	39,84	43,96	43,24	41,97	38,95	43,19	43,60	**41,91**	**4,56**
340	42,54	41,96	46,62	45,77	44,47	41,22	45,92	46,14	**44,33**	**4,80**
360	44,53	43,98	49,12	48,20	46,85	43,30	48,41	48,56	**46,62**	**5,00**
380	46,48	45,92	51,45	50,54	49,23	45,29	50,72	50,91	**48,82**	**5,16**
400	48,30	47,64	53,48	52,60	51,32	47,05	52,78	52,95	**50,77**	**5,24**

Preglednica XXVI Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu s povprečnim pH profilom.

Čas [min]	**Mp1sp**	**Mp2sp**	**Mp3sp**	**Mp4sp**	**Povprečje**	**RSD [%]**
	[% sprošč. uč.]					
0	0	0	0	0	**0,00**	**0,00**
20	0,05	0,10	0,15	0,10	**0,10**	**37,09**
40	0,18	0,33	0,37	0,38	**0,31**	**28,68**
60	0,72	0,94	0,98	1,13	**0,94**	**17,94**
80	3,11	3,31	3,44	4,05	**3,48**	**11,62**
100	6,46	6,75	6,94	8,09	**7,06**	**10,14**
120	10,21	10,51	10,85	11,75	**10,83**	**6,13**
140	14,05	13,91	14,65	15,23	**14,46**	**4,17**
160	18,05	17,31	18,41	18,60	**18,09**	**3,15**
180	22,14	20,97	22,32	22,21	**21,91**	**2,86**
200	26,26	24,70	26,29	25,83	**25,77**	**2,88**
220	29,67	27,80	30,01	29,41	**29,22**	**3,34**
240	32,69	31,02	33,13	32,62	**32,37**	**2,85**
260	35,57	33,73	36,15	35,46	**35,23**	**2,97**
280	38,18	36,29	38,87	38,58	**37,98**	**3,06**
300	40,75	38,75	41,47	41,30	**40,57**	**3,09**
320	43,24	41,14	43,87	43,93	**43,04**	**3,04**
340	45,71	43,43	46,18	46,45	**45,44**	**3,03**
360	48,03	45,58	48,37	48,82	**47,70**	**3,03**
380	50,26	47,82	50,54	51,01	**49,91**	**2,85**
400	52,15	49,80	52,37	53,06	**51,85**	**2,73**

Preglednica XXVII: Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu z višjim pH profilom.

Čas [min]	Mv1sp	Mv3sp	Mv4sp	Mv5sp	Povprečje	RSD [%]
	[% sprošč. uč.]					
0	0	0	0	0	**0,00**	**0**
20	0,09	0,08	0,11	0,10	**0,09**	**14,40**
40	0,30	0,26	0,34	0,32	**0,30**	**11,83**
60	0,74	0,85	0,97	0,92	**0,87**	**11,58**
80	3,33	3,64	3,76	3,75	**3,62**	**5,55**
100	7,23	7,55	7,58	7,70	**7,51**	**2,66**
120	11,03	11,32	11,42	11,61	**11,35**	**2,14**
140	14,61	14,90	15,02	15,29	**14,96**	**1,87**
160	18,14	18,39	18,45	18,99	**18,49**	**1,93**
180	21,66	22,21	21,62	22,66	**22,04**	**2,24**
200	25,16	26,06	24,85	26,29	**25,59**	**2,70**
220	28,61	29,86	27,91	29,85	**29,06**	**3,32**
240	31,71	33,20	30,98	32,85	**32,19**	**3,19**
260	34,53	36,18	33,62	35,58	**34,98**	**3,24**
280	37,21	38,93	36,13	38,14	**37,60**	**3,20**
300	39,71	41,44	38,53	40,58	**40,07**	**3,10**
320	42,14	43,88	40,91	42,86	**42,45**	**2,94**
340	44,43	46,23	43,13	45,05	**44,71**	**2,89**
360	46,52	48,62	45,31	47,18	**46,91**	**2,94**
380	48,71	50,88	47,46	49,29	**49,09**	**2,89**
400	50,65	52,74	49,34	51,19	**50,98**	**2,76**

Preglednica XXVIII: Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu s pH profilom s fosfatnim pufrom pH 6,8, ko od 140. minute poskusa dalje vzorcev nismo več zbirali v 0,1 M NaOH.

Čas [min]	F2spB	F3spB	Povprečje	RSD [%]
	[% sprošč. uč.]			
0	0	0	**0,00**	**0,00**
20	0,13	0,11	**0,12**	**15,65**
40	0,37	0,32	**0,35**	**10,21**
60	1,13	0,93	**1,03**	**13,47**
80	4,22	3,93	**4,08**	**4,95**
100	7,96	7,48	**7,72**	**4,40**
120	11,15	10,65	**10,90**	**3,21**
140	13,94	13,67	**13,80**	**1,34**

160	16,64	16,48	**16,56**	**0,67**
180	19,22	19,05	**19,13**	**0,63**
200	22,12	21,58	**21,85**	**1,78**
220	25,00	24,20	**24,60**	**2,30**
240	27,75	26,65	**27,20**	**2,86**
260	30,58	29,13	**29,85**	**3,44**
280	33,35	31,61	**32,48**	**3,79**
300	35,74	33,84	**34,79**	**3,86**
320	37,97	36,05	**37,01**	**3,66**
340	40,44	38,14	**39,29**	**4,14**
360	42,60	40,23	**41,41**	**4,05**
380	44,66	42,20	**43,43**	**4,01**
400	46,72	44,03	**45,37**	**4,19**

Preglednica XXIX: Rezultati sproščanja Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet v medijih v skladu s povprečnim pH profilom, ko od 140. minute vzorcev več nismo zbirali v 0,1 M NaOH.

Čas [min]	**Mp1spB**	**Mp2spB**	**Povprečje**	**RSD (%)**
	[% sprošč. uč.]			
0	0	0	**0,00**	**0,00**
20	0,07	0,07	**0,07**	**5,27**
40	0,36	0,27	**0,32**	**22,32**
60	1,13	0,90	**1,01**	**16,19**
80	3,41	3,66	**3,53**	**4,94**
100	6,65	7,66	**7,16**	**9,97**
120	9,96	11,45	**10,71**	**9,86**
140	13,37	14,88	**14,12**	**7,53**
160	16,91	18,37	**17,64**	**5,87**
180	20,57	22,03	**21,30**	**4,83**
200	24,38	26,06	**25,22**	**4,70**
220	27,87	29,86	**28,86**	**4,86**
240	30,92	32,90	**31,91**	**4,40**
260	33,71	35,60	**34,66**	**3,85**
280	36,29	38,02	**37,15**	**3,30**
300	38,74	40,29	**39,51**	**2,78**
320	41,06	42,45	**41,76**	**2,37**
340	43,31	44,50	**43,91**	**1,92**
360	45,44	46,52	**45,98**	**1,66**
380	47,47	48,38	**47,93**	**1,34**
400	49,14	50,03	**49,58**	**1,26**

Naredili smo tudi primerjavo sproščanja iz ogrodnih tablet za natrijev diklofenakat in ibuprofen po pH profilu s fosfatnim pufrom pH 6,8. Uporabili smo 250 mg tablete (poglavje 3.2.3.8), vendar samo v eni paralelki. Preglednica XXX prikazuje odstotek sproščene učinkovine.

Preglednica XXX: Sproščanje iz ogrodnih tablet, stisnjenih z manjšim pečatom, s 25% vsebnostjo natrijevega diklofenakata oziroma ibuprofena, v medijih v skladu pH profilu s fosfatnim pufrom s pH 6,8.

Čas [min]	F1spmD (25% Na-diklofenakat)	F1spmI (25% ibuprofen)
	[% sprošč. uč.]	
0	0	0
20	0,17	0,65
40	0,47	1,55
60	1,13	3,01
80	4,43	5,63
100	8,56	8,18
120	12,18	10,89
140	15,75	13,44
160	19,22	15,70
180	22,48	17,87
200	25,70	19,97
220	29,25	21,90
240	32,13	23,74
260	35,02	25,60
280	37,73	27,40
300	40,51	29,28
320	43,06	30,97
340	45,47	32,68
360	47,90	34,45
380	50,21	36,27
400	52,56	37,95

5 RAZPRAVA

V okviru naloge smo oblikovali pH profile po podatkih iz literature, jih s pomočjo pufrov ter različnih kislih in bazičnih raztopin simulirali na pretočnem sistemu s kroglicami, ter nato izvedli še sproščanja natrijevega diklofenakata oziroma ibuprofena iz ogrodnih tablet.

5.1 OBLIKOVANJE pH PROFILOV PO LITERATURNIH VIRIH

Po študiji več literaturnih virov (4, 5, 6) smo določili povprečne čase zadrževanja FO na posameznih delih prebavnega trakta za simulirane pH profile: do 45. minute kislo okolje želodca, nato hiter skok ob simuliranem prehodu v duodenum (približno 2 minuti za skok), nato 90 minut prvega platoja (ponazarjanje začetnega dela tankega črevesa), postopen dvig (v 80 minutah) do drugega platoja z višjim pH (ponazarjanje končnega dela tankega črevesa), vzdrževanje drugega platoja 145 minut, nato pa hiter padec (približno 2 minuti) pH za 1,5 enote ob prehodu v kolon, kjer je nato pH spet konstanten do konca poskusa (40 minut).

Glede pH vrednosti pa smo se odločili za tri različne variante na podlagi tabele iz literaturnih virov-povprečni pH profil (glede na Preglednico IX v Rezultatih) in pa nekoliko višji in nižji pH profil. Povprečni pH profil je nastavljen po dejansko izračunanem povprečju individualnih pH vrednosti, izmerjenih v fizioloških pogojih pri zdravih posameznikih, kot je opisano v poglavjih 1.1.3, 3.1, 4.1. Za višji profil smo nato vzeli najvišjo individualno vrednost v območju, ki smo ga poimenovali prvi pH plato, ter nato še najvišjo individualno vrednost v območju drugega platoja. Po enakem principu smo izbrali tudi najnižjo individualno vrednost za oba platoja za nižji pH profil.

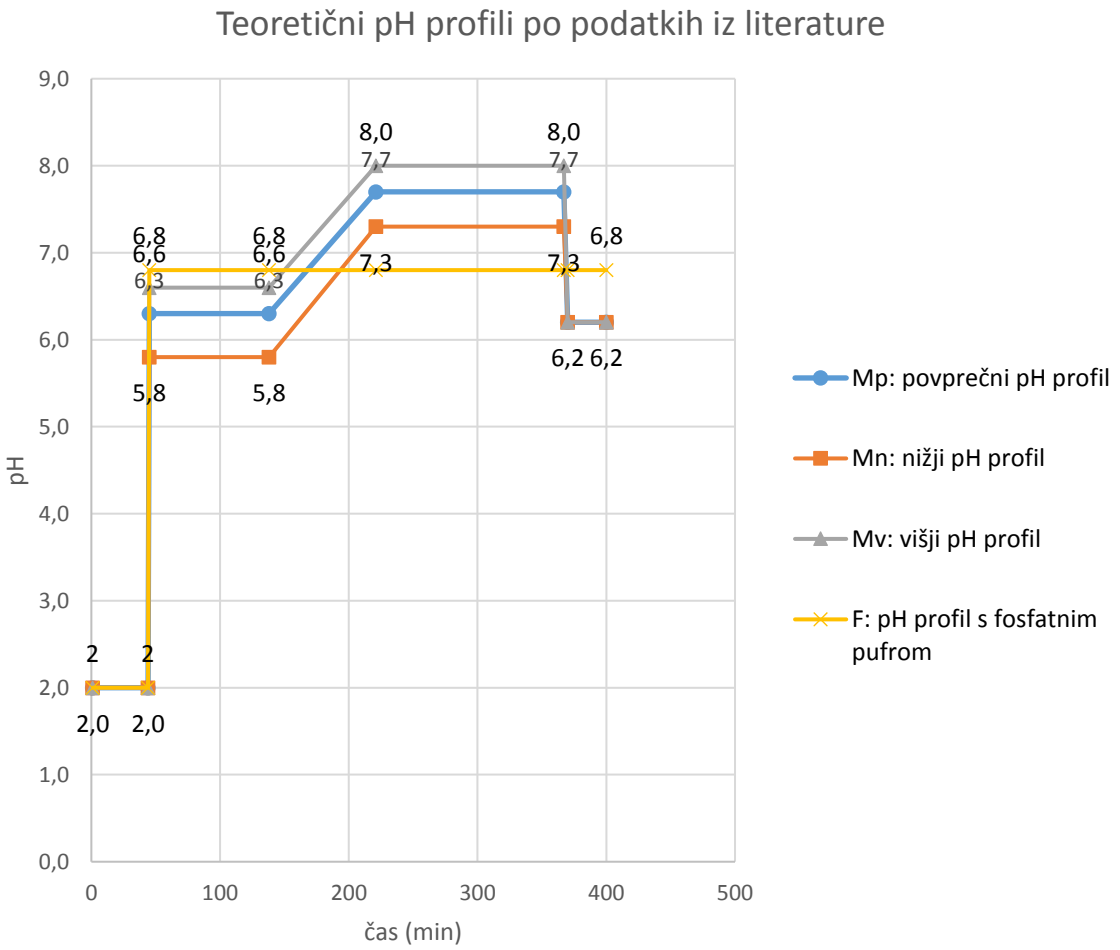
Za simulacijo zgoraj opisanih pH profilov smo uporabili sestavljene citratno-fosfatne pufre, ki kot sestavljeni pufri omogočajo širše območje pufranja in lahko z njimi dosežemo širši spekter pH med 3 in 8.

Poleg določenega pH, smo se želeli vsaj okvirno približati tudi fiziološkim vrednostim pufrskih kapacitet tekočin v GIT. Na podlagi predhodno izvedene magistrske naloge na katedri (7), smo si zastavili vrednosti med 4 in 6 mmol/L/ΔpH za simuliranje tankega črevesa; zaželeno je, da od simuliranega duodenuma do ileocekalne zaklopke pufrske kapacitete rahlo naraščajo. Za simuliranje debelega črevesa, smo ciljali na pufrske kapacitete, ki so bile v našem primeru so okrog 14 mmol/L/ΔpH, v literaturi pa poročajo tudi o višjih vrednostih: med 30-40 mmol/L/ΔpH, pregled vrednosti v (7).

Za primerjavo pa smo želeli uporabiti tudi pogosto uporabljan fosfatni pufer s pH 6,8. Zato smo oblikovali tudi pH profil, kjer smo obdržali enak začetni del (45 minut v kislem okolju), sledil je skok na pH 6,8 (prav tako izveden s 55 mM Na_3PO_4), nato pa smo do konca poskusa samo vzdrževali pH na tej vrednosti (nismo simulirali padca pH in kolonskega dela).

Opisano je prikazano na Sliki 2.

V nadaljevanju (poglavja 5.2, 5.3, 5.4) je natančneje opisana izdelava povprečnega pH profila, ki smo ga izdelali najprej. Po enakem principu pa so bili nato izdelani tudi ostali profili.



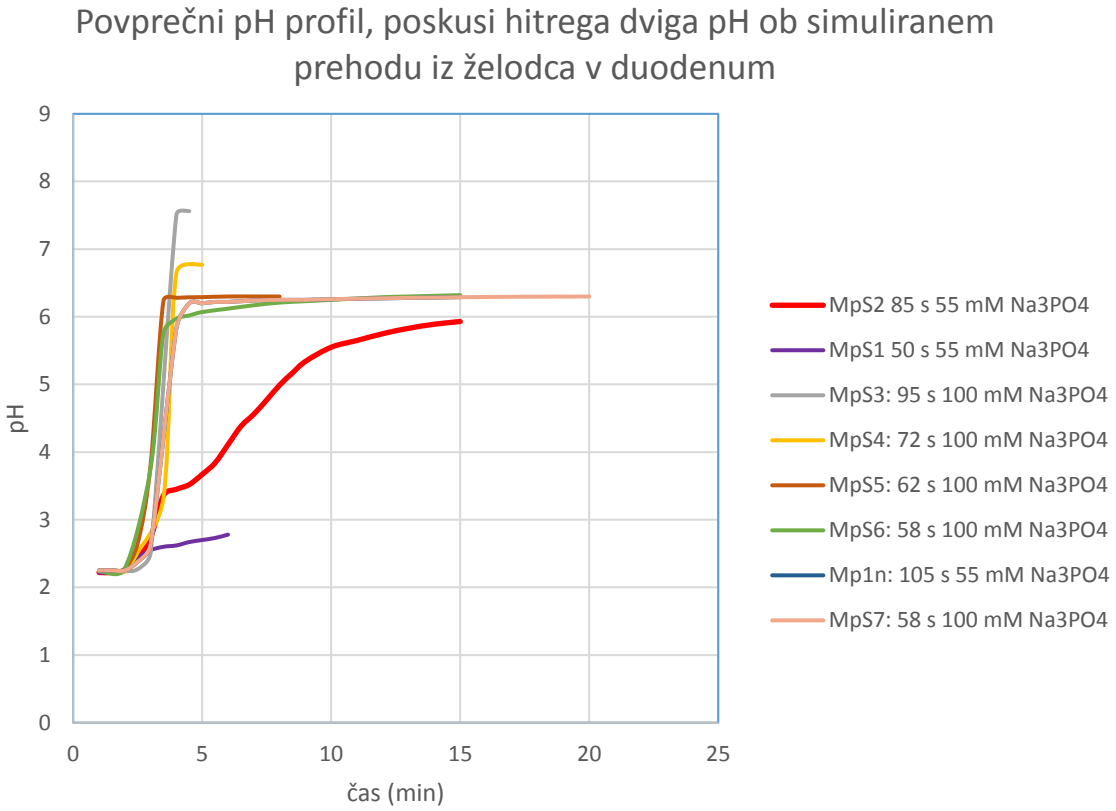
Slika 2: Predlogi za tri pH profile na podlagi študije *»in vivo«* izmerjenih pH vrednosti iz literature (4, 5, 6) in za primerjavo še pH profil s pogosto uporabljanim fosfatnim pufrom. Ob krivuljah so navedene vrednosti pH.

5.2 SIMULACIJA HITREGA NARAŠČANJA pH OB PREHODU IZ ŽELODCA V DUODENUM

S hitrim dvigom pH iz kislega medija (0,01 M HCl) do vrednosti pH 5,8-6,8 smo želeli ponazoriti stanje v prebavnem traktu, ko farmacevtska oblika zapusti želodec in preide v duodenum. Za ta namen smo uporabili raztopine Na_3PO_4.

Najprej smo poskušali s 55 mM Na_3PO_4 (poskusa MpS1 in MpS2), nato pa z bolj koncentrirano 100 mM raztopino (poskusi MpS3-MpS6). Ko smo se s poskusom MpS6 zelo približali želenemu skoku, smo spet prešli na manj koncentrirano 55 mM raztopino

Na_3PO_4, saj je z le-to mogoč boljši nadzor nad dvigom pH. Pri 100 mM raztopini Na_3PO_4 namreč vsaka kapljica več ali manj povzroči precejšnje razlike v pH, zato je bolj primerna 55 mM Na_3PO_4, kjer so razlike manjše in je zato možnih manj eksperimentalnih napak.
Poskusa MpS1 in MpS2 prikazujeta premajhno količino dovedenega 100 mM Na_3PO_4, poskusa MpS3 ter MpS4 pa prevelik skok, ki preseže pH vrednost prvega pH platoja, ki je 6,3. Poskusi MpS5, MpS6 in MpS7 prikazujejo ustrezno hiter porast pH.
S poskusom Mp1n smo najbolj uspešno dosegli želeni hitri dvig iz pH 2,2 na 6,3. Zgoraj omenjeni poskusi skoka so primerjani na Sliki 3. Natančnejši opis izvedbe in izmerjene pH vrednosti v odvisnosti od časa so prikazani v poglavjih 3.2.3.7 in 4.4 (Preglednici V in XVII).



Slika 3: Poskusi hitrega dviga pH v odvisnosti od časa z raztopino Na_3PO_4 dveh različnih koncentracij. V legendi so navedeni časi dovajanja in koncentracije Na_3PO_4, uporabljenih pri posameznih poskusih. Mp1n predstavlja uspešno izveden hiter skok.

Pri poskusih F5, Mp6, Mv4 in Mn5 smo elektrodo potopili v delovno čašo šele proti koncu dviga pH s Na_3PO_4, ko je bil pH že okrog 5. Tako smo želeli preveriti, ali na meritve vpliva, da je elektroda najprej v kislem mediju, saj je bila pred začetkom poskusa vedno

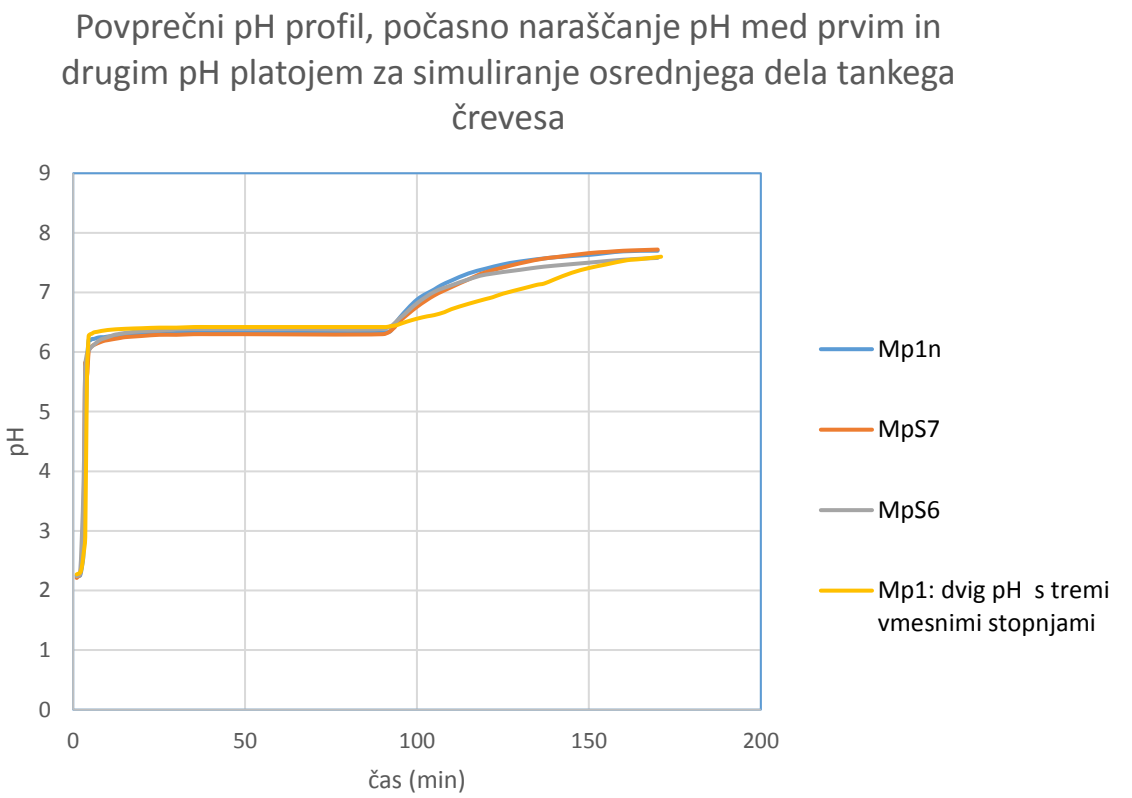
umerjena na pH 7. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da so bile meritve pri višjih pH vrednostih pravilne.

5.3 SIMULACIJA POČASNEGA NARAŠČANJA pH VZDOLŽ TANKEGA ČREVESA

Po zgoraj opisanem hitrem dvigu pH (simuliranje prehoda v duodenum) je sledil prvi plato, kjer smo 90 minut vzdrževali konstanten pH in tako ponazarjali stanje pH v začetnem delu tankega črevesa. Ker študije (Uvod, 1.1.3) poročajo o postopnem dvigu pH vzdolž osrednjega dela tankega črevesa, smo želeli to izvesti tudi na našem profilu.

Najprej smo poskusili tako, da smo po vzdrževanju prvega pH platoja s pufrom 1 začeli neposredno dovajati pufer 2 z višjim pH (za drugi pH plato). To prikazujejo poskusi Mp1n, MpS7 in MpS6 na Sliki 4.

Ugotovili smo, da je dvig pH potekel v ustreznem časovnem okviru (približno 80 minut) glede na literaturne vire, vendar pa ni bil dovolj enakomeren. Kot je razvidno iz Slike IV, je namreč pH najprej naraščal prehitro, nato pa se upočasnjeval, dokler ni bil dosežen plato. Zato smo s poskusom Mp1 poskusili drugače: Pufer 1 in pufer 2 (prvi s pH 6,3 in drugi 7,6) smo zmešali v razmerjih 3:1; 1:1 in 1:3 in nato te mešanice zaporedno dovajali, vsako po 15 minut. Potem smo začeli z dovajanjem čistega drugega pufra in v želenem času dosegli plato. Kot vidimo na Sliki 4 je bilo naraščanje tokrat precej bolj enakomerno, kar je ustrezalo našemu pH profilu. Natančen opis izvedbe poskusa Mp1 je v poglavju 3.2.3.7 v Preglednici VI, izmerjene pH vrednosti v odvisnosti od časa pa v 4.5 v Preglednici XVIII.



Slika 4: Poskusi enakomernega dviga pH med prvim in drugim pH platojem. Poskusi Mp1n, MpS6 in MpS7 so bili izvedeni z zaporednim dovajanjem najprej pufra 1 in nato pufra 2. Poskus Mp1 je bil izveden s tremi vmesnimi stopnjami.

5.4 SIMULACIJA HITREGA PADCA pH OB PREHODU IZ TANKEGA V DEBELO ČREVO

Drugi pH plato ponazarja stanje v terminalnem delu tankega črevesa in ko je farmacevtska oblika pred ileocekalno zaklopko. Sledi prehod v kolon, kjer v literaturnih virih zasledimo, da pade vrednost pH približno za enoto in pol (9).

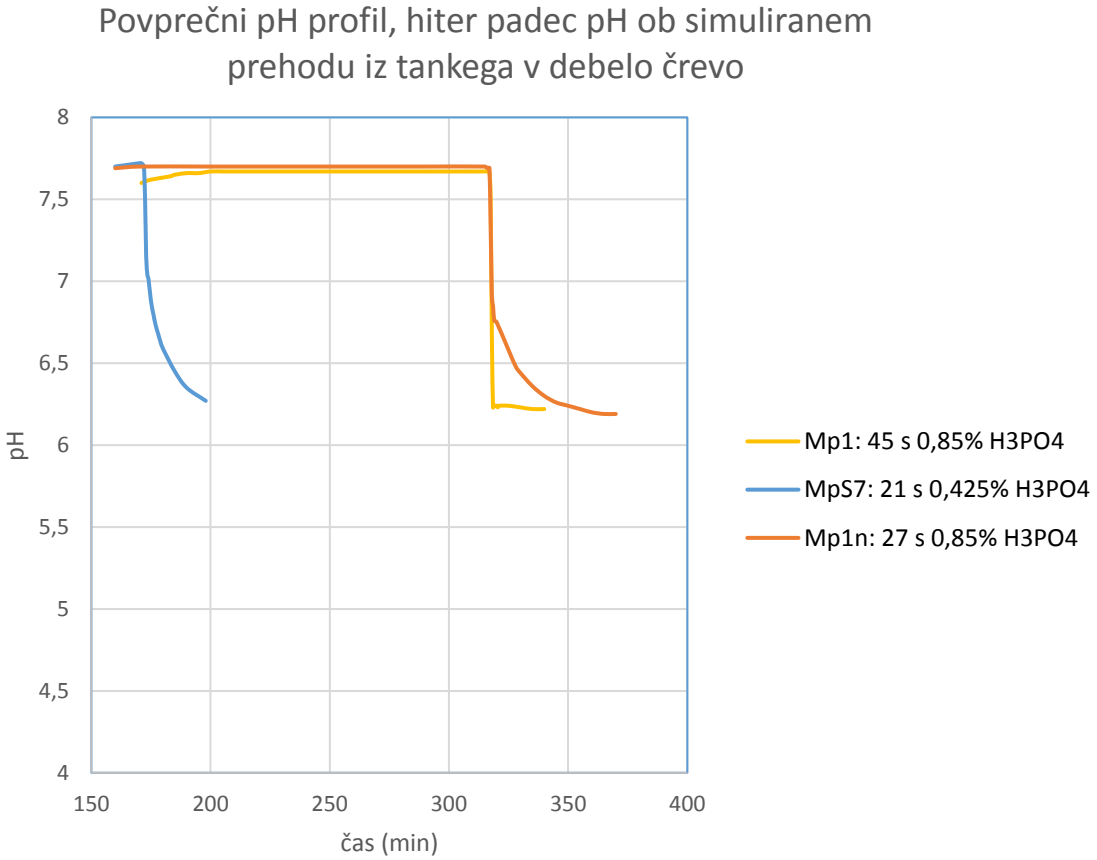
To smo želeli ponazoriti z dovajanjem ortofosforne kisline H_3PO_4. Uporabili smo 0,425% in 0,85% raztopino. Ugotovili smo, da glede na kapacitete uporabljenih pufrov (med 4 in 7 mmol/L/ΔpH, oziroma večje) 0,425% raztopina ni primerna, saj majhne količine še ne spremenijo pH raztopine, za bolj učinkovito se je izkazala uporaba 0,85% raztopine.

MpS7 na Sliki 5 prikazuje poskus, kjer smo samo dosegli drugi plato, nismo pa ga vzdrževali, temveč smo že v 170. minuti poskusa začeli dovajati ortofosforno kislino. Ker je bil to en od začetnih poskusov, smo dovajali 0,425% H_3PO_4 21 sekund, kar se je izkazalo kot premalo.

Mp1n je poskus, kjer smo dosegli in vzdrževali drugi pH plato do 315. minute poskusa, nato pa smo uvajali ortofosforno kislino, vendar še vedno premalo količino, zato padec ni bil dovolj oster.

Pri poskusu Mp1 smo prav tako vzdrževali drugi pH plato do 315. minute poskusa, nato smo uvajali ortofosforno kislino v dovolj veliki količini, da smo dosegli željen hiter padec iz približno 7,7 na 6,2 (za 1,5 pH enote). Natančni opis izvedb poskusov so v poglavju 3.2.3.7 (Preglednici V, VI) in meritve pH v 4.6 (Preglednica XIX).

Na Sliki 5 so prikazani zgoraj omenjeni poskusi.



Slika 5: Poskusi, s katerimi smo želeli določiti primerno koncentracijo in čas dovajanja ortofosforne kisline, da bi pH v nekaj minutah padel za približno 1,5 enote. V legendi je naveden čas dovajanja in koncentracije ortofosforne kisline, uporabljene v posameznem poskusu. Mp1 predstavlja uspešen hiter padec pH.

Ko smo uspešno simulirali povprečni pH profil z zgoraj omenjenimi koraki, smo simulirali še višji in nižji pH profil. Uporabili smo enake raztopine 55 mM Na_3PO_4 in 0,85% H_3PO_4 ter citratno-fosfatne pufre, ki so imeli ustrezne pH. Ker razlike v pH pufrov niso velike (pufri za prvi pH plato 5,8, 6,4, 6,6 in za drugega pH 7,3, 7,7, 8,0), smo le za nekaj sekund prilagodili dovajanje Na_3PO_4 in H_3PO_4 za ustrezen dvig oziroma padec pH.

Za simulacijo pH profila s fosfatnim pufrom smo isti čas dovajali 55 mM Na_3PO_4 kot pri simulaciji povprečnega pH profila in dosegli ustrezen dvig pH.

5.5 TESTI SPROŠČANJA

5.5.1 VPLIV LOVLJENJA VZORCEV V RAZTOPINO NaOH NA REZULTATE SPROŠČANJA

Odločili smo se, da za eksperimentalni del te naloge tekom poskusov sproščanja vzorce zbiramo v 0,1 M NaOH.

V ogrodnih tabletah je bil diklofenak, ki je šibko kisla učinkovina s pKa 3,8, v obliki natrijeve soli (sol šibke kisline z močno bazo). V vodnem mediju začne tableta rahlo nabrekati in na površini se tvori difuzna plast. V difuzni plasti, ki nastane, ko je tableta v 0,1 M HCl, je pH višji kot v okoliški raztopini (pH 5-6). Pride do raztapljanja natrijevega diklofenakata (ionizirana oblika), ki difundira iz difuzne plasti v okolico, nato pa se zaradi kislega pH oborijo majhni skupki (precipitati) neioniziranega diklofenaka. V fizioloških pogojih ti skupki nastajajo v želodcu. Nato majhni precipitati diklofenaka potujejo vzdolž prebavnega trakta in ob višjem pH ponovno ionizirajo in se raztopijo (prehod v duodenum oziroma v tanko črevo). Ker so ti delci zelo majhni, se v tankem črevesu hitro raztopijo, prej kot bi se kristali kisline, če ne bi bila v obliki soli. Z uporabo 0,1 M NaOH smo želeli zagotoviti, da je natrijev diklofenakat v vzorcu vedno povsem raztopljen (tudi precipitati), da lahko celokupni sproščeni učinkovini izmerimo absorbanco in pravilno določimo njeno koncentracijo v vzorcu. Simuliramo namreč *»in vivo«* situacijo: absorpcijo učinkovine v tankem črevesu. S tem ko črpamo medij s pretokom 2 mL/min (kar ustreza pretoku tekočin iz želodca v duodenum) odstranjujemo iz čaše sproščeno učinkovino, tako kot bi se v fizioloških pogojih preko absorpcije odstranjevala iz tankega črevesa.

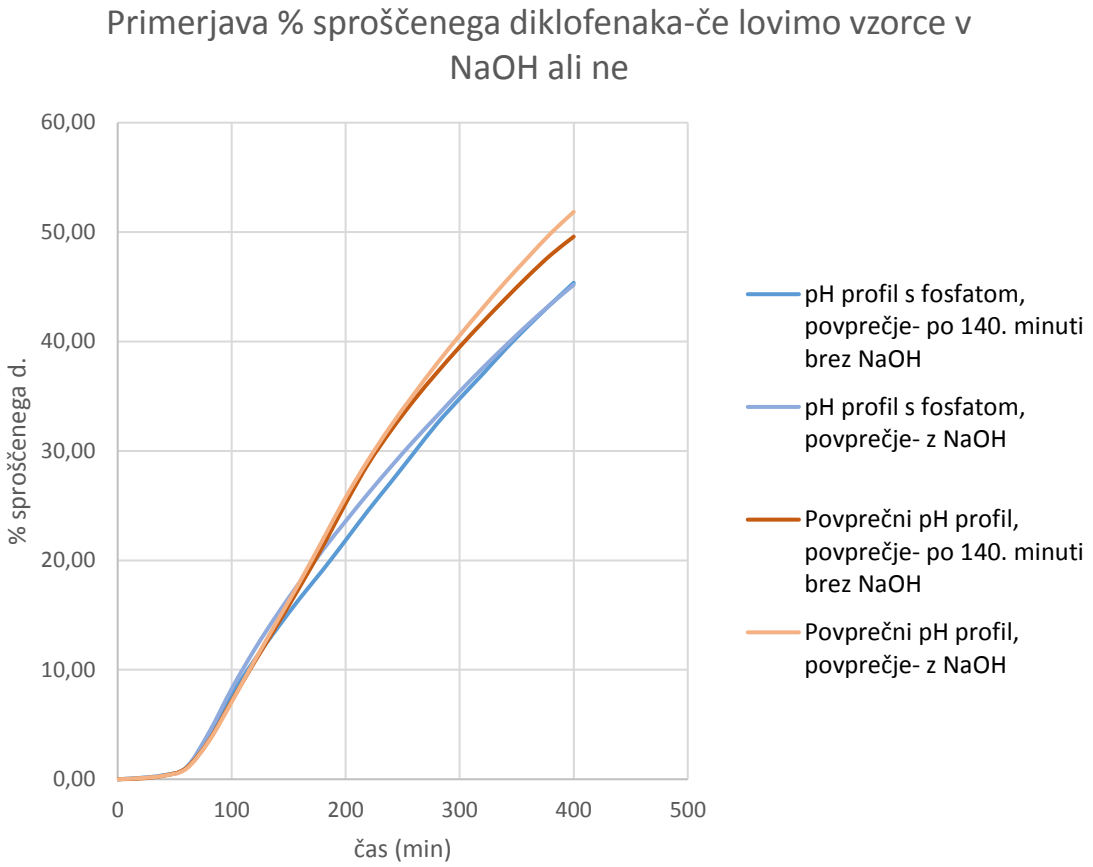
Zanimalo pa nas je, ali bi dobili drugačne rezultate, če vzorcev pri višjih pH (po 140. Minuti) več ne bi zbirali v NaOH. Za štiri pufre, uporabljene pri simulaciji pH profila s fosfatnim pufrom s pH 6,8 ter povprečnega pH profila, smo določili umeritvene premice brez NaOH. Pri tem smo pripravili osnovno raztopino 10 mg natrijevega diklofenakata v 100 mL bučki in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Nato smo osnovno raztopino redčili in dobili raztopine s koncentracijami med 1 in 50 mg/L za pufre s pH 6,4, 6,8 in 7,7, ter od 1 do 15 mg/L za pufer s pH 6,2 (Preglednice X, XI, XII, XIII). Pri pripravi umeritvenih premic v pufrih upoštevamo, da mora biti vodna raztopina vsaj 20-krat redčena, kar v našem primeru pri nekaterih redčitvah ni veljalo. Vendar ima diklofenak

zelo podobne umeritvene premice v pufrih s pH v tem območju, zato smo se odločili za ta postopek, saj napaka ni velika.

Naredili smo po dve paralelki sproščanja za pH profil s fosfatnim pufrom ter povprečni pH profil, kjer od 140. minute dalje vzorcev nismo lovili v NaOH, temveč v prazen stekleni valj. Za spremembo pri 140. minuti smo se odločili, ker je tam pH v delovni čaši že med 6 in 6,5, kar je toliko višje od pKa diklofenaka (pKa= 3,8), da se raztapljajoči natrijev diklofenakat ne obarja več.

Rezultate lahko primerjamo na Sliki 6 in kot je razvidno, do večjih razlik ni prišlo. Pri pH profilu s fosfatom je vidna manjša razlika od 160. pa do približno 280. minute poskusa, kjer je sproščanje v primeru brez NaOH nekoliko počasnejše, nato pa se krivulji spet združita. Na koncu tako je v obeh primerih celokupno sproščenih približno 45% učinkovine.

V primeru povprečnega pH profila pa je nekaj vidne razlike samo ob koncu sproščanja, kar na koncu pomeni 2% razlike (absolutno); približno 50% sproščene učinkovine v primeru brez NaOH in 52% v primeru uporabe raztopine NaOH. Razlike so torej zelo majhne. Zato lahko zaključimo, da nismo opazili pomembnih razlik v profilih sproščanja ob uporabi NaOH v primerjavi z neuporabo NaOH pri višjih pH (pH nad 6).



Slika 6: Primerjava povprečnih grafov sproščanja: pH profil s fosfatom in povprečni pH profil, če smo vzorce lovili v 0,1 M NaOH oziroma, če jih od 140. minute dalje več nismo.

5.5.2 GRAFI SPROŠČANJA

Glede na oblikovane štiri različne pH profile nas je zanimalo, kako se bodo (relativno majhne) razlike v pH odražale na grafih sproščanja. Za sproščanje po posameznem profilu je bilo izvedenih več paralelk, izračunano povprečje pa je prikazano na Sliki 7 (leva y os). Prav tako so na sliki pH profili (desna y os) ujemajočih barv. Slika 7 prikazuje razlike v grafih sproščanja, glede na uporabo različnih pH profilov.

Komentar relativne standardne deviacije (RSD)

Kot je razvidno iz rezultatov, je RSD največji v prvih 40 minutah poskusov (okrog 15 %, tudi do 30%), ko je bila tableta v kislem okolju. Takrat se je sprostilo le malo učinkovine, zato so nihanja relativno večja. RSD nato tekom poskusov pada in doseže končno vrednost pod 5%.

Pri poskusu Mn6sp smo opazili, da je tableta splavala po približno 4 urah poskusa, in ostala na gladini do konca. Po 400. minutah poskusa se je pri omenjeni paralelki sprostilo najmanj učinkovine (47,05%), vendar glede na izračunano povprečje osmih paralelk še vedno primerljivo z ostalimi (povprečje po 400. minutah 50,77%, RSD 5,24%).

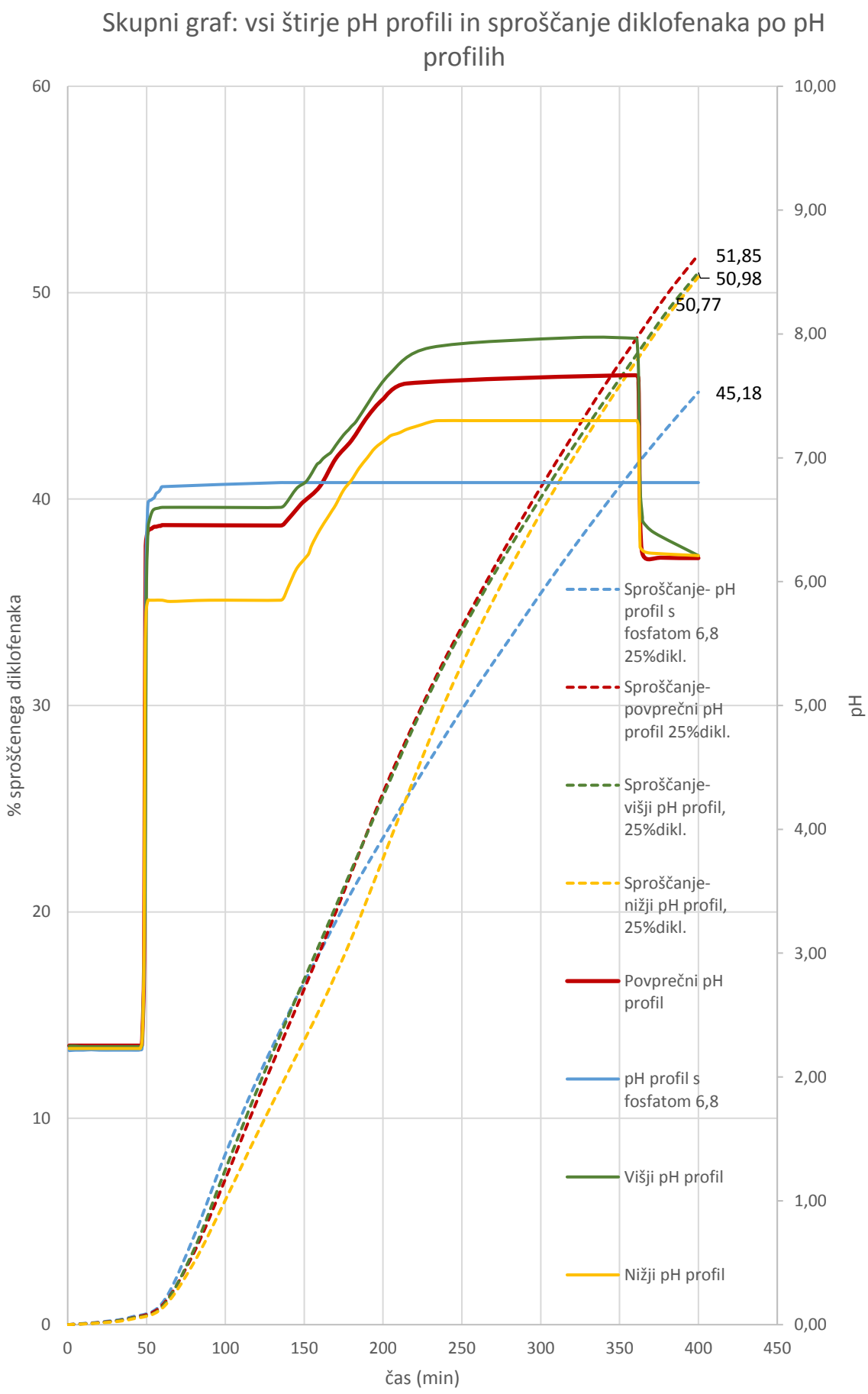
Paralelke poskusov F2sp, F6sp, F7sp, Mv2sp in F1spB niso vključene v rezultate zaradi eksperimentalnih napak pri delu: pri poskusu F2sp smo 5 sekund predolgo dovajali Na_3PO_4, zato se je pH dvignil nad prvi pH plato, kar je vplivalo na večji odstotek sproščene učinkovine. Pri poskusih F6sp, F7sp, Mv2sp in F1spB je bil volumen medija v čaši tekom poskusa neustrezen (ni bil 40 mL), zato smo prav tako dobili napačno koncentracijo učinkovine v vzorcu.

Kot vidimo, že malo višji pH pufra (npr. 6,80 v primerjavi s 6,45) opazno vpliva na krivuljo sproščanja; naklon je večji. Ko se pH začne dvigovati iz prvega na drugi pH plato, se to začne takoj odražati kot višja hitrost sproščanja. Vendar pa se končen odstotek sproščene učinkovine iz tablete, po sproščanju v medijih v skladu z nižjim, povprečnim in višjim pH profilom, ne razlikuje bistveno. V vseh treh primerih je po 400 minutah poskusa sproščenega med 50 in 52% diklofenakata.

Začetnih 45 minut poskusa poteka v vseh primerih enako, zato kot vidimo na Sliki 7, tu ni razlik v sproščanju. Razlike so predvsem med 60. in 250. minuto poskusa, po izvedenem hitrem dvigu pH, prvem pH platoju in počasnem dvigu pH do drugega platoja. Če opazujemo potek pH profilov in pripadajoče krivulje sproščanja po hitrem dvigu pH, v območju prvega platoja in ob počasnem dvigovanju pH, vidimo, kako se te spremembe takoj odražajo v hitrosti sproščanja učinkovine. Opazimo lahko, da se grafi pH profilov in krivulje sproščanj med seboj križajo (sekajo) ob času, ki ustreza menjavi medija. Kot primer: 160. minuta, pH profil s fosfatnim pufrom in povprečni pH profil se sekata, krivulja sproščanja po povprečnem pH profilu pa seka krivuljo pH profila s fosfatom z zamikom približno 20 minut, ter se nato dvigne nad njo. Do zamika pride, ker se pH v čaši dvigne nekaj minut po začetku dovajanja medija z višjim pH in ker zbiramo vzorce v merilni valj v 20-minutnih intervalih.

Pomen teh opažanj je v tem, da so povprečni, višji in nižji pH profil zasnovani na vrednostih, izmerjenih na zdravih ljudeh, kar bi lahko pomenilo, da že fiziološke variabilnosti v pH vzdolž tankega črevesa povzročijo različne profile sproščanja po zaužitju farmacevtske oblike z diklofenakatom. Topnost diklofenaka v območju vrednosti, ki jih zasledimo v tankem črevesu, se namreč veča z višanjem pH, posledično pa se sprosti

različen odstotek učinkovine iz tablete. Glede na povezavo med deležem sproščene učinkovine in absorpcijo le-te v krvni obtok, pa bi lahko prišlo tudi do nihanj v plazemskih vrednostih učinkovine.


Skupni graf: vsi štirje pH profili in sproščanje diklofenaka po pH profilih
% sproščenega diklofenaka
pH
čas (min)
0
10
20
30
40
50
60
0,00
1,00
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
7,00
8,00
9,00
10,00
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
51,85
50,98
50,77
45,18
Sproščanje- pH profil s fosfatom 6,8 25%dikl.
Sproščanje- povprečni pH profil 25%dikl.
Sproščanje- višji pH profil, 25%dikl.
Sproščanje- nižji pH profil, 25%dikl.
Povprečni pH profil
pH profil s fosfatom 6,8
Višji pH profil
Nižji pH profil

Slika 7: Na x osi je naveden čas v minutah, na desni y osi pa so nanešene pH povprečne vrednosti vseh štirih pH profilov. Na levi y osi vidimo odstotek sproščene učinkovine, kar v odvisnosti od časa predstavlja povprečne grafe sproščanja diklofenakata iz tablet. Pripadajoči se pH profili in krivulje sproščanja so barvno usklajeni.

5.6 PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA ZA NATRIJEV DIKLOFENAKAT IN IBUPROFEN

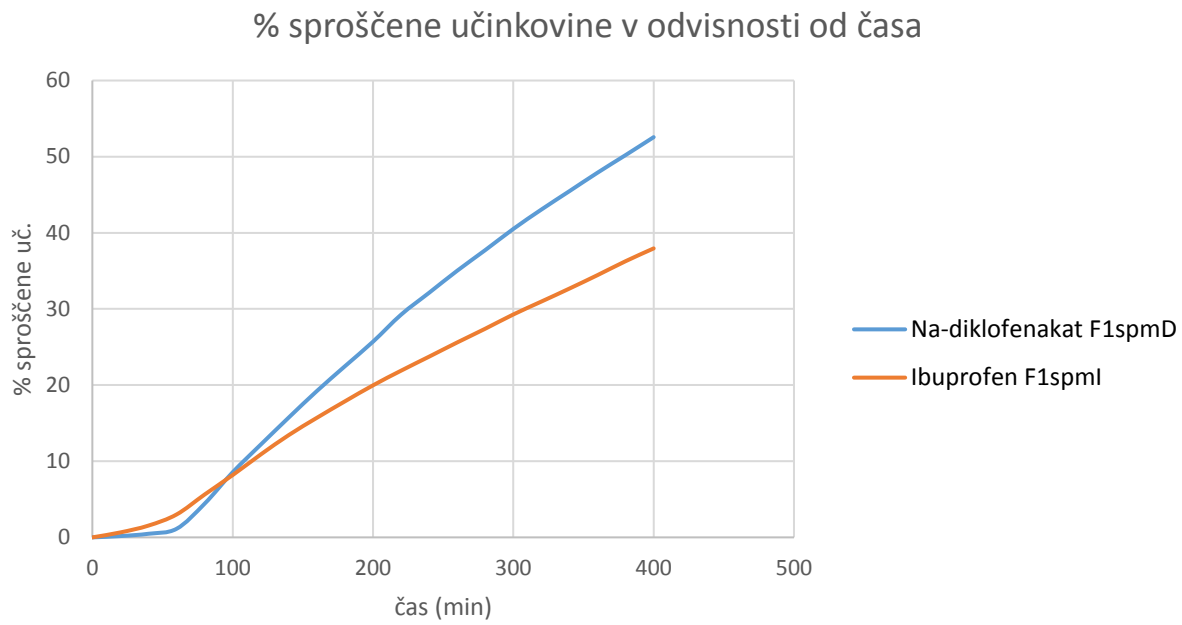
S poskusoma F1spmD in F1spmI smo primerjali sproščanje po istem profilu za dve različni NSAID učinkovini: natrijev diklofenakat in ibuprofen. Uporabili smo pH profil s fosfatom s pH 6,8 in tablete iz serij, kjer smo uporabili manjši, 10 mm pečat (250 mg ogrodne tablete).

Poskus smo začeli s 45 min v 0,01 M HCl, nato 105 sekund dovajali 55 mM Na_3PO_4 in nadaljevali s fosfatnim pufrom s pH 6,80. Ob tem je tableta z ibuprofenom po približno eni uri poskusa splavala in do konca lebdela na površini, medtem ko je tableta z diklofenakatom ostala na steklenih kroglicah na dnu čaše.

Kot vidimo na Sliki 8, se v kislem mediju sprosti iz tablete več ibuprofena, kot diklofenakata. Nato pa se z dvigovanjem pH v približno 100. minuti poskusa krivulja sproščanja diklofenakata dvigne nad krivuljo ibuprofena (hitrost sproščanja diklofenakata je večja), in do konca poskusa je razlika v skupnem odstotku sproščene učinkovine približno 15%.

Dobljeni rezultat bi lahko pojasnili z različnima vrednostma pKa; diklofenak ima vrednost pKa 3,80 in ibuprofen 4,91 (pri 25ºC) (10, 16). Vrednost pKa vpliva na stopnjo ionizacije, topnost obeh učinkovin pa se spreminja s pH medija. V kislem sta oba slabo topna. Na odstotek sproščene učinkovine pa vpliva pa tudi topnost neionizirane oblike. Ker je tableta z ibuprofenom splavala in večino poskusa ni bila v stiku s steklenimi kroglicami, ni prišlo do trenja, ki bi sproti odstranjevalo nabreklo plast tablete in tako pospeševalo raztapljanje ter sproščanje učinkovine. Poleg tega smo izvedli samo eno paralelko sproščanja. Eden od glavnih razlogov za to je ugotovitev, da metoda spektrofotometrije za določanje ibuprofena v vzorcu ni bila najprimernejša. Okoli valovne dolžine 221 nm, kjer ima ibuprofen λ_{max} (absorpcijski maksimum ibuprofena), namreč absorbira molekula ibuprofena, pa tudi nekatere komponente pufra. To otežuje pravilno določitev koncentracije ibuprofena v vzorcu, zato bi bilo dobro uporabiti drugo metodo, npr. analizo vzorcev s HPLC (»high performance liquid chromatography«), ki loči različne spojine med seboj. Zato s tem poskusom v sklopu naše naloge nismo nadaljevali, ugotovili pa smo, da imata različni

učinkovini različen profil sproščanja V našem primeru smo uporabili sol diklofenaka in neioniziran ibuprofen, kar zagotovo vpliva tudi na profile sproščanja.



Slika 8: Grafa sproščanja natrijevega diklofenakata in ibuprofena iz ogrodnih tablet s 25% vsebnostjo učinkovine, v odvisnosti od časa.

6 SKLEPI

- V sklopu magistrske naloge smo na podlagi literaturnih podatkov izdelali postopek zaporedne menjave medijev za simulacijo pH profila od želodca do kolona v stanju na tešče. Zanimalo nas je predvsem spreminjanje pH vzdolž tankega črevesa.
- Za izdelavo pH profilov so se izkazali kot uporabni: vodna raztopina klorovodikove kisline (HCl), raztopine Na_3PO_4 in H_3PO_4, ter redčeni citratno-fosfatni pufri.
- Z 0,01 M HCl smo simulirali kislo okolje v želodcu na tešče.
- Za hiter dvig pH je najuporabnejša 55 mM raztopina Na_3PO_4, za hiter padec pH pa 0,85% H_3PO_4.
- Z redčenimi citratno-fosfatnimi pufri smo dosegli želene pH in pufrske kapacitete za simulacijo medijev v tankem črevesu ter kolonu.
- Za simulacijo počasnega dviga pH v osrednjem delu tankega črevesa (približno 1,5 pH enote v 80 minutah) je primeren postopek z zaporednim dovajanjem mešanic dveh citratno-fosfatnih pufrov v različnih razmerjih.
- Uporaba 0,1 M NaOH pri zbiranju vzorcev z natrijevim diklofenakatom pri višjih pH (pH nad 6) ni imela vpliva na izmerjeno koncentracijo sproščene učinkovine, končne razlike v rezultatih sproščanja, ko smo vse vzorce zbirali v raztopino NaOH, oziroma ko jih po 140. minuti poskusa več nismo, so zelo majhne.
- Že majhne spremembe v pH profilu se odražajo na grafu sproščanja natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet. Ko se pH raztopine začne dvigovati (na primer že razlika med pH 6,45 in 6,80), se to začne takoj odražati tudi na krivulji sproščanja, naklon postane večji. Vendar se končni odstotki sproščene učinkovine iz tablete, ko je sproščanje potekalo v skladu z nižjim, povprečnim in višjim pH profilom, ne razlikujejo bistveno: končne vrednosti po 400 minutah sproščanja so med 50 in 52%.
- Če rezultate sproščanja prenesemo na *»in vivo«* situacijo bi to lahko pomenilo, da že fiziološke variabilnosti pH okolja vzdolž tankega črevesa, med posamezniki in znotraj posameznika, povzročijo različne profile sproščanja diklofenakata iz *»per os«* zaužite farmacevtske oblike.

7 VIRI

1. Fritsch H, Kuehnel W: Color Atlas of Human Anatomy, Volume 2: Internal Organs 5th Revised edition (2007). Thieme Medical Publishers; Stuttgart, Germany, 1957; 141-208.
2. Dahmane R: Ilustrirana anatomija. Prebavila, digestivni aparat. 1. izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1998; 97-107.
3. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP: Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. Pharmaceutical Research 1998; 15 (1): 11-22
4. Koziolek M, Grimm M, Becker D, Iordanov V, Zou H, Shimizu J, Wanke C, Garbacz G, Weitschies W: Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the IntelliCap® System. Journal of Pharmaceutical Sciences 2014; 104 (9): 2855-63.
5. Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD: Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. Gut 1988; 29: 1035-1041.
6. Ibekwe VC, Fadda HM, McConnell EL, Khela MK, Evans DF, Basit AW: Interplay between intestinal pH, transit time and feed status on the »in vivo« performance of pH responsive ileo-colonic release systems. Pharmaceutical research 2008; 25 (8): 1828-1835.
7. Gjuran A: »In vitro« simulacija pH profila in pufrskih kapacitet medijev prebavnega trakta (Diplomska naloga). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016.
8. Zarate N, Mohammed SD, O'Shaughnessy E, et al.: Accurate Localization of a Fall in pH Within the Ileocecal Region: valiadation using a dual-scintigraphic technique. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology 2010; 299: G1276-G1286.
9. Božič K: »In vitro« simulacija pH profila prebavnega trakta in vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata (Diplomska naloga). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014.
10. Chuasuwan B, Binjesoh V, Polli JE, Zhang H, Amidon G, Junginger HE, Midha K, Shah VP, Stavchasky S, Dressman JB, Barends D: Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium

and diclofenac potassium. Journal of Pharmaceutical Sciences 2009; 98: 1206-1219.

11. Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry-5. izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002; 751-768.
12. Diclofenac sodium salt (strukturna formula) http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.25309.html (dostopano 15.6.2016)
13. Palomo ME, Ballesteros MP, Frutos P: Analysis of diclofenac sodium and derivates. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 21: 83-94.
14. Kincl M, Vrečer F, Veber M: Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug prolonged release tablets. Analytica Chimica Acta 2004; 502: 107-113.
15. Mcilvaine's Buffer System http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=McIlvaine_buffer (dostopano 23.6.2015).