UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA ŽVAR

PROUČEVANJE VPLIVA ČASA ZADRŽEVANJA GASTROREZISTENTNIH PELET V BIORELEVANTNEM ŽELODČNEM MEDIJU NA SPROŠČANJE UČINKOVINE

DIPLOMSKA NALOGA UNIVERZITETNEGA ŠTUDIJA FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA ŽVAR

PROUČEVANJE VPLIVA ČASA ZADRŽEVANJA GASTROREZISTENTNIH PELET V BIORELEVANTNEM ŽELODČNEM MEDIJU NA SPROŠČANJE UČINKOVINE

STUDY OF THE IMPACT OF ENTERIC COATED PELLETS RESIDENCE TIME IN BIORELEVANT GASTRIC MEDIA ON THE DRUG RELEASE

Ljubljana, 2012

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Mariji Bogataj, mag.farm., za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi dipl. ing. kem. tehn. Greti Cof in asist. Nataši Nagelj Kovačič, mag. farm., za številne praktične nasvete in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Krki, d. d., in Marku Štefaniču, mag. farm., za zagotavljanje potrebnih surovin pri diplomskem delu.

Hvala tudi predsedniku komisije prof. dr. Francu Vrečerju, mag. farm., in članu komisije asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm., za pregled diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi staršem, fantu in vsem mojim bližnjim za podporo v času mojega študija.

Izjava:

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

Kazalo

1 Povzetek 1
2 Seznam okrajšav 2
3 Uvod 3
3.1 Gibanje v zgornjem gastrointestinalnem traktu 3
3.2 Migracijski motorični kompleks (MMC) 4
3.2.1 Funkcionalni pomen MMC cikla 4
3.2.2 Faze MMC cikla v antrumu in tankem črevesu 4
3.2.3 Lastnosti III. faze MMC cikla 5
3.2.4 Kruljenje želodca 5
3.2.5 pH vrednost v času MMC cikla 6
3.2.6 Cirkadiani ritem MMC cikla 6
3.2.7 Mehanizmi kontrole MMC 7
3.2.8 Merjenje MMC cikla 9
3.2.9 Aplikacija farmacevtskih oblik v času MMC cikla 10
4 Namen dela 11
5 Materiali in metode 12
5.1 Farmacevtska oblika 12
5.2 Snovi, ki smo jih uporabljali pri delu 12
5.3 Priprava raztopin 12
5.3.1 Enostavni želodčni medij - 0,01 M HCl 12
5.3.2 Enostavni črevesni medij – fosfatni pufer s pH=6,8 12
5.3.3 Biorelevantni mediji na tešče 13
5.3.4 0,1 M NaOH 14
5.3.5 Bazična raztopina 0,2 M in 0,047 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ 15
5.3.6 Bazična raztopina 0,047 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ z dodatkom SIF praška 15
5.3.7 50 mM KH_2PO_4 15
5.4 Uporabljene aparature 15
5.5 Metode 16
5.5.1 Analiza vzorcev 16
5.5.2 Priprava umeritvenih premic 17
5.5.3 Testi sproščanja na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki 18
5.5.4 Izračun sproščene učinkovine 23

5.5.5 Hipotetično podaljševanje profilov sproščanja 23
5.5.6 Izračun povprečnega oteženega profila sproščanja 24
6 Rezultati 26
6.1 Rezultati umeritvenih premic 26
6.2 Testi sproščanja na pretočnem sistemu 26
6.2.1 Preliminarni poskusi 26
6.2.2 Primerjava biorelevantnega medija s SIF praškom in brez 32
6.2.3 Proučevanje vpliva časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine 32
6.2.4 Povprečni oteženi profili sproščanja 42
7 Razprava 43
7.1 Posnemanje fizioloških pogojev 44
7.1.1 Mehanski vpliv 44
7.1.2 Volumen 44
7.1.3 Pretok 44
7.1.4 Temperatura 45
7.1.5 pH 45
7.1.6 Površinska napetost 45
7.1.7 Encimi 46
7.1.8 Prehod farmacevtske oblike 46
7.2 Preliminarni testi 46
7.3 Primerjava vpliva biorelevantnega medija s SIF praškom in brez na sproščanje 51
7.4 Vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet Oblike A in Oblike B v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine 52
7.5 Povprečni oteženi profil sproščanja 55
8 Zaključek 57
9 Viri in literatura 59

1 Povzetek

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje zdravilne učinkovine iz orodisperzibilnih tablet, Oblike A in B, ki ob stiku z medijem takoj razpadeta na pelete in pomožne snovi. Na podlagi dobljenih profilov sproščanja smo obliki primerjali med sabo in napovedali *in vivo* profile sproščanja za posamezno obliko.

Z namenom, da kar najbolje ponazorimo fiziološke pogoje, smo poskuse sproščanja izvajali na nefarmakopejski aparaturi, in sicer na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki pod naslednjimi pogoji: temperatura medija 36,5 °C, volumen medija 40 ml, hitrost mešanja magnetnega mešala 80 obratov/min in hitrost pretoka črpalke 2 ml/min. Z uporabo biorelevantnih medijev smo ponazorili fiziološko podobne vrednosti pH in površinske napetosti v želodcu in tankem črevesu. Hitri dvig pH, kateremu je izpostavljena farmacevtska oblika pri prehodu iz želodca v tanko črevo, smo ponazorili z dodatkom bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ med menjavo biorelevantnih medijev.

Za pelete je značilno, da se v stanju na tešče praznijo iz želodca postopoma v obliki bolusov. Čas, v katerem zapustijo želodec, je tako zelo variabilen, saj lahko traja od nekaj minut do treh ur. Pri načrtovanju *in vitro* testov sproščanja smo upoštevali kinetiko praznjenja pelet in jih zadrževali v biorelevantnem želodčnem mediju 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 minut. Na podlagi dobljenih profilov sproščanja smo ugotovili, da daljši kot je čas izpostavljenosti pelet kislemu mediju, večji je razpad zdravilne učinkovine pri obeh oblikah. Izkazalo se je, da je pri Obliki A v primerjavi z Obliko B več zdravilne učinkovine razpadlo v kislem mediju, kar je povzročilo manjšo končno količino sproščene zdravilne učinkovine iz Oblike A v primerjavi z Obliko B.

Z upoštevanjem vseh eksperimentalno dobljenih profilov sproščanja, pri različnih časih zadrževanja farmacevtske oblike v kislem, smo izračunali povprečni oteženi profil sproščanja za obe obliki. Med izračunanima profiloma Oblike A in B se je pokazala le majhna razlika, saj so bili eksperimentalno dobljeni profili sproščanja precej podobni. Z izračunom povprečnega oteženega profila sproščanja smo napovedali *in vivo* profil sproščanja zdravilne učinkovine iz Oblike A in B po peroralni aplikaciji.

Ključne besede: *praznjenje iz želodca, gastrorezistentne pelete, in vitro sproščanje, napoved in vivo sproščanja*

Keywords: *gastric emptying, enteric coated pellets, in vitro dissolution, predicted in vivo dissolution*

2 Seznam okrajšav

MMC – Migrating Motor Complex ali Migrating Myoelectric Complex *(migracijski motorični kompleks ali migracijski mioelektrični kompleks)*

FaSSGF – Fasted State Simulated Gastric Fluid (*biorelevantni medij, ki ponazarja želodčno vsebino na tešče)*

FaSSIF – Fasted State Simulated Intestinal Fluid *(biorelevantni medij, ki ponazarja črevesno vsebino na tešče)*

SIF prašek – Instant powder for preparing FaSSIF/FeSSIF *(instantni prašek natrijevega tauroholata (74,6 ± 5 % w/w) in fosfolipida (lecitin; 26,4 ± 3 % w/w) za pripravo biorelevantnih medijev)*

GIT – GastroIntestinal Tract *(gastrointestinalni trakt)*

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

FO – *farmacevtska oblika*

ZU – *zdravilna učinkovina*

3 Uvod

Za načrtovanje *in vitro* študij, ki ponazarjajo obnašanje farmacevtskih oblik po aplikaciji, je izredno pomembno poznavanje fizioloških pogojev v telesu. Velik del farmacevtskih oblik uporabljamo peroralno, kjer farmacevtska oblika (FO) potuje preko različnih predelov gastrointestinalnega trakta (GIT): ustna votlina, požiralnik, želodec, tanko in debelo črevo. Pri prehodu različnih predelov prebavnega sistema je farmacevtska oblika izpostavljena različnim fiziološkim pogojem, ki se med seboj razlikujejo v pH, puferski kapaciteti, prisotnosti površinsko aktivnih snovi, encimih, volumnu tekočin, pretoku in mehanskim obremenitvam. Na prehod farmacevtskih oblik skozi prebavni trakt močno vpliva tudi gibanje GIT (1).

3.1 Gibanje v zgornjem gastrointestinalnem traktu

V želodcu lahko opazimo dve vrsti gibanj. V stanju na tešče se v tem predelu GIT pojavi posebna vrsta gibanja, ki ga imenujemo migracijski motorični kompleks (MMC), katerega najpomembnejša vloga je čiščenje želodca. Ob zaužitju hrane se MMC prekine in nadomesti ga druga vrsta kontrakcij, ki zaužito hrano zmeša in zmelje na dovolj majhne delce, ki lahko zapustijo želodec skozi pilorus v dvanajstnik (2).

Tako kot v želodcu tudi v tankem črevesu opazimo različna gibanja. Po obroku se pojavijo ritmične segmentne kontrakcije, ki mešajo himus s sekreti jejunuma in ileuma v vse smeri in ga tako izpostavljajo sluznici za lažjo absorpcijo hranil. Druga vrsta gibanja, ki je značilna za postprandialno fazo, so peristaltične kontrakcije, ki trajajo 3–5 ur, sproži pa jih prihod himusa v tanko črevo. Gibanje črevesne vsebine v tem primeru poteka navzdol v distalni smeri, kar je posledica peristaltičnega refleksa, ki relaksira spodnji del črevesa ter skrči zgornji del in tako ne dovoljuje vračanja himusa navzgor. V stanju na tešče se v tankem črevesu pojavi tretja vrsta kontrakcij, ki jo imenujemo MMC (3, 4).

Gibanje kolona predstavljajo segmentne in peristaltične kontrakcije ter veliki peristaltični valovi. Segmentne kontrakcije v kolonu omogočijo mešanje vsebine črevesa in kontakt vsebine z mukozo. Transport črevesne vsebine omogoča propulzivna peristaltika, ki jo sestavljajo počasna nepravilna krčenja. Veliki peristaltični valovi, ki nastanejo 2- do 3-krat dnevno, pa potisnejo črevesno vsebino proti danki (5).

Eno od zelo pomembnih gibanj zgornjega dela GIT, ki je značilno tako za želodec kot tanko črevo, je MMC. Podrobnejše lastnosti migracijskega motoričnega kompleksa so razložene v nadaljevanju diplomske naloge.

3.2 Migracijski motorični kompleks (MMC)

Migracijski motorični kompleks ali migracijski mioelektrični kompleks ali krajše MMC cikel je ciklično in ponavljajoče gibanje želodca in tankega črevesa v stanju na tešče (6, 7, 8). MMC cikel se lahko prične v želodcu ali v proksimalnem delu tankega črevesa (8). Gibanje se nato nadaljuje naprej proti ileumu. Ko doseže III. faza MMC cikla terminalni ileum, se takoj prične nova III. faza v želodcu (9, 10). Ciklično gibanje migracijskega motoričnega kompleksa je sestavljeno iz treh oziroma štirih faz (7). Za migracijski motorični kompleks je značilen cirkadiani ritem, saj se pogostost pojavljanja III. faze MMC cikla razlikuje tekom dneva (6, 7). Po zaužitju hrane se migracijski motorični kompleks prekine (6).

3.2.1 Funkcionalni pomen MMC cikla

Migracijski motorični kompleks ima pomembno vlogo v telesu. Z različnimi fazami kontrakcij, ki potekajo distalno po prebavnem traktu, MMC odstrani večje neprebavljene delce, sekrecijske izločke in odmrle epitelijske celice iz želodca ter tankega črevesa. Druga pomembna vloga MMC cikla v tankem črevesu je preprečevanje razrasta bakterij v tem delu prebavne cevi. Poleg tega je vloga MMC cikla v stanju na tešče tudi preprečevanje prevelikega koncentriranja žolča v žolčniku in preprečevanje tvorbe žolčnih kamnov (9).

3.2.2 Faze MMC cikla v antrumu in tankem črevesu

MMC cikel je sestavljen iz treh oziroma štirih faz, kar je prikazano na sliki 1. Migracijski motorični cikel se prične s fazo I, za katero je značilno mirovanje muskulature. Sledi faza II, kjer se pojavijo močne in neenakomerne kontrakcije. Popolno praznjenje prebavnega trakta, ki je najpomembnejša naloga MMC, je doseženo v III. fazi. Za to fazo, ki traja le nekaj minut, so značilne intenzivne kontrakcije z maksimalno amplitudo krčenja (4, 6, 11). Fazi III sledi faza I ali faza IV. Faza IV predstavlja prehod med intenzivno III. fazo in I. fazo mirovanja (10). Za fazo IV je značilno hitro zmanjševanje intenzitete kontrakcij muskulature (6). Povprečno celotni MMC cikel traja 90–120 minut, vendar pa je moč zaznati veliko intraindividualno in interindividualno variabilnost. Hitrost distalnega širjenja MMC cikla je od 1 do 4 cm/min (8).

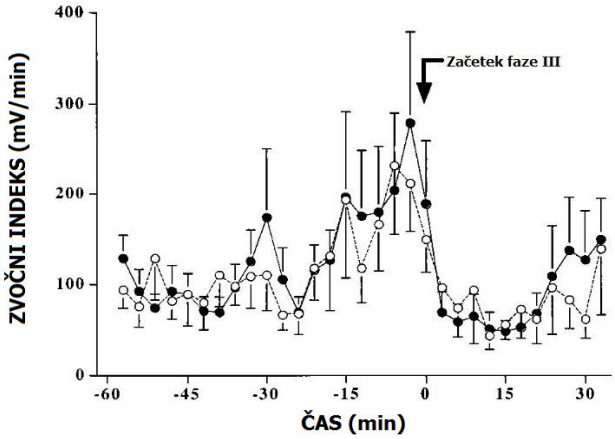
Slika 1: Shematski prikaz faz MMC cikla. Prirejeno po (11).

3.2.3 Lastnosti III. faze MMC cikla

Gibanje v GIT na tešče se prične 2 do 3 ure po obroku oziroma po končani prebavi in absorpciji hranilnih snovi (9). Spontane kontrakcije III. faze se pričnejo večinoma v želodcu (71 %) ali v začetnem delu tankega črevesa (29 %), od koder potujejo naprej proti ileumu. Za III. fazo MMC, ki se prične v antrumu, je značilen sklop kontrakcij s frekvenco 2–3 kontrakcij/min, ki skupaj trajajo najmanj 2 minuti. Povprečna amplituda kontrakcij faze III v antrumu je 75 mmHg. Faza III v želodcu se prične spontano pred ali skupaj s III. fazo proksimalnega dela duodenuma. Za fazo III, ki se prične v duodenumu, so značilne kontrakcije s frekvenco 11–12 kontrakcij/min in skupaj trajajo minimalno 3 minute. Za fazo III v duodenumu je značilna povprečna amplituda kontrakcij z vrednostjo 33 mmHg. Hitrost potovanja kontrakcij III. faze v tankem črevesu se postopoma zmanjšuje od proksimalnega duodenuma (11,4 ± 4,7 cm/min) in naprej proti distalnemu delu jejunuma (7,4 ± 5,8 cm/min). Obratno pa velja za trajanje III. faze, ki je daljše v jejunumu (9,2 ± 9,0 min) kot v duodenumu (5,4 ± 3,0 min) (6).

3.2.4 Kruljenje želodca

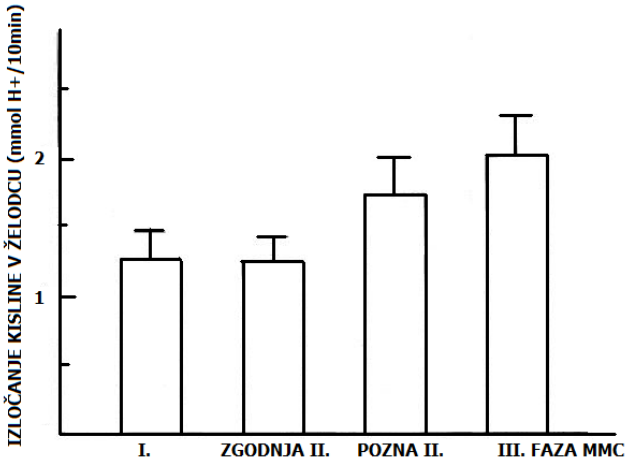
V času na tešče je moč zaznati kruljenje želodca. V študiji so ugotovili, da je zvočni indeks (vsota zvočnih amplitud GIT) največji v pozni II. fazi MMC cikla oz. takoj na začetku III. faze in nato pada tekom faze III MMC cikla, kar je razvidno tudi na sliki 2 (6, 12, 13). Razlaga temelji na tem, da se največ plina izprazni iz zgornjega GIT tekom III. faze. Vzrok za to naj bi bile učinkovite kontrakcije te faze, s pomočjo katerih se izprazni iz GIT večina vsebine vključno s plini. Padec količine plina v želodcu naj bi imel za posledico zmanjšanje zvočnega indeksa tekom III. faze MMC cikla (13).



Slika 2: Zvočni indeks pred, med in po želodčni III. fazi MMC cikla. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti zvočnega indeksa izmerjenih na vsake 3 min (n = 9). Čas 0 označuje začetek III. želodčne faze MMC cikla. Krivulja s praznimi krogci označuje zvok zgornjega predela abdomna, polni krogci pa iz spodnjega (13).

3.2.5 pH vrednost v času MMC cikla

Tekom MMC cikla se spreminja izločanje kisline in posledično pH v želodcu, kar je razvidno iz slike 3. Izločanje kisline je najmanjše na začetku I. faze MMC cikla. Proti koncu II. faze količina izločene kisline naraste. Najnižja vrednost pH v antrumu, ki odraža največjo količino kisline, je bila izmerjena v III. fazi MMC cikla (6, 14). Zvišanje želodčne pH vrednosti v začetku I. faze MMC cikla pa je posledica refluksa iz duodenuma (6).



Slika 3: Izločanje kisline v želodcu tekom MMC cikla (n=10 ljudi, meritev 23 MMC ciklov) (14).

Tekom I. in II. faze MMC cikla je pH v duodenumu nevtralen ali baziče n. Nihanje pH vrednosti med 2 in 7 se lahko pojavi le med II. fazo MMC cikla. Močno znižanje pH v duodenumu inhibira motiliteto želodca in hkrati spodbudi neenakomerne kontrakcije v proksimalnem delu duodenuma (14). Tekom III. faze MMC kontrakcij v tankem črevesu se poveča izločanje vode, bikarbonatnih ionov in pankreatičnih encimov (6).

3.2.6 Cirkadiani ritem MMC cikla

Za pogostost oz. frekvenco pojavljanja III. faze MMC cikla je značilno cirkadiano gibanje. V času spanja je pogostost pojavljanja III. faze MMC cikla 0,25 h^{-1}, kar pomeni, da se v 8 urah spanja III. faza pojavi dvakrat. Nekoliko večja je frekvenca pojavljanja III. faze MMC cikla tekom dneva (0,64 h^{-1}). Poleg razlike v pogostosti pojavljanja III. faze MMC cikla, se skozi dan pojavi razlika tudi v dolžini trajanja posameznih faz cikla. V času spanja je podaljšana I. faza ter skrajšana ali celo odsotna II. faza MMC cikla (6, 7).

3.2.7 Mehanizmi kontrole MMC

3.2.7.1 Vpliv hormonov

3.2.7.1.1 Motilin

Motilin je polipeptidni hormon, ki nastaja v endokrinih celicah duodenuma (M celice (7)) in celicah jejunuma ter mienteričnem pleksusu. Plazemska koncentracija motilina tekom spontanih MMC ciklov niha (6). Najvišjo koncentracijo motilina, ki inducira MMC cikel v želodcu, so zaznali tik pred III. fazo (12). Z eksperimentalnimi poskusi so ugotovili, da aplikacija motilina pri ljudeh povzroči predčasne kontrakcije III. faze MMC cikla v želodcu. Intravenska aplikacija pankreatičnega polipeptida zniža plazemsko koncentracijo motilina in preusmeri izvor faze III iz želodca v duodenum. Pomembna je ugotovitev, da sočasna aplikacija pankreatičnega polipeptida in motilina preusmeri izvor III. faze MMC cikla nazaj v želodec, kar kaže na to, da povišanje koncentracije motilina tik pred III. fazo odloča o antralnem izvoru kontrakcij. Plazemsko koncentracijo motilina zmanjšuje tudi somatostatin, kar ima ravno tako za posledico prekinitev III. želodčne faze MMC cikla. Fazo III v želodcu lahko v tem primeru ponovno aktiviramo z aplikacijo motilina. Poleg pankreatičnega polipeptida in somatostatina vpliva na aktivnost motilina tudi kislost duodenuma. V primeru znižanja pH v duodenumu je mogoče kljub plazemski prisotnosti motilina opaziti odsotnost želodčne faze III (6) (Slika 4).

3.2.7.1.2 Grelin

Grelin je peptidni hormon, katerega sekrecijo povzroča simpatični sistem preko izločanja noradrenalina, ki pa deluje direktno na β_1 receptorje grelin-sekretornih celic v želodcu (6). Sekrecija grelina, ki je največja ravno v času na tešče in času hipoglikemije, povzroči III. fazo MMC cikla z izvorom v želodcu. V primeru, ko apliciramo grelin, ravno tako povzročimo predčasne kontrakcije III. faze. Te kontrakcije izvirajo iz želodca in jih ne spremlja povišana koncentracija motilina v plazmi. Na podlagi tega je bilo ugotovljeno, da ima grelin direktni učinek na MMC cikel (6, 15) (Slika 4).

3.2.7.1.3 Somatostatin

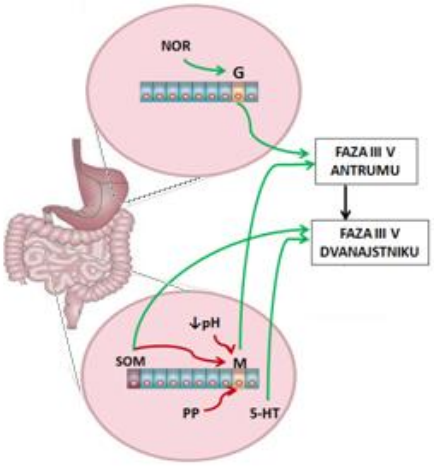
Somatostatin se izloča iz endokrinih celic v GIT. Tekom eksperimentalnih poskusov je bilo ugotovljeno, da začetek kontrakcij III. faze, ki izvirajo iz duodenuma, spremlja povišana koncentracija somatostatina v plazmi. Aplikacija somatostatina povzroči kontrakcije III. faze MMC cikla v tankem črevesu in inhibira izločanje motilina v telesu, kar ima za posledico prekinitev želodčne motorične aktivnosti (6) (Slika 4).

3.2.7.1.4 Pankreatični polipeptid

Pankreatični polipeptid je polipeptid, ki nastaja v specifičnih celicah (F celice) v endokrinem pankreasu. Plazemska koncentracija pankreatičnega polipeptida narašča po jedi. Povišanje koncentracije tega peptida vpliva na znižanje plazemske koncentracije motilina in na prekinitev MMC cikla po jedi (6) (Slika 4).

3.2.7.1.5 Serotonin (5-HT ali 5-hidroksitriptamin)

Serotonin je nevrotransmiter, ki je prisoten v GIT, trombocitih in centralnem živčnem sistemu. V prebavnem traktu nastaja v enterokromafinih celicah (v epiteliju). Intravenska aplikacija serotonina, ki deluje preko 5-HT_3 receptorjev v GIT, povzroči pri ljudeh povečanje frekvence in migracijske hitrosti III. faze MMC cikla v duodenumu (6) (Slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz mehanizmov kontrole MMC cikla pri človeku. Z zeleno črto so označeni vplivi, ki povzročijo MMC cikel. Z rdečo črto pa so označeni vplivi, ki inhibirajo MMC cikel. Oznake: 5-HT-serotonin, M-motilin, NOR-noradrenalin, G-grelin, PP-pankreatični polipeptid in SOM-somatostatin. Prirejeno po (6).

3.2.7.2 Vpliv živčnega sistema

3.2.7.2.1 Vagus

Mišična vlakna proksimalnega dela želodca so oživčena večinoma preko vagusa, ki povzroča tonične kontrakcije v času na tešče (8).

3.2.7.2.2 Enterični živčni sistem

V gladkih mišičnih celicah GIT so prisotne periodične depolarizacije, ki jih imenujemo tudi počasni valovi. Počasni valovi GIT so generirani iz intestinalnih celic Cajal (ICC), ki povzročajo spontane počasne valove s frekvenco 3 min^{-1} v želodcu, 12 min^{-1} v duodenumu in 10 min^{-1} v ileumu. Kontrakcija GIT je povzročena šele takrat, ko so prisotni počasni valovi in sproščeni ekscitatorni nevrotransmiterji iz motoričnih nevronov enteričnega

nevronskega sistema. Tekom I. faze MMC cikla so prisotni samo počasni valovi. Tekom faze II in III so poleg počasnih valov prisotni tudi ekscitatorni nevrotransmiterji, ki skupaj generirajo kontrakcije (6).

3.2.7.3 Vpliv kalorične vsebine na MMC

Migracijski motorični cikel v GIT v stanju na tešče poteka vse dokler ga ne prekine vnos dovolj kalorične vsebine. Za prekinitev MMC cikla je potreben kontakt hrane z zgornjim prebavnim traktom, saj v primeru intravenske aplikacije hranil ne pride do prekinitve migracijskega motoričnega kompleksa. Po zaužitju obroka je potreben zelo kratek čas, da pride do prekinitve MMC cikla, kar nakazuje na nevronski in hormonski mehanizem kontrole. Pomembna hormona, ki se sproščata po obroku, gastrin in holecistokinin, vplivata na prekinitev MMC (9). Migracijski motorični cikel nadomestijo kontrakcije z različno amplitudo in frekvenco, katerih namen je mešanje, drobljenje ter pomikanje vsebine proti kolonu v kratkih odsekih. Intenziteta teh kontrakcij je nižja od kontrakcij III. faze MMC cikla (2, 12, 16). Obdobje teh kontrakcij pa je odvisno od kalorične vsebnosti zaužite hrane (približno1 ura kontrakcij na 200 zaužitih kalorij) (16).

3.2.8 Merjenje MMC cikla

Gibljivost gastrointestinalnega trakta pri ljudeh lahko proučujemo na različne načine. S pomočjo aparatur, kjer zaznavamo gibanje gastrointestinalnega trakta na enem mestu, so prišli do spoznanja, da je migracijski motorični kompleks sestavljen iz več faz. Z uporabo aparature, ki ima več senzorjev lociranih v želodcu in tankem črevesu, so ugotovili, da II. faza in III. faza MMC cikla izvirata iz želodca ali duodenuma in se širita navzdol proti tankem črevesu (9).

V literaturi lahko zasledimo, da so sprva uporabljali intraluminalne balone, s katerimi so merili spremembe v tlaku. Zanesljivo merjenje MMC cikla se izvaja s pomočjo kateterske manometrije. Pozicijo katetra je potrebno preveriti s pomočjo fluoroskopije, s katero zagotovimo pravilno namestitev katetra skozi pilorus. Nekoliko bolj izpopolnjena metoda je visoko-resolucijska manometrija. V tem primeru so tlačni senzorji nameščeni zelo na gosto (na vsak cm). Razvili so tudi brezžično kapsulo, s katero lahko merijo tlak, pH, temperaturo, prehod in gibljivost gastrointestinalnega trakta. Slabost kapsule je v tem, da vsebuje le en tlačni senzor na določeni lokaciji, obenem pa tudi ne omogoča natančne ocene prisotnosti in migracije MMC cikla (6).

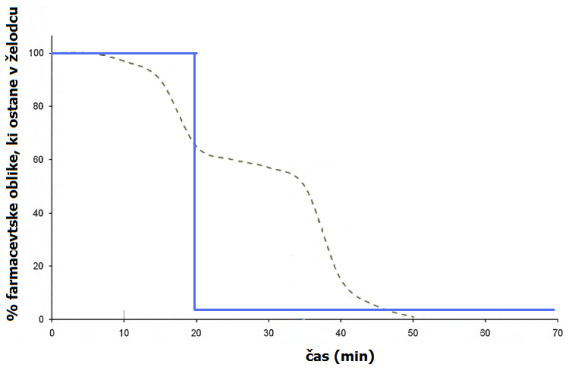
3.2.9 Aplikacija farmacevtskih oblik v času MMC cikla

3.2.9.1 Pelete

Pelete so majhni, skoraj okrogli delci z ozko porazdelitvijo velikosti (od 0,1 do 2 mm) (20). Običajno jih polnimo v kapsule ali stiskamo v tablete. V tem primeru govorimo o več enotnih farmacevtskih oblikah. Kadar farmacevtske oblike, ki sprostijo pelete v želodcu ali v ustih, apliciramo na tešče, se pelete običajno praznijo iz želodca postopoma v obliki bolusov, kar traja od nekaj minut do 3 ur (Slika 5). Večina pelet se izprazni v kratki in intenzivni III. fazi MMC cikla. Pelete, ki ostanejo v želodcu do naslednje periode praznjenja želodca, lahko sproščajo ZU s popolnoma drugačno kinetiko, kot tiste pelete, ki so že predhodno zapustile želodec. Pomembno je, da poznamo kinetiko praznjenja želodca, saj lahko na ta način napovemo, kako dolgo bo določena frakcija pelet v želodcu. Na praznjenje pelet iz želodca vpliva tudi gostota pelet. Pelete z veliko gostoto (> 2,6 g/cm^3) ostanejo v želodcu dalj časa kot pelete z nižjo gostoto. V splošnem na praznjenje pelet vpliva tudi čas razpadnosti kapsule, disperzija pelet v želodčni vsebini, fizikalno-kemijske lastnosti pelet, prisotnost hrane, fiziološki in patofiziološki pogoji v GIT (18, 19).

3.2.9.2 Tablete

Tablete so trdne FO, ki vsebujejo enkraten odmerek ene ali več zdravilnih učinkovin in so različnih velikosti in oblik. Tablete, ki ne razpadajo na manjše delce, zapustijo želodec v intervalu od nekaj minut do dveh ur po principu vse ali nič (Slika 5). Čas praznjenja je tako odvisen od faze MMC cikla v času aplikacije takšnih tablet. Pomembno je dejstvo, da lahko tableta zapusti želodec samo v III. fazi približno dve uri trajajočega MMC cikla. Tableta bo tako ostala v želodcu do prve III. faze MMC cikla. Na splošno pa velja, da je praznjenje tablet odvisno od lastnosti tablet (velikost, oblika, gostota, način in hitrost razpada), prisotnosti hrane, fizioloških in patofizioloških pogojev v GIT (18).



Slika 5: Prikaz tipičnega individualnega profila praznjenja farmacevtskih oblik iz želodca (modra črta- tablete, črtkana črta-pelete). Prirejeno po (18) in (21).

4 Namen dela

Namen diplomske naloge je proučiti vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje zdravilne učinkovine (ZU) iz modelnih orodisperzibilnih tablet, Oblike A in B, ki v stiku z medijem takoj razpadejo na pelete in pomožne snovi. Poleg tega je namen diplomske naloge tudi medsebojna primerjava oblik ob upoštevanju postopnega prehoda pelet skozi želodec in napoved *in vivo* profilov sproščanja za obe obliki.

Poskuse sproščanja bomo izvajali na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki. Hitrost vrtenja magnetnega mešala bomo nastavili na 80 obratov/min. Z uporabo magneta v silikonski cevki bomo ponazorili delovanje mehanske sile na sproščanje ZU v telesu. Zagotoviti moramo, da bo tekom celotnega poskusa v delovni čaši 40 ml medija s temperaturo 36,5 °C. Za ponazarjanje fiziološkega pH in površinske napetosti bomo pri testih sproščanja uporabili biorelevantna želodčna in črevesna (FaSSGF in FaSSIF) medija. Hiter dvig pH pri prehodu farmacevtske oblike iz želodca v tanko črevo bomo v *in vitro* sistemih ponazorili z dodatkom bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ tik pred menjavo biorelevantnega želodčnega medija s črevesnim. Postopen prehod pelet skozi želodec bomo ponazorili z različnim časom zadrževanja pelet v kislem mediju (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 minut). Iz dobljenih profilov sproščanja za posamezen čas zadrževanja gastrorezistentnih pelet Oblike A in Oblike B v kislem in uporabo matematičnega modela praznjenja pelet iz želodca bomo na koncu izračunali povprečne otežene profile sproščanja ZU za obe obliki ter tako napovedali *in vivo* profile sproščanja.

5 Materiali in metode

5.1 Farmacevtska oblika

Na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki smo v čaši testirali sproščanje acidolabilne ZU iz gastrorezistentnih pelet Oblike A in B. Pelete so stisnjene v orodisperzibilne tablete, ki ob stiku z medijem takoj razpadejo na pelete in pomožne snovi.

5.2 Snovi, ki smo jih uporabljali pri delu

- Delovni standard zdravilne učinkovine
- Natrijev hidroksid, Tritisol® za pripravo c(NaOH)=1 M, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Klorovodikova kislina, Tritisol® za pripravo c(HCl)=1 M, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Trinatrijev fosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev klorid, p.a., Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Puferska raztopina pH=7,00 (± 0,02; 20 °C), Panreac, Barcelona, Španija
- Puferska raztopina pH=3,00 (± 0,02; 20 °C), Panreac, Barcelona, Španija
- SIF powder®, Muttenz Baselland, Švica (mešanica natrijevega tauroholata (74,6 ± 5 % w/w) in fosfolipida (lecitin; 26,4 ± 3 % w/w))
- Natrijev tauroholat, Sigma-Aldrich, Co., USA
- Lecitin
- Pepsin

5.3 Priprava raztopin

5.3.1 Enostavni želodčni medij - 0,01 M HCl

V 1000 ml bučko smo s polnilno pipeto kvantitativno prenesli 10 ml 1 M HCl ter dopolnili bučko do oznake z destilirano vodo.

5.3.2 Enostavni črevesni medij – fosfatni pufer s pH=6,8

Enostavni črevesni medij smo pripravili tako, da smo v 1000 ml bučko natehtali 6,8 g K_2HPO_4, dodali 22 ml 1 M NaOH ter dopolnili z destilirano vodo do oznake (pH=6,8 ± 0,05).

5.3.3 Biorelevantni mediji na tešče

Biorelevantna medija, s katerim ponazarjamo fiziološke pogoje na tešče, smo pripravili po članku M. Marques (23), E. Jantratid in J. Dressman (22) ter navodilu proizvajalca SIF praška za pripravo medija (24). Na začetku smo vse sestavine medijev natehtali sami. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo pri pripravi biorelevantnih medijev uporabili SIF prašek z namenom zagotavljanja večje ponovljivosti nateht natrijevega tauroholata in lecitina.

5.3.3.1 Priprava biorelevantnih medijev s tehtanjem vseh osnovnih komponent

Sestavi biorelevantnega želodčnega in črevesnega medija, kjer smo vse osnovne komponente natehtali sami, sta prikazani v preglednici I in II. Medija smo pripravili tako, da smo najprej naredili osnovno raztopino, ki je enaka kot pri pripravi medijev s SIF praškom. Nato smo v to raztopino dodali natehtano količino natrijevega tauroholata, premešali in počakali, da se raztopi. Pri pripravi želodčnega medija smo nato dodali ustrezno količino pepsina. Medij smo nato dobro premešali in počakali toliko časa, dokler se celotna količina pepsina ni popolnoma raztopila. Na koncu smo v medij dodali še ustrezno količino lecitina, katerega smo predhodno suspendirali v majhni količini osnovne raztopine. Biorelevantna medija, z vsemi osnovnimi komponentami, smo mešali 1 do 2 uri oz. vse dokler nismo več zaznali skupkov lecitina. Medij je bil na koncu rahlo moten in rumeno obarvan.

5.3.3.2 Biorelevantni želodčni medij na tešče (FaSSGF) z uporabo SIF praška (22)

1000 ml biorelevantnega želodčnega medija v stanju na tešče smo pripravili tako, da smo najprej naredili osnovno raztopino brez natrijevega tauroholata in lecitina. To smo pripravili tako, da smo v 1000 ml bučko nalili destilirano vodo in v njej raztopili 2 g NaCl ter ji pH uravnali z uporabo 1 M HCl. Raztopino smo dobro premešali in ji s pH metrom izmerili pH, ki je moral biti 1,6 ± 0,05. pH meter smo pred tem umerili s standardnim pufrom s pH 3 ± 0,02. Nato smo v osnovno raztopino s pH 1,6 ± 0,05 dali 59,73 mg mešanice SIF praška. Nastalo raztopino smo mešali dve uri zaščiteno pred svetlobo z uporabo alu folije. Pri uporabi medija smo upoštevali tudi navodila proizvajalca SIF praška, ki priporoča, da se tako pripravljen biorelevantni želodčni medij uporablja maksimalno 48 ur, pri čemer mora biti shranjen na sobni temperaturi in zaščiten pred svetlobo. V preglednici I so zbrani podatki o uporabljenem biorelevantnem želodčnem mediju.

Preglednica I: Sestava in lastnosti biorelevantnega želodčnega medija na tešče (FaSSGF) (22).

Sestava:	
Natrijev tauroholat (μM)	80
Lecitin (μM)	20
Pepsin (mg/ml)*	0,1
NaCl (mM)	34,2
HCl q.s.	pH 1,6
Lastnosti:	
pH	1,6
Osmolalnost (mOsm/kg)	120,7 ± 2,5
Purfska kapaciteta (mmol/L/pH)	/
Površinska napetost (mN/m)	42,6

**Pepsina nismo uporabili pri pripravi FaSSGF medija s SIF praškom.*

5.3.3.3 Biorelevantni črevesni medij na tešče (FaSSIF) z uporabo SIF praška (23, 24)

Osnovno raztopino smo pripravili tako, da smo 1000 ml bučko do polovice napolnili z destilirano vodo in nato dodali 3,95 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ in 6,19 g NaCl. Nato smo bučko dopolnili z destilirano vodo in ji uravnali pH z 1 M NaOH do vrednosti 6,5 ± 0,05. pH meter smo pred tem umerili s standardnim pufrom s pH 7 ± 0,02. V približno 500 ml osnovne raztopine s pH 6,5 ± 0,05 smo dali 2,24 g SIF praška in vse skupaj premešali ter dodali še preostanek osnovne raztopine do 1000 ml. Tako pripravljeno osnovno raztopino z dodatkom natrijevega tauroholata in lecitina smo mešali na magnetnem mešalu 2 uri zaščiteno pred svetlobo z uporabo alu folije. Po koncu mešanja je bil medij rahlo opalescenten. Pripravljen biorelevantni medij, katerega lastnosti so zbrane v preglednici II, smo uporabljali ter shranjevali na sobni temperaturi zaščitenega pred svetlobo maksimalno 2 dni.

Preglednica II: Sestava biorelevantnega črevesnega medija (FaSSIF) (23, 24).

Sestava:	
Natrijev tauroholat (mM)	3
Lecitin (mM)	0,75
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (mM)	28,65
NaCl (mM)	105,85
NaOH qs.	pH 6,5
Prečiščena voda qs.	1 L
Lastnosti:	
pH	6,5
Osmolalnost (mOsm/kg)	~ 270

5.3.4 0,1 M NaOH

0,1 M NaOH smo pripravili tako, da smo 1000 ml bučko do polovice napolnili z destilirano vodo ter dodali 100 ml 1 M NaOH. Nato smo bučko napolnili do oznake z destilirano vodo.

5.3.5 Bazična raztopina 0,2 M in 0,047 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$

0,2 M raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ smo pripravili tako, da smo v 100 ml bučko dali 7,602 g $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ ter do oznake dopolnili z destilirano vodo.

0,047 M raztopino smo naredili tako, da smo natehtali 4,51 g $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ v 250 ml bučko ter z destilirano vodo napolnili do oznake.

5.3.6 Bazična raztopina 0,047 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ z dodatkom SIF praška

V 100 ml 0,047 M raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, pripravljeno po zgornji recepturi, smo z namenom ohranjanja koncentracije natrijevega tauroholata in lecitina, dodali 224 mg SIF praška. Nato smo pripravljeno raztopino mešali 2 uri zaščiteno pred svetlobo. Tako pripravljeno raztopino smo uporabljali največ 48 ur.

5.3.7 50 mM KH_2PO_4

50 mM KH_2PO_4 s pH 4,6, ki je sestavni del mobilne faze, smo pripravili tako, da smo v 1000 ml deionizirane vode prenesli 6,8 g KH_2PO_4 in dobro premešali. Pred uporabo 50 mM KH_2PO_4 na HPLC smo raztopino filtrirali skozi membranski filter s pomočjo vakuumske črpalke ter nato raztopino odzračili v ultrazvočni kadički.

5.4 Uporabljene aparature

- Pretočni sistem za testiranje sproščanja (z magnetom v silikonski cevki): peristaltična črpalka PA-SK4 control, IKA WERKE, Nemčija; grelec in magnetno mešalo IKA WERKE, Nemčija
- Pretočne cevke iz silikona z notranjim premerom 1,52 mm, IKA Nemčija
- HPLC – tekočinski kromatograf z visoko ločljivostjo, Agilent Technologies 1100 Series, Cary, NC, ZDA
- Kolona, Phenomenex, Synergi 4 µm, MAX-RP 80A, 100×4,6 mm
- Spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Tecnology Group, Waldbronn, Nemčija
- Digitalna tehtnica, Exacta 300EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- Analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- Avtomatske pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pH meter, MP220, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- pH meter, MA 5750, Iskra Kranj, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra Kranj, Slovenija
- Membranski filtri, velikost por 0,45 µm, Sartorius AG, Nemčija
- Magnetno mešalo, Rotamix 550MMH, Tehtnica, Železniki, Slovenija

5.5 Metode

5.5.1 Analiza vzorcev

5.5.1.1 UV-VIS spektroskopija

V preliminarnih poskusih z oznako As1p, As2p in Bs1p (Preglednica V) smo za analizo vzorcev uporabili UV-VIS spektroskopijo. Koncentracijo ZU v vzorcu smo določili s pomočjo merjenja absorbance pri njenem absorpcijskem maksimumu. Najprej smo pripravili standardne raztopine ZU z 0,1 M NaOH in medijem (0,01 M HCl ali fosfatni pufer s pH=6,8) v volumskem razmerju 1:1 in posneli spekter v območju 200 in 400 nm ter določili absorpcijski maksimum za acidolabilno ZU, ki je bil v obeh medijih 292 nm. Preden smo pričeli z merjenjem absorbance sproščene ZU iz FO v želodčnem oz. črevesnem mediju, smo brisali ozadje (0,01 M HCl in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1 oz. čisti fosfatni pufer s pH=6,8 in 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1). Kadar je bila absorbanca vzorca višja od območja umeritvene premice za določen medij, smo vzorce redčili v razmerju 1:5 ali 1:10 z raztopino čistega medija in 0,1 M NaOH (v volumskem razmerju 1:1).

5.5.1.2 HPLC analiza

Zaradi kemijske nestabilnosti ZU v kislem okolju smo za določevanje deleža sproščene ZU iz Oblike A in Oblike B v nadaljevanju eksperimentalnih poskusov uporabljali tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pogoji, ki smo jih uporabili za vrednotenje sproščene ZU, so podani v preglednici III.

Preglednica III: Pregled nastavitev na HPLC.

Kolona	Phenomenex, Synergi 4 µm, MAX-RP 80A, 100 mm × 4,6 mm
Temperatura kolone	30 °C
Mobilna faza	55 % 50 mM KH_2PO_4 in 45 % acetonitril
Pretok	1,5 mL/min
Injiciran volumen	10 µL
Valovna dolžina (λ)	292 nm

Dnevno smo preverjali tudi ponovljivost HPLC analize. To smo storili tako, da smo pripravili standardno raztopino ZU v 100 ml 0,1 M NaOH. Nato smo iz 50 µL te raztopine pripravili 1 ml raztopine ZU v mešanici FaSSGF medija in 0,1 M NaOH z volumskim razmerjem 1:1. Podobno raztopino smo pripravili tudi z uporabo FaSSIF medija, le da smo v tem primeru na začetku uporabili 250 µL standardne raztopine ZU in raztopine NaOH. Tako pripravljeni raztopini smo vsako po približno 5-krat injicirali na kromatografski

sistem pred analizo vzorcev. Raztopino ZU v FaSSIF mediju in NaOH smo injicirali dodatno še na vsakih 10 vzorcev. Nato smo posneli kromatogram in iz dobljenih vrednosti površin pod vrhom ZU izračunali povprečje, katerega smo nanašali na umeritveno premico za posamezni medij ter opazovali morebitna odstopanja (maksimalno odstopanje je bilo 5 %).

5.5.2 Priprava umeritvenih premic

5.5.2.1 HPLC

Pred analizo vzorcev sproščene ZU iz Oblike A in B smo pripravili raztopine standardov acidolabilne ZU znane koncentracije v ustreznem mediju. Osnovne raztopine smo pripravili tako, da smo natančno natehtali približno 10 mg (izjema FaSSIF medij-20 mg) standarda ZU na analitski tehtnici. Natehto smo kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in jo dopolnili z 0,1 M NaOH do oznake. Osnovne raztopine smo nato ustrezno redčili z medijem (FaSSGF, FaSSIF, 0,01 M HCl ali fosfatnim pufrom s pH=6,8) in tako dobili nove raztopine s približno enakomerno razporejenimi koncentracijami znotraj izbranega koncentracijskega intervala (1 mg/L–100 mg/L). 1 ml razredčene raztopine z želeno koncentracijo smo dobili tako, da smo iz osnovne raztopine (natehta ZU v 0,1 M NaOH) odpipetirali določen volumen in ga kvantitativno prenesli v viale. Nato smo v vialo odpipetirali tudi ustrezen volumen 0,1 M NaOH in medija (FaSSGF, FaSSIF, 0,01 M HCl ali fosfatni pufer). Celotno volumsko razmerje 0,1 M NaOH (prispevek dodatka NaOH skupaj z ZU in čisto raztopino 0,1 M NaOH) in medija je moralo biti v vseh primerih 1:1. Tako pripravljenim raztopinam z želenimi koncentracijami smo s pomočjo HPLC posneli kromatograme in izmerili površine pod vrhom ZU (λ=292 nm). Nato smo iz teh podatkov izdelali umeritveno premico. Koncentracije smo nanašali na absciso, površine pod vrhom pa na ordinato. Skozi dobljene točke smo narisali premico in s pomočjo linearne regresije izračunali njeno enačbo ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2). Umeritveno premico smo naredili za vse uporabljene medije sproščanja.

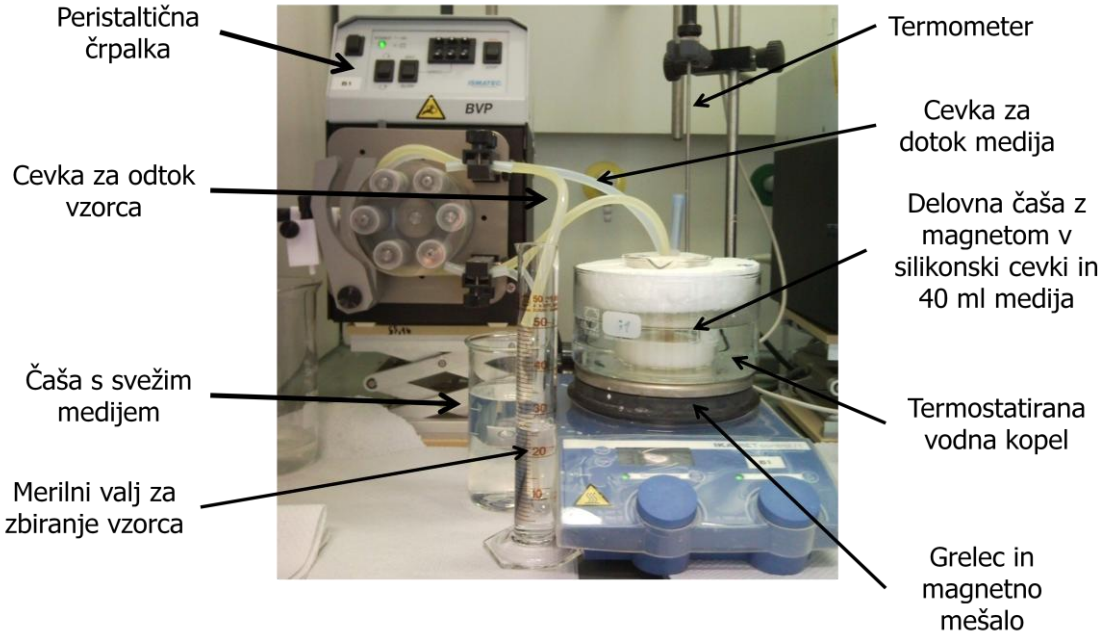
5.5.2.2 UV-VIS spektroskopija

V začetnih preliminarnih testih (As1p, As2p in Bs1p) smo umeritvene premice pripravili na enak način kot je navedeno zgoraj, le da smo v epruvete pripravili večje volumne redčenih raztopin z ustrezno koncentracijo ZU. V tem primeru smo s pomočjo UV-VIS sprektrofotometra izmerili absorbance pri valovni dolžini 292 nm. Nato smo iz dobljenih absorbanc in koncentracij izdelali umeritveno premico.

5.5.3 Testi sproščanja na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki

Teste sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki, ki je sestavljen iz (Slika 6):

- peristaltične črpalke, katere rotor se enakomerno vrti ter tako zagotavlja konstanten dotok svežega medija in odtok vzorca;
- magnetnega mešala z grelcem, ki omogoča nastavitev hitrosti vrtenja mešala in ustrezno temperaturo medija, v katerem ponazarjamo sproščanje ZU iz FO;
- 150 mL delovne čaše, v kateri je magnet v silikonski cevki in 40 ml medija;
- silikonske cevke s filtrom, ki odvaja vzorec iz delovne čaše v merilni valj;
- silikonske cevke, ki dovaja svež medij v delovno čašo;
- merilnega valja, v katerega lovimo vzorec.



Slika 6: Pretočni sistem z magnetom v silikonski cevki.

Pred pričetkom izvajanja testov sproščanja, kjer smo proučevali vpliv časa zadrževanja FO v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje, smo predhodno izvedli preliminarne teste sproščanja, s katerimi smo poskušali optimizirati načine in pogoje izvedbe testov sproščanja (Preglednica V). Na osnovi rezultatov preliminarnih analiz sproščanja smo nadaljnje analize vpliva časa zadrževanja ZU v biorelevantnem kislem mediju na sproščanje izvajali z uporabo pretočnega sistema z oznako Bs (Preglednica VI). Pred začetkom izvajanja testov sproščanja smo vodno kopel termostatirali na 36,5 °C. Nastavljena temperatura je znotraj intervala normalne telesne temperature (36,7 ± 0,4°C za

moške in 36,9 ± 0,4°C za ženske (27)). Nato smo v kopel dali delovno čašo z 40 ml biorelevantnega želodčnega medija (FaSSGF) in magnetom v silikonski cevki. Pri testih sproščanja nismo uporabili petrijevke v vodni kopeli pod delovno čašo, ker smo v preliminarnih testih ugotovili, da odstranitev petrijevke iz vodne kopeli omogoča enakomernejše vrtenje magneta v silikonski cevki v delovni čaši. Pri vseh testih sproščanja smo za posamezni sistem vedno uporabljali isto čašo in se na ta način izognili vplivu delovne čaše na sproščanje (npr. različna oblika čaše, različna debelina in ukrivljenost dna čaše ipd.). Nato smo nastavili hitrost vrtenja magnetnega mešala na 80 obratov/min. Pomembno je bilo, da smo cevko, ki dovaja medij v delovno čašo, napolnili z biorelevantnim želodčnim medijem. Cevko za odtok vzorca pa smo pustili prazno. Ustrezno pripravljeni cevki smo namestili v delovno čašo, čašo s svežim medijem ter merilni valj z 0,1 M NaOH. Ko smo dosegli konstantno temperaturo ter enakomerno vrtenje magneta pri izbranih obratih, smo v delovno čašo dali orodisperziblino tableto ter pognali peristaltično črpalko. Poskuse sproščanja smo izvajali pri hitrosti črpanja pretočne črpalke 2 ml/min. Čas merjenja poskusa se je pričel s prvo kapljico vzorca prečrpanega iz delovne čaše v merilni valj. Pred prvo kapljico je bila FO v delovni čaši izpostavljena kislemu mediju že 2,5 min. Kapljica vzorca je kanila v merilni valj, v katerem je bila ustrezna količina 0,1 M NaOH (razmerje 0,1 M NaOH in vzorca iz delovne čaše je bilo vedno 1:1). NaOH smo v merilni valj dodali z namenom povečanja stabilnosti sproščene acidolabilne ZU v preiskovanem vzorcu. Ob ustreznem času (5 minut pred menjavo merilnega valja) smo čašo z biorelevantnim želodčnim medijem (FaSSGF) nadomestili z bazično raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ z dodatkom SIF praška, ki smo jo dovajali v sistem po cevki točno 2 minuti (4 ml bazične raztopine). Po preteku dveh minut smo čašo z bazično raztopino zamenjali s čašo z biorelevantnim črevesnim medijem (FaSSIF) ter nadaljevali s poskusom sproščanja. Primer izvedbe poskusa sproščanja je prikazan v preglednici IV. Zbrane vzorce iz merilnega valja, ki so odražali stanje, ko je bila FO izpostavljena želeni čas kislemu mediju (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 min v kislem), smo prenesli v manjšo čašo ter približno 3 ml te raztopine preko injekcijske brizge prefiltrirali (filter z velikostjo por 0,45 μm) v epruveto. Koncentracijo sproščene ZU ob določeni časovni točki smo določili s pomočjo HPLC. Po končanem poskusu sproščanja smo cevke sprali z destilirano vodo.

Preglednica IV: Prikaz menjav medijev pri testu sproščanja, kjer smo FO zadrževali v kislem 20 min.

Čas poskusa	**Mediji, ki jih dovajamo po cevki v sistem**	**Izpostavljenost pelet kislemu mediju v del.čaši:**	**Vzorec v merilnem valju**
Pričetek poskusa (t = –2,5 min)	Začetek dovajanja kislega medija *(predhodno napolnjena cevka s kislim medijem)*	FO damo v čašo	40 ml 0,1 M NaOH *(prazna cevka za odvajanje vzorca iz delovne čaše)*
Pričetek merjenja časa poskusa (t = 0 min)	Nadaljevanje dovajanja kislega medija	2,5 min	Prva kapljica vzorca (kislega medija)
t = 15 min	Pričetek dovajanja bazične raztopine ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ z dod. SIF praška)	17,5 min	30 ml vzorca (kislega medija)
t = 17 min	Pričetek dovajanja biorelev. črevesnega medija	19,5 min	34 ml vzorca (kislega medija)
t = 17,5 min	Nadaljevanje dovajanja črevesnega medija	20 min *(v del. čašo kane prva kapljica bazične razt.)*	35 ml vzorca (kislega medija)
t = 20 min	Nadaljevanje dovajanja črevesnega medija	*2,5 min že izpostavljena mediju z višjim pH*	40 ml vzorca (kislega medija) *(Menjava merilnega valja za zbiranje vzorca)*

Preglednica V: Pregled preliminarnih poskusov sproščanja. V tabeli so navedeni različni pogoji poskusa. V prvem stolpcu so navedene oznake poskusov (npr. Bs8p-A pomeni: Bs-oznaka sistema, p-preliminarni poskus, A-Oblika A). Nato sledi oznaka pretočnega sistema z magnetom v silikonski cevki, hitrost mešanja, čas v kislem, testirani kisli medij, čas v črevesnem mediju, izbrani črevesni medij, število opravljenih paralelk, izvajanje poskusa z ali brez petrijevke pod delovno čašo v vodni kopeli, način dodatka $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, analitska metoda in ime oblike. S črno barvo je označena Oblika A in z rdečo Oblika B.

OZNAKA POSKUSA	SISTEM	HITROST MEŠANJA (obratov/min)	ČAS V ŽELODČNEM MEDIJU (min)	ŽELODČNI MEDIJ	ČAS V ČREVESNEM MEDIJU (min)	ČREVESNI MEDIJ	ŠT. PARALELK	PETRIJEVKA/ BREZ	DODATEK $Na_3PO_4 \cdot 12H_20$	METODA	OBLIKA
As1p-A	A	50	60	0,01M HCl	200	6,8	4	petrijevka	/	UV/VIS	Oblika A
As2p-A	A	60	60	0,01M HCl	180	6,8	6	petrijevka	/	UV/VIS	Oblika A
Bs1p-A	B	60	60	0,01M HCl	180	6,8	9	brez	/	UV/VIS	Oblika A
Bs2p-A	B	60	60	0,01M HCl	180	6,8	4	brez	/	HPLC	Oblika A
Bs3p-A	B	60	60	0,01M HCl	180	6,8	5	brez	1x	HPLC	Oblika A
Bs4p-A	B	60	5	0,01M HCl	175	6,8	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs5p-B	B	60	5	0,01M HCl	175	6,8	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika B
Bs6p-A	B	60	20	0,01M HCl	180	6,8	1	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs7p-B	B	60	20	0,01M HCl	180	6,8	1	brez	po cevki	HPLC	Oblika B
Bs8p-A	B	60	60	0,01M HCl	180	6,8	4	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs9p-B	B	60	60	0,01M HCl	180	6,8	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika B
Bs10p-A	B	60	60	FaSSGF (teht.komp)	180	FaSSIF (teht.komp)	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs11p-A	B	60	5	FaSSGF (z upor.SIF)	175	FaSSIF (z upor.SIF)	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs12p-B	B	60	5	FaSSGF (z upor.SIF)	175	FaSSIF (z upor.SIF)	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika B
Bs13p-A	B	60	20	FaSSGF (z upor.SIF)	180	FaSSIF (z upor.SIF)	1	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs14p-B	B	60	20	FaSSGF (z upor.SIF)	180	FaSSIF (z upor.SIF)	1	brez	po cevki	HPLC	Oblika B
Bs15p-A	B	60	60	FaSSGF (z upor.SIF)	180	FaSSIF (z upor.SIF	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika A
Bs16p-B	B	60	60	FaSSGF (z upor.SIF)	180	FaSSIF (z upor.SIF)	2	brez	po cevki	HPLC	Oblika B

Preglednica VI: Pregled poskusov sproščanja z namenom proučevanja vpliva časa zadrževanja pelet v biorelevantnem želodčnem mediju (FaSSGF) na sproščanje. Pri tem smo uporabili pretočni sistem B (brez petrijevke). V prvem stolpcu so navedene oznake poskusov (npr. Bs-5/80-A oznaka poskusa pomeni: Bs- oznaka sistema; 5/80-čas v kislem/št. obratov; A-Oblika A). V naslednjih stolpcih je navedena oblika, uporabljen sistem, hitrost mešanja, čas zadrževanja pelet v kislem in črevesnem mediju, uporabljen biorelevantni medij, število narejenih paralelk pri posameznem poskusu, dodatek bazične raztopine in uporabljena analizna metoda. S črno je označena Oblika A, z rdečo Oblika B in z modro pogoji, ki so enaki tako pri Obliki A in B.

OZNAKA POSKUSA	OBLIKA	SISTEM	HITROST MEŠANJA (obratov/min)	ČAS V KISLEM (min)	KISLI MEDIJ	ČAS V ČREVESNEM (min)	ČREVESNI MEDIJ	ŠT. PARALELK	DODATEK $Na_3PO_4 \cdot 12H_20$ + SIF prašek	METODA
Bs-5/80-A	Oblika A	B	80	5	FaSSGF (z uporabo SIF praška)	175	FaSSIF (z uporabo SIF praška)	5	4 ml po cevki (ob ustreznem času)	HPLC
Bs-5/80-B	Oblika B			5		175		4		
Bs-20/80-A	Oblika A			20		180		5		
Bs-20/80-B	Oblika B			20		180		3		
Bs-40/80-A	Oblika A			40		180		3		
Bs-40/80-B	Oblika B			40		180		3		
Bs-60/80-A	Oblika A			60		180		5		
Bs-60/80-B	Oblika B			60		180		3		
Bs-80/80-A	Oblika A			80		180		4		
Bs-80/80-B	Oblika B			80		180		3		
Bs-100/80-A	Oblika A			100		200		4		
Bs-100/80-B	Oblika B			100		200		3		
Bs-120/80-A	Oblika A			120		180		3		
Bs-120/80-B	Oblika B			120		180		3		
Bs-150/80-A	Oblika A			150		230		3		
Bs-150/80-B	Oblika B			150		230		3		
Bs-200/80-A	Oblika A			200		240		4		
Bs-200/80-B	Oblika B			200		240		3		

5.5.4 Izračun sproščene učinkovine

Koncentracijo sproščene in raztopljene zdravilne učinkovine na časovno enoto v vzorcu (c_t) smo izračunali s pomočjo umeritvenih premic (Enačba 1) in površin pod vrhom (oz. absorbance) ZU, ki smo jih izmerili s pomočjo HPLC metode (oz. UV-VIS spektroskopije) (Enačba 2).

$$\boldsymbol{y = k \cdot c_t + n} \qquad \textit{(Enačba 1)}$$

$$\boldsymbol{c_t = \frac{y-n}{k}} \qquad \textit{(Enačba 2)}$$

Z uporabo enačbe 3 smo izračunali količino sproščene ZU po določenem času. V primeru redčenja upoštevamo pri izračunu količine sproščene ZU tudi faktor redčenja.

$$\boldsymbol{m_t = c_t \cdot V_{vz} \, (\cdot \, f_R)} \qquad \textit{(Enačba 3)}$$

Kumulativno količino sproščene ZU ob določenem času smo dobili tako, da smo posamezne mase sešteli (Enačba 4).

$$\boldsymbol{m_{kum\,t} = m_{t1} + m_{t2} + m_{t3} + \ldots} \qquad \textit{(Enačba 4)}$$

Odstotek sproščene ZU smo izračunali z uporabo enačbe 5.

$$\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{sprošč.uč}} = \left(\frac{\boldsymbol{m_{kum\,t}}}{\boldsymbol{D}}\right) \cdot \boldsymbol{100} \qquad \textit{(Enačba 5)}$$

<u>Uporabljeni simboli v enačbah 1 do 5:</u>

- $\boldsymbol{y}$ – površina pod vrhom (HPLC) ali absorbanca (UV-VIS spektroskopija) ZU
- $\boldsymbol{k}$ – naklon umeritvene premice
- $\boldsymbol{c_t}$ – koncentracija ZU v vzorcu ob času *t* [mg/ml]
- $\boldsymbol{n}$ – presečišče umeritvene premice z ordinatno osjo
- $\boldsymbol{m_t}$ – masa ZU v volumnu vzorca ob času *t* (min) [mg]
- $\boldsymbol{f_R}$ – faktor redčenja
- $\boldsymbol{V_{vz}}$ –volumen vzorca; odvisno od časovnega intervala (npr.: 10 min (20 ml 0,1 M NaOH v valju in 20 ml vzorca iz del.čaše = 40 ml vzorca)
- $\boldsymbol{m_{kum\,t}}$ – kumulativna masa sproščene ZU ob času *t* (min) [mg]
- $\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{sprošč.uč}}$ – odstotek sproščene ZU ob določenem času
- $\boldsymbol{D}$ – deklarirana vsebnost ZU v orodisperzibilnih tabletah [30 mg]

5.5.5 Hipotetično podaljševanje profilov sproščanja

Ker so poskusi sproščanja ZU iz FO trajali različno dolgo (od 180 do 440 min), smo vse profile sproščanja hipotetično podaljšali do 440 min.

Profile sproščanja smo podaljševali na osnovi kinetike sproščanja 1. reda (Enačba 6).

$$\boldsymbol{ln}\left(\mathbf{100} - \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{spro}\text{šč.}\boldsymbol{u}\text{č}}\right) = -\boldsymbol{k_a} \cdot \boldsymbol{t} \qquad \textit{(Enačba 6)}$$

Najprej smo izračunali odvisno spremenljivko (y_t), ki je enaka naravnemu logaritmu nesproščene ZU (Enačba 7). Odvisno spremenljivko (y_t) smo izračunali za vse eksperimentalno dobljene vrednosti sproščene ZU.

$$\boldsymbol{y_t} = \boldsymbol{ln}\left(\mathbf{100} - \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{spro}\text{šč.}\boldsymbol{u}\text{č}}\right) \qquad \textit{(Enačba 7)}$$

Na podlagi izračunanih vrednosti s pomočjo enačbe 7 smo izbrali zadnji set točk (od 2 do 3 točke), pri katerih je bil $R^2 \geq 0{,}95$, in narisali premico (y_t v odvisnosti od časa) s pomočjo linearne regresije. Z uporabo enačbe tako dobljene premice smo izračunali odvisno spremenljivko (y_t) za navidezno hipotetično podaljšane čase vzorčenja. Z enačbo 8 smo izračunali hipotetični delež sproščene zdravilne učinkovine za čase vzorčenja od zadnjega eksperimentalno določenega časa sproščanja pa vse do 440 minute (interval vzorčenja je bil 20 min).

$$\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{spro}\text{šč.}\boldsymbol{u}\text{č}} = \mathbf{100} - \boldsymbol{e}^{-\boldsymbol{k_a} \cdot \boldsymbol{t} + \boldsymbol{b}} \qquad \textit{(Enačba 8)}$$

<u>V enačbah od 6 do 8 uporabljeni simboli:</u>

- $\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{spro}\text{šč.}\boldsymbol{u}\text{č}}$ – odstotek sproščene ZU ob času t [%]
- $\boldsymbol{y_t}$ – naravni logaritem nesproščene ZU
- $\boldsymbol{k_a}$ – naklon premice
- $\boldsymbol{b}$ – presečišče premice z ordinatno osjo
- $\boldsymbol{t}$ – čas vzorčenja [min]

5.5.6 Izračun povprečnega oteženega profila sproščanja

S pomočjo matematičnega modela (19), ki opisuje povprečno praznjenje pelet iz želodca, smo izračunali odstotek pelet, ki ostanejo v želodcu ob različnih časih zadrževanja v kislem (Enačba 9).

$$\boldsymbol{GE(t)} = \mathbf{100} \cdot \boldsymbol{e}^{-\left(\frac{\boldsymbol{t}\,[\boldsymbol{min}]}{\mathbf{61{,}9}\,\boldsymbol{min}}\right)^{\mathbf{0{,}895}}} \qquad \textit{(Enačba 9)}$$

S pomočjo enačbe 10 smo izračunali odstotek pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu (Preglednica VII). Za časovno točko smo uporabili sredino časovnega intervala.

$$\boldsymbol{f^t} = \boldsymbol{GE_z} - \boldsymbol{GE_k} \qquad \textit{(Enačba 10)}$$

Uporabljeni simboli v enačbah 9 in 10:

- $\boldsymbol{GE(t)}$ – odstotek pelet, ki ostanejo v želodcu v določeni časovni točki [%]
- $\boldsymbol{f^t}$ – odstotek pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu [%]
- $\boldsymbol{GE_k}$ – odstotek pelet, ki ostanejo v želodcu na koncu časovnega intervala [%]
- $\boldsymbol{GE_z}$ – odstotek pelet, ki ostanejo v želodcu na začetku časovnega intervala [%]

Preglednica VII: Časovni intervali praznjenja pelet iz želodca in izračunani odstotki pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu.

Časovni interval (min)	Povprečni čas (min)	% pelet, ki zapusti želodec v časovnem intervalu (f^t)
0–10	5	17,8
10–30	20	23,0
30–50	40	15,5
50–70	60	11,0
70–90	80	8,0
90–110	100	5,9
110–130	120	4,4
130–170	150	5,9
170–230	200	8,5*

* prištet tudi odstotek, ki zapusti želodec po 230 minuti

Oteženi profil sproščanja smo dobili tako, da smo delež sproščene ZU v vsaki časovni točki povprečnega profila za določen čas v kislem pomnožili z ustreznim odstotkom pelet, ki zapustijo želodec v določenem času (Enačba 11).

$$\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{oteženi}} = \%^{\boldsymbol{t}} \cdot \boldsymbol{f^t} \qquad \textit{(Enačba 11)}$$

Uporabljeni simboli v enačbi 11:

- $\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{oteženi}}$ – otežen odstotek sproščene ZU ob času *t* [%]
- $\%^{\boldsymbol{t}}$ – delež sproščene ZU v času *t* pri povprečnem profilu sproščanja dobljenega z določenim časom zadrževanja pelet v kislem
- $\boldsymbol{f^t}$ – odstotek pelet, ki zapustijo želodec v določenem časovnem intervalu [%]

Napoved *in vivo* profila sproščanja za Obliko A in B smo dobili tako, da smo izračunali povprečni oteženi profil sproščanja ZU za Obliko A in Obliko B pri vseh časih zadrževanja pelet v kislem. Le-tega smo izračunali tako, da smo sešteli odstotke sproščene ZU vseh devetih oteženih profilih sproščanja (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 min v kislem) v istih časovnih točkah za Obliko A in Obliko B (Enačba 12).

$$\%^{\boldsymbol{Oblika}}_{\boldsymbol{pov.ote\check{z}en}} = \begin{pmatrix} \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.5}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.20}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.40}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.60}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.80}} + \\ \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.100}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.120}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.150}} + \%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.200}} \end{pmatrix} \qquad \textit{(Enačba 12)}$$

Uporabljeni simboli v enačbi 12:

- $\%^{\boldsymbol{t}}_{\boldsymbol{ote\check{z}.(5/20/40/60/80/100/120/150/200\,min)}}$ – oteženi odstotek sproščene ZU ob času *t* pri poskusu z različnim časom zadrževanja v biorelevantnem želodčnem mediju za posamezno obliko [%]
- $\%^{\boldsymbol{Oblika}}_{\boldsymbol{pov.ote\check{z}en}}$ – povprečni oteženi odstotek sproščene ZU za Obliko A ali B [%]

6 Rezultati

6.1 Rezultati umeritvenih premic

V preglednici VIII so prikazane enačbe umeritvenih premic za standardne raztopine ZU v raztopini različnih želodčnih oz. črevesnih medijev z 0,1 M NaOH v volumskem razmerju 1:1, ki smo jih dobili z uporabo UV-VIS spektroskopije ali HPLC.

Preglednica VIII: Enačbe umeritvenih premic in kvadrati Pearsonovih koeficientov korelacije (R^2).

MEDIJ			*ANALIZNA METODA*	*ENAČBA UMERITVENE PREMICE in R^2*
Enostavni želodčni medij (0,01 M HCl s *pH*=2)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*UV-VIS*	***A = 0,0454 · c [mg/L] + 0,0022*** *(R^2=1)*
Enostavni črevesni medij (fosfatni pufer s *pH*=6,8)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*UV-VIS*	***A = 0,045 · c [mg/L] + 0,007*** *(R^2=0,9999)*
Enostavni želodčni medij (0,01 M HCl s *pH*=2)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	HPLC	***AUC = 12,472 · c [mg/L] - 0,3143*** *(R^2=1)*
Enostavni črevesni medij (fosfatni pufer s *pH*=6,8)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,485 · c [mg/L] + 0,3768*** *(R^2=0,9999)*
Biorelevantni želodčni medij *pH*=1,6 *(sestavine natehtali sami)*	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,699 · c [mg/L] + 0,1236*** *(R^2=1)*
Biorelevantni črevesni medij *pH*=6,5 *(sestavine natehtali sami)*	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,851 · c [mg/L] + 0,8113*** *(R^2=0,9999)*
Biorelevantni želodčni medij *pH*=1,6 *(uporaba SIF praška)*	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,577 · c [mg/L] + 0,3419*** *(R^2=1)*
Biorelevantni črevesni medij *pH*=6,5 *(uporaba SIF praška)*	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 13,32 · c [mg/L] + 2,4413*** *(R^2=0,9999)*

6.2 Testi sproščanja na pretočnem sistemu

6.2.1 Preliminarni poskusi

V preglednicah od IX do XXIV so prikazani rezultati preliminarnih poskusov sproščanja. Pogoji izvajanja posameznega poskusa so navedeni v preglednici V. Čas zadrževanja pelet v kislem mediju je označen z odebeljeno črto.

Preglednica IX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu As1p-A, povprečje in standardna deviacija SD. (Oblika A, 50 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, petrijevka, UV/VIS)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
***t* (min)**	**As1p-1A**	**As1p-2A**	**As1p-3A**	**As1p-4A**	**Povprečje**	**SD**
0	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00
20	1,10	0,71	0,86	0,90	0,89	0,16
40	3,62	2,48	3,19	3,48	3,19	0,51
60	6,26	4,32	5,31	5,81	5,43	0,83
80	8,96	6,34	7,88	8,03	7,80	1,09
100	56,19	49,24	45,75	49,63	50,20	4,36
120	82,32	71,41	70,10	75,47	74,82	5,50
140	94,35	80,24	80,17	85,95	85,18	6,69
160	99,45	85,04	84,80	90,84	90,03	6,87
180	101,93	86,83	87,97	93,12	92,46	6,88
200	103,23	87,63	89,14	94,30	93,58	7,04
220	104,14	88,07	89,61	94,93	94,19	7,26
240	104,58	88,56	89,98	95,51	94,66	7,26
260	104,84	88,73	90,12	95,80	94,87	7,32

Preglednica X: Odstotki sproščene ZU pri poskusu As2p-A, povprečje in standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, petrijevka, UV/VIS)

OBLIKA A	% sproščene ZU							
t (min)	As2p-1A	As2p-2A	As2p-3A	As2p-4A	As2p-5A	As2p-6A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,73	0,77	0,80	0,74	0,77	0,68	0,75	0,04
40	1,79	1,85	1,97	1,95	1,84	2,00	1,90	0,08
60	2,50	2,77	2,76	2,64	2,60	2,89	2,69	0,14
80	3,11	3,50	3,49	3,32	3,22	3,56	3,37	0,18
100	3,70	4,25	4,08	3,88	3,88	4,18	4,00	0,21
120	38,37	36,01	42,54	37,19	40,21	36,90	38,54	2,43
140	65,87	67,30	73,29	68,36	67,35	62,85	67,50	3,43
160	76,77	81,17	86,03	80,74	78,31	73,64	79,44	4,24
180	81,78	87,27	91,96	86,37	82,85	78,26	84,75	4,81
200	84,85	89,52	94,58	88,84	85,44	80,30	87,25	4,87
220	85,81	91,00	96,46	90,71	86,50	82,18	88,78	5,01
240	86,28	91,71	97,24	91,36	87,10	82,82	89,42	5,08

Preglednica XI:Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs1p-A, povprečje in standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, UV/VIS)

OBLIKA A	% sproščene ZU										
t (min)	Bs1p-1A	Bs1p-2A	Bs1p-3A	Bs1p-4A	Bs1p-5A	Bs1p-6A	Bs1p-7A	Bs1p-8A	Bs1p-9A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	1,43	1,17	1,18	1,30	1,17	1,37	1,10	1,11	1,10	1,22	0,12
40	4,14	3,48	3,76	3,92	3,71	4,33	3,75	3,84	3,60	3,84	0,27
60	6,42	5,24	6,09	6,54	5,86	6,69	6,18	6,01	5,85	6,10	0,44
80	9,65	8,35	9,76	11,01	9,84	10,44	10,10	11,83	11,91	10,32	1,13
100	59,13	52,55	53,85	55,93	59,86	53,99	55,55	60,12	56,65	56,40	2,77
120	82,42	73,95	74,23	78,04	82,61	74,73	76,11	81,28	77,57	77,88	3,47
140	92,19	82,78	82,35	86,57	92,33	83,06	84,47	89,25	85,21	86,47	3,92
160	96,22	86,48	85,79	90,63	95,83	86,73	87,70	92,51	88,21	90,01	4,01
180	98,17	88,20	88,18	92,27	97,44	88,25	89,18	94,02	89,62	91,70	4,00
200	99,26	89,56	88,97	93,14	98,31	89,25	90,90	94,78	90,65	92,76	3,91
220	99,75	90,03	89,50	93,73	98,92	89,73	91,34	95,24	91,15	93,27	3,93
240	100,15	90,34	89,92	93,99	99,35	90,05	91,62	95,69	91,50	93,62	3,96

Preglednica XII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs2p-A, povprečje in standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
t (min)	Bs2p-1A	Bs2p-2A	Bs2p-3A	Bs2p-4A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,20	0,15	0,16	0,15	0,17	0,02
40	0,55	0,42	0,42	0,40	0,45	0,07
60	0,75	0,62	0,60	0,59	0,64	0,07
80	2,66	2,80	5,07	4,88	3,86	1,30
100	45,81	48,81	52,62	49,08	49,08	2,79
120	66,17	69,24	73,30	69,70	69,60	2,92
140	74,34	77,52	81,10	77,17	77,53	2,77
160	77,98	80,66	84,29	80,15	80,77	2,62
180	79,38	82,03	85,70	80,14	81,81	2,82
200	80,27	83,65	85,70	80,13	82,43	2,72
220	80,69	84,05	85,69	80,12	82,64	2,67
240	80,97	84,31	85,68	80,11	82,77	2,65

Preglednica XIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs3p-A, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, 1x - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU						
t (min)	Bs3p-1A	Bs3p-2A	Bs3p-3A	Bs3p-4A	Bs3p-5A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,30	0,30	0,30	0,27	0,28	0,29	0,02
60	0,60	0,58	0,58	0,55	0,60	0,58	0,02
70	4,02	3,55	3,74	3,50	2,24	3,41	0,69
80	27,52	29,44	28,67	27,86	24,95	27,69	1,70
90	44,71	47,58	47,51	46,96	46,67	46,69	1,17
100	55,79	59,89	59,70	59,55	60,81	59,15	1,94
110	63,00	68,11	67,59	67,69	69,61	67,20	2,49
120	67,77	73,47	72,66	72,84	75,47	72,44	2,84
130	70,91	77,07	75,91	76,22	79,39	75,90	3,11
140	72,98	79,50	78,13	78,30	81,99	78,18	3,29
150	74,37	81,01	79,56	79,65	83,78	79,67	3,42
160	75,53	82,08	80,49	80,58	84,99	80,73	3,43
180	76,42	82,35	81,50	81,97	86,75	81,80	3,67
200	76,85	82,92	81,94	82,43	87,41	82,31	3,75
220	77,08	83,24	82,29	82,72	87,74	82,61	3,79
240	77,21	83,71	82,43	82,96	88,10	82,88	3,89

Preglednica XIV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs4p-A, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 5 min v 0,01M HCl, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU			
t (min)	Bs4p-1A	Bs4p-2A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,03	0,04	0,03	0,01
15	0,46	0,35	0,41	0,08
20	1,23	0,96	1,10	0,19
30	25,55	23,71	24,63	1,30
40	51,23	51,96	51,60	0,52
50	66,44	68,68	67,56	1,58
60	76,00	78,62	77,31	1,85
70	81,81	84,66	83,23	2,02
80	85,52	88,34	86,93	2,00
90	87,81	90,69	89,25	2,04
100	89,28	92,16	90,72	2,04
120	90,82	93,79	92,30	2,10
140	91,53	94,46	93,00	2,08
160	91,93	94,88	93,41	2,09
180	92,23	95,15	93,69	2,07

Preglednica XV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs5p-B, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika B, 60 obratov/min, 5 min v 0,01M HCl, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA B	% sproščene ZU			
t (min)	Bs5p-1B	Bs5p-2B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,03	0,04	0,04	0,01
15	0,32	0,30	0,31	0,02
20	0,61	0,62	0,62	0,01
30	11,45	9,78	10,62	1,18
40	33,60	32,20	32,90	1,00
50	51,34	50,26	50,80	0,76
60	63,92	61,88	62,90	1,44
70	73,08	70,01	71,54	2,17
80	78,91	75,35	77,13	2,51
90	82,67	79,61	81,14	2,16
100	85,06	82,21	83,64	2,02
120	87,25	84,77	86,01	1,76
140	88,15	85,97	87,06	1,55
160	89,14	86,61	87,88	1,79
180	89,49	86,98	88,23	1,78

Preglednica XVI: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs6p-A in Bs7p-B. (Obliki A in B, 60 obratov/min, 20 min v 0,01M HCl, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU
t (min)	Bs6p-1A
0	0,00
20	0,21
30	0,58
40	6,16
50	33,51
60	52,06
70	63,78
80	71,27
90	76,29
100	79,58
110	81,69
120	82,91
140	84,58
160	85,22
180	85,57
200	85,76

OBLIKA B	% sproščene ZU
t (min)	Bs7p-1B
0	0,00
20	0,18
30	0,28
40	4,05
50	29,00
60	46,78
70	59,12
80	67,89
90	73,62
100	77,30
110	79,85
120	81,68
140	83,43
160	84,26
180	87,40
200	88,31

Preglednica XVII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs8p-A, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
t (min)	Bs8p-1A	Bs8p-2A	Bs8p-3A	Bs8p-4A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,32	0,23	0,38	0,30	0,30	0,06
60	0,60	0,48	0,75	0,59	0,60	0,11
70	1,97	1,44	1,73	1,99	1,78	0,26
80	26,32	22,64	23,57	26,53	24,76	1,96
90	47,09	44,17	45,68	48,19	46,28	1,74
100	60,50	58,83	60,23	62,20	60,44	1,39
110	69,21	67,42	69,94	70,87	69,36	1,46
120	74,50	72,75	75,99	76,50	74,94	1,69
130	78,01	76,25	80,29	80,08	78,66	1,91
140	80,33	78,50	82,76	82,45	81,01	1,99
150	81,82	79,95	84,49	84,00	82,56	2,10
160	82,83	80,87	85,50	85,54	83,68	2,27
180	84,15	82,17	86,54	86,57	84,86	2,12
200	84,69	82,63	87,07	87,05	85,36	2,14
220	84,93	82,94	87,35	87,32	85,64	2,12
240	85,07	83,31	87,51	87,52	85,85	2,05

Preglednica XVIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs9p-B, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika B, 60 obratov/min, 60 min v 0,01M HCl, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA B	% sproščene ZU			
t (min)	Bs9p-1B	Bs9p-2B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,22	0,22	0,22	0,00
60	0,34	0,33	0,33	0,01
70	10,21	7,91	9,06	1,63
80	39,30	36,67	37,98	1,86
90	60,80	59,51	60,15	0,91
100	74,56	72,46	73,51	1,49
110	83,14	80,64	81,89	1,77
120	88,59	85,62	87,11	2,11
130	91,96	88,71	90,33	2,30
140	94,04	90,72	92,38	2,35
150	95,34	91,89	93,61	2,44
160	96,16	92,66	94,41	2,48
180	97,90	94,25	96,08	2,58
200	98,24	94,58	96,41	2,59
220	98,86	94,89	96,87	2,81
240	98,97	95,19	97,08	2,67

Preglednica XIX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs10p-A, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v biorel. mediju (vse natehtali), cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU			
t (min)	Bs10p-1A	Bs10p-2A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,24	0,18	0,21	0,05
60	0,46	0,35	0,41	0,08
70	0,59	0,31	0,45	0,19
80	1,46	0,84	1,15	0,44
90	21,32	20,25	20,79	0,76
100	42,72	43,76	43,24	0,74
110	56,15	57,52	56,83	0,97
120	65,36	66,62	65,99	0,89
130	69,95	71,18	70,56	0,87
140	73,21	74,36	73,79	0,82
150	75,42	76,52	75,97	0,77
160	76,88	77,80	77,34	0,65
180	78,41	79,15	78,78	0,52
200	79,11	79,76	79,44	0,46
220	79,45	80,10	79,78	0,46
240	79,63	80,32	79,97	0,49

Preglednica XX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs11p-A, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika A, 60 obratov/min, 5 min v biorel. želodčnem mediju, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU			
t (min)	Bs11p-1A	Bs11p-2A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,02	0,00	0,01	0,01
10	0,02	0,01	0,02	0,01
20	0,06	0,11	0,09	0,03
30	-0,02	0,13	0,06	0,11
40	0,36	1,12	0,74	0,54
50	12,31	26,32	19,32	9,90
60	38,41	47,53	42,97	6,45
70	54,72	61,04	57,88	4,47
80	65,80	69,94	67,87	2,93
90	72,59	75,39	73,99	1,98
100	76,90	78,84	77,87	1,37
110	79,77	81,11	80,44	0,94
120	81,71	82,63	82,17	0,66
140	83,63	84,19	83,91	0,39
160	84,47	85,08	84,77	0,43
180	84,87	85,48	85,17	0,43

Preglednica XXI: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs12p-B, povprečje, standardna deviacija SD. (Oblika B, 60 obratov/min, 5 min v biorel. želodčnem mediju, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA B	% sproščene ZU			
t (min)	Bs12p-1B	Bs12p-2B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,03	0,02	0,02	0,00
10	0,07	0,06	0,06	0,00
20	0,19	0,16	0,17	0,02
30	0,23	0,23	0,22	0,01
40	0,48	1,39	0,93	0,63
50	17,06	25,62	21,33	6,05
60	38,77	45,64	42,20	4,86
70	53,68	59,11	56,40	3,84
80	63,41	66,91	65,16	2,48
90	69,77	72,15	70,96	1,68
100	73,78	75,18	74,48	0,99
110	76,34	77,11	76,72	0,54
120	78,02	78,30	78,16	0,20
140	79,71	79,67	79,69	0,03
160	80,43	80,20	80,31	0,17
180	80,81	80,48	80,65	0,23

Preglednica XXII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs13p-A in Bs14p-B. (Obliki A in B, 60 obratov/min, 20 min v biorel. želodčnem mediju, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU
t (min)	Bs13p-1A
0	0,00
20	0,10
30	0,15
40	0,25
50	0,60
60	11,15
70	37,16
80	54,64
90	65,41
100	72,08
110	76,26
120	78,93
140	81,63
160	82,72
180	83,19
200	83,41

OBLIKA B	% sproščene ZU
t (min)	Bs14p-1B
0	0,00
20	0,15
30	0,21
40	0,23
50	0,22
60	11,78
70	37,50
80	54,88
90	65,67
100	72,22
110	76,51
120	79,20
140	81,94
160	83,13
180	83,56
200	83,78

Preglednica XXIII:Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs15p-A, povprečje in standardna deviacija. (Oblika A, 60 obratov/min, 60 min v biorel. želodčnem mediju, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA A	% sproščene ZU			
t (min)	Bs15p-1A	Bs15p-2A	Povprečje	SD
0	0,00	0,10	0,00	0,00
30	0,13	0,10	0,12	0,02
60	0,26	0,21	0,23	0,03
70	0,26	0,22	0,24	0,02
80	0,33	0,29	0,31	0,03
90	8,94	11,28	10,11	1,65
100	32,62	36,73	34,68	2,90
110	49,01	53,69	51,35	3,31
120	59,49	65,05	62,27	3,93
130	65,64	71,15	68,40	3,90
140	69,55	74,79	72,17	3,71
150	72,02	76,94	74,48	3,48
160	73,66	78,38	76,02	3,34
180	75,40	79,79	77,59	3,10
200	76,17	80,41	78,29	3,00
220	76,56	80,69	78,62	2,92
240	76,80	80,85	78,82	2,87

Preglednica XXIV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs16p-B, povprečje in standardna deviacija. (Oblika B, 60 obratov/min, 60 min v biorel. mediju, cevka - baz. razt., HPLC)

OBLIKA B	% sproščene ZU			
t (min)	Bs16p-1B	Bs16p-2B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,10	0,04	0,07	0,04
60	0,18	0,14	0,16	0,03
70	0,15	0,13	0,14	0,02
80	0,35	0,47	0,41	0,08
90	21,95	23,52	22,74	1,11
100	46,57	46,26	46,42	0,22
110	61,52	59,08	60,30	1,72
120	71,13	67,74	69,44	2,40
130	76,33	72,12	74,22	2,98
140	79,78	75,28	77,53	3,18
150	82,00	77,28	79,64	3,34
160	83,38	78,54	80,96	3,43
180	84,85	79,93	82,39	3,48
200	85,49	80,52	83,01	3,51
220	85,78	80,95	83,37	3,41
240	85,91	81,17	83,54	3,35

6.2.2 Primerjava biorelevantnega medija s SIF praškom in brez

V preglednici XXV so prikazani rezultati testov sproščanja za Obliko A in B, ki smo jih izvajali s pretočnim sistemom z oznako Bs ter z uporabo osnovne raztopine biorelevantnega želodčnega in črevesnega medija (brez dodatka SIF praška). Farmacevtska oblika je bila izpostavljena kislemu mediju 100 minut.

Preglednica XXV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu z uporabo osnovne raztopine biorelevantnih FaSSGF in FaSSIF medijev (brez SIF praška). (Oblika A in B, 100 min, 80 obratov/min)

OBLIKA A	% sproščene ZU
t (min)	Biorel.med. brez SIF
0	0,00
30	0,23
60	0,47
100	0,69
110	0,71
120	0,79
130	2,33
140	21,14
150	43,32
160	57,93
170	67,12
180	73,09
190	76,82
200	79,20
220	81,79
240	83,08

OBLIKA B	% sproščene ZU
t (min)	Biorel.med. brez SIF
0	0,00
30	0,18
60	0,25
100	0,27
110	0,28
120	0,29
130	0,16
140	9,81
150	40,25
160	54,18
170	62,69
180	68,33
190	72,34
200	75,07
220	80,40
240	81,35

V preglednici XXVI so prikazane enačbe umeritvenih premic za osnovni raztopini biorelevantnih medijev (brez dodatka SIF praška).

Preglednica XXVI: Enačbi umeritvenih premic za osnovni raztopini biorelevantnega želodčnega in črevesnega medija (brez SIF praška).

MEDIJ			*ANALIZNA METODA*	*ENAČBA UMERITVENE PREMICE in R^2*
Osnovna razt. biorelev. želodčnega medija (FaSSGF brez SIF praška) (*pH*=1,6)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,649 · c [mg/L] + 0,8562*** *(R2=1)*
Osnovna razt. biorelev. črevesnega medija (FaSSIF brez SIF praška) (*pH*=6,5)	**0,1 M NaOH**	*vol.razm.: 1:1*	*HPLC*	***AUC = 12,37 · c [mg/L] + 2,3227*** *(R^2=1)*

6.2.3 Proučevanje vpliva časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine

V preglednicah od XXVII do XLIV so prikazani rezultati poskusov sproščanja (80 obratov/min). V preglednici VI so navedeni pogoji poskusov. V spodnjih preglednicah smo čas zadrževanja pelet v kislem označili z osenčenimi celicami in odebeljeno črto. Poleg tega so v preglednicah podani tudi rezultati računsko podaljšanih profilov sproščene ZU iz pelet. V tabelah so ti podatki navedeni pod dvojno odebeljeno črto.

Preglednica XXVII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-5/80-A, povprečje, standardna deviacija (SD). (Oblika A, 5 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU						
t (min)	Bs-5/80-1A	Bs-5/80-2A	Bs-5/80-3A	Bs-5/80-4A	Bs-5/80-5A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
5	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	**0,02**	**0,00**
10	0,04	0,05	0,03	0,03	0,02	**0,03**	**0,01**
20	0,12	0,16	0,10	0,14	0,08	**0,12**	**0,03**
30	0,27	0,33	0,25	0,27	0,19	**0,26**	**0,05**
40	1,15	1,10	0,66	0,86	0,63	**0,88**	**0,24**
50	22,52	22,90	7,59	15,79	12,87	**16,33**	**6,52**
60	44,00	42,63	35,10	43,71	36,14	**40,32**	**4,33**
70	57,99	55,72	53,53	61,70	54,11	**56,61**	**3,33**
80	66,41	63,17	65,97	72,74	64,60	**66,58**	**3,67**
90	71,85	67,97	73,96	79,54	70,67	**72,80**	**4,35**
100	75,23	71,02	79,06	83,48	74,33	**76,63**	**4,78**
120	78,66	74,29	84,33	87,55	78,09	**80,58**	**5,30**
140	80,04	75,62	86,61	89,07	79,74	**82,22**	**5,49**
160	80,64	76,24	87,64	89,69	80,38	**82,92**	**5,58**
180	80,92	76,54	88,35	89,95	80,69	**83,29**	**5,65**
200	81,08	76,64	88,92	90,11	80,96	**83,54**	
220	81,34	76,92	89,55	90,34	81,27	**83,88**	
240	81,60	77,20	90,14	90,57	81,56	**84,21**	
260	81,86	77,47	90,69	90,79	81,86	**84,53**	
280	82,11	77,74	91,22	91,01	82,14	**84,84**	
300	82,36	78,00	91,71	91,22	82,43	**85,14**	
320	82,60	78,26	92,18	91,43	82,71	**85,44**	
340	82,85	78,52	92,62	91,64	82,98	**85,72**	
360	83,08	78,78	93,04	91,83	83,25	**86,00**	
380	83,32	79,03	93,43	92,03	83,52	**86,26**	
400	83,55	79,28	93,80	92,22	83,78	**86,53**	
420	83,78	79,53	94,15	92,40	84,04	**86,78**	
440	84,01	79,77	94,48	92,58	84,29	**87,03**	

Preglednica XXVIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-5/80-B, povprečje, standardna deviacija (SD). (Oblika B, 5 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU					
t (min)	Bs-5/80-1B	Bs-5/80-2B	Bs-5/80-3B	Bs-5/80-4B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
5	0,03	0,02	0,02	0,03	**0,03**	**0,00**
10	0,08	0,07	0,08	0,07	**0,07**	**0,00**
20	0,16	0,21	0,18	0,18	**0,18**	**0,02**
30	0,19	0,27	0,21	0,21	**0,22**	**0,04**
40	0,30	1,00	0,24	0,31	**0,46**	**0,36**
50	13,28	23,58	3,68	9,81	**12,59**	**8,34**
60	39,77	44,16	31,13	34,69	**37,44**	**5,71**
70	57,60	57,62	51,33	52,29	**54,71**	**3,37**
80	68,62	65,96	64,80	64,30	**65,92**	**1,93**
90	75,73	71,62	73,32	71,16	**72,96**	**2,07**
100	80,26	75,08	78,82	75,00	**77,29**	**2,66**
120	84,85	78,59	84,60	79,42	**81,86**	**3,32**
140	86,72	80,04	87,08	81,24	**83,77**	**3,65**
160	87,46	80,72	88,11	81,93	**84,56**	**3,77**
180	87,77	81,12	88,62	82,27	**84,95**	**3,80**
200	87,98	81,34	89,10	82,77	**85,30**	
220	88,27	81,71	89,57	83,11	**85,66**	
240	88,55	82,07	90,01	83,44	**86,02**	
260	88,82	82,42	90,44	83,77	**86,36**	
280	89,08	82,77	90,86	84,09	**86,70**	
300	89,34	83,11	91,25	84,41	**87,03**	
320	89,60	83,45	91,63	84,72	**87,35**	
340	89,84	83,77	91,99	85,02	**87,66**	
360	90,08	84,10	92,33	85,32	**87,96**	
380	90,32	84,41	92,66	85,61	**88,25**	
400	90,55	84,72	92,98	85,89	**88,53**	
420	90,77	85,02	93,29	86,17	**88,81**	
440	90,99	85,32	93,57	86,44	**89,08**	

Preglednica XXIX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-20/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 20 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU						
t (min)	Bs-20/80-1A	Bs-20/80-2A	Bs-20/80-3A	Bs-20/80-4A	Bs-20/80-5A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
20	0,13	0,14	0,13	0,11	0,13	**0,12**	**0,01**
30	0,21	0,21	0,23	0,15	0,19	**0,20**	**0,03**
40	0,29	0,30	0,35	0,22	0,29	**0,29**	**0,05**
50	0,68	0,47	0,77	0,39	0,73	**0,61**	**0,17**
60	18,02	1,51	12,40	4,71	2,09	**7,75**	**7,20**
70	39,71	25,05	38,85	31,10	30,08	**32,96**	**6,22**
80	53,97	45,85	56,37	50,54	48,29	**51,01**	**4,24**
90	63,05	60,35	67,19	62,07	59,17	**62,37**	**3,09**
100	68,87	69,93	74,10	69,22	65,80	**69,58**	**2,98**
110	72,39	75,37	78,39	73,64	69,57	**73,87**	**3,29**
120	74,77	79,05	81,16	76,32	71,88	**76,64**	**3,62**
140	77,16	83,24	83,98	78,99	74,11	**79,50**	**4,15**
160	78,22	85,05	85,25	80,04	74,92	**80,70**	**4,46**
180	78,70	85,85	85,88	80,45	75,27	**81,23**	**4,62**
200	78,94	86,23	86,28	80,60	75,41	**81,49**	**4,73**
220	79,17	86,72	86,58	80,78	75,61	**81,77**	
240	79,51	87,09	86,95	80,94	75,75	**82,05**	
260	79,83	87,44	87,31	81,09	75,90	**82,31**	
280	80,15	87,79	87,66	81,24	76,04	**82,58**	
300	80,47	88,13	88,00	81,39	76,19	**82,83**	
320	80,78	88,45	88,33	81,54	76,33	**83,09**	
340	81,08	88,77	88,66	81,68	76,47	**83,33**	
360	81,38	89,08	88,97	81,83	76,61	**83,57**	
380	81,68	89,39	89,27	81,97	76,75	**83,81**	
400	81,97	89,68	89,57	82,12	76,89	**84,04**	
420	82,25	89,96	89,86	82,26	77,03	**84,27**	
440	82,54	90,24	90,14	82,40	77,17	**84,50**	

Preglednica XXX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-20/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 20 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-20/80-1B	Bs-20/80-2B	Bs-20/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,15	0,13	0,17	0,15	0,02
30	0,21	0,17	0,22	0,20	0,02
40	0,23	0,19	0,22	0,21	0,03
50	0,22	0,20	0,27	0,23	0,04
60	13,12	3,52	10,37	9,00	4,94
70	40,46	29,99	38,61	36,36	5,59
80	58,07	50,55	57,29	55,30	4,14
90	68,71	63,90	69,19	67,27	2,93
100	75,56	72,43	77,04	75,01	2,36
110	79,80	77,26	81,96	79,67	2,36
120	82,62	80,59	85,25	82,82	2,34
140	85,40	84,29	88,83	86,17	2,37
160	86,52	85,50	90,27	87,43	2,51
180	87,08	86,00	90,92	88,00	2,59
200	87,31	86,25	91,22	88,26	2,62
220	87,58	86,58	91,48	88,55	
240	87,80	86,92	91,77	88,83	
260	88,02	87,26	92,04	89,11	
280	88,23	87,59	92,31	89,38	
300	88,44	87,90	92,56	89,64	
320	88,65	88,21	92,81	89,89	
340	88,85	88,52	93,05	90,14	
360	89,05	88,81	93,29	90,38	
380	89,25	89,10	93,51	90,62	
400	89,44	89,38	93,73	90,85	
420	89,63	89,65	93,94	91,07	
440	89,81	89,92	94,14	91,29	

Preglednica XXXI: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-40/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 40 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-40/80-1A	Bs-40/80-2A	Bs-40/80-3A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
20	0,12	0,17	0,19	**0,16**	**0,04**
40	0,30	0,32	0,40	**0,34**	**0,05**
50	0,35	0,35	0,44	**0,38**	**0,05**
60	0,40	0,41	0,52	**0,44**	**0,06**
70	2,35	0,81	1,79	**1,650**	**0,78**
80	24,13	13,86	27,23	**21,74**	**7,00**
90	47,04	39,51	49,92	**45,49**	**5,37**
100	61,47	56,65	64,60	**60,90**	**4,00**
110	70,71	67,95	72,93	**70,53**	**2,50**
120	76,44	74,75	78,10	**76,43**	**1,68**
130	80,14	79,02	81,33	**80,16**	**1,16**
140	82,49	81,80	83,44	**82,57**	**0,82**
160	84,98	84,62	85,21	**84,94**	**0,30**
180	86,06	85,86	85,91	**85,95**	**0,10**
200	86,66	86,44	86,23	**86,44**	**0,22**
220	86,94	86,69	86,39	**86,68**	**0,29**
240	87,19	87,10	86,58	**86,96**	
260	87,47	87,35	86,74	**87,19**	
280	87,74	87,60	86,90	**87,41**	
300	88,01	87,85	87,06	**87,64**	
320	88,27	88,09	87,21	**87,86**	
340	88,52	88,33	87,36	**88,07**	
360	88,77	88,56	87,51	**88,28**	
380	89,02	88,78	87,66	**88,49**	
400	89,25	89,01	87,81	**88,69**	
420	89,49	89,22	87,96	**88,89**	
440	89,72	89,44	88,10	**89,08**	

Preglednica XXXII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-40/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 40 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-40/80-1B	Bs-40/80-2B	Bs-40/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
20	0,14	0,13	0,19	**0,15**	**0,03**
40	0,23	0,20	0,31	**0,25**	**0,06**
50	0,23	0,20	0,31	**0,24**	**0,05**
60	0,21	0,19	0,28	**0,23**	**0,05**
70	3,80	0,57	2,58	**2,32**	**1,63**
80	25,43	23,12	30,33	**26,29**	**3,68**
90	48,06	47,43	52,66	**49,38**	**2,86**
100	62,75	64,56	67,29	**64,87**	**2,29**
110	72,00	74,63	75,23	**73,96**	**1,72**
120	77,88	80,07	79,80	**79,25**	**1,20**
130	81,58	83,36	82,30	**82,41**	**0,90**
140	84,04	85,46	83,98	**84,49**	**0,84**
160	86,69	87,45	85,41	**86,51**	**1,03**
180	87,76	88,24	85,97	**87,32**	**1,20**
200	88,22	88,65	86,27	**87,71**	**1,27**
220	88,41	88,80	86,39	**87,86**	**1,30**
240	88,51	88,86	86,45	**87,94**	
260	88,69	89,00	86,56	**88,08**	
280	88,88	89,13	86,67	**88,22**	
300	89,04	89,26	86,77	**88,36**	
320	89,22	89,39	86,88	**88,49**	
340	89,39	89,51	86,98	**88,63**	
360	89,56	89,64	87,09	**88,76**	
380	89,72	89,76	87,19	**88,89**	
400	89,89	89,88	87,29	**89,02**	
420	90,05	90,00	87,39	**89,148**	
440	90,21	90,12	87,49	**89,274**	

Preglednica XXXIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-60/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 60 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU						
t (min)	Bs-60/80-1A	Bs-60/80-2A	Bs-60/80-3A	Bs-60/80-4A	Bs-60/80-5A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,24	0,20	0,20	0,18	0,22	**0,21**	**0,02**
60	0,47	0,35	0,34	0,31	0,42	**0,38**	**0,07**
70	0,50	0,38	0,39	0,33	0,46	**0,41**	**0,07**
80	0,57	0,43	0,47	0,43	0,52	**0,48**	**0,06**
90	7,73	1,49	8,60	8,72	11,44	**7,60**	**3,68**
100	31,93	22,13	33,24	36,18	37,74	**32,24**	**6,10**
110	48,95	45,55	49,84	55,16	55,38	**50,98**	**4,24**
120	59,92	60,82	60,04	65,62	65,29	**62,34**	**2,87**
130	66,63	71,06	66,38	72,19	70,97	**69,45**	**2,73**
140	70,84	76,73	70,16	76,22	74,43	**73,68**	**3,03**
150	73,60	80,32	72,53	78,87	76,65	**76,39**	**3,33**
160	75,33	82,41	74,05	80,37	77,96	**78,03**	**3,46**
180	77,19	84,74	75,51	83,27	79,27	**79,99**	**3,93**
200	78,00	85,64	76,17	83,93	79,83	**80,71**	**3,98**
220	78,43	86,40	76,51	84,22	80,06	**81,12**	**4,10**
240	78,60	86,75	76,75	84,41	80,16	**81,33**	**4,14**
260	78,80	87,09	76,93	84,84	80,05	**81,54**	
280	78,97	87,42	77,20	85,08	80,13	**81,76**	
300	79,13	87,74	77,48	85,32	80,21	**81,98**	
320	79,30	88,06	77,74	85,55	80,29	**82,19**	
340	79,46	88,36	78,01	85,78	80,37	**82,40**	
360	79,63	88,66	78,27	86,01	80,44	**82,60**	
380	79,79	88,95	78,53	86,23	80,52	**82,81**	
400	79,95	89,24	78,79	86,45	80,60	**83,00**	
420	80,11	89,51	79,04	86,66	80,68	**83,20**	
440	80,27	89,78	79,29	86,88	80,75	**83,39**	

Preglednica XXXIV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-60/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 60 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-60/80-1B	Bs-60/80-2B	Bs-60/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00
30	0,20	0,23	0,142	0,19	0,05
60	0,27	0,29	0,258	0,28	0,02
70	0,25	0,28	0,25	0,26	0,02
80	0,23	0,25	0,24	0,24	0,02
90	16,28	0,44	19,39	12,04	10,16
100	41,45	23,66	46,13	37,08	11,85
110	58,05	47,63	63,14	56,28	7,91
120	68,46	62,58	73,59	68,21	5,51
130	74,44	71,80	79,88	75,37	4,12
140	78,30	78,14	83,59	80,01	3,10
150	80,77	81,62	85,92	82,77	2,76
160	82,32	83,97	87,45	84,58	2,62
180	83,80	86,48	88,89	86,39	2,54
200	84,40	87,49	89,48	87,12	2,56
220	84,74	87,93	89,72	87,46	2,52
240	84,86	88,12	89,88	87,62	2,54
260	84,99	88,36	90,17	87,84	
280	85,11	88,54	90,37	88,00	
300	85,23	88,72	90,56	88,17	
320	85,34	88,90	90,74	88,33	
340	85,46	89,08	90,93	88,49	
360	85,58	89,25	91,11	88,64	
380	85,69	89,42	91,28	88,80	
400	85,81	89,59	91,46	88,95	
420	85,92	89,75	91,62	89,10	
440	86,03	89,92	91,79	89,25	

Preglednica XXXV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-80/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 80 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
t (min)	Bs-80/80-1A	Bs-80/80-2A	Bs-80/80-3A	Bs-80/80-4A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
40	0,33	0,23	0,26	0,26	**0,27**	**0,04**
80	0,54	0,37	0,44	0,46	**0,45**	**0,07**
90	0,54	0,38	0,46	0,47	**0,46**	**0,07**
100	0,59	0,45	2,20	0,56	**0,95**	**0,84**
110	0,96	8,94	26,85	12,97	**12,43**	**10,83**
120	20,58	30,67	46,55	36,39	**33,55**	**10,86**
130	42,68	47,01	57,58	52,39	**49,91**	**6,47**
140	57,49	55,46	64,79	62,45	**60,05**	**4,32**
150	67,11	61,64	68,52	68,05	**66,33**	**3,18**
160	72,95	65,72	70,81	71,54	**70,25**	**3,15**
170	76,08	68,46	72,18	73,63	**72,59**	**3,19**
180	78,40	70,24	73,05	74,95	**74,16**	**3,42**
200	80,86	72,13	73,98	76,32	**75,82**	**3,77**
220	82,00	72,98	74,40	76,82	**76,55**	**3,97**
240	82,57	73,38	74,63	77,04	**76,90**	**4,07**
260	82,85	73,58	74,76	77,14	**77,08**	**4,12**
280	83,01	74,01	75,26	77,03	**77,33**	
300	83,28	74,21	75,46	77,17	**77,53**	
320	83,55	74,42	75,65	77,31	**77,73**	
340	83,81	74,62	75,85	77,44	**77,93**	
360	84,07	74,82	76,04	77,58	**78,13**	
380	84,32	75,02	76,23	77,71	**78,32**	
400	84,57	75,22	76,42	77,84	**78,51**	
420	84,81	75,42	76,61	77,98	**78,70**	
440	85,05	75,62	76,79	78,11	**78,89**	

Preglednica XXXVI: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-80/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 80 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-80/80-1B	Bs-80/80-2B	Bs-80/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**
40	0,20	0,26	0,19	0,22	**0,04**
80	0,23	0,30	0,24	0,25	**0,04**
90	0,20	0,29	0,23	0,24	**0,05**
100	0,19	0,34	0,64	0,39	**0,23**
110	0,19	1,96	21,11	7,75	**11,60**
120	13,64	36,10	45,12	31,62	**16,21**
130	47,62	57,11	59,78	54,84	**6,39**
140	62,92	67,18	68,77	66,29	**3,03**
150	71,55	74,80	73,83	73,40	**1,67**
160	77,26	79,44	76,99	77,90	**1,34**
170	80,76	82,23	78,88	80,62	**1,68**
180	83,06	84,10	80,04	82,40	**2,11**
200	85,43	85,96	81,19	84,19	**2,61**
220	86,43	86,78	81,68	84,97	**2,85**
240	86,88	87,15	81,92	85,32	**2,95**
260	87,09	87,32	82,07	85,49	**2,97**
280	87,35	87,59	82,10	85,68	
300	87,55	87,76	82,27	85,86	
320	87,75	87,94	82,45	86,05	
340	87,95	88,10	82,62	86,22	
360	88,13	88,27	82,80	86,40	
380	88,33	88,43	82,97	86,58	
400	88,51	88,59	83,14	86,75	
420	88,69	88,75	83,31	86,92	
440	88,87	88,91	83,47	87,08	

Preglednica XXXVII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-100/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 100 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
t (min)	Bs-100/80-1A	Bs-100/80-2A	Bs-100/80-3A	Bs-100/80-4A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,19	0,23	0,20	0,23	**0,21**	**0,02**
60	0,38	0,43	0,38	0,50	**0,42**	**0,06**
100	0,53	0,57	0,53	0,66	**0,57**	**0,06**
110	0,54	0,60	0,55	0,67	**0,59**	**0,06**
120	0,58	0,80	0,72	0,75	**0,71**	**0,10**
130	1,84	15,24	9,93	9,66	**9,17**	**5,52**
140	22,73	38,80	31,63	34,25	**31,85**	**6,77**
150	44,56	55,48	48,44	51,45	**49,98**	**4,62**
160	57,01	65,86	58,95	62,60	**61,11**	**3,93**
170	64,69	72,48	65,25	69,20	**67,90**	**3,65**
180	69,38	76,75	69,32	73,21	**72,17**	**3,56**
190	72,13	79,42	71,86	75,59	**74,75**	**3,55**
200	74,00	81,25	73,61	77,12	**76,49**	**3,54**
220	75,86	83,25	75,53	78,70	**78,34**	**3,57**
240	76,74	84,15	76,47	79,44	**79,20**	**3,56**
260	77,14	84,61	76,99	79,76	**79,63**	**3,56**
280	77,69	84,89	77,24	79,92	**79,93**	**3,50**
300	78,09	85,07	77,49	80,01	**80,17**	**3,44**
320	78,48	85,07	77,39	80,06	**80,25**	
340	78,87	85,27	77,61	80,18	**80,48**	
360	79,24	85,48	77,84	80,30	**80,71**	
380	79,61	85,68	78,06	80,42	**80,94**	
400	79,98	85,88	78,27	80,53	**81,17**	
420	80,33	86,08	78,49	80,65	**81,39**	
440	80,69	86,27	78,70	80,77	**81,61**	

Preglednica XXXVIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-100/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 100 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-100/80-1B	Bs-100/80-2B	Bs-100/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,25	0,21	0,20	**0,22**	**0,03**
60	0,34	0,29	0,27	**0,30**	**0,03**
100	0,37	0,33	0,32	**0,34**	**0,03**
110	0,37	0,35	0,33	**0,35**	**0,02**
120	0,36	0,37	0,33	**0,36**	**0,02**
130	0,34	6,15	0,86	**2,45**	**3,22**
140	0,55	44,24	34,47	**26,42**	**22,93**
150	31,21	61,89	52,64	**48,58**	**15,74**
160	53,36	71,05	64,11	**62,84**	**8,91**
170	67,08	76,26	70,69	**71,34**	**4,63**
180	74,83	79,46	74,96	**76,42**	**2,64**
190	79,55	81,38	77,49	**79,47**	**1,95**
200	82,73	82,71	79,08	**81,51**	**2,10**
220	86,30	83,93	80,73	**83,65**	**2,80**
240	87,77	84,46	81,53	**84,59**	**3,12**
260	88,44	84,72	81,93	**85,03**	**3,27**
280	89,00	84,91	82,14	**85,35**	**3,45**
300	89,60	85,01	82,28	**85,63**	**3,70**
320	90,17	85,29	82,52	**85,99**	
340	90,70	85,44	82,69	**86,28**	
360	91,21	85,58	82,87	**86,55**	
380	91,69	85,73	83,04	**86,82**	
400	92,14	85,87	83,21	**87,07**	
420	92,57	86,01	83,37	**87,32**	
440	92,97	86,15	83,54	**87,55**	

Preglednica XXXIX: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-120/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 120 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-120/80-1A	Bs-120/80-2A	Bs-120/80-3A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,29	0,22	0,23	**0,25**	**0,04**
60	0,50	0,39	0,40	**0,43**	**0,06**
90	0,68	0,50	0,51	**0,56**	**0,10**
120	0,75	0,56	0,57	**0,63**	**0,10**
130	0,75	0,57	0,58	**0,63**	**0,10**
140	0,88	0,68	0,68	**0,75**	**0,11**
150	1,45	1,03	4,18	**2,22**	**1,71**
160	11,95	9,81	23,69	**15,15**	**7,47**
170	34,38	33,13	41,77	**36,43**	**4,67**
180	51,08	49,52	53,69	**51,43**	**2,11**
190	61,28	60,25	61,32	**60,95**	**0,61**
200	67,62	66,71	66,16	**66,83**	**0,74**
210	71,54	70,76	69,14	**70,48**	**1,23**
220	74,11	73,44	71,24	**72,93**	**1,50**
240	76,75	76,40	73,33	**75,49**	**1,88**
260	78,03	77,85	74,41	**76,76**	**2,04**
280	78,76	78,56	74,98	**77,43**	**2,13**
300	79,53	78,99	75,32	**77,95**	**2,29**
320	80,22	79,41	75,78	**78,47**	
340	80,88	79,94	76,21	**79,01**	
360	81,52	80,45	76,63	**79,53**	
380	82,14	80,95	77,05	**80,05**	
400	82,73	81,44	77,46	**80,54**	
420	83,31	81,92	77,86	**81,03**	
440	83,87	82,38	78,26	**81,50**	

Preglednica XL: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-120/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 120 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-120/80-1B	Bs-120/80-2B	Bs-120/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,19	0,23	0,16	**0,19**	**0,04**
60	0,27	0,32	0,24	**0,27**	**0,04**
90	0,34	0,34	0,28	**0,32**	**0,04**
120	0,42	0,36	0,30	**0,36**	**0,06**
130	0,43	0,35	0,30	**0,36**	**0,07**
140	0,42	0,35	0,30	**0,36**	**0,06**
150	0,43	0,34	0,50	**0,42**	**0,08**
160	45,98	11,35	50,32	**35,88**	**21,35**
170	54,02	47,33	56,35	**52,57**	**4,68**
180	58,58	53,37	61,19	**57,71**	**3,98**
190	63,09	59,25	64,90	**62,41**	**2,89**
200	66,71	64,35	68,11	**66,39**	**1,90**
210	69,49	68,66	70,43	**69,52**	**0,89**
220	71,99	71,96	72,59	**72,18**	**0,35**
240	75,31	76,17	75,24	**75,57**	**0,52**
260	79,16	78,48	76,77	**78,14**	**1,23**
280	80,24	79,97	77,98	**79,40**	**1,24**
300	81,48	80,90	78,87	**80,42**	**1,37**
320	82,45	82,00	80,05	**81,50**	
340	83,38	82,84	80,98	**82,40**	
360	84,25	83,65	81,88	**83,26**	
380	85,08	84,41	82,72	**84,07**	
400	85,86	85,14	83,53	**84,85**	
420	86,61	85,84	84,31	**85,58**	
440	87,310	86,50	85,04	**86,29**	

Preglednica XLI: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-150/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 150 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-150/80-1A	Bs-150/80-2A	Bs-150/80-3A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,23	0,22	0,28	**0,25**	**0,03**
60	0,41	0,42	0,48	**0,44**	**0,04**
90	0,51	0,57	0,62	**0,57**	**0,05**
120	0,60	0,66	0,70	**0,65**	**0,05**
150	0,64	0,77	0,79	**0,73**	**0,08**
160	0,64	0,85	0,86	**0,78**	**0,12**
170	0,68	1,08	0,98	**0,92**	**0,21**
180	0,80	2,21	1,82	**1,61**	**0,73**
190	1,37	8,43	4,65	**4,81**	**3,53**
200	8,49	22,92	16,31	**15,91**	**7,22**
210	24,34	36,30	28,50	**29,72**	**6,07**
220	37,02	44,72	37,81	**39,85**	**4,24**
230	45,36	50,73	43,94	**46,68**	**3,58**
240	51,37	54,84	48,17	**51,46**	**3,33**
260	58,38	59,47	53,20	**57,02**	**3,35**
280	61,37	61,79	56,02	**59,73**	**3,22**
300	62,98	63,12	57,61	**61,24**	**3,14**
320	63,95	63,89	58,52	**62,12**	**3,12**
340	64,51	64,57	59,19	**62,76**	**3,09**
360	64,88	65,08	59,82	**63,26**	**2,98**
380	65,98	65,45	60,25	**63,89**	**3,17**
400	66,45	65,47	60,15	**64,03**	
420	66,92	65,89	60,55	**64,45**	
440	67,38	66,29	60,94	**64,87**	

Preglednica XLII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-150/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 150 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-150/80-1B	Bs-150/80-2B	Bs-150/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,22	0,22	0,19	**0,21**	**0,02**
60	0,30	0,34	0,25	**0,30**	**0,05**
90	0,34	0,54	0,31	**0,40**	**0,12**
120	0,40	0,68	0,48	**0,52**	**0,14**
150	0,45	0,79	0,58	**0,61**	**0,17**
160	0,47	0,81	0,59	**0,62**	**0,17**
170	0,44	0,80	0,59	**0,61**	**0,18**
180	0,49	0,82	0,59	**0,63**	**0,17**
190	0,43	1,30	0,95	**0,89**	**0,44**
200	0,83	3,43	2,12	**2,13**	**1,30**
210	2,75	10,54	5,23	**6,17**	**3,98**
220	7,73	19,77	12,19	**13,23**	**6,08**
230	16,23	29,74	22,59	**22,85**	**6,76**
240	26,42	39,37	32,08	**32,62**	**6,49**
260	44,53	52,80	45,81	**47,71**	**4,45**
280	55,15	57,62	53,13	**55,30**	**2,25**
300	60,75	60,34	56,01	**59,03**	**2,62**
320	63,42	61,96	57,63	**61,00**	**3,01**
340	64,70	63,08	58,69	**62,16**	**3,11**
360	65,30	63,96	59,29	**62,85**	**3,15**
380	66,48	64,55	59,64	**63,56**	**3,52**
400	67,07	65,12	60,43	**64,21**	
420	67,66	65,82	60,90	**64,79**	
440	68,24	66,49	61,36	**65,36**	

Preglednica XLIII: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-200/80-A, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika A, 200 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA A	% sproščene ZU					
t (min)	Bs-200/80-1A	Bs-200/80-2A	Bs-200/80-3A	Bs-200/80-4A	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**	**0,00**
30	0,18	0,23	0,24	0,18	**0,21**	**0,03**
60	0,37	0,45	0,43	0,32	**0,39**	**0,06**
90	0,49	0,55	0,55	0,42	**0,50**	**0,06**
120	0,58	0,62	0,60	0,50	**0,58**	**0,06**
150	0,65	0,71	0,64	0,58	**0,64**	**0,05**
180	0,71	0,87	0,70	0,72	**0,75**	**0,08**
200	0,76	0,95	0,74	0,82	**0,82**	**0,09**
210	0,76	0,94	0,73	0,85	**0,82**	**0,10**
220	0,75	0,94	0,74	0,90	**0,83**	**0,10**
230	0,75	1,08	0,92	1,26	**1,00**	**0,22**
240	0,88	1,28	1,20	1,80	**1,29**	**0,38**
250	1,03	1,68	2,50	2,92	**2,03**	**0,84**
260	4,60	3,33	5,20	5,86	**4,75**	**1,08**
270	10,65	5,58	8,21	9,57	**8,50**	**2,19**
280	15,96	7,74	10,71	12,32	**11,68**	**3,43**
290	20,04	9,61	12,62	14,64	**14,23**	**4,39**
300	23,09	11,32	14,25	16,56	**16,30**	**5,01**
320	27,22	14,23	17,21	19,43	**19,52**	**5,56**
340	29,84	16,41	19,47	21,50	**21,81**	**5,75**
360	31,74	18,24	21,56	23,09	**23,66**	**5,76**
380	33,43	19,78	23,45	24,51	**25,29**	**5,79**
400	34,69	21,17	25,30	25,81	**26,74**	**5,69**
420	35,80	22,27	26,75	27,04	**27,97**	**5,66**
440	35,80	23,24	28,08	28,01	**28,78**	**5,19**

Preglednica XLIV: Odstotki sproščene ZU pri poskusu Bs-200/80-B, povprečje in standardna deviacija (SD). (Oblika B, 200 min v biorel. kislem mediju)

OBLIKA B	% sproščene ZU				
t (min)	Bs-200/80-1B	Bs-200/80-2B	Bs-200/80-3B	Povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**
30	0,24	0,21	0,14	0,20	**0,05**
60	0,33	0,28	0,22	0,28	**0,06**
90	0,36	0,32	0,26	0,31	**0,05**
120	0,41	0,40	0,34	0,38	**0,04**
150	0,47	0,54	0,47	0,49	**0,04**
180	0,51	0,69	0,58	0,59	**0,09**
200	0,50	0,71	0,62	0,61	**0,10**
210	0,49	0,72	0,62	0,61	**0,12**
220	0,60	0,69	0,61	0,60	**0,10**
230	0,47	0,67	0,60	0,58	**0,10**
240	0,47	0,64	0,73	0,61	**0,13**
250	0,36	1,03	1,66	1,02	**0,65**
260	0,93	2,65	3,87	2,48	**1,48**
270	2,86	5,94	7,70	5,50	**2,45**
280	6,23	12,09	14,99	11,11	**4,47**
290	11,73	21,07	23,48	18,76	**6,21**
300	18,83	29,96	29,57	26,12	**6,32**
320	32,56	38,81	37,11	36,16	**3,23**
340	40,40	43,58	40,57	41,52	**1,79**
360	44,39	45,69	42,10	44,06	**1,82**
380	46,47	46,57	42,76	45,26	**2,17**
400	47,42	46,93	43,03	45,79	**2,40**
420	47,83	47,06	43,13	46,01	**2,52**
440	47,83	47,14	43,18	46,05	**2,51**

6.2.4 Povprečni oteženi profili sproščanja

V preglednici XLV sta podana izračunana povprečna otežena profila sproščanja v biorelevantnem FaSSGF in FaSSIF mediju za Obliko A in Obliko B.

Preglednica XLV: Izračunani povprečni oteženi odstotki sproščene učinkovine za Obliko A in B.

t (min)	Povprečni oteženi % sproščene ZU (Oblika A)	Povprečni oteženi % sproščene ZU (Oblika B)
0	0,00	0,00
20	0,14	0,15
40	0,39	0,27
60	9,20	8,89
80	27,16	28,66
100	42,85	45,26
120	53,51	56,04
140	60,63	63,58
160	65,06	69,47
180	68,24	72,13
200	70,42	73,30
220	72,47	74,59
240	73,58	76,13
260	74,47	77,50
280	75,46	78,93
300	76,17	80,66
320	76,71	81,87
340	77,15	82,62
360	77,55	83,09
380	77,94	83,44
400	78,27	83,73
420	78,60	83,98
440	78,89	84,21

7 Razprava

V diplomski nalogi smo pri testih sproščanja, katerih namen je bil proučevanje vpliva časa zadrževanja farmacevtske oblike v kislem na sproščanje, medsebojna primerjava dobljenih profilov ter napoved in vivo sproščanja, uporabili Obliko A in Obliko B. Obe obliki sta orodisperzibilni tableti, ki sta sestavljeni iz pomožnih snovi in gastrorezistentnih pelet, ki vsebujejo acidolabilno zdravilno učinkovino. Ker tablete v stiku s tekočino hitro razpadejo na gastrorezistentne pelete in pomožne snovi, smo se v diplomski nalogi osredotočili na sproščanje acidolabilne ZU iz pelet. Z uporabo gastrorezistentnih pelet je doseženo zakasnjeno sproščanje acidolabilne ZU in zaščita zdravilne učinkovine pred vplivom kislega okolja v želodcu. Kadar imamo opravka z gastrorezistentnimi oblikami, je pomembno, da jih apliciramo v času, ko je pH v želodcu nizek. S tem zagotovimo ustrezno zaščito acidolabilne ZU, saj se pri nižjih pH obloga ne raztaplja. Sproščanje acidolabilne ZU iz gastrorezistentnih pelet naj bi se tako pričelo v tankem črevesu, kjer je pH od 4,9 do 8 (1). Višji pH povzroči raztapljanje obloge in na ta način omogoči sproščanje ZU iz FO.

Sproščanje zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike na ustreznem mestu v telesu je pomemben proces. ZU se lahko absorbira, če se nahaja v sproščeni in raztopljeni obliki. Zato je nujno, da pri načrtovanju zdravil izvajamo teste sproščanja. Z uporabo različnih testov sproščanja, lahko poleg kontroliranja kakovosti izdelka in ustreznosti farmacevtske oblike napovedujemo tudi *in vivo* obnašanje oblike po aplikaciji. *In vitro* testi sproščanja nam tako omogočajo zmanjšanje obsega dela pri razvoju oblik in med drugim tudi zmanjšanje števila in obsega kliničnih oz. farmakokinetičnih študij. Rezultat testov sproščanja so dobljeni profili, v katerih se izražajo lastnosti zdravilne učinkovine, lastnosti uporabljene farmacevtske oblike, ustreznost proizvodnega procesa ter lastnosti uporabljene aparature za testiranje sproščanja. Pri testih sproščanja lahko uporabljamo sedem farmakopejskih aparatur, med katerimi se največ uporabljajo aparat s košarico (aparat I), aparat z veslom (aparat II), aparat z recipročnimi cilindri (aparat III) in aparat s pretočno celico (aparat IV). Uporaba oficinalnih farmakopejskih metod nam omogoča mednarodno harmonizacijo testiranja sproščanja. Z uporabo različnih modifikacij farmakopejskih sistemov in sistemov, ki niso navedeni v Evropski farmakopeji, želimo posnemati dodatne fiziološke faktorje, ki vplivajo na sproščanje (28). Ena od teh, nefarmakopejskih metod je tudi pretočni sistem z magnetom v silikonski cevki.

7.1 Posnemanje fizioloških pogojev

Pri *in vitro* testih sproščanja smo fiziološke pogoje posnemali z uporabo pretočnega sistema z magnetom v silikonski cevki in uporabo biorelevantnih medijev.

7.1.1 Mehanski vpliv

V času na tešče se v želodcu in tankem črevesu pojavijo MMC kontrakcije, ki lahko vplivajo na sproščanje zdravilne učinkovine iz Oblike A in Oblike B. Za ponazoritev mehanskega gibanja v GIT in posledično mehanskega vpliva na sproščanje ZU iz farmacevtske oblike v *in vitro* testih sproščanja, smo uporabili v delovni čaši magnet v silikonski cevki z nastavljeno hitrostjo vrtenja (50, 60 in 80 obratov/min). Magnet, ki je vstavljen v silikonsko cevko, je zelo majhen. Poleg tega se na obeh koncih silikonske cevke naredi tudi mehurček zraka, ki preprečuje vdor medija v cevko. Z uporabo takšnega magneta je obremenitev na sistem zelo majhna, vendar dovolj učinkovita, da povzročimo stalno mešanje in gibanje pelet v mediju. Z uporabo mehanske sile magneta v silikonski cevki, ki deluje na farmacevtsko obliko, lahko ponazarjamo sproščanje ZU iz Oblike A in Oblike B, ki je posledica mehanskega odstranjevanja difuznega sloja iz pelet. Ko gastrorezistentne pelete zadržujemo v želodčnem mediju, naj se ne bi sprostilo nič ZU, saj so pelete z acidolabilno ZU obložene z gastrorezistentno oblogo. V primeru poškodbe ali razpoke obloge bi lahko prišlo do sproščanja ZU, ki bi v kislem mediju razpadla. V tem primeru, bi lahko na hitrejše sproščanje ZU vplivala tudi mehanska sila.

7.1.2 Volumen

Z uporabo majhnih volumnov umetnih medijev (40 ml) v delovni čaši pri *in vitro* testih sproščanja lahko ponazorimo fiziološke pogoje. V literaturi zasledimo podatke, da je volumen tekočine v želodcu v stanju na tešče od 20 do 30 ml (1), v tankem črevesu pa od 45 do 319 ml, pri čemer celoten volumen ni na voljo naenkrat, ampak predstavlja kumulativni volumen vzdolž celotnega tankega črevesa. V tankem črevesu se tekočina pojavlja v obliki žepkov po nekaj ml tekočine, v drugih predelih tega dela prebavnega trakta pa je prisotna minimalna količina tekočine (25).

7.1.3 Pretok

Poleg uporabe majhnih volumnov je prednost pretočnega sistema z magnetom v silikonski cevki uporaba črpalke, ki po cevkah stalno dovaja svež medij in odnaša raztopljeni del zdravilne učinkovine iz medija. Prednost uporabe črpalke in cevk za dovajanje ter odvajanje medija je tudi ta, da na ta način omogočimo manj obremenilno zamenjavo

umetnega želodčnega medija s črevesnim v primerjavi z drugimi aparaturami, pri katerih je potrebno vlivanje ali dolivanje medija ob menjavi (npr. USP 1 ali USP 2). Pri *in vitro* testih sproščanja na izbrani aparaturi smo pri vseh poskusih nastavili hitrosti črpanja pretočne črpalke na 2 ml/min, kar naj bi ponazarjalo pretoke v GIT. Fiziološka vrednost pretoka v črevesu v stanju na tešče znaša od 0 do 2 ml/min (1).

7.1.4 Temperatura

Z uporabo pretočnega sistema z magnetom v silikonski cevki smo lahko ponazorili tudi temperaturo v telesu, ki v povprečju znaša 36,7 ± 0,4°C za moške in 36,9 ± 0,4°C za ženske (27). Vodno kopel smo segreli na 36,5 °C in posledično segreli na to temperaturo tudi medij, v katerem smo testirali sproščanje ZU iz Oblike A in B.

7.1.5 pH

Pri načrtovanju *in vitro* testov sproščanja je za ponazarjanje fizioloških pogojev na tešče pomembno upoštevati pH v gastrointestinalnem traktu, ki lahko pomembno vpliva na samo sproščanje. V literaturi zasledimo podatke, da je pH v želodcu na tešče od 1,4 do 2,1 (1). V ta namen smo v preliminarnih testih sproščanja uporabili 0,01 M HCl s pH 2. Kisli želodčni medij smo ponazarjali tudi z uporabo biorelevantnega želodčnega medija (FaSSGF) s pH 1,6. Fiziološki pH v tankem črevesu pa se giblje od 4,9 do 8,0 (1). Za ponazarjanje fiziološkega pH v tem delu gastrointestinalnega trakta smo v preliminarnih testih sproščanja uporabili fosfatni pufer s pH 6,8 in v nadaljevanju biorelevantni črevesni medij (FaSSIF) s pH 6,5. Z namenom čim bolje ponazoriti dogajanje v gastrointestinalnem traktu smo preskok pH, kateremu je izpostavljena farmacevtska oblika pri prehodu iz želodca (pH = 1,4–2,1 (1)) v dvanajstnik (pH = 4,9–6,4 (1)), ponazorili s hitrejšim dvigom pH v delovni čaši. V ta namen smo uporabili bazično raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, katere dodatek skrajša čas, ki je potreben za dvig pH na želeno vrednost pH črevesnega medija.

7.1.6 Površinska napetost

Poleg vseh omenjenih fizioloških lastnosti prebavnega trakta lahko z uporabo FaSSGF in FaSSIF medijev ponazorimo tudi vpliv površinske napetosti. E. Jantratid in J. Dressman (22) ter M. Marques (23) so pripravili recepturo za pripravo biorelevantnih medijev, ki vsebujejo površinsko aktivni snovi, natrijev tauroholat in lecitin, ki znižujeta površinsko napetost medija na fiziološko raven. Površinska napetost želodčnega soka je zaradi prisotnosti površinsko aktivnih snovi v primerjavi z vodo nižja in znaša 35–45 mN/m (1). Zelo podobno vrednost površinske napetosti dobimo tudi s pripravo biorelevantnega

želodčnega medija (FaSSGF), ki znaša 42,6 mN/m (22). Za dvanajstnik je značilno, da se vanj izliva vsebina iz žolčnika. Žolč je sestavljen iz vode, elektrolitov, soli žolčnih kislin (67 %), fosfolipidov (lecitina) (22 %), holesterola (4 %) in beljakovin (4 %) (26). V literaturi navajajo, da se koncentracija žolčnih soli v tankem črevesu v stanju na tešče giblje okoli 3–5 mM (1). Na podlagi teh podatkov so za pripravo biorelevantnega črevesnega medija na tešče izbrali koncentracijo natrijevega tauroholata 3 mM (24). Natrijev tauroholat je bil izbran kot predstavnik žolčnih soli v biorelevantnih medijih, saj sta glavni primarni žolčni kislini v telesu ravno holna in henodeoksiholna kislina. COOH skupine žolčnih kislin so pri pH telesnih tekočin popolnoma ionizirane, zato žolčne kisline v žolču obstajajo kot soli, predvsem natrijeve (26). V sestavi FaSSGF in FaSSIF je v obeh primerih upoštevano tudi koncentracijsko razmerje med natrijevim tauroholatom in lecitinom, ki je 4:1, saj je koncentracija žolčnih soli v gastrointestinalnem traktu mnogo večja od koncentracije lecitina.

7.1.7 Encimi

S pomočjo ustreznega medija, ki vsebuje encime, ki so prisotni vzdolž prebavnega trakta, lahko ponazarjamo še dodatni vpliv na sproščanje ZU iz FO. E. Jantratid in J. Dressman (22) v recepturi za pripravo biorelevantnega želodčnega medija navajata dodatek želodčnega encima pepsina v koncentraciji 0,1 mg/ml.

7.1.8 Prehod farmacevtske oblike

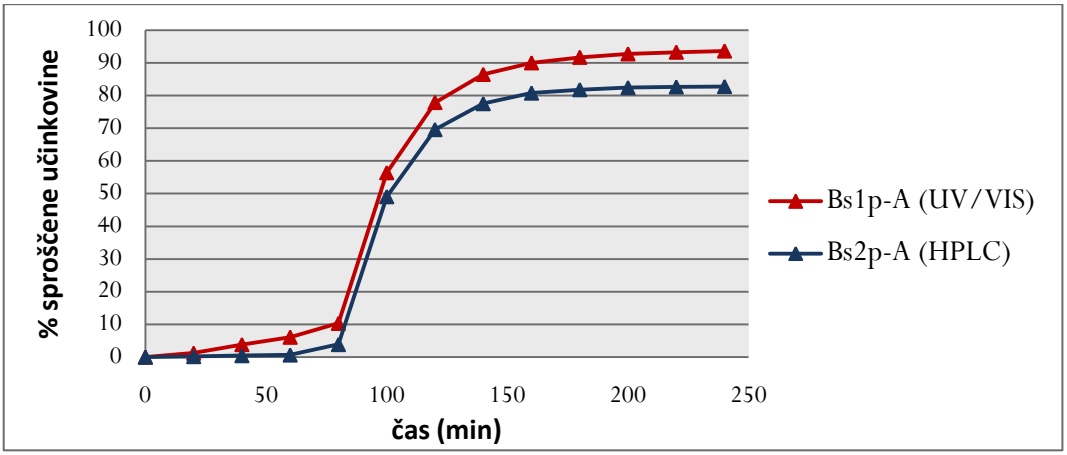
Na samo sproščanje zdravilne učinkovine iz pelet vpliva tudi čas zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju. Za pelete je značilno, da se praznijo iz želodca v obliki bolusov, kar pomeni, da so lahko pelete izpostavljene kislemu mediju različen čas, od nekaj minut in tja do 3 ur (18). *In vitro* smo vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet na sproščanje ZU proučevali tako, da smo pelete različen čas (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 min) zadrževali v biorelevantnem želodčnem mediju.

7.2 Preliminarni testi

Namen preliminarnih testov je bil optimizirati način in pogoje izvedbe testov sproščanja. Preliminarne teste sproščanja smo najprej izvajali na pretočnem sistemu A (oznaka As) z magnetom v silikonski cevki (50 in 60 obratov/min) v delovni čaši. Zaradi zatikanja magneta, tako pri 50 obratih/min kot pri 60 obratih/min, smo sistem A zamenjali s sistemom B (oznaka Bs). Z uporabo sistema B, pri 60 obratih/min in odstranitvijo petrijevke v posodi z vodno kopeljo, smo dosegli enakomerno vrtenje (brez zatikanja)

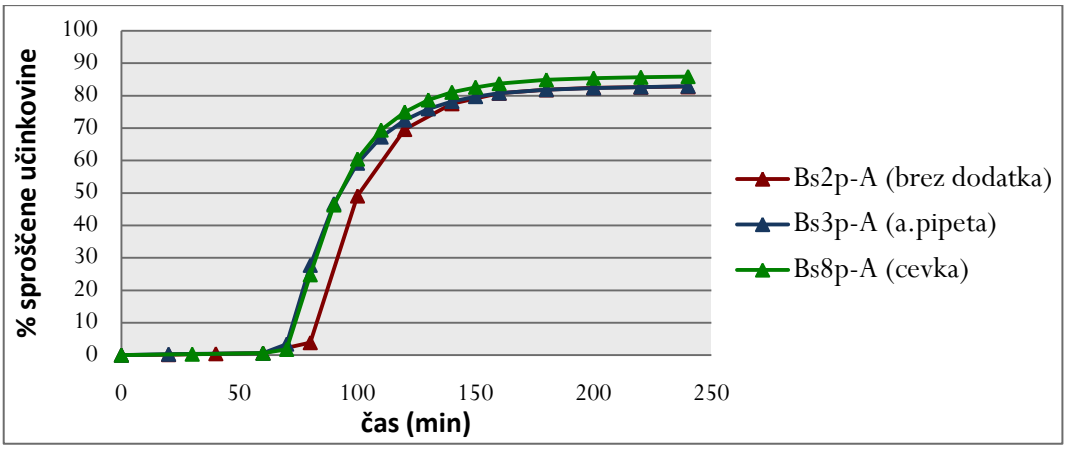
magneta v silikonski cevki v delovni čaši. Pomembno je, da smo pri uporabi pretočnega sistema z magnetom v silikonski cevki pozorni na dinamiko mešanja, saj lahko zatikanje magneta povzroči neenakomerno sproščanje ZU iz FO.

V preliminarnem testu z oznako Bs1p-A smo kot analitsko metodo uporabili UV-VIS spektroskopijo. Nato smo z uporabo HPLC istemu vzorcu določili nižjo koncentracijo sproščene ZU (Slika 7). Zaradi nestabilnosti ZU v kislem okolju smo za določevanje deleža sproščene ZU iz Oblike A in Oblike B v nadaljevanju eksperimentalnih poskusov uporabljali HPLC, s katerim smo detektirali samo intaktno ZU, brez razpadnih produktov. S pomočjo UV-VIS spektroskopije smo določili lažno višje koncentracije sproščene ZU, saj se UV spektri ZU in njenih razpadnih produktov pri preiskovani valovni dolžini (λ=292 nm) med sabo pokrivajo. Prednost HPLC metode je v tem, da vse komponente vzorca najprej ločimo med seboj na kromatografski koloni. Nato pa z detektorjem določimo površino pod vrhom ZU, brez njenih razpadnih produktov, pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma ZU.



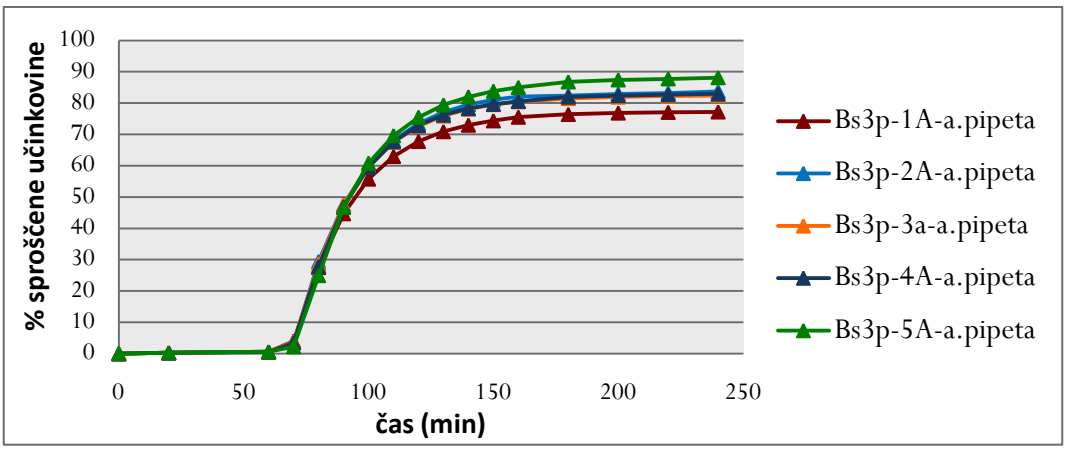
Slika 7: Prikaz različne zaznave količine sproščene zdravilne učinkovine pri istem preiskovanem vzorcu z uporabo dveh različnih analitskih metod (UV-VIS spektroskopija in HPLC).

V *in vivo* pogojih je preskok pH pri prehodu iz želodca v tanko črevo nezvezen, kar smo v *in vitro* poskusih ponazorili z dodatkom bazične raztopine (s pipeto ali po cevki). Z dodatkom raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ smo hitreje dvignili pH ter skrajšali čas, ki je potreben za dvig pH na višjo vrednost po menjavi umetnega želodčnega medija s črevesnim. V primeru, da v sistem ne bi dodajali bazične raztopine, bi se pH ob menjavi medijev dvigoval prepočasi, kar pa ne bi ponazorilo preskoka pH pri prehodu FO iz želodca v tanko črevo. Na sliki 8 lahko opazimo, da dodatek $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ (s pipeto ali po cevki) pomembno vpliva na krivuljo sproščanja ZU iz Oblike A v primerjavi s testi sproščanja brez dodatka. Pri slednjih testih lahko opazimo zamik v začetku sproščanja.



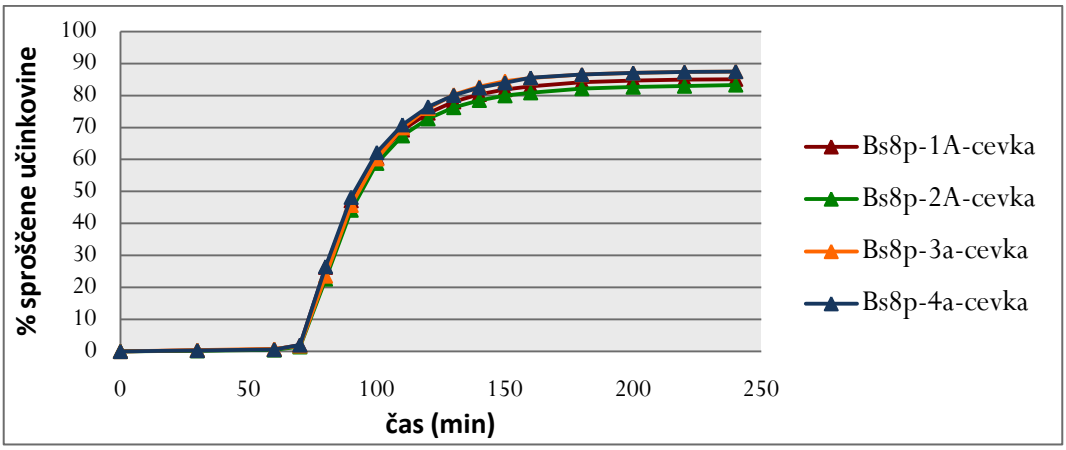
Slika 8: Primerjava povprečnih profilov sproščanja, ki smo jih dobili pri izvajanju eksperimentalnih poskusov brez dodatka bazične raztopine in z dodatkom bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ na dva načina, po cevki in z avtomatsko pipeto.

V preliminarnih poskusih smo testirali različne načine dodatka bazične raztopine. Pri poskusu z oznako Bs3p-A smo z avtomatsko pipeto dodali v 57,5 minuti 950 µL 0,2 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$. Pred tem smo v 55 minuti začeli dovajati fosfatni pufer s pH=6,8. V preliminarnem poskusu Bs8p-A pa smo dodali raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ po cevki. Raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ smo pripravili tako, da smo pri izračunih upoštevali čas dodatka raztopine po cevki, ki je bil 2 minuti. Množina dodanega $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ z enkratnim dodatkom ter dodatkom po cevki (4 ml raztopine) je bila enaka. Koncentracijo 0,2 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ smo izbrali na podlagi predhodnih testiranj na fakulteti. Na sliki 9 lahko opazimo, da dodatek raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ z avtomatsko pipeto povzroči večjo variabilnost dobljenih rezultatov pri istih pogojih. Razlog za to je v tem, da lahko nekaj te raztopine kane direktno na pelete, kljub temu da smo raztopino dodali počasi in ob robu delovne čaše, kar pa povzroči hitrejše raztapljanje obloge in posledično sproščanje.



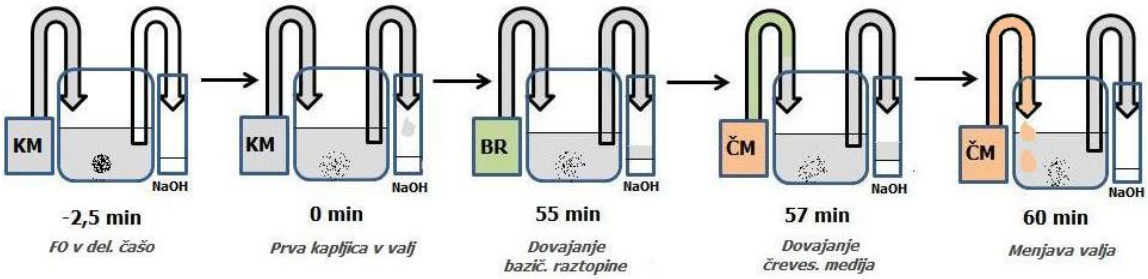
Slika 9: Variabilni profili sproščanja, ki smo jih dobili pri izvajanju poskusov ob dodatku bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ z avtomatsko pipeto ob menjavi želodčnega medija s črevesnim (5 paralelk).

Bolj podobne profile sproščanja z manjšimi odstopanji dobimo, če dodamo bazično raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ po cevki (Slika 10). Na ta način zagotovimo ponovljiv dodatek bazične raztopine.



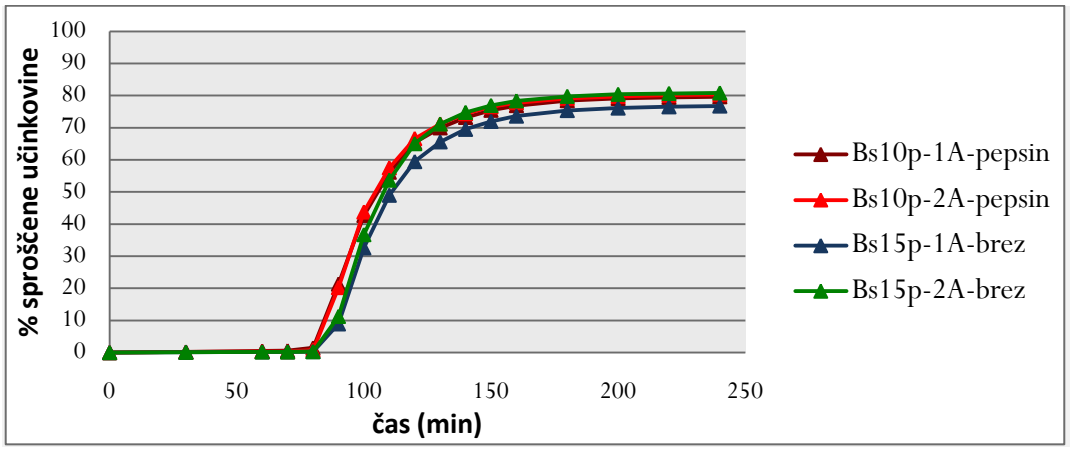
Slika 10: Profili sproščanja, ki smo jih dobili pri izvajanju poskusov z dodatkom bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ po cevki (2 min) ob menjavi želodčnega medija s črevesnim (4 paralelke).

Pri končni izvedbi poskusov sproščanja smo bazično raztopino $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ pričeli dovajati v sistem po cevki točno pri 55 minuti poskusa, v primeru ko smo pelete zadrževali v kislem medij 60 minut. Bazično raztopino smo dodajali v sistem natanko 2 minuti. V 57 minuti smo čašo z bazično raztopino zamenjali s čašo z umetnim črevesnim medijem. Nato pa smo pri 60 min zamenjali merilni valj. Čas merjenja poskusa smo pričeli s prvo kapljico vzorca v merilni valj. Pomembno je, da smo poskus pričeli s prazno cevko, ki odvaja vzorec iz delovne čaše ter polno cevko, ki dovaja svež medij v delovno čašo. S tem načinom izvedbe poskusa smo zagotovili, da so bile pelete v delovni čaši izpostavljene kislemu mediju 60 minut, poleg tega pa smo z zamikom merjenja časa dosegli to, da smo v merilni valj ujeli vzorec, ki je bil izpostavljen kislemu mediju natanko 60 minut. Pri tem smo upoštevali, da so potrebne 2,5 minute za napolnitev in izpraznitev cevke (Slika 11).



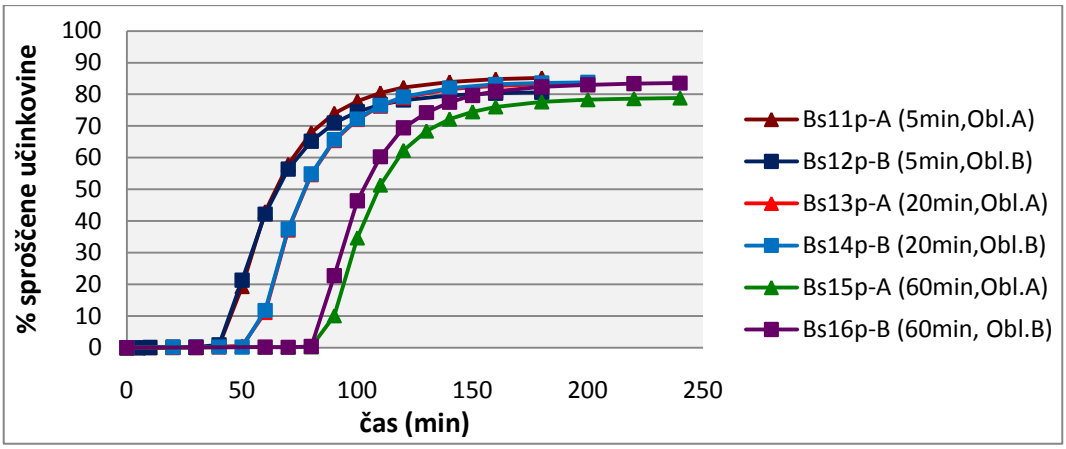
Slika 11: Shema menjave medijev pri testih sproščanja. S sivo barvo je označen kisli medij (KM), z zeleno bazična raztopina (BR) in z roza črevesni medij (ČM) v čašah. Puščice ponazarjajo cevke, smer puščic pa prikazuje smer medija, ki se črpa v čašo, in vzorca, ki se črpa iz čaše. Na desni strani delovne čaše je prikazan merilni valj, v katerem je ustrezna količina NaOH. Pikice v delovni čaši pa predstavljajo FO. Na začetku poskusa je odvodna cevka prazna (prazna puščica) in dovodna polna z medijem (polno obarvana puščica).

Na začetku preliminarnih testov smo kot medij za sproščanje uporabili enostavni želodčni in črevesni medij (0,01 M HCl in fosfatni pufer s pH=6,8). V nadaljevanju testiranja sproščanja zdravilne učinkovine iz Oblike A in B smo ta dva medija zamenjali z biorelevantnima medijema. Pri preliminarnem poskusu z oznako Bs10p-A smo pripravili želodčni medij tako, da smo vse komponente medija, vključno s pepsinom, natehtali sami. V poskusu z oznako Bs15p-A smo za pripravo biorelevantnih medijev uporabili SIF prašek, ki vsebuje mešanico natrijevega tauroholata in lecitina. Pri pripravi FaSSGF medija s pomočjo SIF prahu smo izpustili dodatek pepsina, saj smo v diplomski nalogi želeli povečati biorelevantnost medija na račun dodatka površinsko aktivnih snovi. Za izpustitev dodatka pepsina, katerega odmerjanje v ustrezni masi je težavno, smo se odločili tudi na podlagi podobnosti dobljenih profilov sproščanja za Obliko A pri uporabi medija z in brez dodatka pepsina (Slika 12).



Slika 12: Primerjava profilov sproščanja dobljenih z uporabo dveh biorelevantnih želodčnih medijev, ki se razlikujeta samo v dodatku pepsina. Pri poskusih z oznako Bs10p-1A in Bs10p-2A smo uporabili medij z dodatkom pepsina. Pri poskusih sproščanja Bs15p-1A in Bs15p-2A pa smo FaSSGF medij pripravili brez dodatka pepsina.

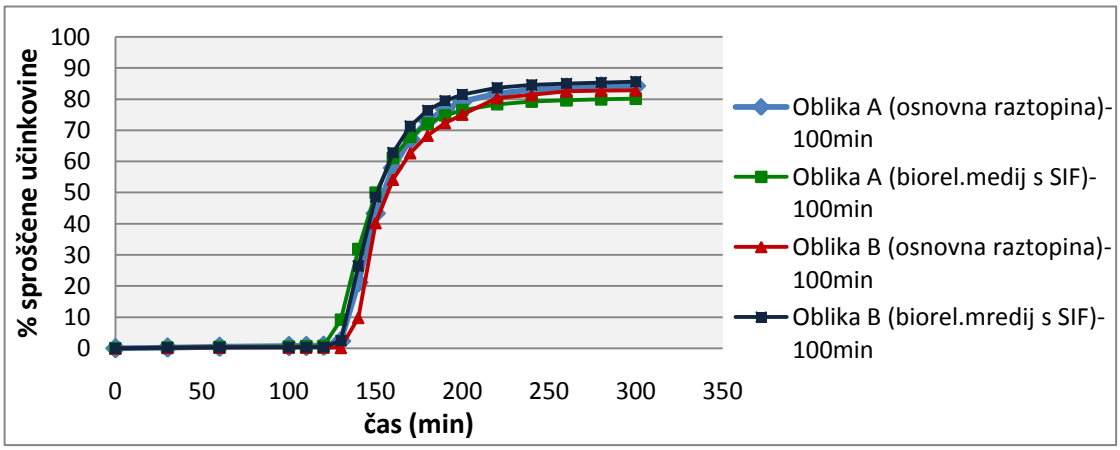
S preliminarnimi testi z oznako Bs11 –Bs16 smo želeli preveriti ponovljivost rezultatov, dobljenih pri testiranju sproščanja acidolabilne zdravilne učinkovine iz Oblike A in Oblike B z uporabo biorelevantnih medijev in dodatka 4 ml $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ po cevki v ustreznem času. Vse te teste smo izvedli na pretočnem sistemu B z magnetom v silikonski cevki in 60 obrati/min (Slika 13). Poleg testiranja ponovljivosti sistema smo opazovali tudi razliko v profilu sproščanja ZU iz Oblike A in B. Ugotovili smo, da so si profili sproščanja med oblikama, pri enakih časih zadrževanja FO v kislem (5, 20 in 60 min), med sabo precej podobni. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili, da Obliki A in B izpostavimo večjim mehanskim vplivom, saj smo predvidevali, da bo večja mehanska obremenitev povzročila večjo razliko med oblikama.



Slika 13: Primerjava povprečnih profilov sproščanja za Obliko A in Obliko B pri različnih časih zadrževanja pelet v kislem. Vse poskuse smo izvedli z uporabo biorelevantnih medijev (uporaba SIF praška), dodatkom bazične raztopine $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ (z dodatkom SIF praška) in hitrostjo vrtenja magneta s 60 obrati/min.

7.3 Primerjava vpliva biorelevantnega medija s SIF praškom in brez na sproščanje

Za vsako obliko smo izvedli en test sproščanja, pri katerem smo proučevali vpliv uporabe bioreleventnega medija, ki je pripravljen s SIF praškom, in osnovne raztopine, ki je FaSSGF in FaSSIF brez dodatka SIF praška, na sproščanje ZU. Iz dobljenih grafov lahko opazimo, da se krivulje sproščanja za obe obliki prekrivata. Poleg tega se pokrivata tudi krivulji, ki prikazujeta sproščanje ZU iz FO ob uporabi dveh medijev, ki se razlikujeta v dodatku SIF praška (Slika 14). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da dodatek SIF praška bistveno ne vpliva na sproščanje. Glede na to, da smo izvedli le eno meritev za vsako obliko (100 min v kislem) tega ne moremo posplošiti za vse preostale čase zadrževanja k kislem.

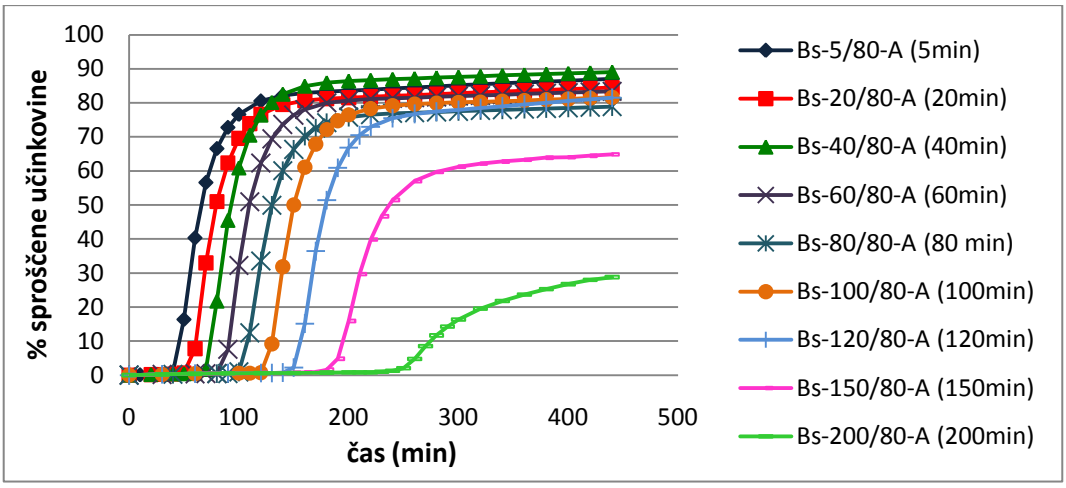


Slika 14: Primerjava dobljenih profilov sproščanja za Obliko A in Obliko B pri 100 min zadrževanja pelet v kislem. Poskuse smo izvedli z uporabo biorelevantnih medijev, ki smo jih pripravili z uporabo in brez uporabe SIF praška. (80 obratov/min)

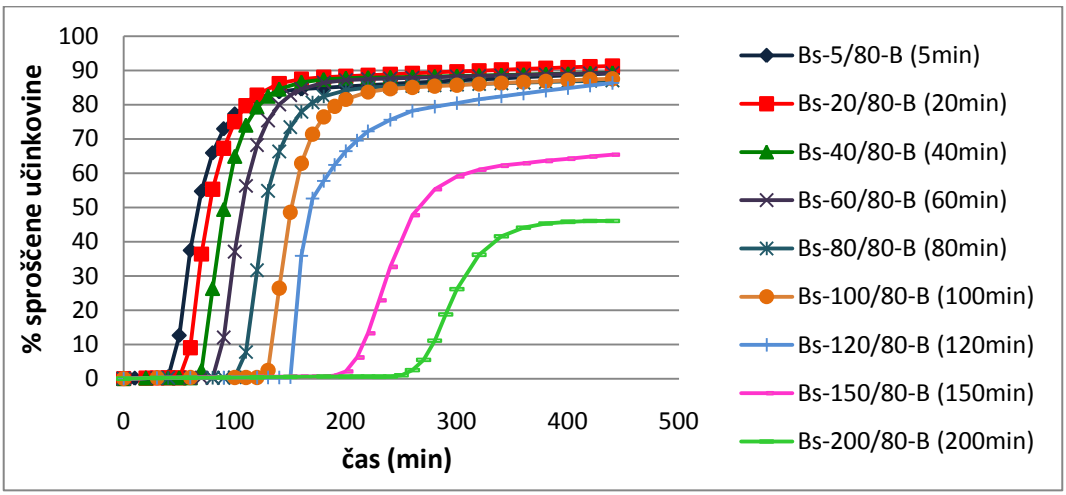
7.4 Vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet Oblike A in Oblike B v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine

Zelo pomembno je poznavanje kinetike želodčnega praznjenja pelet, s katero lahko napovemo *in vivo* sproščanje zdravilne učinkovine iz gastrorezistentnih pelet (18, 19). Na podlagi matematičnega Weibullovega modela povprečnega praznjenja pelet iz želodca smo zasnovali poskuse sproščanja ZU iz farmacevtske oblike *in vitro*. Vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet Oblike A in Oblike B na sproščanje ZU smo izvedli tako, da smo pelete zadrževali v kislem 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 minut. Po vnaprej izbranih časih smo biorelevantni želodčni medij zamenjali z biorelevantnim črevesnim medijem. Vse te teste sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu B z magnetom v silikonski cevki. Hitrost vrtenja mešala je bila 80 obratov/min.

Iz profilov sproščanja prikazanih na slikah 15 in 16, lahko opazimo, da se z daljšanjem časa zadrževanja pelet Oblike A in Oblike B v biorelevantnem želodčnem mediju podaljšuje čas do začetka sproščanja ZU. Opazimo tudi, da v času, v katerem so pelete izpostavljene želodčnemu mediju, ne zaznamo sproščene ZU. To je v večini primerov posledica gastrorezistentne obloge na peletah, ki preprečuje sproščanje ZU v kislem. Tudi v primeru poškodovanih oblog na peletah bi dobili enak začetek krivulje, saj bi poškodovana obloga omogočila sproščanje acidolabilne ZU iz pelet, vendar bi le-ta razpadla v kislem in tako ne bi zaznali sproščene ZU. Iz naklona krivulj profilov sproščanja po menjavi medija opazimo, da se ZU sprošča iz Oblike A in Oblike B s podobno hitrostjo pri nizkih časih zadrževanja pelet v kislem. Hitrost sproščanja, tako pri Obliki A kot pri Obliki B, se nekoliko razlikuje pri testih, kjer smo pelete zadrževali daljši čas v kislem mediju (150 in 200 min). Poleg tega lahko opazimo, da se z daljšanjem časa zadrževanja farmacevtske oblike v kislem mediju zmanjšuje tudi količina sproščene ZU. Vzrok za zmanjšano količino sproščene ZU, ki je bolj opazna v primeru daljšega časa zadrževanja pelet v kislem, je lahko večji razpad acidolabilne ZU v kislem. Zaradi mehanskega vpliva, povzročenega z uporabo magneta v silikonski cevki v delovni čaši, lahko pride do nastanka poškodb ali razširjenja razpok na gastrorezistentni oblogi. V primeru prisotnih poškodb na gastrorezistentnih peletah je učinek zaščite acidolabilne ZU zmanjšan. Poškodovana gastrorezistentna obloga omogoča sproščanje ZU iz oblike v kisli medij ali vdor kislega medija v pelete, kar povzroči razpad ZU.



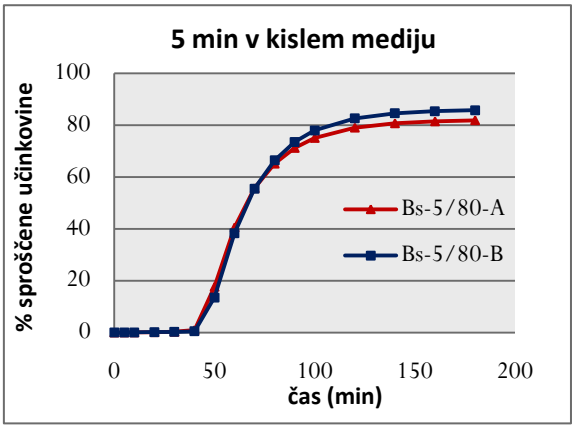
Slika 15: Eksperimentalno dobljeni povprečni profili sproščanja Oblike A pri različnih časih zadrževanja farmacevtske oblike v kislem.

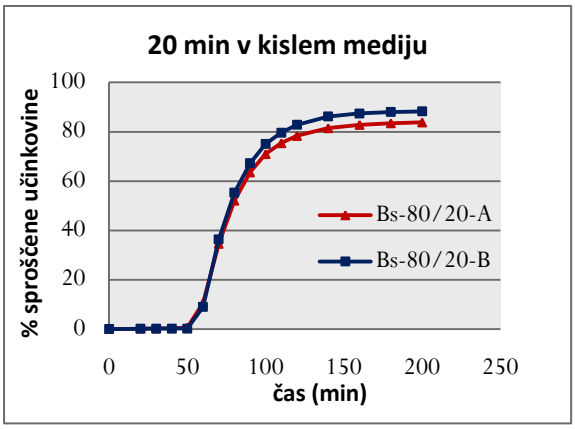


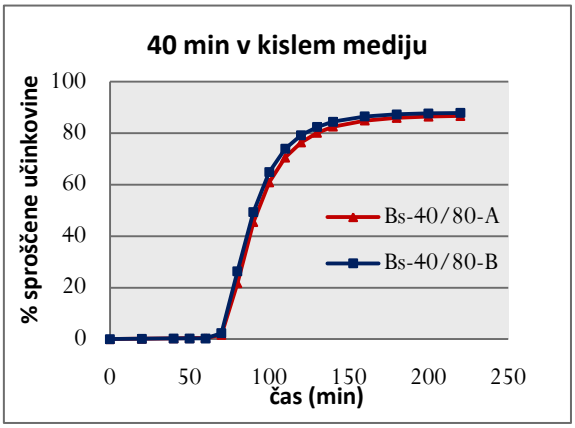
Slika 16: Eksperimentalni povprečni profili sproščanja Oblike B pri različnih časih zadrževanja v biorelevantnem kislem mediju.

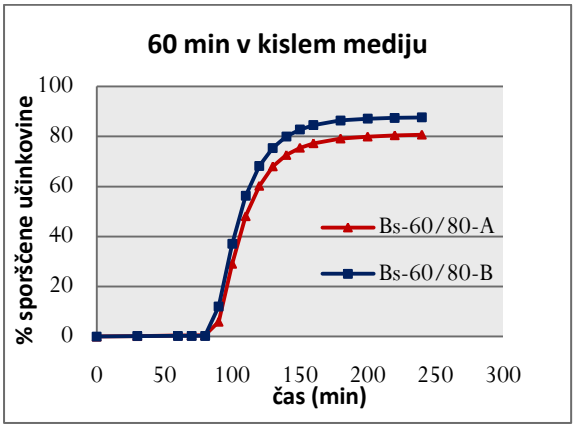
Če primerjamo sproščanje ZU iz Oblike A in Oblike B pri devetih različnih časih zadrževanja pelet v kislem mediju lahko opazimo majhne razlike (Slika 17). Začetni deli krivulj se pri vseh časih zadrževanja pelet v kislem prekrivajo. Razlike v profilih sproščanja med oblikama se pojavijo po zamenjavi biorelevantnega želodčnega medija s črevesnim. Hitrost sproščanja ZU iz obeh oblik je v večini primerov enaka, saj se osrednji del krivulje obeh oblik med sabo prekriva. Razlika v hitrosti sproščanja med oblikama je opazna pri 120, 150 in 200 minutah zadrževanja pelet v kislem mediju. Zadnji deli krivulj, ki odražajo celotno količino sproščene ZU, se med oblikama precej razlikujejo. Pri šestih od devetih časov zadrževanja pelet v kislem mediju, lahko opazimo, da je količina sproščene ZU večja pri Obliki B. Le pri času 5, 40 in 150 minut zadrževanja v kislem se končni deli krivulj obeh oblik skoraj prekrivajo. Do razlik v količini sproščene ZU med

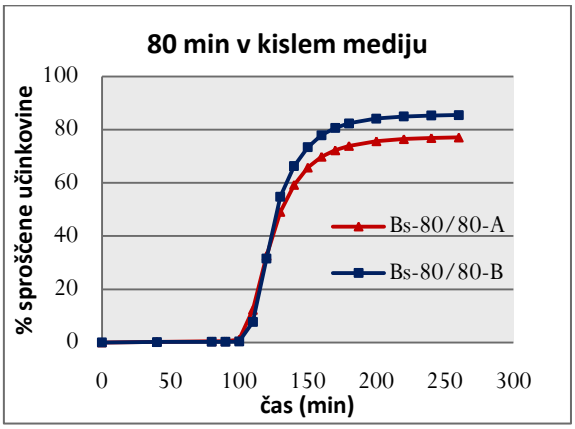
oblikama prihaja zaradi različne sestave pelet, uporabe različnih pomožnih snovi, različne debeline gastrorezistentne obloge in različne občutljivosti pelet na mehanske vplive. Pri enakih pogojih in enakem času zadrževanja pelet Oblike A in Oblike B v kislem več ZU razpade pri sproščanju ZU v kislem iz Oblike A, kar ima za posledico nižji končni odstotek sproščene ZU.

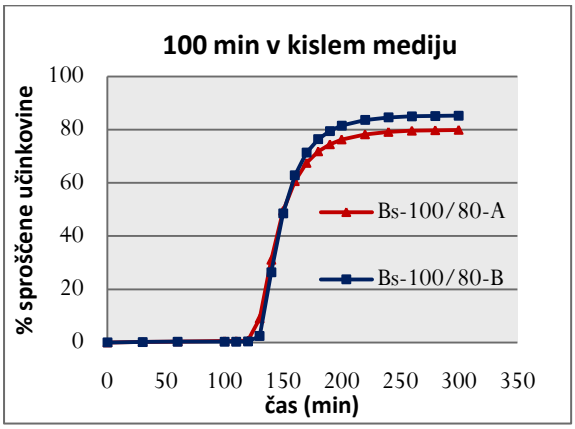


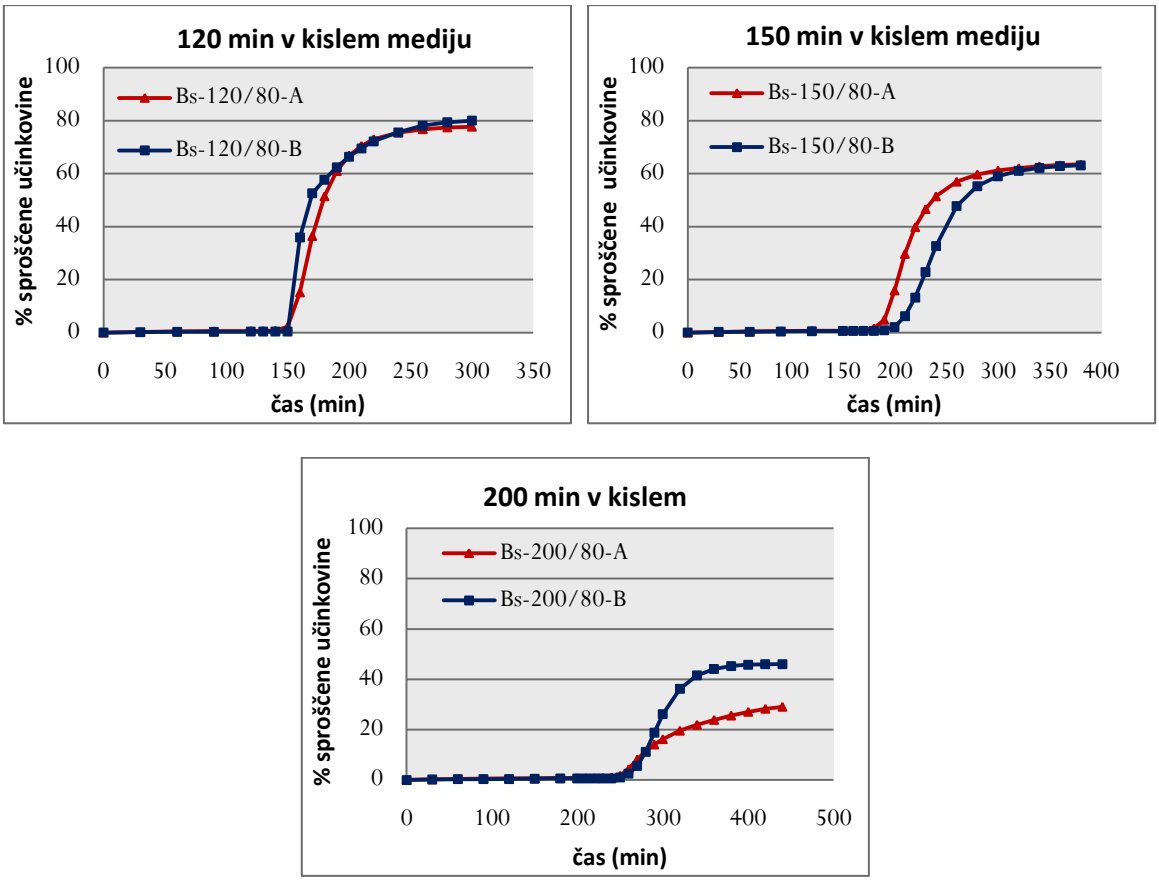










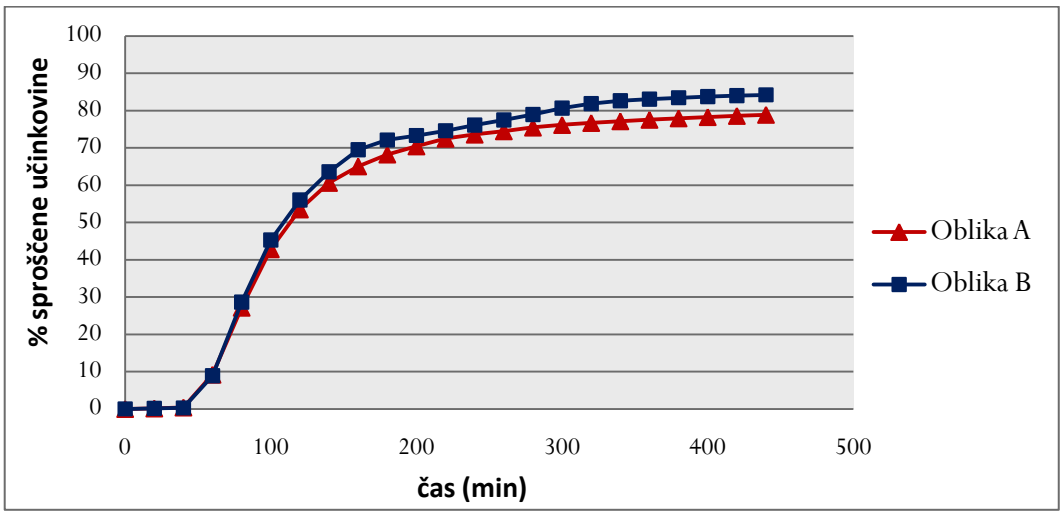


Slika 17: Prikaz eksperimentalno dobljenih povprečnih profilov sproščanja za Obliko A in Obliko B pri posameznih časih zadrževanja v kislem (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 , 150 in 200 min).

7.5 Povprečni oteženi profil sproščanja

Na sliki 18 sta prikazana povprečna otežena profila sproščanja ZU iz Oblike A in Oblike B. Če primerjamo povprečna otežena profila Oblike A in Oblike B, lahko opazimo, da sta si zelo podobna. Razlika se pojavi le v zadnjem delu krivulje, kar predstavlja razliko v deležu sproščene ZU. Do majhne razlike v povprečnem oteženem profilu sproščanja je prišlo zaradi tega, ker so si profili sproščanja obeh oblik precej podobni in je končni prispevek prisotnih razlik relativno majhen. Posamezne profile sproščanja ob določenih časih zadrževanja v kislem smo otežili z določenim procentom pelet, ki preidejo iz želodca v tanko črevo, in jih na koncu sešteli. Profile sproščanja pomnožimo z največjim deležem pelet, ki preidejo iz želodca, prav pri najkrajših časih zadrževanja farmacevtske oblike v kislem (5 min - 17,8 %, 20 min - 23,0 %, 40 min - 15,5 % in 60 min - 11,0 %). Pri teh časih zadrževanja Oblike A in Oblike B v kislem mediju dobimo precej podobne profile sproščanja. Največja razlika pri eksperimentalno dobljenih profilih sproščanja med oblikama se pojavi pri 200-minutni izpostavljenosti pelet kislemu mediju. V tem primeru

profile sproščanja otežimo le z 8,5 %, kar na koncu ne doprinese k velikemu povečanju razlike v povprečnem oteženem profilu sproščanja.



Slika 18: Povprečni oteženi profil sproščanja za Obliko A in Obliko B

S pomočjo povprečnega oteženega profila sproščanja lahko dobro napovemo *in vivo* profile sproščanja ZU kadar imamo opravka z oblikami, ki *in vivo* izkazujejo različno sproščanje v želodcu ali v tankem črevesu in je to ključni vpliv.

8 Zaključek

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju (FaSSGF) na sproščanje acidolabilne ZU iz Oblike A in Oblike B. Gastrorezistentne pelete so stisnjene v orodisperzibilne tablete, ki v stiku z medijem razpadejo na pelete in pomožne snovi. Poskuse sproščanja smo izvajali na pretočnem sistemu z magnetom v silikonski cevki. Hitrost vrtenja magnetnega mešala je bila 80 obratov/min. Ker se pelete praznijo iz želodca v tanko črevo, kjer je glavno mesto absorpcije ZU, postopoma v obliki bolusov, smo teste sproščanja izvajali pri različnem času zadrževanja gastrorezistentnih pelet v kislem. Obliko A in B smo izpostavili biorelevantnemu želodčnemu mediju 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 in 200 minut. Na podlagi eksperimentalno izvedenih testov sproščanja in dobljenih rezultatov smo ugotovili naslednje:

- Z daljšanjem časa zadrževanja pelet Oblike A in Oblike B v biorelevantnem želodčnem mediju se podaljšuje čas do začetka sproščanja ZU. V začetku krivulje je opazen zakasnitveni čas sproščanja ZU, kar je posledica delovanja gastrorezistentne obloge, ki preprečuje difuzijo medija v peleto in s tem raztapljanje oz. sproščanje ZU ter na ta način ščiti acidolabilno ZU pred vplivom kislega želodčnega medija.
- Iz naklona krivulj profilov sproščanja lahko opazimo, da se ZU sprošča iz Oblike A in Oblike B s podobno hitrostjo. Hitrost sproščanja ZU iz farmacevtske oblike je nekoliko različna pri poskusih, ker smo pelete zadrževali daljši čas v kislem mediju.
- Z daljšanjem časa zadrževanja farmacevtske oblike v kislem mediju se zmanjšuje tudi količina sproščene ZU. Vzrok za zmanjšano količino sproščene ZU je večji razpad acidolabilne ZU v kislem. Razpad acidolabilne zdravilne učinkovine je lahko posledica sproščanja ZU v kisli medij ali vdora kislega medija v pelete zaradi poškodovane gastrorezistentne obloge.
- S primerjavo Oblike A in Oblike B ter njunih profilov sproščanja lahko ugotovimo, da se začetni deli krivulj pri vseh časih zadrževanja v kislem prekrivajo. Tudi hitrosti sproščanja ZU iz obeh oblik je pri večini profilov precej podobna. Večja razlika v hitrosti sproščanja je opazna pri eksperimentalno dobljenih profilih, kjer smo pelete zadrževali v kislem 120, 150 in 200 minut. Zadnji deli krivulj, ki

odražajo celotno količino sproščene zdravilne učinkovine, se med oblikama razlikujejo. Do razlik v končnem odstotku sproščene ZU med oblikama lahko prihaja zaradi razlik v sestavi pelet, uporabi različnih pomožnih snovi, razliki v debelini gastrorezistentne obloge in kvaliteti nanešene obloge. Pri enakih pogojih in enakem času zadrževanja pelet Oblike A in Oblike B v kislem, razpade več ZU v kislem pri Obliki A, kar ima za posledico nižji končni odstotek sproščene ZU, kar kaže na slabšo funkcionalnost acidorezistentne obloge.

- Če primerjamo povprečna otežena profila Oblike A in Oblike B, lahko opazimo, da sta si zelo podobna. Razlikujeta se le v zadnjem delu krivulje, ki predstavlja končni delež sproščene ZU iz gastrorezistentnih oblik. Ta majhna razlika je prispevek vseh razlik med oblikama v določenih profilih sproščanja oteženih z odstotkom pelet, ki zapustijo želodec v določenem trenutku.
- Z izračunom povprečnega oteženega profila sproščanja lahko napovemo *in vivo* profile sproščanja zdravilne učinkovine za oblike, pri katerih se pojavi različno sproščanje ZU v *in vivo* pogojih v želodcu in tankem črevesu ter ima to ključni vpliv.
- Pri nadaljnjih poskusih bi lahko proučevali vpliv uporabe še drugih biorelevantnih medijev na sproščanje acidolabilne ZU iz obeh oblik. Proučevali bi lahko vpliv drugih površinsko aktivnih snovi in dodatkov različnih encimov na sproščanje ZU iz Oblike A in B. Pri testih sproščanja bi lahko proučevali tudi vplive skrajnih fizioloških vrednosti na tešče (npr. pH = 1–3 v kislem in pH = 5–8 za ponazarjanje pogojev v črevesu) na sproščanje ZU iz Oblike A in B z namenom napovedovanja dogajanja v telesu.

9 Viri in literatura

1. Dressman JB et al.: Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Form. Pharmaceutical Research 1998; 15: 11-21.
2. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A B C: Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics, 5th ed., McGraw-Hill, New York, 2005: 386-389.
3. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana, 2005: 500-501.
4. Feher J: Quantitative human physiology: an introduction, Elsevier Academic Press, Waltham, San Diego, Amsterdam, 2012: 711–715.
5. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana, 2005: 531.
6. Deloose E, Janseen P, Depoortere I, Tack J: The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2012; 9 (5): 271-85.
7. Feher J: Quantitative human physiology: an introduction, Elsevier Academic Press, Waltham, San Diego, Amsterdam, 2012: 701–710.
8. Johnson LR: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 4th ed., Elsevier Academic Press, Burlingtonm, 2006: 927-928.
9. Johnson LR: Encyclopedia of Gastroenterology, 1st ed., Elsevier Academic Press, Burlingtonm, 2003: 650–652.
10. Wilding IR, Coupe AJ, Davis SS: The role of γ-scintigraphy in oral drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 46: 103-124.
11. Chen J et al.: Gastric retention properties of superporous hydrogel composites. Journal of Controlled Release 2000; 64: 39–51.
12. Janssen P et al.: Review article: the role of gastric motility in the control of food intake. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 2011; 33 (8): 880-94.
13. Tomomasa T et al.: Gastrointestinal sounds and migrating motor complex in fasted humans. The American Journal of Gastroenterology 1999; 94 (2): 374-81.
14. Gielkens HA et al.: Interdigestive antroduodenal motility and gastric acid secretion. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 1998; 12 (1): 27-33.

15. Schmidt PT et al.: Circulating ghrelin levels after food intake during different phases of the migrating motor complex in man. European Journal of Clinical Investigation 2006; 36 (7): 503-8.
16. Camilleri M: Integrated upper gastrointestinal response to food intake. Gastroenterology 2006; 131 (2): 640-58.
17. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana, 2005: 469-470.
18. Locatelli I, Nagelj Kovačič N, Mrhar A, Bogataj M: Gastric emptying of non-disintegrating solid drug delivery systems in fasted state: relevance to drug dissolution. Expert Opinion on Drug Delivery 2010; 7 (8): 967-76.
19. Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M: Gastric emptying of pellets under fasting conditions: a mathematical model. Pharmaceutical Research 2009; 26 (7): 1607-17.
20. Srčič S: Farmacevtska tehnologija za srednjo stopnjo, Didakta, Radovljica, 1997: 165.
21. Newton JM: Gastric emptying of multi-particulate dosage forms. The International Journal of Pharmaceutics 2010; 395: 2-8.
22. Jantratid E, Dressman J: Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. Dissolution Technologies 2009; 21-25.
23. Marques M: Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. Dissolution Technologies 2004; 16.
24. http://biorelevant.com/site_media/pdf/Phares_SIF_Powder_Preparation_Protocol.pdf (Dostop: Julij 2012)
25. Schiller C et al.: Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 2005; 22 (10): 971-9.
26. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, Littera picta, Ljubljana, 2009: 248.
27. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, Littera picta, Ljubljana, 2009: 64.
28. Yihong Q et al: Developing Solid Oral Dosage Forms, Elsevier Academic Press, Burlingtonm, 2008: 319-320.