

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



DAVID ZUPANČIČ

***IN VITRO* SIMULACIJA PROFILA pH GASTROINTESTINALNEGA
TRAKTA S HIDROGENKARBONATNIM PUFROM**

***IN VITRO* SIMULATION OF HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT pH
PROFILE USING HYDROGEN CARBONATE BUFFER**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Zahvaljujem se prof.dr. Mariji Bogataj za strokovno vodenje pri izdelavi raziskovalne naloge ter Greti Cof in Tjaši Felicijan za uporabne nasvete pri izvedbi poskusov in uporabi laboratorijske opreme.

Lepo se zahvaljujem tudi svojim staršem, ki so mi omogočili brezskrben študij in mi vedno stali ob strani. Hkrati se želim zahvaliti tudi svoji partnerici Anji Kržič za vso spodbudo in moralno podporo pri pisanju naloge.

Izjava

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

David Zupančič

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Izločanje hidrogenkarbonata v prebavnem traktu	1
1.1.1 Želodec	1
1.1.2 Dvanajstnik skupaj s pankreatobiliarnim traktom	2
1.1.3 Jejunum in Ileum	4
1.1.4 Kolon	4
1.1.5 Povzetek izločanja hidrogenkarbonatnih ionov <i>in vivo</i>	5
1.2 pH v tankem in debelem črevesu.....	5
1.3 Dinamično ravnotežje hidrogenkarbonatnega pufrskega sistema in njegova povezava z <i>in vitro</i> testi sproščanja	6
1.4 Stabilizacija pH hidrogenkarbonatnega pufra	7
1.5 Testi sproščanja v hidrogenkarbonatnih pufrih	8
1.6 Prednosti in slabosti uporabe hidrogenkarbonatnih pufrov pri testih sproščanja	10
2 NAMEN DELA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI in APARATURE	13
3.1.1 Kemikalije in laboratorijska oprema	13
3.1.2 Aparature	14
3.2 METODE	15
3.2.1 Priprava hidrogenkarbonatnih pufrov	15
3.2.2 Priprava acetatnih pufrov	16
3.2.3 Priprava ostalih raztopin	17
3.2.4 Priprava umeritvenih premic	17
3.2.5 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka	17
3.2.6 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom	19
3.2.7 Pretočni sistem za simulacijo profila pH in testiranje sproščanja	19
3.2.8 Simulacija profila pH.....	20

3.2.9 Izdelava tablet.....	24
3.2.10 Poskusi sproščanja.....	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 Umeritvene premice	25
4.2 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka	25
4.2.1 Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra.....	25
4.2.2 Vpliv premera čaše in mešanja medija na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra.....	27
4.2.3 Vpliv različnih hitrostih mešanja in stabilizacije s plastjo parafinskega olja na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra	28
4.3 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom	30
4.4 Razvoj pH profila	31
4.4.1 Poskusi ponazoritve profila pH od želodca do vključno prvega platoja v tankem črevesu.....	31
4.4.2 Poskusi ponazoritve profila pH v tankem črevesu do vključno drugega platoja	32
4.4.3 Simulacija prehoda iz tankega v debelo črevo	35
4.4.4 Simulacija celotnega profila pH	36
4.5 Testi sproščanja	39
5 RAZPRAVA.....	41
5.1 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka	41
5.1.1 Priprava hidrogenkarbonatnega pufra	41
5.1.2 Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra.....	42
5.1.3 Vpliv volumna hidrogenkarbonatnega pufra na rast pH	42
5.1.4 Vpliv premera čaše na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra.....	43
5.1.5 Vpliv hitrosti mešanja hidrogenkarbonatnega pufra na rast pH.....	44
5.1.6 Vpliv stabilizacije hidrogenkarbonatnega pufra s plastjo parafinskega olja na rast pH	44
5.2 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom	46
5.3 Razvoj profila pH	47
5.3.1 Simulacija profila pH od želodca do vključno prvega platoja v tankem črevesu	48
5.3.2 Simulacija profila pH v tankem črevesu do vključno drugega platoja.....	49
5.3.3 Simulacija profila pH pri prehodu iz tankega v debelo črevo	51
5.3.4 Simulacija celotnega profila pH	54

5.4 Poskusi sproščanja.....	55
6 SKLEPI.....	57
7 LITERATURA	58

POVZETEK

V magistrski nalogi smo simulirali profil pH medijev gastrointestinalnega trakta s hidrogenkarbonatnim pufrom. V primerjavi s simulacijami v fosfatnih pufrih prinaša uporaba hidrogenkarbonatnih pufrov vrsto novih izzivov, ki so posledica njihove termodinamske nestabilnosti. Ta se pojavlja kot posledica izhajanja ogljikovega dioksida iz sistema, kar se nato odraža v rasti pH pufra. V ta namen smo v tej nalogi želeli preučiti obnašanje hidrogenkarbonatnega pufra in napovedati trende rasti pH pod različnimi pogoji. V preliminarnih poskusih, v katerih smo preučevali spreminjanje pH v čaši brez pretoka, smo ugotovili, da na stabilnost hidrogenkarbonatnega pufra odločilno vplivajo mehanski stres (rokovanje, mešanje), temperatura in površina medija v stiku z zračno plastjo, medtem ko volumen medija ob predpostavki konstante površine medij-zrak ne vpliva na spreminjanje pH. V nadaljevanju naloge smo želeli raziskati možnosti stabilizacije pH hidrogenkarbonatnega pufra. V ta namen smo uporabili parafinsko olje, ki smo ga v obliki tanke plasti nanесли na površino medija. Ugotovili smo, da parafinsko olje predstavlja učinkovit in lahko izvedljiv način stabilizacije pH hidrogenkarbonatnih pufrov. Pridobljeno znanje v preliminarnih poskusih smo implementirali v poskusih simulacije profila pH gastrointestinalnega trakta na pretočnem sistemu. Odločili smo se za simulacijo dveh profilov pH, ki se razlikujeta po vrednosti pH po prehodu iz tankega v debelo črevo. Ugotovili smo, da lahko termodinamsko nestabilnost hidrogenkarbonatnih pufrov izkoristimo za lažjo simulacijo profila pH. Tako smo z uporabo ustrezne hitrosti mešanja hidrogenkarbonatnega pufra v čaši za dovajanje in menjavami pufrov dosegli želene hitrosti naraščanja pH, kar se je izkazalo za koristno pri ponazoritvi počasnega dviga pH v tankem črevesu. Uspešno smo izvedli simulacijo obeh profilov pH medijev gastrointestinalnega trakta, pri čemur smo dokazali ponovljivost simulacij. V zadnjem delu naloge smo v zaporedju medijev, ki ustrezajo razvitim profilom pH, sproščali natrijev diklofenakat (Na-DF) iz tablet HPMC z Na-DF. Uspeli smo pokazati, da pH uporabljenih pufrov za simulacijo profila vpliva na delež sproščene učinkovine. Vrednosti pH, ki simulirajo razmere v začetnem delu debelega črevesa, smo dosegli z direktnim dodajanjem oetne kisline v delovno čašo namesto z dovajanjem prek pretočnega sistema, zato ta metoda potrebuje nadaljnjo obravnavo.

ABSTRACT

The aim of this master thesis was to simulate the pH profile of the gastrointestinal tract media using bicarbonate buffer. In comparison with phosphate buffers, usage of bicarbonate buffers brings a series of new challenges as a result of their thermodynamic instability. Thermodynamic instability of bicarbonate buffer is the consequence of carbon dioxide loss from the system, which is in turn reflected in the increase of buffer pH. Therefore, we first wanted to examine the behavior of a bicarbonate buffer and anticipate pH increase trends under different conditions. In preliminary experiments we found out that the stability of a bicarbonate buffer is determined by following major factors: mechanical stress (handling, mixing), temperature and the surface area of the medium which is in contact with air. We also found out that the volume of the medium does not have an effect on pH, provided that surface area medium-air remains constant. Moving forward, we wanted to explore the possibility of bicarbonate buffer pH stabilization. For this purpose, we used a paraffin oil, which was applied onto the surface of the medium in the form of a thin layer. We found that stabilization of bicarbonate buffer with paraffin oil is an effective and straightforward method of bicarbonate buffer pH stabilization. Knowledge that we gained in preliminary experiments was utilized in experiments of gastrointestinal pH profile simulation in a flow-through system. We chose to simulate two pH profiles, which differ in the pH value after drop in the last part of profile, simulating transit from distal parts of small intestine to the colon. In the simulation experiments we showed that we can use thermodynamic instability of bicarbonate buffers as an advantage. By applying the appropriate stirring rate of the bicarbonate buffer in the feeding beaker and switching buffers we managed to achieve a desired rate of pH increase. We were able to successfully simulate both pH profiles of the gastrointestinal tract media where the results were repeatable. In the last part, we performed dissolution tests using continuous sequence of media simulating pH changes along gastrointestinal tract that we established beforehand. For this purpose, we used HMPC tablets with diclofenac sodium. We were able to show that pH value of used buffers influences the release of diclofenac sodium (DS). The pH value, simulating the conditions in the colon, was achieved with the direct addition of acetic acid in the vessel, instead of feeding it through the flow-through system and therefore needs further evaluation.

SEZNAM OKRAJŠAV

FO-farmacevtska oblika

GIT-gastrointestinalni trakt

GR-gastrorezistentna oblika

MMK-migracijski motorični kompleks

Na-DF-natrijev diklofenakat

HPMC-hidroksipropil metilceluloza

CO₂(g)-ogljikov dioksid v plinastem stanju

CO₂(aq)-raztopljena oblika ogljikovega dioksida

1 UVOD

1.1 Izločanje hidrogenkarbonata v prebavnem traktu

Večina hidrogenkarbonata (HCO_3^-), ki ga najdemo v prebavilih se izloča iz treh različnih sistemov: epitelija gastrointestinalnega trakta, trebušne slinavke in biliarnega trakta. V nadaljevanju tega poglavja je opisano izločanje hidrogenkarbonata v posameznem sistemu.

1.1.1 Želodec

Podobno kot izločanje kisline v želodcu, lahko tudi izločanje hidrogenkarbonata v želodcu razdelimo na bazalno in digestivno izločanje, ki ga lahko naprej ločimo na cefalično, gastrično in intestinalno fazo (1). Različna hitrost izločanja hidrogenkarbonata v posamezni fazi, intra- in interindividualne razlike ter uporaba različnih eksperimentalnih metod so vzrok širokemu območju izmerjenih koncentracij hidrogenkarbonata v lumnu želodca, ki jih najdemo v literaturi. Rees in sodelavci (2) tako navajajo koncentracijo hidrogenkarbonata med 2,3 in 20 mmol/L v lumnu želodca v stanju na tešče. J.L. Johnson in sodelavci (3) so na tešče izmerili koncentracije v območju med 0 in 15 mmol/L. Charney in Donowitz (4) pa v svojem delu navajata koncentracijo hidrogenkarbonata 0 mmol/L pri stimuliranem izločanju želodčne kisline in 10 mmol/L v bazalnih pogojih. Vzrok nizke koncentracije hidrogenkarbonata pri stimuliranem izločanju kisline je pretvarjanje hidrogenkarbonata v $\text{CO}_2(\text{g})$ ob reakciji z izločujočo se kislino (5). Brinkmann in sodelavci (5) so izmerili porast vrednosti PCO_2 v želodcu iz 48 mmHg PCO_2 v bazalnih pogojih na 61 mmHg PCO_2 ob aktivnem izločanju kisline.

Podane koncentracije hidrogenkarbonata je potrebno obravnavati z veliko mero previdnosti. Metoda, ki bi omogočala direktno in natančno merjenje hitrosti izločanja ali koncentracij HCO_3^- v želodcu med hkratnim izločanjem želodčne kisline namreč ni razvita (2, 6). Vzrok je v prisotnosti in sočasnem izločanju želodčne kisline, ki v trenutku reagira z izločenim hidrogenkarbonatom in takšne meritve otežuje. Tako je večji del podatkov iz literature, vključno s podanimi v raziskovalnem delu (2), osnovan na meritvah HCO_3^- v želodcu, kjer je izločanje HCl popolnoma zavrto (supresija s cimetidinom ali ranitidinom) (6). Ostali študiji (3, 4) sta pregledna članka, kjer metodologija ni navedena. Kljub nepopolnim metodam je raziskovalcem uspelo pokazati, da se izločanje hidrogenkarbonata v digestivni fazi glede na bazalno izločanje poveča. Hogan in sodelavci (7) tako navajajo

hitrost bazalnega izločanja hidrogenkarbonata 400 $\mu\text{mol/h}$ in hitrost izločanja hidrogenakarbonata med lažnim hranjenjem (ang. »sham feeding«) 900 $\mu\text{mol/h}$.

1.1.2 Dvanajstnik skupaj s pankreatobiliarnim traktom

Med izločanjem klorovodikove kisline iz parietalnih celic v želodcu hkrati poteka izločanje HCO_3^- na bazolateralni membrani teh istih celic. Izločen HCO_3^- vstopa v obtok in s tem povzroči t.i. alkalno plimo. Ta hidrogenkarbonat se nato v veliki meri izloča v lumen dvanajstnika prek trebušne slinavke, biliarnega trakta in epitelija dvanajstnika (8).

Trebušna slinavka

Trebušna slinavka ali pankreas je najpomembnejši vir hidrogenkarbonata, ki ga najdemo v dvanajstniku. Volumen tekočine, ki se dnevno izloči iz duktalnih celic pankreasa v dvanajstnik znaša približno 1 L (9). Večina duktalne tekočine, ki je bogata s HCO_3^- , se izloči ob začetku intestinalne faze, medtem ko v bazalnih pogojih prevladuje izločanje NaCl (10). Koncentracija HCO_3^- v pankreasni tekočini lahko doseže do 140 mmol/L (sekrecija ob začetku intestinalne faze) in je odvisna od hitrosti pretoka pankreatičnega soka, ta pa v veliki meri od pogojev v prebavnem traktu (10). V bazalnih pogojih tako izločanje hidrogenkarbonata znaša le 1-2% maksimalne hitrosti izločanja (9), a tudi ta ni konstantna, saj izločanje hidrogenkarbonata v dvanajstnik poraste med III. fazo migracijskega motoričnega kompleksa (MMK) (11).

Žolčnik in žolčevodi

Tako kot v pankreasu je tudi v žolčni sekciji prebavnega trakta koncentracija hidrogenkarbonata odvisna od hitrosti pretoka žolčne tekočine (12) in s tem prisotnosti oz. odsotnosti hrane v prebavnem traktu. Približen dnevni volumen izločene tekočine skozi žolčevod je 1 L, koncentracija HCO_3^- pa lahko doseže do 40 mmol/L (4, 13).

Epitelij dvanajstnika

Izločanje HCO_3^- skozi epitelij dvanajstnika ni enakomerno preko celotne površine dvanajstnika, ampak je nekajkrat hitrejše v proksimalnem kot v distalnem delu dvanajstnika (14). Ob prihodu kisline v dvanajstnik se hitrost izločanja hidrogenkarbonata poveča za približno 3,5-krat na vrednost (15). Epitelij dvanajstnika je v primerih popolne

zapore izločanja hidrogenkarbonata iz pankreasa in biliarnega trakta sposoben zagotoviti količino hidrogenkarbonata, ki zadostuje za nevtralizacijo želodčne kisline (7).

Karakterizacija celokupnega duodenalnega hidrogenkarbonata

Kot že opisano se hidrogenkarbonat iz pankreasa in žolčnega trakta v proksimalnem delu dvanajstnika pridruži hidrogenkarbonatu iz epitelija dvanajstnika, kjer nato poteka nevtralizacija želodčne kisline z nastankom $\text{CO}_2(\text{g})$. Izmerjeni tlaki $\text{CO}_2(\text{g})$ v proksimalnem delu duodenuma (do 500 mmHg) so zaradi nevtralizacije velike količine želodčne kisline veliko večji od izmerjenih tlakov v želodcu in jejunumu (30-76 mmHg) (14). Sluznica dvanajstnika je za nastali $\text{CO}_2(\text{g})$ izjemno prepustna (16) zaradi česar se slednji izgublja iz dvanajstnika. Posledično (zaradi ravnotežja med CO_2 in HCO_3^-) pa so tudi koncentracije hidrogenkarbonata v dvanajstniku relativno nizke. Krieg in sodelavci (14) so s pomočjo podatkov o izmerjenih tlakih $\text{CO}_2(\text{g})$ v dvanajstniku in z uporabo enačbe $[\text{HCO}_3^-] = \frac{K_a K_H \text{PCO}_2}{[\text{H}^+]}$ izračunali, da koncentracija hidrogenkarbonata v duodenumu in jejunumu v pogojih na tešče niha med 3 in 20 mmol/L, kjer HCO_3^- v enačbi predstavlja koncentracijo hidrogenkarbonatnih ionov, K_H Henryjevo konstanto (0,024 pri 37°C za ogljikov dioksid), PCO_2 parcialni tlak ogljikovega dioksida in pKa negativni logaritem celokupne disociacijske konstante za ogljikovo kislino (6,37 pri 37°C). Ta metoda določanja koncentracije HCO_3^- je v literaturi poimenovana pH/ PCO_2 metoda. Možen vir napake pri pH/ PCO_2 metodi je hitra difuzija $\text{CO}_2(\text{g})$ skozi mukozo dvanajstnika in s tem posledično netočne vrednosti meritev PCO_2 , ki so jih raziskovalci uporabili pri izračunu koncentracije hidrogenkarbonata. Odes in sodelavci (6) so pokazali, da je napaka metode majhna v bazalnih razmerah in večja pri meritvah ob vstopu kisline v dvanajstnik. Repitsh in sodelavci (17) so z uporabo enake metode in lastnih meritev PCO_2 izračunali bazalno koncentracijo hidrogenkarbonata v dvanajstniku 6,7 mmol/L pri pH 7,22. Podatki, ki so jih Sheng in sodelavci (18) zbrali iz različnih študij od leta 1935 naprej, kažejo na razpon koncentracij hidrogenkarbonata v dvanajstniku med 4 in 21 mmol/L (merjeno na tešče), s povprečno vrednostjo 15 mmol/L. Vantrappen in sodelavci (1) so določali koncentracijo hidrogenkarbonata v dvanajstniku s povratno titracijo po odvzemu alikvotov duodenalne tekočine. Ugotovili so, da koncentracija hidrogenkarbonata pred III. fazo MMK znaša približno 15,2 mmol/L, po začetku faze III pa približno 35,9 mmol/L, kar sovпада s prej omenjenim podatkom, da bazalna sekrecija hidrogenkarbonata pankreasa niha in poraste po začetku III. faze MMK.

1.1.3 Jejunum in Ileum

Čeprav v jejunumu in ileumu prevladuje absorpcija intestinalne tekočine, se v tem delu tankega črevesja na dan izloči približno 1 L tekočine, v kateri se koncentracija HCO_3^- giblje okoli 30 mmol/L (4). Izmenjava tekočine je uravnana prek Na^+ in Cl^- ionov, kjer za transport ionov prek membrane skrbijo Na^+/H^+ in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ izmenjevalci. Medtem, ko se Na^+ in Cl^- absorbirata iz lumna tankega črevesja, v nasprotni smeri potujejo H^+ in HCO_3^- ioni. V ileumu, predvsem njegovem končnem delu, prevladuje izmenjava $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, kar pojasni višje koncentracije hidrogenkarbonata v tem delu glede na koncentracije v jejunumu (13). Sheng in sodelavci (18) v preglednem članku navajajo koncentracijo hidrogenkarbonata v jejunumu 18,1 mmol/L pri pH 7,5 v pogojih na tešče. Banwell in sodelavci (19) so določili koncentracijo HCO_3^- 8,2 mmol/L v jejunumu in 30 mmol/L v ileumu (na tešče). Podatki, ki so jih zbrali McNamara in sodelavci (20) iz različnih študij kažejo na razpon koncentracij med 2 in 30 mmol/L v jejunumu in razpon koncentracij med 40 in 75 mmol/L v ileumu. Prevladujoča metoda za določanje koncentracije HCO_3^- , ki je bila uporabljena v teh študijah je bila titracija, kjer so vzorce intestinalne tekočine pridobili s pomočjo intubacije.

Količina izločenega HCO_3^- je tudi v tem predelu črevesja odvisna od pogojev, v katerih se telo nahaja. V bazalnih pogojih prevladuje absorpcija, takoj po obroku pa sekrecija hidrogenkarbonata. Kasneje, ko v duodenum vstopi pankreatična tekočina (bogata s hidrogenkarbonatom) zopet prevladuje absorpcija (13).

1.1.4 Kolon

Izločanje hidrogenkarbonata v kolonu je precej manj raziskano kot v želodcu in posameznih delih tankega črevesja. Hidrogenkarbonat, ki se izloči v kolonu prek $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ izmenjevalca, se porabi za pufranje organskih kislin, ki jih proizvajajo bakterije kolona. Koncentracija HCO_3^- v kolonu se giblje med 15-25 mmol/L (4). V blatu HCO_3^- ne najdemo, a na dan vseeno izgubimo približno 30 mmol hidrogenkarbonata na račun prej omenjenega pufranja organskih kislin (4).

1.1.5 Povzetek izločanja hidrogenkarbonatnih ionov *in vivo*

Povzetek izločanja hidrogenkarbonata v posameznem delu gastrointestinalnega trakta za pogoje na tešče prikazuje preglednica I. Opazimo lahko visoko variabilnost koncentracij hidrogenkarbonata, o katerih poročajo raziskovalci. Kot že omenjeno tekom poglavij 1.1.1-1.1.4 so poglavitni vzroki za široko območje koncentracij: različna hitrost izločanja hidrogenkarbonata glede na stanje prebave, intra- in interindividualne razlike med preiskovanci in uporaba različnih eksperimentalnih metod za določanje koncentracij hidrogenkarbonata.

Preglednica I: Pregled izločanja hidrogenkarbonata za posamezen del prebavnega trakta za pogoje na tešče. Prikazani so koncentracija hidrogenkarbonata, metoda določanja koncentracije hidrogenkarbonata in literaturni vir.

Del prebavnega trakta	Podana koncentracija [HCO_3^-] (mM)	Metoda	Vir
Želodec	2,3-20	pH/PCO ₂ *	2
	0-15	Ni podatka (več študij)	3
	0 in 10	Ni podatka (več študij)	4
Dvanajstnik	3-20	pH/PCO ₂	14
	6,7	pH/PCO ₂	17
	4-21	Ni podatka	18
	Pred III. fazo MMK: 15,2 Po III. fazi MMK: 35,9	Povratna titracija Povratna titracija	1 1
Jejunum in Ileum	Jejunum: 18,1	Ni podatka	18
	Jejunum: 8,2; Ileum: 30	Ni podatka (več študij)	19
	Jejunum: 2-30; Ileum: 40-75	Ni podatka (več študij)	20
Kolon	15-25	Ni podatka (pregledni članek)	4

* izločanje HCl popolnoma zavrtlo (supresija s cimetidinom)

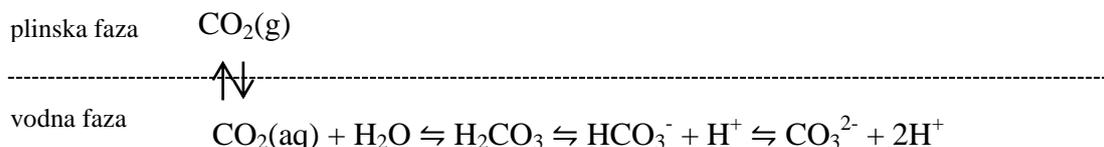
1.2 pH v tankem in debelem črevesu

Vrednosti pH intestinalne tekočine v tankem in debelem črevesu so posledica več različnih faktorjev, kateri so v telesu uravnavani prek številnih kompleksnih mehanizmov. Najpomembnejši od teh faktorjev so stanje presnove, v katerem se telo nahaja, tip in sestava zaužitih hranil ter sekretorno stanje pankreasa, biliarnega trakta in epitelija prebavil. V literaturi je uveljavljeno, da tekom tankega črevesa najdemo nižje vrednosti pH v duodenumu in jejunumu in višje vrednosti pH v terminalnem ileumu. Kljub velikim inter- in intraindividualnim razlikam med izmerjenimi pH, lahko zapišemo okvirne vrednosti pH skozi človeški gastrointestinalni trakt. Tako raziskovalci poročajo o vrednostih pH 4,5-6,5 v dvanajstniku, pH 6-7 v jejunumu, pH 7 v proksimalnem in pH 7,5 v distalnem ileumu za stanje na tešče (21, 22). V primeru meritev ob prisotnosti hrane niso

zaznali večjih razlik, izjema je pH v dvanajstniku ob prihodu želodčnega himusa. Pri prehodu iz tankega črevesa v kolon oz. njegov proksimalen del cekum, se razmere drastično spremenijo. V tem predelu najdemo povečano število bakterij, ki skrbijo za metabolizem beljakovin in ogljikovih hidratov iz hrane. Produkt fermentacije ogljikovih hidratov so kratkoverižne maščobne kisline, najpogosteje v obliki soli acetata, propionata in butirata. Zaradi bakterij kolona so vrednosti pH v proksimalnem kolonu nižje in bolj spremenljive od tistih v terminalnem ileumu. Nahajajo se v območju med pH 5,5 in pH 7,8 (21). Povprečje izmerjenih vrednosti iz večjega števila študij znaša pH 6,4 za proksimalni kolon in pH 7,0 za distalni kolon (23). Tekom kolona pH narašča zaradi nevtralizacije kratkoverižnih maščobnih kislin in manjšega števila prisotnih bakterij v distalnem kolonu (21).

1.3 Dinamično ravnotežje hidrogenkarbonatnega pufrskega sistema in njegova povezava z *in vitro* testi sproščanja

Dinamično ravnotežje hidrogenkarbonatnega pufrskega sistema najlažje opišemo z naslednjo shemo:



V prebavnem traktu v ravnotežju prevladujeta ogljikova kislina (H_2CO_3) in hidrogenkarbonatni ioni (HCO_3^-). H_2CO_3 je šibka kislina ($\text{pK}_a=6,1$), ki se spontano tvori pri raztapljanju ogljikovega dioksida (CO_2) v vodi in nato disociira do hidrogenkarbonatnega iona in protona. Nadaljnja ionizacija hidrogenkarbonata z nastankom karbonata (CO_3^{2-}) s $\text{pK}_{a2}=9,9$ pa v fizioloških pogojih nima večjega pomena (20).

Kot omenjeno je mnogo literaturnih podatkov o koncentraciji hidrogenkarbonata izračunanih na predpostavki dinamičnega ravnotežja, ki se vzpostavlja med $\text{CO}_2(\text{g})$ in HCO_3^- , s t.i. pH/ PCO_2 metodo določanja hidrogenkarbonata. V testih sproščanja se povezava med $\text{CO}_2(\text{g})$ in HCO_3^- izkaže za pomembno. Ohranjanje konstantnega parcialnega tlaka CO_2 nad raztopino namreč služi kot metoda, s katero je možno vzdrževati stalno koncentracijo hidrogenkarbonata v raztopini. Hkrati pa s tem dosežemo, da se pH

raztopine ne spreminja. Vrednost $PCO_2(g)$ in koncentracija $CO_2(aq)$ sta povezana prek enačbe (1).

$$K_H = \frac{[CO_2(aq)]}{PCO_2} \text{ enačba (1)}$$

* K_H - Henryjeva konstanta, za ogljikov dioksid pri 37° C znaša 0,024 (14)

$[CO_2(aq)]$ - koncentracija raztopljenega ogljikovega dioksida

PCO_2 - parcialni tlak ogljikovega dioksida nad raztopino

Enačba (2) pa povezuje koncentracijo hidrogenkarbonata v raztopini s tlakom $CO_2(g)$ nad raztopino.

$$[HCO_3^-] = \frac{K_a K_H PCO_2}{[H^+]} \text{ enačba (2)}$$

* $[HCO_3^-]$ - koncentracija hidrogenkarbonatnih ionov v raztopini

K_a - celokupna konstanta disociacije, pri 37° C znaša $4,3 \times 10^{-7}$ (14)

K_H - Henryjeva konstanta, za ogljikov dioksid pri 37° C znaša 0,024 (14)

PCO_2 - parcialni tlak ogljikovega dioksida nad raztopino

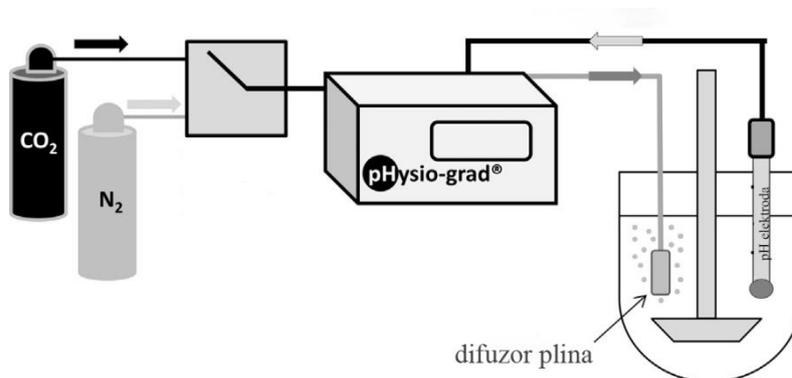
$[H^+]$ - koncentracija vodikovih ionov v raztopini

1.4 Stabilizacija pH hidrogenkarbonatnega pufra

Navkljub prevladujoči vlogi hidrogenkarbonatnega pufra v črevesju so rutinski testi sproščanja v tem pufu zaenkrat še omejeni. Vzrok leži v termodinamski nestabilnosti pufra, ki jo povzroča spontano izhajanje CO_2 iz raztopine, kar ima za posledico nekontrolirano rast pH. Če želimo zagotoviti stabilno koncentracijo hidrogenkarbonata v raztopini in s tem stabilen pH raztopine, se tega lahko lotimo na dva načina. Lahko preprečimo uhajanje $CO_2(g)$ iz sistema ali kontinuirano dovajamo $CO_2(g)$ v raztopino, tako da s tem vzdržujemo raven $CO_2(aq)$.

Prvi način, preprečitev uhajanja $CO_2(g)$, so v literaturi (24) dosegli z nanosom plasti parafina nad medij za raztapljanje ali s prilagojenimi pokrovi, s katerimi so ustvarili zračno zaporo nad aparaturo za raztapljanje. Obe opisani metodi pri stabilizaciji hidrogenkarbonatnega pufra dajeta primerljive rezultate. Drugi način, stabilizacijo z uvajanjem $CO_2(g)$, lahko dosežemo z dovajanjem različnih mešanic zraka z ogljikovim dioksidom v raztopino. McNamara in sodelavci (20) so v raztopino 0,9% NaCl vpihovali mešanice 5%, 10%, 15% in 20% $CO_2(g)$ in zraka, s čimer so dosegli različne koncentracije hidrogenkarbonata v raztopini. Fadda in sodelavci (24) so za vpihovanje uporabili mešanico 5% $CO_2(g)$ v $N_2(g)$ in vzdrževali želeni pH 7,4. Pomanjkljivost tega načina

vzdrževanja vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufru je v tem, da s posamezno mešanico $\text{CO}_2(\text{g})$ lahko dosežemo le določeno območje pH pufru. Prav tako je pri tej metodi potrebno vseskozi uravnavati pretok $\text{CO}_2(\text{g})$, da zagotovimo, da pH ostaja v določenem tolerančnem območju. V ta namen so Garbacz in sodelavci (25) razvili računalniško podprt avtomatiziran sistem, ki prilagaja količino $\text{CO}_2(\text{g})$, ki ga uvajamo v raztopino glede na pH. S posebej za ta namen razvitim algoritmom in napravo pHysio-stat, ki povezuje pH elektrodo in $\text{CO}_2(\text{g})$ difuzor so dosegli vzdrževanje pH hidrogenkarbonatnega pufru na 0,05 enote natančno v obdobju 12h. V svojem naslednjem raziskovalnem delu so Garbacz in sodelavci (21) nadgradili obstoječ sistem. Algoritemsko voden sistem, v tem primeru poimenovan pHysio-grad, so poleg vira $\text{CO}_2(\text{g})$, povezali še z virom $\text{N}_2(\text{g})$ (slika 1). Sistem temelji na principu, da vpihovanje $\text{N}_2(\text{g})$ pospeši izhajanje $\text{CO}_2(\text{g})$ iz raztopine in s tem povzroči hiter dvig pH, nasprotno pa vpihovanje $\text{CO}_2(\text{g})$ zniža pH raztopine. S tem so dosegli možnost posnemanja GIT profilov pH.



Slika 1: Shematski prikaz pHysio-grad® sistema (25) s ključnimi komponentami.

1.5 Testi sproščanja v hidrogenkarbonatnih pufrih

In vitro metode sproščanja naj bi kar v največji meri posnemale *in vivo* razmere. To je mogoče le z uporabo medijev, ki posnemajo sestavo tekočin vzdolž GIT. V ta namen so raziskovalci razvili več modifikacij hidrogenkarbonatnih pufov, med katerimi sta najpogosteje uporabljena modificiran Krebsov in modificiran Hanksov pufer. Nemodificiran Hanksov pufer dobro posnema ionsko sestavo tekočine v tankem črevesu. Omejitev nemodificiranega Krebsovega in nemodificiranega Hanksovega pufru je njun pH 7,4, ki se razlikuje od povprečnega pH intestinalne tekočine 6,8. Druga težava je pufrna kapaciteta obeh nemodificiranih pufov, ki odstopa od izmerjene kapacitete hidrogenkarbonatnega pufru v tankem črevesu $3,2 \text{ mmol/L}/\Delta\text{pH}$ pri pH 6,8. Pufrna kapaciteta za Krebsov pufer znaša $5,45 \text{ mmol/L}/\Delta\text{pH}$ pri pH 7,4, za Hanksovega pa 1

mmol/L/ Δ pH pri pH 7,4. Liu in sodelavci so se tem problemom izognili z modifikacijo Hanksovega pufru, kjer so z uvajanjem $\text{CO}_2(\text{g})$ znižali pH pufru iz 7,4 na 6,8. S tem se je povečala tudi kapaciteta pufru iz 1 mmol/L/ Δ pH na 3,1 mmol/L/ Δ pH (26).

McNamara in sodelavci (20) so v svojem delu izvajali teste raztapljanja v stabiliziranih hidrogenkarbonatnih pufrih z različnimi koncentracijami HCO_3^- in fosfatnih pufrih s pH 6,8. Preverjali so raztapljanje indometacina, učinkovine iz druge skupine (nizka topnost, visoka permeabilnost) biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema. Za indometacin ($\text{pK}_a=4,17$) so odkrili povezavo med koncentracijo hidrogenkarbonatnih ionov kot bazične komponente in hitrostjo raztapljanja ZU. Višja koncentracija HCO_3^- je pomenila hitrejše raztapljanje indometacina zaradi hitrejšega pretvarjanja neionizirane oblike učinkovine (HA) v ionizirano (A^-), kar ponazarja naslednje ravnotežje: $\text{HA} + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{A}^-$. Raztapljanje v fosfatnem pufru pH 6,8 (50 mM KH_2PO_4 , 22,4 mM NaOH) je bilo hitrejše od raztapljanja v hidrogenkarbonatnih pufrih zaradi višje koncentracije fosfata (50 mM) v primerjavi s koncentracijami hidrogenkarbonatnih ionov (28,8 mM, 19,3 mM, 12,9 mM in 6,4 mM). Fadda in sodelavci (24) so raziskovali sproščanje mesalamina v 24 mM hidrogenkarbonatnem (Krebsov pufer s pH 7,4) in fosfatnem pufru s pH 7,4 (50 mM KH_2PO_4 , 39,5 mM NaOH). Hidrogenkarbonatni pufer so stabilizirali na tri načine: z uvajanjem 5% $\text{CO}_2(\text{g})$ v $\text{N}_2(\text{g})$ v medij, z nanosom plasti parafina nad medij za sproščanje in s prekritjem medija z najlonskim pokrovom. Odkrili so, da ni prišlo do signifikantnih razlik pri sproščanju mesalamina pri vseh treh načinih stabilizacije hidrogenkarbonatnega pufru. Pomembne so tudi njihove ugotovitve o razlikah pri sproščanju v hidrogenkarbonatnem oziroma fosfatnem pufru. Ugotovili so, da zakasnitev sproščanja (t_{lag}) mesalamina iz FO z zakasnjnim sproščanjem znaša 30 min za fosfatni in 3 h za hidrogenkarbonatni pufer, kjer se zadnji podatek za razliko od prvega sklada z *in vivo* pridobljenimi podatki. Zakasnitev sproščanja je opredeljena kot čas začetka sproščanja po prehodu iz kislega medija (0,1 M HCl), v katerem v 120 minutah niso zaznali sproščene učinkovine. Glavna razloga za izmerjeno razliko med zakasnitvenima časoma sta različna koncentracija in vrednosti pK_a obeh pufov. Prav tako so ugotovili, da sproščanje v fosfatnem pufru sledi kinetiki 0. reda, medtem ko za hidrogenkarbonatni pufer to ne velja in tudi tu se je izkazalo, da farmakokinetični profili *in vivo* bolje ustrezajo *in vitro* profilom sproščanja v hidrogenkarbonatnem pufru. Liu in sodelavci (26) so raziskovali sproščanje prednizolona iz farmacevtskih oblik (FO) z gastrorezistentno oblogo, pri čemur so izdelali več tablet z različnim polimeri (PVAP, CAP, Eudragit L100-55, Eudragit L100, HP-55,

HP-50). Pokazali so, da so profili sproščanja v hidrogenkarbonatnem pufru signifikantno različni za posamezno FO, medtem ko v fosfatnem pufru to ne velja. Hkrati so ugotovili boljše ujemanje profilov sporočanja v hidrogenkarbonatnem pufru z *in vivo* podatki v primerjavi s fosfatnim pufrom. Tudi Garbacz in sodelavci (21) so potrdili izsledke prejšnjih študij (24, 26) o daljši zakasnitvi sproščanja učinkovine iz FO z zakasnjanim sproščanjem v hidrogenkarbonatnih pufrih glede na fosfatne pufre. Pokazali so, da v primeru sproščanja FO z gastrozistentno oblogo (Nexium®) pride do daljše zakasnitve sproščanja v hidrogenkarbonatnih kot v fosfatnih pufrih. Teorija (Brønstedov katalizni zakon), ki pojasnjuje izmerjeno razliko, stoji na predpostavki, da pKa in predvsem koncentracija medija za raztapljanje vplivata na ionizacijo polimerov iz obloge in s tem na hitrost njihovega raztapljanja. V vseh naštetih študijah (20, 21, 24, 26) je bila uporabljena koncentracija hidrogenkarbonatnih pufrov nižja od fosfatnih, kar pojasni manjšo hitrost raztapljanja ogrodnih polimerov in s tem zakasnitev sproščanja učinkovine v prvih.

1.6 Prednosti in slabosti uporabe hidrogenkarbonatnih pufrov pri testih sproščanja

Zapišemo lahko, da termodinamska nestabilnost hidrogenkarbonatnih pufrov predstavlja njihovo veliko pomanjkljivost pri uporabi v testih sproščanja. Po drugi strani lahko to slabost vidimo tudi kot njihovo prednost, saj nam omogoča enostavnejše posnemanje dinamičnih sprememb intraluminalnih vrednosti pH in koncentracij tekočin v človeškem telesu, kot opisano v poglavju 1.1 in literaturi (21). Druga velika prednost testov sproščanja v hidrogenkarbonatnem pufru je v tem, da gre za fiziološki pufer, z uporabo katerega postane naš sistem bolj biorelevanten. K puferski kapaciteti v črevesju resda prispevajo še žolčne soli, beljakovine, ogljikovi hidrati in ostale sestavine v hrani, a v bistveno manjši meri kot hidrogenkarbonat, ki se sprošča iz pankreasa in epitelijskega gastrointestinalnega trakta (21).

Vseeno pa obstaja nekaj pomanjkljivosti oziroma razlogov, zakaj hidrogenkarbonatnih pufrov v testih sproščanja rutinsko še ne uporabljamo. Fadda in sodelavci (24) so pri stabilizaciji pufru s parafinskim oljem predpostavili, da lahko pride do raztapljanja lipofilne učinkovine v parafinski plasti, kar vpliva na rezultat sproščanja. Boni in sodelavci (27) so opazili visoko variabilnost med rezultati sproščanja v hidrogenkarbonatnem pufru med posameznimi paralelkami. Slabo ponovljivost meritev so pripisali tvorbi mehurčkov ob uvajanju CO₂(g) v medij za sproščanje. Tvorba in potovanje mehurčkov v mediju sta

spremenila hidrodinamiko z nastankom turbulentnega toka in na ta način povečala strižno silo tekočine na tableto. Po drugi strani pa je v primeru, da je prišlo do adhezije mehurčkov na površino FO, prišlo tudi do delovanja sile vzgona na tableto in možnosti, da se ta dvigne na površino. Ugotovili so tudi, da v primeru uporabe USP aparata I mehurčki, ki se naberejo na košari, v manjši meri preprečujejo sproščanje in vodijo v nižje izmerjene vrednosti sproščene učinkovine. Vse naštetu pa vodi v slabšo ponovljivost rezultatov. Omenjene težave se do neke mere pojavljajo tudi pri uporabi standardnih pufrov, zato so v ameriški farmakopeji (USP) zasledimo priporočilo, da naj se medij pred uporabo razplini, kar pa v primeru hidrogenkarbonatnega pufra seveda ni mogoče (27). V omenjeni študiji so težave rešili z uvajanjem $\text{CO}_2(\text{g})$ nad raztopino namesto v njo in tako ohranjali konstanten parcialen tlak $\text{CO}_2(\text{g})$ nad raztopino. V nekaterih drugih študijah (24, 26) so uvajali $\text{CO}_2(\text{g})$ tik pod gladino (do 3 cm) medija in s tem omejili vpliv mehurčkov na hidrodinamske sile v mediju za sproščanje. Naslednja težava, na katero so Boni in sodelavci (27) naleteli, je penjenje, ki ga je povzročilo uvajanje $\text{CO}_2(\text{g})$ v medij z dodanimi žolčnimi kislinami in lecitinom, da bi bolje posnemali sestavo črevesnega medija. Dodane žolčne kisline se namreč obnašajo kot površinsko aktivne snovi in s tem omogočijo nastanek pene, kar oteži pripravo hidrogenkarbonatnih pufrov. V omenjeni študiji tako zaključijo, da je priprava hidrogenkarbonatnega pufra zahtevna, rezultati sproščanj pa slabo ponovljivi, kar pomeni, da hidrogenkarbonatni pufri zaenkrat še niso primerni za rutinsko rabo v testih sproščanja.

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je simulacija profila pH gastrointestinalnega trakta s hidrogenkarbonatnim pufrom. Do sedaj je bila na naši ustanovi ustaljena praksa simulacija pH profilov s fosfatnimi pufri, v tej magistrski nalogi pa se bomo osredotočili na hidrogenkarbonatne pufre, ki bolj posnemajo fiziološke pogoje.

Hidrogenkarbonatni pufri se zaradi svoje osnovne lastnosti – ravnotežja med $\text{CO}_2(\text{aq})/\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ izkažejo za nestabilen sistem, kjer izhajanje $\text{CO}_2(\text{g})$ povzroči rast vrednosti pH pufra. V tej nalogi bomo poskušali predvideti hitrost in trende te rasti. Meritve bomo izvajali pod različnimi pogoji, pri čemer bomo raziskovali naraščanje vrednosti pH pri različnih hitrostih mešanja in metodah stabilizacije hidrogenkarbonatnega pufra. Pri našem delu bomo poskušali ugotoviti, ali se lahko na prvi pogled problematično dviganje vrednosti pH izkaže tudi kot prednost pri simulaciji profila pH, kot so poročali v nekaterih študijah (21, 24, 26). Naslednji cilj te magistrske naloge je simulirati profil pH, izbran izmed individualnih *in vivo* profilov pH gastrointestinalnega trakta in ob tem zagotoviti ponovljivost simulacije. Dinamično ravnotežje med hidrogenkarbonatnimi ioni, ogljikovo kislino in ogljikovim dioksidom (raztopljenim in plinastim) namreč oteži ponovljivost poskusov s hidrogenkarbonatnimi pufri (27), zato je zagotavljanje ponovljivosti na tem mestu še toliko pomembnejše. Hkrati bomo poskušali profil pH simulirati na način, katerega izvedba v praksi ne bo zahtevna. Hidrogenkarbonatni pufri namreč zaradi svojih lastnosti zahtevajo pripravo tik pred njihovo uporabo, zato se bomo pri našem delu trudili, da bo uporabljeno število pufrov najmanjše še sprejemljivo za doseg ustreznih simulacij. V drugem delu magistrske naloge bomo izvajali sproščanja učinkovine iz HPMC tablet z natrijevim diklofenakatom. Sproščanja bomo izvajali na modelih z razvitimi pH profili na pretočnem sistemu s kroglicami, ki dobro ponazarja gibanje in obremenitve v človeškem prebavnem traktu. Cilj je razviti sistem, v katerem bo izvedba testov sproščanja preprosta, ponovljiva in bolj biorelevantna.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI in APARATURE

3.1.1 Kemikalije in laboratorijska oprema

- Snovi, ki smo jih uporabljali pri delu:
 - raztopina Tritisol®, za pripravo 1 L 1 M natrijevega hidroksida (NaOH), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - raztopina Tritisol®, za pripravo 1 L 1 M klorovodikove kisline (HCl), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃) p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - natrijev acetat trihidrat, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - brezvodna očetna kislina, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - pufrna raztopina pH = 4,00 (20°C), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - pufrna raztopina pH = 7,00 (20°C), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
 - parafinsko olje, Pharmachem s.p., Ljubljana, Slovenija
 - natrijev diklofenakat (Na-DF) p.a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 - hidroksipropil metilceluloza (HPMC) Metolose 90SH- 4000SR, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japonska
- Laboratorijska oprema, ki smo jih uporabljali pri delu:
 - laboratorijska steklovina: čaše, merilni valji, epruvete, tehtiči
 - spatule, žličke, plastične kapalke, plastične 10 mL brizge
 - terilnica, pestilo
 - bakrena žica, lepilni trak
 - membranski filtri iz regenerirane celuloze z velikostjo por 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija

3.1.2 Aparature

- Pretočni sistem za izvajanje testov sproščanja:
 - peristaltična črpalka IKA® -WERKE ISM817, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
 - magnetno mešalo z možnostjo gretja IKA®-RET control/t, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
 - magnetno mešalo z možnostjo gretja IKA®-RET control-visc, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
 - 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
 - steklene kroglice s premerom 1 mm
 - kovinska mrežica z velikostjo odprtin 500 µm
 - polipropilenski pokrov za delovno čašo z odprtinami za pH-meter in cevke
 - steklena kristalizirka (vodna kopel)
 - steklena kristalizirka (uporabljena kot čaša za dovajanje)
 - 150 mL delovna čaša
 - čaše za dovajanje (200 mL, 250 mL, 600 mL, 1 L)
 - večji okrogli magnet, dolžina 50 mm, premer 8 mm (uporabljen v delovni čaši in v čašah, v kateri smo izvajali mešanje medija v preliminarnih poskusih)
 - večji trikotni magnet, dolžina 44mm (uporabljen v kristalizirki v poskusih, kjer kristalizirka predstavlja čašo za dovajanje)
- Ostalo:
 - UV/VIS Spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, Združene Države Amerike
 - tabletirka na udarec, Killian SP300, KILLIAN Tableting GmbH, Cologne Nemčija
 - precizna tehtnica Exacta 300EB, Železniki, Slovenija
 - analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Schwarzenbach, Švica
 - avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
 - pH meter Mettler Toledo MP 220, Schwarzenbach, Švica
 - pH meter MA 57590, Iskra, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Priprava hidrogenkarbonatnih pufrov

V magistrski nalogi smo se odločili za uporabo 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru. Hidrogenkarbonatni pufer smo pripravili tako, da smo najprej natehtali potrebno količino natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) in ga z mešanjem raztopili v manjšem volumnu prečiščene vode. Za pripravo 100 mL pufru smo tako natehtali 420,2 mg NaHCO_3 , kjer je pH dobljene raztopine znašal 8,3. Želeni pH smo nato dosegli z dodatkom 0,1 M HCl. Za izdelavo 200 mL pufru s pH 6,0, ki smo ga nato uporabljali pri izvedbi vseh preliminarnih poskusov, smo v manjšem volumnu raztopili 840,4 mg NaHCO_3 , dodali 70 mL 0,1 M HCl in dopolnili s prečiščeno vodo do 200 mL oznake v bučki. Zatem smo bučko s pufrom dvakrat obrnili in vsebino bučke prelili v čašo, v kateri smo pufru merili pH. V primerih poskusov simulacije profila pH in primerih poskusov sproščanja smo vsebino bučke prelili v čašo za dovajanje. Količina dodane 0,1 M HCl za hidrogenkarbonatne pufre, ki smo jih uporabili v poskusih simulacije profila pH, je prikazana v preglednici II. Za izračun pH smo uporabili Henderson-Hasselbalchovo enačbo, kjer vrednost pK_a za ogljikovo kislino zanaša 6,37 pri 37°C. Tri od navedenih pufrov smo nato uporabili v poskusih sproščanja in jim zato dodali ustrezno oznako.

Preglednica II: Za posamezni hidrogenkarbonatni pufer, uporabljen v poskusih simulacije profila pH ali v poskusih sproščanja so prikazani oznaka pufru, volumen pripravljene pufru (mL), natehta NaHCO_3 (mg), dodatek 0,1 M HCl (mL) za doseg želenega pH hidrogenkarbonatnega pufru pri sobni temperaturi – vrednost pH je bila merjena 2 minuti po pripravi pufru, izračunan pH, izmerjen pH in uporabljena čaša za dovajanje. Podane vrednosti izmerjenih pH so povprečja treh meritev.

Hidrogenkarbonatni pufer	Oznaka pufru	V pufru (mL)	Natehta NaHCO_3 (mg)	Dodatek 0,1 M HCl (mL)	Izračunan pH	Izmerjen pH	Uporabljena čaša za dovajanje
Hidrogenkarbonatni pufer 1 (50 mM)	HP1	200	840	80,0	5,76	5,65	250 mL visoka čaša
Hidrogenkarbonatni pufer 2 (50 mM)	HP2	250	1050,5	70,0	6,26	6,20	Kristalizirka
Hidrogenkarbonatni pufer 3 (50 mM)	HP3	500	2101	33,0	7,18	7,10	600 mL čaša
50 mM NaHCO_3 pH = 6,0	/	200	840	70,0	6,00	5,95	250 mL čaša
50 mM NaHCO_3 pH = 6,3	/	100	420	25,5	6,35	6,27	250 mL visoka čaša
50 mM NaHCO_3 pH = 6,7	/	100	420	13,4	6,81	6,73	250 mL visoka čaša
50 mM NaHCO_3 pH	/	100	420	12,0	6,87	6,80	250 mL

= 6,8							visoka čaša
50 mM NaHCO ₃ pH = 6,9	/	100	420	10,2	6,96	6,89	250 mL visoka čaša
50 mM NaHCO ₃ pH = 7,2	/	500	2101	26,5	7,30	7,23	600 mL čaša
50 mM NaHCO ₃ pH = 7,4	/	500	2101	20,0	7,43	7,36	600 mL čaša
50 mM NaHCO ₃ pH = 6,5	/	250	1050,5	50,0	6,54	6,47	250 mL čaša
50 mM NaHCO ₃ pH = 6,1	/	250	1050,5	73,0	6,22	6,14	Kristalizirka
50 mM NaHCO ₃ pH = 6,25	/	250	1050,5	65,0	6,33	6,25	Kristalizirka

3.2.2 Priprava acetatnih pufrov

Za ponazoritev razmer v kolonu smo uporabili acetatne pufre različnih koncentracij in očetno kislino. Z uporabo 0,1 M očetne kisline smo posnemali padec pH pri prehodu iz ileuma v cekum. Po padcu smo vzdrževali želen pH s pomočjo 0,2 M in 0,1 M acetatnih pufrov.

- Očetno kislino s koncentracijo 0,1 M smo pripravili tako, da smo v 1 L bučko nalili manjšo količino prečiščene vode, dodali 5,27 mL brezvodne očetne kisline in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- Očetno kislino s koncentracijo 0,2 M smo pripravili tako, da smo v 1 L bučko nalili manjšo količino prečiščene vode, dodali 10,52 mL brezvodne očetne kisline in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- Natrijev acetat s koncentracijo 0,1 M smo pripravili tako, da smo natehtali 13,61 g Na-acetata trihidrata ter ga raztopili v 1 L prečiščene vode.
- Natrijev acetat s koncentracijo 0,2 M smo pripravili tako, da smo natehtali 27,22 g Na-acetata trihidrata ter ga raztopili v 1 L prečiščene vode.
- Acetatne pufre smo izdelali z mešanjem očetne kisline in Na-acetata v ustreznih razmerjih:
 - 200 mL acetatnega pufra s pH = 6,1 in koncentracijo 0,2 M smo pripravili tako, da smo v 200 mL bučko odmerili 8,74 mL 0,2 M očetne kisline in dopolnili z 0,2 M Na-acetatom do oznake.
 - 200 mL acetatnega pufra s pH = 6,4 in koncentracijo 0,1 M smo pripravili tako, da smo v 200 mL bučko odmerili 4,48 mL 0,1 M očetne kisline in dopolnili z 0,1 M Na-acetatom do oznake.

- 200 mL acetatnega pufra s $\text{pH} = 5,6$ in koncentracijo 0,2 M smo pripravili tako, da smo v 200 mL bučko odmerili 25,26 mL 0,2 M očetne kisline in dopolnili z 0,2 M Na-acetatom do oznake.

3.2.3 Priprava ostalih raztopin

- 0,1 M NaOH: Za pripravo 1 L 0,1 M raztopine NaOH smo v 1 L bučko odmerili 100 mL NaOH in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- 0,1 M HCl: Za pripravo 1 L 0,1M raztopine HCl smo v 1 L bučko nalili manjšo količino prečiščene vode, dodali 100 mL 1 M HCl ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- 0,01 M HCl: Za pripravo 1 L 0,01M raztopine HCl smo v 1 L bučko nalili manjšo količino prečiščene vode, dodali 10 mL 1 M HCl ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

3.2.4 Priprava umeritvenih premic

Pripravili smo umeritvene premice za medije, v katerih smo merili količino sproščenega diklofenaka. Uporabljeni mediji, ki smo jih uporabili tudi kot slepe raztopine pri merjenju absorbanc v poskusih sproščanja, so prikazani v preglednici IV v poglavju Rezultati. Vse umeritvene premice smo pripravili tako, da smo v 100 mL v bučko natančno natehtali približno 10 mg Na-DF in ga raztopili v ustreznem mediju ter dopolnili do oznake. Tri tako pripravljene raztopine smo redčili, da smo iz njih dobili raztopine s koncentracijami med 1 in 40 mg/L. Razredčenim raztopinam smo izmerili absorbanco pri 276 nm in narisali graf odvisnosti absorbance od koncentracije Na-DF. Z linearno regresijo smo dobili premico, ki se je dobljenim točkam najboljše prilegala – ta predstavlja našo umeritveno krivuljo.

3.2.5 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka

Preliminarne poskuse, v katerih smo spremljali spreminjanje pH v čaši brez pretoka, smo izvajali s 50 mM hidrogenkarbonatnim pufrom s $\text{pH} 6,0$ (izdelava je prikazana v preglednici II) pri sobni temperaturi. Pogoji omenjenih preliminarnih poskusov so prikazani v preglednici III. Pri poskusih, kjer smo hidrogenkarbonatni pufer stabilizirali s pomočjo tanke plasti parafinskega olja, smo uporabili odrezane tulce plastičnih brizg, s čimer smo preprečili, da bi elektroda pH metra prišla v stik s parafinskim oljem.

Preglednica III: Pogoji preliminarnih poskusov, v katerih smo preučevali spreminjanje pH v čaši brez pretoma. Prikazani so model uporabljenega pH metra, volumen medija (mL), premer in deklarirana prostornina čaše, hitrost mešanja (obrti/minuto) in morebitna stabilizacija s tanko plastjo parafinskega olja.

Oznaka poskusa	pH meter	Volumen medija (mL)	Premer čaše in deklarirana prostornina čaše	Hitrost mešanja (obrti/minuto)	Stabilizacija s parafinskim oljem
A1a A1b A1c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	0	NE
B1a B1b B1c	Iskra MA 57590	200	6,7 cm 250 mL	0	NE
C1a C1b C1c	Mettler Toledo MP 220	100	6,7 cm 250 mL	0	NE
D1a D1b	Mettler Toledo MP 220	200	10,3 cm 1 L	0	NE
D2a D2b	Mettler Toledo MP 220	200	10,3 cm 1 L	100	NE
E1a E1b	Mettler Toledo MP 220	200	13,5 cm kristalizirka	0	NE
E2a E2b	Mettler Toledo MP 220	200	13,5 cm kristalizirka	100	NE
BP1a BP1b BP1c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	0	NE
SP1a SP1b SP1c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	0	DA
BP2a BP2b BP2c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	50	NE
SP2a SP2b SP2c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	50	DA
BP3a BP3b BP3c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	70	NE
SP3a SP3b SP3c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	70	DA
BP4a BP4b BP4c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	100	NE
SP4a SP4b SP4c	Mettler Toledo MP 220	200	6,7 cm 250 mL	100	DA

3.2.6 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom

- V poskusih F in G smo v delovno čašo smo ob začetku natehtali 25 g steklenih kroglic in nalili 40 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru s pH 6,0 (izdelava je prikazana v preglednici II).
- V paralelkah G1a-G1c smo za razliko od preliminarnih poskusov, v katerih smo spreminjanje pH spremljali v čaši brez pretoka, pH merili v delovni čaši, kjer je bil vzpostavljen pretok.
- V paralelkah G1a-G1c delovno čašo smo konstantno dovajali hidrogenkarbonatni pufer s pH 6,0 s pretokom 2 ml/minuto in ga z enako hitrostjo iz delovne čaše tudi odvajali, s čimer smo poskrbeli za izmenjavo medija.
- Paralelke poskusa F1 so služile kot primerjava poskusu G1, kjer v paralelkah F1a-F1c pretoka nismo uporabili.

Pogoji preliminarnih poskusov spreminjanja pH v čaši s pretokom so prikazani v preglednici IV.

Preglednica IV: Pogoji preliminarnih poskusov, v katerih smo preučevali spreminjanje pH v čaši s pretokom. Prikazani so model uporabljenega pH metra, volumen medija (mL), temperatura merjenega medija, hitrost mešanja (obrati/minuto) in uporaba pretoka. *čaša za dovajanje ni bila potrebna, saj pretok ni bil vzpostavljen

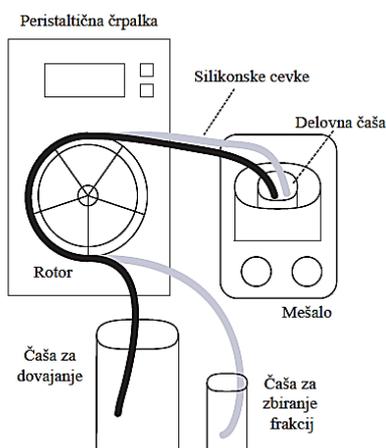
Oznaka poskusa	Volumen medija (mL)	Premer in deklarirana prostornina čaše za dovajanje	Premer in deklarirana prostornina delovne čaše	T medija v čaši za dovajanje	T merjenega medija (v delovni čaši)	Hitrost mešanja (obrati/min)	Pretok (2 mL/min)
F1a F1b F1c	40	/ *	5,7 cm 150 mL	/ *	37 °C	70	NE
G1a G1b G1c	40	6,7 cm 250 mL	5,7 cm 150 mL	21 °C	37 °C	70	DA

3.2.7 Pretočni sistem za simulacijo profila pH in testiranje sproščanja

Simulacijo profila pH in teste sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu s peristaltično črpalko, ki je bil na naši ustanovi že večkrat uporabljen v namene sproščanja s fosfatnimi pufrmi. Tekom naših poskusov smo simulacije in sproščanja izvajali na dveh sistemih, ki sta vsebovala enake komponente. Glavno enoto sistemov predstavlja peristaltična črpalka IKA®-WERKE, ki s pomočjo rotorja skrbi za poganjanje medija po paru silikonskih cevok. Črpalka ima možnost nastavitve hitrosti pretoka in uskladitve pretoka v obeh cevkah prek

moči vpetja le-teh. Kalibracija hitrosti pretoka na 2 mL/min je bila izvedena pred začetkom dela na sistemu. Ena od silikonskih cevk sistema skrbi za pretok medija iz čaše za dovajanje medija v delovno čašo, medtem ko druga cevka črpa medij iz delovne čaše v čašo/valj za zbiranje frakcij (slika 2). Slednja ima na tistem koncu, ki črpa iz delovne čaše, nameščen adapter s kovinsko mrežico, kateri preprečuje črpanje večjih delcev v čašo za zbiranje frakcij. V magistrski nalogi smo cevke pred začetkom simulacij in sproščanj napolnili z 0,01 M HCl oz. začetnim medijem.

V delovno čašo smo ob začetku natehtali 25 g steklenih kroglic in nalili 40 mL začetnega medija. Medij v delovni čaši smo ogreli na 37 °C s pomočjo vodne kopeli v obliki kristalizirke, napolnjene z vodo, ki je obdajala delovno čašo. Hkrati smo poskrbeli za mešanje medija v delovni čaši pri hitrosti 70 obratov/minuto z magnetnim mešalom IKA®-RET. Pri poskusih simulacije profila pH smo v delovni čaši s pH metrom vseskozi merili vrednosti pH.



Slika 2: Shematski prikaz uporabljenega pretočnega sistema s ključnimi komponentami.

3.2.8 Simulacija profila pH

Profil pH, ki smo ga v tej nalogi želeli simulirati, predstavlja individualni *in vivo* profil pH, ki je bil v magistrski nalog (28) izbran izmed literaturnih individualnih *in vivo* profilov pH (podatkov o spreminjanju vrednosti pH v odvisnosti od časa vzdolž gastrointestinalnega trakta). Uporabljeno zaporedje medijev in njihova stabilizacija v čaši za dovajanje za posamezen poskus sta prikazana v preglednici V.

Preglednica V: Menjave pufrov in pogoji simulacije celotnega profila pH. Pogoji v delovni čaši so bili za vse poskuse enaki: mešanje medija pri hitrosti 70 obratov/min, 25 g steklenih kroglic in hitrost pretoka 2mL/min. Okrajšave: HP1 – Hidrogenkarbonatni pufer 1, HP2 – Hidrogenkarbonatni pufer 2, HP3 – Hidrogenkarbonatni pufer 3. *v poskusih P9-P14 smo očetno kislino dodajali direktno v čašo za dovajanje

Oznaka poskusa	Zaporedje uporabljenih medijev v čaši za dovajanje in metode stabilizacije*	Medij v delovni čaši in cevkah ob začetku poskusa
Z1	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min 50 mM NaHCO ₃ (pH = 6,0) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
Z2	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min 50 mM NaHCO ₃ (pH = 6,0) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
Z3	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min 50 mM NaHCO ₃ (pH = 5,7) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
Z4	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min 50 mM NaHCO ₃ (pH = 5,7) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
Z5a	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
Z5b	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
TC1	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-100 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 100 min dalje 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,7	40 mL 0,01 M HCl
TC2	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-100 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 100-130 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,9	40 mL 0,01 M HCl
TC3	5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-100 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 100-130 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,9 130 min dalje 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,7 – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
TC4	5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-100 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 100-130 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,8 130 min dalje 50 mM NaHCO ₃ pH = 7,2 – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
TC5	5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-100 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 100-130 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,8 130 min dalje 50 mM NaHCO ₃ pH = 7,4 – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
TC6	5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-103 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 103-120 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,8	40 mL 0,01 M HCl
TC7a TC7b TC7c	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-103 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,3 103-129 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,9 129 min dalje HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
TC8	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M

	80-130 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,5 109-130 min mešanje pri 70 obratov/min	HCl
TC9	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-105 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,1	40 mL 0,01 M HCl
TC10	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-120 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 6,25 103-120 min mešanje pri 100 obratov/min	40 mL 0,01 M HCl
TC11	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-130 min HP2 (pH = 6,20) 101-130 min mešanje pri 120 obratov/min	40 mL 0,01 M HCl
TC12	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-80 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 80-140 min HP2 (pH = 6,20) 92-140 min mešanje pri 120 obratov/min	40 mL 0,01 M HCl
TC13a TC13b	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ pH = 8,3 5-82 min HP1 (pH = 5,65) – stabilizacija s parafinskim oljem 82-129 min HP2 (pH = 6,20) 92-110 min mešanje pri 120 obratov/min 129 min dalje HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL 0,01 M HCl
P1	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P2	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-75 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P3	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-36 min 0,1 M očetna kislina 36-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P4	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem siol34-36min20s 0,1 M očetna kislina 36min20s-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P5	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-36min40s 0,1 M očetna kislina 36min0s-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P6	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-37 min 0,1 M očetna kislina 37-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,0	40 mL HP3
P7	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 36min40s 0,1 M očetna kislina 36min0s-55 min 0,1 M acetatni pufer pH = 5,9 55-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,3	40 mL HP3
P8	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-39 min 0,05M očetna kislina 39-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 5,7	40 mL HP3
P9	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-52 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,0 37:00 direktni dodatek 5,6mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo 52-75 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,3	40 mL HP3
P10	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-50 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,0 37:00 direktni dodatek 5,6mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo 50-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,3	40 mL HP3
P11	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-75 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,2 37:00 direktni dodatek 4,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	40 mL HP3
P12a	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem	40 mL

P12b P12c	34-50 min 0,2 M acetatni pufer pH = 6,1 37:00 direktni dodatek 4,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo 50-75 min 0,1 M acetatni pufer pH = 6,4	HP3
P13	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-75 min 0,2 M acetatni pufer pH = 5,2 37:00 direktni dodatek 15,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	40 mL HP3
P14a P14b P14c	0-34 min HP3 (pH = 7,10) – stabilizacija s parafinskim oljem 34-75 min 0,2 M acetatni pufer pH = 5,6 37:00 direktni dodatek 13,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	40 mL HP3

Končno simulacijo celotnega profila smo dosegli s sklopitvijo poskusov, prikazanih v preglednici V. Menjave medijev za sproščanje v čaši za dovajanje in pogoji simulacije celotnega profila pH pa so opisani v preglednici VI.

*Preglednica VI: Menjave pufrov in pogoji simulacije celotnega profila pH. Okrajšave: HP1 – Hidrogenkarbonatni pufer 1, HP2 – Hidrogenkarbonatni pufer 2, HP3 – Hidrogenkarbonatni pufer 3. *v poskusih CP1-CP5 smo očetno kislino dodajali direktno v čašo za dovajanje*

Oznaka poskusa	Zaporedje uporabljenih medijev v čaši za dovajanje in metode stabilizacije*	Medij v delovni čaši in cevkah ob začetku poskusa	Pogoji v delovni čaši
CP1	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ 5-82min HP1 (pH = 5,65) – stab. s plastjo parafinskega olja 82-129min HP2 (pH = 6,20) 92-110 min mešanje pri 120 obratov/min 129-284min HP3 (pH = 7,10) – stab. s plastjo parafinskega olja 284-300 min Acetatni pufer 0,2 M pH = 6,1 287min direktni dodatek 4,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo 300-320 min Acetatni pufer 0,1 M pH = 6,4	0,01 M HCl, 40 mL	25g stek. kroglic, mešanje 70 obratov/min, pretok 2mL/min
CP2	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ 45-82min HP1 (pH = 5,65) – stab. s plastjo parafinskega olja 82-129min HP2 (pH = 6,2) 92-100 min mešanje pri 120 obratov/min 129-284min HP3 (pH = 7,1) – stab. s plastjo parafinskega olja 284-320 min Acetatni pufer 0,2 M pH = 5,6 287min direktni dodatek 13,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	0,01 M HCl, 40 mL	25g stek. kroglic, mešanje 70 obratov/min, pretok 2mL/min
CP3	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ 45-82min HP1 (pH = 5,65) – stab. s plastjo parafinskega olja 82-129min HP2 (pH = 6,2) 92-110 min mešanje pri 120 obratov/min 129-284min HP3 (pH = 7,1) – stab. s plastjo parafinskega olja 284-320 min Acetatni pufer 0,2 M pH = 5,6 287min direktni dodatek 12,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	0,01 M HCl, 40 mL	25g stek. kroglic, mešanje 70 obratov/min, pretok 2mL/min
CP4a CP4b CP4c	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ 5-82min HP1 (pH = 5,65) – stab. s plastjo parafinskega olja 82-129min HP2 (pH = 6,20) 92-110 min mešanje pri 120 obratov/min 129-284min HP3 (pH = 7,10) – stab. s plastjo parafinskega olja 284-300 min Acetatni pufer 0,2 M pH = 6,1	0,01 M HCl, 40 mL	25g stek. kroglic, mešanje 70 obratov/min, pretok 2mL/min

	287min direktni dodatek 3,7mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo 300-320 min Acetatni pufer 0,1 M pH = 6,4		
CP5a CP5b CP5c	0-5 min 50 mM NaHCO ₃ 45-82min HP1 (pH = 5,65) – stab. s plastjo parafinskega olja 82-129min HP2 (pH = 6,2) 92-110 min mešanje pri 120 obratov/min 129-284min HP3 (pH = 7,1) – stab. s plastjo parafinskega olja 284-320 min Acetatni pufer 0,2 M pH = 5,6 287min direktni dodatek 11,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo	0,01 M HCl, 40 mL	25g stek. kroglic, mešanje 70 obratov/min, pretok 2mL/min

3.2.9 Izdelava tablet

Tablete z Na-DF smo izdelali s pomočjo tabletirke na udarec Killian SP300. Izdelali smo tablete z maso 400 mg s 25% deležem Na-DF in 75% deležem hidroksipropil metilceluloze Metolose 90SH 4000SR. Natehtali smo obe sestavini in na koncu dodali 0,25% Mg-stearata glede na celotno maso. Homogeno tabletno maso smo tehtali za vsako tableto posebej in vsako tableto posebej stisnili. Pri tabletiranju smo uporabili naslednje nastavitve:

- zgornji pečat: 10,0 mm
- spodnji pečat: 12,3 mm
- sile stiskanja: 14,3-15,4 kN
- trdnost tablet: 108,4-120,2 N

3.2.10 Poskusi sproščanja

Teste sporočanja smo izvajali na istem sistemu in pogojih kot pri poskusih simulacije profila pH (preglednica III). Razliko predstavlja začetno 40 minutno dovajanje 0,01 M HCl, ki smo ga uporabili le v primeru poskusov sproščanja. Tako se vsi časi menjav pufrov v preglednici III za primer sproščanja zamaknejo za 40 minut. Hkrati smo v primeru poskusov sproščanja zbirali vzorce (eluat) sproščene učinkovine. Te smo lovili v 100 mL valje, v katere smo pred začetkom zbiranja nalili 40 mL 0,1 M NaOH. Valje smo menjavali na 20 minut. Pri pretoku 2 mL/min smo po 20 minutah v valj zbrali 40 mL eluata, skupno z 0,1 M NaOH torej 80 mL raztopine. To raztopino smo dobro premešali ter jo nato prefiltrirali skozi membranske filtre iz regenerirane celuloze (0,45µm) ter ji izmerili absorbanco pri 276 nm. Absorbanco smo merili pri 276 nm, ker se tam nahaja maksimum absorpcije diklofenaka. S pomočjo umeritvene premice smo iz absorbanco izračunali količino sproščene učinkovine.

4 REZULTATI

4.1 Umeritvene premice

Izdelali smo umeritvene premice za Na-DF v petih različnih medijih. Enačbe umeritvenih premic so podane v preglednici VII.

Preglednica VII: Enačbe umeritvenih premic. Prikazani so sestava uporabljenega medija, območje merjenih koncentracij v enoti mg/L, enačbe umeritvenih premic (A – absorbance vzorca pri 276 nm; c – koncentracija vzorca v mg/L) in koeficient determinacije (R^2).

Uporabljen medij	Območje koncentracij (mg/L)	Enačba premice	Koeficient determinacije (R^2)
0,01 M HCl + 0,1 M NaOH (1:1)	1,038-36,855	$A = 0,0321c + 0,001$	0,9992
Hidrogenkarbonatni puffer 1 + 0,1 M NaOH (1:1)	1,022-40,880	$A = 0,0331c + 0,0068$	0,9994
Hidrogenkarbonatni puffer 3 + 0,1 M NaOH (1:1)	1,059-42,360	$A = 0,0316c + 0,0102$	0,9996
0,2 M Acetatni puffer pH = 6,1 + 0,1 M NaOH (1:1)	1,026-41,040	$A = 0,0331c + 0,0107$	0,9994
0,2 M Acetatni puffer pH = 5,6 + 0,1 M NaOH (1:1)	1,04-35,665	$A = 0,0315c + 0,0127$	0,9998

4.2 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka

V preliminarnih poskusih, ki so predstavljeni v poglavjih 4.2.1 – 4.2.3 smo želeli predvideti trende in hitrosti naraščanja pH 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra pod različnimi pogoji. Vrednosti pH smo v vseh poskusih merili v čaši brez pretoka, kar pomeni, da pufra nismo vodili skozi pretočni sistem. Vrednosti pH smo začeli meriti po prelitju medija iz bučke v čašo.

4.2.1 Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra

V poskusih A1 in B1 smo pripravili 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra s pH~6 in nato opazovali spreminjanje pH pufra v 250 mL čaši brez mešanja. Uporabili smo dva pH metra različnih proizvajalcev. Rezultati so zbrani v preglednicah VIII in IX.

Preglednica VIII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije v odvisnosti od časa. Merjeno s pH metrom Mettler Toledo MP 220. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	A1a	A1b	A1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,02	6,03	6,00	6,02	0,25
10	6,01	6,03	6,03	6,02	0,19
20	6,02	6,06	6,02	6,03	0,38
30	6,02	6,04	6,04	6,03	0,19
40	6,02	6,06	6,04	6,04	0,33
50	6,04	6,07	6,04	6,05	0,29
60	6,05	6,08	6,05	6,06	0,29
70	6,05	6,08	6,07	6,07	0,25
80	6,05	6,09	6,07	6,07	0,33
90	6,07	6,10	6,08	6,08	0,25
100	6,06	6,10	6,08	6,08	0,33
110	6,08	6,11	6,08	6,09	0,28
120	6,09	6,12	6,10	6,10	0,25
130	6,08	6,14	6,12	6,11	0,50
140	6,11	6,14	6,11	6,12	0,28
150	6,10	6,13	6,12	6,12	0,25

Preglednica IX: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije v odvisnosti od časa. Merjeno s pH metrom Iskra MA 57590. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	B1a	B1b	B1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,99	6,01	6,00	6,00	0,17
10	6,00	6,03	6,02	6,02	0,25
20	6,02	6,04	6,02	6,03	0,19
30	6,03	6,04	6,03	6,03	0,10
40	6,05	6,05	6,03	6,04	0,19
50	6,05	6,06	6,05	6,05	0,10
60	6,07	6,06	6,06	6,06	0,10
70	6,06	6,05	6,05	6,05	0,10
80	6,06	6,06	6,05	6,06	0,10
90	6,06	6,07	6,06	6,06	0,10
100	6,07	6,08	6,07	6,07	0,10
110	6,07	6,08	6,07	6,07	0,10
120	6,09	6,10	6,06	6,08	0,34
130	6,09	6,09	6,08	6,09	0,09
140	6,10	6,10	6,09	6,10	0,09
150	6,11	6,11	6,10	6,11	0,09

V paralelkah C1a-C1c smo spremljali naraščanje pH 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra s 100 mL medija v 250 mL čaši brez mešanja. Rezultati so podani v preglednici X.

Preglednica X: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije v odvisnosti od časa za 100 mL medija. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	C1a	C1b	C1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,01	6,00	6,01	6,01	0,10
10	6,06	6,05	6,05	6,05	0,10
20	6,05	6,07	6,08	6,07	0,25
30	6,05	6,04	6,09	6,06	0,44
40	6,05	6,05	6,07	6,06	0,19
50	6,05	6,04	6,07	6,05	0,25
60	6,04	6,05	6,07	6,05	0,25
70	6,05	6,06	6,09	6,07	0,34
80	6,04	6,05	6,09	6,06	0,44
90	6,06	6,07	6,10	6,08	0,34
100	6,08	6,09	6,10	6,09	0,16
110	6,07	6,07	6,12	6,09	0,47
120	6,07	6,08	6,11	6,09	0,34
130	6,06	6,07	6,15	6,09	0,81
140	6,09	6,09	6,14	6,11	0,47
150	6,09	6,14	6,15	6,13	0,52

4.2.2 Vpliv premera čaše in mešanja medija na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru

V poskusih D1 in D2 ter E1 in E2 smo želeli ugotoviti naraščanje pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru v čašah različnih volumnov in premerov. V vsaki od različnih čaš smo poskuse izvajali za primer brez mešanja in za primer z mešanjem pri hitrosti 100 obratov/minuto. Rezultati so podani v preglednicah XI-XIV.

Preglednica XI: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru brez stabilizacije v čaši prostornine 1 L brez mešanja. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	D1a	D1b	povp.	RSD (%)
	pH	pH		
0	6,00	5,99	6,00	0,12
10	6,01	6,05	6,03	0,47
20	6,04	6,08	6,06	0,47
30	6,08	6,11	6,10	0,35
40	6,12	6,12	6,12	0,00
50	6,14	6,12	6,13	0,23
60	6,15	6,14	6,15	0,12
70	6,16	6,15	6,16	0,11
80	6,19	6,18	6,19	0,11
90	6,21	6,19	6,20	0,23
100	6,23	6,22	6,23	0,11
110	6,24	6,24	6,24	0,00
120	6,26	6,25	6,26	0,11

Preglednica XII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru brez stabilizacije v čaši prostornine 1 L z mešanjem pri hitrosti 100 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	D2a	D2b	povp.	RSD (%)
	pH	pH		
0	5,92	5,95	5,94	0,36
10	6,10	6,12	6,11	0,23
20	6,25	6,28	6,27	0,34
30	6,42	6,43	6,43	0,11
40	6,57	6,58	6,58	0,11
50	6,71	6,73	6,72	0,21
60	6,86	6,88	6,87	0,21
70	7,00	7,02	7,01	0,20
80	7,15	7,16	7,16	0,10
90	7,31	7,29	7,30	0,19
100	7,45	7,43	7,44	0,19
110	7,60	7,58	7,59	0,19
120	7,73	7,71	7,72	0,18

Preglednica XIII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru v kristalizirki brez mešanja. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povp. in RSD.

Čas (min)	E1a	E1b	povp.	RSD (%)
	pH	pH		
0	5,98	5,98	5,98	0,00
10	6,05	6,08	6,07	0,35
20	6,15	6,20	6,18	0,57
30	6,20	6,25	6,23	0,57
40	6,24	6,24	6,24	0,00
50	6,27	6,25	6,26	0,23
60	6,24	6,26	6,30	0,23
70	6,33	6,34	6,34	0,11
80	6,38	6,34	6,36	0,44
90	6,40	6,41	6,41	0,11
100	6,46	6,50	6,48	0,44
110	6,52	6,55	6,54	0,32
120	6,59	6,56	6,58	0,32

Preglednica XIV: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru v kristalizirki z mešanjem pri hitrosti 100 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povp. in RSD.

Čas (min)	E2a	E2b	povp.	RSD (%)
	pH	pH		
0	5,95	5,96	5,96	0,12
10	6,28	6,27	6,28	0,11
20	6,56	6,55	6,56	0,11
30	6,85	6,85	6,85	0,00
40	7,14	7,11	7,13	0,30
50	7,40	7,38	7,39	0,19
60	7,60	7,67	7,64	0,65
70	7,93	7,91	7,92	0,18
80	8,12	8,10	8,11	0,17
90	8,27	8,24	8,26	0,26
100	8,34	8,33	8,34	0,08
110	8,43	8,42	8,43	0,08
120	8,49	8,48	8,49	0,08

4.2.3 Vpliv različnih hitrostih mešanja in stabilizacije s plastjo parafinskega olja na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra

V poskusih BP1-12 in SP1-12 smo spremljali naraščanje pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra v 250 mL čaši glede na prisotnost plasti parafinskega olja na površini medija. Druga spremenljivka v poskusih je bila hitrost mešanja medija. Uporabili smo naslednje hitrosti mešanja: 0 obratov/min, 50 obratov/min, 70 obratov/min in 100 obratov/min. Rezultati so podani v preglednicah XV-XXII.

Preglednica XV: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije pri hitrosti mešanja 0 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	BP1a	BP1b	BP1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,02	6,03	6,00	6,02	0,25
10	6,01	6,03	6,03	6,02	0,19
20	6,02	6,06	6,02	6,03	0,38
30	6,02	6,04	6,04	6,03	0,19
40	6,02	6,06	6,04	6,04	0,33
50	6,04	6,07	6,04	6,05	0,29
60	6,05	6,08	6,05	6,06	0,29
70	6,05	6,08	6,07	6,07	0,25
80	6,05	6,09	6,07	6,07	0,33
90	6,07	6,10	6,08	6,08	0,25
100	6,06	6,10	6,08	6,08	0,33
110	6,08	6,11	6,08	6,09	0,28
120	6,09	6,12	6,10	6,10	0,25
130	6,08	6,14	6,12	6,11	0,50
140	6,11	6,14	6,11	6,12	0,28
150	6,10	6,13	6,12	6,12	0,25

Preglednica XVI: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra, stabiliziranega s plastjo parafinskega olja pri hitrosti mešanja 0 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	SP1a	SP1b	SP1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,99	6,02	5,99	6,00	0,29
10	5,99	6,00	6,01	6,00	0,17
20	6,00	6,02	6,03	6,02	0,25
30	6,00	6,02	6,03	6,02	0,25
40	6,01	6,04	6,03	6,03	0,25
50	6,00	6,03	6,02	6,02	0,25
60	6,01	6,02	6,02	6,02	0,10
70	6,02	6,03	6,02	6,02	0,10
80	6,01	6,02	6,02	6,02	0,10
90	6,00	6,01	6,02	6,01	0,17
100	5,99	6,00	6,00	6,00	0,10
110	6,00	6,01	5,99	6,00	0,17
120	5,99	6,01	6,00	6,00	0,17
130	6,00	6,02	6,00	6,01	0,19
140	6,00	6,02	6,01	6,01	0,17
150	6,01	6,03	6,01	6,02	0,19

Preglednica XVII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije pri hitrosti mešanja 50 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelk ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	BP2a	BP2b	BP2c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,94	5,92	5,91	5,92	0,26
10	5,98	5,96	5,95	5,96	0,26
20	6,03	6,01	6,01	6,02	0,19
30	6,07	6,07	6,08	6,07	0,10
40	6,13	6,12	6,12	6,12	0,09
50	6,18	6,11	6,17	6,15	0,62
60	6,24	6,21	6,22	6,22	0,25
70	6,29	6,28	6,28	6,28	0,09
80	6,36	6,35	6,35	6,35	0,09
90	6,41	6,40	6,40	6,40	0,09
100	6,46	6,44	6,45	6,45	0,16
110	6,50	6,49	6,49	6,49	0,09
120	6,54	6,56	6,56	6,55	0,18
130	6,59	6,59	6,60	6,59	0,09
140	6,63	6,64	6,65	6,64	0,15
150	6,68	6,67	6,69	6,68	0,15

Preglednica XIX: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije pri hitrosti mešanja 70 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelk ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	BP3a	BP3b	BP3c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,94	5,92	5,93	5,93	0,17
10	5,99	5,98	5,98	5,98	0,10
20	6,05	6,04	6,04	6,04	0,10
30	6,10	6,09	6,09	6,09	0,09
40	6,15	6,15	6,15	6,15	0,00
50	6,21	6,21	6,22	6,21	0,09
60	6,28	6,29	6,29	6,29	0,09
70	6,33	6,33	6,33	6,33	0,00
80	6,37	6,38	6,38	6,38	0,09
90	6,45	6,44	6,44	6,44	0,09
100	6,50	6,50	6,51	6,50	0,09
110	6,55	6,56	6,56	6,56	0,09
120	6,60	6,61	6,61	6,61	0,09
130	6,67	6,68	6,69	6,68	0,15
140	6,71	6,73	6,74	6,73	0,23
150	6,78	6,79	6,80	6,79	0,15

Preglednica XVIII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra, stabiliziranega s plastjo parafinskega olja pri hitrosti mešanja 50 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelk ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	SP2a	SP2b	SP2c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,97	5,97	5,96	5,97	0,10
10	5,97	5,96	5,96	5,96	0,10
20	5,98	5,98	5,97	5,98	0,10
30	5,99	5,99	5,99	5,99	0,00
40	5,99	5,99	5,99	5,99	0,00
50	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00
60	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00
70	6,01	6,00	6,01	6,01	0,10
80	6,02	6,01	6,02	6,02	0,10
90	6,02	6,02	6,01	6,02	0,10
100	6,02	6,02	6,02	6,02	0,00
110	6,03	6,03	6,03	6,03	0,00
120	6,04	6,03	6,03	6,03	0,10
130	6,03	6,04	6,03	6,03	0,10
140	6,03	6,04	6,04	6,04	0,10
150	6,04	6,04	6,04	6,04	0,00

Preglednica XX: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra, stabiliziranega s plastjo parafinskega olja pri hitrosti mešanja 70 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelk ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	SP3a	SP3b	SP3c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,00	6,00	5,98	5,99	0,19
10	5,98	5,99	5,99	5,99	0,10
20	6,00	5,99	5,99	5,99	0,10
30	6,01	5,99	6,00	6,00	0,17
40	6,00	6,01	6,02	6,01	0,17
50	6,02	6,02	6,02	6,02	0,00
60	6,03	6,04	6,03	6,03	0,10
70	6,03	6,04	6,02	6,03	0,17
80	6,03	6,03	6,03	6,03	0,00
90	6,04	6,04	6,03	6,04	0,10
100	6,04	6,04	6,04	6,04	0,00
110	6,04	6,05	6,04	6,04	0,10
120	6,05	6,06	6,05	6,05	0,10
130	6,06	6,06	6,06	6,06	0,00
140	6,06	6,07	6,06	6,06	0,10
150	6,07	6,07	6,07	6,07	0,00

Preglednica XXI: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije pri hitrosti mešanja 100 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	BP4a	BP4b	BP4c	povp	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	5,94	5,93	5,93	5,93	0,10
10	6,00	6,03	6,02	6,02	0,25
20	6,06	6,09	6,09	6,08	0,28
30	6,13	6,16	6,16	6,15	0,28
40	6,19	6,20	6,19	6,19	0,09
50	6,24	6,25	6,26	6,25	0,16
60	6,30	6,30	6,32	6,31	0,18
70	6,35	6,37	6,37	6,36	0,18
80	6,41	6,43	6,43	6,42	0,18
90	6,47	6,48	6,49	6,48	0,15
100	6,52	6,53	6,54	6,53	0,15
110	6,58	6,60	6,61	6,60	0,23
120	6,64	6,65	6,66	6,65	0,15
130	6,70	6,70	6,72	6,71	0,17
140	6,75	6,76	6,78	6,76	0,23
150	6,80	6,82	6,84	6,82	0,29

Preglednica XXII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra, stabiliziranega s plastjo parafinskega olja pri hitrosti mešanja 100 obratov/minuto. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	SP4a	SP4b	SP4c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,01	5,98	5,99	5,99	0,25
10	5,98	5,99	5,99	5,99	0,10
20	6,00	6,01	6,01	6,01	0,10
30	6,00	6,03	6,02	6,02	0,25
40	6,01	6,04	6,03	6,03	0,25
50	6,02	6,05	6,04	6,04	0,25
60	6,03	6,05	6,05	6,04	0,19
70	6,04	6,06	6,06	6,05	0,19
80	6,05	6,07	6,07	6,06	0,19
90	6,05	6,07	6,07	6,06	0,19
100	6,06	6,08	6,08	6,07	0,19
110	6,06	6,09	6,09	6,08	0,28
120	6,07	6,09	6,10	6,09	0,25
130	6,07	6,10	6,10	6,09	0,28
140	6,08	6,10	6,10	6,09	0,19
150	6,08	6,11	6,11	6,10	0,28

4.3 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom

V poskusih F1 in G1 smo spremljali naraščanje pH 40 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra v delovni čaši za primera brez in s pretokom. V paralelkah F1a-F1c v delovno čašo nismo dovajali hidrogenkarbonatnega pufra, medtem ko smo v paralelkah G1a-G1c v delovno čašo dovajali pufer s pretokom 2 ml/min. Pogoji poskusov so podani v poglavju 3.2, rezultati pa v preglednicah XXIII in XXIV.

Preglednica XXIII: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra brez pretoka pri hitrosti mešanja 70 obratov/minuto in temperaturi medija 37 °C. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	F1a	F1b	F1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,00	6,01	5,94	5,98	0,63
10	6,35	6,36	6,41	6,37	0,50
20	6,68	6,73	6,73	6,71	0,43
30	7,02	7,02	7,09	7,04	0,57
40	7,35	7,36	7,43	7,38	0,59
50	7,68	7,64	7,72	7,68	0,52
60	7,94	7,90	8,00	7,95	0,63
70	8,12	8,13	8,18	8,14	0,39
80	8,29	8,25	8,27	8,27	0,24
90	8,38	8,34	8,36	8,36	0,24
100	8,45	8,42	8,44	8,44	0,18
110	8,51	8,49	8,48	8,49	0,18
120	8,54	8,54	8,53	8,54	0,07
130	8,58	8,56	8,55	8,56	0,18
140	8,62	8,61	8,59	8,61	0,18
150	8,65	8,64	8,62	8,64	0,18

Preglednica XXIV: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra s pretokom pri hitrosti mešanja 70 obratov/minuto in temperaturi medija 37 °C. Podani so rezultati posameznih paralelek ter njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	G1a	G1b	G1c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	6,01	6,02	5,97	6,00	0,44
10	6,41	6,40	6,39	6,40	0,16
20	6,55	6,53	6,56	6,55	0,23
30	6,58	6,56	6,59	6,58	0,23
40	6,57	6,57	6,60	6,58	0,26
50	6,59	6,58	6,62	6,60	0,32
60	6,61	6,59	6,63	6,61	0,30
70	6,62	6,61	6,62	6,62	0,09
80	6,65	6,63	6,64	6,64	0,15
90	6,67	6,61	6,66	6,65	0,48
100	6,70	6,66	6,70	6,69	0,35
110	6,70	6,68	6,69	6,69	0,15
120	6,72	6,69	6,69	6,70	0,26
130	6,73	6,71	6,71	6,72	0,17
140	6,75	6,72	6,73	6,73	0,23
150	6,75	6,73	6,75	6,74	0,17

4.4 Razvoj pH profila

4.4.1 Poskusi ponazoritve profila pH od želodca do vključno prvega platoja v tankem črevesu

V poskusih Z1-Z5 smo z dovajanjem 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra v 0,01 M HCl želeli ponazoriti dvig pH ob prehodu iz želodca v duodenum. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXV.

Preglednica XXV: Izmerjene vrednosti pH simulacije hitrega dviga pH pri dovajanju hidrogenkarbonata v 0,01 M HCl. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonata v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5a	Z5b
	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	2,30	2,23	2,21	2,24	2,22	2,24
2	2,29	2,21	2,23	2,23	2,21	2,24
3	2,36	2,27	2,28	2,30	2,28	2,29
3,5	2,44	2,33	2,34	2,35	2,35	2,35
4	2,52	2,41	2,42	2,44	2,41	2,42
4,5	2,56	2,50	2,53	2,53	2,53	2,51
5	2,72	2,65	2,72	2,72	2,81	2,73
5,5	2,97	2,90	3,03	3,81	2,99	3,42
6	3,79	3,80	4,38	4,31	4,22	3,67

6,5	5,10	5,00	5,45	5,32	5,37	5,36
7	5,56	5,60	5,65	5,70	5,73	5,75
7,5	5,82	5,85	5,85	5,92	5,90	5,92
8	6,01	6,00	6,06	5,97	5,98	5,99
8,5	6,15	6,15	6,14	6,01	6,02	6,01
9	6,23	6,23	6,22	6,08	6,05	6,03
9,5	6,28	6,28	6,27	6,10	6,04	6,05
10	6,31	6,30	6,29	6,12	6,07	6,06
11	6,35	6,34	6,31	6,14	6,10	6,06
12	6,38	6,37	6,32	6,13	6,13	6,08
13	6,41	6,38	6,32	6,14	6,15	6,10
14	6,41	6,38	6,32	6,16	6,16	6,11
15	6,41	6,38	6,32	6,17	6,16	6,11
20	6,44	6,43	6,30	6,24	6,18	6,15
30	6,47	6,46	6,29	6,28	6,22	6,19
40	6,48	6,49	6,33	6,29	6,26	6,26
50	6,49	6,51	6,33	6,32	6,28	6,26
60	6,53	6,48	6,33	6,33	6,28	6,28
70	6,54	6,49	6,34	6,34	6,29	6,28
75	6,55	6,53	6,34	6,34	6,31	6,29
80	6,55	6,53	6,35	6,36	6,32	6,29

4.4.2 Poskusi ponazoritve profila pH v tankem črevesu do vključno drugega platoja

a) Simulacija dviga pH v tankem črevesu z uporabo dveh hidrogenkarbonatnih pufrov

V poskusih TC1-TC7 smo z dovajanjem 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru želeli ponazoriti počasen dvig pH v tankem črevesu. Za dosego dviga smo uporabili dva hidrogenkarbonatna pufru različnih vrednosti pH. V poskusih smo ponazorili tudi dvig pH pri prehodu iz želodca v tanko črevo. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Izmerjene vrednosti pH simulacije dviga pH v tankem črevesu z uporabo dveh hidrogenkarbonatnih pufrov. Poskusi se med seboj razlikujejo po 80 minuti, ki ponazarja pričetek počasnega dviga pH v tankem črevesu. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonata v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6	TC7a	TC7b	TC7c
	pH								
0	2,23	2,24	2,24	2,23	2,22	2,22	2,24	2,25	2,26
2	2,24	2,23	2,23	2,23	2,22	2,23	2,23	2,24	2,26
3	2,29	2,29	2,30	2,29	2,30	2,29	2,30	2,32	2,32
3,5	2,34	2,34	2,37	2,34	2,37	2,33	2,36	2,41	2,41
4	2,44	2,39	2,49	2,41	2,49	2,41	2,42	2,53	2,48
4,5	2,51	2,48	2,59	2,52	2,61	2,50	2,58	2,63	2,61
5	2,72	2,63	2,84	2,64	3,01	2,63	2,72	2,92	2,74
5,5	2,91	2,75	3,31	3,10	3,17	2,92	2,98	3,17	3,04
6	4,37	3,13	4,93	3,73	5,01	3,59	4,31	4,64	3,96
6,5	5,24	4,54	5,65	5,31	5,72	5,25	5,36	5,68	5,54
7	5,68	5,41	5,98	5,70	6,02	5,72	5,74	5,96	5,91

7,5	5,91	5,68	6,08	5,92	6,08	5,92	5,93	6,01	6,01
8	6,01	5,80	6,10	6,00	6,12	6,00	5,98	6,06	6,03
8,5	6,06	5,86	6,12	6,04	6,14	6,04	6,01	6,09	6,06
9	6,10	5,90	6,13	6,06	6,15	6,07	6,04	6,12	6,10
9,5	6,11	5,93	6,14	6,08	6,16	6,09	6,06	6,14	6,14
10	6,12	5,96	6,15	6,12	6,18	6,11	6,08	6,16	6,15
11	6,12	6,00	6,15	6,15	6,20	6,12	6,11	6,18	6,17
12	6,13	6,03	6,17	6,16	6,21	6,14	6,14	6,20	6,18
13	6,14	6,07	6,19	6,17	6,22	6,16	6,14	6,22	6,19
14	6,15	6,09	6,20	6,19	6,24	6,17	6,15	6,22	6,19
15	6,17	6,11	6,21	6,19	6,26	6,18	6,16	6,23	6,20
20	6,22	6,16	6,25	6,22	6,27	6,20	6,20	6,25	6,24
30	6,25	6,20	6,28	6,24	6,30	6,22	6,23	6,27	6,26
40	6,27	6,24	6,30	6,26	6,33	6,23	6,26	6,29	6,28
50	6,30	6,27	6,33	6,26	6,35	6,26	6,28	6,31	6,30
60	6,33	6,29	6,34	6,29	6,36	6,28	6,30	6,33	6,32
70	6,34	6,31	6,35	6,34	6,38	6,31	6,30	6,35	6,33
75	6,36	6,32	6,36	6,35	6,39	6,33	6,31	6,36	6,34
80	6,37	6,33	6,37	6,37	6,39	6,35	6,33	6,38	6,39
85	6,45	6,41	6,48	6,46	6,50	6,44	6,40	6,47	6,45
90	6,56	6,53	6,62	6,58	6,62	6,56	6,50	6,55	6,58
95	6,66	6,65	6,73	6,70	6,73	6,67	6,63	6,67	6,70
100	6,74	6,72	6,79	6,77	6,79	6,75	6,71	6,75	6,80
105	6,87	6,87	6,95	6,96	6,94	6,81	6,80	6,81	6,85
110	7,01	7,06	7,09	7,06	7,09	6,92	6,95	6,95	7,01
115	7,12	7,21	7,26	7,19	7,21	7,03	7,13	7,11	7,17
120	7,21	7,31	7,35	7,30	7,30	7,11	7,25	7,24	7,28
125	7,33	7,37	7,47	7,37	7,36		7,32	7,34	7,37
130	7,39	7,42	7,49	7,42	7,39		7,40	7,41	7,44
135	7,44		7,55	7,50	7,46		7,48	7,48	7,53
140	7,45		7,58	7,62	7,59		7,55	7,54	7,59
145	7,47		7,61	7,66	7,71		7,61	7,58	7,62
150	7,48		7,64	7,72	7,80		7,65	7,61	7,65
155	7,49		7,66	7,74	7,84		7,67	7,64	7,67
160	7,49			7,74	7,87		7,69	7,66	7,69
165				7,76			7,69	7,68	7,69
170				7,77			7,69	7,69	7,69
175				7,78			7,70	7,69	7,70
180				7,79			7,70	7,69	7,70
190				7,80					
200				7,79					
250				7,80					

b) Simulacija dviga pH v tankem črevesu z uporabo enega hidrogenkarbonatnega pufru

V poskusih TC8-TC13 smo z dovajanjem 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru želeli ponazoriti počasen dvig pH v tankem črevesu. Za dosego dviga smo uporabili en hidrogenkarbonatni pufer, kjer smo hitrost naraščanja pH uravnavali s hitrostjo mešanja medija v čaši za dovajanje. V poskusih je smo ponazorili tudi dvig pH pri prehodu iz

želodca v tanko črevo. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXVII.

Preglednica XXVII: Izmerjene vrednosti pH simulacije dviga pH v tankem črevesu z uporabo enega hidrogenkarbonatnega pufru. Poskusi se med seboj razlikujejo po 80 minuti, ki ponazarja pričetek počasnega dviga pH v tankem črevesu. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonata v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	TC8	TC9	TC10	TC11	TC12	TC13a	TC13b
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	2,18	2,21	2,24	2,24	2,23	2,23	2,24
2	2,19	2,20	2,24	2,24	2,24	2,24	2,23
3	2,25	2,20	2,30	2,30	2,30	2,29	2,29
3,5	2,31						
4	2,40	2,38	2,45	2,42	2,42	2,40	2,39
4,5	2,53						
5	2,60	2,72	2,65	2,63	2,78	2,65	2,63
5,5	3,04						
6	3,84	5,31	4,05	4,07	4,05	4,92	4,94
6,5	5,32						
7	5,84	5,80	5,90	5,89	5,84	5,87	5,89
7,5	6,00						
8	6,04	6,02	6,04	6,01	6,03	6,05	6,08
8,5	6,05						
9	6,07	6,18	6,08	6,08	6,07	6,09	6,11
9,5	6,08						
10	6,10	6,23	6,09	6,12	6,09	6,08	6,12
11	6,12						
12	6,15						
13	6,17						
14	6,18						
15	6,20	6,25	6,12	6,20	6,17	6,18	6,16
20	6,22	6,25	6,17	6,26	6,20	6,19	6,18
30	6,24	6,27	6,21	6,31	6,25	6,23	6,22
40	6,24	6,28	6,24	6,34	6,25	6,27	6,24
50	6,25	6,30	6,25	6,35	6,28	6,28	6,27
60	6,27	6,32	6,28	6,35	6,31	6,28	6,27
70	6,30	6,32	6,32	6,37	6,34	6,30	6,29
75	6,34	6,33	6,32	6,37	6,35	6,31	6,32
80	6,35	6,34	6,34	6,38	6,36	6,33	6,34
85	6,44	6,41	6,46	6,50	6,42	6,39	6,40
90	6,60	6,49	6,58	6,63	6,54	6,49	6,51
95	6,74	6,54	6,70	6,72	6,64	0,63	0,62
100	6,85	6,60	6,78	6,79	6,74	6,72	6,73
105	6,92	6,65	6,86	6,85	6,86	6,84	6,83
110	6,98		6,96	6,94	6,99	6,97	6,97
115	7,00		7,08	7,06	7,13	7,13	7,14
120	7,02		7,18	7,19	7,29	7,27	7,25
125	7,03			7,35	7,43	7,34	7,32
130	7,05			7,51	7,55	7,41	7,42
135					7,69	7,50	7,48
140					7,77	7,59	7,58
145					7,83	7,63	7,61

150												7,66	7,65
155												7,70	7,69
160												7,73	7,72
165												7,75	7,74
170												7,76	7,74
175												7,75	7,74
180												7,75	7,74

4.4.3 Simulacija prehoda iz tankega v debelo črevo

a) Simulacija padca vrednosti pH za 1 enoto na pH~6,6

V poskusih P1-P12 smo z dovajanjem acetatnih pufrov in očetne kisline v medij s pH~7,7 želeli ponazoriti hiter padec pH za 1 enoto ob prehodu iz ileuma v cekum. Delovno čašo in cevke pretočnega sistema smo pred začetkom posuka napolnili s Hidrogenkarbonatnim pufrom 3 s pH 7,1. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXVIII.

Preglednica XXVIII: Izmerjene vrednosti pH simulacije padca pH za 1 enoto pri prehodu iz ileuma v cekum. Poskusi se med seboj razlikujejo po 35 minuti, ki ponazarja pričetek padca pH pri prehodu iz ileuma v cekum. Začetek merjenja sovпада z začetkom dovajanja hidrogenkarbonatnega pufra v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL Hidrogenkarbonatnega pufra 3.

Čas (min)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12a	P12b	P12c
	pH													
0	7,74	7,70	7,71	7,71	7,71	7,71	7,71	7,72	7,71	7,71	7,70	7,75	7,71	7,71
35	7,74	7,70	7,72	7,72	7,72	7,72	7,72	7,73	7,71	7,71	7,70	7,75	7,71	7,71
37	7,72	7,67	7,27	7,24	7,26	7,24	7,16	7,44	7,70	7,71	7,70	7,75	7,71	7,70
37,5	7,69	7,59	7,02	7,00	7,01	7,04	6,97	7,25	6,47	6,42	6,58	6,65	6,64	6,63
38	7,66	7,54	6,86	6,83	6,85	6,89	6,81	7,15	6,48	6,42	6,58	6,65	6,64	6,63
38,5	7,64	7,48	6,80	6,70	6,72	6,70	6,69	7,04	6,49	6,42	6,58	6,66	6,64	6,64
39	7,61	7,45	6,77	6,67	6,59	6,58	6,57	6,95	6,50	6,44	6,59	6,66	6,65	6,64
40	7,57	7,38	6,77	6,67	6,57	6,52	6,55	6,80	6,50	6,46	6,62	6,67	6,66	6,64
45	7,37	7,10	6,84	6,76	6,66	6,60	6,61	6,65	6,50	6,46	6,66	6,68	6,68	6,64
50	7,21	6,93	6,83	6,77	6,68	6,66	6,61	6,59	6,48	6,44	6,65	6,65	6,65	6,60
55	7,07	6,76	6,77	6,73	6,64	6,64	6,57	6,46	6,44	6,43	6,61	6,63	6,66	6,60
60	6,92	6,60	6,70	6,65	6,58	6,58	6,52	6,30	6,47	6,46	6,56	6,66	6,69	6,64
65	6,78	6,48	6,58	6,54	6,50	6,51	6,53	6,14	6,48	6,45	6,50	6,69	6,71	6,65
70	6,64	6,37	6,45	6,41	6,37	6,38	6,52	6,05	6,49	6,44	6,42	6,68	6,70	6,65
75	6,49	6,27	6,33	6,30	6,26	6,27	6,49	6,05	6,48	6,43	6,36	6,66	6,67	6,64

b) Simulacija padca vrednosti pH za 2 enoti na pH~5,6

V poskusih P13 in P14 smo z dovajanjem acetatnih pufrov in očetne kisline v medij s pH~7,7 želeli ponazoriti hiter padec pH za 2 enoti ob prehodu iz ileuma v cekum. Delovno čašo in cevke pretočnega sistema smo pred začetkom posuka napolnili s

Hidrogenkarbonatnim pufrom 3 s pH 7,1. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXIX.

Preglednica XXIX: Izmerjene vrednosti pH simulacije padca pH za 2 enoti pri prehodu iz ileuma v cekum. Poskusi se med seboj razlikujejo po 35 minuti, ki ponazarja pričetek padca pH pri prehodu iz ileuma v cekum. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonatnega pufra v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL Hidrogenkarbonatnega pufra 3.

Čas (min)	P13	P14a	P14b	P14c
	pH	pH	pH	pH
0	7,72	7,75	7,70	7,73
35	7,72	7,75	7,70	7,73
37	7,45	7,55	7,55	7,73
37,5	5,53	5,58	5,64	5,63
38	5,50	5,57	5,64	5,63
38,5	5,48	5,58	5,65	5,64
39	5,47	5,59	5,65	5,64
40	5,45	5,59	5,66	5,65
45	5,32	5,62	5,65	5,65
50		5,60	5,64	5,64
55		5,60	5,63	5,62
60		5,59	5,61	5,61
65		5,59	5,60	5,60
70		5,59	5,59	5,59
75		5,59	5,59	5,59

4.4.4 Simulacija celotnega profila pH

V poskusih CP1-CP5 smo v celoti simulirali dva profila pH, ki se med seboj razlikujeta le v padcu pH, ki ponazarja prehod iz ileuma v cekum. Rezultati so podani v preglednicah XXX-XXXII, kjer poskusi CP1-CP3 predstavljajo neuspešne poskuse simulacije profila, poskusa CP4 in CP5 pa uspešne simulacije omenjenih dveh profilov pH.

Preglednica XXX: Izmerjene vrednosti pH neuspešnih poskusov simulacije celotnega profila pH. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonatnega v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	CP1	CP2	CP3
	pH	pH	pH
0	2,28	2,26	2,23
2	2,29	2,25	2,24
3	2,39	2,28	2,29
3,5	2,58	2,44	2,42
4	2,78	2,57	2,48
4,5	3,42	2,83	2,57
5	4,12	2,99	2,78
5,5	5,02	3,24	2,98
6	5,58	3,68	3,77
6,5	5,89	5,44	5,42
7	6,00	5,86	5,98

7,5	5,99	5,98	6,01
8	6,04	6,02	6,04
8,5	6,05	6,03	6,06
9	6,07	6,03	6,08
9,5	6,09	6,04	6,12
10	6,10	6,08	6,12
11	6,12	6,09	6,14
12	6,14	6,11	6,14
13	6,15	6,12	6,16
14	6,16	6,12	6,16
15	6,16	6,13	6,16
20	6,19	6,18	6,20
30	6,25	6,21	6,23

40	6,27	6,25	6,28
50	6,30	6,27	6,28
60	6,31	6,28	6,29
70	6,33	6,30	6,31
75	6,35	6,32	6,32
80	6,39	6,32	6,33
85	6,44	6,35	6,36
90	6,52	6,47	6,50
95	6,67	6,62	6,65
100	6,77	6,72	6,74
105	6,88	6,81	6,89
110	7,02	6,96	6,99
115	7,13	7,10	7,13
120	7,27	7,24	7,28
125	7,36	7,34	7,41
130	7,45	7,45	7,49
135	7,52	7,51	7,56
140	7,59	7,57	7,63
145	7,63	7,63	7,66
150	7,68	7,69	7,69
155	7,70	7,71	7,70
160	7,72	7,72	7,72
165	7,74	7,72	7,74

170	7,75	7,73	7,74
175	7,75	7,72	7,74
180	7,73	7,73	7,74
190	7,74	7,72	7,73
200	7,75	7,72	7,73
250	7,74	7,73	7,74
280	7,74	7,72	7,73
285	7,74	7,72	7,73
287	7,66	7,55	7,56
287,5	6,51	5,33	5,46
288	6,52	5,34	5,47
288,5	6,52	5,34	5,47
289	6,53	5,35	5,47
290	6,55		5,48
295	6,57		5,49
300	6,55		5,48
305	6,54		
310	6,56		
315	6,56		
320	6,55		

V paralelkah CP4a-CP4c smo izvedli simulacijo celotnega profila pH s padcem pH v cekumu na ~6,6. Ta profil smo poimenovali profil pH I. Simulacijo profila smo dosegli s sklopitvijo poskusov 4.4.1-4.4.3a. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXXI.

Preglednica XXXI: Izmerjene vrednosti pH celotnega profila pH I s padcem pH za 1 enoto pH v cekumu. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonatnega pufra v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	CP4a	CP4b	CP4c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	2,26	2,25	2,39	2,30	3,40
2	2,26	2,25	2,39	2,30	3,40
3	2,30	2,29	2,49	2,36	4,78
3,5	2,39	2,40	2,57	2,45	4,12
4	2,47	2,48	2,72	2,56	5,54
4,5	2,57	2,56	2,94	2,69	8,05
5	2,72	2,68	3,36	2,92	13,07
5,5	3,00	2,90	3,24	3,05	5,74
6	3,85	3,65	4,02	3,84	4,82
6,5	5,51	5,44	5,74	5,56	2,82
7	5,81	5,80	5,99	5,87	1,82
7,5	5,98	5,98	6,08	6,01	0,96
8	6,02	6,04	6,12	6,06	0,87
8,5	6,06	6,08	6,16	6,10	0,87
9	6,07	6,09	6,17	6,11	0,87

9,5	6,08	6,11	6,18	6,12	0,84
10	6,10	6,12	6,20	6,14	0,86
11	6,12	6,14	6,21	6,16	0,77
12	6,14	6,15	6,22	6,17	0,71
13	6,16	6,15	6,23	6,18	0,71
14	6,16	6,16	6,24	6,19	0,75
15	6,17	6,16	6,24	6,19	0,70
20	6,18	6,19	6,28	6,22	0,89
30	6,21	6,23	6,31	6,25	0,85
40	6,23	6,27	6,34	6,28	0,89
50	6,28	6,28	6,35	6,30	0,64
60	6,29	6,29	6,37	6,32	0,73
70	6,30	6,31	6,39	6,33	0,78
75	6,30	6,31	6,40	6,34	0,87
80	6,31	6,33	6,41	6,35	0,83
85	6,36	6,39	6,45	6,40	0,72
90	6,50	6,54	6,55	6,53	0,41
95	6,60	6,65	6,67	6,64	0,54

100	6,72	6,76	6,77	6,75	0,39
105	6,85	6,88	6,88	6,87	0,25
110	7,00	6,99	7,01	7,00	0,14
115	7,13	7,14	7,15	7,14	0,14
120	7,24	7,32	7,27	7,28	0,56
125	7,33	7,44	7,35	7,37	0,79
130	7,40	7,51	7,41	7,44	0,82
135	7,50	7,55	7,51	7,52	0,35
140	7,59	7,61	7,56	7,59	0,33
145	7,64	7,66	7,62	7,64	0,26
150	7,67	7,69	7,66	7,67	0,20
155	7,68	7,71	7,68	7,69	0,23
160	7,69	7,72	7,71	7,71	0,20
165	7,70	7,74	7,72	7,72	0,26
170	7,71	7,74	7,72	7,72	0,20
175	7,71	7,74	7,72	7,72	0,20
180	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07
190	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07

200	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07
250	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07
280	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07
285	7,72	7,73	7,72	7,72	0,07
287	7,66	7,68	7,68	7,67	0,15
287,5	6,56	6,59	6,63	6,59	0,53
288	6,57	6,60	6,63	6,60	0,45
288,5	6,58	6,61	6,64	6,61	0,45
289	6,59	6,61	6,65	6,62	0,46
290	6,61	6,62	6,65	6,63	0,31
295	6,62	6,63	6,66	6,64	0,31
300	6,59	6,60	6,63	6,61	0,32
305	6,59	6,63	6,62	6,61	0,31
310	6,61	6,63	6,64	6,63	0,23
315	6,62	6,66	6,64	6,64	0,30
320	6,61	6,66	6,62	6,63	0,40

V paralelkah CP5a-CP5c smo izvedli simulacijo celotnega profila pH s padcem pH v cekumu na ~5,6. Ta profil smo poimenovali profil pH II. Simulacijo profila smo dosegli s skopitvijo poskusov 4.4.1-4.4.3b. Pogoji poskusov so opredeljeni v poglavju 3.2. Rezultati so podani v preglednici XXXII.

Preglednica XXXII: Izmerjene vrednosti pH celotnega profila pH II s padcem pH za 2 enoti pH v cekumu. Začetek merjenja sovpada z začetkom dovajanja hidrogenkarbonatnega pufru v delovno čašo, v katero smo pred začetkom poskusa natočili 40 mL 0,01 M HCl.

Čas (min)	CP5a	CP5b	CP5c	povp.	RSD (%)
	pH	pH	pH		
0	2,32	2,24	2,36	2,31	2,65
2	2,33	2,25	2,37	2,32	2,64
3	2,44	2,33	2,44	2,40	2,64
3,5	2,52	2,42	2,58	2,51	3,22
4	2,68	2,52	2,69	2,63	3,63
4,5	2,89	2,66	2,86	2,80	4,46
5	3,65	2,95	3,14	3,25	11,15
5,5	4,59	3,68	4,09	4,12	11,06
6	5,24	4,99	5,21	5,15	2,65
6,5	5,67	5,59	5,74	5,67	1,32
7	5,98	5,85	5,88	5,90	1,15
7,5	6,04	5,98	5,97	6,00	0,63
8	6,08	6,02	6,02	6,04	0,57
8,5	6,09	6,04	6,04	6,06	0,48
9	6,10	6,06	6,06	6,07	0,38
9,5	6,12	6,08	6,07	6,09	0,43
10	6,13	6,09	6,07	6,10	0,50
11	6,15	6,12	6,09	6,12	0,49
12	6,17	6,14	6,10	6,14	0,57
13	6,18	6,15	6,11	6,15	0,57

14	6,19	6,17	6,12	6,16	0,59
15	6,20	6,19	6,13	6,17	0,61
20	6,25	6,21	6,16	6,21	0,73
30	6,29	6,24	6,19	6,24	0,80
40	6,32	6,28	6,21	6,27	0,89
50	6,33	6,31	6,25	6,30	0,66
60	6,35	6,32	6,27	6,31	0,64
70	6,37	6,34	6,29	6,33	0,64
75	6,38	6,35	6,29	6,34	0,72
80	6,39	6,37	6,31	6,36	0,65
85	6,43	6,42	6,37	6,41	0,50
90	6,54	6,54	6,50	6,53	0,35
95	6,66	6,65	6,62	6,64	0,31
100	6,75	6,74	6,73	6,74	0,15
105	6,86	6,86	6,84	6,85	0,17
110	7,00	6,98	6,97	6,98	0,22
115	7,14	7,12	7,11	7,12	0,21
120	7,28	7,25	7,24	7,26	0,29
125	7,40	7,37	7,35	7,37	0,34
130	7,49	7,45	7,44	7,46	0,35
135	7,56	7,53	7,50	7,53	0,40
140	7,61	7,57	7,54	7,57	0,46
145	7,65	7,61	7,57	7,61	0,53

150	7,68	7,67	7,64	7,66	0,27
155	7,70	7,69	7,66	7,68	0,27
160	7,72	7,71	7,67	7,70	0,34
165	7,74	7,72	7,68	7,71	0,40
170	7,74	7,72	7,69	7,72	0,33
175	7,75	7,73	7,69	7,72	0,40
180	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26
190	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26
200	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26
250	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26
280	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26
285	7,74	7,72	7,70	7,72	0,26

287	7,60	7,56	7,56	7,57	0,30
287,5	5,54	5,63	5,57	5,58	0,82
288	5,54	5,63	5,57	5,58	0,82
288,5	5,55	5,64	5,57	5,59	0,85
289	5,57	5,64	5,57	5,59	0,72
290	5,58	5,65	5,57	5,60	0,78
295	5,61	5,66	5,58	5,62	0,72
300	5,62	5,65	5,58	5,62	0,63
305	5,61	5,63	5,57	5,60	0,55
310	5,61	5,62	5,57	5,60	0,47
315	5,61	5,61	5,57	5,60	0,41
320	5,60	5,61	5,56	5,59	0,47

4.5 Testi sproščanja

Teste sproščanja tablet z natrijevim diklofenakatom smo izvajali na modelih z razvitimi pH profili (prikazanih v poglavju 4.4.4). V preglednicah XXXIII in XXXIV so podani rezultati sproščanj učinkovine iz tablet s Na-DF za posamezen pH profil.

Preglednica XXXIII: Rezultati sproščanja učinkovine iz tablet s 25% Na-DF v pH profilu I. Podani so rezultati posameznih paralelek, njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	% sproščene učinkovine (%)				RSD (%)
	S1	S2	S3	povp.	
0	0	0	0	0	/
20	0,14	0,14	0,20	0,16	21,13
40	0,38	0,40	0,53	0,44	18,97
60	1,23	1,25	1,58	1,35	14,77
80	3,44	3,37	4,10	3,64	11,10
100	6,17	5,87	6,84	6,29	7,86
120	8,93	8,23	9,43	8,86	6,83
140	11,54	10,48	11,80	11,27	6,21
160	14,11	12,95	14,28	13,78	5,24
180	17,23	15,92	17,33	16,83	4,69
200	20,56	19,26	20,62	20,15	3,83
220	23,93	22,60	24,01	23,52	3,37
240	27,24	25,90	27,37	26,84	3,04
260	30,35	29,05	30,46	29,95	2,62
280	33,24	31,95	33,23	32,81	2,27
300	35,88	34,64	35,84	35,45	1,99
320	38,34	37,18	38,28	37,93	1,72
340	40,43	39,34	40,36	40,05	1,52
360	42,14	41,13	42,05	41,77	1,35

Preglednica XXXIV: Rezultati sproščanja učinkovine iz tablet s 25% Na-DF v pH profilu II. Podani so rezultati posameznih paralelk, njihovo povprečje in relativna standardna deviacija.

Čas (min)	% sproščene učinkovine (%)				RSD (%)
	R1	R2	R3	povp.	
0	0	0	0	0	/
20	0,15	0,13	0,20	0,16	21,79
40	0,41	0,39	0,52	0,44	16,67
60	1,28	1,25	1,50	1,34	10,10
80	3,70	3,88	3,90	3,83	2,86
100	6,48	6,81	6,32	6,54	3,86
120	8,84	9,26	8,51	8,87	4,21
140	11,09	11,33	10,85	11,09	2,16
160	13,57	13,52	13,21	13,43	1,46
180	16,52	16,22	16,21	16,32	1,07
200	19,82	19,37	19,53	19,57	1,18
220	23,12	22,55	22,78	22,82	1,25
240	26,43	25,69	26,01	26,04	1,43
260	29,57	28,59	29,02	29,06	1,70
280	32,44	31,64	32,13	32,07	1,27
300	35,22	34,45	34,84	34,84	1,11
320	37,96	37,04	37,36	37,45	1,24
340	39,94	38,98	39,26	39,39	1,26
360	41,35	40,30	40,64	40,76	1,32

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo simulirali profil pH gastrointestinalnega trakta s hidrogenkarbonatnim pufrom in v zaporedju dovajanih medijev, ki ustrezajo razvitemu profilu sproščali učinkovino iz tablet s Na-DF. Proces razvoja profila smo začeli z raziskovanjem obnašanja hidrogenkarbonatnih pufrov pod različnimi pogoji. Pridobljeno znanje pa smo nato uporabili pri simulaciji samega profila pH. V zadnjem delu naloge smo na modelih z razvitimi pH profili sproščali tablete z Na-DF, kjer nas je zanimala razlika v sproščanju učinkovine pri različnih pH v zadnjem delu simuliranega profila pH, s katerim smo želeli ponazoriti prehod učinkovine iz tankega v debelo črevo.

5.1 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši brez pretoka

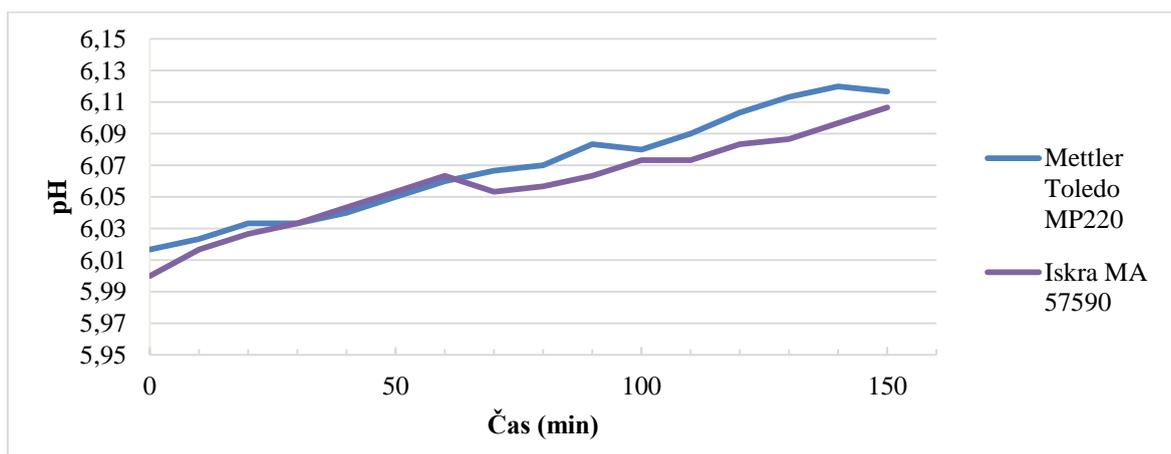
5.1.1 Priprava hidrogenkarbonatnega pufra

V raziskovalnem delu (29) so preučevali različne vplive na začetni pH hidrogenkarbonatnega pufra. Kot že nekateri raziskovalci prej (27) so ugotovili, da sta pri pripravi hidrogenkarbonatnih pufrov potrebna previdnost in konsistentnost v največji možni meri, saj je sistem izjemno občutljiv.

Hidrogenkarbonatne pufre smo sami pripravljali v bučkah z raztapljanjem NaHCO_3 v prečiščeni vodi, ki smo mu dodali potrebno količino HCl za dosego ustreznega pH. Puferski sistem smo dopolnili do oznake in bučko dvakrat obrnili, s čimer smo zagotovili homogenost pufra. Začetni pH hidrogenkarbonatnega pufra je namreč odvisen od tega, kolikokrat bučko obrnemo okoli horizontalne osi (29), kjer večje število obratov pomeni hitrejše izhajanje $\text{CO}_2(\text{g})$ in s tem višji začetni pH pufra. Tudi sicer smo pri svojem delu s hidrogenkarbonatnimi pufri poskušali ravnati maksimalno konsistentno tako, da smo pri pripravi pufrov izvajali ponovljive in počasne gibe. Hkrati čaš, v katerih smo merili pH v preliminarnih poskusih in čaš za dovajanje medija nismo premikali. Drug pomemben vidik priprave hidrogenkarbonatnega pufra je čas priprave. Hidrogenkarbonatne pufre smo zaradi izhajanja $\text{CO}_2(\text{g})$ obvezno pripravljali tik pred njihovo uporabo. V nasprotnem primeru bi pH hidrogenkarbonatnega pufra narasel, kapaciteta pa padla (29) in sproščanje tako ne bi več potekalo v enakih pogojih.

5.1.2 Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra

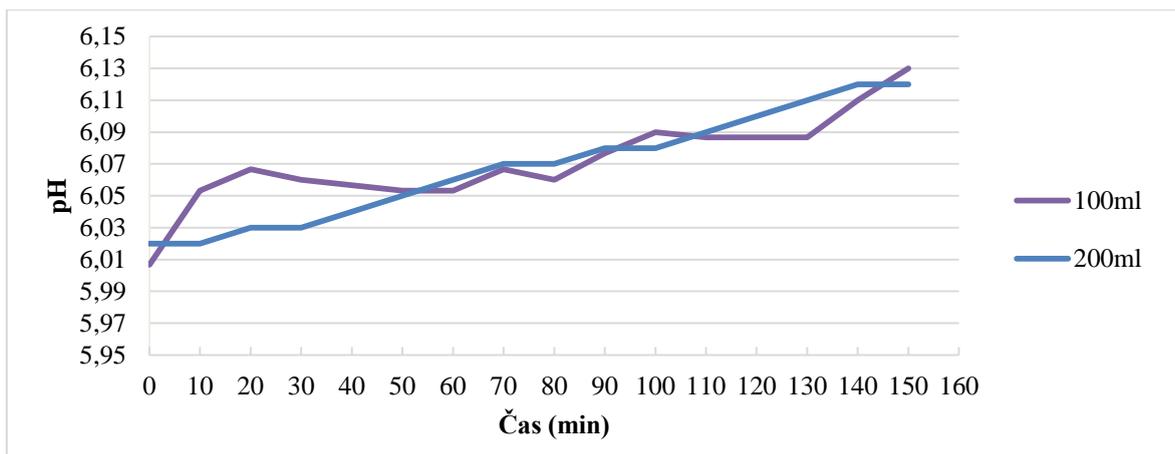
V prvih preliminarnih poskusih, v katerih smo preučevali spreminjanje pH v čaši brez pretoka, smo želeli ugotoviti hitrost naraščanja pH hidrogenkarbonatnega pufra v čaši za dovajanje. Ugotovili smo, da v 150 minutah vrednost pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra s pH~6 v 250 mL čaši od začetka merjenja naraste za približno ~0,1 enote pH (slika 3). Hkrati smo za zanesljivo in ponovljivo izvajanje vseh poskusov v tej nalogi želeli preveriti delovanje pH metra Mettler Toledo MP 220. Vrednosti, izmerjene z omenjenim pH metrom smo zato primerjali z vrednostmi, pridobljenimi s pH metrom drugega proizvajalca (Iskra). Ugotovili smo, da se povprečne vrednosti pH med pH metroma tekom celotnega območja merjenja razlikujejo za največ 0,02 enote, kar se sklada z dopustnim odstopanjem proizvajalca. Na sliki 3 sta prikazani krivulji povprečne rasti vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufra s pH~6 za posamezen pH meter.



Slika 3: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra pH~6 v 250 mL čaši v odvisnosti v časa in primerjava pH metrov različnih proizvajalcev. Pogoji: brez mešanja, sobna T medija. Za posamezen pH meter sta prikazani povprečji 3 paralelek.

5.1.3 Vpliv volumna hidrogenkarbonatnega pufra na rast pH

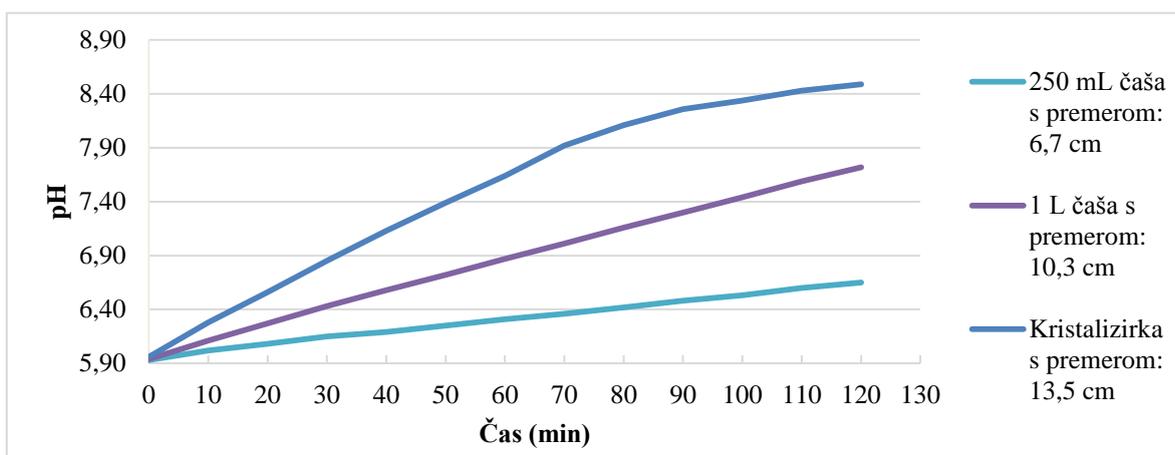
Prvi izmed vplivov na rast pH hidrogenkarbonatnega pufra, ki smo jih želeli preučiti je vpliv volumna raztopine. Ugotovili smo, da različen volumen hidrogenkarbonatnega pufra nima večjega vpliva na naraščanje pH. Slika 4 prikazuje rast pH za hidrogenkarbonatna pufra volumnov 100 mL in 200 mL, kjer smo meritve izvajali v 250 mL čaši pri sobni temperaturi medija. V nasprotju s temi podatki smo v naslednjih poskusih ugotovili, da na rast pH hidrogenkarbonatnega pufra pomembno vpliva premer čaše za dovajanje (poglavje 5.1.4).



Slika 4: Vpliv volumna pufru na rast vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufru pH~6 v 250 mL čaši. Pogoji: brez mešanja, sobna T medija. Krivulja 200 mL predstavlja krivuljo Mettler Toledo MP220 iz poglavja 5.1.2. Za posamezen volumen pufru sta prikazani povprečji 3 paralelk.

5.1.4 Vpliv premera čaše na spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru

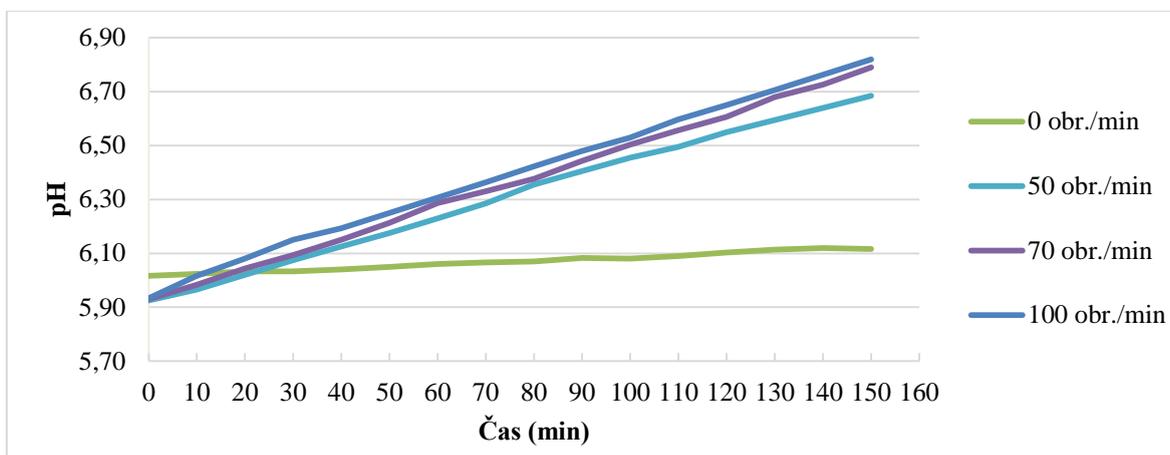
Ko smo ugotovili, da volumen medija ne vpliva na spreminjanje pH, smo želeli preveriti, če to velja tudi za premer čaše, v kateri se nahaja pufer. Odkrili smo, da velikost površine, prek katere sta v stiku zrak in pufer, močno vpliva na rast pH. V poskusih smo merili rast pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufru s pH~6 v čašah prostornine 250 mL in 1 L ter v kristalizirki brez mešanja medija in pri mešanju medija s 100 obrati/minuto. Izkaže se, da večji premer čaše pomeni tudi hitrejšo rast pH tako v primeru brez mešanja kot v primeru z mešanjem. To lahko pojasnimo s tem, da večji premer predstavlja večjo površino medija, s katere lahko $\text{CO}_2(\text{g})$ zapušča vodno fazo. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Vpliv premera čaše na rast vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufru pH~6 pri mešanju s 100 obrati/minuto pri sobni T medija. Za posamezno velikost čaše so prikazana povprečja 3 paralelk.

5.1.5 Vpliv hitrosti mešanja hidrogenkarbonatnega pufra na rast pH

Naslednji vpliv, ki smo ga želeli preučiti je vpliv hitrosti mešanja medija na rast pH. Mešanje smo izvajali z magnetnimi mešali v čaši za dovajanje in istočasno merili pH pufra. Ugotovili smo, da mešanje pospeši rast pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra s pH~6 v 250 mL čaši (slika 6). Hitrost rasti pH se dvigne iz ~0,1 enote/150 min pri pogojih brez mešanja na ~0,9 enote/150 pri mešanju s 70/obroti na minuto, kar kaže na opazno razliko med hitrostjo naraščanja pH v poskusih brez mešanja in hitrostjo naraščanja pH v poskusih z mešanjem. Če med seboj primerjamo vpliv različnih hitrosti mešanja (50, 70 in 100 obratov/min) na hitrost naraščanja pH, opazimo, da tudi spreminjanje hitrosti mešanja pomeni spremembo v hitrosti naraščanja vrednosti pH, vendar so v tem primeru razlike majhne.

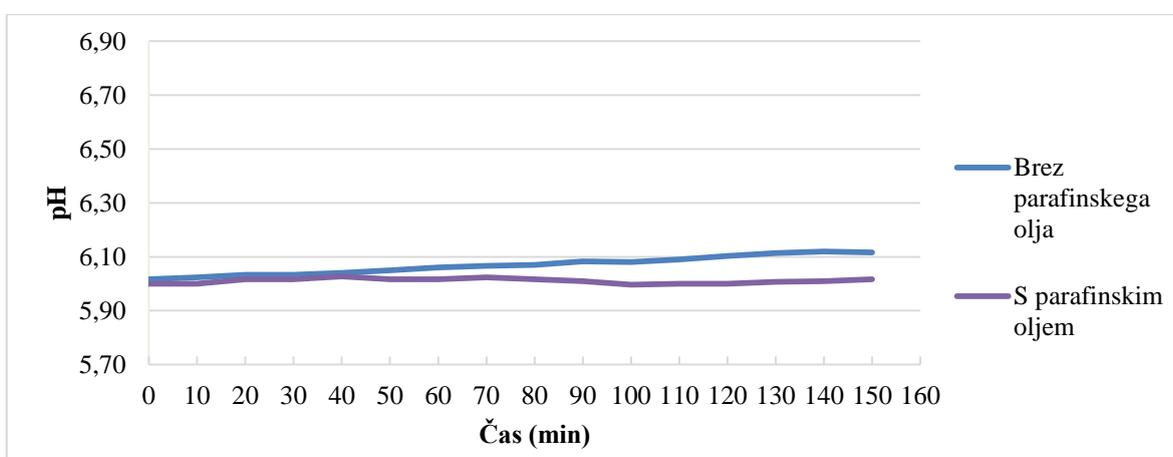


Slika 6: Vpliv hitrosti mešanja na rast vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufra pH~6 v 250 mL čaši. Pogoji: brez mešanja, sobna T medija. Za posamezno hitrost mešanja so prikazana povprečja 3 paralelk.

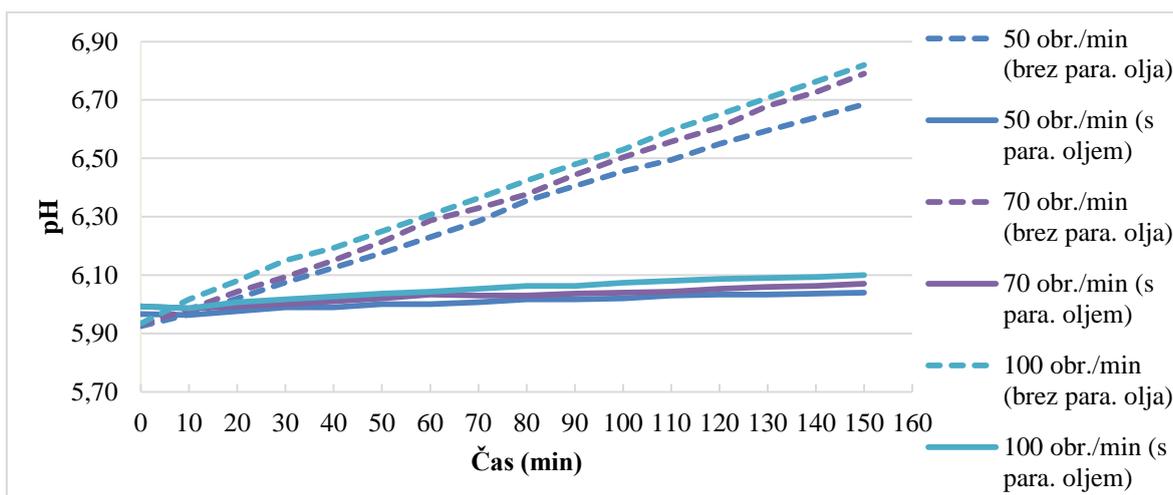
5.1.6 Vpliv stabilizacije hidrogenkarbonatnega pufra s plastjo parafinskega olja na rast pH

Hidrogenkarbonatne pufre lahko stabiliziramo na različne načine. V literaturi (26-30; 32) so najpogosteje uporabljeni načini stabilizacije: stabilizacija v obliki pokrova (zapore) nad pufrom, stabilizacija s plastjo parafinskega olja nad pufrom in stabilizacija s kontinuiranim dovajanjem CO₂(g) v raztopino. Sami smo se zaradi preproste izvedbe in dobrih rezultatov (27; 32), ki jih omogoča stabilizacija s plastjo parafinskega olja, odločili za to metodo stabilizacije. pH 200 mL 50 mM hidrogenkarbonatnega pufra s pH~6 smo tako kot v poskusih, predstavljenih v poglavju 5.1.5, merili v 250 mL čaši, nad medij pa smo tokrat nalili še tanko plast parafinskega olja. Slika 7 prikazuje razliko v rasti pH pufra za primer

brez mešanja glede na prisotnost tanke parafinske plasti nad medijem, medtem ko slika 8 prikazuje razliko v rasti pH pufra za primere z mešanjem pri hitrosti 50, 70 in 100 obratov/min glede na prisotnost tanke parafinske plasti nad medijem. Ugotovili smo, da je razlika v hitrosti naraščanja pH med stabiliziranim in ne-stabiliziranim pufrom majhna za primer brez mešanja. Ta razlika postane večja, ko medij izpostavimo mešanju pri 50, 70 ali 100 obratov/min. V primeru stabilizacije pufra se pH pri vseh hitrostih mešanja (50, 70 in 100 obratov/min) spreminja minimalno, medtem ko pri ne-stabiliziranem pufru pH narašča skladno s poskusi, predstavljenimi v poglavju 5.1.5. Zapišemo lahko, da stabilizacija s plastjo parafinskega olja predstavlja učinkovit in hitro dosegljiv način stabilizacije hidrogenkarbonatnih pufrov.



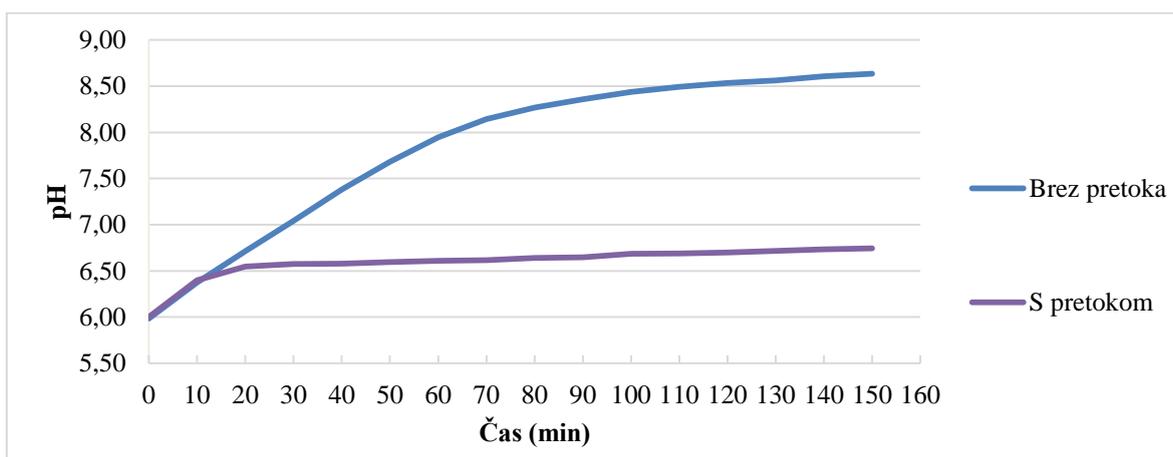
Slika 7: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra pH~6 v 250 mL čaši, stabiliziranega s parafinskim oljem brez mešanja v primerjavi s spreminjanjem pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije in brez mešanja. Pogoji: sobna T medija. Za posamezen primer sta prikazani povprečji 3 paralelk.



Slika 8: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufra pH~6 v 250 mL čaši, stabiliziranega s parafinskim oljem z mešanjem pri hitrostih 50, 70 in 100 obratov/minuto v primerjavi s spreminjanjem pH hidrogenkarbonatnega pufra brez stabilizacije z mešanjem pri hitrostih 50, 70 in 100 obratov/minuto. Pogoji: sobna T medija. Za posamezen primer sta prikazani povprečji 3 paralelk.

5.2 Preliminarni poskusi – spreminjanje pH v čaši s pretokom

V primeru preliminarnih poskusov, ki smo jih izvajali v čaši s pretokom, smo pH 50mM hidrogenkarbonatnega pufru s pH~6 merili v delovni čaši, kamor smo pred poskusom natehtali 25 g steklenih kroglic. Medij smo s pomočjo vodne kopeli segrevali na 37 °C in ga mešali s hitrostjo 70 obratov/minuto. Z merjenjem pH 40 mL medija v pretočnem sistemu smo poskušali ponazoriti spreminjanje vrednosti pH medija v delovni čaši, ki mu dovajamo pufer s pretokom 2 ml/min, ob istem času pa z enako hitrostjo odvajamo pufer iz čaše, s čimer poskrbimo za izmenjavo medija. V delovno čašo smo dovajali 50 mM hidrogenkarbonatni pufer s pH~6 pri sobni temperaturi iz čaše za dovajanje, kjer medija nismo mešali. Na sliki 9 je prikazana razlika v naraščanju pH med primerom s pretokom, kjer izmenjava medija poteka in primerom brez pretoka, kjer izmenjave medija ni. V obeh primerih smo uporabljali enake pogoje (merjenje pH v delovni čaši, 25 g steklenih kroglic, temperatura medija 37 °C in mešanje s hitrostjo 70 obratov/minuto), spremenljivko je predstavljal le pretok medija. Ugotovimo lahko, da izmenjava medija močno upočasni rast pH. Vseeno je tudi v tem primeru rast pH v začetnem delu (označen del na sliki 9) hitra, nato pa se upočasni. V začetnih 20 minutah pH namreč poraste za ~0,6 enote, v naslednjih 130 pa samo še za ~0,2 enote pH. Rast pH ob pričetku merjenja je hitra, kar je posledica mešanja, temperature in vrednosti pH hidrogenkarbonatnega pufru v relativni bližini celokupne vrednosti pKa. Ko pH naraste, se zaradi tega H_2CO_3 tvori počasneje, posledično pa iz raztopine počasneje izhaja tudi $CO_2(g)$. Če stalno dovajamo svež pufer, se ravnotežje vzpostavi pri nižjem pH.

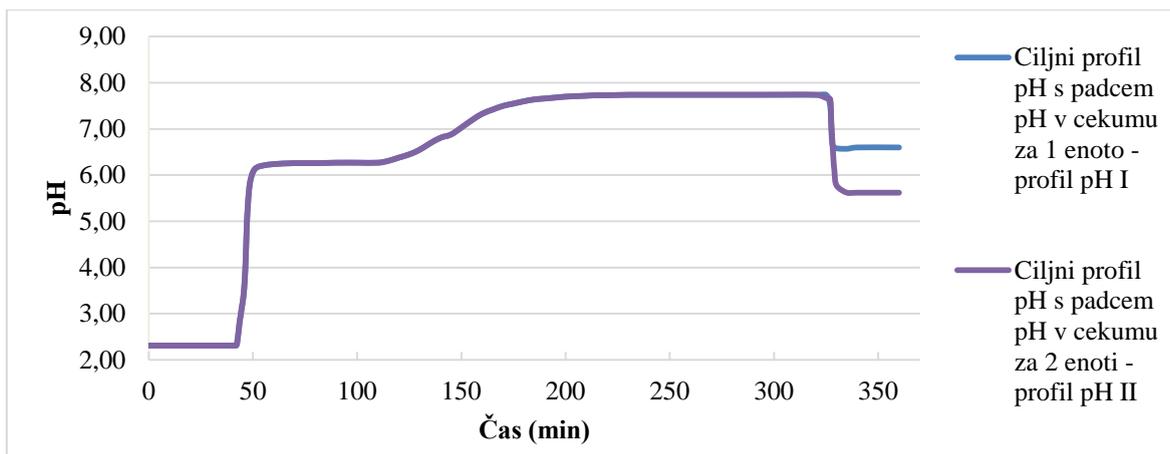


Slika 9: Spreminjanje pH hidrogenkarbonatnega pufru pH~6 v 250 mL čaši za primera brez pretoka in s pretokom. V obeh primerih smo raztopino izpostavili mešanju s hitrostjo 70 obratov/minuto. Pogoji: V delovni čaši smo medij segrevali na 37 °C, medtem ko smo v primeru spreminjanja pH v čaši s pretokom dovajali tudi pufer pri sobni T iz čaše za dovajanje. Za posamezen primer sta prikazani povprečji 3 paralelk.

Na podlagi preliminarnih poskusov, opisanih v poglavjih 5.1.1-5.1.6, lahko napovemo, kaj se skozi čas dogaja z medijem v čaši za dovajanje, vendar je potrebno poudariti, da je nato ta isti medij podvržen številnim dodatnim vplivom v delovni čaši, od katerih so glavni sprememba temperature, mehanski stres (steklene kroglice in mešanje v delovni čaši) in izmenjava medija. Ti faktorji na kompleksen način vplivajo na pH medija v delovni čaši, zato se ta razlikuje od tistega v čaši za dovajanje.

5.3 Razvoj profila pH

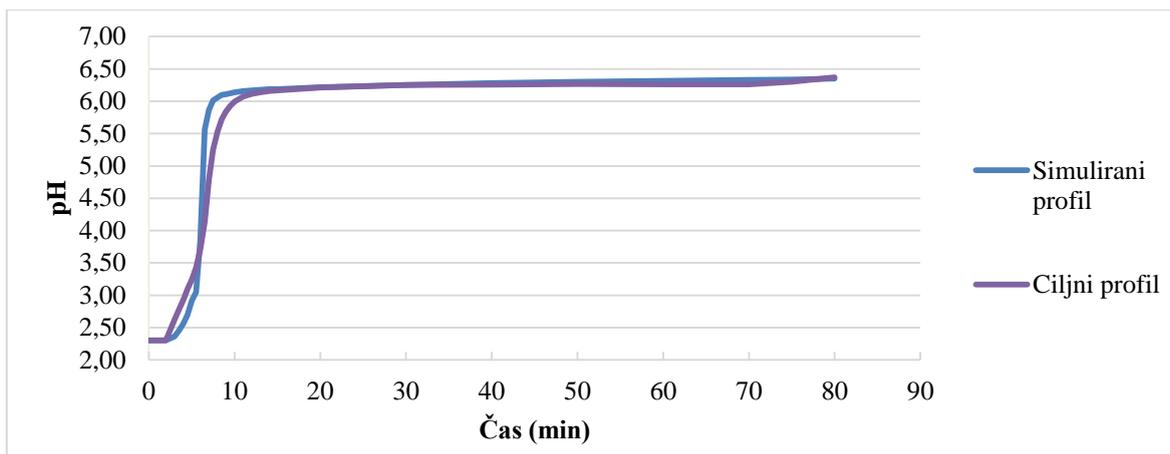
Profil pH, ki smo ga izbrali za simulacijo, je bil osnovan v magistrski nalogi (28). V omenjeni nalogi so s pomočjo računalniškega programa Engauge Digitizer na podlagi literaturnih podatkov narisali individualne grafe spreminjanja pH v odvisnosti od časa. Izmed vseh narisanih individualnih *in vivo* profilov so izbrali tistega, ki so ga ocenili kot sredinsko vrednost vseh ostalih. Izbrani profil, ki hkrati predstavlja naš ciljni profil, smo v tej nalogi poimenovali profil pH I. Začetni del profila pH I predstavlja prehod iz želodca v začetni del tankega črevesa. Z vrednostjo pH~2,3 je v profilu ponazorjeno kislo okolje želodca, nato pa sledi hiter dvig vrednosti pH do pH~6,3, ki ponazarja razmere v začetnem delu tankega črevesa. Na tem mestu v izbranem *in vivo* individualnem profilu zasledimo, da se vrednost pH dalj časa (~30 minut) bistveno ne spreminja, zato smo ta del profila poimenovali prvi plato pH. V nadaljevanju se vrednost pH iz proksimalnega v distalni del tankega črevesa zopet počasi dviga do pH~7,7, kjer se naraščanje ustavi, vrednost pH pa ostane konstantna nadaljnjih ~150 minut. Sledi hiter padec pH za ~1 enoto pH, ki ponazarja prehod iz distalnega ileuma v začetni del debelega črevesa oziroma cekum. V magistrskem delu (28) so poleg opisanega simulirali še en profil pH, ki se od prvega razlikuje v padcu pH pri prehodu iz distalnega ileuma v cekum. V prvem profilu (profil pH I) padec pH pri prehodu iz ileuma v cekum znaša približno 1 enoto pH, medtem ko v drugem profilu, ki smo ga v tej nalogi poimenovali profil pH II, ta padec znaša približno 2 enoti pH. Tudi slednji profil smo v tej nalogi simulirali. Oba profila pH sta prikazana na sliki 10.



Slika 10: pH profila, ki smo ga simulirali v tej nalogi – ciljni profil s padcem pH v cekumu za 1 enoto, v naši nalogi poimenovan profil pH I in ciljni profil s padcem pH v cekumu za 2 enoti, v naši nalogi poimenovan profil pH II (28).

5.3.1 Simulacija profila pH od želodca do vključno prvega platoja v tankem črevesu

Da bi časovno optimizirali svoje delo, smo simulacijo profila pH razdelili na več posameznih delov. Prvi del predstavlja prehod iz želodca v začetni del tankega črevesa. Kislo okolje želodca smo ponazorili z uporabo 0,01 M HCl, ki s pH~2,3 dobro ponazarja razmere v želodcu. Sledi hiter dvig pH do prvega platoja s pH~6,3. Odločili smo se za uporabo 50 mM raztopine NaHCO₃, saj smo želeli doseči čim hitrejši dvig. V poskusih Z1-Z5 smo poskušali ugotoviti, koliko časa moramo dovajati 50 mM NaHCO₃, da dosežemo ustrezno hiter dvig in kakšen hidrogenkarbonatni pufer moramo dovajati zatem, da dosežemo ustrezen plato pH. Po nekaj manjših popravkih (Z1-Z4) smo ugotovili, da je najbolj ustrezno, če 5 minut dovajamo 50 mM NaHCO₃, nato pa začnemo dovajati Hidrogenkarbonatni pufer 1 (HP1). HP1 smo zaradi zelene izvedbe platoja pH stabilizirali s plastjo parafinskega olja v čaši za dovajanje, medtem ko 50 mM NaHCO₃ v čaši za dovajanje nismo stabilizirali. Oba pufra smo iz omenjene čaše dovajali pri sobni temperaturi v delovno čašo, kjer smo medij segrevali na 37 °C. Izvedli smo dve paralelki uspešnega dviga pH (Z5a in Z5b), povprečje katerih je prikazano na sliki 11. S slike je razvidno, da je doseženo ujemanje s ciljnim profilom dobro. Natančnejši bi lahko bili v zaključnem delu dviga pH, kjer je naš dvig nekoliko prestrm, a bi s tem tvegali slabše ujemanje profilov v območju prvega platoja pH.



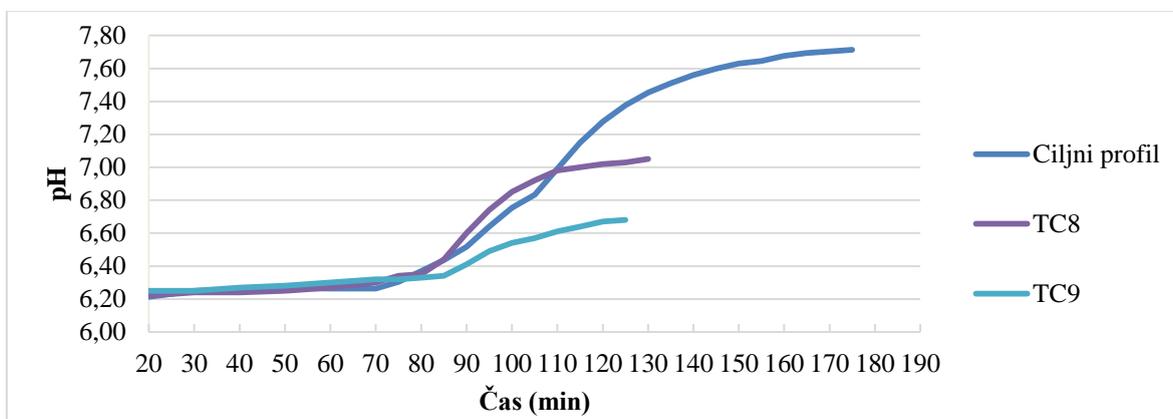
Slika 11: Ujemanje začetnega dela simuliranega (povprečje 2 paralelk) in ciljnega profila pH.

5.3.2 Simulacija profila pH v tankem črevesu do vključno drugega platoja

V nadaljevanju smo želeli ponazoriti počasen dvig pH pri prehodu iz proksimalnega v distalni del tankega črevesa. To smo izvedli z variranjem časov dodajanja posameznih pufrov ter njihovih pH. Iz raziskovalnega dela (29) smo razbrali, da simulacija počasnega dviga z enim samim pufrom ne bo mogoča, saj bi v primeru uvajanja hidrogenkarbonatnega pufra, ki ustreza drugemu platoju, pH narastel prehitro. V poskusih TC1-TC7 smo zato za ponazoritev počasnega dviga uporabili dva hidrogenkarbonatna pufra z različnim pH in še dodaten (tretji) pufer za ponazoritev drugega platoja profila. Z manjšimi modifikacijami časov dovajanja posameznega pufra smo se v poskusih TC1-TC6 postopoma približali zelenemu profilu, v poskusih TC7a-TC7c pa izvedli tri paralelke ustrezno simuliranega profila pH do drugega platoja. Prvi hidrogenkarbonatni pufer, ki smo ga uporabili za ponazoritev počasnega dviga je imel pH 6,3 in smo ga dovajali 23 minut, drugi pa je imel pH 6,9 in smo ga dovajali 26 minut. Za simulacijo drugega platoja smo uporabili pufer s pH 7,1 in ga stabilizirali s parafinskim oljem v čaši za dovajanje, saj smo želeli ohraniti vrednost pH 7,7 (plato pH) približno 150 minut. Ta pufer smo poimenovali HP3.

Navkljub uspešni simulaciji profila pH do drugega platoja pH s tremi hidrogenkarbonatnimi pufri je bil eden od ciljev te magistrske naloge izdelava profila pH na nezahteven način s čim manj uporabljenimi hidrogenkarbonatnimi pufri. Kot zapisano ti namreč zaradi svojih lastnosti zahtevajo pripravo tik pred njihovim uvajanjem v pretočni sistem. Zato smo se odločili, da poskusimo počasen dvig profila pH simulirati samo z enim hidrogenkarbonatnim pufrom in nato uporabiti drugega za simulacijo drugega platoja.

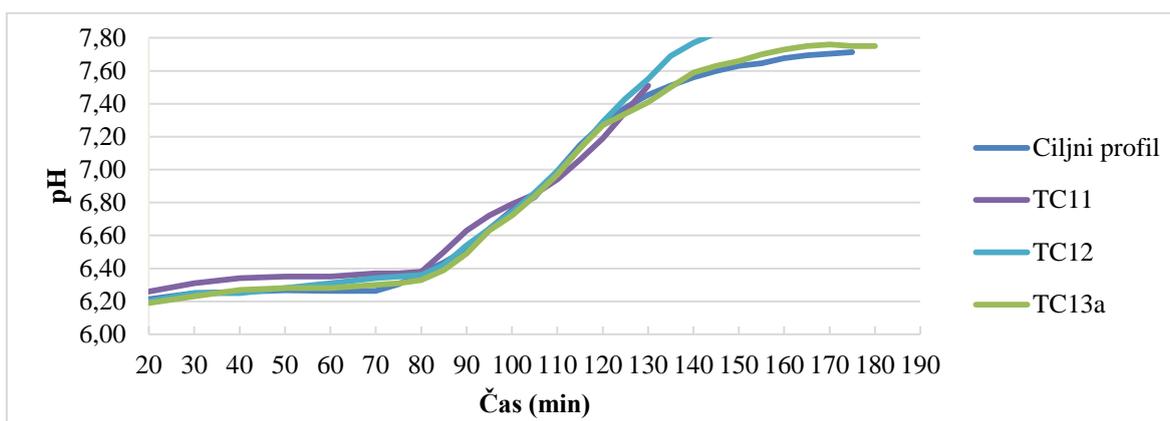
Izračunali smo, da bo za to potreben dvig pH za 1 enoto v obdobju 45 minut. Zavedali smo se, da hidrogenkarbonatni pufer s pH 6,3, ki smo ga uporabili za prvi del dviga v poskusih TC1-TC7 ne bo zadoščal za ponazoritev celotnega počasnega dviga, zato smo pripravili hidrogenkarbonatni pufer s pH 6,5. Na podlagi naraščanja pH v preliminarnih poskusih smo vedeli tudi, da samo ta ukrep ne bo zadostoval za dovolj hitro rast pH, zato smo pod čašo za dovajanje pufru postavili magnetno mešalo in pufer po začetnih 10 minutah dovajanja mešali pri hitrosti 70 obratov/minuto (poskus TC8). Rezultat poskusa TC8 je prikazan na sliki 12. Ugotovili smo, da pH po začetnem dvigu navkljub mešanju narašča veliko počasneje kot v ciljnem profilu. Naslednji smiseln ukrep za rast pH skozi daljše časovno obdobje je zato predstavljal zamenjavo čaše za dovajanje (poglavje 5.1.4). Namesto standardne 250 mL čaše za dovajanje, ki smo jo uporabljali v vseh prejšnjih simulacijah, smo v poskusu TC9 uporabili kristalizirko, poskus pa izvajali brez mešanja. Hkrati smo uporabili tudi pufer s pH 6,1 namesto pufru s pH 6,5, saj uporaba slednjega v čaši z večjim premerom ne bi bila smiselna. Ta bi namreč pomenila še hitrejšo rast pH v začetnem delu dviga. Ugotovili smo, da samo uporaba čaše za dovajanje z večjim premerom ne bo zadostovala za ponazoritev počasnega dviga. Rešitev smo zato iskali v hkratni uporabi čaše za dovajanje z večjim premerom (kristalizirke) in mešanja medija v njej.



Slika 12: Počasen dvig pH, ki ponazarja prehod iz proksimalnega v distalni del tankega črevesa pri poskusih TC8 in TC9 v primerjavi s počasnim dvigom pH v ciljnem profilu.

V naslednjih poskusih (TC10 in TC11) smo glede na prejšnje ugotovitve pripravili pufer s pH 6,2 in po približno 20 minutah uvajanja pufru pričeli z mešanjem medija v kristalizirki kot čaši za dovajanje. V poskusu TC11 smo ugotovili, da s hitrostjo mešanja 120 obratov/minuto ustrezno ponazorimo počasen dvig pH v tankem črevesu. Težavo je predstavljalo dejstvo, da pH v čaši za dovajanje in posledično v delovni čaši narašča še nekaj časa po prenehanju mešanja, kar je razvidno s slike 13 (poskus TC12). Tej težavi

smo se izognili tako, da smo medij mešali le del časa med uvajanjem hidrogenkarbonatnega pufra s pH 6,2. Po točno 10 minutah dovajanja pufra, smo pričeli mešanje medija v čaši za dovajanje s hitrostjo 120 obratov/minuto, medtem ko smo isti medij še vedno dovajali. Po 18 minutah smo mešanje izklopili in dovajali medij še 19 minut – skupno torej 47 minut (poskus TC13a), s čimer smo dosegli želeni profil pH. Ponovljivost poskusa TC13a smo preverili s paralelko TC13b in nato pri simulaciji celotnega profila pH. Hidrogenkarbonatni pufer s pH 6,2 smo zaradi uporabe v končnem profilu pH poimenovali Hidrogenkarbonatni pufer 2 (HP2).



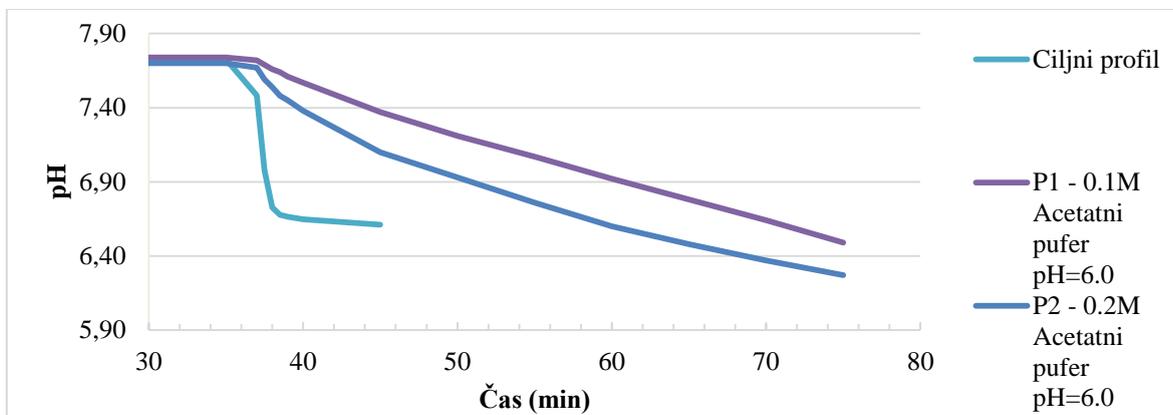
Slika 13: Počasen dvig pH, ki ponazarja prehod iz proksimalnega v distalni del tankega črevesa pri poskusih TC11, TC12 in TC13a v primerjavi s počasnim dvigom pH v ciljnem profilu.

5.3.3 Simulacija profila pH pri prehodu iz tankega v debelo črevo

V zadnjem delu profila pH smo želeli ponazoriti padec pH pri prehodu iz distalnega ileuma v začetni del debelega črevesa oziroma cekum. Simulacije tega dela profila pH nismo izvajali s pomočjo hidrogenkarbonatnih pufrov, temveč z uporabo acetatnih pufrov. Acetatni pufri namreč predstavljajo boljši približek fiziološkim pogojem v debelem črevesu od hidrogenkarbonatnih pufrov (24). Zaradi v uvodu omenjenega širokega območja izmerjenih vrednosti pH v cekumu 5,5-7,8, smo se odločili, da v tej nalogi izvedemo simulacijo dveh padcev pH in sicer padec za približno 1 enoto pH in padec za približno 2 enoti pH. Poskuse smo izvajali tako, da smo pred začetkom poskusa v cevke in v delovno čašo natočili HP3, ki smo ga uporabljali za simulacijo drugega platoja pH v tankem črevesu pred prehodom v cekum. Odločili smo se, da simulacijo profila pH v debelem črevesu izvajamo daljši čas kot v ciljnem profilu, tako da po padcu želene pH vzdržujemo še nadaljnjih 30 minut.

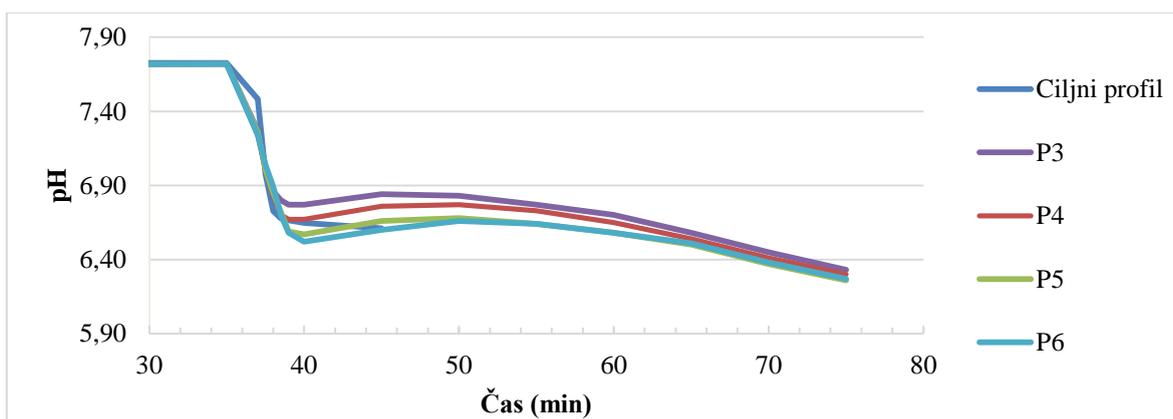
Hitrost padca pH smo sprva ugotavljali z uvajanjem 0,1 M acetatnega pufra s pH 6,0 (poskus P1). Na sliki 14 je prikazan padec pH za poskus P1, kjer lahko opazimo, da je

hitrost padca prenizka, zato smo se odločili, da poskusimo padec doseči še s pufrom z dvakrat večjo koncentracijo (poskus P2). Tudi v tem primeru je bila hitrost padanja vrednosti pH prenizka, zato smo se odločili, da v nadaljnjih poskusih začetni del padca ponazorimo z očetno kislino.



Slika 14: Padec pH, ki ponazarja prehod iz distalnega dela tankega črevesa v cekum pri poskusih P1 in P2 v primerjavi s padcem pH v ciljnem profilu.

V poskusih P3-P6 (slika 15) smo padec pH ponazoril iz začetnim dovajanjem 0,1 M očetne kisline in nato 0,2 M acetatnega pufru s pH 6,2. V posameznem poskusu smo variirali čas dovajanja očetne kisline. V poskusu P3 smo očetno kislino dovajali 2 minuti, v vsakem naslednjem poskusu (P4-P6) pa 20 sekund več kot v prejšnjem. S pomočjo očetne kisline smo dosegli padec, ki dobro posnema ciljani profil pH, a naleteli na težavo, saj se je pH po padcu začel dvigati. Vzrok je ostanek hidrogenkarbonatnega pufru v delovni čaši, ki mu s časom narašča pH.



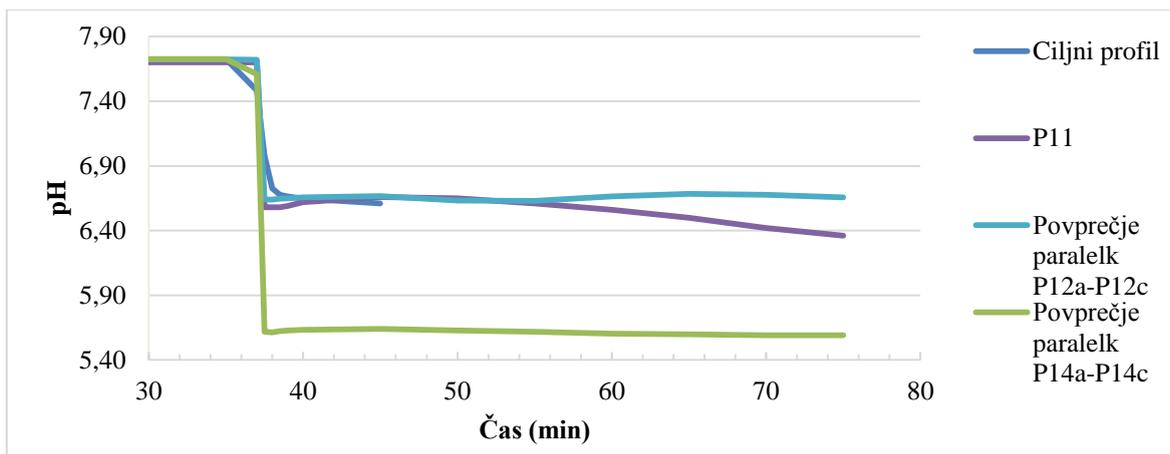
Slika 15: Padec pH, ki ponazarja prehod iz distalnega dela tankega črevesa v cekum pri poskusih P3-P6 v primerjavi s padcem pH v ciljnem profilu.

Rešitev za težavo naraščanja pH smo rešili z direktnim dodatkom 0,1 M očetne kisline v delovno čašo in dovajanjem ustreznega acetatnega pufru preko cevke pretočnega sistema. V nadaljnjih poskusih očetne kisline nismo dovajali prek pretočnega sistema, ampak direktno

v delovno čašo z enkratnim vbrizgom iz avtomatske pipete. Dosegli smo strm padec pH (poskusi na sliki 16), ki se zadovoljivo ujema s padcem pH v ciljnem profilu. Padec pH za ~1 enoto smo dosegli z dodatkom 4,0 mL 0,1 M očetne kisline v delovno čašo. Naslednja modifikacija, ki smo jo naredili, da bi preprečili naraščanje pH po padcu, je bila dovajanje 0,2 M acetatnega pufra s pH 6,1. Z nizkim pH pufra in njegovo koncentracijo 0,2 M smo dosegli, da pH v delovni čaši ni naraščal.

V poskusu P11 (slika 16) smo poskušali celoten zadnji del profila ponazoriti z enim samim pufrom. Kot zapisano, smo za preprečitev naraščanja pH po padcu uporabili 0,2 M acetatni pufer s pH 6,1. Uporaba omenjenega pufra ima za negativno posledico padanje vrednosti pH v zadnjem delu platoja. To dogajanje lahko pojasnimo z razlago, da pH pada sočasno s tem, ko se v delovni čaši zmanjšuje delež hidrogenkarbonatnega pufra oz. prihaja do nevtralizacije njegove bazične komponente. Nižji pH acetatnega pufra od pH platoja takrat povzroči hitro padanje vrednosti pH raztopine. Ugotovili smo, da bo za vzdrževanje konstantne vrednosti pH potrebna uporaba dodatnega acetatnega pufra. Po 16 minutah dovajanja 0,2 M acetatnega pufra s pH 6,1 smo zato začeli dovajati 0,1 M acetatni pufer s pH 6,4, ki smo ga dovajali nadaljnjih 25 minut. Naredili smo tri paralelke (P12a-P12c), katerih rezultati so prikazani na sliki 16. Potrebno je opozoriti, da je tudi v tem primeru ob koncu dovajanja pH začel malenkostno padati. To bi lahko preprečili z dodatno zamenjavo s pufrom s pH 6,6, kar predstavlja tudi približno vrednost našega platoja. Predpostavimo lahko, da je v nasprotju s hidrogenkarbonatnimi pufri pH acetatnih pufrov enak v čaši za dovajanje in delovni čaši (velja za primere, kjer ni vpliva drugih zvrsti, npr. hidrogenkarbonata). pH acetatnih pufrov namreč za razliko od hidrogenkarbonatnih pufrov ni občutljiv na mehanske in temperaturne spremembe, katerim je izpostavljen medij.

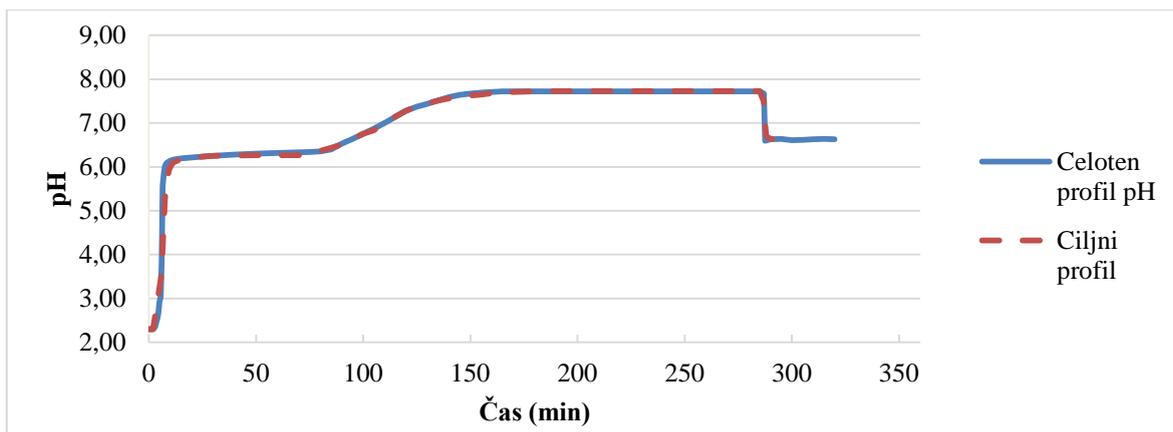
Padec pH za ~2 enoti smo dosegli z dodatkom 13,0 mL 0,1 M očetne kisline in dovajanjem 0,2 M acetatnega pufra s pH 5,6. Povprečje paralelk P14a-P14c je prikazano na sliki 16. V tem primeru uporaba dveh acetatnih pufrov ni bila potrebna, saj očetna kislina v kombinaciji z 0,2 M acetatnim pufrom učinkovito nevtralizira hidrogenkarbonat v delovni čaši, hkrati pa njegov pH predstavlja tudi vrednost platoja, ki smo ga želeli doseči.



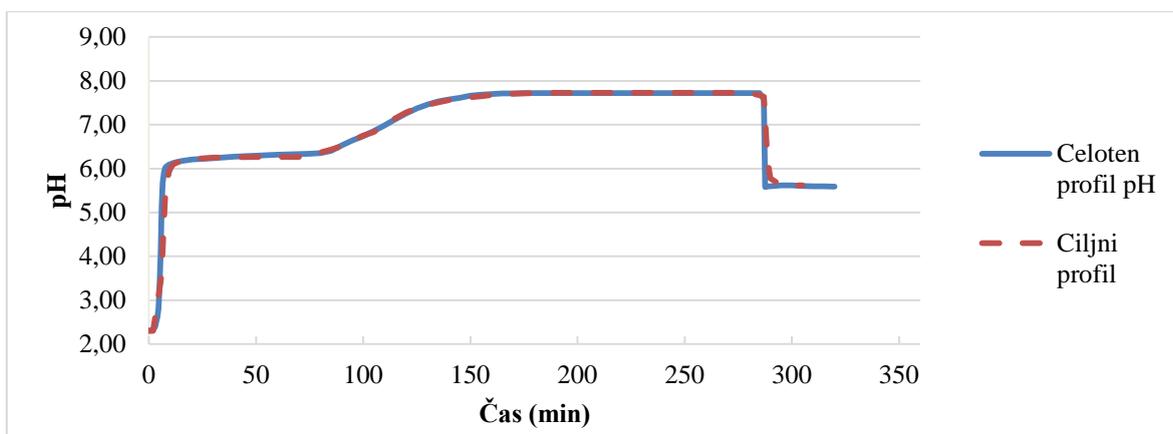
Slika 16: Padec pH, ki ponazarja prehod iz distalnega dela tankega črevesa v cekum pri poskusih P11, P12 in P14 v primerjavi s padcem pH v ciljnem profilu.

5.3.4 Simulacija celotnega profila pH

S sklopitvijo poskusov, predstavljenih v poglavjih 5.3.1-5.3.3, smo simulirali celoten profil pH. Izvedli smo simulacijo profila s padcem pH za približno 1 enoto pH, ki smo ga poimenovali profil pH I in profila s padcem pH za približno 2 enoti pH, ki smo ga poimenovali profil pH II. Rezultati obeh simulacij so prikazani na sliki 17 in sliki 18. Pri sklopitvi poskusov smo naleteli na težavo ob dodatku oetne kisline za ponazoritev padca pH v zadnjem delu profila. Pri uporabi količine oetne kisline, ki smo jo določili v poskusih P12 in P14 je pH padel nižje kot v omenjenih poskusih. Poskusa P12 in P14 smo namreč izvajali brez predhodne simulacije celotnega drugega platoja (37 min namesto 155 min). To lahko pojasnimo z naslednjo predpostavko. Daljši čas dovajanja hidrogenkarbonatnega pufra pomeni tudi manjšo pufrsko kapaciteto le-tega, kar se nato odrazi v bolj izrazitem padcu pH ob doziranju enake količine oetne kisline. Težavo smo rešili tako, da smo ponovno določili količino oetne količine, ki je potrebna za dosego padca pH (poskusi CP1-CP3). Ugotovili smo, da je za ponazoritev padca v primeru profila pH I potrebno 3,7 mL (namesto 4,0 mL) 0,1 M oetne kisline, za ponazoritev padca v primeru profila pH II pa 11,0 mL (namesto 13,0 mL) 0,1 M oetne kisline.



Slika 17: pH profil I - simulacija celotnega profila. Prikazano je povprečje 3 paralelk.

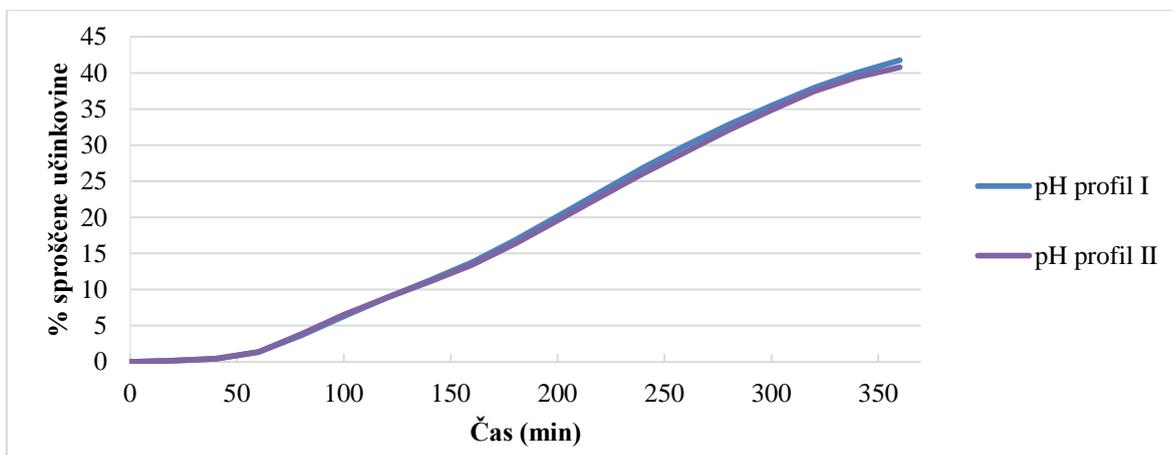


Slika 18: pH profil II - simulacija celotnega profila. Prikazano je povprečje 3 paralelk.

5.4 Poskusi sproščanja

Sproščanja smo izvajali s tabletami iz 25% natrijevega diklofenaka (Na-DF) in 75% hidroksipropil metilceluloze (HPMC). Gre za ogrodne tablete, ki v procesu sproščanja tvorijo gelsko plast, prek katere poteka sproščanje učinkovine v okoliški medij. Zaradi gelske plasti se čas sproščanja podaljša, tako da govorimo o t.i. podaljšanem sproščanju. V tem delu naloge smo v zaporedju medijev, ki ustrezajo obema razvitima profiloma pH, sproščali učinkovino iz tablet HPMC z Na-DF (slika 19). V vseh poskusih sproščanja je prišlo do plavanja tablete, pri čemur se je čas, v katerem je prišlo do tega pojava, razlikoval med posameznimi poskusi. V poskusu CP4a je tako tableta začela plavati po 80 minutah poskusa, v poskusu CP4b po 200 minutah, v poskusih CP5a in CP5b pa po 70 minutah poskusa. Težave z zagotavljanjem enakomernih hidrodinamskih sil na tablete pri sproščanju v hidrogenkarbonatnih pufrih so imeli že Boni in sodelavci (27). Avtorji so ugotovili, da se mehurčki izhajajočega $\text{CO}_2(\text{g})$ ujamejo v gelsko plast tablete in povzročijo, da se ta dvigne na gladino medija. V našem primeru, kjer se tableta dvigne s površine steklenih kroglic to pomeni, da odstranjevanje gelske plasti prek mehanske obremenitve

kroglic na FO ne poteka več. Kljub temu, se rezultati sproščanja med paralelkami za posameznem profilu niso pomembno razlikovali (poglavje 4.5). Fadda in sodelavci so v svojem delu (27) naleteli tudi na težavo raztapljanja učinkovine v plasti parafinskega olja. Temu problemu smo se v naših poskusih izognili, saj smo stabilizirali pufer v čaši za dovajanje namesto v delovni čaši.



Slika 19: %sproščene učinkovine v odvisnosti od časa za pH profil I in pH profil II. Za vsak profil je prikazano povprečje 3 paralelk.

Delež sproščene učinkovine v zadnjem delu profila (od 320 minute dalje) se sklada s teoretičnim in praktičnim znanjem o sproščanju Na-DF iz literature. Na-DF je učinkovina s kislno karboksilno skupino ($pK_a=4,0$), katerega topnost je močno odvisna od pH medija. V kisljih pogojih (npr. želodčni medij) ima diklofenak zelo nizko topnost ($\sim 3,6 \mu\text{g/mL}$), topnost pa se zviša pri vrednostih pH, ki presegajo vrednost pK_a (intestinalna tekočina) (30). Iz grafa na sliki 19 lahko vidimo, da je v prvih 40 minutah, ko smo v delovno čašo dovajali 0,1 M HCl, sproščanje Na-DF iz tablet minimalno. Po tem času smo v delovno čašo začeli dovajati NaHCO_3 – poleg vrednosti pH se je začel dvigati tudi delež sproščene učinkovine, kar se sklada s podatki o topnosti Na-DF pri različnih vrednostih pH. Naši rezultati kažejo tudi, da se je v zadnjih 40 minutah sproščanja v pH profilu I sprostil 9,3% (povprečje treh paralelk) vse sproščene učinkovine, v pH profilu II pa 8,1% vse sproščene učinkovine. Glede na hitrejše raztapljanje Na-DF v mediju z višjim pH so ti rezultati skladni s teorijo. Opozoriti velja, da direktno dodajanje oetne kisline v delovno čašo pomeni, da se je volumen medija za sproščanje v naših poskusih povečal, s čimer je prišlo do redčenja sproščene učinkovine. Ker je sistem v razvojni fazi in ta način predstavlja samo eno od faz pri rutinski uporabi hidrogenkarbonatnih pufrov v testih sproščanja, pri sproščanju redčenja medija zaradi dodane oetne nismo upoštevali. V prihodnosti je potrebna optimizacija postopka in tudi upoštevanje redčenja, če bo ta postopek uporabljen.

6 SKLEPI

Cilj te magistrske naloge je bil razviti sistem, osnovan na uporabi hidrogenkarbonatnih pufrov, v katerem bo izvedba testov sproščanja preprosta, ponovljiva in bolj biorelevantna. Pri doseganju zastavljenega cilja smo prišli do naslednjih sklepov:

1. Priprava hidrogenkarbonatnih pufrov zahteva od nas konsistentnost in natančnost v največji možni meri, s čimer se izognemo nepredvidenemu spreminjanju vrednosti pH pufra.
2. Priprava hidrogenkarbonatnega pufrja je potrebna tik pred njegovo uporabo na pretočnem sistemu. S tem zagotovimo pufrski sistem z enako kapaciteto in vrednostjo pH ob začetku vsakega poskusa ter povečamo ponovljivost poskusov.
3. Na rast pH hidrogenkarbonatnega pufrja močno vplivajo: mehanski stres (mešanje, rokovanje), temperatura medija in premer čaše, v kateri merimo spremembe pH. Volumen medija na spremembe pH ne vpliva.
4. Parafinsko olje v obliki tanke plasti nad medijem predstavlja učinkovit in lahko izvedljiv način stabilizacije hidrogenkarbonatnih pufrov.
5. Termodinamska nestabilnost hidrogenkarbonatnih pufrov z izhajanjem $\text{CO}_2(\text{g})$ lahko predstavlja pomembno prednost pri simulaciji profilov pH. Za ponazoritev dviga pH pri simulaciji profila namreč poskrbijo kar lastnosti hidrogenkarbonatnega pufrja, s čimer zmanjšamo število potrebnih pufrov za simulacijo določenega odseka profila pH.
6. Kapaciteta in visoka molarnost hidrogenkarbonatnega pufrja onemogočata enostavno posnemanje padcev pH, ki ponazarjajo prehod skozi ileo-cekalno zaklopko. Za doseg manjših padcev pH je zato potrebno direktno doziranje očetne kisline v delovno čašo.

V magistrski nalogi smo uspešno izvedli simulacijo dveh profilov pH medijev gastrointestinalnega trakta s hidrogenkarbonatnim pufrom. Pri tem smo uspeli zagotoviti ponovljivost simulacije, navkljub nestabilnosti hidrogenkarbonatnih pufrskih sistemov. V drugem delu magistrske naloge smo na modelih z razvitimi pH profili na pretočnem sistemu s kroglicami izvajali sproščanja učinkovine iz tablet HPMC z Na-DF. Težavo v primerih sproščanja so predstavljale hidrodinamske sile, ki so posledica izhajajočega $\text{CO}_2(\text{g})$ in povzročijo dvig tablete po določenem času, vendar vpliva na rezultate sproščanja nismo zaznali. Izvedba testov sproščanja se je izkazala za enostavno izvedljivo in ponovljivo.

7 LITERATURA

1. Vantrappen GR, Peeters TL, Janssens J: The secretory component of the interdigestive migrating motor complex in man. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1979; 14 (6): 663-667.
2. Rees WDW, Botham D, Turnberg LA: A demonstration of bicarbonate production by the normal human stomach *in vivo*. *Digestive diseases and sciences* 1982; 27 (11): 961-966.
3. Johnson JL, Holinej J, Williams MD: Influence of ionic strength on matrix integrity and drug release from hydroxypropyl cellulose compacts. *International journal of pharmaceutics* 1993; 90 (2): 151-159.
4. Charney AN, Donowitz M: *Acid-base disorders and their treatment*. Taylor and Francis, Boca Raton, 2005: 209-240.
5. Brinkmann A, Glasbrenner B, Vlatten A, Eberhardt H, Geldner G, Radermacher P, Georgieff M, Wiedeck H: Does gastric juice pH influence tonometric PCO₂ measured by automated air tonometry? *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001; 163 (5): 1150-1152.
6. Odes HS, Hogan DL, Steinbach JH, Ballesteros MA, Koss MA, Isenberg JI: Measurement of gastric bicarbonate secretion in the human stomach: different methods produce discordant results. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1992; 27 (10): 829-836.
7. Hogan DL, Ainsworth MA, Isenberg JI: Gastroduodenal bicarbonate secretion. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 1994; 8 (5): 475-488.
8. Ham M, Akiba Y, Takeuchi K, Montrose MH, Kaunitz D: Gastroduodenal mucosal defense physiology of the gastrointestinal tract. *Physiology of the gastrointestinal tract*, Elsevier, London, 2012: 1169-1208.
9. Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressman JB: Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of pharmaceutical sciences* 1997; 86 (3): 269-282.
10. Goo LM, Muallem S: Physiology of duct cell secretion. *Pancreas: an integrated textbook of basic science, medicine, and surgery*, Blackwell publishing limited, Oxford, 2009: 78-90.

11. Pandol SJ: Regulation of whole-organ pancreatic secretion, Morgan & Claypool life sciences, San Rafael, 2010: 1-6.
12. Wheeler HO, Ramos OL, Whitlock RT: Electrolyte excretion in bile. *Circulation* 1960; 21 (5): 988-996.
13. Gennari FJ, Weise WJ: Acid-base disturbances in gastrointestinal disease. *Clinical journal of the american society of nephrology* 2008; 3 (6): 1861-1868.
14. Krieg BJ, Taghavi SM, Amidon GL, Amidon GE: *In vivo* predictive dissolution: Transport analysis of the CO₂, bicarbonate *in vivo* buffer system. *Journal of pharmaceutical sciences* 2014; 103 (11): 3473-3490.
15. Isenberg JI, Selling JA, Hogan DL, Koss MA: Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *New England Journal of medicine* 1987; 316 (7): 374-379.
16. Sjöblom M: Duodenal epithelial sensing of luminal acid: role of carbonic anhydrases. *Acta Physiologica* 2011; 201 (1): 85-95.
17. Repishti M, Hogan DL, Pratha V, Davydova L, Donowitz M, Tse CM, Isenberg JI: Human duodenal mucosal brush border Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3 alter net bicarbonate movement. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology* 2001; 281 (1): G159-G163.
18. Sheng JJ, McNamara DP, Amidon GL: Toward an *in vivo* dissolution methodology: a comparison of phosphate and bicarbonate buffers. *Molecular pharmaceuticals* 2009; 6 (1): 29-39.
19. Banwell JG, Gorbach SL, Pierce NF, Mitra R, Mondal A: Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics: II. Alterations in intestinal fluid and electrolyte movements. *Journal of clinical investigation* 1971; 50 (4): 890.
20. McNamara DP, Whitney KM, Goss SL: Use of a physiologic bicarbonate buffer system for dissolution characterization of ionizable drugs. *Pharmaceutical research* 2003; 20 (1): 1641-1646.
21. Garbacz G, Kołodziej B, Koziol M, Weitschies W, Klein S: A dynamic system for the simulation of fasting luminal pH-gradients using hydrogen carbonate buffers for dissolution testing of ionisable compounds. *European journal of pharmaceutical sciences* 2014; 51: 224-231.
22. Kalantzi L1, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C: Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions

- simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical research* 2006; 23 (1): 165-176.
23. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW: Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International journal of pharmaceutics* 2008; 364 (2): 213-226.
24. Fadda HM, Merchant HA, Arafat BT, Basit AW: Physiological bicarbonate buffers: stabilisation and use as dissolution media for modified release systems. *International journal of pharmaceutics* 2009; 382 (1): 56-60.
25. Garbacz G, Kołodziej B, Koziol M, Weitschies W, Klein S: An automated system for monitoring and regulating the pH of bicarbonate buffers. *AAPS PharmSciTech* 2013; 14 (2): 517-522.
26. Liu F, Merchant HA, Kulkarni RP, Alkademi M, Basit AW: Evolution of a physiological pH 6.8 bicarbonate buffer system: application to the dissolution testing of enteric coated products. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 2011; 78 (1): 151-157.
27. Boni JE, Brickl RS, Dressman J: Is bicarbonate buffer suitable as a dissolution medium? *Journal of pharmacy and pharmacology* 2007; 59 (10): 1375-1382.
28. Ločičnik B: Vpliv variiranja pH in časov zadrževanja tablet v mediju s simuliranim profilom pH prebavnega trakta na sproščanje natrijevega diklofenakata. Magistrsko delo 2016. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
29. Felicijan T: Simulacija pH profila tankega črevesa s hidrogenkarbonatnim pufrom. Raziskovalno delo 2015. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
30. Garbacz G, Weitschies W: Investigation of dissolution behavior of diclofenac sodium extended release formulations under standard and biorelevant test conditions. *Drug development and industrial pharmacy* 2010; 36 (5): 518-530.