

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA BOGATAJ

VREDNOTENJE SPROŠČANJA NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA IZ
TABLET V RAZLIČNIH MLEČNIH MEDIJAH IN CITRATNIH PUFRIH
EVALUATION OF DICLOFENAC SODIUM RELEASE FROM TABLETS
IN VARIOUS MEDIA CONTAINING MILK AND IN CITRATE
BUFFERS

Ljubljana, 2012

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentoriciizr. prof. Mariji Bogataj, mag. farm. za usmeritve in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Iskrena hvala tudi Greti Cof za vso pomoč pri delu in prijetno vzdušje v laboratoriju. Zahvaljujem se tudi ostalim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi pomagali v času diplomskega dela. Hvala družini, ki mi je tekom študija stala ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

VSEBINA

1	POVZETEK	5
2	SEZNAM OKRAJŠAV	6
3	UVOD	7
3.1	Želodec	8
3.1.1	Želodčna kislina	9
3.1.2	Pepsin	9
3.1.3	Lipaza	9
3.1.4	Prebava in absorpcija maščob	11
3.1.5	Mediji testov sproščanja, ki ponazarjajo želodčne pogoje v prisotnosti hrane	12
3.2	Mleko	14
3.2.1	Sestava mleka	15
3.2.1.1	Ogljikovi hidrati	15
3.2.1.2	Dušikove komponente mleka	16
3.2.1.3	Lipidi	18
3.2.1.4	Minerali	19
3.2.1.5	Vitamini in obrambni agensi	19
3.2.2	Fizikalno-kemijske lastnosti	19
3.2.3	Obdelava mleka	20
3.2.3.1	Toplotna obdelava mleka	20
3.2.3.2	Nakisanje segretega mleka	20
3.2.4	Aktivnost encimov pri želodčni prebavi mleka	20
3.3	Natrijev diklofenakat	21
4	NAMEN DELA	23
5	MATERIALI IN METODE	24
5.1	Materiali in aparature	24
5.2	Metode	26
5.2.1	Priprava medijev	26
5.2.2	Določanje pH profila mlečnih vzorcev po dodajanju 1,83 M HCl	28
5.2.3	Določanje pufrne kapacitete	29
5.2.4	Določevanje pH profila mleka in 40 mM citratnega pufra po dodajanju 1,83 M HCl	30
5.2.5	Analiza vzorcev	30
5.2.5.1	Uporaba UV-VIS spektrofotometra	30
5.2.5.2	Uporaba HPLC	31
5.2.6	Določevanje topnosti natrijevega diklofenakata	33
5.2.7	Testi sproščanja	34
5.2.7.1	Preliminarni testi sproščanja	34
5.2.7.2	Končni testi sproščanja	37

5.2.7.3	Izračun količine sproščene učinkovine iz tablet	39
5.2.7.4	Vrednotenje profilov sproščanja	40
5.2.8	Določitev pH profilov medijev med testi sproščanja	41
6	REZULTATI	43
6.1	Pufrna kapaciteta	43
6.2	Analiza vzorcev	49
6.2.1	Določitev enačb umeritvenih premic	49
6.2.2	Vpliv mlečnega medija in zamrzovanja vzorcev na določanje koncentracije učinkovine	53
6.3	Topnost natrijevega diklofenakata	53
6.4	Sproščanje	54
6.4.1	HPLC analiza dnevnih standardnih raztopin	54
6.4.2	Preliminarni testi sproščanja	54
6.4.3	Končni testi sproščanja	60
6.4.4	Vrednosti faktorjev podobnosti in faktorjev različnosti.	62
6.5	pH profili	62
7	RAZPRAVA	66
7.1	Analiza	66
7.2	Pufrna kapaciteta mleka in različnih pufrov	68
7.3	pH profili medijev med testi sproščanja	70
7.4	Testi sproščanja	72
7.4.1	Preliminarni testi sproščanja	72
7.4.2	Končni testi sproščanja	75
8	SKLEP	78
9	LITERATURA	80

1 POVZETEK

V diplomskem delu smo testirali sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v različnih medijih, s katerimi smo ponazorili pogoje polnega želodca. Poskušali smo preučiti vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti medija na sproščanje učinkovine. Uporabili smo tri različne mlečne medije; mleko, mleko z dodatki kisline in medij s postopno prebavo mleka. Ker je za mleko značilna pestra in kompleksna sestava, saj vsebuje lipide, ogljikove hidrate, proteine, minerale, vitamine in druge kompleksne molekule, smo naredili enostavno raztopino, s katero smo želeli ponazoriti pH profil mleka po dodajanju kisline. Uporabili smo pufrni medij (40 mM citratni pufer), s pufrno kapaciteto podobno pufrni kapaciteti mleka. Za teste sproščanja smo uporabili aparat 1 in aparat 2 po USP ter pretočni sistem. Izvedli smo več preliminarних testov sproščanja, s katerimi smo določili končno metodo sproščanja. Na aparatu 1 po USP in aparatu 2 po USP smo preučili vpliv volumna in mehanskih obremenitev, ki so posledica mešanja medija, na sproščanje učinkovine. Aparat 2 po USP smo nato modificirali; tableto smo namestili v žičko obešeno nad mešalom. Žičko smo kasneje uporabili kot uteževalec in tako dosegli boljšo ponovljivost. Ugotovili smo, da aparat 2 po USP ni primeren za sproščanje testiranih tablet v kislih medijih zaradi obarjanja in sedimentacije oborjene učinkovine ter ga zamenjali s pretočnim sistemom, kjer te ovire ni bilo.

V mleku in citratnem pufru z dodatki kisline se je zaradi znižanja pH sproščanje učinkovine iz tablet s prirejenim sproščanjem zmanjšalo. Profila sproščanja v mleku in citratnem pufru z dodatki kisline sta bila med seboj podobna. V mediju s postopno prebavo mleka je bilo sproščanje najmanjše. Kljub višjim pH vrednostim medija, kot v primeru mleka in citratnega pufra z dodatki kisline, smo najmanjše sproščanje v tem sistemu pripisali oblogi prebavnih produktov mleka okrog tablete. Sproščanje je bilo zaradi velike mehanske občutljivosti tablet odvisno tudi od fizične obremenitve steklenih kroglic in je bilo zato pri uporabi pretočnega sistema večje kot pri uporabi aparata 2 po USP.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

USP - Ameriška farmakopeja (ang. The United States Pharmacopeia)

SNF - trdne mlečne snovi, med katere ne štejemo maščob (ang. solids-non-fat)

MFGM - membrana mlečne lipidne globule (ang. milk fat globule membrane)

COX-1 – encim ciklooksigenaza tipa 1

COX-2 – encim ciklooksigenaza tipa 2

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

AUC – površina pod krivuljo (ang. Area under curve)

SD – standardni odklon

UV – ultravijolična svetloba

VIS – vidna svetloba

MMC – migracijski motorični kompleks

IDL – lipoproteini srednje gostote

HDL – lipoproteini visoke gostote

LDL – lipoproteini majhne gostote

LOQ – limita kvantifikacije

RSD – relativna standardna deviacija,

FSGEM– emulzija, ki ponazarja stanje želodca s hrano (ang. Fed State Gastric Emulsion System)

FeSSGF–medij, ki ponazarja želodec v pogojih s hrano (ang. Fed State Simulating Gastric Fluid)

3 UVOD

Biološka uporabnost peroralnih farmacevtskih oblik je odvisna od lastnosti zdravilne učinkovine in pomožnih snovi ter od pogojev v gastrointestinalnem traktu, tudi v povezavi z zaužitim obrokom. Pogoji aplikacije lahko vplivajo na sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike. Faktorji, ki vplivajo na hitrost raztapljanja učinkovine so podani v Noyes-Whitneyevi enačbi:

$$dX_d/dt = A * D/\delta * (C_s - X_d/V), \quad /1/$$

kjer je; dX_d/dt - hitrost raztapljanja, A - površina učinkovine, ki je na razpolago za raztapljanje, D - difuzijski koeficient učinkovine, δ - debelina difuzijske plasti, C_s - koncentracija nasičene raztopine (topnost), X_d - količina raztopljene učinkovine, V - volumen uporabljenega medija. Nekateri izmed naštetih parametrov so odvisni od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, nekateri pa od pogojev v gastrointestinalnem traktu (1, 2).

Površinsko aktivne snovi v želodcu in dvanajstniku vplivajo na močenje in s tem na kontaktno površino učinkovine, ki je na razpolago za raztapljanje. Površinska napetost želodčne vsebine se med pogoji s hrano (fed) in pogoji na tešče (fasted) razlikuje in zato povzroči razlike v sproščanju. Sestava želodčne vsebine lahko vpliva na topnost učinkovine zaradi prisotnih maščob, tvorbe micelov... Difuzivnost učinkovine je odvisna od viskoznosti vsebine želodca. Pri povečani viskoznosti se difuzivnost zmanjša (1). pH in pufrna kapaciteta želodčne vsebine imata pomembno vlogo pri ionizirajočih spojinah in nekaterih pomožnih snoveh. Določata namreč stopnjo ionizacije spojin. Na sproščanje imata lahko pomemben vpliv tudi osmolalnost in ionska moč. Ionska moč vpliva na privzem vode in posledično na nabrekanje nekaterih polimerov (3). Pomemben parameter je volumen medija v želodcu. V pogojih na tešče je volumen manjši (20-30 mL), medtem ko se z zaužitjem hrane lahko poveča na 1,5 L. Na sproščanje vpliva čas zadrževanja farmacevtske oblike v želodcu. Čas zadrževanja je odvisen od pogojev na tešče oziroma pogojev s hrano (hrana ga običajno podaljša) ter vrste farmacevtske oblike. V tankem črevesju pogoji na tešče in pogoji s hrano ne vplivajo značilno na čas zadrževanja farmacevtske oblike (2).

Poleg želodčne vsebine, njenih fizikalno-kemijskih značilnosti, na sproščanje učinkovin vpliva tudi gibanje gastrointestinalnega trakta. Pride lahko do mehanskih poškodb občutljivih farmacevtskih oblik (npr. fizični stres vratarja ali ileocekalnega sfinktra) in posledično večjega sproščanja (4).

3.1 Želodec

Tableta, ki jo zaužijmo, hitro doseže želodec, kjer je izpostavljena prebavnim sokovom in mehanskim obremenitvam (5). Želodec predstavlja najširši del prebavne cevi, ki se prične z želodčnim ustjem (kardijem) in konča z vratarjem (pilorusom). Vrtar vodi v dvanajstnik. Želodec sestavljajo trije deli; svod-fundus, telo-corpus in votlina-antrum. Telo želodca leži med svodom in votlino. Želodčna stena je zgrajena iz štirih plasti; nagubane sluznice in treh mišičnih plasti, ki omogočajo gibanje (6). V želodcu je prisotna motorična aktivnost, ki se razlikuje glede na to ali je v želodcu hrana ali je ni. Za pogoje na tešče je značilen migracijski motorični kompleks (MMC). MMC je ciklično, zaporedno krčenje, ki se širi od želodca do tankega črevesja vsakih 90 min (7). MMC sestavljajo tri faze. V fazi I je želodec v stanju mirovanja, za fazo II je značilna kombinacija šibkih in močnih kontrakcij. V fazi III je krčenje želodca najmočnejše (8). Po končani fazi III se jakost zmanjša, pride do prehoda v fazo I. Z zaužitjem hrane MMC nadomestijo kontrakcije različnih amplitud in frekvenc, ki omogočajo mešanje in prebavo hrane (7).

Prebavne sokove izločajo žleze v telesu in svodu želodca (9). V želodcu se izločata encima pepsin in želodčna lipaza (10-12). Aktivni sta tudi jezična (lingual) lipaza in amilaza, ki prideta iz ustne votline (13).

Sluznico želodca pokriva gosta sluz, ki jo izločajo mukozne celice želodčnega epitelija in želodčnih žlez. Njeno izločanje spodbujajo mehanično in kemično draženje sluznice ter holinergična stimulacija. Sluz in bikarbonatni ioni varujejo sluznico pred nizkim pH. Njuno izločanje spodbujajo prostaglandini, ki so odgovorni tudi za celjenje okvarjene sluznice (14).

Naloga želodca je shranjevanje, mešanje in drobljenje hrane, kemična prebava s kislino in encimi, absorpcija določenih substanc (alkohol) ter varovanje pred nekaterimi zaužitimi škodljivimi mikroorganizmi (kolonizacijo bakterij) (9).

3.1.1 Želodčna kislina

Želodčna sluznica ima sposobnost izločanja solne kisline. HCl izločajo parietalne celice sluzničnih žlez želodca. Izločanje je uravnava s spodbujevalnimi in zaviralnimi mehanizmi in se tekom dneva spreminja. Poznamo več ravni izločanja kisline. Bazalna raven je nekaj ur po zadnjem obroku, cefalična raven izločanja se pojavi ob misli na obrok (vonj ali pogled na hrano), gastrična raven ob vstopu hrane v želodec ter intestinalna raven ob vstopu himusa v tanko črevo. Izločanje kisline poleg parietalnih celic uravnava še celice G, celice D, enterokromafinim celicam podobne celice, živčni končiči vagusa in intramuralni živčni pletež (14).

3.1.2 Pepsin

Proteaze so prisotne v želodcu (pepsin) in tankemu črevesju (tripsin, kimotripsin), kjer hidrolizirajo proteine v manjše polipeptide oz. do aminokislin (15).

Pepsinogeni so proencimi, ki jih večinoma izločajo glavne celice telesa želodca. Ob prisotnosti želodčne kisline se avtokatalitično pretvorijo v pepsin (11, 14). Razvrščeni so v pet skupin; pepsinogen A, B in F, progastricin in prokimozin (11).

Pepsin je encim, aspartat proteaza, v želodčnem soku, ki katalizira hidrolizo proteinov do polipeptidov (10). Maksimalna aktivnost pepsina je v območju $\text{pH}=1,5-2$ (16). Je nespecifična endopeptidaza (nespecifično hidrolizira peptidno vez) s preferenco cepitve pri aminokislinah fenilalanin, levcin in L-tirozin (pepsin A) (10, 11). Aktivnost pepsina lahko *in vitro* določimo s kvantifikacijo L-tirozinskih ostankov v vodni frakciji encimsko hidroliziranega hemoglobina (17).

3.1.3 Lipaza

Lipaze so encimi, ki prebavljajo triacilglicerole (triacilglicerol lipaze) oz. fosfolipide (fosfolipaze). Triacilglicerol lipaze katalizirajo hidrolizo triacilglicerola do prostih maščobnih kislin, monoacilglicerola ter diacilglicerola, fosfolipaze pa katalizirajo hidrolizo fosfolipidov. Človeška lipaza vključuje pre-duodenalno jezično in želodčno lipazo ter ekstra-duodenalne lipaze: pankreatično, hepatično, lipoproteinsko in endotelijsko lipazo (12).

Pre-duodenalni lipazi

Glavna pre-duodenalna lipaza pri človeku je želodčna lipaza, medtem ko je jezične lipaze zelo malo (12). Želodčna lipaza je odgovorna za hidrolizo 10-30 % zaužitih trigliceridov (18). Izločajo jo glavne celice v mukozni svodi želodca. Jezično lipazo izločajo von Ebnerjeve žleze jezika (12, 13). Želodčna lipaza se nahaja ob pepsinogenu v glavnih celicah mukoze svoda (13, 19). Pre-duodenalne lipaze delujejo pri nizkem pH in za svoje delovanje ne potrebujejo kofaktorjev. Človeška želodčna lipaza ima optimum delovanja v območju pH=3,0 - 6,0 v *in vivo* in pH=5,0-5,5 v *in vitro* pogojih (18, 20). Želodčna in jezična lipaza, serinski esterazi, delujeta v želodcu, kjer katalizirata hidrolizo triacilglicerolov. Lipaza je glikoprotein, glikanski del naj bi predstavljal 15 % teže encima (21).

Želodčna lipaza je sestavljena iz jedrne in ekstruzijske domene, ki posedujeta klasično katalitično triado (Ser 153, His 353, Asp 324) in oksianionsko špranjo. Oksianionska špranja stabilizira prehodno stanje. Katalitična triada in jedrna domena se nahajata pod ekstruzijsko domeno, ki se mora odmakniti, da substrat doseže aktivno mesto (21). Aktivno mesto postane dostopno, ko se encim veže na emulgiran substrat, saj pride do konformacijskih sprememb (22).

Ekstra-duodenalne lipaze

Od kolipaze odvisna pankreatična lipaza in z žolčnimi solmi stimulirana lipaza

Od kolipaze odvisna pankreatična lipaza je eksokrin encim trebušne slinavke, ki je potreben za intestinalno prebavo maščob. Za svoje encimsko delovanje potrebuje kolipazo - pankreatični protein, ki omogoči stabilizacijo encima v aktivni obliki.

Z žolčnimi solmi stimulirana lipaza se nahaja v soku trebušne slinavke. Najdemo jo tudi v človeškem mleku. Deluje skupaj z od kolipaze odvisno pankreatično lipazo v tankem črevesju. Odporna je na kislo okolje želodca. Od kolipaze odvisna pankreatična lipaza olajša absorpcijo prostih maščobnih kislin, z žolčnimi solmi stimulirana lipaza pa olajša absorpcijo prostega holesterola iz intestinalnega lumna (12, 20).

Hepatična lipaza

Hepatična lipaza nastaja v hepatocitih. Veže se na endotelijske celice jeter. Za svoje delovanje ne potrebuje kofaktorja. Najpogostejši substrat hepatične lipaze so trigliceridi

lipoproteinov srednje gostote (IDL), iz katerih lipaza tvori lipoproteine z malo trigliceridov in veliko holesterola. To so lipoproteini majhne gostote (LDL) (12).

Endotelijska lipaza

Endotelijska lipaza je izražena v pljučih, jetrih, ledvicah in placenti. Tvorijo jo endotelij. Zanja je primarno značilna fosfolipazna aktivnost. Sodeluje v presnovi lipoproteinov visoke gostote (HDL) (12).

Lipoproteinska lipaza

Lipoproteinsko lipazo tvori adipozno tkivo, srce, mišično tkivo in makrofagi. Nahaja se na stenah kapilar, kjer s hidrolizo cepi triacilglicerole, ki so ali del hilomikronov ali pa lipoproteinov zelo nizke gostote. Sprostijo se maščobne kisline, ki pridejo v celice ter se uporabijo v energijskem metabolizmu oz. se skladiščijo (23).

3.1.4 Prebava in absorpcija maščob

Prebava maščob je sestavljena iz vsaj treh postopnih korakov. Prvi korak vključuje emulgiranje prehranskih lipidov v lumnu želodca. Pride do tvorbe stika med vodno in lipidno fazo (medfaza olje-voda). Medfaza olje-voda omogoča interakcijo med vodotopno lipazo in v vodi netopnim, lipidnim substratom. V drugem koraku pride do encimske hidrolize triacilglicerolov z želodčno in jezično lipazo na medfazi emulgiranih lipidov. Lipaza srednjeveržne (8 do 10 ogljikovih atomov) triacilglicerole hidrolizira bolj kot dolgoveržne, pri čemer nastanejo diacilgliceroli in proste maščobne kisline kot glavni produkti. Delno hidrolizirani produkti se zaradi mehanskih sil želodca (krčenje mišic in praznjenje) emulgirajo in izločijo v dvanajstnik kot kapljice premera manjšega od 0,5 μm . V dvanajstnik se nato izločijo žolčne soli, žolčni lipidi in sok trebušne slinavke. Poteče hidroliza z od kolipaze odvisno pankreatično in z žolčnimi solmi stimulirano lipazo (18, 24). Iz produktov prebave maščob in žolčnih kislin nastanejo mešani miceli, v katere se vključijo tudi holesterol, produkti prebave fosfolipidov in v maščobah topni vitamini. Miceli omogočijo prenos produktov prebave do črevesnih resic, kjer poteče njihova absorpcija (23).

3.1.5 Mediji testov sproščanja, ki ponazarjajo želodčne pogoje v prisotnosti hrane

Biorelevantni mediji, namenjeni testom sproščanja farmacevtskih oblik, naj bi ponazarjali pogoje gastrointestinalnega trakta (želodca oziroma tankega črevesja), sestavo njegove vsebine in fizikalno-kemijske lastnosti. In vivo pogoji želodca določeni pri ljudeh v pogojih na tešče in v pogojih s hrano so navedeni v spodnji preglednici I (25). Pogoji s hrano so bili določeni po administraciji tekočega obroka Ensure®Plus (pH=6.6). Pogoji na tešče pa po administraciji vode.

Preglednica I: Pogoji s hrano in pogoji na tešče v želodcu (in vivo meritve). Podan je čas odvzema vzorcev (min) od zaužitja hrane oziroma vode, mediana pufrne kapacitete (mmol/L/ Δ pH), površinske napetosti (mN/m), osmolalnosti (mOsmol/kg) ter koncentracije žolčnih soli in pepsina, $c_{\text{žolčne soli}}$ oz. c_{pepsin} (mg/mL). LOQ je limita kvantifikacije uporabljene analizne metode z vrednostjo $<500 \mu\text{mol/L}$. Poskus je trajal 3,5 h (25).

Medij	Čas (min)	pH	Pufna kapaciteta (mmol/L/ Δ pH)	Površinska napetost (mN/m)	Osmolalnost (mOsmol/kg)	$c_{\text{žolčne soli}}$ ($\mu\text{mol/L}$)	c_{pepsin} (mg/mL)
fed	30	6,4	14-28	30	559	<LOQ	0,26-0,58
	210	2,7			217		
fasted	20	2,4	7	41,9- 45,5	80	<LOQ	0,11
	>20	1,7	18		140		0,22

Za simulacijo pogojev na tešče in pogojev s hrano v želodcu se uporabljajo različni mediji. Za najbolj primeren medij, ki ponazarja pogoje s hrano je bil predlagan homogeniziran obrok (z modifikacijami-npr. viskoznost, osmolalnost...), ki se uporablja v kliničnih študijah. Omejuje ga zahtevna analiza sproščene učinkovine (3). Mediji, ki se tudi uporabljajo za simulacijo pogojev s hrano so mleko (njegova slabost je neenakomerna sestava, ki je odvisna od obdobja laktacije živali in prehrane), tekoči obroki (Nutridrink in Ensure), emulzije... Ti mediji le deloma ponazarjajo pogoje želodca. Ne prikažejo sprememb v pH, prisotnosti encimov... uporaba emulzij pa ne simulira prisotnosti prehranskih ogljikovih hidratov (1).

Sestava in fizikalno-kemijske lastnosti želodčne vsebine se tekom prebave spreminjajo. Spremembe lahko dosežemo z več pristopi; z uporabo »zaporednih medijev« in postopno prebavo mleka med in vitro poskusom.

Z uporabo »zaporednih medijev« ponazorimo pogoje treh faz želodčne prebave; zgodnjo (prvih 75 min), srednjo (75-165 min) in pozno (po 165 min). Mediji so sestavljeni iz ustrezne količine mleka, ustreznega pufra, NaCl za uravnavanje osmolalnosti ter 0,1 M

HCl oz. 0,1 M NaOH za uravnavanje pH. Medij zgodnje faze (pH=6,4; 559 mOsm/kg) sestavljajo mleko, NaCl ter HCl oz. NaOH, medij srednje faze (pH=5,00; 400 mOsm/kg) acetatni pufer in mleko v razmerju 1:1 ter HCl, medij pozne faze (pH=3,00; 300 mOsm/kg) pa mleko in fosfatni pufer v razmerju 1:3 ter HCl (3).

Postopna prebava mleka lahko poteka na dva načina. Mleku lahko postopoma dodajamo kislino s pepsinom ter z oz. brez dodatka lipaze. Z lipazo ponazorimo želodčno lipolizo, saj se v želodcu prebavi okrog 40 % trigliceridov, sproščene proste maščobne kisline, digliceridi in 2-monogliceridi pa lahko močno vplivajo na sproščanje. Poleg lipolize ponazorimo tudi želodčno prebavo proteinov. V preglednici II je podan primer sestave medija, pridobljenega s postopno prebavo mleka (26).

Preglednica II: Sestava medija po različnih dodatkih kisline in pepsina v mleko (A) in sestava medija po različnih dodatkih kisline, pepsina in lipaze v mleko (B). Podane so koncentracije HCl (mM), pepsina (mg/mL) in lipaze (mg/mL) v izbranih časovnih točkah 360 minut trajajočega testa sproščanja (26).

	Čas (min)	Medij	HCl (mM)	Pepsin (mg/mL)	Lipaza (mg/mL)
	0	Mleko	0	0	0
A	30	mleko _{pepsin} ₃₀	43.9	0.44	0
	60	mleko _{pepsin} ₆₀	73.2	0.73	0
	90-360	mleko _{pepsin} ₉₀₋₃₆₀	102.5	1.03	0
B	30	mleko _{pepsin+lipaza} ₃₀	43.9	0.44	31.2
	60	mleko _{pepsin+lipaza} ₆₀	73.2	0.73	31.2
	90-360	mleko _{pepsin+lipaza} ₉₀₋₃₆₀	102.5	1.03	41.7

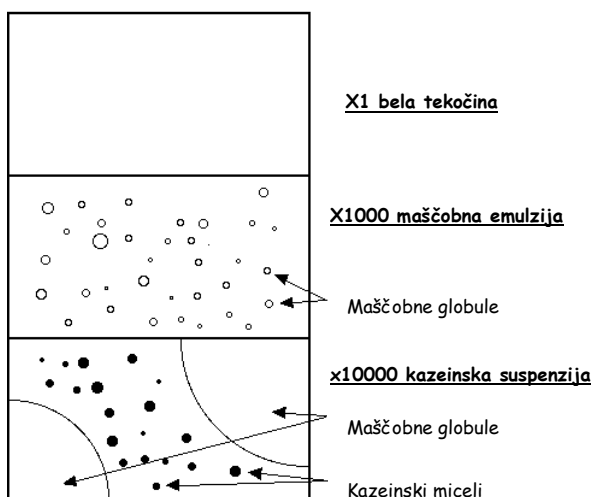
V preglednici III so prikazane nekatere fizikalno-kemijske lastnosti izbranih medijev sproščanja, ki ponazarjajo pogoje polnega želodca (24).

Preglednica III: Primerjava izbranih fizikalno-kemijskih lastnosti nekaterih medijev sproščanja, ki simulirajo pogoje polnega želodca (24).

Medij	pH	Pufer oz. drug medij, žolčne soli, fosfolipidi	Pufna kapaciteta (mmol/L/ Δ pH)	Površinska napetost (mN/m)	Osmolalnost (mOsmol/L)
Mleko (3,5 % maščobe)	6,5-6,63	Kravje mleko brez pufra	14	49±0,6	285±2,7
Ensure (30,1% maščobe)	6,58	Ensure brez pufra	16,4	47,8±0,1	375±3,5
Ensure plus (29,5 % maščobe)	6,45	Ensure Plus brez pufra, 0,45 % pektin	20,0±0,7	48,4±0,1	730±10
Emulzija FSGEM	5	Sezamovo olje, lavrinska kislina, 8,6 mM KCl, 32,2 mM NaCl, natrijev tavroholat, lecitin, lizolecitin			
FeSSGF	5	Acetatni pufer:mleko=1:1	25	400	
Medij s postopno prebavo mleka	a) 6,4-5,0 v 160 min	a) homogenizirano mleko 3,5% maščob			
	b) 6,4-2,6 v 120 min	b) a + pepsin			
	c) 6,4-3,8 v 120 min	c) b + lipaza			
Medij s postopno prebavo mleka	a) 6,5	a) homogenizirano mleko 3,5% maščob	a) 19		a) 260
	b) 6,5-2,6 v 360 min	b) a + pepsin v HCl raztopini	b) 32-38 v 360 min		b) 338-462 v 360 min
	c) 6,5-4,0 v 360 min	c) b + lipaza	c) 49-69 v 360 min		c) 475-540 v 360 min

3.2 Mleko

Mleko je biološka tekočina z različnimi vlogami sestavnih komponent: hranljivo, nehranljivo (npr. imunološko) in strukturno. V naravnem stanju zajema tri faze; je emulzija olje v vodi (ločimo jo lahko že s centrifugiranjem pri nizkih obratih), koloidna disperzija (precipitacija pri ultracentrifugiranju) in prava raztopina (27). Na spodnji sliki je prikazana skica strukture mleka pri različnih povečavah (28).



Slika 1. Struktura mleka (28).

Mleko sestavlja 87 % vode, 4,6 % laktoze, 3,4 % proteinov, 4,2 % maščob, 0,8 % mineralov in 0,1 % vitaminov. Sestava mleka se lahko spreminja in je odvisna od hranjenja, vrste živali oziroma človeka, faze laktacije in sezone (29). V mleku se nahajajo somatske celice (10^4 - 10^7 celic/mL v govejem mleku), med katerimi so epitelne celice (2 %) in levkociti (98 %). Levkociti vsebujejo različne encime (katalaza, proteaza...) (30).

3.2.1 Sestava mleka

Mleko sestavljajo naslednje frakcije (28):

- Plazma = mleko brez maščob
- Serum (sirotka) = plazma brez kazeinskih micelov
- Trdne snovi med katere ne štejemo maščob (SNF; solids-non-fat) = proteini, laktoza, minerali, kisline, encimi, vitamini
- Celokupne trdne snovi = SNF z maščobami

3.2.1.1 Ogljikovi hidrati

Glavni predstavnik ogljikovih hidratov v mleku je laktoza, prisotne pa so tudi manjše količine monosaharidov glukoze in galaktoze (prekurzorjev laktoze). Mleko vsebuje različne konjugate-glikokonjugate; oligosaharide, glikolipide, glikoproteine, glikozaminoglikane, mucine...

3.2.1.2 Dušikove komponente mleka

Dušik je sestavni del različnih komponent mleka, ki jih delimo v kazeine (78,5 %) in proteine sirotke oziroma seruma (16,5 %), ostali del predstavlja neproteinski dušik (5 %) (30).

V mleku so prisotne aminokisline in različni proteini, med katerimi so α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein, χ -kazein, β -laktoglobulin, a-laktalbumin, 0-laktalbumin, imunoglobulini, serumski albumini... Zaradi prisotnosti krvnega plazmina in plazminogena v mleku, so prisotni tudi manjši peptoni in večji peptidi γ -kazeini, ki so posledica post-translacijske proteolize. V mleku so številni drugi proteini in encimi, ki pridejo iz epitelnih celic ali krvi. Encimi se nahajajo prosto v raztopini ali pa so del membrane lipidnih globul. Koncentracija vseh proteinov znaša 36 g/L (30, 31). Odgovorni so za večino lastnosti mleka; kot so barva, penjenje, vonj...

Glavne sestavine mleka z neproteinskim dušikom so: sečnina, kreatin, kreatinin, sečna kislina, hipurna kislina, amoniak... Spojine se nahajajo tudi v urinu, zato bi lahko predstavljale le končni produkt N-metabolizma, ki pride v mleko iz krvi (30).

Kazeinski miceli

Kazeini so glavni fosfoproteini v mleku in se pojavljajo v obliki sferičnih kazeinskih micelov, ki jih sestavljajo α_{s1} -, α_{s2} -, β -, in χ -kazein. α_{s1} - in α_{s2} -kazein (skupno ime α_s -kazein) predstavljata 50 % vseh kazeinov (32, 33). Kazeinski miceli so največje proteinske komponente mleka in predstavljajo 20 % proteinov v človeškem in 80 % v govejem mleku. So koloidni kompleksi proteinov in soli (primarno kalcijeve soli) (30). Njihova funkcija je shranjevanje in transport kovinskih ionov (predvsem kalcij in magnezij) iz matere na otroka. Minerali predstavljajo 7 % suhe teže micelov (34).

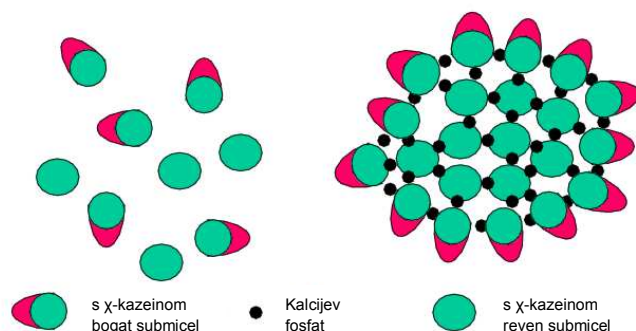
Kazeinske proteine delimo v dve skupini: na kalcij občutljive kazeine (v govejem mleku: α_s -kazein in β -kazein) in na kalcij neobčutljive kazeine (v govejem mleku: χ -kazein). Kalcij namreč povzroči precipitacijo kazeinov. Na kalcij občutljivi kazeini so močno fosforilirani, fosforilirani ostanki pa se nahajajo v skupkih (clusters) po 2, 3, ali 4. V mešanici obeh skupin kazeinov, na kalcij neobčutljivi kazeini preprečijo precipitacijo na kalcij občutljivih kazeinov (32). Kazeinski miceli so v vodnih suspenzijah stabilizirani sterično in z elektrostatskim odbojem sloja χ -kazeina na površini micela. Negativno nabiti

C-terminalni konci χ -kazeina štrlijo iz površine micelov in tvorijo sloj »laskov«, ki omogoča stabilizacijo (31, 34, 35, 36). Kazeinski miceli so odporni na visoko temperaturo, prisotnost soli ali etanola. Pri odstranitvi kalcijevega fosfata disocirajo. Nekateri viri navajajo agregacijo kazeinskih micelov pri povečani ionski moči seruma (večinoma s kalcijem in magnezijem) (27). Kalcijev fosfat lahko odstranimo s kelirajočimi sredstvi (npr. EDTA), acidifikacijo... (34).

Modeli kazeinskih micelov

Model submicelov

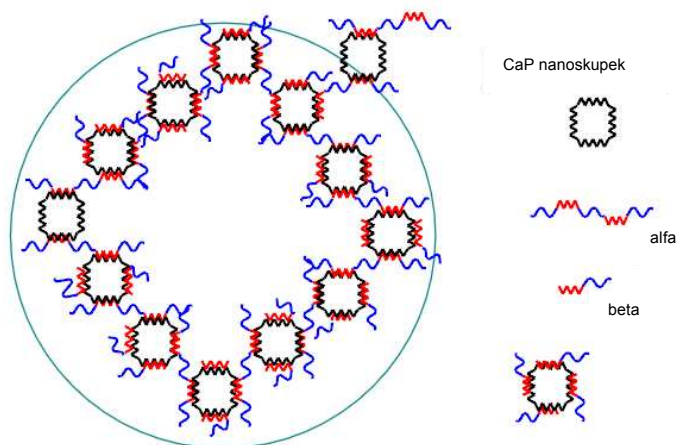
Kazeini se najprej povežejo v submicelle s 15-20 enot. Submiceli vsebujejo različne vrste kazeinov in se glede na vsebnost χ -kazeina delijo na; submicelle z veliko χ -kazeina in submicelle z malo oziroma brez χ -kazeina. Submiceli bogati s χ -kazeinom se nahajajo na površju micelov in se med seboj povežejo z disulfidnimi vezmi, ostali submiceli so v sredici micelov. Kazeini se s hidrofobnimi interakcijami najprej povežejo v submicel. Koloidni kalcijev fosfat poveže več submicelov v micel (28, 31, 32). Model je prikazan na spodnji sliki 2 (32).



Slika 2. Model submicelov; submiceli (levo) in submiceli povezani v micel (desno) (32).

Odprti model-Holtov model

Za razliko od modela submicelov povezava med kazeini ni posledica hidrofobnih interakcij, temveč interakcij med kazeini in kalcijevim fosfatom. Kalcijev fosfat je v obliki nanoskupkov (nanoclusters), ki interagirajo z α_s -kazeini in β -kazeini preko fosfoserinskih skupkov (interakcijsko področje na α_s - in β - kazeinih). α_s -kazeina imata več kot dva fosfoserilna konca zato omogočata navzkrižno povezovanje kazeinov v 3D strukturo. Model kazeinskega micela je prikazan na sliki 3 (32).

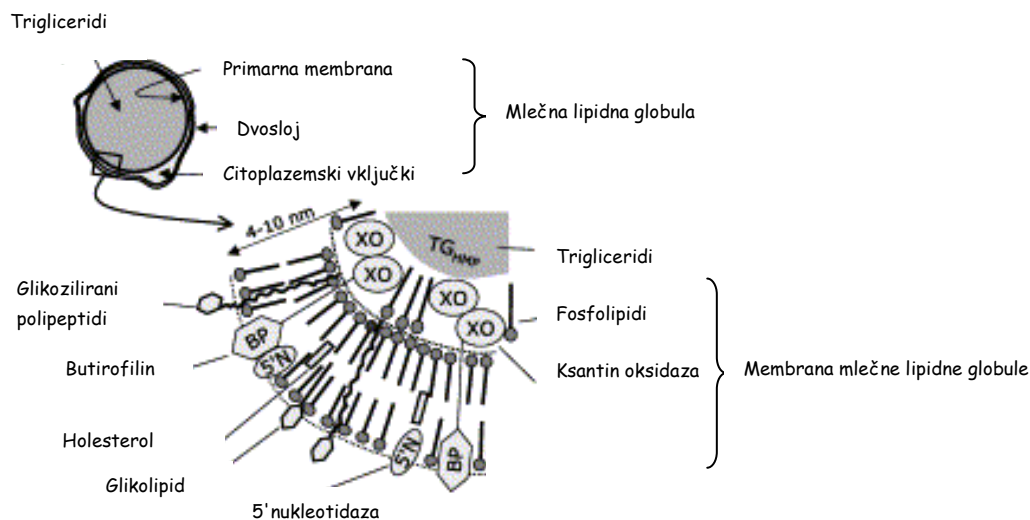


Slika 3. Holtov model micelov. α_s -kazein je bifunkcionalen, β -kazein je monofunkcionalen. Nanoskupki kalcijevega fosfata (CaP) imajo narisana štiri mesta interakcije s kazeini zaradi enostavnejše ilustracije. α_s -kazein se veže na nanoskupke, ki delujejo kot mostovi in omogočajo rast. Na levi strani v krogu se veriga zapre. Na desni strani zgoraj se veriga lahko nadaljuje (32).

3.2.1.3 Lipidi

Večina lipidov v mleku je dispergiranih v globule, katerih sredico obdaja membrana (MFGM-milk fat globule membrane). MFGM stabilizira lipidne globule (37). Lipidne globule so velike 0,2-10 μm , med njimi so manjše od 1 μm najštevilčnejše (70-90 %). V govejem mleku vsebuje sredica globul 99 % vseh lipidov, med katerimi je 95 % triacilglicerolov. Preostali del predstavljajo delni gliceridi, steroli, fosfolipidi, glikolipidi... Globule in membrana vsebujejo 80 % celotnega mlečnega holesterola (38, 39).

Membrana lipidnih globul je sestavljena iz primarne membrane, ki jo tvori fosfolipidni dvosloj in notranje enoslojne membrane iz fosfolipidov. Na notranji strani enoslojne membrane je sredica globul. Med membranama se nahaja material z večjo elektronsko gostoto (30, 38). Membrano poleg polarnih lipidov - fosfolipidov, sestavljajo še triacilgliceroli, glikosfingolipidi, estri vitaminov A in E in nekateri drugi lipidi. Prisotni so tudi različni proteini, glikoproteini, encimi; mucin, ksantin oksidaza, butirofilin... Med plastmi MFGM se lahko pojavijo vključki lunaste oblike. Ti vsebujejo citoplazmo epitelnih (mlečnih) celic, ki izločajo lipidne globule (30, 38, 40). Na spodnji sliki je prikazana skica mlečne lipidne globule (41)



Slika 4. Mlečna lipidna globula in membrana mlečne lipidne globule (41).

3.2.1.4 Minerali

Serum mleka vsebuje veliko ioniziranih natrijevih, kalijevih in kloridnih ionov. Divalentni kationi; kalcij, magnezij, cink... so v veliki meri vezani na proteine (npr. 85 % kalcija je vezanega v kazeinskih micelih) (30).

3.2.1.5 Vitamini in obrambni agensi

Mleko vsebuje vodotopne, v maščobah topne vitamine ter številne obrambne agense, ki se z materinim mlekom prenesejo na potomce (30).

3.2.2 Fizikalno-kemijske lastnosti

Gostota mleka znaša 1,03 g/mL (25 °C), viskoznost 1,9 mPas (25 °C) oz. 1,5 mPas (37°C), površinska napetost, pH, pufrna kapaciteta in osmolalnost so podane v preglednici III (Primerjava izbranih fizikalno-kemijskih lastnosti nekaterih medijev sproščanja, ki simulirajo pogoje polnega želodca) v poglavju 3.1.5 Mediji testov sproščanja, ki ponazarjajo želodčne pogoje v prisotnosti hrane.

Vzdrževanje pufrne kapacitete

Sestava mleka je pestra in ima neposreden vpliv na pufrno kapaciteto mleka. Glavni vpliv imajo fosfati, kalcij in kazeini.

Kalcij je vezan v kazeinskih micelih (90 %), ostali del pa predstavlja ionska oblika. Pri dodatku kisline se koloidni kalcij v kazeinskih micelih zamenja s protoni-njegovo vezavno mesto se protonira. Posledica so minimalne razlike v spremembi pH (42).

3.2.3 Obdelava mleka

3.2.3.1 Toplotna obdelava mleka

Pri segrevanju mleka nad 70 °C pride do denaturacije glavnih serumskih (serum je plazma brez kazeinskih micelov) proteinov, npr. β -laktoglobulinov (β -lg) in α -laktalbuminov (α -lac). Pri denaturaciji pride do izpostavitve reaktivnih tiolnih skupin, ki omogočajo kovalentno povezavo z drugimi spremenjenimi proteini (β -lg, α -lac, BSA, χ - in α_{s2} - kazeini). V segretem mleku s pH=6,5 se denaturirani proteini v večini vežejo na χ - kazein, ki je na površini kazeinskih micelov (pride do povečanja velikosti delcev). Denaturirani proteini so lahko v obliki prostih agregatov ali vezanih na kazeinske micle. Poleg denaturiranih se v segretem mleku nahajajo tudi nedenaturirani serumski proteini (43, 44). Če pH mleka pred segrevanjem povečamo, pride do disociacije χ -kazeinov s površine micelov. Posledično se manj denaturiranih proteinov veže na kazeinske micle (pri pH=6,5 se veže 80 %, pri pH=7,1 pa 20 % proteinov). Zaradi manjše količine vezanih proteinov je tudi viskoznost manjša kot pa v primeru, da pH ne spreminjamo (36, 43).

3.2.3.2 Nakisanje segretega mleka

Z nakisanjem mleka do izoelektrične točke kazeinov (pH=4.6) nevtraliziramo negativnen naboj kazeinskih »laskov« in tako zmanjšamo njihovo stabilnost (33). Ker je sterična stabilizacija zmanjšana, pride do Van der Waalsovih interakcij, miceli flokulirajo in nato koagulirajo. S segrevanjem mleka pred nakisanjem na 20 – 40 °C dvignemo pH geliranja, saj na kazeinske micle vezani denaturirani proteini (z izoelektrično točko pri pH=5.3) dvignejo izoelektrično točko na višje vrednosti pH (43, 44). Med nakisanjem mleka pride tudi do solubilizacije kalcijevega fosfata (njegovega izločanja iz micelov) in disociacije kazeinskih proteinov. Proces disociacije je izrazitejši pri nižjih temperaturah acidifikacije mleka (npr. pri 5 °C) (45).

3.2.4 Aktivnost encimov pri želodčni prebavi mleka

Maščobne globule so v želodcu zmešane s prebavnim sokom, kjer so izpostavljene različnim encimom (pepsin, želodčna lipaza), kislemu pH, elektrolitom in mehanskim

silam peristaltičnega gibanja. Vsi ti dejavniki lahko vplivajo na lastnosti globul in ostalih mlečnih komponent.

Želodčna hidroliza maščob vpliva na nadaljnjo prebavo mleka. Mlečne lipidne globule so namreč odporne na aktivnost pankreatične lipaze brez predhodne želodčne prebave. Na prebavo triacilglicerolov mleka vpliva tudi jezična lipaza, saj prodre v sredico mlečnih globul, kjer hidrolizira triacilglicerole brez motnje v MFGM. Delno hidrolizirani produkti gredo na površje globul in v tankem črevesju sodelujejo pri emulgiranju (20).

Pepsin hidrolizira proteine na površini MFGM, kar vodi v flokulacijo globul. Flokulirane globule povežejo, zaradi kombinacije pepsina in nizkega pH, agregirani kazeinski miceli (37). Agregati kazeinskih micelov tekom prebave s pepsinom rastejo, kar je posledica njihovih konformacijskih sprememb (16).

3.3 Natrijev diklofenakat

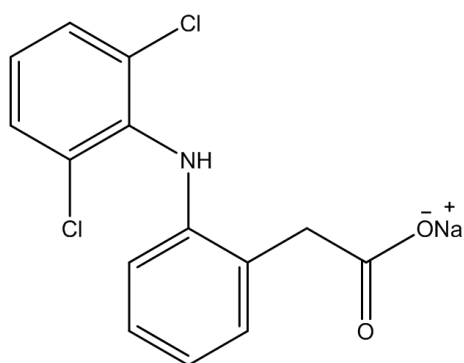
Natrijev diklofenakat (slika 5) spada v skupino nesteroidnih analgetikov in ima antipiretični (zniža povečano telesno temperaturo), analgetični (protibolečinski) ter antiinflamatorni (protivnetni) učinek. Je neselektivni inhibitor izoenzimov COX-1 in COX-2, ki katalizirata sintezo prostaglandinov in tromboksana iz arahidonske kisline (46). Uporablja se za lajšanje bolečin, zdravljenje revmatoidnega artritisa, osteoartritisa in zdravljenje drugih nerekumacijskih vnetij (10).

Diklofenak je šibka kislina s $pK_a=3,80$ pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logaritem porazdelitvenega koeficienta v sistemu n-oktanol/vodni pufer je 1,4 ($pH=6,8$) oz. 1,1 ($pH=7,4$).

Logaritem porazdelitvenega koeficienta $\log P$ v sistemu n-oktanol/voda pa je 4,40. V preglednici IV so podane topnosti natrijevega diklofenakata v medijih z različnimi pH vrednostmi (46).

Preglednica IV: Topnost natrijevega diklofenakata v medijih z različnimi pH vrednostmi. Topnost je podana v mg/mL (46).

pH	Medij	Topnost (mg/mL) (23,0°C)
1,2	0,1N 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



Slika 5. Strukturna formula natrijevega diklofenakata (46).

4 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo vrednotili sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem. S poskusi bomo poskušali razložiti vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti medija, ki ponazarja pogoje želodca po obroku, na sproščanje učinkovine.

S preliminarnimi testi sproščanja bomo razvili metodo, ki bo primerna za izvedbo končnih testov sproščanja. Uporabili bomo aparat 1 po USP, aparat 2 po USP oziroma pretočni sistem ter jih modificirali, če bo to potrebno.

Uporabili bomo različne medije; mleko, mleko z dodatki HCl, medij s postopno prebavo mleka (mleko z dodatki kisline, pepsina in lipaze), citratni pufer in citratni pufer z dodatki HCl. Z mlekom bomo ponazorili kemijsko sestavo zaužite hrane, z dodatki kisline in encimov pa sekrecije v želodcu po zaužitem obroku. S citratnim pufrom bomo nadomestili kompleksno mleko v testih sproščanja: test sproščanja v mleku in test sproščanja v mleku z dodatki HCl.

Teste sproščanja bomo izvedli v vseh petih medijih, jih primerjali in poskušali razložiti morebitne razlike v sproščanju med mlečnimi in pufrnimi mediji. Do razlik bi lahko prišlo zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti (osmolalnost, pufrna kapaciteta, površinska napetost, pH, kemijska sestava ...) uporabljenih medijev. Fizikalno-kemijske lastnosti mleka in citratnega pufra, ki jima bomo dodali kislino, encime oziroma oboje, se bodo tekom testov sproščanja spreminjale. Spremenjene lastnosti pa bi lahko vplivale na sproščanje učinkovine iz tablet.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Materiali in aparature

V in vitro testih sproščanja smo preučevali zdravilo Voltaren® retard s 100 mg učinkovine natrijev diklofenakat (Pliva). Tablete vsebujejo naslednje pomožne snovi:

Jedro tablete: brezvodni koloidni silicijev dioksid (E551), cetilalkohol, magnezijev stearat (E572), povidon, saharoza.

Filmska obloga tablete:

hipromeloza (E464), polisorbat 80 (E433), smukec (E553b), titanov dioksid (E171), železovi oksidi in hidroksidi (E172), makrogol 6000, saharoza.

Snovi in raztopine, ki smo jih uporabili:

- natrijev diklofenakat, Sigma-Aldrich Chemie, Mainland, Kitajska,
- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo $c(\text{NaOH})=1\text{ M}$, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- klorovodikova kislina Titrisol® za pripravo $c(\text{HCl})=1\text{ M}$, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- citronska kislina monohidrat, p.a. kakovosti, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a. kakovosti, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- trinatrijev citrat dihidrat, $\geq 99\%$, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- očetna kislina, 100 %, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija,
- puferske raztopine $\text{pH}=4$ in $\text{pH}=7$, Kefolab, Ljubljana, Slovenija,
- acetinitril, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA,
- Alpsko mleko, 3,5 % mlečne maščobe, Ljubljanske mlekarne, Ljubljana, Slovenija,
- Mleko v prahu, Murska Sobota, Slovenija,
- Bohinjsko mleko, mlekarna Planika Kobarid, Kobarid, Slovenija,
- Mleko Mu, 3,5 % mlečne maščobe, Ljubljanske mlekarne, Ljubljana, Slovenija,
- Lipaza (izvor Rhizopus Niveus) 2,94 U/mg, Sigma-Aldrich St. Luis. ZDA,
- Pepsin (iz želodčne mukoze prašičev), 994 enot/mg proteina, Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA,
- destilirana voda,
- bidestilirana voda (za HPLC)

Aparature, ki smo jih uporabili:

- Spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, HP, Waldbronn, Nemčija,
- Aparatura za testiranje sproščanja z vesli (USP 2) in s košaricami (USP 1), VanKel 7000, Vankel Technology Group, Cary, NC, ZDA,
- Aparatura za testiranje sproščanja z vesli (USP 2) in košaricami (USP 1), Agilent Technologies 708-DS, Waldbronn, Nemčija,
- Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti, Agilent Technologies 1100 Series, Waldbronn, Nemčija,
- Kolona Kranasil C18, 5 μ m, 4,6 mm x 150 mm, Macherey-Nagel, Duren, Nemčija,
- digitalna tehtnica Exacta 300 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija,
- analizna tehtnica AG245, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica,
- pH meter MA 5750, Iskra, Slovenija,
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica,
- avtomatska pipeta 20-200 μ L, Eppendorf, Hamburg, Nemčija,
- avtomatska pipeta 100-1000 μ L, Eppendorf, Hamburg, Nemčija,
- avtomatska pipeta 500-2500 μ L, Eppendorf, Hamburg, Nemčija,
- avtomatska pipeta 500-5000 μ L, Eppendorf, Hamburg, Nemčija,
- Full Flow filtri za USP aparat,
- membranski filtri z 0,45 μ m porami, Sartorius AG, Nemčija,
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija,
- večmestno magnetno mešalo Variomag POLY 15, Labortechnik AG, Nemčija,
- centrifuga Eppendorf 5415R, Hamburg, Nemčija,
- zamrzovalnik, LTH, Škofja Loka, Slovenija,
- plastične 2 mL centrifugirke (epice),
- plastične brizge,
- kovinske žičke (sinkerji), Vankel Technology Group, Cary, NC, ZDA,
- Vortex ekscentrično mešalo, IKA[®]-Werke, Staufen, Nemčija

Pretočni sistem za testiranje sproščanja, razvit na FFA:

- črpalka PA-M1 control, IKA-Werke, Nemčija,
- magnetno mešalo RET control visc, IKA-Werke, Nemčija,

- čaša 150 mL, Schott-Dural, Nemčija,
- steklene kroglice premera 1 mm,
- magnet dolžine 50 mm in premera 8 mm,
- čaša 1000 mL, Schott-Dural, Nemčija

5.2 Metode

5.2.1 Priprava medijev

1,83 M HCl

V 250 mL merilno bučko z nekaj destilirane vode smo nalili standardno raztopino (Titrisol®) za pripravo 1 M HCl in dopolnili do oznake z destilirano vodo. 114,4 mL tako pripravljene 4 M HCl smo redčili do 250 mL z destilirano vodo.

0,5 M HCl

V 1000 mL merilno bučko smo nalili nekaj destilirane vode in standardno raztopino (Titrisol®) za pripravo 1 M HCl. Vsebino smo dopolnili do oznake z destilirano vodo. Vsebino smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:1.

1 M NaOH

V 1000 mL merilno bučko z nekaj destilirane vode smo nalili standardno raztopino (Titrisol®) za pripravo 1 M NaOH in jo redčili do oznake z destilirano vodo.

0,1 M NaOH

10 mL pripravljene 1 M NaOH smo dopolnili z destilirano vodo do 100 mL.

50 mM fosfatni pufer pH=6,8

pKa vrednosti fosforne (V) kisline (47): $pK_{a1} = 2,15$, $pK_{a2} = 7,20$, $pK_{a3} = 12,35$.

V 1000 mL merilno bučko smo nalili nekaj destilirane vode in dodali 22 mL 1 M NaOH, ki smo jo odmerili z merilnim valjem. V vsebino smo nato stresli 6,8 g KH_2PO_4 . Raztopini smo dodali destilirano vodo do oznake 1000 mL ter v vseh primerih izmerili pH=6,8. pH meter smo predhodno umerili na pH=7.

50 mM citratni pufer pH=6,65

pKa citronske kisline (48): $pK_{a1} = 3,13$, $pK_{a2} = 4,76$, $pK_{a3} = 6,40$.

1,4075 g trinatrijevega citrata dihidrata smo raztopili v 100 mL destilirane vode. pH smo z 0,5 M HCl uravnali na pH=6,65. pH meter smo predhodno umerili na pH=7.

40 mM citratni pufer pH=6,68

V 1000 mL merilno bučko smo nalili nekaj destilirane vode in v njej raztopili 8,403 g citronske kisline. Dodali smo 116 mL 1 M NaOH in z destilirano vodo dopolnili do oznake. pH smo z 1 M NaOH uravnali do pH=6,68. pH meter smo predhodno umerili na pH=7. Zaradi primerjave z nadaljnjimi poskusi smo pH meter umerili na pH=4 in izmerili pH=6,80.

Citratno-acetatni pufer pH=6,68

pKa očetne kisline (48): $pK_a = 4,75$

Pufer smo pripravili z raztapljanjem 7,313 g citronske kisline, 0,692 mL očetne kisline ($\rho = 1,05 \text{ g/L}$) in 115 mL 1 M NaOH v litru destilirane vode. pH smo z 1 M NaOH uravnali do pH= 6,68. pH meter smo predhodno umerili na pH=7.

1,83 M HCl s pepsinom

55 mg pepsina smo dali v 50 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z 1,83 M HCl.

Citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl

Ustrezen volumen 1,83 M HCl smo v 1000 mL merilni bučki dopolnili do oznake s 40 mM citratnim pufrom pH=6,68. V preglednici V je podan volumen uporabljene 1,83 M HCl in koncentracija HCl v končni raztopini.

Preglednica V: Raztopine 40 mM citratnega pufru pH=6,68 in 1,83 M HCl. Volumen dodane 1,83 M HCl in koncentracija HCl v raztopini sta podana v mL oz. mM. Vse raztopine so bile dopolnjene s 40 mM citratnim pufrom do 1000 mL.

Volumen 1,83 M HCl (mL)	Koncentracija HCl v raztopini (mM)
0	0
16	29,3
32	58,6
48	87,8
56	102,3

Mleko s 102,3 mM HCl

56 mL 1,83 M HCl smo v 1000 mL bučki dopolnili z mlekom do oznake.

Mobilna faza

Acetonitril, organska faza, predstavlja 40 % in vodna faza 60 % delež v mobilni fazi. Vodno fazo smo pripravili z raztapljanjem 6,804 g KH_2PO_4 in 14 mL 1 M NaOH v nekaj mL bidestilirane razplinjene vode. Vsebino smo nato dopolnili z bidestilirano razplinjeno vodo do 1 L. pH dobljene raztopine smo uravnali z 1 M NaOH na vrednost pH=6,5. pH meter smo predhodno umerili na pH=7.

5.2.2 Določanje pH profila mlečnih vzorcev po dodajanju 1,83 M HCl

V poskusu smo uporabili več vrst mleka, ki smo mu postopoma dodajali 1,83 M HCl in med posameznimi dodatki izmerili pH. Uporabili smo Alpsko mleko (3,6 % maščob), mleko Mu (3,5 % maščob), mleko v prahu pripravljeno z destilirano vodo, mleko v prahu pripravljeno z navadno vodo in Bohinjsko mleko. Mleko v prahu smo pripravili po navodilih proizvajalca. Naredili smo eno paralelko za vsako vrsto mleka. Pripravili smo 100 mL vzorca vsake vrste mleka in vsebino mešali na večmestnem magnetnem mešalu. Izmerili smo začetni pH (pH vzorca brez dodane kisline) in poskus izvajali na sobni temperaturi. 0,8 mL 1,83 M HCl smo v vzorce dodajali z avtomatsko pipeto in pH izmerili minuto po dodatku kisline. Kisline smo v vzorce dali v času 0, 15, 30, 45, 60, 75 in 90 minut, v času 120 in 240 minut smo samo izmerili pH. Volumen medija se je zaradi dodatkov kisline povečeval.

5.2.3 Določanje pufrne kapacitete

Pufna kapaciteta predstavlja sposobnost pufrnih raztopin, da se upirajo spremembi pH po dodatku močne kisline ali baze. Izračunali smo jo z uporabo spodnje Van Slyke-ove enačbe 2 (49):

$$\beta = \frac{\Delta B}{\Delta pH} \quad /2/$$

β – pufna kapaciteta, ΔB – dodatek v mol/L (baze ali kisline na liter raztopine), ΔpH – sprememba pH, ki jo dodatek povzroči.

Eksperimentalno smo pufrno kapaciteto, pri sobni temperaturi 24,4°C, določevali na dva načina.

Metoda A: za titracijo smo uporabili 0,5 M oz. 0,5 M in 4 M HCl. Meritve smo izvajali s pH metrom umerjenim na pH=7 za vse vrednosti pH. Na ta način smo določili pufrno kapaciteto mleka (med posameznimi merjenji smo spirali elektrodo), fosfatnega puфра, vode, 50 mM in 40 mM citratnega puфра in citratno-acetatnega puфра. Uporabili smo 25 mL vzorca, ki smo mu postopoma, z merilno bireto, dodajali HCl, tako da se je pH spremenil za približno 0,4 enote. Vzorec smo med poskusom stalno mešali z magnetnim mešalom. pH smo odčitali takoj, ko je bila dosežena sprememba in se pH vzorca ni več spreminjal. V primeru uporabe 4 M HCl, smo vzorec najprej titrirali s 4 M HCl do pH=3,83±0,57, nato pa titracijo nadaljevali z 0,5 M HCl.

Metoda B: pH meter smo umerili na pH=4. Poskus smo vršili 240 minut. Tudi pri načinu 2 smo uporabili 25 mL vzorca. Dodajali smo mu 0,5 mL 0,5 M HCl vsakih 15 minut do vključno 195 minute. 1 mL smo dodali v času 210 in 225 minute ter 3 mL v času 240 minut. pH vzorca smo izmerili tik pred ponovnim dodatkom kisline. Kisline smo dodajali z avtomatsko pipeto in vzorec med poskusom stalno mešali na magnetnem mešalu.

Izmerjen pH in volumen porabljene HCl smo uporabili za izračun pufrne kapacitete. Testi določevanja pufrne kapacitete so navedeni v spodnji preglednici VI.

Preglednica VI: Določevanje pufrne kapacitete. Navedeni so mediji, umeritev pH metra in kislina, ki smo jo uporabili.

	medij	umeritev pH metra		HCl	
		pH=4	pH=7	0,5 M	4 M
Metoda A	mleko		+	+	
	destilirana voda		+	+	
	fosfatni pufer pH=6,8		+	+	
	50 mM citratni pufer		+	+	
	40 mM citratni pufer	-----	+	+	+
	citratno-acetatni pufer		+	+	
Metoda B	mleko	+		+	
	40 mM citratni pufer	+		+	

Koncentracije citratnega in citratno-acetatnega pufra smo določili na osnovi rezultatov, dobljenih z zgornjimi metodami.

5.2.4 Določevanje pH profila mleka in 40 mM citratnega pufra po dodajanju 1,83 M HCl

Uporabili smo Alpsko mleko in 40 mM citratni pufer. Poskus v obeh medijih smo izvedli vzporedno pri sobni temperaturi po primerljivem postopku opisanem v poglavju 5.2.2. Določanje pH profila mlečnih vzorcev po dodajanju 1,83 M HCl. Uporabili pa smo 50 mL vzorca, v katerega smo dodajali 0,4 mL 1,83 M HCl.

5.2.5 Analiza vzorcev

Vzorci, ki smo jih tekom poskusov dobili, smo obdelali, tako da so bili primerni za aplikacijo na izbrano aparaturo in detekcijo učinkovine.

5.2.5.1 Uporaba UV-VIS spektrofotometra

Priprava in redčenje osnovnih raztopin

Za določitev enačb umeritvenih premic smo pripravili tri osnovne raztopine natrijevega diklofenakata s koncentracijo učinkovine približno 100 mg/L v:

- citratnem pufru pH =6,68
- fosfatnem pufru pH=6,8
- citratnem pufru z različnimi dodatki 1,83 M HCl (navedenimi v preglednici V), ki smo ga redčili z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1.

Osnovne raztopine smo redčili, tako da smo dobili raztopine s koncentracijami učinkovine od 1 mg/L do 50 mg/L.

- enačbo umeritvene premice v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl smo naredili, tako da smo pripravili tri osnovne raztopine natrijevega diklofenakata v destilirani vodi s koncentracijo učinkovine približno 1000 mg/L. Osnovne raztopine smo redčili s citratnim medijem z dodatki 1,83 M HCl, tako da smo dobili raztopine s koncentracijami učinkovine od 1 mg/L do 50 mg/L.

Analiza z UV-VIS spektrofotometrom

Za vsako vrsto raztopine smo z uporabo UV-VIS spektrofotometra posneli spekter in določili absorpcijske maksimume za posamezen medij. Pri absorpcijskih maksimumih smo izmerili absorbance pripravljenih raztopin in določili enačbo umeritvenih premic.

5.2.5.2 Uporaba HPLC

Priprava in analiza vzorcev

Mlečne vzorce smo pripravili za analizo s HPLC, tako da smo najprej odpipetirali 300 µL vsebine vzorca v 2 mL centrifugirne epruvete. Dodali smo 900 µL acetonitrila za obarjanje proteinov in tresli z Vortexom 20 sekund. Vzorce smo nato zamrznili na -20 °C. Vzorci so bili v zamrzovalniku vsaj en dan. Odtajali smo jih na sobni temperaturi in še enkrat pretresli z Vortexom (20 s). Vzorce smo 10 minut centrifugirali pri temperaturi 10°C in 15.000 g. Supernatant smo odpipetirali v vialo ter analizirali s HPLC. Uporabili smo kolono Kranasil C18, 5 µm in 4,6 x 150 mm. Injicirali smo 20 µL obdelanega vzorca in signal merili pri 276 nm in T=40°C. Pretok mobilne faze smo uravnali na 1,2 mL/min. Retencijski čas natrijevega diklofenakata je 2,4 min.

Umeritvene premice in standardi

Umeritvene premice smo pripravili s pomočjo osnovne raztopine natrijevega diklofenakata s koncentracijo učinkovine približno 600 mg/L v:

- mleku,
- mleku, ki vsebuje 102,3 mM HCl,
- mleku, ki vsebuje 102,3 mM HCl redčenim z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 (za izdelavo umeritvene premice smo uporabili svež medij - mleko z 102,3 mM HCl, ki

je ostal po končanem testu sproščanja PS-CK opisanem v poglavju 5.2.7.2 Končni testi sproščanja).

- mediju s postopno prebavo mleka (mleko + HCl + pepsin + lipaza). Za izdelavo umeritvene premice smo uporabili svež medij, ki je ostal po končanem testu sproščanja PS-MKLP opisanem v poglavju 5.2.7.2 Končni testi sproščanja,
- mobilni fazi.

Osnovno raztopino smo redčili, tako da smo dobili raztopine s koncentracijami od 30 mg/L do 600 mg/L.

- umeritveno premico v mleku redčenim z 0,1 M NaOH smo naredili, tako da smo osnovno raztopino natrijevega diklofenakata v mleku redčili z NaOH v razmerju 1:1. Dobljeno raztopino s koncentracijo učinkovine približno 300 mg/L smo redčili, tako da smo dobili raztopine s koncentracijo od 15 mg/L do 300 mg/L.

Tekom poskusov smo dnevno pripravili tudi kontrolne vzorce standardov, s katerimi smo potrdili med dnevno ponovljivost analizne metode. Raztopine smo analizirali s HPLC.

Vpliv mlečnega medija na določanje koncentracije učinkovine

Pripravili smo raztopine visokih koncentracij (od 5 mg/L do 100 mg/L) natrijevega diklofenakata v fosfatnem pufru pH=6,8 in mleku pH=6,65, ki smo jih obdelali po spodaj opisanem postopku. Primerjalno smo naredili raztopine z nizkimi koncentracijami (od 0,25 mg/L do 5 mg/L) natrijevega diklofenakata in jih, brez obdelave, vzporedno z obdelanimi raztopinami z visokimi koncentracijami učinkovine aplicirali na HPLC sistem. Koncentracije natrijevega diklofenakata v raztopinah z visokimi koncentracijami učinkovine so po obdelavi (zaradi redčenja) enake koncentracijam v raztopinah z nizkimi koncentracijami učinkovine. Koncentracije pripravljenih raztopin so navedene v preglednici VII.

Preglednica VII: Priprava, redčenje raztopin za vrednotenje vpliva mlečnega medija na določanje koncentracije natrijevega diklofenakata v vzorcih. Podane so koncentracije osnovnih raztopin, njihova redčenja in koncentracije redčenih raztopin.

medij	Koncentracija osnovne raztopine (mg/L)	VISOKE koncentracije učinkovine (raztopine VK)		NIZKE koncentracije učinkovine (raztopine NK)	
		redčenje	konc.(mg/L)	redčenje	konc.(mg/L)
Fosfatni pufer pH=6,8	100,1	20x	5,01	400x	0,25
		2x	50,05	40x	2,50
		-	100,10	20x	5,01
Mleko pH=6,65	99,3	20x	5,01		
		2x	49,65		
		-	99,30		

300 µL pripravljene raztopine VK (mlečne in fosfatne) smo dodali 900 µL acetonitrila, stresali z Vortexom 20 s in vsebino 10 minut centrifugirali pri temperaturi 10°C in 15.000 g. Po centrifugiranju smo pufrne vzorce in supernatant (pri mlečnih vzorcih) 5x redčili z mobilno fazo (200 µL + 800 µL) ter dobljeno raztopino aplicirali na HPLC. Fosfatne vzorce z nizkimi koncentracijami učinkovine (raztopine NK) smo aplicirali brez obdelave in redčenja.

Vpliv zamrzovanja vzorcev na določanje koncentracije učinkovine

Za določitev tega vpliva smo naredili sedem raztopin z različnimi koncentracijami učinkovine v mleku. Iz njih smo pripravili dva niza vzorcev. En niz smo pripravili za analizo po postopku opisanem v poglavju 5.2.5.2 Uporaba HPLC. Supernatant smo redčili v razmerju 1:2 z mobilno fazo. Drugi niz smo pripravili na enak način, vendar vzorca nismo zamrznili.

5.2.6 Določevanje topnosti natrijevega diklofenakata

Topnost učinkovine smo določili v 50 mM fosfatnem (pH=6,8) in 40 mM citratnem pufru (pH=6,68). Za vsak medij smo naredili tri paralelke. Poskus smo izvajali v 5 mL bučkah. Vanje smo stresli približno 53 mg učinkovine (v presežku), natrijevega diklofenakata, in do oznake dopolnili z ustreznim medijem. V bučke smo dali magnete ter postavili na magnetna mešala z vodno kopeljo temperature 37°C. V času 2h, 6h in 24h smo iz vsake bučke odvzeli 150 µL vzorca, ga filtrirali z membranskimi filtri (velikost por 0,45 µm) in takoj dodali 2850 µL ustreznega pufru. Tako pripravljene vzorce smo nato redčili 10-20 krat in analizirali z UV-VIS spektrofotometrom.

5.2.7 Testi sproščanja

V preglednici VIII so navedeni vsi testi sproščanja.

Preglednica VIII: Izvedeni testi sproščanja.

Test sproščanja	medij	Volumen (mL)	aparatura
USP1-1000/P	Fosfatni pufer pH=6,8	1000	Aparat 1 po USP
USP1-600/P	Fosfatni pufer pH=6,8	600	Aparat 1 po USP
USP1-300/P	Fosfatni pufer pH=6,8	300	Aparat 1 po USP
USP2-300/P	Fosfatni pufer pH=6,8	300	Aparat 2 po USP + žička obešena nad veslo
USP1-300/C	40 mM citratni pufer pH=6,73	300	Aparat 1 po USP
USP2-C	40 mM citratni pufer pH=6,68	300	Aparat 2 po USP + uteževalec
USP2-M	Mleko pH=6,67	300	Aparat 2 po USP + uteževalec
USP2-CK	40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl	300	Aparat 2 po USP + uteževalec
USP2-MK	Mleko z dodatki 1,83 M HCl	300	Aparat 2 po USP + uteževalec
PS-C	40 mM citratni pufer pH=6,70	300	Aparat 2 po USP + uteževalec
PS-M	Mleko pH=6,67	40	Pretočni sistem
PS-CK	40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl	40	Pretočni sistem
PS-MK	Mleko z dodatki 1,83 M HCl	40	Pretočni sistem
PS-MKLP	Medij s postopno prebavo mleka	40	Pretočni sistem

5.2.7.1 Preliminarni testi sproščanja

Preliminarne teste sproščanja smo izvedli z aparatom 1 po USP in aparatom 2 po USP. Aparat 2 po USP smo prilagodili; zvito žičko s tableto smo s kovinsko palčko pritrdili na pokrov aparature 2 po USP, tako da je visela nad robom vesla (26). V nekaterih primerih smo žičko uporabili kot uteževalec. Žičko smo oblikovali, tako da med poskusom ni poškodovala nabrekle tablete. Uporabili smo fosfatni pufer pH=6,8 in citratni pufer pH=6,73.

Testi sproščanja v fosfatnem pufru pH=6,8 USP1-1000/P, USP1-600/P, USP1-300/P in USP2-300/P

V posodo, za testiranje sproščanja, aparata 1 in aparata 2 po USP smo nalili ustrezen volumen fosfatnega pufra s pH=6,8 (preglednica IX) in ga segreli na temperaturo 37 °C. Hitrost vrtenja mešala oziroma košarice je bila 100 obratov/min. Lega tablet v testih sproščanja je podana v preglednici IX. Vzorčili smo z avtomatskim vzorčevalnikom v različnih časovnih intervalih, pri čemer zmanjšane količine medija volumna zaradi jemanja vzorcev nismo nadomeščali. Vzorce smo analizirali z UV-VIS spektrofotometrom in jih, če je bilo potrebno, predhodno redčili. Ostanka učinkovine v tabletah nismo določili.

Test sproščanja v citratnem pufu USP1-300/C

V posodo za testiranje sproščanja aparata 1 po USP smo nalili 300 mL 40 mM citratnega pufru s pH=6,73. Segreli smo ga na temperaturo 37 °C. Hitrost vrtenja košarice je bila 100 obratov/min. Vzorčenje smo prilagodili po članku 26. Vzorčili smo ročno v časovnih intervalih 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 in 360 minut. Vzorčenje je potekalo s pomočjo 5 mL brizge in kanile, ki smo jo pritrdili nanjo. Volumen vzorca je bil 4 mL. Zmanjšan volumen medija smo vsakih 15 minut, od časa 0 do vključno 90 minut, nadomestili z 2,4 mL, v času 120, 180, 240, 300 in 360 minut pa s 4 mL slepega medija. Ostanek tablete smo dali v 200 mL merilno bučko, dopolnili do oznake s citratnim pufrom in na magnetnem mešalu pustili do naslednjega dne. Vzorce smo filtrirali z membranskimi filtri, velikosti por 0,45 µm, jih po potrebi redčili in analizirali z UV-VIS spektrofotometrom.

Preglednica IX: Pogoji, ki smo jih tekom preliminarnih testov sproščanja v fosfatnem in citratnem pufru spreminjali: volumen medija in vzorca, vrsta aparature, položaj tablete (PD-prosto, na steni tik ob dnu posode; K-v košarici; ŽV- v žički nad veslom), nadomeščanje vzorca in način vzorčenja.

Test sproščanja	Volumen medija (mL)	Volumen vzorca (mL)	Aparatura (poUSP)	višina vesla/košarice (mm nad dnom posode)	položaj tablete	Način vzorčenja	Nadomeščanje vzorca
USP2-1000/P	1000	5	USP 2	25±2	PD	avtomatsko	ne
USP1-300/P	300	3	USP 1	25±2	K	avtomatsko	ne
USP1-600/P	600	3		25±2			
USP1-1000/P	1000	3		25±2			
USP2-300/P	300	3	USP 2	20±2	ŽV	avtomatsko	ne
USP1-300/C	300	4	USP 1	25±2	K	ročno	da

Testa sproščanja v citratnem pufu USP2-C in mleku USP2-M

Sproščanje smo izvedli v 300 mL 40 mM citratnega pufru pH=6,68 in 300 mL mleka s pH=6,67 pod enakimi pogoji sproščanja in enakim načinom vzorčenja kot test sproščanja USP1-300/C, vendar z aparaturo 2 po USP in uporabo uteževalca. Tableto smo v obeh poskusih dali v kovinsko žičko (uteževalec), ki smo jo naredili sami. Žička je bila tako velika, da med poskusom ni poškodovala nabrekne tablete. Žičko s tableto smo v času 0 min spustili v medij, da se je potopila na dno posode. Pufrne vzorce smo analizirali z UV-VIS spektrofotometrom, mlečne vzorce pa s HPLC. Ostanek smo pri obeh poskusih določili, tako da smo preostanek tablete prenesli v 200 mL merilno bučko in dopolnili do

oznake s citratnim pufrom, vsebino pustili preko noči na magnetnem mešalu ter analizirali z UV-VIS spektrofotometrom oziroma HPLC.

Testa sproščanja v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl USP2-CK in mleku z dodatki 1,83 M HCl USP2-MK

V posodo za testiranje sproščanja aparata 2 po USP smo nalili 300 mL citratnega pufra oziroma mleka. Medij smo segreli na temperaturo 37 °C. Hitrost vrtenja košarice je bila 100 obratov/min. Vzorčili smo ročno v časovnih intervalih 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 in 360 minut. Volumen vzorca je bil 4 mL. V medij smo vsakih 15 minut v času od 0 do 90 minut dali 2,4 mL 1,83 M HCl. V času 120, 180, 240, 300, 360 minut smo v pufrni medij dali 4 mL citratnega pufra s 102,3 mmol/L HCl, v mlečni medij pa mleko s koncentracijo HCl 102,3 mmol/L. V preglednici X so navedene koncentracije kisline, ki smo jih dosegli v posodi aparata 2 po USP v obeh medijih (citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl in mleko z dodatki 1,83 M HCl) v času odvzema vzorcev.

Vzorke sproščanja v citratnem pufru smo obdelali na dva načina. Pri obeh smo izhajali iz istih vzorcev. Prvi način je bil z dodatkom 1,5 mL 0,1 M NaOH (paralelka USP2-CKB), ki smo jo dodali 1,5 mL nefiltriranega vzorca. Disperzijo smo filtrirali (membranski filter velikosti por 0,45 µm). Pri drugem načinu vzorcu nismo dodali baze, temveč smo preostanek prvotnega vzorca samo filtrirali. Preostanek tablete smo na koncu testa sproščanja prenesli v 200 mL merilno bučko in do oznake dolili citratni pufer pH=6,7 ter vsebino pustili preko noči na magnetnem mešalu. 4 mL vsebine smo nato filtrirali z membranskim filtrom. Filtrirane raztopine smo analizirali z UV-VIS spektrofotometrom.

Mlečne vzorce smo analizirali s HPLC. Preostanek tablet v testu sproščanja USP2-M smo dopolnili do 200 mL s citratnim pufrom pH=6,7 in vsebino pustili preko noči na magnetnem mešalu. 300 µL vsebine smo pripravili za analizo s HPLC (postopek je opisan v poglavju 5.2.5.2. Uporaba HPLC).

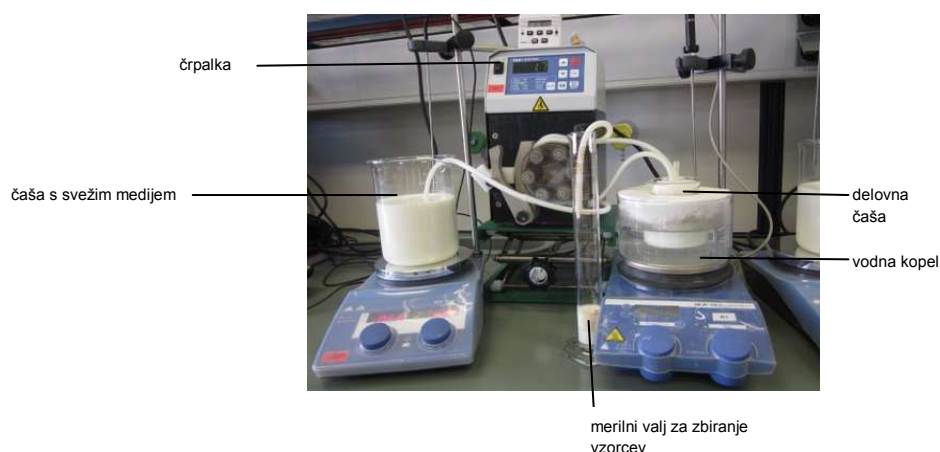
Preglednica X: Koncentracija HCl tekom testov sproščanja v 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl (USP2-CK) in mleku z dodatki 1,83 M HCl (USP2-MK) v času odvzema vzorca (t).

t (min)	Koncentracija HCl v mediju (mM)
0	0
30	29,3
60	58,6
90	87,8
120-360	102,3

5.2.7.2 Končni testi sproščanja

Pretočni sistem

Sledeče teste smo izvedli na pretočnem sistemu, ki je bil razvit na FFA (slika 6). Sproščanje je potekalo v 150 mL čaši, kjer smo imeli 40 mL medija s temperaturo 37 °C, 25 g steklenih kroglic in magnetno mešalo (2r =1 mm, d=50 mm, Φ =8 mm), ki je mešalo s hitrostjo 50 obratov/ minuto. V čašo smo dovajali svež medij s pretokom 2 mL/min in z enakim pretokom iz čaše odvajali medij s sproščeno učinkovino. Uporabili smo predhodno pripravljene oziroma sveže medije. Sveže medije smo pripravili v čaši, iz katere smo jih odvajali v delovno čašo. Vzorčili smo v merilne valje v 30 minutnih intervalih. Volumen vzorca je bil 60 mL. Analiza vzorcev je bila odvisna od medija v katerem smo sproščali. Uporabili smo HPLC in UV-VIS spektrofotometer.



Slika 6. Pretočni sistem za testiranje sproščanja.

Test sproščanja v citratnem pufru PS-C

Celoten test smo izvedli v čistem 40 mM citratnem pufru pH=6,7. Dobljene vzorce smo filtrirali z membranskimi filtri (velikost por 45 μ m), če je bilo potrebno redčili, in

analizirali. Ostanek smo določili, tako da smo 40 mL medija, ki je ostal na koncu poskusa dali v 100 mL merilno bučko, s citratnim pufrom sprali kroglice, vsebino dolili v bučko, dopolnili do oznake ter pustili na magnetnem mešalu preko noči in nato filtrirali 4 mL vsebine. Analizo smo izvedli z UV-VIS spektrofotometrom.

Test sproščanja v mleku PS-M

Test smo izvedli v mleku (pH=6,68). Vzorce ene paralelke smo obdelali na dva načina. Pri prvem načinu smo 300 μ L vzorca obdelali s postopkom obarjanja (PS-M1) opisanem v poglavju 5.2.5.2. Uporaba HPLC. Pri drugem načinu pa smo 1 mL vzorca dodali 1 mL 0,1 M NaOH (PS-M1B), dobro premešali, odpipetirali 300 μ L vsebine in jo prav tako obdelali s postopkom obarjanja. Vzorce preostalih dveh paralelk smo obdelali samo na prvi način. Ostanek učinkovine v delovni čaši smo določili po enakem postopku kot pri poskusu USP2-M (vendar do 100 mL dopolnili z mlekom), v primeru poskusa, koder smo vzorce redčili z bazo, smo ostanek učinkovine v delovni čaši določili, tako da smo vsebino v delovni čaši prelili v 100 mL merilno bučko in dopolnili z mešanico mleko:baza=1:1. Analizo smo izvedli s HPLC.

Testa sproščanja v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl PS-CK in mleku z dodatki 1,83 M HCl PS-MK

Pogoje testov sproščanja PS-CK in PS-MK smo prilagodili po članku 26. Teste sproščanja smo izvedli v 40 mM citratnem pufru pH=6,7 in mleku, ki smo jima tekom poskusa dodajali ustrezno količino 1,83 M HCl.

Mediji v delovni čaši in čaši s svežim medijem tekom testa sproščanja:

- Delovna čaša: v času 0 min citratni pufer oziroma mleko, kasneje doveden medij (citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl oz. mleko z različnimi dodatki 1,83 M HCl) iz čaše s svežim medijem.
- Čaša s svežim medijem: v času 0 minut prvi dodatek 1,83 M HCl v citratni pufer oz. mleko, čas in volumen kasnejših dodatkov 1,83 M HCl v posamezen medij so navedeni v preglednici XI.

Vzorcem obeh medijev smo dodali 0,1 M NaOH v razmerju 1:1, da se je raztopila v kislem oborjena učinkovina, in jih analizirali. Ostanek smo določili v obeh primerih, tako da smo 40 mL ostanka v čaši (s tableto), kjer je potekalo sproščanje, odlili v bučko, vanjo spraznili

vsebino silikonskih cevk ter do oznake dolili 0,1 M NaOH, pustili na magnetnem mešalu preko noči in analizirali. Za analizo smo uporabili UV-VIS spektrofotometer in HPLC.

Test sproščanja v mediju s postopno prebavo mleka PS-MKLP

Sproščanje smo izvedli v mleku, tako da smo mu dodajali 1,83 M HCl s koncentracijo pepsina 1,1 mg/mL. Poleg raztopine pepsina v 1,83 M HCl smo v čašo s svežim medijem 2 min pred začetkom poskusa dodali 23,44 g in v času 88 min 6,282 g lipaze (svež medij smo pred začetkom poskusa segrevali na 37 °C in temperaturo vzdrževali tekom celotnega poskusa).

Mediji v delovni čaši in čaši s svežim medijem tekom testa sproščanja:

- Delovna čaša: v času 0 min mleko, kasneje doveden medij (mleko z različnimi dodatki 1,83 M HCl s pepsinom in lipaza) iz čaše s svežim medijem.
- Čaša s svežim medijem: V času 0 minut prvi dodatek 1,83 M HCl s pepsinom v mleko, ki je vsebovalo 23,44 g lipaze, čas in volumen kasnejših dodatkov 1,83 M HCl v medij so navedeni v preglednici XI. V času 88 min drugi dodatek lipaze (6,282 g).

Učinkovino, ki se iz tablete ni sprostila smo določili, tako da smo v bučko prenesli preostanek medija s tableto iz čaše, kjer se je učinkovina sproščala (steklene kroglice smo sprali z NaOH), vsebino iz silikonskih cevk in dopolnili do oznake z 0,1 M NaOH. Vzorce smo analizirali s HPLC.

Preglednica XI: Priprava svežega medija-čas in volumen dodane 1,83 M HCl (oz. HCl z raztopljenim pepsinom koncentracije 1,1 mg/mL) v čašo s svežim medijem. Postopek uporabljen pri testih sproščanja PS-CK, PS-MK in PS-MKLP.

čas (min)	volumen 1,83 M HCl (mL) oziroma 1,83M HCl z 1,1 mg/mL pepsina
0	6
15	5,808
30	5,614
45	5,419
60	5,223
75	5,024
90	4,825

5.2.7.3 Izračun količine sproščene učinkovine iz tablet

Koncentracijo učinkovine v vzorcih smo izračunali s pomočjo enačb ustreznih umeritvenih premic. Pri računanju koncentracije smo upoštevali redčenja vzorcev. Maso učinkovine v

posodi v času t smo izračunali po enačbi 3:

$$m_n = c_n * V_n \quad /3/$$

V primeru, ko volumna odvzetega vzorca nismo nadomeščali, smo to upoštevali pri izračunu volumna (enačba 4):

$$V_n = V_m - V_{vz} * (n - 1) \quad /4/$$

Če smo volumen odvzetega vzorca nadomeščali smo pri izračunu mase upoštevali (enačba 5):

$$V_n = V_m \quad /5/$$

Maso sproščene učinkovine smo izračunali po enačbi 6:

$$m_n^d = c_n * V_n + V_{vz} * (c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1}) \quad /6/$$

Pri računanju količine sproščene učinkovine v vzorcih, dobljenih na pretočnem sistemu, smo maso izračunali po enačbi 7:

$$m_n^d = c_n * 60 \text{ mL} \quad /7/$$

Iz dobljene mase smo (pri vseh testih sproščanja) izračunali odstotek sproščene učinkovine v n-tem času (enačba 8):

$$\% \text{ sproščene učinkovine} = (m_n^d / M) * 100 \quad /8/$$

Uporabljene spremenljivke:

c - koncentracija učinkovine, m_n - masa učinkovine (mg) v n - tem vzorcu v času t (mg), c_n - koncentracija učinkovine v n - tem vzorcu (mg/L), V_n - volumen medija v času odvzema n - tega vzorca, V_m - začetni volumen medija, V_{vz} - volumen vzorca, m_n^d - dejanska masa učinkovine sproščene v času t (mg), M - masa učinkovine v tableti (mg).

5.2.7.4 Vrednotenje profilov sproščanja

Profile sproščanja smo primerjali z izračunom faktorja različnosti (f_1) in faktorja podobnosti (f_2). Izbrali smo povprečna profila sproščanja v posameznih medijih, ki smo ju primerjali (profil R in profil T). Faktorje smo izračunali z enačbo 9 in enačbo 10 (50):

$$f_1 = \left(\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right) * 100 \quad /9/$$

$$f_2 = 50 * \log [(\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2)^{-0,5} * 100] \quad /10/$$

Za izračun smo uporabili odstotke sproščene učinkovine v času 30-180 minut.

Uporabljene spremenljivke:

n - število točk v profilu, R_t - odstotek raztopljenе učinkovine iz profila R v času t ,
 T_t - odstotek raztopljenе učinkovine iz profila T v času t .

Zahteve, ki smo jih upoštevali pri izračuni f_2 (51):

- uporaba minimalno treh časovnih točk,
- največ ena časovna točka z > 85 % sproščene učinkovine posameznega profila,
- RSD je v prvi meritvi manjša od 20 %, v ostalih pa manjša od 10 %,
- Krivulji sta podobni, če je vrednost f_1 blizu 0 (med 0-15) in vrednost f_2 blizu 100 (med 50-100).

5.2.8 Določitev pH profilov medijev med testi sproščanja

Preliminarni test določitve pH profila v mediju s postopno prebavo mleka

Pred začetkom sproščanja, smo naredili poskus v katerem smo uporabili medij s postopno prebavo mleka (začetni pH=6,58). Medij, ki smo ga tvorili, smo konstantno mešali na magnetnem mešalu. Poskus smo izvajali 360 minut pri sobni temperaturi. Volumen vzorca je bil 50 mL. 0,4 mL kisline, v kateri smo predhodno raztopili pepsin (1,1 mg/mL HCl), smo dodajali mleku v času 0, 15, 30, 45, 60, 75 in 90 minut. Lipazo smo dodali v času 0 (1,56 g) in 90 minut (0,52 g). pH smo izmerili vsakih 5 minut od 0 do 90 minut, nato pa pri 120, 180, 240, 300 in 360 minut. Merili smo ga minuto po dodatku kisline. Volumen medija se je zaradi dodatkov povečeval.

Aparat 2 po USP

pH profil mleka in mleka z dodatki 1,83 M HCl

Poskusa s katerim smo določili pH profil mleka in mleka z dodatki 1,83M HCl, smo izvedli vzporedno na aparatu 2 po USP. Poskusa smo izvajali pri enakih pogojih in istemu postopku kot testa sproščanja USP2-M (za določitev pH profila mleka) in USP2-MK (za določitev pH profila mleka z dodatki 1,83 M HCl) opisana v poglavju 5.2.7.1. Preliminarni testi sproščanja, vendar brez uporabe tablete. Medij smo odvzeli na enak način kot je

potekalo vzorčenje v testih sproščanja USP2-M oziroma USP2-MK v časovnih intervalih 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 in 360 minut. pH meter smo umerili na pH=4 in izmerili pH odvzetega medija.

pH profil 40 mM citratnega pufra z dodatki 1,83 M HCl

pH profil medija smo določili med testom sproščanja USP2-CK (uporabili smo tableto) opisanem v poglavju 5.2.7.1. Preliminarni testi sproščanja, in sicer, tako da smo izmerili pH vrednosti vzorcev, ki smo jih odvzeli. Merjenje smo izvedli na paralelki USP2-CK3.

Vzporedno s testom sproščanja USP2-CK smo, na aparaturi 2 po USP, tvorili enak medij kot pri testu sproščanja USP2-CK. Postopali smo na enak način, vendar brez uporabe tablete. Določili smo pH profil medija, 40 mM citratnega pufra z dodatki 1,83 M HCl, brez sproščene učinkovine.

Pred merjenjem pH, vzorcev nismo redčili. pH smo merili s pH metrom umerjenim na pH=4.

Pretočni sistem

pH profil mleka z dodatki 1,83 M HCl

pH profil mleka z dodatki kisline smo določili tekom testa sproščanja PS-MK na paralelki PS-MK3 (poglavje 5.2.7.2 Končni testi sproščanja). pH smo merili eno minuto pred novim dodatkom 1,83 M HCl. pH smo merili s pH metrom, ki smo ga predhodno umerili na pH=4. Merjenje smo izvajali v čaši s svežim medijem (brez tablete), ki smo ga črpali v delovno čašo.

pH profil medija s postopno prebavo mleka

pH profil medija s postopno prebavo mleka smo določili tekom testa sproščanja PS-MKLP opisanem v poglavju 5.2.7.2. Končni testi sproščanja. pH smo izmerili na paralelki PS-MKLP3. pH smo merili v čaši s svežim medijem. Merili smo ga s pH metrom umerjenim na pH=4 eno minuto pred novim dodatkom kisline s pepsinom. Ko smo v medij dali lipazo, smo pH merili tik pred njenim dodatkom.

6 REZULTATI

6.1 Pufrna kapaciteta

Podani so rezultati določevanja pufrne kapacitete medijev: mleka (preglednici XII in XIII), fosfatnega puфра in destilirane vode (preglednica XIV), 50 mM citratnega puфра (preglednici XV in XVI) ter 40 mM citratnega puфра (preglednici XVII in XVIII).

Preglednica XII: Pufrna kapaciteta (β): medij - mleko. Pufrna kapaciteta petih paralelk določena po metodi A. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

MA1			MA2			MA3			MA4			MA5		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH	β
6,63	6,40	0,0143	6,64	6,41	0,0143	6,68	6,47	0,0138	6,64	6,46	0,0143	6,49	6,24	0,0135
6,16	5,93	0,0161	6,18	5,99	0,0162	6,25	6,04	0,0159	6,28	6,02	0,0161	5,98	5,72	0,0165
5,70	5,56	0,0192	5,80	5,61	0,0197	5,82	5,58	0,0210	5,75	5,53	0,0199	5,45	5,25	0,0238
5,42	5,21	0,0211	5,41	5,23	0,0269	5,33	5,18	0,0278	5,30	5,13	0,0329	5,05	4,84	0,0280
5,00	4,83	0,0379	5,04	4,80	0,0297	5,02	4,86	0,0312	4,96	4,81	0,0278	4,62	4,44	0,0342
4,66	4,45	0,0253	4,56	4,40	0,0269	4,69	4,51	0,0265	4,65	4,47	0,0224	4,25	4,10	0,0315
4,24	4,04	0,0260	4,24	4,05	0,0231	4,32	4,00	0,0231	4,28	4,05	0,0245	3,94	3,64	0,0216
3,84	3,65	0,0209	3,85	3,65	0,0191	3,90	3,72	0,0216	3,82	3,69	0,0274	3,34	3,03	0,0174
3,45	3,25	0,0187	3,44	3,27	0,0200	5,53	3,29	0,0181	3,56	3,33	0,0164	2,71	2,51	0,0282
3,04	2,83	0,0188	3,09	2,90	0,0186	3,04	2,85	0,0181	3,09	2,85	0,0141	2,30	2,11	0,0481
2,62	2,44	0,0234	2,70	2,51	0,0221	2,65	2,47	0,0241	2,60	2,44	0,0229	1,92	1,83	0,1224
2,26	-	-	2,31	-	-	2,28	2,10	0,3842	2,28	2,16	0,0560	1,74	1,70	0,2730
-	-	-	-	-	-	1,91	-	-	2,04	-	-	1,65	-	-

Preglednica XIII: Pufrna kapaciteta (β): medij - mleko. Pufrna kapaciteta štirih paralelk določena po metodi B. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

MB1			MB2			MB3			MB4		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
6,73	6,41	0,0154	6,75	6,42	0,0146	6,76	6,42	0,0142	6,76	6,42	0,0144
6,09	5,82	0,0175	6,08	5,81	0,0175	6,07	5,80	0,0178	6,08	5,81	0,0178
5,55	5,37	0,0255	5,53	5,35	0,0260	5,53	5,35	0,0262	5,54	5,35	0,0248
5,18	5,00	0,0257	5,17	5,00	0,0264	5,17	4,99	0,0257	5,16	4,985	0,0264
4,82	4,63	0,0233	4,82	4,63	0,0239	4,81	4,62	0,0239	4,81	4,615	0,0233
4,43	4,24	0,0235	4,44	4,22	0,0209	4,43	4,23	0,0218	4,42	4,21	0,0213
4,05	3,85	0,0214	4,00	3,80	0,0219	4,02	3,80	0,0199	4,00	3,8	0,0219
3,64	3,43	0,0200	3,60	3,38	0,0192	3,58	3,36	0,0196	3,60	3,38	0,0196
3,21	2,98	0,0184	3,15	2,91	0,0177	3,13	2,89	0,0176	3,16	2,915	0,0173
2,75	2,55	0,0208	2,67	2,49	0,02315	2,65	2,49	0,0260	2,67	2,48	0,0213
2,35	2,20	0,0273	2,31	2,18	0,0304	2,33	2,19	0,0293	2,29	2,165	0,0328
2,05	1,97	0,0504	2,04	1,97	0,0576	2,05	1,97	0,0504	2,04	1,97	0,0576
1,89	1,84	0,0722	1,90	1,86	0,0881	1,89	1,84	0,0722	1,90	1,84	0,0661
1,78	1,72	0,1183	1,81	1,75	0,0962	1,78	1,72	0,1183	1,78	1,715	0,0118
1,65	1,62	0,248	1,65	1,65	0,3731	1,65	1,62	0,2488	1,65	1,6	0,0149
1,59	1,52	0,2740	1,61	1,53	0,2568	1,59	1,52	0,2739	1,55	1,485	0,3161
1,44			1,45			1,44			1,42		

Preglednica XIV: Pufrna kapaciteta (β): medij - destilirana voda z izhodnim pH=5,78 (VA) in fosfatni pufer z izhodnim pH=6,8 (paralelki FA1, FA2). Pufrna kapaciteta določena po Metodi A. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

VA			FA1			FA2		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
5,78	4,41	0,0004	6,81	6,595	0,0183	6,86	6,67	0,0156
3,03			6,38			6,48		
	2,85	0,0055		6,105	0,0124		6,29	0,0129
2,67			5,83			6,10		
	2,61	0,0076		5,535	0,0049		5,86	0,0081
2,54			5,24			5,62		
	2,49	0,0099		4,475	0,0013		4,745	0,0017
2,44			3,71			3,87		
	2,37	0,0150		3,465	0,0020		3,49	0,0025
2,30			3,22			3,11		
	2,19	0,0254		3,11	0,0044		2,69	0,0068
2,07			3,00			2,69		
	1,92	0,0534		2,88	0,0080		2,495	0,0169
1,77			2,76			2,3		
	1,69	0,1299		2,58	0,0131		2,105	0,0376
1,61			2,40			1,91		
	1,55	0,2410		2,23	0,0273		1,715	0,0895
1,5			2,06			1,52		
	-	-		1,865	0,0612		1,41	0,2857
-			1,67			1,30		
	-	-		1,62	0,1375		1,235	0,5725
-			1,57			1,17		
	-	-		1,43	0,2276		1,15	0,9953
-			1,29			1,13		
	-	-		1,21	0,6957		-	-
-			1,13			-		

Preglednica XV: Pufrna kapaciteta (β): medij - 50 mM citratni pufer z izhodnim pH=6,63. Pufrna kapaciteta štirih paralelk določena po metodi A. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

CA1			CA2			CA3			CA4		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
6,58	6,37	0,0139	6,60	6,41	0,0153	6,68	6,45	0,0148	6,62	6,42	0,0146
6,16	5,98	0,2387	6,22	6,03	0,0226	6,22	6,03	0,0201	6,22	6,04	0,0239
5,80	5,6	0,0280	5,84	5,66	0,0285	5,84	5,65	0,0319	5,86	5,66	0,0303
5,40	5,19	0,0303	5,48	5,28	0,0319	5,46	5,265	0,0304	5,46	5,255	0,0310
4,98	4,795	0,03123	5,08	4,875	0,0304	5,07	4,88	0,0305	5,05	4,86	0,0349
4,61	4,42	0,03195	4,67	4,465	0,0337	4,69	4,475	0,0303	4,67	4,465	0,0295
4,23	4,04	0,02901	4,26	4,07	0,0311	4,26	4,065	0,0325	4,26	4,07	0,0332
3,85	3,655	0,0277	3,88	3,675	0,0281	3,87	3,675	0,0276	3,88	3,67	0,0274
3,46	3,27	0,0278	3,47	3,28	0,0276	3,48	3,265	0,0270	3,46	3,225	0,0289
3,08	2,89	0,0272	3,09	2,9	0,0290	3,05	2,855	0,0296	2,99	2,795	0,0300
2,70	2,51	0,0267	2,71	2,53	0,0279	2,66	2,465	0,0277	2,60	2,51	0,0282
2,32	2,11	0,0307	2,35	2,13	0,0324	2,27	2,05	0,0318	2,22	2,03	0,0559
1,90	1,71	0,0771	1,91	-	-	1,89	1,75	0,0748	1,84	-	-
1,52			-	-	-	1,61			-		

Preglednica XVI: Pufrna kapaciteta (β): medij - 50 mM citratni pufer z izhodnim pH=6,6. Pufrna kapaciteta treh paralelek določena po metodi A. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pri titraciji uporabljena 4 M HCl. Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

CA1*			CA2*			CA3*		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
6,67	6,23	0,0194	6,61	6,45	0,0143	6,62	6,27	0,0188
5,78	5,58	0,0313	6,28	6,08	0,0230	5,91	5,76	0,0278
5,38	4,78	0,0389	5,87	5,26	0,0351	5,60	5,35	0,0306
4,98	4,36	0,0247	5,46	4,87	0,0358	5,09	4,91	0,336
4,58	3,96	0,0367	5,06	4,44	0,0296	4,72	4,54	0,377
4,14	3,56	0,0333	4,67	3,92	0,0357	4,35	4,11	0,0290
3,78	3,14	0,0313	4,20	3,46	0,0330	3,87	3,67	0,0338
3,34	2,76	0,0330	3,64	3,09	0,0356	3,46	3,22	0,0288
2,94	2,38	0,0313	3,27	2,73	0,0314	2,98	2,78	0,0349
2,57	2,00	0,0603	2,91	2,34	0,0347	2,58	2,36	0,0341
2,19	1,69	0,1897	2,54	1,97	0,0589	2,13	1,95	0,0628
1,80	-	-	2,14	1,68	0,1735	1,76	1,60	0,2858
1,57	-	-	1,80	1,52	0,3774	1,44	-	-
-	-	-	1,46	-	-	-	-	-

Preglednica XVII: Pufrna kapaciteta (β):medij - 40 mM citratni pufer z izhodnim pH=6,7(paralelki DA1 in DA2) in citratno acetatni pufer z izhodnim pH=6,7 (paralelki AA1 in AA2).Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta določena po metodi A. Pufrna kapaciteta je izražena v mol/L/ Δ pH.*

DA1			DA2			AA1			AA2		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
6,84	6,25	0,0114	6,82	6,59	0,0107	6,85	6,61	0,0102	6,88	6,62	0,0147
6,41			6,36			6,37			6,35		
	6,20	0,0161		6,12	0,0200		6,16	0,0184		6,13	0,0131
5,99			5,88			5,95			5,91		
	5,77	0,0237		5,67	0,0241		5,75	0,0260		5,71	0,0208
5,55			5,45			5,55			5,50		
	5,34	0,0258		5,30	0,0239		5,35	0,0209		5,30	0,0271
5,12			5,14			5,15			5,09		
	4,93	0,0256		4,88	0,0255		5,04	0,0292		4,88	0,0259
4,73			4,61			4,93			4,67		
	4,54	0,0280		4,40	0,0252		4,75	0,0291		4,45	0,0294
4,35			4,19			4,56			4,22		
	4,17	0,0236		3,96	0,0244		4,34	0,0259		4,04	0,0257
3,98			3,73			4,12			3,85		
	3,78	0,0235		3,53	0,0233		3,92	0,0237		3,65	0,0213
3,58			3,33			3,72			3,45		
	3,40	0,0228		3,12	0,0232		3,50	0,0225		3,26	0,0193
3,21			2,90			3,27			3,06		
	2,99	0,0243		2,78	0,0230		2,99	0,0220		2,86	0,0240
2,77			2,65			2,71			2,65		
	2,58	0,0234		2,58	0,0271		2,50	0,0211		2,45	0,0222
2,39			2,50			2,29			2,25		
	2,18	0,0300		2,32	0,0244		2,11	0,0382		2,06	0,0362
1,97			2,14			1,92			1,86		
	1,82	0,0729		2,01	0,0462		1,81	0,0758		1,75	0,0988
1,66			1,87			1,69			1,64		
	1,52	0,02296		1,83	0,0600		1,61	0,01481		1,57	0,1930
1,37			1,78			1,52			1,49		
	-	-		1,66	0,1327		1,47	0,2721		-	-
-			1,53			1,42			-		
	-	-		1,47	0,2324		-	-		-	-
-			1,41			-			-		
	-	-		1,38	0,3948		-	-		-	-
-			1,34			-			-		

Preglednica XVIII: Pufrna kapaciteta (β): medij - 40 mM citratni pufer z izhodnim pH=6,7. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH). Pufrna kapaciteta treh paralelk določena po metodi B. Podane so izmerjene vrednosti pH in povprečne vrednosti pH intervalov (pH*). Pufrna kapaciteta je podana v mol/L/ Δ pH.*

DB1			DB2			DB3		
pH	pH*	β	pH	pH*	β	pH	pH*	β
6,73	6,41	0,0153	6,74	6,42	0,0151	6,75	6,42	0,0189
6,09	5,88	0,0229	6,09	5,88	0,0229	6,09	5,885	0,0235
5,67	5,47	0,0230	5,67	5,47	0,02336	5,68	5,475	0,0230
5,26	5,07	0,0237	5,27	5,08	0,0237	5,27	5,075	0,0237
4,87	4,68	0,0239	4,88	4,69	0,0239	4,88	4,69	0,0239
4,49	4,31	0,0241	4,50	4,31	0,0234	4,50	4,31	0,0234
4,12	3,91	0,0204	4,12	3,92	0,0219	4,12	3,915	0,0214
3,69	3,48	0,0205	3,72	3,51	0,0200	3,71	3,5	0,0205
3,27	3,08	0,0223	3,29	3,10	0,0217	3,29	3,095	0,0217
2,89	2,72	0,0238	2,90	2,72	0,0231	2,90	2,745	0,0268
2,54	2,37	0,0241	2,54	2,37	0,0234	2,59	2,41	0,0227
2,20	2,08	0,0323	2,19	2,05	0,0336	2,23	2,09	0,0288
1,95	1,88	0,0567	1,95	1,89	0,0661	1,95	1,9	0,0794
1,81	1,74	0,1026	1,83	1,75	0,0962	1,85	1,76	0,0854
1,66	1,62	0,1658	1,67	1,62	0,1357	1,67	1,615	0,1357
1,57	1,47	0,2054	1,56	1,47	0,2283	1,56	1,47	0,2283
1,37			1,38			1,38		

6.2 Analiza vzorcev

6.2.1 Določitev enačb umeritvenih premic

Podani so odzivi na HPLC in UV-VIS spektrofotometru (AUC in absorbance) pri koncentraciji natrijevega diklofenakata (c), kvadrati Pearsonovih koeficientov in enačbe umeritvenih premic v citratnem in fosfatnem pufru (preglednici XIX in XX), citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl (preglednici XXI in XXII), citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl, ki smo ga redčili z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 (preglednici XXIII in XXIV), mleku, mleku, ki smo ga redčili z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 (preglednica XV), mleku s

102,3 mM HCl, mleku s 102,3 mM HCl redčenim z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1, mediju s postopno prebavo mleka (preglednica XXVI) in mobilni fazi (preglednica XXVII). Enačbe umeritvenih premic mobilne faze in mlečnih medijev so podane v preglednici XXVIII.

Preglednica XIX: Absorbance (A) standardnih raztopin z znano koncentracijo (c) natrijevega diklofenakata v fosfatnem pufru pH=6,8 in citratnem pufru pH=6,7.

Fosfatni pufer pH=6,8		Citratni pufer pH=6,7	
c (mg/L)	A (276 nm)	c (mg/L)	A (276 nm)
0	0	0	0
0,999	0,034	1,019	0,033
2,004	0,072	2,014	0,065
5,14	0,199	5,015	0,178
9,99	0,339	10,19	0,325
20,04	0,642	20,14	0,646
30,84	0,996	30,09	0,978
39,96	1,257	40,76	1,260
50,1	1,623	50,35	1,599

Preglednica XX: Enačbe umeritvenih premic, absorpcijski maksimumi (λ) in kvadrati Pearsonovih koeficientov (R^2) čistega fosfatnega pufra pH=6,8 in citratnega pufra pH=6,7. A je absorbanca, c (mg/L) je koncentracija učinkovine.

VRSTA MEDIJA	ENAČBA UMERITVENE PREMICE	λ (nm)	R^2
Fosfatni pufer pH=6,8	$A=0,0318 \cdot c + 0,011$	276	0,9993
40 mM citratni pufer pH=6,7	$A=0,0315 \cdot c + 0,0066$	276	0,9993

Preglednica XXI: Absorbance (A) standardnih raztopin z znano koncentracijo (c) natrijevega diklofenakata v citratnem pufru z dodatki 1,83M HCl. Podane so tudi koncentracije HCl v mediju in pripadajoče pH vrednosti.

c (mg/L)	29,3 mM HCl; pH=5,32	58,6 mM HCl; pH=4,15	87,8 mM HCl; pH=2,97	102,3 mM; pH=2,38
	A (275 nm)	A (274 nm)	A (274 nm)	A (273 nm)
0	0	0	0	0
1,0024	0,0269	0,0352	0,0257	0,0312
2,0052	0,0631	0,0659	0,0549	0,0576
2,013	0,1603	0,15498	0,1467	0,1453
10,024	0,3222	0,2962	0,2906	0,2911
20,052	0,6363	0,6209	0,5809	0,5744
30,078	0,9434	0,9466	0,8825	0,8539
40,096	1,2500	1,2003	1,114	obarjanje
50,130	1,5960	1,5676	1,407	obarjanje

Preglednica XXII: Enačbe umeritvenih premic, absorpcijski maksimumi (λ) in kvadrati Pearsonovih koeficientov (R^2) v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl. Podane so koncentracije HCl, ki se v času vzorčenja (t) v testih sproščanja nahajajo v mediju. Koncentracija natrijevega diklofenakata je podana v mg/L. Uporabljena enačba umeritvene premice je poudarjena s krepkim tiskom.

t (min)	VRSTA MEDIJA	ENAČBA UMERITVENE PREMICE	λ (nm)	R^2
30	29,3 mM HCl v citratnem pufru pH=5,32	$A=0,0316 \cdot c - 0,0004$	275	0,9998
60	58,6 mM HCl v citratnem pufru pH=4,15	$A=0,0309 \cdot c - 0,0003$	274	0,9991
90	87,8 mM HCl v citratnem pufru pH=2,97	$A=0,0281 \cdot c + 0,0051$	274	0,9992
90-360	102,3 mM HCl v citratnem pufru pH=2,38	$A=0,0284 \cdot c + 0,0024$	273	0,9999

Preglednica XXIII: Absorbance (A) standardnih raztopin z znano koncentracijo (c) natrijevega diklofenakata v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl, ki smo ga redčili z NaOH v razmerju 1:1.

58,6 mM HCl : NaOH = 1:1		87,8 mM HCl : NaOH = 1:1		102,3 mM HCl : NaOH = 1:1	
c (mg/L)	A (276 nm)	c (mg/L)	A (276 nm)	c (mg/L)	A (276 nm)
0	0	0	0	0	0
0,988	0,0026	0,997	0,00244	1,003	0,0037
2,006	0,0069	2,034	0,0078	1,984	0,015
5,205	0,1673	5,085	0,1639	4,935	0,1593
9,88	0,3242	9,097	0,3018	10,03	0,3191
20,06	0,6527	20,34	0,6328	19,84	0,6315
31,23	1,0085	30,51	0,9737	29,61	0,9455
39,52	1,2494	39,88	1,2940	40,12	1,2600
50,15	1,6186	50,85	1,6535	49,6	1,5842

Preglednica XXIV: Enačbe umeritvenih premic, absorpcijski maksimumi (λ) in kvadrati Pearsonovih koeficientov (R^2) v citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl. Kisel medij je bil redčen z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1. Podane so koncentracije HCl, ki se v času vzorčenja (t) v testih sproščanja nahajajo v mediju. A je absorbanca, c je koncentracija učinkovine v mg/L. Uporabljena enačba umeritvene premice je podana s krepkim tiskom.

t (min)	VRSTA MEDIJA	ENAČBA UMERITVENE PREMICE	λ (nm)	R^2
60	58,6 mM HCl v citratnem pufru + 0,1M NaOH (1:1)	$A=0,0326 \cdot c - 0,0166$	276	0,9988
90	87,8 mM HCl v citratnem pufru + 0,1M NaOH (1:1)	$A=0,0329 \cdot c - 0,0211$	276	0,9990
90-360	102,3 mM HCl v citratnem pufru + 0,1M NaOH	$A=0,0322 \cdot c - 0,0157$	276	0,9992

Preglednica XXV: Površina vrhov (AUC) na HPLC kromatogramu standardnih raztopin, z znano koncentracijo (c), natrijevega diklofenakata v mleku in mleku redčenim z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1.

Mleko		Mleko : NaOH = 1:1	
c (mg/L)	AUC (mAU × s)	c (mg/L)	AUC (mAU × s)
0	0	0	0
29,83	145,3	29,83	64,9
59,66	283,8	59,66	135,6
119,32	552,4	119,32	276,2
178,98	851,6	178,98	408,6
596,6	2726,1	596,6	1370,0

Preglednica XXVI: Površina vrhov (AUC) na HPLC kromatogramu standardnih raztopin, z znano koncentracijo (c), natrijevega diklofenakata v mleku s 102,3 mM HCl, mleku s 102,3 mM HCl redčenim z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 in mediju s postopno prebavo mleka. .

Mleko s 102,3 mM HCl		Mleko s 102,3 mM HCl + 0,1 M NaOH (1:1)		Medij s postopno prebavo mleka	
c (mg/L)	AUC (mAU × s)	c (mg/L)	AUC (mAU × s)	c (mg/L)	AUC (mAU × s)
0	0	0	0	0	0
30,23	171,2	30,12	135,5	29,2	146,7
60,46	330,5	60,24	268,3	58,4	261,7
120,92	650	120,48	541,9	116,8	518
181,38	1013	180,72	801,5	175,2	781,4
-	-	602,4	2759,2	584	2583,5

Preglednica XXVII: Površina pikov (AUC) standardnih raztopin, z znano koncentracijo (c), natrijevega diklofenakata v mobilni fazi.

MOBILNA FAZA	
c (mg/L)	AUC (mAU × s)
0	0
28,37	125,2
56,74	261,6
113,48	529,3
170,22	793,7

Preglednica XXVIII: Enačbe umeritvenih premic in kvadrati Pearsonovih koeficientov (R^2) v vseh uporabljenih mlečnih medijih in mobilni fazi. Koncentracije natrijevega diklofenaka so podane v mg/L. AUC je podan v mAU × s.

VRSTA MEDIJA	ENAČBA UMERITVENE PREMICE	R^2
mleko	$AUC=4,5604 \cdot c + 11,498$	0,9998
mleko + 0,1M NaOH (1:1)	$AUC=2,2985 \cdot c - 1,2078$	1
mleko s 102,3 mM HCl	$AUC=5,5351 \cdot c + 2,1095$	0,9993
mleko s 102,3 mM HCl + 0,1M NaOH (1:1)	$AUC=4,5852 \cdot c - 8,5536$	0,9999
Medij s postopno prebavo mleka	$AUC=4,4127 \cdot c + 6,5382$	1
mobilna faza	$AUC=4,6831 \cdot c - 3,4724$	0,9999

6.2.2 Vpliv mlečnega medija in zamrzovanja vzorcev na določanje koncentracije učinkovine

Navedeni so rezultati vpliva mlečnega medija (preglednica XXIX) in zamrzovanja vzorcev na določanje koncentracije učinkovine (preglednica XXX).

Preglednica XXIX: Rezultati vrednotenja vpliva mlečnega medija na določanje koncentracije učinkovine. Podane so koncentracije (c) natrijevega diklofenakata v mleku pH=6,65 ter fosfatnem pufru pH=6,8 in površine vrhov (AUC) na HPLC kromatogramu. Rastopine z visokimi koncentracijami natrijevega diklofenakata so bile obdelane, rastopine z nizkimi koncentracijami učinkovine pa ne.

medij	VISOKE koncentracije učinkovine			NIZKE koncentracije učinkovine		
	c (mg/L)	AUC (mAU × s)		c (mg/L)	AUC (mAU × s)	
Fosfatni pufer pH=6,8	5,01	9,0	9,2	0,25	8,9	9,1
	50,05	84,9	85,2	2,50	89,6	89,7
	100,10	176,9	176,9	5,01	179,5	179,5
Mleko pH=6,65	c (mg/L)	AUC (mAU × s)				
	4,97	8,6	8,6			
	49,65	94,4	94,4			
	99,30	173,8	173,7			

Preglednica XXX: Rezultati testa vpliv zamrzovanja vzorcev na koncentracijo natrijevega diklofenakata v mleku (c). Podane so površine vrhov (AUC) na HPLC kromatogramu zamrznjenih vzorcev in vzorcev, ki jih nismo zamrznili. Podano je odstopanje (H) AUC zamrznjenih vzorcev od AUC nezamrznjenih vzorcev pri koncentraciji c.

c (mg/L)	AUC (mAU × s)		H (%)
	Zamrznjen	Ni bil zamrznjen	
0	0	0	0
5,01	12,6	15,4	18,2
15,05	67,7	81,0	16,4
50,1	138,1	171,1	19,3
75,15	226,6	264,6	14,4
100	331,5	317,8	4,4

6.3 Topnost natrijevega diklofenakata

V preglednici XXXI sta podani povprečni topnosti natrijevega diklofenakata pri temperaturi 37°C v fosfatnem pufru pH=6,8 in 40 mM citratnem pufru pH=6,68.

Preglednica XXXI: Povprečni topnosti treh paralelk natrijevega diklofenakata pri temperaturi 37°C v fosfatnem pufru pH=6,8 in 40 mM citratnem pufru s pH=6,68. Čas h je čas odvzema vzorca. SD je standardna deviacija.

MEDIJ	čas (h)	T1	T2	T3	Povprečna topnost (mg/mL) pri 37°C	SD (mg/mL)
Fosfatni pufer pH=6,8	2	5,11	4,28	5,01	4,80	0,41
	6	5,01	5,28	5,13	5,14	0,27
	24	5,36	4,99	4,60	4,99	0,28
40 mM citratni pufer pH=6,68	2	9,34	9,24	9,52	9,52	0,46
	6	9,76	9,32	9,45	9,45	0,13
	24	9,41	9,92	9,26	9,26	0,37

6.4 Sproščanje

6.4.1 HPLC analiza dnevnih standardnih raztopin

V preglednici XXXII so podani rezultati analize dnevnih standardnih raztopin.

Preglednica XXXII: Dnevni standardi (st), z znano koncentracijo, natrijevega diklofenakata v uporabljenih mlečnih medijih (M-mleko, MK-mleko s 102,3 mM HCl, MB-mleko redčeno z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1, MKLP-medij s postopno prebavo mleka) in mobilni fazi (st/t-MF). Podano je odstopanje standardov od umeritvene premice.

Test	MEDIJ	oznaka standarda	Odstopanje od umeritvene premice (%)
USP2-M	mleko	st/USP2-M1, M2, M3	5,0
USP2-MK	mleko z 102,3 mM HCl	st/USP2-MK1, MK2, MK3	4,2
PS-M	mleko	st/PS-M1	1,7
		st/PS-M2, M3	2,3
PS-MB	mleko + 0,1M NaOH (1:1)	st/PS-M1B	0,7
PS-MK	mleko s 102,3 mM HCl + 0,1M NaOH (1:1)	st/PS-MK1, MK2	4,4
		st/PS-MK3	4,6
PS-MKLP	medij s postopno prebavo mleka	st/PS-MKLP1	4,2
		st/PS-MKLP2, MKLP3	2,1
topnost	mobilna faza	st/t-MF	2,2

6.4.2 Preliminarni testi sproščanja

Navedeni so rezultati testov sproščanja USP2-1000/P (preglednica XXXIII), USP1-300/P, USP1-600/P in USP1-1000/P (preglednica XXXIV), testa USP2-300/P (preglednica XXXV) in testa sproščanja USP1-300/C (preglednica XXXVI), testa USP2-C (preglednica XXXVII), testa USP2-M (preglednica XXXVIII), testa USP2-CK (preglednica XXXIX) in testa USP2-MK (preglednica XL).

Preglednica XXXIII: Rezultati testov sproščanja USP2-1000/P (aparatus 2 po USP, 1000 mL fosfatnega pufra pH=6,8). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD).

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP2-1000/P1	USP2-1000/P1	USP2-1000/P1	povprečje USP2-1000/P	SD
0	0	0	0	0	0
15	8,479	7,854	8,229	8,187	0,315
30	15,266	12,897	13,397	13,853	1,249
45	17,342	16,769	17,424	17,178	0,357
60	20,423	19,943	20,598	20,321	0,339
75	23,336	22,611	23,480	23,142	0,466
90	25,837	25,02	25,981	25,613	0,518
120	30,419	29,390	30,351	30,054	0,576
180	39,114	38,537	39,227	38,959	0,370
240	58,394	65,055	61,210	61,553	3,344
300	88,447	90,388	92,189	90,342	1,871
360	95,728	98,412	97,538	97,226	1,369
420	94,841	96,491	98,277	96,536	1,718
480	96,900	97,814	98,277	97,663	0,701
1440	101,433	101,177	100,317	101,075	0,417

Preglednica XXXIV: Rezultati testov sproščanja USP1-300/P, USP1-600/P in USP1-1000/P (aparati 1 po USP, volumen medija 300 mL, 600 mL oziroma 1000 mL). Podani so odstotki sproščene učinkovine za posamezne paralelke (dve za vsak test sproščanja), njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščanja			
	USP1-300/P1	USP1-300/P2	Povprečje USP1-300/P	SD
0	0	0	0	0
30	12,870	13,813	13,342	0,667
60	19,360	21,034	20,197	1,183
120	33,910	33,571	33,740	0,240
180	42,061	43,623	42,842	1,105
240	50,396	52,944	51,670	1,802
300	57,402	57,644	57,523	0,172
360	63,894	63,961	63,928	0,047
480	73,094	68,822	70,958	3,021
720	84,340	83,931	84,136	0,289
1440	92,944	90,214	91,480	1,790
S (mg)	96,944	101,129	99,037	2,959
čas (min)	% sproščanja			
	USP1-600/P1	USP1-600/P2	Povprečje USP1-600/P	SD
0	0	0	0	0
30	12,973	13,179	13,076	0,146
60	19,118	19,866	19,492	0,529
120	32,685	31,946	32,316	0,522
180	41,930	43,780	42,855	1,308
240	50,025	51,875	50,950	1,308
300	58,443	58,646	58,545	0,143
360	63,906	63,380	63,643	0,371
480	76,042	72,618	74,330	2,421
720	85,772	82,168	83,970	2,548
1440	89,715	85,753	87,734	2,802
S (mg)	93,460	95,203	94,331	1,233
čas (min)	% sproščanja			
	USP1-1000/P1	USP1-1000/P2	Povprečje USP1-1000/P	SD
0	0	0	0	0
30	12,666	11,538	12,102	0,798
60	21,731	20,134	20,932	1,130
120	33,698	32,194	32,946	1,064
180	42,055	41,173	41,614	0,624
240	45,556	46,160	45,858	0,427
300	53,893	52,953	53,423	0,665
360	58,819	57,879	58,349	0,665
480	64,958	66,780	65,869	1,289
720	72,913	75,959	74,436	2,154
1440	77,488	81,145	79,316	2,585
S (mg)	86,915	90,571	88,743	2,585

Preglednica XXXV: Rezultati testov sproščanja USP2-300/P (aparati 2 po USP, 300 mL fosfatnega pufrja pH=6,8). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralele, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD).

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP2-300/P1	USP2-300/P2	USP2-300/P3	povprečje USP2-300/P	SD
0	0	0	0	0	0
15	10,983	10,582	10,918	10,828	0,215
30	15,782	17,303	16,659	16,581	0,764
45	20,220	19,865	20,732	20,272	0,435
60	24,341	23,307	24,046	24,046	0,644
75	27,567	27,250	28,389	27,735	0,588
90	30,742	29,897	31,119	30,586	0,626
120	36,814	35,702	37,280	36,599	0,811
180	47,924	45,423	48,173	47,173	1,521
240	62,303	56,927	59,676	59,635	2,689
300	76,398	63,889	70,374	70,220	6,256
360	82,527	68,171	75,328	75,342	7,178
420	87,342	73,069	82,385	80,932	7,247
480	88,327	78,158	83,285	83,285	5,085
1440	101,305	97,386	99,674	99,674	2,041

Preglednica XXXVI: Rezultati testov sproščanja USP1-300/C (aparati 1 po USP, 300 mL citratnega pufrja pH=6,73). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralele, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP1-300/C1	USP1-300/C2	USP1-300/C3	Povprečje USP1-300/C	SD
0	0	0	0	0	0
30	12,211	11,812	12,509	12,177	0,349
60	17,935	17,384	18,137	17,819	0,390
90	23,266	23,217	24,441	23,641	0,693
120	28,044	28,704	28,890	28,546	0,445
180	35,683	36,700	38,322	36,902	1,331
240	43,680	44,980	46,300	44,986	1,310
300	52,594	50,869	52,733	52,065	1,038
360	59,797	56,281	56,181	57,065	2,059
S (mg)	103,829	97,249	98,221	99,76	3,552

Preglednica XXXVII: Rezultati testov sproščanja USP2-300/C (aparatus po USP, 300 mL citratnega pufra pH=6,68). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralele, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP2-C1	USP2-C2	USP2-C3	Povprečje USP2-C	SD (%)
0	0	0	0	0	0
30	12,632	12,182	12,032	12,282	0,312
60	18,023	18,106	17,984	18,038	0,062
90	22,663	22,730	22,863	22,752	0,102
120	27,753	27,453	28,297	27,835	0,428
180	35,114	35,930	36,351	35,798	0,629
240	42,617	42,736	43,926	43,093	0,724
300	49,980	49,869	49,959	49,936	0,059
360	54,825	54,927	54,950	54,567	0,537
S (mg)	99,310	100,302	99,001	99,538	0,679

Preglednica XXXVIII: Rezultati testov sproščanja USP2-M (aparatus po USP, 300 mL mleka). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralele,, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP2-M1	USP2-M2	USP2-M3	Povprečje USP2-M	SD (%)
0	0	0	0	0	0
30	9,933	9,848	9,901	9,894	0,043
60	15,552	15,426	15,992	15,657	0,297
90	20,153	20,335	20,691	20,393	0,274
120	23,826	24,458	23,904	24,063	0,344
180	31,097	31,434	30,920	31,150	0,262
240	37,730	39,335	39,024	38,696	0,851
300	43,749	45,652	42,304	43,902	1,679
360	48,105	50,671	48,081	48,952	1,488
S (mg)	97,441	100,006	98,567	98,671	1,286

Preglednica XXXIX: Rezultati testov sproščanja USP2-CK (aparati 2 po USP, 300 mL citratnega pufra z dodajanjem 1,83 M HCl). Podani so odstotki raztopljene učinkovine za tri paralelke, njihove povprečne vrednosti, standardna deviacija (SD) in ostanek (mg) učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja. USP2-CKB1, USP2-CKB2 in USP2-CKB3 so vzorci redčeni z 0,1 M NaOH (1:1).

čas (min)	% raztopljene učinkovine				
	USP2-CK1	USP2-CK2	USP2-CK3	Povprečje USP2-CK	SD (%)
0	0	0	0	0	0
30	7,761	8,794	8,563	0,8373	0,542
60	6,202	6,501	6,227	6,327	0,156
90	2,987	4,409	3,824	3,740	0,715
120	1,990	3,077	2,465	2,511	0,544
180	1,724	2,314	2,548	2,195	0,425
240	1,841	2,411	1,937	2,063	0,305
300	1,589	2,018	1,976	1,861	0,237
360	1,663	2,149	1,940	1,917	0,244
Ostanek v tableti (mg)	62,900	66,076	62,357	63,778	2,009
čas (min)	% sproščene učinkovine				
	USP2-CKB1	USP2-CKB2	USP2-CKB3	Povprečje USP2-CKBM	SD (%)
0	0	0	0	0	0
30	6,999	7,981	7,764	7,581	0,516
60	4,054	4,176	4,034	4,088	0,077
90	3,605	3,839	3,903	3,782	0,157
120	2,792	3,106	2,922	3,000	0,095
180	2,635	2,835	2,816	2,762	0,111
240	2,499	2,234	1,914	2,216	0,293
300	2,480	2,358	2,229	2,356	0,125
360	2,113	2,032	2,022	2,066	0,045
Ostanek v tableti (%)	62,900	66,076	32,357	63,778	2,009

Preglednica XL: Rezultati testov sproščanja USP2-MK (aparati 2 po USP, 300 mL mleka z dodajanjem 1,83 M HCl). Podani so odstotki raztopljene učinkovine za posamezne paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podan je ostanek učinkovine v tableti po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% raztopljene učinkovine				
	USP2-MK1	USP2-MK2	USP2-MK3	Povprečje USP2-MK	SD
0	0	0	0	0	0
30	4,006	4,965	7,496	5,489	1,803
60	6,764	10,427	7,152	8,114	2,012
90	7,098	11,102	6,629	8,276	2,458
120	6,845	7,015	11,229	8,363	2,483
180	4,733	6,590	9,162	6,828	2,224
240	7,068	6,900	10,960	8,309	2,297
300	7,547	7,148	10,747	8,481	1,973
360	8,168	7,463	11,4058	9,012	2,103
Ostanek v tableti (mg)	78,937	79,818	75,974	78,243	2,014

6.4.3 Končni testi sproščanja

Podani so rezultati testov sproščanj PS-C (preglednica XLI), PS-M (preglednica XLII) PS-CK (preglednica XLIII), PS-MK (preglednica XLIV) in PS-MKLP (preglednica XLV).

Preglednica XLI: Rezultati testov sproščanja PS-C (pretočni sistem citratni pufer). Podani so odstotki sproščene učinkovine za štiri paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v delovni čaši po končanem testu sproščanja

čas (min)	% sproščene učinkovine					
	PS-C1	PS-C2	PS-C3	PS-C4	Povprečje PS-C	SD
0	0	0	0	0	0	0
30	15,970	17,398	15,684	17,055	16,527	0,829
60	37,310	43,195	38,244	40,320	39,768	2,609
90	53,890	62,861	56,385	58,309	57,861	3,793
120	67,230	77,078	70,030	71,726	71,516	4,145
150	76,705	86,190	80,495	81,962	81,338	3,921
180	82,389	92,103	87,474	89,131	87,774	4,069
210	86,701	95,425	92,131	93,653	91,978	3,766
240	88,565	98,556	95,068	95,490	94,420	4,201
270	90,480	99,808	97,093	97,477	96,215	4,007
300	91,862	100,662	98,582	99,348	97,614	3,930
330	92,846	101,258	99,683	100,438	98,556	3,861
360	93,513	101,626	100,520	100,860	99,130	3,773
S (mg)	94,356	102,021	101,817	101,025	99,805	3,658

Preglednica XLII: Rezultati testov sproščanja PS-M (pretočni sistem, mleko). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralelke, povprečna vrednost (povprečje PS-M) paralelek PS-M1, PS-M2 in PS-M3 in standardna deviacija (SD). Navedeni so tudi odstotki sproščene učinkovine v mlečnem vzorcu obdelanim z NaOH (PS-M1B). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v delovni čaši po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine					
	PS-M1	PS-M2	PS-M3	Povprečje PS-M	SD	PS-M1B
0	0	0	0	0	0	0
30	20,326	17,454	19,242	19,007	1,450	20,972
60	47,725	40,394	45,386	44,502	3,745	50,128
90	65,914	58,529	61,884	62,109	3,698	68,868
120	78,501	71,704	72,786	74,330	3,652	82,424
150	87,041	82,064	80,088	83,064	3,583	91,161
180	93,738	88,733	85,116	89,196	4,329	98,202
210	97,668	92,468	87,412	92,516	5,128	102,389
240	99,184	94,539	88,232	93,985	5,497	104,198
270	99,693	95,551	88,456	94,567	5,683	104,888
300	99,843	96,067	88,525	94,812	5,762	105,219
330	99,869	96,277	88,525	94,890	5,798	105,491
360	99,869	96,363	88,525	94,919	5,808	105,523
S (mg)	96,615	96,615	88,525	93,918	4,671	105,993

Preglednica XLIII: Rezultati testov sproščanja PS-CK (pretočni sistem, citratni pufer z dodatki 1,83M HCl). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v delovni čaši po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	PS-CK1	PS-CK2	PS-CK3	Povprečje PS-CK	SD
0	0	0	0	0	0
30	18,064	16,761	16,979	17,413	0,922
60	38,813	35,519	36,699	37,166	2,329
90	51,932	49,022	49,945	50,477	2,058
120	59,480	56,957	57,865	58,2219	1,784
150	62,711	60,294	61,823	61,503	1,709
180	64,272	61,709	63,458	62,990	1,813
210	65,280	62,836	64,513	64,058	1,728
240	65,967	63,456	65,189	64,711	1,775
270	66,727	64,000	65,698	65,364	1,928
300	67,279	64,487	66,119	65,883	1,974
330	67,939	64,966	66,525	66,453	2,102
360	68,3225	64,316	66,880	66,820	2,128
S (mg)	99,200	99,210	97,492	98,634	0,989

Preglednica XLIV: Rezultati testov sproščanja PS-MK (pretočni sistem, mleko z dodatki 1,83 M HCl). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v delovni čaši po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	PS-MK1	PS-MK2	PS-MK3	Povprečje PS-MK	SD
0	0	0	0	0	0
30	21,778	21,873	20,373	21,341	0,840
60	47,964	48,791	43,837	46,864	2,654
90	56,811	57,573	51,072	55,152	3,554
120	59,469	60,029	53,081	57,526	3,860
150	60,389	60,797	53,818	58,335	3,917
180	60,862	61,982	54,405	59,083	4,090
210	61,250	63,849	55,323	60,141	4,370
240	61,678	66,457	56,441	61,526	5,010
270	62,049	67,919	58,031	62,666	4,973
300	62,369	68,897	59,998	63,755	4,608
330	62,724	70,094	62,052	64,957	4,462
360	62,948	70,909	63,827	65,895	4,365
S (mg)	106,787	106,489	103,06	105,445	2,071

Preglednica XLV: Rezultati testov sproščanja PS-MKLP (pretočni sistem, mleko z dodajanjem kisline, lipaze in pepsina). Podani so odstotki sproščene učinkovine za tri paralelke, njihove povprečne vrednosti in standardna deviacija (SD). Podana je vsota (S) sproščene učinkovine in ostanka učinkovine v delovni čaši po končanem testu sproščanja.

čas (min)	% sproščene učinkovine				
	PS-MKLP1	PS-MKLP2	PS-MKLP3	Povprečje PS-MKLP	SD (%)
0	0	0	0	0	0
30	12,359	14,119	13,761	13,413	0,930
60	22,451	23,230	24,120	23,267	0,835
90	26,517	27,125	27,719	27,120	0,601
120	28,280	28,837	29,373	28,830	0,547
150	29,090	29,700	30,220	29,670	0,566
180	29,670	30,237	30,789	30,232	0,560
210	30,050	30,602	31,169	30,607	0,560
240	30,294	30,852	31,427	30,858	0,566
270	30,536	31,053	31,640	31,076	0,552
300	30,697	31,236	31,819	31,251	0,561
330	30,829	31,401	31,957	31,396	0,564
360	30,988	31,568	32,549	31,549	0,551
S (mg)	102,558	92,600	99,263	99,263	5,073

6.4.4 Vrednosti faktorjev podobnosti in faktorjev različnosti.

V preglednici XLVI so podane izračunane vrednosti faktorjev podobnosti in faktorjev različnosti.

Preglednica XLVI: Primerjava faktorjev različnosti (f_1) in faktorjev podobnosti (f_2) povprečnih profilov sproščanja R in T, ki jih med seboj primerjamo. Navedena je podobnost (+) oz. različnost (-) profilov.

Test sproščanja	R/T	f_1	f_2	+/-	Test sproščanja	R/T	f_1	f_2	+/-
USP2-C	R	11,95	63,32	+	PS-M	R	59,02	19,03	-
USP2-M	T				PS-MKLP	T			
PS-C	R	4,91	74,04	+	PS-MK	T	9,23	63,76	+
PS-M	T				PS-CK	R			
PS-CK	R	9,23	63,76	+	PS-MK	R	48,86	29,71	-
PS-MK	T				PS-MKLP	T			
PS-C	R	19,39	42,01	-	PS-CK	R	46,95	30,22	-
PS-CK	T				PS-MKLP	T			
PS-C	R	22,63	39,16	-	PS-M	T	27,93	37,68	-
PS-MK	T				PS-MK	R			
PS-M	R	22,68	39,29	-	PS-C	R	57,01	20,55	-
PS-CK	T				PS-MKLP	T			

6.5 pH profili

Podane so pH vrednosti mleka, različnih proizvajalcev, po dodatkih 1,83 M HCl (preglednica XLVII), pH vrednosti Alpskega mleka in 40 mM citratnega pufra po dodatkih 1,83 M HCl (preglednica XLVII), pH vrednosti medija s postopno prebavo

mleka - preliminarni test (preglednica XLIX), pH vrednosti medijev dobljene na aparatu 2 po USP (preglednica L) in pH vrednosti dobljene na pretočnem sistemu (preglednica LI).

Preglednica XLVII: Izmerjene pH vrednosti mleka, različnih proizvajalcev, po dodatkih 1,83 M HCl. Podan je volumen dodatkov 1,83 M HCl, koncentracija HCl (c) v mleku in čas merjenja pH. Koncentracija HCl v mleku je podana v mol/L.

čas (min)	Volumen 1,83 M HCl (mL)	c (HCl)	Alpsko mleko (3,6%)	Mleko Mu (3,5%)	Mleko v pahu (navadna voda)	Mleko v pahu (destilirana voda)	Bohinjsko mleko
0	0	0	6,68	6,69	6,61	6,61	6,72
1	0,8	0,015	6,01	5,97	5,91	5,81	5,81
16	0,8	0,029	5,54	5,58	5,4	5,31	5,31
31	0,8	0,043	5	4,59	4,7	4,93	4,88
46	0,8	0,057	4,39	4,31	4,56	4,45	4,48
61	0,8	0,070	3,87	3,82	4,12	3,99	3,96
76	0,8	0,084	3,32	3,25	3,6	4,45	3,48
91	0,8	0,097	2,75	2,7	3,08	2,89	2,98
121	0	0,097	2,71	2,68	3,08	2,85	2,99
241	0	0,097	2,66	2,65	3,02	2,85	2,99

Preglednica XLVIII: Izmerjene pH vrednosti Alpskega mleka in 40 mM citratnega pufru po dodatkih 1,83 M HCl. Podani so rezultati dveh paralelk pufru in dveh paralelk mleka ter njihova povprečja. Podan je čas merjenja pH, volumen dodatkov HCl in koncentracija HCl (c) v raztopini pufru oziroma mleka. Koncentracija HCl v raztopini je podana v mol/L.

čas (min)	Volumen 1,83 M HCl (mL)	c (HCl)	pufer 1	pufer 2	Povprečje pH pufer	mleko 1	mleko 2	Povprečje pH mleko
0	0	0	6,81	6,79	6,80	6,78	6,77	6,78
1	0,4	0,015	5,81	5,89	5,85	5,75	5,77	5,76
16	0,4	0,029	5,31	5,29	5,30	5,15	5,2	5,18
31	0,4	0,043	4,71	4,71	4,71	4,68	4,74	4,71
46	0,4	0,057	4,17	4,17	4,17	4,19	4,22	4,21
61	0,4	0,070	3,6	3,61	3,61	3,58	3,66	3,62
76	0,4	0,084	3,01	3,03	3,02	2,93	2,94	2,94
91	0,4	0,097	2,46	2,47	2,47	2,33	2,38	2,36
121	0	0,097	2,45	2,46	2,46	2,32	2,37	2,35
241	0	0,097	2,56	2,47	2,52	2,31	2,36	2,34

Preglednica XLIX: pH profil medija s postopno prebavo mleka-preliminarni test. Navedeni so dodani volumni 1,83 M HCl s koncentracijo pepsina 1,1 mg/mL (HCl +P) in masa dodane lipaze (L).

čas (min)	dodatek	pH
0	0	6,58
1	1,56g L + 0,4 mL (HCl + P)	5,71
6	-	5,73
11	-	5,73
16	0,4 mL (HCl + P)	5,14
21	-	5,18
26	-	5,17
31	0,4 mL (HCl + P)	4,82
36	-	4,87
41	-	4,87
46	0,4 mL (HCl + P)	4,54
51	-	4,55
56	-	4,55
61	0,4 mL (HCl + P)	4,2
66	-	4,21
77	-	4,18
76	0,4 mL (HCl + P)	3,91
81	-	3,91
86	-	3,89
91	0,52 g L + 0,4 mL (HCl + P)	3,76
121	-	3,76
181	-	3,79
241	-	3,82
301	-	3,8
361	-	3,8

Preglednica L: pH vrednosti medija (vzorcev) dobljenih na aparatu 2 po USP. Uporabljeni mediji so čisto mleko, mleko z dodatki 1,83 M HCl, 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl z oz. brez tablete. Volumen posameznega dodatka 1,83 M HCl, v 300 mL medija, je znašal 2,4 mL.

Aparat 2 po USP				
čas (min)	pH medija			
	Čisto mleko	Mleko z dodatki 1,83 M HCl	40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl; brez tablete	40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl; s tableto
0	6,77	6,80	6,83	6,82
30	6,78	5,28	5,31	5,30
60	6,77	4,18	4,19	4,17
90	6,74	2,98	2,99	2,97
120	6,74	2,36	2,46	2,42
180	6,76	2,36	2,42	2,42
240	6,79	2,34	2,42	2,43
300	6,74	2,33	2,43	2,42
360	6,74	2,28	2,43	2,43

Preglednica LI: pH vrednosti, svežega medija, dobljene na pretočnem sistemu.

Uporabljena medija sta mleko z dodatki 1,83 M HCl in medij s postopno prebavo mleka. Podan je volumen posameznega dodatka 1,83 M HCl (V) oziroma volumen posameznega dodatka 1,83 M HCl s koncentracijo pepsina 1,1 mg/mL (V+P) v medij. V medij s postopno prebavo mleka smo 2 min pred začetkom poskusa dodali 23,44 g in v času 88 min 6,282 g lipaze.

Čas (min)	Pretočni sistem			
	V (mL)	pH mleka z dodatki 1,83 M HCl	V + P (mL)	pH medija s postopno prebavo mleka
0	6	6,65	6	6,63
15	5,808	5,7	5,808	5,43
30	5,614	5,15	5,614	5,08
45	5,419	4,7	5,419	4,79
60	5,223	4,15	5,223	4,48
75	5,024	3,55	5,024	4,17
90	4,825	2,88	4,825	3,89
120	-	2,28	-	3,77
150	-	2,27	-	3,77
180	-	2,26	-	3,77
240	-	2,25	-	3,78
300	-	2,26	-	3,77
360	-	2,26	-	3,78

7 RAZPRAVA

Pogoji v prebavnem traktu lahko močno vplivajo na sproščanje učinkovine, njeno biološko uporabnost in posledično na terapevtski učinek zdravila. Ključni faktorji pri sproščanju so, poleg lastnosti učinkovine in pomožnih snovi, sestava, volumen in hidrodinamika vsebine, ki je v gastrointestinalnem traktu prisotna pri aplikaciji farmacevtske oblike (2). V okviru moje diplomske naloge smo želeli preučiti vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti medija, ki simulira želodec v pogojih s hrano, na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem. Uporabili smo različne mlečne medije in poskušali pripraviti čist (pufni) medij, ki bi v testih sproščanja dobro posnemal nekatere lastnosti mleka. Pufer bi olajšal vrednotenje vplivov na sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike. Pri delu so se pojavile eksperimentalne težave, ki so zahtevale modifikacijo aparatur ali pa spremembo izvedbe poskusa.

7.1 Analiza

Analiznih metod nismo vrednotili in validirali v skladu z vsemi predpisi, saj je bil namen rezultatov dobiti orientacijske smernice za izvajanje testov sproščanja v izbranih medijih. Izvedli smo vrednotenje metod, s čimer smo potrdili, da so dobljeni rezultati med seboj primerljivi in da njihova točnost zadošča za naše potrebe pri načrtovanju novih metod testov sproščanja.

Umeritvene premice

V testih sproščanja smo za izračun količine sproščene učinkovine uporabili enačbe umeritvenih premic za medij, v katerem je bilo sproščanje izvedeno. V primerih, ko se je medij med sproščanjem spreminjal (je bil v vsaki časovni točki drugačen), smo izmed vseh premic izbrali eno (pripada mediju v času zadnjega odvzema vzorca), ki smo jo uporabili za izračun količine sproščene učinkovine v vseh časovnih točkah. Razlike v premicah za izbran medij, katerega sestava se v času spreminja, so bile namreč manjše od eksperimentalnih nihanj. Za tak način vrednotenja smo se odločili zaradi enostavnejšega dela.

Zamrzovanje mlečnih vzorcev

Zamrzovanje mleka povzroči uničenje membrane mlečnih lipidnih globul zaradi kristalizacije triacilglicerolov ali penetracije ledenih kristalov preko njihove membrane (1).

Da bi pokazali možen vpliv spremenjenih lastnosti mleka na določeno koncentracijo učinkovine, smo pripravili mlečne raztopine natrijevega diklofenakata in iz njih naredili dva niza vzorcev. Oba niza smo obdelali na enak način, pri čemer smo enega pred injiciranjem na kolono HPLC zamrznili in nato odtajali na sobni temperaturi. Površine vrhov na HPLC sistemu so bile v primeru zamrznjenih vzorcev pri koncentracijah učinkovine manjših od 75 mg/L za 14,4 -19,3 % nižje, pri koncentraciji 100 mg/L pa za 4,4 % višje kot v primeru nezamrznjenih vzorcev. Vpliv na končne izračunane profile sproščanja je bil relativno majhen, vendar smo se potencialni napaki izognili, saj smo umeritvene premice za vsak izbran medij pripravili po enakem načinu kot smo obdelali vzorce.

Dodatek baze mlečnim vzorcem

Zaradi slabe topnosti natrijevega diklofenakata v medijih z nizkim pH, smo vzorcem dodali 0,1 M NaOH (1:1), s čimer smo dvignili pH in tako povečali topnost učinkovine. Ker je bilo redčenje vzorcev dobljenih pri testih sproščanja v citratnem pufru z dodatki kisline potrebno, smo jih redčili z bazo tudi v primeru uporabe mleka z dodatki kisline (kljub temu da dodatek baze v mlečne vzorce ni bil potreben, saj se je pri njihovi obdelavi vsa učinkovina raztopila v acetonitrilu). Tako smo zagotovili enak način izvedbe poskusov. Kjer smo imeli samo mleko oziroma citratni pufer, vzorcev nismo redčili z bazo.

Pri dodatkih NaOH vzorcem smo opazili, da je prišlo do spremembe v njihovem izgledu in vonju. Baza je spremenila lastnosti medija, kar bi lahko vplivalo na rezultate analize. Da dodatek baze le malo vpliva na rezultate (5,6 % višje vrednosti pri obdelavi z bazo) smo pokazali, tako da smo vzorce ene paralelke v testu sproščanja na pretočnem sistemu, kjer smo kot medij uporabili mleko (test sproščanja PS-M), obdelali na dva načina. En niz smo pred obdelavo redčili z NaOH, drugega pa ne.

Metoda priprave vzorcev za analizo s HPLC

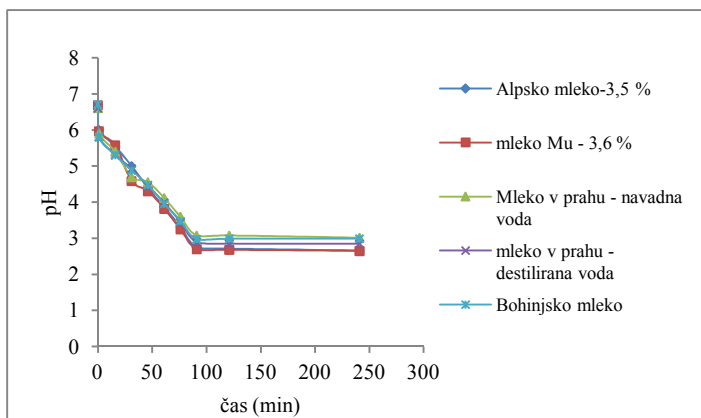
Vzorcev, ki smo jih dobili v testih sproščanja v različnih mlečnih medijih, ne moremo neposredno injicirati na kolono HPLC sistema. Vzorce je bilo potrebno predhodno obdelati s postopkom, v katerem smo uporabili acetonitril in tako odstranili mlečne komponente. Pokazali smo, da se je med postopkom obarjanja učinkovina, vezana na mlečne komponente, raztopila v acetonitrilu in da postopek obarjanja ne vpliva na količino določene učinkovine.

Postopali smo, tako da smo pripravili raztopine z različnimi koncentracijami natrijevega diklofenakata v fosfatnem pufru in mleku ter nato raztopine obdelali s postopkom obarjanja. Vzporedno z obdelanimi raztopinami smo na kolono HPLC injicirali predhodno pripravljene raztopine v fosfatnem pufru. Koncentracije predhodno pripravljenih raztopin v fosfatnem pufru so bile enake koncentracijam raztopin obdelanih s postopkom obarjanja tik pred injiciranjem na kolono HPLC.

Površine vrhov na HPLC sistemu so bile v primeru raztopin učinkovine v fosfatnem pufru, ki smo jih obdelali z acetonitrilom za 5 % nižje pri koncentraciji 5 mg/L, za 1 % nižje pri 100 mg/L in za 12 % višje pri 50 mg/L kot v primeru mlečnih vzorcev obdelanih z acetonitrilom. Površine vrhov na HPLC sistemu v primeru raztopin učinkovine v fosfatnem pufru, ki smo jih obdelali s postopkom obarjanja, in raztopin v fosfatnem pufru brez obdelave, so odstopale za največ 5 %. Potencialnim napakam smo se izognili, ker smo umeritvene premice za vsak izbran medij pripravili po enakem načinu kot smo obdelali vzorce.

7.2 Pufurna kapaciteta mleka in različnih pufrov

Pred izvajanjem poskusov smo se morali odločiti katero vrsto mleka oz. mleko katerega proizvajalca bomo v naših poskusih uporabili. Izbirali smo med: Alpskim mlekom (3,6 % maščob), mlekom Mu (3,5 % maščob), mlekom v prahu pripravljenim z destilirano vodo, mlekom v prahu pripravljenim z navadno vodo in Bohinjskim mlekom. Poskušali smo ugotoviti ali pri dodatkih 1,83 M HCl v mleko pride do različnih sprememb v pH profilu med posameznimi proizvajalci mleka. Iz slike 7 je razvidno, da razlik ni bilo. Odločili smo se, da bomo v nadaljnjih poskusih uporabili Alpsko mleko.

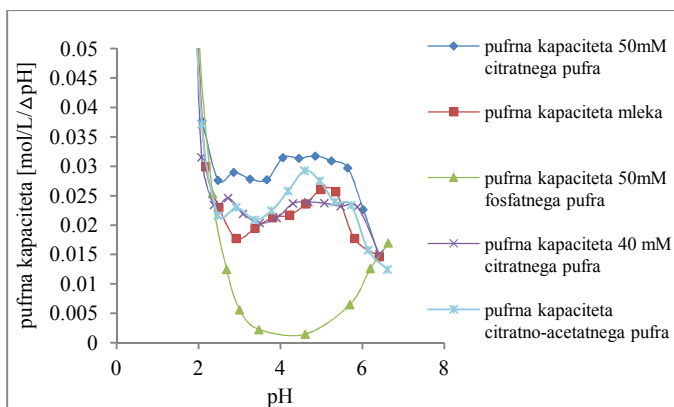


Slika 7. pH profili različnih vrst mleka po dodatkih 1,83M HCl v času 0 – 240 minut.

pH mleka je po dodatkih 1,83 M HCl padal. Ker smo enak padec pH (pri dodatkih iste kisline) želeli doseči v pufru, smo določili pufrno kapaciteto mleka in izbranih medijev ter jih med seboj primerjali.

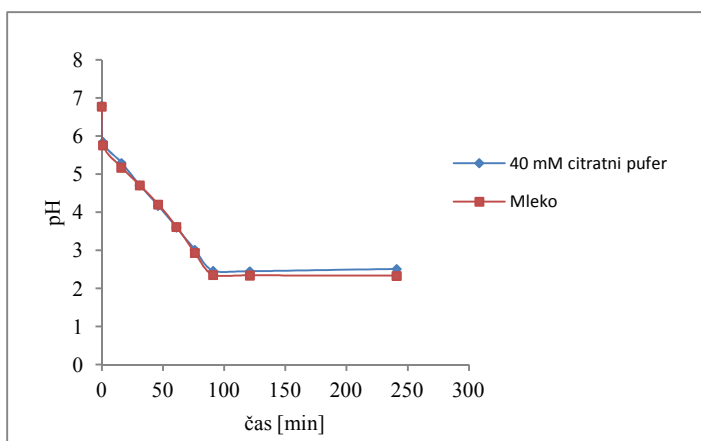
Pri določevanju pufrne kapacitete izbranim medijem smo izhajali iz 50 mM fosfatnega in 50 mM citratnega pufra. Krivulja pufrne kapacitete 50 mM citratnega pufra se v primerjavi s krivuljo 50 mM fosfatnega pufra po pH območju maksimalne pufrne kapacitete bolje prilega krivulji pufrne kapacitete mleka (slika 8). Zaradi boljšega ujemanja smo se odločili uporabiti citratni pufer, katerega koncentracijo smo znižali iz 50 mM na 40 mM. Z zmanjšanjem koncentracije smo znižali pufrno kapaciteto medija (slika 8). Naredili smo tudi citratno-acetatni pufer, katerega krivulja pufrne kapacitete se po pH območju maksimalne pufrne kapacitete prav tako dobro prilega krivulji pufrne kapacitete mleka. Odločili pa smo se, da bomo v nadaljnjih testih uporabili 40 mM citratni pufer s preprostejšo sestavo.

Pufrno kapaciteto medijev smo najprej določili z dodatki kisline v medij s pomočjo merilne birete do spremembe pH za približno 0,4 enote. pH smo odčitali takoj, ko je bila dosežena sprememba in se pH vzorca ni več spreminjal ter mu nato ponovno dodali kislino (metoda A). Kasneje smo se odločili za drug pristop in sicer z dodatki enakih volumnov kisline v mleko s pomočjo avtomatske pipete, pri čemer smo pH odčitali 15 minut po dodatku kisline v vzorec oz. tik pred novim dodatkom (metoda B). Z uporabo metode B smo dosegli boljšo ponovljivost določevanja pufrne kapacitete. Predvidevali smo, da je slabša ponovljivost določevanja pufrne kapacitete mleka z metodo A lahko posledica sesirjenega mleka, ki se je kljub pogostemu spiranju elektrode nanjo nalepilo in tako onemogočilo pravilno meritev. pH meter je bil namreč med določevanjem pufrne kapacitete z metodo A dalj časa v stiku z medijem kot pa v primeru določevanja pufrne kapacitete z metodo B.



Slika 8. Primerjava povprečij pufrnih kapacitet 40 mM in 50 mM citratnega pufr, 50 mM fosfatnega pufr, citratno-acetatnega pufr in mleka.

Z dodajanjem enakih volumnov 1,83 M HCl v mleko in 40 mM citratni pufer, smo poskušali ugotoviti njuno podobnost z vidika spreminjanja pH po dodatkih kisline. pH profila se zelo dobro ujemata, kar je razvidno iz slike 9. Pufer smo zaradi dobrega ujemanja uporabili v testih sproščanja. Sprejeli smo ga kot pufrni medij primeren za simulacijo mleka pri dodatkih kisline.



Slika 9. Povprečni pH profili 40 mM citratnega pufr in mleka po dodatkih 1,83 M HCl v času 0 – 240 minut.

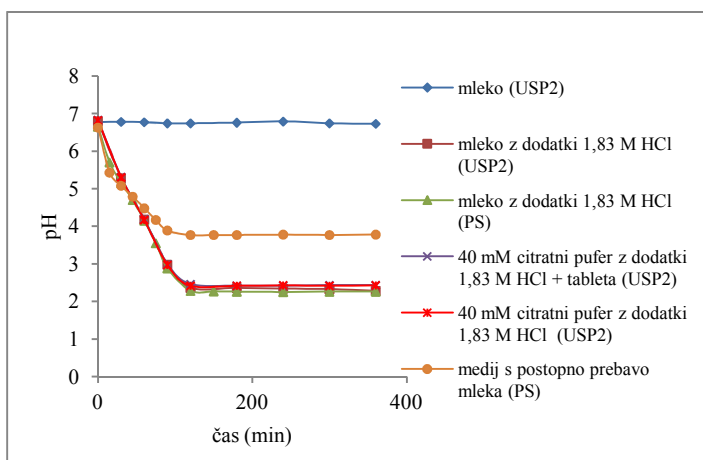
7.3 pH profili medijev med testi sproščanja

Tekom testov sproščanja na aparatu 2 po USP smo merili pH vrednosti naslednjim medijem: mleku, mleku z dodatki 1,83 M HCl, 40 mM citratnemu pufru z dodatki 1,83 M HCl ter 40 mM citratnemu pufru z dodatki 1,83 M HCl v katerem je bila tableta iz katere se je sproščal natrijev diklofenakat. Tekom testov sproščanja na pretočnem sistemu pa smo izmerili pH vrednosti mleku z dodaki 1,83 M HCl in mediju s postopno prebavo mleka. Izmerjene pH vrednosti medijev v času 0-360 minut smo med seboj primerjali.

pH čistega mleka, ki mu nismo dodajali kisline, je ostal nespremenjen tekom celotnega testa. pH vrednosti ostalih medijev so padale zaradi dodane kisline. V medijih 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl in mleko z dodatki 1,83 M HCl so bile dosežene najnižje vrednosti pH. Volumen kisline za oba medija smo preračunali, tako da sta bila pH profila medijev po dodatkih kisline enaka tako pri testih sproščanja na pretočnem sistemu kot na aparatu 2 po USP. Ker je merjenje pH potekalo v čaši, kjer smo tvorili svež medij, smo upoštevali, da pride v delavni časi do zamika v spremembi pH po dodatku kisline (52). V mediju s postopno prebavo mleka so bile dosežene višje vrednosti kot pa v medijih 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl in mleko z dodatki 1,83 M HCl. Večje vrednosti so verjetno posledica povečane pufrne kapacitete medija zaradi produktov prebave mleka (26).

Tableta v mediju ne vpliva na pH, saj sta pH profila 40 mM citratnega pufera z dodatki 1,83 M HCl s tableto in enakega medija brez tablete enaka.

Na spodnji sliki 10 so prikazani pH profili medijev tekom testov sproščanja.



Slika 10. pH profili v času 0 – 360 minut v medijih: mleko, mleko z dodatki 1,83 M HCl, 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl z in brez uporabe tablete, medij s postopno prebavo mleka. V oklepajih je podan sistem na katerem je bil test izveden (USP2-aparat 2 po USP, PS-pretočni sistem).

7.4 Testi sproščanja

7.4.1 Preliminarni testi sproščanja

Pred izvajanjem testov sproščanja smo s preliminarnimi testi postopoma določili metodo, ki smo jo uporabili v končnih testih sproščanja. V vseh testih smo uporabili tablete s prirejenim sproščanjem

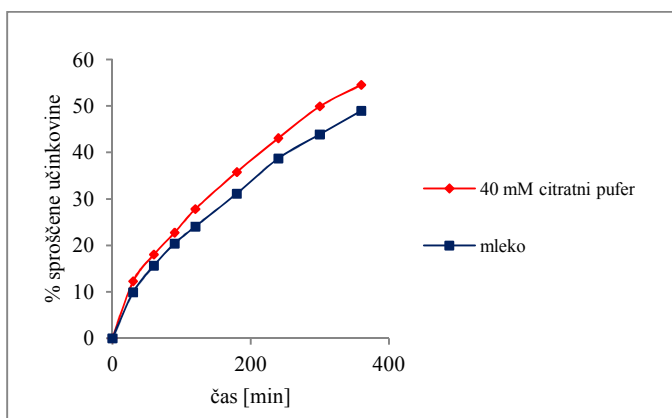
Vpliv različnih volumnov medija in mehanskih obremenitev na sproščanje pri uporabi aparata 1 in aparata 2 po USP

Teste sproščanja smo izvedli na aparatu 2 po USP in aparatu 1 po USP. Preučevali smo vpliv različnih volumnov na sproščanje učinkovine iz tablet. Uporabili smo 1000 mL (testa sproščanja USP2-1000/P in USP1-1000/P), 600 mL (USP1-600/P) in 300 mL (USP1-300/P) fosfatnega pufra. Hitrost sproščanja je bila najmanjša v 1000 mL medija pri testu sproščanja na aparatu 1 po USP. V 24 h se je sprostilo približno 80 % učinkovine, medtem ko se je pri enakem volumnu medija na aparatu 2 po USP sprostilo 100 % učinkovine. V testih sproščanja s 300 mL in 600 mL medija se je sprostilo približno 90 % učinkovine. Predvidevali smo, da je rezultat posledica lege tablete v košarici aparata 1 po USP, saj je v primeru testa sproščanja v 1000 mL tableta obeh paralelek lebdela tik pod vrhom košarice, kjer ni mrežice, ampak je kovinska ploščica. Tableta je imela posledično manjšo površino na razpolago za sproščanje učinkovine. Tableti v testih sproščanja s 300 mL in 600 mL sta bili v celoti potopljeni v medij (v primeru 300 mL sta ležali na dnu košarice, v primeru 600 mL pa sta se vrteli med vrhom in dnom košarice), zato se je učinkovina lahko sproščala preko celotne površine tablete. Večja hitrost sproščanja v 1000 mL fosfatnega pufra pri uporabi aparata 2 po USP v primerjavi z uporabo aparata 1 po USP je tudi posledica večje mehanske obremenitve zaradi mešanja medija kot v primeru uporabe aparata 1 po USP.

Vpliv modifikacije aparata 2 po USP

Odločili smo se za izvedbo testa sproščanja v 300 mL medija na aparatu 2 po USP, ki smo ga modificirali. Tableto v zviti žički smo s kovinsko žičko obesili tik nad veslo. Med paralelkami je prišlo do razlik v sproščanju, za katere smo predvidevali, da so posledica nestabilnih žičk, ki so se rahlo premikale zaradi vrtenja vesel aparata 2 po USP. Zvito žičko smo nato uporabili kot uteževalec in tako izboljšali ponovljivost. Na aparatu 2 po

USP, s tableto v uteževalcu, smo najprej izvedli testa sproščanja v 40 mM citratnem pufru (USP2-C) in mleku (USP2-M). Profila sproščanja sta bila podobna ($f_1 < 15$), kar se vidi na sliki 11.



Slika 11. Povprečni profil sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v mleku in 40 mM citratnem pufru na aparatu 2 po USP.

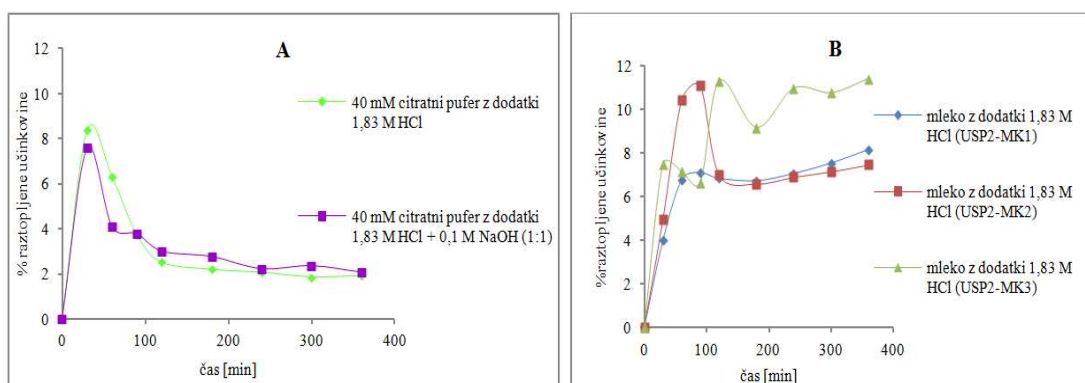
Vpliv dodatkov 1,83 M HCl v medij

S preliminarnimi testi sproščanja na aparatu 1 po USP smo dobili dobro ponovljivost. Ker pa smo v nekaterih testih sproščanja kot medij nameravali uporabiti mleko z dodatki 1,83 M HCl, aparat 1 po USP ni bil primeren za izvedbo naših testov. Sesirjeno mleko bi se namreč naložilo na košarico aparata in preprečilo prost pretok medija skozi reže in posledično odtekanje in sproščanje učinkovine.

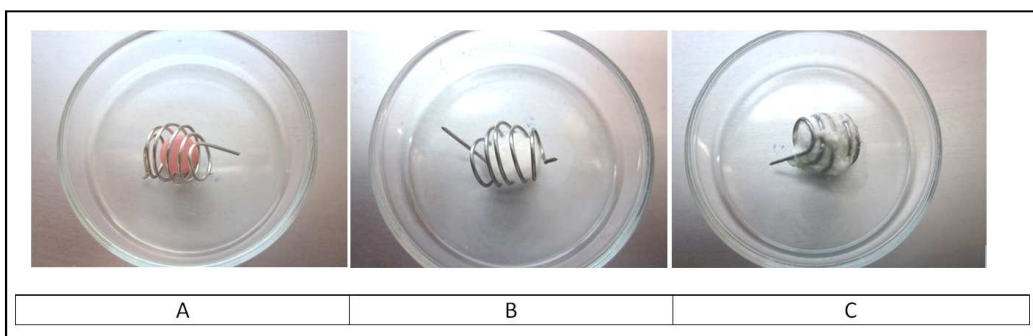
Profila sproščanja, dobljena pri testu sproščanja na aparatu 2 po USP v 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl (USP2-CK) in mleku z dodatki 1,83 M HCl (USP2-MK), kjer smo tableto namestili v uteževalec, sta si podobna (slika 12). Tekom testa sproščanja je zaradi zmanjšane topnosti natrijevega diklofenakata v kislem mediju prišlo do obarjanja učinkovine. Vzorce ene paralelke, dobljene pri testu sproščanja v 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl smo za analizo pripravili, tako da smo 1,5 mL vzorca filtrirali in analizirali oziroma 1,5 mL vzorca iste paralelke najprej redčili z 1,5 mL 0,1 M NaOH (da smo raztopili oborjeno učinkovino), ga filtrirali in nato analizirali. Ker se profila sproščanja kljub različni obdelavi vzorcev nista razlikovala, smo predvidevali, da so se oborjeni delci učinkovine posedli na dno posode aparata 2 po USP, zaradi česar jih nismo zajeli v vzorce.

Pri testu sproščanja na aparatu 2 po USP v mleku z dodatki 1,83 M HCl se je, kljub temu da je pH profil medija enak pH profilu citratnega pufru z dodatki 1,83 M HCl, sprostito nekoliko več učinkovine, vendar tega zaradi variabilnosti rezultatov med posameznimi paralelkami pri testu sproščanja v mleku z dodatki 1,83 M HCl ne moremo z gotovostjo trditi. Predvidevali smo, da so na sproščanje vplivale druge (po dodatkih kisline spremenjene) lastnosti mleka. Žička - uteževalec, v katero smo namestili tableto, da se ne bi lepila na dno in stene posode, ni primerna za teste sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem na aparatu 2 po USP, kjer kot medij uporabimo mleko z dodatki 1,83 M HCl. Sesirjeno mleko se je nabralo med tableto in žičko (slika 13), kar je zmanjšalo oziroma onemogočilo že tako majhno sproščanje iz tablete.

Ker aparat 2 po USP ni bil primeren za izvajanje testov sproščanja v medijih z dodatki 1,83 M HCl, smo se odločili, da bomo za nadaljnje teste uporabili pretočni sistem.



Slika 12. Povprečni profil sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl po analizi z oziroma brez redčenja z 0,1 M NaOH v razmerju 1:1 (A). Profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v mleku z dodatki 1,83 M HCl-podane so tri paralelke (B).



Slika 13. Primerjava tablet po končanih testih sproščanja pred (A) in po testih sproščanja v mleku (B) in mleku z dodatki 1,83 M HCl (C).

7.4.2 Končni testi sproščanja

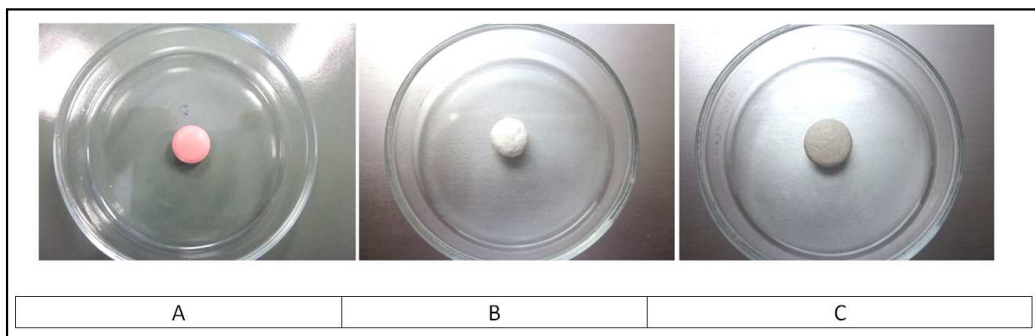
Na pretočnem sistemu smo uporabili enake medije kot pri uporabi aparata 2 po USP. Medije, ki smo jih tvorili postopno (med poskusom), smo pripravili s tako koncentracijo kisline, kot je bila uporabljena v poskusih na aparatu 2 po USP. Na pretočnem sistemu smo uporabili tudi medije z dodatkom encimov. Medij smo tvorili v rezervoarju, iz katerega smo ga črpali v čašo s steklenimi kroglicami, kjer je poskus potekal. S steklenimi kroglicami smo ponazorili mehanske in hidrodinamske obremenitve želodca, ki jim je tableta v želodcu izpostavljena.

Profila sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v mleku in 40 mM citratnem pufru sta podobna (slika 15). Sprostilo se je približno 97 % učinkovine. V primerjavi s testi sproščanja (v istih medijih) na aparatu 2 po USP se je v testih sproščanja na pretočnem sistemu sprostilo več učinkovine. Predvidevali smo, da je večje sproščanje posledica mehanskih in hidrodinamskih obremenitev, na katere je tableta občutljiva.

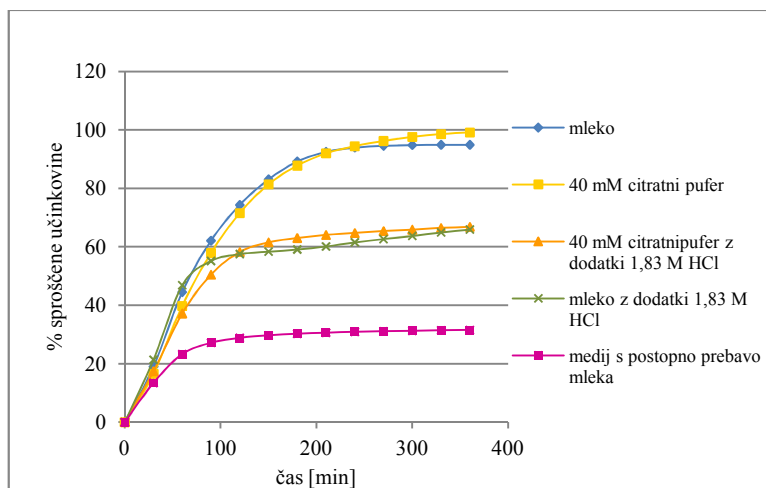
V testih sproščanja, kjer smo kot medij uporabili mleko oziroma 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl, je bilo sproščanje manjše kot pa v primeru istih medijev brez dodatkov kisline (slika 15). Sprostilo se je približno 65 % učinkovine. Profila sproščanja pa sta si bila prav tako podobna. Predvidevali smo, da je bilo zmanjšano sproščanje posledica nižjega pH medija zaradi dodatkov kisline.

Na sliki 15 lahko vidimo, da se je v mediju s postopno prebavo mleka (mleku smo dodajali 1,83 M HCl s pepsinom koncentracije 1,1 mg/mL in lipazo) sprostilo najmanj učinkovine (približno 32 %). Glede na pH profile medijev (slika 10) smo pričakovali, da bo sproščanje

v mediju s postopno prebavo mleka manjše kot sproščanje v mleku in 40 mM citratnem pufru, vendar večje od sproščanja v mleku oziroma 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl. Predvidevali smo, da je do najmanjšega sproščanja v mediju s postopno prebavo mleka poleg znižanja pH medija prišlo predvsem zaradi obloge (tableta je bila po končanem testu sproščanja večja in obarvana rahlo rjavo) okrog tablete (slika 14). Sklepali smo, da se je okrog tablete nabrala plast produktov prebave mleka. Obloga je oteževala sproščanje.



Slika 14. Tableta pred sproščanjem (A), po sproščanju v mleku z dodatki 1,83 M HCl (B) in po sproščanju v mediju s postopno prebavo mleka (C).



Slika 15. Profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem v mleku, 40 mM citratnem pufru, mleku oziroma 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl in mediju s postopno prebavo mleka.

V testih sproščanja, ki smo jih izvedli na pretočnem sistemu, smo opazili, da sta na sproščanje učinkovine iz tablet vplivala pH medija in obloga, ki se je med sproščanjem nabrala okrog tablete. Za določitev vpliva osmolalnosti, ionske moči, viskoznosti in

površinske napetosti na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem bi morali narediti še dodatne teste sproščanj. Uporabili bi medij (npr. citratni pufer), vanj dali snov, s katero bi spremenili lastnost, katere vpliv določamo in primerjali profile sproščanja. V nadaljnjih študijah bi bilo potrebno preučiti vpliv obloge (na sproščanje), ki se nabere okrog tablete v primeru testov sproščanja iz tablet s prirejenim sproščanjem v mediju s postopno prebavo mleka. V ta namen bi narediti pufer, katerega pH bi po dodatku kisline padal enako kot pH medija s postopno prebavo mleka. Obloga se v pufru ne bi tvorila in ne bi imela vpliva na sproščanje. Predvidevamo, da bi se v takem pufru sprostilo več učinkovine kot v mediju s postopno prebavo mleka, mleku z dodatki 1,83 M HCl in 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl, vendar manj kot v mleku in 40 mM citratnem pufru.

8 SKLEP

Naredili smo enostavni raztopini (40 mM citratni pufer in 40 mM citratni pufer z dodatki 1,83 M HCl), v katerih smo izvedli teste sproščanja iz tablet s prirejenim sproščanjem in rezultate primerjali z rezultati testov sproščanja v različnih mlečnih medijih, ki simulirajo pogoje polnega želodca (mleko, mleko z dodatki 1,83 M HCl in medij s postopno prebavo mleka). 40 mM citratni pufer in mleko imata podobno pufrno kapaciteto, njuna pH profila po dodajanju iste kisline sta enaka.

Ugotovili smo:

- Zamrzovanje, redčenje mlečnih vzorcev z 0,1 M NaOH (1:1) in metoda priprave mlečnih vzorcev za analizo s HPLC le malo vplivajo na določanje koncentracije natrijevega diklofenakata. Potencialni napaki smo se izognili, saj smo umeritvene premice pripravili na enak način kot vzorce.
- pH profili mleka po dodatkih 1,83 M HCl se med različnimi proizvajalci mleka ne razlikujejo.
- 40 mM citratni pufer je primeren medij za ponazarjanje pH profila mleka po dodatkih kisline. pH profil mleka (začetni pH=6,78) in 40 mM citratnega pufra (začetni pH=6,80) sta po dodatkih enakih volumnov 1,83 M HCl enaka.
- pH čistega mleka se med poskusom pri 37 °C ne spreminja (pH=6,7).
- V 40 mM citratnem pufu oziroma mleku z dodatki 1,83 M HCl pH pada zaradi dodane kisline. Tableta oz. sproščena učinkovina na pH profil 40 mM citratnega pufra z dodatki 1,83 M HCl ne vpliva.
- pH je pri mediju s postopno prebavo mleka višji kot pri 40 mM citratnem pufu in mleku z dodatki 1,83 M HCl.
- Poleg volumna ima na sproščanje na aparatu 1 po USP velik vpliv položaj tablete v košarici. Če tableta ni v celoti obdana z medijem, ima na razpolago manjšo površino za sproščanje učinkovine.
- Na sproščanje pri testih sproščanja na aparatu 1 po USP in aparatu 2 po USP vplivajo tudi mehanske obremenitve zaradi vrtenja košarice oziroma vesla.
- Sproščanje na aparatu 2 po USP, kjer tableto pritrdimo v žičko nad veslo, je odvisno od lege in mirovanja oziroma gibanja pritrjene tablete.

- V primeru, ko v testih sproščanja kot medij uporabimo mleko z dodatki kisline, uporaba aparata 1 po USP in aparata 2 po USP, kjer uporabimo uteževalec, ni primerna. Sesirjeno mleko se namreč nabere na košarico oziroma uteževalec in oteži sproščanje iz tablete.
- Uporaba aparata 1 po USP, aparata 2 po USP in aparata 2 po USP, kjer uporabimo žičko obešeno tik nad veslo oziroma uteževalec, ni primerna za teste sproščanja natrijevega diklofenakata v mleku in 40 mM citratnem pufru, ki jima dodajamo kislino, saj se v kislem mediju oborjeni delci učinkovine posedejo na dno posode zaradi česar jih ne zajamemo v vzorce.
- Sproščanje natrijevega diklofenakata na pretočnem sistemu v 40 mM citratnem pufru in mleku, kjer se zaradi najvišje pH vrednosti medija sprosti največ učinkovine, je podobno. Prav tako sta si med seboj podobna profila sproščanja v mleku oziroma 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl, kjer z dodatki kisline dosežemo najnižjo vrednost pH. Kljub temu da je pH v mediju s postopno prebavo mleka višji kot v mleku oziroma 40 mM citratnem pufru z dodatki 1,83 M HCl, se tu sprosti najmanj učinkovine. Na najmanjše sproščanje v mediju s postopno prebavo mleka poleg padca pH medija vpliva sloj produktov prebave mleka, ki se nabere okrog tablete. Nastali plašč zmanjša sproščanje učinkovine.
- Pri uporabi pretočnega sistema je 40 mM citratni pufer primeren medij, s katerim lahko ponazorimo pH profil čistega mleka oziroma mleka z dodatki kisline in neprimeren za ponazoritev pH profila medija s postopno prebavo mleka.

9 LITERATURA

1. Klein S, Butler J, Hempenstall J M, Reppas C and Dressman J B. Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004; 56: 605-610.
2. Dressman J B, Amidon G L, Reppas C and Shan V P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 1998; 15(1): 11-22.
3. Jantratid E, Janssen N, Reppas C and Dressman J B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharmaceutical Research*, 2008; 25(7): 1663-1676.
4. Garbacz G, Wedbemeyer R S, Nagel S, Giessmann T, Monnikes H, Wilson C G, Sigmund W, 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.
5. Ložar K. Vpliv simuliranih fizioloških pogojev želodca na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
6. Dahmane R. Ilustrirana anatomija. Prebavila, digestivni aparat. 2nd ed. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2005; 95-107.
7. Camilleri M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. *Gastroenterology*, 2006; 131(2): 640-658.
8. Glavač A. Ponazarjanje sil v želodcu na pretočnem sistemu s kroglicami in njihov vpliv na sproščanje iz tablet. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2010.
9. <http://www.virtualmedicalcentre.com/anatomy.asp?sid=Gastrointestinal-System#C6>. Dostopano 11-2011.

10. Dorland I, Newman W A. Dorland's illustrated medicinal dictionary. 31st ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007; 1428.
11. Wu T, Sun L C, Du C H, Cai Q F, Zhang Q B, Su W J, Cai M J. Identification of pepsinogenes and pepsines from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). Food Chemistry, 2009; 115: 137-142.
12. Mukherjee M. Human digestive and metabolic lipases-a brief review. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003; 22: 369-376.
13. Hamosh M. Lingual and gastric lipases. Nutrition, 1990; 6(6): 421-428.
14. Bresjanac M et al. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001.
15. Hur S J, Lim B O, Decker E A, McClements D J. In vitro human digestion models for food applications. Food Chemistry, 2011; 125: 1-12.
16. Qi W, Su R X, He Z M, Zhang Y B, and Jin F M. Pepsin-induced changes in the size and molecular weight distribution of bovine casein during enzymatic hydrolysis. American Dairy Science Association, 2007; 90: 5004-5011.
17. Forzani E S, Bernardi M E, Sisti A M, Zarzur J A, Solis V M. Indirect determination of pepsin activity in human seric protein samples by polyphenol oxidase electrodes. Analytica Chimica Acta, 2002; 460: 163-175.
18. Singh H, Ye A, Horne D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. Progress in Lipid Research, 2009; 48: 92-100.
19. Miled N, Cannan S, Dupuis L, Roussel A, Riviere M, Carriere F, de Caro A, Cambillau C, Verger R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. Biochimie, 2000; 82: 973-986.
20. Iverson S J, Kirk C L, Hamosh M, Newsome J. Milk lipid digestion in the neonatal dog: the combined actions of gastric and bile salt stimulated lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 1991; 1083: 109-119.
21. Canaan S, Roussel A, Verger R, Cabillau C. Gastric lipase: crystal structure and activity. Biochimica et Biophysica Acta, 1999; 1441: 197-204.

22. Embleton J K, Pouton C W. Structure and function of gastro-intestinal lipase. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997; 25: 15-32.
23. Boyer R. *Temelji biokemije*. 2nd ed, Študentska založba, Ljubljana, 2005.
24. Di Maio S, Carrier R L. Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2011; 151(1): 110-122.
25. Kalantzi L, Goumas C, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman J B, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, 2006; 23(1): 165-176.
26. Diakidou A, Vertzoni M, Abrahamsson B, Dressman J, Reppas C. Simulation of gastric lipolysis and prediction of felodipine release from matrix tablet in the fed stomach. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2009; 37: 133-140.
27. Fox P F, O'Connor T P, McSweeney. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in food and Nutritional Research*, 1996; 39: 163-328.
28. <http://foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>. Dostopano 10-2011.
29. Lindmark Mansson H. Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research*, 2008; 52: 1-3.
30. Jensen R G. *Handbook of milk composition*, Academic press, San Diego, 1995.
31. Creamer L K, MacGibbon A K H. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*, 1996; 6: 539-568.
32. Horne D S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current opinion in colloid and interface science*, 2006; 11: 148-153.
33. Chakraborty A, Basak S. pH-induced transition of caseins . *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007; 87: 191-199.
34. Panouille M, Nicolai T, Durand D. Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles. *International Dairy Journal*, 2004; 14: 297-303.

35. Walstra P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 1999; 9: 189-192.
36. Anema S G, Lee S K, Klostermeyer H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2005; 40: 99-106.
37. Ye A, Cui J, Singh H. Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during in vitro gastric digestion of milk. *American Dairy Science Association*, 2010; 94: 2762-2770.
38. Heid H W, Keenan T W. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology*, 2005; 84: 245-258.
39. Bermudez-Aguirre D, Mawson R, and Barbosa-Canovas. Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*, 2008; 73(7): 325-331.
40. Fong B Y, Norris C S, MacGibbon A K H. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, 2007; 17: 275-288.
41. <http://www.drcate.com/raw-milk-why-mess-with-udder-perfection/>.
Dostopano: 12-2011.
42. Lutchman D, Pillay S, Naidoo R, Shangase N, Nayak R, Rughoobee A. Evaluation of the buffering capacity of powdered cow's, goat's and soy milk and non-prescription antacids in the treatment of non-ulcer peptic acid. *South African Medical Journal*, 2006; 96(1): 57-61.
43. Anema S G, Lowe E K, Lee S K. Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2004; 37: 779-787.
44. Vasbinder A J, Alting A C, Visschers R W, De Kruif C G. Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, 2003; 13: 29-38.

45. McMahon D J, Du H, McManus W R, Larsen K M. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. American Dairy Science Association, 2009; 92: 5854-5876.
46. Chuasuwan B, Binjesoh V, Polli J E, Zhang H, Amidon G L, Junginger H E, Midha K K, Shah V P, Stavchansky S, Dressman J B, Barends D M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Diclofenac sodium and diclofenac potassium. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009; 98(4): 1206-1219.
47. http://www2ucdsb.on.ca/tiss/stretton/database/polyprotic_acids.htm.
Dostopano 8.3.2012.
48. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/acidity2.html>.
Dostopano 8.3.2012.
49. <http://www.chembuddy.com/?left=pH-calculation&right=pH-buffer-capacity>.
Dostopano 26.2.2012.
50. Shah V P, Tsong Y Sathe P and Jen-Pei Liu. In vitro dissolution profile comparison-statistics of the similarity factor f_2 . Pharmaceutical Research, 1998; 15(6): 889-895.
51. <http://www.pharmainfo.net/similarity-factor-f2>. Dostopano: 12-2011.
52. Cof M. Sproščanje natrijevega diklofenakata iz Voltaren tablet. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2010.