

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ZALETEL

**PREDVIDEVANJE VPLIVA KISLOSTI ŽELODČNEGA MEDIJA IN
HITROSTI PREHODA PELET NA SPROŠČANJE NATRIJEVEGA
DIKLOFENAKATA**

**PREDICTING OF THE IMPACT OF ACIDITY OF GASTRIC MEDIA
AND PELLETS GASTRIC EMPTYING RATE ON THE RELEASE OF
DICLOFENAC SODIUM**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

Zahvala

Za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentoriciizr. prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. Zahvaljujem se tudi Greti Cof in asist. Nataši Nagelj Kovačič, mag. farm. za nasvete in usmeritve pri izvedbi laboratorijskega dela diplome. Za nasvete, pripombe in razprave hvala tudi dragi Katji. Iskrena hvala mojim staršem, fantu Gregorju in vsem mojim bližnjim, ki so mi tekom študija stali ob strani in me vzpodbujali pri doseganju zastavljenih ciljev.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

Anja Zaletel

KAZALO

1. POVZETEK	5
2. SEZNAM OKRAJŠAV	7
3. UVOD.....	8
3.1 Farmakopejski sistemi za testiranje sproščanja učinkovine iz peroralnih farmacevtskih oblik.....	8
3.1.1 USP 1 Naprava s košarico.....	9
3.1.2 USP 2 Naprava z vesli	10
3.1.3 USP 3 Naprava z recipročnimi cilindri (Bio-Dis)	13
3.1.4 USP 4 Pretočna celica	14
3.2 Nekonvencionalni sistemi za testiranje sproščanja učinkovine iz peroralnih farmacevtskih oblik	17
3.2.1 Večprostorni sistemi	18
3.2.2. Sistemi, ki ponazarjajo sile v GIT	20
3.2.3 Sistemi za posnemanje raztapljanja in absorpcije	22
3.2.4 Kompleksni <i>in vitro</i> sistemi, ki posnemajo procese prebave	24
3.2.5 Sistemi za sproščanja iz plavajočih dostavnih sistemov	27
3.2.6 Naprava za raztapljanje majhnih količin učinkovin	28
3.3 Fizikalno-kemijske lastnosti diklofenaka	30
3.3 Farmakološke lastnosti diklofenaka.....	31
4. NAMEN DELA.....	32
5. MATERIALI IN METODE	33
5.1 Pelete z natrijevim diklofenakatom.....	33
5.2 Snovi, ki smo jih uporabljali pri delu.....	33
5.3 Uporabljene aparature	33
5.4 Raztopine	34
5.4.1 Simulirani želodčni mediji	34
5.4.2 Simulirani črevesni mediji	34
5.5 Metode.....	35
5.5.1 UV/VIS spektroskopija	35
5.5.2 Merjenje sedimentacije neraztopljene učinkovine	35
5.5.2.1 Preliminarni test merjenja sedimentacije učinkovine v vzorcih (T1).....	35
5.5.2.2 Merjenje sedimentacije učinkovine v vseh motnih vzorcih pri poskusu sproščanja z uporabo 0,001 M HCl (T2)	36
5.5.3 Sproščanje natrijevega diklofenakata.....	36
5.5.3.1 Izdelava umeritvenih premic	36
5.5.3.2 Testi sproščanja na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami	37
5.5.3.2.1 Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje	39
5.5.3.2.2 Vpliv časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje	40
5.5.4 Računsko podaljševanje profilov sproščanja	41
5.5.5 Oteženi povprečni profili sproščanja pri določenem pH želodčnega medija	42
5.5.6 Statistična analiza s Studentovim t-testom.....	43
6. REZULTATI.....	44
6.1 Določanje enačb umeritvenih premic.....	44
6.1.1 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju.....	44
6.1.1.1 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju brez dodatka 0,1 M natrijevega hidroksida	44

6.1.1.2 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju z dodatkom 0,1M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1	45
6.1.2 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem črevesnem mediju.....	47
6.2 Merjenje sedimentacije neraztopljene učinkovine v vzorcih	47
6.2.1 Preliminarni test merjenja sedimentacije učinkovine v vzorcu, zbranem med 20. in 40. minuto poskusa (T1)	47
6.2.2 Merjenje sedimentacije v vseh motnih vzorcih z uporabo 0,001 M HCl	48
6.3 TESTI SPROŠČANJA	49
6.3.1 Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje	49
6.3.2 Vpliv časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje	51
6.3.2.1 Poskusi z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline	51
6.3.2.2 Poskusi z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline	54
6.3.2.3 Poskusi z uporabo 0,0013 M klorovodikove kisline	60
6.3.2.3 Računsko podaljšani povprečni profili sproščanja	66
6.3.2.4 Oteženi povprečni profili sproščanja	71
6.4 Statistična analiza s Studentovim t-testom	72
7. RAZPRAVA	74
7.1 Vpliv pH na sproščanje natrijevega diklofenakata.....	74
7.2 Vpliv časa zadrževanja v kislem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata	77
7.2.1 Poskusi z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline	77
7.2.2. Poskusi z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline	77
7.2.3 Poskusi z uporabo 0,0013 M klorovodikove kisline	79
7.2.4 Oteženi povprečni profili sproščanja in druge primerjave	79
7.3 Možnosti nadaljnjih poskusov	82
8. SKLEP.....	83
9. VIRI IN LITERATURA	85

1. POVZETEK

V diplomskem delu smo testirali sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem. Osredotočili smo se na predvidevanje dveh fizioloških vplivov: vpliv pH želodčnega medija in vpliv hitrosti prehoda pelet skozi želodec. Poskuse smo izvajali na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami z naslednjimi konstantnimi parametri: velikost delovne čaše je bila 150 mL, volumen medija v njej 40 mL, masa uporabljeni kroglic 25 g in hitrost mešanja magnetnega mešala 50 obratov/minuto. Parametra poskusa, ki smo jih spreminjali pa sta bila čas dotoka svežega želodčnega medija v delovno čašo in pH želodčnega medija (koncentracija HCl). Za simulirani želodčni medij smo uporabili raztopino HCl ustrezne koncentracije, črevesni sok pa je ponazarjal fosfatni pufer s pH 6,8. Poskuse, s katerimi smo proučevali vpliv pH, smo izvajali pri konstantnem času zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju 120 min. Preverjali smo vpliv pH v intervalu med pH 2 in 3. Dobljene podatke smo primerjali s podatki predhodno opravljene diplomske naloge in ugotovili, da lahko vpliv pH razdelimo na tri intervale: pri vrednostih pH, ki se približujejo 1 se sproščanje zelo upočasni (podaljšanje $t_{50\%}$), v širokem intervalu okoli vrednosti pH 2 praktično skoraj ni vpliva na $t_{50\%}$ oz. se ta čas zelo počasi krajša, ko pa se vrednosti približujejo pH 3, pa je zaznati zelo hitro sproščanje (skrajšanje $t_{50\%}$). Vzorci, zbrani pri poskusu z uporabo 0,001 M HCl, so bili zaradi neraztopljene učinkovine motni, zato smo v njih preverjali možnost sedimentacije učinkovine v 30 min po odvzemu vzorca. S statistično analizo smo slednjo ovrgli.

Za študijo vpliva hitrosti prehoda želodca smo uporabili 5 različnih časov zadrževanja v kislem mediju (10, 30, 60, 120 in 200 min) in 3 različne pH: 2; 2,89 in 3. Pri poskusih sproščanja z uporabo 0,001 in 0,0013 M HCl smo v vzorcih določali tako celotno kot raztopljeno sproščeno učinkovino. Ugotovili smo, da se z daljšanjem časa zadrževanja v kislem mediju podaljšuje zakasnitveni čas sproščanja. Z upoštevanjem odstotkov pelet, ki v *in vivo* pogojih zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu, smo dobljene profile sproščanja ustrezno otežili in izračunali oteženi povprečni profil sproščanja pri določenem pH simuliranega želodčnega medija. To smo naredili tako za celotno kot raztopljeno sproščeno učinkovino. Ker smo s predhodno sedimentacijsko analizo ugotovili majhen obseg posedanja neraztopljene učinkovine, smo sklepali, da v *in vivo* pogojih tako raztopljena kot neraztopljena učinkovina enako hitro zapustita želodec in neraztopljeni del

se raztopi v višjem pH črevesnega soka. Če je proces raztapljanja dovolj hiter in posledično tudi hitra absorpcija, lahko sklepamo, da so za primerjavo z absorpcijskimi profili bolj uporabni oteženi povprečni profili sproščanja za celotno sproščeno učinkovino.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

MMC – mioelektrični oz. migracijski motorični kompleks

SD – standardna deviacija

USP – Ameriška farmakopeja (The United States Pharmacopeia)

IVIVC – *in vitro in vivo* korelacija

R^2 – kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije

PAS – površinsko aktivna snov

$t_{50\%}$ - čas, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine

3. UVOD

Poskusi sproščanja učinkovine iz trdnih farmacevtskih oblik so zelo pomemben del razvoja farmacevtskih oblik. Omogočajo izbiro in optimizacijo farmacevtskih oblik, študijo mehanizmov sproščanja iz oblik s prirejenim sproščanjem in testiranje stabilnosti. Pri razvoju farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem skušamo z optimizacijo pogojev testov sproščanja napovedati *in vivo* obnašanje oblike. Idealni sistem za sproščanje bi moral biti enostaven, cenovno ugoden in moral bi biti ogledalo fiziološkega okolja človeškega gastrointestinalnega trakta (1).

Testiranje sproščanja se uporablja za optimizacijo farmacevtskih oblik in kontrolo kakovosti. Navadno se za testiranje uporabljajo farmakopejske aparature pod standardiziranimi pogoji. Kljub temu so z ozirom na *in vivo* karakteristike posameznika profili sproščanja težko predvidljivi. Slednje napovedovanje je še posebej kritično pri oblikah s podaljšanim sproščanjem (2).

V literaturi zasledimo malo študij o simulacijah hidrodinamskih in mehanskih pogojev v prebavnem traktu. To ne pomeni majhnega zanimanja za tovrstna testiranja, pač pa je posledica kompleksnosti naprav, ki bi dobro posnemale pogoje v gastrointestinalnem traktu (3).

Testiranje sproščanja je rutinsko v uporabi v kontroli kakovosti in raziskavah ter razvoju. Za kontrolo kakovosti je nujno, da testi zagotavljajo odkrivanje napak v sestavi in detekcijo proizvodnih napak. Pomembno je, da pokažejo, če proizvodnja nekega izdelka ustreza zahtevam specifikacije z vidika sproščanja. Pri raziskavah in razvoju se ti testi uporabljajo za napovedovanje obnašanja oblike v gastrointestinalnem traktu (3, 4).

3.1 Farmakopejski sistemi za testiranje sproščanja učinkovine iz peroralnih farmacevtskih oblik

Oficinalne farmakopejske naprave so v zadnjem desetletju omogočile napredovanje mednarodne harmonizacije testiranja sproščanja. USP naprave za preizkušanje sproščanja iz trdnih farmacevtskih oblik vključujejo:

- napravo USP 1 (s košarico),
- napravo USP 2 (z veslom),

- napravo USP 3 (recipročni cilindri) in
- napravo USP 4 (pretočna celica) (6).

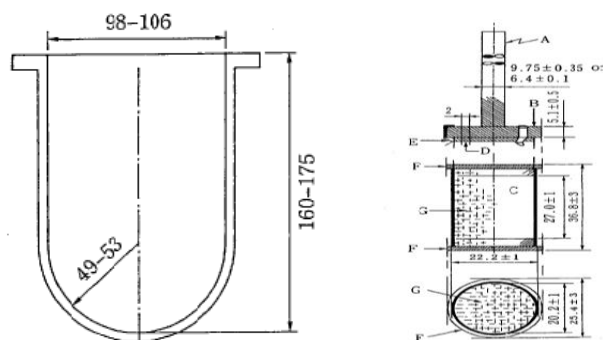
Vsi deli naprav, ki kakor koli pridejo v stik s farmacevtsko obliko ali medijem za sproščanje, morajo biti kemijsko inertni in ne smejo reagirati z učinkovino. Večinoma so izdelani iz čistega jekla ali pa prevlečeni z inertnim materialom (6).

Modifikacije teh aparatov in nove izvedbe se uporabljajo v specifičnih primerih kot je npr. velika mehanska občutljivost (5).

3.1.1 USP 1 Naprava s košarico

To napravo je leta 1968 sestavil Pernarowski s svojimi sodelavci, z nekaj dodatnimi modifikacijami pa je leta 1970 postala prva uradno sprejeta metoda za testiranje sproščanja iz trdnih farmacevtskih oblik (6).

Naprava je sestavljena iz posode z okroglim dnom s prozornim pokrovom iz stekla ali drugega inertnega prozornega materiala, cilindrične košarice z rotirajočim držalom, električnega motorja in termostatisane kopeli (Slika 1). Držalo s košarico je med testom sproščanja potopljeno v medij za sproščanje. Ker je farmacevtska oblika v neposrednem stiku s košarico, imajo njene dimenzije in gibanje velik vpliv na hitrost sproščanja učinkovine iz oblike. Višina košarice in velikost mrežice, iz katere je narejena košarica, sta predpisani v USP<711>. Kalibracijo naprave izvedemo s kalibracijskimi tabletami, dobljeni rezultati pa morajo ustrezati postavljenim kriterijem (6).



Slika 1: Shema posode za sproščanje naprave USP 1 (levo) in košarice (desno) s pripadajočimi dimenzijami: (A) rotirajoče držalo, (B) disk, (C) košarica, (D) odprtina, (E) zaponka, (F) obroč, (G) mrežica (6).

Naprava je enostavna, robustna in dobro standardizirana. Pogosto se uporablja za testiranje sproščanja iz trdnih farmacevtskih oblik s takojšnjim ali podaljšanim sproščanjem (5).

Slabosti te naprave so (5,6):

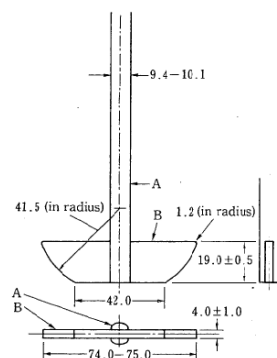
- velika občutljivost na raztopljene pline v mediju za sproščanje,
- neustrezna hitrost gibanja delcev po zapustitvi košarice,
- lepljive substance lahko zamašijo mrežasto košarico,
- nehomogeno mešanje in
- možnost aglomeracije delcev farmacevtske oblike, potem ko ti zapustijo košarico.

Poznane so modifikacije dimenzij košarice, velikosti odprtin mreže, iz katere je košarica in sprememb v volumnu posode za sproščanje od 100 do 4000 mL (6).

3.1.2 USP 2 Naprava z vesli

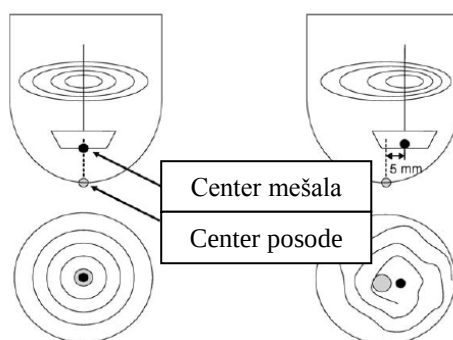
Prvi je to metodo razvil raziskovalec Poole, nato pa so jo znanstveniki Nacionalnega centra za analizo zdravil v Missouri v ZDA še dodatno spreminjali. Modificirana oblika je postala uradna naprava za sproščanje v ameriški farmakopeji. Z uporabo vesla so odpravili mnoge slabosti košarice, vseeno pa ta metoda zahteva veliko natančnosti pri geometriji vesla, saj so od le-te odvisni vplivi na teste sproščanja (6).

Naprava je sestavljena iz posode z okroglim dnom z volumnom približno 1 liter, rotirajočega veslastega mešala, električnega motorja in termostata. Mešalo mora biti prevlečeno z inertnim materialom npr. polifluoroogljikom, saj s tem preprečimo korozijo in izplavljanje ionov v medij za sproščanje. Specifikacije mešala so podane na sliki 2. Ustrezna geometrija mešala in njegova mirna rotacija omogočata konstantno hidrodinamiko in s tem tudi dobro ponovljivost pri uporabi te metode (6).



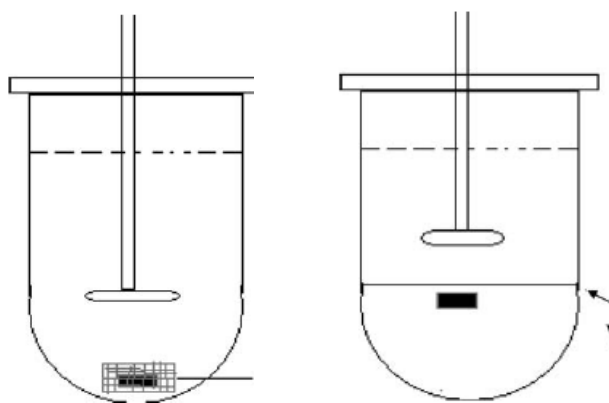
Slika 2: Dimenzije mešala naprave USP 2 (A) držalo mešala, (B) veslo (8).

Pozicije mešala (Slika 3) vplivajo na količino sproščene učinkovine. Če je mešalo nameščeno na sredini, ustvarja laminaren pretok medija, mešalo izven centra pa ustvarja turbulenten tok. Pri slednjem se v večini primerov sprosti več učinkovine (2).



Slika 3: Centralno nameščeno mešalo, ki ustvarja laminaren tok (levo) in izven centra nameščeno mešalo, ki ustvarja turbulenten tok (desno) (2).

Ameriška farmakopeja za farmacevtske oblike, pri katerih se pojavlja problem plavanja na gladini medija, priporoča uporabo **potapljalnikov** (Slika 4 levo). Kot alternativa farmakopejskim potapljalnikom se lahko uporablja tudi **mrežica** (Slika 4 desno). Z njimi dobimo bolj ponovljive profile sproščanja, zmanjšamo plavanje, zmanjšamo adherenco na mešalo in olajšamo vzorčenje (9).



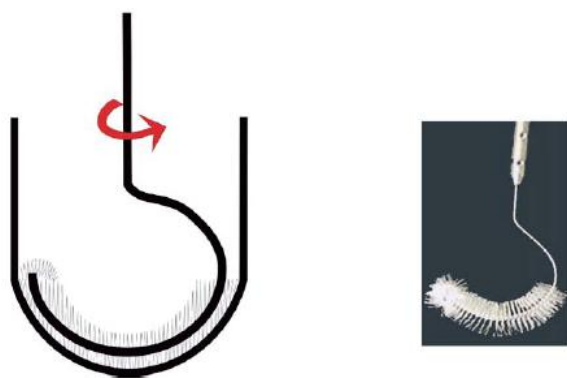
Slika 4: Prikaz uporabe potapljalnika (levo) in mrežice (desno) (9).

Uporabljajo se tudi mešala in delovne posode manjših dimenzij(6).

Slabosti naprave USP 2 so (10,11):

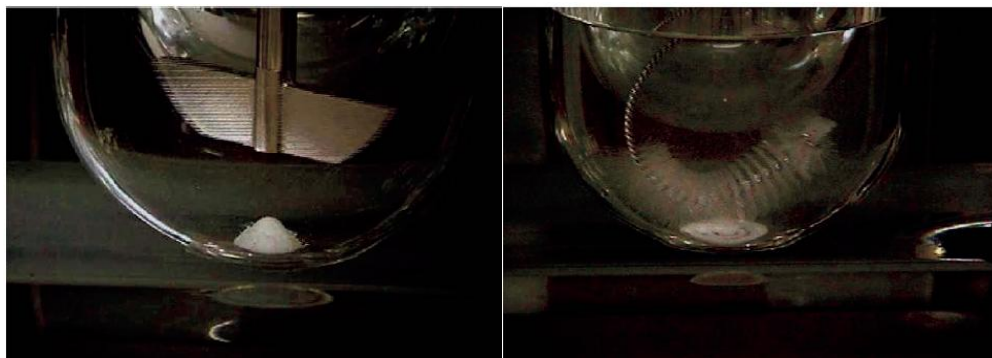
- tresenje medija zaradi delovanja električnega motorja mešala lahko povzroča turbulenco,
- nasičenje medija pri slabo topnih učinkovinah in
- volumen medija za sproščanje je neprimerljiv z volumenom v želodcu.

Z modifikacijo mešala pri napravi USP 2 izboljšamo nekatere slabosti prvotnega sistema. **Srpasta oblika mešala** je ena od možnih potencialnih sprememb. Spodnja polovica mešala je ukrivljena tako, da se ujema z zaokroženim spodnjim delom posode za medij. Mešalo je pokrito s filamenti, ki zapolnijo praznino med mešalom in dnom posode (Slika 5). Geometrija mešala zagotavlja bolj učinkovito mešanje kot prvotno mešalo pri aparatu USP 2 in preprečuje nabiranje razdrobljenega materiala na dnu posode (ni mrtvega območja) (12).



Slika 5: Srpasta oblika mešala (13).

To mešalo zagotavlja bolj stabilno okolje za testiranje sproščanja. V primerjavi z običajnim mešalom pri napravi USP 2 dobimo z uporabo srpastega mešala s filamenti večji odstotek sproščene učinkovine. To je posledica preprečitve nastanka območja agregacije razpadlih delov farmacevtske oblike na dnu posode za sproščanje (Slika 6). Večja površina farmacevtske oblike je tako na voljo za interakcije z okoliškim medijem in posledično se sprostijo tudi več učinkovine. Dokazano je bilo, da tudi pri farmacevtskih oblikah, ki ne razpadejo, dobimo signifikantno večji delež sproščene učinkovine (13).



Slika 6: Primerjava uporabe veslastega (levo) in srpastega (desno) mešala (13).

3.1.3 USP 3 Naprava z recipročnimi cilindri (Bio-Dis)

Recipročni cilindri so bili prvič uradno predstavljeni leta 1995 v ameriški farmakopeji USP 23. Predstavljajo modifikacijo naprave za izvedbo testa razpadnosti (5).

Naprava (Slika 7) je sestavljena iz ogrevane posode, ki vsebuje več kolon valjastih posod z medijem za sproščanje, v vsaki posodi je notranja posoda, v kateri je farmacevtska

oblika za analizo. Z operacijskim programom nastavljamo hitrost gibanja (število premikov navzgor in navzdol notranjih posod v zunanji posodi). Steklena notranja posoda ima na obeh koncih mrežico, skozi katero v medij zunanje posode prihaja sproščena učinkovina. Zunanja posoda z medijem za sproščanje je povezana z vodno kopeljo, ki vzdržuje temperaturo medija na 37°C. Notranje posode se premikajo iz ene zunanje posode v drugo in s tem omogočajo zamenjavo medija za sproščanje (5).

Pri uporabi naprave USP 3 majhne spremembe v geometriji posod in prisotnost zračnih mehurčkov v medijih ne vplivajo na hitrost sproščanja. Slednji parametri imajo velik vpliv pri testiranju sproščanja z USP 1 in USP 2 (5).



Slika 7: Naprava z recipročnimi cilindri Bio Dis (10).

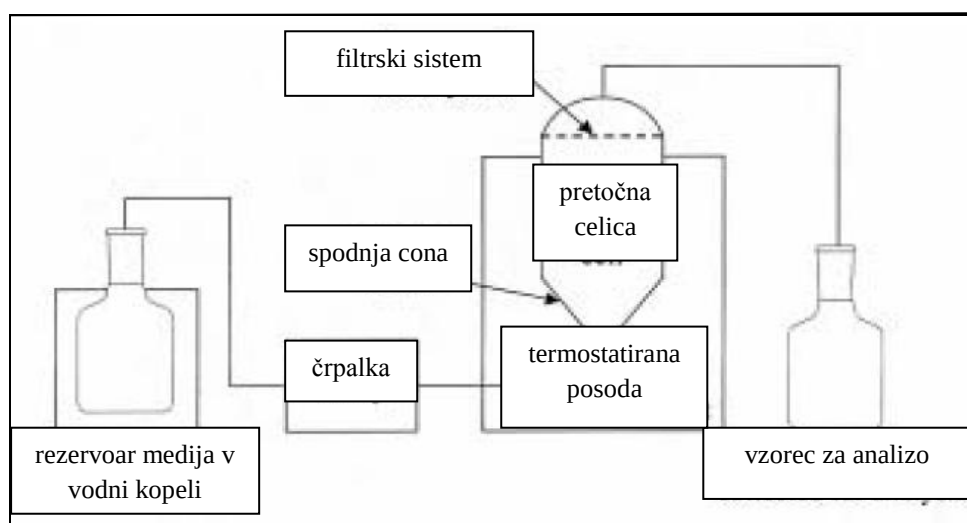
Naprava se priporoča kot prvi izbor pri testiranju oblik s prirejenim sproščanjem, saj je uporabna, zanesljiva in omogoča postopno spreminjanje pH. Med njene prednosti sodi tudi majhna poraba topil (5).

3.1.4 USP 4 Pretočna celica

Pretočna celica je zelo fleksibilna metoda, saj ima veliko možnosti za spreminjanje pH in sestave medija. Aparatura je uporabna za zapletene analize, pri katerih imamo opravka s slabo topnostjo oz. je topnost odvisna od pH medija. Visoki pretoki in s tem velik volumen medija za sproščanje niso fiziološki, vendar z njimi dosežemo sink pogoje (1).

Naprava je sestavljena iz rezervoarja in črpalke za medij sproščanja, kontrolirane pretočne celice ter vodne kopeli, ki vzdržuje konstantno temperaturo medija (Slika 8).

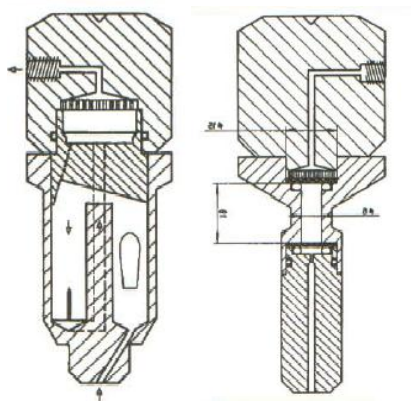
Črpalka je fizično ločena od dela za sproščanje, saj se s tem izognemo vplivom vibracij na hidrodinamiko medija. Celica je narejena iz prosojnega in inertnega materiala. Filtrski sistem preprečuje uhajanje neraztopljenih delcev iz vrha celice. Spodnji del celice je običajno napolnjen z majhnimi steklenimi kroglicami (premera 1mm) in eno kroglico s premerom 5 mm, ki je na dnu celice in preprečuje tok medija nazaj. Farmacevtska oblika je nameščena na kroglicah ali na notranjem nosilcu. Pretok tekočine poteka kontinuirano s pomočjo črpalke od rezervoarja proti vrhu celice. Tekočina se po prehodu skozi celico zbira v posodi za vzorec. Frakcije se zbirajo v določenih intervalih in so nato na voljo za analizo (10).



Slika 8: Shemska predstavitev pretočne celice (10).

Pretočni sistem je lahko odprt ali zaprt. Pri odprtem je medij za sproščanje vedno svež, pri zaprtem pa teče po celici vedno isti medij (14).

Na trgu je prisotnih pet tipov celic (za praške, tablete, želatinske kapsule, transdermalne farmacevtske oblike). Za testiranje tablet in kapsul sta večinoma v uporabi 12 mm in 22,6 mm celici (Slika 9 levo). Farmacevtska oblika se namesti na nosilec znotraj celice, ki je povezana s filtrskim sistemom. Za praške in granule se uporablja celica drugega tipa (Slika 9 desno), ki preprečuje mašenje filtra. Volumen celice je manjši, manjši pa je tudi pretok (15).



Slika 9: Pretočni celici za tablete in kapsule (levo) ter praške in granule (desno) (15).

Vrsta farmacevtske oblike vpliva tudi na izbiro dinamike pretoka. Splošno pravilo je, da se uporablja laminaren pretok medija, saj s tem relativno enako vplivamo na razpad farmacevtske oblike iz vseh strani (15).

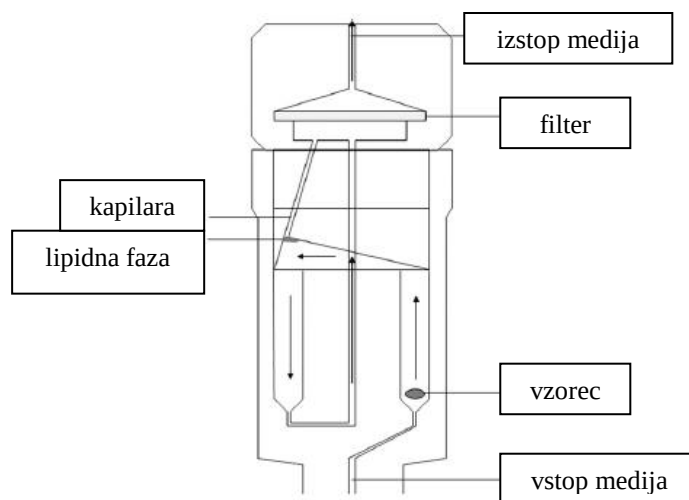
Pretočna celica nima omejitve volumna medija, zato je primerna tudi za slabo topne učinkovine. USP predpisuje naslednje pretoke: 4, 8 in 16 mL/min. Ti pretoki se lahko povečajo, če se še vedno pojavljajo problemi s topnostjo, zmanjšajo pa se v primeru, ko želimo varčevati z mediji in topnost ne predstavlja problema. Prednost celice je tudi možnost kontinuiranega spreminjanja pH znotraj celotnega časa za sproščanje (5, 15).

V preglednici I so zbrane prednosti in slabosti pretočnega sistema.

Preglednica I: Prednosti in slabosti pretočnega sistema (10).

Prednosti pretočnega sistema	Slabosti pretočnega sistema
homogen laminaren pretok skozi široko območje pretokov medija	možnost velike porabe volumnov medija (odvisno od hitrosti pretoka)
omogoča sink pogoje za slabo topne učinkovine	možnost zamašitve filtrskega sistema
enostavna modifikacija pH medija	težavna validacija hitrosti pretoka med analizo
uporabna za farmacevtske oblike z visokimi odmerki	

Za testiranje sproščanja iz mehkih želatinskih kapsul se uporablja modificirana oblika pretočne celice (Slika 10), ki jo je opisal raziskovalec Hu s svojimi sodelavci (4).



Slika 10: Pretočna celica po Hu-ju (4).

3.2 Nekonvencionalni sistemi za testiranje sproščanja učinkovine iz peroralnih farmacevtskih oblik

Modifikacije obstoječih naprav za izvedbo testov sproščanja omogočajo napredek pri napovedovanju *in vivo* obnašanja farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. *In vivo* topnost in hitrost raztapljanja sta odvisni od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine in farmacevtske oblike ter fizioloških faktorjev (pH, sestava intestinalnih tekočin, hidrodinamika). Zaradi številnih vpletenih faktorjev je težko napovedati popolno *in vivo* obnašanje, zato se uporabljajo tudi *in vivo* tehnike kot so tehnika Loc-I-Gut in tehnika luminalnega vzorčenja, ki omogoča direktno spremljanje raztapljanja v sistemu (6).

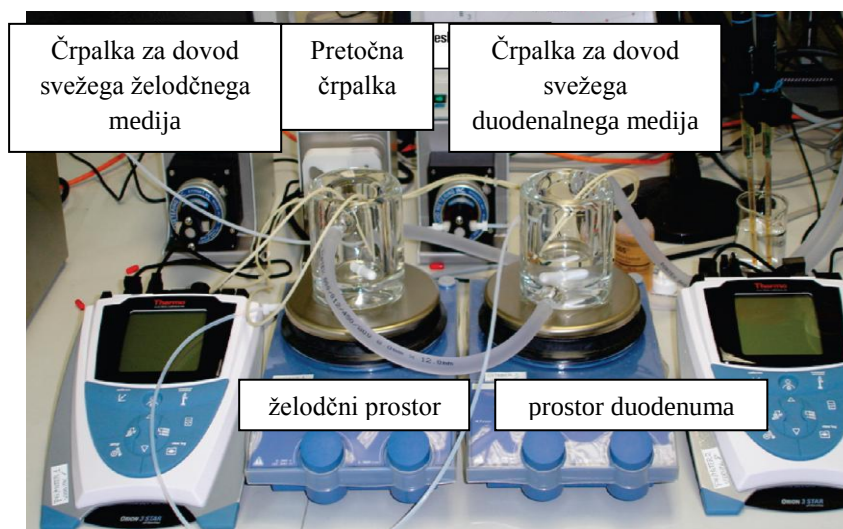
Sestava želodčnega in črevesnega medija močno vpliva na raztapljanje učinkovine, zato se namesto enokomponentnih medijev za sproščanje preizkušajo nove večkomponentne sestave (npr. z dodanimi PAS, lipidi), ki omogočajo boljše ponazarjanje želodčnega in črevesnega medija (6).

Na raztapljanje učinkovine ima velik vpliv tudi volumen razpoložljive tekočine, ki je odvisen od vnosa tekočin, sekrecije in pretoka tekočin skozi GIT. Tekočina ni enakomerno razporejena po GIT, saj zaostaja v tako imenovanih žepih. Farmacevtska oblika ni celoten čas v stiku z medijem za raztapljanje in to je eden od razlogov, zakaj dosedanje tehnike za testiranje sproščanja niso dovolj dobre (6).

3.2.1 Večprostorni sistemi

Na voljo so nekonvencionalni večprostorni modeli, ki ponazarjajo proces praznjenja GIT in potencialnega obarjanja. Sistemi so sestavljeni tako, da omogočajo pretok medija iz želodčnega v sekundarni črevesni prostor (16).

Eden izmed teh sistemov je **umetni model želodca in dvanajstnika** (ASD - Artificial stomach duodenal model) (Slika 11). Z njim lahko ovrednotimo vpliv prehoda želodca na raztapljanje, solubilizacijo in obarjanje v prostoru, ki ponazarja dvanajstnik. Kot v *in vivo* sistemu tekočine iz želodčnega prostora tečejo z določenim pretokom v črevesni prostor in s tem bolj reprezentativno ponazarjajo dinamične pogoje v GIT. V prostora stalno doteka tudi svež medij za raztapljanje, ki zagotavlja sink pogoje v obeh delih. S tem se bolj približamo *in vivo* pogojem in dobimo bolj relevantne rezultate. Avtorji predvidevajo, da je količina raztopljenе učinkovine v prostoru dvanajstnika enaka količini absorbirane učinkovine (17).

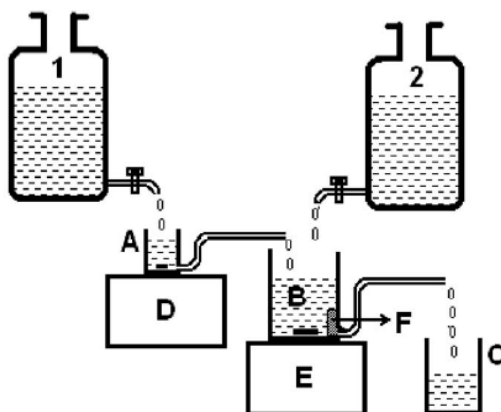


Slika 11: Fotografija umetnega modela želodca in dvanajstnika (16).

Eden od problemov začetnega sistema ASD je bila detekcija. V vsak prostor so bile nameščene UV-Vis optične niti. V primeru prenasičenja medija v prostoru so bili v mediju suspendirani delci, ki so blokirali svetlobo in onemogočili kvantifikacijo. Ena od modifikacij detekcije je bila vključitev notranjega vzorčenja in sistema redčenja ter s tem omogočena kvantifikacija. Kljub vsemu pa enostavnost tega modela z uporabo ustreznih biorelevantnih medijev oblikuje uporabno orodje za razumevanje dinamike raztapljanja.

Enak princip večprostornega modela je opisal tudi raziskovalec **Kostewicz** s svojo raziskovalno skupino (16, 17).

Z **modifikacijo čaš** je bil razvit še en večprostorni sistem za sproščanje (Slika 12). Sistem sestoji iz treh ločenih delov, ki predstavljajo želodčni, črevesni in absorpcijski prostor. Farmacevtsko obliko damo v želodčni del, sproščena učinkovina preide v črevesni del in raztopljena učinkovina gre skozi filter v prostor za absorpcijo. Želodčni prostor ponazarja 100 mL modificirana čaša, ki vsebuje 70 mL medija. Ta volumen dobro ponazarja tekočino v želodcu. Črevesni del predstavlja modificirana 500 mL čaša, ki lahko vsebuje 400 mL intestinalnega medija. Na dnu te čaše je nameščen Whatman-ov filter, ki zadrži neraztopljene delce pred prehodom v absorpcijski prostor. Slednjega ponazarja volumetrični cilinder. Obe čaši sta postavljeni na termostahiranih magnetnih mešalih. V čašah so magneti, ki omogočajo mešanje medija. Med magnetom v čaši, ki ponazarja črevesni del, in filtrskim sistemom je jeklena mrežica, ki ščiti filter. Želodčni in črevesni medij prihajata s hitrostjo kapljanja 2 mL/min v ustrezne čaše iz dveh pet litrskih posod, ki služita kot rezervoarja za medije (18).



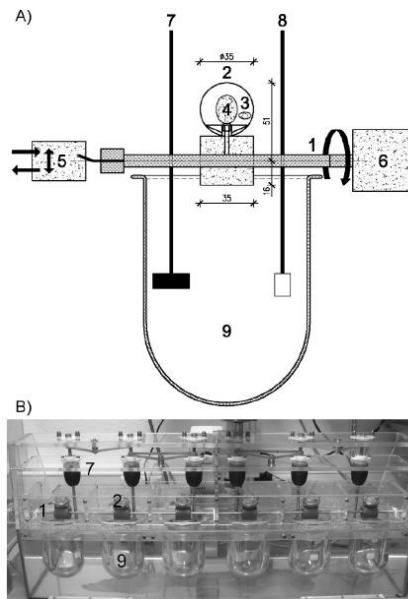
Slika 12: Večprostorni model razvit z modifikacijo čaš: (A) želodčni prostor, (B) črevesni prostor, (C) absorpcijski prostor, (D&E) termostahirani magnetni mešali, (F) Whatman-ov filter, (1) svež umetni želodčni medij, (2) svež umetni črevesni medij (18).

3.2.2. Sistemi, ki ponazarjajo sile v GIT

Podatki, ki so bili pridobljeni z uporabo gama scintigrafije in telemetričnih kapsul, so omogočili boljšo opredelitev sil, ki delujejo na farmacevtsko obliko tekom prehoda gastrointestinalnega trakta. Ti podatki so omogočili tudi razvoj novih naprav za sproščanje. Eno izmed njih je razvila ekipa raziskovalca **Garbacz**-a (16).

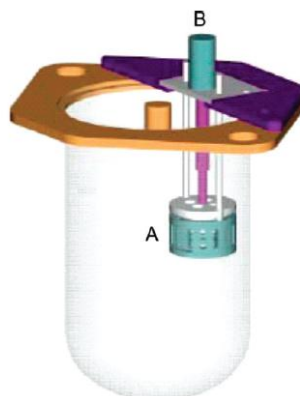
Aparatura (Slika 13) omogoča posnemanje dosedaj neupoštevanih parametrov, ki vplivajo na hidrodinamski in mehanski stres v *in vivo* pogojih. Ponazarja neprekinjeno gibanje farmacevtske oblike znotraj gastrointestinalnega trakta, gibanje valov pritiska in prekinitev kontakta farmacevtske oblike z črevesno tekočino (»faza počitka«) (3).

Naprava je sestavljena iz centralne osi s šestimi celicami iz jeklene mreže premera 35 mm. V teh celicah je nameščena farmacevtska oblika za testiranje. Premikanje centralne osi, nihanje tlaka, sinhronizacija tlačnih valov in vzorčenje je računalniško kontrolirano. Pulzirajoče napihovanje balona znotraj mrežaste krogle proizvaja valove pritiska na farmacevtsko obliko. Medij za sproščanje se nahaja v delovni posodi, ki je enaka kot pri napravah USP 1 in USP 2. V članku (3) navajajo, da je potreben volumen medija v delovni čaši 1150 mL, saj ta količina omogoča popolno potopitev mrežastih krogel v medij med »fazo počitka«, ko so mrežaste krogle obrnjene navzdol (3).



Slika 13: Shematska (A) in fotografska (B) predstavitev Garbacz-ove naprave za sproščanje. (1) centralna os, (2) celica iz jeklene mreže, (3) farmacevtska oblika, (4) napihljiv balon, (5) elektromagnetni ventil, (6) motor, (7) mešalo, (8) naprava za vzorčenje, (9) standardna posoda za sproščanje (16).

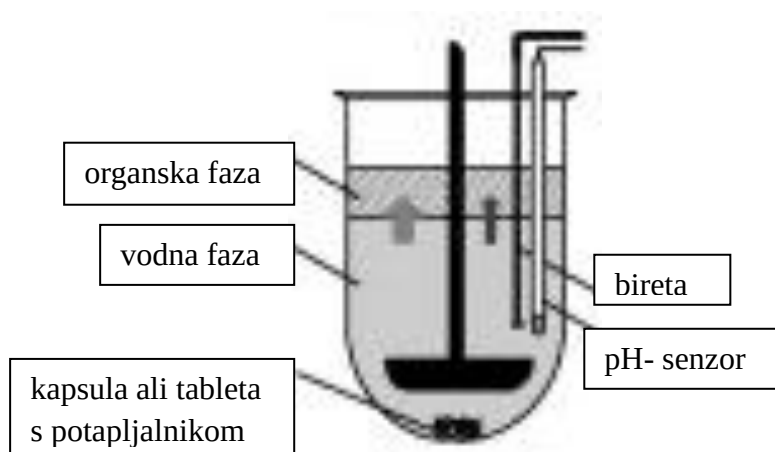
Manj vsestransko, vendar enostavnejšo napravo, ki ponazarja sile v gastrointestinalnem traktu je opisal **Burke** s svojimi sodelavci (Slika 14). Naprava je modifikacija standardne naprave USP 2. Farmacevtska oblika je nameščena v posebni celici, v kateri se v določenih intervalih proizvajajo sile z različnim časom trajanja in različno intenziteto (19).



Slika 14: Shematska predstavitev modificirane naprave USP 2. (A) celica za farmacevtsko obliko, (B) bat. Na sliki zaradi jasnosti ni narisano mešalo (16).

3.2.3 Sistemi za posnemanje raztapljanja in absorpcije

Bifazno pH-regulirano napravo (Slika 15) za sproščanje je opisal **Wagner** s svojo raziskovalno skupino. Sistem je sestavljen iz USP 29 naprave 2, avtomatske pH titracije, pH metra za kontrolo in naprave za vzorčenje. Ta model omogoča raztapljanje in porazdelitev učinkovine med vodno in organsko fazo. Za slednjo se večinoma uporablja *n*-oktanol, ki ponazarja *in vivo* lipofilno membrano skozi katero se mora učinkovina absorbirati. Celotna koncentracija raztopljene učinkovine se izračuna kot vsota frakcij v vodni in lipofilni fazi. Sistem omogoča fleksibilno in enostavno testiranje sproščanja za učinkovine, katerih topnost je odvisna od pH in tiste, ki imajo slabo topnost (1).



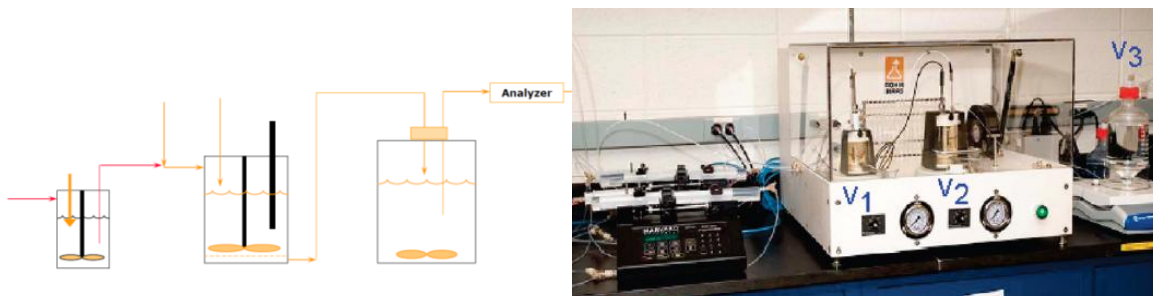
Slika 15: Shema bifazne pH-regulirane naprave za sproščanje (1).

Vangani-jeva raziskovalna skupina je opisala kombinacijo naprave USP 4 in USP 2, ki vsebuje organsko fazo in s tem posnema proces absorpcije. Primarni sistem za sproščanje je pretočni sistem. Zbrani in raztopljeni vzorci gredo nato v delovno posodo naprave USP 2. V slednji je bifazni sistem, sestavljen iz fosfatnega pufra s pH 6,8 in organskega topila (npr. nonanol). Poleg standardnega mešala je dodano še manjše mešalo s katerim zagotavljamo mešanje tako v vodni kot v organski fazi. Vodna faza je nazaj povezana s primarno pretočno napravo. S tem pristopom so preizkušali sproščanje slabo topnih učinkovin (20).

Ena izmed modifikacij večprostorne naprave za sproščanje je tudi dodatek tretje komponente v sistem, s katero je ponazorjen proces absorpcije. Tako napravo je opisal **Gu**

s svojimi sodelavci. Prvotni sistem obsega želodčni in črevesni prostor, dodan pa mu je še tretji prostor, ki posnema absorpcijo. Vrtenje mešala s hitrostjo 100 obratov na minuto posnema hidrodinamiko, s spremembo pH iz vrednosti 5,5 na 6,5 v eni uri pa je ponazorjen prehod farmacevtske oblike iz želodca preko dvanajstnika v tanko črevo. Hitrost prehoda iz črevesnega v absorpcijski prostor je osnovana na *in vivo* permeabilnosti učinkovine (21).

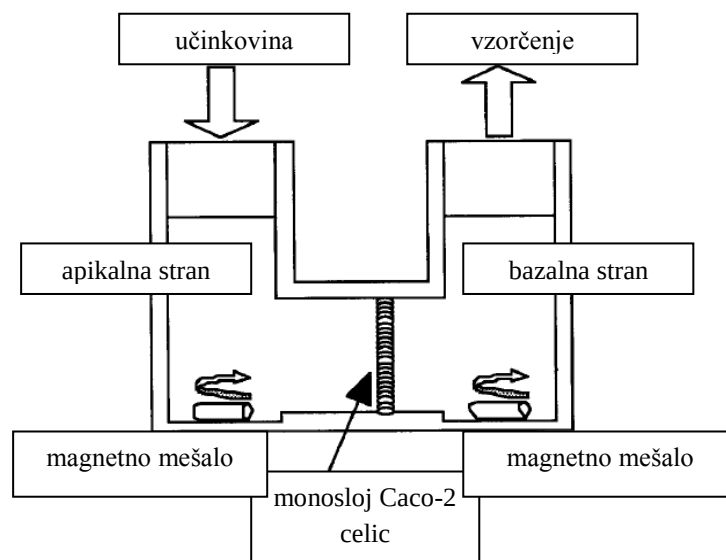
Flo Vitro sistem sproščanja je bil razvit v skupini Dow Chemical Company (Slika 16). Sistem je zelo podoben zgoraj opisanem Gu-jevem sistemu. Obsega tri prostore: želodčni, črevesni in absorpcijski. Njegova uporabnost se kaže v dobrem *in vitro* posnemanju *in vivo* absorpcijskih profilov. To je mogoče zaradi spreminjanja hitrosti pretokov, volumnov in pH med tremi prostori (16).



Slika 16: Flo Vitro sistem za sproščanje. (V1) želodčni, (V2) črevesni in (V3) absorpcijski prostor (16).

Bolj napredni pristopi vsebujejo celične kulture, ki omogočajo ovrednotenje vpliva permeabilnosti na hitrost raztapljanja. To so tako imenovani **modeli za raztapljanje in permeabilnost** (D-P), ki se nahajajo v različnih oblikah (16).

Kataoka in sodelavci so uporabljali D-P sistem, ki je vseboval sloj Caco-2 celic (Slika 17). Ta je bil nameščen med dva prostora. Apikalna in bazalna stran sta bili napolnjeni s pufrno raztopino. Učinkovine v obliki praškov, suspenzij ali raztopin so bile aplicirane na apikalno stran. Na bazalni strani so nato določen čas spremljali količino učinkovine, ki je prešla skozi Caco-2 celice (22).



Slika 17: Shematska predstavitev D-P sistema (22).

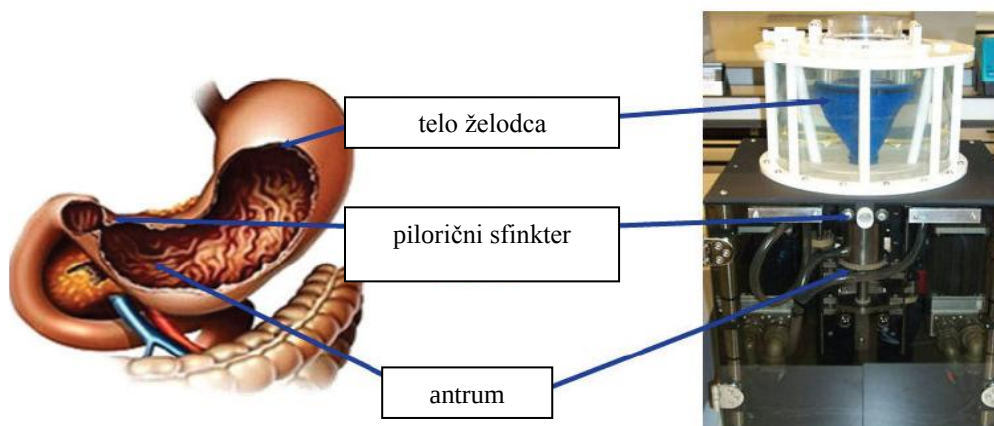
3.2.4 Kompleksni *in vitro* sistemi, ki posnemajo procese prebave

Na sproščanje ne vpliva le hidrodinamika in sestava medija za sproščanje ampak tudi sam način prebave. V zadnjih letih je bila razvita vrsta enostavnih **lipoliznih modelov**, ki omogočajo razumevanje obnašanja samoemulgirajočih dostavnih sistemov (npr. Zangenberg-ov sistem). Slabost teh sistemov je v njihovem neposnemanju praznjenja gastrointestinalnega trakta. Novi sistemi omogočajo posnemanje prebave in vpliva prebave na farmacevtsko obliko (16).

Prvi od teh sistemov je bil **IFR DGM** (Institut for Food Research dynamic gastric model). Razvit je bil na podlagi rezultatov, pridobljenih z magnetno resonančnimi študijami prebavnega procesa. Študije so pokazale, da mešanje v želodcu ni homogeno, področja z vodo pa se po obroku nahajajo v antrumu želodca (16).

Naprava je sestavljena iz dveh delov (Slika 18). Prvi ponazarja želodčno mešanje in dinamiko sekrecij v fundusu, drugi pa sile in mešanje v antrumu. Obstaja tudi možnost sklopitve s tretjim delom, s katerim ponazarjamo tanko črevo. Prostor želodca je nameščen v vodno kopel, ki omogoča kontrolo temperature. Nehomogeno mešanje ponazarjajo trije cikli kontrakcij. V želodčni prostor je dodana želodčna kislina in encimske sekrecije. Hitrost dodatka encimov (npr. pepsina) je fiziološko uravnana glede na kaloričnost in velikost obroka. Računalniška kontrola pH nadzoruje dodatek kislin v fiziološkem območju. V del, ki ponazarja antrum, so aplicirane večje sile in močnejše kontrakcije, ki povzročijo razpad hrane na manjše delčke in njihovo sedimentacijo. Kontrakcije ustvarja

bat, ki hkrati tudi potiska hrano skozi elastični krožni odsek. Velikosti sil v napravi so zelo podobne fiziološkim vrednostim, kar daje tej napravi bistveno prednost (23).



Slika 138: Dinamični želodčni model (desno) in podobnost s človeškim želodcem (levo) (23).

TIM je dinamični večprostorni *in vitro* sistem, ki dobro posnema dinamične prebavne in fiziološke procese želodca in tankega črevesja. TIM so razvili na TNO Nutrition and Food Research na Nizozemskem. Vrednosti parametrov, ki jih ponazarja TIM 1, temeljijo na podatkih, pridobljenih na študijah zdravih prostovoljcev (16, 24).

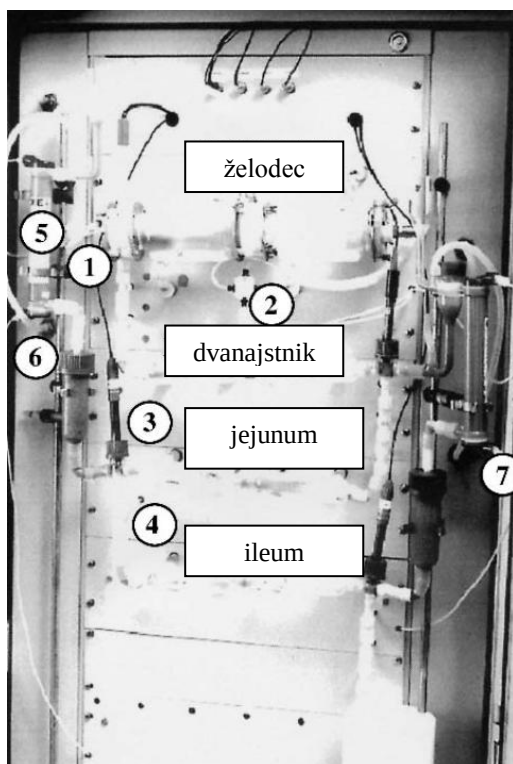
Ponazorjeni so naslednji parametri (24):

- encimi v fizioloških količinah,
- ustrezen pH za delovanje encimov,
- dodatek kofaktorjev,
- odstranjevanje produkta,
- mešanje in peristaltika v vsaki stopnji prebave,
- fiziološki čas prehoda posameznih delov prebavnega trakta,
- izločanje žlez slinavk, pankreasa, želodčnih epitelijskih celic,
- absorpcija,
- voda in
- telesna temperatura.

TIM (Slika 19) je sestavljen iz štirih segmentov, ki ponazarjajo želodec in tri segmente tankega črevesja (duodenum, jejunum in ileum). Vsak segment je sestavljen iz

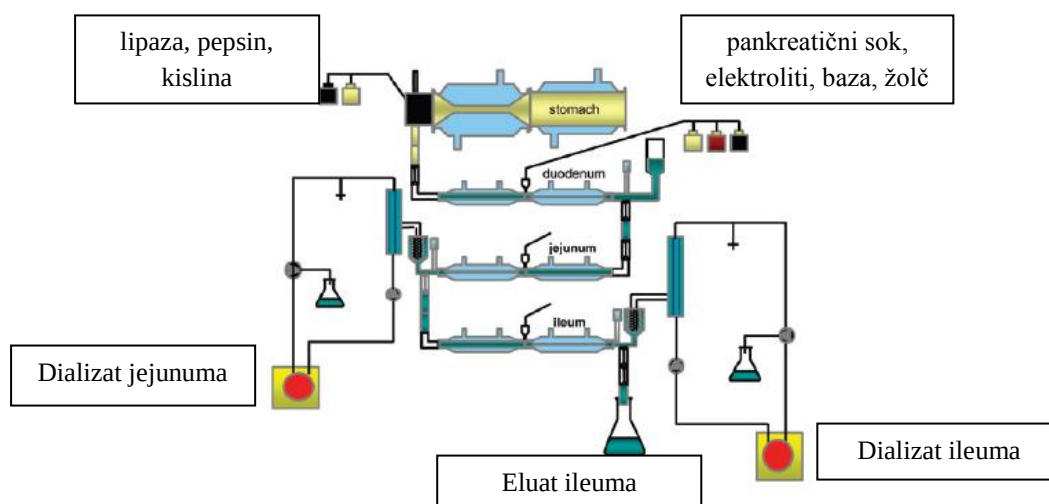
dveh osnovnih delov: steklenega ovoja in notranje fleksibilne stene. V zunanji ovoj se iz vodne kopeli črpa voda, ki omogoča kontrolo temperature in pritiska na fleksibilno steno znotraj prostora. Spremembe v pritisku vode povzročajo kompresijo in relaksacijo fleksibilne stene. Volumen v vsakem segmentu je kontroliran z nadzorovanjem pritiska preko računalnika. Vzorec iz jejunuma in ileuma teče skozi semipermeabilno membrano, ki prepušča delce manjše od 5kDa (16).

Faza absorpcije je ponazorjena z uporabo dializne membrane. Možno je testiranje učinkovin, ki se absorbirajo s pasivno difuzijo, saj v *in vitro* sistemu ni udeležениh mukoznih celic, ki bi omogočale aktivni transport (24).



Slika 19: TIM: (1) dodatki v želodčni prostor (pepsin, lipaza, klorovodikova kislina), (2) dodatki v prostor tankega črevesja (natrijev hidrogenkarbonat, žolč, pankreatični sok), (3) pH elektroda, (4) naprava za proizvajanje peristaltičnih valov, (5) membrana, (6) dializat jejunuma, (7) dializat ileuma (24).

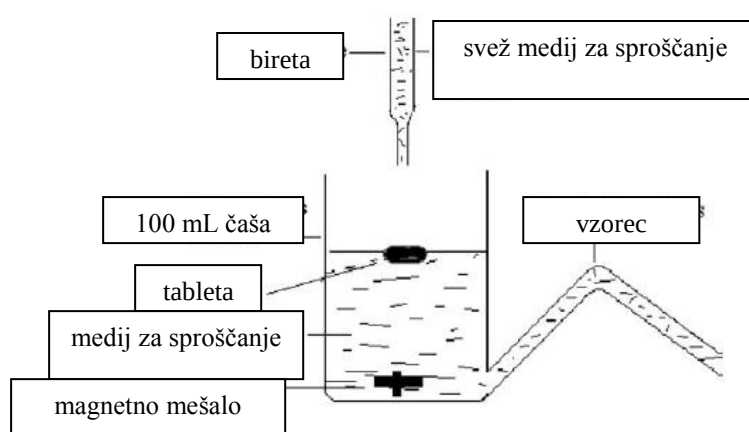
Prednosti te naprave so zanesljivost, ponovljivost in možnost zbiranja vzorcev na več mestih simuliranega prebavnega trakta med vsakim časom prebave (Slika 20) (24).



Slika 20: Shematska predstavitev sekretornih mest in mest vzorčenja (16).

3.2.5 Sistemi za sproščanja iz plavajočih dostavnih sistemov

Čaši z volumnom 100 mL je na dnu dodana steklena cev S-oblike tako, da je največji volumen medija za sproščanje v čaši 70 mL. Na dnu je magnetno mešalo, s katerim se meša medij. Nad čašo je nameščena bireta, skozi katero dovajamo medij s hitrostjo pretoka 2 mL/min (Slika 21). Ta naprava je modifikacija že obstoječe Rossett-Rice-jeve metode, ki se uporablja za testiranje antacidov. Njihov čas testiranja je med 30 in 60 minut, zato modifikacija spodnjega dna čaše ni bila potrebna. Pri novi metodi s spodnjim odtokom posnemamo praznjenje želodca skozi pilorus, z dodajanjem svežega medija skozi bireto pa posnemamo hitrost izločanja želodčne kisline. Volumen medija v čaši posnema volumen želodčne tekočine (11).



Slika 21: Sistem za sproščanje iz plavajočih dostavnih sistemov (11).

3.2.6 Naprava za raztapljanje majhnih količin učinkovin

μDISS PROFILER™ (Slika 22) je bil razvit za testiranje v zgodnji fazi razvoja, kjer učinkovina, za vgradnjo v farmacevtsko obliko, ni na voljo v veliki količini. Uporablja se za testiranje majhnih mas in majhnih volumnov učinkovin. Lahko se uporablja za določevanje intrinzične topnosti, detekcijo polimorfnih sprememb, testiranje stabilnosti in določevanje ravnotežne topnosti učinkovine (25).

Naprava je sestavljena iz osmih optičnih niti, vsaki pa pripada fotodiodni spektrofotometer. Nameščene so v centre vial, ki imajo magnetno mešalo. Volumen medija v viali je 1 do 3 mL s temperaturo $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Koncentracije sproščene učinkovine so merjene direktno v mediju za sproščanje in rezultati so pridobljeni v realnem času (26).

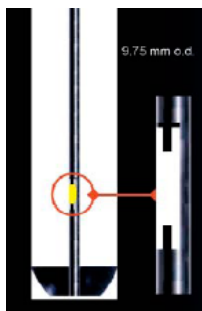


Slika 22: Fotografija μdiss Profile™ sistema (25).

UV sistem optičnih niti predstavlja uporabno alternativno metodo konvencionalnim metodam sproščanja. Njihova uporaba je spremenila način vzorčenja. Sistem omogoča kontinuirano in situ spremljanje koncentracije učinkovine brez predpriprave vzorca. Metoda je avtomatizirana in eliminira potencialne napake v predpripravi vzorca ter posledično tudi bolj ekonomsko sprejemljiva. Omogoča bolj pogosto vzorčenje in bolj natančno predstavitev profilov sproščanja. Slabost je potencialna interferenca netopnih pomožnih snovi in manjše spremembe v hidrodinamiki v posodi za sproščanje zaradi oblike in položaja optične sonde. Potrebna je tudi uporaba deareiranega medija, saj se drugače zračni mehurčki adherirajo na optično nit in motijo poskus. Optične sonde se uporabljajo kot detektorji tudi pri aparatih USP 1, USP 2 in USP 4 (27, 28).

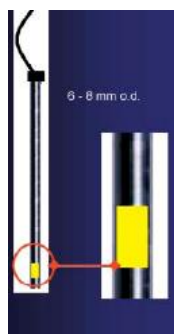
Glede na obliko in položaj sond v posodi za sproščanje ločimo naslednje kategorije optičnih sond (27):

- Gredna sonda, ki je nameščena v votlem delu mešala in pozicionirana na sredini delovne posode (Slika 23).



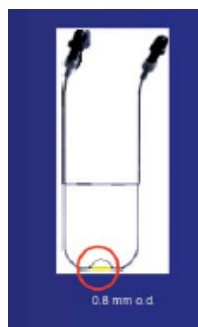
Slika 23: Gredna sonda (27).

- Paličasta sonda v trdni kratki palici, nameščena v delovno posodo. Obstajata dve vrsti paličastih sond dveh proizvajalcev z majhnimi razlikami (Slika 24).



Slika 24: Paličasta sonda (27).

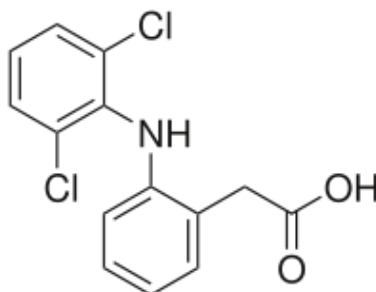
- Sonda v obliki oboka (arch probe), ukrivljene oblike. Te sonde imajo različne dimenzije, različne poti svetlobnega žarka in različno vzorčenje. Vrsta teh parametrov vpliva na rezultate testov sproščanja. Njen premer je 0,8 mm. (Slika 25).



Slika 145: Sonda v obliki oboka (27).

3.3 Fizikalno-kemijske lastnosti diklofenaka

Diklofenak je šibka kislina s pK_a 3,8 ($T = 25^\circ\text{C}$). Njegov porazdelitveni koeficient v sistemu oktanol/fosfatni pufer s pH 7,4 je 13, v sistemu oktanol/pufer s pH 6,8 pa je logaritem porazdelitvenega koeficienta 1,4 (29,30).



Slika 26: Formula diklofenaka oz. 2-(2-(2,6-diklorofenilamino)fenil)etanojske kisline.

Topnost diklofenaka je pri nevtralnem pH 17,8 mg/L, v kislem pa se zmanjša na manj kot 1 mg/L. S tvorbo natrijeve soli povečamo topnost v vodi na 1113 mg/L (29, 30).

V preglednici II so podane topnosti natrijevega diklofenakata v medijih z različnimi pH vrednostmi (29).

Preglednica II: Topnost natrijeve soli diklofenaka v medijih z različnim pH (29).

pH	medij	topnost [mg/mL] pri $23 \pm 2^\circ\text{C}$
1,2	0,1 N HCl	0,0012
2,0	0,01 N HCl	0,0017
3,0	0,001 N HCl	0,28
4,1	acetatni pufer	0,0033
4,5	acetatni pufer	0,0036
5,5	acetatni pufer	0,036
5,8	fosfatni pufer	0,14
6,0	fosfatni pufer	0,15
6,8	fosfatni pufer	0,67
7,0	fosfatni pufer	1,36
7,4	fosfatni pufer	5,15
7,8	fosfatni pufer	12,00
8,0	fosfatni pufer	12,14

3.3 Farmakološke lastnosti diklofenaka

Diklofenak spada med nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID) in sicer v skupino derivatov očetne kisline. Je neselektivni inhibitor encima COX, ki katalizira sintezo prostaglandinov in tromboksana iz arahidonske kisline (32).

Diklofenak tako kot vsa druga nesteroidna protivnetna zdravila deluje protivnetno, saj zavira nastanek mediatorjev vnetja – prostaglandinov, ki povzročijo vazodilatacijo in povečajo prepustnost žilnih sten. Preko zaviranja nastanka PGE₂ v hipotalamusu znižuje telesno temperaturo. Zavira tudi nastanek prostaglandinov, ki povečajo občutljivost receptorjev za bolečinske dražljaje za mediatorje vnetja (protibolečinsko delovanje). Uporablja se za zdravljenje vnetnih revmatskih bolezni, degenerativnega revmatizma sklepov in hrbtenice, druga vnetna in bolečinska stanja mišično–skeletnega sistema, pri menstrualni bolečini, v kombinaciji z opiodi pa se uporablja tudi pri bolečinah, povezanih z rakom (32).

4. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bilo testiranje sproščanja natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem. S poskusi smo želeli predvideti vpliv kislosti želodčnega medija in hitrosti prehoda pelet skozi želodec na sproščanje učinkovine. Poskuse smo izvajali na pretočnem sistemu s kroglicami. Osnovna medija za sproščanje sta bila simulirani želodčni in simulirani črevesni sok. Prvega je predstavljala ustrezno koncentrirana klorovodikova kislina, drugega pa fosfatni pufer s pH 6,8. Za konstantni čas zadrževanja (2 uri) smo izvedli serijo poskusov z različnimi pH vrednostmi simuliranega želodčnega medija in iz dobljenih profilov sproščanja skušali napovedati vpliv pH na sproščanje. Izvedli smo tudi poskuse z uporabo 0,001M klorovodikove kisline in preverili možnost sedimentacije neraztopljene učinkovine v zbranih vzorcih. S slednjo smo želeli predvideti ali v *in vivo* sistemu tako raztopljena kot neraztopljena oblika enako hitro preideta iz želodca v dvanajstnik in je tako celotna sproščena učinkovina na voljo za absorpcijo (ni sedimentacije učinkovine v želodcu) ali pa je za slednjo na voljo le raztopljeni del. Preverjali smo tudi vpliv časa zadrževanja v želodcu na sproščanje učinkovine. Za vsak preizkušani pH (0,01 M, 0,001 M in 0,0013 M HCl) smo izvedli serijo poskusov s petimi različnimi časi zadrževanja (10, 30, 60, 120 in 200 min) farmacevtske oblike v kislem mediju. Dobljeni profili sproščanja za vsak čas so nam z upoštevanjem hitrosti prehoda pelet omogočili izračun oteženega povprečnega profila sproščanja pri določenem pH, s katerim smo ponazorili sproščanje učinkovine po aplikaciji v *in vivo* sistemu.

5. MATERIALI IN METODE

5.1 Pelete z natrijevim diklofenakatom

S poskusi sproščanja smo preizkušali pelete s podaljšanim sproščanjem iz Diclofenac-ratiopharm® 100 mg Retard kapsul s 100 mg natrijevega diklofenakata proizvajalca Ratiopharm GmbH.

5.2 Snovi, ki smo jih uporabljali pri delu

- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo $c(\text{HCl}) = 1\text{M}$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenofosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo $c(\text{NaOH}) = 1\text{M}$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- koncentrirani etanol, Ph. Eur. 5th (96% etanol), Kefolab, Ljubljana, Slovenija
- natrijev diklofenakat, Sigma, Kitajska

5.3 Uporabljene aparature

- pretočni sistem za testiranje sproščanja (s kroglicami): peristaltična črpalka PA-SK4 control, IKA WERKE, Nemčija; grelec in magnetno mešalo IKA WERKE, Nemčija
- pretočne cevke iz silikona z notranjim premerom 1,52 mm, IKA, Nemčija
- spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technology Group, Waldbronn, Nemčija
- digitalna tehtnica, Exacta 300EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- avtomatska pipeta 1-10 mL, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtomatska pipeta 100-1000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pH meter, MP220, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra Kranj, Slovenija
- membranski filtri, velikost por 0,45 μm , Sartorius AG, Nemčija
- stereomikroskop Olympus SZX12, Olympus, Japonska

5.4 Raztopine

5.4.1 Simulirani želodčni mediji

- Klorovodikova kislina določene koncentracije (0,01 M; 0,001 M; 0,09 M; 0,0011 M; 0,0012 M; 0,0013 M; 0,0015 M; 0,0025 M; 0,005 M; 0,0075 M)

Klorovodikovo kislino ustrezne koncentracije smo pripravili z redčenjem 1 M raztopine klorovodikove kisline, ki smo jo pripravili tako, da smo standard za pripravo 1 M koncentracije redčili z deionizirano vodo do oznake v litrski merilni bučki. Preračunali smo kolikšen volumen 1 M kisline potrebujemo za pripravo želene koncentracije, volumen z avtomatsko pipeto oz. z merilnim valjem odmerili v litrsko merilno bučko in redčili z deionizirano vodo do oznake. V preglednici III so podani preračunani volumni 1 M HCl, ki smo ji potrebovali za pripravo naših raztopin.

Preglednica III: Volumni 1 M HCl, potrebni za pripravo 1 litra HCl določene koncentracije.

koncentracija HCl (M)	volumen 1 M HCl [mL]
0,09	90
0,01	10
0,0075	7,5
0,005	5
0,0025	2,5
0,0015	1,5
0,0013	1,3
0,0012	1,2
0,0011	1,1
0,001	1

5.4.2 Simulirani črevesni mediji

- Fosfatni pufer pH 6,8

Sestavine: 6,8 g KH_2PO_4

22 mL 1M NaOH

destilirana voda do 1 L

Fosfatni pufer s pH 6,8 smo naredili tako, da smo najprej do približno polovice volumna 1 L steklene buče nalili deionizirano vodo. Z merilnim valjem smo nato odmerili ustrezen volumen 1 M NaOH in stehali predpisano maso KH_2PO_4 na digitalni tehtnici. Vse sestavine prenesli v bučo in z deionizirano vodo redčili do oznake. Raztopino smo

premešali in ji s pH metrom zmerili pH, ki je moral biti med $6,8 \pm 0,05$. pH meter smo pred vsako meritvijo umerili s standardnim pufrom s pH 7.

5.5 Metode

5.5.1 UV/VIS spektroskopija

Na začetku merjenja absorbanc v določenem mediju smo morali določiti maksimum absorbance natrijevega diklofenakata. V vsakem mediju smo najprej brisali ozadje s slepim vzorcem, ki je bil sestavljen iz medija v katerem je bil nato raztopljena učinkovina. Nato smo pomerili naš vzorec in računalniški program nam je podal valovno dolžino pri kateri je bila absorbanca največja. Postopek smo ponovili z vsakim medijem in tako določili maksimume absorbanc za želodčni sok 273 (sama kislina) oz. 276 nm (kislina: natrijev hidroksid v volumskem razmerju 1:1) in za črevesni sok (pufer s pH 6,8: natrijev hidroksid v volumskem razmerju 1:1) 276 nm. Pred vsako meritvijo smo brisali ozadje z uporabljenim medijem (želodčni ali črevesni medij). Če je bila izmerjena absorbanca vzorca večja od 1, smo vzorec ustrezno redčili z medijem, katerega smo uporabili pri poskusu.

5.5.2 Merjenje sedimentacije neraztopljene učinkovine

5.5.2.1 Preliminarni test merjenja sedimentacije učinkovine v vzorcih (T1)

Izvedli smo poskus samo z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline (brez zamenjave medija). Pogoji poskusa so bili: pretok medija 2 mL/min, volumen medija v delovni čaši 40 mL, hitrost mešanja 50 obratov/minuto, temperatura medija 37°C, masa steklenih kroglic 25 g. Vzorec, ki smo ga zbrali med 20 in 40 minuto poskusa, je bil že zelo moten, zato smo slednjega uporabili pri preliminarnih testih merjenja sedimentacije. Zbrali smo 40 mL vzorca. Dobro smo ga premešali s stekleno palčko, nato 30 mL enakomerno razdelili v tri 10 mL steklene merilne valje, iz preostanka pa smo določili koncentracijo celotne in raztopljene učinkovine v vzorcu. Iz preostanka smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 2 mL vzorca, mu dodali 2 mL 0,1 M natrijevega hidroksida, da se je vsa učinkovina raztopila in pripravljeno raztopino filtrirali skozi 0,45 µm filter. Raztopino smo nato desetkrat redčili z medijem, ki je bil sestavljen iz 0,001 M klorovodikove kisline in 0,1 M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1, ter ji zmerili absorbanco pri 276 nm. S to meritvijo smo določili celotno koncentracijo učinkovine v vzorcu. Preostalih 8 mL smo najprej filtrirali skozi 0,45

µm filter, iz filtrata odpipetirali 2 mL, dodali 2 mL 0,1 M natrijevega hidroksida, desetkrat redčili z medijem, sestavljenim iz 0,001 M klorovodikove kisline in 0,1 M natrijevega hidroksida (1:1) ter zmerili absorbanco raztopine. Določili smo koncentracijo raztopljene učinkovine.

Merilne valje smo pustili stati določen čas. Iz prvega smo vzeli zgornje 2 mL vzorca raztopine po desetih minutah, iz drugega po dvajsetih in iz tretjega po tridesetih minutah. Vsakemu vzorcu smo nato dodali 2 mL 0,1 M natrijevega hidroksida, raztopino filtrirali skozi 0,45 µm filter, desetkrat redčili z raztopino, sestavljeno iz 0,001 M klorovodikove kisline in 0,1 M natrijevega hidroksida (1:1) in izmerili absorbanco pri 276 nm. Naredili smo štiri paralele.

Vzorec smo si ogledali tudi s stereomikroskopom in določili velikost neraztopljene učinkovine. Na objektnem stekelcu smo pripravili razmaz vzorca. Opazovali smo pri 90-kratni povečavi.

5.5.2.2 Merjenje sedimentacije učinkovine v vseh motnih vzorcih pri poskusu sproščanja z uporabo 0,001 M HCl (T2)

Na pretočnem sistemu s kroglicami smo izvedli poskus sproščanja z medijem 0,001 M klorovodikovo kislino brez menjave medija. Pogoji poskusa so bili naslednji: pretok medija 2 mL/min, volumen medija v delovni čaši 40 mL, hitrost mešanja 50 obratov/minuto, temperatura medija 37°C, masa steklenih kroglic 25 g. Vzorce smo zbirali v dvajset minutnih intervalih (40 mL vzorec). Vzorec smo premešali in iz njega z avtomatsko pipeto odpipetirali 2 mL, dodali enak volumen 0,1 M natrijevega hidroksida, raztopino desetkrat redčili z raztopino, sestavljeno iz 0,001 M klorovodikove kisline in 0,1 M natrijevega hidroksida (1:1) in izmerili absorbanco pri 276 nm. Preostali vzorec smo nalili v tri 10 mL steklene valje in po 10, 20 in 30 minutah določali koncentracijo učinkovine v zgornjih dveh mililitrih valja. Določanje je potekalo po enakem postopku kot ničtem vzorcu. Naredili smo tri paralele.

5.5.3 Sproščanje natrijevega diklofenakata

5.5.3.1 Izdelava umeritvenih premic

V vsakemu uporabljenemu mediju za sproščanje smo naredili umeritveno premico. Pripravili smo tri osnovne raztopine natrijevega diklofenakata v ustreznem mediju in jih

redčili na nižje koncentracije (enakomerno razporejene po območju, v katerem smo pričakovali rezultate analiz vzorcev) ter izmerili absorbance. Pri določanju umeritvene premice v kislih medijih (0,01 M klorovodikova kislina in 0,001 M klorovodikova kislina) smo osnovne raztopine pripravili v destilirani vodi, saj je diklofenak pri nizki pH vrednosti slabo topen. Vse nadaljnje raztopine smo pripravili z najmanj dvajsetkratnim redčenjem s klorovodikovo kislino. Delež vode v končni raztopini je bil zelo majhen, zato smo ga zanemarili. Glede na to, da so se pH pripravljenih raztopin kislin zelo malo razlikovali, bi ta voda lahko pomembno vplivala na pH raztopin, vendar so bile dobljene enačbe umeritvenih premic v različnih pH praktično enake in voda ni predstavljala vpliva. Pri raztopinah z natrijevim hidroksidom smo osnovne raztopine pripravili v 0,1 M natrijevem hidroksidu. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali umeritveno premico z ustreznim kvadratom Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2). Enačbe umeritvenih premic in Pearsonovi koeficienti korelacije so podani v poglavju 6.1.

5.5.3.2 Testi sproščanja na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami

Poskuse smo izvajali na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami s kontrolirano temperaturo, pretokom in hitrostjo vrtenja magnetnega mešala. Sistem prikazuje slika 27. Sestavljen je iz peristaltične črpalke, katere rotor se je enakomerno vrtel ter tako zagotavljal, da je bil dotok svežega medija in odtok vzorca enak. Magnetno mešalo z grelcem je omogočalo nastavitve hitrosti vrtenja in temperature medija za sproščanje. Na mešalu je bila postavljena čaša s 40 mL medija za sproščanje in magnetom. Iz čaše je vodila silikonska cevka s filtrom, ki je odvajala vzorce v merilni valj. Pred začetkom poskusa smo določili hitrost črpanja, ki je znašala 2 mL/min. Vzorce smo zbirali na 20 min. Vodno kopel smo termostatirali na 37°C. Pred vsakim poskusom smo celoten sistem večkrat sprali z deionizirano vodo in potem še z medijem za sproščanje, ki smo ga uporabili pri nadaljnjem poskusu. V delovni čaši, katere volumen je bil 150 mL, je bilo v vsakem trenutku 40 mL medija za sproščanje. Ustrezen čas (10, 30, 60, 120 ali 200 min) smo v delovno čašo črpali svež želodčni medij, nato pa svež črevesni medij do konca trajanja poskusa (6, 7 oz. 8 ur).

Pri poskusu z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline za želodčni medij, smo zbrani 40 mL vzorec redčili z 0,1 M natrijevim hidroksidom v razmerju 1:1, da se je raztopila vsa sproščena učinkovina. Razredčeni vzorec smo nato z brizgo prefiltrirali skozi filter

velikostjo 0,45 µm. Filtrat smo po potrebi redčili 1/5 ali 1/10 z raztopino želodčnega oz. črevesnega medija in 0,1 M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1.

Pri poskusih z uporabo manj koncentrirane klorovodikove kisline (0,001 in 0,0013 M) smo določali količino raztopljene in količino celotne sproščene učinkovine. Prav tako kot v primeru 0,01 M klorovodikove kisline smo zbrali 40 mL vzorca. Od slednjega smo odpipetirali 2 mL, dodali 2 mL natrijevega hidroksida, raztopino filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm in po potrebi redčili z ustrezno pripravljeno raztopino želodčnega oz. črevesnega medija in 0,1 M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1 ter izmerili absorbanco, iz katere smo nato izračunali količino celotne sproščene učinkovine.

Preostali del zbranega vzorca smo prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm, od filtrata odpipetirali 2 mL, dodali 2 mL 0,1 M natrijevega hidroksida in po potrebi redčili z ustrezno pripravljeno raztopino želodčnega oz. črevesnega medija in 0,1 M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1 ter izmerili absorbanco tako pripravljene raztopine. Določili smo raztopljeni del sproščene učinkovine.

Na osnovi dobljenih absorbanc smo iz umeritvenih premic določili koncentracijo celotne in raztopljene učinkovine v vzorcu, ki se je ob določenem času zbral v merilnem valju. Iz koncentracije učinkovine v valju in volumna odvzetega vzorca pa smo izračunali količino sproščene učinkovine po določenem času po enačbi 1.

$$m_n = c_n \cdot V_{vz} \quad (1)$$

Posamezne mase smo sešteli in dobili kumulativno količino (enačba 2), nato pa smo izračunali še odstotek sproščene učinkovine po enačbi 3.

$$m_n' = (c_1 + c_2 + \dots + c_n) \cdot V_{vz} \quad (2)$$

$$\% = (m_n' / M) \cdot 100 \quad (3)$$

n - število vzorcev (pri vzorec pri času 0 je imel koncentracijo 0 mg/L)

V_{vz} - volumen vzorca (40 mL)

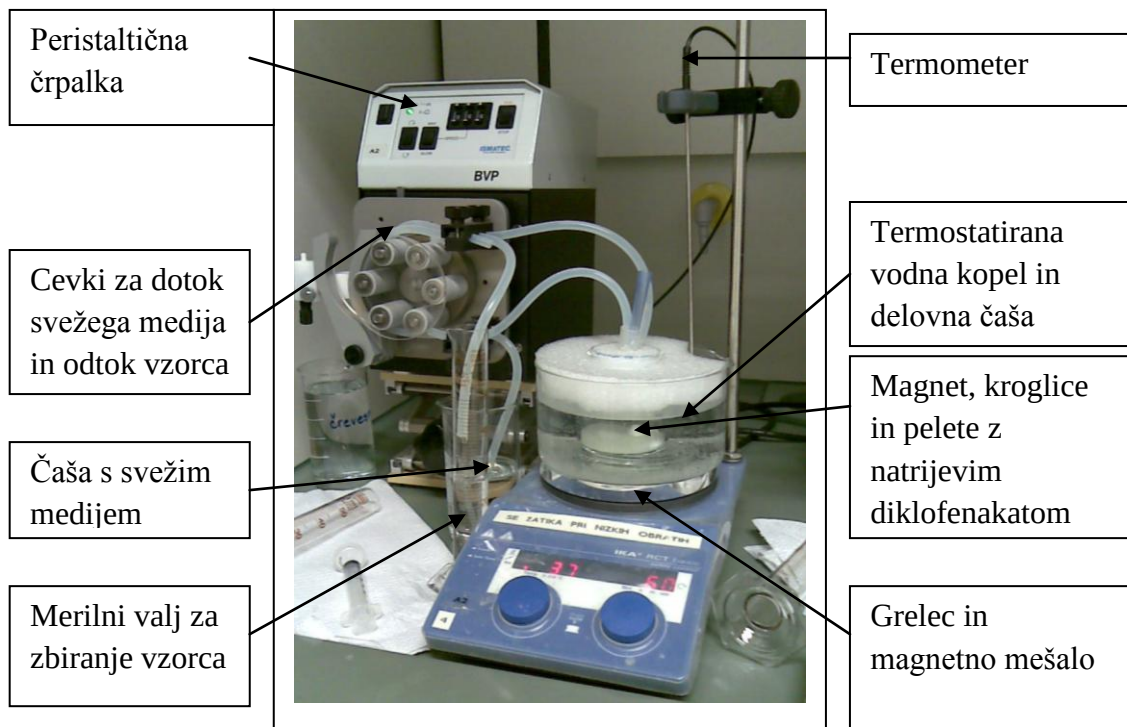
m_n - masa učinkovine v volumnu vzorca ob času t [mg]

c_n - konc. učinkovine v n-tem vzorcu [mg/mL]

m_n - masa sproščene učinkovine do časa t [mg]

% - odstotek sproščene učinkovine ob času t

M – deklarirana vsebnost natrijevega diklofenakata v Diclofenac-ratiopharm® 100 mg Retardkapseln [100 mg]



Slika 157: Pretočni sistem za testiranje sproščanja

5.5.3.2.1 Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje

Izvedli smo poskuse z različnimi koncentracijami uporabljene klorovodikove kisline za simulirani želodčni medij. Čas dotoka svežega želodčnega medija v delovno čašo je bil pri vseh poskusi konstanten in je znašal 120 min. Ostali pogoji poskusa so bili:

- velikost delovne čaše: 150 mL,
- volumen medija v delovni čaši: 40 mL,
- hitrost mešanja magnetnega mešala: 50 obratov/minuto,
- pretok medija: 2 mL/min,
- masa uporabljenih steklenih kroglic: 25 g in
- črevesni medij: fosfatni pufer s pH 6,8.

V preglednici IV so navedeni vsi izvedeni poskusi, s katerimi smo ugotavljali vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje natrijevega diklofenakata.

Preglednica IV: Poskusi sproščanja, s kateri smo ugotavljali vpliv pH na sproščanje učinkovine (T3-T10 so oznake poskusov).

Oznaka poskusa	Koncentracija HCl [M]	Število paralelk
T3	0,09	2
T4	0,0075	1
T5	0,005	1
T6	0,0025	1
T7	0,0015	1
T8	0,0013	3
T9	0,0012	2
T10	0,0011	1

5.5.3.2.2 Vpliv časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje

Vpliv časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju smo ugotavljali pri treh pH simuliranega želodčnega medija (pH 2; 2,89 in 3). Poskuse smo izvajali na pretočnem sistemu. Pri vseh poskusi so bili konstantni naslednji pogoji:

- velikost delovne čaše: 150 mL,
- volumen medija v delovni čaši: 40 mL,
- pretok medija: 2 mL/min,
- masa uporabljenih steklenih kroglic: 25 g,
- hitrost mešanja magnetnega mešala: 50 obratov/min in
- črevesni medij (fosfatni pufer s pH 6,8)

Pogoja poskusa, ki smo jih spreminjali pa sta bila:

- čas dotoka svežega želodčnega medija v delovno čašo in
- pH želodčnega medija (koncentracija klorovodikove kisline)

V preglednici V so zbrani vsi izvedeni poskusi sproščanja z navedenimi modificiranimi pogoji.

Preglednica V: Oznake in modificirani pogoji poskusov sproščanja.

Oznaka poskusa	Koncentracija HCl [M]	Čas dotoka HCl v delovno čašo [min]	Trajanje poskusa [h]	Število paralelek
T11	0,01	10	6	3
T12	0,01	30	7	5
T13	0,01	60	7	3
T14	0,01	120	7	5
T15	0,01	200	8	3
T16	0,001	10	6	3
T17	0,001	30	7	3
T18	0,001	60	7	3
T19	0,001	120	7	3
T20	0,001	200	8	3
T21	0,0013	10	6	3
T22	0,0013	30	7	3
T23	0,0013	60	7	3
T24	0,0013	120	7	3
T25	0,0013	200	8	3

Pri poskusih z uporabo 0,001 M in 0,0013 M klorovodikove kisline smo v vsakem vzorcu določali celotno in raztopljeno količino sproščene učinkovine.

5.5.4 Računsko podaljševanje profilov sproščanja

Pri eksperimentalnem delu so bile pelete različen čas izpostavljen simularnemu črevesnemu mediju. Celoten čas poskusov z 10 minutnim časom zadrževanja v kislem mediju je bil 6 ur, s časom zadrževanja 200 min pa 8 ur. Trajanje ostalih poskusov je bilo 7 ur. Učinkovina je bila po koncu izvedenih poskusov praktično že v celoti sproščena, zato smo računsko podaljšali povprečne profile, pri katerih je bilo to potrebno, do 8 h.

Za računsko podaljševanje smo uporabili linearno regresijo, saj so bili rezultati zadnjih merjenih vzorcev v vseh primerih praktično enaki, saj se učinkovina ni več raztapljala. Skozi zadnje dve oz. tri točke smo narisali premico in izračunali njeno enačbo (enačba 4). S pomočjo te enačbe smo za navidezne čase vzorčenja izračunali odvisno spremenljivko oz. odstotek sproščene učinkovine ob določenih časih.

$$\%^{t}_{\text{sprošč.}} = kt + n \quad (4)$$

$\%^{t}_{\text{sprošč.}}$ – odstotek sproščene učinkovine ob času t [%]

k - naklon umeritvene premice [%/min]

t – čas vzorčenja [min]

n – odsek na osi y [%]

5.5.5 Oteženi povprečni profili sproščanja pri določenem pH želodčnega medija

Otežene povprečne profile sproščanja natrijevega diklofenakata pri določenem pH simuliranega želodčnega medija smo izračunali z uporabo odstotkov pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu. Ti podatki so rezultat raziskovalnega dela na katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Na podlagi profilov praznjenja želodca iz različnih virov literature so bili z Weibull-ovim matematičnim modelom (enačba 5) izračunani deleži pelet, ki ostanejo v želodcu ob določenih časih. Izbrani viri so vsebovali podatke zbrane z gama scintigrafijo na tešče, velikost zaužitih pelet pa je bila med 0,5 in 5 mm. Deleži pelet, ki zapustijo želodec ob določenih časih njegovega praznjenja, so bili izračunani po enačbi 6 (preglednica VI) (31).

$$GE(t) = 100e^{-(t[\text{min}]/61,9)^{0,895}} \quad (5)$$

$$\%{}^t_{\text{praznjenja pelet}} = GE(z) - GE(k) \quad (6)$$

GE – delež pelet, ki ostane v želodcu v določeni časovni točki

$\%{}^t_{\text{praznjenja pelet}}$ – delež pelet, ki zapusti želodec v določenem časovnem intervalu

GE(z) – odstotek pelet, ki ostane v želodcu na začetku časovnega intervala [%]

GE(k) – odstotek pelet, ki ostane v želodcu na koncu časovnega intervala [%]

*Preglednica VI: Časovni intervali praznjenja pelet iz želodca in izračunani odstotki pelet, ki se praznijo v določenem intervalu ($t(k)$ – končni čas intervala, $t(z)$ – začetni čas intervala, $\%{}^t_{\text{praznjenja pelet}}$ – odstotek pelet, ki zapusti želodec v določenem časovnem intervalu); *v zadnjem deležu pelet je prišteta tudi delež, ki se zapusti želodec po 240min.*

$t(z) - t(k)$ [min]	$(t(k) - t(z))/2$ [min]	$\%{}^t_{\text{praznjenja pelet}}$
0-20	10	30,5
20-40	30	18,7
40-80	60	22,4
80-160	120	18,8
160-240	200	9,6*

Z uporabo teh odstotkov smo izračunali oteženi povprečni profil sproščanja pri določenem pH simuliranega želodčnega medija tako, da smo odstotek sproščene učinkovine v vsaki časovni točki povprečnega profila sproščanja pomnožili z ustreznim deležem pelet (preglednica VI) glede na čas zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju (enačba 7).

$$\%^t_{\text{otežen}} = \%^t * \%^t_{\text{praznjenja}} \quad (7)$$

$\%^t_{\text{otežen}}$ - oteženi odstotek sproščene učinkovine ob času t [%]

$\%^t$ - odstotek sproščene učinkovine ob času t [%]

$\%^t_{\text{praznjenja}}$ - odstotek pelet, ki zapusti želodec v določenem časovnem intervalu [%]

Nato smo otežene odstotke sproščene učinkovine za 5 različnih časov zadrževanja ob vsakem času vzorčenja sešteli in izračunali oteženi povprečni profil sproščanja za določen pH simuliranega želodčnega medija (enačba 8).

$$\%^t_{\text{otežen, povpr.}} = (\%^t_{\text{otežen 10min}} + \%^t_{\text{otežen 30min}} + \%^t_{\text{otežen 60min}} + \%^t_{\text{otežen 120min}} + \%^t_{\text{otežen 200min}})/100 \quad (8)$$

$\%^t_{\text{otežen, povpr.}}$ - oteženi povprečni odstotek sproščene učinkovine ob času t [%]

$\%^t_{\text{otežen 10/30/60/120/200 min}}$ – oteženi odstotek sproščene učinkovine ob času t pri poskusu s časom zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju 10 ali 30 ali 60 ali 120 ali 200 min [%]

5.5.6 Statistična analiza s Studentovim t-testom

Rezultate sedimentacijske analize (poskusa T1 in T2) smo statistično ovrednotili s parnim, dvostranskim Studentovim t-testom. Primerjali smo prvi in četrti (30 min) vzorec. Analizo smo izvedli s programom Microsoft Excel. Signifikantnost oz. nesignifikantnost razlik med vzorci smo ugotavljali glede na primerjavo med mejno verjetnostjo (p), ki je znašala 0,05 in verjetnostjo, ki nam jo je za posamezen primer podal program.

6. REZULTATI

6.1 Določanje enačb umeritvenih premic

6.1.1 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju

6.1.1.1 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju brez dodatka 0,1 M natrijevega hidroksida

V preglednici VII podani rezultati izmerjenih absorbanc v simuliranem želodčnem mediju brez dodatka natrijevega hidroksida z različnimi pH vrednostmi. Na osnovi teh rezultatov smo izračunali umeritvene premice in kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (preglednica VIII).

Preglednica VII : Absorbance raztopin učinkovine določenih koncentracij v določeni konc. HCl pri $\lambda = 273\text{nm}$.

0,1 M HCl		0,01 M HCl		0,001 M HCl	
konc. (mg/L)	A (273 nm)	konc. (mg/L)	A (273 nm)	konc. (mg/L)	A (273 nm)
1,00375	0,0190	1,00375	0,0246	2,08	0,0597
2,0325	0,0509	2,0325	0,0532	4,95625	0,128
3	0,0773	3	0,0762	10,45	0,293
4,015	0,106	4,015	0,100	16,64	0,462
5,08125	0,133	5,08125	0,123	19,825	0,545
6	0,157	8,03	0,200	26,752	0,718
8,03	0,220	10,1625	0,248	31,2	0,847
10,1625	0,271	12	0,301	35,685	0,988
12	0,325	/	/	41,8	1,116

Preglednica VIII: Enačbe umeritvenih premic in kvadrati Pearsonovega koeficienta korelacije (A – absorbanca, c – koncentracija raztopine učinkovine [mg/L]).

Koncentracija HCl [M]	Enačba umeritvene premice	Kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije [R^2]
0,1	$A = 0,0276c - 0,0063$	0,9994
0,01	$A = 0,0247c + 0,0008$	0,9993
0,001	$A = 0,027c + 0,0053$	0,9991

6.1.1.2 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem želodčnem mediju z dodatkom 0,1M natrijevega hidroksida v razmerju 1:1

V preglednici IX podani rezultati izmerjenih absorbanc v simuliranem želodčnem mediju z različnimi pH vrednostmi z dodatkom 0,1 M NaOH (volumsko razmerje 1:1). Na osnovi teh rezultatov smo izračunali umeritvene premice in kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (preglednica X).

Preglednica IX: Absorbance raztopin učinkovin določenih koncentracij v raztopini zmesi HCl in 0,1 M NaOH (vol.razmerje:1:1) pri $\lambda = 276\text{nm}$.

0,01 M HCl/NaOH		0,001 M HCl/NaOH		0,0013 M HCl/NaOH	
konc. (mg/L)	A (276 nm)	konc. (mg/L)	A (276 nm)	konc.(mg/l)	A (276 nm)
0,511	0,0083	1,022	0,0249	1,02	0,0348
1,069	0,0343	5,345	0,156	5,5	0,182
2,062	0,0638	10,31	0,309	9,9	0,316
3,066	0,0855	15,33	0,489	15,3	0,478
5,345	0,166	21,38	0,675	22	0,711
7,217	0,227	25,775	0,828	24,75	0,793
10,22	0,316	30,93	0,972	44	1,429
12,828	0,416	/	/	/	/
15,465	0,486	/	/	/	/

Preglednica IX: Nadaljevanje.

0,09 M HCl/NaOH		0,0075 M HCl/NaOH		0,005 M HCl/NaOH	
konc.(mg/L)	A (276 nm)	konc.(mg/L)	A (276 nm)	konc.(mg/L)	A (276 nm)
2,14	0,0773	1,066	0,03	1,066	0,0414
3,18	0,106	5,33	0,168	5,375	0,163
4,24	0,138	10,04	0,315	10,04	0,305
6,42	0,208	15,99	0,505	21,5	0,681
8,48	0,277	21,5	0,686	25,1	0,811
10,6	0,343	25,1	0,791	37,625	1,191
/	/	31,98	1,016	/	/
/	/	37,625	1,204	/	/

Preglednica IXI: Nadaljevanje.

0,0025 M HCl/NaOH		0,0015 M HCl/NaOH		0,0012 M HCl/NaOH	
konc. (mg/L)	A (276 nm)	konc. (mg/L)	A (276 nm)	konc. (mg/L)	A (276 nm)
1,02	0,029	1,05	0,036403	1,06	0,02056
5,01	0,175	4,95	0,16346	5,35	0,16146
10,3	0,318	10,3	0,32827	10,6	0,33453
16,89	0,567	15,75	0,50031	15,9	0,49735
19,8	0,645	19,8	0,64529	21,4	0,6737
26,02	0,845	25,75	0,81712	26,5	0,85483
33,8	1,112	31,5	1,0041	31,8	1,0014
40,1	1,299	39,6	1,2999	42,8	1,3542

Preglednica IX: Nadaljevanje.

0,0011 M HCl/NaOH	
konc.(mg/l)	A (276 nm)
1,02	0,038
5,5	0,179
9,9	0,328
15,3	0,492
22	0,714
24,75	0,804
30,6	0,978
44	1,405

Preglednica X: Enačbe umeritvenih premic in kvadrati Pearsonovega koeficienta korelacije v simuliranem želodčnem mediju z NaOH (vol.razmerje:1:1); (A – absorbanca, c – koncentracija raztopine učinkovine [mg/L]).

Koncentracija HCl [M]	Enačba umeritvene premice	Kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije [R^2]
0,01	$A = 0,0321c - 0,0056$	0,9989
0,001	$A = 0,0321c - 0,0117$	0,9994
0,0013	$A = 0,0324c - 0,0038$	0,9997
0,09	$A = 0,0321c - 0,0031$	0,9994
0,0075	$A = 0,032c - 0,0051$	0,9999
0,005	$A = 0,0319c + 0,0025$	0,9995
0,0025	$A = 0,0326c + 0,0009$	0,9994
0,0015	$A = 0,0324c - 0,0031$	0,9993
0,0012	$A = 0,0319c - 0,0084$	0,9997
0,0011	$A = 0,0321c - 0,0117$	0,9994

6.1.2 Določanje enačb umeritvenih premic v simuliranem črevesnem mediju

V preglednici XI so podani rezultati izmerjenih absorbanc v simuliranem črevesnem mediju brez in z dodatkom 0,1 M NaOH. Črevesni sok je ponazarjala raztopina pufru s pH vrednostjo 6,8. Na osnovi teh rezultatov smo izračunali umeritvene premice in kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (preglednica XII).

Preglednica XI: Absorbance raztopin učinkovine določenih koncentracij v simuliranem črevesnem mediju pri $\lambda = 276\text{nm}$.

pufer pH 6,8		pufer pH 6,8 + NaOH (1:1)	
konc. (mg/L)	A (276 nm)	konc. [mg/L]	A (276 nm)
0,5035	0,0179	1,061	0,035
3,15	0,104	3,084	0,099
4,91	0,159	6,336	0,200
10,07	0,328	10,61	0,339
15,75	0,513	15,42	0,501
19,64	0,634	21,12	0,665
25,175	0,817	31,83	1,017
31,5	1,018	41,12	1,331
39,28	1,261	/	/

Preglednica XIII: Enačbe umeritvenih premic in kvadrati Pearsonovega koeficienta korelacije v simuliranem črevesnem mediju (A – absorbanca, c – koncentracija raztopine učinkovine [mg/L]).

Medij	Enačba umeritvene premice	Kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije [R^2]
fosfatni pufer pH 6,8	$A = 0,0321c + 0,0034$	1
fosfatni pufer pH 6,8+NaOH	$A = 0,0322c - 0,002$	0,9998

6.2 Merjenje sedimentacije neraztopljenе učinkovine v vzorcih

6.2.1 Preliminarni test merjenja sedimentacije učinkovine v vzorcu, zbranem med 20. in 40. minuto poskusa (T1)

V preglednici XIII so zbrani rezultati testa T1. Podana je masa raztopljenе učinkovine ob času odvzema vzorca (20 minut poskusa) in nato še mase celotne sproščene nesedimentirane učinkovine ob časih 0, 10, 20 in 30 min po odvzemu vzorca.

Preglednica XIII: Rezultati testa merjenja sedimentacije učinkovine v vzorcu zbranem med 20. in 40. min poskusa (T1a,b,c,d so paralele poskusa T1).

	T1a	T1b	T1c	T1d	povprečje
m(razt.uč.) [mg]	1,279	0,596	4,479	4,479	2,708
m(celot.nesed. uč.) 0min [mg]	13,783	12,763	12,676	14,373	13,399
m(celot.nesed. uč.) 10min [mg]	13,969	11,967	12,237	14,488	13,165
m(celot.nesed. uč.) 20min [mg]	13,723	11,245	12,210	13,814	12,748
m(celot.nesed. uč.) 30min [mg]	13,563	12,080	11,975	14,129	12,937
povpr. m(celotne nesed. uč) [mg]	13,760	12,014	12,274	14,201	/
SD [%]	0,168	0,621	0,292	0,298	/

6.2.2 Merjenje sedimentacije v vseh motnih vzorcih z uporabo 0,001 M HCl

V preglednici XIV so podani rezultati merjenja sedimentacije v vseh motnih vzorcih pri poskusu T2.

Preglednica XIV: Rezultati testa merjenja sedimentacije učinkovine v vseh motnih vzorcih pri testu T2 (T2a,b,c so paralele poskusa T2; SD- standardna deviacija).

čas odvzema	čas merjenja sedimentacije	m(nesed.uč.T2a) [mg]	m(nesed.uč.T2b) [mg]	m(nesed.uč.T2c) [mg]	povpr. masa nesed.. uč.[mg]	SD [%]
20	0	2,567	3,176	3,376	3,04	0,421
	10	2,601	3,337	3,408	3,116	0,447
	20	2,482	3,356	3,057	2,965	0,444
	30	2,454	3,279	2,927	2,887	0,414
40	0	13,783	15,365	14,373	14,507	0,799
	10	13,969	15,096	14,488	14,517	0,564
	20	13,723	14,694	13,814	14,077	0,536
	30	13,563	14,591	14,129	14,094	0,515
60	0	17,570	16,839	17,273	17,235	0,369
	10	17,640	16,812	17,142	17,198	0,417
	20	17,742	16,609	16,622	16,991	0,651
	30	17,482	16,613	16,372	16,822	0,584
80	0	15,829	14,776	14,001	14,869	0,917
	10	15,772	14,736	14,340	14,950	0,74
	20	15,764	14,534	13,881	14,726	0,956
	30	15,702	14,427	13,993	14,707	0,888
100	0	11,115	8,161	8,576	9,284	1,599
	10	11,460	8,159	8,468	9,362	1,823
	20	11,075	7,818	8,459	9,117	1,725
	30	10,977	7,738	8,428	9,048	1,706
120	0	4,227	3,275	3,912	3,925	0,564
	10	3,945	3,208	3,866	3,673	0,404
	20	3,890	3,032	3,641	3,521	0,441
	30	3,807	3,045	3,556	3,469	0,388
140	0	1,917	1,925	2,13	1,991	0,121
	10	1,840	1,98	2,13	1,983	0,145
	20	1,785	1,675	2,121	1,891	0,284
	30	1,632	1,612	2,161	1,802	0,312

6.3 TESTI SPROŠČANJA

6.3.1 Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje

V preglednicah od XV do XVIII so podani rezultati poskusov, s katerimi smo preverjali vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje natrijevega diklofenakata.

Preglednica XV: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata pri poskusu T3: simulirani želodčni medij s pH 1,05 (T3a,b sta paraleli poskusa T3, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sproščene uč. T3a	% sproščene uč. T3b	povpr. % sproščene uč. pri T3	SD [%]
0	0	0	0	0
20	0,087	0,039	0,063	0,034
40	0,283	0,344	0,313	0,043
60	0,552	0,670	0,611	0,083
80	0,868	1,195	1,032	0,232
100	1,143	1,515	1,329	0,263
120	1,404	1,658	1,531	0,180
140	1,831	2,132	1,981	0,213
160	2,611	2,619	2,615	0,006
180	6,814	5,469	6,142	0,951
200	15,575	13,916	14,746	1,173
220	26,206	22,640	24,423	2,521
240	35,894	31,212	33,553	3,310
260	44,407	38,361	41,384	4,275
280	51,112	44,324	47,718	4,799
300	56,797	49,577	53,187	5,106
320	61,313	53,965	57,639	5,195
340	65,373	57,673	61,523	5,445
360	68,572	60,267	64,419	5,873
380	71,107	63,158	67,132	5,621
400	73,619	65,717	69,668	5,587
420	75,902	67,950	71,926	5,623

Preglednica XVI: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata pri poskusih T4 do T7 in T10 (pH simuliranih želodčnih medijev: T4: 2,12; T5: 2,3; T6: 2,6; T7: 2,82; T10: 2,96).

čas [min]	% sprošč. uč. pri T4 (pH 2,12)	% sprošč. uč. pri T5(pH 2,3)	% sprošč. uč. pri T6(pH 2,6)	% sprošč. uč. pri T7 (pH 2,82)	% sprošč. uč. pri T10 (pH 2,96)
0	0	0	0	0	0
20	0,223	0,011	1,268	1,410	2,834
40	0,639	0,110	2,589	3,298	13,688
60	1,434	0,351	3,562	5,179	29,068
80	2,424	0,637	4,376	6,844	45,177
100	3,090	1,036	5,033	8,173	54,966
120	3,871	1,544	5,683	9,376	58,805
140	7,131	5,007	11,262	17,105	68,025
160	15,850	14,690	23,315	27,705	76,885
180	27,634	27,321	34,269	39,408	81,548
200	39,984	40,222	44,541	49,771	84,654
220	51,718	52,359	54,460	59,087	87,096
240	62,631	63,288	63,965	67,328	89,120
260	71,496	71,526	71,204	74,117	90,638
280	78,764	78,075	77,377	79,582	92,026
300	83,567	83,476	82,573	84,116	93,243
320	86,617	87,238	87,080	87,953	94,336
340	88,768	89,723	90,567	90,774	95,243
360	90,272	90,494	93,295	92,757	95,912
380	91,355	90,764	95,503	94,352	96,437
400	92,261	90,786	97,495	95,666	96,893
420	93,084	90,958	98,981	96,653	97,268

Preglednica XVII: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata pri poskusu T8: simulirani želodčni medij s pH 2,89 (T8a,b,c so paralele poskusa T8, SD – standardna deviacija).

čas [min]	% sproščene uč. pri T8a	% sproščene uč. pri T8b	% sproščene uč. pri T8c	povpr. % sprošč. uč. pri T8	SD [%g]
0	0	0	0	0	0
20	4,067	2,268	2,391	2,909	1,005
40	11,835	6,760	7,303	8,633	2,786
60	18,686	11,118	11,281	13,695	4,324
80	23,920	15,110	14,452	17,828	5,287
100	27,674	18,454	17,690	21,272	5,557
120	30,042	20,421	20,064	23,509	5,660
140	39,543	29,704	29,895	33,047	5,626
160	51,438	41,873	42,092	45,135	5,460
180	62,293	53,039	52,424	55,918	5,529
200	70,914	62,179	61,373	64,822	5,291
220	77,388	70,417	68,626	72,144	4,629
240	82,997	76,803	74,526	78,109	4,384
260	86,999	81,925	79,386	82,770	3,876
280	90,026	85,840	83,306	86,391	3,394
300	92,432	88,770	86,301	89,167	3,085
320	94,471	90,927	88,557	91,318	2,976
340	96,199	92,713	90,399	93,104	2,920
360	97,418	95,046	91,737	94,734	2,853
380	98,516	96,441	93,114	96,024	2,725
400	99,345	97,270	94,058	96,891	2,664
420	100,012	97,887	94,593	97,497	2,731

Preglednica XVIII: Odstotki sproščenega natrijevega diklofenakata pri poskusu T9: simulirani želodčni medij s pH 2,92 (T9a,b sta paraleli poskusa T9, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sproščene uč. pri T9a	% sproščene uč. pri T9b	povprečni % sproščene uč. pri T9	SD [%]
0	0	0	0	0
20	2,180	3,537	2,858	0,959
40	7,399	14,376	10,887	4,933
60	14,479	22,531	18,505	5,694
80	23,136	29,194	26,165	4,284
100	28,613	34,362	31,487	4,065
120	32,528	37,079	34,804	3,218
140	44,588	47,594	46,091	2,126
160	56,466	57,756	57,111	0,912
180	65,777	65,256	65,517	0,368
200	72,720	69,273	70,997	2,437
220	77,715	72,575	75,145	3,635
240	81,820	75,665	78,743	4,352
260	84,630	77,673	81,151	4,920
280	87,109	79,430	83,269	5,430
300	88,779	80,814	84,796	5,632
320	90,007	81,915	85,961	5,722
340	91,323	82,868	87,096	5,978
360	92,224	84,095	88,160	5,748
380	92,888	84,878	88,883	5,664
400	93,439	85,470	89,455	5,635
420	93,962	86,010	89,986	5,623

6.3.2 Vpliv časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje

6.3.2.1 Poskusi z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline

V preglednicah od XIX do XXIII so zbrani odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusih z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline in petimi različnimi časi dovajanja sveže kisline v delovno čašo (10, 30, 60, 120 in 200 min).

Preglednica XIX: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T11: čas v kislem mediju 10 min (T11a,b,c so paralele poskusa T11, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sproščene uč. pri T11a	% sproščene uč. pri T11b	% sproščene uč. pri T11c	povpr.% sproščene uč. pri T11	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,175	0,201	0,186	0,187	0,013
40	3,402	3,078	2,882	3,121	0,263
60	12,878	10,418	10,062	11,119	1,533
80	23,763	20,019	19,515	21,099	2,321
100	34,492	29,926	29,490	31,303	2,770
120	44,782	39,621	39,229	41,211	3,099
140	54,113	48,616	48,397	50,375	3,238
160	62,284	56,778	56,422	58,495	3,287
180	70,243	63,621	64,186	66,017	3,671
200	76,334	69,779	70,708	72,274	3,547
220	79,949	75,059	76,509	77,172	2,511
240	84,759	79,296	80,546	81,534	2,862
260	88,804	83,744	85,428	85,992	2,577
280	92,021	87,470	88,745	89,412	2,347
300	94,942	90,501	91,751	92,398	2,290
320	96,969	92,744	93,714	94,476	2,213
340	98,549	94,763	96,198	96,503	1,911
360	99,790	96,319	97,503	97,870	1,764

Preglednica XX: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T12: čas v kislem mediju 30 min (T12a-e so paralele poskusa T12, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč. pri T12a	% sprošč. uč. pri T12b	% sprošč. uč. pri T12c	% sprošč. uč. pri T12d	% sprošč. uč. pri T12e	povp. % sprošč. uč. pri T12	SD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0,219	0,261	0,121	0,173	0,128	0,180	0,060
40	0,492	0,547	0,349	0,547	0,472	0,481	0,081
60	3,176	4,111	3,775	6,965	3,795	4,364	1,493
80	7,370	8,925	10,957	16,325	11,456	11,007	3,393
100	13,113	14,200	20,533	25,581	21,324	18,950	5,214
120	25,358	24,903	31,552	35,361	31,776	29,790	4,517
140	32,527	31,346	43,005	45,880	42,349	39,021	6,616
160	42,912	41,398	53,742	55,560	52,147	49,152	6,522
180	52,297	50,655	63,086	64,206	60,859	58,221	6,301
200	60,667	59,077	70,663	70,707	68,014	65,826	5,572
220	68,669	66,976	76,947	76,573	73,804	72,594	4,561
240	75,073	73,295	82,076	81,324	78,617	78,077	3,832
260	80,483	78,677	86,183	85,358	82,873	82,715	3,175
280	84,860	83,074	89,553	88,968	86,019	86,495	2,742
300	89,175	87,049	92,297	91,776	88,755	89,810	2,190
320	92,513	90,718	94,070	93,653	91,033	92,397	1,506
340	95,343	93,846	95,514	94,682	92,807	94,438	1,123
360	97,581	96,301	96,527	95,467	94,188	96,013	1,268
380	99,802	98,202	97,360	96,022	95,276	97,332	1,789
400	101,219	99,727	97,932	97,575	96,181	98,527	1,966
420	102,790	100,988	98,297	98,019	96,947	99,408	2,406

Preglednica XXI: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T13: čas v kislem mediju 60 min (T13a,b,c so paralele poskusa T13, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč. pri T13a	% sprošč. uč. pri T13b	% sprošč. uč. pri T13c	povpr.% sprošč.uč.pri T13	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,175	0,208	0,218	0,192	0,024
40	0,449	0,605	0,587	0,527	0,110
60	0,828	1,046	1,089	0,937	0,154
80	2,586	2,875	3,189	2,730	0,205
100	9,220	9,211	9,710	9,216	0,006
120	19,527	18,962	19,226	19,244	0,400
140	31,854	30,572	31,512	31,213	0,906
160	43,881	42,275	42,978	43,078	1,135
180	54,932	52,838	53,884	53,885	1,481
200	64,364	61,739	62,915	63,052	1,856
220	72,064	68,977	70,319	70,521	2,183
240	78,368	74,812	75,847	76,590	2,514
260	83,729	80,006	80,866	81,867	2,633
280	88,058	84,423	85,450	86,240	2,570
300	91,602	88,149	89,151	89,875	2,441
320	94,139	91,092	92,642	92,616	2,154
340	96,216	93,323	95,040	94,769	2,045
360	97,753	95,081	96,592	96,417	1,889
380	99,060	96,475	97,959	97,767	1,827
400	99,933	97,565	99,238	98,749	1,674
420	100,712	98,359	100,355	99,536	1,664

Preglednica XXII: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T14: čas v kislem mediju 120 min (T14a-e so paralele poskusa T14, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč. pri T14a	% sprošč. uč. pri T14b	% sprošč. uč. pri T14c	% sprošč. uč. pri T14d	% sprošč. uč. pri T14e	povpr. % sprošč. uč.	SD [%]
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0,212	0,202	0,177	0,276	0,162	0,206	0,044
40	1,023	0,475	0,551	1,177	0,597	0,765	0,314
60	3,121	0,905	1,169	2,169	1,087	1,690	0,939
80	5,692	1,410	1,969	2,926	1,625	2,724	1,757
100	7,635	1,974	2,672	3,710	2,238	3,646	2,326
120	9,457	2,572	3,367	4,404	2,870	4,534	2,839
140	14,618	13,051	4,381	5,615	5,802	8,693	4,757
160	21,555	18,330	11,822	12,856	13,373	15,587	4,174
180	28,312	26,556	22,670	22,619	23,928	24,817	2,523
200	45,230	37,986	36,285	45,664	35,893	40,211	4,846
220	53,670	50,599	49,836	58,121	47,182	51,881	4,185
240	67,230	60,643	61,666	68,518	57,048	63,021	4,772
260	73,460	68,029	71,070	77,855	65,371	71,157	4,833
280	80,450	74,968	78,048	84,714	72,304	78,097	4,813
300	87,140	80,782	84,193	90,628	78,055	84,159	4,985
320	92,460	85,860	88,959	95,477	83,156	89,182	4,944
340	97,474	90,854	92,542	99,448	87,275	93,519	4,946
360	99,803	98,083	95,018	102,659	90,856	97,284	4,537
380	101,388	101,149	96,852	105,548	93,655	99,718	4,577
400	102,724	103,391	98,070	107,494	96,103	101,557	4,524
420	102,855	105,152	98,986	108,989	97,842	102,765	4,554

Preglednica XXIII: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T15: čas v kislem mediju 200 min (T15a,b,c so paralele poskusa T15, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T15a	% sprošč.uč.pri T15b	% sprošč.uč.pri T15c	povpr.% sprošč.uč.pri T15	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,191	0,286	0,014	0,164	0,138
40	0,574	0,631	0,324	0,510	0,163
60	1,013	0,997	0,720	0,910	0,165
80	1,547	1,426	1,105	1,359	0,228
100	2,260	2,117	1,515	1,964	0,395
120	3,244	2,821	2,212	2,759	0,519
140	4,041	3,636	2,926	3,534	0,564
160	4,779	4,295	3,778	4,284	0,501
180	5,517	5,059	4,440	5,005	0,541
200	6,372	5,729	5,224	5,775	0,576
220	8,907	8,486	8,565	8,653	0,223
240	17,925	17,402	17,882	17,736	0,290
260	29,857	29,704	29,783	29,781	0,077
280	43,394	42,402	43,335	43,044	0,557
300	55,657	53,441	54,379	54,492	1,112
320	65,848	63,220	64,280	64,449	1,322
340	73,208	71,610	72,863	72,561	0,841
360	79,998	78,148	79,360	79,169	0,940
380	85,104	83,603	84,640	84,449	0,768
400	89,494	88,132	88,690	88,772	0,685
420	93,075	91,883	92,168	92,375	0,623
440	95,363	94,604	94,789	94,918	0,396
460	96,657	96,338	96,675	96,557	0,190
480	97,671	97,476	97,565	97,571	0,097

6.3.2.2 Poskusi z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline

6.3.2.2.1 Celotna sproščena učinkovina v vzorcu

V preglednicah od XXIV do XXVIII so podani odstotki celotne sproščene učinkovine v vzorcu pri poskusih z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline za želodčni medij.

Preglednica XXIV: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T16: čas v kislem mediju 10 min (T16a,b,c so paralele poskusa T16, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč.pri T16a	% sprošč. uč.pri T16b	% sprošč. uč.pri T16c	povpr. % sprošč. uč. pri T16	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	3,583	4,459	3,372	3,805	0,576
40	19,223	21,328	15,597	18,716	2,899
60	30,714	33,639	28,249	30,867	2,698
80	41,782	44,546	39,595	41,974	2,481
100	52,384	53,592	50,312	52,096	1,659
120	61,764	61,825	59,008	60,866	1,609
140	70,295	71,557	67,592	69,815	2,026
160	77,277	78,127	74,139	76,514	2,100
180	82,664	83,444	79,176	81,761	2,273
200	86,440	87,382	83,826	85,883	1,842
220	89,334	90,326	87,570	89,077	1,396
240	92,649	93,729	90,650	92,343	1,562
260	95,255	96,422	93,255	94,977	1,602
280	97,601	98,842	95,585	97,343	1,644
300	99,449	100,845	97,257	99,184	1,808
320	101,133	102,660	98,648	100,814	2,025
340	102,471	104,226	99,991	102,229	2,128
360	103,619	105,553	101,128	103,433	2,218

Preglednica XXV: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T17: čas v kislem mediju 30 min (T17a,b,c so paralele poskusa T17, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč.pri T17a	% sprošč. uč.pri T17b	% sprošč. uč.pri T17c	povpr. % sprošč. uč.pri T17	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	7,234	6,874	6,786	6,965	0,238
40	25,844	25,610	23,753	25,069	1,145
60	41,876	41,645	39,166	40,896	1,503
80	51,983	51,753	49,430	51,055	1,412
100	59,349	59,118	57,276	58,581	1,136
120	65,961	65,640	64,762	65,454	0,621
140	71,310	71,290	70,346	70,982	0,551
160	75,834	76,550	75,581	75,988	0,503
180	80,140	81,236	80,694	80,690	0,548
200	83,694	85,134	84,518	84,449	0,722
220	87,309	88,332	87,799	87,813	0,512
240	90,116	91,173	90,448	90,579	0,540
260	92,010	93,533	92,841	92,795	0,762
280	93,567	95,464	94,978	94,669	0,985
300	94,963	97,079	96,515	96,186	1,096
320	96,200	98,384	97,839	97,474	1,136
340	97,205	99,191	99,099	98,498	1,121
360	98,179	99,701	100,226	99,368	1,063
380	98,941	100,753	101,166	100,287	1,183
400	99,596	101,721	102,010	101,109	1,318
420	100,187	102,598	102,705	101,830	1,424

Preglednica XXVI: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T18: čas v kislem mediju 60 min (T18a,b,c so paralele poskusa T18, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T18a	% sprošč.uč.pri T18b	% sprošč.uč.pri T18c	povpr.% sprošč.uč.pri T18	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	2,799	2,791	4,538	3,376	1,007
40	15,167	13,791	15,511	14,823	0,910
60	30,888	28,815	27,867	29,190	1,545
80	48,328	46,446	44,307	46,360	2,012
100	60,948	59,095	58,282	59,442	1,366
120	68,066	66,399	65,910	66,791	1,131
140	73,127	71,452	70,625	71,735	1,275
160	77,358	75,799	74,604	75,920	1,381
180	80,987	79,765	77,950	79,567	1,528
200	83,936	83,191	81,664	82,930	1,158
220	86,505	86,359	85,391	86,085	0,605
240	88,540	88,915	88,062	88,506	0,428
260	90,095	90,918	89,761	90,258	0,595
280	91,803	92,629	91,125	91,852	0,753
300	92,860	93,961	92,280	93,034	0,854
320	93,799	95,112	93,212	94,041	0,973
340	94,605	96,097	94,129	94,944	1,027
360	95,322	96,971	94,877	95,723	1,103
380	95,928	97,727	95,623	96,426	1,137
400	96,590	98,398	96,251	97,080	1,154
420	97,040	98,991	96,867	97,633	1,180

Preglednica XXVII: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T19: čas v kislem mediju 120 min (T19a,b,c so paralele poskusa T19, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T19a	% sprošč.uč.pri T19b	% sprošč.uč.pri T19c	povpr.% sprošč.uč.pri T19	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	2,961	0,692	2,849	2,167	1,279
40	14,482	12,263	14,283	13,676	1,228
60	29,672	28,601	28,209	28,827	0,757
80	44,992	43,767	43,270	44,010	0,886
100	54,346	54,424	54,255	54,342	0,084
120	57,782	58,690	58,462	58,311	0,473
140	66,673	68,134	68,500	67,769	0,967
160	74,547	75,960	76,451	75,653	0,989
180	80,016	81,098	80,639	80,584	0,543
200	83,052	84,153	83,450	83,552	0,557
220	85,213	86,444	85,851	85,836	0,616
240	86,798	88,486	87,947	87,744	0,862
260	88,377	90,265	89,707	89,450	0,970
280	89,717	91,751	91,094	90,854	1,038
300	90,735	92,675	92,121	91,844	0,999
320	91,511	93,395	93,035	92,647	1,000
340	92,114	94,174	93,819	93,369	1,101
360	92,642	94,902	94,507	94,017	1,207
380	93,063	95,417	95,064	94,515	1,270
400	93,439	95,891	95,531	94,954	1,324
420	93,761	96,303	95,950	95,338	1,377

Preglednica XXVIII: : Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T20: čas v kislem mediju 200 min (T20a,b,c so paralele poskusa T20, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč. pri T20a	% sprošč.uč. pri T20b	% sprošč.uč. pri T20c	povpr.% sprošč.uč.pri T20	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	5,948	4,681	4,681	5,103	0,732
40	22,050	19,437	19,437	20,308	1,509
60	40,277	36,750	36,750	37,925	2,037
80	55,614	52,687	52,687	53,663	1,690
100	63,324	61,308	61,308	61,980	1,164
120	66,313	64,479	64,479	65,090	1,059
140	67,770	66,163	66,163	66,699	0,928
160	68,749	67,124	67,124	67,666	0,938
180	69,871	68,293	68,293	68,819	0,911
200	70,541	69,019	69,019	69,526	0,878
220	76,932	76,174	76,174	76,427	0,438
240	83,287	82,545	82,545	82,793	0,428
260	86,927	86,511	86,511	86,650	0,240
280	89,553	89,107	89,107	89,256	0,257
300	91,508	91,174	91,174	91,285	0,193
320	92,913	92,717	92,717	92,782	0,113
340	94,122	94,077	94,077	94,092	0,026
360	95,152	95,253	95,253	95,219	0,058
380	95,939	96,227	96,227	96,131	0,166
400	96,597	97,078	97,078	96,918	0,278
420	97,125	97,705	97,705	97,512	0,335
440	97,595	98,240	98,240	98,025	0,372
460	97,990	98,702	98,702	98,465	0,411
480	98,304	99,089	99,089	98,827	0,453

6.3.2.2.2 Sproščena učinkovina, določena v vzorcu, v raztopljeni obliki

V preglednicah od XXIX do XXXIII so podani odstotki sproščene učinkovine, ki je bila raztopljena v vzorcu. Pri poskusih smo za simulirani želodčni medij uporabili 0,001 M HCl.

Preglednica XXIX: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T16: čas v kislem mediju 10 min (T16a,b,c so paralele poskusa T16, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T16a	% razt.sprošč.uč.pri T16b	% razt.sprošč.uč.pri T16c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T16	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	1,486	2,528	1,069	1,694	0,752
40	13,796	18,528	13,267	15,197	2,897
60	24,964	29,770	25,250	26,661	2,696
80	35,734	40,019	36,412	37,388	2,303
100	46,114	48,951	46,873	47,313	1,469
120	54,816	56,673	55,368	55,619	0,953
140	62,720	64,466	62,709	63,298	1,011
160	69,212	70,862	69,221	69,765	0,950
180	74,598	76,119	74,138	74,952	1,037
200	78,411	80,020	78,770	79,067	0,844
220	81,331	82,827	82,456	82,205	0,779
240	84,348	86,107	85,509	85,321	0,894
260	86,888	88,835	88,071	87,931	0,981
280	89,134	91,277	90,358	90,256	1,076
300	91,025	93,333	92,183	92,180	1,154
320	92,617	95,164	93,605	93,795	1,284
340	93,905	96,737	94,903	95,182	1,436
360	95,050	98,086	96,006	96,381	1,552

Preglednica XXX: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T17: čas v kislem mediju 30 min (T17a,b,c so paralele poskusa T17, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T17a	% razt.sprošč.uč.pri T17b	% razt.sprošč.uč.pri T17c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T17	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,693	0,581	0,234	0,503	0,239
40	15,223	14,644	9,036	12,968	3,417
60	31,569	28,477	24,677	28,241	3,452
80	41,361	37,470	34,926	37,919	3,241
100	48,596	44,212	42,666	45,158	3,076
120	54,496	50,256	50,007	51,586	2,523
140	59,819	55,643	55,614	57,025	2,419
160	63,919	60,819	60,757	61,831	1,808
180	67,960	65,280	65,819	66,353	1,417
200	71,582	69,141	69,755	70,159	1,270
220	74,372	72,075	72,925	73,124	1,161
240	76,649	74,932	75,589	75,723	0,866
260	78,420	77,297	77,935	77,884	0,563
280	79,915	79,229	79,678	79,608	0,349
300	81,152	80,846	81,362	81,120	0,260
320	82,252	82,300	82,686	82,413	0,238
340	83,249	83,642	83,910	83,600	0,332
360	84,180	84,909	85,006	84,698	0,452
380	84,951	85,961	85,931	85,615	0,575
400	85,663	86,929	86,761	86,451	0,688
420	86,236	87,807	87,445	87,022	1,111

Preglednica XXXI: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T18: čas v kislem mediju 60 min (T18a,b,c so paralele poskusa T18, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T18a	% razt.sprošč.uč.pri T18b	% razt.sprošč.uč.pri T18c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T18	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,137	0,116	0,088	0,114	0,024
40	3,509	3,134	5,612	4,085	1,336
60	10,377	8,378	11,688	10,148	1,667
80	27,433	25,881	27,375	26,896	0,880
100	40,022	38,350	39,427	39,266	0,848
120	46,862	45,476	46,629	46,322	0,742
140	51,787	50,333	51,401	51,174	0,753
160	55,983	54,694	55,319	55,332	0,645
180	59,748	58,636	58,717	59,033	0,620
200	62,836	62,044	61,581	62,154	0,635
220	65,341	65,037	63,983	64,787	0,713
240	67,327	67,523	65,994	66,948	0,832
260	68,851	69,498	67,629	68,659	0,949
280	70,418	71,132	68,995	70,182	1,088
300	71,480	72,506	70,548	71,511	0,979
320	72,377	73,631	71,471	72,493	1,084
340	73,154	74,590	72,398	73,381	1,114
360	73,842	75,455	73,130	74,142	1,191
380	74,422	76,197	73,863	74,827	1,219
400	74,917	76,867	74,486	75,423	1,269
420	75,347	77,457	75,095	76,402	1,492

Preglednica XXXIII: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T19: čas v kislem mediju 120 min (T19a,b,c so paralele poskusa T19, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T19a	% razt.sprošč.uč.pri T19b	% razt.sprošč.uč.pri T19c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T19	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,291	0,052	0,203	0,182	0,120
40	4,796	4,567	3,508	4,290	0,687
60	9,987	10,226	8,716	9,643	0,812
80	13,660	14,268	13,254	13,727	0,510
100	14,269	15,301	14,332	14,634	0,579
120	14,667	15,700	14,667	15,011	0,596
140	23,303	24,108	24,628	24,013	0,667
160	30,699	31,680	32,354	31,578	0,833
180	36,448	37,130	36,523	36,700	0,374
200	39,251	40,165	39,321	39,579	0,509
220	41,394	42,380	41,721	41,832	0,502
240	43,062	44,357	43,770	43,730	0,648
260	44,886	46,198	45,629	45,571	0,658
280	46,190	47,686	47,011	46,962	0,749
300	47,190	48,878	48,105	48,058	0,845
320	47,950	49,821	49,020	48,931	0,939
340	48,540	50,564	49,797	49,633	1,022
360	49,064	51,224	50,469	50,252	1,096
380	49,495	51,746	50,995	50,745	1,146
400	49,857	52,227	51,458	51,181	1,209
420	50,177	52,633	51,866	51,405	1,736

Preglednica XXXIII: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T20: čas v kislem mediju 200 min (T20a,b,c so paralele poskusa T20, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T20a	% razt.sprošč.uč.pri T20b	% razt.sprošč.uč.pri T20c	povpr.% razt.sprošč.uč pri T20	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,501	0,336	0,336	0,391	0,095
40	7,058	6,233	6,233	6,508	0,476
60	15,176	14,355	14,355	14,629	0,474
80	19,163	18,680	18,680	18,841	0,279
100	19,509	19,124	19,124	19,252	0,222
120	19,865	19,505	19,505	19,625	0,208
140	20,114	19,860	19,860	19,945	0,147
160	20,361	20,258	20,258	20,292	0,059
180	20,675	20,728	20,728	20,710	0,030
200	20,951	21,300	21,300	21,184	0,202
220	27,670	28,498	28,498	28,222	0,478
240	33,902	34,908	34,908	34,572	0,581
260	37,489	38,780	38,780	38,350	0,745
280	40,612	41,551	41,551	41,238	0,542
300	42,518	43,617	43,617	43,251	0,635
320	43,943	45,223	45,223	44,796	0,739
340	45,148	46,570	46,570	46,096	0,821
360	46,124	47,679	47,679	47,160	0,898
380	46,900	48,638	48,638	48,058	1,003
400	47,513	49,421	49,421	48,785	1,102
420	48,016	50,049	50,049	49,371	1,174
440	48,478	50,613	50,613	49,901	1,233
460	48,852	51,055	51,055	50,321	1,272
480	49,150	51,419	51,419	50,663	1,310

6.3.2.3 Poskusi z uporabo 0,0013 M klorovodikove kisline

6.3.2.3.1 Celotna sproščena učinkovina v vzorcu

V preglednicah od XXXIV do XXXVIII so podani odstotki celotne sproščene učinkovine v vzorcu pri poskusih z uporabo 0,0013 M klorovodikove kisline za želodčni medij.

Preglednica XXXIV: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T21: čas v kislem mediju 10 min (T21a,b,c so paralele poskusa T21, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T21a	% sprošč.uč.pri T21b	% sprošč.uč.pri T21c	povpr.% sprošč.uč.pri T21	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	3,959	4,161	4,065	4,062	0,101
40	17,296	17,266	17,316	17,292	0,025
60	29,450	28,267	29,271	28,996	0,638
80	40,339	38,988	39,347	39,558	0,700
100	49,779	48,292	48,677	48,916	0,772
120	58,108	56,558	57,476	57,381	0,779
140	65,622	64,106	65,618	65,115	0,874
160	71,811	70,581	71,997	71,463	0,769
180	77,109	76,330	77,539	76,993	0,613
200	81,517	80,933	82,142	81,531	0,605
220	85,435	84,886	85,807	85,376	0,463
240	88,553	88,287	88,678	88,506	0,200
260	91,034	90,953	90,954	90,980	0,047
280	93,041	93,156	92,776	92,991	0,195
300	94,746	95,076	94,376	94,733	0,350
320	96,221	96,750	95,758	96,243	0,496
340	97,443	98,164	96,850	97,486	0,658
360	98,742	99,491	98,217	98,817	0,640

Preglednica XXXV: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T22: čas v kislem mediju 30 min (T22a,b,c so paralele poskusa T22, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T22a	% sprošč.uč.pri T22b	% sprošč.uč.pri T22c	povpr.% sprošč.uč.pri T22	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	4,137	4,917	5,010	4,688	0,480
40	13,229	16,383	16,074	15,229	1,739
60	29,758	34,680	33,423	32,620	2,557
80	42,348	47,148	46,655	45,384	2,641
100	52,637	56,040	55,525	54,734	1,834
120	61,238	63,350	63,301	62,630	1,206
140	67,996	69,517	69,301	68,938	0,823
160	74,580	75,072	74,991	74,881	0,264
180	80,403	79,972	79,711	80,029	0,350
200	85,252	84,040	83,475	84,256	0,908
220	89,475	87,395	87,190	88,020	1,265
240	92,701	90,044	89,860	90,869	1,590
260	94,882	92,046	91,662	92,863	1,759
280	96,892	93,785	93,259	94,645	1,963
300	98,380	95,267	94,623	96,090	2,009
320	99,749	96,503	95,900	97,384	2,070
340	100,777	97,560	96,789	98,375	2,116
360	101,630	98,473	97,670	99,258	2,093
380	102,322	99,176	98,277	99,925	2,124
400	102,932	99,753	98,804	100,496	2,162
420	103,410	100,264	99,237	100,971	2,174

Preglednica XXXVI: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T23: čas v kislem mediju 60 min (T23a,b,c so paralele poskusa T23, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč. uč. pri T23a	% sprošč. uč. pri T23b	% sprošč. uč. pri T23c	povp. % sprošč. uč. pri T23	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	4,257	1,640	1,928	2,608	1,435
40	14,044	11,391	10,587	12,007	1,809
60	22,894	20,351	22,301	21,849	1,330
80	39,367	31,630	37,928	36,308	4,115
100	52,854	45,558	52,177	50,196	4,031
120	61,294	56,917	61,450	59,887	2,574
140	67,116	63,438	66,939	65,831	2,074
160	71,795	68,581	71,204	70,527	1,711
180	75,829	73,438	74,693	74,653	1,196
200	79,393	77,339	77,591	78,108	1,120
220	82,297	79,873	80,229	80,800	1,309
240	84,540	82,072	82,601	83,071	1,300
260	86,354	85,278	84,680	85,437	0,849
280	87,865	87,626	86,568	87,353	0,691
300	89,135	89,614	88,056	88,935	0,798
320	90,200	91,184	89,276	90,220	0,954
340	91,067	92,460	90,148	91,225	1,164
360	91,999	93,517	90,871	92,129	1,328
380	92,671	94,445	91,534	92,883	1,467
400	93,276	95,217	92,073	93,522	1,586
420	93,800	95,825	92,552	94,059	1,652

Preglednica XXXVII: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T24: čas v kislem mediju 120 min (T24a,b,c so paralele poskusa T24, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sproščene uč. pri T24a	% sproščene uč. pri T24b	% sproščene uč. pri T24c	povp. % sprošč. uč. pri T24	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	1,886	2,268	2,553	2,236	0,334
40	6,551	6,760	6,859	6,723	0,158
60	13,402	11,118	11,301	11,940	1,269
80	18,636	15,110	15,286	16,344	1,987
100	22,389	18,454	18,524	19,789	2,252
120	24,757	20,421	20,898	22,025	2,378
140	34,258	29,704	30,729	31,564	2,389
160	46,154	41,873	42,926	43,651	2,230
180	57,008	53,039	53,258	54,435	2,231
200	65,630	62,179	62,207	63,339	1,984
220	72,104	70,417	69,460	70,660	1,338
240	77,713	76,803	75,360	76,625	1,186
260	81,715	81,925	80,220	81,287	0,929
280	84,742	85,840	84,140	84,907	0,862
300	87,147	88,770	87,135	87,684	0,940
320	89,186	90,927	89,391	89,835	0,951
340	90,914	92,713	91,233	91,620	0,960
360	92,133	95,046	92,571	93,250	1,571
380	93,232	96,441	93,948	94,540	1,685
400	94,061	97,270	94,892	95,408	1,666
420	94,727	97,887	95,426	96,014	1,659

Preglednica XXXVIII: Odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusu T25: čas v kislem mediju 200 min (T25a,b,c so paralele poskusa T25, SD- standardna deviacija).

čas [min]	% sprošč.uč.pri T25a	% sprošč.uč.pri T25b	% sprošč.uč.pri T25c	povpr.% sprošč-uč.pri T25	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,825617	1,62321	1,455679012	1,3	0,421
40	3,886235	5,29185	4,527283951	4,57	0,704
60	7,818827	8,79037	8,574197531	8,39	0,51
80	11,19772	11,5251	11,96679012	11,6	0,386
100	13,20648	13,0647	13,82851852	13,4	0,406
120	14,6787	14,4696	15,70259259	15	0,66
140	16,03747	15,8877	17,15691358	16,4	0,694
160	18,04142	16,6691	18,50950617	17,7	0,957
180	19,34759	17,3188	19,13666667	18,6	1,115
200	20,5711	18,0251	19,66506173	19,4	1,29
220	31,4788	28,9993	30,79549651	30,4	1,281
240	45,67135	42,4105	45,15574496	44,4	1,753
260	57,56153	53,5224	56,09984434	55,7	2,045
280	66,72762	62,0085	64,18642819	64,3	2,362
300	73,92116	68,8849	71,52804309	71,4	2,519
320	80,19743	75,2615	77,72680086	77,7	2,468
340	85,4106	80,709	81,17773254	82,4	2,59
360	89,55346	85,1491	83,55785676	86,1	3,106
380	90,45532	86,0716	85,76158347	87,4	2,625
400	91,24817	86,8646	87,45350893	88,5	2,379
420	91,88124	87,5876	88,55701204	89,3	2,252
440	92,21286	88,1702	89,46901204	90	2,064
460	92,46963	88,5182	90,21929527	90,4	1,982
480	92,72802	88,8163	90,85159341	90,8	1,956

6.3.2.3.2 Sproščena učinkovina, določena v vzorcu, v raztopljeni obliki

V preglednicah od XXXIX do XLIII so podani odstotki sproščene učinkovine, ki je bila raztopljena v vzorcu. Pri poskusih smo za simulirani želodčni medij uporabili 0,0013 M HCl.

Preglednica XXXVII: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T21: čas v kislem mediju 10 min (T21a,b,c so paralele poskusa T21, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T21a	% razt.sprošč.uč.pri T21b	% razt.sprošč.uč.pri T21c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T21	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,829	1,488	2,391	1,569	0,784
40	14,453	14,631	15,642	14,908	0,641
60	26,516	25,307	27,236	26,353	0,975
80	37,482	35,370	37,644	36,832	1,269
100	47,239	44,889	46,833	46,321	1,256
120	55,531	53,406	55,635	54,857	1,258
140	62,941	60,900	62,825	62,222	1,147
160	69,172	67,376	69,021	68,523	0,996
180	74,316	71,790	74,350	73,485	1,468
200	78,685	76,388	78,936	78,003	1,404
220	82,403	80,229	82,398	81,677	1,254
240	85,424	83,629	85,080	84,711	0,953
260	87,873	86,274	87,230	87,126	0,805
280	89,870	88,426	89,031	89,109	0,725
300	91,570	90,325	90,599	90,831	0,654
320	92,921	92,001	91,953	92,292	0,546
340	94,048	93,407	93,035	93,497	0,513
360	95,343	94,714	93,928	94,662	0,709

Preglednica XL: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T22: čas v kislem mediju 30 min (T22a,b,c so paralele poskusa T22, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T22a	% razt.sprošč.uč.pri T22b	% razt.sprošč.uč.pri T22c	povpr.% razt.sprošč.uč. pri T22	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,047	0,047	0,047	0,047	0,000
40	4,336	5,909	5,316	5,187	0,794
60	20,414	23,991	22,186	22,197	1,788
80	32,566	36,130	34,782	34,493	1,800
100	42,472	44,889	43,515	43,625	1,212
120	50,931	51,952	51,142	51,342	0,539
140	57,427	58,182	57,242	57,617	0,498
160	63,883	63,624	62,856	63,454	0,534
180	69,753	68,466	67,403	68,541	1,177
200	74,528	72,461	71,217	72,736	1,673
220	78,630	75,725	74,906	76,420	1,957
240	81,933	78,346	77,589	79,289	2,320
260	84,385	80,281	79,368	81,345	2,672
280	86,342	81,951	80,981	83,091	2,856
300	88,005	83,407	82,322	84,578	3,017
320	89,353	84,712	83,627	85,897	3,042
340	90,379	85,752	84,494	86,875	3,099
360	91,226	86,652	85,301	87,726	3,105
380	91,921	87,369	85,902	88,397	3,138
400	92,474	87,943	86,453	88,957	3,136
420	92,843	88,446	86,891	89,393	3,087

Preglednica XLI: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T23: čas v kislem mediju 60 min (T23a,b,c so paralele poskusa T23, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T23a	% razt.sprošč.uč.pri T23b	% razt.sprošč.uč.pri T23c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T23	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,047	0,047	0,221	0,105	0,100
40	2,321	1,427	1,594	1,781	0,476
60	4,147	3,684	4,073	3,968	0,249
80	18,809	14,144	19,541	17,498	2,928
100	31,967	27,960	33,628	31,185	2,914
120	39,985	39,118	42,234	40,446	1,608
140	45,846	45,504	47,426	46,258	1,026
160	50,513	50,622	51,465	50,866	0,521
180	54,470	55,292	54,932	54,898	0,412
200	57,961	59,069	57,831	58,287	0,680
220	60,754	61,665	60,438	60,952	0,637
240	63,045	63,914	62,686	63,215	0,631
260	64,914	67,206	64,739	65,620	1,377
280	66,446	69,268	66,562	67,425	1,597
300	67,689	71,169	68,026	68,961	1,920
320	68,729	72,735	69,178	70,214	2,194
340	69,625	74,002	69,981	71,202	2,431
360	70,437	75,037	70,691	72,055	2,585
380	71,103	75,958	71,350	72,804	2,735
400	71,696	76,725	71,876	73,433	2,853
420	72,215	77,317	72,356	73,963	2,906

Preglednica XLII: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T24: čas v kislem mediju 120 min (T24a,b,c so paralele poskusa T24, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T24a	% razt.sprošč.uč.pri T24b	% razt.sprošč.uč.pri T24c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T24	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,266	0,156	0,092	0,171	0,088
40	0,669	0,261	0,254	0,395	0,238
60	4,042	0,368	0,400	1,603	2,112
80	4,284	0,640	0,547	1,824	2,131
100	4,573	1,239	0,635	2,149	2,121
120	4,765	1,293	0,730	2,263	2,185
140	14,293	10,393	10,744	11,810	2,158
160	26,070	22,196	22,866	23,711	2,070
180	36,860	33,268	33,785	34,638	1,942
200	45,384	42,250	42,736	43,457	1,687
220	51,833	50,088	50,326	50,749	0,946
240	62,064	56,314	56,329	58,236	3,316
260	67,430	61,056	61,106	63,197	3,666
280	70,448	64,900	64,945	66,765	3,190
300	72,778	67,694	67,956	69,476	2,863
320	74,882	69,825	70,033	71,580	2,862
340	76,591	71,575	71,804	73,323	2,832
360	77,935	72,861	73,336	74,711	2,803
380	78,977	74,071	74,705	75,918	2,669
400	79,815	74,858	75,632	76,768	2,667
420	80,453	75,445	76,161	77,353	2,709

Preglednica XLIII: Odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusu T25: čas v kislem mediju 200 min (T25a,b,c so paralele poskusa T25, SD-standardna deviacija).

čas [min]	% razt.sprošč.uč.pri T25a	% razt.sprošč.uč.pri T25b	% razt.sprošč.uč.pri T25c	povpr.% razt.sprošč.uč.pri T25	SD [%]
0	0	0	0	0	0
20	0,047	0,047	0,124	0,073	0,044
40	0,094	0,094	0,342	0,177	0,143
60	0,155	0,141	0,603	0,300	0,263
80	0,202	0,188	0,834	0,408	0,369
100	0,249	0,235	1,103	0,529	0,497
120	0,339	0,281	1,363	0,661	0,609
140	0,386	0,328	1,597	0,771	0,716
160	0,433	0,375	1,828	0,879	0,823
180	0,480	0,422	2,018	0,973	0,905
200	0,527	0,469	2,206	1,067	0,986
220	10,347	10,223	11,779	10,783	0,865
240	24,162	22,261	25,405	23,942	1,583
260	35,893	33,158	36,311	35,121	1,713
280	44,731	41,422	44,249	43,467	1,788
300	52,256	48,639	51,467	50,787	1,902
320	58,527	54,925	57,541	56,998	1,861
340	63,652	60,281	60,764	61,565	1,823
360	67,751	64,392	63,094	65,079	2,403
380	68,623	65,173	65,293	66,363	1,959
400	69,366	65,928	66,947	67,414	1,766
420	69,995	66,482	68,059	68,178	1,759
440	70,318	67,051	68,958	68,775	1,641
460	70,571	67,359	69,705	69,212	1,662
480	70,822	67,622	70,345	69,596	1,726

6.3.2.3 Računsko podaljšani povprečni profili sproščanja

V preglednicah od XLIV do XLVII so podani računsko podaljšani profili celotne in raztopljene sproščene učinkovine iz pelet. Poskuse s časom zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju 10 min smo podaljšali od 360 min dalje, tiste s časom zadrževanja 30,60 ali 120 min pa od 420 min dalje.

Preglednica XXXVIII: Povprečni odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusih z uporabo 0,01 M HCl (T11-čas zadrževanja 10 min, T12-30 min, T13-60 min, T14-120 min); pod odebeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

	povp.% celotne sproščene učinkovine.			
čas [min]	T11(10 min)	T12(30 min)	T13(60 min)	T14(120 min)
0	0	0	0	0
20	0,187	0,180	0,192	0,206
40	3,121	0,481	0,527	0,765
60	11,119	4,364	0,937	1,690
80	21,099	11,007	2,730	2,724
100	31,303	18,950	9,216	3,646
120	41,211	29,790	19,244	4,534
140	50,375	39,021	31,213	8,693
160	58,495	49,152	43,078	15,587
180	66,017	58,221	53,885	24,817
200	72,274	65,826	63,052	40,211
220	77,172	72,594	70,521	51,881
240	81,534	78,077	76,590	63,021
260	85,992	82,715	81,867	71,157
280	89,412	86,495	86,240	78,097
300	92,398	89,810	89,875	84,159
320	94,476	92,397	92,616	89,182
340	96,503	94,438	94,769	93,519
360	97,870	96,013	96,417	97,284
380	98,990	97,332	97,767	99,718
400	100,110	98,527	98,749	101,557
420	101,230	99,408	99,536	102,765
440	102,350	100,300	100,302	103,965
460	103,470	101,182	101,088	105,173
480	104,590	102,064	101,874	106,381

Preglednica XLV: Povprečni odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusih z uporabo 0,001 M HCl (T16-čas zadrževanja 10 min, T17-30 min, T18-60 min, T19-120 min); pod odebeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

	povp.% celotne sproščene učinkovine			
čas [min]	T16(10 min)	T17(30 min)	T18(60 min)	T19(120 min)
0	0	0	0	0
20	3,805	6,965	3,376	2,167
40	18,716	25,069	14,823	13,676
60	30,867	40,896	29,190	28,827
80	41,974	51,055	46,360	44,010
100	52,096	58,581	59,442	54,342
120	60,866	65,454	66,791	58,311
140	69,815	70,982	71,735	67,769
160	76,514	75,988	75,920	75,653
180	81,761	80,690	79,567	80,584
200	85,883	84,449	82,930	83,552
220	89,077	87,813	86,085	85,836
240	92,343	90,579	88,506	87,744
260	94,977	92,795	90,258	89,450
280	97,343	94,669	91,852	90,854
300	99,184	96,186	93,034	91,844
320	100,814	97,474	94,041	92,647
340	102,229	98,498	94,944	93,369
360	103,433	99,368	95,723	94,017
380	104,466	100,287	96,426	94,515
400	105,327	101,109	97,080	94,954
420	99,103	101,830	97,633	95,338
440	99,945	102,530	98,208	95,768
460	100,787	103,250	98,762	96,180
480	101,629	103,970	99,316	96,592

Preglednica XLVI: Povprečni odstotki celotne sproščene učinkovine pri poskusih z uporabo 0,0013 M HCl (T21-čas zadrževanja 10 min, T22-30 min, T23-60 min, T24-120 min); pod odebeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

čas [min]	povp.% celotne sproščene učinkovine			
	T21(10 min)	T22(30 min)	T23(60 min)	T24(120 min)
0	0	0	0	0
20	4,062	4,688	2,608	2,236
40	17,292	15,229	12,007	6,723
60	28,996	32,620	21,849	11,940
80	39,558	45,384	36,308	16,344
100	48,916	54,734	50,196	19,789
120	57,381	62,630	59,887	22,025
140	65,115	68,938	65,831	31,564
160	71,463	74,881	70,527	43,651
180	76,993	80,029	74,653	54,435
200	81,531	84,256	78,108	63,339
220	85,376	88,020	80,800	70,660
240	88,506	90,869	83,071	76,625
260	90,980	92,863	85,437	81,287
280	92,991	94,645	87,353	84,907
300	94,733	96,090	88,935	87,684
320	96,243	97,384	90,220	89,835
340	97,486	98,375	91,225	91,620
360	98,817	99,258	92,129	93,250
380	99,556	99,925	92,883	94,540
400	100,208	100,496	93,522	95,408
420	100,540	100,971	94,059	96,014
440	100,856	101,492	94,667	96,627
460	101,188	102,014	95,255	97,233
480	101,520	102,536	95,843	97,839

Preglednica XLVII: Povprečni odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri poskusih z uporabo 0,001 M in 0,0013 M HCl (T16&T21-čas zadrževanja 10 min, T17&T22-30 min, T18&T23-60 min, T19&T24-120 min); pod odebeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

	povp. % raztopljene sproščene učinkovine							
	0,001M HCl				0,0013M HCl			
čas [min]	T16 (10 min)	T17 (30 min)	T18 (60 min)	T19 (120 min)	T21 (10 min)	T22 (30 min)	T23 (60 min)	T24 (120 min)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1,694	0,503	0,114	0,182	1,569	0,047	0,105	0,171
40	15,197	12,968	4,085	4,290	14,908	5,187	1,781	0,395
60	26,661	28,241	10,148	9,643	26,353	22,197	3,968	1,603
80	37,388	37,919	26,896	13,727	36,832	34,493	17,498	1,824
100	47,313	45,158	39,266	14,634	46,321	43,625	31,185	2,149
120	55,619	51,586	46,322	15,011	54,857	51,342	40,446	2,263
140	63,298	57,025	51,174	24,013	62,222	57,617	46,258	11,810
160	69,765	61,831	55,332	31,578	68,523	63,454	50,866	23,711
180	74,952	66,353	59,033	36,700	73,485	68,541	54,898	34,638
200	79,067	70,159	62,154	39,579	78,003	72,736	58,287	43,457
220	82,205	73,124	64,787	41,832	81,677	76,420	60,952	50,749
240	85,321	75,723	66,948	43,730	84,711	79,289	63,215	58,236
260	87,931	77,884	68,659	45,571	87,126	81,345	65,620	63,197
280	90,256	79,608	70,182	46,962	89,109	83,091	67,425	66,765
300	92,180	81,120	71,511	48,058	90,831	84,578	68,961	69,476
320	93,795	82,413	72,493	48,931	92,292	85,897	70,214	71,580
340	95,182	83,600	73,381	49,633	93,497	86,875	71,202	73,323
360	96,381	84,698	74,142	50,252	94,662	87,726	72,055	74,711
380	97,693	85,615	74,827	50,745	95,808	88,397	72,804	75,918
400	98,985	86,451	75,423	51,181	96,972	88,957	73,433	76,768
420	100,277	87,022	76,402	51,405	98,136	89,393	73,963	77,353
440	101,569	87,582	77,366	51,623	99,300	89,816	74,498	77,926
460	102,861	88,152	78,344	51,847	100,464	90,252	75,028	78,510
480	104,276	88,722	79,322	52,071	101,628	90,688	75,558	79,094

6.3.2.4 Oteženi povprečni profili sproščanja

V preglednicah od XLVIII in XLIX so podani izračunani oteženi povprečni profili sproščanja z uporabo določene koncentracije kisline za želodčni medij.

Preglednica XXXXIX: Izračunani oteženi povprečni odstotki celotne sproščene učinkovine pri uporabi 0,01 M (T11-T15), 0,001 M (T16-T20) in 0,0013 M (T21-T25) klorovodikove kisline.

čas [min]	otež.povpr.% sprošč.uč. T11-T15	otež.povpr.% sprošč.uč. T16-T20	otež.povpr.% sprošč.uč. T21-T25
0	0	0	0
20	0,188	4,120	3,245
40	1,352	18,256	12,514
60	4,823	32,692	22,889
80	9,748	46,202	32,868
100	16,029	56,377	41,402
120	23,568	63,037	48,204
140	31,627	69,849	55,002
160	40,023	75,348	61,506
180	48,239	79,688	67,190
200	56,591	83,031	71,891
220	63,494	86,436	76,803
240	70,175	89,464	81,264
260	76,270	91,768	84,884
280	81,577	93,714	87,764
300	86,161	95,206	90,127
320	89,793	96,467	92,125
340	92,869	97,555	93,702
360	95,292	98,491	95,133
380	97,147	99,317	96,023
400	98,692	100,039	96,740
420	99,948	98,522	97,243
440	101,098	99,170	97,747
460	102,165	99,806	98,235
480	103,172	100,434	98,717

Preglednica XLIX: Izračunani oteženi povprečni odstotki sproščene učinkovine, določene v vzorcu, v raztopljeni obliki pri uporabi 0,001 M (T16-T20) in 0,0013 M (T21-T25) klorovodikove kisline.

čas [min]	povpr. % sprošč raztoplj. uč. pri T16-T20	povpr. % sprošč raztoplj. uč. pri T21-T25
0	0	0
20	0,709	0,550
40	9,422	6,007
60	18,929	13,407
80	28,946	21,986
100	36,317	29,726
120	41,748	35,881
140	47,925	42,408
160	53,189	48,702
180	57,455	54,133
200	60,711	58,721
220	63,915	63,431
240	66,805	68,070
260	69,099	71,736
280	71,013	74,544
300	72,582	76,904
320	73,850	78,869
340	74,952	80,407
360	75,914	81,710
380	76,819	82,703
400	77,656	83,565
420	78,476	84,303
440	79,284	85,022
460	80,087	85,729
480	80,921	86,431

6.4 Statistična analiza s Studentovim t-testom

V preglednicah L in LI so podani rezultati statistične analize s Studentovim t-testom pri poskusih merjenja sedimentacije T1 (merjenje sedimentacije v drugem odvzetem vzorcu) in T2 (merjenje sedimentacije v vseh motnih vzorcih). Primerjali smo mase nesedimentirane učinkovine v vzorcu ob času 0 in 30 min.

Preglednica L: Rezultati statistične analize mas nesedimentirane učinkovine v vzorcu pri T1 s Studentovim t-testom s $p(\text{mejna})=0,05$ ($p(\text{izračunana})$ - verjetnost, ki je bila rezultat Studentovega t-testa).

čas odvzema vzorca pri T1	$p(\text{izračunana})$	signifikantnost/nesignifikantnost
40 min	0,04	S

Preglednica LI: Rezultati statistične analize mas nesedimentirane učinkovine v vzorcih pri T2 s Studentovim t-testom s $p(\text{mejna})=0,05$. ($p(\text{izračunana})$ - verjetnost, ki je bila rezultat Studentovega t-testa; 20-140 min čas odvzeta vzorca).

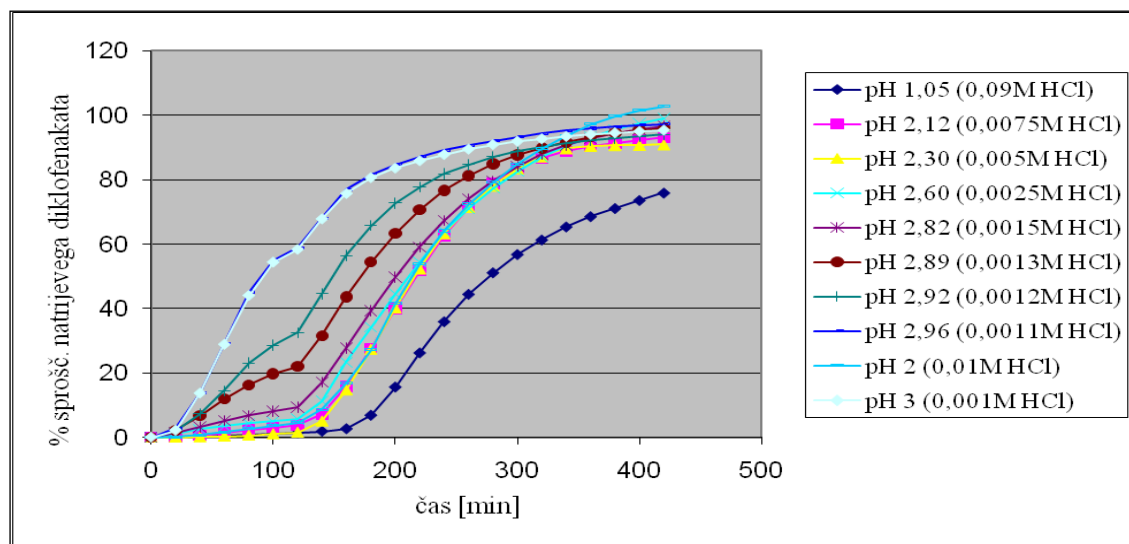
čas odvzema vzorca pri poskusu T2	$p(\text{izračunana})$	signifikantnost/nesignifikantnost
20 min	0,440	NS
40 min	0,150	NS
60 min	0,249	NS
80 min	0,247	NS
100 min	0,126	NS
120 min	0,027	S
140 min	0,229	NS

7. RAZPRAVA

Z *in vitro* testi sproščanja skušamo predvideti kakšne relativne absorpcijske profile bi dobili pri *in vivo* testiranjih na prostovoljcih. Za kakovostno izvedbo *in vitro* poskusov je pomembna izbira in določitev osnovnih pogojev poskusa, saj nam ti omogočajo pridobivanje dovolj relevantnih rezultatov, s pomočjo katerih lahko napovemo *in vivo* obnašanje farmacevtske oblike. V okviru moje diplome smo proučevali vpliv pH simuliranega želodčnega medija in vpliv časa zadrževanja v njem na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem. Pri delu so se pojavljale tudi različne eksperimentalne težave, vpliv katerih smo ustrezno obravnavali.

7.1 Vpliv pH na sproščanje natrijevega diklofenakata

Izvedli smo poskuse pri konstantnem času zadrževanja v simuliranih želodčnih medijih z različnimi pH vrednostmi. Za čas zadrževanja v kislem mediju smo izbrali 120 min, saj je to dovolj relevanten čas praznjenja želodca. Naredili smo serijo poskusov z različnimi pH vrednostmi. Ugotovili smo, da pH želodčnega medija pomembno vpliva na sproščanje učinkovine (Slika 29).



Slika 29: Profili sproščanja učinkovine v različnih pH simuliranega želodčnega medija s časom zadrževanja v 120 min. (v legendi so podane pH vrednosti simuliranega želodčnega medija in koncentracije HCl za posamezen poskus).

Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje natrijevega diklofenakata je variabilen. Obstaja široko območje pH vrednosti okoli pH 2 znotraj katerih zasledimo zelo

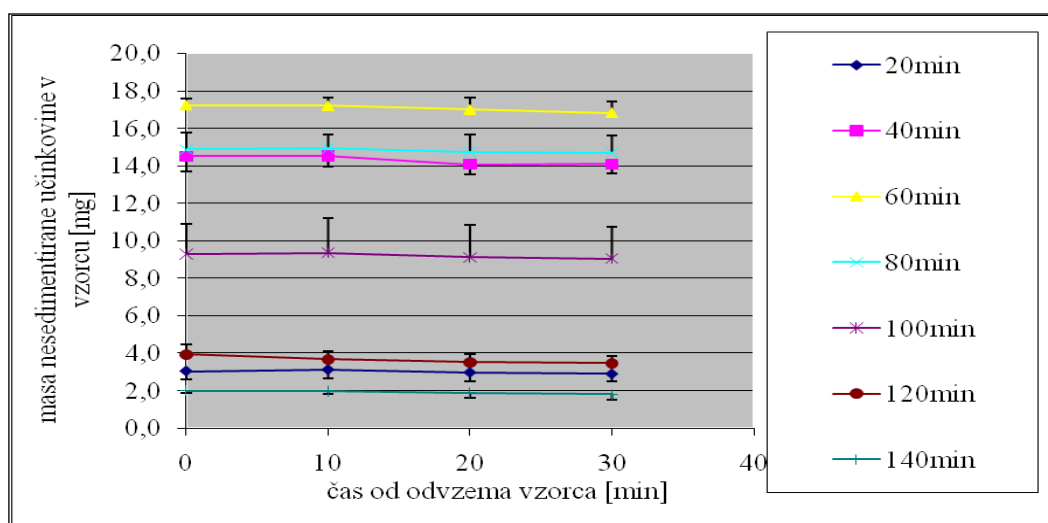
majhen vpliv na sproščanje (vrednosti od 2 do 2,82). Ko pa se vrednosti že zelo približajo vrednosti pH 3 (pH 2,82; 2,89), pa pride do večjih sprememb v sproščanju. Za primerjavo smo pregledali še rezultate predhodno že opravljene diplome, ki je proučevala vpliv pH simuliranega želodčnega medija od vrednosti 1 do 2 (33). Ugotovili smo, da tudi tu lahko zasledimo enak trend vpliva na sproščanje. Okoli pH vrednosti 2 skoraj ni bilo vpliva, ko pa so se vrednosti začele zelo približevati pH 1 pa je bilo opazno veliko zmanjšanje hitrosti sproščanja. Ob predpostavki, da vpliv pH želodčnega medija prevlada nad ostalimi parametri, ki vplivajo na sproščanje, lahko predvidevamo, da bi enake sklepe dobili tudi pri *in vivo* študiji na prostovoljcih. Vpliv skrajnih vrednosti pH je zelo izrazit in bi lahko prevladal nad drugimi variabilnimi fiziološkimi parametri. Enake ugotovitve vpliva pH na sproščanje prikazuje tudi graf na sliki 37.

Pri poskusu z uporabo 0,001 M HCl za simulirani želodčni medij smo opazili motnost vzorcev. Predvidevali smo, da je motnost lahko posledica razpada pelet in posledične sprostitve neraztopljenih delčkov učinkovine ali pomožnih snovi ali pa je prišlo do prenasičenja medija za sproščanje in posledično do obarjanja učinkovine. Želeli smo preveriti ali je naš način priprave vzorcev, ki obsega redčenje zbranih vzorcev z 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1, pravilen in dovolj dobro posnema fiziološke razmere v prebavnem traktu. Z redčenjem z NaOH smo želeli posnemati dvig pH pri prehodu iz želodca v tanko črevo, pri čemer pride do zvišanja pH iz vrednosti 1-3 na 6-7. Zanimalo nas je ali bi v *in vivo* pogojih vsa sproščena učinkovina (raztopljena in neraztopljena) dejansko zapustila želodec in bi se še neraztopljeni del raztopil v črevesni tekočini z višjim pH ali pa bi v želodcu prišlo do sedimentacije in zaostajanja neraztopljene učinkovine v želodčnih gubah.

Pri preliminarnem poskusu merjenja sedimentacije (T1) smo preverjali sedimentacijo neraztopljene učinkovine v vzorcu zbranem med 20 in 40 min poskusa sproščanja. Sedimentacijo smo merili 30 minut, saj smo predvidevali, da v tem času že velik del sproščene učinkovine zapusti želodec. S tem poskusom smo dobili orientacijske podatke o sedimentaciji. Statistična analiza je sicer pokazala signifikantne razlike, vendar je bila izračunana p vrednost 0,04, ki pa je že zelo blizu mejni vrednosti. V povprečju se je glede na prvotno nesedimentirano količino učinkovine posedlo 3,59%.

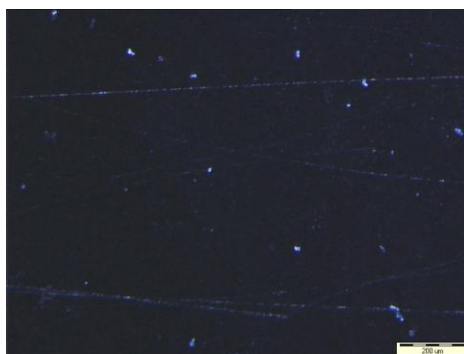
Želeli smo se prepričati, ali do sedimentacije prihaja v vseh motnih vzorcih, zato smo izvedli poskus T2 in preverjali možnost sedimentacije v vseh motnih vzorcih. Zadnji motni

vzorec je bil odvzet po 140 min poskusa. Po tem času vzorci niso bili več motni. Graf (Slika 30) nam prikazuje povprečne nesedimentirane mase učinkovine v vseh motnih vzorcih po 0, 10, 20 in 30 minutah po odvzetju vzorca. Vidimo, da se masa s časom praktično ne spreminja. Izveden parni, dvostranski Studentov t-test v večini vzorcev ni pokazal statistično signifikantnih razlik. Signifikantne razlike je pokazal le pri vzorcu odvzetem po dveh urah poskusa. Kljub temu smo predpostavili, da do posedanja neraztopljene učinkovine v vzorcih prihaja v zelo majhnem obsegu in je naš postopek priprave vzorcev ustrezen.



Slika 30: Merjenje sedimentacije v vseh motnih vzorcih - T2 (v legendi so podani časi odvzema vzorca).

Neraztopljeno učinkovino smo si ogledali tudi s stereomikroskopom pri 90-kratni povečavi, da bi določili njeno velikost. Določili smo premer neraztopljenega delca in ta je znašal približno 15-20 μm (slika 31).

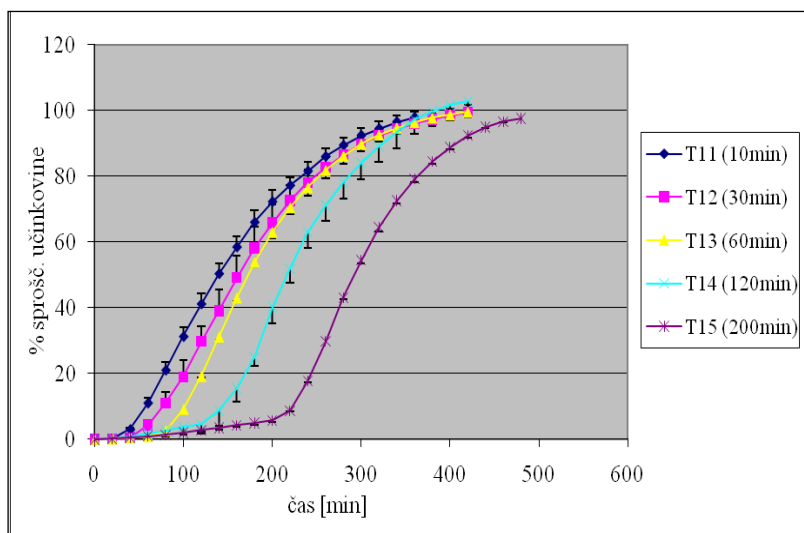


Slika 31: Neraztopljena učinkovina (vzorec zbran pri poskusu T2) pod stereomikroskopom (90-kratna povečava).

7.2 Vpliv časa zadrževanja v kislem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata

7.2.1 Poskusi z uporabo 0,01 M klorovodikove kisline

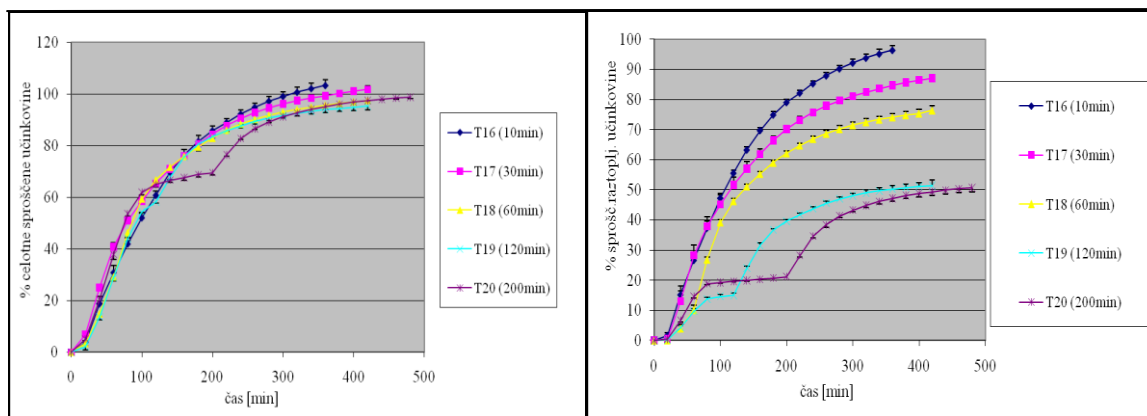
Izvedli smo poskuse s petimi različnimi časi zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju. Ti časi oz. časovni intervali so bili v predhodnih študijah določeni glede na hitrosti praznjenja pelet iz želodca. Iz slike 32 je razvidno, da se z daljšanjem časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju podaljšuje čas do začetka sproščanja učinkovine. Ko pa se je ta pričela sproščati, se je učinkovina v vseh primerih sproščala s primerljivimi hitrostmi. V želodčnem mediju s pH se je sprostila zanemarljivo majhna količina, kar je posledica zelo nizke topnosti učinkovine v tem mediju.



Slika 32: Profili sproščanja pri poskusih T11-T15 (oznake poskusov iz tabele V; v legendi so podani časi zadrževanja v kislem mediju za posamezen poskus).

7.2.2. Poskusi z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline

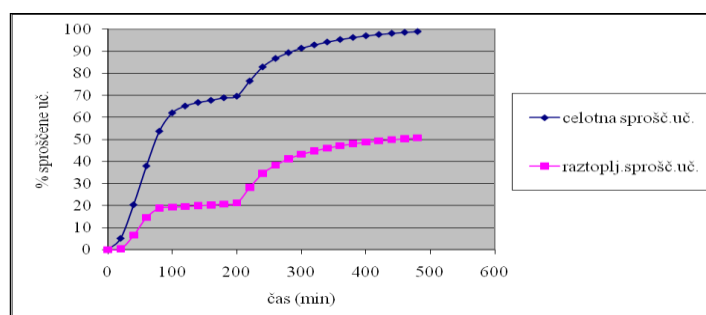
Profili celotne sproščene učinkovine pri poskusih z uporabo 0,001 M klorovodikove kisline (Slika 33 levo) nakazujejo dva trenda sproščanja. pH kislega medija je bil že dovolj visok, da je omogočal raztapljanje sicer v kislem slabo topne učinkovine. Učinkovina se je v kislem mediju sproščala z določeno hitrostjo do nasičenja medija v delovni čaši, nato pa se je zaradi slabe topnosti učinkovine hitrost zelo zmanjšala. Z zamenjavo medija smo pH v čaši zvišali na vrednost 6,8 in s tem povzročili ponoven začetek sproščanja učinkovine iz pelet. Plato, ki nam nakazuje nasičenje, je razviden le iz profilov pri poskusih T19 (čas zadrževanja 120 min) in T20 (čas zadrževanja 200 min). Ob koncu poskusov je količina sproščene učinkovine v vseh primerih presegala 90 odstotkov.



Slika 33: Profili sproščanja celotne sproščene učinkovine (levo) in raztopljene učinkovine (desno) pri poskusih T16-T20 (oznake poskusov iz tabele V, v legendi so podani časi zadrževanja v kislem mediju za posamezen poskus).

Kljub temu, da smo predhodno s poskusi merjenja sedimentacije (T2) predvideli, da do sedimentacije v vzorcih prihaja v zelo majhnem obsegu, smo v vsakem odvzetem vzorcu določali tudi količino raztopljene učinkovine. Vzrok za to je bila slaba topnost učinkovine v kislem mediju in posledična motnost vzorcev. Želeli smo ugotoviti, kateri profili sproščanja (za celotno ali raztopljeno učinkovino) so bolj primerni za primerjavo z *in vivo* absorpcijskimi profili.

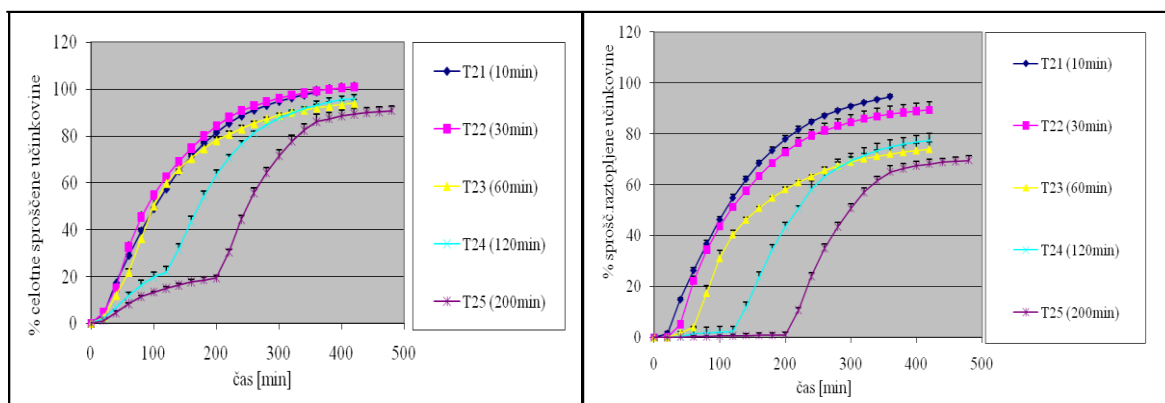
Iz profilov sproščanja (Slika 33 desno), ki prikazujejo le odstotke raztopljene sproščene učinkovine v vzorcu lahko vidimo, da je količina le-te v kislem mediju zelo majhna. Po zamenjavi medija je količina začela strmo naraščati, vendar se pri poskusih z daljšimi časi zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju ni približala sto odstotkom, saj je bil preostali sproščeni del prisoten v mediju v neraztopljenem stanju. Na sliki 34 je vidna primerjava med profilom sproščanja celotne in raztopljene sproščene učinkovine, ki še enkrat jasno ponazori prej postavljene zaključke.



Slika 34: Primerjava profilov sproščanja celotne in raztopljene učinkovine pri poskusu T20 (čas zadrževanja v kislem mediju 200 min).

7.2.3 Poskusi z uporabo 0,0013 M klorovodikove kisline

Na sliki 35 (levo) so prikazani profili sproščanja učinkovine pri uporabi simuliranega želodčnega medija s pH 2,89. Prav tako kot v prejšnjih dveh primerih opazimo, da je z daljšanjem časa zadrževanja daljšal zakasnitveni čas sproščanja. Če ta graf primerjamo z grafom na sliki 33 (levo) lahko vidimo, da ima že zelo majhna sprememba pH (za 0,11 enote) velik vpliv na količino sproščene učinkovine. Ta vpliv je zelo izrazit zlasti pri profilih sproščanja z daljšim časom zadrževanja (120 in 200 min). Tudi pri tej koncentraciji kisline smo določali raztopljeni del učinkovine v vzorcu. (Slika 35 desno).

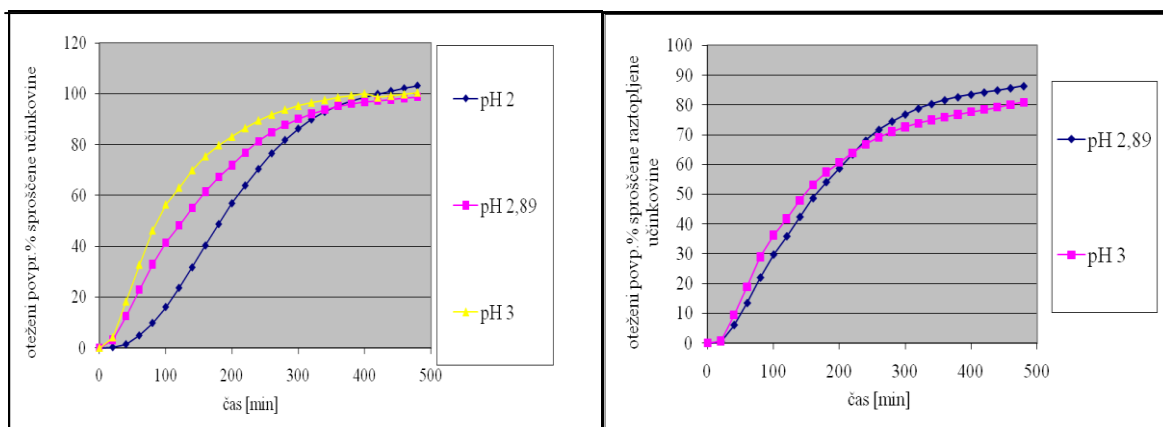


Slika 35: Profili sproščanja celotne sproščene učinkovine (levo) in raztopljene učinkovine (desno) pri poskusi T21-T24 (oznake poskusov iz tabele V, v legendi so podani časi zadrževanja v kislem mediju za posamezen poskus).

7.2.4 Oteženi povprečni profili sproščanja in druge primerjave

Iz posameznih profilov sproščanja pri določenih časih zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju smo z uporabo ustreznih odstotkov, izračunanih iz profilov praznjenja pelet iz želodca, izračunali otežene povprečne profile pri določenem pH simuliranega želodčnega medija, ki jih lahko uporabimo za primerjavo z absorpcijskimi profili.

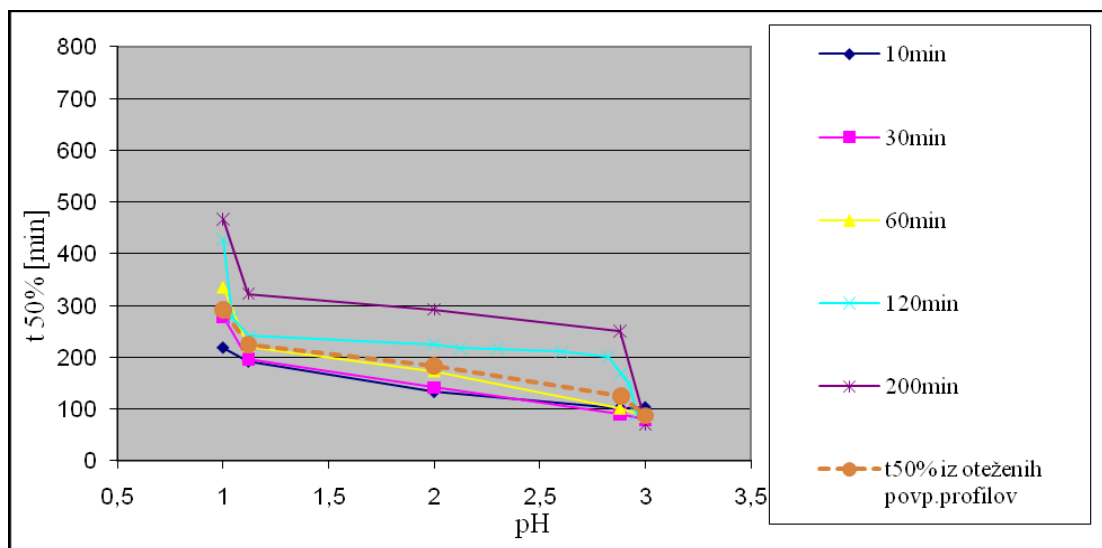
Z nižanjem pH simuliranega želodčnega medija se je hitrost sproščanja učinkovine iz pelet zmanjševala zaradi podaljšanja časov zakasnitve sproščanja (Slika 36 levo). Pri pH 2 opazimo očiten čas zakasnitve, saj je odstotek sproščene učinkovine pri tem pH praktično zanemarljiv. Otežena povprečna profila sproščanja za raztopljeno učinkovino v vzorcu (Slika 36 desno) ne nakazujeta nekega zelo očitnega vpliva pH na hitrost sproščanja.



Slika 36: Oteženi povprečni profili sproščanja učinkovine pri preizkušanih vrednostih pH. (levo: celotna sproščena učinkovina, desno: raztopljena sproščena učinkovina). V legendi so podane pH vrednosti simuliranih želodčnih medijev.

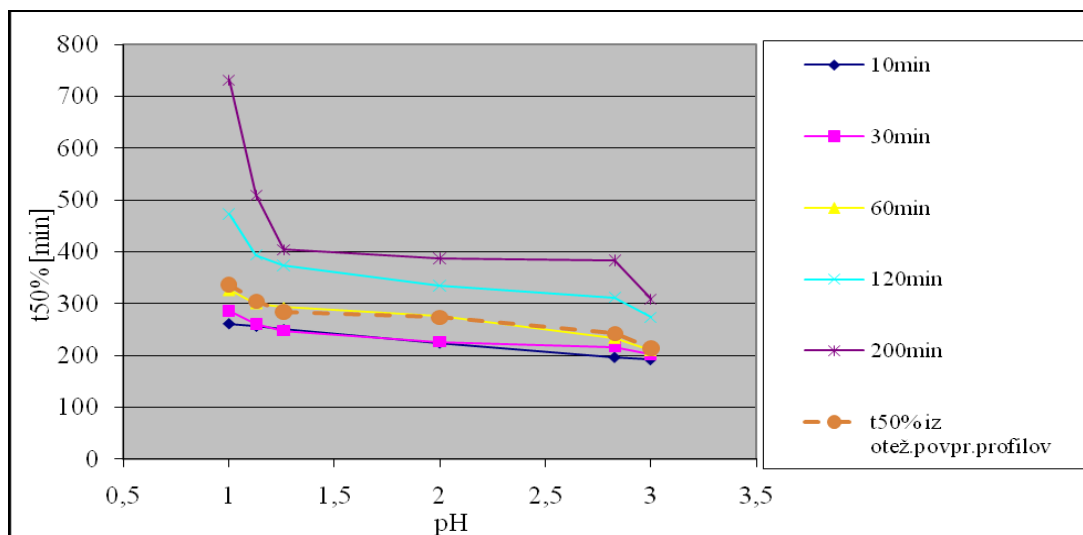
Glede na to, da smo s predhodnimi testi zasledili majhen obseg sedimentacije neraztopljene učinkovine v vzorcih lahko predvidevamo, da tako raztopljeni kot neraztopljeni del sproščene učinkovine enako hitro preideta iz želodca v dvanajstnik. S tem pride celotna sproščena učinkovina v območje z višjim pH, kjer je učinkovina dobro topna. Celotna količina se tako raztopi in je na voljo za absorpcijo. Ob predpostavkah, da je učinkovina dobro permeabilna in da so odsotni drugi predsistemi procesi, so za primerjavo z *in vivo* absorpcijskimi profili bolj primerni oteženi profili sproščanja celotne učinkovine.

Vpliv pH na sproščanje smo ponazorili tudi z izračunom časa, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine. Izračunali smo ga iz profilov sproščanja za vsak čas zadrževanja in vse pH vrednosti simuliranega želodčnega medija. Na graf (Slika 37) smo narisali tudi $t_{50\%}$ za pH 1 in 1,12. Za slednje dva pH smo uporabili rezultate predhodno opravljene diplome, ki je prav tako preizkušala sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet, le da so bili uporabljeni drugi pH simuliranih želodčnih medijev (33). Iz grafa lahko vidimo, da obstajata dva skrajna intervala, v katerih pride do velikih sprememb v času, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine. Če je pH zelo nizek (blizu vrednosti 1) se čas, v katerem se sprosti 50 odstotkov učinkovine, poveča do 7 ur, če pa je visok (okoli 3) pa se ta čas skrajša celo pod 2 uri. Med njima graf od nižjega proti višjem pH sicer vseskozi pada, vendar ta naklon ni tako zelo drastičen. Drugi trend, ki ga opazimo pa je, da se s krajšim časom zadrževanja v kislem mediju, krajša tudi čas v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine. Vzrok za to je krajši zakasnitveni čas.



Slika 37: Sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem: $t_{50\%}$ v odvisnosti od pH za različne čase zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju (časi zadrževanja so podani v legendi).

Sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem smo primerjali s sproščanjem iz tablet s podaljšanim sproščanjem (34). Odvisnost časa, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine, od pH simuliranega želodčnega medija nam v obeh primerih nakazuje enake trende (slika 37 in slika 38). Če primerjamo $t_{50\%}$ izračunane iz oteženih povprečnih profilov, lahko rečemo, da je sproščanje iz tablet v skrajnih dveh območjih deležno nekoliko manjše spremembe kot sproščanje iz pelet. Povzamemo lahko, da se bo več učinkovine sprostilo v mediju z višjim pH ne glede na to, iz katere farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem se ta sprošča. Tudi trenda vpliva časa zadrževanja v kislem mediju sta enaka.



Slika 38: Sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s podaljšanim sproščanjem: $t_{50\%}$ v odvisnosti od pH za različne čase zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju (časi zadrževanja so podani v legendi) (34).

7.3 Možnosti nadaljnjih poskusov

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da bi bilo smiselno še dodatno preizkušati skrajne vrednosti fizioloških pH. Ugotovili smo, da imajo lahko majhne spremembe v območju skrajnih fizioloških pH vrednosti velik vpliv na potek profilov sproščanja. Smiselno bi bilo tudi, da bi spreminjali sestavo simuliranih želodčnih in črevesnih medijev (različni pufri, ionske moči) ter gledali njihov vpliv na sproščanje. Lahko bi spreminjali tudi hitrost pretoka in mehansko obremenitev. S tem bi dobili dodatne profile sproščanja za primerjavo in natančnejšo opredelitev *in vivo* situacije.

Dobljene otežene povprečne profile sproščanja za celotno in raztopljeno sproščeno učinkovino smo primerjali z absorpcijskimi profili. Ugotovili smo, da se profili za raztopljeno sproščeno učinkovino povsem prilegajo podanim absorpcijskim profilom, kar ovrže našo postavljeno tezo o vplivu sedimentacije neraztopljenih delčkov učinkovine. Smiselno bi bilo, da bi preverjali hitrost raztapljanja sproščenih neraztopljenih delčkov učinkovine v pufrih s fiziološkimi pH vrednostmi (pH od 3 do 7) in s tem gledati kako hitro po prehodu iz želodca v tanko črevo se učinkovina dejansko raztopi.

8. SKLEP

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv pH želodčnega medija in časa zadrževanja v njem na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem. Ugotovili smo naslednje:

1. Vpliv pH lahko razdelimo na tri območja: zelo nizke in zelo visoke fiziološke vrednosti pH podaljšajo oz. skrajšajo čas, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine, širok interval pH vrednosti okrog pH 2 pa ima le minimalen vpliv na trajanje časa, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine.
2. Vzorci, zbrani pri poskusu z uporabo 0,001 M HCl so bili motni, zato smo v njih določali morebitno sedimentacijo neraztopljenih delcev učinkovine. Ugotovili smo, da je po 30 minutah od odvzema vzorca do posedanja neraztopljene učinkovine prišlo v majhnem obsegu, zato predvidevamo, da celotna količina sproščene učinkovine (raztopljena in neraztopljena) preide iz želodca v dvanajstnik. Če se nato učinkovina v dvanajstniku hitro raztopi, se lahko tudi hitro absorbira.
3. Z daljšanjem časa zadrževanja v kislem mediju se je zaradi slabe topnosti učinkovine podaljševal čas do začetka njenega sproščanja v črevesnem mediju. Potem ko se je učinkovina pričela sproščati, so bile hitrosti sproščanja, ne glede na čas zadrževanja v želodcu, primerljive.
4. Odstotek raztopljene učinkovine pri poskusih sproščanja v simuliranem želodčnem soku s pH 2,89 je bil zelo majhen, v pH 3 pa se je signifikantno povečal (po 200 min zadrževanja v kislem mediju je znašal že 20 %). Vzrok za to je majhna topnost učinkovine pri pH 2,89.
5. Če se učinkovina, ki pride v dvanajstnik, v njem hitro raztopi in predpostavljamo, da je dobro permeabilna ter da so odsotni predsistemski procesi, lahko predvidevamo, da so za primerjavo z relativnimi absorpcijskimi profili uporabni oteženi (upoštevajo hitrost praznjenje pelet iz želodca) povprečni profili sproščanja za celotno količino sproščene učinkovine, saj smo ugotovili, da je do posedanja učinkovine prišlo v majhnem obsegu.

6. Primerjava časa, v katerem se sprosti petdeset odstotkov učinkovine, v odvisnosti od pH nam tako za sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet kot iz tablet s podaljšanim sproščanjem nakazuje enake trende.

9. VIRI IN LITERATURA

1. Heigoldt U, Sommer F, Daniels R, Wagner K: Predicting in vivo absorption behavior of oral modified release dosage forms containing pH-dependent poorly soluble drugs using a novel pH-adjusted biphasic in vitro dissolution test. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010; 76(1): 105-11
2. Fujimoto M, Mihara K, Jorgenson J, Otsuka K, Aburada M, Kawada T. Effect of paddle-shaft position of the dissolution rate of sodium diclofenac tablets and the equivalence assessment of a generic product. *Dissolution Technologies* 2009; 16(4): 29-34
3. Garbacz G, Wedemeyer R, Nagel S, Giessmann T, Monnikes H, Wilson C, Weitschies W. 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: 421-428
4. Azarmi S, Roa W, Lobenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 328: 12-21
5. Borst I, Ugwu Sydney, Beckett A. New and extended applications for USP drug release apparatus 3. *Dissolution Technologies* 1997; 4(2): 11-16
6. Hanson R, Gray V. Handbook of dissolution testings. *Dissolution Technologies* Hockessin, 2004
7. Bynum K, Kassis A, Patel T. A Go-NoGo gauge for USP apparatus 1 baskets. *Dissolution Technologies* 2008; 15(4): 7-12
8. <http://jpd.b.nihs.go.jp/jp14e/contents.html> (datum dostopa:18.10.2010)
9. Karande A, Yeole P. Comparative assessment of different dissolution apparatus for floating drug delivery systems. *Dissolution Technologies* 2006; 13(1): 20-24
10. Farrugia C. Flow-through dissolution testing: A comparison with stirred beaker methods. *The Chronicill* 2002; 6: 27-29

11. Gohel M, Mehta P, Dave R.K., Bariya N. A more relevant dissolution method for evaluation of floating drug delivery system. *Dissolution technologies* 2004; 11(4): 22-26
12. Qureshi S, Shabnam. Applications of new device (spindle) for improved characterization of drug release (dissolution) of pharmaceutical product. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 19: 291-297
13. Qureshi S. A new crescent-shaped spindle for new drug dissolution testing-but why a new spindle. *Dissolution Technologies* 2004; 11(4): 13-21
14. Jorgensen E, Bhagwat D. Development of dissolution tests for oral extended-release products. *Pharm. Science & Technology today* 1998; 1(3): 128-135
15. Looney T. USP apparatus 4-applying the technology. *Dissolution technologies* 1997; 4(2): 16-18
16. McAllister M. Dynamic dissolution: a step closer to predictive dissolution testing. *Molecular pharmaceuticals* 2010; 7(5): 1374-1387
17. Carino S, Sperry D, Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 95(1): 116-25
18. Parikh R, Delvadia E, Patel S.M. A novel multicompartment dissolution apparatus for evaluation of floating dosage form containing poorly soluble weakly basic drug. *Dissolution Technologies* 2006; 13(1): 14-19
19. Burke, Maheshwari M, Zimmerman C.R. Pharmaceutical analysis apparatus and method. United States Patent, Patent number: 12/298,476, date of patent: Nov.2, 2009
20. Vagani S, Zhou P, Del-Battio M., Chiu R, Cauchon N, Gao P, Medina C, Jasti B. Dissolution of poorly water-soluble drugs in biphasic media using USP 4 and fiber optic system. *Clin. Res. Regul. Affairs* 2009; 26: 8-19
21. Gu.C, Rao D, Gandhi R, Hilden J, Raghavan K. Using a novel multicompartment dissolution system to predict the effect of gastric pH on the oral absorption of weak bases with poor intrinsic solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 94(1): 199-208

22. Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharmaceutical Research* 2003; 20: 1674-80
23. Mercuri A. The dynamic gastric model. *UKICRS newsletter* 2010; 7: 28-30
24. Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, Meunier J, Denis A, Havenaar R, Alric M. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(4): 585-591
25. <http://www.pion-inc.com/instruments/udiss-profiler.html> (datum dostopa: 3.8.2010)
26. Tsinman K. et al. Miniaturization of powder dissolution measurement and estimation of particle size. *Chem Biodivers* 2009; 6(11): 1796-811
27. Lu Xujin, Lozalo R, Shah P. In-situ dissolution testingg using different UV fiber optic probes and instruments. *Dissolution Technologies* 2003; 10(4): 6-16
28. Voisine J, Zolnik B, Burgess D. In situ fiber optic method for long-term in vitro release testing of microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 356(1-2): 206-11
29. Chuasuwan B, Binjesoh V, Polli J.E, Zhang H, Amidon G, Junginger H.E, Midha K, Shah V.P, Stavchasky S, Dressman J.B, Barends D. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009; 98: 1206-1219
30. Khazaeinia T, Jamali F. Comparison of gastrointestinal permeability induced by diclofenac-phospholipid complex with diclofenac acid and its sodium salt. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2003; 6(3): 352-359
31. Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M. Gastric emptying of pellets under fasting conditions: A mathematical model. *Pharmaceutical Research* 2009; 26(7): 1607-1617
32. Lemke T.L, Williams D.A, Roche V.F, Zito S.W. Foye`s principles of Medicinal Chemistry, 6th ed, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2008: 954-962, 969-970

33. Korošec J, Diplomsko delo: Vpliv pH in časa zadrževanja v želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011

34. Ložar K, Diplomsko delo: Vpliv simuliranih fizioloških pogojev želodca na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011