

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA GLAVAČ

PONAZARJANJE SIL V ŽELODCU NA PRETOČNEM SISTEMU S
KROGLICAMI IN NJIHOV VPLIV NA SPROŠČANJE IZ TABLET

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA GLAVAČ

**PONAZARJANJE SIL V ŽELODCU NA PRETOČNEM SISTEMU S
KROGLICAMI IN NJIHOV VPLIV NA SPROŠČANJE IZ TABLET**

**SIMULATION OF GASTRIC FORCES USING FLOW-THROUGH
SYSTEM WITH GLASS BEADS AND THEIR INFLUENCE ON DRUG
RELEASE FROM TABLETS**

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

Zahvala

Mentorici, izr. prof. dr. Mariji Bogataj, se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in pomoč pri diplomskem delu. Najlepše se zahvaljujem tehnični sodelavki Greti Cof za mnoge praktične nasvete in vesele trenutke v laboratoriju. Hvala tudi asist. dr. Igorju Locatelliju za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se staršem, da so mi omogočili brezskrben študij in nenazadnje hvala tudi Blažu, ker mi je vso pot stal ob strani.

Izjava

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

VSEBINA

1. POVZETEK	4
2. SEZNAM OKRAJŠAV	5
3. UVOD	7
3.1. Želodec	7
3.1.1. Anatomija, histologija	7
3.1.2. Fiziologija	8
3.2. Motiliteta	9
3.3. Migracijski motorični kompleks	10
3.3.1. Časovni potek MMC-ja	11
3.4. Mehanski dogodki med MMC-jem	12
3.4.1. Spremembe tlaka med kontrakcijami	13
3.4.1.1. Faza I	13
3.4.1.2. Faza II	13
3.4.1.3. Faza III	13
3.4.2. Sile med kontrakcijami	15
3.4.3. Hitrost potovanja kontrakcij	16
3.5. Pylorus	16
3.5.1. Izolirani pilorični valovi	17
3.6. Metode za merjenje mehanskih obremenitev <i>in vivo</i>	18
3.6.1. Manometrija	18
3.6.2. Manometrija s pomočjo kapsule	19
4. NAMEN DELA	20
5. MATERIALI IN METODE	21
5.1. Materiali in aparature	21
5.2. Metode	23
5.2.1. Priprava medijev za raztapljanje	23
5.2.2. UV spektrofotometrija	24
5.2.3. Umeritev avtomatske pipete	24
5.2.4. Določanje enačb umeritvenih premic	24

5.2.4.1. Umeritvena premica natrijevega diklofenakata:	24
5.2.4.2. Umeritvena premica tramadolijevega klorida:	25
5.2.5. Testi sproščanja	25
5.2.5.1. Sproščanje učinkovine iz tablet na pretočnem sistemu s kroglicami	25
5.2.5.2. Mehanske obremenitve pri testih sproščanja	27
5.2.6. Določitev vpliva uporabljenih ovir na absorbanco	30
5.2.7. Izračun profila sproščanja	30
5.2.8. Statistična analiza	31
5.2.8.1. Izračun $t_{50\%}$ iz profilov sproščanja	32
6. REZULTATI	33
6.1. Določanje enačb umeritvenih premic	33
6.1.1. Določanje enačb umeritvenih premic natrijevega diklofenakata	33
6.1.2. Določanje enačb umeritvenih premic tramadolijevega klorida	34
6.2. Testi sproščanja	35
6.2.1. Profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet	35
6.2.2. Profili sproščanja tramadolijevega klorida iz Tramal tablet	51
6.3. Vpliv uporabljenih ovir na absorbanco pri testih sproščanja	55
6.4. Rezultati statistične analize	56
6.4.1. Sproščanje natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet	56
6.4.1.1. Vpliv količine steklenih kroglic	56
6.4.1.2. Vpliv hitrosti vrtenja magnetnega mešala	57
6.4.1.3. Vpliv dodatka ovir	58
6.4.2. Sproščanje tramadolijevega klorida iz Tramal tablet	60
7. RAZPRAVA	61
7.1. Aparatura za teste sproščanja	63
7.2. Oblika profilov sproščanja učinkovine iz tablete	63
7.3. Vpliv količine steklenih kroglic	65
7.4. Vpliv hitrosti vrtenja magnetnega mešala	66
7.5. Vpliv dodatka steklene palčke	67
7.6. Vpliv dodatka mrežastega pokrova	69

7.7. Vpliv dodatka silikonske ovire	71
7.8. Vpliv obremenitev na sproščanje tramadolijevega klorida iz tablet	72
7.9. Ovrednotenje proučevanih obremenitev	73
7.10. Možnosti nadaljnje optimizacije metode sproščanja	74
8. SKLEP	75
9. LITERATURA	77

1. POVZETEK

Zaradi motorične aktivnosti želodca in pilorusa je farmacevtska oblika izpostavljena različnim mehanskim obremenitvam, ki lahko vplivajo na sproščanje učinkovine iz oblike. Zato smo skušali v sklopu diplomske naloge na pretočnem sistemu s kroglicami ponazoriti sile v želodcu na tešče. Proučevana farmacevtska oblika je bila Voltaren® retard filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg, za katero je značilen pojav več vrhov v plazemskem profilu po peroralnem zaužitju. Eden od vzrokov za to je mehanska občutljivost tablet, ki se odraža v povečanem sproščanju natrijevega diklofenakata ob prehodu skozi pilorus in ileocekalni sfinkter. S spreminjanjem mehanske obremenitve z različnimi pogoji med testom sproščanja smo želeli izbrati tistega, s katerim bi najbolje ponazorili pojav obeh plazemskih vrhov. Za oceno vpliva smo nekatere pogoje preizkusili tudi na Tramal® filmsko obloženih tabletah s podaljšanim sproščanjem 100 mg.

V pretočnem sistemu s kroglicami smo začasno mehansko obremenitev, ki je delovala na tableto, dosegli s povečanjem hitrosti vrtenja magnetnega mešala ali z dodatkom ovir. Kot oviro smo izbrali kovinski mrežast pokrov, plastični mrežast pokrov, silikonsko oviro in stekleno palčko, ki smo jo vstavili do različnih globlin ob različnih časih testa sproščanja. Medij za sproščanje smo uporabili umetni želodčni sok (pH 1,2) in umetni črevesni sok (pH 6,8).

Ugotovili smo, da je dodatek ovir in povečano mešanje imelo značilen vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata. Na sproščanje tramadolijevega klorida izbrani pogoji niso imeli značilnega vpliva oziroma je bil le-ta minimalen. Sproščanje natrijevega diklofenakata se je izrazito povečalo ob dodatku kovinskega mrežastega pokrova in silikonske ovire. Pri tem smo opazili, da se pri ovirah lahko pojavi problem grobe površine ali ostrih robov, ki oddrgnejo in opraskajo tableto, kar se v fizioloških pogojih ne dogaja. Kljub temu lahko izpostavimo, da se je gibanje tablete pri uporabi silikonske ovire najbolj približalo prehodu skozi pilorus, saj je ovira tableto potisnila globoko med steklene kroglice in povečala pritisk na tableto iz vseh smeri. S preiskušanimi obremenitvami se vseeno nismo približali fiziološkemu pogojem, saj se v plazemskem profilu pojavi vrh, torej povečanemu sproščanju sledi njegovo zmanjšanje. V naših poskusih je prišlo do povečanega sproščanja, vendar zmanjšanje ni sledilo.

Za optimizacijo metode sproščanja je potrebna izbira ustrezne ovire ali drugačen pristop povečanja sile na farmacevtsko obliko.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

GIT – gastrointestinalni trakt

IPPW – izolirani pilorični valovi

K1 – oznaka pogoja sproščanja: 15 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min

K2 – oznaka pogoja sproščanja: 25 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min

K3 – oznaka pogoja sproščanja: 40 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min

K3/150 – oznaka pogoja sproščanja: 40 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 min poskusa je bila hitrost vrtenja magnetnega mešala 150 obratov/min

K4 – oznaka pogoja sproščanja: 55 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min

M1 – oznaka pogoja sproščanja: 40 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 100 obratov/min

M2 – oznaka pogoja sproščanja: 40 g steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala 150 obratov/min

MMC – migracijski motorični kompleks

NS – neznačilen vpliv faktorja

O1/20 – oznaka ovire: kovinski mrežast pokrov dodan med 120-140 min poskusa, pogoj sproščanja K3

O1/5 – oznaka ovire: kovinski mrežast pokrov dodan med 120-125 min poskusa, pogoj sproščanja K3

O2 – oznaka ovire: plastičen mrežast pokrov dodan med 120-140 min poskusa, pogoj sproščanja K3

O3 – oznaka ovire: steklena palčka dodana od 120 min poskusa dalje, do nivoja kroglic, pogoj sproščanja K3

O4 – oznaka ovire: steklena palčka dodana od 120 min poskusa dalje, 1 cm pod gladino medija, pogoj sproščanja K3

O4/120 – oznaka ovire: steklena palčka dodana začetnih 120 min poskusa, 1 cm pod gladino medija, pogoj sproščanja K3

O5 – oznaka ovire: silikonska ovira 1 dodana med 120-125 min poskusa do kroglic, pogoj sproščanja K3

O6 – oznaka ovire: silikonska ovira 2 dodana med 120-125 min poskusa do kroglic, pogoj sproščanja K3

S – značilen vpliv faktorja

SD – standardna deviacija

$t_{50\%}$ - čas, ko se je sprostilo 50 % učinkovine

t_{lag} – časoven zamik začetka sproščanja

USP – The United States Pharmacopeia

3. UVOD

V gastrointestinalnem traktu je farmacevtska oblika izpostavljena prebavnim sokovom, ki s svojo sestavo vplivajo na sproščanje učinkovine in tudi mehanskim obremenitvam. Stik sluznice s farmacevtsko obliko in pritisk stene prebavne cevi na obliko pomembno vplivata na njeno raztapljanje. Če tableta razpade na več manjših delcev, se poveča njihova skupna površina in če se zmanjša debelina difuznega sloja okoli delca, potem se hitrost raztapljanja poveča. Mehanske obremenitve tako vplivajo na dva parametra, ki vplivata na hitrost raztapljanja učinkovine na površini trdnega delca in jih opisuje Noyes – Whitneyeva enačba (enačba 1) (1).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D \cdot S}{h \cdot V} \cdot (c_s - c) \quad (1)$$

V enačbi 1 dc/dt predstavlja hitrost raztapljanja učinkovine v času t , D difuzijski koeficient, A površina delca, c_s koncentracijo učinkovine v difuznem sloju (topnost), c koncentracijo učinkovine v vodnem mediju in h debelino difuznega sloja.

3.1. Želodec

3.1.1. Anatomija, histologija

Želodec je najširši del prebavne cevi. Leži v zgornjem delu trebušne votline tik pod trebušno prepono. Lega želodca je sicer odvisna od tonusa trebušnih mišic in lege organov okoli njega, vendar večji del želodca leži na levi strani. Pri pokončni drži ima želodec obliko črke J. Njegova oblika je odvisna od polnitve ter tonusa mišičja in se zelo spreminja. Prostornina praznega želodca je približno 50 ml, polnega pa od 1000 do 1500 ml (2).

Vhod v želodec je želodčno ustje, kardija. Del želodca nad kardijo je kupolast – želodčni svod (fundus), v njem je vedno nekaj zraka. Največji del želodca zavzema telo (korpus), ki je pod ravnjo kardije. Zožen spodnji del želodca je pilorični del, ki ga delimo v začetni razširjeni del – antrum in ožji del – pilorični kanal, ki se konča z vratarjem (pilorus). Od požiralnika do dvanajstnika poteka po desni mala želodčna krivina, na levi pa velika želodčna krivina. Zunaj pokriva želodec potrebušnica (peritonej), ki prehaja z male krivine navzgor na jetra, z velike krivine pa navzdol na prečno debelo črevo (2; 3).

Na notranjem površju želodca so vidne številne gube. Želodčna steno sestavljajo sluznica, podsluznica, mišična plast in seroza. Sluznico sestavlja enoskladni visokoprizmatški epitelij, vezivna lamina propria z žlezami in mišična plast sluznice. Žleze v lamini propiji fundusa in korpusa želodca so iz petih vrst celic: iz nediferenciranih, mukoidnih, pepsinogenih, acidogenih in enteroendokrinih. Rahlo vezivno tkivo s posameznimi maščobnimi celicami sestavlja podsluznico. Mišična plast je iz v različnih smereh urejene gladke mišičnine. Zunanja vzdolžna plast, srednja krožna plast in notranja prečna plast mišičja. Prečna plast je dodatna tretja plast mišičja v želodcu, ki je najbolj vidna med kardijo in mejo med korpusom in piloričnim delom. Krožna plast mišic se debeli proti pilorusu. Pilorus obdaja debel obroč gladkega mišičja – dve krožni mišični zanki, ki sta na vrhu povezani z vzdolžno plastjo mišičja, imenujemo ga tudi vratarjeva zapiralka (sfinkter). Zunanja plast seroza je sestavljena iz rahlega veziva, pokritega z enoskladnim ploščatim epitelijem (2; 4; 5).

3.1.2. Fiziologija

Gastrointestinalni trakt (GIT) je nadzorovan preko simpatičnega in parasimpatičnega živčnega sistema (ekstrinzična inervacija) ter preko nevronov v enteričnem živčnem sistemu (intrinzična inervacija). Večina simpatičnih vlaken ne vpliva direktno na strukture gastrointestinalnega trakta, ampak na nevrone v intramularnem pletežu. Stimulacija simpatičnih vlaken zavrže motorično aktivnost mišične plasti, aktivnost v mišični plasti sluznice pa se poveča. Vpliv simpatika v splošnem zmanjša sekretorno aktivnost v prebavnem traktu. Vpliv parasimpatika v glavnem poteka preko vagusa. Njegovo vzdraženje v splošnem poveča motorično in sekretorno aktivnost prebavnega trakta. Večina parasimpatičnih vlaken se konča v intramularnem pletežu. Enterični živčni sistem ali intramuralni pletež tvorijo submukozni pletež (Meissnerjev pletež) v podsluznici, mienterični pletež (Auerbachov pletež), ki se nahaja med krožno in vzdolžno plastjo mišic v mišični plasti, ter nekateri ostali nevroni prebavnega trakta. Mienterični plexus je v glavnem odgovoren za regulacijo motilitete, submukozni pa je primarno odgovoren za regulacijo sekrecije in absorpcije (6; 7).

Mirovni membranski potencial gladke mišice gastrointestinalnega trakta je med -40 do -80 mV, za vzdrževanje tega potenciala v večini odgovorna Na-K-ATPaza. Pri gladki mišici prebavnega trakta mirovni membranski potencial oscilira, temu pravimo počasni valovi ali osnovni električni ritem. V želodcu je frekvenca teh valov okoli 3 na minuto. Počasne

valove ustvarjajo intersticijske (Cajalove) celice, te celice veljajo za ritmovnik (ang. pacemaker) mišic v želodcu. Tanka plast teh celic se nahaja med krožno in vzdolžno plastjo mišic v mišični plasti. Ritmovnik se nahaja v zgornjem delu korpusa ob veliki krivini. Valovi potujejo navzdol proti distalnemu delu želodca in določajo ritem, hitrost in smer kontrakcij gladkih mišič. Na amplitudo in frekvenco počasnih valov vplivajo ekstrinzična in intrinzična inervacija ter hormoni (2; 6; 8; 9).

Ko mirovni membranski potencial doseže določeno mejo (prag), običajno v bližini vrha počasnega vala, se pojavi zaporedje akcijskih potencialov s frekvenco $1-10\text{ s}^{-1}$. Akcijski potencial naraste zaradi vstopa natrija in kalcija skozi kanalčke v celico. Kalcij, ki vstopi, pomaga tudi pri kontrakciji mišice. Počasni valovi brez akcijskega potenciala povzročijo šibke kontrakcije v gladkih mišicah. Močnejše kontrakcije se pojavijo pri akcijskem potencialu, ki se je sprožil ob vrhu počasnega vala. Več akcijskih potencialov se pojavi ob vrhu počasnega vala, bolj intenzivna je kontrakcija gladkih mišic. Želodčni počasni val je trifazičen, razdelimo ga lahko na dvig (depolarizacija), plato in padec membranskega potenciala. Ker se gladka mišica krči počasi, se vsaka kontrakcija povzročena z akcijskim potencialom, ne odraža kot samostojen trzlaj, ampak se več akcijskih potencialov sešteje in odrazi kot začasno povečanje napetosti mišice (6; 10).

3.2. Motiliteta

Motiliteta označuje gibanje prebavnega trakta, ki meša gastrointestinalno vsebino in jo potiska naprej po prebavni cevi. Motiliteta želodca omogoča, da je želodec rezervoar za velik volumen hrane, drobljenje hrane v manjše koščke, mešanje hrane z želodčnimi izločki in kontrolirano praznjenje vsebine želodca v duodenum (6).

Fundus in korpus lahko prilagodita volumen do 1,5 L brez povečanja pritiska v želodcu. Ta pojav imenujemo prilagoditvena relaksacija. V tem delu želodca je mišična plast tanjša, zato so kontrakcije šibke, tako da tukaj hrana ostaja dalj časa nepremešana. Posledica tega je, da vsebina tukaj tvori plasti, glede na njeno gostoto. Maščobe navadno tvorijo oljno plast na vrhu. Tekočine lahko stečejo mimo skupka trdne hrane in se spraznijo v duodenum (6; 10).

V antrumu so kontrakcije močnejše, zato se vsebina tukaj dobro premeša in zdrobi. Značilna kontrakcija distalnega želodca je peristaltični val. To so krožne kontrakcije, ki kot obroč potujejo po želodčni steni navzdol. Želodčni peristaltični valovi se pojavljajo z isto frekvenco kot želodčni počasni valovi, ki jih generira ritmovnik in potujejo proti pilorusu s

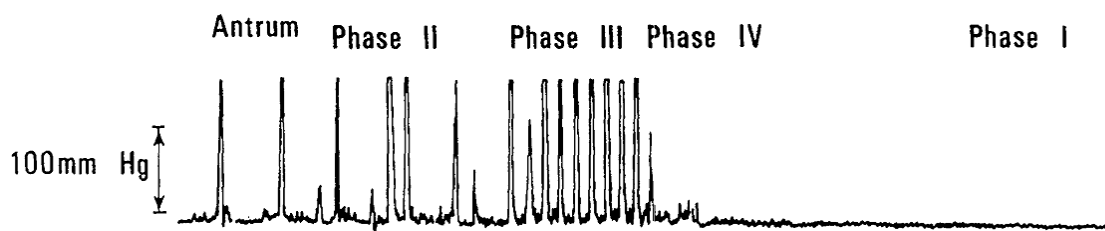
frekvenco okoli 3 na minuto. Hitrost potovanja valov je okoli 0,5 cm/s v korpusu in se v antrumu pospeši do okoli 4 cm/s. Peristaltični val potiska vsebino želodca iz korpusa proti pilorusu, tako lahko tekočine in manjši trdni delci zapustijo želodec. Ko nastopijo terminalne antralne kontrakcije se pilorus zapre in vsebina se pomakne nazaj. Za regulirano praznjenje želodčne vsebine skrbi pilorus. Praznjenje poteka s tako hitrostjo, da lahko duodenum sprejme to količino himusa oziroma delno prebavljene hrane in prepreči vračanje duodenalne vsebine v želodec (6; 10).

3.3. Migracijski motorični kompleks

Nekaj ur po zaužitju zadnjega obroka se začne motiliteta gastrointestinalnega trakta obnašati po določenem vzorcu. Obdobja močno povečanega krčenja so prekinjena z daljšimi obdobji mirovanja. Motorično aktivnost želodca na tešče imenujemo migracijski motorični kompleks ali mioelektrični motorični kompleks (MMC). Podoben vzorec električne in motorične aktivnosti prebavnega trakta na tešče je bil najprej opisan na psih, kasneje tudi pri človeku (11). MMC se običajno začne v želodcu ter potuje do terminalnega ileuma in se ponovi približno vsaki dve uri pri ljudeh. Ko prvi cikel MMC-ja doseže distalni ileum, se drugi MMC začne v želodcu (10). MMC se lahko začne tudi nižje v prebavnem traktu. V študiji, kjer so opazovali skupno 52 ciklov MMC-ja, se jih 35 začelo v antrumu, 17 v območju pilorusa in ostali nižje (11). Do podobne ugotovitve so prišli v drugi raziskavi, kjer se 71% od vseh opazovanih ciklov MMC-ja začelo v antrumu (12).

Kontrakcije, ki se pojavijo, povečajo mišično napetost v fundusu in korpusu, v antrumu pa lahko popolnoma stisnejo lumen in potisnejo vsebino proti pilorusu. Frekvenca pojavljanja kontrakcij je 1-3 v intervalu 2-3 minut. Ko se pilorusu približa peristaltični val se pilorus široko odpre in mišice v začetku duodenuma se sprostijo, kar omogoča, da močne kontrakcije izpraznijo iz želodca neprebavljeno vsebino (5).

MMC je sestavljen iz treh oziroma štirih faz. Prva faza je obdobje mirovanja in zavzema večino časa MMC-ja. Drugo fazo zaznamuje občasen pojav neenakomernih kontrakcij. Pri tretji fazi je opazen izbruh ritmičnih enakomernih kontrakcij (8). Nekateri omenjajo tudi četrto fazo, ki zajema počasno umirjanje kontrakcij in predstavlja prehod iz tretje v prvo fazo (10). Shematski prikaz zaporedja faz MMC-ja je predstavljen na sliki 1.



Slika 1: Shematski prikaz zaporedja faz MMC-ja in amplitude kontrakcij v antrumu (11).

Namen kontrakcij med MMC-jem je praznjenje neprebavljivih večjih delcev iz želodca. Močna krčenja očistijo želodec neprebavljene hrane in drugih delcev (nerazpadle tablete), odstranijo se tudi odluščene celice, izločki in bakterije (10). Med tretjo fazo MMC-ja so krčenja najmočnejša, zato to fazo imenujejo tudi čistilna faza (8). Ker MMC potuje proti distalnemu ileumu v obliki peristaltičnega vala, je tudi v črevesju njegov namen potisk vsebine naprej in praznjenje črevesja. Pri tem pa tudi preprečuje prevelik razrast bakterij v tankem črevesju (5).

Motilin je peptid, ki ga izloča sluznica duodenuma in je v največji meri odgovoren za pojav MMC-ja. Izločanje motilina je stimulirano pri nakisanju duodenalne vsebine. Najvišja koncentracija motilina v plazmi sovpada z pojavom tretje faze MMC-ja (11).

3.3.1. Časovni potek MMC-ja

Pregled trajanja celotnega cikla MMC in posameznih faz je podan v preglednici I. Rees s sodelavci (11) je raziskoval motorični vzorec obnašanja želodca na tešče pri 11 prostovoljcih. Pokazali so, da obstajajo velike razlike v času trajanja celotnega cikla MMC med posamezniki, saj so bile vrednosti med 53 ± 8 min do 136 ± 10 min. V osmih urah opazovanja so zajeli od tri do šest celotnih ciklov MMC-ja. Ugotovili so tudi, da se med posamezniki najmanj razlikuje tretja faza MMC-ja, ki je trajala od 4 do 7 minut. V drugi študiji (12), so pokazali veliko variabilnost v trajanju MMC-ja pri istem posamezniku izmerjeno v šestih poskusih v razmaku najmanj 48 ur. Koeficient variacije pri istem prostovoljcu je bil tudi do 88%. Velike razlike so bile tudi med posamezniki, saj je bil čas trajanja MMC-ja med 112 ± 60 min do 230 ± 60 min.

Preglednica I: Trajanje celotnega cikla migracijskega motoričnega kompleksa in posameznih faz.

Celoten MMC	Faza I	Faza II	Faza III	Faza IV	Vir
2 h	45-60 min	30-45 min	5-15 min	5 min	(10)
~ 100 min	40-50 min	40-50 min	5-10 min		(8)
53- 136 min	64 %	31 %	5 % (4-7 min)		(11)
172±76 min	55±23 %				(12)
			10-15 min		(13)
107±34 min			3,2±0,5 min		(14)
			4,2 min (1,8-4,3 min)		(15)

3.4. Mehanski dogodki med MMC-jem

Najpogostejši vzorec gibanja na tešče so usklajena krčenja, ki zajemajo antrum in duodenum ter tako delujejo kot enota. V eni od raziskav so kot običajen vzorec gibanja zaznali, da je iz začetne antralne kontrakcije sledilo 1-6 valov krčenja v pilorusu, ki so nato potovali v duodenum. Izmerjena frekvenca usklajenih kontrakcij je bila $0,9 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ (15). White s sodelavci je v raziskavi proučeval gibanje in usklajenost krčenja v območju želodca in duodenuma. Ugotovili so, da je bilo 46% antralnih kontrakcij povezanih s krčenji pilorusa in 54% krčenj v antrumu je bilo samostojnih. Najmočnejše kontrakcije so se pojavile, ko je bilo krčenje antruma, pilorusa in duodenuma povezano (16).

V želodcu na tešče so pokazali, da je amplituda pritiskov zaradi kontrakcij lahko med 0,2-310 mmHg (9). Ta raziskava je tudi potrdila, da ima želodec mehansko aktivnost okoli 3 min^{-1} , kar ustreza aktivnosti ritmovnika. Število kontrakcij, ne glede na amplitudo, je bilo 2,4-3,6 min^{-1} . V preglednici II je prikaz številčne porazdelitve tlakov v želodcu, ki so bili merjeni v obdobju 2-3 h pod pogoji na tešče. Razvidno je, da je bilo največ prisotnih mikrokontrakcij, kar je pričakovano, saj faza mirovanja oziroma prva faza zavzema večino cikla MMC-ja.

Preglednica II: Številčna porazdelitev tlakov (v odstotkih) v želodcu pod pogoji na tešče (9).

0-9 mmHg	9-50 mmHg	50-200 mmHg	>200 mmHg
76%	14%	6%	4%

3.4.1. Spremembe tlaka med kontrakcijami

3.4.1.1. Faza I

V prvi fazi MMC-ja so prisotne nizko amplitudne spremembe tlaka v želodcu (<9 mmHg), čeprav se akcijski potenciali ne pojavljajo. Ker želodec ne miruje popolnoma, se pojavlja izraz, da je v »prostem teku« (9). V raziskavah, kjer so merili pritiske med MMC-jem s pomočjo manometrije, sprememb v tej fazi niso opazili, saj naprava ni zaznala pritiskov manjših od 10 mmHg (11; 14).

3.4.1.2. Faza II

V drugi fazi so akcijski potenciali naključno prisotni in prihaja do krčenj želodčne stene. Ta faza je mešanica nizko in visoko amplitudnih sprememb intraluminalnega tlaka (9). Zato lahko tukaj pričakujemo velik razpon amplitud tlaka oziroma kombinacijo šibkih in močnih kontrakcij v želodcu, kar je tudi razvidno iz preglednice III. K velikim razlikam med tlaki, ki jih navajajo raziskave močno vpliva mesto merjenja pritiska v želodcu. Bolj kot se od antruma približamo pilorusu, večji so pritiski, kar je razvidno iz dveh raziskav. V prvi so bili izmerjeni pritisk v proksimalnem antrumu okoli 18 mmHg največ do 57 mmHg, v distalnem antrumu pa okoli 84 mmHg (17). V drugi raziskavi je bil antralni pritisk 3 cm od pilorusa med 40-107 mmHg, 1,5 cm od pilorusa pa med 67-240 mmHg (18).

3.4.1.3. Faza III

Akcijski potenciali so v tretji fazi redno prisotni. Kontrakcije se pojavljajo na 20 sekund oziroma s frekvenco 3 min^{-1} (9; 11; 13). Raziskava, v kateri so opazovali sile v želodcu med praznjenjem trdne farmacevtske oblike, je pokazala, da so najmočnejša krčenja prisotna v tretji fazi MMC-ja in tik preden oblika zapusti želodec (13). V preglednici IV so

zbrani podatki o tlakih pri kontrakcijah med tretjo fazo. Če primerjamo izmerjene tlake med drugo in tretjo fazo MMC-ja, vidimo, da ni večjih razlik v amplitudi tlakov. Vendar če iz slik primerjamo časoven potek amplitud, so v tretji fazi bolj pogoste in se enakomerno pojavljajo.

Preglednica III: Izmerjeno povečanje tlaka na določenem delu želodca med drugo fazo MMC-ja in čas trajanja povečanega pritiska.

Mesto merjenja	Izmerjen tlak (mmHg)	Čas povečanega tlaka (s)	Vir (odčitano iz slik)
-	40-80	15	(14)
proksimalni antrum	~18 (do 57)	10	(17)
distalni antrum	~84	10	(17)
-	42-167	8	(11)
antrum 3 cm od pilorusa	40-107	5	(18)
antrum 1,5 cm od pilorusa	67-240	5	(18)

Preglednica IV: Izmerjeno povečanje tlaka na določenem delu v želodcu med tretjo fazo MMC-ja in čas trajanja povečanega pritiska.

Opomba	Izmerjen tlak (mmHg)	Čas povečanega tlaka (s)	Vir (odčitano iz slik)
merjeno v distalnem antrumu	63-150	10	(13)
-	~90	20	(14)
med merjenjem potekala infuzija v želodec, hitrost 1 L/h	~44	9-18	(16)
merjeno v proksimalnem antrumu	~100	10	(17)
merjeno v distalnem antrumu	~57	10	(17)
-	~167	8	(11)
-	~80	5-17	(12)
-	~80	12	(15)

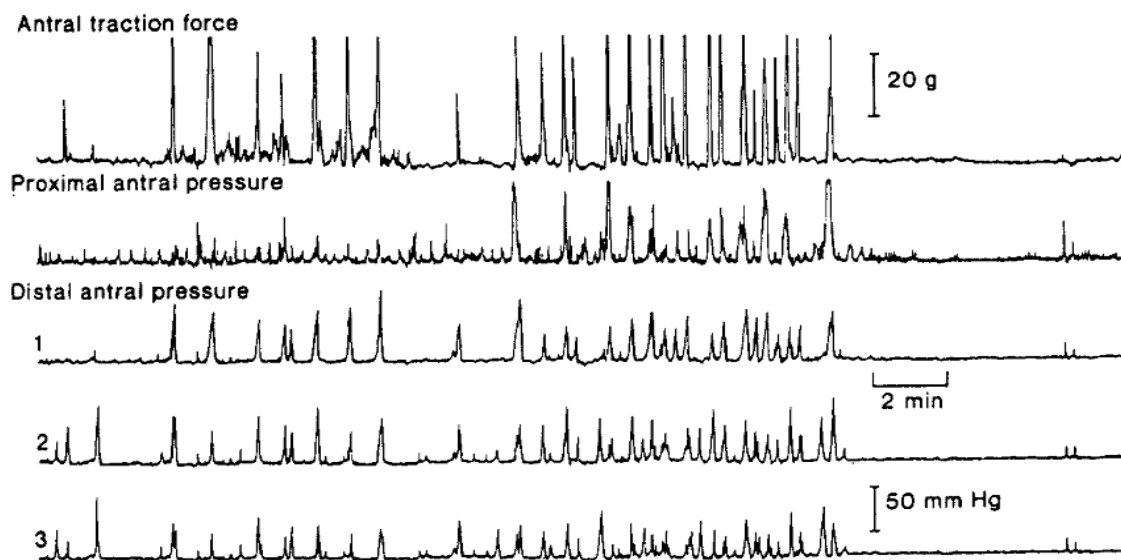
3.4.2. Sile med kontrakcijami

Najbolj razširjen pristop za opazovanje sil v želodcu je merjenje povečanega tlaka med kontrakcijo. V nekaterih raziskavah so za določevanje teh sil izbrali drugačen pristop. V študiji je Kamba s sodelavci (19) naredil tablete iz hidrofobnega praška, ki se lahko oblikuje pri nizkih tlakih. Tablete so bile izdelane pri izbrani sili stiskanja tako, da so dosegli točno določeno trdnost tablete (1,5 N ali 1,89 N). Učinkovina se je iz tablete lahko sproščala, ko je tableta razpadla. To se je zgodilo, ko so tlaki v želodcu presegli mejno vrednost trdnosti tablet. Zaradi hidrofobne sestave tablete ni prišlo do hidratacije, ki bi lahko vplivala na trdnost tablete. Ugotovili so, da ima želodec potencialno moč razbitja tablete na tešče 1,5 N. Pri pogojih s hrano je ta vrednost višja (1,89 N). Razlaga rezultatov je bila, da se pojavi na tešče v želodcu močno krčenje sten, vendar farmacevtska oblika ni izpostavljena tako veliki sili, saj je pilorus odprt in kontrakcija premakne obliko v duodenum. V pogojih s hrano je pilorus zaprt, namen krčenj je zdrobiti in zmešati vsebino želodca, zato na obliko delujejo večje sile.

V drugi raziskavi, pri kateri so želeli izmeriti aksialne sile v želodcu med praznjenjem, so poleg meritev povečanega tlaka izvajali tudi merjenje sil želodčne stene na kateter, imenovali so jo sila trenja. Uporabljali so kateter za merjenje sile trenja z napihljivim balončkom. Sila trenja v drugi fazi MMC-ja je bila med 10-42 g (0,098-4,12 N), v tretji fazi pa okoli 44 g (4,31 N) (odčitano iz slike) (17). V preglednici V je primerjava med izmerjenimi tlaki in silami v proksimalnem in distalnem antrumu. Na sliki 2 pa je grafičen prikaz teh podatkov.

Preglednica V: Pregled izmerjenih tlakov in sil v želodcu v drugi in tretji fazi MMC-ja (odčitano iz slike) (17).

Mesto merjenja	Faza MMC-ja	Tlak (mmHg)	Sila (g)
proksimalni antrum	II.	18-57	10-42
distalni antrum	II.	~84	
proksimalni antrum	III.	~100	44
distalni antrum	III.	~57	



Slika 2: Shematski prikaz zaporedja amplitud kontrakcij v proksimalnem in distalnem antrumu med drugo in tretjo fazo MMC-ja (17).

3.4.3. Hitrost potovanja kontrakcij

Pri raziskavah, kjer uporabljajo za merjenje sprememb tlaka v želodcu kateter z več stranskimi odprtinami, lahko zaznajo hitrost potovanja peristaltičnega vala vzdolž prebavnega trakta. Ena od študij navaja povprečno hitrost potovanja 0,69 cm/s (območje 0,37-0,74 cm/s) v predelu antruma (15). Druga navaja hitrost potovanja krčenj tretje faze MMC-ja od antruma do proksimalnega jejunuma od $0,040 \pm 0,003$ cm/s do $0,170 \pm 0,005$ cm/s (11). Hitrost potovanja kontrakcij se zmanjšuje, ko peristaltični val potuje distalno od želodca po prebavnem traktu (12).

3.5. Pylorus

Električna aktivnost pilorusa je podobna frekvenci potencialov v antrumu, ki jo generira ritmovnik v želodcu, to je 3 min^{-1} (5). Druga raziskava razlaga, da je električna aktivnost pilorusa pod vplivom nihanj membranskega potenciala iz antruma in duodenuma. Do tega zaključka so prišli na podlagi izmerjenih frekvenc ritmičnih kontrakcij, pri čemer je bila največja frekvenca v antrumu $3,49 \text{ min}^{-1}$, v področju pilorusa pa višja in sicer $6,82 \text{ min}^{-1}$ (16).

Ko peristaltični val potuje od korpusa skozi antrum in se konča kot krčenje antruma, se pilorus zapre v zaporedju kontrakcij ter se nato sprosti. Če pa želodec miruje, je pilorus

odprt in ne predstavlja ovire (5). Do podobnih zaključkov so prišli tudi v drugi raziskavi, v kateri trdijo, da je pri mladih, zdravih ljudeh na tešče pilorus odprt večino časa, kar potrjuje tudi endoskopija, ki je pokazala, da je pilorus večinoma ozko odprt in se zapre v končni fazi antralne kontrakcije (20). V preglednici VI je podan izmerjen pritisk v pilorusu med kontrakcijo.

Preglednica VI: Pregled izmerjenih pritiskov v pilorusu med kontrakcijo v času tretje faze MMC-ja in čas trajanja povečanega pritiska.

Opomba	Izmerjen tlak (mmHg)	Trajanje (s)	Vir (odčitano iz slik)
med merjenjem potekala infuzija v želodec, hitrost 1 L/h	~34	15-24	(16)
	~40 (največ 96)	4	(15)

Večina raziskovalcev ni zaznala, da je pilorus mesto povečanega pritiska (5; 16; 20), vendar nekateri so (15; 21). Izmerili so, da je povprečni mirovni pritisk v pilorusu $26,9 \pm 7,5$ mmHg (območje 18,4-33,8 mmHg) v antrumu pa $4,0 \pm 1,0$ mmHg (območje 3,0-5,1 mmHg) (21). Podatki iz druge raziskave so za povprečni mirovni pritisk v pilorusu 14 mmHg (območje 11-18 mmHg) v antrumu pa 8 mmHg (območje 6 -11 mmHg) (15).

3.5.1. Izolirani pilorični valovi

IPPW (ang. isolated pyloric pressure waves) so izolirani pilorični valovi oziroma valovi povečanega pritiska, ki se pojavljajo omejeno na področju pilorusa, saj v krčenju ne sodeluje antrum ali duodenum (22). Večina kontrakcij, ki se pojavljajo v pilorusu so del povezanih krčenj antruma, pilorusa in duodenuma, IPPW se pojavljajo redkeje. V študiji, kjer so opazovali gibanje v področju pilorusa, je bilo 36% vseh kontrakcij, ki so jih zaznali, izoliranih (16). Na tešče se IPPW pojavijo tik pred ali v času 15 minut po tretji fazi MMC-ja. Pojavi se sklop izoliranih kontrakcij v določenem intervalu med 6 do 35 minut. Vsak interval vsebuje med 18-89 rednih krčenj s frekvenco $2,9-3,3 \text{ min}^{-1}$. Večina izmerjenih pritiskov v pilorusu med IPPW je bila okoli 30 mmHg, nekateri tudi do 70 mmHg, povečan pritisk je trajal okoli 10 sekund (odčitano iz slike) (15). Po podatkih iz druge študije je frekvenca pojavljanja manjša in sicer v povprečju $0,2 \text{ min}^{-1}$ (območje $0,05-1,40 \text{ min}^{-1}$) (22).

3.6. Metode za merjenje mehanskih obremenitev *in vivo*

3.6.1. Manometrija

Manometrija je metoda, ki se uporablja za ugotavljanje motilitete in merjenje pritiskov v zgornjem delu prebavnega trakta. Sistem je sestavljen iz senzorja za pritisk, pretvornika, ojačevalca in števca oziroma zaslona (23).

Senzor za pritisk je lahko pretočna cevka običajno iz polivinila z odprtino na koncu ali z več stranskimi odprtinami vzdolž cevke skozi katere izhaja medij. Po cevki se pretaka medij z ustrezno določenim pretokom, ki ga zagotavlja črpalka. Običajna hitrost pretoka je 1-3 mL/min, lahko tudi manj. V cevki je majhen volumen medija, v katerem se ne smejo pojavljati zračni mehurčki. Krčenje prebavne cevi poveča pritisk na cevko, kar povzroči zaprtje odprtin v cevki in pritisk v pretočni cevki naraste. Zato je pomembno, da je hitrost pretoka skozi cevke točno določena, saj ne sme povečati pritiska v sistemu. Za visoko amplitudne pritiske so potrebni hitrejši pretoki. Običajno se ne uporablja samo ena cevka, ampak je več cevk povezanih skupaj (perfuzni kateter z več kanali), z odprtinami na določeni razdalji, da lahko merijo pritiske v več smereh na izbrani dolžini prebavnega trakta (23). Kateter ima stranske odprtine razporejene na razdalji nekaj centimetrov ali še bolje manj kot 1 cm. Možnost izdelave silikonskih cevk z majhnim notranjim premerom in s stranskimi odprtinami v kratkih razdaljah je pripeljalo do razvoja manometrije z visoko ločljivostjo (24).

Za merjenje majhnih sprememb pritiska v ozkem lumnu, predvsem na področju pilorusa, so razvili manjši senzor (ang. sleeve sensor) dolžine okoli 4 cm. Njegov glavni del je perfuzna membrana, ki lahko meri pritiske na svoji površini (22). Ta senzor je običajno del pretočnega katetra z več kanali in je nameščen za zaznavo krčenj v pilorusu, kontrakcije v antrumu in duodenumu pa beleži pretočni kateter (24).

Poleg pretočnega katetra obstajajo tudi ne-pretočni katetri, ki imajo vzdolž svoje dolžine razporejene elemente občutljive na pritisk (izraz v ang. solid state manometry) (24).

Ena od možnosti za zaznavo pritiska je tudi majhen, z zrakom napolnjen balonček (premer manj kot 1 cm), ki je pripet na konec cevke. Naprava meri pritisk v balončku. Stene balončka se stisnejo zaradi zoženja lumna v prebavnem traktu, ki se pojavi zaradi krčenj ali pa zaradi pritiska vsebine v GIT-u (23).

Merilec obremenitve lahko beleži pritisk ali sile v prebavni cevi. Pritisk se prenese do zunanega pretvornika, ki meri obremenitev ali razteg in ga pretvori v spremembo električnega upora. Merilno območje je običajno med -50 do +300 mmHg. Preiskovancu se kateter skozi nos uvede do želenega mesta v GIT-u (13; 14). Za določitev ustrezne pozicije pretočne cevke se uporablja fluoroskopija ali merjenje potencialne razlike oziroma TMPD (ang. transmucosal potential difference) (15; 23). Pri fluoroskopiji morajo biti pretočne cevke označene z rentgenskim kontrastnim sredstvom, da se lahko določi njihova pozicija (23).

Slabost metode je, da gre za invaziven poseg in je neprijetna za preiskovanca. Pri kontrakcijah, ki ne zaprejo popolnoma lumna prebavne cevi ima metoda slabo občutljivost (25).

3.6.2. Manometrija s pomočjo kapsule

S pomočjo radiotelemetrije, pri kateri gre za prenos podatkov z elektromagnetnim sevanjem na radio frekvencah, kapsula oddaja podatke o pritisku, temperaturi in pH-ju na tistem mestu, kjer se nahaja. Preiskovanec kapsulo pogoltne in ta meri pogoje med potovanjem skozi prebavni trakt. Gre za neinvazivno metodo, ki ne moti motorične aktivnosti v GIT-u (23). Dimenzije kapsule, ki so jo uporabljali v eni od raziskav so bile 26×13 mm (26). Kapsula zazna pritisk s pomočjo diafragme, ki vpliva na prevodnost in se odraža v spremenjeni frekvenci, ki jo oscilator oddaja (23).

4. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo poskušali na pretočnem sistemu s kroglicami ponazoriti mehanske sile v želodcu na tešče, ki delujejo na farmacevtsko obliko. Teste sproščanja bomo izvajali na dveh farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem in sicer Voltaren[®] retard filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg, ki veljajo za mehansko občutljive ter Tramal[®] filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg.

V ta namen bomo optimizirali pretočni sistem s kroglicami tako, da bo omogočil ponazarjanje mehanskih obremenitev. Zato bomo v sistemu spreminjali količino kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala ali pa bomo v delovno čašo sistema uvedli oviro za določeno časovno obdobje in se tako skušali približati pritiskom, ki delujejo na tableto pri praznjenju iz želodca ter ob prehodu skozi pilorus. Osnovna medija za teste sproščanja bosta umetni želodčni sok s pH 1,2 (brez NaCl in pepsina) in umetni črevesni sok s pH 6,8 (brez pankreatina).

S primerjavo profilov sproščanja bomo lahko določili občutljivost Voltaren[®] retard tablet na različne obremenitve v pretočnem sistemu s kroglicami in vpliv uporabe enake ovire ob različnih vrednostih pH (1,2 in 6,8) medija. Nekateri pogoje bomo preizkusili tudi na Tramal[®] tabletah in določili vpliv obremenitev na sproščanje. S testi sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren[®] retard tablet bomo lahko izbrali med preizkušenimi pogoji tiste, s katerimi bi lahko najboljše ponazorili začasno povečanje sproščanja v času pojava vrha v plazemskem profilu.

5. MATERIALI IN METODE

5.1. Materiali in aparature

Farmacevtske oblike

Za in vitro teste sproščanja na pretočnem sistemu s kroglicami smo uporabili tablete s podaljšanim sproščanjem:

- Voltaren® retard filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg, Pliva (v nadaljevanju Voltaren)
- Tramal® filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg, Grünenthal (v nadaljevanju Tramal)

Sestavo omenjenih farmacevtskih oblik prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII. Sestava proučevanih farmacevtskih oblik.

Farmacevtska oblika	Zdravilna učinkovina	Pomožne snovi	Vir
Voltaren	natrijev diklofenakat	jedro tablete: brezvoden koloidni silicijev dioksid, cetilalkohol, magnezijev stearat, povidon, saharoza filmska obloga tablete: hipromeloza, polisorbit 80, smukec, titanov dioksid (E 171), železov oksid in hidroksid (E 172), makrogol 6000, saharoza	(27)
Tramal	tramadolijev klorid	mikrokristalna celuloza, hipromeloza, magnezijev stearat, brezvoden koloidni silicijev dioksid, monohidrat laktoze, makrogol 6000, propilenglikol, smukec, titanov dioksid (E 171)	(28)

Snovi, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu:

- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo $c_{(\text{NaOH})} = 1 \text{ mol/L}$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a. kakovosti, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo $c_{(\text{HCl})} = 1 \text{ mol/L}$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

- koncentriran etanol, Ph.Eur.5th (96% etanol), Kefolab, Ljubljana, Slovenija
- puferska raztopina pH= 7,00 ($\pm 0,02$; 20°C) (fosfat), Kefolab, Ljubljana, Slovenija
- puferska raztopina pH= 1,00 ($\pm 0,02$; 20°C) (glicin / klorovodikova kislina), Kefolab, Ljubljana, Slovenija
- tramadolijev klorid, $\geq 99,0\%$ (HPLC), Fluka, Švica
- natrijev diklofenakat, Sigma, Kitajska

Aparature in materiali, ki smo jih uporabljali pri testih sproščanja:

- pretočni sistem za sproščanje
 - peristaltična črpalka PA – SK4 control, IKA WERKE, IKA, Nemčija
 - grelec in magnetno mešalo IKA WERKE, IKA, Nemčija
- pretočne cevke iz silikona z notranjim premerom 3,2 mm, Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Nemčija
- nerjaveča kovinska žička, VanKel Technology Group, Severna Karolina, ZDA
- kovinska mrežica, odprtine v mreži velikosti $(400-500) \times (400-500) \mu\text{m}$
- steklene kroglice, premer 1 mm (uporaba za pretočno celico aparata USP 4)
- kovinski mrežast pokrov (opis in slika v preglednici XI)
- steklena palčka (opis in slika v preglednici XI)
- plastični mrežast pokrov (opis in slika v preglednici XI)
- silikonska ovira 1 (opis in slika v preglednici XI)
- silikonska ovira 2 (opis in slika v preglednici XI)
- spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija
- digitalna tehtnica, Exacta 300 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- analizna tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- avtomatska pipeta 100-1000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtomatska pipeta 500-2500 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- filtri, Minisart RC 15 membrane, velikost por 0,45 μm , Sartorius Stedim Biotech, GmbH, Nemčija
- pH meter, MP 220, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- večmestno magnetno mešalo Variomag POLY 15, Labortechnik AG, Nemčija

5.2. Metode

5.2.1. Priprava medijev za raztapljanje

Teste sproščanja smo izvajali v umetnem želodčnem soku (Simulated gastric fluid, USP) brez pepsina in natrijevega klorida (pH=1,2) ter v umetnem črevesnem soku (Simulated intestinal fluid, USP) brez pankreatina (pH=6,8) (29). Pri testih sproščanja natrijevega diklofenakata smo uporabili tudi 0,1 M NaOH. Pri izdelavi umeritvene krivulje smo uporabili vse navedene medije v ustrezni kombinaciji.

Priprava umetnega želodčnega soka s pH 1,2:

V merilni valj smo odmerili 80 mL 1M HCl. V 1 L bučo smo nalili približno do polovice deionizirano vodo, ter kvantitativno prelili vsebino valja v bučo. Bučo smo dopolnili do oznake z deionizirano vodo. Tako pripravljen medij smo dobro premešali in mu izmerili pH na pH metru. Po potrebi smo pH medija uravnali na $1,2 \pm 0,05$ z 1 M HCl ali 1 M NaOH. Pred vsako meritvijo smo pH meter umerili na pH 1,00.

Preglednica VIII: Sestava umetnega želodčnega soka pH=1,2.

pH 1,2	
1M HCl (mL)	80
Deionizirana voda do 1 L	

Priprava umetnega črevesnega soka s pH 6,8:

V čašo smo natehtali 6,8 g KH_2PO_4 in dodali deionizirano vodo, vsebino smo kvantitativno prenesli v 1 L bučo. V merilni valj smo odmerili 22 mL 1M NaOH in kvantitativno prelili v bučo. Bučo smo dopolnili do oznake z deionizirano vodo. Tako pripravljen medij smo dobro premešali in mu izmerili pH na pH metru. Po potrebi smo pH medija uravnali na $6,8 \pm 0,05$ z 1 M HCl ali 1 M NaOH. Pred vsako meritvijo smo pH meter umerili na pH 7,00.

Preglednica IX: Sestava umetnega črevesnega soka pH=6,8.

pH 6,8	
KH ₂ PO ₄ (g)	6,8
1M NaOH (mL)	22
Deionizirana voda do 1 L	

Priprava 0,1 M NaOH:

V merilni valj smo odmerili 100 mL 1M NaOH. V 1 L bučo smo nalili približno do polovice deionizirano vodo, ter kvantitativno prelili vsebino valja v bučo. Bučo smo dopolnili do oznake z deionizirano vodo. Tako pripravljen medij smo dobro premešali.

5.2.2. UV spektrofotometrija

Kot analizno metodo za določevanje koncentracije učinkovine v raztopini smo uporabili UV spektrofotometrijo. Na spektrometru smo posneli absorpcijski spekter raztopine učinkovine. Iz spektra smo določili maksimum učinkovine v vsakem od medijev, v katerih so se nahajali vzorci testov sproščanja. Če smo izmerili absorbance, ki so bile izven območja umeritvene krivulje, smo vzorce ustrezno redčili (redčitev 1/5 ali 1/10). Slepí vzorec je bil medij brez učinkovine.

Absorpcijski maksimum natrijevega diklofenakata v vseh uporabljenih medijih je bil 276 nm, tramadolijevega klorida pa pri 271 nm.

5.2.3. Umeritev avtomatske pipete

Avtomatsko pipeto smo umerili s pipetiranjem destilirane vode pri sobni temperaturi in tehtanjem odpipetirane vode na analitski tehtnici. Postopek smo desetkrat ponovili in izračunali volumen odpipetiranega vzorca kot povprečje vseh meritev. Pri izračunu smo za gostoto destilirane vode upoštevali $\rho=1,0$ g/mL.

5.2.4. Določanje enačb umeritvenih premic

5.2.4.1. Umeritvena premica natrijevega diklofenakata:

Pripravili smo tri osnovne raztopine natrijevega diklofenakata s približno koncentracijo 100 mg/L, tako da smo približno 10 mg natrijevega diklofenakata natančno stehali na

analitski tehnici in natehto kvantitativno prenesli v 100 mL bučko ter z medijem dopolnili do oznake. Z uporabo večjega števila osnovnih raztopin smo se želeli izogniti morebitnim napakam pri tehtanju. Osnovne raztopine smo redčili in dobili nove raztopine z razporejenimi koncentracijami od približno 1 mg/L do 50 mg/L. Iz vsake osnovne raztopine smo z različnimi polnilnimi pipetami odpipetirali določene volumne in jih prenesli v bučke ustreznih volumnov ter bučke dopolnili z medijem do oznake. Tem raztopinam smo izmerili absorbanco in izdelali umeritveno premico. Koncentracije smo nanašali na absciso, na ordinato pa izmerjene absorbance. Skozi dobljene točke smo narisali premico in pomočjo linearne regresije izračunali njeno enačbo ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

Umeritveno premico natrijevega diklofenakata smo naredili v dveh medijih. Prvi je bil mešanica umetnega želodčnega soka in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1. Drugi je bil mešanica umetnega črevesnega soka in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1.

5.2.4.2. Umeritvena premica tramadolijevega klorida:

Izdelava te umeritvene premice je potekala po enakih korakih kot pri umeritveni krivulji natrijevega diklofenakata. Pripravili smo tri osnovne raztopine tramadolijevega klorida s približno koncentracijo 100 mg/L. Osnovne raztopine smo redčili in dobili nove raztopine z razporejenimi koncentracijami od približno 3 mg/L do 100 mg/L. Tem raztopinam smo izmerili absorbanco in izdelali umeritveno premico. Koncentracije smo nanašali na absciso, na ordinato pa izmerjene absorbance. Skozi dobljene točke smo narisali premico in pomočjo linearne regresije izračunali njeno enačbo ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

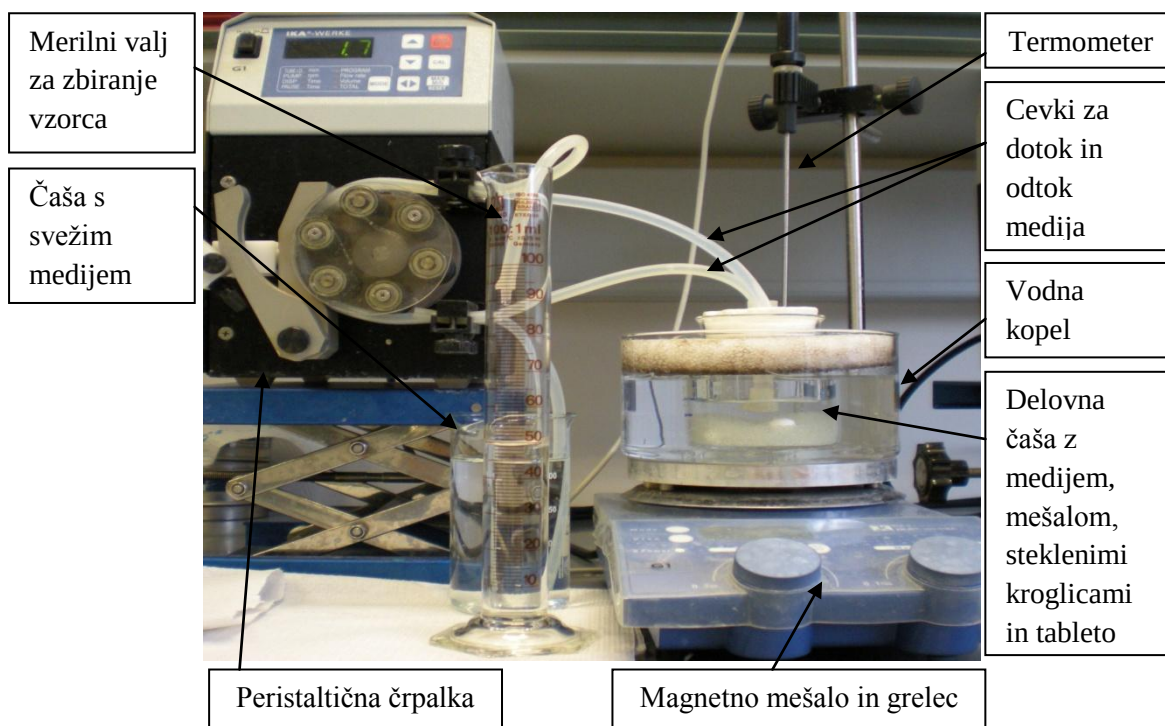
Pri izdelavi umeritvene premice smo uporabili dva medija, in sicer umetni želodčni sok ter umetni črevesni sok.

5.2.5. Testi sproščanja

5.2.5.1. Sproščanje učinkovine iz tablet na pretočnem sistemu s kroglicami

Sistem je sestavljen iz dveh delovnih enot: peristaltične črpalke in magnetnega mešala z grelcem. Peristaltična črpalka preko rotorja in dveh silikonskih cevk omogoča kontroliran in enakomeren pritok svežega medija ter odtok vzorca v merilni valj. Na magnetnem mešalu z grelcem smo nastavili ustrezno hitrost vrtenja magnetnega mešala, ki je bil v delovni čaši v vodni kopeli, in temperaturo vodne kopeli. Na magnetno mešalo z grelcem

je bila postavljena vodna kopel, v kateri je bila delovna čaša s pokrovom z odprtinami za cevke. Iz delovne čaše je potekala silikonska cevka z namenom odvajanja vzorca v merilni valj. Ta cevka je na začetku imela pritrjeno mrežico, ki je delovala kot filter in tako preprečila večjim delcem, da bi zapustili delovno čašo. Po drugi silikonski cevki je pritekal svež medij v delovno čašo. Sistem je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Pretočni sistem s kroglicami, ki smo ga uporabili za teste sproščanja.

Na začetku poskusa smo termostatirali vodno kopel na $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Pred vsakim poskusom smo cevke večkrat sprali najprej z deionizirano vodo in potem še z medijem za sproščanje, ki smo ga uporabili v nadaljnjem poskusu. V vodno kopel smo pred poskusom dali čašo z 40 mL začetnega medija, ustrezno količino natehtanih steklenih kroglic in magnetom. Na zunanji steni delovne čaše smo označili nivo medija za sproščanje, da smo lahko med poskusom s kapalko dodali medij, če ga je kaj izhlapelo. Cevke za pritok in odtok medija smo ustrezno namestili. Peristaltično črpalko smo nastavili tako, da je bil pretok medija 2 mL/min. V delovno čašo smo dali farmacevtsko obliko in pognali peristaltično črpalko, magnetno mešalo ter štoparico. Vzorce smo v umetnem želodčnem soku s pH 1,2 zbirali na 20 minut dve uri. Po preteku dveh ur smo v delovno čašo začeli črpati umetni črevesni sok s pH 6,8. Vzorce v črevesnem mediju smo zbirali na 20 minut naslednje štiri ure ali manj, če je farmacevtska oblika že prej razpadla in se raztopila.

Pri poskusih sproščanja tablet Voltaren je vzorec pritekal v merilni valj, ki je bil napolnjen z 40 mL 0,1 M NaOH. Tako smo zagotovili ustrezno topnost zdravilne učinkovine. Pri tabletah Tramal to ni bilo potrebno.

Posamezni vzorec smo iz zbirnega valja prelili v čašo, iz katere smo z brizgo vzeli del vzorca in ga prefiltrirali skozi filter papir. Filtratu smo izmerili absorbanco na spektrofotometru. Absorbanco smo merili pri absorpcijskem maksimumu učinkovine v mediju, v katerem so se nahajali vzorci sproščanja, če je bilo potrebno, smo pred tem filtrat redčili 1/5, 1/10 z ustreznim medijem. Pri poskusih sproščanja tablet Tramal je bil medij z vzorcem enak mediju za sproščanje. V primeru tablet Voltaren pa je bil medij z vzorcem sestavljen iz medija za sproščanje in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1.

5.2.5.2. Mehanske obremenitve pri testih sproščanja

Pri testih sproščanja smo želeli vplivati na mehanske obremenitve, ki delujejo na tableto in vplivajo na sproščanje učinkovine iz tablet. V prvem sklopu poskusov smo spreminjali izhodne pogoje v pretočnem sistemu s kroglicami in sicer spreminjali smo količino steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala v delovni čaši. Eden od pogojev v tem sklopu poskusov je bil tudi začasno povečanje hitrosti vrtenja magnetnega mešala. V preglednici X so zbrani vsi uporabljeni pogoji.

V drugem sklopu poskusov smo vedno uporabili 40 g steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, pri tem pa smo v delovno čašo za določen čas dodali oviro. Uporabljene ovire so prikazane in opisane v preglednici XI. Za oviro smo izbrali kovinski in plastični mrežast pokrov, ki smo ga v delovno čašo dodali za določen čas ob zamenjavi medija (po preteku 120 minut poskusa). Dodali smo ga tako, da smo iz delovne čaše odmaknili pokrov, ki preprečuje izhlapevanje medija in skozi katerega potekajo cevke za dovajanje medija in odvajanje vzorca, mrežast pokrov položili v medij in delovno čašo pokrili nazaj ter preverili, da so vse cevke ponovno ustrezno nameščene. Ko smo mrežast pokrov odstranili iz delovne čaše, smo postopek ponovili po enakih korakih.

Kot ovira je bila v poskusih uporabljena tudi steklena palčka. V pokrov delovne čaše smo naredili luknjo skozi katero smo lahko potisnili stekleno palčko. Steklена palčka je bila v čaši začetni dve uri poskusa ali pa smo jo v čašo uvedli po preteku prvih dveh ur (ob zamenjavi medija) in je v delovni čaši ostala do konca poskusa. Palčko smo v čašo potisnili pravokotno glede na pot gibanja tablete, do dveh različnih globin. Ena je bila, da je steklena palčka segala do globine nivoja kroglic, kar je 1,5 cm pod nivojem gladine medija

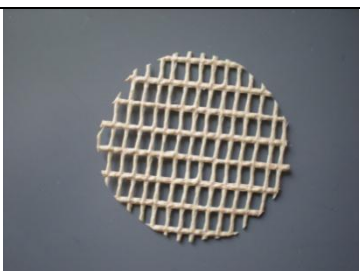
za sproščanje. Pri drugi je palčka segala 1 cm pod nivojem medija za sproščanje. Pred začetkom poskusa smo si želeni nivo označili na zunanji steni delovne čaše. Da smo zagotovili, da je palčka ostala na želeni globini, smo na drugem koncu palčke, ki je gledal ven iz pokrova delovne čaše, palčko ovili v parafilm.

Zadnji dve oviri smo izdelali iz silikonskega pokrova za mikrotitrsko ploščico. Oviro smo skozi odprtino, ki smo jo pred tem naredili v pokrovčku od delovne čaše, potisnili do nivoja kroglic tako, da je bila lega ovire pravokotna glede na pot po kateri se je gibala tableta. Oviro smo v delovno čašo vstavili po preteku prvih dveh ur (ob zamenjavi medija) za pet minut. V preglednice XII so zbrani vsi pogoji, ki smo jih izvajali s pomočjo ovir.

Preglednica X: Pregled uporabljenih pogojev za sproščanje, ki se razlikujejo v količini steklenih kroglic, hitrosti vrtenja magnetnega mešala ali v začasni spremembi hitrosti vrtenja magnetnega mešala. Navedeno je število paralelek posameznega poskusa sproščanja za vsako farmacevtsko obliko.

Oznaka pogoja	Količina kroglic (g)	Hitrost vrtenja magnetnega mešala (obradi/min)	Sprememba pogojev		Število paralelek	
			Čas med poskusom (min)	Sprememba hitrosti vrtenja magnetnega mešala (obradi/min)	Voltaren	Tramal
K1	15	50	-	-	3	-
K2	25	50	-	-	4	-
K3	40	50	-	-	3	3
K4	55	50	-	-	6	-
M1	40	100	-	-	4	-
M2	40	150	-	-	4	-
K3/150	40	50	120-140	150	4	3

Preglednica XI: Slike uporabljenih ovir, ki smo jih uvedli v delovno čašo v pretočnem sistemu s kroglicami.

Ovira	Slika	Opis
Kovinski mrežast pokrov		– izdelan iz kovinske mrežice v cedilu, – napet okoli nerjaveče kovinske žice, – odprtine v mreži velikosti 0,5×0,5 mm, – masa: 2,764g
Plastičen mrežast pokrov		– izrezan iz mehke plastične mreže, ki se uporablja v gradbeništvu, – odprtine v mreži velikosti 5×3 mm in 5×2 mm, – masa: 0,355 g
Steklena palčka		– premer 6 mm
Silikonska ovira 1		– izrezana v obliki traku iz pokrovčka za mikrotitrsko ploščico, – na površini so izbokline – na izboklinah so s plutovrtom izdelane luknje s premerom 5 mm, – širina traku 18 mm, – debelina traku 1 mm,
Silikonska ovira 2		– izrezana v obliki traku iz pokrovčka za mikrotitrsko ploščico, – na površini so izbokline – na izboklinah so s plutovrtom izdelane luknje s premerom 5 mm, – širina traku 20 mm, – debelina traku 1 mm, – konec traka (dolžina 7 mm) ima površino brez izboklin

Preglednica XII: Pregled uporabljenih ovir, ki smo jih v uvedli v delovno čašo s 40 g steklenih kroglic in hitrostjo vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, položaj ovire in čas prisotnosti ovire med poskusom. Navedeno je število paralelk posameznega poskusa sproščanja za vsako farmacevtsko obliko.

Oznaka pogoja	Ovira	Položaj ovire	Čas prisotnosti ovire med poskusom	Število paralelk	
				Voltaren	Tramal
O1/20	kovinski mrežast pokrov	v mediju nad tableto	120-140 min	4	3
O1/5	kovinski mrežast pokrov	v mediju nad tableto	120-125 min	4	-
O2	plastičen mrežast pokrov	v mediju nad tableto	120-140 min	4	3
O3	steklena palčka	do nivoja kroglic	od 120 min dalje	4	-
O4	steklena palčka	1 cm pod gladino medija	od 120 min dalje	6	-
O4/120	steklena palčka	1 cm pod gladino medija	0-120 min	4	-
O5	silikonska ovira 1	do nivoja kroglic	120-125 min	4	-
O6	silikonska ovira 2	do nivoja kroglic	120-125 min	4	-

5.2.6. Določitev vpliva uporabljenih ovir na absorbanco

Ovire, ki smo jih uporabljali pri testih sproščanja, smo preizkusili na odpuščanje snovi, ki bi lahko vplivale na absorbanco vzorca. Kovinski in plastičen mrežast pokrov ter silikonsko oviro smo posamezno namočili v čašo s 40 mL medija, ki je bil sestavljen iz umetnega želodčnega soka s pH 1,2 in umetnega črevesnega soka s pH 6,8 v volumskem razmerju 1:1. Medijem smo izmerili absorbanco po preteku 20 minut, 1 ure in 3 ur, pri dveh valovnih dolžinah ($\lambda_1=271$ nm, $\lambda_2=276$ nm), ki predstavljata absorpcijski maksimum tramadolijevega klorida in natrijevega diklofenakata.

5.2.7. Izračun profila sproščanja

Koncentracijo učinkovine v posameznem vzorcu smo izračunali s pomočjo umeritvene premice za to učinkovino v ustreznem mediju in izmerjene absorbance (enačba 2).

$$c = \frac{(A - n)}{k} \quad (2)$$

Maso učinkovine, ki se je sprostila v času t smo izračunali tako, da smo koncentracijo učinkovine v posameznem vzorcu pomnožili z volumnom vzorca, ki je bil v merilnem valju (enačba 3).

$$m = c \cdot V \quad (3)$$

Kumulativno maso sproščene učinkovine smo dobili s seštevanjem posameznih mas učinkovine v vzorcih (enačba 4).

$$M = c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2 + \dots + c_n \cdot V_n \quad (4)$$

Za izračun odstotka sproščene učinkovine smo uporabili enačbo 5.

$$\% = \frac{M}{D} \cdot 100 \quad (5)$$

Pomen oznak v navedenih enačbah:

c – koncentracija učinkovine v vzorcu ob času t

A – absorbanca vzorca

n – odsek na ordinati umeritvene premice

k – naklon umeritvene premice

m – masa učinkovine v vzorcu ob času t

V – volumen vzorca

M – kumulativna masa sproščene učinkovine

n – število vzorcev, pri čemer je imel prvi vzorec ob času $t = 0$ koncentracijo $c = 0$ mg/ L

M – kumulativna masa sproščene učinkovine

D – masa učinkovine v farmacevtski obliki

5.2.8. Statistična analiza

S statističnimi testi smo ugotavljali ali imajo spremembe izhodnih pogojev (količina steklenih kroglic, hitrost vrtenja magnetnega mešala) ali dodatek ovir značilen vpliv na sproščanje učinkovine (natrijev diklofenakat, tramadolijev klorid) iz tablete (Voltaren, Tramal). Uporabili smo statistični program PASW Statistic (PASW for Windows, ver. 18.0). Vse teste smo izvedli pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$.

Najprej smo izvedli statistične teste na rezultatih sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet. Da bi določili vpliv količine kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala

na sproščanje smo izvedli dva testa analize variance (ANOVA) z eno odvisno spremenljivko. Če smo pri posameznem ANOVA testu pokazali značilen vpliv faktorjev in je bila dokazana homogenost varianc, smo izvedli še Post Hoc (Sidak) test za izbrani faktor. Za odvisno spremenljivko smo vzeli čas, ko se je sprostilo 50 % učinkovine iz tablete ($t_{50\%}$), kot neodvisni spremenljivki sta bili količina steklenih kroglic ali hitrost vrtenja magnetnega mešala. Za določevanje značilnega vpliva dodanih ovir na sproščanje smo uporabili Studentov t - test (dvostranski) ali ANOVA test in Post Hoc (Sidak) test pri dokazani homogenosti varianc. Pri ugotavljanju vpliva dodatka steklene palčke do različnih globin smo uporabili ANOVA test, kjer smo za odvisno spremenljivko izbrali $t_{50\%}$ in neodvisne spremenljivke pogoje K3, O3, O4. Za določevanje vpliva steklene palčke ob različnih časih (pred zamenjavo ali po zamenjavi medija) smo izvedli dvostranski Studentov t – test z odvisno spremenljivko $t_{50\%}$ in neodvisni spremenljivki pogoja O4 in O4/120. Značilen vpliv dodatka kovinskega ali plastičnega mrežastega pokrova, vpliv začasnega povečanja hitrosti vrtenja magnetnega mešala ter dodatek silikonske ovire 1 ali 2 smo dokazovali z dvostranskim Studentovim t – testom. Pri tem je bil za odvisno spremenljivko izbran $t_{50\%}$, za neodvisno spremenljivko je bil eden od pogojev vedno izbran pogoj K3 (40 g steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min), drugi pogoj pa je bil dodatek ene od ovir ali začasno povečanje mešanja (O1/5, O1/20, O2, K3/150, O5, O6).

Za določevanje značilnih vplivov izbranih pogojev pri sproščanju tramadolijevega klorida iz Tramal tablet smo uporabili Studentov t – test (dvostranski). Pri tem je bil za odvisno spremenljivko izbran $t_{50\%}$, za neodvisno spremenljivko je bil eden od pogojev vedno izbran pogoj K3 (40 g steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min), drugi pogoj pa je bil dodatek ene od ovir (O1/20, O2, K3/150).

5.2.8.1. Izračun $t_{50\%}$ iz profilov sproščanja

Čas, ko se je sprostilo 50 % učinkovine iz tablete smo izračunali iz rezultatov posameznega testa sproščanja. To smo storili tako, da smo z linearno interpolacijo dveh sosednjih točk določili iskano vrednost.

6. REZULTATI

6.1. Določanje enačb umeritvenih premic

6.1.1. Določanje enačb umeritvenih premic natrijevega diklofenakata

V preglednici XIII so prikazani rezultati meritev absorbanc standardnih raztopin natrijevega diklofenakata v raztopini medija za sproščanje in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1 ter v raztopini obeh medijev za sproščanje in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1:2. Na osnovi izmerjenih absorbanc pri absorpcijskem maksimumu natrijevega diklofenakata v določeni raztopini in znanih koncentracij standardnih raztopin smo z linearno regresijo določili enačbe umeritvenih premic (enačbe 6,7,8). Podan je tudi pripadajoči kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

Preglednica XIII: Absorbance (A) standardnih raztopin natrijevega diklofenakata pri $\lambda_{max}=276$ nm z znano koncentracijo (c) v raztopini umetnega želodčnega soka s pH 1,2 (želodčni medij) in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1, v raztopini umetnega črevesnega soka s pH 6,8 (črevesni medij) in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 ter v raztopini želodčnega medija, črevesnega medija in 0,1 M NaOH v razmerju 1:1:2.

Želodčni medij / NaOH (1:1)		Črevesni medij / NaOH (1:1)		Želodčni medij / Črevesni medij / NaOH (1:1:2)	
c (mg/L)	A	c (mg/L)	A	c (mg/L)	A
0	0	0	0	0	0
1,03	0,0296	1,04	0,0367	1,00	0,0033
3,08	0,0961	3,12	0,1072	2,93	0,0096
6,13	0,1939	6,24	0,2054	6,04	0,1983
10,3	0,3387	10,4	0,3575	9,99	0,3378
15,4	0,4898	15,6	0,5275	14,7	0,4764
20,4	0,6595	20,8	0,6858	20,1	0,6588
30,8	0,9881	31,2	1,0330	30,0	0,9835
41,0	1,3262	41,6	1,3920	39,1	1,2812
51,1	1,6280	52,0	1,6967	50,4	1,6159

Enačba umeritvene premice v želodčnem mediju / NaOH (enačba 6):

$$A = 0,0321 \cdot c \text{ [mg/L]} + 0,0003 \quad (6)$$

$$R^2 = 0,9997$$

Enačba umeritvene premice v črevesnem mediju / NaOH (enačba 7):

$$A = 0,0329 \cdot c \text{ [mg/L]} + 0,0061 \quad (7)$$

$$R^2 = 0,9999$$

Enačba umeritvene premice v želodčnem mediju / črevesnem mediju / NaOH (enačba 8):

$$A = 0,0323 \cdot c \text{ [mg/L]} + 0,0013 \quad (8)$$

$$R^2 = 0,9994$$

6.1.2. Določanje enačb umeritvenih premic tramadolijevega klorida

V preglednici XIV so prikazani rezultati meritev absorbanc standardnih raztopin tramadolijevega klorida v mediju za sproščanje. Na osnovi izmerjenih absorbanc pri absorpcijskem maksimumu tramadolijevega korida v mediju za sproščanje in znanih koncentracij standardnih raztopin smo z linearno regresijo določili enačbe umeritvenih premic (enačbe 9 in 10). Podan je tudi pripadajoči kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

Preglednica XIV: Absorbance (A) standardnih raztopin tramadolijevega klorida pri $\lambda_{max}=271$ nm z znano koncentracijo (c) v umetnem želodčnem soku s pH 1,2 (želodčni medij) in umetnem črevesnem soku s pH 6,8 (črevesni medij).

Želodčni medij		Črevesni medij	
c (mg/L)	A	c (mg/L)	A
0	0	0	0
3	0,0221	2,91	0,0172
10	0,0660	10,30	0,0632
15	0,0925	15,45	0,0910
21	0,1282	19,40	0,1140
40	0,2352	41,20	0,2516
60	0,3528	61,80	0,3600
84	0,4908	77,60	0,4571
100	0,5892	103,0	0,6219

Enačba umeritvene premice v želodčnem mediju (enačba 9):

$$A = 0,0058 \cdot c \text{ [mg/L]} + 0,0041 \quad (9)$$

$$R^2 = 0,9999$$

Enačba umeritvene premice v črevesnem mediju (enačba 10):

$$A = 0,006 \cdot c \text{ [mg/L]} - 0,0006 \quad (10)$$
$$R^2 = 0,9995$$

6.2. Testi sproščanja

6.2.1. Profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet

V prvem sklopu poskusov smo spreminjali izhodne pogoje v pretočnem sistemu s kroglicami in sicer spreminjali smo količino steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala v delovni čaši. Pri enem od pogojev smo spremenili hitrost vrtenja magnetnega mešala samo za določen čas.

V preglednicah XV-XVIII so zbrani rezultati sproščanja pri različnih količinah steklenih kroglic (15 g, 25 g, 40 g, 55g) v delovni čaši in pri hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (K1, K2, K3, K4). V preglednicah XIX, XX so zbrani rezultati sproščanja pri različnih hitrostih vrtenja magnetnega mešala (100 obratov/min, 150 obratov/min) in pri 40 g steklenih kroglic (M1, M2). V preglednici XXI so podani rezultati sproščanja pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, ki smo jo med 120-140 minutami poskusa povečali na 150 obratov/min (K3/150).

V drugem sklopu poskusov smo vedno uporabili 40 g steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, pri tem pa smo v delovno čašo za določen čas dodali oviro.

V preglednici XXI so zbrani rezultati sproščanja, ko v delovno čašo uvedemo kovinski mrežast pokrov med 120-140 minutami poskusa (O1/20), v preglednici XXII pa so rezultati, ko ta je ovira prisotna med 120-125 minutami poskusa (O1/5). Rezultati sproščanja, ko je bil kot ovira prisoten plastičen mrežast pokrov (O2) so zbrani v preglednici XXIII. V preglednicah XXIV, XXV, XXVI so podani rezultati sproščanja, ko smo za oviro uporabili stekleno palčko (pogoji O3, O4, O4/120). Rezultati sproščanja ob uporabi silikonske ovire 1 in 2 so zbrani v preglednicah XXVII, XXVIII (O4, O5).

Preglednica XV: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 15 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (pogoji poskusa K1), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,080	0,083	0,049	0,071	0,019
40	0,250	0,347	0,208	0,268	0,071
60	0,446	0,741	0,462	0,550	0,166
80	0,667	1,065	0,961	0,897	0,206
100	0,903	1,320	1,475	1,232	0,296
120	1,206	1,540	1,935	1,560	0,365
140	1,645	1,871	2,353	1,956	0,362
160	2,826	2,347	3,103	2,759	0,382
180	16,742	14,253	13,236	14,744	1,804
200	43,172	40,835	38,843	40,950	2,166
220	64,454	64,917	63,067	64,146	0,963
240	77,369	80,092	79,727	79,062	1,478
260	84,654	87,437	88,758	86,950	2,095
280	88,300	90,731	92,937	90,656	2,319
300	89,902	92,272	94,818	92,331	2,459
320	90,822	93,026	95,752	93,200	2,470
340	91,127	93,461	96,272	93,620	2,576
360	91,359	93,746	96,572	93,892	2,610

Preglednica XVI: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 25 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (pogoji poskusa K2), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,080	0,086	0,086	0,102	0,088	0,010
40	0,282	0,236	0,269	0,314	0,275	0,032
60	0,611	0,385	0,492	0,607	0,524	0,108
80	0,863	0,525	0,665	0,914	0,741	0,180
100	1,068	0,745	0,846	1,147	0,952	0,187
120	1,261	0,899	1,025	1,373	1,139	0,216
140	1,393	1,055	1,234	1,602	1,321	0,233
160	1,751	1,287	1,626	1,964	1,657	0,283
180	7,772	5,939	7,658	9,072	7,610	1,286
200	25,229	22,503	25,340	28,286	25,340	2,362
220	47,119	45,594	49,489	52,036	48,559	2,818
240	62,783	64,949	71,505	70,526	67,441	4,240
260	75,462	79,991	85,222	82,895	80,893	4,206
280	85,759	89,598	93,691	89,018	89,517	3,256
300	91,770	94,557	97,590	91,635	93,888	2,812
320	94,217	96,799	99,248	92,799	95,765	2,852
340	95,220	97,839	100,003	93,353	96,604	2,919
360	95,690	98,456	100,392	93,644	97,046	2,977

Preglednica XVII: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (pogoji poskusa K3), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,074	0,083	0,080	0,079	0,005
40	0,200	0,228	0,219	0,216	0,014
60	0,338	0,361	0,366	0,355	0,015
80	0,444	0,469	0,505	0,473	0,031
100	0,530	0,550	0,621	0,567	0,048
120	0,603	0,614	0,721	0,646	0,065
140	0,656	0,664	0,811	0,710	0,087
160	0,736	0,764	0,988	0,829	0,138
180	1,896	2,022	2,130	2,016	0,117
200	6,675	5,907	4,635	5,739	1,030
220	16,047	16,041	10,332	14,140	3,298
240	30,908	34,487	23,459	29,618	5,626
260	48,936	51,452	43,991	48,126	3,796
280	62,976	63,807	59,944	62,242	2,033
300	73,211	72,787	72,209	72,736	0,503
320	79,708	79,436	80,417	79,854	0,507
340	81,867	82,325	83,217	82,470	0,687
360	83,379	84,258	85,254	84,297	0,938

Preglednica XVIII: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 55 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (pogoji poskusa K4) v posameznih paralelkah (P), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)							SD (%)
	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,073	0,104	0,068	0,061	0,083	0,080	0,078	0,015
40	0,192	0,251	0,179	0,187	0,209	0,211	0,205	0,026
60	0,301	0,375	0,306	0,348	0,343	0,361	0,339	0,030
80	0,400	0,478	0,444	0,431	0,461	0,475	0,448	0,030
100	0,481	0,572	0,539	0,455	0,563	0,586	0,533	0,053
120	0,550	0,647	0,624	0,469	0,644	0,680	0,602	0,078
140	0,630	0,716	0,687	0,476	0,714	0,750	0,662	0,100
160	0,750	0,791	0,787	0,547	0,779	0,809	0,744	0,098
180	1,741	1,665	1,577	1,417	1,499	1,594	1,582	0,115
200	4,223	2,353	3,110	3,764	2,928	3,619	3,333	0,668
220	10,710	12,908	6,345	8,809	5,800	7,990	8,760	2,690
240	24,346	30,751	20,156	20,961	15,074	17,981	21,545	5,467
260	39,646	51,588	36,546	37,565	33,386	37,087	39,303	6,349
280	49,084	67,044	48,210	51,546	49,991	54,721	53,433	7,050
300	54,784	77,107	58,361	61,691	61,141	67,839	63,487	7,940
320	58,836	83,536	66,266	68,026	68,632	77,757	70,509	8,788
340	62,608	87,087	72,221	72,222	73,425	83,609	75,196	8,848
360	66,742	89,197	76,405	75,066	77,350	87,327	78,681	8,342
380	75,948	90,589	79,250	77,229	81,657	89,708	82,397	6,314

Preglednica XIX: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 100 obratov/min (pogoji poskusa M1), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,064	0,006	0,092	0,009	0,043	0,043
40	0,195	0,093	0,240	0,187	0,179	0,062
60	0,336	0,198	0,376	0,375	0,321	0,084
80	0,424	0,274	0,495	0,512	0,426	0,108
100	0,466	0,307	0,603	0,619	0,499	0,145
120	0,493	0,315	0,693	0,705	0,551	0,185
140	0,496	0,338	0,758	0,806	0,599	0,221
160	0,670	0,454	0,879	0,893	0,724	0,207
180	2,294	1,742	2,249	2,359	2,161	0,283
200	12,325	8,420	7,641	9,042	9,357	2,060
220	42,049	28,564	26,105	28,665	31,346	7,233
240	70,231	50,995	49,118	52,524	55,717	9,776
260	85,769	68,226	67,713	69,804	72,878	8,640
280	92,685	79,559	80,697	81,222	83,541	6,136
300	95,348	86,399	87,329	87,751	89,207	4,133
320	96,424	90,334	91,038	91,564	92,340	2,769
340	96,828	92,681	92,999	93,736	94,061	1,897

Preglednica XX: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 150 obratov/min (pogoji poskusa M2), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,116	0,117	0,008	0,099	0,085	0,052
40	0,245	0,272	0,098	0,291	0,227	0,088
60	0,371	0,438	0,223	0,519	0,388	0,126
80	0,492	0,565	0,318	0,732	0,527	0,172
100	0,569	0,672	0,401	0,918	0,640	0,216
120	0,616	0,753	0,531	1,091	0,748	0,246
140	0,653	0,860	0,673	1,246	0,858	0,275
160	0,913	1,185	0,920	1,466	1,121	0,262
180	6,665	10,759	3,343	4,144	6,228	3,336
200	33,901	39,802	20,783	23,327	29,453	8,937
220	63,054	65,144	53,773	52,304	58,569	6,470
240	81,145	80,660	77,742	73,854	78,350	3,353
260	89,859	88,988	89,684	85,938	88,617	1,825
280	93,669	92,557	93,933	91,646	92,951	1,055
300	95,050	94,163	95,354	94,188	94,689	0,606
320	95,652	94,952	95,897	95,267	95,442	0,417
340	95,905	95,386	96,116	95,771	95,795	0,307

Preglednica XXI: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bila hitrost vrtenja magnetnega mešala 150 obratov/min (pogoji poskusa K3/150), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,068	0,073	0,079	0,078	0,075	0,005
40	0,200	0,195	0,224	0,215	0,208	0,013
60	0,323	0,309	0,376	0,354	0,341	0,030
80	0,424	0,407	0,502	0,473	0,451	0,044
100	0,503	0,497	0,602	0,593	0,549	0,056
120	0,578	0,588	0,689	0,723	0,644	0,072
140	0,710	0,713	0,866	0,877	0,791	0,092
160	0,882	0,894	1,066	1,065	0,977	0,102
180	3,563	2,740	3,035	2,914	3,063	0,355
200	13,019	11,603	13,229	12,318	12,542	0,738
220	30,676	29,649	31,819	32,724	31,217	1,340
240	52,656	51,185	52,974	55,370	53,046	1,734
260	70,711	70,054	70,625	73,292	71,170	1,444
280	82,692	84,523	82,023	84,377	83,404	1,240
300	88,474	92,134	87,307	89,486	89,350	2,058
320	91,259	95,343	89,486	91,355	91,861	2,476
340	92,580	96,617	90,576	92,226	93,000	2,565
360	93,304	97,182	91,108	92,593	93,547	2,590

Preglednica XXI: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bil v delovno čašo dodan kovinski mrežast pokrov (pogoji poskusa O1/20), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,073	0,083	0,077	0,077	0,078	0,004
40	0,199	0,208	0,218	0,202	0,207	0,008
60	0,323	0,318	0,353	0,356	0,337	0,020
80	0,420	0,407	0,464	0,470	0,440	0,031
100	0,513	0,490	0,570	0,568	0,535	0,040
120	0,590	0,576	0,666	0,672	0,626	0,050
140	4,678	4,021	4,031	4,887	4,404	0,445
160	35,224	45,708	38,930	45,398	41,315	5,124
180	63,968	71,206	66,558	73,255	68,747	4,242
200	77,878	81,916	83,338	84,565	81,924	2,907
220	86,811	88,835	92,015	92,124	89,946	2,587
240	90,229	90,973	94,899	95,886	92,997	2,812
260	91,293	91,765	96,014	96,932	94,001	2,885
280	91,741	92,210	96,453	97,335	94,435	2,869

Preglednica XXII: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-125 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bil v delovno čašo dodan kovinski mrežast pokrov (pogoji poskusa O1/5), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,073	0,080	0,072	0,032	0,064	0,022
40	0,202	0,214	0,159	0,078	0,163	0,062
60	0,315	0,333	0,246	0,137	0,258	0,089
80	0,405	0,436	0,348	0,224	0,353	0,094
100	0,477	0,548	0,426	0,332	0,446	0,091
120	0,537	0,662	0,489	0,382	0,518	0,116
140	5,488	5,242	5,260	3,810	4,950	0,768
160	21,652	28,149	23,077	28,277	25,289	3,427
180	49,555	56,601	53,474	59,086	54,679	4,116
200	68,983	71,689	72,935	78,291	72,974	3,909
220	80,331	79,267	83,545	88,285	82,857	4,050
240	86,007	83,564	89,587	92,946	88,026	4,108
260	88,791	86,383	92,289	95,528	90,748	4,004
280	91,179	88,318	93,611	96,544	92,413	3,502

Preglednica XXIII: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bil v delovno čašo dodan plastičen mrežast pokrov (pogoji poskusa O2), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,078	0,024	0,078	0,079	0,065	0,027
40	0,210	0,041	0,212	0,216	0,170	0,086
60	0,331	0,148	0,338	0,359	0,294	0,098
80	0,429	0,265	0,451	0,500	0,411	0,102
100	0,520	0,362	0,546	0,603	0,508	0,103
120	0,597	0,437	0,630	0,747	0,603	0,128
140	0,864	0,670	0,852	0,934	0,830	0,112
160	1,280	1,089	1,099	1,342	1,203	0,128
180	7,167	8,273	2,749	5,906	6,024	2,388
200	24,715	30,062	10,118	23,034	21,982	8,458
220	46,683	53,853	27,297	46,642	43,619	11,397
240	66,819	73,201	50,008	66,488	64,129	9,908
260	80,975	84,397	68,165	80,101	78,409	7,077
280	89,521	90,671	79,981	87,796	86,992	4,821
300	93,511	93,442	86,348	90,970	91,068	3,361
320	95,414	94,670	89,399	92,464	92,987	2,700
340	96,300	95,161	90,834	93,155	93,862	2,402

Preglednica XXIV: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, od 120 minut (ob zamenjavi medija) do konca poskusa je bila v delovno čašo dodana steklena palčka do nivoja steklenih kroglic (pogoji poskusa O3), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,074	0,068	0,080	0,096	0,079	0,012
40	0,194	0,199	0,225	0,219	0,209	0,015
60	0,352	0,327	0,380	0,357	0,354	0,022
80	0,466	0,463	0,536	0,494	0,490	0,034
100	0,556	0,568	0,654	0,625	0,601	0,046
120	0,630	0,652	0,764	0,738	0,696	0,065
140	0,743	0,832	0,902	0,834	0,828	0,065
160	2,963	4,073	1,830	7,752	4,155	2,567
180	17,412	24,289	7,669	37,211	21,645	12,417
200	35,257	44,610	23,669	62,040	41,394	16,212
220	53,022	63,306	44,434	79,999	60,190	15,295
240	66,856	77,877	61,728	89,841	74,075	12,484
260	77,448	87,375	74,328	94,593	83,436	9,288
280	85,840	91,798	84,935	96,756	89,832	5,529
300	90,594	93,600	90,565	97,734	93,123	3,387
320	92,952	94,397	93,179	98,169	94,674	2,415
340	94,084	94,792	94,410	98,378	95,416	1,996

Preglednica XXV: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet v posameznih paralelkah (P) pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, od 120 minut (ob zamenjavi medija) do konca poskusa je bila v delovno čašo dodana steklena palčka 1 cm pod gladino medija (pogoji poskusa O4) , povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)							SD (%)
	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,067	0,070	0,072	0,073	0,078	0,081	0,073	0,005
40	0,179	0,187	0,198	0,204	0,233	0,218	0,203	0,020
60	0,286	0,303	0,349	0,341	0,384	0,353	0,336	0,035
80	0,374	0,396	0,459	0,456	0,490	0,468	0,441	0,045
100	0,447	0,480	0,542	0,547	0,583	0,560	0,526	0,052
120	0,535	0,559	0,617	0,626	0,672	0,651	0,610	0,053
140	0,885	3,030	0,711	0,721	0,810	0,774	1,155	0,921
160	16,207	39,655	4,348	10,536	1,032	6,875	13,109	14,017
180	42,405	69,695	25,686	43,837	12,587	37,234	38,574	19,257
200	65,106	86,633	46,838	69,211	40,314	62,987	61,848	16,549
220	80,476	93,501	64,599	85,535	64,223	80,222	78,093	11,640
240	89,469	96,095	77,742	94,294	80,572	90,137	88,051	7,379
260	95,039	97,217	78,639	97,179	89,205	94,700	91,997	7,168
280	97,056	97,716	83,366	98,531	93,292	96,717	94,446	5,717
300	98,030	97,913	85,752	99,007	95,126	97,619	95,575	4,983
320	98,546	97,998	87,226	99,271	96,041	98,042	96,187	4,519

Preglednica XXVI: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, od začetka do 120 minut poskusa (do zamenjave medija) je bila v delovno čašo dodana steklena palčka 1 cm pod gladino medija (pogoji poskusa O4/120), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,040	0,045	0,081	0,087	0,063	0,025
40	0,117	0,097	0,278	1,989	0,620	0,916
60	0,180	0,195	0,500	2,186	0,765	0,958
80	0,245	0,291	0,704	2,390	0,907	1,010
100	0,271	0,373	0,940	2,644	1,057	1,098
120	0,296	0,434	1,271	2,988	1,247	1,238
140	0,362	0,561	1,717	3,632	1,568	1,500
160	0,498	0,857	2,035	4,417	1,952	1,770
180	1,779	2,290	3,888	7,538	3,874	2,603
200	9,115	7,786	12,583	16,675	11,540	3,976
220	27,697	24,134	29,364	41,065	30,565	7,332
240	50,222	46,105	49,637	64,241	52,551	8,003
260	68,053	65,340	70,045	79,761	70,800	6,278
280	81,048	78,910	84,576	87,178	82,928	3,672
300	88,138	87,169	92,068	90,647	89,505	2,251
320	91,113	90,817	95,581	92,271	92,445	2,182
340	92,429	92,487	97,223	93,129	93,817	2,293
360	93,071	93,289	98,041	93,636	94,509	2,366

Preglednica XXVII: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-125 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bila v delovno čašo dodana silikonska ovira 1 (pogoji poskusa O5), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,071	0,074	0,068	0,076	0,072	0,004
40	0,205	0,191	0,190	0,200	0,196	0,007
60	0,353	0,326	0,314	0,349	0,336	0,019
80	0,500	0,484	0,428	0,468	0,470	0,031
100	0,625	0,607	0,532	0,576	0,585	0,041
120	0,726	0,728	0,607	0,705	0,692	0,057
140	2,056	2,468	2,168	1,992	2,171	0,211
160	5,697	8,374	12,947	6,876	8,473	3,177
180	18,178	33,086	44,728	25,339	30,333	11,365
200	37,124	56,402	69,030	47,609	52,541	13,525
220	55,605	73,995	84,196	66,807	70,151	12,039
240	69,549	84,385	92,697	79,541	81,543	9,667
260	79,691	89,549	95,962	86,297	87,875	6,774
280	85,327	91,909	97,285	89,647	91,042	4,978
300	88,400	93,054	97,864	91,375	92,673	3,960
320	90,094	93,597	98,152	92,282	93,531	3,403

Preglednica XXVIII: Odstotki sproščene natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-125 minutami poskusa (ob zamenjavi medija) je bila v delovno čašo dodana silikonska ovira 2 (pogoji poskusa O6), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)					SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,069	0,068	0,057	0,060	0,064	0,006
40	0,182	0,172	0,153	0,170	0,169	0,012
60	0,286	0,274	0,246	0,294	0,275	0,021
80	0,386	0,379	0,329	0,406	0,375	0,033
100	0,468	0,460	0,401	0,500	0,457	0,041
120	0,544	0,537	0,493	0,624	0,549	0,055
140	1,064	1,664	1,266	2,299	1,573	0,544
160	3,156	12,237	5,722	14,273	8,847	5,263
180	20,013	42,865	23,820	45,842	33,135	13,103
200	43,733	65,953	48,706	71,063	57,364	13,193
220	63,010	81,966	70,365	84,877	75,055	10,187
240	76,386	88,363	83,208	91,438	84,849	6,585
260	84,012	90,769	89,593	93,958	89,583	4,147
280	87,657	91,865	92,452	94,979	91,738	3,038
300	89,650	92,344	93,823	95,385	92,801	2,440
320	90,837	92,558	94,559	95,608	93,390	2,121
340	91,475	92,710	94,993	95,746	93,731	1,982

6.2.2. Profili sproščanja tramadolijevega klorida iz Tramal tablet

Teste sproščanja na tabletah Tramal smo izvedli samo pri nekaj izbranih pogojih. V preglednici XXIX so zbrani rezultati, ko smo poskus izvajali s 40 g steklenih kroglic in hitrostjo vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (K3). Pri naslednjem pogoju smo med 120-140 minutami poskusa povečali hitrost vrtenja magnetnega mešala na 150 obratov/min (K3/150). Rezultati tega testa so zbrani v preglednici XXX. Teste sproščanja smo izvajali še v prisotnosti dveh ovir in sicer kovinskega ter plastičnega mrežastega pokrova v času 120-140 minut poskusa (O1/20, O2). Rezultati so zbrani v preglednicah XXXI in XXXII.

Preglednica XXIX: Odstotki sproščenega tramadolijevega klorida iz Tramal tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min (pogoji poskusa K3), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	6,187	6,213	6,400	6,266	0,116
40	16,700	16,346	16,752	16,599	0,221
60	25,714	25,307	25,794	25,605	0,261
80	33,190	32,824	33,212	33,075	0,218
100	39,742	39,193	39,529	39,488	0,277
120	45,224	44,587	44,844	44,885	0,321
140	50,210	49,511	49,581	49,767	0,385
160	54,837	54,056	54,183	54,358	0,419
180	59,197	58,401	58,522	58,707	0,429
200	63,139	62,376	62,386	62,634	0,438
220	66,738	65,975	65,955	66,222	0,446
240	69,939	69,205	69,194	69,446	0,427
260	72,870	72,167	72,120	72,386	0,420
280	75,565	74,857	74,803	75,075	0,425
300	78,009	77,233	77,163	77,468	0,469
320	80,254	79,414	79,377	79,682	0,496
340	82,290	81,386	81,426	81,701	0,511
360	84,176	83,212	83,327	83,572	0,526

Preglednica XXX: Odstotki sproščene tramadolijevega klorida iz Tramal tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa se bila hitrost vrtenja magnetnega mešala 150 obratov/minuto (pogoji poskusa K3/150), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	6,166	6,166	6,125	6,152	0,023
40	16,437	16,437	16,613	16,496	0,101
60	25,512	25,512	25,791	25,605	0,161
80	33,012	33,012	33,444	33,156	0,250
100	39,433	39,433	40,096	39,654	0,383
120	45,137	45,137	45,799	45,358	0,382
140	50,249	50,249	51,080	50,526	0,480
160	55,229	55,229	56,185	55,548	0,552
180	59,637	59,637	60,790	60,022	0,666
200	63,539	63,539	64,873	63,983	0,770
220	67,106	67,106	68,422	67,545	0,759
240	70,312	70,312	71,648	70,757	0,771
260	73,210	73,210	74,577	73,666	0,790
280	75,814	75,814	77,240	76,289	0,823
300	78,147	78,147	79,673	78,656	0,881
320	80,376	80,376	81,897	80,883	0,878
340	82,420	82,420	83,924	82,922	0,868
360	84,290	84,290	85,751	84,777	0,844

Preglednica XXXI: Odstotki sproščenega tramadolijevega klorida iz Tramal tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa je bil v delovno čašo dodan kovinski mrežast pokrov (pogoji poskusa O1/20), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	6,348	6,110	6,346	6,268	0,137
40	16,640	16,463	16,815	16,639	0,176
60	25,320	25,671	26,057	25,683	0,369
80	32,896	33,170	33,911	33,325	0,525
100	39,372	39,490	39,873	39,579	0,262
120	45,073	44,923	45,485	45,160	0,291
140	50,846	50,432	51,613	50,964	0,599
160	57,279	55,659	57,639	56,859	1,055
180	62,295	59,968	62,630	61,631	1,450
200	66,593	63,931	66,839	65,788	1,612
220	70,407	67,547	70,587	69,513	1,705
240	73,772	70,898	73,898	72,856	1,697
260	76,715	73,822	76,821	75,786	1,702
280	79,354	76,442	79,488	78,428	1,721
300	81,742	78,843	81,872	80,819	1,713
320	83,858	81,022	84,014	82,964	1,684
340	85,780	82,953	85,948	84,893	1,683
360	87,534	84,695	87,703	86,644	1,690

Preglednica XXXII: Odstotki sproščenega tramadolijevega klorida iz Tramal tablet pri 40 g steklenih kroglic in hitrosti vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min, med 120-140 minutami poskusa je bil v delovno čašo dodan plastičen mrežast pokrov (pogoji poskusa O2), povprečje in standardna deviacija.

t (min)	Sproščena učinkovina (%)				SD (%)
	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Povprečje	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	5,942	6,210	6,062	6,071	0,134
40	16,383	16,585	16,454	16,474	0,102
60	25,712	25,531	25,871	25,705	0,170
80	33,206	33,126	33,650	33,327	0,282
100	39,500	39,591	40,500	39,864	0,553
120	45,201	45,061	46,278	45,513	0,666
140	50,676	50,136	51,631	50,814	0,758
160	56,008	55,009	56,814	55,943	0,905
180	60,480	59,358	61,326	60,388	0,987
200	64,602	63,365	65,317	64,428	0,987
220	68,311	66,968	68,870	68,050	0,978
240	71,654	70,076	71,964	71,231	1,013
260	74,648	72,979	74,813	74,146	1,015
280	77,388	75,643	77,422	76,818	1,017
300	79,860	78,054	79,765	79,226	1,016
320	82,146	80,270	81,883	81,433	1,016
340	84,203	82,310	83,820	83,444	1,001
360	86,058	84,135	85,490	85,228	0,988

6.3. Vpliv uporabljenih ovir na absorbanco pri testih sproščanja

V preglednicah XXXIII, XXXIV, XXXV so podani rezultati meritev absorbanc v mediju, v katerem so bili potopljene kovinski in plastičen mrežast pokrov ter silikonska ovira. Medij (40 mL) je bil sestavljen iz umetnega želodčnega soka s pH 1,2 in umetnega črevesnega soka s pH 6,8 v volumskem razmerju 1:1. Medijem smo izmerili absorbanco po preteku 20 minut, 1 ure in 3 ur, pri dveh valovnih dolžinah ($\lambda_1=271$ nm, $\lambda_2=276$ nm), ki predstavljata absorpcijski maksimum tramadolijevega klorida in natrijevega diklofenakata.

Preglednica XXXIII: Absorbanca medija pri določeni valovni dolžini $[A(\lambda)]$ v katerem je bil namočen kovinski mrežast pokrov 20, 60 in 180 minut (t).

t (min)	A ($\lambda = 271$ nm)	A ($\lambda = 276$ nm)
20	0,0036	0,0034
60	0,0044	0,0042
180	0,0052	0,0049

Preglednica XXXIV: Absorbanca medija pri določeni valovni dolžini $[A(\lambda)]$ v katerem je bil namočen plastičen mrežast pokrov 20, 60 in 180 minut (t).

t (min)	A ($\lambda = 271$ nm)	A ($\lambda = 276$ nm)
20	0,0161	0,0141
60	0,0291	0,0259
180	0,0536	0,0485

Preglednica XXXV: Absorbanca medija pri določeni valovni dolžini $[A(\lambda)]$ v katerem je bila namočena silikonska ovira 20, 60 in 180 minut (t).

t (min)	A ($\lambda = 271$ nm)	A ($\lambda = 276$ nm)
20	0,0014	0,0012
60	0,0011	0,0011
180	0,0026	0,0024

6.4. Rezultati statistične analize

V prvem delu so zbrani rezultati statistične analize profilov sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet ob različnih pogojih. V preglednicah XXXVI, XXXVII in XXXVIII, XXXIX so zbrani rezultati statistične analize profilov sproščanja pri različnih količinah steklenih kroglic in pri različnih hitrostih vrtenja magnetnega mešala, ki smo jih dobili z ANOVA testi in Post Hoc (Sidaki) testi. V preglednici XL so rezultati Studentovega t – testa za določitev vpliva začasnega povečanja hitrosti vrtenja magnetnega mešala. S pomočjo ANOVA in Post Hoc (Sidaki) testi smo določevali vpliv dodatka steklene palčke do različnih globlin, ti rezultati so zbrani v preglednicah XLI, XLII. Vpliv steklene palčke na sproščanje, ki je bila prisotna pred ali po zamenjavi medija je določen s Studentovim t – testom v preglednici XLIII. V nadaljevanju smo hoteli določiti vpliv dodatka preostalih ovir in smo vedno za dva izbrana pogoja uporabili Studentov t – test. V preglednicah XLIV in XLV so rezultati vpliva dodatka kovinskega mrežastega pokrova za 20 ali 5 minut med poskusom, v preglednici XLVI pa je primerjava vpliva med njima. V preglednici XLVII je rezultat vpliva dodatka plastičnega mrežastega pokrova. Primerjava med dodatkov kovinskega in plastičnega mrežastega pokrova je v preglednici XLVIII. Kako vpliva dodatek silikonske ovire 1 in 2 na sproščanje in primerjava vpliva med njima je zbrano v preglednicah IL, L, LI.

V drugem delu so zbrani rezultati statistične analize profilov sproščanja tramadolijevega klorida iz Tramal tablet ob različnih pogojih. V preglednicah LII, LIII, LIV so prikazani rezultati Studentovega t – testa, s katerim smo določevali vpliv začasnega povečanja hitrosti vrtenja magnetnega mešala ter dodatek plastičnega ali kovinskega mrežastega pokrova na sproščanje.

Pri statističnih testih smo uporabili stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Vpliv faktorja je značilen (S) pri $p < 0,05$ in neznačilen (NS) pri $p > 0,05$.

6.4.1. Sproščanje natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet

6.4.1.1. Vpliv količine steklenih kroglic

Preglednica XXXVI: Rezultati testa homogenosti variance in analize variance odvisne spremenljivke ($t_{50\%}$) s faktorjem količina steklenih kroglic (K1, K2, K3, K4).

Homogenost varianc		ANOVA	
p	S/NS	p	S/NS
0,199	NS	<0,0005	S

Preglednica XXXVII: Rezultati Post Hoc (Sidak) testa za količino steklenih kroglic kot izbrani faktor (K1, K2, K3, K4) in $t_{50\%}$ kot odvisna spremenljivka.

Količina steklenih kroglic		p	S/NS
K1	K2	0,117	NS
K1	K3	<0,0005	S
K1	K4	<0,0005	S
K2	K1	0,117	NS
K2	K3	<0,0005	S
K2	K4	<0,0005	S
K3	K1	<0,0005	S
K3	K2	<0,0005	S
K3	K4	0,089	NS
K4	K1	<0,0005	S
K4	K2	<0,0005	S
K4	K3	0,089	NS

6.4.1.2. Vpliv hitrosti vrtenja magnetnega mešala

Preglednica XXXVIII: Rezultati testa homogenosti variance in analize variance odvisne spremenljivke ($t_{50\%}$) s faktorjem hitrost vrtenja magnetnega mešala (M1, M2, K3).

Homogenost varianc		ANOVA	
p	S/NS	p	S/NS
0,691	NS	<0,0005	S

Preglednica XXXIX: Rezultati Post Hoc (Sidak) testa za hitrost vrtenja magnetnega mešala kot izbrani faktor (M1, M2, K3) in $t_{50\%}$ kot odvisna spremenljivka.

Hitrost vrtenja magnetnega mešala		p	S/NS
K3	M1	0,001	S
K3	M2	<0,0005	S
M1	K3	0,001	S
M1	M2	0,002	S
M2	K3	<0,0005	S
M2	M1	0,002	S

Preglednica XL: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost povečanja hitrosti vrtenja magnetnega mešala za določen čas (K3, K3/150).

p	S/NS
<0,0005	S

6.4.1.3. Vpliv dodatka ovir

Preglednica XLI: Rezultati testa homogenosti variance in analize variance odvisne spremenljivke ($t_{50\%}$) s faktorjem prisotnost steklene palčke pri različnih globinah (K3,O3,O4).

Homogenost varianc		ANOVA	
p	S/NS	p	S/NS
0,350	NS	<0,0005	S

Preglednica XLII: Rezultati Post Hoc (Sidak) testa za prisotnost steklene palčke pri različnih globinah (K3,O3,O4) kot izbrani faktor in $t_{50\%}$ kot odvisna spremenljivka.

Hitrost vrtenja magnetnega mešala		p	S/NS
K3	O3	0,001	S
K3	O4	<0,0005	S
O3	K3	0,001	S
O3	O4	0,137	NS
O4	K3	<0,0005	S
O4	O3	0,137	NS

Preglednica XLIII: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem različne časovne prisotnosti steklene palčke 1 cm pod gladino medija (O4, O4/120).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica XLIV: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost kovinskega mrežastega pokrova med 120-140 minutami poskusa (K3, O1/20).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica XLV: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost kovinskega mrežastega pokrova med 120-125 minutami poskusa (K3, O1/5).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica XLVI: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem različne časovne prisotnost kovinskega mrežastega pokrova (O1/20, O1/5).

p	S/NS
0,003	S

Preglednica XLVII: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost plastičnega mrežastega pokrova med 120-140 minutami poskusa (K3, O2).

p	S/NS
0,002	S

Preglednica XLVIII: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnosti dveh različnih mrežastih pokrovov med 120-140 minutami poskusa (O1/20, O2).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica IL: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost silikonske ovire 1 med 120-125 minutami poskusa (K3, O5).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica L: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost silikonske ovire 2 med 120-125 minutami poskusa (K3, O6).

p	S/NS
<0,0005	S

Preglednica LI: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost silikonske ovire 1 ali 2 med 120-125 minutami poskusa (O5, O6).

p	S/NS
0,611	S

6.4.2. Sproščanje tramadolijevega klorida iz Tramal tablet

Preglednica LII: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem povečanje hitrosti vrtenja magnetnega mešala med 120-140 minutami poskusa (K3, K3/150).

p	S/NS
0,159	NS

Preglednica LIII: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost kovinskega mrežastega pokrova med 120-140 minutami poskusa (K3, O1/20).

p	S/NS
0,040	S

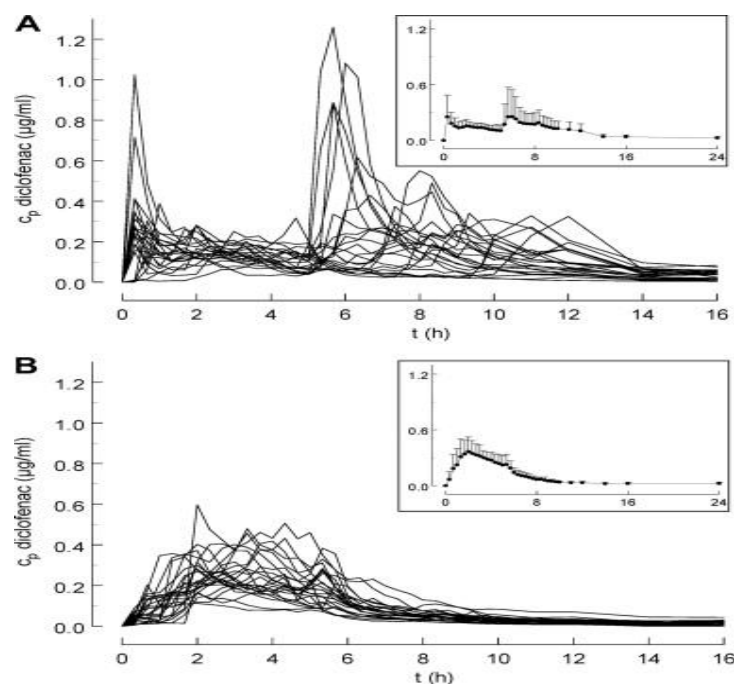
Preglednica LIV: Rezultati Studentovega t – testa odvisne spremenljivke $t_{50\%}$ s faktorjem prisotnost plastičnega mrežastega pokrova med 120-140 minutami poskusa (K3, O2).

p	S/NS
0,098	NS

7. RAZPRAVA

Pogosto je namen *in vitro* testov sproščanja vzpostavitev korelacije z *in vivo* plazemskimi profili. Če se ugotovi ustrezna korelacija, se test lahko uporablja kot del rednega testiranja kakovosti ali za napovedovanje sproščanja iz nove farmacevtske oblike. Aparature in mediji za sproščanje, ki jih priporočajo farmakopeje, omogočajo zelo standardizirane teste za ponazarjanje pogojev v prebavnem traktu. Ustrezna sestava medija za raztapljanje, predvsem njegov pH, ionska moč, puferska kapaciteta, prisotnost površinsko aktivnih snovi in prebavnih encimov ter možnost spreminjanja hidrodinamskih pogojev približata *in vitro* pogoje k dejanskim fiziološkim okoliščinam. S pomočjo takšnih pristopov lažje sklepamo, kako se bo farmacevtska oblika obnašala *in vivo*. Manj načinov obstaja za ponazoritev mehanskih obremenitev v prebavnem traktu z namenom ocene občutljivosti farmacevtske oblike na mehanske dogodke *in vivo*. Takšna občutljivost ima v nekaterih primerih velik vpliv na sproščanje učinkovine.

V nalogi je bilo proučevano zdravilo Voltaren[®] retard filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg. Pri nekaterih farmacevtskih oblikah z natrijevim diklofenakatom s podaljšanim sproščanjem je značilno, da se po peroralnem zaužitju oblike pojavita dva ali več vrhov v plazemskem profilu (30). Raziskovalci navajajo več možnih razlogov za njihov nastanek in sicer, da je učinkovina slabo topna v kislem, zato je njeno raztapljanje odvisno od pH medija, na njeno absorpcijo vpliva prisotnost žolčnih soli, učinkovina podleže enterohepatičnemu kroženju in obstoj več absorpcijskih oken (30). Pri peroralnem zaužitju tablet s podaljšanim sproščanjem v plazemskem profilu izstopata dva vrhova, prvi se pojavi v času prve ure in drugi 5-6 ur po zaužitju tablete. Ta profil se razlikuje od profila, ki so ga dobili po zaužitju pelet s podaljšanim sproščanjem, saj tukaj ni tako izrazitih porastov plazemske koncentracije (slika 4). Te razlike pojasnjujejo z mehansko občutljivostjo tablet z natrijevim diklofenakatom. Ob prehodu tablete skozi pilorus in skozi ileocekalni sfinkter je tableta izpostavljena velikim mehanskim obremenitvam, zato pride do velikega sproščanja učinkovine in pojava plazemskih vrhov (30).



Slika 4: Plazemski profili diklofenaka pri posameznikih ($n = 24$), ki so zaužili farmacevtsko obliko s podaljšanim sproščanjem s 100 mg diklofenaka pri pogojih na tešče. V okvirju nad grafom je prikazano povprečje s standardno deviacijo. Farmacevtska oblika pri (A) so Voltaren retard tablet s podaljšanim sproščanjem, pri (B) pa Diclofenac-ratiopharm pelete (30).

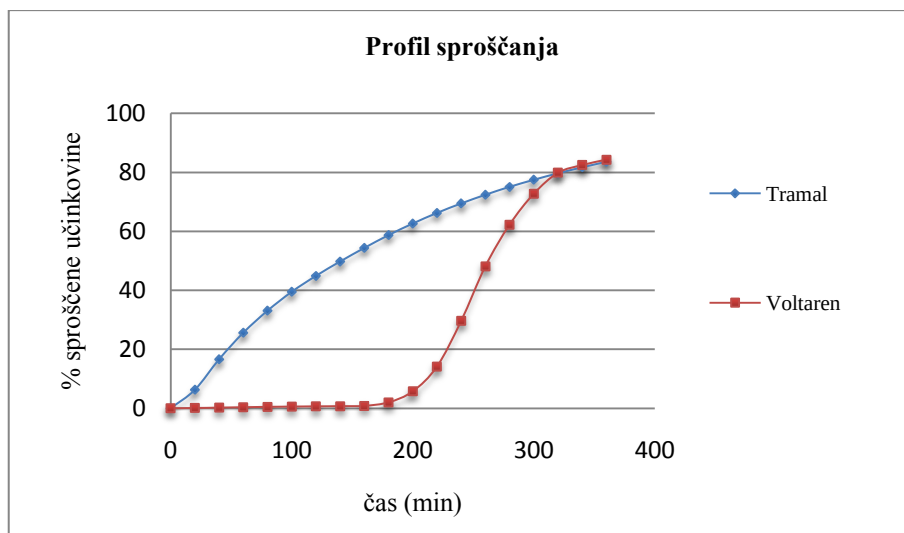
Naš namen je bil na pretočnem sistemu s kroglicami in z dodatkom ovir ponazoriti sile, ki delujejo na farmacevtsko obliko med praznjenjem želodca na tešče. Na podlagi dobljenih profilov sproščanja smo lahko ugotovili, kakšen ima vpliv posamezna sprememba pogojev na sproščanje in kakšna je ponovljivost rezultatov pri izbranem pogoju. Med proučevanimi pogoji smo določili tiste, ki prispevajo k najboljši *in vitro in vivo* korelaciji. Glavna proučevana farmacevtska oblika so bile tablete Voltaren, za katere smo pričakovali, da se bodo pri testih sproščanja zaradi svoje mehanske občutljivosti odzvale na vsako spremembo pogojev. Natrijev diklofenakat je učinkovina, ki po biofarmacevtski klasifikaciji zdravil (BCS, Biopharmaceutics Classification Scheme) spada v II. razred (31). To pomeni, da je omejitveni faktor absorpcije hitrost raztapljanja, saj dobro prehaja biološke membrane, vendar je slabo topna. Pričakujemo lahko, da bomo z povečanjem mehanske obremenitve pri testih sproščanja, pospešili hitrost raztapljanja učinkovine. Druga farmacevtska oblika so bile Tramal[®] filmsko obložene tablete s podaljšanim sproščanjem 100 mg, ki so služile za primerjavo in oceno vpliva samo nekaterih izbranih obremenitev pri testih sproščanja.

7.1. Aparatura za teste sproščanja

Teste sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu s kroglicami. V delovno čašo sistema smo hkrati dovajali svež medij, iz čaše pa črpali vzorec oziroma medij z raztopljeno učinkovino. Na tak način aparatura omogoča uporabo večjega volumna medija, ki je na voljo za raztapljanje učinkovine. V okolici farmacevtske oblike tako ni prisotna nasičena raztopina učinkovine in je omogočeno nadaljnje raztapljanje učinkovine. Zaradi pretočnosti so bile v sistemu ob zamenjavi medija spremembe v delovni čaši zvezne, kar je bližje *in vivo* pogojem. Ponazarjanje fizioloških pogojev v prebavnem traktu smo dosegli tudi z uporabo steklenih kroglic, ki omogočajo posnemaje premikanja farmacevtske oblike ob sluznici GIT-a. Vrtenje magnetnega mešala povzroči, da se steklene kroglice gibljejo in da njihova gladina valovi. Farmacevtska oblika je v testih sproščanja potovala po gladini steklenih kroglic. Zaradi stika s kroglicami se iz površine oblike odstranjuje difuzni sloj, kar pospeši raztapljanje učinkovine.

7.2. Oblika profilov sproščanja učinkovine iz tablete

Za profil sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet je značilen zamik začetka sproščanja (t_{lag}). Učinkovina je namreč slabo topna v kislem pH (topnost pri sobni temperaturi pri pH 1,0 je 0,0012 mg/mL) (32), v dveh urah se je sprostilo manj kot 2% učinkovine. Hitrost sproščanja je narasla v mediju z višjim pH, saj je topnost učinkovine pri pH 6,8 pri sobni temperaturi 0,67 mg/mL (32). Učinkovina je sol šibke kisline (2-[2,6-diklorofenil)amino]fenilacetne kisline) s pK_a 4,0 (33). V mediju s pH 1,2 je učinkovina prisotna v glavnem v neionizirani obliki, ki je skoraj netopna, zato je bilo raztapljanje učinkovine v tem mediju majhno. Nasprotno je v intestinalnem pH natrijev diklofenakat lahko topen, zato se je s porastom pH vrednosti zvečala tudi hitrost sproščanja. Drugačen profil opazimo pri sproščanju tramadolijevega klorida iz Tramal tablet (slika 5). Tramadolijev klorid je sol bazične učinkovine (2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoksifenil) cikloheksanol) s pK_a 9,41 in je v vodi lahko topen (34; 35). Torej je učinkovina ionizirana in topna v obeh uporabljenih pH vrednostih medija, pH 1,2 ter pH 6,8. V profilu sproščanja učinkovine iz tablet Tramal se zato ne pojavi t_{lag} , saj se učinkovina sprošča skozi celoten profil sproščanja.



Slika 5: Profil sproščanja natrijevega diklofenakata (Voltaren) in tramadolijevega klorida (Tramal) iz tablet na pretočnem sistemu s kroglicami (pogoj: 40 g steklenih kroglic in hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min).

Koncentracijo učinkovine ob določenem času smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene premice v ustreznem mediju in izmerjene absorbance. Pri testih sproščanja tablet Tramal je bil medij za sproščanje enak mediju, v katerem so se nahajali vzorci. Pri Voltaren tabletah so vzorci testov sproščanja pritekali v merilni valj napolnjen z NaOH. Vzorec z natrijevim diklofenakatom se je zato vedno nahajal v raztopini medija za sproščanje (črevesni ali želodčni medij) in NaOH v volumskem razmerju 1:1. S tem smo preprečili, da bi se sicer majhna količina učinkovine, ki se je raztopila v želodčnem mediju, oborila. Ob enem pa smo z NaOH omogočili raztapljanje učinkovine, ki je bila prisotna v majhnih delčkih tablete, ki so lahko prešli mrežico v cevki za odtok vzorca. Na tak način je bila sicer količina raztopljene učinkovine v merilnem valju večja, kot je bila v delovni čaši, kjer je potekalo sproščanje. Vendar lahko postopek izvajanja sproščanja zagovarjamo s tem, da majhni delčki tablete v želodcu lahko skozi pilorus preidejo v duodenum, preden tableta zapusti želodec in je tako omogočeno raztapljanje natrijevega diklofenakata zaradi porasta pH medija.

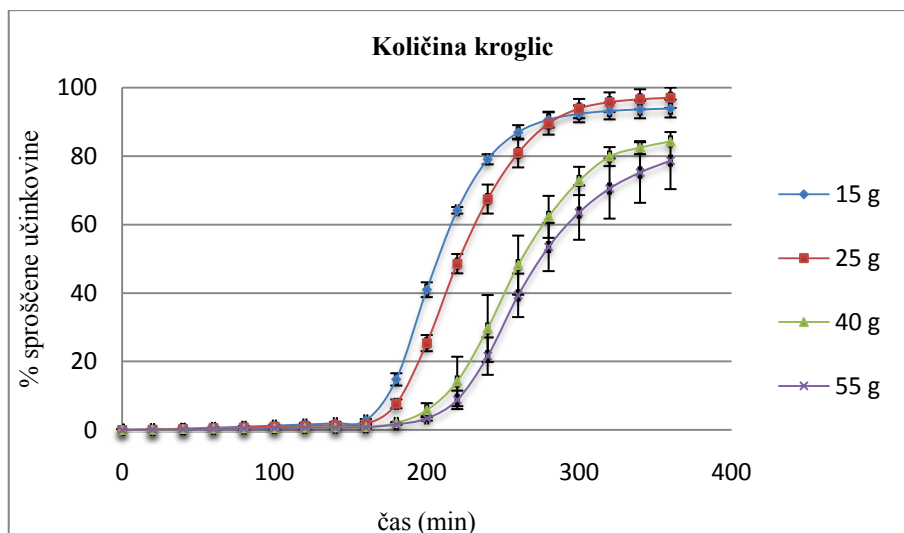
Po preteku 120 minut poskusa smo cevko za dotok medija prestavili iz želodčnega v črevesni medij. Koncentracijo učinkovine v vzorcih smo med 0-140 min poskusa izračunali s pomočjo umeritvene premice, ki je bila določena v želodčnem mediju, od 160 min poskusa dalje smo vzorcem izračunali koncentracijo s pomočjo umeritvene premice, ki je bila določena v črevesnem mediju. Med 120 in 140 minutami poskusa je sicer test

sproščanja potekal pri mešanici obeh medijev. Zato smo za natrijev diklofenakat izdelali umeritveno premico tudi pri uporabi želodčnega in črevesnega medija v volumskem razmerju 1:1. Vendar se je pri tem pokazalo, da je minimalna razlika v koncentraciji učinkovine v vzorcu nastalim med 120–140 min poskusa, če smo za izračun uporabili enačbo umeritvene premice določene v želodčnem mediju ali enačbo umeritvene premice določene v mešanici obeh medijev, zato slednje umeritvene premice pri izračunih nismo uporabljali.

7.3. Vpliv količine steklenih kroglic

S spreminjanjem količine steklenih kroglic (15 g, 25 g, 40 g, 55 g) v delovni čaši smo želeli vplivati na jakost mehanske obremenitve, ki je delovala na tableto med poskusom sproščanja. Manjša kot je bila količina steklenih kroglic, večji je bil vpliv vrtenja magnetnega mešala pod kroglicami in zato je bilo valovanje gladine steklenih kroglic izrazitejše. Tableta, ki se je gibala po takšni površini, je bila izpostavljena večjim mehanskim silam.

Rezultati (slika 6, preglednici XXXVI, XXXVII) kažejo, da se z zmanjševanjem količine steklenih kroglic povečuje hitrost sproščanja učinkovine. Statistično ni bilo značilne razlike med rezultati sproščanja pri uporabi 15 g in 25 g kroglic ter med 40 in 55 g kroglic, med ostalimi uporabljenimi količinami kroglic so bile razlike značilne. Kot rezultat sproščanja za statistično analizo smo izbrali čas, ko se je sprostilo 50 % učinkovine iz tablete ($t_{50\%}$).

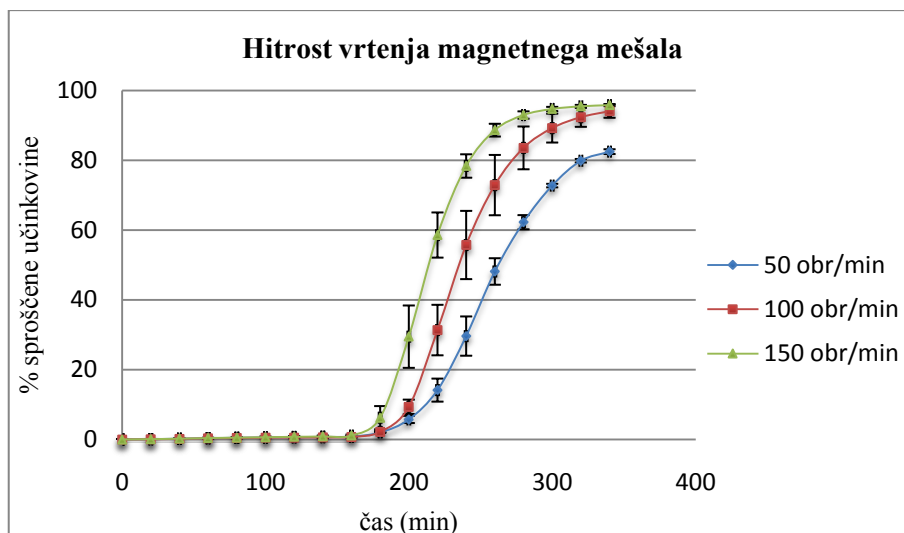


Slika 6: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri različnih količinah steklenih kroglic (v gramih). Hitrost vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min.

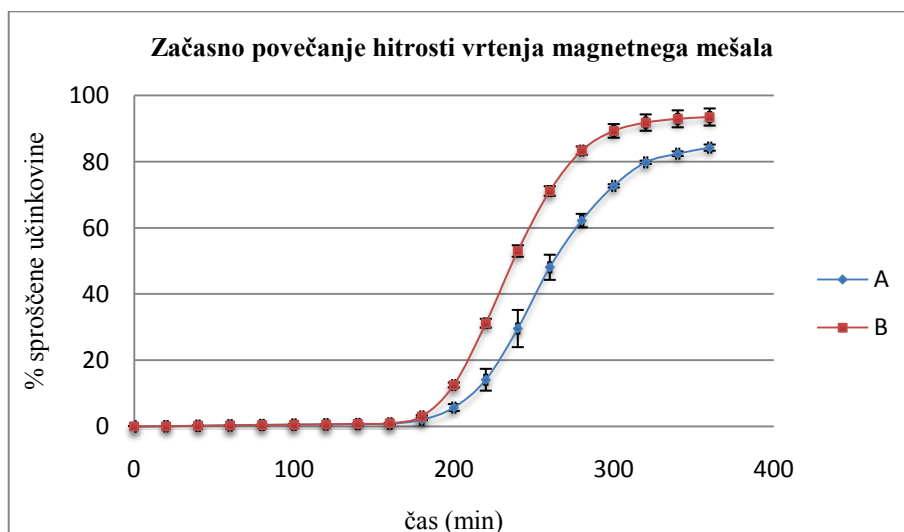
7.4. Vpliv hitrosti vrtenja magnetnega mešala

Vpliv hitrosti vrtenja magnetnega mešala na sproščanje smo opazovali pri 50, 100, 150 obrati/min. Iz rezultatov (slika 7, preglednica XXXVIII, XXXIX) je razvidno, da ima ta parameter značilen vpliv. Ob večji hitrosti mešanja se spremenijo hidrodinamski pogoji pri testu sproščanja, ki povečajo raztapljanje učinkovine. Poleg tega pa smo lahko opazili med poskusom, da se je tableta pri večjih hitrostih mešanja odbijala od močno valujoče gladine steklenih kroglic in je bila tako izpostavljena dodatnim mehanskim obremenitvam.

Tudi če smo hitrost vrtenja magnetnega mešala povečali samo začasno (20 minut), je bil to značilen vpliv na sproščanje (slika 8, preglednica XL).



Slika 7: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri različnih hitrostih vrtenja magnetnega mešala (obradi/min). Količina steklenih kroglic 40 g.

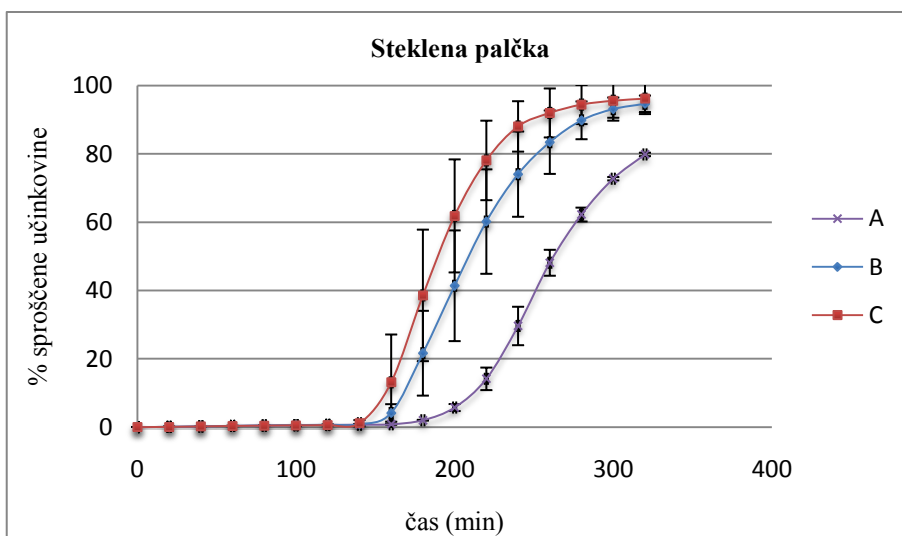


Slika 8: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri hitrostih vrtenja magnetnega mešala 50 obratov/min in količini steklenih kroglic 40 g (pogoj K3). V primeru (A) se hitrost vrtenja ni spreminjala, v primeru (B) je bila hitrost vrtenja med 120-140 minutami poskusa 150 obratov/min.

7.5. Vpliv dodatka steklene palčke

V delovno čašo smo uvedli stekleno palčko do različnih globin tako, da je tableta na svoji poti prišla v stik z njo. Konec palčke je segal 1 cm pod gladino medija za sproščanje, kar je

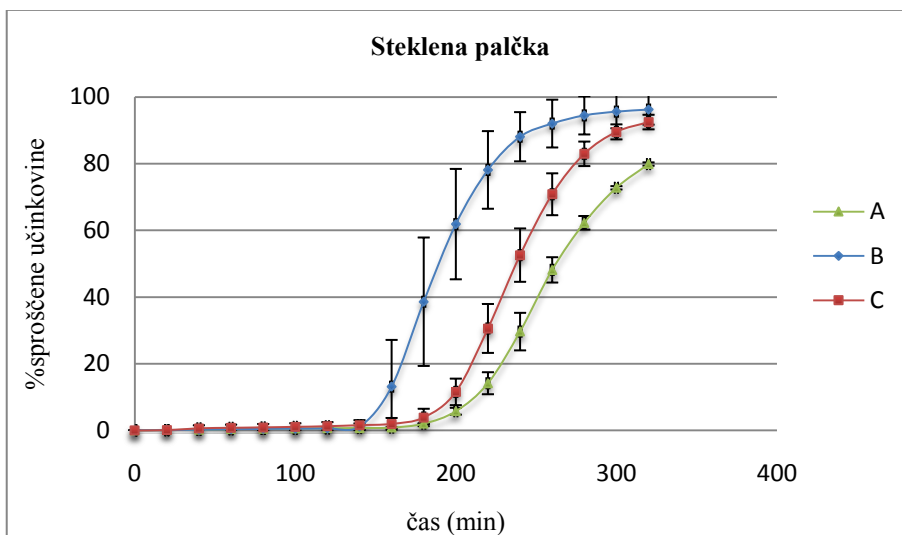
0,5 cm nad gladino kroglic ali pa do nivoja gladine steklenih kroglic, ki je bila 1,5 cm pod gladino medija. Iz rezultatov je razvidno (slika 9, preglednica XLI, XLII), da dodatek steklene palčke značilno vpliva na sproščanje. Ni pa značilnega vpliva faktorja, kako globoko se palčka uvede, čeprav smo med poskusom opazili, da pride do razlik v gibanju tablete med obema pogojem. Če je segal konec palčke do nivoja kroglic, se je tableta na svoji poti zadela ob palčko in jo obšla. Ko pa je bila palčka postavljena višje (1 cm pod gladino medija), se je tableta ob palčko zadela in nadaljevala pot tako, da je šla pod palčko in se pri tem malo ugreznila med steklene kroglice. Dotik tablete ob oviro je vplival na sproščanje, saj je pri tem od površine tablete odstopilo nekaj koščkov tablete, kar je povečalo skupno površino za sproščanje učinkovine.



Slika 9: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri pogoju K3. V primeru (A) ovira ni bila dodana, v primeru (B) je bila dodana steklena palčka do nivoja kroglic od 120 minute poskusa dalje, v primeru (C) je bila dodana steklena palčka 1 cm pod gladino medija od 120 minute poskusa dalje.

Vpliv dodatka steklene palčke na $t_{50\%}$ je bil značilno različen (slika 10, preglednica XLIII), če je bila palčka prisotna samo začetnih 120 minut poskusa, ko je bil kot medij za raztapljanje prisoten umetni želodčni sok ali če je bila palčka uvedena v delovno čašo od 120 minut poskusa dalje, ko je bil za medij uporabljen umetni črevesni sok. T_{lag} je bil manjši, če je bila palčka prisotna v umetnem črevesnem soku. Razlog za razlike v t_{lag} je najverjetneje v tem, da je natrijev diklofenakat prisoten v velikem deležu tablete (učinkovina predstavlja približno tretjino mase tablete). Ker je učinkovina skoraj netopna v želodčnem mediju in zaradi prehoda v ionizirano obliko lahko topna v črevesnem mediju,

raztapljanje učinkovine povzroči, da je tableta veliko bolj občutljiva na mehanske vplive v tistem mediju, v katerem je učinkovina bolje topna. Na podlagi te ugotovitve lahko predpostavimo, da je Voltaren tableta bolj mehansko občutljiva pri prehodu skozi ileocekalni sfinkter kot skozi pilorus. To je tudi razvidno iz plazemskega profila po zaužitju Voltaren tablet (slika 4), saj je drugi plazemski vrh bolj izrazit kot prvi.



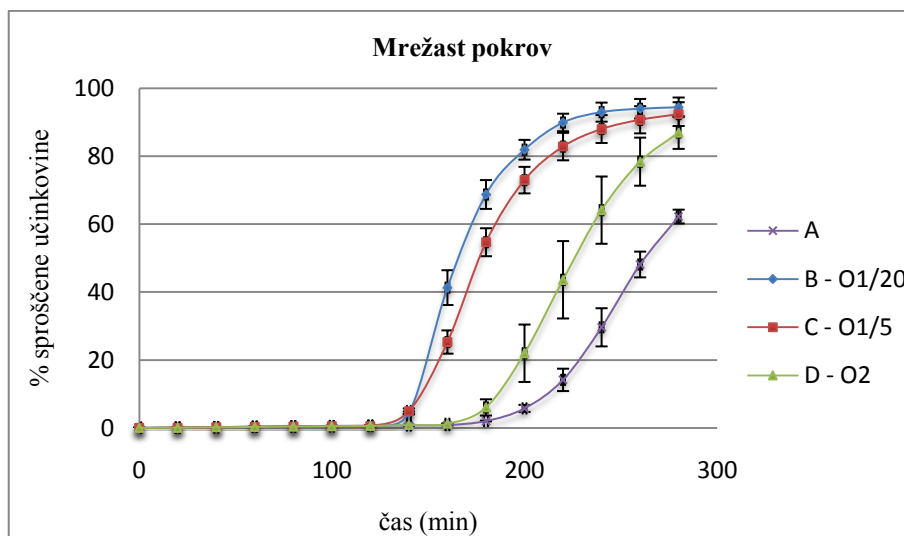
Slika 10: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri pogoju K3. V primeru (A) ovira ni bila dodana, v primeru (B) bila dodana steklena palčka 1 cm pod gladino medija od 120 minute poskusa dalje ter v primeru (C) je bila dodana steklena palčka 1 cm pod gladino medija začetnih 120 minut poskusa.

7.6. Vpliv dodatka mrežastega pokrova

Ob času zamenjave medija za sproščanje smo v delovno čašo za določeno obdobje dodali mrežast pokrov iz kovine ali plastike. Kovinski mrežast pokrov je v mediju potonil in bil ves čas v stiku s tableto. Plastičen mrežast pokrov se je v delovni čaši nahajal tik pod gladino medija, saj mu je cevka za odvajanje vzorca preprečevala, da bi plaval po površini medija. Tableta se je plastičnega mrežastega pokrova dotaknila samo takrat, ko je valovanje steklenih kroglic tableto potisnilo višje proti pokrovu. Uvedba omenjenih ovir je imela značilen vpliv na sproščanje, prav tako so bile značilne razlike med uporabo kovinskega ali plastičnega pokrova ali med dodatkom kovinskega pokrova za 5 in 20 minut (slika 11, preglednice XLIV-XLVIII). Kovinski mrežast pokrov je imel največji vpliv, saj je bil težji od plastičnega in je tableto bolj pritiskal proti kroglicam. Obenem pa

je bila mrežasta površina kovinskega pokrova groba na otip in se je zaradi nje med poskusom tableta bolj oddrgnila, kar je povzročilo, da je od tablete odkrušilo več manjših delcev. Ta učinek je bil manjši pri uporabi plastičnega mrežastega pokrova, ki je bil lažji in na otip mehkejši. Uporaba mehke plastike za povečevanje mehanske obremenitve se nam je zdela smiselna, saj bolje ponazarja želodčno sluznico.

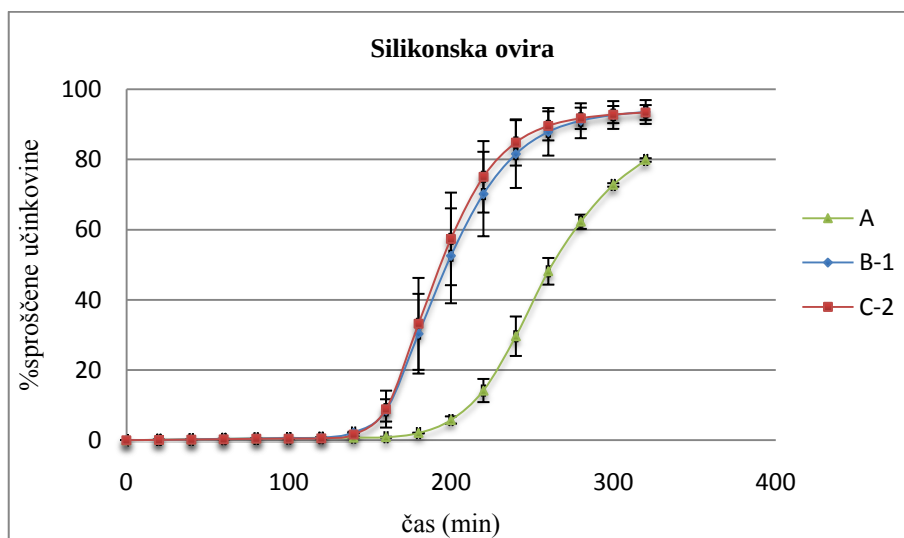
Problem, ki se je pojavil pri uporabi izbrane plastične mrežice, je bil, da je plastika odpuščala snovi, ki so v manjši meri vplivale na absorbanco vzorca (preglednica XXXIV). Vpliv odpuščenih snovi na absorbanco smo določili tako, da smo oviro namočili v 40 mL raztopine želodčnega in črevesnega medija v volumskem razmerju 1:1 ter izmerili absorbanco pri absorpcijskem maksimumu učinkovine po preteku 20, 60 in 180 minut. Ker smo oviro dodali v delovno čašo ob času zamenjave medija, ko je test sproščanja potekal ob prisotnosti obeh medijev, smo tudi test na odpuščanje snovi izvedli v raztopini obeh medijev. Dlje časa, kot je bila plastična mrežica prisotna v raztopini, bolj je absorbanca naraščala, tudi če smo postopek namakanja večkrat ponovili.



Slika 11: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri pogoju K3. V primeru (A) ovira ni bila dodana, v primeru (B-O1/20) je bil dodan kovinski mrežast pokrov med 120-140 min poskusa, v primeru (C-O1/5) je bil dodan kovinski mrežast pokrov med 120-125 min poskusa, v primeru (D-O2) je bil dodan plastičen mrežast pokrov med 120-140 min poskusa.

7.7. Vpliv dodatka silikonske ovire

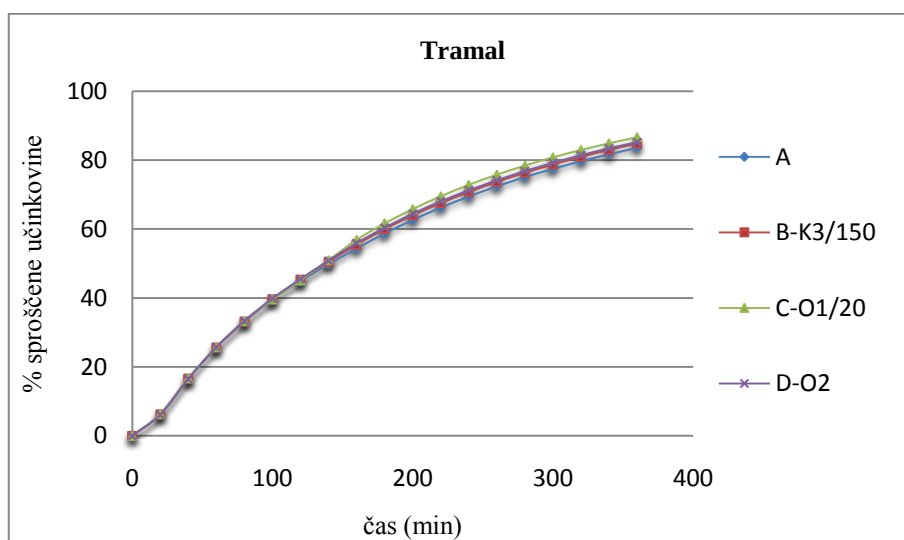
Silikonsko oviro smo uvedli v delovno čašo do nivoja gladine steklenih kroglic za 5 minut ob času zamenjave medija. Na sproščanje je to imelo značilen vpliv, vendar pa vpliv ni bil značilen med uporabo silikonske ovire 1 in ovire 2 (slika 12, preglednice IL, L, LI). Silikonska ovira 2 se je le delno razlikovala od ovire 1 in sicer je imela na koncu del traku brez nagubane površine. Pri testu sproščanja je tableto ovira najprej za trenutek ustavila, nato pa je mešanje oziroma valovanje steklenih kroglic tableto potisnilo pod oviro med kroglice. Tableta je nato spet prišla na površino steklenih kroglic in nadaljevala pot. Zaradi mehanske obremenitve je prišlo do krušenja in odpuščanja koščkov tablete, kar je pospešilo hitrost sproščanja učinkovine. Pri uporabi takšne ovire je prišlo tudi do nezaželenega pojava, in sicer je spodnji rob ovire odgrnil površino tablete kljub temu, da je bila silikonska ovira zelo mehka na otip. V *in vivo* pogojih je res, da na tableto lahko delujejo relativno veliki pritiski stene prebavnega trakta, vendar tableta ni nikoli izpostavljena ostrim robovom, ki poškodujejo površino tablete.



Slika 12: Primerjava povprečnih profilov sproščanja natrijevega diklofenakata s standardnimi deviacijami pri pogoju K3. V primeru (A) ovira ni bila dodana, v primeru (B-1) je bila dodana silikonska ovira 1 med 120-125 min poskusa, v primeru (C-2) je bila dodana silikonska 2 ovira med 120-125 min poskusa.

7.8. Vpliv obremenitev na sproščanje tramadolijevega klorida iz tablet

Vpliv nekaterih proučevanih obremenitev smo določili tudi na Tramal tabletah. Poleg osnovnega pogoja (K3) smo teste sproščanja izvedli še pri začasnem povečanju obratov na 150 obratov/min (K3/150), dodatek kovinskega (O1/20) in plastičnega (O2) mrežastega pokrova. Značilen vpliv na sproščanje je imel samo kovinski mrežast pokrov, pri ostalih pogojih vpliv ni bil značilen (slika 13, preglednica LII, LIII, LIV). Kovinski mrežast pokrov je najverjetneje na tableto pritiskal v tolikšni meri, da se je delno porušila struktura gela, ki jo tvori hidrofilni polimer (hipromeloza) in je bilo sproščanje učinkovine povečano. Pri tem je potrebno opozoriti, da je bila razlika pri sproščanju med osnovnim pogojem (K3) in dodatkom kovinskega mrežastega pokrova (O1/20) zelo majhna (manj kot 4%), vendar je statistična analiza zaradi dobre ponovljivosti pri posameznem pogoju pokazala značilno razliko. V primeru sproščanja natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet je bila največja razlika v odstotku sproščene učinkovine ob določenem času med osnovnim pogojem (K3) in dodatkom kovinskega mrežastega pokrova (O1/20) 66%.



Slika 13: Primerjava povprečnih profilov sproščanja tramadolijevega klorida pri pogoju K3. V primeru (A) ni bila dodana ovira in hitrost vrtenja magnetnega mešala se ni spreminjala, v primeru (B-K3/150) je bila povečana hitrost vrtenja magnetnega mešala na 150 obratov/min med 120-140 min poskusa, v primeru (C-O1/20) je bil dodan kovinski mrežast pokrov med 120-140 min poskusa, v primeru (D-O2) je bil dodan plastičen mrežast pokrov med 120-140 min poskusa.

7.9. Ovrednotenje proučevanih obremenitev

Z dodajanjem ovir in povečevanjem mehanske obremenitve smo želeli ponazoriti praznjenje tablete iz želodca na tešče. Predvsem smo se želeli približati razmeram, ki jim je tableta izpostavljena ob prehodu skozi pilorus. Zato smo v večini primerov povečali obremenitev (dodali oviro ali pospešili mešanje) ob času zamenjave medija, saj se pri prehodu iz želodca v duodenum spremeni sestava prebavnih sokov, ki jim je farmacevtska oblika izpostavljena. Za ponazarjanje prehoda skozi pilorus je bilo potrebno za kratek čas močno povečati silo, ki je delovala na tableto. Temu se je najbolje približal dodatek kovinskega mrežastega pokrova ali silikonske ovire med poskusom, saj se je sproščanje natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet močno povečalo. Pri uporabi silikonske ovire se gibanje tablete najbolj približa prehodu skozi pilorus oziroma dosežemo, da na tableto deluje pritisk iz vseh strani, saj ovira potisne tableto globoko med steklene kroglice. Težava, ki se je pojavila pri omenjenih ovirah, je bila, da je groba struktura ovire opraskala površino tablete. V fizioloških pogojih ne prihaja do tako močne erozije.

Pričakovali smo, da bo začasno povečanje mehanske obremenitve povečalo hitrost sproščanja samo za kratek čas, potem pa se bo sproščanje potekalo tako, kot v primeru, ko se pogoji niso spreminjali. Do upočasnitve hitrosti sproščanja po prenehanju delovanja povečane sile na tableto ni prišlo, saj se je zaradi začasne obremenitve tableta drobila in delno razpadla na več manjših koščkov. Princip povečanega sproščanja učinkovine iz Voltaren tablet pri mehanskih obremenitvah lahko razložimo z Noyes – Whitneyevo enačbo (enačba 1). Več manjših delcev poveča skupno površino, iz katere se sprošča učinkovina. Ob enem pa se debelina difuznega sloja zmanjša, če se tableta zadene ob oviro.

Po zaužitju Voltaren tablet je iz plazemskega profila (slika 4) razvidno, da se pri prehodu skozi pilorus sproščanje učinkovine iz tablete začasno poveča, nato pa se zmanjša. Torej pritiski zaradi krčenja antruma in prehoda skozi pilorus tablete ne zdrobijo, saj v tem primeru kasneje ne bi prišlo do zmanjšanega sproščanja. Predpostavljamo lahko, da pritiski stene prebavnega trakta v manjši meri lahko povzročijo, da tableta odpusti nekaj delcev ali pa pritiski iztisnejo raztopljeno učinkovino iz tablete, kar povzroči pojav plazemskega vrha.

7.10. Možnosti nadaljnje optimizacije metode sproščanja

Za optimizacijo ponazarjanja sil v prebavnem traktu na pretočnem sistemu s kroglicami je pomembna ustrezna izbira ovire. Ta naj bo iz inertnega materiala, ki ne odpušča snovi. Njena oblika naj nima ostrih robov, ki bi lahko popraskali površino farmacevtske oblike. Material mora biti dovolj mehak, da posnema stene prebavnega trakta, ob enem pa omogoča, da na tableto med poskusom deluje dovolj velik pritisk. Oviro je potrebno v sistem uvesti tako, da mešanje in pretok medija ni moten.

Silikonska ovira, ki smo jo uporabili pri testih sproščanja, se tem zahtevam približa, vendar bi bilo potrebno preoblikovati spodnji rob ovire, da ne bi imel ostrih robov, ki bi povzročili erozijo tablete. Test sproščanja z uporabo silikonske ovire bi morda lahko bolje ponazoril pojav plazemskega vrha, če bi bila ovira v delovni čaši prisotna manj časa. Ovira je bila v poskusih prisotna 5 minut, v tem času se je tableta večkrat zadela ob oviro in se ugreznila med steklene kroglice. Če bi oviro v delovni čaši pustili samo toliko časa, da se tableta z oviro sreča samo enkrat ali dvakrat, na tableti ne bi prišlo do tako močne erozije in bi na profilu sproščanja mogoče lahko opazili območje povečanega sproščanja, zaradi prisotnosti ovire in nato zmanjšanje.

Poleg ovire bi lahko za povečanje mehanske obremenitve izbrali tudi drugačen pristop. V eni od raziskav so razvili napravo za teste sproščanja s košaricami, ki so se gibale po določenem programu kroženja ter mirovanja v mediju in izven njega. V košarico od aparature so uvedli balonček, ki so ga ob izbranih časih napihnil in tako povečali mehansko obremenitev na farmacevtsko obliko (30). Tudi na pretočnem sistemu s kroglicami bi lahko uporabili oviro, ki se jo napihne oziroma bolje bi bilo, če bi jo napolnili s tekočino in s tem povečali pritisk na tableto. Ob vsem tem je potrebno upoštevati, da mora izbran pristop omogočiti ponovljive rezultate.

8. SKLEP

S pomočjo pretočnega sistema s kroglicami smo skušali ponazoriti sile v želodcu na tešče, ki delujejo na farmacevtsko obliko. Povečanje mehanske obremenitve smo dosegli z dodajanjem različnih ovir v sistem ali s spremembo hitrosti vrtenja magnetnega mešala. Proučevali smo sproščanje natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet ob različnih obremenilnih pogojih in preizkusili vpliv le nekaterih na sproščanje tramadolijevega klorida iz Tramal tablet. Pri tem lahko zaključimo naslednje:

- Voltaren izkazuje značilno občutljivost na večjo spremembo količine steklenih kroglic v sistemu in na spremembo hitrosti vrtenja magnetnega mešala. Pri večji količini steklenih kroglic je sproščanje iz Voltaren tablet upočasnjeno. Do povečanega sproščanja prihaja pri uporabi večjih hitrosti mešanja.
- Opazili smo značilen vpliv na sproščanje natrijevega diklofenakata pri Voltarenu ob dodatku ovir (plastičen in kovinski mrežast pokrov, steklena palčka, silikonska ovira).
- Dodatek ovir ima značilno večji vpliv, ko se tableta Voltaren nahaja v umetnem črevesnem soku. To pripisujemo k boljši topnosti natrijevega diklofenakata pri pH črevesnega medija in velikemu deležu učinkovine v tableti, kar povzroči, da je oblika bolj občutljiva na mehanske vplive pri višjem pH. *In vivo* lahko to pomeni večjo mehansko občutljivost Voltaren tablete pri prehodu ileocekalnega sfinktra kot pri prehodu pilorusa.
- Uporaba kovinskega mrežastega pokrova ali silikonske ovire je izrazito povečala sproščanje natrijevega diklofenakata. Problem, ki se je pojavil pri teh ovirah, je bil, da sta oviri opraskali površino tablete, kar se v *in vivo* pogojih ne more zgoditi.
- Pri uporabi silikonske ovire se je gibanje tablete najbolj približalo fiziološkim razmeram ob prehodu skozi pilorus. Tableta se je zaradi ovire ugreznila med steklene kroglice in bila tako izpostavljena pritiskom iz vseh smeri.
- Z uporabo kovinskega mrežastega pokrova in silikonske ovire nismo dosegli samo začasnega povečanja sproščanja, ki bi ponazorilo prvi vrh v plazemskem profilu, ampak je tableta razpadla na več manjših koščkov in prišlo je do povečanega sproščanja, ki mu nato ni sledilo zmanjšanje.

- Voltaren tablete so se pri testih sproščanja pokazale za bolj mehansko občutljive, kot Tramal tablete.
- Uporaba kovinskega mrežastega pokrova je pri Tramal tabletah značilno povečala sproščanje tramadolijevega klorida iz tablet. Sproščanje se je povečalo minimalno, vendar je statistična analiza pokazala značilno razliko zaradi velike ponovljivosti paralelk pri istem pogoju.
- V nadaljnjih korakih optimizacije povečanja mehanske obremenitve v sistemu je potrebno izbrati ustrezno oviro, ki bi omogočila začasen povečan pritisk na tableto. Ovira mora tableto stisniti, pri tem se lahko odpustijo manjši delci iz tablete, ne sme pa prihajati do razbitja ali erozije tablete.

9. LITERATURA

1. Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics 5th edition, McGraw-Hill, New York, 2005: 414.
2. Martinčič Š. D. Anatomija histologija fiziologija, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 121-122, 127-128.
3. Porenta O, Ravnik D. Histologija in anatomija, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 1993: 124-126.
4. Kahle W, Leonhart H. Color atlas and textbook of human anatomy - Internal organs 4th edition, Thieme flexibooks, New York, 1993: 214.
5. Kelly KA, Johnson RL. Physiology of the gastrointestinal tract, Raven Press, New York, 1981: 393-409.
6. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Berne Levy Principles of physiology 4th edition, Elsevier Mosby, 2006: 429-441, 444-445.
7. Dajčman D. Osnove fiziologije želodca. Medicinski mesečnik 2005; maj: 21-28.
8. Chang FY. Motor physiology of human stomach. Engineering in Medicine and Biology Society, Proceedings of the 20th annual international conference of the IEE 1998; 20(6): 2808-2809.
9. Collard JM, Romagnoli R. Human stomach has a recordable mechanical activity at rate of about three cycles/minute. European Journal of Surgery 2000; 166: 942-948.
10. Ehrlein HJ, Schemann M. Gastrointestinal motility.
<http://www.wzw.tum.de/humanbiology/data/motility/34/>. Dostopano: 10-2009
11. Rees WDW, Malagelada JR, Miller LJ, Go VLW. Human interdigestive and postprandial gastrointestinal motor and gastrointestinal hormone patterns. Digestive Diseases and Sciences 1982; 27(4): 321-329.
12. Dooley CP, Lorenzo C, Valenzuela JE. Variability of migrating motor complex in humans. Digestive Diseases and Science 1992; 37(5): 723-728.
13. Cassilly D, Kantor S, Knight LC et al. Gastric emptying of non-digestible solid: assessment with simultaneous SmartPill pH and pressure capsule, antroduodenal manometry, gastric emptying scintigraphy. Neurogastroenterology and Motility 2008; 20(4): 311-319.
14. Chen JDZ, Richards RD, McCallum RW. Identification of gastric contractions from the cutaneous electrogastrogram. American Journal of Gastroenterology 1994; 89(1): 79-85.

15. Houghton LA, Read NW, Heddle R et al. Motor activity of the gastric antrum, pylorus, and duodenum under fasted conditions and after a liquid meal. *Gastroenterology* 1988; 94(6): 1276-84.
16. White CM, Poxon V, Williams JA. A study of motility of normal human gastroduodenal region. *Digestive Diseases and Sciences* 1981; 26(7): 609-617.
17. Vassalo MJ, Camilleri M, Prather CM et al. Measurement of axial forces during emptying from the human stomach. *American Journal of Physiology* 1992; 263(2 Pt 1): G230-G239.
18. Sun WM, Smout A, Malbert C et al. Relationship between surface electrogastragraphy and antropyloric pressures. *American Journal of Physiology* 1995; 268(3 Pt 1): G424-G430.
19. Kamba M, Seta Y, Kusai A et al. A unique dosage form to evaluate the mechanical destructive force in the gastrointestinal tract. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 208(1-2): 61-70.
20. Kaye MD, Mehta SJ, Showalter JP. Manometric studies of the human pylorus. *Gastroenterology* 1976; 70(4): 477-480.
21. Shafik A, El Sibai O, Shafik AA, Shafik IA. Mechanism of gastric emptying through the pyloric sphincter: A human study. *Medical Science Monitor* 2007; 13(1): CR24-29.
22. Heddle R, Dent J, Tooilu J, Read NW. Topography and measurement of pyloric pressure waves and tone in humans. *American Journal of Physiology* 1988; 255(4 Pt 1): G490-G497.
23. Trotman I, Misiewicz G. Methods in human alimentary motility. *British Journal of Clinical Pharmacy* 1982; 14(6): 757-763.
24. Smout AJPM, Mundt MW. Gastrointestinal motility testing. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology* 2009; 23(3): 287-298.
25. Miranda JRA, Oliveira RB, Sousa PL et al. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. *Physics in Medicine and Biology* 1997;42(9): 1791-1799.
26. Maqbool S, Parkman HP, Friedenberg FK. Wireless capsule motility: Comparison of the SmartPill GI monitoring system with scintigraphy for measuring whole gut transit. *Digestive Diseases and Science* 2009; 54:2167-2174.
27. <http://www.zdravila.net/navodila.php?navodilo=s-003895.pdf&dir=smpc>.
Dostopano: 02-2010

28. <http://www.zdravila.net/navodila.php?navodilo=s-005819.pdf&dir=smpc>.
Dostopano: 02-2010
29. The United states pharmacopeia (USP 28), The national formulary (NF 23). USP convention, INC, 2005: 2855
30. Garbacz G, Wedemeyer RS, Nagel S et al. Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 70(2): 421-428.
31. Bertocchi P, Antoniella E, Valvo L et al. Diclofenac sodium multisource prolonged release tablets - a comparative study on the dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 2005; 37(4): 679-685.
32. Kincl M, Vrečer F, Veber M. Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug from prolonged release tablets. *Analytica Chimica Acta* 2004; 502(1): 107-113.
33. Savaşer A, Özkan Y, Işimer A. Preparation and in vitro evaluation of sustained release tablet formulations of diclofenac sodium. *Il Farmaco* 2005; 60(2): 171-177.
34. Aguzzi C, Bonferoni MC, Rosario Osorio Fortich M et al. Influence of complex solubility on formulations based on lambda carrageenan and basic drugs. *AAPS PharmSciTech* 2002; 3(3): E27.
35. Kumar P, Singh S, Mishra B. Development and biopharmaceutical evaluation of extended release formulation of tramadol hydrochloride based on osmotic technology. *Acta Pharmaceutica* 2009; 59(1): 15-30.