

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA DRAKSLER

VPLIV ČASA IZPOSTAVLJANJA PELET KISLEMU
ŽELODČNEMU MEDIJU NA SPROŠČANJE NATRIJEVEGA
DIKLOFENAKATA

THE INFLUENCE OF EXPOSURE TIME OF PELLETS TO
GASTRIC MEDIUM ON THE RELEASE OF DICLOFENAC
SODIUM

Ljubljana, 2012

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

Zahvala

Za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. Za vodenje in prijazne nasvete se najlepše zahvaljujem vsem sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko. Posebno se zahvaljujem gospe Greti Cof, ki mi je s svojimi nasveti in znanjem olajševala laboratorijsko delo ter polepšala dneve, preživete v laboratoriju.

Za podporo v času mojega študija se iskreno zahvaljujem svojim staršem, fantu Primožu ter vsem mojim bližnjim.

Izjava

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

Petra Draksler

KAZALO

KAZALO.....	2
POVZETEK	4
SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
1 UVOD	7
1.1 Metode raztopljanja.....	7
1.1.1 Metoda za sproščanje serij (3)	9
1.1.2 Diskriminatorna metoda raztopljanja (3)	10
1.1.3 Metoda testiranja raztopljanja za registracijo v Evropi (2)	11
1.1.4 Metode testiranja raztopljanja za registracijo v Ameriki (3, 4)	12
1.1.5 Metode raztopljanja za namen registracije na Japonskem (5, 6, 7).....	12
1.2 Izbira medija za raztopljanje	13
1.2.1 Farmakopejski pufri.....	16
1.2.2 Nekonvencionalni mediji.....	18
1.2.3 Primerjava vseh medijev med seboj	36
1.3 Fizikalno-kemijske lastnosti diklofenaka	37
1.4 Farmakološke lastnosti diklofenaka.....	38
2 NAMEN DELA.....	39
3 MATERIALI IN METODE.....	40
3.1 Pelete s podaljšanim sproščanjem.....	40
3.2 Snovi, uporabljene pri delu	40
3.3 Aparature	40
3.4 Raztopine	41
3.4.1 Simuliran želodčni medij s pH 1.8	41
3.4.2 Simuliran črevesni medij s pH 6.8	41
3.4.3 Simuliran medij kolona s pH 5.8.....	42
3.5 Metode	43
3.5.1 UV/VIS spektroskopija.....	43
3.5.2 Merjenje gostote pelet.....	43
3.5.3 Določanje pH-profila	44
3.5.4 pH-profil pri povečanih pretokih.....	44

3.5.5	Hitrejši dvig pH z dodajanjem različnih bazičnih raztopin.....	44
3.5.6	Sproščanje natrijevega diklofenakata	45
3.5.7	Računsko podaljševanje profilov sproščanja.....	48
3.5.8	Oteženi profili sproščanja.....	49
4	REZULTATI.....	51
4.1	Določanje enačb umeritvenih premic	51
4.2	Merjenje gostote pelet.....	53
4.3	pH-profil pri normalnem in pospešenem pretoku.....	54
4.3.1	Hitrejši dvig pH z dodajanjem različnih bazičnih raztopin.....	56
4.4	Testi sproščanja.....	57
4.4.1	Vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata.....	57
4.4.2	Oteženi profili sproščanja.....	65
5	RAZPRAVA	66
5.1	Utemeljitev eksperimentalnega dela in načina dela.....	66
5.2	Izbira analizne metode	68
5.3	Merjenje gostote pelet.....	69
5.4	pH-profil	70
5.5	pH-profil pri povečanih pretokih	70
5.5.1	Dvig pH z 1.8 na 6.8	71
5.6	Vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata.....	71
5.6.1	Vpliv topnosti na sproščanje natrijevega diklofenakata	73
5.6.2	Ostali vplivi na sproščanje	74
5.7	Oteženi profili sproščanja	75
5.8	Možnosti nadaljnjih poskusov	76
6	SKLEPI	78
7	VIRI IN LITERATURA	80

POVZETEK

V diplomskem delu smo testirali sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem. Osredotočili smo se predvsem na čas zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju. Teste raztpljanja smo izvajali na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami s konstantnimi parametri: volumen delovne čaše je bil 150 mL, masa uporabljenih kroglic 25 g, volumen medija v delovni čaši 40 mL in hitrost mešanja magnetnega mešala 50 obratov/minuto. Med poskusom smo spremajali čas izpostavitve pelet kislemu želodčnemu mediju in ugotavliali, kako različni časi izpostavljanja pelet kislemu želodčnemu mediju vplivajo na sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike (FO). Kot simulirani želodčni medij smo uporabili medij s pH 1.8, simuliran črevesni sok pa je ponazarjal fosfatni pufer s pH 6.8.

Za poskuse, s katerimi smo proučevali vpliv različnih časov zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju s pH 1.8, smo uporabili 7 različnih časov zadrževanja pelet v kislem mediju (5, 20, 40, 60, 100, 150 in 200 minut). Pri testih raztpljanja smo v vzorcih določali celotno sproščeno učinkovino. Ugotovili smo, da se pri daljših časih zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju podaljša čas, ko pride do začetka sproščanja učinkovine. Dobljene profile sproščanja smo, z upoštevanjem odstotkov pelet, ki v *in vivo* pogojuh, v določenem časovnem intervalu, zapustijo želodec, ustrezno otežili in izračunali oteženi profil sproščanja, ki je približek *in vivo* profila sproščanja učinkovine, na podlagi katerega lahko, ob dobri permeabilnosti diklofenaka in odsotnosti predsistemskega metabolizma, napovemo absorpcijski profil.

Z določitvijo pH-profila smo skušali ugotoviti, kako hitrost in čas povečanega pretoka po zamenjavi kislega želodčnega medija s simuliranim črevesnim vplivata na hitrost dviga pH. S povečanim pretokom smo tako poskušali ponazoriti *in vivo* pogoje ob prehodu pelet iz želodca v območje z višjim pH v tankem črevesju. Poleg povečane hitrost ter časa povečanih pretokov smo za hiter dvig pH uporabili tudi različne bazične raztopine, ki smo jih dodali simuliranemu želodčnemu mediju in po dodatku izmerili pH-profil raztopine. Ugotovili smo, da je dvig pH med testiranjem hitrejši če pretok za 7 minut iz 2 mL/min povečamo na 10 mL/min ter ob dodatku 0.580 mL 1 M bazične raztopine $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$.

Ugotavljali smo tudi gostoto pelet v simuliranem želodčnem in črevesnem mediju in ugotovili, da se gostota pelet spremeni (zmanjša) ob prihodu v medij z višjo pH-vrednostjo.

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS – biofarmacevtski klasifikacijski sistem

BE – bioekvivalenca

DR – delayed release; FO z zakasnjenim sproščanjem

FaSSGF – fasted state simulating gastric fluid; simuliran želodčni sok za pogoje na tešče

FaSSIF – fasted state simulating intestinal fluid; simuliran črevesni sok za pogoje na tešče

FDA – Food and Drug Administration

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

IR – immediate release forms; FO s hitrim sproščanjem

IVIVC – *in vitro - in vivo* korelacija

KMK – kritična micelna koncentracija

MMC – mioelektrični oz. migracijski motorični kompleks

MR – modified release forms; FO s prizadelenim sproščanjem

p(CO₂) – parcialni tlak ogljikovega dioksida

PAS – površinsko aktivna snov

PS – pomožne snovi

R² – kvadrat Pearsonovega koeficiente korelacije

RSD – relativna standardna deviacija

SCoF – simulated colonic fluid; simuliran medij kolona

SD – standardna deviacija

SGF – simulated gastric fluid; simuliran želodčni medij

SGF_{sp} – simulated gastric fluid without pepsin; simuliran želodčni medij brez pepsina

SIF – simulated intestinal fluid; simuliran črevesni medij

SIF_{sp} – simulated intestinal fluid without pancreatin; simuliran črevesni medij brez pankreatina

sink pogoji – pogoji, ko naj bi bil volumen medija vsaj 3-krat večji od tistega, pri katerem je dosežena maksimalna topnost pri testni temperaturi

SLS – natrijev lavril sulfat

USP – ameriška farmakopeja (The United States Pharmacopeia)

1 UVOD

Peroralna aplikacija je ena izmed najpogostejših aplikacij zdravil. Absorpcija učinkovine iz trdne FO je določena z njeno topnostjo in permeabilnostjo skozi črevesno membrano. Omejujoč faktor absorpcije določene dobro permeabilne učinkovine zato lahko predstavljata raztpljanje in topnost učinkovine iz FO. Zaradi tega je pred samo izvedbo kakršnekoli študije pomembno okarakterizirati učinkovino in ji določiti fizikalno-kemijske lastnosti, s katerimi nato lahko načrtujemo ustrezni *in vitro* poskus, na podlagi katerega lahko nato predpostavimo obnašanje učinkovine v *in vivo* okolju.

Pri napovedi absorpcije učinkovine iz gastrointestinalnega trakta (GIT) si lahko pomagamo z BCS-klasifikacijo. Po njej razdelimo zdravila na štiri razrede glede na njihovo topnost in permeabilnost. V razred I spadajo zdravila z visoko permeabilnostjo in dobro topnostjo v vodnih medijih s pH od 1 do 8; v razred II spadajo učinkovine z dobro permeabilnostjo in slabo topnostjo; v razred III se uvrščajo spojine z dobro topnostjo in slabo permeabilnostjo; v razred IV pa spadajo spojine s slabo topnostjo in permeabilnostjo (1).

V I. razredu, kjer ni problemov s topnostjo in permeabilnostjo, je absorpcija učinkovine visoka. Pri II. razredu pa je premišljena izbira medija za raztpljanja, s katerim naj bi ponazorili pogoje *in vivo*, pomembnejša, saj vanj spadajo učinkovine z visoko permeabilnostjo in omejeno topnostjo v GIT. Ker je topnost učinkovin, ki spadajo v II. in IV. razred BCS, omejujoč faktor absorpcije, lahko na njihovo topnost vplivamo s PAS, pH, ionsko močjo, pufrsko kapaciteto in volumnom medija za raztpljanje (11). Medij za test raztpljanja naj bi kar najbolje ponazarjal GIT in tako dosegel kar najboljšo napoved obnašanju učinkovine *in vivo*. S testi raztpljanja lahko dobro napovemo obnašanje učinkovine v *in vivo* okolju in na njihovi podlagi s pomočjo IVIVC napovemo BE (1).

1.1 Metode raztpljanja

S testi raztpljanja *in vitro* lahko napovemo obnašanje učinkovine v *in vivo* okolju. Uporabljajo se v razvojni fazi FO za spremljanje vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, vpliva tehnološkega procesa, vpliva FO in stabilnosti izdelka. Glede na to lahko določimo FO, ki je najprimernejša za BE-študijo. S pomočjo testov raztpljanja potrjujemo tudi kakovost izdelka različnih serij (t. i. batch-to-batch quality) ter sprostitev

le-teh. Če pride do kasnejših manjših sprememb v FO (postapproval, minor changes), mora biti nov izdelek primerljiv z izdelkom, uporabljenim v BE-študiji, *in vitro* test raztopljanja nove FO tako lahko nadomesti BE-študijo za to obliko (2).

Če izdelku dokažemo najvišjo stopnjo IVIVC – nivo A, lahko *in vitro* test raztopljanja služi kot pokazatelj obnašanja produkta *in vivo*. Glede na želene cilje se, z upoštevanjem regulatornih zahtev in farmakopejskih predpisov, ki veljajo za posamezne države, v industriji uporabljajo tri različne metode raztopljanja (2, 3):

- metoda za sproščanje serij (RDT – release dissolution test),
- diskriminatorna metoda raztopljanja (DDT – discriminating dissolution test),
- metoda za raztpljanje za namen registracij, ki se glede na regulatorne zahteve posameznih trgov deli še na:
 - metodo raztopljanja za namen registracije v Evropi (EDT – European dissolution test) (2),
 - metodo raztopljanja za namen registracije v ZDA (ADT – American dissolution test) (3),
 - metodo raztopljanja za namen registracije v Kanadi (CDT – Canadian dissolution test) (4) in
 - metodo raztopljanja za namen registracije na japonskem trgu (JDT – Japanese dissolution test) (5).

Pri vseh metodah raztopljanja so opisani kriteriji, s pomočjo katerih lahko izberemo pravo metodo in medije raztopljanja. Pri medijih raztopljanja se farmakopejski mediji in farmakopejske metode pojavljajo kot prva izbira. Če teh ni na razpolago, se kot alternativa lahko izberejo metode, ki jih predlagajo ustrezeni regulatorni organi (npr. FDA), če tudi te ne zadostujejo, se uporabijo metode, ki jih razvije farmacevtsko podjetje, vendar morajo biti te del razvojnega poročila v registracijski dokumentaciji. Če metoda, ki jo predlagajo regulatorni organi, ni primerna za FO, ki jo razvija farmacevtsko podjetje, lahko podjetje razvije svojo metodo.

1.1.1 Metoda za sproščanje serij (3)

Se uporablja za kontrolo končnega izdelka, ugotavljanje ponovljivosti med serijami in testiranje stabilnosti izdelka.

Vedno težimo k uporabi enostavnih medijev za raztopljanje, ki jih pred uporabo odzračimo. Najpogosteje uporabljeni mediji, ki ponazarjata pogoje v želodcu, sta 0.1 M HCl oz. medij s pH 1.2. Mediji, ki najpogosteje ponazarjajo pogoje v tankem črevesju, pa imajo pH-vrednost 6.8. Če raztopljanje končnega izdelka ni odvisno od pH, je medij za raztopljanje lahko tudi voda. Pufrske raztopine se vedno uporabljajo v pH-območju od 1 do 6.8, lahko tudi v območju od 1 do 8, vendar je pH večji od 6.8 potrebno ustrezno upravičiti.

Kadar ne moremo doseči *sink* pogojev, lahko v raztopino dodamo PAS v koncentraciji, ki je manjša ali večja od kritične micelne koncentracije, pri tem pa moramo težiti k čim manjši koncentraciji PAS.

Najpogosteje uporabljeni PAS so natrijev lavril sulfat (SLS), cetil trimetil amonijev bromid (CTAB), polisorbat 20 (Tween 20), polisorbat 80 (Tween 80).

Navadno uporabljeni volumni mediji za raztopljanje so od 500 mL do 1000 mL, najpogosteje 900 mL. Odstopanja so možna le pri slabo topnih učinkovinah, pri katerih za dosego *sink* pogojev potrebujemo večji volumen medija.

Pomemben je tudi pH medija, ki mora biti skozi celoten čas testa raztopljanja konstanten, zato se pH medija meri pred in po koncu testa raztopljanja.

Pri gastrorezistentnih tabletah so testi raztopljanja prilagojeni pogojem, ki jim je FO podvržena po peroralni aplikaciji. V ameriški in evropski farmakopeji testiranje gastrorezistentnih tablet najprej poteka dve uri v 0.1 M HCl, nato se medij zamenja s pufrom pH 6.8. Glede na primer se izbere metodo A ali metodo B.

Metoda A je sestavljena tako, da najprej FO dve uri raztopljamamo v 750 mL 0.1 M HCl, po dveh urah v kislino dodamo 250 mL 0.20 M tribazičnega natrijevega fosfata in tako dosežemo končni pH 6.8.

Pri metodi B po dveh urah raztpljanja FO v 1000 mL 0.1 M HCl medij zamenjamo s 1000 mL fosfatnega pufra pH 6.8. Iz posode odlijemo medij in ga zamenjamo z novim, na 37 °C temperiranim medijem.

V japonski farmakopeji pri gastrorezistentnih oblikah test raztpljanja najprej poteka dve uri v kislem mediju (1st fluid for dissolution test pH 1.2) in eno uro v primeru zrnc, nato se medij zamenja s pufrom pH 6.8 (2nd fluid for dissolution test) (5, 6, 7 17).

Pri IR-oblikah se analize izvedejo v eni časovni točki, pri MR-oblikah pa se test raztpljanja izvaja v treh ali štirih časovnih točkah od začetka sproščanja učinkovine (3).

1.1.2 Diskriminatorna metoda raztpljanja (3)

Gre za metodo raztpljanja, ki je zelo občutljiva na spremembe v FO, tehnološkem postopku in na spremembe v lastnostih vhodnih surovin. Gre za *in vitro* orodje, s katerim razvijamo in optimiziramo končno FO ter tehnološki proces. Uporablja pa se tudi za primerjavo testnega in referenčnega produkta, ki sta vključena v BE-študijo, ter kot primerjava z originatorjem za ostale jakosti. V razvojni fazi služi kot optimizacija pri razvoju FO s ciljem, da zagotovi uspešno BE-študijo. Metoda mora biti dovolj diskriminatorna, da odraža spremembe v FO, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost ter dovolj robustna, da je uporabna za rutinsko analizo.

Kadar primerjamo testne vzorce z referenčnimi, za primerjavo profilov sproščanja uporabimo enačbo 1 za izračun faktorja podobnosti (f_2).

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad \text{Enačba 1}$$

log – desetiški logaritem

n – število časovnih točk vzorčenja

$\sum_{t=1}^n$ – vsota preko vseh časovnih točk

R_t – % raztpljanja v času t za referenčni pripravek

T_t – % raztpljanja v času t za testni pripravek

Pri vzorčenju morajo biti upoštevane najmanj tri časovne točke, ki morajo biti iste za testni in referenčni pripravek. Profila sta podobna, kadar je f_2 med 50 in 100.

1.1.3 Metoda testiranja raztpljanja za registracijo v Evropi (2)

V Evropi registracijski organi zahtevajo primerjavo raztpljanja novega produkta z originatorjem iz držav članic. Primerjalno testiranje se mora izvesti vsaj v treh medijih oziroma štirih, če medij, ki se zahteva za kontrolo kakovosti, ni eden od treh predpisanih.

Metoda za test raztpljanja mora biti v skladu s farmakopejskimi zahtevami. Če te niso ustrezne, se lahko uporabijo alternativne metode.

Navadno se kot mediji pojavljajo 0.1 M HCl, SGF_{sp}, pH 4.5, SIF_{sp} ali drugi mediji, pri katerih je pH blizu tem vrednostim. Mediji, ki se uporabljo za testiranje serij v registracijske namene v EU, so običajno mediji s pH 1.2, 4.5, 6.8. V primeru višjega pH je treba to upravičiti. Priporočajo se pufrske raztopine, ki so navedene v farmakopeji. PAS se v medije, če je le možno, ne dodajajo. Testirajo se testne in referenčne serije produktov, ki so bili uporabljeni v BE-študiji, in pa preostale jakosti, ki morajo biti primerljive profilu BE-serij pri vseh pogojih. Če *sink* pogoji niso zagotovljeni, je raztpljanje lahko odvisno od jakosti. Če pride do tega, lahko v testno posodo prenesemo več tablet (2-krat po 5 mg tablete namesto ene 10 mg) (2).

V primeru IR-oblik morajo biti rezultati testov raztpljanja testnega produkta primerljivi z referenčnimi v vsakem izmed treh medijev, ki imajo pH v fiziološkem območju.

Za IR-oblike je najpomembnejša 15-minutna točka, saj pri njej ugotovimo, ali je raztpljanje pred praznenjem želodca popolno (> 85 % učinkovine je raztopljene). Za te oblike matematični izračun faktorja podobnosti ni potreben. V primeru, ko več kot 85 % učinkovine ni raztopljene v 15 minutah, ampak kasneje, moramo imeti v profil sproščanja vključene vsaj tri časovne točke (prva pred 15. minuto, druga je 15. minuta in tretja, ko je raztpljanje blizu 85 %).

Pri testih raztpljanja z več časovnimi točkami (profili) se po začetku sproščanja učinkovine iz FO zahtevajo vsaj štiri oziroma toliko, da se sprosti 90 % učinkovine oz. dokler ne pride do prenehanja sproščanja učinkovine in nastanka platoja. Da ugotovimo, ali sta dva profila sproščanja v istih časovnih točkah med seboj primerljiva, si pomagamo z izračunom faktorja podobnosti (Enačba 1).

Pri gastrorezistentnih oblikah je pogosto vzorčenje (na 5 minut) po zamenjavi kislega medija potrebno v tistem delu krivulje, kjer gre za hitro fazo raztpljanja, saj se le tako lahko pridobi zadovoljiv opis profila sproščanja v naraščajoči fazì (9).

1.1.4 Metode testiranja raztopljanja za registracijo v Ameriki (3, 4)

Če gre za IR-oblike, se uporabi metoda, objavljena v USP ali na FDA-strani. Upoštevaje priporočljivo metodo se izvedejo testi referenčnih in testnih vzorcev. Če metode ni v USP ali na FDA-strani, potem podjetje razvije svojo metodo, ki jo predloži registracijski dokumentaciji. Raztpljanje testnega in referenčnega vzorca je potrebno narediti v treh medijih. Najbolje pa je, da se pridobi podatek o metodi, ki jo je uporabil originator.

V primeru MR-oblik se uporabi USP-metoda. Če metode ni na razpolago, potem FDA priporoči metodo, ki je bila uporabljena za referenco ali pa jo objavi na svoji spletni strani. Poleg tega je potrebno narediti raztpljanje vzorcev v vsaj še treh pufrskih medijih in nato še v vodi. Če pride do sprememb v FO pri IR- in MR-oblikah, dobimo v FDA-navodilih informacije o potrebnih *in vitro* študijah. Primerja se profile raztpljanja pred in po spremembni, nato pa se oceni primerljivost na podlagi faktorja podobnosti (enačba 1).

1.1.5 Metode raztpljanja za namen registracije na Japonskem (5, 6, 7)

Za razliko od ostalih metod raztpljanja, ki so med seboj dokaj podobne, je metoda raztpljanja za namen registracije na Japonskem malce drugačna.

Tu se najprej izvedejo preliminarni testi na treh serijah referenčnega vzorca. Pri pogojih testiranja, kjer so razlike med serijami največje, se izbere serija referenčnega vzorca s srednjim profilom raztpljanja, ki je nato vključena v BE-študijo.

Pri IR in MR se test v mediju s pH 1.2 izvaja dve uri, v medijih z drugimi pH-vrednostmi pa se test izvaja šest ur in se zaključi pri časovni točki s povprečno vrednostjo več kot 85 % raztopljene učinkovine referenčnega vzorca.

Mediji, ki se uporabljajo pri testih raztpljanja in so navedeni v japonski farmakopeji, so kisel želodčni medij (1st Fluid for dissolution test) s pH 1.2, McIlvainovi citratno-fosfatni pufrski sistemi s pH od 3 do 7.5 in simuliran črevesni medij (2nd Fluid for dissolution test) s pH 6.8. Če je povprečna vrednost raztopljene oblike učinkovine referenčnega vzorca manjša od 85 %, v pufru z drugačno sestavo in isto pH-vrednostjo pa večja, se lahko uporabi druga pufrska raztopina.

Medij za raztpljanje se seveda izbere glede na lastnosti učinkovine oz. FO.

Iz navedenih regulatornih zahtev lahko opazimo, da je eden izmed najpomembnejših faktorjev pri izbiri testov raztpljanja sestava medija za raztpljanje. Pomembno pa je tudi

posnemanje hidrodinamike, predvsem s pomočjo izbire aparatov, obratov in pretokov v sistemih, ki jih uporabljam za teste raztpljanja.

1.2 Izbira medija za raztpljanje

Priporoča se, da medij za raztpljanje ponazarja *in vivo* pogoje in zagotavlja *sink* pogoje učinkovini, ki se v njem raztplja. Za zmanjšanje števila BE-študij so testi raztpljanja, s katerimi si lahko pomagamo pri napovedi IVIVC, zelo pomembni.

Dobro je, da je izbrana metoda preprosta, ponovljiva in zanesljiva. Za dosego napovedi obnašanja FO *in vivo* iz *in vitro* podatkov je pomembno, da imamo znanih dovolj fizikalno-kemijskih parametrov učinkovine in FO, v enaki meri pa moramo upoštevati fiziološke pogoje (10).

Najbolje kontroliran faktor pri testih raztpljanja je pH-vrednost, ki največjo vlogo igra pri ionizirajočih spojinah, saj vpliva na njihovo topnost in raztpljanje, zato mora biti skozi celoten čas testa raztpljanja pH uravnavan. Najpogosteje mediji pri testih raztpljanja vsebujejo HCl, fosfat, ocetno in citronsko kislino v pH-območju od 1 do 6.8.

Pufrska kapaciteta teh medijev pri enakih pH-vrednostih pogosto niha in vpliva na raztpljanje učinkovine in pomožnih snovi ter predstavlja naslednji pomembni dejavnik pri sproščanju učinkovine, še posebno, kadar gre za ionizirane spojine.

Osmolalnost in ionska moč prav tako vplivata na sproščanje učinkovine iz FO, zato morata biti usklajeni s fiziološkimi vrednostmi.

Navadno mediji, ki se uporabljajo pri testih raztpljanja, niso natančno določeni, imajo le določen pH. Da bi se s pH-vrednostjo medija čim bolj približali fiziološkim pogojem v tankem črevesju, se je kot smernica ustalil medij s pH 6.8 (11).

Z namenom boljše napovedi *in vivo* obnašanja učinkovine so se pojavili novi mediji, s katerimi so želeli kar najbolje ponazarjati pogoje *in vivo* v GIT na tešče in s hrano (1).

Za ponazoritev pogojev na poln želodec (fed stanje) so se začeli uporabljati mediji v kombinaciji z mlekom. Pogojem na tešče pa so sledili mediji z različnimi kombinacijami PAS, ionsko močjo, pufrsko kapaciteto in pufrsko sestavo. Pred začetkom testa raztpljanja je treba poznati fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine in na tej podlagi načrtovati test raztpljanja. V študiji (1) so ugotovili, da za raztpljanje oblik, ki vsebujejo učinkovini iz I. razreda BCS (metoprolol in acetaminofen), ne potrebujejo kompleksnih medijev, ker za

napoved IVIVC za uporabljeni učinkovini zadošča SGF_{sp}. V 15 minutah se je pri teh dveh oblikah sprostilo več kot 85 % učinkovine, kar ustreza zahtevam za FO s hitrim sproščanjem.

Za učinkovine iz II. razreda BCS (danazol, ketokonazol in mefenaminska kislina) je poznavanje fizikalno-kemijskih parametrov učinkovine pomembnejše kot pri učinkovinah iz I. razreda BCS (je ionizirana ali ne). Če gre za šibko bazo, ki spada v II. razred BCS (ketokonazol), je pomembna njena topnost v želodcu, saj baza v kislem okolju preide v ionizirano obliko, kar privede do raztplavljanja učinkovine, če pa gre za šibko kislino (mefenaminska kislina), igra pomembno vlogo njena topnost v duodenumu in tankem črevesju, kjer je pH višji, kar omogoča prehod kisline v ionizirano obliko in njen raztplavljanje. V dani študiji (1) so zaključili, da za primer šibko kisle učinkovine, ki spada v II. razred BCS najboljše pogoje na tešče v tankem črevesju ponazarja medij FaSSIF. Če ima učinkovina pKa-vrednost znotraj fiziološkega območja, pride do sprememb v topnosti ob spremembni pH okolja.

Za ustrezeno pripravo medijev pri testih raztplavljanja *in vitro* potrebujemo dobre *in vivo* podatke o sestavi GIT-tekočin (želodčni sok, proksimalni jejunum, ileum) na tešče. To je naredil Lindhahl v svoji študiji (12). Ugotovil je naslednjo sestavo tekočin v želodcu in proksimalnem jejunumu na tešče (Preglednica I).

Preglednica I: Fiziološke vrednosti v želodcu in jejunumu pri pogojih na tešče (12, 13).

	želodec (n = 36)		jejunum (n = 37)	
	povprečje	±SD	povprečje	±SD
osmolalnost (mOsm/kg) (12)	191	36	271	15
pufrska kapaciteta (mmol/LΔpH) (13)	7-18	/*	5.6	/*
ionska moč (12)	0.1	0.025	0.139	0.014
površinska napetost (mN/m) (13)	41	6	32.3	/*
pH (12)	2.9	1.97	7.1	0.6
Na ⁺ (mM) (12)	68	29	142	13
K ⁺ (mM) (12)	13.4	3	5.4	2.1
Cl ⁻ (mM) (12)	102	28	126	19
Ca ⁺⁺ (mM) (12)	0.6	0.2	0.5	0.3
pepsin (mg/ml) (13)	0.87	/*		
žolčne soli (mM) (12)	0.2	0.5	2.9	2.9
proteini (g/L) (12)	1.8	0.7	2.1	1.2

n – število vzorcev

* – ni literaturnih podatkov

V preglednem članku (14) so zbrane fiziološke vrednosti ionskih moči (Preglednica II) iz različnih virov literature.

Preglednica II: Elektrolitska sestava prebavnih tekočin (14).

Tekočina	Na ⁺ (meq/L)	K ⁺ (meq/L)	Cl ⁻ (meq/L)	hidrogenkarbonat (meq/L)	območje celokupne ionske moči
želodčna	10–115	1–35	8–155	0–15	0.010–0.160
intestinalna	72–150	2–10	45–131	20–40	0.070–0.166

Če je le mogoče, se kot prva izbira uporablja farmakopejski pufri, ki so široko uporabljeni, njihove priprave in uporabe pa so hitre in enostavne. Vendar je problem farmakopejskih pufrov ravno ta, da pogojev *in vivo* ne posnemajo najbolje.

Najpogosteje so uporabljene fosfatne in fosfatno-citratne pufrske raztopine, manj pa voda in bikarbonatni pufri.

1.2.1 Farmakopejski pufri

1.2.1.1 Ameriška farmakopeja (15)

V ameriški farmakopeji se pojavljajo naslednji mediji za raztpljanje: SGF, SIF (Preglednica III), kisle raztopine s HCl s pH 1.2 do 2.2, kisli ftalatni pufri v pH-območju od 2.2 do 4.0, nevtralni ftalatni pufri v pH-območju od 4.2 do 5.8, fosfatni pufri s pH od 5.8 do 8.0 ter alkalni boratni pufri s pH od 8.0 do 10.0. V pH-območju od 4.1 do 5.5 se pojavljajo tudi acetatni pufri. Vse raztopine v ameriški farmakopeji v poglavju z reagenti v osnovi vsebujejo kalijev klorid.

Na začetku je bil SIF sestavljen tako, da je bil njegov pH 7.5 (ker so predvidevali, da je pH v GIT podoben pH v plazmi), a se je leta 1996 smernica spremenila in glavni simulirani črevesni medij je postal fosfatni pufer – SIF s pH 6.8, ki bolje ponazarja pH v GIT, saj gre za pH v duodenumu in proksimalnem jejunumu (10).

Preglednica III: Sestava medijev v ameriški farmakopeji (15).

medij	SGF	SIF
sestava	2 g NaCl	6.8 g KH ₂ PO ₄
	3.2 g pepsina	77 mL 0.2 M NaOH
	7 mL konc. HCl (36.5% – 38 %)	10 g pankreatina
	prečiščena voda do 1 L	prečiščena voda do 1 L
pH	1.2	6.8

1.2.1.2 Evropska farmakopeja (16)

V evropski farmakopeji se, tako kot v ameriški, poleg SGF in SIF (Preglednica III) uporabljajo kisle raztopine s HCl s pH 1.2 do 2.2, vendar te namesto kalijevega klorida v osnovi vsebujejo raztopine z natrijevim kloridom. V poglavju z disolucijskimi mediji (2.9.3) pa se v evropski farmakopeji pojavljajo tudi fosfatni pufri s pH od 4.5 do 8.0. Pri pH-vrednostih 4.5, 5.5 in 5.8 se pojavljajo acetatni pufri. Za simulacijo želodčnega medija se uporablja 0.1 M HCl z dodatkom soli in pepsina (Preglednica IV), za simulacijo črevesnega medija pa fosfatni pufer z dodatkom pankreatina (Preglednica V). Lahko pa se uporabljajo mediji, ki so predpisani v monografiji učinkovine in se od učinkovine do učinkovine razlikujejo.

Preglednica IV: Sestava simuliranega želodčnega medija (16).

medij	simuliran želodčni medij
sestava	80 mL 1 M HCl
	3.2 g pepsina
	2 g NaCl
	do 1000 mL prečiščene vode
pH	1.2

Preglednica V: Sestava simulacije črevesnega medija (16).

medij	simuliran črevesni medij
sestava	250 mL 0.2 M KH_2PO_4
	77 mL 0.2 M NaOH
	10.0 g pankreatina
	prečiščena voda do 1 L
pH	6.8

1.2.1.3 Japonska farmakopeja (17)

V japonski farmakopeji se kot črevesni medij uporablja fosfatni pufer s pH 6.8 (*2nd Fluid for dissolution test*), kot simulacija želodčnega soka pa kisel želodčni medij s pH 1.2 (*1st Fluid for dissolution test*) (Preglednica VI).

Preglednica VI: Sestava simuliranega želodčnega in črevesnega medija v japonski farmakopeji (17).

sestava/medij	1 st Fluid for dissolution test	2 nd Fluid for dissolution test
NaCl (g)	2	
konc. HCl (mL)	7	
KH ₂ PO ₄ (g)		3.40
Na ₂ HPO ₄ (g)		3.55
prečiščena voda	do 1 L	do 1 L
		redčenje z vodo 1:1
pH	1.2	okoli 6.8

1.2.2 Nekonvencionalni mediji

Farmakopejski mediji imajo enostavno sestavo, vendar pa niso vedno najboljši pokazatelji *in vivo* pogojev (osmolalnost, ionska moč in pufrska kapaciteta) in prav zaradi tega so se pojavile težnje po izboljšavi, ki bi pripeljale do medijev, ki bi bili prav tako enostavni za uporabo in pripravo ter bi hkrati bolje ponazarjali fiziološke pogoje v GIT na tešče.

1.2.2.1 Voda

Zaradi svoje preprostosti se kot medij za raztopljanje pogosto uporablja voda. Predvsem pri spojinah, kjer ni problemov s topnostjo in permeabilnostjo oz. kadar se dokaže, da pH medija ne vpliva na raztopljanje učinkovine iz FO (3). Pri uporabi vode kot medija za raztopljanje moramo biti pozorni, saj se lahko njena sestava in pH-vrednost med poskusom raztopljanja spreminja (15).

1.2.2.2 Fosfatni pufri

1.2.2.2.1 FaSSGF in FaSSIF po Dressmanovi

Dressmanova in sodelavci (18) so leta 1998 pripravili biorelevantne medije, ki posnemajo *in vivo* pogoje v prebavnem traktu – FaSSGF in FaSSIF – in namesto naravnih vsebujejo sintezne površinsko aktivne snovi (SLS), ki znižajo površinsko napetost medija na fiziološko vrednost. FaSSGF in FaSSIF predstavljata poenostavljeni sestavo vsebine lumna GIT in zato v omenjeni študiji dobro napovedujeta *in vivo* procese in absorpcijo slabo topnih učinkovin, lipofilnih šibkih kislin, šibkih baz in neioniziranih spojin (Preglednica VII in Preglednica VIII).

Preglednica VII: Sestava medija FaSSGF po Dressmanovi (18).

FaSSGF - Dressman
2 g NaCl
2.5 g Na-lavrilsulfata
50 mL 1 M HCl
prečiščena voda do 1 L
pH = 1.2

Preglednica VIII: Sestava medija FaSSIF po Dressmanovi (18).

FaSSIF - Dressman
17 mL 1M NaOH
3.95 g KH ₂ PO ₄
2.69 g Na-tavroholata
1.16 g lecitina
16.40 g KCl
prečiščena voda do 1 L
pH = 6.8

Slabost FaSSIF medija po Dressmanovi je njegova cena, ki je zaradi uporabe mešanice žolčnih soli draga. Pri uporabi FaSSIF oz. FaSSGF se oteži tudi analitika, saj je sestava

medijev kompleksnejša, mi pa težimo k enostavnemu mediju, s katerim bo analitska metoda hitra in enostavna. Slabost predstavlja tudi stabilnost medija, ki mora biti pripravljen na dan izvedbe testa raztpljanja (19).

1.2.2.2 FaSSIF po Galii

Galia je pripravil FaSSIF s sestavo (Preglednica IX), kjer natrijev tavroholat prav tako predstavlja glavno naravno površinsko aktivno substanco, vendar pa je namesto kalijevega uporabil natrijev dihidrogen fosfat (11).

Preglednica IX: Sestava FaSSIF po Galii (11).

<i>FaSSIF - Galii</i>
3.438 g NaH ₂ PO ₄
1.65 mM Na-tavroholata
0.75 mM lecitina
6.186 g NaCl
prečiščena voda do 1 L
NaOH do želenega pH
pH = 6.5
osmolalnost = 270 mOsmol/kg
pufrska kapaciteta = 12 mEq/pH/L
površinska napetost = 54 mM/m

1.2.2.2.3 Blank FaSSIF

V literaturi (9) se pojavlja Blank-FaSSIF, ki predstavlja FaSSIF brez žolčnih soli (Preglednica X).

Preglednica X: Sestava medija Blank-FaSSIF (9).

Blank-FaSSIF
3.438 g NaH ₂ PO ₄
6.186 g NaCl
prečiščena voda do 1 L
0.1 M NaOH do želenega pH
pH = 6.5

1.2.2.2.4 FaSSIFm (FaSSIF po Vertzoni) (22)

Vertzoni in sodelavci so žeeli spremeniti sestavo FaSSIF po Galii in zamenjati prej uporabljen delno hidroliziran sojin fosfatidilholin z jajčnim.

Najprej so spremenili sestavo FaSSIF po Galii tako, da so natrij zamenjali s kalijem. Da ne bi preveč vplivali na osmolalnost, je bila zamenjava ekvimolarna. Rezultat ni pokazal bistvenih sprememb pri raztopljanju nekaterih ioniziranih lipofilnih šibkih kislin in hidrofilnih neioniziranih spojin, ki so jih uporabili v študiji.

Prav tako so spremenili sestavo FaSSIF po Galii in namesto natrijevega fosfata vanj dodali maleinsko kislino (FaSSIFm) (Preglednica XI). Rezultati testov raztopljanja niso pokazali bistvenih sprememb pri raztopljanju kisline s pKa 4.4. in neionizirane učinkovine. Pokazala pa se je razlika pri testih raztopljanja uporabljene šibko bazične učinkovine s pKa 5.1, kjer je bila topnost v FaSSIFm 21 % nižja kot v FaSSIF po Galii.

Zamenjava sojinega fosfatidilholina z jajčnim ni pokazala sprememb v raztopljanju učinkovin, če te niso bile zelo lipofilne. Pri zelo lipofilnih učinkovinah pa igra sestava fosfatidilholina pomembno vlogo. Preglednica XII prikazuje razlike v sestavi glavnih maščobnih kislin v jajčnem in sojinem fosfatidilholinu.

Preglednica XI: Primerjava sestave medija FaSSIF po Galii in FaSSIFm po Verzoni.

sestava	FaSSIF po Galii	FaSSIFm - Vertzoni
Na-tavroholat (mM)	3	3
jajčni fosfatidilholin (mM)	0.75	0.75
NaH ₂ PO ₄ (mM)	28.66	
brezvodna maleinska kislina (mM)		25.01
NaCl (mM)	13.8	45
NaOH (mM)	106	109
osmolarnost	270 ± 10 mOsmol/kg	
pufrska kapaciteta	12 mEq/pH/L	
pH	6.5	

Preglednica XII: Primerjava glavnih maščobnih kislin v jajčnem in sojinem fosfatidilholinu (lecitinu) (22).

Glavne maščobne kisline		
kislina	jajčni	sojin
palmitinska kislina (mol %)	32	14
stearinska kislina (mol %)	12	6
oleinska kislina (mol %)	31	6
linolenska kislina (mol %)	15	72
arahidonska kislina (mol %)	3	

V *in vivo* okolju pri pogojih na tešče v GIT prevladuje Na⁺, koncentracije K⁺ pa so bistveno manjše v primerjavi z njim (14). Zato je, glede na dano študijo, FaSSIF po Galii boljši medij za ponazarjanje *in vivo* pogojev kot modificiran FaSSIF (FaSSIFm), hkrati pa modifikacije niso bistveno vplivale na raztpljanje učinkovin, uporabljenih v študiji.

1.2.2.2.5 FaSSGF po Vertzoni

Vertzoni je s sodelavci razvila želodčni medij, ki vsebuje pepsin in majhne količine žolčnih soli ter lecitina (22), kar je boljše od predhodno sestavljenega medija, saj pride pri njem do zmanjšanja površinske napetosti zaradi dodatka pepsina in ne zaradi sintezne površinsko aktivne substance (Preglednica XIII). Upoštevali so, da se FO zaužije s kozarcem vode, ki vpliva na pogoje v želodcu in medij je dobro napovedal topnost slabo topnih učinkovin, izbranih v raziskavi (23, 24).

Preglednica XIII: Sestava FaSSGF po Vertzoni (22).

FaSSGF - Vertzoni
34.2 mM NaCl
80 µM Na-tavroholat
20 µM lecitina
0.1 mg/mL pepsina
prečiščena voda do 1 L
<i>1M HCl do pH 1.6</i>
osmolalnost = 120.7 ± 2.5 mOsmol/kg

1.2.2.2.6 FaSSIF- Zoeller in Klein

Zoeller in Klein (19) sta želela sestaviti medij, ki bo cenovno ugoden, stabilen in še vedno učinkovit pri napovedovanju *in vivo* obnašanja FO. Medij naj bi dobro oponašal fizikalno-kemijske lastnosti tekočin GIT in ustvarjal micele v enaki obliki in količini kot žolčne soli. Natrijev tavroholat in lecitin sta zamenjala z različnimi koncentracijami in različnimi sinteznimi površinsko aktivnimi snovmi, ki sta jih dodala v FaSSIF tako, da so bile osmolalnost, površinska napetost in pufrska kapaciteta medija enake kot pri FaSSIF, ki je vseboval lecitin in tavroholat (19). Izmerjene vrednosti prikazuje Preglednica XIV.

Preglednica XIV: Sestava osnovnega medija FaSSIF, v katerega sta Zoeller in Klein dodajala različne koncentracije različnih sinteznih PAS in fizikalno-kemijske lastnosti medija FaSSIF – Zoeller in Klein, ki so bile dosežene po dodatku različnih PAS (19).

FaSSIF- Zoeller in Klein
8.65 g ocetne kisline
11.874 g NaCl
4.04 g trdnega NaOH
prečiščena voda do 1 L
pH = 5.0 ± 0.1
površinska napetost = 48 ± 2 mM/m
osmolalnost = 670 ± 15 mOsmol/kg
pufrska kapaciteta = 72 mmol/LΔpH

Ugotovili so, da na površinsko napetost vpliva vrsta in koncentracija površinsko aktivne snovi (19). Kot najbolj primerna za razapljanje tamoksifena in gliburida sta se v raziskavi izkazala 0.05 % Tween 60 in Tween 80 (polisorbatna PAS). SLS je preveč znižal površinsko napetost in zato ni bil najboljša izbira, prav tako nista bila primerna Tween 20 in Tween 40.

1.2.2.2.7 FaSSIF-V2

Če zmanjšamo količino lecitina v mediju FaSSIF, po Dressmanovi dobimo FaSSIF-V2 (25). V njem je koncentracija lecitina znižana s prvotnih 0.75 mM na 0.2 mM, kar bolje ponazarja pogoje *in vivo*. Hkrati pa je fosfatni pufer zamenjan z maleatnim (Preglednica XV).

Preglednica XV: Sestava FaSSIF-V2 in FaSSIF (25).

Medij	FaSSIF	FaSSIF-V2
Na-tavroholat	3 mM	3 mM
lecitin	0.75 mM	0.2 mM
maleinska kislina		19.12 mM
KH ₂ PO ₄	3.9 g	
NaCl		68.62 mM
KCl	7.7 g	
NaOH	do pH 6.8	34.8 mM
prečiščena voda	do 1 L	do 1 L
pH	6.8	6.5
osmolalnost (mOsmol/kg)	670 ±15	180 ±10
puferska kapaciteta (mmol/LΔpH)	72	10

Maleinska kislina je bila uporabljena kot sestavina simuliranega črevesnega medija predvsem iz praktičnega vidika. Njen pKa₂ znaša 6.27 (pKa₁ = 1.92), najprimernejša puferska kapaciteta maleinske kisline se nahaja v pH-območju 5.4 do 6.5, prav tako v tem pH-območju ni presežena osmolalnost, hkrati pa maleinska kislina zmanjša kvarjenje maščob in vzdržuje pH medija. Če primerjamo FaSSIF z FaSSIF-V2, ugotovimo, da

FaSSIF-V2 bolje napoveduje obnašanja FO na tešče, saj ponazarja pogoje v prebavnem traktu bolje kot FaSSIF. Z analitskega vidika pa je še vedno prekompleksen (25).

1.2.2.2.8 FaSSGF, FaSSIF-V2, half-FaSSIF in FaSSIF-sans po Jandratidu

Jandratid je s sodelavci (26) pripravil medije FaSSGF, FaSSIF-V2, half-FaSSIF in FaSSIF-sans ter jih uporabil na pretočnem sistemu, kjer je za prehod FO iz želodca do kolona uporabil pH gradient (Preglednica XVI). FaSSGF je ponazarjal pogoje v želodcu, FaSSIF-V2 v duodenumu in jejunumu, half-FaSSIF pogoje v jejunumu in ileumu, FaSSIF-sans pogoje v distalnem ileumu in SCoF pogoje v kolonu.

Preglednica XVI: Sestava medijev, ki jih je na pretočnem sistemu uporabil Jandratid (26).

medij	FaSSGF	FaSSIF-V2	half-FaSSIF	FaSSIF-sans	SCoF
Na-tavroholat (mM)	0.080	3	1.5		
lecitin (mM)	0.020	0.2	0.2		
pepsin (mg/mL)	0.1				
maleinska kislina (mM)		19.12	19.12	19.12	
ocetna kislina (mM)					170
NaCl (mM)	34.2	68.62	68.62	68.62	
KCl					
NaOH (mM)		34.8	34.8	34.8	157
prečiščena voda	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L	
pH	6.5	6.5	7.0	7.5	5.8
osmolalnost (mOsmol/kg)	180 ±10	180 ±10	270	270	295
pufrska kapaciteta (mmol/LΔpH)	10	10	10	10	29

1.2.2.2.9 FaSSIF po Sunesenu

Sunesen je s sodelavci (27) sestavil medij, v katerem je uporabil površinsko aktivne snovi, ki posnemajo sestavo žolča. Gre za žolčne soli, pridobljene iz svinjskega žolča. Te soli so cenejše od čistih žolčnih soli, vendar je problem v njihovi sestavi, ki se med serijami lahko razlikuje in jo moramo zato pred uporabo vedno znova določiti. Svinjski žolč je podoben človeškemu, saj je njegova glavna sestavina fosfatidilholin, zmes njegovih žolčnih soli pa vsebuje glikoholat in glikogendeoksiholat, zato so skupaj z mešanico sojinih fosfolipidov dobro posnemali človeške žolčne soli. Razmerje med žolčnimi solmi in fosfolipidi je bilo glede na podatke iz literature 5 : 1 (27).

Površinska napetost medija ($34.8 \pm 1.1 \text{ mM/m}$) je bila približana pogojem *in vivo* ($33.7 \pm 2.8 \text{ mM/m}$). Sojni fosfolipidi so bili uporabljeni kot vir fosfolipidov in so se razlikovali od žolčnih po večjem deležu nenasičenih maščobnih kislin (oleinske in linolenske) (27). Sestava medija z uporabo mešanice žolčnih soli prikazuje Preglednica XVII.

Preglednica XVII: Sestava Sunesenovega črevesnega medija za fasted stanje (27).

FaSSIF – Sunesen
6.3 mM žolčne soli
29 mM KH_2PO_4
1.25 mM fosfolipidi
prečiščena voda do 1 L
pH = 6,8
površinska napetost = $34.8 \pm 1.1 \text{ mM/m}$
topnost = $18.6 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$

1.2.2.10 Medij z uporabo 24-fosfonobilne kisline

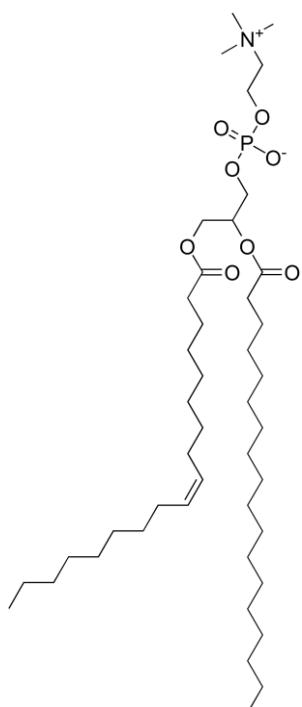
Jogia in sodelavci (28) predpostavijo uporabo sintetičnih PAS, ki so, za razliko od SLS, Tweena in Spana, strukturno podobni žolčnim kislinam.

S pomočjo te sintezne površinsko aktivne substance so pripravili medij za raztopljanje, ki naj bi ponazarjal fiziološke pogoje z ustrezno pufrsko kapaciteto, pH, osmolalnostjo in površinsko napetostjo (Preglednica XVIII).

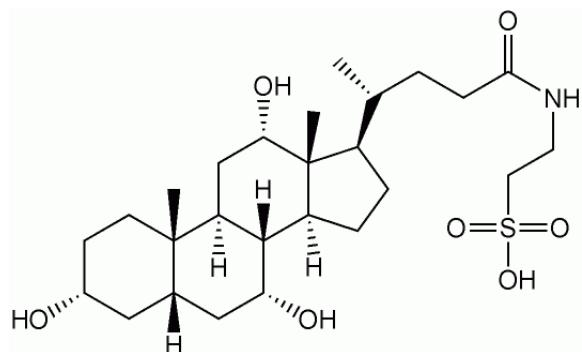
Preglednica XVIII: Sestava medija z uporabo 24-fosfonobilne kisline (28).

Fasted medij z uporabo 24-fosfonobilne kisline
0.025 M NaH ₂ PO ₄
3 mM 24-PBS
2 g NaCl
prečiščena voda do 1 L
NaOH do pH 6.5
pH = 6.5
površinska napetost = 35 mM/m
osmolalnost = 140 mOsmol/kg
pufrska kapaciteta = 13 mEqΔpH/L

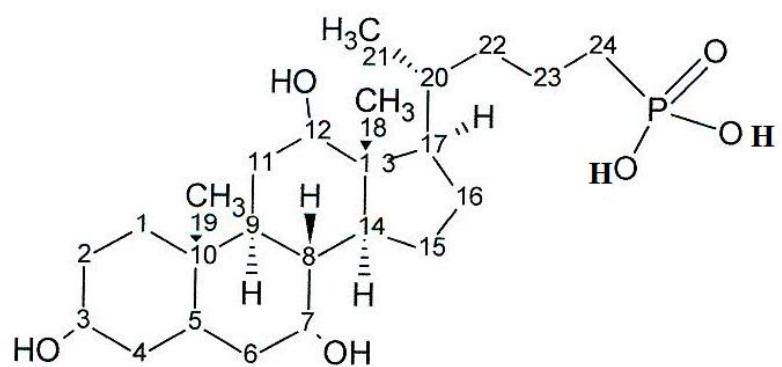
Če primerjamo strukturo 24-fosfonobilne kisline, Na-tavroholata in fosfatidilholina, opazimo podobnosti.



Slika 1: Struktura fosfatidilholina (28).



Slika 2: Struktura tavroholne kisline (28).



Slika 3: 24-fosfonobilna kislina (28).

Kot lahko vidimo, ima 24-fosfonobilna kislina ciklopantanofenantrensko strukturo, ki predstavlja nepolarni del molekule in posnema žolčno sol – Na-tavroholat. Ima tudi polarno glavo, ki posnema del molekule lecitina (Slika 1, Slika 2, Slika 3). 24-fosfonobilna kislina se uporablja kot pomoč pri raztopljanju žolčnih kamnov in predstavlja primerno površinsko aktivno substanco za ponazoritev fizioloških pogojev v mediju za raztopljanje (28).

NaCl je bil dodan za dosego primerne osmolalnosti medija, natrijev dihidrogen fosfat pa je določal pufrsko kapaciteto. Površinska napetost je bila podobna *in vivo* pogojem v duodenumu na tešče (32.2 mN/m).

Prišli so do zaključka, da je medij primerljiv s medijem FaSSIF po Galii. Priprava medija pa je, tako kot priprava FaSSIF, dokaj preprosta, vrednosti so zelo podobne fiziološkim, vendar pa je analitika zelo zahtevna.

1.2.2.11 Simuliran želodčni medij po Vertzoni

Vertzoni (23) je želeta sestaviti medij, ki kar najbolje ponazarja fiziološko stanje v želodcu na tešče glede na objavljene *in vivo* podatke. Mnogi izmed medijev namreč ne ponazarjajo *in vivo* pogojev, saj vsebujejo PAS, ki so nerelevantni, ali pa jih vsebujejo v napačni koncentraciji.

V medij je dodala jajčni lecitin, natrijev lavril sulfat, tavroholat in pepsin, pridobljen iz želodčne sluznice svinje. Glede na literaturne podatke o *in vivo* sekreciji pepsina, želodčne kisline in delovanja lipaz je določila dejansko koncentracijo pepsina v želodcu pri pogojih na tešče, glede na površinsko napetost v želodcu v stanju na tešče pa še koncentracijo natrijevega tavroholata in lecitina. Upoštevala je osmolalnost v želodcu in to, da sta najpogostejsa kationa v želodcu natrij in kalij, najpogostejsi anion pa klorid. Sestavila je svoj FaSSGF in ga primerjala z najbolj uporabljenimi mediji:

- simuliran želodčni medij z anionsko površinsko aktivno substanco – natrijevim lavril sulfatom (SGF_{SLS}),
- simuliran želodčni medij z neionsko površinsko aktivno substanco – Triton X-100 (SGF_{Triton}).

Primerjala je rezultate lipofilne šibko bazične in lipofilne neionizirane spojine (Preglednica XIX).

Preglednica XIX: Primerjava simuliranih želodčnih medijev z in vivo podatki (23).

Sestava	SGF _{SLS}	SGF _{Triton}	FaSSGF - Vertzoni	<i>in vivo</i> podatki
Na-lavril sulfat (%)	0.25			
Triton X100 (%)		0.1		
pepsin (mg/ml)			0.1	0.8
Na-tavroholat (μ M)			80	80
lecitin (μ M)			20	
NaCl (mM)	34.2	34.2	34.2	68 \pm 29
površinska napetost (mN/m)	33.7	32	42.6	41.0 \pm6.0
osmolalnost (mOsmol/kg)	180.5 \pm3.6	157.7 \pm2.9	120.7 \pm2.5	191 \pm36
pH	1.2	1.2	1.6	1.4–2.1

Ugotovila je, da med mediji ni bistvenih razlik in vpliva na raztpljanje učinkovin, uporabljenih v raziskavi. Le lipofilne šibke baze so se v njenem FaSSGF počasneje raztpljale kot v ostalih dveh medijih, kar je bila najverjetnejše posledica višjega pH medija. Natrijev lavril sulfat, ki je nefiziološka sestavina, v raztopinah s pH, nižjim od 4, hidrolizira, kar lahko privede do spremembe v dejanski sestavi medija. Prav tako SLS močno reagira z želatino pri pH, nižjem od 5, na kar moramo biti pozorni pri želatinskih kapsulah. Kisle PAS pa lahko tvorijo komplekse s šibkimi bazami, kar lahko vpliva na raztpljanje učinkovine (23).

Poleg vsega naštetege so fosfatni pufri še vedno najpogosteje uporabljeni, saj zagotavljajo stabilnost pH-vrednosti pufra med testom raztpljanja. Vendar pa lahko na raztpljanje močno vpliva tudi vrsta pufra in njegova ionska moč (29).

1.2.2.3 Bikarbonatni pufri

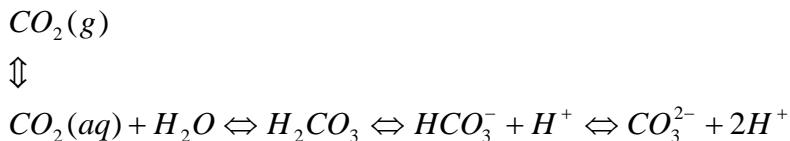
Kot alternativa fosfatnim se je pojavil bikarbonatni pufer.

Bikarbonat je prevladujoč pufer v GIT v stanju na tešče, konstantno ga izloča trebušna slinavka in tako nevtralizira kisel želodčni sok ter ščiti steno želodca pred dražečo kislino. Njegova sekrecija iz žlez in epitelnih celic je nadzorovana s spremembou pH v želodcu, ki

se ne sme bistveno spreminjati (30). Prav tako bikarbonat izločajo epitelne celice duodenuma in tako ščitijo duodenalni epitelij pred kislino, ki se izloča iz želodca. V ileumu pa se bikarbonat izloča skozi bikarbonatno-kloridne kanalčke (31).

Alternativa medijem, ki se pojavljajo v literaturi, je bikarbonatni FaSSIF, sestavljen tako, da se ogljikov dioksid (CO_2) vpihuje v medij. Najpomembnejše pri njem pa je to, da je medij pripravljen tik pred uporabo (*in-situ*), kar zagotavlja njegovo stabilnost in ustrezni pH med celotnim testom raztplavljanja, zato se CO_2 dovaja nad površino medija tudi med testom raztplavljanja. Zahtevna priprava in izvedba testa raztplavljanja vplivajo na slabo ponovljivost rezultatov. Kljub temu, da je bikarbonatni pufer najblžji približek fiziološkim pogojem, je njegova priprava zahtevnejša od večine ostalih pufrov in zaradi tega precej neuporabna, saj se nagibamo k čim bolj enostavnemu pripravi in izvedbi testa raztplavljanja, kar omogoča hitrejšo analizo večjega števila vzorcev (32).

Bikarbonatni pufer temelji na raztplavljanju CO_2 v vodni raztopini. Raztplavljanje je odvisno od pH raztopine.



Slika 4: Shema za plinasti/raztopljeni CO_2 /bikarbonatni pufrski sistem (32).

Ko se v vodnem mediju CO_2 raztopi, iz njega nastane ogljikova kislina (H_2CO_3), ki nato disociira in tvori bikarbonatni ion (HCO_3^-) in proton (H^+). Bikarbonat še naprej disociira do karbonata (CO_3^{2-}), vendar pa se to pojavlja le v redkih primerih (zaradi visokega $\text{pK}_{\text{a}2}$ ogljikove kisline, ki pri 25°C znaša 9.9), saj fiziološki pH ni nikoli tako visok. V *in vivo* okolju je koncentracija bikarbonatnega pufra konstantna, česar pa ne moremo trditi za bikarbonatni pufer, pripravljen *in vitro*. Konstantno pH-vrednost pufra poskušamo uravnavati s parcialnim tlakom CO_2 (pCO_2) nad medijem za raztplavljanje oz. s konstantnim prepihavanjem medija z njim (30). CO_2 namreč izhlapeva iz čaše z medijem za test raztplavljanja, kar lahko privede do povišanja pH. Za zagotavljanje konstantne pH-vrednosti pufra moramo zato uravnotežiti koncentracijo CO_2 v vodnem in plinastem območju.

V literaturi se pojavlja več načinov priprave bikarbonatnih pufrov.

1.2.2.3.1 McNamarov pufer

McNamara (30) poda predloge za vzpostavitev čistega in stabilnega bikarbonatnega sistema. Za izhodiščno raztopino je vzel 0.9 % raztopino NaCl in vanjo vpihal zmes CO₂. CO₂, ki ga je vpihal v medij, je predstavljal mešanico zraka s 5, 10, 15 in 20 % CO₂ atm. Po 30- oz. 40-minutnem prepihavanju raztopine s CO₂ je pH uravnal na 6.8 z 1M NaOH in tako ponazoril SIF_{sp}. Nato so medij prelimi v posode za test raztpljanja in med tamperiranjem nadaljevali s prepihavanjem medija z mešanico CO₂ ter tako preprečili dvig pH. Med temperiranjem medija za raztpljanje na 37 °C je prišlo do zmanjšanja topnosti CO₂ v mediju, s čimer se je zmanjšala tudi pufrska kapaciteta. Prišlo je do nastanka zračnih mehurčkov, ki so lahko v nadaljevanju testa raztpljanja vplivali na raztpljanje učinkovine (32). Vsak poskus testa raztpljanja so izvedli z drugačno mešanico zraka in CO₂ (5, 10, 15 in 20 % CO₂ atm). Izvedli so teste raztpljanja za indometacin (pKa = 4.17) in dipiridamol (pKa = 6.05) v FaSSIF po Galii, SIF, vodnem mediju 0.9 % NaCl s pH 6.8 brez prepihavanja in v vodnem mediju 0.9 % NaCl s prepihavanjem s CO₂ (30).

Ugotovili so, da je topnost indometacina (pKa = 4.17) v vodnem mediju s pH 6.8, kjer je bilo prisotno prepihavanje, večja od njegove topnosti v mediju, kjer prepihavanja ni bilo. Topnost učinkovine pa ni bila primerljiva s topnostjo v FaSSIF po Galii, kar je najverjetneje posledica dodanega lecitina in tavroholata v FaSSIF.

McNamara je predpostavil, da nižji parcialni tlak dovajanega CO₂ vpliva na nižjo pufrsko kapaciteto, saj je z dovajanjem CO₂ z nižjim parcialnim tlakom nastalo manj bikarbonata, kar je pomenilo manjši obseg raztpljanja šibke kisline. Čas za dosego koncentracijskega ravnotežja CO₂ v mediju je bil krajsi, ko je bila koncentracija CO₂ v mešanici večja (30).

Ker je McNamara pri svoji metodi predvideval, da le parcialni tlak CO₂ vpliva na pufrsko kapaciteto, so se pri njegovi metodi pojavile številne negotovosti, zaradi česar je prišlo do modifikacij njegovega pufra.

1.2.2.3.2 Modificiran McNamarov pufer

Pri modificiranem McNamarovem pufru (32) so za osnovo vzeli osnovni McNamarov pufer (30), ki so mu skrajšali čas priprave in zmanjšali stroške. Čisti CO₂ je cenejši od mešanice plinov, hkrati pa so tako povečali ponovljivost nastanka pufra (32). Pri pripravi pufra je bila količina dodanega 1 M NaOH v 0.9 % raztopino NaCl konstantna in dodana le enkrat – na začetku testa raztpljanja in to v količini, ki je zadostovala za uravnavo pH-vrednosti medija na 6.5. Z enako količino dodanega NaOH so želeli doseči boljšo

ponovljivost pufrske kapacitete. Čisti CO₂ je bil na začetku konstantno vpihavan v medij, spremenjal se je le njegov pretok in tlak nad njim. Večja količina dodanega 1 M NaOH ob isti koncentraciji CO₂ je pomenila večjo pufrsko kapaciteto medija. Po končanem termostatiranju so nadaljevali s konstantnim vpihavanjem CO₂ nad medijem skozi celoten čas trajanja testa raztpljanja, s čimer so se izognili nastanku mehurčkov, ki bi lahko vplivali na raztpljanje učinkovine (32).

1.2.2.3.3 FaSSIF z uporabo bikarbonatnega pufra (32)

Sama priprava medijaFaSSIF, ki so ga uporabili v tej študiji, je bila drugačna kot navadno opisana priprava FaSSIF po Galii. V 0.9 % raztopino NaCl so dodali surovi holat in fosfatidilholin. Glede na želeno pufrsko kapaciteto so dodali ustrezno količino NaOH in dosegli želen pH 6.5 z ustreznim pretokom CO₂. Po vzpostavitev koncentracijskega ravnotežja bikarbonata v mediju in nad njim, so medij prenesli v aparaturo za test raztpljanja. Pri pripravi tega medija so naleteli na težave, saj je CO₂, ki je bil vpihavan nad površino medija za raztpljanje, interagiral s PAS, kar je povzročilo nastanek velike količine pene, otežilo nadaljne delo in podaljšalo proces priprave medija.

1.2.2.3.4 Medij, ki sta jih pripravila Fadda in Basit

Fadda in Basit (33) sta naredila primerjavo raztpljanja mesalazina v različnih medijih, ki so večinoma vsebovali fosfat, nekateri med njimi pa tudi karbonat. Uporabljeni so bili mediji, ki se pogosto uporabljajo za inkubiranje celic in za preučevanje študij permeabilnosti. Uporabljeni mediji vsebujejo veliko ionov, bikarbonat pa opravlja vlogo pufra. Ionska moč teh medijev je podobna ionski moči sokov v GIT (Preglednica XX).

Preglednica XX: Sestave posameznih pufrov, ki sta jih uporabila Fadda in Basit (33) .

sestava	0.00217 M fosfatni pufer	nadomestek Hanksovega pufra	Hanksov pufer	Hanksov pufer	Krebsov pufer	Krebsov pufer	Sorensonov pufer	0.05 M fosfatni pufer z NaCl	0.2 M fosfatni pufer	0.05 M fosfatni pufer	NaOH (mM)	KH ₂ PO ₄ (mM)
Na ₂ HPO ₄ (mM)												
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (mM)												
NaHCO ₃ (mM)												
NaCl (mM)												
KCl (mM)												
CaCl ₂ (mM)												
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (mM)												
ionska moč (mmol/L)	0.129	0.5262	0.5262	0.1737	0.161	0.161	0.155	0.155	0.155	0.155		
pufrska kapaciteta (mM/LΔpH)	23.0	58.8	23.0	28.1	3.7	3.7	1.0	1.0	1.0	1.0		

Proksimalni del GIT, če pogledamo elektrolitsko sestavo, najbolje posnema Hanksov pufer, distalni del pa Krebsov (33). Nadomestni pufri za Krebsov in Hanksov pufer so bili pripravljeni tako, da so vsebovali bikarbonatne in fosfatne soli ter NaCl, s katerimi se je zagotovila ustrezna ionska moč. Nadomestne pufre so pripravili zato, da bi ugotovili, ali prisotnost elektrolitov (K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} in Ca^{2+}) vpliva na raztplavljanje učinkovin. Upoštevali so kapaciteto Hanksovega pufra in na podlagi izmerjenih vrednosti sestavili fosfatni pufer z ustrezno koncentracijo (0.00217 M). Prav tako so glede na njegovo ionsko moč v fosfatni pufer dodali ustrezno količino NaCl (33).

Slabost pri uporabi bikarbonatnih pufrov je, da se ob izgubi CO₂ pH hitro spremeni. Zato se Krebsov pufer vedno stabilizira s 5 % mešanico CO₂ in zraka, ki se konstantno vpihava v pufer med potekom testa raztplavljanja.

V nasprotju s Krebsovim pufrom Hanksov pufer ne vsebuje velike količine bikarbonata in ga zato ni potrebno konstantno prepihovati (33).

Fosfat v Sorensonovem pufru je 0.066 M, pufer ima ionsko moč 0.1737 mM, rezultati sproščanja učinkovine v njem pa so kazali rezultate, ki so bili enaki sproščanju učinkovine v 0.05 M in 0.2 M fosfatnem pufru. Ugotovili so, da je raztpljanje mesalazina v Krebsovem pufru bistveno hitrejše kot v Hanksovem in da na raztpljanje mesalazina vplivata tako ionska moč kot pufrska kapaciteta (33).

Do razlik pri raztpljanju ni prišlo med fiziološkimi pufri in njihovimi nadomestki, ki niso vsebovali soli (KCl , $NaCl$, $MgSO_4 \times 7 H_2O$). Iz članka je vidno, da sta fosfatna in bikarbonatna sol najpomembnejši pri raztpljanju mesalazina in da ostale soli, ki sestavljajo pufre, na njegovo raztpljanje bistveno ne vplivajo (33).

Če primerjamo bikarbonatne pufre med seboj, ugotovimo, da vsi zahtevajo previdnost pri sami izvedbi.

Pri vseh metodah se CO_2 vpihava v medij ali nad njega, to pa predstavlja mehanični stres za medij in FO, kar lahko privede do hitrejšega sproščanje učinkovine iz FO. Tega stresa pri fosfatnih pufrih ni. Vsekakor pa so bikarbonatni boljši posnemovalci pogojev *in vivo* od ostalih medijev (32).

1.2.2.4 Citratni pufri

Citatni pufri se uporabljajo predvsem za študije primerjalnih profilov raztpljanja za registracijo na Japonskem. Omenjeni in opisani so v japonski farmakopeji (17). Gre za McIlvainove pufre, ki so uporabni predvsem zato, ker zajemajo široko pH-območje. Gre za pufrske sisteme s kombinacijo citrata in fosfata (Preglednica XXI).

Preglednica XXI: Sestave posameznih citratnih pufrov, ki se nahajajo v japonski farmakopeji (17).

sestava/medij	McIlvai -ne buffer pH 3.0	McIlvai -ne buffer pH 4.0	McIlvai- aine buffer pH 5.0	McIlvai -ne buffer pH 5.5	McIlvai -ne buffer pH 6.0	McIlvai -ne buffer pH 6.5	McIlvai -ne buffer pH 7.0	McIlvai -ne buffer pH 7.5
0.025 M citronska kislina (mL)	794.5	614.5	485.0	431.3	368.5	290.0	181.5	77.5
0.05 M Na₂HPO₄ (mL)	205.5	385.5	515.0	568.7	631.5	710.0	818.5	922.5
prečiščena voda	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L	do 1 L
pH	3.0	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5

Prav tako v japonski farmakopeji najdemo fosfatne pufre različnih koncentracijskih jakosti, ki pa so primerljivi s tistimi v evropski in ameriški farmakopeji.

1.2.3 Primerjava vseh medijev med seboj

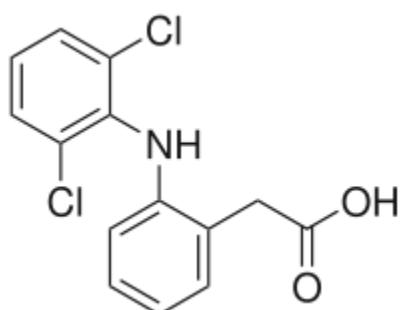
Če primerjamo bikarbonatne in fosfatne pufre med seboj, ugotovimo, da so si bolj ali manj podobni, so pa pH-vrednosti bikarbonatnih pufrov manj stabilne in slabše ponovljive. Čeprav bikarbonatni pufer najbolje ponazarja fiziološke pogoje, so *in vitro* rezultati v njem manj ponovljivi in posledično opredeljeni kot slabši od rezultatov, pridobljenih v fosfatnih pufrih, kar je najverjetnejše posledica same izvedbe testa raztapljanja in velikega vpliva CO₂ na pH-vrednost medija. Prav tako je bikarbonatni pufer stabilen le toliko časa, dokler se CO₂ konstantno dovaja v medij. Bikarbonatni medij je potrebno pripraviti v manjših količinah in to tik pred uporabo, medtem ko lahko ostale pufre pripravljamo v velikih količinah in za dlje časa, hkrati pa je njihova priprava krajsa od priprave bikarbonatnega pufra.

Ker pri bikarbonatnem pufru dobimo slabo ponovljivost rezultatov, lahko napačno napovemo *in vivo* obnašanja učinkovine. Zaradi vseh teh pomanjkljivosti lahko na podlagi literarnih podatkov rečemo, da je bikarbonatni pufer v primerjavi s fosfatnim in citratnim manj uporaben. Ima pa to prednost, da je najbližje fiziološkim pufrom in zato najbolje ponazarja pogoje *in vivo*. Zato je pred razvojem metode potrebno premisliti, ali bi bilo

bolje uporabiti zahtevnejši pufer in se z njim kar najbolje približati pogojem *in vivo* ter tako dobro napovedati obnašanje učinkovine po aplikaciji ali pa vzeti enostavnejši medij, ki *in vivo* pogojev ne posnema najbolje, in tvegati napako pri napovedovanju absorpcije učinkovine.

1.3 Fizikalno-kemijske lastnosti diklofenaka

Diklofenak ima pKa 3.8 ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) in spada v razred šibkih kislin. Njegova permeabilnost, določena s Caco-2 celicami, iz apikalne na bazolateralno stran znaša $20.2 \times 10^{-6}\text{ cm/s}$ in $21.3 \times 10^{-6}\text{ cm/s}$ iz bazolateralne na apikalno stran celic, kar pomeni, da je diklofenak dobro permeabilen in se zato tudi hitro absorbira. Njegov obseg absorpcije je večji od 90 %. Njegova biološka uporabnost je zaradi razgradnje pri prvem prehodu skozi jetra približno 60 %. Maksimalno plazemska koncentracijo doseže v 1–4 urah (34).



Slika 5: Formula diklofenaka oz. 2-(2,6-diklorofenilamino)fenzil etanojske kisline.

Topnost diklofenaka v kislem je manjša kot 1 mg/L. Njegovo topnost lahko povečamo s tvorbo natrijeve soli (35).

Preglednica XXII prikazuje topnosti natrijeve soli diklofenaka v medijih z različnimi pH-vrednostmi (34).

Preglednica XXII: Topnost natrijeve soli diklofenaka (34).

medij	pH	topnost(mg/mL)
0.1 M HCl	1.2	0.0012
0.01 M HCl	2	0.0017
0.001 M HCl	3	0.28
acetatni pufer	4.1	0.0033
acetatni pufer	4.5	0.0036
acetatni pufer	5.5	0.036
fosfatni pufer	5.8	0.14
fosfatni pufer	6	0.15
fosfatni pufer	6.8	0.67
fosfatni pufer	7	1.36
fosfatni pufer	7.4	5.15
fosfatni pufer	7.8	12
fosfatni pufer	8	12.14

1.4 Farmakološke lastnosti diklofenaka

Diklofenak 2-(2-(2,6-diklorofenilamino)fenil)etanojska kislina spada v skupino nesteroidnih protivnetnih zdravil (NSAID), natančneje v skupino derivatov arilocetne kisline.

Gre za dobro poznano zdravilo s protivnetnim, analgetičnim in antipiretičnim delovanjem. Je neselektivni inhibitor izoencimov COX, ki katalizirata sintezo prostaglandinov, prostaciklinov in tromboksana iz arahidonske kisline.

Njegovo protivnetno delovanje je povezano z zaviranjem nastanka prostaglandinov (mediatorji vnetja), ki povzročajo vazodilatacijo in povečajo prepustnost žilnih sten. Ker diklofenak zavira nastanek PGE₂ v hipotalamusu, znižuje telesno temperaturo, hkrati pa zavira tudi nastanek prostaglandinov na periferiji, ki povečajo občutljivost receptorjev za bolečinske dražljaje za mediatorje vnetja ter tako deluje protbolečinsko. Z njim zdravimo večino vnetnih revmatskih bolezni, degenerativni revmatizem sklepov in hrbtenice, druga vnetna in bolečinska stanja mišično-skeletnega sistema. Uporablja se tudi pri menstrualni bolečini, v kombinaciji z opioidi pa tudi pri bolečinah, povezanih z rakom (36).

2 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo skušali ugotoviti, kako različni časi zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju vplivajo na sproščanje natrijevega diklofenakata iz njih. S testi raztpljanja, ki smo jih izvajali na pretočnem sistemu s kroglicami, smo želeli ugotoviti vpliv hitrosti prehoda pelet skozi želodec na sproščanje učinkovine.

Osnovni mediji za sproščanje so bili simuliran želodčni medij s pH 1.8, simuliran črevesni medij s pH 6.8 in simuliran medij kolona s pH 5.8. Poskuse smo izvedli tako, da smo enako količino pelet sproščali pri istih pogojih in jih različno dolgo zadrževali v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8. Nato smo simuliran želodčni medij zamenjali s simuliranim črevesnim medijem s pH 6.8 in nato, pri vseh poskusih, pelete štiri ure sproščali v njem. Po štirih urah smo simuliran črevesni medij za kratek čas zamenjali s simuliranim medijem kolona s pH 5.8. Tako smo skušali ugotoviti, kako čas zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju vpliva na sproščanje natrijevega diklofenakata.

Ker so bili testi raztpljanja različno dolgi, smo jih s pomočjo matematičnega modela računsko podaljšali ter tako dobili enoten čas trajanja testov raztpljanja.

Iz profilov sproščanja za posamezne čase zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju smo izračunali otežene profile sproščanja, iz katerih smo dobili povprečni oteženi profil in tako ponazorili sproščanje učinkovine po aplikaciji v *in vivo* sistemu.

Hkrati smo, z različno hitrostjo in trajanjem pretokov ob zamenjavi kislega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem, s pH-profilom skušali ugotoviti, kako hitro dejansko pride do dviga pH-vrednosti, s čimer smo želeli ponazoriti pogoje, ki so jim izpostavljeni pelete pri prehodu iz želodca v tanko črevo.

Pri spremembi pH medija se je pojavil problem splavanja pelet na površino, zato smo s preliminarnimi testi izmerili še gostoto pelet v kislem mediju s pH 1.8 in nato še v mediju s pH 6.8.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Pelete s podaljšanim sproščanjem

Preizkušali smo pelete s podaljšanim sproščanjem v kapsulah Dicloberl® retard 100 mg, ki vsebujejo 100 mg natrijevega diklofenakata proizvajalca Berlin-Chemie AG.

Pomožne snovi v peletah so saharoza, smukec, šelak, koruzni škrob, Eudragit RL PO, želatina in titanov dioksid (E172) (43).

Vsebnosti učinkovine v peletah in mase pelet v posamezni kapsuli nismo posebej določevali, saj smo privzeli, da so v vseh kapsulah količine enake.

3.2 Snovi, uporabljene pri delu

- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo $c(HCl) = 1M$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev dihidrogenfosfat - monohidrat, p. a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo $c(NaOH) = 1M$ (1N), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev diklofenakat, Sigma, Kitajska;
- natrijev klorid, p. a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- 100 % ocetna kislina, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- pufrska raztopina $pH = 7.00 (\pm 0.02; 20^\circ C)$ (fosfat), Kefolab, Ljubljana, Slovenija;
- pufrska raztopina $pH = 2.00 (\pm 0.02; 20^\circ C)$ (glicin/klorovodikova kislina), Kefolab, Ljubljana, Slovenija;
- pufrska raztopina $pH = 6.00 (\pm 0.02; 20^\circ C)$ (glicin/klorovodikova kislina), Kefolab, Ljubljana, Slovenija.

3.3 Aparature

- Pretočni sistem za testiranje sproščanja (s kroglicami): peristaltična črpalka PA-SK4 control, IKA WERKE, Nemčija; grelec in magnetno mešalo IKA WERKE, Nemčija; steklene kroglice (premer 1mm);
- spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technology Group, Waldbronn, Nemčija;
- analizna tehnika Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;

- digitalna tehnica, Exacta 300EB, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- avtomatska pipeta 100–1000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- avtomatska pipeta 1000–5000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- pH meter, MP220, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica;
- pH meter, MA 5750, Iskra, Slovenija;
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra Kranj, Slovenija;
- pretočne cevke iz silikona z notranjim premerom 1.52 mm, IKA, Nemčija;
- membranski filtri, velikost por 0.45 μm , Sartorius AG, Nemčija;
- magnet (dolžina 50 mm, premer 8 mm).

3.4 Raztopine

3.4.1 Simuliran želodčni medij s pH 1.8

Iz pripravljenega koncentrata klorovodikove kisline (Titrisol®) smo v litrski buči pripravili 1 M HCl. Drugo bučo smo nato do polovice napolnili z deionizirano vodo ter z merilnim valjem vanjo odmerili določeno količino 1 M HCl (Preglednica XXIII), na analitski tehnici smo natehtali ustrezzo količino NaCl (Preglednica XXIII), jo dodali v bučo in jo dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Nato smo zmes premešali in ji s pH-metrom izmerili pH, ki je moral po predhodnem kalibriraju elektrode s standardnim pufom pH 2.0 znašati 1.8.

Preglednica XXIII: Sestava simuliranega želodčnega medija s pH 1.8 glede na končni volumen medija.

1 M HCl (mL)	NaCl (g)	prečiščena voda do (L)
20	3	1
40	6	2
180	30	5

3.4.2 Simuliran črevesni medij s pH 6.8

Gre za fosfatni puffer s pH 6.8, ki smo ga pripravili tako, da smo v do polovice napolnjeno bučo z deionizirano vodo z merilnim valjem odmerili določeno količino 1 M NaOH (Preglednica XXIV), ki smo je predhodno pripravili iz pripravljenega koncentrata (Titrisol®). Nato smo na digitalni tehnici natehtali določeno količino natrijevega

dihidrogen fosfata monohidrata in natrijevega klorida (Preglednica XXIV), ju dodali v bučo in dopolnili z deionizirano vodo do oznake, premešali in s pH-metrom izmerili pH, ki je moral biti 6.8. Pred vsako meritvijo smo pH-meter umerili s standardnim pufom pH 7.0.

Preglednica XXIV: Sestava simuliranega črevesnega medija s pH 6.8 glede na končni volumen medija.

1 M NaOH (mL)	NaCl (g)	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (g)	prečiščena voda do (L)
14.4	6.18	3.96	1
28.8	12.36	7.91	2
72	30.9	19.77	5

3.4.3 Simuliran medij kolona s pH 5.8

Simuliran medij kolona smo pripravili tako, da smo bučo do polovice napolnili z deionizirano vodo in nato vanjo dodali ustrezeno količino koncentrirane ocetne kisline (Preglednica XXV), dodali še nekaj vode in z merilnim valjem odmerili željeno količino 1 M NaOH, ki smo jo predhodno pripravili iz pripravljenega koncentrata. Na digitalni tehtnici smo natehtali želeno maso NaCl (Preglednica XXV) in napolnili bučo z deionizirano vodo do oznake. Ko smo zmes premešali, smo s pH-metrom izmerili pH raztopine, ki je morala biti po predhodnem kalibriranju elektrode pH-metra na pH 6.0 5.8.

Preglednica XXV: Sestava simuliranega medija v kolonu s pH 5.8 glede na končni volumen medija.

1 M NaOH (mL)	NaCl (g)	konc. CH ₃ COOH (mL)	prečiščena voda do (L)
157	5.85	9.72	1
314	11.7	19.44	2
785	29.25	48.6	5

3.5 Metode

3.5.1 UV/VIS spektroskopija

Za določitev rezultatov smo uporabili UV spektrofotometrično metodo.

Pred začetkom merjenja absorbanc v različnih medijih smo morali določiti maksimum absorbance natrijevega diklofenakata. Uporabljeni mediji so bili:

- simuliran želodčni medij s pH 1.8 in 0.1 M natrijev hidroksid v volumskem razmerju 1 : 1,
- simuliran črevesni medij s pH 6.8 in 0.1 M natrijev hidroksid v volumskem razmerju 1 : 1,
- simuliran medij kolona s pH 5.8 in 0.1 M natrijev hidroksid v volumskem razmerju 1 : 1.

Najprej smo v vsakem mediju s slepim vzorcem (sam medij brez učinkovine) brisali ozadje. Nato smo posneli spekter našega vzorca in računalniški program nam je podal valovno dolžino z največjo absorbanco. Postopek smo ponovili v vsakem izmed medijev in določili isti absorpcijski maksimum za vse medije pri valovni dolžini 276 nm. Pred vsako meritvijo smo brisali ozadje z uporabljenim medijem, da se je od izmerjene absorbance odštela absorbanca, ki jo je prispeval medij. Če je bila izmerjena absorbanca vzorca večja od 1.6, smo vzorec ustrezno redčili (redčitev 1/5).

3.5.2 Merjenje gostote pelet

Zaradi problema s splavanjem pelet, ki se je pojavil ob menjavi medija s pH 1.8 na pH 6.8, smo se odločili, da s pomočjo piknometra določimo gostoto pelet v mediju s pH 1.8 in pH 6.8.

Najprej smo stehtali prazen piknometer, nato piknometer napolnjen z vodo, ki smo ji predhodno izmerili temperaturo in ji na podlagi tabel (44) določili gostoto. Glede na maso vode smo izračunali volumen piknometra.

Nato smo postopek ponovili in najprej izračunali gostote posameznih medijev. To smo storili tako, da smo piknometer posušili, ga stehtali, nalili vanj medij za razapljanje in ga ponovno stehtali. Na podlagi razlike v masah piknometra z vodo in medijem smo izračunali volumen, kasneje pa še gostoto medija. V suh piknometer, ki smo ga predhodno stehtali, smo prenesli pelete, ki smo jih dobili iz ene kapsule in stehtali piknometer skupaj s peletami. V piknometer s peletami smo nato dolili medij s pH 1.8. Na podlagi razlike mas

piknometra z medijem in peletami ter piknometra s samim medijem smo dobili volumen pelet, iz katerega smo lahko izračunali gostoto pelet.

Nato smo izvedli test raztpljanja in po dveh urah v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8 medij zamenjali s simuliranim črevesnim medijem s pH 6.8. Ko so pelete splavale na površino, smo test raztpljanja ustavili in medij s peletami prefiltrirali čez filtrirni papir in ga nato, skupaj s peletami na njem, prenesli v sušilnik, kjer smo vse skupaj 60 minut sušili. Postopek za določitev gostote pelet smo žeeli ponoviti še za pelete v simuliranem črevesnem mediju, a smo po osušitvi pelet pri prenosu naleteli na težavo – pelete so se ob poskusu prenosa s spatulo iz filtrirnega papirja v piknometer takoj zdrobile in kljub temu, da smo jih nekaj nato le prenesli v piknometer, je bila zatehtana masa tako majhna, da je bilo nemogoče natančno izračunati volumen in nato še gostoto pelet v simuliranem črevesnem mediju.

3.5.3 Določanje pH-profila

Pripravili smo simuliran želodčni medij s pH 1.8 in pripravili pogoje, ki so bili isti kot pri testih raztpljanja (pretok 2 mL/min, temp. medija 37 °C, $V_{(\text{medija})} = 40 \text{ mL}$). Po začetku testa smo simuliran želodčni medij zamenjali s simuliranim črevesnim medijem in merili pH-vrednost medija vsakih 5 minut po zamenjavi medija, dokler se pH ni ustalil na 6.8. Po ustalitvi pH-vrednosti smo simuliran črevesni medij zamenjali s simuliranim medijem kolona s pH 5.8 in prav tako vsakih 5 minut do ustalitve merili pH-vrednosti.

3.5.4 pH-profil pri povečanih pretokih

Ko smo dobili pH-profil pri konstantnem pretoku 2 mL/min, smo pretoke ob zamenjavi simuliranega želodčnega medija s črevesnim za določen čas povečali na 10 mL/min. Časi s povečanim pretokom so bili 3, 5 in 7 minut. Do preteka 5 (pri 3 minutnem pospešenem pretoku) oz. 10 minut (pri 5 in 7 minutnem pospešenem pretoku) smo vsako minuto izmerili pH-vrednost v naši raztopini, kasneje pa smo pH merili le še vsakih 5 minut do ustalitve pH. Po zamenjavi simuliranega črevesnega medija s simuliranim medijem kolona smo po dokončni ustalitvi pH na 5.8 končali z merjenjem pH-profila.

3.5.5 Hitrejši dvig pH z dodajanjem različnih bazičnih raztopin

Želeli smo ugotoviti, koliko 1 M NaOH, 0.1 M NaOH ozziroma 1 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ moramo dodati, da se pH kar najhitreje dvigne z 1.8 na 6.8. Pripravili smo delovno čašo z 40 mL simuliranega želodčnega medija s pH 1.8 in vklopili magnetno mešalo. V delovno

čašo smo nato postavili pH-meter in merili pH-vrednosti ob dodatku različnih volumnov predhodno pripravljenih raztopin 1 M NaOH, 0.1 M NaOH in 1 M Na₃PO₄ x 12 H₂O.

3.5.6 Sproščanje natrijevega diklofenakata

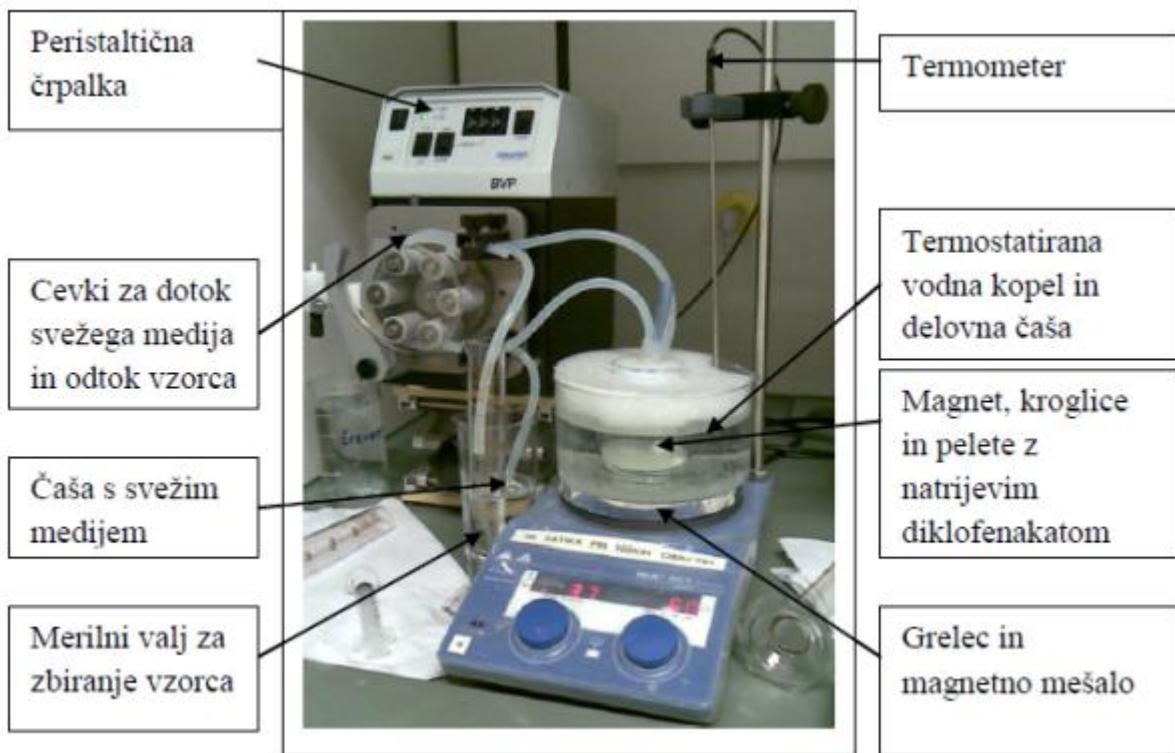
3.5.6.1 Izdelava umeritvenih premic

V vsakem uporabljenem mediju, ki ga je predstavljal medij skupaj z 0.1 M NaOH v volumskem razmerju 1 : 1, smo naredili umeritveno premico. Pripravili smo tri osnovne standardne raztopine natrijevega diklofenakata s približno koncentracijo 100 mg/L za uporabljene medije in jih nato redčili na nižje koncentracije v koncentracijskem območju, v katerem smo pričakovali naše rezultate pri testih sproščanja in izmerili absorbance.

Osnovne raztopine smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici natančno natehtali približno 10 mg standarda natrijevega diklofenakata in nato natehtano količino kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko ter jo raztopili v nekaj mL 0.1 M NaOH ter nato dopolnili bučko z 0.1 M NaOH do oznake. Naredili smo tri paralelke osnovne standardne raztopine, saj smo tako poskušali zmanjšati vpliv napak, ki so se pojavile pri tehtanju. Nato smo osnovne raztopine redčili tako, da smo na koncu redčenja dobili ustrezno koncentrirane raztopine uporabljenega medija in 0.1 M NaOH v volumskem razmerju 1 : 1. V kislem želodčnem mediju smo pripravili raztopine s približnimi koncentracijami od 1 mg/L do 7 mg/L, v simuliranem črevesnem mediju in mediju kolona pa smo iz osnovnih raztopin pripravili raztopine s približnimi koncentracijami v območju od 1mg/L do 50 mg/L. Po pripravi standardov različnih koncentracij smo izmerili absorbance pripravljenih raztopin in dobili umeritvene premice za posamezne medije ter jim določili ustrezen kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficiente (R²).

3.5.6.2 Testi sproščanja na pretočnem sistemu s kroglicami

Teste sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu s steklenimi kroglicami z nadzorovano temperaturo, hitrostjo vrtenja magnetnega mešala in pretokom. Sistem je sestavljen iz magnetnega mešala z grelcem, ki je omogočal nastavitev hitrosti vrtenja mešala in nastavitev želene temperature medija. Na mešalo smo postavili 150 mL delovno čašo s 25 g steklenih kroglic, 40 mL medija za sproščanje in magnetom. Iz čaše je vodila silikonska cevka z mrežico, ki je odvajala vzorce v merilni valj. Sistem je sestavljal še peristaltična črpalka, katere rotor se je enakomerno vrtel in zagotavljal, da je bil dotok svežega medija v čašo enak odtoku vzorca iz čaše.



Slika 6: Pretočni sistem s kroglicami (37).

Vsakič znova smo pred začetkom poskusa nastavili hitrost črpanja pretočne črpalke, ki je pri večini testov sproščanja znašala 2 mL/min, nekajkrat pa smo jo nastavili tudi na 10 mL/min. Nastavitev smo kontrolirali tako, da smo v merilni valj, v katerem je bil določen volumen 0.1 M NaOH, v določenem času zbrali želeno količino medija. Vodno kopel smo termostatirali na $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in 40 mL vzorca zbirali na 20 minut.

Pred vsakim poskusom smo sistem večkrat sprali s prečiščeno vodo in z medijem za raztpljanje, ki smo ga uporabili pri nadalnjem poskusu. V 150 ml delovni čaši smo sproščali pelete in s konstantnim pretokom zagotovili, da je bilo v njej vedno 40 mL medija za raztpljanje. V začetku testa smo v delovno čašo dali pelete natrijevega diklofenakata, nato pa v čašo črpali svež simuliran želodčni medij s pH 1.8, istočasno pa smo iz čaše črpali naš vzorec. Po določenem času (5, 20, 40, 60, 100, 150 ali 200 min) smo medij zamenjali s svežim simuliranim črevesnim medijem s pH 6.8. Štiri ure po menjavi želodčnega medija s črevesnim smo svež črevesni medij zamenjali s svežim medijem kolona do točke, v kateri v simuliranem mediju kolona ni bilo več sproščanja učinkovine.

Pri poskusih smo določali količino sproščene učinkovine v vzorcu. 40 mL vzorca, ki smo ga 20 minut zbirali v 40 mL 0.1 M NaOH v merilnem valju, smo premešali in raztopino filtrirali skozi filter z velikostjo por 0.45 µm ter ga nato po potrebi redčili z ustrezno pripravljeno raztopino želodčnega medija, črevesnega medija ali medija kolona in 0.1 M NaOH v volumskem razmerju 1 : 1. Po ustremnem redčenju smo vzorcu izmerili absorbanco, iz katere smo nato lahko določili količino sproščene učinkovine

Iz dobljenih absorbanc vzorcev smo s pomočjo umeritvenih premic določili koncentracijo raztopljene učinkovine v vzorcu, ki smo jo zbrali v merilnem valju po določenem času. Iz koncentracije učinkovine in volumna vzorca smo izračunali količino sproščene učinkovine po določenem času (enačba 2).

$$m_t = c_t * V_{vz} \quad \text{Enačba 2}$$

Posamezne mase smo sešeli in dobili kumulativno količino (enačba 3), nato pa smo izračunali še odstotek sproščene učinkovine po enačbi 4.

$$m_t = (c_{t1} + c_{t2} + \dots + c_{tn}) * V_{vz} \quad \text{Enačba 3}$$

$$\% = (m_t / D) * 100 \quad \text{Enačba 4}$$

n – število vzorcev (prvi vzorec ob času 0 je imel koncentracijo 0 mg/mL)

V_{vz} – volumen vzorca (40 mL)

m_t – masa učinkovine v volumnu vzorca ob času t (min)

c_t – konc. učinkovine v vzorcu ob času t (mg/mL)

% – odstotek sproščene učinkovine ob času t

D – deklarirana vsebnost natrijevega diklofenakata v Dicloberl® retard 100 mg

3.5.6.2.1 Vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje

Izvedli smo teste sproščanja z različnim časom zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju. Vsi ostali parametri, razen časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju, so bili konstantni pri vseh testih: velikost čaše (150 ml), hitrost mešanja magnetnega mešala (50 obratov/minuto), masa kroglic v čaši (25 g), volumen medija v čaši (40 ml), pretok medija (2 mL/min), temperatura medija za raztopljanje (37 °C). Časi

zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem soku s pH 1.8 pa so bili različni (5, 20, 40, 60, 100, 150 in 200 min). Pri vsakem poskusu smo določali raztopljeno količino sproščene učinkovine.

Preglednica XXVI: Oznake testov sproščanja pri različnih časih zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju.

Čas zadrževanja pelet v želodčnem mediju (min.)	Trajanje poskusa (min.)	Št. paralelk	Oznaka poskusa
5	400	6	T5
20	320	3	T20
40	320	3	T40
60	380	3	T60
100	420	3	T100
150	420	3	T150
200	580	5	T200

3.5.7 Računsko podaljševanje profilov sproščanja

Zaradi različno dolgega trajanja testov raztpljanja smo se odločili, da s pomočjo matematičnega modela računsko podaljšamo profile sproščanja, pri katerih je to potrebno, do 460 minute (7.7 h).

Pri profilih sproščanja, kjer so bili rezultati pri zadnjih meritvah vzorcev skorajda enaki (T5, T100, T150, T200), smo za računsko podaljševanje uporabili enačbo 0. reda, saj se učinkovina praktično ni več raztplljala. Skozi zadnje dve oz. tri točke smo narisali premico in izračunali njen enačbo (enačba 5). S pomočjo te enačbe smo za navidezne čase vzorčenja izračunali odvisno spremenljivko, tj. odstotek sproščene učinkovine ob določenem času.

$$\%, spr. = k * t + n$$

Enačba 5

Kjer pa enačbe 0. reda nismo mogli uporabiti, ker je šlo za večje razlike v količini sproščene učinkovine (T20, T40, T60), smo profile podaljševali s pomočjo enačbe 1. reda (enačba 6). Izračunali smo naravni logaritem nesproščene učinkovine in na podlagi

dobljenih rezultatov s pomočjo linearne regresije v zadnjih treh točkah te premice določili enačbo premice in kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficienta. S pomočjo enačbe smo nato za navidezne čase vzorčenja izračunali odvisno spremenljivko, tj. odstotek sproščene učinkovine v določenem času.

$$\ln(100 - \%_{t, spr}) = k * t + \ln(n)$$

Enačba 6

$\%_{t, spr}$ – odstotek sproščene učinkovine ob času t (%)

k – naklon umeritvene premice (%/min)

t – čas vzorčenja (min)

n – odsek na osi y (%)

3.5.8 Oteženi profili sproščanja

Po določenem času izpostavljanja pelet simuliranemu želodčnemu mediju smo, z uporabo odstotkov pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu, izračunali otežene profile sproščanja natrijevega diklofenakata. Podatke o tem smo dobili na katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. V raziskavi so, na podlagi profilov praznjenja želodca iz različnih virov literature, z Weibullovim matematičnim modelom (enačba 7) izračunali delež pelet, ki ostanejo v želodcu po določenem času praznjenja želodca. Izbrani viri so vsebovali podatke, zbrane z gama scintigrafijo na tešče. Deleži pelet, ki zapustijo želodec ob določenih časih njegovega praznjenja, so bili izračunani po enačbi 8 s pomočjo podatkov (Preglednica XXVIII) (38).

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

Enačba 7

$$\%^t_{praznjenja\ pelet} = GE\ (zač.) - GE\ (kon.)$$

Enačba 8

$GE(t)$ – delež pelet, ki ostane v želodcu v določeni časovni točki

$\%^t_{praznjenja\ pelet}$ – odstotek pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu (%)

$GE\ (zač.)$ – odstotek pelet, ki so ostale v želodcu na začetku časovnega intervala (%)

$GE\ (kon.)$ – odstotek pelet, ki so ostale v želodcu na koncu časovnega intervala (%)

Preglednica XXVII: Časovni intervali praznjenja pelet iz želodca in izračunani odstotki pelet, ki se praznijo v določenem intervalu (t_{kon} – končni čas intervala, $t_{zač}$ – začetni čas intervala, $\%^t$ praznjenja pelet – odstotek pelet, ki zapusti želodec v določenem časovem intervalu); *v zadnjem deležu pelet je prištet tudi delež, ki zapusti želodec po 230 min.

$t_{zač} - t_{kon}$ (min)	$(t_{kon} - t_{zač}/2)$ (min)	$\%^t$ praznjenja pelet
0–10	5	17.8
10–30	20	23.0
30–50	40	15.5
50–70	60	11.0
70–130	100	18.4
130–170	150	5.9
170–230	200	8.4*

Z uporabo odstotkov praznjenja pelet smo izračunali otežene profile sproščanja pri različnih časih zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju. To pa smo storili tako, da smo odstotek sproščene učinkovine v vsaki časovni točki profila sproščanja (za vse čase zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju) pomnožili z ustreznim deležem pelet (Preglednica XXVIII) glede na čas zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju (enačba 9).

$$\%^t \text{ otežen} = \%^t * \%^t \text{ praznjenja pelet}$$

Enačba 9

$\%^t \text{ otežen}$ – oteženi odstotek sproščene učinkovine ob času t (%)

$\%^t$ – odstotek sproščene učinkovine ob času t (%)

$\%^t$ praznjenja – odstotek pelet, ki zapusti želodec v določenem časovnem intervalu (%)

Nato smo otežene profile z določenimi časi zadrževanja v simuliranem želodčnem soku sešteli in izračunali povprečni oteženi profil sproščanja (enačba 10).

$$\begin{aligned} \%^t \text{ otežen. povpr. profil} &= (\%^t \text{ otežen. } 5\text{ min.} + \%^t \text{ otežen. } 20\text{ min.} + \%^t \text{ otežen. } 40\text{ min.} \\ &+ \%^t \text{ otežen. } 60\text{ min.} + \%^t \text{ otežen. } 100\text{ min.} + \%^t \text{ otežen. } 150\text{ min.} + \%^t \text{ otežen. } 200\text{ min.}) \end{aligned}$$

Enačba 10

$\%^t_{\text{otežen. povpr. profil}}$ – oteženi povprečni odstotek sproščene učinkovine ob času t (%)

$\%^t_{\text{otežen 5/10/20/40/60/100/150/200 min}}$ – oteženi odstotek sproščene učinkovine ob času t pri poskusu s časom zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju 5, 20, 40, 60, 100, 150 ali 200 min (%).

4 REZULTATI

4.1 Določanje enačb umeritvenih premic

Preglednica XXVIII, Preglednica XXIX in Preglednica XXX prikazujejo rezultate absorbanc umeritvenih premic standardnih raztopin v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8, simuliranem črevesnem mediju s pH 6.8 in simuliranem mediju kolona s pH 5.8, kjer je bil medijem v volumskem razmerju 1 : 1 dodan 0.1 M NaOH. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali enačbe umeritvenih premic in kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficienta za posamezen medij.

Preglednica XXVIII: Absorbance raztopin učinkovine različnih koncentracij pri $\lambda = 276 \text{ nm}$ v zmesi raztopin s pH 1.8 in 0.1 M NaOH (vol. razmerje 1 : 1).

pH 1.8 + 0.1 M NaOH	
$c (\text{mg/L})$	$A (276 \text{ nm})$
1.018	0.033
2.032	0.07
3.027	0.103
4.072	0.137
5.08	0.173
6.054	0.204
7.126	0.231

Iz rezultatov smo dobili enačbo umeritvene premice:

$$A = 0.033c + 0.0016$$

Enačba 11

$$R^2 = 0.9986$$

Preglednica XXIX: Absorbance raztopin učinkovine različnih koncentracij pri $\lambda = 276 \text{ nm}$ v zmesi raztopin pufra s pH 6.8 in 0.1 M NaOH (vol. razmerje 1: 1).

pufer s pH 6.8 + 0.1 M NaOH	
<i>c</i> (mg/L)	<i>A</i> (276 nm)
1.002	0.029
4.985	0.157
10.02	0.327
20	0.685
30.06	0.984
40	1.31
49.85	1.595

Iz rezultatov smo dobili enačbo umeritvene premice:

$$A = 0.0324c + 0.0051 \quad \text{Enačba 12}$$

$$R^2 = 0.9992$$

Preglednica XXX: Absorbance raztopin učinkovine različnih koncentracij pri $\lambda = 276 \text{ nm}$ v zmesi raztopin pufra s pH 5.8 in 0.1 M NaOH (vol. razmerje 1 : 1)

pufer s pH 5.8 + 0.1 M NaOH	
<i>c</i> (mg/L)	<i>A</i> (276 nm)
1	0.032
5.01	0.164
10	0.328
19.94	0.651
30	0.986
39.88	1.286
50.1	1.622

Iz rezultatov smo dobili enačbo umeritvene premice:

$$A = 0.0324c + 0.0026 \quad \text{Enačba 13}$$

$$R^2 = 0.9999$$

4.2 Merjenje gostote pelet

S piknometrom smo izmerili gostoto simuliranega želodčnega medija in simuliranega črevesnega medija ter pelet v njih in prišli do rezultatov (Preglednica XXXI). Ker je bil prenos pelet, ki so pri prehodu pH medija z 1.8 na 6.8 splavale na površino, otežen oz. skorajda nemogoč, saj so se pelete ob dotiku zdrobile in sploščile, smo na podlagi opažanj med poskusi sproščanj sklenili, da je gostota pelet v mediju s pH 6.8 manjša od gostote medija. Rezultate smo dobili le na podlagi ene pararelke poskusov.

Preglednica XXXI: Rezultati merjenja gostote pelet s piknometrom v medijih z različnim pH.

pH medija	ϱ medija (g/mL)	ϱ pelet (g/mL)
1.8	~1.00	~1.40
6.8	~1.01	<~1.01

4.3 pH-profil pri normalnem in pospešenem pretoku

Preglednica XXXIII prikazuje rezultate pH-sprememb pri profilu sproščanja pri normalnem pretoku (2 mL/min) in pri različno dolgih (3, 5 in 7 minut) pospešenih pretokih ob zamenjavi kislega želodčnega medija s pH 1.8 s simuliranim črevesnim medijem s pH 6.8.

Preglednica XXXII: pH-vrednosti pri različno povečanih pretokih po zamenjavi kislega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem: P1 – pretok 2 mL/min; P2 – 7 min. pretok 10mL/min; P3 – 5 min. pretok 10 mL/min; P4 – 3 min. pretok 10mL/min.

t (min)	pH-P1	pH-P2	pH-P3	pH-P4	t (min)	pH-P1	pH-P2	pH-P3	pH-P4
0	1.82	1.83	1.83	1.75	75	6.81	6.83	6.75	6.76
1	1.82	2	2.2	1.9	80	6.82	6.83	6.75	6.76
2	1.82	2.38	2.48	2.28	85	6.84	6.83	6.75	6.76
3	1.82	3.17	3.06	2.89	90	6.84	6.83	6.75	6.76
4	1.82	5.81	5.73	3.16	95	6.84	6.83	6.75	6.76
5	1.82	6.28	6.26	3.68	100	6.84	6.83	6.75	6.76
6	1.82	6.48	6.32	3.68	105	6.84	6.83	6.75	6.76
7	1.82	6.57	6.36	3.68	110	6.84	6.83	6.75	6.76
8	1.82	6.6	6.4	3.68	115	6.84	6.83	6.75	6.76
9	1.82	6.62	6.44	3.68	120	6.84	6.83	6.75	6.76
10	2.39	6.64	6.48	6.06	125	6.84	6.83	6.75	6.76
15	3.08	6.7	6.55	6.33	130	6.84	6.83	6.75	6.76
20	5.53	6.74	6.58	6.48	135	6.84	6.83	6.75	6.76
25	6.14	6.77	6.61	6.58	140	6.84	6.83	6.75	6.76
30	6.36	6.79	6.65	6.63	145	6.84	6.83	6.75	6.76
35	6.48	6.8	6.68	6.66	150	6.84	6.83	6.75	6.76
40	6.58	6.82	6.7	6.7	155	6.84	6.83	6.75	6.76
45	6.66	6.83	6.72	6.72	160	6.84	6.83	6.75	6.76
50	6.7	6.83	6.74	6.73	165	6.84	6.83	6.75	6.76
55	6.74	6.83	6.75	6.74	170	6.84	6.83	6.75	6.76
60	6.77	6.83	6.75	6.76	175	6.84	6.83	6.75	6.76
65	6.79	6.83	6.75	6.76	180	6.84	6.83	6.75	6.76
70	6.8	6.83	6.75	6.76	185	6.84	6.83	6.75	6.76

Preglednica XXXIII nadaljevanje:

t (min)	pH-P1	pH-P2	pH-P3	pH- P4	t (min)	pH-P1	pH-P2	pH-P3	pH- P4
190	6.84	6.83	6.75	6.76	320	5.82	5.83	5.83	5.83
195	6.84	6.83	6.75	6.76	325	5.82	5.83	5.83	5.83
200	6.84	6.83	6.75	6.76	330	5.82	5.83	5.83	5.83
205	6.84	6.83	6.75	6.76	335	5.82	5.83	5.83	5.83
210	6.84	6.83	6.75	6.76	340	5.82	5.83	5.83	5.83
215	6.84	6.83	6.75	6.76	345	5.82	5.83	5.83	5.83
220	6.84	6.83	6.75	6.76	350	5.82	5.83	5.83	5.83
225	6.84	6.83	6.75	6.76	355	5.82	5.83	5.83	5.83
230	6.84	6.83	6.75	6.76	360	5.82	5.83	5.83	5.83
235	6.84	6.83	6.75	6.76	365	5.82	5.83	5.83	5.83
240	6.84	6.83	6.75	6.76	370	5.82	5.83	5.83	5.83
245	6.75	6.76	6.75	6.76	375	5.82	5.83	5.83	5.83
250	6.62	6.57	6.6	6.57	370	5.82	5.83	5.83	5.83
255	6.49	6.48	6.49	6.48	375	5.82	5.83	5.83	5.83
260	6.33	6.28	6.31	6.28	320	5.82	5.83	5.83	5.83
265	6.22	6.17	6.2	6.17	325	5.82	5.83	5.83	5.83
270	6.13	6.08	6.11	6.08	330	5.82	5.83	5.83	5.83
275	6.08	6.04	6.06	6.04	365	5.82	5.83	5.83	5.83
280	6.04	6	6.02	6	370	5.82	5.83	5.83	5.83
285	5.97	5.96	5.97	5.96	375	5.82	5.83	5.83	5.83
290	5.94	5.94	5.94	5.94	380	5.82	5.83	5.83	5.83
295	5.93	5.92	5.93	5.92	385	5.82	5.83	5.83	5.83
300	5.91	5.86	5.89	5.86	390	5.82	5.83	5.83	5.83
305	5.85	5.85	5.85	5.85	395	5.82	5.83	5.83	5.83
310	5.83	5.83	5.83	5.83	400	5.82	5.83	5.83	5.83
315	5.82	5.83	5.83	5.83					

4.3.1 Hitrejši dvig pH z dodajanjem različnih bazičnih raztopin

Po poskusu smo ugotovili, da za hitri dvig pH z 1.8 na 6.8 potrebujemo 0.580 mL 1 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ oziroma 7.726 mL 0.1 M NaOH, kot kaže Preglednica XXXIII. Pri uporabi 1 M NaOH pa smo ugotovili, da je premočna baza, zaradi česar ne moremo natančno uravnati pH na želeno vrednost.

Preglednica XXXIII: Vrsta in količina dodanega medija za dvig pH-ja z 1.8 na 6.8.

dodan medij	dodan volumen (ml)	končen pH
1M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	0.50	5.9
	0.52	6.1
	0.54	5.9
	0.58	6.8
	1.0	12
0.1 M NaOH	7.70	6.65
	7.71	6.65
	7.72	6.7
	7.725	6.75
	7.726	6.8
1 M NaOH	7.727	6.9
	7.76	7.1
	0.75	6.3
	0.76	6.4
	0.77	6.5
	0.775	6.6
	0.78	7

4.4 Testi sproščanja

4.4.1 Vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata

Preglednica XXXIV, Preglednica XXXV, Preglednica XXXVI, Preglednica XXXVII, Preglednica XXXVIII, Preglednica XXXIX in Preglednica XL prikazujejo rezultate profilov sproščanja za posamezno pararelko, s pomočjo katerih smo ugotavljali vpliv različno dolgega zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata. Zbrani so odstotki sproščene učinkovine, ki je bila sproščena v poskusih s sedmimi različnimi časi izpostavljanja pelet simuliranemu želodčnemu mediju s pH 1.8. Gre za čase 5, 20, 40, 60, 100, 150 in 200 minut.

Pod odbeljeno črto so rezultati odstotkov sproščene učinkovine, pridobljeni z računskim podaljševanjem profila. Poskuse, pri katerih je bil čas zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju 5 min, smo podaljševali od 400. minute dalje. Teste z 20- in 40-minutnim zadrževanjem pelet v simuliranem želodčnem mediju smo podaljševali od 320. minute dalje, teste s 60-minutnim zadrževanjem pelet od 380. minute naprej in teste s 100-minutnim zadrževanjem od 420. minute dalje. Vsi testi so bili podaljšani do 460. minute. Testov s 150- in 200-minutnim zadrževanjem v simuliranem želodčnem mediju nam zaradi zadostnih časovnih točk ni bilo potrebno podaljševati, zato rezultati v preglednicah niso podaljšani.

Računsko smo podaljšali tudi povprečne profile sproščanja za posamezne čase zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju.

Preglednica XXXIV: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusih pri času zadrževanja pelet v simuliranem črevesnem mediju s pH 1.8 5 minut. T5 a, b, c, d, e, f so paralele poskusa T5.

Pod odbeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

t (min)	% sprošč. uč. T5a	% sprošč. uč. T5b	% sprošč. uč. T5c	% sprošč. uč. T5d	% sprošč. uč. T5e	% sprošč. uč. T5f	povp. % sprošč. uč. T5	RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0.000	0
20	0.694	0.922	0.602	0.983	0.782	0.665	0.775	0.195
40	9.286	11.291	8.033	10.673	11.472	9.368	10.020	0.134
60	28.346	40.421	25.476	29.301	33.688	27.379	30.769	0.178
80	47.382	59.914	42.203	48.177	52.143	44.118	48.990	0.13
100	61.652	73.344	54.647	64.484	65.29	59.697	63.186	0.099
120	71.182	81.627	65.917	74.828	73.783	71.301	73.106	0.071
140	77.983	87.107	72.829	82.296	79.337	78.868	79.737	0.06
160	82.488	90.526	77.137	87.085	82.978	83.792	84.001	0.054
180	85.166	92.796	79.901	90.008	85.637	86.671	86.697	0.051
200	87.017	94.449	81.702	92.075	87.407	88.55	88.533	0.05
220	88.609	95.706	83.03	93.445	88.76	89.72	89.878	0.049
240	89.801	96.762	84.057	94.447	89.841	90.574	90.914	0.048
260	90.68	97.644	85.008	95.207	90.712	91.191	91.740	0.047
280	91.269	98.311	85.739	95.828	91.331	91.812	92.382	0.047
300	91.593	98.735	86.202	96.153	91.779	92.136	92.766	0.046
320	91.794	98.968	86.719	96.354	92.012	92.369	93.036	0.045
340	91.896	99.109	86.94	96.456	92.153	92.459	93.169	0.045
360	91.959	99.204	87.101	96.519	92.248	92.52	93.258	0.045
380	91.999	99.274	87.342	96.559	92.318	92.558	93.342	0.044
400	92.038	99.342	87.538	96.597	92.386	92.588	93.415	0.044
420	92.093	99.408	87.75	96.652	92.452	92.617	93.543	
440	92.133	99.484	87.954	96.692	92.528	92.651	93.637	
460	92.173	99.56	88.158	96.732	92.604	92.685	93.731	

Preglednica XXXV: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusih pri času zadrževanja pelet v simuliranem črevesnem mediju s pH 1.8 20 minut. T20 a, b, c so paralele poskusa T20. Pododebeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

t (min)	% sprošč. uč. T20a	% sprošč. uč. T20b	% sprošč. uč. T20c	povp. % sprošč. uč. T20	RSD (%)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0
20	0.411	0.816	0.493	0.573	0.374
40	1.675	2.138	1.743	1.852	0.135
60	11.834	15.741	14.852	14.142	0.145
80	27.820	32.197	30.271	30.096	0.073
100	42.819	48.307	45.443	45.523	0.06
120	54.497	59.380	57.318	57.065	0.043
140	61.891	66.329	64.514	64.245	0.035
160	66.964	70.772	69.636	69.124	0.028
180	70.678	73.845	73.252	72.592	0.023
200	73.294	76.190	75.967	75.150	0.021
220	75.108	77.867	79.226	77.400	0.027
240	76.658	79.304	80.730	78.897	0.026
260	78.317	80.573	82.011	80.300	0.023
280	79.438	81.605	83.030	81.358	0.022
300	80.150	82.486	84.550	82.396	0.027
320	80.586	83.428	85.497	83.170	0.03
340	80.946	84.268	86.494	83.903	
360	81.472	85.065	87.433	84.656	
380	81.983	85.822	88.306	85.370	
400	82.481	86.540	89.118	86.046	
420	82.964	87.222	89.874	86.687	
440	83.435	87.870	90.578	87.294	
460	83.892	88.484	91.232	87.870	

Preglednica XXXVI: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusih pri času zadrževanja pelet v simuliranem črevesnem mediju s pH 1.8 40 minut. T40 a, b, c so paralele poskusa T40. Pod odebeleno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

t (min)	% sprošč. uč. T40a	% sprošč. uč. T40b	% sprošč. uč. T40c	povp. % sprošč. uč. T40	RSD (%)
0	0	0	0	0	0
20	0.294	0.333	0.352	0.326	0.092
40	1.476	1.57	1.992	1.679	0.164
60	3.048	2.723	3.358	3.043	0.105
80	8.425	7.52	6.423	7.456	0.135
100	22.121	20.388	21.579	21.363	0.042
120	39.033	36.153	39.146	38.111	0.045
140	51.353	48.374	51.935	50.554	0.038
160	58.796	57.656	61.995	59.482	0.038
180	64.745	64.285	68.117	65.716	0.032
200	69.09	68.592	72.598	70.093	0.031
220	72.025	71.661	75.148	72.945	0.026
240	74.094	73.972	77.024	75.03	0.023
260	75.684	75.856	78.325	76.622	0.019
280	76.837	77.416	79.206	77.82	0.016
300	77.698	78.796	80.196	78.897	0.016
320	78.272	79.715	80.689	79.559	0.015
340	79.350	81.709	81.768	80.942	
360	80.120	82.980	82.552	81.884	
380	80.862	84.162	83.303	82.776	
400	81.575	85.262	84.022	83.620	
420	82.262	86.286	84.710	84.419	
440	82.924	87.239	85.368	85.177	
460	83.560	88.125	85.998	85.895	

Preglednica XXXVII: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusih pri času zadrževanja pelet v simuliranem črevesnem mediju s pH 1.8 60 minut. T60 a, b, c so paralele poskusa T60. Pod odebeleno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z računskim podaljšanjem profilov.

t (min)	% sprošč. uč. T60a	% sprošč. uč. T60b	% sprošč. uč. T60c	povp. % sprošč. uč. T60	RSD (%)
0	0	0	0	0	0
20	0.321	0.428	0.343	0.364	0.157
40	1.435	1.175	1.209	1.273	0.111
60	2.558	2.587	2.032	2.392	0.13
80	3.645	4.261	2.799	3.568	0.206
100	13.989	14.82	14.216	14.342	0.03
120	33.736	34.214	27.585	31.845	0.116
140	49.241	48.608	40.065	45.971	0.111
160	59.536	58.101	52.089	56.575	0.07
180	66.707	64.322	60.902	63.977	0.046
200	71.706	68.95	67.16	69.272	0.033
220	75.174	72.295	71.888	73.119	0.024
240	77.781	74.825	75.598	76.068	0.02
260	79.949	76.8	78.862	78.537	0.02
280	81.623	78.506	81.435	80.521	0.022
300	82.911	80.247	83.694	82.284	0.022
320	84.375	82.953	85.459	84.262	0.015
340	85.268	84.159	86.606	85.344	0.014
360	85.832	84.587	87.266	85.895	0.016
380	86.176	84.854	87.677	86.236	0.016
400	86.690	85.079	88.292	86.687	0.027
420	87.109	85.403	88.773	87.095	
440	87.515	85.721	89.235	87.490	
460	87.909	86.032	89.678	87.873	

**Preglednica XXXVIII: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusih pri času zadrževanja
pelet v simuliranem črevesnem mediju s pH 1.8 100 minut. T100 a, b, c so paralele poskusa
T100. Pod odbeljeno črto so podani odstotki sproščene učinkovine, ki smo jih dobili z
računskim podaljšanjem profilov.**

t (min)	% sprošč. uč. T100a	% sprošč. uč. T100b	% sprošč. uč. T100c	povp. % sprošč. uč. T100	RSD (%)
0	0	0	0	0	0
20	0.483	0.447	0.428	0.453	0.062
40	1.82	1.573	1.52	1.638	0.098
60	3.031	2.83	2.425	2.762	0.112
80	4.152	3.851	3.434	3.812	0.095
100	5.193	4.72	4.415	4.776	0.082
120	6.372	5.931	5.618	5.974	0.063
140	11.148	10.078	10.333	10.52	0.053
160	22.616	21.064	20.813	21.498	0.045
180	34.455	33.174	33.219	33.616	0.022
200	43.169	42.963	43.292	43.141	0.004
220	49.736	49.159	49.748	49.548	0.007
240	54.216	53.38	54.215	53.937	0.009
260	58.03	57.49	58.375	57.965	0.008
280	61.723	60.672	61.431	61.275	0.009
300	64.78	63.447	64.959	64.395	0.013
320	67.237	65.867	67.712	66.939	0.014
340	69.303	68.22	70.285	69.269	0.015
360	71.004	70.049	72.157	71.07	0.015
380	72.161	71.421	73.252	72.278	0.013
400	72.959	72.219	74.041	73.073	0.013
420	73.516	72.776	74.797	73.696	0.014
440	74.244	73.504	75.720	74.489	
460	74.922	74.182	76.590	75.231	

Preglednica XXXIX: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusu T150: čas v kislem želodčnem mediju 150 min. (T150 a, b, c so paralele poskusa T150, RSD – relativna standardna deviacija).

t (min)	% sprošč. uč. T150a	% sprošč. uč. T150b	% sprošč. uč. T150c	povp. % sprošč. uč. T150	RSD (%)
0	0	0	0	0	0
20	0.226	0.285	0.365	0.292	0.24
40	1.304	1.19	1.381	1.292	0.074
60	2.485	2.255	2.447	2.396	0.051
80	3.475	3.209	3.378	3.354	0.04
100	4.497	4.141	4.065	4.234	0.055
120	5.39	5.043	4.774	5.069	0.061
140	6.135	5.946	5.427	5.836	0.063
160	6.905	6.936	5.967	6.603	0.083
180	8.015	7.849	6.817	7.56	0.086
200	14.322	12.884	10.668	12.625	0.146
220	22.926	20.871	16.79	20.196	0.155
240	29.887	27.24	23.838	26.988	0.112
260	35.985	33.35	30.726	33.354	0.079
280	41.379	38.435	36.428	38.747	0.064
300	45.97	42.952	41.402	43.441	0.053
320	49.673	46.754	45.463	47.297	0.046
340	52.917	50.035	48.897	50.616	0.041
360	55.756	53.047	51.862	53.555	0.037
380	58.193	55.615	54.41	56.073	0.034
400	60.341	58.012	56.862	58.405	0.03
420	61.938	59.878	58.721	60.179	0.027
440	63.006	61.205	60.006	61.406	0.025
460	63.659	62.06	60.809	62.176	0.023

Preglednica XL: Odstotki sproščene učinkovine pri poskusu T200: čas v kislem želodčnem mediju 200 min. (T200 a, b, c, d, e so paralele poskusa T200, RSD – relativna standardna deviacija).

t (min)	% sprošč. uč. T200a	% sprošč. uč. T200b	% sprošč. uč. T200c	% sprošč. uč. T200d	% sprošč. uč. T200e	povp. % sprošč. uč. T200a	RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0.59	0.893	0.605	0.973	0.241	0.66	0.439
40	2.099	2.278	2.269	2.189	0.683	1.904	0.36
60	3.535	4.667	3.935	3.913	1.118	3.434	0.395
80	5.085	5.575	5.786	6.098	1.374	4.784	0.406
100	6.512	6.71	7.479	7.384	1.588	5.935	0.415
120	7.822	7.839	9.359	8.399	1.788	7.041	0.426
140	9.435	8.64	11.469	9.146	2.002	8.138	0.442
160	10.704	10.173	13.533	10.897	2.177	9.497	0.452
180	12.101	12.355	15.517	13.175	2.321	11.094	0.458
200	13.304	13.265	17.459	14.002	2.478	12.102	0.467
220	16.028	14.137	18.912	14.786	2.597	13.292	0.47
240	18.958	20.382	20.971	24.711	5.411	18.087	0.409
260	29.871	28.406	24.771	35.537	12.237	26.164	0.332
280	38.524	35.294	33.807	43.314	20.408	34.269	0.25
300	44.3	40.095	39.781	49.201	27.444	40.164	0.201
320	48.892	44.55	43.953	53.36	33.48	44.847	0.165
340	53.162	50.129	47.013	55.964	38.454	48.944	0.138
360	55.914	53.486	49.506	57.926	42.515	51.869	0.118
380	58.151	56.377	51.698	59.595	46.081	54.38	0.101
400	60.148	58.7	53.323	61.123	49.259	56.511	0.089
420	61.841	60.829	54.875	62.728	52.254	58.505	0.08
440	63.399	62.759	56.273	63.873	54.76	60.213	0.072
460	64.708	64.398	57.411	65.033	56.927	61.695	0.067
480	65.664	66.135	58.273	66.101	58.639	62.962	0.065
500	66.416	66.912	59.129	66.761	59.588	63.761	0.063
520	66.928	67.42	59.646	67.278	60.167	64.288	0.062
540	69.048	69.641	62.044	89.646	82.534	74.583	0.15

4.4.2 Oteženi profili sproščanja

Preglednica XLI in Preglednica XLII podajata otežene pofile za posamezne čase zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju in povprečni oteženi profil sproščanja raztopljene sproščene učinkovine.

Preglednica XLI: Izračunani oteženi odstotki celotne sproščene učinkovine pri različnih časih zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8. (T5 – čas zadrževanja 5 min., T20 – 20 min., T40 – 40 min., T60 – 60 min., T100 – 100 min., T150 – 150 min., T200 – 200 min.).

t (min)	otež. % sprošč. uč. T5	otež. % sprošč. uč. T20	otež. % sprošč. uč. T40	otež. % sprošč. uč. T60	otež. % sprošč. uč. T100	otež. % sprošč. uč. T150	otež. % sprošč. uč. T200
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0.138	0.132	0.051	0.040	0.081	0.017	0.053
40	1.784	0.426	0.260	0.140	0.295	0.076	0.152
60	5.477	3.253	0.472	0.263	0.497	0.141	0.275
80	8.720	6.922	1.156	0.393	0.686	0.198	0.383
100	11.247	10.470	3.311	1.578	0.860	0.250	0.475
120	13.013	13.125	5.907	3.503	1.075	0.299	0.563
140	14.193	14.776	7.836	5.057	1.894	0.344	0.651
160	14.952	15.899	9.220	6.223	3.870	0.390	0.760
180	15.432	16.696	10.186	7.037	6.051	0.446	0.888
200	15.759	17.285	10.864	7.620	7.765	0.745	0.968
220	15.998	17.802	11.306	8.043	8.919	1.192	1.063
240	16.183	18.146	11.630	8.368	9.709	1.592	1.447
260	16.330	18.469	11.876	8.639	10.434	1.968	2.093
280	16.444	18.712	12.062	8.857	11.030	2.286	2.742
300	16.512	18.951	12.229	9.051	11.591	2.563	3.213
320	16.560	19.129	12.332	9.269	12.049	2.790	3.588
340	16.584	19.298	12.546	9.388	12.468	2.986	3.916
360	16.600	19.471	12.692	9.448	12.793	3.160	4.150

Preglednica XLI nadaljevanje:

t (min)	otež. % sprošč. uč. T5	otež. % sprošč. uč. T20	otež. % sprošč. uč. T40	otež. % sprošč. uč. T60	otež. % sprošč. uč. T100	otež. % sprošč. uč. T150	otež. % sprošč. uč. T200
380	16.615	19.635	12.830	9.486	13.010	3.308	4.350
400	16.628	19.791	12.961	9.536	13.153	3.446	4.521
420	16.642	19.938	13.085	9.580	13.265	3.551	4.680
440	16.656	20.078	13.202	9.624	13.408	3.623	4.817
460	16.670	20.210	13.314	9.666	13.542	3.668	4.936

Preglednica XLII: Povprečni oteženi profil.

t (min)	povp. oteženi profil sproščanja (%)	t (min)	povp. oteženi profil sproščanja (%)
0	0	240	67.074
20	0.512	260	69.809
40	3.133	280	72.133
60	10.378	300	74.111
80	18.457	320	75.717
100	28.190	340	77.186
120	37.486	360	78.313
140	44.751	380	79.235
160	51.313	400	80.035
180	56.736	420	80.742
200	61.006	440	81.408
220	64.323	460	82.005

5 RAZPRAVA

In vitro testi sproščanja so pogosto uporabljeni za predvidevanje obnašanja FO *in vivo*. Da bi *in vitro* rezultati kar najbolje ponazarjali okolje in obnašanje farmacevtske oblike v *in vivo* okolju, je pred izvedbo testov raztplavljanja treba ustrezeno določiti/izbrati pogoje poskusa. To pa je mogoče le, če dobro poznamo fiziološke in fizikalno-kemijske parametre, ki lahko vplivajo na FO. Parametrov je več in se med seboj razlikujejo, vsak od njih pa je pomemben za posamezen primer učinkovine in FO, zato moramo pred začetkom testa sproščanja vedeti, kakšen je/bo potek klinične študije (na tešče, s hrano, časovna razporeditev obrokov in njihova kalorična vrednost, bolni/zdravi prostovoljci ...). Predvideti je treba tudi fizikalne parametre, ki v veliki meri vplivajo na sproščanje učinkovine iz FO (čas zadrževanja FO v posameznih predelih GIT, mehanske obremenitve), kemijske parametre (pH, ionska moč, pufrska kapaciteta), ki so prav tako pomembni za raztplavljanje FO, ter fiziološke parametre (encimi, površinsko aktivne snovi, permeabilnost, izločanje prebavnih sokov ...).

V diplomski nalogi smo se osredotočili na čas zadrževanja FO v kislem želodčnem mediju in vpliv le-tega na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet s podaljšanim sproščanjem.

5.1 Utemeljitev eksperimentalnega dela in načina dela

Ker je čas zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju eden glavnih fizikalnih parametrov, ki vplivajo na sproščanje, smo z različno dolgim izpostavljanjem pelet natrijevega diklofenakata simuliranemu kislemu želodčnemu mediju s pH 1.8 skušali ugotoviti, kako ta parameter vpliva na sproščanje natrijevega diklofenakata. Pelete v *in vivo* pogojih pilorus preidejo v več fazah in se praznijo v skupkih, t. i. bolusih. Čas prehoda pelet na tešče, ki se praznijo v bolusih, je odvisen od faze MMC in je pri vsakem posamezniku in aplikaciji FO drugačen. Na podlagi že razvitega Weibullovega matematičnega modela praznjenja želodca smo si izbrali čase praznjenja pelet iz želodca. Ti so obsegali območje od 5 do 200 minut. Iz profilov sproščanja smo glede na matematični model prazenja pelet iz želodca (enačba 7) otežili dobljene podatke ter izračunali oteženi povprečni profil sproščanja. Zadali smo si nalogo, da z izbiro sedmih različnih časov zadrževanja pelet v simuliranem kislem želodčnem mediju razložimo vpliv časa zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju. Časi zadrževanja pelet v simuliranem

želodčnem mediju so bili 5, 20, 40, 60, 100, 150 in 200 minut. Po določenem času smo simuliran želodčni medij za naslednje štiri ure zamenjali s simuliranim črevesnim medijem s pH 6.8. Čas v simuliranem črevesnem mediju je bil pri vseh testih sproščanja konstanten – štiri ure. Po štirih urah v simuliranem črevesnem mediju smo medij zamenjali s simuliranim medijem kolona s pH 5.8 in test nadaljevali do časa, ko ni bilo več očitnega sproščanja učinkovine.

Simuliran želodčni medij s pH 1.8, ki smo ga uporabljali pri našem delu, predstavlja pH-vrednost kislega želodčnega soka, ki je nekje v povprečnem območju izmerjenih pH-vrednosti v želodcu na tešče. Ne gre za farmakopejski medij, razlika je v sestavi in ionski moči našega pufra, ki je glede na dodano količino NaCl večja kot pri farmakopejskih pufrih.

Prav tako se sestava našega simuliranega črevesnega medija s pH 6.8 razlikuje od farmakopejskega, saj namesto kalijevega dihidrogen fosfata vsebuje natrijev dihidrogen fosfat. Kljub temu, da je imel naš pufer enak pH kot farmakopejski, je imel različno ionsko moč (0.14 mol/L), kar pa bistvenega vpliva na raztopljanje naše učinkovine v drugih vrstah pelet ni imelo (40).

Pelete smo v simuliranem črevesnem mediju s pH 6.8 zadrževali štiri ure in tako ponazorili čas, v katerem se iz tankega črevesja najverjetneje izpraznijo vse pelete.

Čas zadrževanja pelet v simuliranem mediju kolona je bil kratek zato, ker se topnost diklofenaka pri nižjem pH zmanjša ali pa je do takrat sproščena že vsa učinkovina, prav tako pa je bila sama izvedba celotnega testa sproščanja časovno omejena.

Količino sproščene učinkovine smo dobili z uporabo 0.1 M NaOH, v katero smo lovili naš vzorec. Pri nizkem pH medija lahko v majhnem obsegu pride do obarjanja raztopljenega diklofenaka, kar se kaže v obliki drobnih izpadlih delcev, ki lahko predstavljajo neraztopljen delež sproščenega diklofenaka. Ti delci lahko nato preidejo mrežico na koncu cevke, ki črpa vzorec iz delovne čaše v merilni valj. Ko oborjeni delci diklofenaka pridejo v stik z 0.1 M NaOH v merilnem valju, se v njem raztopijo. To pomeni, da je na koncu v vzorcu v merilnem valju vsa sproščena raztopljena učinkovina in še majhen delež sproščene neraztopljene učinkovine. Ker je delež sproščene neraztopljene učinkovine, glede na prejšnje rezultate predvidoma majhen in zato zanemarljiv (37), smo smo pri vseh poskusih določali samo celokupno sproščeno učinkovino na zgoraj opisan način.

Za sistem, na katerem smo izvajali teste raztopljanja, smo izbrali pretočni sistem s kroglicami, ki kar najbolje ponazarja pogoje v GIT in se je že pred našo diplomsko nalogo izkazal za izredno uporabnega. Volumen medija je bil 40 mL, kar dobro ponazarja volumen medija v želodcu na tešče. Magnetno mešalo, ki se je enakomerno vrtelo s hitrostjo 50 obratov/ minuto, je dobro predstavljalo mehaniko gibanja v GIT. Črpalka, ki je enakomerno črpala sveže pripravljen medij iz čaše v delovno časo, je konstantno odčrpavala raztopljeno učinkovino v merilni valj za vzorčenje in nadomeščala odčrpan medij z novim ter tako konstantno odnašala raztopljen del učinkovine z difuznega sloja okoli pelet. Pretočni sistem je dobro ponazarjal pretoče v GIT, ki smo jih lahko poljubno tudi povečali. Temperatura kopeli, ki je bila 37.5 °C, je medij za raztpljanje segrela na želeno fiziološko temperaturo (37 °C), ki bistveno vpliva na sproščanje učinkovine. Sistem steklenih kroglic skupaj z mešalom je dobro ponazoril mehanske sile, ki delujejo na FO. Mehanska sila bi lahko vplivala na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet, saj so bile na začetku poskusa, ko smo pelete sproščali v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8, pelete potopljene in razporejene nad in tudi med steklene kroglice. Ob dvigu pH na 6.8 pa je prišlo do zanimivega pojava – pelete so se dvignile na površino in niso bile več v stiku s steklenimi kroglicami.

5.2 Izbera analizne metode

Vse zbrane vzorce smo analizirali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma natrijevega diklofenakata – 276 nm. Spektrofotometrična metoda, ki je enostavna, poceni in hitra, je bila v našem primeru, kjer smo uporabljali preproste medije brez dodatka encimov in PAS, najprimernejša. Diklofenak je učinkovina, ki vsebuje aromatski obroč, ki je kromofor, kar pomeni, da zelo dobro absorbira UV-svetlogo, pri čemer elektroni preidejo v višje energetsko stanje. Valovna dolžina, pri kateri kromofor najbolje absorbira, je absorpcijski maksimum učinkovine, ta je pri natrijevem diklofenaku znašal 276 nm in je bil enak v vseh treh simuliranih medijih z dodatkom 0:1 M NaOH.

Pri analizi smo vzorce lovili v merilni valj z 0.1 M NaOH, jih premešali, prefiltrirali in izmerjene absorbance, glede na umeritveno krivuljo, ugotavljali koncentracijo raztopljene učinkovine v vzorcu. Vzorce z absorbenco višjo od 1.6, smo redčili z raztopino simuliranega medija in 0.1 M NaOH v volumskem razmerju 1 : 1, in sicer 1/5, da smo dobili koncentracijo vzorca, ki je bila v koncentracijskem območju naše umeritvene

premice. Absorbance vzorcev so bile sorazmerne koncentraciji raztopljene učinkovine, ki pa je bila v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8 manjša kot v simuliranem črevesnem mediju s pH 6.8, kjer je topnost diklofenaka večja. S tem se je seveda povečala tudi absorbanca, ki pa se je, po prehodu učinkovine v simuliran medij kolona, zopet zmanjšala zaradi zmanjšane koncentracije učinkovine v vzorcu.

5.3 Merjenje gostote pelet

Kot smo že omenili, se je med poskusom pojavljala spremembra v gostoti pelet, saj so bile v začetku, ko je bil v delovni čaši simuliran želodčni medij, razporejene po površini steklenih kroglic ali pa celo med njimi, raztopina pa je po 20 minutah pomotnila. Po prehodu v simuliran črevesni medij s pH 6.8 je prišlo do splavanja pelet na površino medija in zbistritve le-tega. Zanimalo nas je, zakaj pride do splavanja pelet in kaj se dejansko zgodi z gostoto pelet, ki se po prehodu v višji pH očitno spremeni.

Rezultati so pokazali, da je gostota pelet v simuliranem želodčnem mediju višja od gostote medija s pH 1.8. Gostota simuliranega želodčnega in črevesnega medija je bila podobna vodi. Po zamenjavi želodčnega medija s črevesnim, ko je prišlo do dviga pelet na površino medija, smo poskusili izmeriti gostoto pelet, a je bilo to nemogoče, saj so bile pelete krhke in so se ob prenosu v piknometer zdrobile. Nekaj pelet smo kljub njihovi krhkosti prenesli v piknometer in pri tem ugotovili, da je njihova teža zelo majhna, saj smo, kljub velikemu volumnu pelet, v piknometru natehtali zanemarljivo maso pelet, kar kaže na njihovo majhno gostoto.

Eudragit ® RL PO je kopolimer etil akrilata, metil akrilata in majhne količine estra metakrilne kisline s kvarterno amonijevo skupino, ki je odgovorna za permeabilnost polimera. Gre za netopen, visoko permeabilen polimer, katerega nabrekanje je neodvisno od pH. Kljub temu, da je Eudragit ® RL PO slabo topen v vodi, ob stiku z vodo pride do nastanka kanalčkov, ki peljejo od medija do učinkovine in tako omogočijo raztapljanje učinkovine, ki s pomočjo difuzije odide v medij. Do tega pojava prihaja v vseh vodnih medijih, ne glede na njihovo pH vrednost.

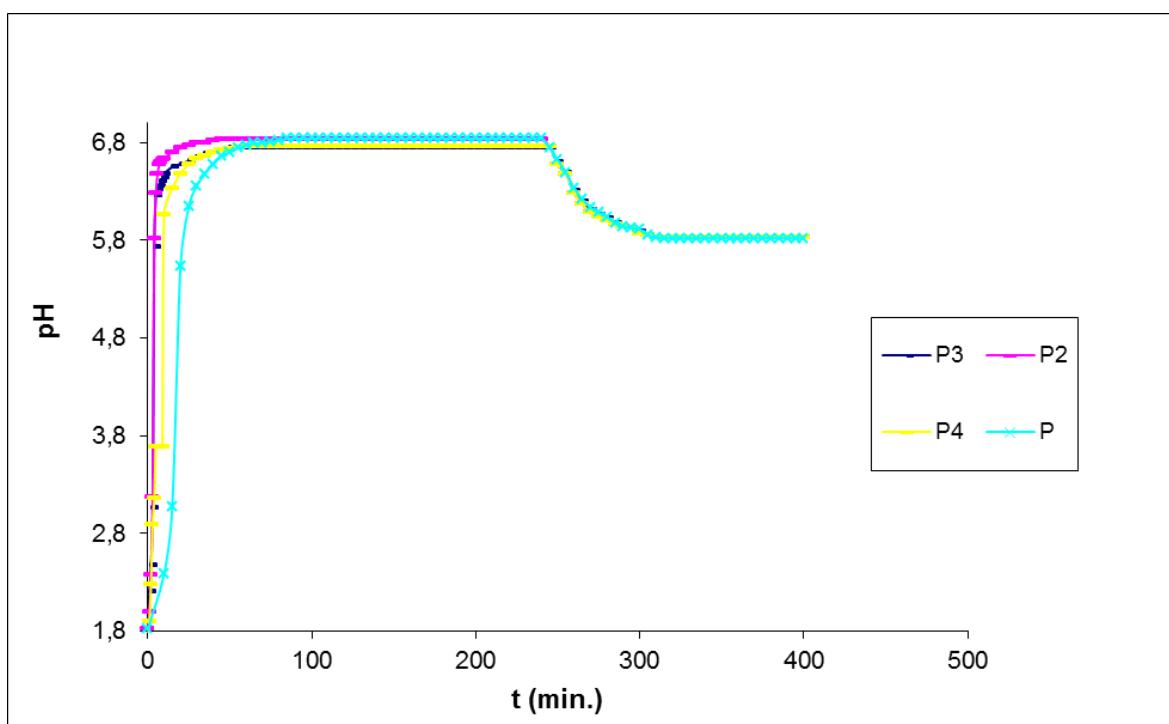
Zaradi plavanja pelet na površini simuliranega črevesnega medija s pH 6.8 in tehničnih težav pri prenosu in merjenju gostote pelet, smo na podlagi opažanj sklenili, da je gostota pelet v mediju s pH 6.8 manjša od samega medija.

5.4 pH-profil

Ker smo pri testih raztpljanja po določenem času zamenjali simuliran želodčni medij s simuliranim črevesnim medijem in pri tem nismo pospešili pretoka, nas je zanimalo, koliko časa po zamenjavi medija dejansko pride do dviga pH-vrednosti z 1.8 na 6.8. Posneli smo pH-profil in ugotovili, kot kaže Slika 7, da pri normalnem pretoku 2 mL/min pride do dviga pH dokaj hitro, vendar pa se pH ustali na želeni vrednosti 6.8 šele v 60 minutah po zamenjavi medija.

5.5 pH-profil pri povečanih pretokih

Kasneje smo žeeli ugotoviti vpliv hitrosti pretoka ob zamenjavi medija na hitrost dviga pH-vrednosti. Ko smo pretok ob zamenjavi simuliranega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem za tri minute povečali na 10 mL/min, je prišlo do ustalitve pH na 6.8 enako hitro kot pri normalnem pretoku. Če je bil pretok povečan 5 minut na 10 mL/min, se je pH na 6.8 ustalil po 55 minutah, ko pa smo pretok povečali za 7 minut, se je pH na 6.8 ustalil že po 25 minutah. Rezultate kaže Slika 7.



Slika 7:pH-vrednosti po zamenjavi simuliranega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem: P – pretok 2 mL/min; P2 – 7 min. pretok 10 mL/min; P3 – 5 min. pretok 10 mL/min; P4 – 3 min. pretok 10 mL/min.

5.5.1 Dvig pH z 1.8 na 6.8

Ker smo iz pH-profila sproščanja ugotovili, da pri normalnem pretoku 2 mL/min pride do dviga pH z 1.8 na ustaljeno vrednost 6.8 šele 60 minut po zamenjavi medija, smo skušali ugotoviti, kako bi lahko hitro dvignili pH in tako bolje ponazorili pogoje, ki so jim izpostavljene pelete v *in vivo* sistemu pri prehodu iz želodca v tanko črevo. Pripravili smo 40 mL simuliranega želodčnega medija s pH 1.8 in nato z različnimi bazičnimi raztopinami poskušali dvigniti pH-vrednost medija na 6.8. Poskus smo začeli z 1 M NaOH in ugotovili, da je baza premočna, saj že najmanjša sprememba količine dodanega 1 M NaOH močno vpliva na končno vrednost pH. Odločili smo se za manj koncentrirano bazo in poskusili z 0.1 M NaOH. Z 0.1 M NaOH smo hitro uspeli doseči konstantno želeno vrednost 6.8, vendar pa je bil volumen dodanega 0.1 M NaOH precej velik glede na začeten volumen medija. Ker z rezultati nismo bili zadovoljni, smo poskusili z uporabo 1 M Na₃PO₄ x 12 H₂O in ugotovili, da pridemo na želeno pH-vrednost z dodatkom 0.580 mL 1 M Na₃PO₄ x 12 H₂O v 40 mL simuliranega želodčnega medija. Ker želimo z dodatkom čim manj vplivati na proces raztopljanja učinkovine, je zaželeno, da je volumen dodane bazične raztopine čim manjši, kar nas privede do zaključka, da je v našem primeru najugodnejša rešitev dodatek 1 M Na₃PO₄ x 12 H₂O, saj z dodanim volumenom bazične raztopine ne vplivamo bistveno na volumen medija.

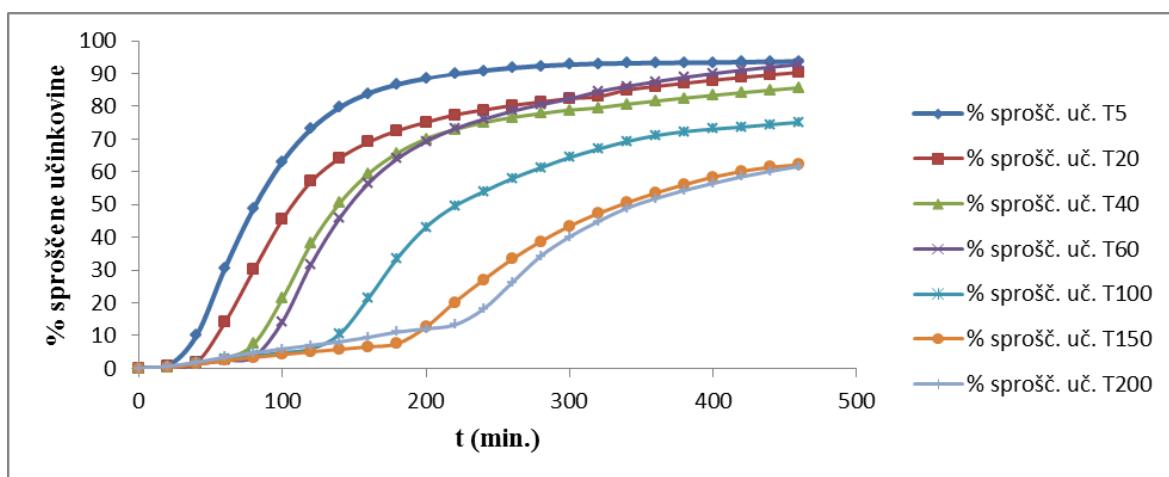
Posebno moramo biti pozorni na način dodajanja bazičnega medija v raztopino, saj ta med dodajanjem ne bi smela priti v stik z našim vzorcem, ker bi lahko povzročila takojšnje raztopljanje učinkovine, kar pa bi privelo do nerealnega rezultata profila sproščanja, ki bi ga sprožili tako, da bi neposredno na pelete kapnili bazično raztopino. Zato je najboljša metoda, da bazično raztopino dolivamo počasi in to takrat, ko na mestu stika med bazično raztopino in medijem ni pelet ali ob robu čase, če seveda tudi tam ni pelet.

5.6 Vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata

Za dosego terapevtskega učinka se mora učinkovina iz FO najprej sprostiti, nato pa absorbirati iz prebavnega trakta. Diklofenak spada v II. razred po BCS-klasifikaciji (34), kar pomeni, da je slabo topna in dobro permeabilna. Zanimalo nas je, kako različni časi

zadrževanja natrijevega diklofenakata v kislem želodčnem mediju s pH 1.8 vplivajo na sproščanje učinkovine iz FO.

Teste sproščanja smo razdelili glede na čas zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju. Pelete smo glede na hitrost praznjenja pelet iz želodca različno dolgo zadrževali v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8. Nato smo iz povprečja pararelk profilov sproščanja, ki smo jih naredili pri določenih časih, dobili profile sproščanja za določen čas zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju. Kjer testi sproščanja niso bili dovolj dolgi, smo se poslužili matematičnega podaljševanja profilov sproščanja s pomočjo enačbe za 0. in 1. red. Rezultate kaže Slika 8.



Slika 8: Profili sproščanja za posamezne čase zadrževanja učinkovine v simuliranem želodčnem mediju s pH 1.8.

Iz profilov sproščanja lahko vidimo, da daljši, kot je čas zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju, daljši je čas, potreben za začetek sproščanja učinkovine iz FO. Ko se učinkovina, po zamenjavi želodčnega medija s črevesnim, začne sproščati iz FO, je pri krajših časih zadrževanja pelet v kislem mediju (5, 20, 40 in 60 minut) po začetku sproščanja učinkovine vidno, da se učinkovina sprošča s približno enako hitrostjo. To vidimo iz krivulj testov sproščanja, ki so vzporedne v petih časovnih točkah po zamenjavi kislega želodčnega medija s črevesnim. Pri daljšem zadrževanju pelet v kislem želodčnem mediju (100, 150 in 200 minut), pa tega ni moč opaziti. Čas do začetka sproščanja učinkovine iz FO, se ob daljšem času zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju poveča, saj se podaljša čas prehoda FO v območje z višjim pH medija, kjer je učinkovina dobro topna.

V začetku testov sproščanja, ko je učinkovina v kislem mediju, je odstotek sproščene učinkovine majhen, kar je posledica slabe topnosti diklofenaka v kislem mediju in tega da gre za FO z zakasnjenim sproščanjem (*retard* oblika). Pri daljših časih zadrževanja pelet v kislem mediju (100, 150 in 200 minut) je odstotek sproščene učinkovine v kislem želodčnem mediju večji kot pri krajsih (5, 20, 40 in 60 minut), kar je najverjetneje posledica popuščanja obloge na peletah.

Odstotek sproščene učinkovine ob koncu testa raztpljanja se je močno zmanjšal pri daljših časih zadrževanja učinkovine v simuliranem želodčnem mediju (100, 150 in 200 minut), kar je posledica podaljšanega časa do začetka pospešenega sproščanja učinkovine iz FO in časovno prekratkega testa raztpljanja. Sklepamo lahko, da je čas, ko je diklofenak na voljo za absorpcijo, pomemben parameter, ki lahko vpliva na plazemske koncentracije diklofenaka po aplikaciji. Dlje časa, kot bodo pelete v tankem črevesju, večji bo delež sproščene učinkovine in dlje časa se bo učinkovina lahko absorbirala.

5.6.1 Vpliv topnosti na sproščanje natrijevega diklofenakata

Topnost diklofenaka, ki je šibka kislina, je v kislem mediju nizka ($pK_a = 3.80$ pri $25^\circ C$), pri višjem pH, v intestinalni tekočini pa se njegova topnost na račun ioniziranosti molekule poveča (34).

Iz enačbe za topnost (enačba 14) lahko vidimo, da je topnost šibkih kislin in baz v osnovi odvisna od njihove ionizacijske konstante (K_a) in pH medija, v katerem se raztopljujo (40). Maksimalno topnost dosežemo, ko je molekula popolnoma ionizirana.

$$S = S_0 * \left(1 + K_a / [H^+]\right) \quad \text{Enačba 14}$$

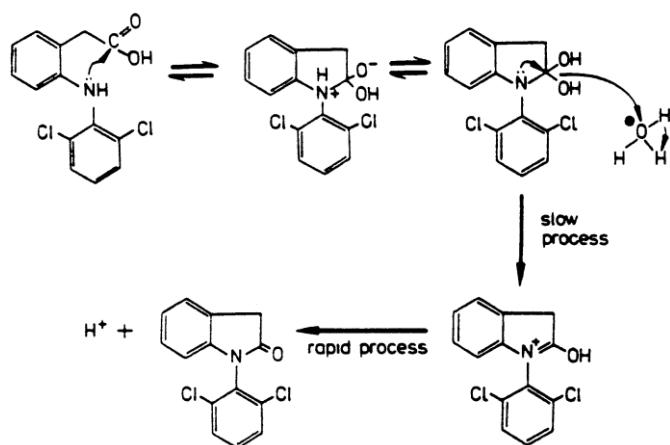
S – topnost

S_0 – intrinzična topnost (neodvisna od pH)

K_a – ionizacijska konstanta

Za diklofenak ($S_0 = 1.03 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, $pK_a = 3.80$) (34) lahko izračunamo topnost v določenem mediju. V literaturi najdemo podatek, da v kislem želodčnem mediju pride do tvorbe slabo topnega tetrahidrata in do intramolekularne ciklizacije, po prehodu v območje z višjim pH pa se pojavi deciklizacija (Slika 9) in prvotna oblika diklofenaka brez tetrahidrata, učinkovina pa preide v ionizirano obliko (42). Nastanek slabo topnega

tetrahidrata je lahko dodaten vzrok, ki je privadel do manjšega odstotka sproščene učinkovine pri daljšem zadrževanju pelet v kislem želodčnem mediju.



Slika 9: Ciklizacija diklofenaka ob prehodu v območje s kislom pH, ki ji v območju z višjim pH sledi deciklizacija (42).

5.6.2 Ostali vplivi na sproščanje

Kot lahko vidimo iz profilov sproščanja, je pri profilih z 200-minutnim časom zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju prišlo do tega, da se je do zamenjave medija sprostilo že 12 % učinkovine. To je najverjetneje posledica tega, da je v oblogo po 150 in 200 minutah že prodrla voda in je posledično prišlo do sproščanja diklofenaka iz FO. Popuščanja oblage je lahko tudi posledica tega, da so se v začetku poskusa pelete zaradi njihove večje gostote od medija vmešale med steklene kroglice, kar je lahko privedlo do mehanskih poškodb oblage pelet. Zaradi daljšega časa v kislem mediju so pelete dlje časa ostale med steklenimi kroglicami in je zato obstajala večja možnost za poškodbo pelet. Med poskusom smo opazili, da so pelete po nekaj več kot 20 minutah prešle med kroglice, simuliran želodčni medij pa je postal moten.

Medij je lahko postal moten tudi zaradi popuščanja oblage, zaradi česar je prišlo do sproščanja diklofenaka iz FO, ki pa je v kislem slabo topen in je prešel v neionizirano obliko ter se začel zaradi prenasičenosti izobarjati. Ob dvigu pH-vrednosti pa je neionizirana oblika prešla nazaj v ionizirano in s počasnim dvigom pH se je počasi povečal tudi odstotek raztopljene učinkovine, motnost medija pa je izginila.

Težava z motnostjo medija za sproščanje se je pojavljala skorajda pri vseh časih zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju, le pri 5- in 20-minutnem ne.

Manjši odstotek sproščene učinkovine pri 150- in 200-minutnem zadrževanju pelet v kislem želodčnem mediju je lahko posledica tvorbe tetrahidrata. Pri 150- in 200-minutnem zadrževanju pelet v kislem želodčnem mediju ga je lahko nastalo veliko več kot pri krajšem časovnem zadrževanju in ob zamenjavi medija ni prišlo do deciklizacije vsega nastalega natrijevega dioklofenakata tetrahidrata, kar je posledično pomenilo manjši odstotek sproščene učinkovine ob koncu testa raztplavljanja. Vendar pa bi bili pri daljšem časovnem poteku testa raztplavljanja odstotki sproščene učinkovine pri vseh časih zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju najverjetneje enaki.

5.7 Oteženi profili sproščanja

Iz posameznih profilov sproščanja smo, pri določenih časih zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju, z uporabo ustreznih odstotkov izračunanih iz profilov praznjenja pelet iz želodca, izračunali oteženi povprečni profil sproščanja, ki velja za populacijo in nam je lahko v pomoč pri razlagi povprečnih plazemskih profilov za populacijo.

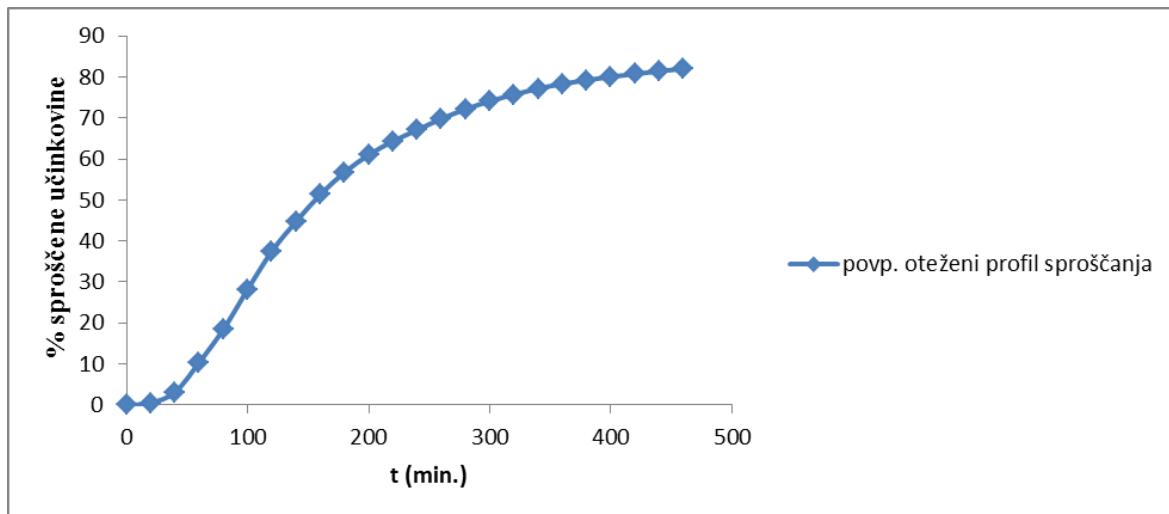
Za vsako posamezno serijo poskusov pri določenem času zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju smo izračunali otežen profil sproščanja, iz tega pa kasneje še povprečni oteženi profil sproščanja. Pri izračunu oteženih profilov smo si pomagali z enačbo Weibullovega modela za praznjenje želodca (enačba 7), na podlagi katere smo vsako krivuljo posameznega časa zadrževanja otežili z deležem GE, ki smo ga dobili na podlagi izračunanega modela.

Tako smo vsako od dobljenih krivulj sproščanja pri določenem čas zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju pomnožili z deležem pelet, ki so se v tistem časovnem obdobju izpraznile iz želodca (enačba 8).

Ker zaradi različnih časov zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju in posledično različno dolgih testov raztplavljanja nismo imeli vseh podatkov, so nam nekatere točke profilov sproščanja manjkale, zato smo manjkajoče podatke izračunali s pomočjo enačbe za 0. in 1. red, odvisno od predvidene oblike krivulje. Z linearno regresijo, ki velja za 0. red oz. po logaritemski transformaciji, smo nato izračunali manjkajoči podatek.

Otežen povprečni profil sproščanja, če gre pri *in vivo* sistemu za enake pogoje, nam je lahko v pomoč pri napovedi *in vivo* profila sproščanja učinkovine, iz katerega lahko nato napovemo absorpcijske profile za učinkovino.

Povprečni oteženi profil sproščanja prikazuje Slika 10.



Slika 10: Povprečni oteženi profil sproščanja.

5.8 Možnosti nadaljnjih poskusov

Iz dobljenih rezultatov je lepo viden vpliv časa zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine. Vendar pa je to le delček, ki smo ga odkrili. Dokazali oz. vsaj delno nakazali smo tudi, da je pri testih raztapljanja na pretočnem sistemu s kroglicami pomemben pretok ob zamenjavi simuliranega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem. Sproščanje učinkovine iz FO se najverjetneje poveča, ko se zviša pH medija, to pa se ob povečanem pretoku ob zamenjavi medija zgodi hitreje. Na podlagi ugotovljenega bi bilo, ob zamenjavi medija, vedno dobro povečati pretok, saj pelete v *in vivo* sistemu po prehodu iz želodca skozi pilorični sfinkter takoj pridejo v območje področje z višjim pH.

Prav tako bi lahko modificirali hitrosti pretokov, ki bi bili ob zamenjavi simuliranega želodčnega medija s simuliranim črevesnim, enaki povprečnim *in vivo* pretokom v ileumu in jejunumu. Pri naših poskusih smo uporabili pretok 2 mL/min, ki je primerljiv z *in vivo* podatki v GIT. Vendar je to zgornja meja pretoka, v jejunumu je povprečna vrednost okoli 0.73 mL/min in kasneje v ileumu okoli 0.43 mL/min (19). Zato bi bilo zanimivo ovrednotiti vpliv teh pretokov na samo sproščanje učinkovine iz pelet.

Morda bi bilo smiselno pogledati še različne sestave medija. Tokrat smo imeli različno sestavo medija v primerjavi s farmakopejskim, lahko pa bi z drugimi ionskimi močmi, dodatki PAS in encimi prišli od drugačnega rezultata.

Opazili smo tudi, da obloga pelet lahko vpliva na rezultate sproščanja. Zanimivo bi bilo primerjati pelete diklofenaka, ki naj bi bile bioekvivalentne našim in bi imele drugačno oblogo od naših uporabljenih pelet ter primerjati njihove rezultate sproščanja z našimi.

Zanimivo bi bilo tudi preveriti, kako volumen medija, ki bi bil enak fiziološkemu, v stanju na tešče vpliva na sproščanje učinkovine. Pri naših poskusih smo pelete raztopljal v 40 mL medija, kar je podobno fiziološkemu volumnu medija v želodcu, medtem ko je 40 mL medija v pogojih v tankem črevesju manjše od celotnega fiziološkega, ki pri pogojih na tešče znaša od 45 do 319 mL (46). Gre za skupni volumen tekočine po celotni dolžini črevesja, iz česar pridemo do zaključka, da je 40 mL veliko večji volumen od fiziološkega volumna medija v žepkih, ki se nahajajo v tankem črevesju (12 mL) in katerih tekočina je v dejanskem stiku s FO. Kljub temu je volumen 40 mL še vedno bolj fiziološki od volumna, ki se navadno uporablja na USP-aparaturah (900 mL).

Ker pri našem sistemu sumimo na mehansko poškodbo pelet, ki se razporedijo med steklene kroglice, bi to lahko potrdili s pregledom pelet pod mikroskopom. Vzeli bi pelete pred testom raztopljanja, nato bi po določenem času zadrževanja pelet v mediju vzeli pelete iz medija in njihovo strukturo pregledali pod mikroskopom. Ugotovili bi lahko, ali pri pretočnem sistemu s kroglicami res pride do mehanske poškodbe pelet ali ne in je naše predvidevanje napačno.

6 SKLEPI

V diplomski nalogi smo s pomočjo poskusov sproščanja ugotavljali vpliv časa zadrževanja pelet v simuliranem želodčnem mediju na sproščanje natrijevega diklofenakata iz pelet in prišli do naslednjih ugotovitev:

1. S podaljševanjem časa zadrževanja pelet v kislem mediju se je podaljšal tudi čas do začetka sproščanja učinkovine iz FO. Sproščanje učinkovine iz FO se je začelo po zamenjavi simuliranega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem.
2. Po začetku sproščanja učinkovine so bile hitrosti sproščanja pri krajsih časih zadrževanja pelet v kislem želodčnem mediju (5, 20, 40 in 60 minut) podobne.
3. Viden je vpliv pH-vrednosti medija na sproščanje učinkovine iz pelet, saj pri nižjih vrednostih pH zaradi slabe topnosti diklofenaka v kislem skorajda ne prihaja do sproščanja diklofenaka iz FO. Ob dvigu pH-vrednosti pa se odstotek sproščene učinkovine poveča.
4. Pelete so pri prehodu iz nižje pH-vrednosti na višjo splavale na površino medija. Po izmerjenih gostotah pelet in na osnovi opažanj smo zaključili, da je gostota pelet višja od medija s pH 1.8 in nižja od medija s pH 6.8. Zaradi problemov pri določanju gostote, bi bilo za potrditev dobljenih rezultatov, smiselno uporabiti še kakšno drugo metodo.
5. pH-vrednost medija lahko hitreje dvignemo s povečanim pretokom ob zamenjavi kislega želodčnega medija s simuliranim črevesnim medijem. Tako bolje ponazorimo *in vivo* pogoje prehoda pelet iz želodca v tanko črevo.

6. Na dvig pH-vrednosti medija lahko vplivamo tudi z dodatkom 0.580 mL 1 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ v 40 mL simuliranega želodčnega medija. V tem primeru v hipu dvignemo pH-vrednost medija z 1.8 na 6.8.
7. Ob predpostavki dobre permeabilnosti diklofenaka v tankem črevesju ter odsotnosti predsystemskega metabolizma lahko predvidevamo, da je naš oteženi povprečni profil sproščanja, pri katerem upoštevamo hitrost praznjenja pelet iz želodca, uporaben za primerjavo s povprečnim absorpcijskim profilom oz. z absorpcijskim profilom populacije za isto FO.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Galia E, Nicolaides E, Hortscher D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of Various Dissolution Media for predicting In Vivo Performance of Class I and II Drugs. *Pharmaceutical Research* 1998; 15(5): 698–705
2. EMA. Guidance on the investigation of bioequivalence.
http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. (Datum dostopa: 2.10.2011)
3. US Department of health and human service, FDA, CDER. Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/AbbreviatedNewDrugApplicationANDAGenerics/UCM154838.pdf>. (Datum dostopa: 2.10.2011)
4. Post-Notice of Compliance Changes. Guidance Document. Quality Document.
http://www.capra.ca/notice/2009/noc_pn_quality_ac_sa_qualite-eng.pdf. (Datum dostopa: 2.10.2011)
5. Guidance for Bioequivalence Studies of Generic Products.
[http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide\(e\)/Generic/be97E.pdf](http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide(e)/Generic/be97E.pdf). (Datum dostopa: 2.10.2011)
6. Guideline for Bioequivalence Studies for Different Strengths of Oral Solid Dosage Forms. [http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide\(e\)/strength/strength.html](http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide(e)/strength/strength.html). (Datum dostopa: 2.10.2011)
7. Guideline for Bioequivalence Studies for Different Strengths of Oral Solid Dosage Forms <http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide%28e%29/strength2006e.pdf>. (Datum dostopa: 2.10.2011)
8. US Department of health and human service, FDA. Guidance for industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070636.pdf>. (Datum dostopa: 2.10.2011)
9. US Department of health and human service, FDA, CDER. Guidance for industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage forms.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070640.pdf>. (Datum dostopa: 2.10.2011)

10. Klein S. The use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *The AAPS Jurnal* 2010; 12(3): 397–406
11. Owen I. C, Devlin. Y, Butler J. Influence of dissolution medium buffer composition on ketoprofen release from ER products and in vitro-in vivo correlation. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 254: 147–154
12. Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, Lennernas H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research* 1997; 14: 497–502
13. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharmaceutical Research* 2006; 23(1): 165–176
14. Johnson, Holinej, Williams. Influence of ionic strength on matrix integrity and drug release from hydroxypropyl cellulose compacts. *International Journal of Pharmaceutics* 1993; 90: 151–159.
15. The United States Pharmacopeia (USP 33). The National Formulary 28. USP convention. INC. 2010: 711, 724, 862, 1088 in 1092
16. European Pharmacopoeia. 5th Ed. Strassbourg. Council of Europe. 2007; General notices. 7: 2.9.3
17. The Japanese Pharmacopeia. 15th Ed., The MHLW Ministerial Notification No.285, March 2006:9.41
18. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C and Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms; *Pharmaceutical Research* 1998; 15: 11–22
19. Zoeller T, Klein S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technologies* 2007: 8–13
20. Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6(3): 231–248

21. Dressman JB, Berardi RR, Dermentzoglou LC, Russel TL, Schmaltz SP, Barnett JL, Jarvenpaa KM. Upper gastrointestinal (GI) pH in young healthy men and women. *Pharmaceutical Research* 1990; 7 (7): 756–761
22. Vertzoni M, Fotaki N, Kostwicz E, Stipper E, Leuner C, Nicolaides E, Dressman J, Reppas C. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects. *Jurnal of Pharmacy and Pharmacology* 2004; 56: 453–462
23. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *European Jurnal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* 2005; 60: 413–417
24. Dressman JB, Vertzoni M, Goumas K, Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59 (7): 591–602
25. Jantratid E, Janssen N, Reppas C and Dressman J. Dissolution Media Stimulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Pharmaceutical Research* 2008; 25(7): 1663–1676
26. Jantratid E, De Maio V, Ronda E, Mattavelli V, Vertzoni M, Dressman JB. Appliaction of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pelet dosage form. *European Jurnal of Pharmaceutical Science* 2009; 37: 434–441
27. Sunesen VH, Pedersen BL, Kristensen HG, Müllertz A. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug danazol. usinf the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. *European Jurnal of Pharmaceutical Science* 2005; 24: 305–313
28. Jogia H, Mehta T, Patel M. Evaluation of Dissolution Media Containng a Novel Sythetic Surfactant by In Vitro Testing of BCS Class II Drugs. *Dissolution Tehnologies* 2009: 14–19
29. Ramtoola Z, Corrigan. Influence of the buffering capacity od the medium on the dissoultion of drug-excipient mixtures. *Drug Developement and Industrial Pharmacy* 1989; 15: 2359–2374

30. McNamara DP, Whitney KM, Goss SL. Use of a Physiologic Bicarbonate Buffer System for Dissolution Characterization of Ionizable Drugs. *Pharmaceutical Research* 2003; 20(10): 1641–1646
31. Flemström G. Gastric and duodenal mucosal secretion of bicarbonate. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3rd ed. vol.2. Raven Press. New York 1994: 1285–1309
32. Boni JE, Brickl RS, Dressman J. Is bicarbonate buffer suitable as dissolution medium? *Jurnal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; 59: 1375–1382
33. Fadda HM, Basit AW. Dissolution of pH responsive formulations in media resembling intestinal fluids: bicarbonate versus phosphate buffers. *J. Drug Del. Sci. Tech* 2005; 15 (4): 273–279
34. Chusawan B, Binjesoh V, Polli JE, Zhang H, Amidon G, Junginger HE, Midha K, Shah VP, Stavchasky S, Dressman JB, Barends D. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98: 1206–1219
35. Khazaenia T, Jamali F. Comparison of gastrointestinal permeability induced by diclofenac-phospholipid complex with diclofenac acid and its sodium salt. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 6 (3): 352–359
36. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito S. W. *Foye's principles of Medicinal Chemistry*. 6th ed. Wolters Kluwer. Philadelphia. 2008: 954–962: 969–970
37. Zaletel A. Predvidevanje vpliva kislosti želodčnega medija in hitrosti prehoda pelet na sproščanje natrijevega diklofenakata [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
38. Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M. Gastric emptying of pellets under fasting conditions: A mathematical model. *Pharmaceutical Research* 2009; 26 (7): 1607–1617
39. Garbacz G , Golke B, Wedemeyer RS, Axell M, Söderlind E, Abrahamsson B, Weitsches 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; 5: 1–8.

40. Ložar K. Vpliv simuliranih fizioloških pogojev želodca na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s prirejenim sproščanjem [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
41. EMA. Guidance on the investigation of bioequivalence.
http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (Datum dostopa: 2.10.2011)
42. Palomo ME et al. Analysis of diclofenac sodium and derivates. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 21: 83-94
43. PIL pelet spodeljšanim sproščanjem Dicloberl® retard 100 mg, Berlin Chemie.
44. http://www2.volstate.edu/CHEM/Density_of_Water.htm (Datum dostopa: 5.4.2011)
45. Schiller C, Fröhlich P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, Weitschies W. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2005; 22(10): 971-979