

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN JERMAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN JERMAN

IN VITRO pH SIMULACIJA INDIVIDUALNIH PROFILOV
PREBAVNEGA TRAKTA NA PRETOČNEM SISTEMU S
KROGLICAMI IN VPLIV NA SPROŠČANJE NATRIJEVEGA
DIKLOFENAKATA IZ OGRODNIH TABLET

IN VITRO pH SIMULATION OF INDIVIDUAL
GASTROINTESTINAL PROFILES ON A GLASS BEAD FLOW-
THROUGH SYSTEM AND THE IMPACT ON RELEASE OF
DICLOFENAC SODIUM FROM MATRIX TABLETS

EMŠ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. za strokovno pomoč, napotke in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Za praktične nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem Greti Cof, dipl. ing. kem. teh.

Posebna zahvala gre mojemu dekletu Jasmini za nasvete, pomoč, podporo in potrpljenje pri pisanju.

Komisija za zagovor

Predsednica: prof. dr. Janja Marc, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Članica: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Izjava

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

Klemen Jerman

Vsebina

Povzetek	III
Abstract	IV
Seznam okrajšav.....	V
1 Uvod	1
1.1 Potek pH prebavnega trakta na tešče	1
1.2 Vpliv hrane in pijače na pH prebavnega trakta	4
1.3 Vpliv nekaterih bolezenskih stanj gastrointestinalnega trakta	4
1.4 Pufrska kapaciteta gastrointestinalnega trakta.....	5
2 Namen dela.....	7
3 Materiali in metode	8
3.1 Materiali in aparature.....	8
3.1.1 Materiali	8
3.1.2 Aparature.....	8
3.2 Priprava raztopin.....	9
3.2.1 Redčeni McIlvaine pufri	11
3.3 Metode	12
3.3.1 Določitev in izbira profilov za simulacijo	12
3.3.2 Pretočni sistem	13
3.3.3 Umeritvene krivulje	14
3.3.4 Simulacija pH profilov.....	15
3.3.5 Pufrska kapaciteta	22
3.3.6 Izdelava tablet	22
3.3.7 Testi sproščanja.....	23
3.3.8 Priprava in analiza vzorcev	25
4 Rezultati	26
4.1. Izbrani profili	26
4.2 Umeritvene krivulje	26
4.3 Simulacija pH profilov	26
4.3.1 Hitri dvig (simulacija prehoda želodec – duodenum).....	26
4.3.2 Hitri padec (simulacija prehoda ileum – cekum)	29
4.3.3 Osrednji deli in celotni profil	29
4.4 Pufrska kapaciteta.....	39

4.5 Sproščanje.....	42
5 Razprava.....	44
5.1 Izbrani profili	44
5.2 Umeritvene krivulje	45
5.3 Pufrska kapaciteta.....	45
5.4 Simulacija pH profilov	47
5.4.1 Hitri dvig (simulacija prehoda želodec – duodenum).....	47
5.4.2 Hitri padec (simulacija prehoda ileum – cekum)	50
5.4.3 Osrednji deli in celoten profil	51
5.5 Sproščanje.....	57
5.5.1 Visok profil	57
5.5.2 Nizek profil	57
5.5.3 Srednji profil	58
5.5.4 Primerjava	58
6 Sklep.....	60
7 Viri in literatura	61

Povzetek

pH profil medijev vzdolž človeškega prebavnega trakta poteka znotraj določenih fizioloških mej, a je kljub temu podvržen velikim intra- in interindividualnim razlikam. Te razlike imajo lahko velik vpliv na farmakokinetiko učinkovin, vgrajenih v različne farmacevtske oblike.

V sklopu te magistrske naloge smo z uporabo McIlvainovih pufrskih raztopin simulirali različne individualne pH profile prebavnega traka pri pogojih na tešče, nato pa preučevali njihov vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet. Vse poskuse smo izvajali na pretočnem sistemu z uvajanjem ustreznih kislin, baz in McIlvainovih pufrov s primernim pH in pufrsko kapaciteto.

Delovna čaša v pretočnem sistemu je bila termostatisirana na 37°C, hitrost mešanja z magnetom je bila 60 obratov na minuto, gibanje v prebavnem traktu pa smo simulirali z uporabo steklenih kroglic. Volumen medija v delovni čaši smo vzdrževali na 40 mL, hitrost dovajanja in odvajanja raztopin pa je bila 2 mL/min.

Podatke o individualnih profilih smo dobili iz literature. V enem primeru so bile vrednosti pH predstavljene v odvisnosti od mesta v prebavnem traktu, v ostalih treh pa kot grafi časovne odvisnosti ob prehodu merilne kapsule skozi prebavni trakt.

Individualne pH profile prebavnega trakta smo uspešno simulirali z zadostno ponovljivostjo. Pri tem smo upoštevali tako vrednosti pH, kot tudi pufrsko kapaciteto.

Tablete, ki smo jih uporabili pri poskusih sproščanja smo izdelali iz natrijevega diklofenakata in HPMC. Vsebnost zdravilne učinkovine je bila v eni seriji 25%, v drugi pa 50%. Analizo vzorcev smo izvedli spektrofotometrično pri valovni dolžini 276 nm.

Opazili smo precejšen vpliv pH na profil sproščanja natrijevega diklofenakata med simulacijo. Dolgotrajnejša izpostavitve kislemu mediju je povzročila podaljšanje časa zakasnitve, ki je trajal še precej časa po tem, ko se je medij že zamenjal. Vrednost pH v simuliranem tankem črevesu na hitrost sproščanja natrijevega diklofenakata ni vplivala, opazna pa je bila upočasnitev sproščanja po simuliranem prehodu iz ileuma v cekum.

Ključne besede: gastrointestinalni pH profil, pufrska kapaciteta, sproščanje zdravilne učinkovine, McIlvainov pufrski sistem

Abstract

pH profile of the human gastrointestinal tract is well-defined by physiological limits, but is nonetheless subject to considerable intra- and inter-individual differences. Those differences can have a significant influence on the pharmacokinetics of active pharmaceutical ingredient in various dosage forms.

During the course of this master's thesis, we simulated different individual gastrointestinal pH profiles using McIlvaine buffer solutions, and studied the impact of the pH profiles on the release of diclofenac sodium from matrix tablets. All experiments were performed by pumping appropriate acids, bases and McIlvaine buffer solutions with suitable pH and buffer capacity through a flow-through system.

The temperature of the contents of the central beaker of the flow-through system was maintained at 37°C, stirring speed of the magnet stirrer was 60 rpm, and the movement in the intestinal tract was simulated using glass beads. The volume of the medium in the central beaker was maintained at 40 mL, while the pumping speed was 2 mL/min.

The data about individual gastrointestinal pH profiles was acquired from literature. In one case, the data was presented as pH value as a function of the part of the gastrointestinal tract. In other three cases, it was presented as graphs of pH value in dependence of transit time through the gastrointestinal tract.

The tablets used for dissolution testing were made from diclofenac sodium and HPMC in two series. The API content was 25% and 50%, respectively. The samples were analysed spectrophotometrically at wavelength 276 nm.

Individual gastrointestinal pH profiles were successfully simulated with suitable repeatability, both in terms of pH and buffer capacity.

pH profiles had a considerable impact on the release of diclofenac sodium. Prolonged exposure to acidic medium was followed by a lag time that lasted longer than the exposure of tablets to the acidic medium. pH value in the simulated small intestine had no impact on the rate of release of diclofenac sodium, however after the simulated passage through the ileocaecal junction the rate was noticeably lower.

Keywords: gastrointestinal pH profile, buffer capacity, release of active pharmaceutical ingredient, McIlvaine buffer system

Seznam okrajšav

DČ – debelo črevo

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

HPMC - hidroksipropilmetilceluloza

rpm – obrati na minuto (revolutions per minute)

TČ – tanko črevo

TNAF – trinatrijev fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

ZU – zdravilna učinkovina

1 Uvod

Vrednost pH vzdolž gastrointestinalnega trakta (GIT) je eden od pomembnih dejavnikov, ki vplivajo na farmakokinetiko zdravilnih učinkovin (ZU), vgrajenih v peroralne farmacevtske oblike. Vpliva namreč na procese kot so raztapljanje tako ZU, kot tudi različnih pomožnih snovi, na primer polimera filmske obloge za prirejeno sproščanje. Za načrtovanje novih farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem je še posebej pomembno, da upoštevamo morebitne spremembe pH profila zaradi bolezni.

Natančna regulacija gastrointestinalnega pH je ključna za več vidikov fiziologije in funkcije prebavnega trakta. Kisel medij v želodcu je pomemben za razgradnjo hranil, predstavlja pa tudi kemično oviro zaužitim mikroorganizmom. Hitra nevtralizacija želodčne kisline v proksimalnem tankem črevesu (TČ), predvsem v dvanajstniku je pomembna za olajšanje nadaljnje razgradnje in absorpcije hranil. Učinkovito pufranje vsebine dvanajstnika izboljša prebavo hranil, ker ščiti in aktivira izločene pankreatične encime in pospešuje tvorbo micelov [1].

Učinkovito in hitro pufranje kisline prav tako ščiti mukozo dvanajstnika pred poškodbami zaradi daljše izpostavljenosti kislini. Pomemben dejavnik zaščite celic je tudi mukus [1].

1.1 Potek pH prebavnega trakta na tešče

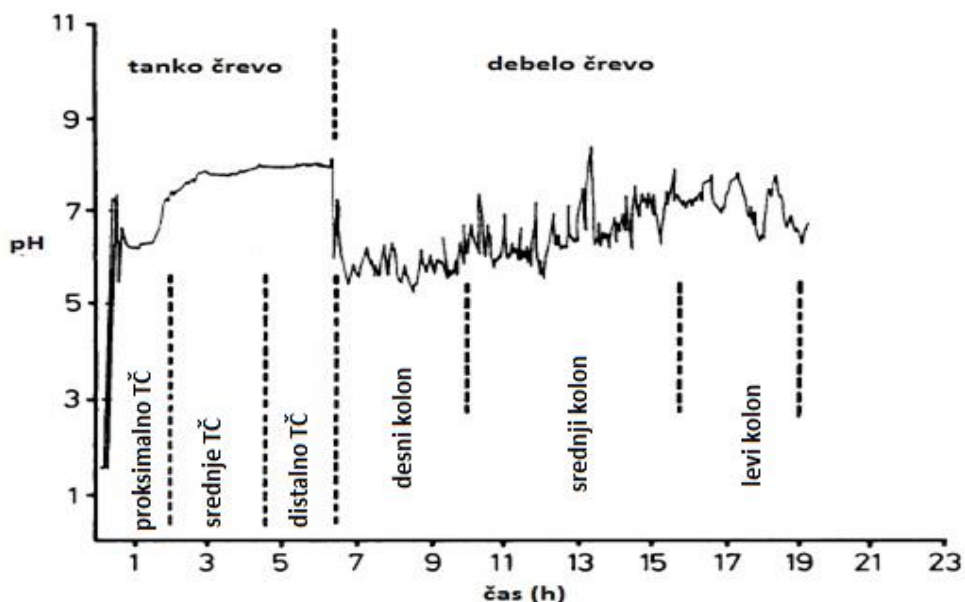
Prvi pomembni del GIT za farmakokinetiko peroralnih FO je želodec. pH njegovega medija je praviloma kisel, različni avtorji pa kot povprečne vrednosti svojih študij navajajo precej različne vrednosti. Primer poteka pH profila GIT je prikazan na sliki 1.

Ibekwe in sodelavci [2] so z na tešče peroralno zaužito pH kapsulo med zdravimi prostovoljci določili povprečen pH medija želodca 1,4, medtem ko so Koziolk in sodelavci [3] v podobni študiji ugotovili povprečno vrednost pH želodčnega medija 2,7. Koziolk in sodelavci poročajo tudi o velikih variacijah pH, ki so dosegale tudi 8.

Kalantzi in sodelavci [4], so v svoji študiji na tešče določili vrednost mediane pH želodčnega medija 1,7. Tudi oni pa poročajo o nekaterih ekstremno visokih vrednostih pH želodčnega medija, ki jih razlagajo kot posledice redčenja vsebine želodca s slino. Pri dveh posameznikih pa so bile izmerjene vrednosti pH želodčnega medija v vseh primerih (3 meritve pri vsakem posamezniku) blizu nevtralne, kar razlagajo kot posledico hipoklorhidrije.

Pri zdravih ljudeh se pH iz močno kislega medija želodca ob prihodu v dvanajstnik hitro dvigne na vrednosti okoli 6. [5,6] Da je ta trajen strmi porast pH posledica prehoda v dvanajstnik, so Ibekwe in sodelavci potrdili tudi z gama scintigrafijo [2].

Nato tekom tankega črevesa postopoma raste in v terminalnem ileumu doseže vrednost približno 7,4 [5,6]. Volumen tekočine v TČ je na tešče majhen in razporejen v več žepov. Zaradi tega TČ ne smemo obravnavati kot enostavno cev z velikim volumnom tekočine in konstantno vrednostjo pH [3].

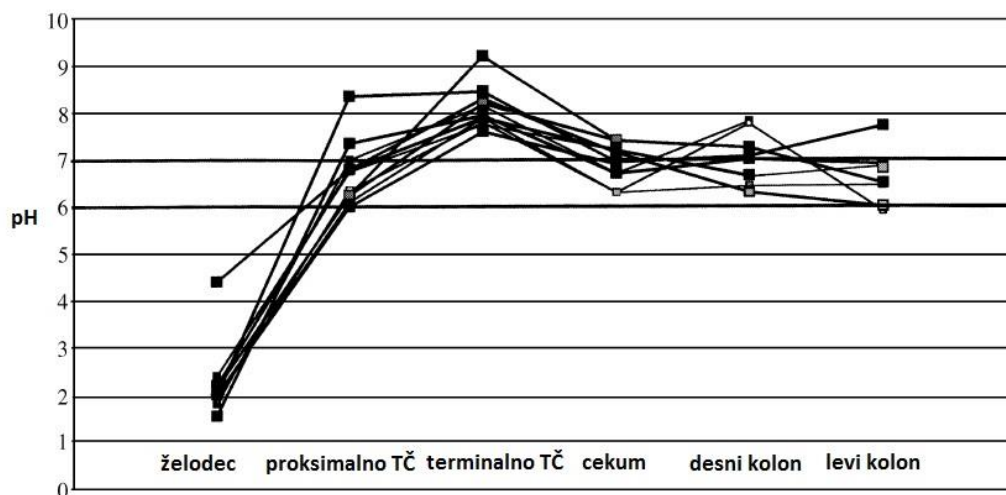


Slika 1: Primer poteka pH profila GIT na tešče. Prikazano je spreminjanje pH s časom in delom GIT. Povzeto po [6].

V cekumu pH vrednost pade do približno 5,7, od tam naprej pa se spet počasi dviga proti vrednosti 6,7, ki jo doseže v rektumu [1]. pH vrednosti vsebine kolona so rahlo bolj kisle od medija ileuma zaradi fermentacijskih procesov kolonske črevesne flore. V prvi vrsti gre za presnovo nerazgrajenih ogljikovih hidratov [3, 7]. Padec pH ob vstopu v cekum se med posamezniki precej razlikuje, poleg tega pa je odvisen tudi od prehrane posameznika [3].

Navedene vrednosti predstavljajo povprečje zdravih prostovoljcev, dejanske vrednosti pa od tega lahko precej odstopajo. Razlike so tako interindividualne, kot tudi intraindividualne. Velika variabilnost pogojev GIT ima lahko vpliv na obnašanje številnih FO. To ima še posebej velik vpliv na FO s prirejenim sproščanjem. Spremenita se lahko tako začetek sproščanja kot tudi kinetika sproščanja ZU [5].

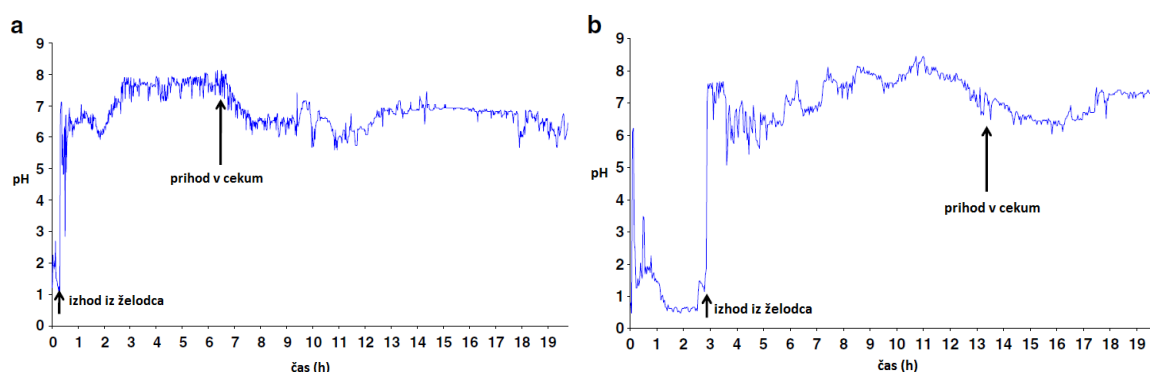
V svoji študiji so Press in sodelavci [8] med zdravimi posamezniki ugotovili precejšnje razlike pH po celotnem GIT. Izmerjene pH vrednosti želodčnega medija so bile v razponu 0,95 – 2,6, vsebine proksimalnega TČ 6,15 – 7,35, terminalnega TČ pa 6,8-7,88. Tudi po prehodu iz tankega v debelo črevo je bil razpon vrednosti precejšen: v cekumu 5,3-6,55, v desnem kolonu 5,26-6,72 in v levem kolonu 5,2-7,07. Njihovi izsledki so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Interindividualna varibilnost pH GIT. Prikazane so mediane vrednosti pH zdravih posameznikov v določenih delih GIT. Povzeto po [8].

Tudi Koziolšek in sodelavci so v svoji študiji [3] opazili veliko interindividualno variabilnost pH v GIT. Mediane pH vrednosti posameznikov so bile v želodcu v intervalu 1,4-4,6. V proksimalnem delu TČ so bile mediane pH vrednosti v območju 5,9-6,3, v distalnem pa 7,4-7,8. V kolonu so vrednosti pH precej nihale, gibale so se med 5 in 8.

Ibekwe in sodelavci so v raziskavi [2] opazili, da je ob prehodu iz ileocekalnega stika v cekum pri nekaterih osebah prišlo do padca pH, pri nekaterih pa se pH ni spremenil. V nasprotju z nekaterimi raziskavami je bil opažen padec pH, kjer je do njega prišlo, postopen. Opazili pa so tudi intraindividualno variabilnost, ki je predstavljena na sliki 3.



Slika 3: pH profila istega posameznika izmerjena v razmaku 7 dni – intraindividualna variabilnost. Obe merjenji sta bili izvedeni na tešče. Prikazano je spreminjanje pH s časom, v obeh primerih pa sta prikazana tudi izhod kapsule, ki je merila pH, iz želodca in njen prihod v cekum. Povzeto po [2].

1.2 Vpliv hrane in pijače na pH prebavnega trakta

Zaužitje hrane ali pijače navadno povzroči dvig pH vrednosti želodčnega medija zaradi majhnega volumna in majhne pufrske kapacitete želodca na tešče. Glede na sestavo in količino zaužite hrane se vrednost pH v želodcu lahko dvigne tudi nad 6. pH se nato zniža do osnovne vrednosti zaradi sekrecije HCl in praznjenja želodca. V primeru vnosa zgolj vode je sprememba kratkotrajna zaradi hitrega praznjenja in ker v njej ni snovi s pufrskimi lastnostmi, kot so na primer maščobne kisline in proteini [3].

Kalantzi in sodelavci so v študiji [4] ugotovili opazno spremembo pH po obroku tako v želodcu kot tudi v dvanajstniku. Na tešče so opazili velike interindividualne razlike: razpon vrednosti pH vsebine želodca je bil od 1,23 do 7,36, pri čemer je bila vrednost mediane 2,4. Po zaužitju visokokaloričnega uravnoteženega dietetičnega živila Ensure Plus se je vrednost želodčnega pH dvignila: 30 minut po obroku je bila vrednost mediane pH 6,4, kar je blizu pH vrednosti živila Ensure Plus (6,6). Želodčni pH je nato postopoma padal proti osnovni vrednosti, a je tudi po 210 minutah po obroku še ni dosegel. Po tem času je bila mediana 2,7. Prav tako se je precej spremenila tudi mediana pH medija distalnega dvanajstnika. Njegova vrednost na tešče v tej študiji je bila 6,2, 30 minut po zaužitju živila Ensure Plus pa je bila pH vrednost zvišana na 6,6. Od takrat naprej pa je vrednost pH počasi padala in 210 minut po obroku je dosegla 5,2.

1.3 Vpliv nekaterih bolezenskih stanj gastrointestinalnega trakta

Za ustrezne obloge pri FO s prilagojenim sproščanjem je treba poleg normalnih vrednosti pH v GIT poznati tudi vpliv različnih bolezenskih stanj na pH profil [6]. Za cistično fibrozo na primer so Gelfond in sodelavci [1] ugotovili, da se kislina vsebina, ki pride iz želodca v dvanajstniku nevtralizira veliko počasneje. Medtem ko je pri zdravih potrebno manj kot 5 minut, da pH naraste nad 5,5, je pri bolnikih s cistično fibrozo za tak dvig pH potrebnih več kot 15 minut.

Press in sodelavci so v raziskavi [8] odkrili signifikantne razlike v pH medija na nekaterih odsekih GIT med zdravimi prostovoljci in bolniki z boleznimi prebavil (Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis). Pri obeh boleznih so bile vrednosti pH v želodcu, terminalnem ileumu, cekumu in desnemu kolonu višje kot pri zdravih posameznikih.

Ewe in sodelavci [7] pa so v nasprotju s Pressom v primerjavi z zdravimi osebami pri bolnikih s Crohnovo boleznijo ugotovili zgolj znižanje pH medija v terminalnem ileumu in levem kolonu. Pri bolnikih z ulceroznim kolitisom pa so poročali o znižanem pH po celotnem

ileumu in v cekumu, v kolonu in rektumu pa je bil pH v primerjavi z zdravimi prostovoljci zvišan.

1.4 Pufrska kapaciteta gastrointestinalnega trakta

Pufri so snovi, ki se v raztopini ob dodatku majhnih količin kislin ali baz upirajo spremembi pH. Navadno pufrske sisteme sestavljata šibka kislina (HA) in njena konjugirana baza (A^-) ali šibka baza in njena konjugirana kislina. Njihovo delovanje temelji na tem, da ob dodatku kisline, A^- reagira s prostimi protoni pri čemer se tvori HA (ob dodatku baze HA sprosti protone, ki reagirajo s hidroksidnimi ioni, pri čemer nastane A^- in H_2O). Zaradi tega se pH ne spremeni tako močno. [9, 10]

Pufrska kapaciteta je mera za učinkovitost pufra, da se upira spremembi pH. Teoretično je izražena kot množina močne kisline ali baze, ki jo je potrebno dodati v 1 L pufrske raztopine, da se pH spremeni za eno enoto. [9] Pufrsko kapaciteto se v splošnem izračuna po enačbi 1.

$$\beta = \frac{\Delta B}{\Delta pH}$$

Enačba 1: Izračun pufrske kapacitete; ΔB – množina močne kisline ali baze, ki povzroči spremembo pH v 1 L pufrske raztopine; ΔpH – sprememba pH po dodatku močne kisline ali baze; povzeto po [10]

V praksi se jo večinoma določa z merjenjem manjših sprememb pH in kvantitativno izrazi kot razmerje med dodano množino kisline ali baze in spremembo pH ob upoštevanju volumna raztopine. [9, 10]

Pufrska kapaciteta je odvisna predvsem od dveh dejavnikov. Prvo je razmerje med kislino ali bazo in njeno soljo. Pufrska kapaciteta je največja, ko je razmerje med njima 1:1, kar se zgodi, ko je vrednost pH enaka vrednosti pK_a pufra. Drugi dejavnik pa je celotna koncentracija pufra v raztopini. Bolj kot je koncentrirana, večja je pufrska kapaciteta raztopine. [9]

Pufrska kapaciteta medija tudi vpliva na topnost nekaterih ZU. Cohen Rabbie in sodelavci so ugotovili, da je furosemid eden od takih primerov. Njegova topnost se izrazito poveča pri višji pufski kapaciteti po celotnem pH območju [11].

Na pufsko kapaciteto želodčnega medija na tešče ima velik vpliv predvsem volumen zaužite tekočine. Kalantzi in sodelavci so v svoji raziskavi [4] merili tudi pufsko kapaciteto. Na tešče so za vsebino želodca izmerili vrednost mediane $18 \text{ mmol L}^{-1} \Delta pH^{-1}$. 20 minut po zaužitju 250 mL vode so izmerili precej nižjo pufsko kapaciteto, kot pri ostalih pogojih. V tem primeru je mediana pufrske kapacitete znašala $7 \text{ mmol L}^{-1} \Delta pH^{-1}$. To znižanje pa je bilo

kratkotrajno in ob naslednjem vzorčenju (40 minut po zaužitju vode) se je mediana pufrske kapacitete vrnila na $18 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. Po zaužitju hrane (Ensure Plus) so se mediane vrednosti pufrske kapacitete spreminjale pri vseh vzorčenjih (zadnje vzorčenje 210 minut po obroku), kar kaže na dolgotrajnejši vpliv na pufrsko kapaciteto kot zaužitje zgolj vode. Kljub daljšemu trajanju pa spremembe pufrske kapacitete niso bile signifikantne glede na stanje na tešče. Mediane so se gibale med 14 in $28 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. To je posledica pufrske kapacitete zaužitega obroka, ki je bila podobna fiziološkim vrednostim želodca.

Na tešče so Kalantzi in sodelavci [4] v dvanajstniku izmerili mediano pufrske kapacitete z vrednostjo $5,6 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. Po obroku se je mediana pufrske kapacitete gibala med 18 in $30 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$, a znotraj tega intervala niso opazili nikakršnega trenda.

Fadda in sodelavci [12] so v svoji raziskavi izmerili pufrsko kapaciteto medijev različnih delov GIT pri pogojih na tešče. Opazili so naraščanje pufrske kapacitete vzdolž tankega in debelega črevesa. V jejunumu so določili povprečno vrednost $3,23 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$, v ileumu pa $6,4 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. Največji preskok se je pojavil med ileumom in ascendentim kolonom, kjer je vrednost pufrske kapacitete medija znašala že $32,1 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. V descendentem kolonu se je še malo povečala, izmerili so $44,4 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Tudi Cohen-Rabbie in sodelavci [11] so opazili naraščanje pufrske kapacitete vzdolž tankega črevesa pri teščih pogojih. Za povprečno pufrsko kapaciteto medija jejunuma zdravih prostovoljcev so določili vrednost $6,6 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. Analizo vsebine ileuma pa so v tej študiji izvajali na vsebini vrečk bolnikov z ileostomo. Ti rezultati ne odražajo nujno fiziološkega stanja zdravih ljudi, a je tak pristop v raziskavah ileuma precej pogost, saj je vzorčenje iz tega dela tankega črevesa zelo zahtevno oziroma invazivno. Na ta način so dobili povprečno pufrsko kapaciteto vsebine ileuma z vrednostjo $15,9 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$, razpon posameznih vrednosti pa je bil širok ($5,6 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1} - 32,4 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$).

Diakidou in sodelavci so v svoji raziskavi [13] podrobno preučili pogoje v ascendentnem kolonu zdravih prostovoljcev, med drugim so preučevali tudi pufrsko kapaciteto. Pri pogojih na tešče so izvedli dve študiji, pri katerih so dobili precej različne rezultate. V prvi je bila povprečna pufrska kapaciteta, določena z dodajanjem HCl, $11,0 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. V drugi pa je bila njena vrednost skoraj dvakrat večja: $21,4 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$. Ko so pufrsko kapaciteto vsebine ascendentega kolona določali po zaužitju obroka, se je le-ta še povečala. Njeno povprečje je znašalo $37,7 \text{ mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Vsi ti podatki kažejo tako na veliko interindividualno variabilnost v pufrski kapaciteti vsebine GIT, kot tudi na precejšno intraindividualno raznolikost pufrske kapacitete medija vzdolž GIT.

2 Namen dela

Ta magistrska naloga je del daljšega projekta na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, cilj katerega je čim bolj natančna simulacija *in vivo* pogojev v GIT od želodca do debelega črevesa. To zajema tako pH profil, kot tudi pufersko kapaciteto, gibanje FO znotraj GIT, vpliv hrane...

Cilj te naloge je ugotoviti, kako različni pH profili vplivajo na sproščanje modelne ZU (natrijevega diklofenakata) iz ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem. To bomo dosegli s poskusi sproščanja v različnih simuliranih individualnih pH profilih zdravih odraslih posameznikov. Podatke o njihovih pH profilih bomo poiskali v literaturi, uporabili pa bomo vrednosti, pridobljene na tešče. Ob tem bomo upoštevali tudi literaturne podatke o puferski kapaciteti tekočine v različnih delih GIT.

Izbrane pH profile bomo poskusili simulirati z uporabo primernih medijev (pufrov, kislin in baz) na pretočnem sistemu. Za simulirano želodčno kislino bomo uporabili raztopino HCl ustreznih koncentracij, za črevesni sok pa razredčene McIlvainove pufre z različnimi pH vrednostmi. Medij bomo termostatirali na 37°C in ga mešali s hitrostjo 60 rpm na magnetnem mešalu. Pretok skozi sistem bo 2 mL/min, pri čemer bomo morali paziti, da ne bo odstopanj med hitrostjo dovajanja in odvajanja medija iz delovne čaše. Na ta način se volumen medija v čaši ne bo spreminjal in bo ves čas 40 mL. V delovni čaši bo 25 g steklenih kroglic, ki bodo simulirale gibanje prebavnega trakta.

Simulacija pH profila bo potekala v petih fazah. Prva bo konstanten kisel pH simuliranega želodca, za kar bomo uporabili raztopino HCl. Druga faza bo hiter dvig pH na prehodu iz želodca v dvanajstnik, kjer bomo v HCl dovajali raztopino Na₃PO₄ ustreznih koncentracij. Tretja faza bo počasno naraščanje pH vzdolž TČ, kar bomo dosegli z uporabo različnih McIlvainovih pufrov. Četrta faza bo hiter padec pH ob prehodu iz tankega v debelo črevo, ki ga bomo simulirali z uvajanjem raztopine H₃PO₄ v pufer. Zadnja faza bo simuliranje začetnega dela DČ, za kar bomo uporabili McIlvainov pufer.

Pufersko kapaciteto medija v delovni čaši bomo vzdrževali znotraj fizioloških mej. V simuliranem tankem črevesu bo njena vrednost med 4 in 8 mmol L⁻¹ ΔpH⁻¹, v simuliranem debelem črevesu pa približno 15 mmol L⁻¹ ΔpH⁻¹.

Profili, ki jih bomo simulirali se bodo po pH vrednostih med seboj čim bolj razlikovali. Na ta način bomo lahko na končnih profilih preverjali vpliv pH na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablete s podaljšanim sproščanjem. Poskuse sproščanja bomo izvajali na istih pretočnih sistemih pod pogoji, ki jih bomo določili za simulacijo pH profilov.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali in aparature

3.1.1 Materiali

Za pripravo pufrov, raztopin soli, izdelavo tablet in izvajanje poskusov smo uporabili:

- natrijev hidroksid, Titrisol[®] za pripravo 1 M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- klorovodikova kislina, Titrisol[®] za pripravo 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 monohidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev diklofenakat, p.a., Sigma-Aldrich CO, St. Louis, ZDA;
- metolose 90SH 4000SR, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- pufrska raztopina pH = 7,00 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- pufrska raztopina pH = 4,00 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

3.1.2 Aparature

Pretočni sistem za simuliranje pH profilov in izvajanje testov sproščanja:

- peristaltični črpalki IKA[®] -WERKE ISM817, IKA[®]-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija (interni oznaki G1 in G2);
- silikonske pretočne cevke (debelina silikona 1,6 mm, notranji premer 3,2 mm, zunanji premer 6,4 mm), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemčija;
- kovinska mrežica z velikostjo odprtin 500 µm;
- stojali za peristaltični črpalki;
- magnetni mešali z električnima grelcema IKA[®]-RET CV, IKA[®]-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija (interni oznaki G1 in G2);
- vodni kopeli;
- delovni čaši 150 mL (notranji premer 55 mm), Schott Duran, Nemčija;
- magneti (premer 8 mm, dolžina 25 mm (mali) in 50 mm (veliki));
- polipropilenski pokrovi za čaše z 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.

Druge aparature in laboratorijski pribor:

- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA;
- digitalna tehtnica Exacta 300EB, Exacta, Železniki, Slovenija;
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- ultrazvočna kopel Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- ultrazvočna kopel Bandelin Sonorex RK514BH, Bandelin electronic, Berlin, Nemčija;
- vorteks stresalnik Lab Dancer, IKA[®]-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- čaše 25 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL;
- polnilne bučke 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL;
- merilni valji 50 mL, 100 mL;
- polnilne pipete 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, Blaubrand, Nemčija;
- tabletirka na udarec Kilian SP300, KILIAN Tableting GmbH, Köln, Nemčija;
- membranski filtri z velikostjo por 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija;
- centrifugirke 10 mL;
- tehtiči, čolnički, spatule, žličke;
- brizge 5 mL
- steklene kroglice, premer 1 mm;

3.2 Priprava raztopin

1 M HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo kvantitativno prenesli vsebino brizge za pripravo 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

1 M NaOH: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo kvantitativno prenesli vsebino brizge za pripravo 1 M NaOH in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

1,25 mM HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo z avtomatsko pipeto prenesli 1,25 mL 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

10 mM HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo s polnilno pipeto prenesli 10 mL 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

20 mM HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo s polnilno pipeto prenesli 20 mL 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

30 mM HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo s polnilno pipeto prenesli 30 mL 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

50 mM HCl: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo s polnilno pipeto prenesli 50 mL 1 M HCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

0,1 M NaOH: V 1000 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo z merilnim valjem prenesli 100 mL 1 M NaOH in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

5 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 0,1901 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

20 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 0,7604 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

55 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 2,0910 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

100 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 3,8018 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

110 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 4,1820 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

120 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 4,5622 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

130 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 4,9423 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

140 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 5,3225 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

150 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 5,7027 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

160 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 6,0829 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

200 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 7,6036 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

280 mM Na₃PO₄: V 100 mL bučko smo kvantitativno prenesli 10,645 g Na₃PO₄·12H₂O in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

0,85% H₃PO₄: V 100 mL bučko smo nalili nekaj prečiščene vode, vanjo z avtomatsko pipeto prenesli 1 mL 85% M H₃PO₄ in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

0,2 M Na₂HPO₄: V 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 28,392 g Na₂HPO₄, ga raztopili v prečiščeni vodi s pomočjo ultrazvoka in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

0,1 M citronska kislina: V 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 19,212 g citronske kisline monohidrata, ga raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do oznake.

50 mM fosfatni pufer (pH=6,8): 6,8 g KH₂PO₄ smo kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko. Preden smo raztopino dopolnili do oznake, smo dopolnili z demineralizirano vodo do dveh tretjin ter dodali toliko 1 M NaOH, da je bil pH=6,8

3.2.1 Redčeni McIlvainovi pufri

McIlvainovi pufri so sestavljeni iz dveh komponent: raztopine citronske kisline in Na₂HPO₄. Za izbrano pH vrednost McIlvainovega pufera je potrebno zmešati točno določeni količini teh dveh komponent. Točne količine za 0,2 M Na₂HPO₄ in 0,1 M citronsko kislino smo razbrali iz tabele [14], a smo te vrednosti lahko uporabili le za orientacijo. Pri redčenju pufrov se pH raztopine lahko spremeni, kar smo morali upoštevati pri pripravi naših pufrov.

Zaradi redčenja smo zato morali eksperimentalno določiti pravo količino vsake od raztopin, ki jo je bilo potrebno uporabiti, da smo dosegli želeno vrednost pH.

V bučko smo najprej nalili nekaj prečiščene vode, vanjo prenesli raztopini Na₂HPO₄ in citronske kisline in dopolnili do oznake. Za odmerjanje Na₂HPO₄ in citronske kisline smo uporabili merilne valje, količine manjše od 1 mL pa smo dodali s pomočjo avtomatskih pipet.

Preglednica I prikazuje recepture za pripravo vseh uporabljenih pufrov.

Preglednica I: Recepture za pripravo uporabljenih redčenih McIlvainovih pufrov. Predstavljene so vrednosti končnega pH pufrov, njihove redčitve, volumni 0,2 M Na₂HPO₄ in 0,1 M citronske kisline ter končni volumni razredčenih pufrov (volumen bučke).

pH pufera	Redčitev	mL 0,2 M Na ₂ HPO ₄	mL 0,1 M citronske kisline	V bučke (mL)	Oznaka pufera
6,8	2x	386,0	114,0	1000	6,8 (2x)
6,8	100x	7,1	2,9	1000	6,8 (100x)
6,6	100x	7,0	3,0	1000	6,6 (100x)
6,8	15x	46,7	20,0	1000	6,8 (15x)
6,5	200x	1,75	0,75	500	6,5 (200x)
5,6	4x	69,0	56,0	500	5,6 (4x)
5,5	4x	67,0	58,0	500	5,5 (4x)
6,4	2x	84,0	61,0	250	6,4 (2x)
6,4	15x	42,1	24,5	1000	6,4 (15x)
6,4	200x	3,6	1,6	1000	6,4 (200x)
8,1	15x	65,0	1,6	1000	8,1 (15x)
6,7	15x	175,0	75,0	1000	6,7 (15x)
5,5	15x	17,5	15,8	500	5,5 (15x)
6,6	15x	22,0	11,3	500	6,6 (15x)
4,8	4x	23,2	26,8	200	4,8 (4x)
7,7	15x	30,75	2,63	500	7,7 (15x)
6,0	15x	19,33	14,0	500	6,0 (15x)
6,5	4x	82,6	42,4	500	6,5 (4x)

Vsakemu pripravljenemu pufru smo tudi izmerili pH, da smo preverili njegovo ustreznost. Zaradi vpliva na pufrsko kapaciteto morebitnih odstopanj nismo smeli korigirati z dodatki manjših količin osnovnih raztopin ampak smo v primeru napake naredili nov pufer.

3.3 Metode

3.3.1 Določitev in izbira profilov za simulacijo

Za zagotovitev raznolikosti in realnosti pH profilov, ki smo jih simulirali smo se odločili, da v strokovni literaturi poiščemo študije, ki so raziskovale pH profil posameznikov vzdolž GIT vsaj do začetnega dela debelega črevesa. Ob tem pa smo poleg podatkih o vrednosti pH v posameznih delih GIT potrebovali tudi podatke o času zadrževanja pH kapsule v določenem delu GIT. V obeh primerih smo se pri izbiri profilov omejili na podatke za tešče pogoje.

3.3.1.1 Prvi način

Najprej smo v ta namen uporabili podatke pridobljene iz rezultatov študije Ibekweja in sodelavcev [2]. V njem so predstavljeni podatki o posameznikovem pH v odvisnosti od mesta v GIT in o času, ki ga je pH kapsula potrebovala za prehod posameznega dela. Te podatke smo nato združili v graf, ki je prikazoval spreminjanje pH s časom. Od teh grafov smo nato izbrali en profil za simulacijo (profil 6).

3.3.1.2 Drugi način

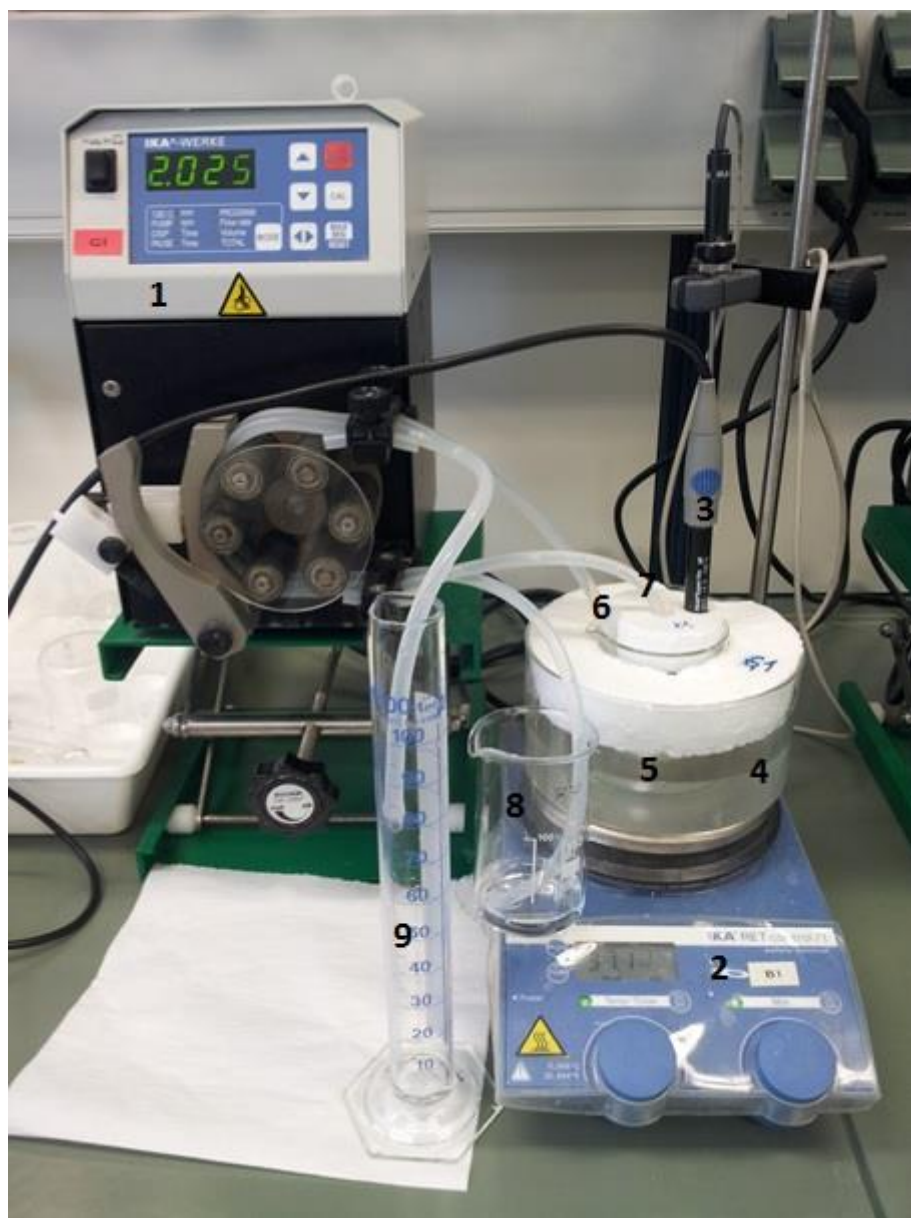
Kasneje smo našli še novejši članek, ki je še bolj ustrežal našim potrebam. Kozirolek in sodelavci so rezultate študije [3] podali z grafi, ki prikazujejo časovno odvisnost pH okolja kapsule, ki so jo posamezniki pogoltnili. S tem smo videli natančen potek pH profila, iz grafov pa smo številčne vrednosti pH dobili z uporabo programa Engauge Digitizer. [15]

Najprej smo iz elektronske verzije članka zajeli slike vseh grafov, ki so prikazovali spreminjanje pH s časom. Nato smo zajete slike uvozili v program, na grafu označili koordinatno izhodišče in po eno vrednost na vsaki izmed osi. Nazadnje smo izbrali še del krivulje, ki nas je zanimala (področje želodca, tankega črevesa in začetni del debelega črevesa), potem pa je program analiziral graf in nam podal potek krivulje v obliki koordinat. Delo nam je olajšalo tudi dejstvo, da so avtorji članka na grafih že označili točke, kjer je kapsula vstopila in izstopila iz tankega črevesa. Te koordinate so predstavljale vrednosti pH in čas v minutah, ki smo jih potem uporabili, da smo v Excelu narisali bolj enostaven graf za vsak individualni pH profil. Ker smo se osredotočili na vpliv pH, smo od teh grafov za simulacijo izbrali tri take (2-3 – visok profil; 2-2 – nizek profil; 1-6 – srednji profil), ki so se med seboj razlikovali po pH vsebine tankega črevesa, a so si bili podobni po času, potrebnem za prehod do debelega črevesa.

3.3.2 Pretočni sistem

Vse poskuse smo izvajali na enem od dveh enakih pretočnih sistemov G1 in G2. Osrednji del teh sistemov je bila delovna čaša, v kateri smo simulirali pogoje GIT. Vanjo smo po dovodni cevki črpali različne raztopine s pomočjo peristaltične črpalke. Ista črpalka je po drugi cevki črpala tekočino iz delovne čaše do merilnega valja, kjer smo jo zbirali. Delovna čaša je bila postavljena v vodno kopel, termostatisirano na 37°C.

Pretočni sistem, ki smo ga uporabili, je predstavljen na sliki 3.



Slika 3: Pretočni sistem: 1: peristaltična črpalka; 2: magnetno mešalo, grelec; 3: elektroda pH metra; 4: vodna kopel; 5: delovna čaša; 6: dovodna cevka; 7: odvodna cevka; 8: čaša z dovajanim medijem; 9: merilni valj za zbiranje odvedenega medija

3.3.3 Umeritvene krivulje

Za vse pufre, ki smo jih uporabili pri poskusih s sproščanjem, smo določili umeritvene krivulje za določanje koncentracije natrijevega diklofenakata.

Najprej smo natančno natehtali tri paralelke po približno 10 mg ZU. Vsako od teh paralelek smo nato kvantitativno prenesli v svojo 100 mL bučko, ki smo jo dopolnili do oznake z 0,1 M NaOH. Tako smo dobili tri osnovne raztopine s koncentracijo ZU približno 100 mg/L. Tri osnovne raztopine smo uporabili, ker se na ta način zmanjša verjetnost napak.

Te osnovne raztopine smo nadalje redčili, tako da smo iz njih odpipetirali izbrane volumne raztopine, jo prenesli v novo bučko in dopolnili do oznake z 0,1 M NaOH in izbranim pufrom v takih količinah, da smo med njima dobili razmerje 1:1. Na ta način smo dobili šest do devet novih raztopin z različnimi znanimi koncentracijami ZU, za katere smo pričakovali, da bodo imeli razpon absorbanco od skoraj 0 do 1,2. Tem smo nato izmerili absorbanco po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.8 *Priprava in analiza vzorcev*.

Iz vrednosti izmerjenih absorbanc glede na koncentracijo ZU v raztopini smo z uporabo linearne regresije izračunali umeritvene krivulje in Pearsonov koeficient korelacije (R^2).

Umeritvene krivulje smo določali v zmesi 0,1 M NaOH in naslednjih medijev v razmerju 1:1:

- 30 mM HCl
- 50 mM fosfatni pufer (pH = 6,8)
- McIlvainov pufer s pH 5,5 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 6,6 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 4,8 (4x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 6,4 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 8,1 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 6,7 (4x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 6,0 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 7,7 (15x redčen)
- McIlvainov pufer s pH 6,5 (4x redčen)

Umeritveno krivuljo 30 mM HCl smo uporabili tudi za določitev koncentracije ZU v 20 in 50 mM HCl.

3.3.4 Simulacija pH profilov

Z uporabo različnih medijev, ki smo jih dovajali v pretočni sistem, smo želeli čim boljše simulirati vrednosti pH in pufrske kapacitete v GIT izbranih posameznikov. V grobem se lahko naše simulacije razdelijo v pet različnih faz:

- želodec (simuliran z raztopino HCl)
- hiter dvig pH ob vstopu v dvanajstnik (simuliran z dovajanjem TNAF)
- postopno naraščanje pH tekom tankega črevesa (simuliran z McIlvainovimi pufri z različnimi pH)
- hiter padec pH ob vstopu v cekum (simuliran z dovajanjem H_3PO_4)
- enakomeren pH v cekumu ob zvišanju pufrske kapacitete (simuliran z McIlvainovimi pufri z različnimi pH, ki so bili manj redčeni kot za tanko črevo)

Za izvedbo simulacij pH profilov smo uporabili dva pretočna sistema: G1 in G2. Oba smo pripravili na enak način. Pretok peristaltične črpalke smo nastavili na vrednost 2 mL/min. V 150 mL delovno čašo smo natehtali 25,0 g steklenih kroglic. Nato smo vanjo nalili 40,0 mL začetnega medija, dodali magnet in termostatirali na 37°C. Na magnetnem mešalu smo mešali s hitrostjo 60 rpm skozi celotno simulacijo. Cevke smo napolnili z istim medijem, kot smo ga natočili v delovno čašo. Čašo smo pokrili s stiropornim pokrovom s tremi odprtini. Skozi eno smo vstavili elektrodo pH metra, skozi drugo cevko, ki je dovajala svež medij, in skozi tretjo cevko z mrežico, ki je črpala medij iz delovne čaše. Prosti konec dovodne cevke smo potopili v čašo z medijem, ki smo ga kot prvega dovajali v sistem. Prosti konec odvodne cevke pa smo postavili v prazen merilni valj, kamor smo zbirali tekočino, ki je prišla iz pretočnega sistema. Merilni valj je služil tudi kot dodatna kontrola pretoka. V isti namen smo z alkoholnim flomastrom na delovni čaši označili višino, ki jo je dosegla gladina medija (40 mL), v katerem so bili potopljeni magnet, steklene kroglice, elektroda pH metra in odvodna cevka.

Preden smo pognali poskus smo pripravili vse raztopine, ki smo jih za dotično simulacijo potrebovali. V zadostnih količinah smo jih nalili v steklene čaše iz katerih smo jih po dovodni cevki črpali v pretočni sistem po vnaprej izbranem časovnem planu. Ko je bilo potrebno, smo dovodno cevko potegnili iz raztopine, jo narahlo obrisali in prestavili v čašo z naslednjim medijem. To menjavo dovajanega medija smo izvedli čim hitreje.

Ko smo zagnali črpalko, smo istočasno pognali tudi štoparico. Ves čas izvajanja simulacije smo spremljali vrednosti pH in jih beležili ob vnaprej določenih časovnih intervalih. Dolžino intervalov smo prilagajali glede na spremembe, ki smo jih glede na dovajane raztopine lahko pričakovali.

Začetne simulacije kompleksnejših delov pH profilov smo večinoma izvajali samostojno, ločeno od ostalega dela profila. Ko smo dosegli ustrezno ujemanje simuliranih delov z izbranimi literaturnimi profili, smo simulacijo celotnega profila izvedli v celoti od vstopa v želodec do začetnega dela cekuma. Za zagotovitev ponovljivosti smo vse končne simulacije izvedli v več paralelkah.

Preden smo začeli s simulacijo naših profilov, smo za spoznavanje z delovanjem pretočnega sistema izvedli nekaj ponovitev profilov, ki sta jih v svojih magistrskih nalogah opisala Klemen Božič [16] in Alenka Gjuran [17]. S tem smo tudi preverili ustrezno delovanje našega pretočnega sistema.

Poskuse smo označili po naslednjem ključu:

X – poskusi, vezani na profil, ki smo ga dobili po prvem načinu [2]

V – poskusi, vezani na profil z najvišjim doseženim pH v TČ (visoki profil) [3]

N – poskusi, vezani na profil z najnižjim maksimumom pH v TČ (nizki profil) [3]

S – poskusi, vezani na profil z vrednostjo maksimuma pH v TČ med visokim in nizkim profilom (srednji profil) [3]

r – poskusi hitrega dviga pH

p – poskusi hitrega padca pH

s – poskusi sproščanja ZU

Arabske številke označujejo zaporedno številko poskusa, majhne tiskane črke, ki jim sledijo (a,b,c...), pa paralelke.

3.3.4.1 Hitri dvig pH (simulacija prehoda želodec – duodenum)

Začetne simulacije hitrega dviga pH ob prehodu iz želodca v dvanajstnik so predstavljale prvi korak pri postavljanju protokola za simulacijo celotnega pH profila. Njihov namen je bil določiti ustrezno koncentracijo raztopine TNAF, ki smo jo morali uvajati v raztopino HCl, da smo dosegli dovolj hiter dvig pH do zelenega vrednosti. pH smo nato na ciljni vrednosti vzdrževali z istim pufrom kot smo ga nameravali uporabiti v nadaljevanju simulacije.

Pretočni sistem smo pripravili na način, ki je opisan zgoraj, z eno izjemo. Ker je šlo za kratke, nekajminutne poskuse, katerih rezultate smo naknadno preverili skozi simulacijo celotnega profila, smo jih izvajali brez dodatka steklenih kroglic.

Začetni medij v delovni čaši je bila vedno raztopina HCl take koncentracije, kot jo je zahteval določen profil. Glede na ugotovitve predhodnih magistrskih nalog (Klemen Božič [16]), je bilo za ustrezno hitrost dviga pH najbolje, da se je raztopino TNAF uvajalo v sistem 100

sekund. Zato smo iskali tako koncentracijo TNAF, ki bi omogočala porast pH na zeleno vrednost po 100 sekundah uvajanja, nato pa bi začeli uvajati primeren pufer.

Po nekaj začetnih težavah smo ugotovili, da je za ta namen najbolj enostavno, da smo v začetni fazi v HCl uvajali 0,1 M TNAF. Ko smo ugotovili koliko časa je za zelen dvig potrebno dovajati raztopino s tako koncentracijo TNAF smo iz tega izračunali potrebno koncentracijo za ustrezen dvig po 100 sekundah.

Okvirno vrednost, ki smo jo dobili na ta način, smo preverili tako da smo test ponovili še z novo raztopino z izračunano koncentracijo.

Te poskuse smo pogosto prekinili preden smo jih po planu izvedli do konca, ker je bilo že vnaprej očitno, da ne bomo dobili zelenih rezultatov.

V preglednicah II - V so predstavljeni poskusi hitrega dviga pH za vse simulirane profile.

Preglednica II: Poskusi simulacije hitrega dviga pH, vezani na profil X. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine. Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McII – McIIvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Raztopina TNAF	Pufer 1	Pufer 2
Xr1	G1	20mM HCl	5 mM 0 s – 100 s	McII 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr2	G1	20mM HCl	20 mM 0 s – 100 s	McII 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr3	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 100 s	McII 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr4	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 120 s	McII 6,8 (2x) 120 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr5	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 140 s	McII 6,8 (2x) 140 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr6	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 160 s	McII 6,8 (2x) 160 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr7	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 150 s	McII 6,8 (2x) 150 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr8 a,b	G1	20mM HCl	140 mM 0 s – 100 s	McII 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 15 min
Xr9	G1	20mM HCl	130 mM 0 s – 100 s	McII 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McII 6,8 (100x) 10 min – 30 min

Preglednica III: Poskusi simulacije hitrega dviga pH, vezani na visok profil. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine. Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Raztopina TNAF	Pufer 1
Vr1	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 100 s	McIl 6,4 (2x) 100 s -15 min
Vr2	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 120 s	McIl 6,8 (2x) 120 s -15 min
Vr3	G1	20mM HCl	100 mM 0 s – 110 s	McIl 6,8 (2x) 110 s -15 min

Preglednica IV: Poskusi simulacije hitrega dviga pH, vezani na nizek profil. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine. Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Raztopina TNAF	Pufer 1
Nr1	G1	30mM HCl	100 mM 0 s – 100 s	McIl 5,5 (15x) 100 s -15 min
Nr2	G1	30mM HCl	100 mM 0 s – 130 s	McIl 5,5 (15x) 130 s -15 min
Nr3	G1	30mM HCl	100 mM 0 s – 150 s	McIl 5,5 (15x) 150 s -15 min
Nr4	G1	30mM HCl	100 mM 0 s – 180 s	McIl 5,5 (15x) 180 s -15 min
Nr5	G1	30mM HCl	150 mM 0 s – 100 s	McIl 5,5 (15x) 100 s -15 min
Nr6	G1	30mM HCl	150 mM 0 s – 105 s	McIl 5,5 (15x) 105 s -15 min
Nr7	G1	30mM HCl	150 mM 0 s – 107 s	McIl 5,5 (15x) 107 s -15 min
Nr8	G1	30mM HCl	150 mM 0 s – 108 s	McIl 5,5 (15x) 108 s -15 min

Preglednica V: Poskusi simulacije hitrega dviga pH, vezani na srednji profil. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine. Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Raztopina TNAF	Pufer 1
Sr1	G1	50mM HCl	200 mM 0 s – 100 s	McIl 6,0 (15x) 100 s -15 min
Sr2	G1	50mM HCl	200 mM 0 s – 200 s	McIl 6,0 (15x) 200 s -15 min
Sr3	G1	50mM HCl	200 mM 0 s – 150 s	McIl 6,0 (15x) 150 s -15 min
Sr4	G1	50mM HCl	200 mM 0 s – 130 s	McIl 6,0 (15x) 130 s -15 min
Sr5	G1	50mM HCl	200 mM 0 s – 140 s	McIl 6,0 (15x) 140 s -15 min
Sr6	G1	50mM HCl	280 mM 0 s – 100 s	McIl 6,0 (15x) 100 s -15 min

3.3.4.2 Hiter padec pH (simulacija prehoda ileum – cekum)

Simulacija hitrega padca pH predstavlja spremembo okolja tablete, ko pride skozi ileocekalni sfinkter in na ta način preide iz tankega v debelo črevo.

Pri začetnih poskusih hitrega padca pH smo postopali podobno kot pri hitrem dvigu. Ponovno je šlo za kratke, nekajminutne poskuse, kjer smo uporabili le tri različne medije. Pretočni sistem smo ponovno pripravili po opisu v poglavju 3.3.4 *Simulacija pH profilov*, a brez steklenih kroglic.

Začetni medij v sistemu je bil zadnji pufer simuliranega tankega črevesa določenega profila. Za dosego hitrega padca pH smo vedno uporabili enako raztopino – 0,85% H_3PO_4 . Za razliko od TNAF pri hitrem dvigu pH, smo tu spreminjali čas dovajanja in ne koncentracije. Zadnji medij, ki smo ga črpali v sistem pri poskusih hitrega padca, je bil pufer z vrednostjo pH, ki je ustrezala pogojem v začetnem delu debelega črevesa. Poskusi simulacije padca pH so predstavljeni v preglednici VI.

Preglednica VI: Poskusi simulacije hitrega padca pH. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine. Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McII – McIIvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	H_3PO_4	Pufer
Xp1	G1	McII 6,8 (15x)	0,85% H_3PO_4 0s – 100 s	McII 5,6 (4x) 100 s – 15 min
Xp2	G1	McII 6,8 (15x)	0,85% H_3PO_4 0s – 50 s	McII 5,6 (4x) 50 s – 15 min
Xp3	G1	McII 6,8 (15x)	0,85% H_3PO_4 0s – 40 s	McII 5,6 (4x) 40 s – 15 min
Xp4	G1	McII 6,8 (15x)	0,85% H_3PO_4 0s – 45 s	McII 5,6 (4x) 45 s – 15 min
Xp5	G1	McII 6,8 (15x)	0,85% H_3PO_4 0s – 43 s	McII 5,6 (4x) 43 s – 30 min

3.3.4.3 Osrednji del profila in celotni profil

Ko smo poznali postopek in zaporedje medijev za simulacije začetnih posameznih delov profila, smo izvedli še simulacijo celotnega profila. Pri tem smo upoštevali tako vrednosti pH kot tudi okvirne vrednosti puferske kapacitete medijev posameznih delov GIT.

Pretočni sistem smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.3.4 *Simulacija pH profilov*. Ves čas med poskusom smo beležili vrednosti pH, ki smo jih nato uporabili, da smo v Excelu narisali graf. Ta graf smo nato primerjali z grafom izbranega pH profila iz literature in ocenili ujemanje. Če so bila odstopanja prevelika, smo prilagodili uporabljene medije oziroma časovni plan in izvedli nov poskus. To smo ponovili tolikokrat, dokler nismo dobili ustreznega ujemanja med simuliranim in dejanskim profilom. Ko smo to dosegli, smo za

dokaz ponovljivosti, to simulacijo pod enakimi pogoji izvedli še nekajkrat. Pri visokem in nizkem profilu smo izvedli pet paralelek, pri srednjem pa tri.

V nekaterih primerih, ko smo imeli več težav s simuliranjem postopnega naraščanja pH, smo večkrat ponovili le poskuse srednjega dela profila. Preglednice VII – X prikazujejo poskuse, pri katerih smo simulirali celoten profil oziroma njegove osrednje dele.

Preglednica VII: Poskusi simulacije celotnega pH profila X, oziroma njegovega osrednjega dela. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 6). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer)

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6
X1 a, b	G1	20 mM HCl	0,14M TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McIl 6,6 (100x) 10 min - 120 min			
X2	G1	20 mM HCl	0,14M TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McIl 6,5 (200x) 10 min - 30 min	McIl 6,8 (15x) 30 min – 120 min		
X3	G1	20 mM HCl	0,14M TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,8 (2x) 100 s – 10 min	McIl 6,5 (200x) 10 min - 30 min	McIl 6,8 (15x) 30 min – 100 min	0,85% H ₃ PO ₄ 100 min – 100 min 43 s	McIl 5,5 (4x) 100 min 43 s – 120 min

Preglednica VIII: Poskusi simulacije celotnega visokega pH profila, oziroma njegovega osrednjega dela. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 8). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 6,4 (15x); B – McIlvainov pufer 8,1 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6	Medij 7	Medij 8
V1	G1	20 mM HCl	0,11M TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,4 (2x) 100 s – 10 min	McIl 6,4 (200x) 10 min - 25 min	McIl 6,4 (15x) 25 min – 70 min	McIl 8,1 (15x) 70 min – 160 min			
V2	G1	McIl 6,4 (15x) = A	A:B = 4:1 0 min – 10 min	A:B = 3:1 10 min – 20 min	A:B = 2:1 20 min – 30 min	A:B = 1:1 30 min – 40 min	A:B = 1:2 40 min – 50 min	A:B = 1:3 50 min – 60 min	A:B = 1:4 60 min – 70 min	McIl 8,1 (15x) = B 70 min – 140 min
V3	G1	McIl 6,4 (15x) = A	A:B = 3:1 0 min – 15 min	A:B = 1:1 15 min – 30 min	A:B = 1:3 30 min – 45 min	McIl 8,1 (15x) = B 45 min – 120 min				
V4	G1	McIl 6,4 (15x) = A	A:B = 1:1 0 min – 20 min	McIl 8,1 (15x) = B 20 min – 120 min						
V5 a, b, c, d, e	G1	20 mM HCl	120 mM TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,4 (15x) = A 100 s – 70 min	A:B = 3:1 70 min – 85 min	McIl 8,1 (15x) = B 85 min – 200 min	0,85% H ₃ PO ₄ 200 min – 200 min 45 s	McIl 6,7 (4x) 200 min 45 s – 220 min		

Preglednica IX: Poskusi simulacije celotnega nizkega pH profila, oziroma njegovega osrednjega dela. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 6). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. Sestavi medijev A in B sta navedeni v ustreznih stolpcih. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 5,5 (15x); B – McIlvainov pufer 6,6 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6
N1	G1	30 mM HCl	160 mM TNAF 0 s – 100 s	McIl 5,5 (15x) = A 100 s – 40 min	A:B = 1:3 40 min – 80 min	McIl 6,6 (15x) = B 80 min – 200 min	0,85% H ₃ PO ₄ 200 min – 200 min 30 s	McIl 4,8 (4x) 200 min 30 s – 220 min
N2 a, b, c, d, e	G1	30 mM HCl	160 mM TNAF 0 s – 100 s	McIl 5,5 (15x) = A 100 s – 60 min	A:B = 1:3 60 min – 100 min	McIl 6,6 (15x) = B 100 min – 210 min	0,85% H ₃ PO ₄ 210 min – 210 min 30 s	McIl 4,8 (4x) 210 min 30 s – 230 min

Preglednica X: Poskusi simulacije celotnega srednjega pH profila, oziroma njegovega osrednjega dela. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 7). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še redčitve in časovni intervali dovajanja. Sestavi medijev A in B sta navedeni v ustreznih stolpcih. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 6,0 (15x); B – McIlvainov pufer 7,7 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6	Medij 7
S1	G1	50 mM HCl	280 mM TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,0 (15x) = A 100 s – 20 min	A:B = 1:2 20 min – 70 min	McIl 7,7 (15x) = B 70 min – 200 min	0,85% H ₃ PO ₄ 200 min – 200 min 30 s	McIl 7,7 (4x) 200 min 30 s – 220 min	
S2	G1	McIl 6,0 (15x) = A	A:B = 1:1 0 min – 50 min	McIl 7,7 (15x) = B 50 min – 130 min					
S3	G1	McIl 6,0 (15x) = A	A:B = 2:1 0 min – 20 min	McIl 7,7 (15x) = B 20 min – 130 min					
S4	G1	McIl 6,0 (15x) = A	A:B = 2:1 0 min – 20 min	A:B = 1:3 20 min – 120 min	McIl 7,7 (15x) = B 120 min – 240 min				
S5 a, b, c	G1	50 mM HCl	280 mM TNAF 0 s – 100 s	McIl 6,0 (15x) = A 100 s – 52 min	A:B = 2:1 52 min – 72 min	A:B = 1:3 72 min – 172 min	McIl 7,7 (15x) = B 172 min – 316 min	0,85% H ₃ PO ₄ 316 min – 316 min 45 s	McIl 6,5 (4x) 316 min 45 s – 365 min

3.3.5 Pufrska kapaciteta

Pri simulacijah pogojev v GIT se nismo omejevali le na pH profile, ampak smo upoštevali tudi fiziološke vrednosti pufrske kapacitete. Pri tem smo za osnovo vzeli ugotovitve predhodne magistrske naloge [17], od koder smo prevzeli ciljne vrednosti pufrske kapacitete in tudi redčitve pufrov, s katerimi jih doseči.

Pufrske kapacitete smo merili že posameznim pufrom pred njihovo uporabo. Da pa smo preverili, če tudi pufrska kapaciteta v delovni čaši ustreza zahtevam, smo po vsaki menjavi zbirnega merilnega valja izmerili še pufrsko kapaciteto zbrani tekočini. Meritve pufrske kapacitete smo izvajali le ob poskusih simulacije pH profila, ne pa pri poskusih sproščanja.

Pufrsko kapaciteto smo določili tako, da smo znanemu volumnu izbrane raztopine izmerili pH. V to raztopino smo postopoma z avtomatsko pipeto dodajali majhne količine 0,1 M HCl. Po vsakem dodatku kisline smo ponovno izmerili pH. To smo ponavljali toliko časa, da se je pH raztopine glede na začetnega znižal za 0,3 enote.

Ker smo pufrsko kapaciteto določali v medijih z volumnom 40 mL, smo to morali upoštevati tudi pri izračunu. Zaradi tega pufrske kapacitete nismo izračunali z uporabo enačbe 1 (poglavje 1.4 *Pufrska kapaciteta gastrointestinalnega trakta*), ampak smo uporabili enačbo 2, ki smo jo izpeljali iz enačbe 1.

$$\beta = \frac{V_{HCl} \times C_{HCl}}{\Delta pH \times V}$$

Enačba 2: Izračun pufrske kapacitete; V_{HCl} – volumen dodane raztopine HCl; C_{HCl} – koncentracija raztopine HCl; V – volumen raztopine medija; ΔpH – sprememba pH

Pri tej enačbi smo upoštevali, da so bili volumni dodane raztopine HCl v primerjavi z volumnom pufra zanemarljivo majhni (približno 1%). Če bi raztopina kisline predstavljala večji delež volumna, bi izračunani rezultati odstopali od dejanskega stanja. Množino dodane HCl smo izračunali iz koncentracije in volumna dodane raztopine.

3.3.6 Izdelava tablet

Za izvajanje testov sproščanja ZU smo morali najprej narediti tablete. Izdelali smo ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem iz zgolj dveh sestavin, natrijevega diklofenakata in HPMC. Taka enostavna sestava nam je koristila tudi pri analizi vzorcev, saj se ni iz tablet sproščalo nič razen ZU in je za določitev koncentracije ZU zadoščal že spektrofotometer.

Izdelali smo dve seriji 400 mg tablet. Prve so imele vsebnost ZU 25%, druge pa 50%. Pri obeh serijah smo postopali na enak način. Najprej smo natehtali zadostno količino ZU in HPMC in obe snovi stresli v plastično vrečko, kjer smo ju s stresanjem dobro premešali. Nato

smo na tehtalne čolničke zatehtali po 400 mg tabletirne mase in jo stresli v matrično vdolbino tabletirke na ekscenter in ročno stisnili tableto. Izdelanim tabletam smo izmerili trdnost. Glede na izmerjeno trdnost smo prek nastavitve zgornjega pečata prilagajali silo stiskanja, dokler nismo dosegli trdnosti približno 100 N. Za stiskanje smo uporabili pečat s premerom 12 mm, ravnimi robovi in brez zarez.

Natančnejše informacije o pogojih stiskanja tablet podaja razpredelnica XI.

Preglednica XI: Parametri stiskanja tablet. Prikazani so serija tablet, masni delež ZU v tabletirni masi, nastavitve zgornjega in spodnjega pečata, sila stiskanja in trdnost izdelanih tablet.

Serija	M	N
Delež ZU	25%	50%
Nastavitev zgornjega pečata	10,0 mm	10,0 mm
Nastavitev spodnjega pečata	12,2 mm	12,0 mm
Trdnost tablet	100 – 110 N	95 – 105 N
Sila stiskanja (zgornji pečat)	10,1 – 11,0 kN	13,3 – 14,5 kN

Intervala trdnosti tablet smo določili z merjenjem trdnosti tablet, stisnjenih z največjo in najmanjšo silo stiskanja.

3.3.7 Testi sproščanja

Ko smo potrdili ponovljivost simulacije pH profilov, smo začeli s testi sproščanja ZU iz tablet. Pretočni sistem smo pripravili na enak način kot za simulacijo pH profilov z dvema razlikama. Prva je bila, da smo v delovno čašo dodali še tableto z ZU, ki smo jo predhodno stehali na analitski tehtnici. Ob času 0 smo v čašo spustili tableto in pognali sistem.

Druga je bila, da v medij delovne čaše v tem primeru nismo potopili pH metra, ker bi predstavljal oviro tableti ob njenem gibanju po čaši. Tableta bi se ob tem lahko zataknila ali poškodovala, kar bi oboje lahko vplivala na hitrost sproščanja ZU.

Vzorci smo zbirali in analizirali po postopku opisanem v poglavju 3.3.8 *Priprava in analiza vzorcev*, iz dobljenih podatkov, pa smo nato izračunali potek sproščanja ZU iz tablet.

Preglednice XII – XIV predstavljajo menjave medijev pri testih sproščanja.

Preglednica XII: Menjave medijev pri testih sproščanja ZU na visokem pH profilu. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 6). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 6,4 (15x); B – McIlvainov pufer 8,1 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Serija tablete	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6
Vs1 a, c	G1	M	20 mM HCl 0 min – 20 min	120 mM TNAF 20 min – 21 min 40 s	McIl 6,4 (15x) = A 21 min 40 s – 90 min	A:B = 3:1 90 min – 105 min	McIl 8,1 (15x) = B 105 min – 252 min	0,85% H ₃ PO ₄ 252 min - 252 min 45 s	McIl 6,7 (4x) 252 min 45 s – 360 min
Vs1b	G2	M	20 mM HCl 0 min – 20 min	120 mM TNAF 20 min – 21 min 40 s	McIl 6,4 (15x) = A 21 min 40 s – 90 min	A:B = 3:1 90 min – 105 min	McIl 8,1 (15x) = B 105 min – 252 min	0,85% H ₃ PO ₄ 252 min - 252 min 45 s	McIl 6,7 (4x) 252 min 45 s – 360 min
Vs2 a, c	G2	N	20 mM HCl 0 min – 20 min	120 mM TNAF 20 min – 21 min 40 s	McIl 6,4 (15x) = A 21 min 40 s – 90 min	A:B = 3:1 90 min – 105 min	McIl 8,1 (15x) = B 105 min – 252 min	0,85% H ₃ PO ₄ 252 min - 252 min 45 s	McIl 6,7 (4x) 252 min 45 s – 360 min
Vs2b	G1	N	20 mM HCl 0 min – 20 min	120 mM TNAF 20 min – 21 min 40 s	McIl 6,4 (15x) = A 21 min 40 s – 90 min	A:B = 3:1 90 min – 105 min	McIl 8,1 (15x) = B 105 min – 252 min	0,85% H ₃ PO ₄ 252 min - 252 min 45 s	McIl 6,7 (4x) 252 min 45 s – 360 min

Preglednica XIII: Menjave medijev pri testih sproščanja ZU na nizkem pH profilu. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 6). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 5,5 (15x); B – McIlvainov pufer 6,6 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Serija tablete	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6
Ns1 a, b, d, f	G1	M	30 mM HCl 0 min – 60 min	160 mM TNAF 60 min – 61 min 40 s	McIl 5,5 (15x) = A 61 min 40 s – 120 min	A:B = 1:3 120 min – 160 min	McIl 6,6 (15x) = B 160 min – 270 min	0,85% H ₃ PO ₄ 270 min – 270 min 30 s	McIl 4,8 (4x) 270 min 30 s – 360 min
Ns1 c, e, g	G2	M	30 mM HCl 0 min – 60 min	160 mM TNAF 60 min – 61 min 40 s	McIl 5,5 (15x) = A 61 min 40 s – 120 min	A:B = 1:3 120 min – 160 min	McIl 6,6 (15x) = B 160 min – 270 min	0,85% H ₃ PO ₄ 270 min – 270 min 30 s	McIl 4,8 (4x) 270 min 30 s – 360 min

Preglednica XIV: Menjave medijev pri testih sproščanja ZU na srednjem pH profilu. Prikazani so oznake poskusa, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, začetni medij in dovajane raztopine (mediji 1 – 7). Pod dovajanimi raztopinami so navedeni še časovni intervali dovajanja. (Legenda: McIl – McIlvainov pufer; A – McIlvainov pufer 6,0 (15x); B – McIlvainov pufer 7,7 (15x))

Oznaka poskusa	Pretočni sistem	Serija tablete	Začetni medij	Medij 1	Medij 2	Medij 3	Medij 4	Medij 5	Medij 6	Medij 7
Ss1 a, c	G1	M	50 mM HCl 0 min – 15 min	280 mM TNAF 15 min – 16 min 40 s	McIl 6,0 (15x) = A 16 min 40 s – 67 min	A:B = 2:1 67 min – 87 min	A:B = 1:3 87 min – 187 min	McIl 7,7 (15x) = B 187 min – 331 min	0,85% H ₃ PO ₄ 331 min – 331 min 45 s	McIl 6,5 (4x) 331 min 45 s – 380 min
Ss1 b, d	G2	M	50 mM HCl 0 min – 15 min	280 mM TNAF 15 min – 16 min 40 s	McIl 6,0 (15x) = A 16 min 40 s – 67 min	A:B = 2:1 67 min – 87 min	A:B = 1:3 87 min – 187 min	McIl 7,7 (15x) = B 187 min – 331 min	0,85% H ₃ PO ₄ 331 min – 331 min 45 s	McIl 6,5 (4x) 331 min 45 s – 380 min

3.3.8 Priprava in analiza vzorcev

Pri testih sproščanja in izdelavi umeritvenih krivulj smo koncentracijo ZU v vzorcih določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance. Meritve smo izvajali pri naslednjih pogojih:

- absorpcijski maksimum: 276 nm;
- kontrolna valovna dolžina: 400 nm;
- spekter snemanja: od 200 do 400 nm;
- dimenzije kivete: volumen 4 mL, dolžina stranice 1 cm.

Raztopino, ki je pritekla iz pretočnega sistema, smo zbirali v 100 mL merilne valje, v katere smo predhodno natočili 40,0 mL 0,1 M NaOH in tako preprečili morebitno obarvanje ZU ter dosegli raztapljanje neraztopljene ZU. Po 20 minutah, ko smo v valj zbrali 40,0 mL raztopine z ZU, smo zbiranje vzorca nadaljevali v naslednjem, enako pripravljenem valju.

Dobljeno raztopino smo premešali, potegnili v brizgo in prefiltrirali prek filtra za brizgo. 10 do 12 mL filtrata smo zbrali v epruvete in mu izmerili absorbanco pri zgoraj opisanih pogojih. Pri vrednostih absorbance, ki so bile višje od zgornje meje območja linearnosti (1,2), smo 600 µL vzorca razredčili z 2400 µL zmesi ustreznega pufru in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1. To zmes smo uporabili tudi kot slepo raztopino.

4 Rezultati

4.1. Izbrani profili

Za simulacijo smo izbrali štiri različne pH profile. To so bili profil prostovoljca 6 iz študije Ibekweja in sodelavcev [4] (profil X), in trije profili iz študije Kozioleka in sodelavcev [5]: 2-3 (visok profil – V), 2-2 (nizek profil – N) in 1-6 (srednji profil – S).

4.2 Umeritvene krivulje

Preglednica XV prikazuje enačbe umeritvenih krivulj za določanje koncentracije ZU v različnih pufrih in pripadajoče Pearsonove koeficiente korelacije (R^2).

Preglednica XV: Enačbe krivulj umeritvenih premic. Navedeni so mediji, ki smo jih zmešali z 0,1 M raztopino NaOH, v razmerju 1:1, enačba krivulje (C: koncentracija [mg/L]; A: absorbanca) in Pearsonove koeficiente korelacije (R^2).

Medij v zmesi z 0,1 M NaOH	Enačba krivulje	R^2
HCl	$C = 0,0324A + 0,0024$	0,9996
fosfatni pufer (pH = 6,8)	$C = 0,0314A + 0,0078$	0,9996
Mcllvainov pufer 5,5 (15x)	$C = 0,0327A - 0,0246$	0,9993
Mcllvainov pufer 6,6 (15x)	$C = 0,0326A - 0,0354$	0,9997
Mcllvainov pufer 4,8 (4x)	$C = 0,0323A - 0,0003$	0,9998
Mcllvainov pufer 6,4 (15x)	$C = 0,0325A - 0,0273$	0,9998
Mcllvainov pufer 8,1 (15x)	$C = 0,0321A - 0,0022$	1
Mcllvainov pufer 6,7 (4x)	$C = 0,0338A - 0,0024$	0,9999
Mcllvainov pufer 6,0 (15x)	$C = 0,0326A - 0,0154$	0,9997
Mcllvainov pufer 7,7 (15x)	$C = 0,0323A - 0,0097$	1
Mcllvainov pufer 6,5 (4x)	$C = 0,0335A - 0,0138$	0,9998

Koncentracije natrijevega diklofenakata v raztopinah za določanje umeritvenih krivulj so bile v razponu 0,01 – 47,9 mg/L.

4.3 Simulacija pH profilov

4.3.1 Hitri dvig (simulacija prehoda želodec – duodenum)

Preglednice XVI – XIX prikazujejo potek pH pri poskusih, kjer smo simulirali hitri dvig pH.

Preglednica XVI: Rezultati merjenja pH pri poskusih hitrega dviga za profil X. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH									
	Xr1	Xr2	Xr3	Xr4	Xr5	Xr6	Xr7	Xr8a	Xr8b	Xr9
0	1,90	1,90	1,93	1,93	1,96	1,91	1,95	1,94	1,98	1,98
1	1,90	1,89	1,92	1,92	1,94	1,90	1,92	1,92	1,95	1,95
1,5	1,90	1,89	1,91	/	/	/	/	/	/	/
2	1,90	1,89	1,92	1,93	1,93	1,89	1,92	1,93	1,94	1,94
2,5	1,90	1,89	2,01	2,04	2,04	2,01	2,04	2,09	2,10	2,09
3	1,90	1,90	2,20	2,25	2,23	2,20	2,22	2,50	2,45	2,39
3,5	1,92	1,93	2,42	2,63	2,55	2,54	2,61	5,65	2,84	2,72
4	1,95	1,98	2,66	5,57	3,53	4,27	5,27	6,63	3,73	3,16
4,5	2,00	2,04	3,00	6,39	6,15	6,80	6,56	6,74	5,54	4,38
5	2,06	2,13	3,63	6,54	6,45	7,08	6,73	6,80	6,06	5,56
5,5	/	2,20	4,80	6,62	6,58	7,11	6,80	6,82	6,27	5,99
6	/	/	5,74	6,66	6,67	7,11	6,85	6,84	6,40	6,17
7	/	/	6,00	6,69	6,77	7,08	6,89	6,87	6,55	6,38
8	/	/	6,18	/	6,82	7,06	6,93	6,87	6,65	6,50
9	/	/	/	/	6,85	/	6,94	6,87	6,71	6,58
10	/	/	/	/	/	/	/	6,87	6,75	6,62
12	/	/	/	/	/	/	/	6,86	6,80	6,68
14	/	/	/	/	/	/	/	6,87	6,81	6,71
16	/	/	/	/	/	/	/	6,87	6,83	6,71
18	/	/	/	/	/	/	/	6,88	6,83	6,73
20	/	/	/	/	/	/	/	6,89	6,84	6,74
25	/	/	/	/	/	/	/	6,91	6,86	6,75
30	/	/	/	/	/	/	/	6,92	6,89	6,79
35	/	/	/	/	/	/	/	6,94	6,90	/
40	/	/	/	/	/	/	/	6,95	6,92	/

Preglednica XVII: Rezultati merjenja pH pri poskusih hitrega dviga za visok profil. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH		
	Vr1	Vr2	Vr3
0	1,91	1,93	1,94
1	1,92	1,93	1,93
2	1,92	1,93	1,93
2,5	2,05	2,04	2,04
3	2,25	2,24	2,23
3,5	2,48	2,63	2,53
4	2,73	3,20	2,84
4,5	3,02	4,71	3,23
5	3,48	5,81	4,00
5,5	4,30	6,07	5,20
6	5,12	6,21	5,69
7	5,83	6,36	6,07
8	6,08	6,43	6,24
9	6,21	6,47	6,34
10	6,29	6,50	6,40
11	/	/	6,43
12	/	/	6,45
13	/	/	6,46
14	/	/	6,47
15	/	/	6,47

Preglednica XVIII: Rezultati merjenja pH pri poskusih hitrega dviga za nizek profil. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH							
	Nr1	Nr2	Nr3	Nr4	Nr5	Nr6	Nr7	Nr8
0	1,79	1,83	1,82	1,8	1,82	1,82	1,81	1,83
1	1,79	1,83	1,81	1,79	1,82	1,81	1,8	1,82
2	1,79	1,83	1,81	1,8	1,82	1,83	1,82	1,82
2,5	1,87	1,89	1,87	1,98	1,94	1,94	1,94	1,93
3	2,02	1,99	2,00	2,40	2,18	2,16	2,17	2,14
3,5	2,17	2,14	2,16	6,07	2,64	2,6	2,62	2,61
4	2,28	2,40	2,42	/	2,95	3,29	3,25	3,56
4,5	2,32	2,60	2,88	/	3,16	3,62	3,70	4,81
5	2,34	2,67	3,18	/	3,25	4,05	4,35	5,23
5,5	/	2,72	3,35	/	3,33	4,53	4,93	5,40
6	/	/	3,50	/	3,39	4,88	5,21	5,45
7	/	/	3,75	/	3,54	5,16	5,41	5,53
8	/	/	3,97	/	3,69	5,26	5,49	5,56
9	/	/	4,17	/	3,84	5,29	5,54	5,57
10	/	/	4,34	/	3,99	5,32	5,55	5,57
11	/	/	/	/	/	5,34	5,56	5,56
12	/	/	/	/	/	5,35	5,55	5,56
13	/	/	/	/	/	5,36	5,55	5,55
14	/	/	/	/	/	5,36	5,54	5,55
15	/	/	/	/	/	5,37	5,54	5,54

Preglednica XIX: Rezultati merjenja pH pri poskusih hitrega dviga za srednji profil. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH					
	Sr1	Sr2	Sr3	Sr4	Sr5	Sr6
0	1,62	1,6	1,61	1,63	1,62	1,63
1	1,62	1,59	1,61	1,63	1,62	1,62
2	1,62	1,60	1,62	1,64	1,62	1,64
2,5	1,71	1,72	1,71	1,72	1,73	1,80
3	1,87	1,92	1,90	1,89	1,88	2,12
3,5	2,11	2,18	2,15	2,15	2,14	2,88
4	2,21	2,79	2,73	2,69	2,70	4,98
4,5	2,25	3,69	5,75	3,04	4,83	5,65
5	2,29	6,45	6,31	3,24	5,75	5,82
5,5	/	7,04	6,35	3,40	5,85	5,90
6	/	7,27	6,36	3,55	5,90	5,96
7	/	7,29	6,40	3,93	5,96	6,03
8	/	/	6,42	/	6,00	6,08
9	/	/	/	/	6,04	6,10
10	/	/	/	/	6,06	6,14
11	/	/	/	/	/	6,15
12	/	/	/	/	/	6,17

4.3.2 Hitri padec (simulacija prehoda ileum – cekum)

Preglednica XX prikazuje potek pH pri poskusih, kjer smo simulirali hitri padec pH ob prehodu iz tankega v debelo črevo.

Preglednica XX: Rezultati merjenja pH pri poskusih hitrega padca. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH				
	Xp1	Xp2	Xp3	Xp4	Xp5
0	6,81	6,77	6,86	6,65	6,75
1	6,81	6,77	6,86	6,65	6,75
2	6,81	6,76	6,86	6,65	6,73
2,5	6,34	6,33	6,52	6,26	6,32
3	5,32	5,90	6,30	5,91	6,00
3,5	3,68	5,60	6,06	5,62	5,70
4	3,33	5,38	5,88	5,43	5,53
4,5	/	5,23	5,81	5,30	5,44
5	3,22	5,17	5,78	5,24	5,40
5,5	/	/	/	5,23	5,37
6	/	5,17	5,76	5,24	5,37
7	/	5,23	5,75	5,29	5,40
8	/	5,29	5,74	5,34	5,44
9	/	5,33	5,74	5,38	5,47
10	/	5,38	5,73	5,41	5,49
11	/	5,42	/	5,44	5,51
12	/	5,45	/	5,47	5,53
13	/	5,47	/	5,49	5,54
14	/	5,50	/	5,50	5,56
15	/	5,51	/	5,51	5,57

4.3.3 Osrednji deli in celotni profil

Preglednice XXI – XXIV prikazujejo potek pH pri poskusih, kjer smo simulirali osrednji del oziroma celotni profil.

Preglednica XXI: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega profila X (X3) oziroma njegovega osrednjega dela (X1a-2). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t (min)	pH			
	X1a	X1b	X2	X3
0	1,86	1,90	1,90	1,96
1	1,84	1,91	1,89	1,94
2	1,86	1,93	1,91	1,95
2,5	2,07	2,1	2,09	2,12
3	2,47	2,51	2,56	2,48
3,5	2,97	3,8	3,05	2,96
4	5,34	4,06	4,98	3,73
4,5	6,61	5,75	6,08	5,44
5	6,77	6,12	6,37	6,35
5,5	6,82	6,30	6,51	6,54
6	6,85	6,40	6,60	6,61

Preglednica XXI: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega profila X (X3) oziroma njegovega osrednjega dela (X1a-2). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t (min)	pH			
	X1a	X1b	X2	X3
7	6,87	6,54	6,86	6,68
8	6,87	6,69	6,93	6,74
9	6,87	6,75	6,93	6,77
10	6,87	6,77	6,93	6,79
12	6,86	6,79	6,91	6,82
14	6,86	6,82	6,91	6,82
16	6,87	6,83	6,92	6,83
18	6,87	6,84	6,93	6,84
20	6,88	6,84	6,94	6,85
25	6,90	6,86	6,96	6,87
30	6,92	6,90	6,97	6,90
35	6,93	6,91	6,97	6,90
40	6,94	6,92	6,94	6,90
45	6,94	6,93	6,91	6,90
50	6,94	6,93	6,89	6,89
55	6,93	6,92	6,87	6,89
60	6,92	6,92	6,86	6,89
65	6,91	6,91	6,85	6,88
70	6,89	6,91	6,84	6,86
75	6,87	6,90	6,84	6,85
80	6,85	6,88	6,83	6,84
85	6,83	6,87	6,83	6,84
90	6,82	6,85	6,82	6,84
95	6,80	6,84	6,82	6,84
100	6,79	6,83	6,82	6,84
101	/	/	/	6,84
102	/	/	/	6,84
102,5	/	/	/	6,47
103	/	/	/	6,17
103,5	/	/	/	5,90
104	/	/	/	5,71
104,5	/	/	/	5,54
105	6,78	6,82	6,82	5,49
105,5	/	/	/	5,45
106	/	/	/	5,43
107	/	/	/	5,43
108	/	/	/	5,44
109	/	/	/	5,45
110	6,76	6,81	6,82	5,46
112	/	/	/	5,48
114	/	/	/	5,49
115	6,75	6,79	6,82	/
116	/	/	/	5,50
118	/	/	/	5,51
120	6,73	6,78	6,82	5,51

Preglednica XXII: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega visokega profila (V1, V5a-e) oziroma njegovega osrednjega dela (V2-4). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Navedene so tudi povprečne vrednosti paralelk V5a-e in njihov RSD. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t(min)	pH										V5 RSD (%)
	V1	V2	V3	V4	V5a	V5b	V5c	V5d	V5e	V5 povp	
0	1,86	6,41	6,42	6,39	1,93	1,88	1,93	1,93	1,92	1,92	1,13
1	1,86	/	/	/	1,93	1,88	1,93	1,93	1,91	1,92	1,14
2	1,87	6,42	6,43	6,41	1,94	1,89	1,95	1,94	1,92	1,93	1,24
2,5	2,00	/	/	/	2,08	2,05	2,15	2,08	2,08	2,09	1,77
3	2,24	/	/	/	2,31	2,42	2,60	2,40	2,38	2,42	4,45
3,5	2,51	/	/	/	3,03	5,04	3,36	3,38	3,50	3,66	21,57
4	2,82	6,46	6,47	6,5	3,46	6,31	6,28	6,06	6,45	5,71	22,18
4,5	3,30	/	/	/	4,17	6,44	6,33	6,28	6,49	5,94	16,73
5	4,30	/	/	/	5,26	6,48	6,35	6,36	6,52	6,19	8,51
5,5	5,29	/	/	/	5,60	6,49	6,36	6,39	6,53	6,27	6,11
6	5,75	6,5	6,52	6,59	5,79	6,50	6,38	6,41	6,54	6,32	4,83
7	6,10	/	/	/	5,98	6,49	6,40	6,45	6,55	6,37	3,56
8	6,25	6,54	6,56	6,67	6,12	6,49	6,42	6,47	6,55	6,41	2,63
9	6,35	/	/	/	6,24	6,49	6,43	6,47	6,57	6,44	1,91
10	6,39	6,57	6,61	6,74	6,36	6,49	6,44	6,50	6,56	6,47	1,16
12	6,44	6,59	6,63	6,80	6,40	6,49	6,43	6,50	6,55	6,47	0,92
14	6,47	6,62	6,66	6,85	6,43	6,49	6,44	6,50	6,54	6,48	0,70
16	6,49	6,65	6,69	6,89	6,44	6,48	6,44	6,50	6,53	6,48	0,60
18	6,50	6,68	6,72	6,93	6,45	6,48	6,45	6,50	6,52	6,48	0,48
20	6,51	6,70	6,78	6,96	6,46	6,47	6,45	6,49	6,52	6,48	0,43
22	/	6,72	6,83	6,99	/	/	/	/	/	/	/
24	/	6,75	6,87	7,05	/	/	/	/	/	/	/
25	6,54	/	/	/	6,46	6,47	6,46	6,50	6,49	6,48	0,28
26	/	6,78	6,92	7,13	/	/	/	/	/	/	/
28	/	6,81	6,95	7,20	/	/	/	/	/	/	/
30	6,55	6,83	6,98	7,27	6,47	6,46	6,47	6,5	6,49	6,48	0,25
35	6,53	6,91	7,07	7,41	6,47	6,46	6,48	6,49	6,48	6,48	0,18
40	6,51	6,98	7,18	7,53	6,47	6,46	6,48	6,49	6,47	6,47	0,18
45	6,50	7,06	7,26	7,62	6,47	6,45	6,48	6,50	6,47	6,47	0,28
50	6,49	7,15	7,37	7,71	6,47	6,45	6,48	6,49	6,46	6,47	0,24
55	6,48	7,23	7,48	7,78	6,47	6,45	6,48	6,49	6,46	6,47	0,24
60	6,47	7,31	7,59	7,84	6,47	6,45	6,49	6,50	6,46	6,47	0,32
65	6,46	7,39	7,67	7,89	6,47	6,45	6,49	6,49	6,46	6,47	0,28
70	6,45	7,43	7,74	7,93	6,47	6,45	6,49	6,49	6,46	6,47	0,28
72	6,46	/	/	/	6,48	6,45	6,49	6,49	6,46	6,47	0,28
74	6,61	/	/	/	6,51	6,48	6,53	6,53	6,49	6,51	0,35
75	/	7,51	7,8	7,97	/	/	/	/	/	/	/
76	6,77	/	/	/	6,55	6,52	6,57	6,57	6,53	6,55	0,35
78	6,90	/	/	/	6,58	6,56	6,60	6,60	6,57	6,58	0,27
80	7,01	7,62	7,85	8,00	6,61	6,59	6,64	6,63	6,60	6,61	0,31
82	7,1	/	/	/	6,64	6,62	6,67	6,66	6,62	6,64	0,34
84	7,17	/	/	/	6,66	6,65	6,69	6,69	6,65	6,67	0,31
85	/	7,70	7,89	8,02	/	/	/	/	/	/	/
86	7,26	/	/	/	6,69	6,67	6,71	6,71	6,67	6,69	0,30
88	7,32	/	/	/	6,75	6,73	6,77	6,77	6,73	6,75	0,30
90	7,37	7,77	7,92	8,03	6,86	6,84	6,88	6,89	6,84	6,86	0,33
92	7,43	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
94	7,48	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
95	/	7,83	7,95	8,05	7,08	7,07	7,09	7,12	7,07	7,09	0,29

Preglednica XXII: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega visokega profila (V1, V5a-e) oziroma njegovega osrednjega dela (V2-4). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Navedene so tudi povprečne vrednosti paralelk V5a-e in njihov RSD.

t(min)	pH										V5 RSD (%)
	V1	V2	V3	V4	V5a	V5b	V5c	V5d	V5e	V5 povp	
96	7,53	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
98	7,57	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
100	7,61	7,88	7,98	8,06	7,24	7,24	7,28	7,28	7,23	7,25	0,33
105	7,70	7,93	7,99	8,07	7,38	7,38	7,41	7,42	7,37	7,39	0,29
110	7,78	7,96	8,00	8,08	7,50	7,51	7,53	7,54	7,49	7,51	0,28
115	7,85	7,98	8,01	8,08	7,60	7,60	7,62	7,64	7,58	7,61	0,30
120	7,90	8,00	8,01	8,09	7,68	7,68	7,70	7,72	7,67	7,69	0,26
125	7,94	8,01	/	/	7,75	7,76	7,77	7,80	7,74	7,76	0,30
130	7,97	8,02	/	/	7,82	7,82	7,81	7,86	7,80	7,82	0,29
135	8,00	8,03	/	/	7,87	7,87	7,86	7,91	7,85	7,87	0,29
140	8,02	8,04	/	/	7,91	7,91	7,9	7,95	7,89	7,91	0,29
145	8,03	/	/	/	7,95	7,95	7,93	7,99	7,92	7,95	0,34
150	8,05	/	/	/	7,99	7,98	7,96	8,01	7,95	7,98	0,30
155	8,05	/	/	/	8,01	8,00	7,98	8,03	7,98	8,00	0,27
160	8,05	/	/	/	8,03	8,02	8,00	8,05	7,99	8,02	0,30
165	/	/	/	/	8,04	8,03	8,01	8,06	8,00	8,03	0,30
170	/	/	/	/	8,05	8,04	8,02	8,07	8,02	8,04	0,26
175	/	/	/	/	8,06	8,05	8,02	8,08	8,02	8,05	0,32
180	/	/	/	/	8,07	8,05	8,03	8,08	8,03	8,05	0,28
185	/	/	/	/	8,08	8,06	8,04	8,09	8,03	8,06	0,32
190	/	/	/	/	8,08	8,06	8,05	8,09	8,03	8,06	0,30
195	/	/	/	/	8,09	8,06	8,05	8,09	8,03	8,06	0,32
200	/	/	/	/	8,08	8,06	8,05	8,09	8,03	8,06	0,30
201	/	/	/	/	8,09	8,06	8,05	8,09	8,03	8,06	0,32
202	/	/	/	/	7,95	7,98	7,84	7,80	7,93	7,90	0,97
202,5	/	/	/	/	7,26	7,27	7,10	7,09	7,16	7,18	1,19
203	/	/	/	/	7,00	6,81	6,69	6,66	6,75	6,78	1,99
203,5	/	/	/	/	6,85	6,67	6,64	6,63	6,63	6,68	1,41
204	/	/	/	/	6,74	6,62	6,65	6,63	6,61	6,65	0,79
204,5	/	/	/	/	6,70	6,61	6,65	6,63	6,6	6,64	0,60
205	/	/	/	/	6,68	6,61	6,66	6,64	6,61	6,64	0,46
205,5	/	/	/	/	6,66	6,61	6,66	6,64	6,61	6,64	0,38
206	/	/	/	/	6,66	6,62	6,66	6,65	6,61	6,64	0,35
207	/	/	/	/	6,65	6,62	6,67	6,66	6,62	6,64	0,35
208	/	/	/	/	6,66	6,63	6,67	6,67	6,63	6,65	0,31
209	/	/	/	/	6,66	6,63	6,67	6,67	6,63	6,65	0,31
210	/	/	/	/	6,67	6,63	6,67	6,67	6,64	6,66	0,29
212	/	/	/	/	6,67	6,63	6,68	6,68	6,65	6,66	0,33
214	/	/	/	/	6,67	6,64	6,69	6,69	6,66	6,67	0,32
216	/	/	/	/	6,67	6,64	6,69	6,70	6,66	6,67	0,36
218	/	/	/	/	6,67	6,64	6,69	6,70	6,67	6,67	0,34
220	/	/	/	/	6,67	6,65	6,69	6,70	6,67	6,68	0,29
225	/	/	/	/	/	/	/	/	6,67	/	/
230	/	/	/	/	/	/	/	/	6,67	/	/
235	/	/	/	/	/	/	/	/	6,68	/	/
240	/	/	/	/	/	/	/	/	6,67	/	/

Preglednica XXIII: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega nizkega profila. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Poleg tega so navedene tudi povprečne vrednosti paralelk N2a-e in njihov RSD. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t(min)	pH							N2 RSD (%)
	N1	N2a	N2b	N2c	N2d	N2e	N2 povp	
0	1,80	1,78	1,78	1,75	1,76	1,74	1,76	1,02
1	1,79	1,78	1,77	1,75	1,76	1,74	1,76	0,90
2	1,82	1,81	1,77	1,76	1,77	1,75	1,77	1,29
2,5	1,98	1,95	1,89	1,90	1,90	1,89	1,91	1,32
3	2,28	2,20	2,13	2,13	2,14	2,20	2,16	1,70
3,5	3,04	2,74	2,65	2,65	2,66	2,70	2,68	1,47
4	5,17	3,42	3,23	3,20	3,22	3,18	3,25	2,98
4,5	5,61	4,01	3,60	3,69	3,71	3,58	3,72	4,64
5	/	4,69	4,10	4,72	4,20	4,02	4,35	7,69
5,5	5,71	5,02	4,71	5,12	5,06	4,50	4,88	5,45
6	5,74	5,19	5,06	5,23	5,37	4,83	5,14	3,97
7	5,76	5,37	5,33	5,37	5,46	5,07	5,32	2,78
8	5,78	5,44	5,45	5,46	5,50	5,22	5,41	2,05
9	5,77	5,46	5,51	5,49	5,50	5,30	5,45	1,60
10	5,75	5,47	5,53	5,51	5,51	5,35	5,47	1,33
12	5,72	5,49	5,54	5,53	5,52	5,40	5,50	1,03
14	5,69	5,5	5,54	5,52	5,54	5,42	5,50	0,90
16	5,51	5,52	5,54	5,51	5,55	5,45	5,51	0,71
18	5,51	5,53	5,55	5,51	5,56	5,47	5,52	0,65
20	5,51	5,54	5,55	5,51	5,57	5,49	5,53	0,58
25	5,52	5,56	5,57	5,50	5,59	5,53	5,55	0,64
30	5,52	5,57	5,58	5,50	5,60	5,58	5,57	0,69
35	5,53	5,58	5,59	5,50	5,60	5,59	5,57	0,73
40	5,53	5,59	5,60	5,50	5,60	5,60	5,58	0,79
42	5,54	/	/	/	/	/	/	/
44	5,62	/	/	/	/	/	/	/
45	/	5,60	5,61	5,50	5,60	5,61	5,58	0,85
46	5,72	/	/	/	/	/	/	/
48	5,80	/	/	/	/	/	/	/
50	5,87	5,61	5,61	5,49	5,60	5,61	5,58	0,94
52	5,94	/	/	/	/	/	/	/
54	6,00	/	/	/	/	/	/	/
55	/	5,61	5,62	5,49	5,60	5,62	5,59	0,99
56	6,04	/	/	/	/	/	/	/
58	6,08	/	/	/	/	/	/	/
60	6,12	5,62	5,63	5,50	5,60	5,62	5,59	0,96
62	/	5,62	5,64	5,50	5,60	5,62	5,60	0,99
64	/	5,72	5,71	5,58	5,67	5,70	5,68	1,00
65	6,19	/	/	/	/	/	/	/
66	/	5,81	5,80	5,67	5,76	5,79	5,77	0,99
68	/	5,90	5,89	5,76	5,85	5,87	5,85	0,96
70	6,25	5,98	5,95	5,83	5,92	5,94	5,92	0,96
72	/	6,04	6,00	5,89	5,98	6,00	5,98	0,93
74	/	6,09	6,06	5,95	6,03	6,05	6,04	0,87
75	6,29	/	/	/	/	/	/	/
76	/	6,13	6,10	5,99	6,07	6,10	6,08	0,88
78	/	6,17	6,14	6,03	6,11	6,13	6,12	0,86
80	6,31	6,21	6,17	6,06	6,14	6,15	6,15	0,90
82	6,32	/	/	/	/	/	/	/
84	6,32	/	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXIII: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega nizkega profila. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Poleg tega so navedene tudi povprečne vrednosti paralelek N2a-e in njihov RSD. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t(min)	pH							N2 RSD (%)
	N1	N2a	N2b	N2c	N2d	N2e	N2 povp	
85	/	6,27	6,24	6,13	6,21	6,22	6,21	0,84
86	6,35	/	/	/	/	/	/	/
88	6,37	/	/	/	/	/	/	/
90	6,39	6,32	6,30	6,18	6,26	6,27	6,27	0,86
92	6,41	/	/	/	/	/	/	/
94	6,42	/	/	/	/	/	/	/
95	/	6,35	6,33	6,22	6,29	6,31	6,30	0,79
96	6,44	/	/	/	/	/	/	/
98	6,45	/	/	/	/	/	/	/
100	6,46	6,37	6,36	6,25	6,32	6,34	6,33	0,75
102	/	6,38	6,37	6,26	6,33	6,35	6,34	0,75
104	/	6,41	6,39	6,29	6,36	6,37	6,36	0,72
105	6,48	/	/	/	/	/	/	/
106	/	6,43	6,42	6,31	6,39	6,40	6,39	0,74
108	/	6,46	6,44	6,34	6,41	6,43	6,42	0,72
110	6,51	6,48	6,44	6,36	6,43	6,45	6,43	0,69
112	/	6,49	6,46	6,38	6,45	6,48	6,45	0,67
114	/	6,51	6,48	6,40	6,46	6,49	6,47	0,65
115	6,53	/	/	/	/	/	/	/
116	/	6,53	6,49	6,41	6,47	6,51	6,48	0,71
118	/	6,54	6,5	6,43	6,48	6,53	6,50	0,68
120	6,53	6,55	6,52	6,44	6,49	6,54	6,51	0,68
125	6,54	6,57	6,54	6,46	6,52	6,57	6,53	0,70
130	6,55	6,58	6,56	6,47	6,53	6,59	6,55	0,74
135	6,56	6,59	6,59	6,49	6,54	6,61	6,56	0,74
140	6,56	6,60	6,60	6,50	6,54	6,63	6,57	0,80
145	6,57	6,60	6,61	6,50	6,54	6,65	6,58	0,91
150	6,57	6,61	6,61	6,51	6,56	6,65	6,59	0,82
155	6,57	6,61	6,61	6,52	6,57	6,66	6,59	0,79
160	6,58	6,61	6,62	6,52	6,58	6,66	6,60	0,79
165	6,58	6,61	6,62	6,52	6,58	6,66	6,60	0,79
170	6,58	6,62	6,63	6,52	6,58	6,67	6,60	0,86
175	6,58	6,62	6,62	6,51	6,59	6,67	6,60	0,89
180	6,58	6,62	6,63	6,52	6,59	6,68	6,61	0,89
185	6,59	6,62	6,63	6,52	6,59	6,67	6,61	0,85
190	6,58	6,62	6,63	6,51	6,59	6,67	6,60	0,91
195	6,59	6,62	6,63	6,52	6,59	6,68	6,61	0,89
200	6,59	6,62	6,63	6,52	6,59	6,67	6,61	0,85
201	6,59	/	/	/	/	/	/	/
202	6,58	/	/	/	/	/	/	/
202,5	6,34	/	/	/	/	/	/	/
203	6,00	/	/	/	/	/	/	/
203,5	5,67	/	/	/	/	/	/	/
204	5,48	/	/	/	/	/	/	/
204,5	5,29	/	/	/	/	/	/	/
205	5,16	6,62	6,63	6,51	6,59	6,68	6,61	0,95
205,5	5,08	/	/	/	/	/	/	/
206	5,03	/	/	/	/	/	/	/
207	4,98	/	/	/	/	/	/	/
208	4,95	/	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXIII: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega nizkega profila. Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Poleg tega so navedene tudi povprečne vrednosti paralelk N2a-e in njihov RSD.

t(min)	pH							N2 RSD (%)
	N1	N2a	N2b	N2c	N2d	N2e	N2 povp	
209	4,93	/	/	/	/	/	/	/
210	4,91	6,62	6,63	6,52	6,59	6,68	6,61	0,89
211	/	6,62	6,63	6,52	6,59	6,68	6,61	0,89
212	4,88	6,62	6,63	6,52	6,59	6,67	6,61	0,85
212,5	/	5,88	6,58	6,51	6,59	6,68	6,45	5,01
213	/	4,94	5,24	5,61	5,86	5,27	5,38	6,62
213,5	/	4,88	4,93	5,02	5,02	4,96	4,96	1,21
214	4,86	4,86	4,88	4,86	4,93	4,87	4,88	0,60
214,5	/	4,85	4,86	4,80	4,85	4,83	4,84	0,49
215	/	4,83	4,85	4,77	4,86	4,80	4,82	0,77
215,5	/	4,83	4,84	4,79	4,87	4,81	4,83	0,63
216	4,84	4,83	4,84	4,8	4,88	4,82	4,83	0,61
217	/	4,82	4,83	4,81	4,88	4,83	4,83	0,56
218	4,83	4,81	4,83	4,81	4,89	4,84	4,84	0,68
219	/	4,81	4,82	4,82	4,89	4,84	4,84	0,66
220	4,82	4,80	4,81	4,82	4,89	4,85	4,83	0,75
222	/	4,80	4,81	4,82	4,89	4,85	4,83	0,75
224	/	4,79	4,80	4,82	4,89	4,85	4,83	0,84
226	/	4,78	4,80	4,82	4,89	4,85	4,83	0,90
228	/	4,78	4,80	4,82	4,89	4,86	4,83	0,93
230	/	4,78	4,80	4,82	4,88	4,86	4,83	0,86

Preglednica XXIV: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega srednjega profila (S1, S5a-c) oziroma njegovega osrednjega dela (S2-4). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t(min)	pH								S5 RSD (%)
	S1	S2	S3	S4	S5a	S5b	S5c	S5 povp	
0	1,61	6,12	6,11	6,13	1,61	1,61	1,62	1,61	0,36
1	1,61	/	/	/	1,61	1,61	1,62	1,61	0,36
2	1,63	6,16	6,11	6,14	1,63	1,63	1,64	1,63	0,35
2,5	1,77	/	/	/	1,77	1,77	1,78	1,77	0,33
3	2,11	/	/	/	2,11	2,11	2,12	2,11	0,27
3,5	2,88	/	/	/	2,88	2,88	2,89	2,88	0,20
4	4,98	6,24	6,17	6,20	4,98	4,98	4,99	4,98	0,12
4,5	5,65	/	/	/	5,65	5,65	5,66	5,65	0,10
5	5,82	/	/	/	5,82	5,82	5,83	5,82	0,10
5,5	5,90	/	/	/	5,90	5,90	5,91	5,90	0,10
6	5,96	6,33	6,24	6,26	5,96	5,96	5,97	5,96	0,10
7	5,99	/	/	/	5,99	5,99	6,00	5,99	0,10
8	6,00	6,41	6,30	6,31	6,00	6,00	6,01	6,00	0,10
9	6,01	/	/	/	6,00	6,01	6,02	6,01	0,17
10	6,02	6,48	6,35	6,36	6,01	6,02	6,03	6,02	0,17
12	6,02	6,54	6,40	6,40	6,01	6,02	6,03	6,02	0,17
14	6,03	6,59	6,44	6,43	6,02	6,05	6,06	6,04	0,34
16	6,04	6,63	6,48	6,46	6,02	6,06	6,07	6,05	0,44
18	6,05	6,67	6,50	6,49	6,03	6,07	6,08	6,06	0,44
20	6,06	6,70	6,53	6,51	6,04	6,08	6,09	6,07	0,44
22	6,08	/	6,56	6,54	/	/	/	/	/
24	6,18	/	6,66	6,61	/	/	/	/	/
25	/	6,78	/	/	6,04	6,09	6,08	6,07	0,44
26	6,29	/	6,76	6,68	/	/	/	/	/
28	6,39	/	6,85	6,74	/	/	/	/	/
30	6,48	6,83	6,93	6,80	6,05	6,08	6,09	6,07	0,34
32	6,55	/	7,00	6,85	/	/	/	/	/
34	6,62	/	7,05	6,89	/	/	/	/	/
35	/	6,86	/	/	6,04	6,08	6,09	6,07	0,44
36	6,67	/	7,11	6,93	/	/	/	/	/
38	6,72	/	7,16	6,97	/	/	/	/	/
40	6,76	6,90	/	6,99	6,04	6,08	6,10	6,07	0,50
45	6,86	6,92	/	7,05	6,05	6,09	6,09	6,08	0,38
50	6,93	6,94	/	7,10	6,04	6,09	6,09	6,07	0,48
52	/	6,94	/	/	6,05	6,09	6,10	6,08	0,44
54	/	6,99	/	/	6,10	6,15	6,16	6,14	0,52
55	6,99	/	/	7,14	/	/	/	/	/
56	/	7,04	/	/	6,17	6,21	6,22	6,20	0,43
58	/	7,10	/	/	6,23	6,26	6,27	6,25	0,33
60	7,04	7,15		7,17	6,29	6,30	6,31	6,30	0,16
62	/	7,19	/	/	6,33	6,35	6,36	6,35	0,24
64	/	7,23	/	/	6,37	6,39	6,40	6,39	0,24
65	7,07	/	/	7,19	/	/	/	/	/
66	/	7,27	/	/	6,41	6,43	6,44	6,43	0,24
68	/	7,30	/	/	6,45	6,46	6,47	6,46	0,15
70	7,10	7,33	/	7,21	6,48	6,49	6,50	6,49	0,15
72	7,12	/	/	/	6,51	6,52	6,53	6,52	0,15
74	7,16	/	/	/	6,58	6,59	6,60	6,59	0,15
75	/	7,40	/	7,22	/	/	/	/	/
76	7,20	/	/	/	6,66	6,66	6,67	6,66	0,09

Preglednica XXIV: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega srednjega profila (S1, S5a-c) oziroma njegovega osrednjega dela (S2-4). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti. Preglednica se nadaljuje na naslednji strani.

t(min)	pH								S5 RSD (%)
	S1	S2	S3	S4	S5a	S5b	S5c	S5 povp	
78	7,24	/	/	/	6,72	6,72	6,73	6,72	0,09
80	7,28	7,45		7,23	6,78	6,79	6,80	6,79	0,15
82	7,32	/	/	/	6,83	6,83	6,84	6,83	0,08
84	7,35	/	/	/	6,88	6,88	6,89	6,88	0,08
85	/	7,49	/	7,24	/	/	/	/	/
86	7,38	/	/	/	6,92	6,92	6,93	6,92	0,08
88	7,41	/	/	/	6,96	6,96	6,97	6,96	0,08
90	7,43	/	/	7,24	6,99	6,99	7,00	6,99	0,08
95	7,49	/	/	7,25	7,05	7,05	7,06	7,05	0,08
100	7,53	/	/	7,25	7,11	7,11	7,12	7,11	0,08
105	7,56	/	/	7,25	7,16	7,16	7,17	7,16	0,08
110	7,60	/	/	7,25	7,20	7,19	7,20	7,20	0,08
115	7,63	/	/	7,25	7,22	7,22	7,23	7,22	0,08
120	7,65	/	/	7,25	7,25	7,25	7,26	7,25	0,08
122	/	/	/	7,25	/	/	/	/	/
124	/	/	/	7,28	/	/	/	/	/
125	7,67	/	/	/	7,27	7,26	7,27	7,27	0,08
126	/	/	/	7,31	/	/	/	/	/
128	/	/	/	7,34	/	/	/	/	/
130	7,68	/	/	7,37	7,28	7,27	7,28	7,28	0,08
132	/	/	/	7,39	/	/	/	/	/
134	/	/	/	7,41	/	/	/	/	/
135	/	/	/	/	7,29	7,28	7,29	7,29	0,08
136	/	/	/	7,43	/	/	/	/	/
138	/	/	/	7,45	/	/	/	/	/
140	/	/	/	7,46	7,30	7,29	7,30	7,30	0,08
145	/	/	/	7,51	7,30	7,30	7,31	7,30	0,08
150	/	/	/	7,54	7,31	7,31	7,32	7,31	0,08
155	/	/	/	7,56	7,32	7,31	7,32	7,32	0,08
160	/	/	/	7,58	7,32	7,31	7,32	7,32	0,08
165	/	/	/	7,59	7,32	7,32	7,33	7,32	0,08
170	/	/	/	7,60	7,32	7,32	7,33	7,32	0,08
172	/	/	/	/	7,31	7,32	7,33	7,32	0,14
174	/	/	/	/	7,34	7,34	7,35	7,34	0,08
175	/	/	/	7,62	/	/	/	/	/
176	/	/	/	/	7,37	7,37	7,38	7,37	0,08
178	/	/	/	/	7,40	7,40	7,41	7,40	0,08
180	/	/	/	7,62	7,43	7,43	7,44	7,43	0,08
182	/	/	/	/	7,45	7,45	7,46	7,45	0,08
184	/	/	/	/	7,48	7,47	7,48	7,48	0,08
185	/	/	/	7,63	/	/	/	/	/
186	/	/	/	/	7,50	7,50	7,51	7,50	0,08
188	/	/	/	/	7,52	7,51	7,52	7,52	0,08
190	/	/	/	7,63	7,53	7,53	7,54	7,53	0,08
195	/	/	/	7,63	7,57	7,57	7,58	7,57	0,08
200	/	/	/	7,64	7,60	7,59	7,60	7,60	0,08
205	/	/	/	/	7,63	7,62	7,63	7,63	0,08
210	/	/	/	7,64	7,63	7,63	7,64	7,63	0,08
215	/	/	/	/	7,65	7,65	7,66	7,65	0,08
220	/	/	/	7,64	7,66	7,66	7,67	7,66	0,08

Preglednica XXIV: Rezultati merjenja pH pri poskusih celotnega srednjega profila (S1, S5a-c) oziroma njegovega osrednjega dela (S2-4). Navedeni so časi meritev pH od začetka poskusa, oznake poskusov in izmerjene pH vrednosti.

t(min)	pH								S5 RSD (%)
	S1	S2	S3	S4	S5a	S5b	S5c	S5 povp	
225	/	/	/	/	7,67	7,67	7,68	7,67	0,08
230	/	/	/	7,65	7,67	7,67	7,68	7,67	0,08
235	/	/	/	/	7,68	7,68	7,69	7,68	0,08
240	/	/	/	7,65	7,68	7,68	7,69	7,68	0,08
245	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
250	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
255	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
260	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
265	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
270	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
316	/	/	/	/	7,69	7,69	7,70	7,69	0,08
317	/	/	/	/	7,66	7,67	7,68	7,67	0,13
317,5	/	/	/	/	7,01	7,08	7,09	7,06	0,62
318	/	/	/	/	6,67	6,82	6,83	6,77	1,32
318,5	/	/	/	/	6,56	6,66	6,67	6,63	0,92
319	/	/	/	/	6,54	6,58	6,59	6,57	0,40
319,5	/	/	/	/	6,53	6,55	6,56	6,55	0,23
320	/	/	/	/	6,53	6,53	6,54	6,53	0,09
320,5	/	/	/	/	6,53	6,53	6,54	6,53	0,09
321	/	/	/	/	6,54	6,53	6,54	6,54	0,09
322	/	/	/	/	6,54	6,54	6,55	6,54	0,09
323	/	/	/	/	6,54	6,54	6,55	6,54	0,09
324	/	/	/	/	6,54	6,55	6,56	6,55	0,15
325	/	/	/	/	6,54	6,55	6,56	6,55	0,15
327	/	/	/	/	6,54	6,55	6,56	6,55	0,15
329	/	/	/	/	6,54	6,55	6,56	6,55	0,15
331	/	/	/	/	6,54	6,56	6,57	6,56	0,23
333	/	/	/	/	6,54	6,55	6,56	6,55	0,15
365	/	/	/	/	6,57	6,59	6,58	6,56	0,23

4.4 Pufrska kapaciteta

Preglednice XXV – XXXI prikazujejo rezultate merjenja pufrske kapacitete.

Preglednica XXV: Pufrske kapacitete izmerjene pri simulacijah profila X. Navedeni so oznaka poskusa, časovni interval zbiranja odvajanega medija in pufrske kapacitete zbranega medija, v oklepaju pod vrednostjo pufrske kapacitete pa je navedeno še območje pH v katerem smo pufirsko kapaciteto določili. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Poskus	X1b	X2
0 – 20 min	4,31 (4,37 – 4,08)	6,25 (5,15 – 4,83)
20 – 40 min	8,91 (6,90 – 6,58)	5,55 (6,97 – 6,66)
40 – 60 min	4,02 (6,92 – 6,61)	6,90 (6,88 – 6,53)
60 – 80 min	2,03 (6,93 – 6,60)	6,05 (6,84 – 6,51)
80 – 100 min	1,21 (6,86 – 6,53)	5,46 (6,82 – 6,50)
100 – 120 min	0,96 (6,80 – 6,51)	5,55 (6,82 – 6,55)

Preglednica XXVI: Pufrske kapacitete izmerjene pri simulacijah visokega profila. Navedeni so oznaka poskusa, časovni interval zbiranja odvajanega medija in pufrske kapacitete zbranega medija, v oklepaju pod vrednostjo pufrske kapacitete pa je navedeno še območje pH v katerem smo pufirsko kapaciteto določili. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Poskus	V5a	V5b	V5c	V5d	V5e
0 – 20 min	5,48 (5,20 – 4,86)	5,37 (5,17 – 4,82)	5,51 (5,21 – 4,90)	5,56 (5,23 – 4,91)	5,40 (5,22 – 4,88)
20 – 40 min	5,76 (6,46 – 6,15)	5,81 (6,47 – 6,18)	5,84 (6,46 – 6,13)	5,78 (6,45 – 6,15)	5,67 (6,44 – 6,11)
40 – 60 min	6,14 (6,47 – 6,13)	6,03 (6,47 – 6,15)	6,20 (6,45 – 6,16)	6,05 (6,48 – 6,16)	6,09 (6,46 – 6,14)
60 – 80 min	6,53 (6,52 – 6,21)	6,28 (6,53 – 6,21)	6,37 (6,51 – 6,20)	6,24 (6,53 – 6,20)	6,19 (6,52 – 6,19)
80 – 100 min	5,55 (6,86 – 6,52)	5,65 (6,85 – 6,53)	5,43 (6,83 – 6,50)	5,33 (6,85 – 6,56)	5,38 (6,86 – 6,53)
100 – 120 min	6,13 (7,45 – 7,13)	5,97 (7,45 – 7,16)	6,10 (7,44 – 7,12)	5,95 (7,46 – 7,13)	5,88 (7,47 – 7,16)
120 – 140 min	5,36 (7,82 – 7,53)	5,40 (7,83 – 7,51)	5,47 (7,81 – 7,49)	5,39 (7,83 – 7,50)	5,35 (7,84 – 7,52)
140 – 160 min	4,98 (7,95 – 7,63)	4,91 (7,94 – 7,66)	5,08 (7,95 – 7,63)	4,89 (7,93 – 7,60)	4,92 (7,96 – 7,65)
160 – 180 min	4,45 (8,04 – 7,73)	4,53 (8,05 – 7,76)	4,46 (8,03 – 7,70)	4,42 (8,04 – 7,74)	4,49 (8,03 – 7,74)
180 – 200 min	4,22 (8,07 – 7,75)	4,30 (8,06 – 7,78)	4,26 (8,07 – 7,75)	4,19 (8,07 – 7,74)	4,30 (8,08 – 7,78)
200 – 220 min	13,71 (6,93 – 6,62)	13,84 (6,93 – 6,64)	13,79 (6,94 – 6,62)	13,68 (6,95 – 6,64)	13,83 (6,92 – 6,59)

Preglednica XXVII: Pufrske kapacitete izmerjene v sveže pripravljenih pufrih, uporabljenih v simulacijah visokega profila. Navedeni so pH vrednosti, redčitve, izmerjene pufrske kapacitete in sprememba pH. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Pufer	Pufrska kapaciteta	Sprememba pH
Mcllvainov pufer 6,4 (15x)	6,14	6,41 – 6,09
Mcllvainov pufer 8,1(15x)	4,13	8,10 – 7,81
Mcllvainov pufer 6,7 (4x)	14,82	6,69 – 6,38

Preglednica XXVIII: Pufrske kapacitete izmerjene pri simulacijah nizkega profila. Navedeni so oznaka poskusa, časovni interval zbiranja odvajane medija in pufrske kapacitete zbranega medija, v oklepaju pod vrednostjo pufrske kapacitete pa je navedeno še območje pH v katerem smo pufsko kapaciteto določili. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Poskus	N2a	N2b	N2c	N2d	N2e
0 – 20 min	5,62 (4,07 – 3,75)	5,73 (4,06 – 3,73)	5,54 (4,09 – 3,75)	5,64 (4,05 – 3,76)	5,59 (4,07 – 3,74)
20 – 40 min	5,16 (5,52 – 5,20)	5,42 (5,53 – 5,22)	5,25 (5,51 – 5,23)	5,29 (5,54 – 5,21)	5,37 (5,51 – 5,22)
40 – 60 min	5,57 (5,61 – 5,30)	5,61 (5,62 – 5,33)	5,70 (5,61 – 5,31)	5,64 (5,64 – 5,31)	5,68 (5,63 – 5,39)
60 – 80 min	5,76 (5,83 – 5,50)	5,72 (5,84 – 5,52)	5,81 (5,82 – 5,53)	5,74 (5,83 – 5,52)	5,78 (5,84 – 5,51)
80 – 100 min	5,90 (6,27 – 5,95)	5,84 (6,26 – 5,92)	5,83 (6,29 – 5,95)	5,96 (6,28 – 5,96)	6,04 (6,27 – 5,97)
100 – 120 min	6,15 (6,43 – 6,11)	6,25 (6,44 – 6,13)	6,14 (6,43 – 6,14)	6,02 (6,45 – 6,11)	6,21 (6,44 – 6,11)
120 – 140 min	6,35 (6,58 – 6,26)	6,51 (6,59 – 6,24)	6,43 (6,57 – 6,25)	6,51 (6,58 – 6,28)	6,52 (6,57 – 6,28)
140 – 160 min	6,43 (6,61 – 6,30)	6,46 (6,62 – 6,33)	6,38 (6,61 – 6,31)	6,49 (6,60 – 6,31)	6,42 (6,61 – 6,28)
160 – 180 min	6,39 (6,61 – 6,28)	6,35 (6,62 – 6,30)	6,42 (6,62 – 6,30)	6,40 (6,62 – 6,29)	6,37 (6,62 – 6,31)
180 – 200 min	6,34 (6,62 – 6,32)	6,30 (6,64 – 6,31)	6,37 (6,63 – 6,30)	6,43 (6,61 – 6,32)	6,27 (6,63 – 6,30)
200 – 220 min	9,25 (5,07 – 4,74)	9,43 (5,09 – 4,74)	9,37 (5,04 – 4,75)	9,32 (5,05 – 4,75)	9,40 (5,07 – 4,78)
220 – 230 min	14,25 (4,78 – 4,45)	14,37 (4,77 – 4,45)	14,29 (4,78 – 4,47)	14,39 (4,79 – 4,49)	14,43 (4,79 – 4,48)

Preglednica XXIX: Pufrske kapacitete izmerjene v sveže pripravljenih pufrih, uporabljenih v simulacijah nizkega profila. Navedeni so pH vrednosti, redčitve, izmerjene pufrske kapacitete in sprememba pH. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Pufer	Pufrska kapaciteta	Sprememba pH
Mcllvainov pufer 5,5 (15x)	5,43	5,51 -5,20
Mcllvainov pufer 6,6 (15x)	6,34	6,60 – 6,28
Mcllvainov pufer 4,8 (4x)	15,42	4,81 – 4,52

Preglednica XXX: Pufrske kapacitete izmerjene pri simulacijah srednjega profila. Navedeni so oznaka poskusa, časovni interval zbiranja odvajanega medija in pufrske kapacitete zbranega medija, v oklepaju pod vrednostjo pufrske kapacitete pa je navedeno še območje pH v katerem smo pufirsko kapaciteto določili. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Poskus	S5a	S5b	S5c
0 – 20 min	5,34 (4,37 – 4,06)	5,17 (4,38 – 4,04)	5,49 (4,33 – 4,04)
20 – 40 min	5,63 (6,04 – 5,75)	5,57 (6,06 – 5,74)	5,68 (6,05 – 5,72)
40 – 60 min	5,52 (6,10 – 5,77)	5,79 (6,11 – 5,80)	5,64 (6,10 – 5,81)
60 – 80 min	6,34 (6,48 – 6,14)	6,55 (6,47 – 6,16)	6,29 (6,48 – 6,18)
80 – 100 min	5,27 (6,92 – 6,61)	5,62 (6,92 – 6,62)	5,34 (6,93 – 6,60)
100 – 120 min	6,31 (7,18 – 6,86)	6,23 (7,19 – 6,86)	6,21 (7,18 – 6,85)
120 – 140 min	6,24 (7,28 – 6,95)	6,27 (7,29 – 6,99)	6,24 (7,28 – 6,97)
140 – 160 min	6,16 (7,31 – 7,00)	6,18 (7,33 – 7,04)	6,10 (7,33 – 6,99)
160 – 180 min	5,98 (7,34 – 7,00)	6,01 (7,35 – 7,03)	5,94 (7,35 – 7,05)
180 – 200 min	6,04 (7,48 – 7,15)	5,94 (7,49 – 7,17)	6,07 (7,48 – 7,16)
200 – 220 min	5,40 (7,63 – 7,32)	5,87 (7,64 – 7,31)	5,95 (7,63 – 7,34)
220 – 240 min	5,59 (7,67 – 7,34)	5,73 (7,67 – 7,36)	5,82 (7,67 – 7,33)
240 – 260 min	5,46 (7,68 – 7,37)	5,81 (7,69 – 7,36)	5,72 (7,69 – 7,39)
260 – 280 min	5,64 (7,69 – 7,37)	5,70 (7,69 – 7,38)	5,73 (7,68 – 7,39)
280 – 300 min	5,40 (7,69 – 7,36)	5,65 (7,69 – 7,37)	5,58 (7,68 – 7,36)
300 – 320 min	5,43 (7,68 – 7,32)	5,54 (7,69 – 7,40)	5,67 (7,70 – 7,40)
320 – 340 min	8,74 (7,30 – 7,02)	8,94 (7,32 – 7,00)	8,82 (7,31 – 7,00)
340 – 365 min	15,17 (6,78 – 6,48)	15,06 (6,78 – 6,47)	15,14 (6,78 – 6,45)

Preglednica XXXI: Pufrske kapacitete izmerjene v sveže pripravljenih pufrih, uporabljenih v simulacijah srednjega profila. Navedeni so pH vrednosti, redčitve, izmerjene pufrske kapacitete in sprememba pH. Rezultati so podani v $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$.

Pufer	Pufrska kapaciteta	Sprememba pH
Mcllvainov pufer 6,0 (15x)	5,59	6,02 – 5,71
Mcllvainov pufer 7,7 (15x)	5,67	7,71 – 7,40
Mcllvainov pufer 6,5 (4x)	15,13	6,49 – 6,17

4.5 Sproščanje

V preglednicah XXXII - XXXIV so predstavljeni rezultati testov sproščanja ZU iz naših tablet.

Preglednica XXXII: Sproščanje ZU iz tablet v simuliranem visokem profilu. Predstavljen je kumulativni odstotek sproščene ZU po 20-minutnih intervalih za vse paralelke obeh poskusov. Za oba poskusa so navedene tudi povprečne vrednosti paralelek in RSD.

t(min)	Serija M					Serija N				
	Vs1a	Vs1b	Vs1c	Vs1 povp	Vs1 RSD (%)	Vs2a	Vs2b	Vs2c	Vs2 povp	Vs2 RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0,118	0,082	0,092	0,10	19,09	0,060	0,075	0,057	0,06	14,95
40	1,18	1,08	0,92	1,06	12,40	1,18	1,02	1,02	1,08	8,47
60	4,18	4,20	3,38	3,92	11,97	4,55	4,26	4,15	4,32	4,73
80	8,15	8,14	6,46	7,58	12,82	8,30	8,11	7,74	8,05	3,54
100	12,20	11,94	9,86	11,33	11,30	12,07	11,88	11,34	11,76	3,21
120	16,33	15,97	13,48	15,26	10,17	15,87	15,52	14,91	15,43	3,15
140	20,49	20,07	17,63	19,40	7,94	19,82	19,37	18,87	19,35	2,44
160	24,17	23,50	21,63	23,10	5,69	23,36	23,05	22,60	23,00	1,66
180	27,39	26,78	25,23	26,46	4,20	26,82	26,30	26,14	26,42	1,35
200	30,21	29,71	28,47	29,46	3,04	30,05	29,30	29,20	29,52	1,56
220	32,83	32,38	31,29	32,17	2,47	33,16	32,14	32,03	32,45	1,92
240	35,27	34,89	33,91	34,69	2,01	36,13	34,83	34,81	35,26	2,15
260	37,54	37,18	36,30	37,01	1,73	38,98	37,45	37,55	37,99	2,26
280	39,75	39,32	38,49	39,19	1,63	41,44	39,63	39,80	40,29	2,48
300	41,71	41,16	40,46	41,11	1,53	43,71	41,63	41,83	42,39	2,72
320	43,50	42,88	42,28	42,89	1,43	45,88	43,41	43,62	44,30	3,09
340	45,20	44,46	44,04	44,57	1,31	47,96	45,14	45,28	46,13	3,44
360	46,76	46,05	45,68	46,16	1,18	49,69	46,84	46,85	47,79	3,44

Preglednica XXXIII: Sproščanje ZU iz tablet v simuliranem nizkem profilu. Predstavljen je kumulativni odstotek sproščene ZU po 20-minutnih intervalih. Navedene so tudi povprečne vrednosti paralelek in RSD.

t(min)	Ns1a	Ns1b	Ns1c	Ns1d	Ns1e	Ns1f	Ns1g	Ns1 povp	Ns1 RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0,05	0,08	0,07	0,08	0,06	0,05	0,07	0,07	26,08
40	0,19	0,25	0,23	0,26	0,20	0,20	0,28	0,24	16,80
60	0,37	0,46	0,44	0,47	0,41	0,45	0,60	0,47	17,47
80	0,90	0,91	0,91	1,00	1,09	0,99	0,81	0,92	8,34
100	2,12	1,94	1,96	2,15	2,40	2,02	1,24	1,89	19,70
120	3,81	3,45	3,55	3,91	4,07	3,51	2,79	3,49	12,66
140	5,87	5,52	5,61	6,27	6,27	5,65	5,09	5,68	7,67
160	8,46	8,32	7,96	8,80	8,50	8,57	7,75	8,38	4,73
180	11,44	11,52	10,65	11,88	11,23	11,24	10,42	11,30	4,79
200	14,91	14,80	13,70	15,45	14,30	14,44	14,08	14,74	3,52
220	18,75	18,27	17,02	19,38	17,49	18,33	17,09	18,36	4,57
240	22,82	21,86	20,25	23,56	20,61	21,96	19,94	22,03	6,16
260	26,57	25,56	23,22	27,87	23,74	25,47	22,71	25,64	7,41
280	30,05	29,08	26,33	31,66	26,59	28,62	25,35	28,95	8,04
300	32,15	31,14	28,33	34,02	28,32	30,76	27,28	31,07	7,95
320	33,48	32,38	29,65	35,61	29,34	32,08	28,58	32,42	7,89
340	34,60	33,38	30,67	36,90	30,11	33,13	29,63	33,53	7,88
360	35,51	34,21	31,60	38,16	30,83	34,11	30,39	34,48	8,14

Preglednica XXXIV: Sproščanje ZU iz tablet v simuliranem srednjem profilu. Predstavljen je kumulativni odstotek sproščene ZU po 20-minutnih intervalih. Navedene so tudi povprečne vrednosti paralelk in RSD.

t(min)	Ss1a	Ss1b	Ss1c	Ss1d	Ss1 povp	Ss1 RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0
20	0,03	0,06	0,11	0,11	0,08	59,31
40	0,58	0,84	0,61	0,65	0,62	5,24
60	2,25	2,75	2,21	2,27	2,24	1,43
80	4,74	5,50	4,61	4,70	4,68	1,39
100	7,73	8,93	7,74	7,71	7,73	0,23
120	11,21	12,70	11,61	11,33	11,39	1,83
140	14,98	16,90	15,65	15,31	15,31	2,20
160	18,74	21,08	19,73	19,21	19,23	2,59
180	22,29	25,08	23,59	22,70	22,86	2,89
200	25,72	28,62	27,12	25,93	26,25	2,87
220	28,81	32,02	30,24	29,03	29,36	2,62
240	31,86	35,22	33,19	31,80	32,28	2,42
260	34,84	38,28	36,07	34,57	35,16	2,28
280	37,64	41,13	38,90	37,14	37,90	2,39
300	40,32	43,83	41,65	39,65	40,54	2,52
320	42,89	46,40	44,22	42,02	43,04	2,58
340	45,29	48,76	46,53	44,33	45,38	2,43
360	47,40	50,87	48,60	46,33	47,44	2,39
380	49,24	52,72	50,51	48,12	49,29	2,43

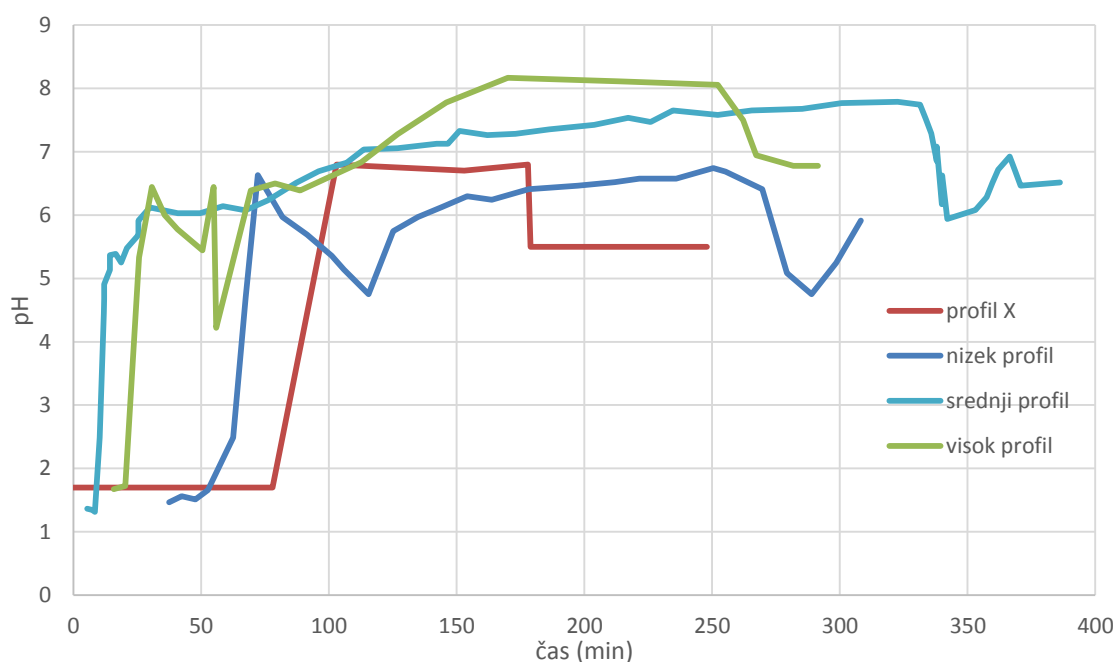
5 Razprava

V okviru naloge smo iz literaturnih podatkov izbrali 4 različne pH profile vsebine GIT teščih zdravih posameznikov. Te pH profile smo nato ob upoštevanju fizioloških vrednosti pufrske kapacitete simulirali na pretočnem sistemu z uporabo različnih raztopin HCl in redčenih McIlvainovih pufrov. Simulacije smo izvedli z namenom, da smo v simuliranih profilih ugotavljali vpliv poteka pH na sproščanje ZU iz ogrodnih tablet.

5.1 Izbrani profili

Za simulacijo smo iz literaturnih podatkov izbrali 4 profile, ki so predstavljeni v poglavju 4.1 *Izbrani profili*. Profil X smo pridobili na po prvem načinu, to je iz združevanja podatkov o odvisnosti pH od mesta v GIT in času zadrževanja kapsule v določenih predelih GIT. Dobljen graf je precej enostaven. Razen dveh pričakovanih izjem (hitrega dviga pH ob prehodu iz želodca v dvanajstnik in padca ob vstopu v cekum), ni hitrih, sunkovitih sprememb pH v katerokoli smer. To nam je omogočilo, da smo kot ciljni profil pri simulaciji lahko uporabili že nespremenjen literaturni profil.

Profili V, N in S pa so bili pridobljeni na drugi način, to je z uporabo podatkov o časovni odvisnosti pH med potovanjem skozi GIT. V tem primeru so bili podatki predstavljeni bolj podrobno, zato so izbrani literaturni pH profili precej bolj razgibani z večjim številom nenadnih skokov in padcev pH.



Slika 4: Izbrani pH profili za simulacijo. Prikazane so vrednosti pH GIT (od želodca do začetnega dela debelega črevesa) prostovoljcev v odvisnosti od časa.

Ker bi bilo tako kompleksne profile na našem sistemu skorajda nemogoče simulirati z ustrezno ponovljivostjo, smo določene problematične dele za naše simulacije prilagodili. Tipično je bilo potrebno to narediti na območju dvanajstnika. Tu se namreč kisla vsebina, ki pride iz želodca pomeša z bazičnima žolčem in izločkom pankreasa. Kot posledica so za pH v tem območju značilna izrazita nihanja. Ta problem smo rešili tako, da smo si izbrali vrednost, ki je ustrezala povprečju krivulje na tem kompleksnem delu in jo uporabili za ciljno vrednost pri simulaciji. Vse štiri izbrane literaturne pH profile prikazuje slika 4.

5.2 Umeritvene krivulje

Z določitvijo umeritvenih krivulj smo dobili enačbe premic, ki smo jih uporabili za izračun koncentracij ZU pri poskusih sproščanja. Kot je razvidno iz rezultatov, so se izmerjeni rezultati zelo dobro prilegali izračunanim premicam, najmanjši R^2 je imel vrednost 0,9993. Nobenega določanja umeritvene krivulje tudi ni bilo potrebno ponoviti, pri vseh smo že v prvem poskusu dobili ustrezno kvaliteto rezultatov.

Dobljene premice so si med seboj zelo podobne, kar pomeni da mediji, ki smo jih uporabili v naših poskusih nimajo velikega vpliva na absorbanco. Razlog za to je najverjetneje, da smo vse meritve izvajali v medijih, ki smo jih zmešali z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1. Vpliv raztopine NaOH se zato pozna tudi pri enačbah umeritvenih krivulj.

Posledica tega je, da nam ni bilo potrebno izvesti še večjega števila določitev umeritvenih krivulj, npr. še katero izmed pH vrednosti med postopnim naraščanjem pH tekom simuliranega tankega črevesa. V tem delu je medij v delovni čaši mešanica pufrov, ki smo jim določili umeritveno krivuljo. Ker je dodatek NaOH zmanjšal vpliv uporabljenih medijev smo se tudi odločili, da bomo izvedli le eno določitev umeritvene krivulje v HCl, ne glede na koncentracijo HCl, ki smo jo uporabili pri poskusih.

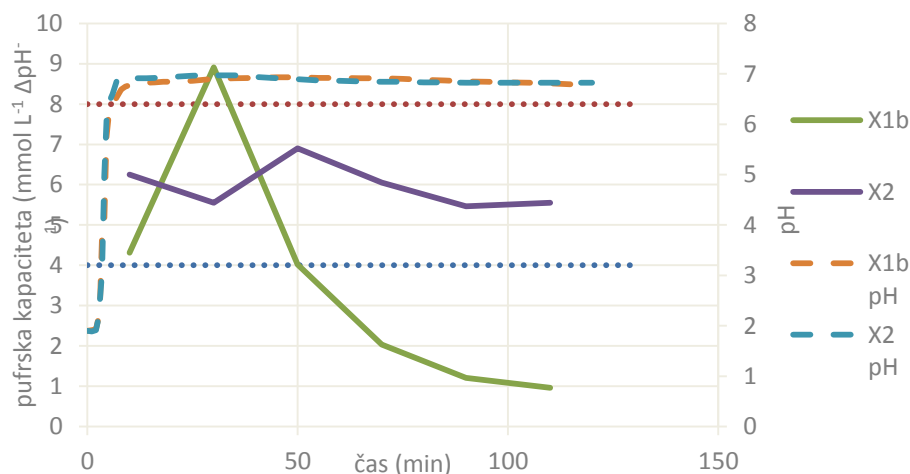
5.3 Pufrska kapaciteta

Naš zastavljen cilj glede pufrske kapacitete je bil, da njene vrednosti po celotnih simuliranih profilih ohranjamo znotraj fizioloških mej za relevanten del GIT. Te vrednosti smo določili na osnovi literaturnih vrednosti in so znašale med 4 in 8 mmol L⁻¹ ΔpH⁻¹ za simulirano tanko črevo in približno 15 mmol L⁻¹ ΔpH⁻¹ za simulirano debelo črevo.

Prvi poskus z merjenjem pufrske kapacitete je bil poskus X1b. Osnovan je bil na ugotovitvah predhodne naloge [17], a se je izkazalo, da pufrska kapaciteta ustreza zahtevam le v kratkem časovnem območju v začetnem delu simuliranega TČ. Po hitrem dvigu pH smo najprej uvajali

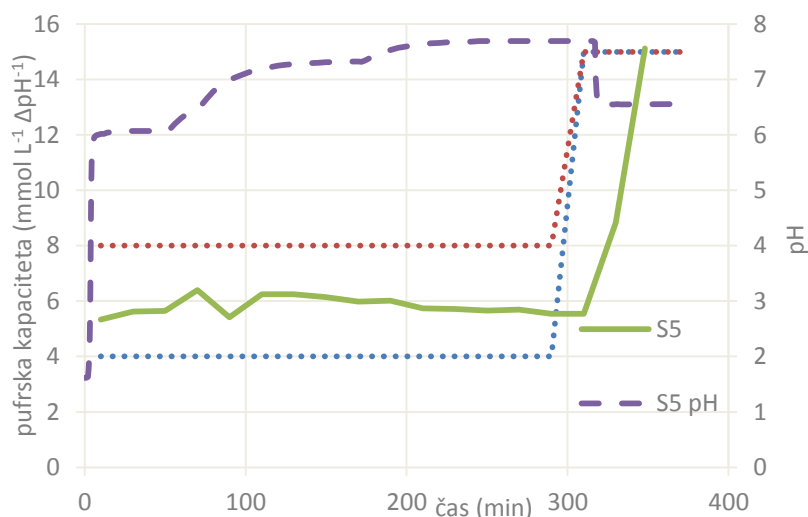
bolj koncentriran pufer s preveliko pufrsko kapaciteto, da smo zagotovili čim bolj ponovljiv in natančen hitri dvig. Temu je sledil zelo razredčen pufer s prenizko pufrsko kapaciteto. V časovnem območju, ko so vrednosti pufrske kapacitete ustrezale našim zahtevam, je bila v delovni čaši mešanica obeh pufrov z ravno ustreznim razmerjem obeh pufrov. Čim bolj kot smo se od tega območja odmikali, bolj so izmerjene vrednosti pufrske kapacitete odstopale od želenih.

Zaradi rezultatov pri poskusu X1b smo redčitve pufrov prilagodili tako, da smo po celotnem profilu zagotovili ustrezne vrednosti pufrske kapacitete. Pri poskusu X2 smo še vedno sledili istemu principu: močan prvi pufer po uvajanju TNAF, ki smo ga nato razredčili s pufrom z enakim pH, a veliko manjšo koncentracijo, in po dosegu želene pufrske kapacitete nadaljujemo z uvajanjem pufra, ki to kapaciteto vzdržuje (15-krat redčen). Slika 5 prikazuje potek pH in vrednosti pufrske kapacitete pri poskusih X1b in X2.



Slika 5: Potek pufrske kapacitete in pH pri poskusih X1b in X2. Polna črta prikazuje potek pufrske kapacitete, prekinjena črta prikazuje potek pH, pikčasto pa je označeno ciljno področje pufrske kapacitete.

Pri kasnejših poskusih na drugih pH profilih pa smo postopek poenostavili in že takoj po uvajanju TNAF uporabili 15-krat redčen pufer. Ta redčitev nam je omogočala ustrezno pufrsko kapaciteto po celotnem simuliranem TČ. Obenem pa so bili mediji dovolj koncentrirani, da smo ob pazljivem dovajanju TNAF dobili ustrezno ponovljive poteke pH pri hitrem dvigu. Ko smo našli ustrezne redčitve uporabljenih pufrov, težav s neustrezno pufrsko kapaciteto nismo imeli več. Potek pufrske kapacitete in pH pri poskusih S5 prikazuje slika 6.



Slika 6: Potek pufrske kapacitete in pH pri poskusih S5. Polna črta prikazuje potek povprečne pufrske kapacitete, prekinjena črta prikazuje potek povprečnega pH, pikčasto pa je označeno ciljno področje pufrske kapacitete.

5.4 Simulacija pH profilov

Izbrane profile smo simulirali na pretočnem sistemu po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4 *Simulacija pH profilov*. Kot je razvidno že iz preglednic, predstavljenih v poglavju 4.3 *Simulacija pH profilov*, velikega števila poskusov nismo izvedli do konca po predvidenem načrtu, ampak smo jih že prej prekinili. To se je še posebno pogosto zgodilo pri poskusih hitrega dviga. Tu so se lahko že po nekaj minutah videla velika odstopanja od želenega poteka pH, še posebno v primerih, ko se je količina dodanega TNAF precej razlikovala od ustrezne. Večkrat smo poskuse prekinili še ob simulacijah postopnega naraščanja pH v tankem črevesu. Razlog za to je bilo dejstvo, da smo pri začetnih poskusih v veliko primerih ugibali katere kombinacije pufrov je treba uporabiti, da se približamo želenemu poteku pH.

5.4.1 Hitri dvig (simulacija prehoda želodec – duodenum)

5.4.1.1 Profil X

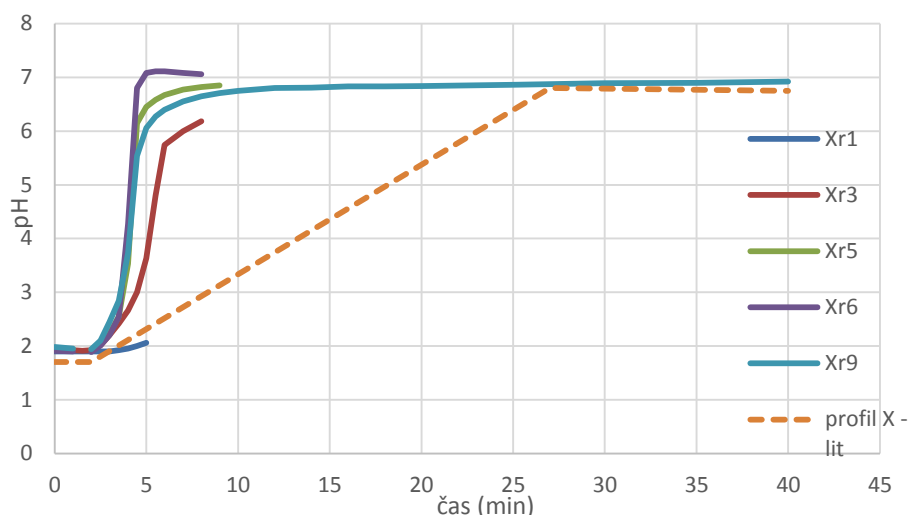
Rezultati prvih poskusov hitrega dviga so bili precej slabi in so zelo odstopali od želenih (Xr1, Xr2). Problem pri tem je bil, ker smo za ta namen uporabili premalo koncentrirane raztopine TNAF. Po teh dveh neuspešnih poskusih, smo se simulacije lotili precej bolj sistematično, z uporabo 100 mM raztopine TNAF. V poskusu Xr3 smo TNAF dovajali 100 sekund, nato pa v vsakem naslednjem poskusu ta čas podaljšali za 20 sekund, dokler nismo pri poskusu Xr6 presegli ciljnega pH po skoku (čas dovajanja 160 sekund). Da bi ugotovili,

kje bi bil skok najhitrejši, a vseeno ne prevelik, smo preverili še kakšen je rezultat za čas dovajanja 150 sekund.

Iz časa dovajanja, ki nam je dal najboljše rezultate, (Xr5) smo nato izračunali koncentracijo raztopine TNAF, ki bi nam tak dvig pH omogočila po 100 sekundah dodajanja. To raztopino (140 mM TNAF) smo nato preverili še v poskusih Xr8 in Xr9. Krivulji poteka pH se med seboj malo razlikujeta (pri Xr8 je skok hitrejši), kar je posledica napake pri izvedbi. V poskusu Xr8, smo menjavo dovajane tekočine izvedli sekundo prepozno, s čimer smo v delovno čašo uvedli preveliko količino baze.

Zaradi te razlike smo izvedli še poskus s 130 mM raztopino TNAF (Xr10). S tem smo bi preverili, če bi bil skok še vedno dovolj hiter tudi z manj koncentrirano raztopino, ki pa bi tudi zmanjšala vpliv netočnosti pri zamenjavi medija. Ugotovili smo, da je bila najprimernejša 140 mM raztopina TNAF.

Slika 7 prikazuje potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega profila X.



Slika 7: Potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega profila X in potek literaturnega profila. Do večjega odstopanja pride v strmini hitrega dviga. V primeru grafa, ki predstavlja potek literaturnega pH profila smo namreč povezali le majhno število točk, zaradi česar naklon na grafu verjetno ne odraža povsem fiziološkega stanja.

5.4.1.2 Visok profil

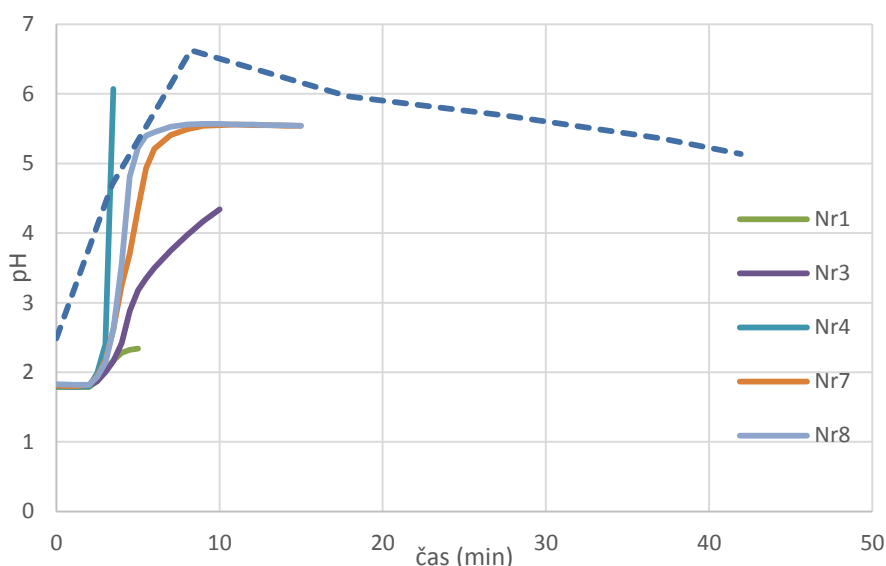
Pri visokem profilu smo že pri prvem poskusu (Vr1) uporabili 100 mM raztopino TNAF, ki smo jo dovajali 100 sekund. Dvig pH je bil zelo blizu želenemu, zato smo za poskus Vr2 čas dovajanja le malo povečali, kar pa je bilo vseeno preveč. S poskusom Vr3 smo dosegli ustrezen dvig pH pri času dovajanja 110 sekund. Posebnega testa hitrega dviga z uvajanjem 110 mM TNAF 100 sekund nismo izvedli, ampak smo ga izvedli kot del simulacije večjega dela profila (V1).

5.4.1.3 Nizek profil

Ponovno smo za prvi poskus (Nr1) 100 sekund uvajali 100 mM raztopino TNAF. Dvig pH je bil prenizek, zato smo čas dovajanja postopno podaljševali do poskusa Nr4, kjer je bil skok previsok. Za točnejšo določitev, smo pripravili novo, bolj koncentrirano raztopino TNAF (150 mM). Enako kot pri 100 mM raztopino, smo jo najprej uvajali 100 sekund (Nr5), nato pa smo čas podaljševali, dokler nismo dosegli želenega skoka pri poskusu Nr8.

Enako kot pri visokem profilu, raztopine z izračunano ustrežno koncentracijo TNAF (160 mM) nismo preizkusili izolirano kot poskus hitrega dviga, ampak kot del daljšega poskusa (N1, N2).

Slika 8 prikazuje potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega nizkega profila.

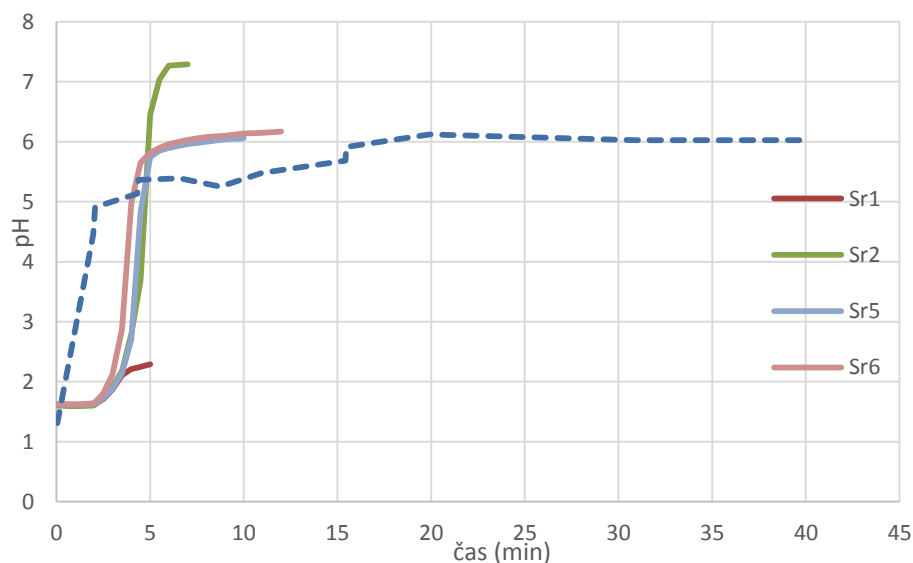


Slika 8: Potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega nizkega profila in potek literaturnega profila.

5.4.1.4 Srednji profil

Pri srednjem profilu je bil začetni dvig pH višji kot pri ostalih, zato smo že pri poskusu Sr1 uporabili, 200 mM TNAF. Kljub temu smo ohranili začetni čas dovajanja raztopine TNAF 100 sekund. Ponovno smo glede na rezultate podaljšali ali skrajšali čas dovajanja, dokler nismo dosegli ustreznega dviga pH v poskusu Sr5. S poskusom Sr6 smo še potrdili ustreznost preračunane koncentracije 280 mM za čas dovajanja 100 sekund.

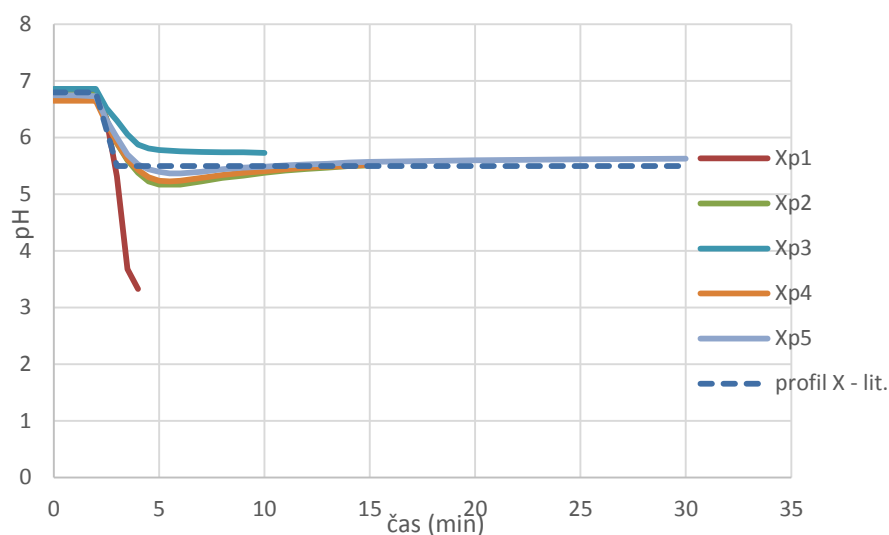
Slika 9 prikazuje potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega srednjega profila.



Slika 9: Potek pH pri nekaterih poskusih hitrega dviga simuliranega srednjega profila in potek literarnega profila.

5.4.2 Hitri padec (simulacija prehoda ileum – cekum)

Pristop pri poskusih hitrega padca pH so bili podobni poskusom hitrega dviga, z eno pomembno razliko. Vedno smo uporabljali 0,85% H_3PO_4 , spreminjali pa smo čas dovajanja. Pri prvem poskusu (Xp1) smo kislino dovajali 100 sekund, kar je povzročilo veliko prevelik padec pH, zato smo čas dovajanja prepolovili. Glede na nove rezultate smo čas dovajanja skrajšali ali podaljšali, dokler nismo dobili ustrezno hitrega padca pH (Xp5). Potek pH pri poskusih hitrega padca prikazuje slika 10.



Slika 10: Potek pH pri poskusih hitrega padca simuliranega profila X in poteka literarnega profila.

Pri ostalih pH profilih izoliranih poskusov hitrega padca nismo izvajali. Ko smo prvič simulirali celotni pH profil, vključno s hitrim padcem smo čas dovajanja 0,85% H_3PO_4 izbrali

glede na rezultate dobljene za profil X. Že na ta način smo čas dovajanja določili dovolj dobro, da smo dobili ustrezen padec pH.

Vzrokov, da smo si lahko dovolili tako določitev časa dovajanja kisline, medtem ko smo koncentracijo TNAF določali zelo natančno, je več. V prvi vrsti je imel pufer, ki je sledil hitremu padcu pH približno trikrat večjo pufrsko kapaciteto kot pufer, ki je sledil hitremu dvigu, zato se morebitne nenatančnosti ne odrazijo v taki meri. Poleg tega tudi sama sprememba pH ni tako ekstremna kot pri hitrem dvigu, zato je bilo lažje predvideti obnašanje pH po dodatku kisline.

5.4.3 Osrednji deli in celoten profil

Pri simulaciji osrednjega dela pH profila so se poskusi precej razlikovali med sabo, saj so bile v teh delih med literaturnimi profili največje razlike. Poleg tega pa je bila večina pH profilov v tem delu tudi najtežja za simulacijo, predvsem zaradi počasnega naraščanja pH, ki ga je bilo težko posnemati. Nekatere poskuse simulacije osrednjih delov pH profilov smo povezali s hitrim dvigom in padcem in tako simulirali celoten profil hkrati. Te poskuse zaradi sorodnosti še vedno opisujemo v tem poglavju.

5.4.3.1 Profil X

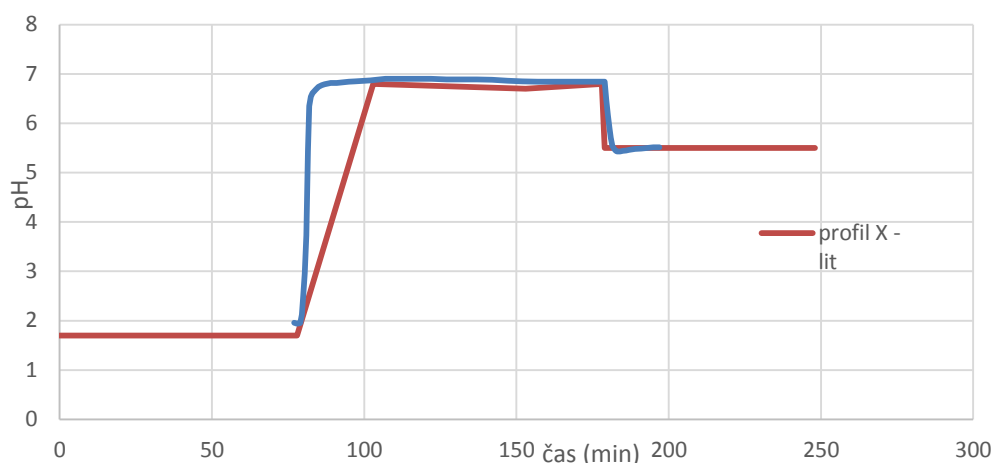
Literaturni profil X je precej enostaven profil za simulacijo, brez večjih sprememb v pH v osrednjem delu.

Pri poskusu X1 smo za osnovo vzeli predhodne simulacije pH profilov [17], prilagodili smo le pH vrednosti uporabljenih pufrov, redčitve pa smo pustili enake. V poskusu X1 smo potrdili, da z uporabo pufrov v predvidenem zaporedju dobimo ustrezen potek pH, nismo pa še izvedli hitrega padca.

Pri poskusu X1b smo poleg poteka profila prvič spremljali tudi pufrsko kapaciteto po celotnem profilu. Zaradi ugotovitve, da je ta prevelika na začetku, proti koncu pa premajhna, smo prilagodili redčitve uporabljenih pufrov.

V poskusu X2 smo 100x redčen pufer s pH 6,6 zamenjali z uporabo dveh. Prvi je bil 200x redčen McIlvainov pufer s pH 6,5, drugi pa 15x redčen z vrednostjo pH 6,8. S tem smo dosegli hitrejši padec pufrske kapacitete v prvem delu in kasneje obdržali njeno vrednost na zadostnem nivoju. Ob tem smo tudi potek pH ohranili nespremenjen.

V poskusu X3 smo nato simulaciji profila le še dodali zadnji del, hitri padec pH, in s tem dobili protokol za simulacijo profila X. Na sliki 11 je prikazana primerjava literaturnega in simuliranega profila X.



Slika 11: Primerjava literaturnega in eksperimentalnega profila X. Prikazana sta časovni potek profila narisane iz literaturnih podatkov in časovni potek pH v poskusu X3.

Iz slike 11 lahko razberemo, da sta si profila zelo podobna. Do večjega odstopanja pride le v strmini hitrega dviga. V primeru grafa, ki predstavlja potek literaturnega pH profila smo namreč povezali le majhno število točk, zaradi česar naklon na grafu verjetno ne odraža povsem fiziološkega stanja.

Manjše odstopanje je vidno tudi pri pH simuliranega želodca, ki se razlikuje za 0,3 pH enote. Razlog za to je, da smo simulacije pH profilov izvajali s pH metrom, umerjenim na pH 7,00. Za to vrednost smo se odločili, ker se je večina sprememb pH dogajala v območju vrednosti 6 – 8. pH vrednost simuliranega želodčnega medija smo izmerili tudi s pH metrom, umerjenim na vrednost 2,00, in s tem potrdili, da je njegov pH ustrezen. Odstopanje, vidno na sliki 11, je tako zgolj posledica drugače umerjenega pH metra. Dejanski pH želodčnega medija je enak literaturnemu. Prav tako je to razlog za podobno odstopanje tudi pri ostalih simuliranih želodčnih medijih.

5.4.3.2 Visok profil

Daljše poskuse visokega profila smo izvajali z enakimi redčitvami pufrov, kot smo jih uporabili pri poskusu X3. Za poskus V1 smo po hitrem dvigu pH najprej uporabili precej koncentriran pufer (2x redčen; pH = 6,4), s katerim smo učinkovito ustavili naraščanje pH po dodatku baze. Nato smo z uvajanjem 200x redčenega pufru (pH = 6,4) znižali pufrsko kapaciteto in jo nato vzdrževali na želenem nivoju s 15x redčenim pufrom (pH = 6,4). Za

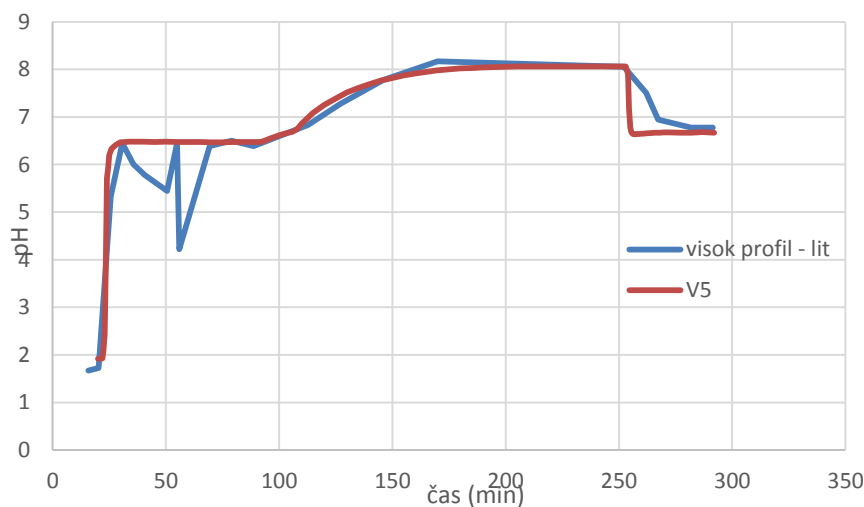
postopno naraščanje pH do vrednosti 8,1 smo pri tem poskusu dovajali kar 15x redčen pufer s pH 8,1.

Pri tem načinu je dobljena krivulja zelo odstopala od poteka simuliranega profila. Vzdolž simuliranega TČ je pH na začetku naraščal prehitro nato pa čedalje počasneje, kar nam je dalo stopničasto obliko grafa, medtem ko je bilo v literaturnem profilu naraščanje enakomerno.

Za boljšo simulacijo TČ smo naslednje poskuse (V2, V3, in V4) izvedli le na območju tega naraščanja. Ti poskusi so si bili med sabo podobni, pri vseh smo med pufroma z vrednostjo pH 6,5 (A) in 8,1 (B) uvajali še nekaj vmesnih stopenj – zmesi teh dveh pufrov v različnih razmerjih – s čimer smo zagotovili bolj enakomerno naraščanje pH. Pri V2 smo uporabili sedem vmesnih stopenj, pri V3 tri in pri V4 le eno. Dobljene rezultate smo nato primerjali med sabo in z literaturnim profilom. Noben od teh treh poskusov ni dal rezultatov, ki bi povsem ustrezali zahtevam. Iz načina naraščanja pH ob uvajanju teh mešanic v delovno čašo pa smo lahko sklepali, s kakšnim zaporedjem mešanic pufrov A in B bi se lahko najbolj približali poteku pH iz literaturnega profila.

V poskusu V5 smo nato našo predpostavko preverili, poleg tega pa smo izvedli še eno pomembno spremembo. Namesto uporabe treh pufrov z enakim pH in različnimi redčitvami, smo že takoj po uvajanju TNAF uporabili 15x redčen pufer (pH = 6,4). S tem smo precej poenostavili tako pripravo kot izvedbo simulacije, vrednosti pufrske kapacitete in pH pa so ostale ustrezne. Ta poskus nam je dal ustrezen potek postopnega naraščanja pH vzdolž tankega črevesa, poleg tega pa smo uspešno izvedli tudi hitri padec pH.

Poskus V5 smo izvedli v petih paralelkah in s tem potrdili ponovljivost simulacije pH profila. Na sliki 12 je prikazana primerjava literaturnega in simuliranega visokega profila.



Slika 12: Primerjava literaturnega in eksperimentalnega visokega profila. Prikazana sta časovni potek profila narisane iz literaturnih podatkov in časovni potek povprečnega pH poskusov V5.

S slike 12 je razvidno dobro ujemanje ciljnega profila s simuliranim. Večja odstopanja na začetku simuliranega tankega črevesa so posledica poenostavitve, ki smo jo naredili zaradi lažjega dela. Nihanje, ki ga vidimo na literaturnem profilu je posledica mešanja vsebine v dvanajstniku [5]. Da bi tako nihanje lahko simulirali, bi bilo potrebno izredno natančno hitro izmenično dovajanje kisline in baze, kar bi pomenilo več možnosti napake in slabšo ponovljivost. Zaradi tega smo se odločili za zgoraj prikazano poenostavitev. Lahko pričakujemo, da ta sprememba glede na literaturni profil vpliva tudi na sproščanje naše ZU iz tablet. V literaturnem profilu se vrednost pH namreč v neki točki precej približa pKa vrednosti natrijevega diklofenakata (3,8), tudi drugače pa je pH večino časa simuliranega duodenuma višji od literaturnih vrednosti za več kot 1 enoto. Iz tega lahko sklepamo, da bi se v literaturnem profilu iz tablete v tem območju sprostil manj natrijevega diklofenakata, kot smo eksperimentalno določili.

Še eno odstopanje našega profila se pojavi v strmini hitrega padca pH ob vstopu v debelo črevo, kjer z uporabo 0,85% H_3PO_4 ni mogoče simulirati postopnega padca pH. Tak padec bi lahko simulirali z dolgotrajnejšim uvajanjem manj koncentrirane kisline, morda pa bi lahko uvajanje kisline lahko kar preskočili in takoj začeli uvajati pufer za simulacijo medija DČ.

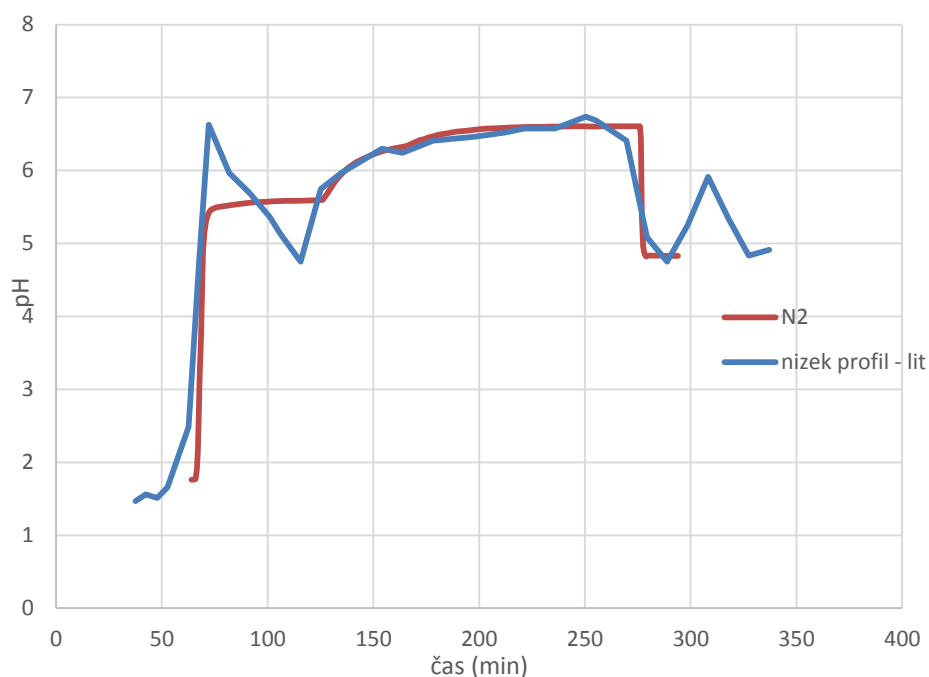
Ponovno lahko razberemo tudi razliko v pH simuliranega želodca in literaturnih podatkov. Kot je razloženo že pri razpravi o profilu X, je to posledica vpliva umeritve pH metra na vrednost 7,00. Dejanski pH simuliranega želodčnega medija je enak literaturnemu.

5.4.3.3 Nizek profil

Po ugotovitvah poskusov na visokem profilu smo pri simulaciji nizkega profila že takoj začeli z uporabo 15x redčenih pufrov po hitrem dvigu pH in mešanice pufrov za doseg postopnega naraščanja pH.

Poskus N1 se nam je deloma ponesrečil. Pri hitrem dvigu pH smo malo zamudili pri menjavi dovajane tekočine, zato se je pH dvignil na previsoko vrednost. Da poskusa ni bilo potrebno prekiniti in ponovno zagnati, smo v delovno čašo dodali nekaj kapljic raztopine citronske kisline in znižali pH na vrednost dovajanega pufra. V nadaljevanju poskusa smo zaradi napake pri preračunu prekmalu začeli s postopnim dvigom pH. Kljub temu smo lahko iz poteka krivulje pH razbrali, da je vrstni red dovajanih pufrov ustrezen, prilagoditi smo morali le začetek postopnega dviga.

V poskusu N2 smo nato potrdili ustreznost protokola za simulacijo nizkega pH profila, ponovljivost pa smo preverili v petih paralelkah. Na sliki 13 je prikazana primerjava končnega simuliranega nizkega profila in ciljnega profila iz literature.



Slika 13: Primerjava literarnega in eksperimentalnega nizkega profila. Prikazana sta časovni potek profila narisane iz literarnih podatkov in časovni potek povprečnega pH poskusov N2.

Tako kot pri visokem profilu, tudi tu lahko opazimo večjo razliko med profiloma takoj po hitrem dvigu. Ponovno je razlog za to nazobčan literaturni profil. Čeprav smo imeli v tem primeru v duodenumu opraviti z le enkratnim strmim padcem pH, smo se vseeno odločili za poenostavitev tega dela profila. Za pH vrednost prvega platoja smo izbrali 5,5, saj na ta način profil poteka po sredini med ekstremoma pH, ki so ga izmerili v dvanajstniku.

Drugo odstopanje je vidno na koncu simuliranega tankega črevesa, kjer smo prehod v debelo črevo nekaj minut zakasnili. Na tak način kot smo simulirali padec pH (z uporabo 0,85% H_3PO_4), je le-ta vedno hiter, zato te hitrosti nismo mogli posnemati. Zato smo se odločili, da v tem primeru kislino začnemo dovajati ob takem času, da se padec pH pri simuliranem profilu konča istočasno kot pri literarnem. Za to smo se odločili zaradi dejstva, da se pri tem posamezniku pH nato precej hitro ponovno dvigne, česar pa v okviru te magistrske naloge nismo simulirali. Da smo to vsaj malo upoštevali pri poskusih sproščanja, smo v nasprotju z visokim profilom (slika 12) nekoliko podaljšali čas simulacije tankega črevesa, kot je prikazano na sliki 13. V nadaljevanju literarnega profila se vrednost pH nekaj minut po tem dvigu ponovno vrne na raven simuliranega profila.

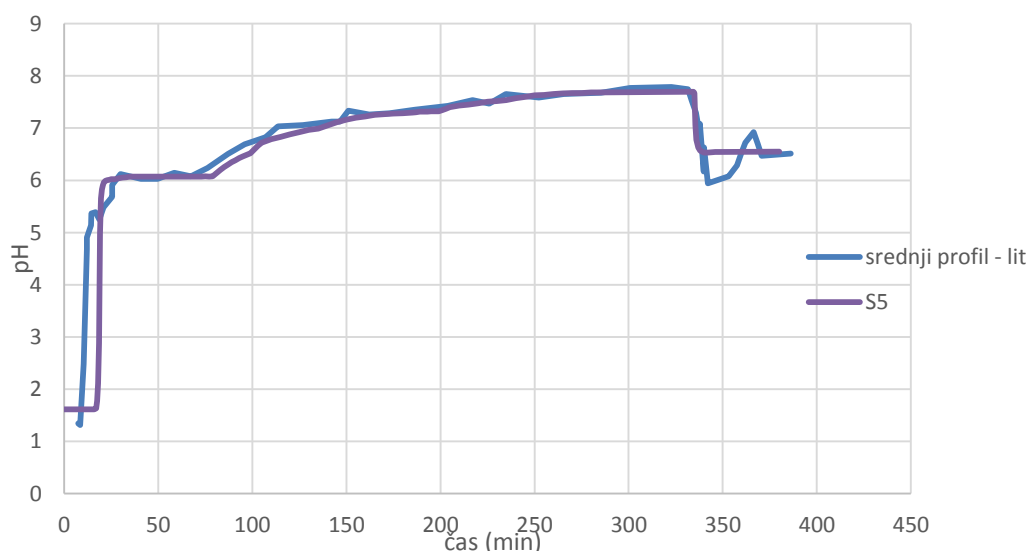
Razlika v pH želodca je zgolj navidezna in je posledica umeritve pH metra.

5.4.3.4 Srednji profil

Pri simulaciji srednjega profila, smo s poskusom S1 potrdili ustreznost hitrega dviga pH in izvedli prvi poskus postopnega naraščanja pH vzdolž tankega črevesa. Razmerje pufrov v uporabljeni zmesi ni bilo primerno za doseg ciljnega poteka pH.

Zaradi tega smo v poskusih S2, S3 in S4 preizkušali različna razmerja pufrov v vmesnih stopnjah. V poskusu S4 smo dosegli želeni potek pH, ki smo ga nato v poskusu S5 povezali v celoten profil.

Z izvedbo poskusa S5 v treh paralelkah smo potrdili še ponovljivost simulacije. Na sliki 14 je prikazana primerjava končnega simuliranega srednjega profila in ciljnega profila iz literature.



Slika 14: Primerjava literarnega in eksperimentalnega srednjega profila. Prikazana sta časovni potek profila narisane iz literarnih podatkov in časovni potek povprečnega pH poskusov S5.

Ker literarni pH profil ne vsebuje nobenega dela s skokovitim, nepredvidenim spreminjanjem pH vrednosti se mu simulirani profil dobro prilega po celotni dolžini.

Edino izrazitejše odstopanje je po hitrem padcu pH ob prehodu iz tankega v debelo črevo. V tem primeru gre za izrazitejši padec pH vrednosti v literarnem profilu, ki pa je zgolj kratkotrajen. Zato smo profil poenostavili in za medij simuliranega debelega črevesa takoj uporabili pufer s pH vrednostjo na kateri se pH literarnega profila kmalu za tem ustali. Razlika v pH želodca je zgolj navidezna in je posledica umeritve pH metra.

5.5 Sproščanje

Poskuse sproščanja ZU iz tablet smo izvajali le na treh profilih (visoki, nizki, srednji), na profilu X pa ne. Za to smo se odločili, ker je bil cilj te naloge čim bolj simulirati individualne profile GIT in ugotoviti morebitne razlike v sproščanju ZU v teh pogojih. Profil X ni bil dobljen z enako metodo in ni enako dobro predstavljal dejanskega poteka pH znotraj GIT, zato ga nismo vključili v poskuse sproščanja.

5.5.1 Visok profil

Pri visokem profilu smo za začetek izvedli tri poskuse sproščanja s tabletami iz serije M (Vs1). Dobljeni rezultati so se med seboj lepo ujemali, tako po vrednosti končnega odstotka sproščene ZU, kot tudi po obliki krivulje. RSD je pri nekaj zgodnjih vzorcih višji od 10 %, tekom poskusa pa postopno pada, tako da je v drugi polovici poskusa ves čas nižji od 5 %, v zadnjih dveh urah poskusa pa celo nižji od 2 %.

Izvedli smo tudi tri poskuse s tabletami serije N (Vs2) in tako preverili, če ima tudi količina ZU v tableti vpliv na hitrost sproščanja. Dobljeni rezultati niso pokazali razlik v odstotku sproščene učinkovine glede na tablete iz serije M, zato nadaljnjih poskusov s tabletami serije N nismo izvajali. RSD je tudi v tem primeru na začetku poskusov malo višji (14,95 % za prvi vzorec), od tretjega vzorca naprej pa nikoli ne preseže 4 %

5.5.2 Nizek profil

Pri poskusih sproščanja na nizkem profilu smo imeli kar nekaj težav. Razlog za to so bili predvsem neustrezno nastavljeni pretoki skozi cevke na sistemu G2. Raztopina se je iz delovne čaše namreč hitreje odvajala kot dovajala. Posledično se je v delovni čaši volumen medija zmanjšal in s tem omejil količino ZU, ki jo je tableta lahko sproščala, kar je vodilo do upočasnjene sproščanja in manjšega končnega odstotka sproščene učinkovine.

To se je dogodilo pri poskusih Ns1c in Ns1e in je tudi vzrok za odstopanje rezultatov teh poskusov. Zaradi teh napak smo pri obdelavi rezultatov ta poskusa zanemarili.

Tudi drugače ujemanje rezultatov ni tako dobro kot pri ostalih dveh profilih, zato smo izvedli več ponovitev (5 veljavnih paralelk) kot pri drugih dveh. RSD je pri večini vzorcev v območju med 7 % in 9 %, pod temi vrednostmi pa je le pri štirih vzorcih v srednjem delu poskusa.

Večja variabilnost bi bila lahko posledica nižjega pH v tem profilu, kar pomeni, da smo bližje pKa vrednosti natrijevega diklofenkata (3,8). Zaradi tega imajo morebitne eksperimentalne napake pri simulaciji večji vpliv na topnost ZU in posledično njeno sproščanje iz tablet.

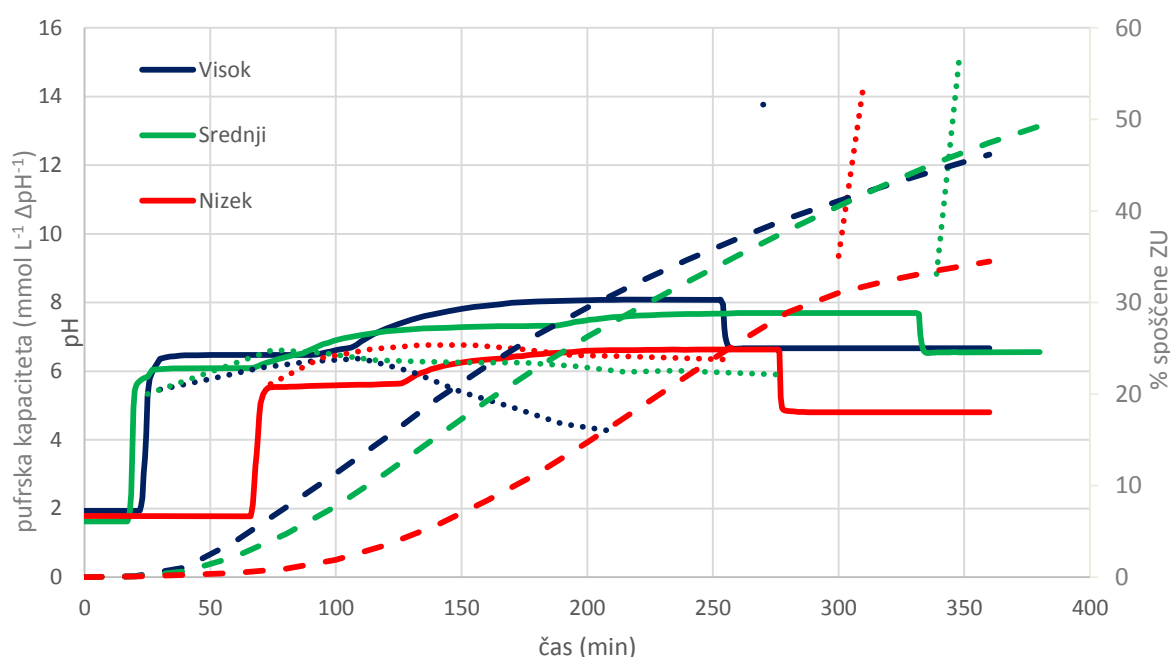
5.5.3 Srednji profil

Pri srednjem profilu smo sproščanje izvedli v štirih paralelkah. To je bila posledica težave pri poskusu Ss1b, pri katerem se je med poskusom tableta prilepila med steno čaše in odvodno cevko. Zaradi črpanja raztopine iz neposredne okolice tablete se je na ta način iz delovne čaše prečrpalo več ZU, kar je posledično omogočilo tudi hitrejše sproščanje ZU iz tablete. To se lepo vidi tudi iz poteka krivulje sproščanja ZU, ki se v začetnem delu lepo prilega ostalim, po približno 150 minutah pa se sproščanje ZU pospeši, kar pripelje do višjega odstotka sproščene učinkovine na koncu poskusa. Rezultate poskusa Ss1b smo zato pri obdelavi rezultatov zanemarili.

Ostali trije poskusi so nam dali lepo ujemajoče se rezultate. RSD je z izjemo prvih dveh vzorcev ves čas nižji od 3 %.

5.5.4 Primerjava

Po pričakovanju so se pri sproščanju ZU iz tablet med profili pojavile razlike. Pri nizkem profilu se je v celotnem poskusu sprostilo najmanj ZU (v povprečju 34,48%), kar je znatno manj kot pri ostalih dveh, kljub podobnem času trajanja poskusa. Slika 15 prikazuje primerjavo pH profilov in profilov sproščanja za visok, nizek in srednji profil.



Slika 15: Primerjava poteka pH profilov in odstotka sproščene ZU. Prikazani so poteki vseh končnih simuliranih pH profilov v odvisnosti od časa (polne črte), povprečni odstotek sproščene ZU v odvisnosti od časa pri vseh treh profilih (prekinjene črte) in pufrske kapacitete (pikčaste črte). Na levi ordinatni osi so navedene vrednosti pH in vrednosti pufrske kapacitete ($\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$), na desni pa povprečni odstotek sproščene ZU. Rezultate visokega profila predstavlja modra črta, nizek profil predstavlja rdeča črta, rezultate srednjega profila pa zelena. Ciljno območje pufrske kapacitete znaša od 4 do 8 $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$ v tankem črevesu in 15 $\text{mmol L}^{-1} \Delta\text{pH}^{-1}$ v debelem.

Nedvomno ima vpliv na manjšo količino sproščene ZU v času poskusa tudi daljši čas, ki ga je tableta pri nizkem profilu prebila v simuliranem želodčnem soku, kjer je sproščanje ZU zanemarljivo majhno. Razlike v hitrosti sproščanja ZU iz tablet pa so vidne tudi po prehodu tablet v simulirano tanko črevo. Če namreč primerjamo količino sproščene ZU v prvih 40 minutah po izstopu iz želodca, vidimo, da se v tem času v visokem profilu iz tablete spusti približno dvakrat toliko ZU kot pri nizkem. Vidimo, da po daljši izpostavitvi natrijevega diklofenakata kislemu mediju zakasnitveni čas traja precej dlje kot se je tableta nahajala v simuliranem želodčnem mediju.

S slike 15 lahko razberemo, da so v osrednjem delu (150 – 250 minut) velike razlike v odstotku sproščene ZU, a se je v tem območju ZU sproščala s približno enako hitrostjo pri vseh treh pH profilih, saj so krivulje, ki prikazujejo kumulativni odstotek sproščene ZU, skoraj vzporedne, kljub precejšnji razliki v pH vrednosti (med visokim in nizkim profilom razlika znaša 1,5 enote pH).

Bolj kompleksna je zadeva pri visokem in srednjem profilu. Tu razlike v vrednosti pH niso tako velike kot med nizkim profilom in tema dvema, zato ima večji vpliv tudi spreminjanje vrednosti pH s časom. Srednji profil ima sicer nižji maksimum pH, a to vrednost vzdržuje dlje časa kot visok profil. Iz tega lahko sklepamo, da je za upočasnitev sproščanja diklofenakata pri visokem profilu odgovoren padec pH ob simuliranem prehodu iz ileuma v cekum.

Ta pojav smo namreč opazili pri vseh treh profilih – najbolj izrazit je pri nizkem profilu, kjer se vrednost pH v simuliranem DČ od pKa natrijevega diklofenakata razlikuje zgolj za 1 enoto, zaradi česar se njegova topnost precej zmanjša.

Ponovljivost je bila pri vseh poskusih zadovoljiva. Opazili smo, da je pri vseh poskusih sproščanja RSD največji pri nekaj začetnih vzorcih, ko se tableta nahaja v simuliranem želodčnem mediju in na začetku simuliranega medija TČ. Tu še posebej izstopa vrednost RSD prvega vzorca poskusov Ss1, ki znaša kar 59,31 %. Večja variabilnost rezultatov v tem območju je posledica zelo majhne količine sproščenega natrijevega diklofenakata.

6 Sklep

V tem magistrskem delu smo uspešno simulirali različne individualne pH profile GIT teščih zdravih posameznikov na pretočnem sistemu in preučevali njihov vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s podaljšanim sproščanjem. Ugotovili smo naslednje:

- Pred izvedbo poskusov je potrebno natančno uskladiti pretoka skozi dovodno in odvodno cevko, ker se v nasprotnem primeru volumen medija v delovni čaši s časom spreminja. Vsaka sprememba volumna ima vpliv na rezultate, kar se je pokazalo pri težavah na sistemu G2.
- Z ustreznim zaporedjem McIlvainovih pufrov je možno ustrezno simulirati pH profil GIT in pri tem upoštevati tudi primerno pufrsko kapaciteto. Željeno pufrsko kapaciteto smo dosegli z ustreznim redčenjem McIlvainovih pufrov.
- Pri simulaciji hitrega dviga pH je postopek ugotavljanja ustrezne koncentracije raztopine TNAF precej zamuden, ker jo je treba določiti eksperimentalno z uporabo različnih raztopin. Poleg tega je potrebno za vsak poskus sistem očistiti, ponovno nastaviti in počakati, da se medij v delovni čaši segreje na 37°C.
- Za simuliranje počasnega naraščanja pH tekom TČ je najbolje uporabiti mešanice pufra prvega in drugega platoja v ustreznem razmerju. V drugih metodah, ki smo jih preizkusili, je bil prehod preveč stopničast.
- Kljub temu, da so bile vrednosti pH po celotnih profilih oddaljene od pKa diklofenaka (3,8) za več kot 1 enoto (izjema hitri dvig pH ob prehodu v dvanajstnik), je vpliv na sproščeno količino velik. V osrednjem delu profilov (od 150. do 250. minute) je bila hitrost sproščanja pri vseh profilih približno enaka, ne glede na različne vrednosti pH.
- Daljši čas izpostavitve tablete kislemu mediju simuliranega želodca je povzročil dolg čas zakasnitve pred nastopom maksimalne hitrosti sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablete. Ob znižanju pH pri prehodu v simulirano DČ se je sproščanje natrijevega diklofenakata upočasnilo pri vseh treh profilih.

Pri tej magistrski nalogi smo za simulacijo pH profilov uporabili McIlvainove pufre. Za boljši približek fiziološkim pogojem, bi bilo potrebno uporabiti karbonatni pufer. Kar se tiče preučevanja vpliva pH profila na sproščanje modelne ZU iz tablet, pa so rezultati pokazali precejšnje razlike pri sproščanju natrijevega diklofenakata, zato bi bilo zanimivo videti kako bi bilo pri uporabi katere druge ZU. V prihodnosti bi se lahko preverilo še vpliv drugih dejavnikov, kot so na primer čas zadrževanja FO v TČ, razlika med pogoji na tešče in po jedi...

7 Viri in literatura

1. Gelfond D, Ma C, Semler J, Borowitz D: Intestinal pH and Gastrointestinal Transit Profiles in Cystic Fibrosis Patients Measured by Wireless Motility Capsule. *Digestive Diseases and Sciences* 2013; 58: 2275–2281.
2. Ibekwe VC, Fadda HM, McConnell EL, et al.: 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.
3. Koziolk M, Grimm M, Becker D, et al.: Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap® System. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 104: 2855–2863
4. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, et al.: Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharmaceutical Research* 2006; 23(1): 165-76.
5. Fallingborg J: Intraluminal pH of the Human Gastrointestinal Tract. *Danish Medical Bulletin* 07/1999; 46(3): 183-96.
6. Evans DF, Pye G, Bramley R, et al.: Measurement of Gastrointestinal pH Profiles in Normal Ambulant Human Subjects. *Gut* 1988; 29: 1035–1041.
7. Ewe K, Schwartz S, Petersen S, Press AG: Inflammation Does Not Decrease Intraluminal pH in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44 (7): 1434–1439.
8. Press AG, Hauptmann IA, Hauptmann L, et al.: Gastrointestinal pH Profiles in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1998; 12: 673–678.
9. The Pharmaceutics and Compounding Laboratory:
<http://pharmlabs.unc.edu/labs/opthalmics/buffers.htm> (dostopano 28. 4. 2016)
10. Chang R.: *Physical Chemistry for the Biosciences*, University Science Books, Sausalito, 2005: 280-6
11. Cohen-Rabbie S, Flanagan T, Martin PD, Basul AW: Inter-subject Variability in Intestinal Drug Solubility. *International Journal of Pharmaceutics* 2015 May 15;485(1-2):229-34.
12. Fadda HM, Sousa T, Carlson AS, et al.: Drug Solubility in Luminal Fluids from Different Regions of the Small and Large intestine of Humans. *Molecular Pharmaceutics* 2010; 7(5): 1527-32.

13. Diakidou A, Vertzoni M, Goumas K, et al.: Characterization of the Contents of Ascending Colon to Which Drugs are Exposed After Oral Administration to Healthy Adults. *Pharmaceutical Research* 2009; 26(9): 2141-51.
14. The Pamela Stanley Lab:
http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=McIlvaine_buffer (dostopano 11. 2014)
15. Engauge Digitizer: <http://markummitchell.github.io/engauge-digitizer/> (dostopano 5. 2016)
16. Božič K: In vitro simulacija pH profila prebavnega trakta in vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata [Diplomska naloga]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Ljubljana, 2014.
17. Gjuran A: In vitro simulacija pH profila in puferskih kapacitet medijev prebavnega trakta [Diplomska naloga v izdelavi]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko Ljubljana.