

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA GORJAN

OPTIMIZACIJA IN VPLIVI pH VREDNOSTI TER PRETOKOV MEDIJEV NA
SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ GASTROREZISTENTNIH PELET

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA GORJAN

OPTIMIZACIJA IN VPLIVI pH VREDNOSTI TER PRETOKOV MEDIJEV NA
SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ GASTROREZISTENTNIH PELET

OPTIMIZATION AND IMPACT OF pH VALUES AND FLOW RATES OF MEDIA ON
DRUG RELEASE FROM ENTERIC COATED PELLETS

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm., za strokovno vodenje, svetovanje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Za usmerjanje, praktične nasvete in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela se zahvaljujem dipl. ing. kem. tehn. Greti Cof.

Zahvaljujem se tudi podjetju Krka, d.d. za zagotavljanje standardov in vzorcev ter dr. Marku Štefaniču, mag. farm., za pomoč in nasvete.

Posebna zahvala gre Gašperju, staršem in prijateljem za podporo v času študija.

Izjava

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

Petra Gorjan

VSEBINA

POVZETEK	i
ABSTRACT	ii
SEZNAM OKRAJŠAV	iii
1 UVOD	- 1 -
1.1 Testi sproščanja.....	- 2 -
1.2 Posnemanje pogojev v GIT pri izvedbi testov sproščanja.....	- 3 -
1.2.1 Hidrodinamika v prebavnem traktu.....	- 4 -
1.3 Raziskave pretoka v prebavnem traktu	- 5 -
1.3.1 Transpilorični pretoki	- 5 -
1.3.2 Vpliv starosti in položaja telesa na transpilorične pretoke.....	- 7 -
1.3.3 Pretoki v tankem črevesu.....	- 9 -
1.3.4 Vpliv pretoka na prehod skozi sluznico v tankem črevesu	- 10 -
2 NAMEN DELA.....	- 12 -
3 MATERIALI IN METODE	- 13 -
3.1 Materiali in aparature	- 13 -
3.1.1 Farmacevtska oblika	- 13 -
3.1.2 Snovi za izvedbo eksperimentalnega dela	- 13 -
3.1.3 Priprava raztopin za izvedbo eksperimentalnega dela.....	- 13 -
3.1.4 Naprave, materiali in pripomočki za izvedbo eksperimentalnega dela	- 15 -
3.2 Metode	- 17 -
3.2.1 Analiza vzorcev	- 17 -
3.2.2 Določitev enačbe umeritvenih premic	- 17 -
3.2.3 Simulacija in določevanje pH profilov	- 18 -
3.2.3.1 Postopek določevanja pH profilov	- 19 -
3.2.3.2 Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov .	- 19 -
3.2.3.3 Določitev točne koncentracije Na ₃ PO ₄ in preliminarni pH profili	- 22 -
3.2.3.4 Končna izvedba	- 22 -
3.2.4 Testiranje sproščanja	- 23 -
3.2.4.1 Priprava pretočnega sistema	- 24 -
3.2.4.2 Postopek testiranja sproščanja	- 24 -
3.2.4.3 Preliminarni testi sproščanja.....	- 27 -
3.2.4.4 Končna izvedba	- 28 -
3.3 Izračuni	- 29 -
4 REZULTATI.....	- 32 -
4.1 Določitev enačbe umeritvenih premic	- 32 -

4.2	Simulacija in določevanje pH profilov	- 32 -
4.2.1	Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov..	- 32 -
4.2.2	Določitev točne koncentracije Na ₃ PO ₄ in preliminarni pH profili	- 34 -
4.2.3	Končna izvedba	- 35 -
4.3	Testiranje sproščanja.....	- 36 -
4.3.1	Preliminarni testi sproščanja.....	- 36 -
4.3.2	Vpliv pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje.....	- 37 -
4.3.3	Primerjava sproščanja iz Oblike A in B	- 40 -
4.3.4	Podaljšani in oteženi profili sproščanja	- 42 -
5	RAZPRAVA	- 44 -
5.1	Simulacija in določevanje pH profilov	- 44 -
5.1.1	Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov..	- 45 -
5.1.2	Določitev točne koncentracije Na ₃ PO ₄ in preliminarni pH profili	- 48 -
5.1.3	Končna izvedba	- 49 -
5.2	Testiranje sproščanja.....	- 49 -
5.2.1	Preliminarni testi sproščanja.....	- 50 -
5.2.2	Končna izvedba	- 53 -
5.2.3	Oteženi profil sproščanja	- 58 -
5.3	Možnosti za dodatne poskuse	- 59 -
6	SKLEP.....	- 60 -
7	VIRI IN LITERATURA	- 62 -

POVZETEK

V diplomski nalogi smo optimizirali pogoje in izvedbo poskusov na pretočnem sistemu za testiranje sproščanja. Proučevali smo vplive pH medijev za sproščanje, hitrosti pretoka in časa izpostavljenosti kislemu mediju na sproščanje iz gastrozistentnih pelet.

Na pretočnem sistemu smo z menjavo medijev simulirali pH spremembe v prebavnem traktu od želodca do tankega črevesa. pH profil smo posnemali pri pretoku 2 ml/min na optimiziranem pretočnem sistemu za določevanje pH profilov. Z izhodnimi kislimi mediji s pH = 1,1, 1,6, 2,1, 2,4, 2,8 in 3,2 smo ponazarjali variabilen pH v želodcu v stanju na tešče in jih uporabili kot izhodišče za simulacijo šestih različnih pH profilov. Želodčni medij smo simulirali z raztopino HCl. Hiter pH preskok po prehodu oblike preko pilorusa smo dosegli z dodajanjem raztopine Na₃PO₄. Za posnemanje črevesnega medija smo uporabili fosfatni pufer s pH = 6,8.

Medije, s katerimi smo simulirali pH profil, smo uporabili pri testiranju sproščanja zdravilne učinkovine (ZU) iz gastrozistentnih pelet. Pelete so bile vgrajene v orodisperzibilne tablete, ki ob stiku z medijem hitro razpadejo. Sproščanje smo testirali s tabletami, ki smo jih poimenovali Oblika A in Oblika B, poskuse smo izvajali pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja v kislem. Koncentracijo sproščene ZU smo določili z analizo metodo HPLC.

S testi sproščanja, izvedenimi pri hitrostih pretoka 2, 3, 4 in 6 ml/min, ter časih izpostavljenosti kislemu mediju 10, 30, 60 in 120 min smo ugotovili, da je pri povečanem pretoku sproščanje pospešeno in sprosti se več ZU. Daljši kot je čas zadrževanja v kislem, manjši je delež sproščene ZU, ker je tedaj več razpade. Primerjava sproščanja iz Oblik A in B pri različnih pogojih je pokazala, da se je ZU hitreje in v večji meri sproščala iz Oblike A. Z daljšo izpostavljenostjo kislemu okolju so se razlike v % sproščene ZU med oblikama povečevale. Do razlik v sproščanju je najverjetneje prišlo zaradi različne sestave Oblik A in B.

Z oteženimi profili sproščanja, pri katerih v izračunih profilov sproščanja upoštevamo tudi kinetiko praznjenja iz želodca, smo poskušali napovedati *in vivo* profile sproščanja. Otežena profila Oblike A in B sta v začetnem delu podobna, po 140 min pa se je nakazovalo povečano sproščanje iz Oblike A. Za boljšo napoved *in vivo* profilov sproščanja bi morali izvesti več poskusov z različnimi časi zadrževanja v kislem.

Ključne besede: *in vitro testi sproščanja, optimizacija pretočnega sistema, pH profil v gastrointestinalnem traktu, vplivi na sproščanje učinkovine*

ABSTRACT

The aim of this thesis was to optimize the experimental conditions, used for dissolution testing on a flow-through system. We studied the impact of pH of media, flow rates, and residence time in acidic medium on drug release from enteric coated pellets.

By successively replacing the media on the flow-through system, we simulated pH changes in the upper gastrointestinal tract, from the stomach to the small intestine. Tests were performed at the flow rate 2 ml/min on an optimized flow-through system. Initial acidic media with pH = 1.1, 1.6, 2.1, 2.4, 2.8, and 3.2 represented various pH values in the stomach in fasting state and were used as a starting point to determine six pH profiles.

Gastric medium was simulated with HCl solution, fast pH increase was achieved with the addition of Na₃PO₄ solution and phosphate buffer with pH = 6.8 was used to mimic the intestinal medium.

Dissolution tests were performed with the media that were used to stimulate pH profiles. Enteric coated pellets were incorporated into orodispersible tablets, which disintegrate rapidly in contact with the medium. Drug release was tested for tablets named Formulation A and B, experiments were carried out at different flow rates and different residence times in acidic medium, the concentration of drug was determined with HPLC.

Dissolution testing at flow rates 2, 3, 4, and 6 ml/min and at residence times in acidic medium 10, 30, 60, and 120 min showed that drug release was more rapid and increased when tested at higher flow rates. Longer exposure to acidic environment caused a decrease in drug release due to drug degradation. Comparative tests between Formulation A and B performed under different conditions showed that drug release was faster and more extensive from Formulation A. The differences in the % of released drug increased with longer residence time in acidic medium, probably as a consequence of different composition of Formulation A and B.

With weighted release profiles of Formulation A and B, which included the multiplication of drug release portions with the corresponding fractions of pellets emptied from the stomach, we tried to predict *in vivo* release profiles. Predicted profiles of two Formulations A and B were similar in the initial part, however after 140 minutes, drug release was higher from Formulation A. For a better prediction of *in vivo* release profiles, we should have carried out more experiments with different residence times in acidic medium.

Key words: *in vitro* dissolution test, flow-through system optimization, simulation of gastrointestinal pH profile, impact on drug release

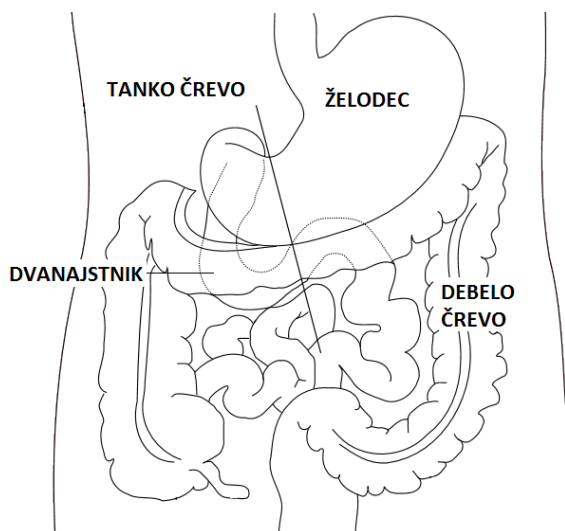
SEZNAM OKRAJŠAV

ZU	zdravilna učinkovina
FO	farmacevtska oblika
GIT	gastrointestinalni trakt
TČ	tanko črevo
MMC	Migrating Motoric Compex (migracijski motorični kompleks)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (slikanje z magnetno resonanco)
SEM	Standard error of the mean (standardna napaka srednje vrednosti)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo)
AUC	Area Under Curve – površina pod krivuljo
OS	optimiziran sistem za določevanje pH profilov
STS	sistem za testiranje sproščanja
IVIVC	<i>in vivo/in vitro</i> korelacija
CKO	centralni krvni obtok

1 UVOD

Prebavni trakt je namenjen presnovi v telo vnesenih snovi, kot so esencialna hranila, minerali in voda. Zgrajen je tako, da razčleni in razgradi večje dele hranil v preproste molekule, ki se lahko absorbirajo v krvni obtok. Glavne funkcije prebavnega trakta so zaužitje, prenos vnesene snovi preko prebavnega trakta, ki omogoča optimalno presnavljanje in absorpcijo, sekrecija tekočine, soli in prebavnih encimov, presnavljanje, absorpcija prebavljenih snovi ter izločanje iz telesa.

Prebavna pot zajema ustno votlino, žrelo, požiralnik, želodec, dvanajstnik, tanko (tešče črevo - jejunum in vito črevo – ileum) in debelo črevo (ascendentno, transversalno, descendentno in sigmoidno črevo), rektum ter danko. Celotni trakt je približno 5,5 m dolga cev (1, 2). Na Sliki 1 je prikazan osrednji del prebavne cevi (3).



Slika 1: Osrednji del prebavne cevi (3).

Peroralna aplikacija predstavlja najpomembnejšo in najpogostejšo pot vnosa farmacevtskih oblik (FO). Učinkovitost zdravila, ki ga apliciramo po tej poti, je odvisna od številnih dejavnikov. Po vnosu FO, ko potekajo razpad oblike ter raztapljanje in sproščanje zdravilne učinkovine (ZU), na dogajanje večinoma vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti FO (4). Med razvojem FO s testi sproščanja omenjeno dogajanje prenesemo na umetni *in vitro* sistem in tako poskušamo napovedati, kakšno bo obnašanje FO v fizioloških razmerah (5).

1.1 Testi sproščanja

In vitro teste sproščanja uporabljamo rutinsko za kontrolo kakovosti in ustreznosti izdelka ter napoved *in vivo* profilov sproščanja. Predstavljajo pomembno stopnjo v razvoju novih FO, saj z njimi pridobimo številne informacije o izbrani obliki.

Pri *in vitro* testih sproščanja za napoved *in vivo* profilov sproščanja poskušamo na umetnem sistemu simulirati pogoje prebavnega trakta. Za pridobitev profilov sproščanja, ki dobro korelirajo z absorpcijskimi profili, je namreč potrebno na *in vitro* sistemu upoštevati čim več faktorjev, ki v telesu vplivajo na FO. Pri načrtovanju takih testov so pomembni predvsem naslednji (5, 6):

❖ Sestava in pH medijev za sproščanje

Primeren pH raztopin za simulacijo kisle vsebine v želodcu na tešče je 1,5 ali 2, po hranjenju 3 - 7. V dvanajstniku znaša pH v stanju na tešče povprečno 6,1, v stanju po hrani pa 6,3. Za jejunum so značilne vrednosti med 4,4 - 6,5 (brez hrane) in 5,2 - 6,0 (s hrano), v ileumu pa med 6,8 - 8,0 za obe stanji. Osnovna sestavina za pripravo želodčnega medija je HCl, za posnemanje črevesnega medija pa večinoma uporabljamo fosfatni pufer. Priporočljivo je, da medijem dodamo površinsko aktivne snovi (npr. natrijev lavril-sulfat, natrijev tavroholat, lecitin) in encime (pepsin, lipaze, amilaze, proteaze) (5, 7).

❖ Volumen tekočine v gastrointestinalnem traktu (GIT)

Volumen tekočine v lumnu GIT je odvisen od volumna vnesenih tekočin, sekrecije endogenih sokov in prehajanja vode skozi sluznico. Volumni v želodcu nihajo od 13 do 72 ml, s povprečno vrednostjo 45 ml. V tankem črevesu (TČ) znaša volumen tekočine od 45 do 319 ml; ta se nahaja v vodnih žepkih, ki so neenakomerno razporejeni po črevesu (8).

❖ Čas prehoda preko GIT

Na biološko uporabnost peroralnih FO v veliki meri vpliva tudi čas prehoda skozi GIT, zato moramo pri razvoju testov sproščanja upoštevati čas zadrževanja v posameznem prostoru. Čas zadrževanja v želodcu je zelo variabilen in je odvisen od gibanja miškulature in zaužitja hrane (FO se v želodcu lahko zadržujejo od nekaj minut do 12 ur), medtem ko je čas prehoda skozi tanko črevo bolj konstanten (3 do 4 ure) (5, 9).

❖ Pretoki in gibanje v GIT

Fiziološki pretoki so spremenljivi. Takoj po vnosu 400 ml fiziološke raztopine lahko med praznjenjem iz želodca dosežejo velike vrednosti – 40 ml/min. Če pa dlje časa vnašamo manjše količine tekočine, so pretoki med praznjenjem iz želodca zanemarljivi. Hitrost praznjenja hranljive tekočine iz želodca je odvisna od kalorične vrednosti, večja kot je

kalorična vrednost, počasneje se vsebina prazni iz želodca (npr. pri kalorični vrednosti 1 kcal/ml znaša pretok med praznjenjem približno 2,5 ml/min, pri 0,2 kcal/ml pa 10 ml/min). V TČ so v stanju na tešče zabeležili vrednosti pretoka med 0 in 2 ml/min. Po hranjenju so se pretoki povečali do povprečno 3 ml/min v jejunumu in 2 ml/min v ileumu. Gibanje v prebavnem traktu predstavljajo različne vrste kontrakcij, ki mešajo in prenašajo vsebino (5).

Modifikacije farmakopejskih naprav in ne-farmakopejske naprave za sproščanje nam omogočajo, da z *in vitro* sistemi simuliramo želene biorelevantne pogoje. Pri razvoju novih testov sproščanja oziroma modifikaciji obstoječih poskušajo raziskovalci sestaviti čim preprostejši test, ki posnema več različnih fizioloških pogojev, in s katerim bi dosegli dobro korelacijo profilov sproščanja z absorpcijskimi profili (5, 6).

1.2 Posnemanje pogojev v GIT pri izvedbi testov sproščanja

Za simulacijo fiziološkega okolja na umetnem sistemu je potrebno dobro poznavanje GIT ter dogajanja v njem. Kompleksni *in vitro* sistemi za testiranje sproščanja nam omogočajo posnemanje različnih *in vivo* pogojev in vplivov na FO. Rezultati testov temeljijo na realnih pogojih, zato jih lažje interpretiramo. Slabosti takih sistemov so predvsem kompleksnost, variabilnost izvedbe in zahtevno rokovanje (10). V preglednici I so predstavljeni trije kompleksni sistemi.

Preglednica I: Primerjava kompleksnih *in vitro* GIT sistemov (10).

Fiziološki parameter, ki ga simuliramo	Kompleksni sistemi		
	Umetni želodčno-dudenalni model	Dinamični želodčni model	TIM1
Volumen tekočine v želodcu	stanje na tešče: 50 ml želodčnega soka in 50 ml vode, stanje po jedi: 250 ml	20-800 ml	150-300 ml
Volumen tekočine v tankem črevesu	dvanaestnik: 30 ml	/	300 ml (dvanaestnik: 50 ml, jejunum 125 ml, ileum 125 ml)
pH	želodec: 2-5 dvanaestnik: 6,5	pH odvisen od vnesenih snovi	želodec: odvisno od stanja, dvanaestnik: 5.9-6.4, jejunum: 6.4-6.6, ileum: 7.2-7.4
Pufni sistem	želodčni pH dosežen s raztopino HCl, dvanaestnik: fosfatni pufer	želodčni pH kontroliran z raztopino HCl	želodčni pH kontroliran z raztopino HCl, pH v TČ: karbonatni pufer
Simuliranje stanja po jedi	pufri, zamenjava medija	celoten obrok, predhodno zmešan	tekoči ali trdi obrok, umetno zmešan
Žolčne soli, encimi	dodatek natrijevega tauroholata v dvanaestniku	kontrolirana sekrecija želodčnih encimov: pepsin, lipaze	kontrolirana sekrecija želodčnih encimov (pepsin, lipaze, amilaze) in encimov v dvanaestniku: pankreatin + žolč
Praznjenje želodca	programiran čas praznjenja, ki upošteva $t_{50\%}$	programiran čas praznjenja (krivulja praznjenja)	programiran čas praznjenja (krivulja praznjenja), odvisno od vrste in količine hrane
Gibanje FO	gibanje razpadlih delov FO	enoprostorni model	razpadla FO: praznjenje želodca, prehod preko TČ
Simulacija mehanske sile	/	simulacija gibanja želodca (fleksibilne stene) in mešanja v antrumu	simulacija peristaltike (spremembe v pritisku na fleksibilne stene), hidrodinamika
Odstranjevanje sproščene ZU (sink pogoji)	ohranjanje volumna v dvanaestniku: odnašanje sproščene snovi, dotok svežega medija	ne, enkratno praznjenje vsebine	prehajanje sproščene snovi preko membrane z dializo ali filtracijo

Umetni želodčno-duodenalni model zajema dva povezana prostora, ki simulirata želodec in dvanajstnik. Vsečina se iz prvega prostora kontinuirano črpa v drugi prostor in stalen je dotok svežega medija. Model upošteva fiziološke volumne, pH in sestave medijev, pomanjkljivost predstavlja predvsem odsotnost mehanskih sil in nepopolno posnemanje hidrodinamike.

Dinamični želodčni model (DGM – Dynamic Gastric Model) je osnovan na študijah o dogajanju v želodcu, posnetih z MRI (slikanje z magnetno resonanco). Enoprostorni *in vitro* sistem posname mešanje, strižne sile, peristaltiko in praznjenje želodca ter upošteva fiziološke volumne, pH in sestavo medijev (10).

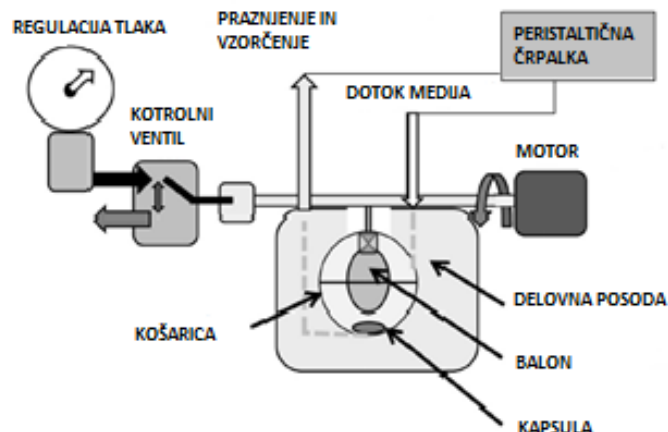
TIM1 je več-prostorni, dinamični, računalniško kontroliran sistem, ki simulira želodec ter tanko črevo (TČ). Spada med sisteme, ki najbolje posnamejo dogajanje v GIT. Sestavljen je na podlagi parametrov in podatkov, ki so jih pridobili s študijami na prostovoljcih in posnema naslednje fiziološke parametre: pH, temperaturo, peristaltiko (mešanje in prenašanje), sekrecijo sline, želodčnih, žolčnih ter pankreatičnih sokov, absorpcijo molekul in vode (11).

1.2.1 Hidrodinamika v prebavnem traktu

V zgornjem prebavnem traktu zasledimo štiri poglavitne vrste gibanja miškulature: mirovanje ter segmentalne, propagativne in tonične kontrakcije (5). Za stanje na tešče je značilen poseben ciklični način gibanja miškulature – migracijski motorični kompleks (MMC), ki se običajno začne v želodcu in propagira v distalni smeri. MMC poteka v ciklikih, od katerih vsak traja približno dve uri, in je razdeljen na več faz. Prva faza je faza mirovanja, sledi druga faza z neenakomernimi kontrakcijami, katerih intenziteta narašča do tretje faze. Gibanje miškulature je tedaj zelo intenzivno, močne kontrakcije povzročijo odprtje pilorusa in praznjenje zaostale želodčne vsebine (12, 13).

Pretok variira vzdolž prebavne cevi in je odvisen od gibanja miškulature v traktu, sekrecije endogenih tekočin, količine in vrste vnesene hrane ali tekočine, razlike v pritisku med prostori v traktu, v manjši meri pa nanj vplivata tudi starost in položaj telesa (5, 13-17).

Na Sliki 2 je predstavljen dinamični stresni model s peristaltično črpalko, ki posnema hidrodinamiko v želodcu.



Slika 2: Primer naprave za posnemanje hidrodinamike: dinamični stresni model s pretočno črpalko. Model upošteva pretoke, temperaturo in mehanske vplive v želodcu. Model sestavlja košarica, v katero je postavljena FO. V košarici je balon, ki se napihuje z določenim pritiskom in tako pritisne FO na žilno mrežo. Košarica se vrti okrog vrtljive osi, FO je izpostavljena mediju in zraku, kar ponazarja nekontinuiran kontakt oblike s tekočino v GIT. Preko peristaltične črpalke v delovno posodo doteka svež medij, istočasno poteka odvajanje medija (vzorčenje). Medij v delovni posodi je temperiran na $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (18).

1.3 Raziskave pretoka v prebavnem traktu

V strokovni in znanstveni literaturi smo iskali študije o hidrodinamiki v prebavnem traktu. Osredotočili smo se na preučevanje pretokov v GIT, metod, s katerimi jih določajo, kaj nanje vpliva in kako so povezani z gibanjem miškulature.

1.3.1 Transpilorični pretoki

Schindlbeck in sod. (14) so raziskovali odnos med pretokom tekočine preko pilorusa in antroduodenalnim gibanjem miškulature v stanju brez hrane.

Izvedli so raziskavo z dvanajstimi zdravimi prostovoljci v stanju na tešče. Pretok, praznjenje iz želodca, sekrecijo ter refluks so določali z aspiracijo tekočine v želodcu. Pred začetkom testa so želodec izpraznili in nadomestili vsebino s testno raztopino 1% polietilenglikola (PEG) v fiziološki raztopini. Nato so iz želodca na 20 min odvezemali 5 ml vzorce ter v njih določali koncentracijo kisline, razredčenega PEG, fenolne raztopine in žolčnih soli. Gibanje v antrumu in dvanajstniku so merili z manometrično cevjo, sestavljeno iz več katetrov in z več odprtinami vzdolž preiskovanega segmenta. Iz odprtine v sredini dvanajstnika so vbrizgali fenolno raztopino za vrednotenje refluksa iz dvanajstnika, skozi ostale odprtine pa so infundirali destilirano vodo pri pretoku 0,1 ml/min za vrednotenje pritiska. V primeru krčenja prebavne cevi se je povečal pritisk na cevko, posledično je prišlo do zapore odprtin in povečanja pritiska v katetrih. Mirovanje

muskulature so smatrali kot fazo I, neenakomerne, naraščajoče krče kot fazo II in fazo III kot intenzivne kontrakcije.

Med praznjenjem iz želodca so določili naslednje transpilorične pretoke (v ml/min):

- ❖ v fazi I je povprečen pretok 0,9 (0,0 – 2,4),
- ❖ v fazi II 1,74 (1,2 – 4,2),
- ❖ v fazi III 1,1 (0,64 – 1,9).

Največji pretok pri praznjenju iz želodca so zabeležili v fazi II. Tedaj so izmerili tudi največjo sekrecijo endogenih tekočin in največ povezanih kontrakcij med antrumom in dvanajstnikom, ki bi lahko pospešili pretok, vendar vpliva niso potrdili.

Z raziskavo so pokazali, da gibanje muskulature v antroduodenalnem predelu prebavnega trakta v določeni meri lahko vpliva na pretok tekočin preko pilorusa, na praznjenje iz želodca ter sekrecijo, nima pa vpliva na refluks iz dvanajstnika v želodec (14).

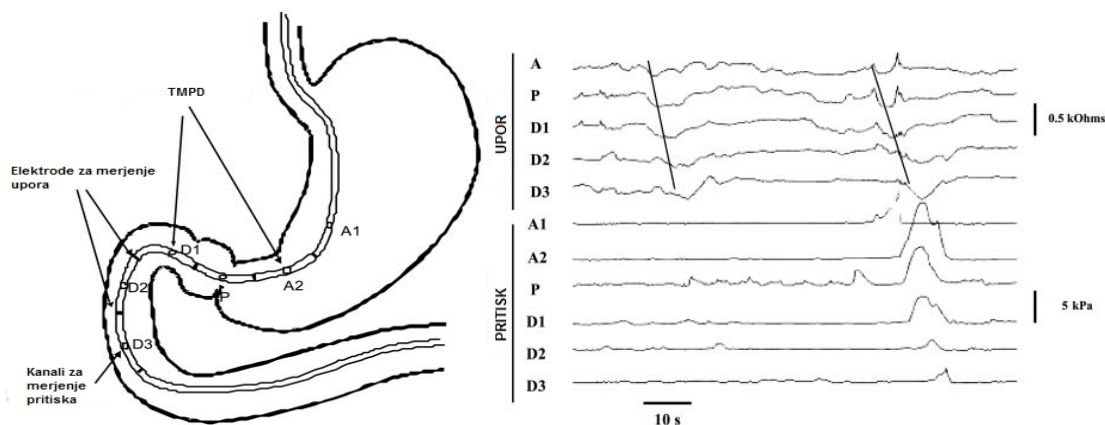
Razvoj tehnologije je znatno prispeval k boljšemu poznavanju dogajanja v človeškem telesu. Za preučevanje GIT se raziskovalci poslužujejo številnih naprednih metod: slikanja z ultrazvokom, scintigrafije, flurosopskih metod in MRI. Eno novejših tehnik za preiskovanje trakta predstavlja metoda, s katero merimo intraluminalno impedanco oziroma upor.

Z navedeno metodo so transpilorične pretoke in vplive na gibanje tekočin preučevali Savoye in sod. (15) ter prišli do podobnih ugotovitev kot Schindlbeck in sod. (14).

Raziskovalci so izbrali dvajset zdravih posameznikov srednjih let. Teste so izvajali po večurnem nočnem postu. Kateter s šestimi kanali za določitev motilitete (pritisk) in šestimi krožnimi elektrodami za meritve pretoka (upor) so prostovoljcem vstavili skozi nos. Lokacija elektrod in kanalov je prikazana na Sliki 3. Položaj katetra so nadzirali z merjenjem TMPD (transmucosal potential difference – razlika potencialov v sluznici). Za validiranje metode so sedmim preiskovancem po zaužitju 300 ml vode pretok merili tudi z pulznim Dopplerjevim ultrazvokom. Vsi dogodki zaznani z Dopplerjevim ultrazvokom (daljši od 4 s) so sovpadali s padci upora.

Po potrditvi pravilne lege katetra so spremljali manometrične spremembe v prebavnem traktu in določili faze MMC ciklusa. V fazi II so zaznali neenakomerne krče in minimalno 2 kontrakciji/10 min. Močne kontrakcije, približno 3/minuto, in daljše kot 1 min so predstavljale antralno fazo III. Vsaj 5-minutno mirovanje muskulature je pomenilo nastop faze I. Povprečno je faza I trajala 16 ± 13 min, faza II 63 ± 48 min in faza III $6,9 \pm 3,2$ min.

V času mirovanja je upor variiral med 0,2 k Ω in 0,8 k Ω . Upad upora med antralnim in duodenalnim kanalom za 40% glede na začetno vrednost je pomenil pretok tekočine preko pilorusa (tekočine so prevodne – upor pade). Pretok so opazili med vsemi MMC fazami, številčno največ padcev upora so zaznali v fazi II, glede na enoto časa pa je bilo teh več v fazi III. Retrogradni prehod tekočin so opazili predvsem v I fazi. V fazi II so zabeležili največje število povezanih, sočasnih transpiloričnih pretokov in kontrakcij, kar prikazuje graf na Sliki 3.



Slika 3: Na levi je prikazana lokacija katetra v želodcu oziroma dvanaajstniku s posameznimi kanali ter elektrodami. Na desni sta predstavljena grafa upora in pritiska v odvisnosti od časa, ki prikazujeta prehod tekočine preko pilorusa v odsotnosti kontrakcij in ko so le-te prisotne (11).

Po aplikaciji 300 ml vode so se v prvih 5 min po vnosu nakazovali dobro definirani padci upora. Sicer z merjenjem upora ni bilo mogoče kvantitativno ovrednotiti pretočenih količin, lahko pa so potrdili, da je enkratni vnos vode spodbudil pretok preko pilorusa. Kljub temu, da se je številčno več transpiloričnih prehodov tekočine zgodilo v fazi II, so sklepali, da se je v fazi III glede na intenziteto krčev in načela "čiščenja" ("housekeeping") pretočilo količinsko največ tekočine. Dvosmerne pretoke v fazi mirovanja so povezali z razliko v pritisku med antrumom in dvanaajstnikom.

Z merjenjem upora so potrdili, da gibanje miškulature vpliva na transpilorične pretoke. V stanju na tešče nanje vplivata tudi vnesena tekočina in intraluminalna razlika v pritisku (15).

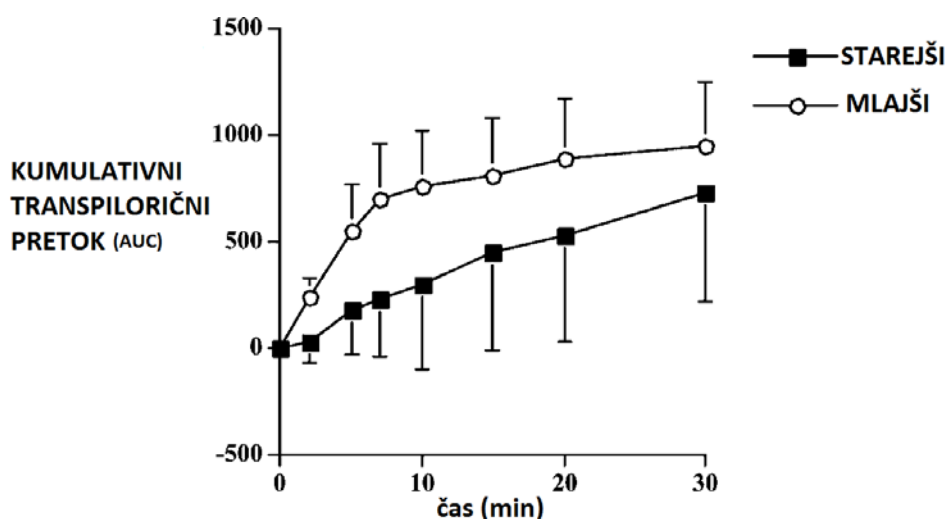
1.3.2 Vpliv starosti in položaja telesa na transpilorične pretoke

Študijo vpliva starosti na transpilorične pretoke, praznjenje želodca in glikemijo je izvedel O'Donovan s sod. (16). Z desetimi mladimi (povprečno 24 let) in osmimi starejšimi (povprečno 74 let) zdravimi preiskovanci so izvedli naslednje testiranje: testiranci so spili 600 ml napitka s 75 g glukoze, označene s radioizotopom ^{99m}Tc (tehnecij). Sledilo je

sočasno merjenje pretoka preko pilorusa z ultrazvokom, praznjenje iz želodca s scintigrafijo in koncentracije glukoze v krvi (c_p).

Ugotovili so, da je takoj po vnosu napitka transpilorični pretok znatno večji pri mlajših testirancih. Absorpcijski profil glukoze je bil v začetnem delu nekoliko strmejši pri mlajših, po 90 min pa je bila c_p glukoze višja pri starejših.

S študijo so pokazali, da sta pri mlajših praznjenje in pretok v distalni smeri nekoliko pospešena, kar vpliva na višjo c_p glukoze v začetni fazi merjenja. Pri starejših so zabeležili podaljšano retencijo vsebine v proksimalnem želodcu in počasnejše praznjenje. Posledično je koncentracija glukoze v krvi počasneje naraščala, po določenem času pa je bila višja kot pri mlajših. Poleg številnih dejavnikov (presnova ogljikovih hidratov, količina le-teh v TČ, stopnja absorpcije, ipd.) na ta pojav vplivata s starostjo zmanjšana toleranca na glukozo in povečana rezistenca na inzulin. Na Sliki 4 je prikazan graf kumulativnega pretoka preko pilorusa pri mlajših in starejših testirancih (16).



Slika 4: Graf kumulativnega pretoka preko pilorusa po aplikaciji napitka s 75 g glukoze v odvisnosti od časa glede na starost (AUC – površina pod krivuljo antegradnega transpiloričnega pretoka pri starejših in mlajših) (16).

Podobno raziskavo so izvedli Jones in sod. (17), le da so ugotavljali, kako na transpilorične pretoke, praznjenje iz želodca in koncentracijo glukoze v krvi vpliva položaj telesa. Po vnosu označenega glukoznega napitka so na preiskovancih izvajali meritve v sedečem in ležečem položaju. Transpilorični pretok so merili z Dopplerjevim ultrazvokom. Ugotovili so, da je pretok preko pilorusa takoj po vnosu napitka večji v sedečem položaju, razlike med položajema v končnem kumulativnem pretoku v intervalu od 0 do 30 min pa so bile zanemarljive.

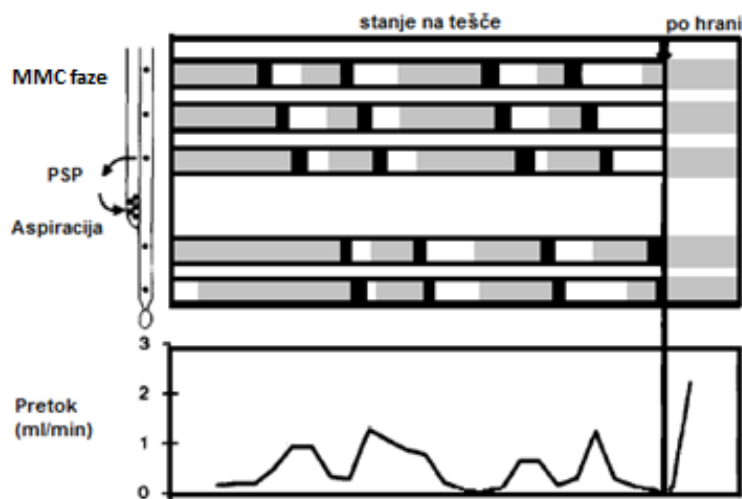
Študija je pokazala, da pri mladih in zdravih posameznikih položaj telesa vpliva na pretok takoj po vnosu glukozonega napitka in na distribucijo v želodcu – v sedečem položaju se večja količina napitka zadržuje v antrumu. Neposredno po vnosu je v ležečem položaju retencija vsebine v proksimalnem delu želodca nekoliko podaljšana (17).

1.3.3 Pretoki v tankem črevesu

Odnos med gibanjem miškulature in tekočin v TČ je preučeval Kerlin s sod. (13). Študijo so izvedli z desetimi prostovoljci v stanju na tešče in po vnosu hrane. Motiliteto so merili s hidravlično cevjo s petimi odprtinami, med katerimi je bila razdalja 100 cm, za vrednotenje gibanja v jejunumu, ileumu in terminalnem ileumu. Pretok intestinalne vsebine so ocenjevali z indikatorjem fenolsulfonftaleinom (PSP), ki se ne absorbira. V črevo so indikator vnašali skozi odprtine s konstantno hitrostjo infundiranja 0,5 ml/min in koncentracijo 0,25 g/L. Aspirat so odvezemali 20 cm od mesta infuzije, raztopino PSP in endogene tekočine so vzorčili na 15 min (Slika 5). Na podlagi koncentracije PSP v vzorcih so ovrednotili pretok v ileumu na enoto časa:

$$\text{Pretok}_{(v\ 15\ min)} = \frac{[PSP]_i \cdot 15\ min \cdot \text{hitrost infundiranja PSP}}{[PSP]_a} - \text{volumen infuzije}/15\ min \quad (1)$$

$[PSP]_i$ je koncentracija indikatorja na mestu infuzije, $[PSP]_a$ pa na mestu aspiracije. Na Sliki 5 je prikazan primer merjenja pretoka v ileumu v povezavi z MMC fazami.



Slika 5: Slika prikazuje povezavo med pretokom v ileumu in MMC fazami, ki so jih zabeležili na mestih v TČ, kjer so bile odprtine v cevki. Beli prostori predstavljajo fazo I, sivo obarvani fazo II in črni fazo III. Na levi je shematično prikazana cev s petimi odprtinami razporejenimi v TČ za merjenje pritiska in mesto infuzije ter aspiracije PSP za vrednotenje pretoka v ileumu. Povečan pretok v ileumu sovпада s tretjo fazo MMC v tem delu TČ.

Po šestih urah so preiskovanci zaužili tekoči obrok, ki je vseboval 15 g ne-absorptivnega indikatorja PEG (400 ml, 600 kcal). Na mestu aspiracije so tega odvzemali in ga turbidimetrično analizirali.

Študija je pokazala, da je pretok vsebine v TČ v stanju na tešče neenakomeren in da so večji pretoki povezani z aktivno, tretjo fazo MMC ciklusa. Kar 80% povečanih pretokov ($> 0,75$ ml/min) so zabeležili v omenjeni fazi. Čas faze III je kratek, fazi I in II sta predstavljali 2/3 celotnega ciklusa, vendar se je približno 50 % pretokov zgodilo v fazi III. Po vnosu tekočega obroka se je pretok povečal, pri večini so opazili periodično naraščanje pretoka, tudi do 7 ml/min. V preglednici II so navedeni pretoki, ki so jih izmerili v posameznem delu TČ v stanju na tešče oziroma po zaužitem obroku.

Preglednica II: Povprečen pretok v TČ v ml/min, v stanju na tešče in po obroku (13).

Mesto meritev	Stanje na tešče			Stanje po zaužitem obroku
	povprečje $\pm$ SEM	faza III	fazi I in II	povprečje $\pm$ SEM
jejunum	$0,73 \pm 0,11$	$1,28 \pm 0,18$	$0,58 \pm 0,12$	$3,00 \pm 0,67$
ileum	$0,33 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,13$	$0,17 \pm 0,03$	$2,35 \pm 0,28$
terminalni ileum	$0,43 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,003$	$2,09 \pm 0,16$

Zaključili so, da na pretok vsebine v tankem črevesu v stanju na tešče vpliva predvsem MMC. Hrana pospeši pretok, niso pa potrdili, da so povečani pretoki povezani s postprandialnim gibanjem v črevesu (13).

1.3.4 Vpliv pretoka na prehod skozi sluznico v tankem črevesu

Navajamo še študijo vpliva različnih pretokov na prehod skozi sluznico v tankem črevesu. V proksimalnem TČ so Fine in sod. (19) testirali prepustnost snovi, ki prehajajo sluznico s pasivnim transportom preko vodnih kanalčkov, in sicer uree, ksiloze in manitola. Izbrane spojine so hidrofilne, nenabite, ne prehajajo prek lipofilnih membran ali s prenašalci, zato so omogočale natančno ovrednotenje te vrste pasivnega prehoda. Raztopine z omenjenimi topljenci so izločali skozi perfuzijsko cev s pretoki 5, 10 in 20 ml/min ter vsebino aspirirali na koncu 30 cm testnega odseka. Koncentracijo ksiloze in manitola so določali kolorimetrično, sečnino pa z encimsko reakcijo z ureazo. Prepustnost za ksilozo in ureo so računali kot koeficient med hitrostjo absorpcije (J) in povprečnim koncentracijskim gradientom (ΔC) tekom testnega odseka (razlika med koncentracijo topljenca v lumnu in serumu):

$$\text{Prepustnost} = \frac{J}{\Delta C} \quad (2)$$

Iz razmerja prepustnosti ksiloze in uree so ocenili prepustnost sluznice ter na podlagi poznavanja velikosti molekul testnih spojin izračunali povprečno velikost difuzijskih por oziroma vodnih kanalčkov, preko katerih poteka omenjeni pasivni transport pri posameznem pretoku.

Prišli so do naslednjih ugotovitev: pri večjem pretoku sta se ΔC in J povečala za ksilozo in sečnino, vendar se je znatno povečala samo prepustnost za sečnino. Pri pretoku 20 ml/min je bil izračunan radij difuzijskih por manjši kot pri pretoku 5 ml/min.

Pri večjem pretoku je bila raztopina razporejena na večji površini sluznice in posledično je bila tudi površina za absorpcijo večja. Molekula uree je manjša kot ostali dve in lahko prehaja skozi manjše pore, kar je vplivalo na večjo prepustnost za to spojino. Domnevali so, da so bile pri večjem pretoku črevesne resice bolj razprte in urea je lahko dosegla ter prehajala skozi več celic z manjšimi porami. Večje molekule skozi te pore niso prehajale.

Z raziskavo so pokazali, da večji pretok lahko poveča prepustnost črevesne sluznice, vendar na prehajanje vplivajo tudi drugi faktorji (velikost molekul, velikost por, tesnost stikov, ipd.) (19).

2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo optimizirali pogoje in izvedbo testov na *in vitro* pretočnem sistemu za testiranje sproščanja. Testirali bomo sproščanje iz gastrozistentnih pelet.

Na pretočnem sistemu bomo simulirali fiziološki pH od želodca do tankega črevesa. Optimizirali bomo pretočni sistem za določevanje pH profilov. Za posnemanje želodčnega medija bomo uporabili raztopino HCl, hiter pH preskok, ki nastopi po prehodu oblike preko pilorusa, bomo dosegli z dodatkom raztopine Na_3PO_4 . Črevesni medij bomo simulirali s fosfatnim pufrom s $\text{pH} = 6,8$.

Medije, s katerimi bomo posnemali pH profil v zgornjem delu GIT, bomo uporabili pri testiranju sproščanja. Poskuse bomo izvajali z orodisperzibilnimi tabletami, Oblike A in B, ki ob stiku z medijem razpadejo na gastrozistentne pelete z ZU in pomožne snovi. S testiranjem sproščanja pri različnih hitrostih pretoka in časih izpostavljenosti kislemu mediju bomo ugotavljali, kakšen je vpliv teh parametrov na sproščanje. Primerjali bomo sproščanje iz Oblike A in B ter z računanjem oteženih profilov sproščanja skušali napovedati *in vivo* profile sproščanja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali in aparature

3.1.1 Farmacevtska oblika

Pri testiranju sproščanja na pretočnem sistemu smo uporabljali orodisperzibilne tablete, Obliki A in B, ki ob stiku z medijem takoj razpadejo. Tablete so zgrajene iz gastrozistentnih pelet, ki vsebujejo acidolabilno ZU, in pomožnih snovi.

3.1.2 Snovi za izvedbo eksperimentalnega dela

- natrijev hidroksid, Tritisol®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija za pripravo 1 M raztopine NaOH,
- klorovodikova kislina, Tritisol®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija za pripravo 1 M raztopine HCl,
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija za pripravo fosfatnega pufra in mobilne faze,
- trinatrijev fosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija za pripravo raztopine Na_3PO_4 za dosego hitrega pH preskoka,
- standard ZU za pripravo osnovne standardne raztopine za določitev umeritvene premice in dnevno preverjanje kromatografskega sistema,
- puferske raztopine za umeritev pH metra s $\text{pH} = 7,00 (\pm 0,02; 20^\circ\text{C})$, Panreac, Barcelona, Španija, $\text{pH} = 3,00 (\pm 0,02; 20^\circ\text{C})$ in $\text{pH} = 4,00 (\pm 0,02; 20^\circ\text{C})$, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

3.1.3 Priprava raztopin za izvedbo eksperimentalnega dela

❖ 0,1 M NaOH

Raztopino smo pripravili tako, da smo v 2000 ml bučo do polovice napolnjeno z destilirano vodo dodali 200 ml 1 M NaOH, premešali in z destilirano vodo dopolnili do oznake ter raztopino še enkrat dobro zmešali.

❖ Osnovna kislina raztopina za izvedbo testov sproščanja: 0,01 M HCl

Raztopino smo pripravili tako, da smo v 1000 ml bučo do polovice napolnjeno z destilirano vodo s polnilno pipeto odpipetirali 10 ml 1 M HCl, premešali in z destilirano vodo dopolnili do oznake ter raztopino še enkrat dobro zmešali.

❖ Osnovna standardna raztopina

Natančno smo natehtali standard ZU, približno 10 mg, in ga raztopili v 0,1 M NaOH v 50 ml bučki.

❖ Fosfatni pufer s pH = 6,8 in pH = 6,5

Fosfatni pufer s pH = $6,8 \pm 0,05$ smo pripravili v 2000 ml buči. V čaši smo natehtali 13,6 g KH_2PO_4 in vsebino kvantitativno prenesli v bučo, do polovice napolnjeno z destilirano vodo. V bučo smo prelili še 44 ml 1 M NaOH, dobro premešali, ter do oznake dopolnili z destilirano vodo. 2000 ml fosfatnega pufra s pH = $6,5 \pm 0,05$ smo pripravili po enakem postopku, s 13,6 g KH_2PO_4 in 35 ml 1 M NaOH. Pripravljenim pufrom smo pred uporabo izmerili pH, ki je lahko odstopal za $\pm 0,05$ od izbrane vrednosti.

❖ Raztopine HCl različnih koncentracij

V 1000 ml bučo do polovice napolnjeno z destilirano vodo smo s pipeto odpipetirali določeno količino 1 M HCl ter dodali destilirano vodo do oznake in premešali. Tako smo pripravili kisle raztopine s koncentracijami 7×10^{-4} M HCl, $1,85 \times 10^{-3}$ M HCl, $4,5 \times 10^{-3}$ M HCl, 0,035 M HCl in 0,1 M HCl, ki smo jih uporabljali za določitev pH profilov in za izvedbo preliminarne poskusov sproščanja. Sestava in količine za pripravo posameznih kislih medijev so navedene v preglednici III.

Preglednica III: Raztopine HCl različnih koncentracij in izmerjen pH

sestava	količina	izmerjene pH vrednosti
7×10^{-4} M HCl		3,2
1 M HCl	0,7 ml	
destilirana voda	do 1000 ml	
$1,85 \times 10^{-3}$ M HCl		2,8
1 M HCl	1,85 ml	
destilirana voda	do 1000 ml	
$4,5 \times 10^{-3}$ M HCl		2,4
1 M HCl	4,5 ml	
destilirana voda	do 1000 ml	
0,035 M HCl		1,6
1 M HCl	35 ml	
destilirana voda	do 1000 ml	
0,1 M HCl		1,1
1 M HCl	100 ml	
destilirana voda	do 1000 ml	

❖ Raztopine Na_3PO_4 različnih koncentracij

Na podlagi izračuna in eksperimentalnih meritev smo za vsak izhodni kisel medij pripravili raztopino Na_3PO_4 za dvig pH v mediju. Na analizni tehnici smo na tehtič natehtali

določeno maso Na_3PO_4 , uporabljali smo hidratno obliko $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, in vsebino kvantitativno prenesli v 100 ml bučko ter jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Pri raztopinah z visoko koncentracijo smo raztopitev pospešili z uporabo ultrazvočne kadičke. Sestava in količine za pripravo raztopin Na_3PO_4 so navedene v preglednici IV.

Preglednica IV: Raztopine Na_3PO_4 različnih koncentracij

sestava	količina
$4 \times 10^{-3} \text{ M Na}_3\text{PO}_4$	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	152 mg
destilirana voda	do 100 ml
0,01 M Na_3PO_4	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	380 mg
destilirana voda	do 100 ml
0,023 M Na_3PO_4	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	874 mg
destilirana voda	do 100 ml
0,055 M Na_3PO_4	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,09 g
destilirana voda	do 100 ml
0,21 M Na_3PO_4	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7,98 g
destilirana voda	do 100 ml
0,61 M Na_3PO_4	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	23,19 g
destilirana voda	do 100 ml

❖ 50 mM KH_2PO_4

V čaši smo natehtali 6,8 g KH_2PO_4 ter snov kvantitativno prenesli v 1000 ml bučko, delno napolnjeno z de-ionizirano vodo, premešali ter dodali preostalo vodo do oznake. Raztopino smo uporabljali kot sestavni del mobilne faze na kromatografskem sistemu, zato smo jo pred uporabo filtrirali skozi membranski filter in odzračili na ultrazvočni kadički.

3.1.4 Naprave, materiali in pripomočki za izvedbo eksperimentalnega dela

Pretočni sistem za testiranje sproščanja:

- peristaltična črpalka, IKA WERKE, Nemčija,
- magnetno mešalo in grelec z vgrajenim termometrom, IKA WERKE, Nemčija,
- vodna kopel z nastavkom za stabilizacijo delovne čaše,
- pretočne cevke z notranjim premerom 3,2 mm in zunanjim premerom 6,4 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija,
- 150 ml delovna čaša s pokrovom,

- magnet v silikonski cevki (dimenzije: 15 mm x 6 mm, silikonska cevka: 48 mm),
- merilni valji različnih volumnov za zbiranje vzorca.
- dovajalne čaše s čistim medijem.

Naprave in pripomočki za določitev pH profilov:

- ❖ Določitev pH profilov na pretočnem sistemu STS - sistem za testiranje sproščanja:
 - peristaltična črpalka, IKA WERKE, Nemčija,
 - magnetno mešalo in grelec z vgrajenim termometrom, IKA WERKE, Nemčija,
 - vodna kopel z nastavkom za stabilizacijo delovne čaše,
 - pretočne cevke z notranjim premerom 3,2 mm in zunanjim premerom 6,4 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe,
 - dovajalne čaše s čistim medijem,
 - pH meter MP220 Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica,
 - 150 ml delovna čaša,
 - magnet v silikonski cevki (dimenzije: 15 mm x 6 mm, silikonska cevka: 48 mm).
- ❖ Določitev pH profilov na pretočnem sistemu OS – optimiziran sistem za določitev pH profilov:
 - peristaltična črpalka, IKA WERKE, Nemčija,
 - magnetno mešalo in grelec z vgrajenim termometrom, IKA WERKE, Nemčija,
 - vodna kopel z nastavkom za stabilizacijo delovne čaše,
 - pretočne cevke z notranjim premerom 3,2 mm in zunanjim premerom 6,4 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe,
 - dovajalne čaše s čistim medijem,
 - pH meter MA5750, Iskra Kranj, Slovenija,
 - 80 ml čaša,
 - magnet (dimenzije: 15 mm x 6 mm).

Ostale naprave in pripomočki:

- digitalna tehtnica Exacta 300EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija,
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica,
- avtomatske pipete z različnimi volumni Eppendorf, Hamburg, Nemčija,

- polnilne pipete različnih volumnov,
- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti - HPLC Agilent 1100 Series Agilent Technologies ZDA,
- kolona MAX-RP 80A, Synergi 4 μm , 100 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, ZDA,
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra Kranj, Slovenija,
- membranski filtri, pore 0,45 μm , Sartorius AG, Nemčija.

3.2 Metode

3.2.1 Analiza vzorcev

Za analizo vzorcev smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV detekcijo.

Pogoji kromatografskega sistema:

- kolona: MAX-RP 80A, Synergi 4 μm , 100 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, ZDA, temperatura kolone: 30°C,
- valovna dolžina (λ): 292 nm,
- pretok: 1,5 mL/min,
- injiciran volumen: 10 μL ,
- mobilna faza: vodna faza - 55%: 50 mM KH_2PO_4 , organska faza - 45 %: acetonitril.

Ponovljivost analize: poleg vzorcev smo med vsako analizo posneli kromatogram dveh standardnih raztopin nizke in visoke koncentracije (10 mg/L in 100 mg/L) in sicer pred, med in po končani analizi vseh vzorcev. Na ta način smo preverjali ponovljivost in stabilnost analizne metode.

Vsak teden smo v ponedeljek pripravili svežo osnovno standardno raztopino s koncentracijo 200 mg/L in jo shranili v hladilnik. Iz osnovne standardne raztopine smo dnevno z ustreznim redčenjem z 0,1 M NaOH in medijem za sproščanje (fosfatni pufer pH = 6,8) pripravili kontrolne standardne raztopine nizke in visoke koncentracije (10 mg/L in 100 mg/L). Povprečje površin pod vrhom kontrolnih standardnih raztopin smo prenesli na umeritveno premico, odstopanje od le-te ni smelo biti večje kot 2 %.

3.2.2 Določitev enačbe umeritvenih premic

Za določitev umeritvene premice smo pripravili standardne raztopine znanih koncentracij. Na analitski tehnici smo natančno natehtali približno 10 mg standarda in snov kvantitativno prenesli v 50 ml bučko ter dopolnili do oznake z 0,1 M raztopino NaOH.

Pripravili smo dve taki osnovni standardni raztopini s koncentracijo 200 mg/L in ju nadalje z 0,1 M raztopino NaOH in medijem za sproščanje redčili tako, da smo znotraj intervala 0 – 200 mg/L dobili približno enakomerno razporejene standardne raztopine - izmenično iz obeh osnovnih standardnih raztopin.

V vsaki standardni raztopini je bilo razmerje NaOH : medij za sproščanje (fosfatni pufer s pH = 6,8) 1:1. Količino NaOH smo sešteli iz prispevka v osnovni raztopini in dodatka NaOH, npr.: za pripravo 1 ml standardne raztopine s koncentracijo 40 mg/L smo odpipetirali 200 µL osnovne raztopine in dodali 300 µL 0,1 M NaOH ter 500 µL medija za sproščanje.

Pripravljenim raztopinam smo na HPLC posneli kromatograme in določili površine pod kromatografskim vrhom (AUC – Area Under Curve). Merili smo pri valovni dolžini $\lambda=292$ nm. Koncentracije smo nanašali na abscisno os, površine vrhov pa na ordinatno in tako določili umeritveno premico. Z linearno regresijo smo izračunali enačbo premice in določili kvadrat Pearsonovega koeficienta (R^2).

Zaradi manjših sprememb na kromatografskem sistemu in odstopanj kontrolnih standardnih raztopin smo določili še eno umeritveno premico v koncentracijskem intervalu 0 – 240 mg/L. Novo umeritveno premico smo pripravili pod istimi pogoji in po enakem postopku kot prej navedeno ter jo upoštevali pri vseh končnih testih sproščanja (v rezultatih – umeritvena premica 2). Pri preliminarnih testih sproščanja smo za izračun sproščene ZU uporabili prvo umeritveno premico (umeritvena premica 1).

3.2.3 Simulacija in določevanje pH profilov

Na pretočnem sistemu smo simulirali pH profil v prebavnem traktu po prehodu oblike iz želodca v dvanajstnik. Osredotočili smo se na hiter pH preskok, ki nastopi ob prehodu oblike preko pilorusa iz kislega medija v želodcu v črevesni medij z višjim pH. Z izračuni in merjenjem pH medijev smo določili točne koncentracije raztopin za ponazoritev pH profila. Le-te smo nadalje uporabljali tudi kot medije za sproščanje pri testih sproščanja.

Izhodne kisle raztopine s pH = 1,1, 1,6, 2,1, 2,4, 2,8 in 3,2 smo uporabili za simulacijo šest pH profilov. pH izhodnih kislih medijev smo izbrali glede na okvirni pH v želodcu v stanju na tešče. Želodčni medij smo ponazarjali z raztopino HCl. Za hiter dvig pH, ki nastopi po prehodu FO iz želodca v dvanajstnik, smo uporabljali raztopino Na₃PO₄. S fosfatnim pufrom s pH = 6,8 smo simulirali črevesni medij.

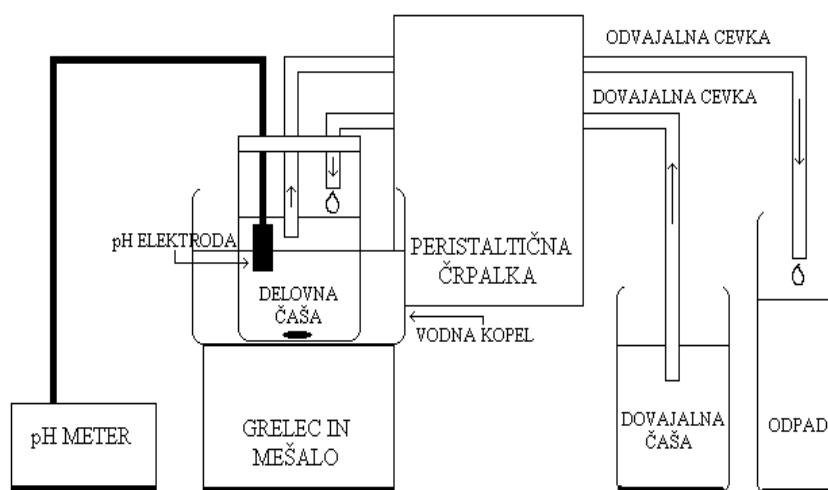
3.2.3.1 Postopek določevanja pH profilov

Delovno čašo smo postavili v vodno kopel in na grelec z magnetnim mešalom ter jo napolnili s 40 ml izhodnega kislega medija. Skozi pokrov na delovni čaši smo pritrdili dovodno in odvodno cevko ter elektrodo pH metra. Cevke so bile pred začetkom poskusa prazne. Počakali smo, da se je vodna kopel segrela na temperaturo $T = 36,5^{\circ}\text{C}$. Medij v delovni čaši smo mešali s pomočjo magneta. Hitrost pretoka smo nastavili na 2 ml/min, torej sta v 1 minuti v čašo pritekla 2 ml čistega medija ter se obenem 2 ml odvedla iz čaše. V dovajalno čašo smo prelili raztopino Na_3PO_4 ter vanjo potopili dovajalno cevko. Pripravili smo tudi drugo dovajalno čašo ter jo napolnili s fosfatnim pufrom s $\text{pH} = 6,8$. Ob času 0 smo zabeležili izhodni kisli pH medija, nato smo obenem zagnali peristaltično črpalko in štoparico ter na določen časovni interval izpisovali spremembo pH vrednosti. Od časa 0 do 2 min smo dovajali raztopino Na_3PO_4 (uvedli smo 4 ml te raztopine), nato smo dovajalno čašo zamenjali in dodajali fosfatni pufer s $\text{pH} = 6,8$ do konca poskusa. pH smo merili do vzpostavitve konstantne vrednosti $\text{pH} = 6,8 \pm 0,1$.

Pred meritvami smo pH meter umerili na $\text{pH} = 3$ oziroma 4, odvisno od uporabljenega pH metra, zadnjo meritev vseh pH profilov pa smo še enkrat izmerili po umeritvi na $\text{pH} = 7$.

Vse pH profile smo določevali na pretočnem sistemu s peristaltično črpalko z oznako PS1.

Na Sliki 6 je prikazana shema pretočnega sistema s pH metrom za določevanje pH profilov.



Slika 6: Naprava za določevanje pH profilov

3.2.3.2 Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov

pH profile smo simulirali na dveh različnih napravah za določevanje pH profilov. Preliminarne poskuse določevanja pH profilov smo izvajali na pretočnem sistemu za

testiranje sproščanja - **STS**, kjer so bili pogoji izvedbe pri določanju pH profilov isti kot pri izvajanju testov sproščanja. Uporabljali smo:

- 150 ml delovno čašo,
- magnet v silikonski cevki,
- za merjenje pH: pH meter MP220 Mettler Toledo (v nadaljevanju pH meter 1), umerjen na pH = 4.

Na optimiziranem pretočnem sistemu za določevanje pH profilov – **OS** smo določevali preliminarne in končne pH profile. Uporabili smo:

- 80 ml delovno čašo,
- magnet brez silikonske cevke,
- za merjenje pH: pH meter MA5750, Iskra Kranj (v nadaljevanju pH meter 2), umerjen na pH = 3.

OS smo uvedli zaradi zamenjave pH metra na napravi za določevanje pH profilov (večja občutljivost pH metra 2 v primerjavi s pH metrom 1). Z menjavo pH metra smo nekoliko modificirali pretočni sistem, saj smo zamenjali delovno čašo in glede na to optimizirali nekatere parametre (pokrov na čaši, hitrost mešanja, uporaba magneta brez silikonske cevke).

Optimizacijo in spremembe na OS smo preverjali s preliminarnimi poskusi, ki smo jih izvedli po postopku za določevanje pH profilov (3.2.3.1).

❖ **Simulacija in določevanje pH profilov na OS v ožji, 80 ml čaši in optimizacija izvedbe**

Na OS smo pH profile določevali v ožji, 80 ml čaši, saj uporaba 150 ml čaše, ki smo jo uporabljali pri testiranju sproščanja, ni bila mogoča. Elektroda pH metra 2 v večji čaši ni bila popolnoma potopljena v medij. Na 150 ml čaši smo pri vsakem poskusu uporabljali pokrov, s katerim smo pritrdili cevke in pH elektrodo ter tako poskušali zagotoviti ponovljive pogoje (enak razmik med cevkami in pH elektrodo). Za 80 ml čašo smo izdelali nov pokrov s tremi odprtini za odvodno in dovodno cevko ter pH elektrodo.

Opazovali smo vpliv pokrova oziroma položaja cevk ter elektrode na pH vrednosti. Izvedli smo po tri paralele z in brez pokrova ter primerjali dobljene profile.

Pogoji izvedbe pH profilov z in brez pokrova (poskusa PP – 1, PP - 2):

- uporabljeni mediji: izhodna kisl raztopina 0,1 M HCl (pH = 1,1), koncentracija raztopine Na₃PO₄ = 0,61 M, fosfatni pufer pH = 6,8,
- hitrost mešanja v delovnem mediju: 140 obratov/minuto.

❖ **Hitrosti mešanja na OS**

S kratkim testom smo izbrali hitrost mešanja medija na OS in preverili vpliv na pH. Na OS smo za mešanje uporabili samo magnet, brez silikonske cevke, saj je bila le-ta prevelika za 80 ml čašo.

Pogoji izvedbe (poskusa PP - 3, PP - 4):

- uporabljeni mediji: izhodna kisl raztopina 0,1 M HCl (pH = 1,1), koncentracija raztopine Na_3PO_4 = 0,61 M, fosfatni pufer pH = 6,8,
- hitrost mešanja v delovnem mediju: 100 in 140 obratov/minuto.

❖ **Primerjava parametrov in profilov določenih na STS in OS**

Medije in postopek, s katerimi smo na pretočnem sistemu simulirali pH profile, smo uporabljali tudi pri testiranju sproščanja. Teste sproščanja smo izvajali pod pogoji STS, zato smo s primerjalnimi testi preverjali podobnost pH profilov določenih na STS ter OS in ugotavljali ustreznost optimiziranih parametrov na OS.

Na STS smo določili tri pH profile pri različnih hitrostih mešanja: 80, 100 in 150 obratov/minuto. pH profil STS pri 80 obratih/minuto (hitrost mešanja pri testih sproščanja) smo nato primerjali s pH profilom OS pri 140 obratih/minuto (hitrost mešanja pri določevanju pH profilov).

Pogoji izvedbe na STS (poskusi PP – 5, PP - 6, PP - 7):

- 150 ml čaša, magnet v silikonski cevki,
- uporabljeni mediji: izhodna kisl raztopina 0,1 M HCl (pH = 1,1), koncentracija raztopine Na_3PO_4 = 0,61 M, fosfatni pufer pH = 6,8,
- hitrost mešanja: 80, 100 in 150 obratov/minuto.

pH profil za primerjavo določen na OS (poskus PP – 2):

- 80 ml čaša, magnet brez silikonske cevke,
- uporabljeni mediji: izhodna kisl raztopina 0,1 M HCl (pH = 1,1), koncentracija raztopine Na_3PO_4 = 0,61 M, fosfatni pufer pH = 6,8,
- hitrost mešanja: 140 obratov/minuto.

V preglednici V je seznam preliminarne pH profilov, s katerimi smo optimizirali pretočni sistem za določevanje pH profilov.

Preglednica V: Seznam poskusov za določevanje preliminarnih pH profilov: razvoj in optimizacija pretočnega sistema. Pomen oznak: PP – 1: preliminarni pH profil in zaporedna številka poskusa, OS – optimiziran sistem, STS – sistem za testiranje sproščanja.

oznaka poskusa	pretočni sistem za določevanje pH profilov	namen poskusa	parametri optimizacije – izvedba poskusov	število paralel
PP - 1	OS	vpliv položaja cevki in pokrova na pH profile	čaha brez pokrova	3
PP – 2*			čaha s pokrovom	3
PP - 3	OS	izbor hitrosti mešanja na OS	mešanje: 100 obratov/minuto	1
PP - 4			mešanje: 140 obratov/minuto	1
PP - 5	STS	primerjava pH profilov določenih na STS in OS	mešanje: 80 obratov/minuto	1
PP - 6			mešanje: 100 obratov/minuto	1
PP - 7			mešanje: 150 obratov/minuto	1
PP – 2*	OS		mešanje: 140 obratov/minuto	3

Op.: poskus označen z * smo upoštevali pri končni izvedbi določevanja pH profilov (oznaka P -1).

3.2.3.3 Določitev točne koncentracije Na₃PO₄ in preliminarni pH profili

Z dodatkom raztopine Na₃PO₄ smo želeli doseči hiter dvig pH medija v delovni čaši od kislega pH do pH = 6,8. Za vsako izhodno kislno raztopino smo na podlagi reakcije med HCl in fosfatom izračunali koncentracijo Na₃PO₄, ki dvigne pH do želene vrednosti. Na sistemu smo preverili pH profil po dodatku izračunane koncentracije Na₃PO₄ in s preizkušanjem s preliminarnimi pH profili določili točno koncentracijo fosfata.

V preglednici VI je naveden primer preliminarnih pH profilov, ko smo za simulacijo pH profila uporabili izhodno kislno raztopino 0,035 M HCl (pH = 1,6). Poskuse smo izvedli na OS, pogoji: hitrost mešanja 140 obratov/minuto.

Preglednica VI: Seznam poskusov za določevanje preliminarnih pH profilov: določitev točne koncentracije Na₃PO₄, izhodna kislna raztopina 0,035 M HCl. Pomen oznak: PP – 8: preliminarni pH profil in zaporedna oznaka poskusa.

oznaka poskusa	namen poskusa	koncentracija Na ₃ PO ₄ (M)
PP - 8	določitev točne koncentracije Na ₃ PO ₄	0,02
PP - 9		0,021
PP - 10		0,022
PP - 11		0,025

3.2.3.4 Končna izvedba

Raztopine HCl s pH = 1,1, 1,6, 2,1, 2,4, 2,8 in 3,2 smo izbrali kot izhodne kislne raztopine za simulacijo pH profilov od želodca do TČ.

Priprava raztopin HCl: koncentracijo HCl posameznih raztopin smo izračunali iz izbranega pH izhodne raztopine, pripravili raztopine ter jim izmerili pH s pH metrom 2. Ker so izmerjeni pH tako pripravljenih raztopin nekoliko odstopali od izbranih pH-jev, smo točne koncentracije raztopin HCl določili eksperimentalno (preglednica VII).

Pogoji končne izvedbe na OS:

- pretok: 2 ml/min,
- hitrost mešanja: 140 obratov/minuto z magnetom brez silikonske cevke,
- 80 ml delovna čaša s pokrovom.

Uporabljeni mediji pri končni izvedbi:

- izhodna kisl raztopina: raztopina HCl - koncentracije so navedene v preglednici VII,
- medij za hiter pH preskok: raztopina Na₃PO₄ - koncentracije v preglednici VII,
- simulacija črevesnega medija: fosfatni pufer s pH = 6,8.

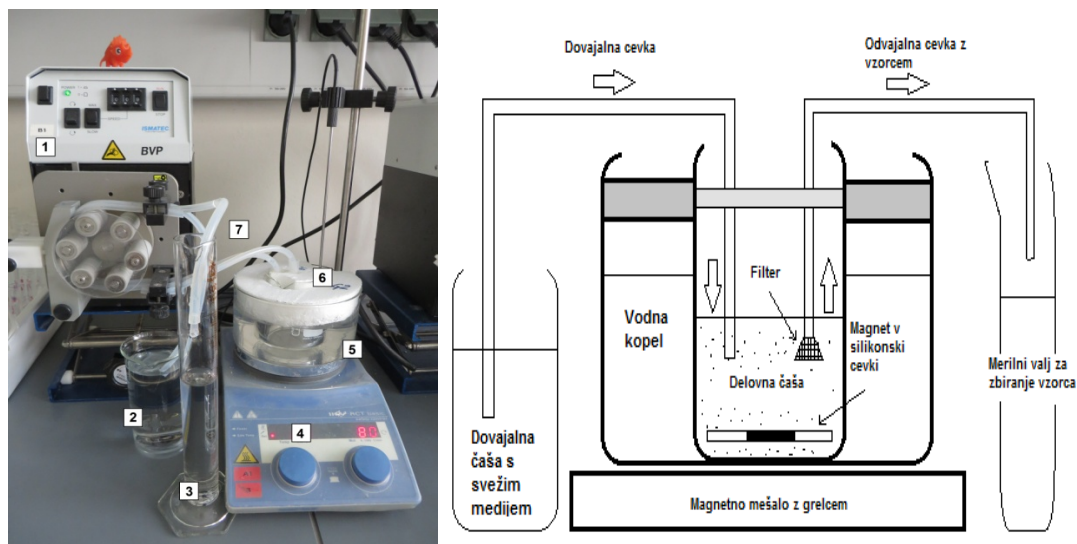
Preglednica VII: Seznam poskusov: končni pH profili - pH izhodnih kislih raztopin ter točne koncentracije raztopin HCl in Na₃PO₄, ki smo jih uporabili pri simuliranju pH profilov. Pomen oznak: P – 1: pH profil in zaporedna številka poskusa.

oznaka poskusa	pH izhodne kisle raztopine	koncentracija HCl (M)	koncentracija Na ₃ PO ₄ (M)
P – 1	1,1	0,1	0,61
P – 2	1,6	0,035	0,21
P – 3	2,1	0,01	0,055
P – 4	2,4	$4,5 \times 10^{-3}$	0,023
P – 5	2,8	$1,85 \times 10^{-3}$	0,01
P – 6	3,2	7×10^{-4}	4×10^{-3}

3.2.4 Testiranje sproščanja

Na pretočnem sistemu smo testirali sproščanje ZU iz gastrorezistentnih pelet. Teste smo izvajali sočasno na dveh pretočnih sistemih, PS1 in PS2.

Kot medije za sproščanje smo uporabili raztopino HCl za simulacijo želodčnega medija, raztopino Na₃PO₄ za hiter pH preskok, ki ponazarja prehod oblike iz želodca v dvanajstnik, in fosfatni pufer s pH = 6,8 za simulacijo črevesnega medija. Teste sproščanja smo izvajali pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja v kislem. Na Sliki 7 levo je fotografija pretočnega sistema za testiranje sproščanja, na desni je predstavljena shema pretočnega sistema.



Slika 7: Pretočni sistem za testiranje sproščanja, fotografija (levo) in shematični prikaz (desno): 1 – peristaltična črpalka, 2 – dovajalna čaša, 3 – merilni valj za zbiranje vzorca, 4 – grelec in magnetno mešalo, 5 – vodna kopel, 6 – delovna čaša, 7 – dovajalne in odvajalne cevke.

3.2.4.1 Priprava pretočnega sistema

Pred izvajanjem testov sproščanja smo preverili enakomernost delovanja rotorja obeh uporabljenih peristaltičnih črpalk (PS1 in PS2) in kontrolirali pretok. Slednje smo izvedli tako, da smo istočasno pognali peristaltično črpalko in štoparico ter v merilnem valju zbirali pretočeno destilirano vodo (npr: pri pretoku 3ml/min se je moralo v merilni valj v času 10 min pretočiti 30 ml vode). V kolikor je prišlo do odstopanj, smo s stiskanjem oziroma popuščanjem držal, s katerimi so bile cevke pritrjene na rotor, dosegli enakomeren pretok.

Pred vsakim testiranjem smo vodno kopel termostatirali na temperaturo $T = 36,5^{\circ}\text{C}$. Cevke smo predhodno sprali z destilirano vodo in jih osušili. Pred poskusom smo dovodno cevko napolnili z medijem, odvodna pa je bila prazna. Cevke smo pritrdili skozi odprtine v pokrovu delovne čaše. Preverili smo vrtenje magneta v silikonski cevki in preprečili morebitno zatikanje ob stene čaše.

3.2.4.2 Postopek testiranja sproščanja

150 ml delovno čašo smo napolnili s 40 ml simuliranega želodčnega medija (raztopina HCl). Delovno čašo smo postavili v vodno kopel in na grelec z magnetnim mešalom. Vodno kopel smo segreli do temperature $T = 36,5^{\circ}\text{C}$. V delovno čašo smo dali magnet v silikonski cevki, s katerim smo medij mešali pri hitrosti 80 obratov/minuto. Na peristaltični črpalki smo nastavili želeno hitrost pretoka. Pripravili smo tri dovajalne čaše s svežimi

mediji: najprej smo dovajali raztopino HCl, nato raztopino Na_3PO_4 in nazadnje fosfatni pufer s $\text{pH} = 6,8$. V dovajalno čašo z raztopino HCl smo potopili dovodno cevko, jo napolnili in nasprotni konec uvedli v delovno čašo. Prazno odvodno cevko smo potopili v medij v delovni čaši, nasprotni konec pa uvedli v merilni valj, kjer smo zbirali vzorce (Slika 7). Merilni valj smo predhodno napolnili z 0,1 M raztopino NaOH, s katero smo stabilizirali acidolabilno ZU. Količina 0,1 M NaOH v merilnem valju je bila odvisna od intervala vzorčenja in hitrosti pretoka. Na koncu enega vzorčenja je bilo volumsko razmerje 0,1 M NaOH in vzorca v merilnem valju vedno 1:1. V preglednici VIII je primer vzorčenja pri pretoku 3 ml/min in različnih intervalih vzorčenja.

Preglednica VIII: Vzorčenje pri pretoku 3 ml/min.

interval vzorčenja (min)	volumen 0,1 M NaOH v valju pred vzorčenjem (ml)	volumen vzorčne raztopine (0,1 M NaOH + vzorec) (ml)
0 - 5	15	30
0 - 10	30	60
0 - 20	60	120

Po pregledu vseh komponent pretočnega sistema smo zagnali peristaltično črpalko in istočasno z rokavicami v delovno čašo spustili orodisperzibilno tableto. Čas poskusa smo merili od trenutka, ko je prva kapljica iz odvodne cevke kanila v merilni valj. Pred tem je bila FO nekaj časa že izpostavljena raztopini v delovni čaši, npr. pri pretoku 2 ml/min je prva kapljica v merilni valj pritekla po 2,5 min. Časovni zamik smo upoštevali pri menjavi medijev.

Po določenem času, glede na čas zadrževanja v kislem in hitrost pretoka, smo zamenjali dovajalno čašo s kislim medijem in začeli dovajati raztopino Na_3PO_4 . Menjavo smo izvedli kolikor hitro je bilo mogoče. Uvedli smo 4 ml fosfata, čas dovajanja pa je bil odvisen od hitrosti pretoka. Nazadnje smo dovajano čašo s Na_3PO_4 zamenjali s čašo s fosfatnim pufrom s $\text{pH} = 6,8$, ki smo ga dovajali do konca poskusa.

Sproščanje smo testirali pri pretoku 2, 3, 4 in 6 ml/min, v kislem pa smo zadrževali 10, 30, 60 in 120 min. V preglednici IX so navedeni časi menjave medijev pri posameznem pretoku in pri času zadrževanja v kislem 10 min (pri časih zadrževanja 30, 60 in 120 min smo v zadnjih 10 min zadrževanja v kislem upoštevali isti postopek menjave).

Vzorčenje in analiza: v merilnem valju smo s črpanjem preko odvodne cevke zbirali vzorec. Po končanem vzorčenju smo vsebino merilnega valja prelili v čašo, premešali in prefiltrirali v epruveto. Uporabili smo filtre z velikostjo por 45 μm . Iz epruvete smo v vialo

odpipetirali 1 ml vzorca in koncentracijo sproščene učinkovine določili z analizno metodo HPLC.

Preglednica IX: Čas menjave in dovajanja medijev pri različnih pretokih in času zadrževanja v kislem 10 min.

pretok: 2 ml/min, čas zadrževanja v kislem 10 min				pretok: 3 ml/min, čas zadrževanja v kislem 10 min			
čas poskusa	dogajanje v delovni čaši	dovajalni medij	dogajanje v merilnem valju	čas poskusa	dogajanje v delovni čaši	dovajalni medij	dogajanje v merilnem valju
zažene peristaltično črpalko, -2 min 30 sek	FO damo v delovno čašo	kisel medij	v merilnem valju je 20 ml 0,1 M NaOH	zažene peristaltično črpalko, - 2 min	FO damo v delovno čašo	kisel medij	v merilnem valju je 30 ml 0,1 M NaOH
začetek poskusa, 0 min	kisel medij priteka v delovno čašo	kisel medij	prva kapljica kapne v merilni valj	začetek poskusa, 0 min	kisel medij priteka v delovno čašo	kisel medij	prva kapljica kapne v merilni valj
5 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo Na ₃ PO ₄ čas dovajanja: 2 min	zbiramo vzorec, v valju je 30 ml vzorca (20 ml NaOH + 10 ml iz delovne čaše)	6 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo Na ₃ PO ₄ čas dovajanja: 1 min 20 sek	zbiramo vzorec, v valju je 48 ml vzorca
7 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 34 ml vzorca	7 min 20 sek	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 52 ml vzorca
7 min 30 sek	prva kapljica Na ₃ PO ₄ priteče v delovno čašo	fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 35 ml vzorca	8 min	prva kapljica Na ₃ PO ₄ priteče v delovno čašo	fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 54 ml vzorca
10 min	v delovno čašo priteka fosfatni puffer	fosfatni puffer pH = 6,8	v merilnem valju je 40 ml vzorca	10 min	v delovno čašo priteka fosfatni puffer	fosfatni puffer pH = 6,8	v merilnem valju je 60 ml vzorca
pretok: 4 ml/min, čas zadrževanja v kislem 10 min				pretok: 6 ml/min, čas zadrževanja v kislem 10 min			
čas poskusa	dogajanje v delovni čaši	dovajalni medij	dogajanje v merilnem valju	čas poskusa	dogajanje v delovni čaši	dovajalni medij	dogajanje v merilnem valju
zažene peristaltično črpalko, -1 min 30 sek	FO damo v delovno čašo	kisel medij	v merilnem valju je 40 ml 0,1 M NaOH	zažene peristaltično črpalko, -1 min	FO damo v delovno čašo	kisel medij	v merilnem valju je 60 ml 0,1 M NaOH
začetek poskusa, 0 min	kisel medij priteka v delovno čašo	kisel medij	prva kapljica kapne v merilni valj	začetek poskusa, 0 min	kisel medij priteka v delovno čašo	kisel medij	prva kapljica kapne v merilni valj
7 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo Na ₃ PO ₄ čas dovajanja: 1 min	zbiramo vzorec, v valju je 68 ml vzorca	8 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo Na ₃ PO ₄ čas dovajanja: 40 sek	zbiramo vzorec, v valju je 108 ml vzorca
8 min	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 72 ml vzorca	8 min 40 sek	kisel medij priteka v delovno čašo	menjava medijev: dovajamo fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 112 ml vzorca
8 min 30 sek	prva kapljica Na ₃ PO ₄ priteče v delovno čašo	fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je prib. 73 ml vzorca	9 min	prva kapljica Na ₃ PO ₄ priteče v delovno čašo	fosfatni puffer pH = 6,8	zbiramo vzorec, v valju je 114 ml vzorca
10 min	v delovno čašo priteka fosfatni puffer	fosfatni puffer pH = 6,8	v merilnem valju je 80 ml vzorca	10 min	v delovno čašo priteka fosfatni puffer	fosfatni puffer pH = 6,8	v merilnem valju je 120 ml vzorca

3.2.4.3 Preliminarni testi sproščanja

Vpliv pH simuliranega črevesnega medija na sproščanje učinkovine

S preliminarnim poskusom smo poskušali ugotoviti ali sprememba pH fosfatnega pufru, s katerim simuliramo črevesni medij, vpliva na količino sproščene ZU iz gastrorezistentnih pelet. Izvedli smo osem poskusov, 4 paralele za vsak pH fosfatnega pufru. Pogoji izvedbe:

- ❖ pretok 2 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 60 min, hitrost mešanja: 80 obratov/minuto, Oblika B,
- ❖ uporabljeni mediji:
 - PT - 1: 0,01 M HCl, 0,2 M Na₃PO₄* in fosfatni pufer s pH = 6,8,
 - PT - 2: 0,01 M HCl, 0,2 M Na₃PO₄* in fosfatni pufer s pH = 6,5.

*upoštevali smo koncentracijo Na₃PO₄ iz predhodnih študij na fakulteti (20)

Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje učinkovine

S preliminarnim poskusom smo želeli ugotoviti, kako poteka sproščanje, če teste izvajamo z različnimi izhodnimi kislimi raztopinami in kakšen je vpliv. Z vsakim kislim medijem smo izvedli 2 paralele. Pogoji izvedbe:

- ❖ pretok 2 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 60 min, hitrost mešanja 80 obratov/minuto, Oblika B,
- ❖ uporabljeni mediji:
 - PT - 3: 0,01 M HCl, 0,055 M Na₃PO₄ in fosfatni pufer s pH = 6,8,
 - PT - 4: 0,1 M HCl, 0,61 M Na₃PO₄ in fosfatni pufer s pH = 6,8,
 - PT - 5: 1,85x10⁻³ M HCl, 0,01 M Na₃PO₄ fosfatni pufer s pH = 6,8.

V preglednici X so navedeni preliminarni testi sproščanja.

Preglednica X: Seznam preliminarних testov sproščanja. Pomen oznak in okrajšav: PT - 1: preliminarni test in zaporedna številka poskusa, PS1 – pretočni sistem 1.

oznaka poskusa	pretočni sistem	namen poskusa	koncentracija HCl (M)	koncentracija Na ₃ PO ₄ (M)	fosfatni pufer, pH	število paralel
PT - 1	PS1, PS2	vpliv pH simuliranega črevesnega medija na sproščanje	0,01 M	0,2 M	6,8	4
PT - 2	PS1, PS2		0,01 M	0,2 M	6,5	4
PT - 3*	PS1, PS2	vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje	0,01 M	0,055 M	6,8	2
PT - 4	PS1, PS2		0,1M	0,61 M	6,8	2
PT - 5	PS1, PS2		1,85x10 ⁻³ M	0,01 M	6,8	2

***Op.: poskus označen z * smo izvedli kot preliminarni poskus, vendar smo ga upoštevali pri končni obravnavi vpliva pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje.**

3.2.4.4 Končna izvedba

Izvedli smo več testov pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja v kislem ter primerjali sproščanje iz Oblike A in B. Uporabljeni mediji in pogoji:

- 0,01 M HCl, 0,055 M Na₃PO₄ in fosfatni pufer s pH = 6,8,
- pogoji: hitrost mešanja z magnetom v silikonski cevki: 80 obratov/minuto in temperatura vodne kopeli T = 36,5°C.

❖ Vpliv pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje

S testi sproščanja pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv teh parametrov na sproščanje. Pogoji izvedbe:

- Oblika B,
- pretoki: 2, 3, 4 in 6 ml/min,
- časi zadrževanja v kislem: 10, 60, 120 min.

❖ Primerjava sproščanja iz Oblike A in B

S testi sproščanja iz Oblik A in B pri različnih pretokih in času izpostavljenosti kislemu mediju 60 min smo ugotavljali, kako se obliki tedaj obnašata in kakšno je sproščanje ZU.

Pogoji izvedbe:

- Obliki A in B,
- pretoki: 3 in 4 ml/min,
- čas zadrževanja v kislem: 60 min.

Sproščanje iz Oblik A in B smo primerjali tudi s testi izvedenimi z različnimi časi zadrževanja v kislem in pri pretoku 3 ml/min. Dobljene profile sproščanja smo uporabili za izračun povprečnih oteženih profilov sproščanja, s katerimi smo poskušali napovedati *in vivo* profile sproščanja. Pogoji izvedbe:

- Obliki A in B,
- pretok: 3 ml/min,
- čas zadrževanja v kislem: 10, 30, 60 in 120 min.

V preglednici XI je naveden seznam testov sproščanja.

Preglednica XI: Seznam testov sproščanja. Pomen oznak in okrajšav: TS - 1: test sproščanja in številčna oznaka poskusa, PS1 – pretočni sistem 1

oznaka poskusa	pretočni sistem	namen poskusa	oblika	pretok (ml/min)	čas zadrževanja v kislem (min)	število paralel
TS - 1	PS1, PS2	vpliv pretoka in časa zadrževanja na sproščanje	B	2	10	2
TS - 2 (PT - 3)	PS1, PS2		B	2	60	2
TS - 3	PS1, PS2		B	2	120	2
TS - 4	PS1, PS2		B	3	10	2
TS - 5	PS1, PS2		B	3	60	2
TS - 6	PS1, PS2		B	3	120	2
TS - 7	PS1, PS2		B	4	10	2
TS - 8	PS1, PS2		B	4	60	2
TS - 9	PS1, PS2		B	4	120	2
TS - 10	PS1, PS2		B	6	60	2
TS - 11	PS1, PS2	primerjava Oblike A in B pri različnih pretokih	A	3	60	2
TS - 12	PS1, PS2		A	4	60	2
TS - 13	PS2	primerjava Oblike A in B pri različnih časih zadrževanja	B	3	30	1
TS - 14	PS1, PS2		A	3	10	2
TS - 15	PS1		A	3	30	1
TS - 16	PS1, PS2		A	3	120	2

3.3 Izračuni

❖ Izračun sproščene ZU

Na osnovi enačbe umeritvene premice (enačba 3, 4) in površin pod kromatografskim vrhom določenih s HPLC smo izračunali koncentracijo sproščene ZU:

$$AUC = k \cdot c + n \quad (3)$$

$$c = \frac{(AUC - n)}{k} \quad (4)$$

Maso sproščene ZU ob določenem času t smo izračunali s pomočjo enačbe 5 in sicer tako, da smo koncentracijo ZU množili z volumnom vzorca.

$$m_{\text{spr.ZU}} = c_{\text{spr.ZU}} \cdot V_{\text{vz}} \quad (5)$$

S seštevanjem mas ob času t smo izračunali kumulativno maso sproščene ZU (enačba 6).

$$m_{\text{kum}} = m_{1 \text{ spr.ZU}} + m_{2 \text{ spr.ZU}} + m_{3 \text{ spr.ZU}} \dots + m_{n \text{ spr.ZU}} \quad (6)$$

Nazadnje smo glede na deklarirano vsebnost ZU v FO (D = 30 mg) izračunali še odstotek sproščene učinkovine (enačba 8).

$$\%_{\text{spr.ZU}} = \left(\frac{m_{\text{kum}}}{D} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

V enačbah 3 - 7 smo uporabili naslednje simbole:

- AUC – površina pod kromatografskim vrhom [mAU·s]
- k – naklon umeritvene premice [mAU·s/l/mg]

- n – presečišče umeritvene premice z ordinatno osjo [mAU·s]
- c – koncentracija [mg/l]
- $c_{\text{spr.ZU}}$ – koncentracija ZU v vzorcu ob času t [mg/l]
- $m_{\text{spr.ZU}}$ – masa ZU v vzorcu ob času t [mg]
- V_{vz} – volumen vzorca [l]
- m_{kum} – kumulativna masa sproščene ZU [mg]
- $\%_{\text{spr.ZU}}$ – odstotek sproščene ZU od določenem času glede na deklarirano vsebnost
- D – masa ZU [30mg]

❖ Podaljšani profili sproščanja in izračun povprečnega oteženega profila sproščanja

Sproščanje smo izvajali pri različnih časih zadrževanja v kislem, zato so bili končni časi poskusov različni. Za lažjo obravnavo in izračun oteženih profilov smo profile sproščanja z linearno ekstrapolacijo podaljšali na čas najdaljšega poskusa. V primeru, da so bili pri zadnjih štirih vzorčenjih odstotki sproščene ZU enaki, smo zadnjo vrednost upoštevali kot ekstrapoliran odstotek sproščene ZU.

Oteženi profil sproščanja smo izračunali na podlagi matematičnega modela, ki opisuje povprečno praznjenje pelet iz želodca (enačba 9) (21):

$$GE_t = 100 \cdot e^{-(t(\text{min})/61,9)^{0,895}} \quad (8)$$

Časovne intervale praznjenja pelet smo določili glede na čase zadrževanja v kislem, ki so predstavljali sredino intervala. Frakcije pelet, ki zapustijo želodec, smo računali kot razliko začetnega in končnega deleža pelet v posameznem časovnem intervalu:

$$f(\%) = GE_{\text{začetni čas}} - GE_{\text{končni čas}} \quad (9)$$

V preglednici XII so navedeni časi zadrževanja v kislem, časovni intervale praznjenja pelet glede na čase zadrževanja in deleži pelet, ki se v posameznem časovnem intervalu izpraznijo iz želodca.

Preglednica XII: Časi zadrževanja v kislem, časovni intervale praznjenja pelet in izračunani deleži pelet, ki v posameznem intervalu zapustijo želodec

Čas zadrževanja v kislem, sredina časovnega intervala (min)	Časovni interval (min)	Delež pelet (%), ki zapusti želodec v časovnem intervalu
10	0 -20	30,50
30	20-40	18,66
60	40-80	22,42
120	80-160	28,42 (všet je delež pelet, ki zapustijo želodec po 160 min)

Izračun oteženega profila sproščanja:

$$\% \text{ oteženi prof.spr.} = \%_{\text{spr.ZU}} \cdot \left(\frac{f(\%)}{100} \right) \quad (10)$$

Profile sproščanja smo pomnožili s frakcijo pelet, ki zapustijo želodec v posameznem časovnem intervalu, in dobili otežene profile sproščanja za različne čase zadrževanja v kislem. Nato smo seštelili otežene deleže sproščene ZU istih časovnih točk vseh poskusov ter izračunali povprečni oteženi profil:

$$\% \text{ povprečni oteženi prof.spr.} = \%_{10} \text{ oteženi prof.spr.} + \%_{30} \text{ oteženi prof.spr. čas točka} + \%_{60} \text{ oteženi prof.spr.} + \%_{120} \text{ oteženi prof.spr.} \quad (11)$$

V enačbah 8 - 11 smo uporabili naslednje simbole:

- GE_t – delež pelet v želodcu ob času t [%]
- $GE_{\text{začetni čas}}$ – delež pelet ob začetnem času intervala v želodcu [%]
- $GE_{\text{končni čas}}$ – delež pelet ob končnem času intervala v želodcu [%]
- f (%) – frakcija pelet, ki v časovnem intervalu zapusti želodec [%]
- $\%_{\text{oteženi prof.spr.}}$ – otežen delež sproščene ZU ob času t [%]
- $\%_{\text{spr.ZU}}$ – delež sproščene ZU ob času t [mg/l]
- $\%_{10} \text{ oteženi prof.spr.}$ – otežen profil sproščanja v časovni točki pri določenem času zadrževanja v kislem, 10 – 10 min zadrževanja v kislem [%]
- $\% \text{ povprečni oteženi prof.spr.}$ – povprečen otežen profil sproščanja [%]

4 REZULTATI

4.1 Določitev enačbe umeritvenih premic

V preglednici XIII so predstavljene koncentracije standardnih raztopin in površine pod kromatografskimi vrhovi, določenimi s HPLC-metodo.

Preglednica XIII: Koncentracije standardnih raztopin in površine pod kromatografskim vrhom standardov ZU v 0,1 M NaOH in mediju za sproščanje fosfatnem pufru s pH = 6,8.

Umeritvena premica 1		Umeritvena premica 2	
c (mg/l)	AUC (mAU·s)	c (mg/l)	AUC (mAU·s)
0	0	0	0
1,081	23,5	1,028	14,8
4,925	66	6,02	75
10,81	133,41	10,28	128
19,7	282,5	24,08	298,6
43,24	540	41,12	514,52
59,1	757,9	60,2	747,1
84,48	1070,9	82,24	1021,7
98,5	1267,3	96,32	1191,5
91,7	1187,1	102,8	1281,4
146,72	1906,5	120,4	1496,3
183,4	2375,6	164,48	2038,6
		192,64	2337,2

Enačba umeritvene premice 1:

$$\text{AUC} = 12,916 \cdot c \text{ [mg/l]} + 0,4407$$
$$R^2 = 0,9998$$

Enačba umeritvene premice 2:

$$\text{AUC} = 12,268 \cdot c \text{ [mg/l]} + 6,4385$$
$$R^2 = 0,9997$$

4.2 Simulacija in določevanje pH profilov

4.2.1 Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov

V preglednicah XIV – XVI so predstavljeni rezultati preliminarne poskusov, s katerimi smo simulirali pH profile ter optimizirali pretočni sistem: optimizirali smo izvedbo poskusov z 80 ml čašo s pokrovom, določili hitrosti mešanja na OS in primerjali parametre in pH profile določene na OS oziroma STS. Pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.3.2.

❖ **Simulacija in določevanje pH profilov na OS v ožji, 80 ml čaši in optimizacija izvedbe**

Preglednica XIV: Preliminarni pH profili določeni brez pokrova na čaši (PP – 1), izvedba na OS.

PP - 1	pH		
t (min)	paralela 1	paralela 2	paralela 3
0	1.21	1.17	1.17
2	1.2	1.17	1.17
2.5	1.26	1.22	1.21
3	1.54	1.39	1.4
3.5	3.68	2	1.88
4	5.9	5.39	4.85
4.5	6.78	6.24	6.12
5	7.02	6.35	6.29
5.5	6.98	6.36	6.35
6	6.91	6.36	6.38
6.5	6.86	6.37	6.41
7	6.82	6.37	6.43
7,5	6.79	6.38	6.45
8	6.74	6.39	6.48
8.5	6.72	6.41	6.52
9	6.7	6.43	6.54
9.5	6.67	6.45	6.56
10	6.63	6.47	6.58
10.5	6.6	6.49	6.61
15.5	6.61	6.65	6.72
20.5	6.78	6.74	6.7
25.5	6.8	6.72	6.7
30.5	6.8	6.71	6.7
pH meter umerjen na pH = 7	6.78	6.82	6.81

❖ **Hitrost mešanja na OS**

Preglednica XV: Preliminarni pH profili za izbor hitrosti mešanja na OS. Hitrost mešanja 100 obratov/minuto: PP – 3, 140 obratov/minuto: PP – 4.

preliminarni poskusi določanja pH profilov	PP - 3	PP - 4
t (min)	pH	
0	1.15	1.13
2	1.16	1.13
2.5	1.72	1.22
3	2.77	1.49
3.5	4.46	2.72
4	7.07	6.14
4.5	7.45	6.63
5	7.63	6.74
5.5	7.75	6.76

❖ Primerjava parametrov in pH profilov določenih na STS in OS

Preglednica XVI: Preliminarni pH profili določeni pri različnih hitrostih mešanja na STS. Hitrost mešanja 80 obratov/minuto: PP - 5, 100 obratov/minuto: PP - 6, 150 obratov/minuto: PP - 7.

preliminarni poskusi določanja pH profilov	PP - 5	PP - 6	PP - 7
t (min)	pH		
0	1.46	1.44	1.41
2	1.46	1.44	1.41
2.5	1.46	1.55	1.54
3	1.54	1.81	1.86
3.5	1.81	2.76	2.74
4	4.85	6.33	6.32
4.5	6.5	6.54	6.5
5	6.6	6.61	6.57
5.5	6.65	6.66	6.62
6	6.7	6.7	6.67
6.5	6.73	6.74	6.69
7	6.76	6.76	6.72
7.5	6.78	6.78	6.75
8	6.8	6.79	6.75
8.5	6.81	6.82	6.78
9	6.83	6.84	6.79
9.5	6.85	6.85	6.8
10	6.85	6.86	6.81
10.5	6.86	6.86	6.82
15.5	6.89	6.89	6.85
20.5	6.89	6.88	6.84
25.5	6.89	6.87	6.82
30.5	6.87	6.84	6.82
pH meter umerjen na pH = 7	6.84	6.82	6.85

4.2.2 Določitev točne koncentracije Na₃PO₄ in preliminarni pH profili

V preglednici XVII so navedeni rezultati preliminarnih pH profilov z izhodno kislom raztopino s pH = 1,6 (0,035 M HCl), s katerimi smo določili točno koncentracijo raztopine Na₃PO₄, ki jo dodamo za hiter dvig pH. Pogoji so navedeni pod točko 3.2.3.3.

Preglednica XVII: Preliminarni pH profili za določitev točne koncentracije Na₃PO₄, izvedba na OS. Koncentracija Na₃PO₄: 0,02 M (PP - 8), 0,021 M (PP - 9), 0,022 M (PP - 10), 0,025 M (PP - 11).

preliminarni poskusi določanja pH profilov	PP - 8	PP - 9	PP - 10	PP - 11
t (min)	pH			
0	1.63	1.61	1.61	1.61
2	1.63	1.61	1.61	1.6
2.5	1.66	1.63	1.65	1.62
3	1.78	1.76	1.81	1.78
3.5	2.04	2.11	2.4	2.34
4	4.41	4.37	5.54	5.73
4.5	6.28	6.3	6.49	6.63
5	6.54	6.57	6.66	6.95
5.5	6.6	6.65	6.72	7.04
6	6.65	6.71	6.73	7.04
6.5	6.68	6.76	6.74	7.02
7	6.71	6.8	6.74	7
7.5	6.7	6.82	6.77	7
8	6.71	6.85	6.78	7.01
8.5	6.73	6.88	6.8	7.02
9	/	6.89	6.81	7.03
9.5	/	6.89	6.83	7.04
10	/	6.89	6.86	7.04
10.5	6.84	6.89	6.9	/

4.2.3 Končna izvedba

V preglednici XVIII so navedeni pH profili z izhodnimi kislimi raztopinami s pH = 1,1 (P - 1), 1,6 (P - 2), 2,1 (P - 3), 2,4 (P - 4), 2,8 (P - 5) in 3,2 (P - 6). Za vsak pH smo izvedli po tri paralele in izračunali povprečje, pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.3.4.

Preglednica XVIII: Končni pH profili, izvedba na OS, v oklepaju je podan izhodni pH

t (min)	P – 1 (pH = 1,1)				P – 2 (pH = 1,6)				P – 3 (pH = 2,1)			
	pH											
	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje
0	1,17	1,18	1,2	1,18	1,61	1,58	1,6	1,6	2,08	2,11	2,1	2,1
2	1,17	1,18	1,2	1,18	1,6	1,59	1,59	1,59	2,08	2,11	2,11	2,1
2,5	1,27	1,5	1,34	1,37	1,64	1,63	1,64	1,64	2,17	2,15	2,15	2,16
3	1,68	2,51	1,73	1,97	1,8	1,85	1,81	1,82	2,33	2,31	2,35	2,33
3,5	4,1	4,03	3,8	3,98	2,32	2,38	2,27	2,32	2,66	2,65	2,76	2,69
4	6,57	6,7	6,55	6,61	5,88	5,69	5,5	5,69	4,36	4,48	4,51	4,45
4,5	6,74	6,83	6,8	6,79	6,82	6,83	6,76	6,8	6,59	6,3	6,74	6,54
5	6,8	6,82	6,83	6,82	6,88	6,94	6,9	6,91	6,77	6,76	6,82	6,78
5,5	6,82	6,81	6,84	6,82	6,88	6,94	6,9	6,91	6,79	6,85	6,84	6,83
6	6,83	6,81	6,81	6,82	6,87	6,93	6,89	6,9	6,8	6,86	6,84	6,83
6,5	6,83	6,81	6,8	6,81	6,86	6,92	6,89	6,89	6,81	6,86	6,84	6,84
7	6,83	6,81	6,8	6,81	6,86	6,91	6,88	6,88	6,81	6,85	6,83	6,83
7,5	6,83	6,81	6,81	6,82	6,85	6,9	6,87	6,87	6,81	6,85	6,83	6,83
8	6,82	6,82	6,82	6,82	6,85	6,9	6,87	6,87	6,81	6,85	6,82	6,83
8,5	6,82	6,83	6,83	6,83	6,84	6,89	6,86	6,86	6,81	6,85	6,82	6,83
9	6,82	6,84	6,84	6,83	6,84	6,88	6,85	6,86	6,8	6,85	6,81	6,82
9,5	6,81	6,84	6,85	6,83	6,83	6,88	6,85	6,85	6,79	6,84	6,81	6,81
10	6,81	6,85	6,85	6,84	6,82	6,87	6,84	6,84	6,79	6,84	6,81	6,81
10,5	6,81	6,86	6,86	6,84	6,82	6,87	6,84	6,84	6,79	6,84	6,81	6,81
15,5	6,79	6,86	6,86	6,84	6,79	6,83	6,8	6,81	6,78	6,81	6,78	6,79
20,5	6,78	6,85	6,85	6,83	6,77	6,8	6,77	6,78	6,76	6,8	6,77	6,78
25,5	6,77	6,82	6,84	6,81	6,76	6,79	6,76	6,77	6,75	6,79	6,75	6,76
30,5	6,77	6,81	6,83	6,8	6,75	6,77	6,75	6,76	6,75	6,78	6,75	6,76
pH meter umerjen na pH = 7	6,83	6,84	6,81	6,83	6,79	6,8	6,81	6,8	6,8	6,8	6,79	6,8
t (min)	P – 4 (pH = 2,4)				P – 5 (pH = 2,8)				P – 6 (pH = 3,2)			
	pH											
	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje	paralela 1	paralela 2	paralela 3	povprečje
0	2,46	2,48	2,5	2,48	2,84	2,84	2,84	2,84	3,2	3,24	3,22	3,22
2	2,46	2,58	2,5	2,51	2,84	2,84	2,83	2,84	3,21	3,24	3,22	3,22
2,5	2,5	2,51	2,54	2,52	2,89	2,91	2,87	2,89	3,26	3,38	3,25	3,3
3	2,64	2,65	2,66	2,65	3,02	3,04	3,02	3,03	3,38	3,4	3,41	3,4
3,5	2,89	2,88	2,9	2,89	3,3	3,25	3,24	3,26	3,68	3,66	3,68	3,67
4	3,5	3,31	3,38	3,4	3,42	4,32	3,55	3,76	5,11	4,28	4,46	4,62
4,5	6,3	6,16	6,22	6,23	6,35	6,29	5,84	6,16	6,71	6,5	6,82	6,68
5	6,68	6,61	6,62	6,64	6,91	6,71	6,6	6,74	6,83	6,8	6,95	6,86
5,5	6,79	6,74	6,76	6,76	6,93	6,81	6,74	6,83	6,84	6,84	6,94	6,87
6	6,83	6,8	6,81	6,81	6,92	6,85	6,81	6,86	6,83	6,84	6,94	6,87
6,5	6,84	6,82	6,85	6,84	6,92	6,87	6,82	6,87	6,82	6,84	6,93	6,86
7	6,85	6,84	6,86	6,85	6,92	6,87	6,84	6,88	6,82	6,84	6,92	6,86
7,5	6,85	6,85	6,87	6,86	6,91	6,87	6,84	6,87	6,81	6,84	6,91	6,85
8	6,85	6,85	6,87	6,86	6,9	6,87	6,84	6,87	6,8	6,83	6,9	6,84
8,5	6,85	6,85	6,87	6,86	6,89	6,87	6,84	6,87	6,79	6,82	6,9	6,84
9	6,85	6,85	6,87	6,86	6,88	6,86	6,84	6,86	6,79	6,82	6,89	6,83
9,5	6,84	6,84	6,87	6,85	6,88	6,86	6,84	6,86	6,78	6,81	6,88	6,82
10	6,84	6,84	6,87	6,85	6,87	6,85	6,83	6,85	6,78	6,81	6,88	6,82
10,5	6,84	6,84	6,87	6,85	6,87	6,85	6,83	6,85	6,77	6,81	6,87	6,82
15,5	6,81	6,82	6,85	6,83	6,84	6,82	6,8	6,82	6,77	6,79	6,85	6,8
20,5	6,79	6,81	6,83	6,81	6,81	6,8	6,79	6,8	6,76	6,78	6,82	6,79
25,5	6,78	6,79	6,82	6,8	6,8	6,78	6,77	6,78	6,76	6,77	6,8	6,78
30,5	6,78	6,78	6,81	6,79	6,79	6,77	6,76	6,77	6,75	6,76	6,78	6,76
pH meter umerjen na pH = 7	6,77	/	6,77	6,77	6,82	6,82	6,81	6,82	6,78	6,77	6,75	6,77

4.3 Testiranje sproščanja

4.3.1 Preliminarni testi sproščanja

❖ Vpliv pH simuliranega črevesnega medija na sproščanje učinkovine

V preglednicah XIX in XX so navedeni rezultati preliminarnih testov sproščanja, s katerimi smo ugotavljali vpliv pH simuliranega črevesnega medija na sproščanje ZU. Kot črevesni medij smo uporabili fosfatni pufer s pH = 6,8 oziroma pH = 6,5. Pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.4.3.

Senčene celice in dvojna črta v vseh preglednicah z rezultati testov sproščanja predstavljajo čas zadrževanja v kislem. V preglednicah so predstavljeni % sproščene ZU posameznih paralel, povprečje paralel in standardna deviacija (SD).

Preglednica XIX: Preliminarni testi sproščanja, vpliv simuliranega črevesnega medija na sproščanje: uporaba fosfatnega pufera s pH = 6,8 (PT – 1).

PT - 1 t (min)	% sproščene ZU					
	paralela 1, PS1	paralela 2, PS2	paralela 3, PS1	paralela 4, PS2	povprečje	SD
0	0	0	0	0	0	0
20	0,18	0,25	0,22	0,19	0,21	0,03
40	0,44	0,43	0,47	0,42	0,44	0,02
60	0,69	0,58	0,7	0,62	0,65	0,06
80	40,89	33,2	37,95	36,64	37,17	3,19
100	69,58	58,46	63,01	63,41	63,62	4,57
120	81,03	70,94	73,92	74,65	75,14	4,24
140	87,07	76,98	84,43	79,65	82,03	4,56
160	88,81	79,05	86,63	81,96	84,11	4,42
180	89,58	80,51	87,56	84,18	85,49	3,98
200	90,03	81,62	87,96	84,93	86,14	3,67
220	90,24	82,55	88,15	85,51	86,61	3,33
240	90,39	83,12	88,24	85,87	86,91	3,13

Preglednica XX: Preliminarni testi sproščanja, vpliv simuliranega črevesnega medija na sproščanje: uporaba fosfatnega pufera s pH = 6,5 (PT – 2).

PT - 2 t(min)	% sproščene ZU					
	paralela 1, PS1	paralela 2, PS2	paralela 3, PS1	paralela 4, PS2	povprečje	SD
0	0	0	0	0	0	0
20	0,18	0,23	0,21	0,12	0,19	0,05
40	0,35	0,45	0,44	0,36	0,40	0,05
60	0,59	0,68	0,67	0,59	0,63	0,05
80	42,75	24,97	36,6	39,03	35,84	7,67
100	68,36	65,37	60,81	63,93	64,62	3,14
120	79,22	77,45	69,36	75,67	75,42	4,3
140	83,78	83,2	73,59	79,33	79,97	4,69
160	88,05	85,37	77,13	80,99	82,89	4,82
180	89	86,49	77,89	81,81	83,79	4,94
200	89,48	87,02	78,25	82,23	84,25	5,01
220	89,77	87,35	78,46	82,54	84,53	5,04
240	89,98	87,82	78,64	82,7	84,78	5,11

❖ Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje učinkovine

V preglednici XXI so navedeni rezultati preliminarnih testov sproščanja, s katerimi smo ugotavljali vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje učinkovine. Sproščanje smo izvajali z izhodnimi kislimi raztopinami z 0,1 M, 0,01 M in $1,85 \times 10^{-3}$ M HCl. Pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.4.3.

Preglednica XXI: Preliminarni testi sproščanja, vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje: uporaba različnih kislih medijev z 0,01 M HCl (PT-3), 0,1 M HCl (PT-4) in $1,85 \times 10^{-3}$ M HCl (PT-5).

% sproščene ZU												
t (min)	PT - 3 (TS - 2)				PT - 4				PT - 5			
	paralela 1, PS1	paralela 2, PS2	povprečje	SD	paralela 1, PS1	paralela 2, PS2	povprečje	SD	paralela 1, PS1	paralela 2, PS2	povprečje	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,11	0,18	0,14	0,05	0,00	0,03	0,01	0,02	0,23	0,30	0,27	0,05
40	0,28	0,43	0,36	0,11	0,05	0,07	0,06	0,02	0,48	0,59	0,54	0,08
60	0,44	0,62	0,53	0,13	0,11	0,12	0,11	0,01	0,65	0,78	0,72	0,09
80	23,40	29,82	26,61	4,54	41,16	44,76	42,96	2,55	27,01	25,22	26,12	1,27
100	53,15	59,77	56,46	4,68	69,12	73,98	71,55	3,44	59,32	59,49	59,40	0,12
120	64,59	70,66	67,63	4,29	79,75	84,84	82,30	3,60	71,01	73,48	72,25	1,75
140	69,11	74,85	71,98	4,06	83,97	89,09	86,53	3,62	75,56	78,86	77,21	2,33
160	71,85	76,49	74,17	3,28	85,83	91,21	88,52	3,80	77,39	81,12	79,25	2,64
180	72,70	77,21	74,95	3,19	87,32	92,13	89,73	3,40	78,23	82,68	80,45	3,14
200	73,27	77,57	75,42	3,04	87,88	92,66	90,27	3,38	78,60	83,32	80,96	3,34
220	73,50	77,81	75,66	3,04	88,21	93,04	90,63	3,41	78,87	83,61	81,24	3,35
240	73,77	77,92	75,85	2,94	88,60	93,26	90,93	3,30	79,06	83,89	81,48	3,41

4.3.2 Vpliv pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje

V preglednicah XXII – XXV so navedeni rezultati testov sproščanja, ki smo jih izvajali pri hitrostih pretoka 2, 3, 4 in 6 ml/min in časih zadrževanja v kislem 10, 60 in 120 min. Uporabili smo Obliko B, ostali pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.4.4.

Preglednica XXII: Testi sproščanja, pretok: 2 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 10 min (TS – 1) in 120 min (TS – 3), Oblika B.

TS - 1		% sproščene ZU				TS - 3		% sproščene ZU			
t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	0,02	0,02	0,02	0	30	0,31	0,3	0,3	0,01		
10	0,08	0,06	0,07	0,01	60	0,59	0,61	0,6	0,02		
15	0,32	0,22	0,27	0,07	90	0,87	0,84	0,86	0,02		
20	0,83	0,6	0,71	0,16	120	1,55	1,26	1,4	0,21		
30	16,09	16,21	16,15	0,08	130	12,72	14,45	13,58	1,22		
40	42,78	43,61	43,19	0,59	140	34,05	34,98	34,51	0,66		
50	59,08	61,49	60,29	1,71	150	46,9	48,04	47,47	0,8		
60	69,32	72,22	70,77	2,05	160	55,49	56,59	56,04	0,78		
70	75,81	78,92	77,37	2,2	170	60,71	62,2	61,45	1,05		
80	79,73	83,1	81,41	2,38	180	63,95	65,48	64,71	1,08		
90	82,17	85,76	83,96	2,54	190	66	67,64	66,82	1,16		
100	83,72	87,41	85,57	2,61	200	67,29	69,04	68,17	1,24		
120	85,54	89,34	87,44	2,68	210	68,11	69,95	69,03	1,3		
140	86,47	90,46	88,47	2,82	220	68,62	70,75	69,69	1,51		
160	87	91,81	89,4	3,4	240	69,17	71,46	70,32	1,62		
180	87,39	92,25	89,82	3,44	260	69,46	71,92	70,69	1,74		
					280	69,57	72,14	70,86	1,82		
					300	69,62	72,38	71	1,95		

Preglednica XXIII: Testi sproščanja, pretok: 3 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 10 min (TS – 4) , 60 min (TS – 5) in 120 min (TS – 6), Oblika B.

TS - 4		% sproščene ZU				TS - 5		% sproščene ZU				TS - 6		% sproščene ZU			
t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5	0	0	0	0	20	0,06	0,01	0,03	0,04	20	0,07	0,06	0,07	0,01			
10	0,05	0,06	0,05	0,01	40	0,22	0,13	0,17	0,06	40	0,21	0,19	0,2	0,01			
15	0,35	0,38	0,36	0,02	60	0,33	0,21	0,27	0,08	60	0,31	0,22	0,26	0,06			
20	1,12	1,07	1,09	0,03	65	0,51	0,36	0,43	0,11	80	0,39	0,22	0,3	0,12			
25	9,25	7,57	8,41	1,19	70	4,21	1,76	2,99	1,73	100	0,52	0,22	0,37	0,21			
30	34,94	30,14	32,54	3,4	75	25,39	17,61	21,5	5,5	120	0,89	0,48	0,68	0,29			
35	54,26	48,47	51,36	4,09	80	43,55	36,05	39,8	5,3	125	7,01	6,46	6,74	0,39			
40	68,15	61,78	64,96	4,5	85	56,64	50,05	53,34	4,66	130	26,28	25,22	25,75	0,75			
60	92,1	85,57	88,83	4,62	90	65,87	60,36	63,11	3,89	135	41,07	39,55	40,31	1,07			
80	98,17	91,7	94,93	4,57	100	76,52	73,46	74,99	2,17	140	51,46	49,63	50,55	1,29			
100	99,63	93,91	96,77	4,04	110	81,31	80,74	81,03	0,41	150	63,22	61,69	62,46	1,08			
120	100,05	94,42	97,23	3,98	120	83,79	84,13	83,96	0,24	160	68,86	67,3	68,08	1,11			
140	100,17	94,99	97,58	3,66	140	85,68	86,75	86,21	0,75	180	72,82	71,66	72,24	0,82			
160	100,24	94,99	97,62	3,71	160	86,15	87,9	87,03	1,24	200	73,82	72,92	73,37	0,63			
180	100,24	94,99	97,62	3,71	180	86,22	88,12	87,17	1,34	220	74,1	73,22	73,66	0,62			
					200	86,22	88,12	87,17	1,34	240	74,17	73,29	73,73	0,62			
					220	86,22	88,12	87,17	1,34	260	74,17	73,29	73,73	0,62			
					240	86,22	88,12	87,17	1,34	280	74,17	73,29	73,73	0,62			
										300	74,17	73,29	73,73	0,62			

Preglednica XXIV: Testi sproščanja, pretok: 4 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 10 min (TS – 7) , 60 min (TS – 8) in 120 min (TS – 9), Oblika B.

TS - 7					TS – 8					TS - 9				
% sproščene ZU					% sproščene ZU					% sproščene ZU				
t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	10	0,14	0,07	0,1	0,05	10	0	0,02	0,01	0,02
10	0,07	0,06	0,06	0,01	20	0,39	0,27	0,33	0,09	20	0,17	0,2	0,18	0,02
15	0,48	0,38	0,43	0,07	30	0,71	0,54	0,63	0,12	30	0,34	0,35	0,34	0,01
20	1,37	1,18	1,28	0,13	40	0,93	0,77	0,85	0,11	40	0,41	0,39	0,4	0,01
25	11,71	9,09	10,4	1,85	50	1,12	0,99	1,05	0,1	50	0,49	0,42	0,46	0,05
30	42,19	35,68	38,93	4,6	60	1,28	1,17	1,23	0,08	60	0,93	0,42	0,68	0,36
40	77,22	68,19	72,7	6,39	70	8,94	4,76	6,85	2,96	70	0,96	0,42	0,69	0,38
50	90,65	81,71	86,18	6,32	80	54,26	47,78	51,02	4,58	80	0,94	0,42	0,68	0,36
60	95,78	87,25	91,52	6,03	90	74,16	69,39	71,77	3,37	90	1	0,46	0,73	0,38
70	98,05	89,63	93,84	5,95	100	81,57	78,36	79,96	2,27	100	1,14	0,54	0,84	0,42
80	98,82	90,74	94,78	5,71	110	84,31	82	83,15	1,64	110	1,36	0,66	1,01	0,5
90	99,24	91,18	95,21	5,7	120	85,47	83,68	84,58	1,27	120	1,68	0,88	1,28	0,56
100	99,58	91,42	95,5	5,77	130	86,03	84,38	85,21	1,17	125	11,8	7,86	9,83	2,79
110	99,71	91,53	95,62	5,79	140	86,29	84,81	85,55	1,05	130	39,44	34,59	37,01	3,43
120	99,79	91,56	95,68	5,82	150	86,44	84,99	85,71	1,03	135	58,17	52,5	55,34	4,01
130	99,83	91,8	95,81	5,68	160	86,54	85,1	85,82	1,02	140	69,87	64,64	67,25	3,7
140	99,83	91,8	95,82	5,68	170	86,61	85,19	85,9	1	145	76,1	72,53	74,32	2,52
150	99,83	91,8	95,82	5,68	180	86,67	85,29	85,98	0,97	150	79,65	77,69	78,67	1,39
160	99,83	91,8	95,82	5,68	190	86,72	85,36	86,04	0,96	160	83,29	83,21	83,25	0,06
170	99,83	91,8	95,82	5,68	200	86,75	85,41	86,08	0,95	170	84,74	85,51	85,12	0,55
180	99,83	91,8	95,82	5,68	210	86,78	85,45	86,12	0,94	180	85,34	86,5	85,92	0,82
					220	86,81	85,48	86,15	0,94	190	85,59	86,89	86,24	0,92
					230	86,83	85,51	86,17	0,93	200	85,71	87,03	86,37	0,93
					240	86,87	85,53	86,2	0,94	210	85,75	87,07	86,41	0,93
										220	85,75	87,07	86,41	0,93
										230	85,75	87,07	86,41	0,93
										240	85,75	87,07	86,41	0,93
										250	85,75	87,07	86,41	0,93
										260	85,75	87,07	86,41	0,93
										270	85,75	87,07	86,41	0,93
										280	85,75	87,07	86,41	0,93
										290	85,75	87,07	86,41	0,93
										300	85,75	87,07	86,41	0,93

Preglednica XXV: Testi sproščanja, pretok: 6 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 60 min, Oblika B (TS – 10).

TS - 10	% sproščene ZU			
t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD
0	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0,24	0,55	0,39	0,22
30	0,34	0,67	0,5	0,23
40	0,44	0,79	0,61	0,25
50	0,49	0,85	0,67	0,26
60	0,54	0,89	0,71	0,25
65	0,81	1,12	0,97	0,21
70	16,44	7,19	11,82	6,54
75	54,29	45,46	49,87	6,24
80	73,95	70,92	72,44	2,14
85	82,91	83,59	83,25	0,48
90	86,89	90,24	88,56	2,37
100	89,48	94,8	92,14	3,77
110	89,99	95,96	92,97	4,22
120	90,07	96,15	93,11	4,3
130	90,07	96,15	93,11	4,3
140	90,07	96,15	93,11	4,3
150	90,07	96,15	93,11	4,3
160	90,07	96,15	93,11	4,3
170	90,07	96,15	93,11	4,3
180	90,07	96,15	93,11	4,3
190	90,07	96,15	93,11	4,3
200	90,07	96,15	93,11	4,3
210	90,07	96,15	93,11	4,3
220	90,07	96,15	93,11	4,3
230	90,07	96,15	93,11	4,3
240	90,07	96,15	93,11	4,3

4.3.3 Primerjava sproščanja iz Oblike A in B

V preglednicah XXVI – XXVIII so navedeni rezultati testov sproščanja, s katerimi smo primerjali sproščanje iz Oblike A in B pri pretokih 3 in 4 ml/min ter pri različnih časih zadrževanja v kislem. Pogoji izvedbe so navedeni pod točko 3.2.4.4.

Preglednica XXVI: Testi sproščanja, čas zadrževanja v kislem: 60 min, pretok: 3 ml/min (TS – 11), pretok 4 ml/min (TS – 12), Oblika A.

TS - 11	% sproščene ZU				TS - 12	% sproščene ZU			
	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje		t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,10	0,04	0,07	0,04	10	0,03	0,07	0,05	0,03
40	0,10	0,04	0,07	0,04	20	0,12	0,22	0,17	0,07
60	0,10	0,04	0,07	0,04	30	0,12	0,23	0,18	0,07
65	1,00	0,72	0,86	0,20	40	0,12	0,23	0,18	0,07
70	19,06	17,69	18,37	0,97	50	0,12	0,23	0,18	0,07
75	43,12	40,97	42,04	1,52	60	0,12	0,23	0,18	0,07
80	60,05	57,86	58,95	1,55	65	1,47	0,96	1,21	0,36
85	71,74	69,75	70,74	1,40	70	27,88	20,70	24,29	5,08
90	79,46	78,00	78,73	1,03	75	53,25	49,13	51,19	2,91
100	88,22	87,63	87,92	0,42	80	69,30	67,40	68,35	1,34
110	92,24	92,34	92,29	0,07	85	79,69	78,94	79,31	0,53
120	94,00	94,57	94,28	0,40	90	85,34	85,90	85,62	0,40
140	95,11	96,61	95,86	1,06	100	91,19	93,13	92,16	1,37
160	95,26	97,09	96,18	1,29	110	93,40	96,15	94,78	1,94
180	95,26	97,09	96,18	1,29	120	94,12	97,34	95,73	2,28
200	95,26	97,09	96,18	1,29	130	94,37	97,76	96,06	2,40
220	95,26	97,09	96,18	1,29	140	94,40	97,84	96,12	2,43
240	95,26	97,09	96,18	1,29	150	94,40	97,84	96,12	2,43
					160	94,40	97,84	96,12	2,43
					170	94,40	97,84	96,12	2,43
					180	94,40	97,84	96,12	2,43
					190	94,40	97,84	96,12	2,43
					200	94,40	97,84	96,12	2,43
					210	94,40	97,84	96,12	2,43
					220	94,40	97,84	96,12	2,43
					230	94,40	97,84	96,12	2,43
					240	94,40	97,84	96,12	2,43

Preglednica XXVII: Testi sproščanja, čas zadrževanja v kislem: 30 min, pretok: 3 ml/min, Oblika B (TS – 13).

TS - 13	% sproščene ZU
t(min)	paralela 1 PS2
0	0
20	0,07
30	0,19
35	0,32
40	0,92
45	15,26
50	34,52
60	60,23
80	80,92
100	86,21
120	87,56
140	87,89
160	87,94
180	87,94
200	87,94
220	87,94

Preglednica XXVIII: Testi sproščanja, pretok 3 ml/min, čas zadrževanja v kislem: 10 min (TS – 14), 30 min (TS – 15), 120 min (TS – 16), Oblika A.

TS - 14		% sproščene ZU			TS - 15		% sproščene ZU	TS - 16		% sproščene ZU		
t(min)		paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD	t(min)	paralela 1 PS1	t(min)	paralela 1 PS1	paralela 2 PS2	povprečje	SD
0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5		0	0	0	0	20	0,08	20	0,02	0,07	0,04	0,03
10		0,07	0,04	0,06	0,02	30	0,3	40	0,02	0,07	0,04	0,03
15		0,3	0,19	0,25	0,08	35	0,3	60	0,02	0,07	0,04	0,03
20		0,59	0,58	0,59	0,01	40	0,49	80	0,02	0,07	0,04	0,03
25		1,87	3,01	2,44	0,81	45	13,25	100	0,07	0,12	0,09	0,04
30		19,95	23,84	21,89	2,75	50	34,22	120	0,25	0,27	0,26	0,02
35		40,36	41,94	41,15	1,12	60	62,08	125	2,29	23,75	13,02	15,18
40		55,86	55,46	55,66	0,28	80	83,98	130	58,55	58,55	58,55	0,01
60		85,58	82,01	83,79	2,53	100	89,74	135	68,02	64,78	66,4	2,29
80		93,35	89,01	91,18	3,06	120	91,14	140	73,34	68,38	70,86	3,5
100		95,48	90,8	93,14	3,31	140	93,78	150	79,91	72,98	76,45	4,9
120		96,15	91,25	93,7	3,47	160	94,02	160	83,47	75,13	79,3	5,9
140		96,43	91,4	93,92	3,55	180	94,07	180	86,5	77,57	82,04	6,31
160		96,59	93,3	94,94	2,32	200	94,07	200	87,48	78,95	83,22	6,03
180		96,62	94,05	95,33	1,81	220	94,07	220	87,87	79,69	83,78	5,79
								240	87,96	80,09	84,03	5,57
								260	87,96	80,41	84,18	5,34
								280	87,96	80,6	84,28	5,2
								300	87,96	80,74	84,35	5,11

4.3.4 Podaljšani in oteženi profili sproščanja

V preglednici XXIX so navedene ekstrapolirane vrednosti sproščene ZU po 300 min pri poskusih, ki so bili krajši kot 300 min. S pomočjo podaljšanih profilov smo izračunali otežen profil sproščanja za Obliko A in B – rezultati so v preglednici XXX. Pogoji izvedbe testov sproščanja, na podlagi katerih smo računali podaljšane in otežene profile, so navedeni pod točko 3.2.4.4.

Preglednica XXIX: % sproščene ZU po 300 min, določeno z linearno ekstrapolacijo.

oznaka poskusa	% sproščene ZU po 300 min
TS - 4	98,4
TS - 5	87,17
TS - 11	96,18
TS - 13	87,94
TS - 14	98,93
TS - 15	94,13

Preglednica XXX: Povprečni oteženi profil sproščanja za Obliko A in B.

t (min)	povprečni oteženi % sproščene ZU	
	Oblika A	Oblika B
0	0,00	0,00
20	0,22	0,37
40	17,09	20,08
60	37,34	38,47
80	56,71	53,06
100	64,89	62,52
120	66,80	65,01
140	87,78	79,86
160	90,60	85,04
180	91,51	86,26
300	93,27	86,92

5 RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo optimizirali pogoje in izvedbo poskusov na pretočnem sistemu za testiranje sproščanja. Teste smo izvajali z različnimi mediji za sproščanje, s katerimi smo simulirali fiziološki pH v želodcu in TČ, pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja v kislem in preučevali vplive na sproščanje iz gastrozistentnih pelet.

Med razvojem FO uporabljamo teste sproščanja za določanje lastnosti oblike in njeno ustreznost, z njimi lahko kontroliramo kakovost izdelka in napovedujemo *in vivo* sproščanje. Testne metode so odvisne od izdelka in se izvajajo po splošnih ali specifičnih farmakopejskih predpisih, v uporabi pa so tudi modifikacije in ne-farmakopejske aparature, s katerimi lahko dodatno posnemamo dogajanje v fizioloških pogojih in boljše napovemo *in vivo* profile sproščanja.

V diplomski nalogi smo teste izvajali na ne-farmakopejski napravi za testiranje sproščanja, na pretočnem sistemu, ki nam omogoča menjavo medijev z različnimi sestavami in pH vrednostmi ter s tem ponazarjanje različnih prostorov in prehodov oblike v prebavnem traktu. S pretočnim sistemom lahko posnemamo tudi fiziološke pretoke, volumne v GIT, dovajamo svež medij ter odvajamo vzorce s sproščeno ZU in enostavno vzorčimo.

Testirali in primerjali smo sproščanje iz orodisperzibilnih tablet, ki ob stiku z medijem razpadejo na gastrozistentne pelete z acidolabilno ZU ter pomožne snovi. Gastrozistentne oblike so pripravljene tako, da lahko z njihovo aplikacijo dosežemo zakasnelo sproščanje ZU. Obloga, s katero so obložene pelete, je v kislem mediju obstojna, zaščiti acidolabilno ZU in vpliva na mesto sproščanja, do katerega praviloma pride po prehodu v tanko črevo pri višjem pH. Takrat se začne obloga raztapljati in ZU sproščati.

Teste sproščanja smo izvajali z mediji za sproščanje, s katerimi smo predhodno simulirali fiziološki pH profil po prehodu oblike iz želodca v dvanajstnik. Sproščanje smo testirali pri različnih hitrostih pretoka in časih zadrževanja v kislem ter preučevali vplive na sproščanje, primerjali smo sproščanje iz Oblike A in B ter z oteženimi profili sproščanja poskušali napovedati *in vivo* profile sproščanja. Analizo vzorcev smo izvedli s HPLC metodo z UV detektorjem.

5.1 Simulacija in določevanje pH profilov

Eden najvažnejših parametrov, ki ga poskušamo posnemati na *in vitro* sistemu za testiranje sproščanja, je pH. Ta se spreminja od ust do rektuma. V stanju na tešče pH v želodcu niha od 1 do 3. V dvanajstniku je povprečen pH = 6,1, v tankem črevesu počasi narašča od

približno 6 v začetnem delu do 7,5 v distalnem ileumu (5, 7). V kolonu je pH variabilen in doseže vrednosti med 5,5 in 7,8 (22).

Na pretočnem sistemu smo z menjavo medijev simulirali pH profile v prebavnem traktu. V diplomski nalogi smo se osredotočili na posnemanje pH preskoka po prehodu oblike iz želodca v dvanajstnik. Želodčni medij smo simulirali z raztopino HCl, hiter pH preskok smo dosegli z dodajanjem raztopine Na_3PO_4 , črevesni medij pa smo posnemali s fosfatnim pufrom s $\text{pH} = 6,8$.

5.1.1 Razvoj in optimizacija pretočnega sistema za določevanje pH profilov

pH profile smo sprva določali na pretočnem sistemu pod pogoji testiranja sproščanja (sistem za testiranje sproščanja – STS). Poskuse smo izvajali v 150 ml čaši in mešali z magnetom v silikonski cevki pri hitrosti 80 obratov/minuto. pH smo merili s pH metrom 1. Tekom določevanja pH profilov smo se odločili za uporabo pH metra 2 zaradi večje občutljivosti le-tega in pH metra zamenjali. Zaradi zamenjave pH metra smo morali uvesti nekaj sprememb na pretočnem sistemu, pripravili smo optimiziran sistem za določevanje pH profilov – OS: zamenjali smo delovno čašo, uporabili smo magnet brez silikonske čaše in optimizirali izvedbo (uporaba pokrova na čaši, določitev hitrosti mešanja).

S preliminarnimi poskusi smo testirali uvedene modifikacije na OS ter preverjali podobnost pH profilov izvedenih na STS in OS.

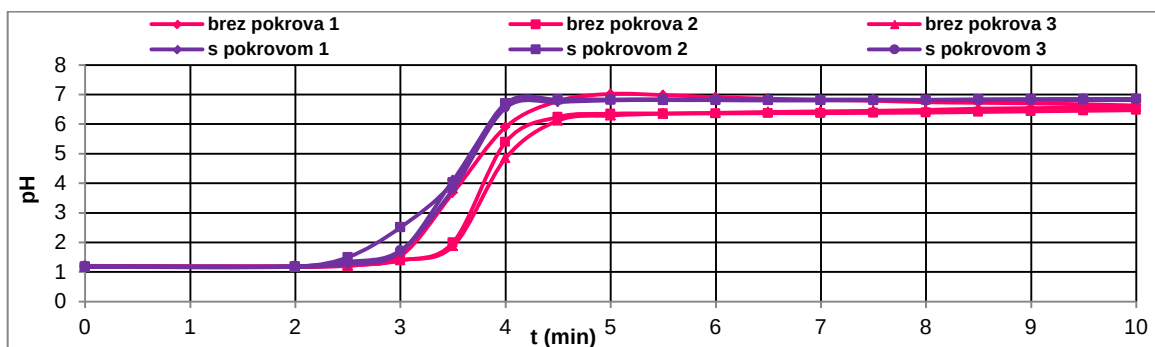
❖ Simulacija in določevanje pH profilov na OS v ožji, 80 ml čaši in optimizacija izvedbe

Na OS smo uporabili manjšo in ožjo delovno čašo (80 ml) zaradi daljše pH elektrode oziroma nastavka za elektrodo pH metra 2. V 150 ml čaši elektroda ni bila v celoti potopljena v medij. Po uvedbi nove čaše so se med paralelami pH profilov nakazovala večja odstopanja, razlike smo opazili predvsem med paralelami visokih koncentracij, najbolj izrazito pri pH profilu z izhodnim kislim medijem 0,1 M HCl ($\text{pH} = 1,1$).

Izvedbo smo optimizirali s pritrditvijo dovodne in odvodne cevke in pH elektrode. Izdelali smo pokrov za čašo s tremi odprtini. Na sliki 8 je predstavljena primerjava pH profilov določenih brez in s pokrovom v prvih 5,5 min testiranja, ko pride do pH preskoka.

Pri poskusih brez pokrova smo med beleženjem pH vrednosti opazili večja pH nihanja in odstopanja med paralelami, medtem ko so pri čaši s pokrovom paralele pH profilov primerljive in pH je enakomerno naraščal do vzpostavitve konstantnega pH-ja. Pri

poskusih brez pokrova cevke in pH elektroda niso bile pritrjene in med izvajanjem je verjetno prihajalo do manjših premikov le-teh, kar je vplivalo na variiranje pH vrednosti.



Slika 8: Primerjava pH profilov, izvedba na OS, določitev pH profila brez pokrova - 3 paralele (PP – 1) in s pokrovom - 3 paralele (PP – 2).

Vse končne pH profile smo določali z isto 80 ml čašo in pokrovom. Tako smo poskušali zagotoviti ponovljive pogoje oziroma zmanjšati vpliv sprememb na čaši oziroma v položaju cevk in pH elektrode na pH.

❖ Hitrost mešanja na OS

Pri poskusih na STS za določitev preliminarne pH profile in testih sproščanja smo mešali z magnetom v silikonski cevki in pri hitrosti 80 obratov/minuto. V 80 ml čaši smo za mešanje uporabili samo magnet, brez silikonske cevke, saj je bila le-ta prevelika za ozko čašo. Mešanje je lahko pri nižji hitrosti vrtenja magnetu manj učinkovito, kar lahko upočasni reakcijo med kislino in bazo, pH elektroda pa zazna vsako spremembo pH v nehomogenem mediju. Zaradi uporabe magnetu brez silikonske cevke smo na OS povišali hitrosti mešanja.

Za hitrost mešanja na OS smo tako izbrali 140 obratov/minuto.

❖ Primerjava parametrov in pH profilov določenih na STS in OS

Z mediji in po postopku, s katerimi smo na pretočnem sistemu simulirali pH profile na OS, smo izvajali tudi teste sproščanja. Slednje smo izvajali pod pogoji STS. S poskusnimi pH profili smo zato preverjali podobnost profilov določenih na OS oziroma STS ter ugotavljali, ali smo parametre na OS ustrezno optimizirali. Primerjali smo pH profile z izhodnim kislim medijem 0,1 M HCl (pH = 1,1).

Na STS smo določili tri pH profile pri hitrosti mešanja 80, 100 in 150 obratov/minuto. Ugotoviti smo želeli, kakšne pH profile dobimo na STS pri hitrosti mešanja, pri kateri smo izvajali teste sproščanja (80 obratov/minuto), ter kakšne pri višji hitrosti mešanja in če pride med pH profili do odstopanj (PP – 5, PP - 6, PP - 7). Nazadnje smo preverili podobnost pH profilov določenih na STS in OS. Primerjali smo naslednja pH profila:

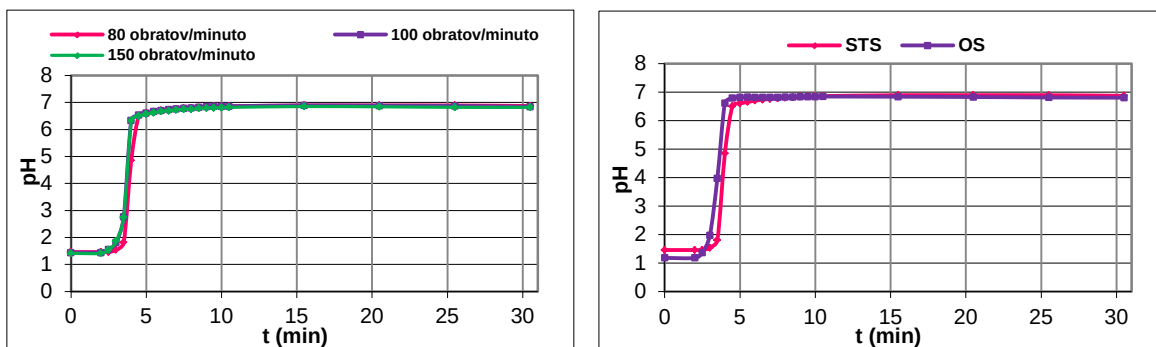
- pH profil PP – 2, pogoji: OS, hitrost mešanja 140 obratov/minuto (upoštevali smo povprečje treh paralel),
- pH profil PP – 5, pogoji: STS, hitrost mešanja 80 obratov/minuto.

Kot je razvidno iz Slike 9 (levo), so pH profili določeni na STS pri 80, 100 in 150 obratih/minuto zelo podobni in se prekrivajo. Hitrost mešanja nima večjega vpliva na pH profile STS, verjetno zaradi pogojev izvedbe poskusov na STS:

- 150 ml čaša: večji razmik med dovodno, odvodno cevko in pH elektrodo pH metra,
- pH meter 1 je pri nizkih pH-jih manj občutljiv in verjetno ni zaznal vseh pH sprememb,
- magnet v silikonski cevki: na STS smo uporabili magnet v silikonski cevki. Silikonska cevka je dolga približno 5 cm in zavzame skoraj celoten premer čaše. Z vstavljenim magnetom predstavlja večje mešalno sredstvo, kar poveča učinek mešanja in predvsem spremeni način, kako se medij meša,
- način gibanja tekočine: na meritve pH najverjetneje vpliva tudi način gibanja tekočine.

Na Sliki 9 (desno) je prikazana primerjava pH profilov določenih na OS in STS (PP – 2, PP - 5), s katero smo preverjali podobnost profilov obeh sistemov.

pH profila se razlikujeta v začetnem delu. pH meter 2 (meritve na OS, umerjen na pH = 3) je v primerjavi s pH metrom 1 (meritve na STS in umeritev na pH = 4) meril pH v širšem območju. S pH metrom 2 smo točneje izmerili izhoden kisel pH in le-ta je bil približno 0,3 enote nižji kot izmerjen s pH metrom 1. Opaziti je tudi manjši zamik pri pH preskoku profila STS, sicer pa so razlike med pH profiloma STS in OS relativno majhne, zato smo ocenili, da smo parametre in izvedbo pH profilov na OS ustrezno optimizirali in da bomo z uporabo istih medijev in postopka kot pri simuliranju pH profilov podoben pH profil dosegli tudi pri izvedbi testov sproščanja pod pogoji STS.



Slika 9: Levo: primerjava pH profilov, izvedba na STS pri različnih hitrostih mešanja: 80 (PP – 5), 100 (PP – 6) in 150 obratov/minuto (PP – 7). Desno: primerjava pH profilov, izvedba pod pogoji STS (PP – 5) in OS (PP – 2).

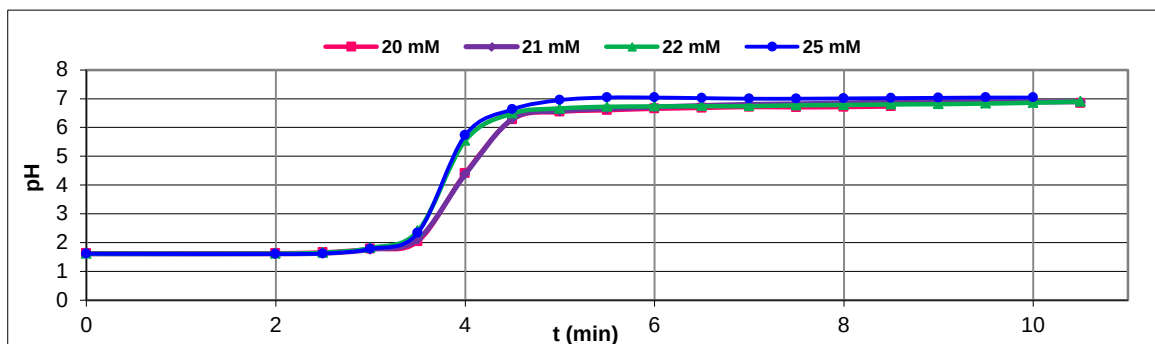
5.1.2 Določitev točne koncentracije Na_3PO_4 in preliminarni pH profili

Prehod oblike preko pilorusa iz želodca v dvanajstnik je hiter. V slednjem se prične mešanje želodčne vsebine s sokovi iz žolčnika ter trebušne slinavke in pH naraste.

Preskok pH, do katerega pride po prehodu prostorov, smo na *in vitro* sistemu ponazarjali z dodajanjem raztopine Na_3PO_4 , s katerim smo hitro in do želene vrednosti dvignili pH, npr. pri pretoku 2ml/min v približno treh minutah od kislega do pH = 6,8. Raztopino Na_3PO_4 smo uporabljali na podlagi predhodnih študij (20), omenjena je tudi v farmakopeji kot medij za dvig pH pri testiranju sproščanja oblik z zakasnelim sproščanjem (23).

Koncentracijo fosfata, ki smo ga dodali za doseg želenega pH v delovni čaši, smo računali na podlagi ravnotežne reakcije med kislino in Na_3PO_4 do druge konstante ionizacije (za posnemanje fizioloških pogojev pride v poštev druga stopnja disociacije s $\text{pK}_{a2} = 7,22$, sicer ima fosfatna kislina tri konstante ionizacije) (24). Tekom določevanja pH profilov smo ugotovili razlike med izračunano in pričakovano vrednostjo pH v delovnem mediju. Izračunane pH vrednosti posamezne koncentracije Na_3PO_4 so bile v povprečju 0,3 enote višje v primerjavi z eksperimentalno izmerjenimi v delovni čaši, zato smo točne koncentracije fosfata določili z več poskusnimi preliminarnimi pH profili.

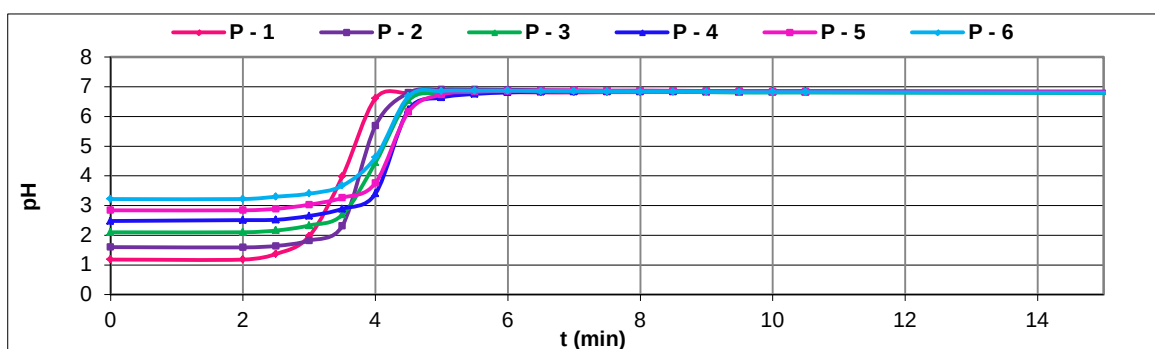
Primer določevanja preliminarnih pH profilov, s katerimi smo želeli doseči čim hitrejši pH preskok, ki pa ni previsok in ne preseže vrednosti $\text{pH} = 6,8 \pm 0,1$, je prikazan na Sliki 10. Za izhodno kislo raztopino smo uporabili 0,035 M HCl ($\text{pH} = 1,6$). Profila s koncentracijo Na_3PO_4 0,022 M in 0,025 M hitro naraseta, vendar je njun pH po preskoku previsok. pH profila s 0,02 M in 0,021 M Na_3PO_4 sicer počasneje naraseta, vendar z njima nismo presegli $\text{pH} = 6,8$. pH vrednosti so po dodatku 0,02 M Na_3PO_4 in po preskoku nekoliko nižje, zato smo za končno koncentracijo fosfata izbrali 0,021 M Na_3PO_4 .



Slika 10: Primerjava preliminarних pH profilov za določitev točne koncentracije Na_3PO_4 , izhodna kislina raztopina: 0,035 M HCl (pH = 1,6), dodatek različnih koncentracij Na_3PO_4 (koncentracije v legendi): 0,02 M (PP – 8), 0,021 M (PP – 9), 0,022 M (PP – 10) in 0,025 M Na_3PO_4 (PP – 11).

5.1.3 Končna izvedba

Po končani optimizaciji sistema in določitvi točnih koncentracij medijev smo določili šest pH profilov z izhodnimi raztopinami s pH = 1,1 (P – 1), 1,6 (P – 2), 2,1 (P – 3), 2,4 (P – 4), 2,8 (P – 5) in 3,2 (P – 6) (Slika 11). Razlike v pH izhodnih kislin raztopin botrujejo k manjšim odstopanjem profilov pri pH preskoku. Predvidevali smo, da je nepričakovano zaporedje pH profilov posledica različnih koncentracij dodanega Na_3PO_4 .



Slika 11: Končni pH profili (pri izrisu smo upoštevali povprečje treh paralel za posamezen profil), v legendi so oznake pH profilov.

5.2 Testiranje sproščanja

Testirali smo sproščanje ZU iz gastrozistentnih pelet, ki so vgrajene v orodisperzibilne tablete Oblike A in B. Teste smo izvajali na pretočnem sistemu, na katerem smo posnemali naslednje fiziološke dejavnike:

❖ Hidrodinamika v GIT

Pretok: fiziološki transplorični pretok v stanju na tešče variira od 0 do 4 ml/min, v TČ pa znaša pretok od 0 do 2 ml/min. Na pretočnem sistemu smo za ponazoritev pretoka v prebavnem traktu uporabljali peristaltično črpalko, s katero smo v delovno čašo sproti

dovajali svež medij in odvajali vzorce s sproščeno ZU. Teste smo izvajali pri hitrosti pretoka 2, 3, 4 in 6 ml/min.

Mehanski vplivi: mehanske vplive na FO v prebavnem traktu smo posnemali z mešanjem medija v delovni čaši. Uporabili smo magnet v silikonski cevki, s katerim smo dosegli gibanje pelet v mediju in fizični stres ob stiku pelet z mešalnim sredstvom.

Prehod pelet skozi trakt: pelete se iz želodca praznijo postopoma, v obliki bolusov, kislemu okolju so lahko izpostavljene od nekaj min do približno 3 ur, tranzit preko TČ pa je relativno konstanten (3 - 4 ure) (21,9). Sproščanje smo testirali pri različnih časih zadrževanja v kislem in sicer 10, 30, 60 in 120 min, intestinalno fazo smo ponazarjali 3 ure.

❖ Pogoji v GIT

pH: z menjavo medijev smo posnemali pH spremembe v GIT in prehod pelet iz kislega okolja želodca v tanko črevo.

Volumen: farmakopejski testi sproščanja (Aparat I in Aparat II) se večinoma izvajajo z velikimi volumni delovnega medija zaradi omogočanja »sink« pogojev (23), ki zagotavljajo zadostno topnost za sproščanje celotne količine ZU. S pretočnim sistemom pa lahko zaradi biorelevantnega nizkega pretoka, ki vključuje sprotni dotok svežega medija in odvajanje raztopine vzorca, uporabimo manjše volumne v fizioloških mejah – 40 ml.

Temperatura: ljudje vzdržujemo normalno telesno temperaturo okrog 37°C, ne glede na presnovne aktivnosti in temperaturo okolja. Pri 95% populacije je telesna temperatura izmerjena v ustih v intervalu 36,3°C – 37,1°C (25). Teste sproščanja smo izvajali pri temperaturi 36,5°C.

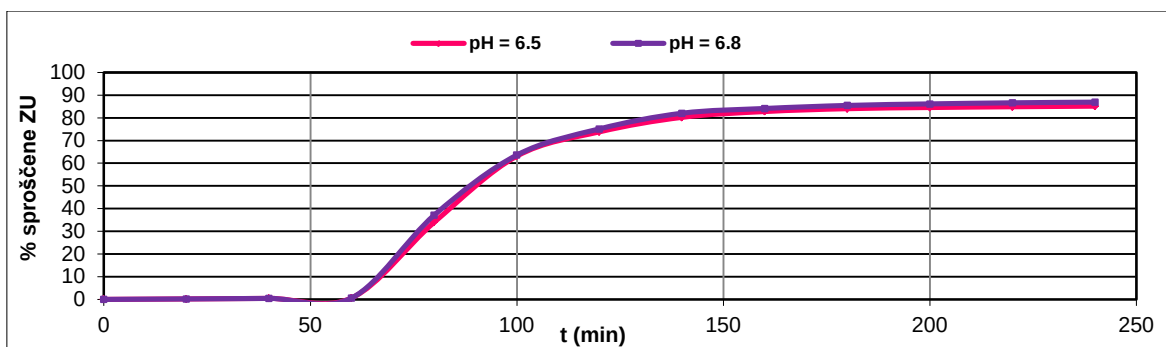
5.2.1 Preliminarni testi sproščanja

❖ Vpliv pH simuliranega črevesnega medija na sproščanje učinkovine

Ugotavljali smo ali uporaba simuliranih črevesnih medijev z različnim pH-jem vpliva na količino sproščene ZU. Okolje v TČ, kjer se praviloma začne sproščanje učinkovine iz FO, smo ponazarjali s fosfatnim pufrom. Kot medije za sproščanje smo uporabili še 0,01 M HCl za simuliranje želodčnega medija in 0,2 M Na₃PO₄ za dvig pH - 0,2 M Na₃PO₄ smo uporabili na podlagi predhodnih študij na fakulteti (20). Slednje so bile izvedene z biorelevantnim črevesnim medijem s pH = 6,5, v katerega so bile dodane žolčne soli in lecitin. V naši nalogi smo se osredotočili samo na pH medijev brez dodatkov, saj smo želeli preveriti ali pufer z različno vrednostjo pH vpliva na količino sproščene ZU. Teste smo

izvedli z fosfatnim pufrom s pH = 6,8 (PT - 1) in pH = 6,5 (PT - 2) ter primerjali dobljene profile sproščanja. Na Sliki 12 vidimo, da je končni delež sproščene ZU pri fosfatnem pufru s pH = 6,5 približno 2% nižji, sicer pa se profila prekrivata.

Pri testih sproščanja PT -1 in PT - 2 pH profila nismo poznali, saj pri teh poskusih še nismo uporabili medijev in postopka, s katerimi smo določali pH profil. S slednjimi smo pokazali, da moramo v 0,01 M HCl dodati 4 ml 0,055 M Na₃PO₄, da dosežemo pH preskok do pH = 6,8. Dodatek 4 ml 0,2 M Na₃PO₄ v teh poskusih je najverjetneje povzročil visok dvig pH v delovni čaši in pH je presegel pH = 6,5 oziroma 6,8, vendar pod temi pogoji večjih razlik med profiloma sproščanja s črevesnimi mediji z različnimi pH-ji ni.



Slika 12: Primerjava povprečnih profilov sproščanja, uporaba fosfatnega pufra s pH = 6,8 (PT-1) in 6,5 (PT-2).

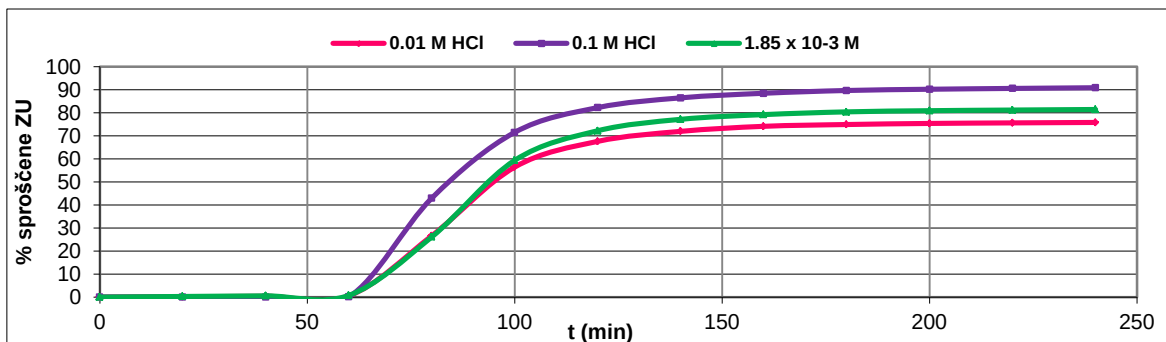
❖ Vpliv pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje učinkovine

Pri oblikah z gastrozistentno oblogo se ZU praviloma sprošča v delu prebavnega trakta, kjer se pH dvigne, torej po prehodu v tanko črevo. Polimerne obloge teh FO so odporne na kislo okolje in preprečujejo raztapljanje obloge v želodcu ter posledično sproščanje in/ali razpad učinkovine, v kolikor je le-ta acidolabilna. Funkcionalne skupine gastrozistentnih polimerov so običajno karboksilne skupine, ki so pri nizkem pH-ju v želodcu v ne-ionizirani obliki in tako preprečujejo raztapljanje obloge. Po prehodu oblike v območje z višjim pH karboksilne skupine ionizirajo, kar povzroči raztapljanje (26).

S testom smo preverjali ali različni kisli mediji za simulacijo želodčnega medija vplivajo na sproščanje ZU. Izvedli smo tri teste sproščanja z izhodnimi kislimi raztopinami HCl s koncentracijo 0,01 M (pH = 2,1, PT – 3), 0,1 M (pH = 1,1, PT – 4) in 1,85x10⁻³ M (pH = 2,8, PT – 5). Za dvig pH smo uporabili na podlagi pH profilov določene koncentracije Na₃PO₄. Črevesni medij smo simulirali s fosfatnim pufrom s pH = 6,8.

Na Sliki 13 vidimo, da do sproščanja v kisli fazi ne pride oziroma če pride, ZU razpade in je ne izmerimo. Po dodatku fosfata in nadalje fosfatnega pufra se je ZU pri poskusu z začetno izpostavljenostjo 0,1 M HCl hitro sproščala in profil je strm, medtem ko sta profila

sproščanja pri poskusih z 0,01 M in $1,85 \times 10^{-3}$ M HCl počasneje naraščala. Večja odstopanja zasledimo pri končni kumulativni količini sproščene ZU. Največ ZU se je sprostil pri poskusu z 0,1 M HCl, skoraj 10% več kot pri $1,85 \times 10^{-3}$ M oziroma 15% več kot pri 0,01 M HCl.



Slika 13: Primerjava povprečnih profilov sproščanja, uporaba različnih izhodnih kislih medijev: 0,01 M HCl (PT - 3), 0,1 M (PT - 4) in $1,85 \times 10^{-3}$ HCl (PT - 5).

V tem primeru na % sproščene ZU verjetno vplivata predvsem dva procesa – raztapljanje oziroma popuščanje gastrozistentne obloge v kislem in razpad ZU, v kolikor pride do stika ZU z kislim medijem. Bolj kisel kot je medij, več karboksilnih skupin gastrozistentne obloge je ne-ioniziranih in le-ta je bolj obstojna. Po drugi strani je med popuščanjem obloge v kislem in stiku acidolabilne ZU s kislino ZU pri zelo kisljih medijih bolj podvržena razpadu kot pri manj kisljih.

Glede na dobljene profile smo sklepali, da so profili sproščanja pri poskusih z različnimi simuliranimi želodčnimi mediji rezultat ravnovesja zgoraj opisanih procesov. Verjetno je pri poskusih z 0,01 M in $1,85 \times 10^{-3}$ M HCl prišlo do večjega popuščanja gastrozistentne obloge in posledično je tedaj razpadlo več ZU, pri 0,1 M HCl je bil razpad manjši zaradi obstojnosti obloge.

Na pretočnem sistemu dovajamo medij v delovno čašo preko cevke, iz katere sveži medij kaplja v delovni medij. Način dovajanja lahko privede do napak pri izvedbi – nekaj pelet lahko takoj pride v stik s kapljico baze ali pufra, kar povzroči hitrejše raztapljanje gastrozistentne obloge. Tako bi lahko razložili hitro in obsežno sproščanje po zamenjavi medija pri poskusu z izhodnim kislim medijem 0,1 M HCl, saj se napaka verjetno bolj izrazi po dodatku visoke koncentracije Na_3PO_4 .

Za opredelitev vpliva pH simuliranega želodčnega medija na sproščanje ZU smo izvedli premalo primerjalnih poskusov z različnimi izhodnimi kisljimi mediji.

5.2.2 Končna izvedba

Poskuse sproščanja ZU iz gastrobezistentnih pelet smo izvajali pri različnih pogojih, spreminjali smo hitrost pretoka in čas izpostavljenosti kislemu mediju. Ugotavljali smo vpliv teh parametrov na sproščanje ter primerjali sproščanje iz Oblike A in B.

Poskuse smo izvajali z naslednjimi mediji za sproščanje:

- simulacija želodčnega medija: 0,01 M raztopina HCl,
- simulacija hitrega pH preskoka po prehodu oblike iz želodca v dvanajstnik: dodatek 0,055 M raztopine Na₃PO₄,
- simulacija črevesnega medija: fosfatni pufer s pH = 6,8.

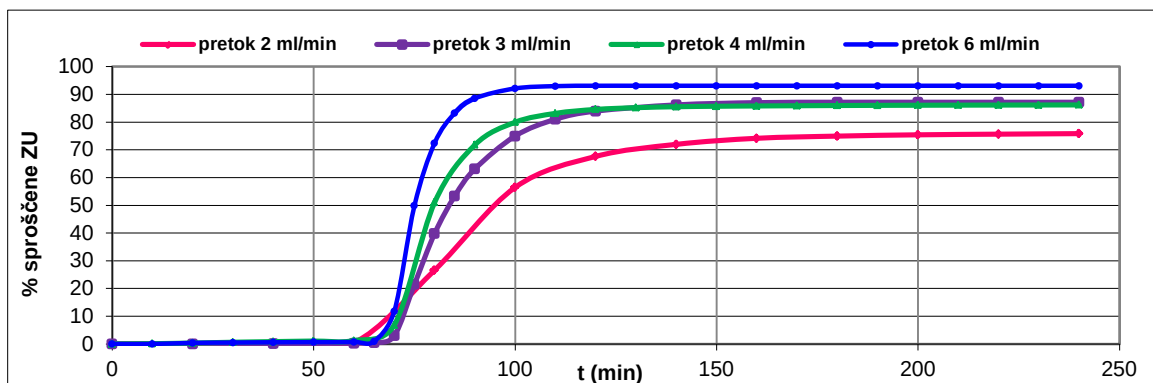
Delovni medij smo mešali pri hitrosti 80 obratov/minuto. Teste smo izvajali pri temperaturi vodne kopeli: T = 36,5°C.

❖ Vpliv pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje

S testi smo ugotavljali vpliv pretoka in časa zadrževanja v kislem na sproščanje iz Oblike B. Teste smo izvajali pri hitrostih pretoka 2, 3, 4 in 6 ml/min ter času izpostavljenosti kislemu mediju 10, 60 in 120 min.

Vpliv pretoka na sproščanje: pretok v prebavnem traktu ni konstanten in se glede na mesto v traktu in fazo gibanja MMC preminja. Poleg tega nanj vplivajo tudi endogena ter zaužita tekočina, hrana in kalorična vrednost, v manjši meri pa tudi starost in položaj telesa. Med praznjenjem iz želodca v stanju na tešče pretok variira od 0 do 4 ml/min, v tankem črevesu pa so v istem stanju zabeležili vrednosti pretoka med 0 in 2 ml/min (14, 5). Sprva smo sproščanje testirali pri pretoku 2 ml/min. Na podlagi raziskav, v katerih so pokazali, da je pretok v določenem odseku trakta lahko tudi večji (14), smo nadalje teste sproščanja izvajali pri višjih hitrostih pretoka znotraj fiziološkega intervala in preučevali, kakšen je tedaj profil sproščanja in kako pretok vpliva na sproščanje.

Na Sliki 14 so predstavljeni povprečni profili sproščanja Oblike B izvedeni pri hitrostih pretoka 2 ml/min (TS – 2), 3 ml/min (TS – 5), 4 ml/min (TS – 8) in 6 ml/min (TS – 10) ter času zadrževanja v kislem 60 min.

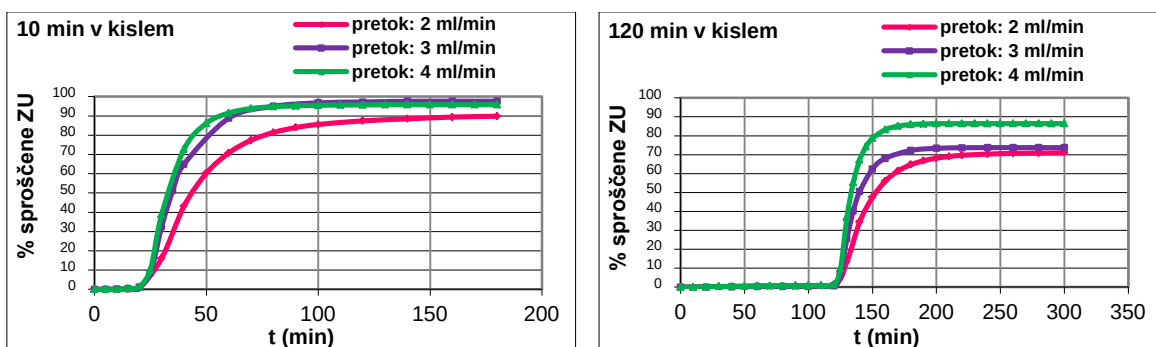


Slika 14: Primerjava povprečnih profilov sproščanja izvedenih pri različnih pretokih in času zadrževanja v kislem 60 min: pretok 2 ml/min (TS - 2), 3 ml/min (TS - 5), 4 ml/min (TS - 8) in 6 ml/min (TS - 10).

ZU se v kisli fazi ne sprošča oziroma, če se je kaj sprosti zaradi popuščanja gastrozistentne obloge, ta razpade. Sproščanje se praviloma začne, ko zamenjamo kisel medij in povišamo pH v delovni čaši (dodatek fosfata in fosfatnega pufru). Iz slike je razvidno, da se je največ učinkovine sprostil pri največjem pretoku - 6 ml/min in najmanj pri 2 ml/min, vmesna profila sproščanja sta primerljiva. Učinkovina se je sicer po zamenjavi medija pri pretoku 4 ml/min sproščala nekoliko hitreje kot pri 3 ml/min, končni odstotek sproščene ZU pa je približno enak.

Podrobneje smo vplive pretoka preučevali s primerjavo profilov sproščanja pri pretokih 2, 3 in 4 ml/min. Predvidevali smo, da je pretok 6 ml/min prevelik in tako ne odraža najbolje dogajanja v fizioloških pogojih.

Kot je razvidno iz Slike 15, je sproščanje pri pretokih 2, 3 in 4 ml/min in posameznem času zadrževanja v kislem pospešeno pri večjem pretoku – ZU se je najhitreje sproščala pri pretoku 4 ml/min. Profil pri pretoku 3 ml/min in časih zadrževanja 10 in 120 min je po začetku sproščanja nekoliko manj strm kot tisti pri 4 ml/min, najmanjši pa je naklon krivulje pri pretoku 2 ml/min.



Slika 15: Primerjava povprečnih profilov sproščanja izvedenih pri različnih pretokih in časih zadrževanja v kislem. Levo: 10 min v kislem: 2 ml/min (TS - 1), 3 ml/min (TS - 4), 4 ml/min (TS - 7). Desno: 120 min v kislem: 2 ml/min (TS - 3), 3 ml/min (TS - 6), 4 ml/min (TS - 9).

Povečan pretok najverjetneje vpliva na hitrejšo raztapljanje ZU in večjo količino sproščene ZU. Hitrost raztapljanja opisuje Noyes – Whitney-jeva enačba, s katero smo poskušali razložiti, kako povečan pretok vpliva na sproščanje:

$$\frac{dXd}{dt} = \frac{A \cdot D}{h} \cdot \left(cs - \frac{Xd}{V} \right), \quad (12)$$

A predstavlja površino, na kateri poteka raztapljanje, D je difuzijski koeficient, h debelina difuzijske plasti, V volumen medija, cs topnost ZU, x_d količina raztopljene ZU v raztopini in dt čas (27).

Pogoji izvedbe poskusov - uporabljena FO, volumen, sestava medijev za sproščanje, hitrost mešanja, so bili pri vseh poskusih isti, zato smo predpostavili, da so A, D, h in V konstantni, topnosti (cs) ZU pa nismo poznali. Sklepali smo, da na hitrost raztapljanja v največji meri vpliva količina raztopljene ZU v raztopini (x_d). Pri večjem pretoku, pri katerem sta dotok svežega medija in odnašanje ZU iz delovne čaše pospešena, je količina sproščene učinkovine v delovnem mediju nižja kot v primeru počasnejših pretokov in manjša je verjetnost, da bi raztopljena ZU ovirala proces raztapljanja. Posledično je hitrost raztapljanja višja in več je sproščene ZU.

pH profile smo določali pri pretoku 2 ml/min. Pri povečanih pretokih jih nismo določevali, vendar smo predvidevali, da je pri pretokih 3 ml/min in 4 ml/min pH preskok hitreje dosežen, kar lahko dodatno vpliva na pospešeno sproščanje ZU pri večjem pretoku. Raztopina v delovni čaši se pri večjem pretoku izmenja v krajšem času in FO je zato hitreje izpostavljena pogojem, v katerih se gastrozistentna obloga raztaplja.

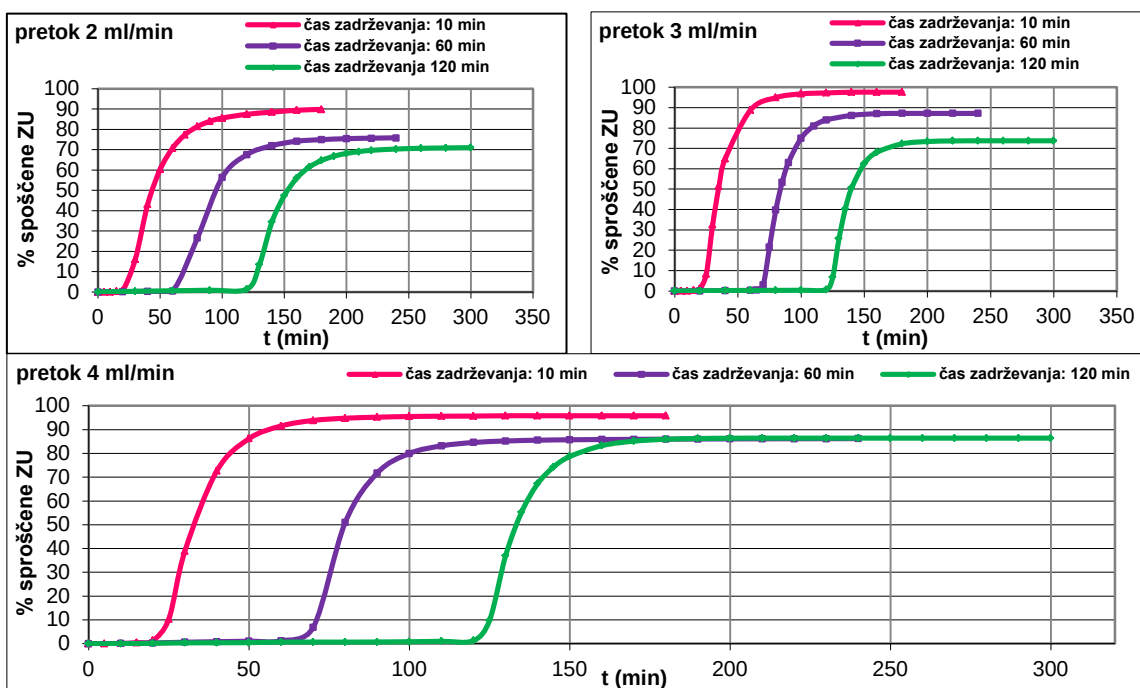
Acidolabilno ZU smo zbirali v merilne valje z 0,1 M raztopino NaOH. Pri pospešenem pretoku je bila sproščena ZU hitreje prečrpana v merilni valj, kjer je obstojna. Najverjetneje je bil tudi zato delež razpadle ZU pri poskusih z večjim pretokom manjši.

Vpliv časa zadrževanja v kislem na sproščanje: na Sliki 16 so predstavljeni profili sproščanja pri posamezni hitrosti pretoka in različnih časih zadrževanja v kislem 10, 60 in 120 min, s katerimi smo ponazarjali variabilno praznjenje pelet iz želodca. Pri posameznem pretoku se je sprostilo več ZU, ko je bil čas zadrževanja v kislem krajši.

Z daljšanjem časa v kislem lahko začne gastrozistentna obloga popuščati, medij lahko pride v stik z acidolabilno ZU in le-ta razpade. Poškodbe obloge zaradi mehanske sile (mešanje z magnetom v silikonski cevki) ali nepravilnosti na oblogi (nepopolno oblaganje s polimerom, možne razpoke) lahko dodatno prispevajo k vdoru kisline in razpadu ZU.

Daljši kot je čas v kislem, več je možnosti, da se napake na oblogi izrazijo oziroma da pride do poškodb obloge.

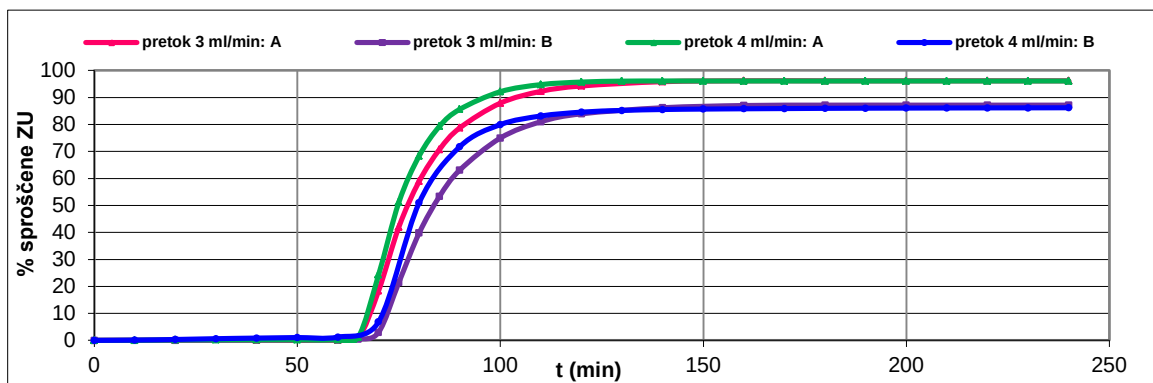
Pri poskusu TS – 9 (pretok 4 ml/min, 120 min v kislem) je celokupna količina sproščene ZU visoka, čeprav je bil čas zadrževanja v kislem tedaj najdaljši in smo pričakovali, da bo delež razpadle ZU večji. To je lahko v določeni meri povezano s povečanim pretokom, ki je pospešil raztapljanje in odvod sproščene ZU iz delovne čase v merilni valj z 0,1 M NaOH, kjer je ZU stabilna in ne razpada, vendar bi pričakovali, da je vpliv pretoka viden pri vseh krivuljah. Možno je tudi, da je med testiranjem prišlo do eksperimentalnih napak.



Slika 16: Primerjava povprečnih profilov sproščanja pri različnih časih zadrževanja v kislem in pretoku:
 Zgoraj levo: pretok 2 ml/min: 10 min (TS - 1), 60 min (TS - 2), 120 min (TS - 3).
 Zgoraj desno: pretok 3 ml/min: 10 (TS - 4), 60 min (TS - 5), 120 min (TS - 6).
 Spodaj: pretok 4 ml/min: 10 min (TS - 7), 60 min (TS - 8), 120 min (TS - 9).

❖ Primerjava sproščanja iz Oblike A in B

Sproščanja iz Oblike A in B smo najprej testirali pri pretokih 3 in 4 ml/min ter s časom izpostavljenosti kislemu mediju 60 min. S testi smo ugotavljali, kako se obliki obnašata pri različnih pretokih in kakšno je sproščanje (Slika 17).



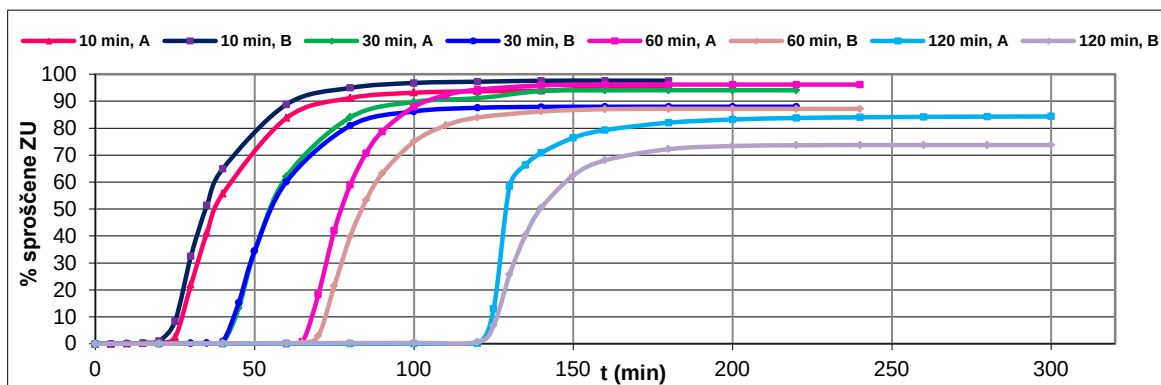
Slika 17: Primerjava povprečnih profilov sproščanja Oblike A in B pri pretoku 3 ml/min: Oblika A (TS – 11) in Oblika B (TS – 5) ter 4 ml/min: Oblika A (TS – 12) in Oblika B (TS – 8).

Na Sliki 17 vidimo, da so razlike med profiloma sproščanja Oblike A in B pri posameznem pretoku precej velike. Razlike se pokažejo po zamenjavi medija in predvidenem začetku sproščanja - pri obeh pretokih se je ZU prej, hitreje in v večji meri sproščala iz Oblike A. Pri obeh oblikah opazimo zamik začetka sproščanja, nekoliko večji je zamik pri profilih sproščanja iz Oblike B.

Sestave Oblike A in B nismo poznali, vendar smo glede na opažanja med izvedbo poskusov sklepali, da se sestavi razlikujeta, kar je najverjetneje vplivalo tudi na razlike v % sproščene ZU. Med testiranjem smo namreč opazili različno obnašanje posamezne FO - pri Obliki A se je delovni medij po menjavi medijev hitro zbistril, nasprotno kot pri Obliki B. Obliki imata lahko različne pomožne snovi, sestavo pelet in različne gastrozistentne obloge. Na sproščanje lahko vplivajo tudi morebitne napake oziroma poškodbe na oblogi in debelina le-te ter mehanske sile v delovni čaši, saj se posamezna oblika nanje različno odziva.

S testi sproščanja, izvedenimi pri pretoku 3 ml/min in časih izpostavljenosti kislemu mediju 10, 30, 60 in 120 min, smo ugotavljali vpliv časa zadrževanja v kislem na sproščanje iz Oblike A in B (Slika 18).

Profil sproščanja Oblike B po 10 min v kislem je strmejši in % sproščene ZU je večji kot pri Obliki A. Profila sproščanja Oblike A in B po 30 min zadrževanja v kislem se v začetnem delu prekrivata, po 100 min pa je že opaziti povečano sproščanje iz Oblike A. Pri poskusu z Obliko B in 60 min v kisli fazi je viden precejšen zamik začetka sproščanja v primerjavi z Obliko A.



Slika 18: Primerjava povprečnih profilov sproščanja Oblike A in B pri pretoku 3 ml/min in

10 min zadrževanja v kislem: Oblika A (TS – 14), Oblika B (TS – 4),

30 min zadrževanja v kislem: Oblika A (TS – 15), Oblika B (TS – 13),

60 min zadrževanja v kislem: Oblika A (TS – 11), Oblika B (TS – 5),

120 min zadrževanja v kislem: Oblika A (TS – 16) Oblika B (TS – 6).

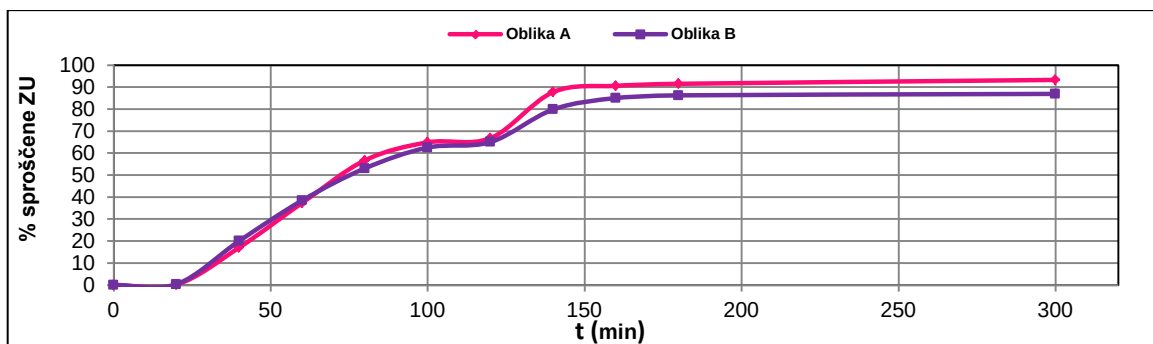
Z daljšanjem časa zadrževanja v kislem se razlike med oblikama povečujejo. Razen pri poskusu s časom zadrževanja v kislem 10 min, se je več ZU sprostilo iz Oblike A. Predvidevali smo, se je iz Oblike B sprostilo manj ZU, ker je je več razpadlo. Najverjetneje se je z daljšo izpostavljenostjo kislemu okolju učinkovitost gastrozistentne obloge Oblike B v primerjavi z Obliko A zmanjševala (ko je bil pri poskusu 10 min v kislem vpliv kisline na FO minimalen, se je iz Oblike B celokupno sprostilo več ZU kot iz Oblike A).

5.2.3 Oteženi profil sproščanja

Profile sproščanja, ki smo jih izvedli pri pretoku 3 ml/min in časih zadrževanja v kislem 10, 30, 60 in 120 min, smo otežili s frakcijami pelet, ki se v določenem časovnem intervalu izpraznijo iz želodca. Z oteženimi profili sproščanja Oblike A in B smo želeli napovedati *in vivo* profile sproščanja (Slika 19).

Z različnimi časi zadrževanja v kislem smo ponazarjali postopno praznjenje pelet iz želodca. Časi zadrževanja v kislem so predstavljali sredino časovnega intervala za izračun deleža pelet, ki zapustijo želodec. Frakcije pelet smo nato množili s sproščeno ZU.

Zaradi manjšega števila časovnih intervalov, s katerimi smo ponazarjali praznjenje pelet iz želodca, sta otežena profila sproščanja stopničasta.



Slika 19: Povprečna otežena profila sproščanja Oblike A in B.

Do približno 80 min so razlike med oteženima profiloma majhne. Časovne točke po 80 min smo upoštevali v enem časovnem intervalu praznjenja pelet (80 min - 160 min, z dodanim deležem pelet, ki se praznijo po 160 min). Na Sliki 19 je pri obeh oteženih profilih opaziti manjši plato v območju zadnjega časovnega intervala. Večje razlike med oteženima profila se kažejo predvsem od 140 min dalje. Končni oteženi % sproščene ZU je večji pri Obliki A.

Za pridobitev bolj realnih oteženih profilov in boljše napoved *in vivo* profilov sproščanja bi morali izvesti več poskusov z različnimi časi zadrževanja v kislem, saj v *in vivo* pogojih ne dobimo stopničastih profilov.

5.3 Možnosti za dodatne poskuse

- ❖ V diplomski nalogi smo na pretočnem sistemu simulirali pH profile v GIT po prehodu FO iz želodca v dvanajstnik. Z dodatnimi poskusi bi lahko podaljšali pH profile z natančnejšo simulacijo pH v tankem in debelem črevesu. Te pH profile bi lahko na primer uporabili za testiranje sproščanja s FO, pri katerih se ZU sprošča v debelem črevesu.
- ❖ S preliminarnimi testi sproščanja smo poskušali ugotoviti vpliv pH simuliranih želodčnih medijev na sproščanje. Izvedli bi lahko večje število testov sproščanja z več različnimi izhodnimi mediji (lahko bi uporabili medije, s katerimi smo simulirali šest različnih pH profilov v zgornjem delu GIT).
- ❖ Sproščanje smo testirali pri štirih časih zadrževanja v kislem. Za boljše napoved *in vivo* profilov sproščanja in podrobnejšo analizo vpliva časa zadrževanja v kislem bi bilo potrebno izvesti večje število poskusov pri več različnih časih izpostavljenosti kislemu mediju (npr. 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200 min).

6 SKLEP

V diplomski nalogi smo optimizirali pogoje in izvedbo testov sproščanja na pretočnem sistemu. Testirali smo sproščanje iz gastrozistentnih pelet.

Na pretočnem sistemu smo simulirali fiziološki pH profil od želodca do TČ in optimizirali sistem za določevanje pH profilov. Medije, ki smo jih uporabili za simulacijo pH okolja v želodcu in TČ, smo uporabili pri testiranju sproščanja ZU iz gastrozistentnih pelet, ki so vgrajene v orodisperzibilne tablete Oblike A in B. Teste sproščanja smo izvajali pri različnih hitrostih pretoka in časih izpostavljenosti kislemu mediju, preučevali smo vplive na sproščanje ter primerjali sproščanje iz Oblike A in B. *In vivo* profile sproščanja smo poskušali napovedati z oteženimi profili sproščanja. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

❖ Simulacija pH profila na pretočnem sistemu

Na pretočnem sistemu lahko z menjavo medijev simuliramo fiziološki pH profil. Želodčni medij smo posnemali z raztopino HCl, hiter pH preskok po prehodu oblike preko pilorusa smo dosegli z dodatkom raztopine Na_3PO_4 , črevesni medij pa smo simulirali s fosfatnim pufrom s $\text{pH} = 6,8$.

❖ Vpliv pretoka na sproščanje

Pri povečanem pretoku se sprosti več ZU in sproščanje je pospešeno. Pri večjem pretoku se ZU najverjetneje hitreje raztaplja zaradi nižje koncentracije ZU v raztopini, sproščena ZU je hitreje odvedena v merilni valj, kjer je stabilizirana z 0,1 M NaOH, in manj je razpade.

❖ Vpliv časa zadrževanja v kislem na sproščanje

Daljši čas zadrževanja v kislem zmanjša % sproščene ZU. Dlje časa kot je oblika izpostavljena kislemu okolju, večja je verjetnost popuščanja obloge in razpada acidolabilne ZU v kislem okolju - večji razpad v kislem zaznamo kot manjši celokupen obseg sproščene ZU.

❖ Primerjava sproščanja iz Oblike A in B

ZU se hitreje sprošča iz Oblike A. Z daljšanjem časa izpostavljenosti kislemu mediju se razlike med profili sproščanja Oblike A in B povečujejo. Na sproščanje verjetno vpliva različna sestava pelet in gastrozistentne obloge Oblike A in B. Pri Obliki B je delež razpadle ZU večji.

❖ Oteženi profili sproščanja

Z oteženimi profili sproščanja lahko napovemo *in vivo* profile sproščanja, saj tedaj v izračunih profilov sproščanja upoštevamo tudi kinetiko praznjenja iz želodca. V začetnem delu sta povprečna otežena profila sproščanja Oblike A in B podobna, večje razlike se nakazujejo po 140 min. Pri Obliki A je bil končni oteženi % sproščene ZU večji. Za boljšo napoved *in vivo* profilov sproščanja bi morali izvesti več poskusov z različnimi časi izpostavljenosti kislemu mediju.

7 VIRI IN LITERATURA

- 1) Pocock G, Richards CD, de Burgh Daly M: Human Physiology, The Basis of Medicine, Oxford University Press, New York, 1999: 395
- 2) Kališnik M, Klun B, Sket D, ur.: Slovenski medicinski slovar, peta razširjena izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2014: 509, 463
- 3) https://en.wikipedia.org/wiki/Human_gastrointestinal_tract#/media/File:Stomach_colon_rectum_diagram-en.svg (Dostop: oktober 2015)
- 4) Mutschler E, Derendorf H, Schafer-Korting M, et al.: Drug Actions, Basic Principles and Therapeutic Aspects, Medpharm, Stuttgart, 1995: 5-6
- 5) Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, et al.: Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms, Pharmaceutical Research, 1998; 15: 11-22
- 6) Azarmi S, Wilson R, Löbenberg R: Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms, International Journal of Pharmaceutics, 2007; 328: 12-21
- 7) Dressman JB, Berardi RR, Dermentzoglou LC, et al.: Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women, Pharmaceutical Research, 1990; 7: 756-761
- 8) Schiller C, Frohlich CP, Giessmann T, et al.: Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging, Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2005; 22: 971-979
- 9) Varum FJO, Merchant HA, Basit AW: Oral modified-release formulations in motion: the relationship between gastrointestinal transit and drug absorption, International Journal of Pharmaceutics, 2010; 395: 26-36
- 10) Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, et al.: *In vitro* models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014; 57: 342-366
- 11) Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, et al.: A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behaviour of orally administered dosage forms under various physiological conditions, Pharmaceutical Research, 2004; 21: 585-590
- 12) Oberle RL, Chen TS, Lloyd C, et al.: The influence of the interdigestive migrating myoelectric complex on the gastric emptying of liquids, Gastroenterology, 1990; 99: 1275-1282

- 13) Kerlin P, Zinsmeister A, Phillips S: Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine, *Gastroenterology*, 1982; 82: 701-706
- 14) Schindlbeck NE, Heinrich C, Müller-Lissner SA: Relation between fasting antroduodenal motility and transpyloric fluid movements, *The American Journal of Physiology*, 1989; 257: 198-201
- 15) Savoye G, Savoye-Collet C, Oors J, et al.: Interdigestive transpyloric fluid transport assessed by intraluminal impedance recording, *The American Journal of Physiology*, 2003; 284: G663-G669
- 16) O'Donovan D, Hausken T, Lei Y, et al.: Effect of aging on transpyloric flow, gastric emptying, and intragastric distribution in healthy humans – impact on glycemia, *Digestive Diseases and Science*, 2005; 50: 671-676
- 17) Jones KL, O'Donovan D, Horowitz M, et al.: Effects of posture on gastric emptying, transpyloric flow, and hunger after a glucose drink in healthy humans, *Digestive Diseases and Science*, 2006; 51: 1331-1338
- 18) Garbacz G, Cade D, Benamuer H, et al.: Bio-relevant dissolution testing of hard capsules prepared from different shell materials using the dynamic open flow through test apparatus, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 57: 264-272
- 19) Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, et al. : Effect of changing intestinal flow rate on the measurement of intestinal permeability, *Gastroenterology*, 1995; 108: 983-989
- 20) Žvar S: Preučevanje vpliva časa zadrževanja gastrozistentnih pelet v biorelevantnem želodčnem mediju na sproščanje učinkovine, diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012
- 21) Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M: Gastric emptying of pellets under fasting condition: a mathematical model, *Pharmaceutical Research*, 2009; 27: 1607-1617
- 22) Garbacz G, Kolodziej B, Koziol M, et al.: A dynamic system for the simulation of fasting luminal pH-gradients using hydrogen carbonate buffers for dissolution testing of ionisable compounds, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 51: 224-231
- 23) European Pharmacopoeia 6.0, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, 2007, 265-275

- 24) Goldberg RN, Kishore N, Lennen RM: Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers, Journal of Physical and Chemical Reference Data, 2002; 31: 231-370 (321)
- 25) Pocock G, Richards CD, de Burgh Daly M: Human Physiology, The Basis of Medicine, Oxford University Press, New York, 1999: 539
- 26) Li X, Jasti BR: Design of controlled release drug delivery systems, The McGraw-Hill, New York, 2006: 142-144
- 27) Hörter D, Dressman JB: Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, Advanced Drug Delivery Reviews, 1997; 25: 3-14