

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA KERIN
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA KERIN

**VPLIV pH IN ČASA ZADRŽEVANJA OGRODNIH TABLET V
SIMULIRANEM ŽELODČNEM MEDIJU NA SPROŠČANJE
NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA**

**THE INFLUENCE OF pH AND THE RETENTION TIME IN
SIMULATED GASTRIC MEDIUM ON DICLOFENAC SODIUM
RELEASE FROM MATRIX TABLETS**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja, mag. farm.

ZAHVALA

Prof. dr. Alešu Mrharju, mag. farm. se zahvaljujem za mentorstvo. Za strokovno pomoč, nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem izr. prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. in Nataši Nagelj Kovačič, mag. farm. Greti Cof se zahvaljujem za praktične nasvete pri eksperimentalnem delu in odlično vzdušje v laboratoriju.

Petri in Jasni se zahvaljujem za vse lepe trenutke, ki smo jih preživele skupaj v laboratoriju. Posebna zahvala gre staršem in bratu, ki so mi tekom študija vedno stali ob strani in verjeli vame. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi polepšali študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja, mag. farm.

Helena Kerin

Vsebina

POVZETEK	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1. UVOD	4
1.1. POMEN FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI UČINKOVIN ZA SPROŠČANJE	4
1.2. NEKATERE FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA	4
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1. MATERIALI	12
3.2. APARATURE	12
3.3. METODE	13
4. REZULTATI	24
4.1. UMERITVENE PREMICE	24
4.2. PRELIMINARNI TESTI SPROŠČANJA	24
4.3. KONČNI TESTI SPROŠČANJA	32
4.4. VREDNOSTI $t_{50\%}$	41
5. RAZPRAVA	42
5.1. IZBIRA PARAMETROV ZA TESTE SPROŠČANJA	42
5.2. PRELIMINARNI TESTI SPROŠČANJA	43
5.3. IZBIRA POGOJEV KONČNIH TESTOV SPROŠČANJA	48
5.4. KONČNI TESTI SPROŠČANJA	49
5.5. POMEN <i>IN VITRO</i> PROFILOV SPROŠČANJA	56
6. SKLEPI	57
7. LITERATURA	58

POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo proučevali vpliv pH in časa zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju (SŽM) na *in vitro* sproščanje natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet iz hidroksipropil metil celuloze (HPMC). pH in časi tablete v simuliranem želodčnem mediju so v razponu fiziološkega pH želodca in časov zadrževanja tablet v želodcu na tešče. Vrednosti pH SŽM so bile: 1,0; 1,6; 2,4 in 3,0, časi tablet v SŽM pa so bili: 10, 30, 60, 120 in 200 minut. Tablete smo na začetku izpostavili SŽM, ki so bile raztopine z različno koncentracijo HCl. Po različnih časih v simuliranem želodčnem mediju smo medij za sproščanje zamenjali za simuliran črevesni medij (SČM). S preliminarnimi poskusi sproščanja smo ugotavljali, kateri način sproščanja bi bil najbolj primeren za vrednotenje omenjenih dveh parametrov. Preverjali smo, kako različni aparati za sproščanje (košarice, vesla), uporaba uteževalca, način menjave medija (odlivanje medija ali prenos tablete v segret medij) in sestava tablet vplivajo na ponovljivost profilov sproščanja. Končne poskuse sproščanja smo izvajali na aparatu z vesli, tableto smo vpeli v žičko, medij pa smo zamenjali tako, da smo tableto prenesli v predhodno segret SČM. Ponovljivost je pri tabletah, ki vsebujejo mikrokristalno celulozo in nižji % HPMC neustrezna. Boljšo ponovljivost smo dosegli pri tabletah z višjim % HPMC in brez mikrokristalne celuloze. Ugotovili smo, da pH in čas tablete v SŽM močno vplivata na sproščanje učinkovine v SČM. Modelna učinkovina natrijev diklofenakat, ki je sol šibke kisline s pKa 3,8, ima od pH odvisno topnost. Pri nižjih pH se natrijev diklofenakat slabo raztaplja (neionizirana oblika), pri višjih pH pa bolje (ionizirana oblika). Največje razlike v sproščanju opazimo pri 200 minutah v SŽM med pH 1,0 in 3,0 ter pri pH 1,0 med časi 10 in 200 minut v SŽM.

Ključne besede: natrijev diklofenakat, pH, čas praznjenja želodca, topnost, ionizacija, testi sproščanja

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem
DIK	diklofenak (prosta kislina)
DIK-Na	natrijev diklofenakat (sol)
GIT	gastrointestinalni trakt
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
HPMC	hidroksipropil metil celuloza
Ka	ionizacijska konstanta
M	molarnost (mol/L)
MCC	mikrokristalna celuloza
MMC	migracijski motorični kompleks
Ph. Eur.	evropska farmakopeja
pKa	ionizacijska konstanta na logaritemski skali
PAR	paralelka
POS	poskus
POVP	povprečna vrednost
R ²	kvadrat Pearsonovega koeficienta
SČM	simuliran črevesni medij
SD	standardna deviacija
SR	podaljšano sproščanje
SŽM	simuliran želodčni medij
t	časovne točke vzorčenja
USP	aparatus za sproščanje po zahtevah ameriške farmakopeje
USP1	aparatus za sproščanje s košaricami
USP2	aparatus za sproščanje z vesli
UV	ultravijolična svetloba
UV-VIS	ultravijolična in vidna svetloba
v/v delež	volumsko/volumski delež
ut/ut %	masno/masni delež

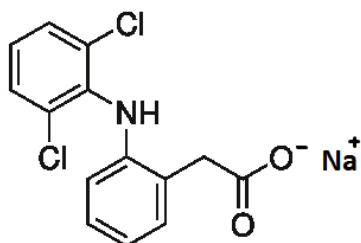
1. UVOD

1.1. POMEN FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI UČINKOVIN ZA SPROŠČANJE

Sproščanje zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike je pogosto proces, ki omejuje hitrost absorpcije učinkovine iz gastrointestinalnega trakta (GIT) po peroralni aplikaciji. Difuzija učinkovine, njena topnost v vsebini GIT, močljivost trdne površine z luminalno tekočino in hidrodinamika GIT imajo pomembno vlogo pri *in vivo* hitrosti sproščanja. Na topnost zdravilne učinkovine v vsebini GIT vplivajo tako njena topnost v vodi, kot tudi kristalna oblika, lipofilnost učinkovine, solubilizacija v prisotnosti naravnih površinsko aktivnih snovi in zaužite hrane ter pKa učinkovine. pH medijev v GIT ima pomemben vpliv na topnost učinkovin, če je njihova topnost odvisna od pH medija, kot je značilno za šibke kisline ali šibke baze. Sočasno uživanje hrane lahko spremeni nekatere parametre v GIT in vpliva na topnost učinkovine v prebavnih medijih. Slaba topnost spojine (nižja od 0,1 mg/mL) pogosto omejuje sproščanje. Razmerje med odmerkom in topnostjo učinkovine v mediju predstavlja oceno, kolikšen volumen medija je potreben za sprostitve posameznega odmerka. Če je to razmerje večje kot 1 liter, je sproščanje pogosto problematično. Površina farmacevtske oblike, ki je na voljo za sproščanje, je odvisna od velikosti delcev trde snovi in njihove močljivosti z luminalno tekočino. Za dobro napoved *in vivo* sproščanja je potrebno pri testih sproščanja uporabiti pogoje, ki dobro posnemajo fiziološke pogoje (1).

1.2. NEKATERE FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA

Kemijsko ime: natrijev {2-[(2,6-diklorofenil)amino]fenil}acetat (2).



Slika 1: Natrijev diklofenakat (2).

Diklofenak (DIK) je nesteroidna protivnetna učinkovina s protivnetnim, antipiretičnim in analgetičnim delovanjem. DIK je neselektivni inhibitor ciklooksigenaz, vendar šibko selektivno inhibira encim ciklooksigenazo 2 (3). Pogosto se uporablja pri dolgotrajnem zdravljenju degenerativnih sklepnih bolezni (4), predvsem revmatoidnega artritisa (5). DIK je v farmacevtskih oblikah navadno prisoten v obliki natrijeve ali kalijeve soli. Natrijev diklofenakat (DIK-Na) uvrščamo v razred II po BCS (Biopharmaceutics Classification System) klasifikaciji (3), saj ima dobro permeabilnost in slabo topnost (6).

Po peroralni aplikaciji farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem se DIK absorbira 100% glede na intravensko aplikacijo. Približno 60% učinkovine doseže sistemski krvni obtok zaradi predsistemskega metabolizma (3).

Absolutna topnost diklofenaka v različnih medijih

Topnost DIK-Na je odvisna od pH okoliške raztopine. V močno kislih raztopinah je nižja kot 1 mg/mL in narašča z zviševanjem pH (5). Preglednica I prikazuje vrednosti absolutne topnosti DIK-Na v različnih medijih.

Preglednica I: Absolutna topnost DIK-Na v različnih medijih pri sobni temperaturi (7).

Medij	ionska moč medija [mol/L]	topnost [mg/mL]
0,1 M HCl	0,1	0,0012
0,01 M HCl	0,01	0,0017
0,001 M HCl	0,001	0,28
acetatni pufer pH = 4,1	0,05	0,0033
acetatni pufer pH = 4,5	0,05	0,0036
acetatni pufer pH = 5,5	0,05	0,036
prečiščena voda	0	14,18
fosfatni pufer pH = 5,8	0,06	0,14
fosfatni pufer pH = 6,0	0,06	0,15
fosfatni pufer pH = 6,8	0,08	0,67
fosfatni pufer pH = 7,0	0,09	1,36
fosfatni pufer pH = 7,4	0,12	5,15
fosfatni pufer pH = 7,8	0,13	12,00
fosfatni pufer pH = 8,0	0,14	12,14

V literaturi navedeni podatki o nekaterih vrstah topnosti DIK-Na se med seboj močno razlikujejo. Določanje topnosti je zapleteno zaradi zahtevnosti zagotavljanja enakih termodinamskih pogojev pri meritvah, saj lahko zlahka nastane prenasočena raztopina. Natančno morajo biti podani pogoji pri določanju topnosti, saj lahko že majhne spremembe v pH, prisotnosti raztopljenih soli in temperaturi vplivajo na topnost. Potrebna je natančna

karakterizacija topljenca, zlasti prisotnost morebitnih hidratov ali polimorfov topljenca mora biti natančno spremljana (8).

V literaturi so opazne velike razlike med vrednostmi vodotopnosti DIK-Na, in sicer so vrednosti med 0,0178 in 1,771 mg/mL. Mediji za raztapljanje pogosto niso jasno navedeni. Avtorji so določali topnost v vodnih pufrih pri določenem pH ali v vodi. Tudi raztopljeni ogljikov dioksid vpliva na pH medija in s tem na topnost (8).

Obstaja veliko opredelitev topnosti. Pomembne opredelitve topnosti so kinetična, intrinzična in termodinamska topnost. Intrinzična topnost šibke kisline je opredeljena kot topnost učinkovine v njeni neionizirani (kislinski) obliki. Kinetična topnost je merilo sposobnosti učinkovine, da tvori prenasičeno raztopino. Topnost se lahko določa v različnih medijih (voda, vodni pufri), zato je bistvenega pomena, da je jasno navedeno, kateri medij je izbran, saj se izmerjene vrednosti topnosti razlikujejo glede na medij, v katerem je bila topnost določena (8). Termodinamska topnost je vrednost raztopljene učinkovine, ko je doseženo termodinamsko ravnotežje (9).

Llinas *et al.* (8) so določali intrinzično topnost s potenciometrično kislinsko-bazično titracijo. DIK-Na so raztopili v vodi in titriral s kislino. Nastanek oborine so določali s turbidimetrijo, ki s pomočjo spektroskopske sonde zazna sipanje svetlobe zaradi nastanka oborine. Intrinzično topnost so določali z zasledovanjem ravnotežja (»chasing equilibrium«). Pri izračunu titracijske krivulje so upoštevali vrednost pKa DIK pri pogojih (temperatura in ionska moč), ki so enaki pogojem pri določanju topnosti. Ker je intrinzična topnost definirana kot topnost DIK, se pričakuje, da je enaka za vse preiskovane oblike DIK-Na. Preiskovali so tri oblike DIK-Na, in sicer (i) komercialno dostopni brezvodni DIK-Na, (ii) 4,75-hidrat DIK-Na, ki nastane po rekristalizaciji iz etanola in (iii) brezvodni DIK, ki je bil oborjen iz raztopine. Intrinzična topnost DIK-Na je bila enaka za vse preiskovane oblike DIK-Na (8). Preglednica II prikazuje vrednosti absolutne vrednosti topnosti DIK v različnih medijih pri sobni temperaturi. Rezultati drugih študij, kjer so določali intrinzično topnost DIK so si v glavnem precej podobni in znašajo okoli 0,001 mg/mL (8).

Preglednica II: Absolutne vrednosti topnosti DIK v različnih medijih pri sobni temperaturi (8).

Medij	topnost [mg/mL]
medij s pH 3,0; ionska moč = 0,5 M (vsebuje NaCl)	0,00236
kisel medij s pH 1,0	0,001

Vrednosti kinetične topnosti se določajo v trenutku, ko se začne učinkovina obarjati. Vrednost kinetične topnosti je veliko višja kot vrednost intrinzične topnosti, kar nakazuje nagnjenost DIK do tvorbe prenasičene raztopine. Variabilnost med paralelkami kinetične topnosti DIK in DIK-Na je zelo velika. Vrednost kinetične topnosti za DIK-Na je $0,040 \pm 0,005$ mg/mL, za DIK pa $0,012 \pm 0,004$ mg/mL. Ionska moč medijev za raztapljanje je bila $0,165$ mol/L (8).

Ionizacija

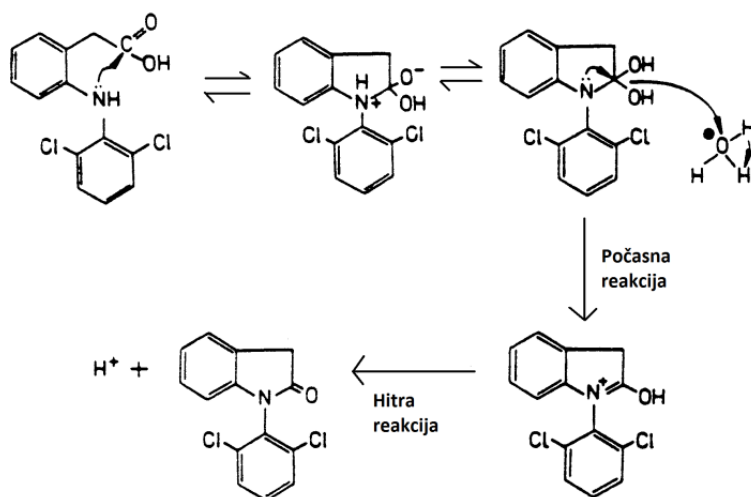
DIK-Na je sol šibke kisline. V literaturi lahko zasledimo različne vrednosti pKa, in sicer vrednosti 3,8 (3) in okoli 4 (5).

Topnost DIK-Na je močno odvisna od pH medija za raztapljanje (Preglednica I). Topnost DIK-Na je veliko večja v medijih z višjim pH kot v medijih z nižjim pH. DIK-Na je zelo težko topen oziroma praktično netopen v močno kislem mediju (7). V mediju za raztapljanje s pH več kot eno enoto pod vrednostjo pKa je DIK-Na prisoten predvsem (razmerje med ionizirano in neionizirano obliko je $< 1:10$) v neionizirani obliki, ki je slabše topna kot ionizirana oblika. Z naraščanjem pH medija za raztapljanje se povečuje topnost DIK-Na zaradi prispevka ionizirane oblike. pH GIT tekočin je tako eden pomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na topnost ionizirajočih učinkovin. Vrednosti pH GIT tekočin se vzdolž GIT spreminjajo (1). Najpogostejše vrednosti pH v želodcu na tešče so med 1 in 2,5 (včasih določijo višje vrednosti do pH 7,5), medtem ko so v duodenumu med 5,8 in 6,5; v jejunumu pa med 4,4 in 6,5 (10).

Poleg pH medija na topnost DIK-Na vpliva tudi ionska moč medija za raztapljanje in sestava medija, vendar je njun vpliv na topnost manjši. V pufrih z višjo ionsko močjo je topnost DIK-Na nižja kot v pufrih z nižjo ionsko močjo pri enakem pH. Opazili so tudi, da je topnost v medijih, ki vsebujejo NaCl, nekoliko nižja v primerjavi z mediji, ki vsebujejo KCl. Razlog je verjetno vpliv skupnih natrijevih ionov (7).

Intramolekularna ciklizacija

V kislinskih vodnih raztopinah lahko poteče intramolekularna ciklizacija. Morebitna ciklizacija poteče med amsko in karboksilno skupino. Produkt ciklizacije je laktam (11). Slika 2 prikazuje potek intramolekularne ciklizacije v kislinskih pogojih. Produkt ciklizacije je kemijsko analogen nečistoti A po monografiji DIK-Na v evropski farmakopeji (Ph. Eur.) (12).



Slika 2: Kislinsko katalizirana intramolekularna ciklizacija DIK-Na (5).

Larsen *et al.* (11) so določili hitrostne konstante ciklizacije pri pH 1 in 2, ki so psevdno 1. reda. S pomočjo teh so izračunali delež DIK-Na, ki je podvržen kislinsko-katalizirani ciklizaciji v želodcu. Izračunali so, da pri pH 1 ostane 92% DIK-Na necikliziranega, pri pH 2 pa 99%. Tako zaključujejo, da kislinsko-katalizirana ciklizacija DIK-Na ni pomembna za biološko uporabnost DIK-Na po peroralni aplikaciji (11).

Palomo je s sodelavci (5) poskušal potrditi ciklizacijo z analizo nastalih spojin po izpostavitvi DIK-Na različnim medijem, in sicer HCl s pH 1,3, NaOH s pH 12,65, fosfatnemu pufru s pH 6,8 in destilirani vodi. Za analizo nastalih spojin so uporabili številne analize metode: UV–VIS spektrometrijo, diferenčno dinamično kalorimetrijo, infrardečo spektroskopijo, rentgensko praškovo difrakcijo in energijsko disperzijsko rentgensko analizo (»energy dispersive X-ray analysis«).

Ciklizacija v kislem mediju je reverzibilna, zato pride *in vitro* po spremembi okoliške raztopine v bazično oziroma nevtrarno raztopino z visokim deležem natrija do obnove prvotne strukture spojine. Nekateri avtorji (5) predvidevajo, da poteka kislinsko–bazična reakcija samo na zunanji površini farmacevtske oblike. Nizka topnost DIK preprečuje

nadaljnje sproščanje in raztapljanje pri nizkem pH. Ko se pH poveča, se sproščanje ponovno začne (5). Guhmann *et al.* (13) so dokazali reverzibilnost intramolekularne ciklizacije DIK-Na.

Učinkovino so najprej izpostavili kislini. Pri analizi spojine z infrardečo spektroskopijo dobljeni spekter v nasprotju s pričakovanji ni ustrezal ciklični strukturi. Analizirana spojina ni imela laktamske strukture, zato najverjetneje ni prišlo do intramolekularne ciklizacije v kislem mediju. V kisli raztopini so protoni zamenjali Na⁺ v strukturi DIK-Na in povzročili nastanek kisle oblike spojine s precej nizko vodotopnostjo, vendar ne ciklične oblike (5).

Poleg tega so lahko pretvorili učinkovino v prvotno sol DIK-Na z ustrežno raztopino (na primer NaOH), kar je ponovno pomenilo, da spojina po izpostavitvi kislini nima ciklične strukture. Ciklizacija je reverzibilna reakcija, vendar je pretvorba ciklične strukture v prvotno obliko DIK-Na upočasnjena. Laktamska struktura ne reagira tako hitro, ker ima precej visoko kemijsko stabilnost (5).

Hidrati

DIK-Na lahko obstaja v obliki trihidrata in tetrahidrata. Za pripravo zdravil, ki ustrezajo farmakopejskim predpisom, se uporablja samo brezvodna oblika (3). V literaturi zasledimo tudi opise oblike DIK-Na skoraj tetrahidrata (»almost tetrahydrate diclofenac sodium«) in pentahidrata (4, 14).

Tvorba hidratov lahko močno vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti, kot so stabilnost, topnost, hitrost raztapljanja in posledično tudi na biološko uporabnost (4). Molekula vode se z vodikovimi vezmi povezuje z molekulami zdravilne učinkovine, pri čemer nastane stabilna kristalna struktura (15).

Nekateri proizvodni procesi lahko vključujejo prisotnost vode v sintezi in/ali kristalizaciji zdravilnih učinkovin ali pri oblikovanju zdravila s pomožnimi snovmi. Do izgube adsorbirane in/ali kristalno vezane vode pa lahko pride pri procesu sušenja, mletja, mešanja in tabletiranja (15). Trde snovi v farmaciji so lahko v stiku z vodo med procesnimi postopki, kot so kristalizacija, liofilizacija, mokro granuliranje, filmsko oblaganje z vodno raztopino ali pri metodi sušenja z razprševanjem (»spray drying«). Prav tako lahko pridejo v stik z vodo med shranjevanjem (4).

V brezvodni obliki DIK-Na kaže nagnjenost do vezave vode iz okolja. Tvorba tetrahidratov poteka spontano že pri temperaturi 25°C in relativni vlažnosti 60%. Poteka

trdno-trdni prehod v hidratno obliko DIK-Na tetrahidrata, ki se od brezvodne oblike razlikuje po fizikalno-kemijskih, biofarmaceutskih in tehnoloških lastnostih. Ta oblika se razlikuje od oblike tetrahidrata, pridobljenega z rekristalizacijo iz vode ali s suspendiranjem učinkovine v vreli vodi in nadaljnjo kristalizacijo. Pri shranjevanju brezvodne oblike pri relativni vlažnosti 59% ali 98% pri sobni temperaturi in relativni vlažnosti 100% pri različnih temperaturah (20° in 30°C) dajo vedno enake hidratne oblike (4).

Med shranjevanjem lahko pride do vezave vode v strukturo DIK-Na, kljub temu da ni bil DIK-Na v neposrednem stiku z vodo med proizvodnim procesom. Na ta pojav lahko učinkovito vplivamo z dodatkom pomožnih snovi, ki vežejo vodo in preprečujejo vezavo vode v strukturo DIK-Na (4).

Primerjave razlik v topnosti in intrinzični hitrosti raztapljanja med brezvodnim DIK-Na in DIK-Na tetrahidratom so pokazale, da ima brezvodni DIK-Na višjo topnost in se hitreje raztaplja kot DIK-Na tetrahidrat tudi pri fiziološkem pH 6,8. Posledica razlik v topnosti in hitrosti raztapljanja pri pH 6,8 so razlike v biološki uporabnosti. Za DIK-Na je namreč značilno, da je hitrost raztapljanja proces, ki omejuje absorpcijo. Sproščanje DIK-Na poteka predvsem v tankem črevesju, kjer je pH gastrointestinalnih tekočin približno 6,8. Topnost DIK-Na je odvisna od pH medija. V kislih pogojih pride do tvorbe DIK. Topnost DIK-Na je v kislih medijih zelo slaba, zato se sprosti zelo majhen delež DIK-Na. Brezvodni DIK-Na in DIK-Na tetrahidrat se različno obnašata med raztapljanjem, verjetno zaradi različne močljivosti prahov. Rezultati študije intrinzične hitrosti raztapljanja kažejo tudi na razliko med tetrahidrati glede na način priprave (4).

Poročajo o pripravi in karakterizaciji oblike hidratov DIK-Na trihidrat. Študija hidratnih oblik DIK-Na kaže, da lahko obstajajo izomorfne oblike trihidrata z različno kristaliničnostjo in različno porazdelitvijo vode znotraj kristalne strukture (15).

Različni vzorci enake hidratne oblike lahko izkazujejo različne lastnosti, če je velikost njihovih kristalov in/ali morfologija različna. Dehidracija je hitrejša za vzorce z manjšimi delci. Metoda, ki jo izberemo za pripravo določene polimorfne oblike, lahko kritično vpliva na lastnosti in stabilnost končnega produkta zaradi različne morfologije in/ali velikosti kristalov. Ključen je pravilen izbor parametrov obdelave snovi, ki zagotovijo, da dobimo želeno obliko zdravilne učinkovine (16).

2. NAMEN DELA

Posnemanje fizioloških pogojev v *in vitro* testih sproščanja je pomembno za napovedovanje obnašanja farmacevtske oblike v GIT po peroralni aplikaciji. Namen diplomske naloge je ovrednotiti vpliv pH in časov zadrževanja tablet v simuliranem želodčnem mediju (SŽM) na sproščanje DIK-Na iz ogrodnih tablet iz hidroksipropil metil celuloze (HPMC). pH in časi v SŽM bodo v razponu fizioloških pH in časov zadrževanja tablet v želodcu na tešče.

Fiziološki pH in čas zadrževanja tablete v želodcu sta zelo variabilna. pH želodčnega medija v želodcu na tešče je med 1 in 3. Čas zadrževanja tablete v želodcu na tešče je od nekaj minut do dveh ur, v nekaterih primerih tudi dlje. S preliminarnimi poskusi bomo opredelili pogoje sproščanja z najboljšo ponovljivostjo, pri čemer bomo vrednotili vpliv različnih aparatov za sproščanje (košarice, vesla), uporabe uteževalca, različne načine zamenjave medijev in sestave tablet. Končne poskuse bomo izvedli pri teh pogojih pri štirih pH (1,0; 1,6; 2,4 in 3,0) in petih časih v SŽM (10, 30, 60, 120 in 200 minut), sproščanje pa bomo do izteka 24 ur nadaljevali v simuliranem črevesnem mediju (SČM). Bistveni sestavini tablet bosta DIK-Na in HPMC, ki tvori ogrodje tablet. Tablete bomo na začetku izpostavili SŽM, ki bodo raztopine HCl z različno koncentracijo, in jih po različnih časih v SŽM prenesli v 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8 (SČM). DIK-Na smo izbrali kot modelno učinkovino, saj ima topnost odvisno od pH in ima pKa v območju fiziološkega pH GIT.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

- natrijev diklofenakat, čistota $\geq 98\%$, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija, proizvedeno na Kitajskem;
- Metolose® 90SH-100.000SR (lastnosti so prikazane v Preglednici III), Shin Etsu, Japonska;

Preglednica III: Lastnosti Metolose® 90SH-100.000SR (HPMC) (17).

viskoznost 2% vodne raztopine pri 20°C	100 000 mPa × s
pH	5,0–8,0
vsebnost metoksi substituenta	22,0–24,0%
vsebnost hidroksipropil substituenta	8,0–12,0%
velikost delcev	150 μm
Gostota	1,26–1,31 g/mL
nasipni kot	39–46°

- klorovodikova kislina, Titrisol®, za pripravo 1 M HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev hidroksid, Titrisol®, za pripravo 1 M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- kalijev dihidrogenfosfat, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- magnezijev stearat, Ph. Eur. 6th, Lex, Koper, Slovenija;
- Avicel PH 200; mikrokristalna celuloza, FMC;
- standard za umeritev pH metra, puferska raztopina, fosfatni pufer pH 7,00 ($\pm 0,02$; 20°C), Kefolab, Ljubljana, Slovenija.

3.2. APARATURE

- spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technologies, HP, Waldbronn, Nemčija;
- aparat za testiranje sproščanja, aparat z vesli in aparat s košaricami, VK 7000, VanKel Technology Group, Cary, NC, ZDA;
- digitalna tehtnica, Exacta 300 EB, tehtnica, Železniki, Slovenija;
- analizna tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwarzenbach, Švica;
- avtomatska pipeta 20–200 μl , Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- avtomatska pipeta 100–1000 μl , Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- avtomatska pipeta 500–2500 μl , Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- avtomatska pipeta 1–10 ml, Eppendorf, Hamburg, Nemčija;

- polnilne pipete (1, 2, 3, 5, 10, 15, 25 ml);
- filtri, Minisart RC 15 membrane, velikost por 0,45 μm , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija;
- pH meter, MP 220, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica;
- pH meter, MA 5750, Iskra, Kranj, Slovenija;
- nerjaveča kovinska žička za izdelavo uteževalcev, VanKel Technology Group, North Carolina, USA;
- tabletirka na udarec Kilian SP 300, Kilian and Co GmbH, Nemčija;
- ultrazvočna kadička Sonis, Iskra, Kranj, Slovenija;
- filtri Full flow filters 35 MI, Agilent Technologies, HP, Waldbronn, Nemčija;
- membranski filtri, velikost por 0,45 μm , Sartorius AG, Nemčija;
- aparat za merjenje trdnosti VK 200 tablet hardness tester Agilent Technologies, HP, Waldbronn, Nemčija.

3.3. METODE

Izdelava ogrodnih tablet

Teste sproščanja smo delali na dveh različnih vrstah ogrodnih tablet iz HPMC. Sestava tablet je prikazana v Preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava tablet A in B.

	tablete A	tablete B
natrijev diklofenakat [ut/ut %]	15	25
Metolose 90SH-100.000SR [ut/ut %]	15	74,5
Avicel PH 200,0 [ut/ut %]	69,5	/
magnezijev stearat [ut/ut %]	0,5	0,5

Tablete smo izdelali s tabletirko na udarec. Natančno smo natehtali snovi za tablete in jih zmešali po pravilu rastočih mas. Nato smo mešali še 20 minut, da smo dobili homogeno zmes. Tablete A smo tabletirali polavtomatsko s hitrostjo 15 tablet na minuto. Za tablete B smo na tehtič natehtali 400 ± 10 mg zmesi za tabletiranje, jo nasuli v matrično vdolbino in ročno stisnili tablete. Med tabletiranjem smo redno preverjali pogoje (prikazani v Preglednici V).

Preglednica V: Pogoji pri tabletiranju za tablete A in B.

	tablete A	tablete B
interval mase tablet [mg]	380-400	385-415
interval sile na zgornjem pečatu [kN]	7,2-8,2	9,8-10,8
interval sile na spodnjem pečatu [kN]	9,6-10,6	12,0-13,0
interval sile stiskanja [kN]	7-8	13-14
interval trdnosti [N]	približno 100	85-95

Priprava medijev

- **1 M HCl**

1 M HCl smo pripravljali z ampulami Titrisol za pripravo 1 M HCl. V bučko z volumnom 1 liter smo do polovice nalili deionizirano vodo. Vsebino ampule smo kvantitativno prenesli v bučko z deionizirano vodo, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in dobro premešali.

- **1 M NaOH**

1 M NaOH smo pripravljali z ampulami Titrisol za pripravo 1 M NaOH. V bučko z volumnom 1 liter smo do polovice nalili deionizirano vodo. Vsebino ampule smo kvantitativno prenesli v bučko z deionizirano vodo, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in dobro premešali.

- **Simuliran želodčni medij (SŽM)**

Kot SŽM smo uporabili raztopine HCl v različnih koncentracijah. Do polovice bučke smo nalili deionizirano vodo. Z merilnim valjem oziroma polavtomatsko pipeto smo odmerili potreben volumen 1 M HCl (Preglednica VI) in jo kvantitativno prenesli v bučko z deionizirano vodo. Z deionizirano vodo smo dopolnili do oznake na bučki in dobro premešali. V nadaljevanju podajamo raztopine HCl glede na pH, izračunan iz molarnih koncentracij HCl.

Preglednica VI: Volumni 1 M HCl za pripravo SŽM z različnimi vrednostmi pH.

koncentracija pripravljene HCl [mol/L]	0,1	0,0251	0,01	0,00398	0,001
izračunani pH	1,0	1,6	2,0	2,4	3,0
1 M HCl za 1 L raztopine HCl [mL]	100	25,11	10	3,9811	1,0
1 M HCl za 5 L raztopine HCl [mL]	500	125,6	50	19,91	5,0

- **Simuliran črevesni medij (SČM)**

SČM je bil 50 mM fosfatni pufer s pH = 6,8. Sestava je prikazana v Preglednici VII. Na precizni tehtnici smo natančno natehtali KH_2PO_4 v čašo. V bučko smo približno do polovice nalili deionizirano vodo. KH_2PO_4 smo kvantitativno prenesli v bučko z deionizirano vodo. Z merilnim valjem smo odmerili potreben volumen 1 M NaOH in ga kvantitativno prenesli v bučko z deionizirano vodo. Z deionizirano vodo smo dopolnili do oznake na bučki in dobro premešali. Fosfatnemu pufru smo izmerili pH in po potrebi uravnali pH na $6,8 \pm 0,05$. Predhodno je bil pH meter umerjen s pufersko raztopino s pH $7,00 \pm 0,02$.

Preglednica VII: Sestava 50 mM fosfatnega pufra s pH 6,8.

volumen fosfatnega pufra s pH 6,8 [L]	2	5
KH_2PO_4 [g]	13,6	34
1 M NaOH [mL]	44	110
H_2O	do 2 L	do 5 L

Testi sproščanja

Teste sproščanja smo izvajali na aparatu za sproščanje z vesli - USP2 (preliminarni in končni testi) ali košaricami - USP1 (preliminarni testi). V posodo, v kateri je potekalo sproščanje, smo nalili en liter medija. Medij smo pred sproščanjem segreli na $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Hitrost vrtenja vesel in košaric je bila 100 obratov/minuto. Vzorčili smo avtomatsko. Vzorec je bil avtomatsko filtriran. Velikost por v filtru je bila $35 \mu\text{m}$. Volumen posameznega vzorca je bil 5 mL. Odvzetih vzorcev nismo nadomeščali s svežim medijem, ampak smo pri izračunih profilov sproščanja upoštevali zmanjšan volumen in odvzeto maso učinkovine. Pred začetkom sproščanja smo vzorčili medij, ki je predstavljal nulti vzorec.

Pred sproščanjem smo vsako tableto stehali. Mase tablet smo upoštevali pri izračunu profilov sproščanja, kjer smo predpostavili, da masa učinkovine predstavlja 15 (tablete A) oziroma 25 (tablete B) ut/ut % mase tablete. Nato smo tablete previdno spustili v medij v posodi in začeli teste sproščanja. Pri testih sproščanja na aparatu z vesli so bile tablete v žički (tablete smo predhodno vstavili v večkrat zavito nerjavečo žičko) ali brez žičke.

Začetni medij so bile raztopine HCl različnih koncentracij, ki so nam predstavljale SŽM. Tablete so se zadrževale v SŽM različni čas. Po tem času smo sproščanje nadaljevali v SČM, ki je bil 50 mM fosfatni pufer s pH 6,8. Začetni volumen SČM je bil 1 liter. Časovne

točke vzorčenja v SŽM in SČM so se razlikovale glede na čas zadrževanja v SŽM (Preglednica VIII za preliminarnne, Preglednica X pa za končne teste sproščanja).

- **Preliminarni testi sproščanja**

V preliminarnih testih smo uporabljali tablete A in B. Tableto smo izpostavili SŽM. SŽM so imeli pH 1, 2 in 3 (Preglednica VI). Časi zadrževanja v SŽM pa so bili 10, 60, 90 in 200 minut. Po tem času smo zamenjali medij s SČM s pH 6,8. Skupen čas poteka poskusa je bil 20 ur. Časovne točke vzorčenja so prikazane v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Časovne točke vzorčenja v SŽM in SČM za različne čase zadrževanja tablet v SŽM pri preliminarnih poskusih.

čas zadrževanja tablete v SŽM	10 minut	60 minut	90 minut	200 minut
časovne točke vzorčenja v SŽM [min]	0	0	0	0
	10	30	30	30
		60	60	60
			90	90
				120
				150
				180
				200
časovne točke vzorčenja v SČM [min]	30	90	120	240
	60	120	150	300
	90	180	180	360
	120	240	240	420
	180	300	300	480
	240	360	360	600
	300	480	480	720
	360	600	600	900
	480	720	720	1200
	1200	1200	1200	

S preliminarnimi testi smo želeli določiti optimalne pogoje, pri katerih bi dobili najboljše ponovljivost profilov sproščanja. Preliminarne poskuse smo izvajali na 4 različne načine (Preglednica IX). Razlikovali so se v načinu zamenjave medija, aparaturi za sproščanje in uporabi žičke za tablete.

Preglednica IX: Pogoji in parametri sproščanja (čas v SŽM in pH), tablete, na katerih smo izvajali teste sproščanja in število paralelk (PAR) pri posameznih pogojih za preliminarnе teste sproščanja.

izvedba	pogoji sproščanja	tablete	čas v SŽM [min]	število PAR pH		
				1	2	3
ODLIVANJE MEDIJA						
I	košarice	A	60			9
		A	200			3
II	vesla (brez žičke)	A	60	2	2	4
		poskusne A ^a	60	3	4	4
		A	10	2	2	2
		A	60	2	2	11
III	vesla (žička)	A	90	8	2	2
		A	200	2	2	3
		B	60			5
PRENOS TABLETE V SEGRET MEDIJ						
IV	vesla (žička)	A	60			8
		B	60	3	3	2

^a Poskusne tablete A so tablete A, ki smo jih preliminarno ročno tabletirali. Z njimi smo preverjali profile sproščanja.

Pri izvedbi I smo v posode USP aparata nalili SŽM. Tableto smo vstavili v košarico. Košarice s tabletami smo spustili v SŽM. Po času zadrževanja v SŽM smo dvignili košarice s tabletami. Odlili smo SŽM in nalili neogret SČM. Košarice s tabletami smo spustili v SČM.

Pri izvedbi II smo v posode USP aparata nalili SŽM in tableto previdno spustili v SŽM. Po času zadrževanja v SŽM smo odlili SŽM. Pozorni smo bili, da nismo odlili tudi neraztopljenih snovi na dnu posode. Neogret SČM smo počasi in previdno nalivali ob steni posode za sproščanje, ki je bila rahlo nagnjena.

Pri izvedbi III smo v posode USP aparata nalili SŽM. Tableto smo vstavili v večkrat zavito nerjavečo žičko, ki je imela funkcijo uteževalca. Tableto v žički smo previdno spustili v SŽM. Po času zadrževanja v SŽM smo odlili SŽM. Pozorni smo bili, da nismo odlili tudi neraztopljenih snovi na dnu posode. Neogret SČM smo počasi in previdno nalivali ob steni posode za sproščanje, ki je bila rahlo nagnjena.

Pri izvedbi IV smo v štiri posode USP aparata nalili SŽM, v štiri pa SČM. Tableto smo vstavili v žičko. Tableto v žički smo previdno spustili v SŽM. Po času zadrževanja v SŽM smo prenesli tableto v predhodno segret SČM. S pinceto smo zelo previdno prijeli končni del žičke, ki ni bil v stiku s tableto, in prenesli tableto v žički v SČM. Pozorni smo bili, da se nismo dotaknili tablete in jo s tem poškodovali.

- **Končni testi sproščanja**

Končne teste sproščanja smo izvajali samo na tabletah B. Teste sproščanja smo izvajali na USP2. Tableto smo vstavili v žičko. Sproščanje je določen čas potekalo v SŽM, nato pa smo tableto s pinceto prenesli v predhodno ogret SČM. Skupen čas sproščanja v obeh medijih je bil 24 ur. Kot SŽM smo uporabili raztopine HCl s pH 1,0; 1,6; 2,4 in 3,0 (Preglednica VI). SČM je bil 50 mM fosfatni pufer s pH=6,8 ± 0,05.

Časi zadrževanja v SŽM so bili 10, 30, 60, 120 in 200 minut. Časovne točke vzorčenja so prikazane v Preglednici X.

Preglednica X: Časovne točke vzorčenja v SŽM in SČM za različne čase zadrževanja tablet v SŽM pri končnih poskusih.

čas zadrževanja tablete v SŽM	10 minut	30 minut	60 minut	120 minut	200 minut
časovne točke vzorčenja v SŽM [min]	0	0	0	0	0
	10	30	30	30	30
			60	60	60
				90	90
				120	120
					150
					180
					200
časovne točke vzorčenja v SČM [min]	30	60	90	150	240
	60	90	120	180	300
	120	120	180	240	360
	180	180	240	300	420
	240	240	300	360	480
	300	300	360	480	600
	360	360	480	600	720
	480	480	600	720	900
	1080	1080	1080	1080	1080
	1440	1440	1440	1440	1440

Preglednica XI prikazuje število paralelk končnih testov sproščanja.

Preglednica XI: Število paralelek končnih testov sproščanja pri različnih pH in časih v SŽM.

čas v SŽM [min]	pH			
	1,0	1,6	2,4	3,0
10	3	3	5	5
30	3	3	5	5
60	3	3	3	3
120	3	3	5	3
200	4	4	3	4

• **Določanje učinkovine v neraztopljenem ostanku v simuliranem želodčnem mediju**

Pri izvedbi IV smo določili učinkovino v neraztopljenem ostanku v SŽM po prenosu tablete v SČM. Po sproščanju smo prefiltrirali medij in dobro sprali filter s SČM v čašo. S SČM smo dobro sprali v čašo vse dele aparata USP, ki so bili v kontaktu z DIK-Na. Vsebino čaše smo kvantitativno prenesli v bučko z volumnom 100 mL in s SČM dopolnili do oznake na bučki. V bučko smo dali magnetno mešalo in pustili mešati čez noč. Vsebino bučke smo naslednji dan prefiltrirali z membranskim filtrom 0,45 µm, izmerili absorbanco in izračunali maso DIK-Na v neraztopljenem ostanku.

Analiza vzorcev

• **Priprava umeritvenih krivulj v simuliranem želodčnem mediju**

Umeritvene premice smo pripravili za raztopine HCl s pH 1,0; 1,6; 2,0; 2,4 in 3,0. Za vsako koncentracijo HCl smo pripravili tri osnovne raztopine DIK-Na v deionizirani vodi s koncentracijo 300 mg/L. V 100 mL bučko smo natančno natehtali približno 30 mg DIK-Na, ga raztopili v deionizirani vodi in dopolnili do oznake. Da se je raztopila vsa učinkovina, smo uporabili ultrazvočno kadičko. Iz vsake osnovne raztopine smo s polavtomatsko pipeto odmerili tri različne volumne raztopine, ki smo jih prenesli v nove bučke in redčili s kislim medijem do oznake. Pri izboru koncentracijskega območja smo bili pozorni, da smo zajeli celotno območje odzivov pri naših poskusih. Koncentracijska območja standardnih raztopin so prikazana v Preglednici XII. Absorbanco smo izmerili z UV spektrofotometrom pri valovni dolžini 272 nm, kjer ima DIK-Na absorpcijski maksimum v kislih medijih. Ozadje smo brisali s čistimi kislimi mediji. Absorbanco smo merili takoj po pripravi standardnih raztopin. Narisali smo graf absorbance v odvisnosti od koncentracije, z linearno regresijo določili enačbo premice skozi točke in določili kvadrat Pearsonovega koeficienta (R^2).

Preglednica XII: Koncentracijsko območje standardnih raztopin DIK-Na za pripravo umeritvenih krivulj v SŽM.

izračunani pH medija	koncentracijsko območje [mg/L]
1,0	0,6-3,6
1,6	1-6,9
2,0	0,6-5,6
2,4	1-17
3,0	1-16

- **Priprava umeritvenih krivulj v simuliranem črevesnem mediju**

Pripravili smo tri osnovne raztopine DIK-Na v fosfatnem pufru s koncentracijo 100 mg/L. Osnovne raztopine smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko natančno natehtali približno 10 mg DIK-Na, ga raztopili v fosfatnem pufru in dopolnili do oznake. Iz vsake osnovne raztopine smo s polnilno ali polavtomatsko pipeto odmerili tri različne volumne raztopine, ki smo jih prenesli v nove bučke in redčili s fosfatnim pufrom do oznake. Pri izboru koncentracijskega območja smo bili pozorni, da so bili odzivi (absorbance) v območju linearne odvisnosti absorbance od koncentracije. Koncentracijsko območje standardnih raztopin DIK-Na v fosfatnem pufru je bilo od 0,5 do 30 mg/L. Absorbance standardnih raztopin smo izmerili z UV spektrofotometrom pri valovni dolžini 276 nm, kjer ima DIK-Na absorpcijski maksimum v fosfatnem pufru s pH 6,8. Ozadje smo brisali s čistim fosfatnim pufrom. Narisali smo graf absorbance v odvisnosti od koncentracije, določili enačbo premice skozi točke z linearno regresijo in določili R^2 .

- **Analiza vzorcev testov sproščanja**

Koncentracije učinkovine v vzorcih smo določali z merjenjem absorbance z UV spektrofotometrom. Za slepi vzorec smo uporabljali čiste medije brez učinkovine. Absorbance smo merili pri valovni dolžini, kjer ima DIK-Na absorpcijski maksimum. V kisljih medijih je bil absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 272 nm, v fosfatnem pufru pri 276 nm. Če so bile absorbance vzorcev v fosfatnem pufru izven območja umeritvene premice (absorbance nad 1,1), smo vzorce petkrat redčili s fosfatnim pufrom in ponovno izmerili absorbance.

Izračun profilov sproščanja

• Izračun koncentracije iz umeritvene krivulje

Koncentracije DIK-Na v vzorcu smo izračunali iz umeritvenih premic za ustrezen medij. V primeru redčenja smo dobljeni rezultat pomnožili s faktorjem redčitve, da smo dobili koncentracijo v neredčenem vzorcu (*Enačba 1*).

$$c = \left(\frac{A}{n_a} \right) \cdot k \cdot f \quad \text{Enačba 1}$$

c – koncentracija učinkovine v vzorcu ob času t [mg/L]

A – izmerjena absorbanca vzorca ob času t

n_a – presečišče umeritvene premice z osjo y za ustrezen medij

k – naklon umeritvene premice v ustreznem mediju [L/mg]

f – faktor redčenja (vzorci brez redčenja = 1, s petkratnim redčenjem = 5)

• Masa DIK-Na v kislem mediju

Volumna odvzetega vzorca nismo nadomeščali s svežim medijem, zato smo morali pri izračunih korigirati vrednosti zaradi zmanjševanja volumna in odvzema mase učinkovine. Maso sproščenega DIK-Na v kislem mediju smo izračunali po *Enačbi 2*.

$$m_k = c_k \cdot (V_0 - V_{vz} \cdot (n_k - 1)) + V_{vz} \cdot (c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1}) \quad \text{Enačba 2}$$

m_k – korigirana masa učinkovine, sproščene v kislem mediju v času t [mg]

c_k – izmerjena koncentracija učinkovine, sproščene v kislem mediju v vzorcu v času t [mg/L]

V_0 – začetni volumen medija [L]

V_{vz} – volumen vzorca [L]

n_k – število vzorcev v kislem mediju ($n = 1$ pri $t = 0$ min)

c_1, c_2, c_{n-1} – izmerjene koncentracije učinkovine v prvem, drugem, ($n - 1$)-tem vzorcu [mg]

• % DIK-Na v kislem mediju

Nato smo izračunali delež sproščene učinkovine. Količino DIK-Na v posamezni tableti smo izračunali iz mase stehtane tablete in % DIK-Na v tableti (*Enačba 3*).

$$\% \text{ u}\check{c}_k = \frac{m_k}{m_{\text{tablete}}} \cdot 100 \quad \text{Enačba 3}$$

$\% \text{ u}\check{c}_k$ – % sproščene učinkovine v kislem mediju v času t

m_k – korigirana masa učinkovine, sproščene v kislem mediju v času t [mg]

ut/ut % - masno/masni delež učinkovine v tableti

m_{tab} - masa tablete [mg]

- **Masa DIK-Na v fosfatnem pufru**

→ **Odlivanje medija**

Pri metodi z odlivanjem medija smo odlili kisel medij in nalili fosfatni pufer. Začetni volumen fosfatnega pufru je bil vedno enak, kar smo upoštevali pri izračunu (*Enačba 4*).

$$m_{\text{fos}} = c_{\text{fos}} (V_0 - V_{\text{VZ}} (n_{\text{fos}} - 1)) + V_{\text{VZ}} (c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1}) \quad \text{Enačba 4}$$

m_{fos} – korigirana masa učinkovine, sproščene v fosfatnem pufru ob času t [mg]

c_{fos} – izmerjena koncentracija učinkovine, sproščene v fosfatnem pufru v vzorcu ob času t [mg/L]

V_0 – začetni volumen medija [L]

V_{VZ} – volumen vzorca [L]

n_{fos} – število vzorcev v fosfatnem pufru

c_1, c_2, \dots, c_{n-1} – izmerjene koncentracije učinkovine v prvem, drugem, $(n - 1)$ -tem vzorcu v fosfatnem pufru [mg]

→ **Prenos tablete**

Tableto smo prenesli v fosfatni pufer, kjer je predhodno potekalo vzorčenje sočasno z vzorčenjem v kislem. Pri izračunu smo upoštevali tudi zmanjšan volumen medija (*Enačba 5*).

$$m_{\text{fos}} = c_{\text{fos}} ((V_0 - V_{\text{VZ}} n_k) - (V_{\text{VZ}} (n_{\text{fos}} - 1))) + V_{\text{VZ}} (c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1})$$

Enačba 5

m_{fos} – korigirana masa učinkovine, sproščene v fosfatnem pufru ob času t [mg]

c_{fos} – izmerjena koncentracija učinkovine, sproščene v fosfatnem pufru v vzorcu ob času t [mg/L]

V_0 – začetni volumen medija [L]

V_{VZ} – volumen vzorca [L]

n_{fos} – število vzorcev v fosfatnem pufru

n_k – število vzorcev v kislem mediju ($n = 1$ pri $t = 0$ min)

c_1, c_2, \dots, c_{n-1} – izmerjene koncentracije učinkovine v prvem, drugem, (n - 1)-tem vzorcu v fosfatnem pufru [mg]

- **Celokupen % DIK-Na**

Nekaj učinkovine je bilo raztopljene v kislem mediju. Raztopljena učinkovina je ostala v kislem mediju po prenosu tablete v fosfatni pufer (metoda prenosa tablete) ali smo jo odlili skupaj s kislim medijem (metoda odlivanja medija). To smo upoštevati tudi pri izračunu celokupnega deleža sproščene učinkovine (*Enačba 6*).

$$\% \text{ u}\check{c} = \frac{m_{kn} - m_{fos}}{m_{tab} \cdot ut} \cdot 100 \quad \text{Ena}\check{c}ba \ 6$$

% u \check{c} – % sproščene učinkovine ob času t

m_{kn} – korigirana masa učinkovine ob zadnjem vzorčenju v kislem mediju [mg]

m_{fos} – korigirana masa učinkovine, sproščene v fosfatnem pufru ob času t [mg]

(enačba za izračun je prikazana predhodno: *Enačba 4* ali *Enačba 5*)

ut/ut % - masno/masni delež učinkovine v tableti

m_{tab} - masa tablete [mg]

Izračun $t_{50\%}$

$t_{50\%}$ je čas, v katerem se sprosti 50% učinkovine iz tablete. Čase smo določili iz povprečnih profilov sproščanja z uporabo metode linearne interpolacije. Poiskali smo dve sosednji točki, med katerima je ležala vrednost $t_{50\%}$ in skozi njiju narisali premico. Z linearno regresijo smo določili enačbo premice skozi točki (vrednosti n in k) (*Enačba 7*).

$$\% \text{ u}\check{c} = k \cdot t + n \quad \text{Ena}\check{c}ba \ 7$$

% u \check{c} - % sproščene učinkovine v času t

k – naklon premice [min^{-1}]

t – čas [min]

n – presečišče premice z osjo y

Iz enačbe smo izračunali čas, ko se je sprostilo 50% učinkovine (% u \check{c} = 50).

4. REZULTATI

4.1. UMERITVENE PREMICE

Preglednica XIII prikazuje enačbe umeritvenih premic za medije, ki smo jih uporabili v poskusih sproščanja; valovne dolžine [nm], pri katerih smo merili absorbance vzorcev za določanje enačb umeritvenih premic in predstavljajo absorpcijski maksimum DIK-Na v izbranem mediju; kvadrat Pearsonovega koeficienta (R^2).

Preglednica XIII: Enačbe umeritvenih premic za uporabljene medije.

medij	enačba umeritvene premice	valovna dolžina [nm]	R^2
SŽM s pH 1,0	$A = 0,0281c + 0,0018$	272	0,9976
SŽM s pH 1,6	$A = 0,0281c - 0,0024$	272	0,999
SŽM s pH 2,0	$A = 0,033c - 0,0009$	272	0,9992
SŽM s pH 2,4	$A = 0,0279c + 0,002$	272	0,9996
SŽM s pH 3,0	$A = 0,0268c + 0,0032$	272	0,9995
SČM	$A = 0,0306c - 0,0009$	276	0,9996

A – absorbanca c – koncentracija [mg/L]

4.2. PRELIMINARNI TESTI SPROŠČANJA

Tableto smo izpostavili SŽM. SŽM so imeli pH 1, 2 in 3. Časi zadrževanja v SŽM pa so bili 10, 60, 90 in 200 minut. Po času zadrževanja v SŽM smo menjali medij s SČM s pH 6,8. Skupen čas poteka poskusa je bil 20 ur.

Preglednice XIV-XXVII prikazujejo delež sproščenega DIK-Na v vseh časovnih točkah vzorčenja pri različnih pogojih preliminarnih testov sproščanja z izračunanim povprečjem in standardno deviacijo med paralelkami.

Profili sproščanja za tablete A

Preglednica XIV: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 3,0. Poskuse smo delali na USP1. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

I - odlivanje medija, USP1											
pH 3,0 in 60 minut v SŽM											
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	PAR 6 [%]	PAR 7 [%]	PAR 8 [%]	PAR 9 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,82	0,82	0,64	1,51	0,83	0,41	2,20	3,69	0,00	1,21	1,12
30	5,88	7,48	12,53	9,44	4,04	5,18	10,59	6,49	7,71	7,71	2,72
60	7,85	9,85	16,90	11,87	5,55	6,70	12,75	7,07	10,02	9,84	3,58
90	25,85	28,65	36,57	31,03	24,90	26,96	33,51	25,55	30,65	29,30	3,98
120	31,81	35,14	42,25	41,03	31,60	36,21	40,11	31,97	39,34	36,61	4,23
180	38,56	43,20	50,79	49,85	39,51	47,67	48,48	39,47	46,64	44,91	4,80
240	43,91	48,82	57,23	50,90	42,72	52,15	54,72	45,20	51,98	49,74	4,97
300	48,51	53,51	62,22	59,11	47,74	57,79	60,08	49,56	56,22	54,97	5,37
360	52,24	57,77	66,57	62,88	52,21	63,73	64,36	53,62	59,97	59,26	5,55
480	58,27	64,57	72,60	69,25	58,97	65,75	72,41	60,18	65,67	65,30	5,43
600	64,21	69,32	78,78	67,62	59,29	72,05	78,71	65,54	70,39	69,54	6,42
720	69,45	75,02	81,46	68,60	60,93	73,44	84,27	70,62	74,31	73,12	6,96
1200	85,57	91,94	93,35	83,16	77,79	85,95	96,12	88,44	85,89	87,58	5,60

Preglednica XV: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 200 minut in pH SŽM 3,0. Poskuse smo delali na USP1. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

I - odlivanje medija, USP1					
pH 3,0 in 200 minut v SŽM					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0	0	0	0
30	5,38	4,41	5,21	5,00	0,52
60	7,58	6,12	6,12	6,61	0,85
90	8,57	7,01	7,06	7,55	0,89
120	9,10	7,73	7,59	8,14	0,83
150	9,56	8,43	8,12	8,70	0,76
180	9,85	8,62	8,46	8,98	0,76
200	12,93	11,55	10,81	11,77	1,07
230	34,80	33,80	33,07	33,89	0,87
260	42,26	41,37	40,66	41,43	0,80
320	51,87	50,21	47,44	49,84	2,24
380	58,40	55,55	51,43	55,13	3,50
440	62,57	59,42	59,62	60,54	1,77
500	65,63	62,57	65,06	64,42	1,62
620	71,28	67,68	72,29	70,42	2,42
740	75,44	72,36	77,60	75,14	2,63
860	78,84	76,56	82,86	79,42	3,19

Preglednica XVI: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 1,0; 2,0 ter 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile brez žičke. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

II - odlivanje medija, tablete brez žičke, USP2														
60 minut v SŽM														
pH 1,0					pH 2,0				pH 3,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	1,25	0,00	0,62	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,01	5,10	5,16	2,60	2,92
30	2,39	2,75	2,57	0,25	3,92	2,44	3,18	1,05	11,39	10,31	10,30	7,76	9,94	1,54
60	2,55	3,28	2,91	0,52	4,16	2,58	3,37	1,12	14,75	11,95	11,60	9,32	11,91	2,23
90	16,13	16,30	16,21	0,12	19,07	13,52	16,29	3,93	39,11	38,37	33,92	31,67	35,76	3,56
120	23,10	21,61	22,36	1,05	26,86	20,62	23,74	4,41	43,68	43,54	38,89	36,44	40,64	3,58
180	34,99	28,54	31,76	4,57	44,32	34,01	39,17	7,29	50,13	51,40	46,30	43,81	47,91	3,49
240	45,92	34,43	40,18	8,12	56,44	45,57	51,01	7,69	55,27	57,51	52,07	49,73	53,65	3,44
300	54,36	39,67	47,02	10,38	63,64	54,56	59,10	6,42	59,75	61,73	58,42	54,43	58,58	3,08
360	58,72	44,23	51,47	10,25	69,38	61,67	65,53	5,45	63,09	66,57	63,28	58,63	62,89	3,26
480	68,74	52,28	60,51	11,64	78,24	74,65	76,44	2,54	69,20	72,08	70,55	65,79	69,41	2,68
600	76,30	58,53	67,41	12,57	84,72	82,63	83,67	1,48	73,16	76,94	76,43	72,57	74,78	2,23
720	81,66	65,99	73,82	11,08	88,91	87,41	88,16	1,06	76,92	80,42	82,11	79,56	79,75	2,16
1440	107,32	97,98	102,65	6,60	102,38	103,47	102,92	0,77	83,93	87,84	93,82	95,24	90,21	5,27

Preglednica XVII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 1,0. Poskuse smo delali na USP2 s poskusnimi tabletami A. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2					
pH 1,0 in 60 minut v SŽM					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,00	0,11	0,57	0,22	0,30
30	0,00	0,19	0,78	0,32	0,41
60	0,15	0,63	0,79	0,53	0,33
90	6,10	4,65	6,59	5,78	1,01
120	10,07	7,77	9,94	9,26	1,29
180	15,84	12,96	14,89	14,56	1,47
240	20,85	18,10	19,89	19,62	1,40
300	25,37	22,84	25,14	24,45	1,40
360	29,87	27,82	30,14	29,28	1,27
480	38,11	37,34	40,62	38,69	1,72
600	46,17	46,66	50,74	47,86	2,51
720	53,77	55,19	60,68	56,55	3,65
1200	74,36	92,84	102,26	89,82	14,19

Preglednica XVIII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 2,0 in 3,0. Poskuse smo delali na USP2 s poskusnimi tabletami A. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2												
60 minut v SŽM												
pH 2,0							pH 3,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,39	0,27	0,55	0,56	0,46	0,16	0,02	0,60	0,17	0,70	0,49	0,28
30	0,79	0,92	0,71	0,74	0,79	0,12	7,98	7,52	7,42	6,47	7,13	0,58
60	1,05	1,00	1,17	0,97	1,05	0,11	9,08	9,07	8,71	7,32	8,37	0,92
90	7,61	9,63	8,05	6,76	8,15	1,44	30,21	29,95	25,98	24,32	26,75	2,89
120	12,22	13,25	12,58	11,27	12,36	1,01	37,25	36,32	32,55	31,23	33,37	2,64
180	21,97	24,02	20,24	20,08	21,45	2,23	47,07	44,44	40,30	39,67	41,47	2,59
240	31,75	34,34	27,13	31,06	30,84	3,61	54,11	50,82	47,08	46,06	47,99	2,50
300	41,51	43,42	34,61	36,82	38,28	4,59	59,47	55,96	52,97	51,79	53,57	2,15
360	50,17	51,42	39,79	43,24	44,81	5,98	63,95	60,25	58,33	56,71	58,43	1,78
480	64,41	65,26	50,29	55,53	57,02	7,60	74,40	70,40	66,84	64,66	67,30	2,90
600	73,55	69,87	59,14	65,39	64,80	5,39	79,10	73,84	73,78	71,73	73,12	1,20
720	79,98	77,04	66,72	73,38	72,38	5,24	82,91	79,12	79,98	77,96	79,02	1,01
1200	96,12	93,32	89,81	98,24	93,79	4,23	95,29	90,82	99,74	97,53	96,03	4,65

Preglednica XIX: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 10 minut in pH SŽM 1,0, 2,0 in 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2												
10 minut v SŽM												
pH 1,0					pH 2,0				pH 3,0			
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0	0,00	0,00	0	0,88	0,44	0,62	0,49	0,28	0,39	0,15
10	0,86	0,72	0,79	0,10	1,06	0,93	1,00	0,09	5,91	6,10	6,01	0,13
30	4,92	4,22	4,57	0,50	7,92	7,20	7,56	0,51	21,37	23,65	22,51	1,61
60	9,01	8,73	8,87	0,20	14,20	14,51	14,35	0,22	27,30	30,98	29,14	2,60
90	13,20	13,11	13,15	0,06	21,40	22,76	22,08	0,96	32,27	36,86	34,57	3,25
120	17,09	17,05	17,07	0,03	28,77	30,36	29,57	1,12	36,69	42,15	39,42	3,86
180	24,04	24,34	24,19	0,21	41,13	42,86	42,00	1,22	43,63	50,58	47,11	4,91
240	30,57	31,51	31,04	0,66	50,41	51,49	50,95	0,77	49,49	57,57	53,53	5,72
300	36,80	38,14	37,47	0,95	57,13	58,14	57,63	0,72	54,50	64,04	59,27	6,74
360	42,55	44,48	43,52	1,36	62,71	63,35	63,03	0,45	59,29	69,67	64,48	7,34
480	54,20	56,00	55,10	1,27	72,33	71,85	72,09	0,34	67,60	80,86	74,23	9,38
1200	103,59	102,75	103,17	0,59	99,63	98,39	99,01	0,88	95,04	104,77	99,91	6,88

Preglednica XX: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 1,0 ter 2,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2								
60 minut v SŽM								
pH 1,0					pH 2,0			
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	1,22	1,37	1,30	0,11	2,01	1,86	1,94	0,10
30	1,80	1,68	1,74	0,09	2,74	2,03	2,39	0,50
60	4,47	4,54	4,50	0,04	5,94	3,78	4,86	1,52
90	10,20	11,12	10,66	0,65	14,25	12,31	13,28	1,38
120	13,85	14,61	14,23	0,54	20,90	18,93	19,92	1,39
180	19,79	20,24	20,01	0,31	33,82	32,97	33,39	0,60
240	25,10	25,24	25,17	0,10	45,21	45,07	45,14	0,10
300	30,00	29,72	29,86	0,20	54,75	54,54	54,65	0,15
360	34,32	34,02	34,17	0,21	62,61	62,43	62,52	0,13
480	43,43	41,82	42,62	1,14	72,16	72,26	72,21	0,07
600	52,04	48,85	50,45	2,26	80,70	79,36	80,03	0,95
720	60,13	55,80	57,96	3,06	86,55	84,51	85,53	1,44
1200	89,30	79,95	84,62	6,61	100,63	100,07	100,35	0,40

Preglednica XXI: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2													
pH 3,0 in 60 minut v SŽM													
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	PAR 6 [%]	PAR 7 [%]	PAR 8 [%]	PAR 9 [%]	PAR 10 [%]	PAR 11 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,11	0,80	0,85	1,93	1,99	4,82	2,58	2,57	3,86	0,59	4,00	2,19	1,55
30	8,94	6,49	9,74	8,53	8,91	11,14	10,76	9,73	10,36	10,40	9,25	9,48	1,29
60	11,81	10,38	12,64	10,31	12,07	13,77	13,18	10,83	11,06	12,02	10,90	11,72	1,14
90	30,55	32,54	37,69	31,10	39,31	42,13	38,73	39,05	38,72	36,44	34,13	36,40	3,78
120	38,52	40,20	41,66	40,02	46,09	48,99	46,35	44,53	45,31	42,89	40,91	43,22	3,27
180	47,76	49,36	48,83	49,61	55,86	60,40	54,26	52,55	53,76	51,11	49,56	52,10	3,76
240	54,50	56,60	54,96	56,27	63,11	68,90	60,60	58,56	60,48	57,40	55,92	58,85	4,26
300	59,53	62,54	59,62	59,01	66,13	73,59	65,50	63,59	65,66	62,09	61,16	63,49	4,20
360	63,92	67,18	63,97	63,55	70,70	79,22	69,64	67,45	70,32	66,30	65,40	67,97	4,52
480	70,70	74,08	70,49	70,85	78,22	83,71	76,25	74,49	77,64	73,89	72,34	74,79	4,00
600	75,59	78,78	74,90	69,14	77,76	86,81	81,52	79,85	82,92	80,71	78,42	78,76	4,62
720	77,65	84,13	76,77	84,97	82,46	90,77	86,24	84,77	87,01	85,79	82,84	83,95	4,01
1200	89,71	95,71	89,24	94,20	92,30	100,25	95,40	93,39	97,48	98,30	95,30	94,66	3,40

Preglednica XXII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 90 minut in pH SŽM 1,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2										
pH 1,0 in 90 minut v SŽM										
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	PAR 6 [%]	PAR 7 [%]	PAR 8 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,23	0,00	0,35	0,15	1,58	0,05	0,26	0,00	0,33	0,52
30	0,31	0,16	0,37	0,39	1,33	0,22	0,29	0,02	0,39	0,40
60	0,37	0,24	0,46	0,43	1,07	0,33	0,31	0,13	0,42	0,28
90	0,48	0,35	0,48	0,58	1,10	0,41	0,30	0,36	0,51	0,25
120	7,19	6,17	6,37	7,05	6,75	6,55	5,11	7,70	6,61	0,78
150	11,09	9,89	9,58	10,12	9,57	10,73	8,68	12,15	10,23	1,08
180	14,44	12,82	12,52	12,95	12,32	13,40	11,62	15,90	13,25	1,35
240	20,07	18,22	17,51	18,01	16,86	18,66	16,60	22,59	18,56	1,96
300	25,14	23,08	22,13	22,52	20,90	23,47	20,94	28,30	23,31	2,44
360	29,96	27,65	26,44	26,91	24,90	27,99	25,02	33,25	27,77	2,76
480	38,53	36,41	34,70	35,23	32,15	36,39	32,55	42,22	36,02	3,26
600	46,55	44,66	42,72	43,13	39,14	44,53	39,96	50,54	43,91	3,63
720	54,09	52,43	49,89	50,62	45,53	52,48	47,22	58,40	51,33	4,02
1200	81,15	81,54	76,46	78,00	69,82	82,67	74,52	87,25	78,93	5,40

Preglednica XXIII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 90 minut in pH SŽM 2,0 ter 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2								
90 minut v SŽM								
t [min]	pH 2,0				pH 3,0			
	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,18	0,21	0,19	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,83	0,70	0,76	0,10	9,46	9,53	9,50	0,04
60	1,13	1,07	1,10	0,04	10,28	10,44	10,36	0,11
90	1,44	1,35	1,40	0,07	10,78	10,72	10,75	0,05
120	10,10	10,56	10,33	0,33	37,55	36,87	37,21	0,48
150	15,84	16,49	16,17	0,46	44,28	43,42	43,85	0,61
180	21,28	22,77	22,02	1,05	48,77	47,63	48,20	0,81
240	31,60	35,20	33,40	2,55	55,65	54,30	54,98	0,95
300	41,28	46,40	43,84	3,62	60,28	59,42	59,85	0,61
360	49,76	55,69	52,72	4,19	64,19	63,76	63,98	0,30
480	62,64	69,19	65,92	4,63	70,41	70,61	70,51	0,14
600	72,04	78,50	75,27	4,56	76,44	78,90	77,67	1,74
720	78,52	84,08	81,30	3,93	80,42	81,38	80,90	0,68
1200	91,04	96,72	93,88	4,01	89,19	91,62	90,40	1,72

Preglednica XXIV: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 200 minut in pH SŽM 1,0; 2,0 ter 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2													
200 minut v SŽM													
pH 1,0					pH 2,0				pH 3,0				
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	9,61	9,09	8,61	9,10	0,50
60	0,90	0,00	0,45	0,64	1,90	1,49	1,69	0,29	13,56	12,38	12,27	12,74	0,72
90	0,92	0,87	0,89	0,04	1,93	1,60	1,77	0,23	15,48	13,71	13,58	14,26	1,07
120	0,94	0,88	0,91	0,04	2,03	1,81	1,92	0,15	15,48	14,08	13,91	14,49	0,86
150	1,02	0,99	1,01	0,02	1,29	1,85	1,57	0,39	15,63	14,23	14,30	14,72	0,79
180	1,10	1,01	1,05	0,06	2,32	2,06	2,19	0,18	15,72	14,42	14,17	14,77	0,83
200	1,25	1,10	1,17	0,10	2,45	2,26	2,35	0,14	18,10	16,76	16,04	16,97	1,05
240	11,46	10,38	10,92	0,76	16,28	15,35	15,81	0,66	45,67	41,75	46,55	44,65	2,56
300	17,64	16,96	17,30	0,49	27,38	27,76	27,57	0,26	55,60	50,40	58,25	54,75	3,99
360	23,18	22,64	22,91	0,39	37,94	38,80	38,37	0,61	68,71	61,51	69,15	66,46	4,29
420	27,93	28,53	28,23	0,42	47,31	49,26	48,29	1,38	75,14	69,64	74,95	73,24	3,12
480	31,96	34,04	33,00	1,47	55,60	57,69	56,65	1,48	79,23	74,79	78,98	77,67	2,50
600	39,85	43,78	41,81	2,78	69,48	70,48	69,98	0,71	82,15	78,26	82,06	80,82	2,22
720	47,74	51,09	49,42	2,37	80,12	78,70	79,41	1,01	85,24	82,69	82,28	83,40	1,60
900	58,46	59,32	58,89	0,61	88,73	87,50	88,12	0,87	87,93	85,86	85,52	86,44	1,30
1200	73,56	72,19	72,87	0,97	96,56	96,55	96,55	0,01	94,17	89,79	89,87	91,27	2,51

Preglednica XXV: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil prenos tablet v segret medij.

IV - prenos tablet v segret medij, tablete v žički, USP2										
pH 3,0 in 60 minut v SŽM										
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	PAR 6 [%]	PAR 7 [%]	PAR 8 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,00	2,78	5,61	2,94	0	0	0,28	0,06	1,46	2,10
30	9,42	7,97	11,47	10,71	10,13	7,54	9,38	6,92	9,19	1,60
60	11,22	9,50	12,25	12,06	11,23	9,27	10,9	10,24	10,84	1,10
90	32,13	29,87	32,35	33,35	31,29	29,54	31,21	25,96	30,71	2,30
120	39,20	36,94	39,11	39,70	37,94	35,82	38,71	32,73	37,52	2,33
180	47,13	44,93	47,11	48,10	46,08	43,46	47,73	40,91	45,68	2,47
240	53,46	51,06	53,66	54,23	52,01	49,26	54,9	46,84	51,93	2,76
300	58,90	56,02	59,21	59,22	57,28	54,13	60,79	51,86	57,18	3,01
360	63,78	60,53	64,12	63,51	61,8	58,42	65,67	56,38	61,78	3,15
480	72,42	67,74	72,47	71,10	69,5	66,11	74,06	63,91	69,66	3,51
600	81,14	76,00	80,34	77,79	76,02	71,7	81,33	70,44	76,84	4,15
720	86,02	80,83	86,44	82,62	81,02	77,05	86,49	76,68	82,14	3,99
1200	98,89	93,12	97,71	94,28	92,32	91,24	97,77	90,4	94,47	3,26

Profili sproščanja za tablete B

Preglednica XXVI: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 3,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil odlivanje medija.

III - odlivanje medija, tablete v žički, USP2							
pH 3,0 in 60 minut v SŽM							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,18	0,26	0,75	0,13	0,18	0,30	0,26
30	2,29	2,54	2,68	2,43	2,44	2,48	0,14
60	2,65	3,17	2,96	2,69	2,89	2,87	0,21
90	14,04	14,25	14,46	14,22	14,85	14,36	0,31
120	18,24	18,34	18,30	18,30	18,46	18,33	0,08
180	24,12	23,57	24,07	24,34	24,16	24,05	0,29
240	29,69	28,58	29,31	29,52	30,01	29,42	0,53
300	35,02	33,35	34,58	34,46	35,57	34,60	0,82
360	39,72	37,86	39,27	39,65	40,92	39,49	1,10
480	49,58	46,60	48,69	48,12	50,05	48,61	1,35
600	57,20	54,34	56,37	55,69	57,82	56,28	1,35
720	63,79	61,19	63,15	63,11	64,59	63,16	1,26
1200	82,21	81,24	83,24	84,27	84,16	83,02	1,30

Preglednica XXVII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min] za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 1,0 ter 2,0. Poskuse smo delali na USP2. Tablete so bile v žički. Način menjave medija je bil prenos tablet v segret medij.

IV - prenos tablet v segret medij, tablete v žički, USP2														
60 minut v SŽM														
t [min]	pH 1,0					pH 2,0					pH 3,0			
	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	1,77	1,76	0,02
30	0,68	0,33	0,33	0,44	0,20	0,90	0,70	0,56	0,72	0,17	3,19	2,98	3,09	0,15
60	0,96	0,32	0,44	0,58	0,34	1,06	0,69	0,57	0,77	0,25	3,34	3,05	3,19	0,20
90	2,87	2,65	2,18	2,57	0,35	4,53	3,84	3,50	3,96	0,53	15,26	14,52	14,89	0,52
120	4,27	4,14	3,69	4,03	0,31	7,48	6,56	6,24	6,76	0,65	20,38	19,16	19,77	0,86
180	7,44	7,39	6,77	7,20	0,37	13,46	12,66	11,87	12,66	0,80	27,15	25,88	26,52	0,90
240	10,93	10,65	10,26	10,61	0,34	19,59	18,60	17,62	18,60	0,98	32,96	31,49	32,22	1,04
300	14,51	14,10	13,71	14,10	0,40	25,60	24,62	23,25	24,49	1,18	38,22	36,60	37,41	1,14
360	18,08	17,51	17,26	17,62	0,42	31,36	30,15	28,70	30,07	1,33	43,04	40,95	42,00	1,48
480	24,96	24,70	24,13	24,60	0,42	41,67	39,71	38,94	40,11	1,40	52,50	50,11	51,30	1,69
600	32,05	30,46	29,94	30,82	1,10	51,18	49,00	48,17	49,45	1,55	60,03	57,50	58,76	1,78
720	38,93	40,52	37,82	39,09	1,36	58,20	56,41	55,97	56,86	1,18	66,62	63,70	65,16	2,07
1200	67,05	65,39	62,17	64,87	2,48	81,59	79,48	77,32	79,46	2,14	85,86	83,75	84,81	1,49

4.3. KONČNI TESTI SPROŠČANJA

Končne poskuse sproščanja smo izvajali na USP2. Tableto smo vstavili v žičko in jo izpostavili SŽM. Po času zadrževanja v SŽM smo prenesli tableto s pinceto v predhodno segret SČM s pH 6,8. Skupen čas poteka poskusa je bil 24 ur.

Preglednice XXVIII-XXXII prikazujejo delež sproščenega DIK-Na v točkah vzorčenja za različne čase v SŽM in različne kislosti SŽM. Izračunana so tudi povprečja in standardne deviacije [%] med paralelkami za vsako točko vzorčenja.

Preglednica XXVIII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min], izračunano povprečje (POVP.) in standardna deviacija (SD) med paralelkami za čas v SŽM 10 minut in pH SŽM 1,0, 1,6, 2,4 in 3,0.

10 min v SŽM					
pH 1,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,09	0,06	0,00	0,05	0,05
10	0,63	0,12	0,14	0,30	0,29
30	2,00	1,75	1,63	1,79	0,19
60	3,82	4,11	3,45	3,79	0,34
120	8,65	8,96	8,05	8,55	0,46
180	14,00	14,03	13,14	13,72	0,51
240	19,34	19,25	18,49	19,03	0,47
300	24,49	24,33	23,95	24,25	0,28
360	29,36	29,36	29,09	29,27	0,16
480	38,31	38,11	38,99	38,47	0,46
1080	70,35	72,50	72,84	71,90	1,35
1440	82,52	83,24	86,95	84,24	2,38
pH 1,6					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,25	0,25	0,12	0,21	0,08
10	0,75	0,25	0,21	0,40	0,30
30	3,44	3,69	2,97	3,37	0,37
60	6,50	7,48	5,61	6,53	0,94
120	12,43	14,03	11,56	12,68	1,25
180	18,56	20,57	17,36	18,83	1,62
240	24,36	26,62	22,85	24,61	1,90
300	29,79	32,27	28,06	30,04	2,12
360	34,90	37,53	33,06	35,17	2,25
480	44,20	47,26	41,92	44,46	2,68
1080	77,06	80,95	74,38	77,46	3,30
1440	88,27	90,93	87,79	89,00	1,70

(se nadaljuje)

pH 2,4							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,05	0,06	0,00	0,09	0,00	0,04	0,04
10	0,91	0,45	0,32	0,27	0,30	0,45	0,27
30	5,95	5,79	4,76	5,02	5,23	5,35	0,51
60	9,86	9,81	8,34	8,99	9,12	9,22	0,63
120	17,20	16,42	15,29	16,00	16,12	16,20	0,69
180	23,55	22,92	21,66	22,75	22,54	22,68	0,69
240	29,42	29,14	27,21	28,65	28,22	28,53	0,87
300	34,68	34,97	32,38	33,83	33,40	33,85	1,04
360	39,67	41,91	36,20	38,38	37,96	38,83	2,12
480	48,91	50,45	45,80	47,75	46,41	47,86	1,88
1080	80,19	83,29	74,26	76,58	76,32	78,13	3,59
1440	90,19	92,11	85,70	86,35	87,86	88,44	2,68

pH 3,0							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0	0	0,08	0,00	0,02	0,04
10	2,14	1,60	1,59	1,67	1,59	1,72	0,24
30	8,60	7,72	7,32	7,10	7,54	7,66	0,58
60	12,51	11,78	11,03	10,56	11,60	11,50	0,74
120	18,56	17,89	17,58	16,91	18,43	17,87	0,67
180	24,23	23,99	24,00	22,91	25,22	24,07	0,82
240	29,50	29,41	29,78	28,45	31,38	29,70	1,06
300	34,30	36,06	34,78	33,57	36,77	35,10	1,30
360	39,22	41,02	39,38	38,70	41,20	39,90	1,13
480	47,53	49,97	47,54	47,24	49,39	48,34	1,25
1080	76,60	80,35	77,39	80,91	80,63	79,18	2,02
1440	86,75	86,03	89,51	89,02	94,77	89,22	3,43

Preglednica XXIX: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min], izračunano povprečje (POVP.) in standardna deviacija (SD) med paralelkami za čas v SŽM 30 minut in pH SŽM 1,0, 1,6, 2,4 in 3,0.

30 min v SŽM					
pH 1,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,24	0,41	0,00	0,21	0,21
30	0,24	0,20	0,08	0,17	0,08
60	1,70	2,01	1,37	1,69	0,32
90	3,22	3,90	3,00	3,37	0,47
120	5,07	5,88	4,97	5,30	0,50
180	9,87	10,32	9,10	9,76	0,62
240	14,69	15,02	13,40	14,37	0,85
300	19,71	19,64	17,74	19,03	1,12
360	24,81	24,28	22,06	23,72	1,46
480	34,87	33,46	30,45	32,93	2,26
1080	69,44	67,87	64,93	67,41	2,29
1440	83,45	82,83	80,54	82,27	1,53

(se nadaljuje)

pH 1,6					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,46	0,14	0,19	0,26	0,18
30	0,47	0,57	0,25	0,43	0,17
60	3,24	2,63	2,20	2,69	0,52
90	6,12	4,87	4,28	5,09	0,94
120	9,09	7,55	6,93	7,86	1,11
180	15,12	13,39	12,34	13,62	1,41
240	21,41	19,23	18,17	19,60	1,65
300	27,52	25,09	24,09	25,57	1,76
360	33,32	30,29	29,82	31,15	1,90
480	43,10	39,12	39,76	40,66	2,13
1080	78,51	74,00	74,23	75,58	2,54
1440	90,19	87,15	87,49	88,28	1,66

pH 2,4							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0,26	0,03	0	0,10	0,08	0,11
30	0,43	0,63	0,61	0,43	0,46	0,51	0,10
60	6,46	5,97	6,03	6,16	6,04	6,13	0,20
90	10,16	9,68	9,90	9,77	9,79	9,86	0,18
120	13,36	12,94	13,84	13,33	13,03	13,30	0,35
180	19,73	19,02	21,27	19,38	19,52	19,79	0,87
240	25,86	24,67	27,65	25,36	25,48	25,80	1,12
300	31,47	29,66	33,45	30,65	30,85	31,22	1,41
360	36,56	34,46	38,28	36,52	36,52	36,47	1,35
480	46,32	42,60	48,16	45,01	45,78	45,57	2,03
1080	76,27	74,85	79,55	76,00	76,48	76,63	1,75
1440	89,44	86,96	91,63	87,32	88,04	88,68	1,91

pH 3,0							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0,33	0	0,04	0,01	0,08	0,15
30	1,94	2,33	1,94	2,46	1,90	2,11	0,26
60	10,69	11,53	11,19	11,52	10,89	11,16	0,38
90	15,03	15,81	14,58	15,29	14,34	15,01	0,58
120	18,15	18,99	17,62	18,39	17,06	18,04	0,74
180	23,61	24,71	23,43	23,91	23,00	23,73	0,64
240	28,78	29,91	29,11	29,42	28,09	29,06	0,69
300	33,74	34,71	34,40	34,43	33,09	34,07	0,66
360	38,47	38,81	38,72	40,15	37,44	38,72	0,97
480	47,57	47,53	47,40	48,51	46,13	47,43	0,85
1080	76,88	76,30	80,51	78,42	75,23	77,47	2,05
1440	87,83	88,40	93,04	91,35	88,11	89,75	2,32

Preglednica XXX: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min], izračunano povprečje (POVP.) in standardna deviacija (SD) med paralelkami za čas v SŽM 60 minut in pH SŽM 1,0, 1,6, 2,4 in 3,0.

60 min v SŽM					
pH 1,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,16	0,26	0,00	0,14	0,13
30	0,15	0,27	0,20	0,20	0,06
60	0,15	0,25	0,11	0,17	0,07
90	1,50	1,56	1,48	1,51	0,04
120	2,68	2,82	2,76	2,75	0,07
180	5,75	5,56	5,57	5,63	0,10
240	9,03	8,64	8,95	8,87	0,21
300	12,62	11,92	12,44	12,33	0,36
360	16,03	15,30	16,06	15,80	0,43
480	23,10	21,92	23,35	22,79	0,76
600	30,09	29,63	30,51	30,08	0,44
1080	55,65	53,44	57,44	55,51	2,00
1440	71,31	70,88	75,52	72,57	2,56
pH 1,6					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,22	0,37	0,13	0,24	0,12
30	0,23	0,41	0,47	0,37	0,13
60	0,28	0,40	0,34	0,34	0,06
90	2,14	1,91	2,07	2,04	0,12
120	3,95	3,68	3,80	3,81	0,13
180	8,38	7,68	7,87	7,98	0,36
240	13,06	12,13	12,30	12,49	0,49
300	18,03	16,70	16,88	17,20	0,72
360	23,11	21,24	21,47	21,94	1,02
480	33,19	30,38	29,85	31,14	1,80
600	43,11	38,60	38,04	39,92	2,78
1080	70,65	65,78	64,20	66,88	3,36
1440	82,95	79,35	79,08	80,46	2,16

(se nadaljuje)

pH 2,4					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,21	0,19	0,00	0,14	0,12
30	0,60	0,59	0,60	0,60	0,00
60	0,75	0,75	0,66	0,72	0,05
90	5,27	5,11	5,87	5,42	0,40
120	8,31	8,76	9,80	8,95	0,76
180	14,68	15,53	16,56	15,59	0,95
240	20,53	21,94	22,77	21,75	1,13
300	26,08	27,66	28,48	27,40	1,22
360	31,15	32,78	33,86	32,60	1,37
480	40,69	41,71	44,16	42,19	1,78
600	49,14	50,47	51,88	50,50	1,37
1080	72,57	73,72	74,95	73,75	1,19
1440	82,68	86,49	87,12	85,43	2,40

pH 3,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,03	0,27	0,00	0,10	0,15
30	0,11	1,91	2,16	1,39	1,12
60	2,37	2,30	2,48	2,38	0,09
90	13,66	13,54	13,88	13,69	0,17
120	18,11	18,09	17,91	18,04	0,11
180	24,29	24,43	24,21	24,31	0,11
240	29,93	29,75	29,87	29,85	0,09
300	34,95	34,73	35,08	34,92	0,18
360	39,09	38,87	40,01	39,32	0,60
480	48,51	47,37	48,92	48,27	0,80
600	56,15	54,58	56,87	55,87	1,17
1080	79,26	76,11	79,26	78,21	1,82
1440	89,93	87,94	91,09	89,65	1,59

Preglednica XXXI: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min], izračunano povprečje (POVP.) in standardna deviacija (SD) med paralelkami za čas v SŽM 120 minut in pH SŽM 1,0, 1,6, 2,4 in 3,0.

120 min v SŽM					
pH 1,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,14	0,00	0,09	0,08	0,07
30	0,09	0,04	0,25	0,13	0,11
60	0,15	0,04	0,19	0,13	0,08
90	0,19	0,14	0,17	0,17	0,02
120	0,18	0,09	0,18	0,15	0,05
150	1,85	1,85	1,89	1,86	0,03
180	3,27	3,33	3,26	3,29	0,04
240	5,94	6,15	5,87	5,99	0,15
300	8,65	8,80	8,56	8,67	0,12
360	11,44	11,49	11,28	11,40	0,11
480	17,20	17,15	16,64	17,00	0,31
600	22,97	22,90	22,13	22,67	0,47
720	28,67	28,75	27,30	28,24	0,81
1080	43,80	46,24	42,58	44,21	1,86
1440	60,03	63,01	58,36	60,46	2,35
pH 1,6					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,23	0,21	0,13	0,19	0,05
30	0,34	0,26	0,19	0,26	0,07
60	0,35	0,32	0,21	0,30	0,08
90	0,36	0,37	0,23	0,32	0,08
120	0,42	0,38	0,17	0,32	0,14
150	2,66	2,43	1,87	2,32	0,40
180	4,37	4,06	3,38	3,94	0,50
240	8,07	7,48	6,45	7,33	0,82
300	11,86	11,03	9,78	10,89	1,05
360	15,60	14,57	13,00	14,39	1,31
480	22,93	21,65	19,76	21,45	1,59
600	30,14	29,66	26,35	28,72	2,07
720	37,00	36,70	32,99	35,56	2,23
1080	56,62	56,55	55,20	56,12	0,80
1440	73,34	73,90	75,55	74,26	1,15

(se nadaljuje)

pH 2,4							
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	PAR 5 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,38	0,07	0,01	0,00	0,00	0,09	0,16
30	0,62	0,51	0,62	0,34	0,38	0,49	0,13
60	0,77	0,62	0,67	0,36	0,43	0,57	0,17
90	0,87	0,74	0,76	0,50	0,57	0,69	0,15
120	0,97	0,87	0,89	0,49	0,58	0,76	0,21
150	5,63	5,32	4,95	5,58	4,88	5,27	0,35
180	9,29	9,38	8,56	10,17	8,68	9,22	0,65
240	16,38	17,05	15,62	18,26	16,09	16,68	1,02
300	23,13	24,17	22,42	25,07	22,90	23,54	1,07
360	29,51	30,45	28,71	30,92	29,32	29,78	0,89
480	39,50	42,11	38,74	40,24	39,52	40,02	1,28
600	49,03	50,44	48,37	48,87	48,56	49,05	0,81
720	57,15	58,12	56,09	54,96	55,92	56,45	1,21
1080	80,85	76,44	72,72	71,99	72,49	74,90	3,77
1440	87,65	90,00	86,19	83,43	85,13	86,48	2,50

pH 3,0					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,05	0,00	0,00	0,02	0,03
30	1,74	2,73	1,95	2,14	0,52
60	2,21	3,15	2,31	2,56	0,52
90	2,48	3,37	2,52	2,79	0,50
120	2,70	3,53	2,82	3,02	0,45
150	16,01	17,63	16,48	16,70	0,83
180	20,92	23,34	21,37	21,88	1,29
240	27,46	29,86	28,09	28,47	1,24
300	32,92	35,37	33,68	33,99	1,26
360	37,40	41,07	40,12	39,53	1,91
480	46,94	49,90	47,92	48,25	1,51
600	54,93	58,10	55,50	56,18	1,69
720	61,42	64,64	63,15	63,07	1,61
1080	77,11	79,88	79,38	78,79	1,48
1440	90,58	91,12	93,58	91,76	1,60

Preglednica XXXII: Delež sproščenega DIK-Na [%] v točkah vzorčenja [min], izračunano povprečje (POVP.) in standardna deviacija (SD) med paralelkami za čas v SŽM 200 minut in pH SŽM 1,0, 1,6, 2,4 in 3,0.

200 min v SŽM						
pH 1,0						
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0	0	0,06	0,06	0,03	0,03
30	0,25	0,01	0,07	0,15	0,12	0,10
60	0,31	0,37	0,37	0,12	0,29	0,12
90	0,28	0,26	0,18	0,24	0,24	0,04
120	0,31	0,30	0,33	0,16	0,27	0,08
150	0,45	0,31	0,35	0,23	0,34	0,09
180	0,53	0,41	0,46	0,33	0,43	0,09
200	0,62	0,28	0,49	0,35	0,44	0,15
240	2,81	2,64	2,87	3,23	2,89	0,25
300	5,66	5,46	5,63	6,42	5,79	0,43
360	8,11	7,77	8,14	9,03	8,26	0,54
420	10,60	9,98	10,53	11,66	10,69	0,70
480	13,01	12,21	12,93	14,20	13,09	0,83
600	17,80	16,67	17,53	19,15	17,79	1,03
720	22,52	21,01	22,31	24,15	22,50	1,29
900	29,91	27,50	29,35	31,52	29,57	1,66
1080	40,63	35,08	36,50	38,88	37,77	2,47
1440	55,62	45,73	51,46	52,25	51,26	4,11
pH 1,6						
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,23	0,08	0,17	0,26	0,19	0,08
30	0,34	0,27	0,29	0,31	0,30	0,03
60	0,33	0,38	0,31	0,35	0,34	0,03
90	0,42	0,43	0,34	0,42	0,40	0,04
120	0,41	0,49	0,34	0,40	0,41	0,06
150	0,44	0,55	0,41	0,43	0,46	0,06
180	0,53	0,56	0,41	0,53	0,51	0,07
200	0,59	0,55	0,49	0,55	0,54	0,04
240	3,48	3,31	3,27	3,85	3,47	0,26
300	7,01	6,50	6,49	7,08	6,77	0,32
360	10,52	9,46	9,67	10,41	10,01	0,53
420	14,00	12,50	12,77	13,59	13,21	0,70
480	17,59	15,37	15,82	16,76	16,39	0,99
600	24,69	20,90	22,22	23,00	22,70	1,58
720	31,81	26,26	28,67	29,09	28,96	2,27
900	41,31	34,00	38,06	39,14	38,13	3,06
1080	51,78	42,66	47,98	49,13	47,89	3,83
1440	72,29	57,28	67,04	68,66	66,32	6,41

(se nadaljuje)

pH 2,4					
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,11	0,45	0,06	0,21	0,21
30	0,65	0,57	0,41	0,55	0,12
60	0,73	0,66	0,57	0,65	0,08
90	0,98	0,85	0,65	0,83	0,16
120	0,96	0,85	0,73	0,85	0,12
150	1,05	1,02	0,76	0,95	0,16
180	1,17	1,08	0,91	1,06	0,13
200	1,21	1,11	0,91	1,08	0,16
240	9,53	9,01	8,35	8,96	0,59
300	18,52	17,78	16,57	17,62	0,98
360	26,10	25,13	23,28	24,84	1,43
420	32,11	31,52	29,01	30,88	1,64
480	37,07	37,09	34,21	36,12	1,66
600	47,72	47,74	43,11	46,19	2,67
720	55,65	55,27	51,54	54,15	2,27
900	65,30	66,28	61,20	64,26	2,70
1080	74,60	73,77	69,23	72,53	2,89
1440	88,31	83,73	82,66	84,90	3,00

pH 3,0						
t [min]	PAR 1 [%]	PAR 2 [%]	PAR 3 [%]	PAR 4 [%]	POVP. [%]	SD [%]
0	0,18	0,23	0,02	0,00	0,11	0,11
30	2,02	1,75	2,13	1,69	1,90	0,21
60	2,35	1,98	2,78	2,07	2,29	0,36
90	2,57	2,27	3,18	2,34	2,59	0,42
120	2,82	2,40	3,39	2,49	2,78	0,45
150	3,08	2,59	3,56	2,87	3,02	0,41
180	3,33	2,86	3,73	3,04	3,24	0,38
200	3,43	3,02	3,92	3,11	3,37	0,41
240	19,80	19,33	20,88	20,54	20,14	0,70
300	28,93	27,37	28,94	28,51	28,44	0,74
360	35,06	32,88	34,86	34,28	34,27	0,98
420	42,47	37,81	40,09	39,79	40,04	1,91
480	48,14	43,67	44,57	44,58	45,24	1,98
600	56,68	51,32	52,63	53,05	53,42	2,30
720	64,11	58,80	59,64	60,42	60,74	2,34
900	73,01	67,40	68,38	69,59	69,60	2,45
1080	81,26	75,72	75,82	78,68	77,87	2,64
1440	94,27	85,61	87,76	92,21	89,96	3,98

4.4. VREDNOSTI $t_{50\%}$

Preglednica XXXIII prikazuje izračunane vrednosti $t_{50\%}$ pri vseh pH in časih v SŽM za končne poskuse sproščanja.

Preglednica XXXIII: Izračunane vrednosti $t_{50\%}$ [min] za preizkušene čase v SŽM (10, 30, 60, 120, 200 minut) pri vseh pH SŽM (1,0, 1,6, 2,4, 3,0).

$t_{50\%}$ [min]				
pH	1,0	1,6	2,4	3,0
Čas v SŽM [min]				
10	687,11	580,84	522,72	512,39
30	776,72	640,48	565,08	531,00
60	975,69	779,12	593,21	507,10
120	1207,02	972,87	615,75	506,71
200	1405,51	1120,98	657,83	550,19

5. RAZPRAVA

DIK-Na uvrščamo v razred II po BCS klasifikaciji (3), za katero je značilna dobra permeabilnost in slaba topnost (6). Za to skupino je značilno, da je hitrost sproščanja proces, ki omejuje absorpcijo. Hitrost sproščanja je opredeljena kot hitrost prehoda učinkovine iz tablete v raztopino.

Topnost DIK-Na je močno odvisna od pH medija. V kislem mediju je topnost zelo nizka in narašča z zviševanjem pH. Topnost učinkovine je tako bistvena tudi za njeno sproščanje iz tablete v raztopino.

5.1. IZBIRA PARAMETROV ZA TESTE SPROŠČANJA

Cilj *in vitro* poskusov sproščanja je napovedovanje obnašanja farmacevtske oblike *in vivo*. Izbrati moramo pogoje sproščanja, s katerimi se približamo fiziološkemu pogojem v GIT in tako simuliramo dogajanje v GIT po peroralni aplikaciji tablete. Napovedna moč je boljša, če so *in vitro* pogoji sproščanja zelo podobni *in vivo* pogojem, ki jim je farmacevtska oblika izpostavljena po aplikaciji (18).

Fiziološki pogoji v želodcu se zelo razlikujejo med posamezniki in tudi intraindividualno. S poskusi smo želeli določiti vpliv pH in časa tablete v SŽM na sproščanje DIK-Na iz ogrodnih tablet iz HPMC. Za oba proučevana parametra smo zato izbrali vrednosti, ki so enakomerno porazdeljene na celotnem intervalu fizioloških vrednosti in nam dajo vpogled v dogajanje pri različnih pogojih.

pH v želodcu na tešče je pri večini zdravih ljudi kavkazijske rase nižji od 3. Najpogostejše vrednosti so med 1,4 in 2,1 (19). Za teste sproščanja smo tako izbrali vrednosti pH SŽM na intervalu med 1 in 3, in sicer 1,0; 1,6; 2,4 in 3,0.

Različni časi v SŽM ponazarjajo čas zadrževanja tablete v želodcu na tešče. V praznem želodcu poteka gibanje v ciklusih migracijskega motoričnega kompleksa (MMC). Ciklus MMC traja približno dve uri (20). Za MMC so značilne tri faze. Prva faza traja približno 60-70 minut in je obdobje mirovanja. Mišične kontrakcije niso prisotne ali jih je malo. Druga faza traja 20-30 minut. Kontrakcije postajajo pogostejše in intenzivnejše. Tretja faza traja približno 5-10 minut. Kontrakcije so zelo intenzivne in pogoste (21). Ciklusi se ponavljajo do vnosa hrane, ki prekine ciklus MMC (20). Pilorični sfinkter je v prvi in drugi fazi skorajda zaprt. Prehajajo lahko samo drobni koloidni delci in tekočina. Močne

kontraksije v tretji fazi povzročijo začasno odprtje pilorusa, kar omogoča praznjenje snovi iz želodca v tanko črevo. Tablete se zadržujejo v želodcu na tešče večinoma do naslednje tretje faze MMC (do dve uri) (21). Tableta se lahko po aplikaciji na prazen želodec zadrži v želodcu od nekaj minut do dveh ur, odvisno v kateri fazi cikla MMC je želodec v času aplikacije tablete. Čas zadrževanja tablete v želodcu je lahko tudi daljši od dveh ur, če se tableta prazni šele v tretji fazi naslednjega MMC cikla (20). Za teste sproščanja smo izbrali čase v SŽM: 10, 30, 60, 120 in 200 minut.

5.2. PRELIMINARNI TESTI SPROŠČANJA

S preliminarnimi testi smo želeli določiti optimalne pogoje, pri katerih bi dobili ponovljive profile sproščanja. Uporabili smo aparat za sproščanje s košaricami (USP1) in vesli (USP2). Pri aparatu z vesli smo uporabljali dve modifikaciji: tableta je bila brez žičke in tableta je bila v žički. Žička je imela funkcijo uteževalca, ki je preprečila, da bi tableta plavalala ali se lepila na stene posode. Preizkusili smo dva načina zamenjave medija: odlivanje medija ali prenos tablete v predhodno segret SČM.

Pri menjavi medija z odlivanjem (izvedba I-III) smo SŽM odlili. Nalili smo neogret SČM, ki je imel sobno temperaturo. Sproščanje je do segretja medija na 37°C potekalo pri nižji temperaturi. Medij smo morali odlivati zelo previdno, da nismo poškodovali tablete ali odlili neraztopljenih snovi, ki so se nabrale na dnu posode. Poskuse smo sočasno izvajali v 6 posodah, zato je bilo odlivanje zelo zamudno. Posledično so bile nekatere tablete izpostavljene SŽM tudi do 10 minut dlje kot druge. Razlika je prišla do izraza predvsem pri krajših časih v SŽM, kjer se je čas v SŽM lahko povečal tudi za 100% (pri času 10 minut). Pri daljših časih razlika ni bila več tako izrazita.

Pri menjavi medija s prenosom tablete (izvedba IV) je potekalo sproščanje ves čas pri konstantni temperaturi, saj je bil medij predhodno segret na 37°C. Prenos tablete v SČM je potekal zelo hitro in ni prišlo do večjih razlik v času zadrževanja v SŽM med posameznimi posodami.

Tablete A

Pri preliminarnih testih sproščanja s tabletami A smo tekom poskusov opazili nekaj neraztopljenih snovi na dnu posode. Neraztopljena snov, ki je bila prisotna že v SŽM, je bila velika težava pri odlivanju SŽM. Med neraztopljenimi snovmi so bile lahko pomožne

snovi, najverjetneje MCC, kot tudi oborjena učinkovina. Neraztopljene snovi so bile lahko tudi posledica poškodb tablet.

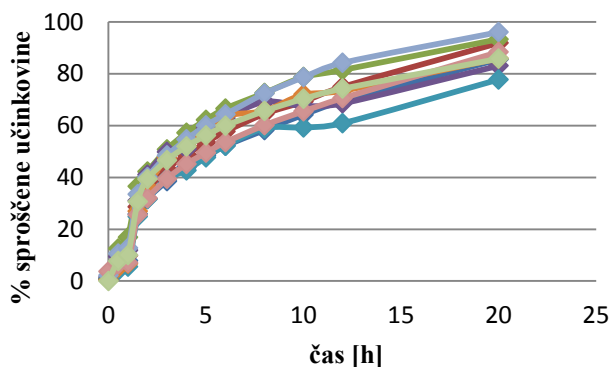
Po prenosu tablet A v SČM so ostale neraztopljene snovi v SŽM. Raztopljeni DIK-Na, ki se je sprostil iz tablete v SŽM, se je lahko oboril v SŽM. Tablete so se lahko med sproščanjem okrušile, zato so lahko neraztopljeni delci zapuščali tableto, vendar se niso raztapljali. Zato je obstajala možnost, da bi ostalo nekaj DIK-Na ob prenosu neraztopljenega oziroma oborjenega. Z merjenjem absorbance smo določili samo koncentracijo raztopljenega učinkovine. DIK-Na bi se lahko kasneje raztopil v SŽM ali ostal kot neraztopljeni ostanek. Po prenosu tablete v SČM smo hkrati vzorčili tudi iz posod s SŽM in spremljali vrednosti absorbance. Absorbance vzorcev iz SŽM po prenosu tablet so bile zelo podobne absorbanci v zadnji točki vzorčenja pred prenosom. Zato zaključujemo, da se je DIK-Na, ki se je sprostil iz tablete v SŽM, raztopil v SŽM pred prenosom tablete v SČM, kasneje pa ne pride do nadaljnjega raztapljanja neraztopljenega DIK-Na.

Po končanem sproščanju smo določili še delež DIK-Na v neraztopljenem ostanku v SŽM s pH 3,0. Izračunana masa DIK-Na v neraztopljenem ostanku je bila nizka. Zato zaključujemo, da je bil delež neraztopljenega DIK-Na v SŽM nizek in ni vplival pomembno na rezultat testov sproščanja. Ker je bila izračunana masa DIK-Na nizka, nismo določali učinkovine v neraztopljenem ostanku pri kasnejših testih sproščanja.

Tablete A so bile med poskusi sproščanja popolnoma omočene in enakomerno rahlo nabrekle zaradi nizkega deleža HPMC. Na površini tablete ni bilo vidnega nastanka gelskega sloja. Na površini so bile luknjice različnih velikosti. Med sproščanjem so se občasno odtrgali delčki tablete s površine zaradi slabe adhezije med delci. Iz teh delcev se je hitreje in lažje sprostila učinkovina kot iz tablete, ker se je povečala površina tablete, s katere se je sproščal DIK-Na. Razlog za slabo ponovljivost sproščanja učinkovine med paralelkami je lahko bila slaba povezanost delcev v tableti.

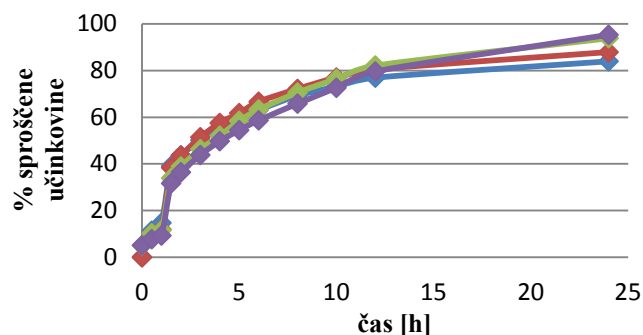
Pri testih sproščanja na USP1 (izvedba I) so se tablete A v SŽM zadrževale na različnih mestih, in sicer na vrhu, na dnu ali ob stenah košarice. Gibale so se skupaj s košarico okoli osi in se niso prilepile na steno košarice. Nekatere tablete so med poskusom spremenile položaj. V SŽM ni bilo prisotnih neraztopljenih snovi. Po prenosu v SČM so se nekatere tablete nalepile na steno košarice na različnih mestih. Posledica lepljenja tablete na steno košarice je zmanjšana površina, ki je na voljo učinkovini za sproščanje. Nekaj tablet se ni nalepilo na stene, ampak so se še vedno gibale s košarico okoli osi. Tableta je v košarici

izpostavljena manjšim tokovom medija kot pri USP2 zaradi goste mrežice košaric. Po sproščanju so tablete ohranile obliko tablete. Slika 3 prikazuje izredno slabo ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami, saj je razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo % sproščene učinkovine med paralelkami po 20 urah poskusa 20%.



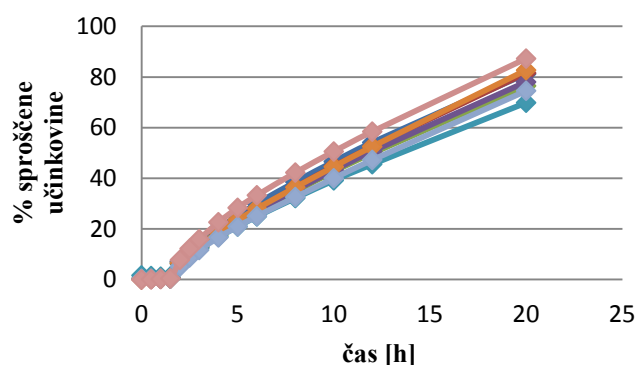
Slika 3: Ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami (9 paralelek) pri izvedbi I (USP1, odlivanje medija), tabletah A, pH 3,0 in času v SŽM 60 minut.

Pri sproščanju na USP2, tableta brez žičke (izvedba II) so bile tablete A med poskusom pod veslom in so enakomerno krožile z gibanjem vesla. Občasno so se dvignile in se nekaj časa gibale v višini vesla, ki je udarjalo po njih. Nato so se dvignile proti vrhu posode ali se vrnile nazaj proti dnu. Gibanje je bilo zelo neurejeno in nepredvidljivo. Tablete se niso lepile na stene posod. Pregled tablet po sproščanju je nakazal, da je verjetno prišlo do mehanskih poškodb zaradi udarjanja vesla ob tableto. Tablete so imele zelo hrapavo površino in luknjice. Med sproščanjem so se s površine utrgali tudi večji skupki. Ostanek tablet po poskusu je bil zelo majhen. V večini poskusov (tudi pri pH 1 in 2) se je sprostil skoraj vsa učinkovina. Slika 4 prikazuje ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami. Razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo % sproščene učinkovine med paralelkami v zadnji časovni točki vzorčenja (po 24 urah poskusa) je bila 12%.



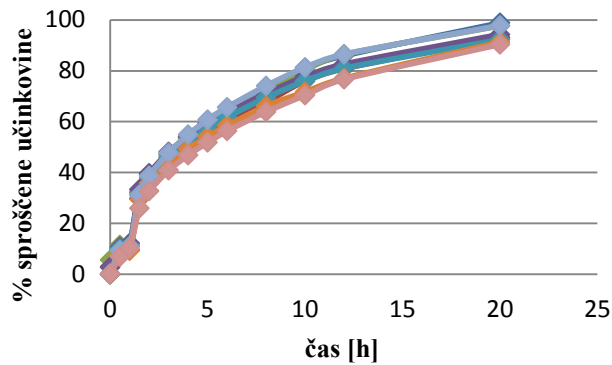
Slika 4: Ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami (4 paralelke) pri izvedbi II (USP2, tableta brez žičke, odlivanje medija), tabletah A, pH 3,0 in času v SŽM 60 minut.

Pri sproščanju na USP2, tableta v žički (izvedba III) so tablete A potonile na dno posode in se med sproščanjem niso premikale. Veslo ni udarjalo ob njih. Nekatere tablete so občasno zanihale ali se za trenutek zavrtle. Tablete so nabrekale, a žička ni vplivala na obliko tablet. Po sproščanju so tablete ohranile svojo obliko. Ostanek tablet po sproščanju je bil zelo majhen. Slika 5 prikazuje izredno slabo ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami, saj je razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo % sproščene učinkovine med paralelkami po 20 urah poskusa 18%.



Slika 5: Ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami (8 paralelk) pri izvedbi III (USP2, tableta v žički, odlivanje medija), tabletah A, pH 1,0 in času v SŽM 90 minut.

Boljšo ponovljivost sproščanja smo želeli doseči z drugačnim načinom zamenjave medija. Tako smo poskusili s prenosom tablete v žički iz SŽM v predhodno segreti SČM (izvedba IV). Slika 6 prikazuje ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami. Razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo % sproščene učinkovine med paralelkami po 20 urah poskusa je okoli 8%.



Slika 6: Ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami (8 paralelk) pri izvedbi IV (USP2, tableta v žički, prenos v segret medij), tabletah A, pH 3,0 in času v SŽM 60 minut.

Kljub boljši ponovljivosti pri menjavi medija s prenosom tablet, ponovljivost profilov sproščanja še vedno ni bila optimalna. Na katedri so že delali poskuse sproščanja na ogrodnih tabletah iz HPMC in DIK-Na, brez MCC. Profili sproščanja so bili dobro ponovljivi. MCC smo dodali v tabletirno zmes za izboljšanje pretočnih lastnosti, ki bi olajšale tabletiranje. Zmes HPMC in DIK-Na je imela zelo slabe pretočne lastnosti, kar je onemogočilo polavtomatsko stiskanje tablet. Kot možen razlog slabe ponovljivosti profilov sproščanja bi tako lahko bila tudi sestava tablet. Poskusno smo tabletirali tablete iz zmesi HPMC in DIK-Na ter dodatka magnezijevega stearata kot antiadheziva (tablete B).

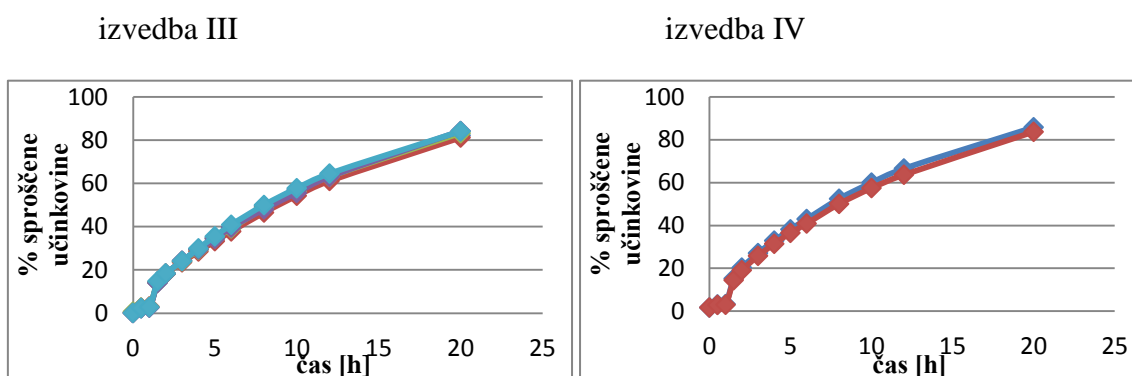
MCC je pomožna snov, ki se v farmacevtski tehnologiji uporablja kot adsorbent, polnilo v tabletah in kapsulah, razgrajevalo v tabletah, poleg tega pa tudi zmanjšuje sedimentacijo suspenzij. MCC ima pri pripravi tablet z direktnim stiskanjem vlogo veziva, polnila, drsila in razgrajevala (22). Sestava tablet z MCC ni bila optimalna.

Na osnovi preliminarnih testov s tabletami A smo se odločili, da bomo tudi na tabletah B preizkusili sproščanje na USP2, tableta v žički na oba načina menjave medija (odlivanje medija - izvedba III in prenos tablete - izvedba IV), kjer je bila ponovljivost profilov sproščanja pri tabletah A najboljša.

Tablete B

Tablete B so v žički prav tako potonile na dno posode in se med sproščanjem niso premikale. Veslo ni udarjalo ob njih. Na dnu posode ni bilo neraztopljenih snovi. Tablete so bile na površini enakomerno omočene in opazen je bil gelski sloj. Zaradi višje vsebnosti HPMC kot pri tabletah A je bil tudi gelski sloj na površini tablet B debelejši kot pri tabletah A. Tablete so nabrekale, a žička ni vplivala na obliko tablet. Po sproščanju so bile

močno nabrekle in lepljive. Površina tablet je bila povsem gladka in brez luknjic. Na površini je bil prisoten prozoren gel, v notranjosti pa različno veliko negelirano belo jedro (suhi polimer). Slika 7 prikazuje ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami za oba načina menjave medija. Pri izvedbi III je razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo % sproščene učinkovine med paralelkami po 20 urah poskusa 3%, pri izvedbi IV pa 2%. Ponovljivost sproščanja DIK-Na iz tablet B je pri obeh izvedbah boljša kot pri tabletah A.



Slika 7: Ponovljivost profilov sproščanja med paralelkami pri tabletah B, pH 3,0 in času v SŽM 60 minut ter izvedbi III (USP2, tableta v žički, odlivanje medija; 5 paralelk) in IV (USP2, tableta v žički, prenos tablete v segret medij; 2 paralelki).

5.3. IZBIRA POGOJEV KONČNIH TESTOV SPROŠČANJA

Pri poskusih na tabletah A na USP1 (izvedba I) in USP2, tableta brez žičke (izvedba II) je bila ponovljivost sproščanja iz tablet slaba, pri poskusih na istih tabletah na USP2, tableta v žički (izvedba III) pa je bila ponovljivost boljša. Zaradi slabe ponovljivosti obnašanja tablet med sproščanjem in profilov sproščanja smo presodili, da USP1 ne daje optimalnih rezultatov. Osredotočili smo se na USP2 in obe modifikaciji, ki sta bili: tableta je bila brez žičke (izvedba II) ali v žički (izvedba III). Pri izvedbi II vesla ne smejo udarjati v tableto.

Pričakovali smo, da bodo vrednosti sproščene učinkovine za tablete brez žičke enake ali večje od vrednosti za tablete v žički zaradi gibanja tablete in možnih mehanskih poškodb. Pri pH 3 se je zgodilo ravno obratno in so vrednosti nižje. Zaradi boljše ponovljivosti obnašanja tablet med sproščanjem in profilov sproščanja smo se odločili, da bomo končne teste sproščanja izvajali **s tableto v žički**.

Pri testih sproščanja na tabletah A je bila ponovljivost boljša pri prenosu tablete v segret medij kot pri odlivanju medija, pri testih na tabletah B pa je bila ponovljivost dobra pri obeh načinih menjave medija. Pri menjavi medija s prenosom tablete lahko dosežemo

večjo ponovljivost med prenosi in paralelkami. Presodili smo, da je menjava medija s **prenosom tablete** ustrežnejši način menjave medija.

Povprečne vrednosti sproščenega DIK-Na v SČM so pri tabletah B veliko nižje kot pri tabletah A. Pri tabletah A je sproščanje v SČM na začetku veliko hitrejše kot pri tabletah B. Proti koncu pa se sproščanje upočasnjuje, ker je skoraj vsa učinkovina že sproščena. Pri tabletah B se bolj enakomerno povečuje delež sproščenega DIK-Na v primerjavi s tabletami A. Razlike med profili sproščanja so posledica deleža HPMC v tabletah. Večji delež HPMC v tableti je pomenil počasnejše sproščanje. Kljub počasnejšemu sproščanju se iz tablet B sprostijo dovolj učinkovine, da lahko opazujemo potek sproščanja in vpliv želenih parametrov.

Sproščanje učinkovine iz HPMC ogrodnih tablet je kontrolirano z difuzijo skozi gelsko plast in erozijo gelske plasti. Učinkovina se na površini ogrodnih tablet sprosti. Sledi širitev gelske plasti zaradi prehajanja vode v tableto. Poveča se debelina gela. Če se tvori ustrezna gelska plast, se hitrost sproščanja upočasni. Sproščanje postane odvisno od hitrosti, s katero molekule učinkovine prehajajo skozi gelsko plast (difuzija), in hitrosti, s katero se gelska plast mehansko razgrajuje (erozija). V večini primerov poteka difuzija in erozija hkrati (23).

Zaradi ustrezne ponovljivosti sproščanja, obnašanja tablet med sproščanjem in izgleda po končanem poskusu smo se odločili, da bomo izvajali končne poskuse na **tabletah B** (učinkovina, HPMC in antiadheziv).

5.4. KONČNI TESTI SPROŠČANJA

Končni testi sproščanja so bili opravljeni na tabletah B. Poskuse smo izvedli na USP2. Tableta je bila med poskusom v žički, medij pa smo zamenjali s prenosom tablete iz SŽM v SČM (izvedba IV). S poskusi smo želeli proučiti vpliv pH in časa zadrževanja tablete v SŽM na sproščanje DIK-Na iz tablet.

Vpliv pH in časa zadrževanja tablete v SŽM smo opredelili s $t_{50\%}$ in profili sproščanja. $t_{50\%}$ je čas, v katerem se sprosti 50% učinkovine. Ker ena točka ne opiše celega profila, smo prikazali tudi profile sproščanja. Pozorni smo bili na hitrost sproščanja, % sproščene učinkovine po 24 urah in časovne zamike v sproščanju. Hitrost sproščanja smo ocenjevali glede na naklon profila sproščanja, in sicer bolj strma krivulja pomeni hitrejše sproščanje. Pozorni smo bili na potek profilov in čas, pri katerem so se krivulje približale ali združile

skupaj. S pomočjo teh parametrov smo ocenili, kako močan je vpliv proučevanega dejavnika.

Končne teste sproščanja smo izvajali na treh paralelkah za posamezne parametre sproščanja (čas v SŽM in pH SŽM). Če so bile razlike med profili sproščanja med paralelkami prevelike, smo naredili eno ali dve dodatni paralelki.

t_{50%}

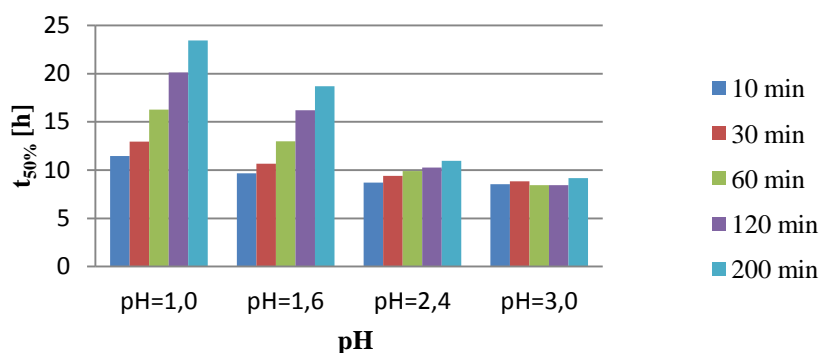
t_{50%} je čas, v katerem se sprosti 50% učinkovine, ki je vgrajena v tableto. Vrednost t_{50%} uporabljamo za primerjavo sproščanja pri različnih pogojih. Daljši čas t_{50%} pomeni daljši čas, da se sprosti 50% učinkovine. Če je čas v SŽM konstanten (enak časovni zamik v sproščanju), je t_{50%} merilo za hitrost sproščanja. V tem primeru pomeni krajši čas t_{50%} hitrejše sproščanje, daljši čas pa počasnejše. Če čas v SŽM ni konstanten (različni časovni zamiki v sproščanju), t_{50%} ni merilo za hitrost sproščanja. Najkrajši čas t_{50%} je pri pH SŽM 3,0 in času v SŽM 10 minut. 50% učinkovine, ki je vgrajena v tableti, se sprosti v približno 8,5 ure. Najdaljši čas t_{50%} je pri SŽM pH 1,0 in času v SŽM 200 minut. 50% učinkovine se sprosti po približno 23,5 ure. Največje razlike v t_{50%} opazimo pri 200 minutah v SŽM med pH 1,0 in 3,0 ter pri pH 1 med časi v SŽM 10 in 200 minut.

Opažene razlike so najverjetneje posledica razlik v ionizaciji DIK pri različnih pH in različnih časih v SŽM.

V mediju za raztapljanje z vrednostjo pH več kot 1 enoto pod vrednostjo pKa (pKa = 3,8), je velik delež DIK-Na protoniran. Protonirana oblika je slabše topna kot sol. Zato je topnost DIK-Na v mediju za raztapljanje s pH nižjim kot 3 zelo slaba. Z naraščanjem pH medija se topnost DIK-Na izboljša zaradi večjega prispevka bolj topne ionizirane oblike (7). Po prenosu tablete iz SŽM v SČM se šibko kislina učinkovina pretvori v ionizirano obliko.

- $t_{50\%}$ v odvisnosti od časa v simuliranem želodčnem mediju

Slika 8 prikazuje odvisnost izračunane vrednosti $t_{50\%}$ od časa v SŽM pri testiranih pH.



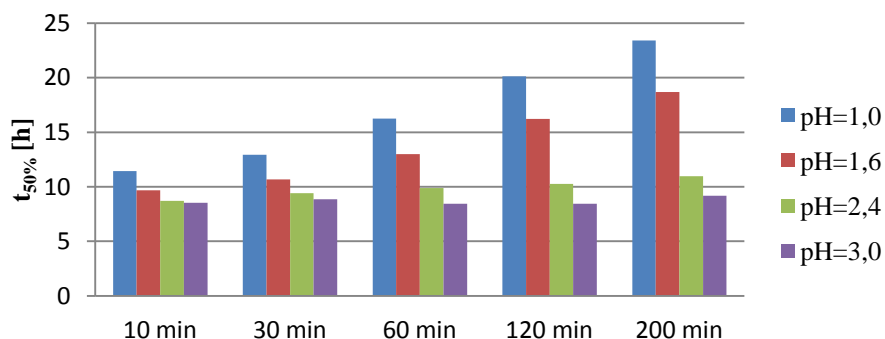
Slika 8: $t_{50\%}$ v odvisnosti od časa v SŽM za različne pH.

Pri vseh pH je opaziti, da $t_{50\%}$ naraščajo z daljšanjem časa v SŽM pri enakem pH. $t_{50\%}$ se močno podaljšuje, če čas v SŽM podaljšamo. Pri pH 1,0 so opažene največje razlike v $t_{50\%}$ med časi v SŽM. Z zviševanjem pH SŽM se zmanjšujejo razlike v $t_{50\%}$ med časi v SŽM. Razlike v $t_{50\%}$ med časi v SŽM so tako večje pri pH 1,6 kot pri pH 2,4. Pri pH 3,0 ima čas v SŽM najmanjši vpliv na $t_{50\%}$, saj so opažene najmanjše razlike v $t_{50\%}$ med časi v SŽM. Vrednost $t_{50\%}$ je pri pH 3,0 skoraj konstantna, zato čas v SŽM pri tem pH ne vpliva bistveno na $t_{50\%}$.

S podaljševanjem časa v SŽM se povečuje delež DIK-Na, ki se pretvori v kislinsko obliko zaradi prodiranja medija v notranjost tablete. Delež kislinske oblike vpliva na hitrost sproščanja. Večji kot je delež DIK, počasnejše je sproščanje v SČM s pH 6,8. Pretvorba nazaj v ionizirano obliko po menjavi medija je počasnejša. Razlika v $t_{50\%}$ med različnimi časi v SŽM je najbolj očitna pri pH 1, ko je topnost DIK-Na najslabša.

- $t_{50\%}$ v odvisnosti od pH simuliranega želodčnega medija

Slika 9 prikazuje odvisnost izračunane vrednosti $t_{50\%}$ od pH SŽM pri konstantnem času v SŽM.



Slika 9: $t_{50\%}$ v odvisnosti od pH SŽM za različne čase zadrževanja v SŽM.

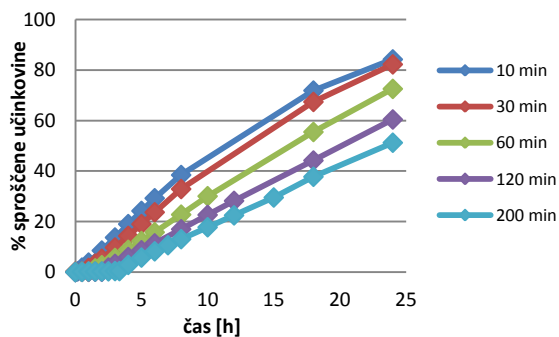
Pri vseh časih v SŽM opazimo, da se z nižanjem pH SŽM pri enakem času v SŽM sproščanje upočasni ($t_{50\%}$ pada). Sproščanje se močno upočasnjuje, če pH SŽM znižamo. Pri času v SŽM 10 minut ima pH SŽM najmanjši vpliv na sproščanje, saj so razlike v vrednosti $t_{50\%}$ med pH SŽM najmanjše med opazovanimi časi. S podaljševanjem časa v SŽM se povečujejo razlike v $t_{50\%}$ med pH SŽM. Pri času v SŽM 200 minut je vpliv pH SŽM najbolj izrazit, saj so opažene največje razlike v $t_{50\%}$ med pH SŽM.

Daljši kot je čas v SŽM, večje so opažene razlike med profili sproščanja med različnimi pH. Delež slabše topne kislinske oblike v SŽM se povečuje z zniževanjem pH SŽM, vendar je velik delež učinkovine že pri pH nižjem od 3 v kislinski obliki. Z zniževanjem pH se povečuje delež učinkovine, ki ostane v kislinski obliki na površini tablete po menjavi medija. Z nižanjem pH pada hitrost sproščanja v SČM po menjavi medija. Razlike so posledica večjega ali manjšega deleža učinkovine v kislinski obliki v površinski plasti tablete med različnimi pH.

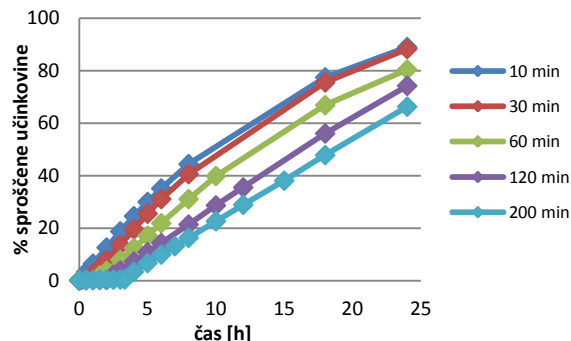
Vpliv časa zadrževanja tablete v SŽM na sproščanje natrijevega diklofenakata

Slika 10 prikazuje vpliv časa tablete v SŽM na sproščanje DIK-Na.

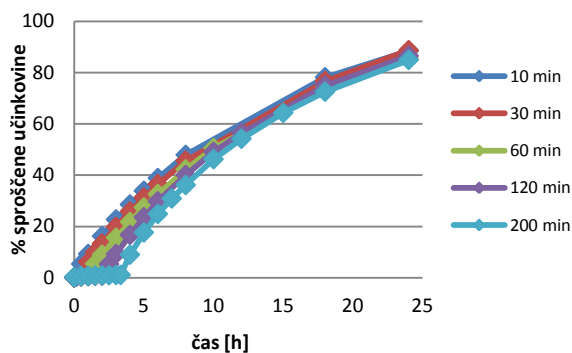
A: pH 1,0



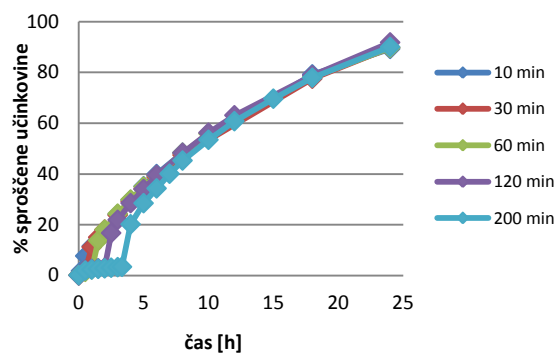
B: pH 1,6



C: pH 2,4



D: pH 3,0



Slika 10: Vpliv časa zadrževanja tablete v SŽM (10, 30, 60, 120 in 200 minut) pri A) pH 1,0 (pri časih 10, 30, 60 in 120 minut 3 paralelke, pri času 200 minut 4 paralelke); B) 1,6 (pri časih 10, 30, 60 in 120 minut 3 paralelke, pri času 200 minut 4 paralelke); C) 2,4 (pri časih 10, 30 in 120 minut 5 paralelk, pri časih 60 in 200 minut 3 paralelke) in D) 3,0 (pri časih 10 in 30 minut 5 paralelk, pri časih 60 in 120 minut 3 paralelke, pri času 200 minut 4 paralelke) na sproščanje DIK-Na.

V mediju za raztapljanje z vrednostjo pH več kot 1 enoto pod vrednostjo pKa ($pK_a = 3,8$), je velik delež DIK-Na protoniran. Protonirana oblika je slabše topna kot sol. Zato je topnost zdravilne učinkovine v mediju za raztapljanje s pH nižjim kot 3 zelo slaba. Z naraščanjem vrednosti pH se topnost zdravilne učinkovine izboljša zaradi večjega prispevka bolj topne ionizirane oblike (7). Po menjavi medija se učinkovina pretvori v ionizirano obliko. Zato lahko sklepamo, da je nižji % sproščene učinkovine po 24 urah sproščanja posledica večjega deleža DIK-Na v neionizirani obliki na površini tablete pred prenosom tablete iz SŽM v SČM.

Zaradi zadrževanja tablet v kislem SŽM pride do časovnega zamika v sproščanju. DIK-Na je namreč slabo topen v kislem mediju in se v SŽM slabo raztaplja. % sproščene DIK-Na začne naraščati šele, ko prenesemo tableto v fosfatni pufer s pH 6,8. Na grafu odvisnosti sproščene učinkovine od časa opazimo zamik v začetku sproščanja v SČM.

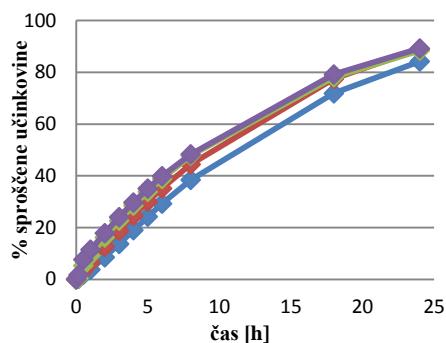
Pri poskusih sproščanja smo opazili zelo nizek % sproščene DIK-Na po koncu sproščanja v SŽM. Pri pH 1,0; 1,6 in 2,4 se sprosti manj kot 1% DIK-Na, pri pH 3,0 pa je delež nekoliko višji, in sicer do 3,4%. Nekoliko višje vrednosti pri pH 3,0 kot v preostalih medijih so posledica boljše topnosti v mediju s pH 3,0 kot pri nižjih pH. Topnost DIK-Na pri sobni temperaturi v 0,1 M raztopini HCl (pH 1,0) je 0,0012 mg/mL, v 0,01 M raztopini HCl (pH 2,0) 0,0017 mg/mL, v 0,001 M raztopini HCl (pH 3,0) pa 0,28 mg/mL. V fosfatnem pufru s pH 6,8 so pri sobni temperaturi določili topnost 0,67 mg/mL (7).

Z daljšanjem časa v SŽM se povečuje časovni zamik v začetku sproščanja. Pri pH 1,0 in 1,6 je opazen precejšen vpliv časa v SŽM na sproščanje DIK-Na v SČM. S podaljševanjem časa v SŽM se povečujejo razlike v profilih sproščanja in % sproščene učinkovine po 24 urah sproščanja med skrajnimi časi v SŽM. Razlika v % sproščene učinkovine po 24 urah poskusa med časoma zadrževanja v SŽM 10 in 200 minut pri pH 1,0 je približno 33%, pri pH 1,6 pa približno 25%. Vpliv časa v SŽM na sproščanje DIK-Na v SČM se pri pH 2,4 in 3,0 zmanjša in je opazen le še v začetni stopnji sproščanja v SČM. Hitrost sproščanja v začetni stopnji sproščanja v SČM narašča s podaljševanjem časa v SŽM. S hitrejšim sproščanjem v SČM se kompenzirajo razlike med profili sproščanja zaradi različnih časov v SŽM.

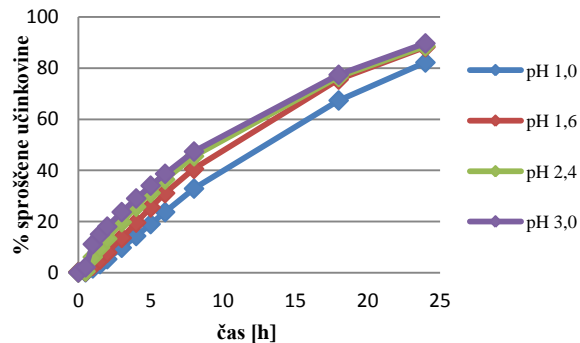
Vpliv pH na sproščanje natrijevega diklofenakata

Slika 11 prikazuje vpliv pH na sproščanje DIK-Na.

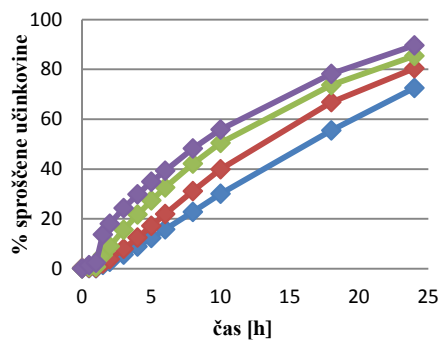
A: 10 min



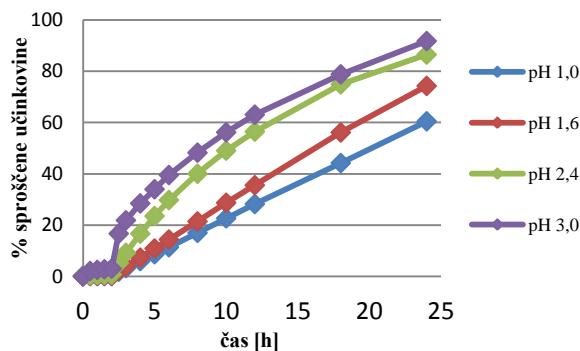
B: 30 min



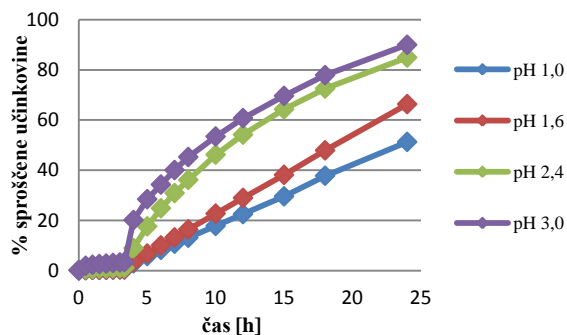
C: 60 min



D: 120 min



E: 200 min



Slika 11: Vpliv pH (1,0; 1,6; 2,4 in 3,0) pri A) 10 min (pri pH 1,0 in 1,6 3 paralelke, pri pH 2,4 in 3,0 5 paralelk), B) 30 min (pri pH 1,0 in 1,6 3 paralelke, pri pH 2,4 in 3,0 5 paralelk), C) 60 min (pri pH 1,0; 1,6; 2,4 in 3,0 3 paralelke), D) 120 min (pri pH 1,0; 1,6 in 3,0 3 paralelke, pri pH 2,4 5 paralelk) in E) 200 min (pri pH 1,0; 1,6 in 3,0 4 paralelke, pri pH 2,4 3 paralelke) v SŽM na sproščanje DIK-Na.

Pri vseh časih v SŽM je opazen vpliv pH SŽM na sproščanje DIK-Na v SČM. Z zniževanjem pH SŽM se sproščanje upočasni. Z zniževanjem pH SŽM se povečujejo razlike med profili sproščanja in % sproščene učinkovine po 24 urah sproščanja v primerjavi z najvišjim pH SŽM (3,0). Vpliv pH SŽM na sproščanje v SČM je najbolj izrazit pri času v SŽM 200 minut in najmanj pri času 10 minut. Pri vseh časih v SŽM so majhne razlike med profiloma sproščanja pri pH 2,4 in 3,0. Razlika v % sproščene učinkovine po 24 urah sproščanja med pH 1,0 in 3,0 pri času v SŽM 10 minut je približno 5%, pri času 30 minut 6%, pri času 60 minut 17%, pri času 120 minut 32% in pri času 200 minut 39%.

Z daljšanjem časa v SŽM (predvsem pri 120 in 200 minut) opazimo, da je razlika v % sproščene učinkovine med profili sproščanja za pH 1,6 in 2,4 bistveno večja kot razlike med preostalimi sosednjimi pH. Pri nadaljnjem proučevanju vplivov pH na sproščanje bi morali narediti poskuse sproščanja vsaj za pH 2,0 oziroma še kakšen dodaten vmesni pH. Tako bi lažje pojasnili vpliv pH na sproščanje.

5.5. POMEN *IN VITRO* PROFILOV SPROŠČANJA

V *in vivo* okolju so prisotni številni parametri, ki vplivajo na sproščanje in delujejo v več smeri. V teste sproščanja smo vključili samo dva fiziološka parametra (pH in čas v SŽM), zato sta lahko njuna vpliva na *in vitro* in *in vivo* sproščanje različno izražena. Preostali parametri lahko zmanjšajo ali povečajo vpliv proučevanih parametrov.

S testi sproščanja smo pokazali, da pH in čas v SŽM vplivata na *in vitro* sproščanje DIK-Na. Vpliv teh parametrov pričakujemo tudi pri *in vivo* sproščanju, a ga je zaradi prisotnih drugih fizioloških parametrov nemogoče kvantitativno opredeliti. Z *in vitro* profili sproščanja lahko predvidimo *in vivo* profile. Ker je DIK-Na zdravilna učinkovina z dobro permeabilnostjo (2. razreda po BCS), lahko sklepamo, da so *in vivo* absorpcijski profili enaki *in vivo* profilom sproščanja. Iz *in vivo* absorpcijskih profilov pa lahko napovemo plazemske koncentracijske profile.

6. SKLEPI

Proučevali smo vpliv pH SŽM in časa zadrževanja tablete v SŽM na sproščanje DIK-Na iz ogrodnih tablet in zaključujemo sledeče:

- Aparat za sproščanje (košarice, vesla), izvedba sproščanja (tableta v žički ali brez žičke) in način menjave medija (odlivanje medija, prenos v segret medij) vplivajo na ponovljivost profilov sproščanja. Sproščanje na aparatu z vesli, tableta v žički s prenosom tablete v predhodno segret medij daje najbolj optimalne in ponovljive rezultate za izbrano sestavo tablet.
- Sestava tablet vpliva na ponovljivost profilov sproščanja. Ponovljivost je boljša pri poskusih s tabletami, ki vsebujejo višji % HPMC in ne vsebujejo mikrokristalne celuloze.
- V SŽM se sprosti zelo majhen delež DIK-Na, zato pride v sproščanju do časovnega zamika zaradi zadrževanja tablet v SŽM.
- Hitrost sproščanja učinkovine v SČM pada z zniževanjem pH SŽM (pri enakem času v SŽM).
- Pri nižjem pH SŽM so razlike med profili sproščanja pri različnih časih zadrževanja v SŽM največje. Čas zadrževanja v kislem ima večji vpliv pri nižjem pH kot pri višjih pH SŽM.
- Pri daljšem času zadrževanja v kislem so razlike med profili sproščanja pri različnih pH SŽM največje. pH SŽM ima večji vpliv pri daljših časih v kislem kot pri krajših časih v kislem.
- Največje razlike v sproščanju opazimo pri 200 minutah v SŽM med pH 1,0 in 3,0 ter pri pH 1 med časi 10 in 200 minut v SŽM.

7. LITERATURA

1. Hörter D, Dressman J B: Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 75–87.
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Diclofenac>, dostopano 30. 5. 2013.
3. Chuasuwan B, Binjesoh V, Polli J E, Zhang H, Amidon G L, Junginger H E, Midha K K, Shah V P, Stavchansky S, Dressman J B, Barends D M: Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium. *J Pharm Sci* 2009; 98: 1206-1219.
4. Bartolomei M, Bertocchi P, Antoniella E, Rodomonte A: Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40: 1105-1113.
5. Palomo M E, Ballesteros M P, Frutos P: Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21: 83-94.
6. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm>, dostopano 30. 5. 2013.
7. Kincl M, Vrečer F, Veber M: Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug prolonged release tablets. *Anal Chim Acta* 2004; 502: 107-113.
8. Llinas A, Burley J C, Box K J, Glen R C, Goodman J M: Diclofenac solubility: independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. *J Med Chem* 2007; 50: 979-983.
9. <http://www.biofocus.com/discovery-capabilities/adme/Solubility.htm>, dostopano 19. 5. 2014.
10. Mudie D M, Amidon G L, Amidon G E: Physiological parameters for oral delivery and *in vitro* testing. *Mol Pharm* 2010; 7: 1388-1405.
11. Larsen C, Bundgaard H: Kinetics of the acid-catalyzed cyclization of diclofenac to an indolinon in aqueous solution. *Arch Pharm* 1980; 8: 100-108.
12. European Pharmacopoeia: 8th edition, Volume II, EDQM, Strasbourg, 2013: 2036-2038.
13. Guhmann M, Thommes M, Gerber F, Pöllinger N, Klein S, Breitzkreutz J, Weitschies W: Design of biorelevant test setups for the prediction of diclofenac *in vivo* features after oral administration. *Pharm Res* 2013; 30: 1483-1501.

14. Muangsin N, Prajaubsook M, Chaichit N, Siritaedmukul K, Hannongbua S: Crystal structure of a unique sodium distorted linkage in diclofenac sodium pentahydrate. *Anal Sci* 2002; 18: 967-968.
15. Bartolomei M, Rodomonte A, Antoniella E, Minelli G, Bertocchi P: Hydrate modifications of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium: Solid-state characterisation of a trihydrate form. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45: 443-449.
16. Rodomonte A, Antoniella E, Bertocchi P, Gaudiano M C, Manna L, Bartolomei M: Different crystal morphologies arising from different preparation methods of a same polymorphic form may result in different properties of the final materials: The case of diclofenac sodium trihydrate. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 477-481.
17. ShinEtsu: Metolose SR, Hypromellose USP, 2009.
18. Štefanič M, Locatelli I, Vrečer F, Sever T, Mrhar A, Bogataj M: The influence of gastric emptying kinetics on the drug release from enteric coated pellets in fasted state: An *in vitro/in vivo* correlation. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 82: 376-382.
19. Dressman J B, Amidon G L, Reppas C, Shah V P: Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Res Pharm Sci* 1998; 15: 11-22.
20. Locatelli I, Nagelj K N, Mrhar A, Bogataj M: Gastric emptying of the non-disintegrating solid drug delivery systems in fasted state: relevance to drug dissolution. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7(8): 1-10.
21. Garbacz G, Klein S: Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 944-968.
22. Rowe R C, Sheskey P J, Quinn M E: *Pharmaceutical excipients*, 6th edition, Pharmaceutical Press, London, 2009: 129-134.
23. Li C L, Martini L G, Ford J L, Roberts M: The use of hydromellose in oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 533-546.