

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN BOŽIČ

***IN VITRO SIMULACIJA pH PROFILA PREBAVNEGA TRAKTA  
IN VPLIV NA SPROŠČANJE NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA***

***IN VITRO SIMULATION OF THE GASTROINTESTINAL pH PROFILE AND  
THE IMPACT ON THE RELEASE OF DICLOFENAC SODIUM***

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Mariji Bogataj, mag. farm. za strokovno vodenje in usmerjanje pri izdelavi magistrskega dela. Za pomoč in praktične nasvete pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Greti Cof, dipl. ing. kem. tehn. in Petri Rizmal, mag. farm.

Velika zahvala gre moji zaročenki Barbari Jež za spodbudne besede in razumevanje ter mojim domačim za vso izkazano podporo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj, mag. farm.

Klemen Božič

## **VSEBINA**

VSEBINA .....	I
POVZETEK .....	III
ABSTRACT .....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1 UVOD .....	1
1.1 pH V PREBAVNEM TRAKTU V STANJU NA TEŠČE .....	1
1.2 VARIABILNOST pH GIT .....	1
1.2.1 INTERINDIVIDUALNA VARIABILNOST pH GIT .....	1
1.2.2 INTRAINDIVIDUALNA VARIABILNOST pH GIT .....	2
1.3 MERJENJE pH IN PREHODOV GIT Z RTK METODO .....	3
1.4 ŠTUDIJE S PODATKI O PADCU pH NA PREHODU IZ TERMINALNEGA TANKEGA ČREVESA V CEKUM .....	3
1.4.1 ŠTUDIJE Z INDIVIDUALNIMI PODATKI O PADCU pH NA PREHODU IZ TERMINALNEGA TANKEGA ČREVESA V CEKUM .....	8
2 NAMEN .....	9
3 MATERIALI IN METODE .....	10
3.1 MATERIALI IN APARATURE .....	10
3.1.1 MATERIALI .....	10
3.1.2 APARATURE .....	10
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN .....	11
3.2.1 KISLINE IN RAZTOPINE SOLI .....	11
3.2.2 FOSFATNI PUFRI .....	12
3.2.3 REDČENI MCILVAINOVI PUFRI .....	12
3.3 METODE .....	14
3.3.1 ANALIZA VZORCEV .....	14
3.3.2 UMERITVENE PREMICE .....	14
3.3.3 IZVEDBA POSKUSOV NA PRETOČNEM SISTEMU .....	16
3.3.4 PRELIMINARNI POSKUSI .....	17
3.3.5 SIMULACIJA pH PROFILOV .....	18
3.3.6 IZDELAVA TABLET Z NATRIJEVIM DIKLOFENAKATOM .....	27
3.3.7 TESTI SPROŠČANJA .....	27
4 REZULTATI .....	28

4.1	UMERITVENE PREMICE .....	28
4.2	PRELIMINARNI POSKUSI .....	28
4.2.1	NASTAVITEV PRETOKA SKOZI CEVKE .....	28
4.2.2	OCENA KOLIČINE $H_3PO_4$ ZA SIMULACIJO PADCEV pH .....	29
4.3	SIMULACIJA pH PROFILOV .....	29
4.3.1	TESTI HITREGA DVIGA pH .....	29
4.3.2	SIMULACIJA pH PROFILOV S FOSFATNIMI PUFRI .....	30
4.3.3	SIMULACIJA pH PROFILOV Z REDČENIMI MCILVAINOVIMI PUFRI	34
4.4	TESTI SPROŠČANJA .....	39
4.4.1	PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 7,0 .....	39
4.4.2	PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 7,5 .....	40
4.4.3	PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 8,0 .....	41
5	RAZPRAVA .....	42
5.1	UMERITVENE PREMICE .....	43
5.2	PRELIMINARNI POSKUSI .....	44
5.2.1	NASTAVITEV PRETOKA SKOZI CEVKE .....	44
5.3	SIMULACIJA pH PROFILOV .....	45
5.3.1	SIMULACIJA HITREGA DVIGA pH (ŽELODEC – DVANAJSTNIK) .....	45
5.3.2	SIMULACIJA NARAŠČANJA pH DO PLATOJA (TANKO ČREVO) .....	47
5.3.3	SIMULACIJA PADCA pH (TANKO ČREVO – CEKUM) .....	53
5.3.4	SIMULACIJA KONSTANTNEGA pH (DESNO DEBELO ČREVO) .....	54
5.3.5	VSI pH PROFILI .....	54
5.4	TESTI SPROŠČANJA .....	56
5.4.1	TESTI SPROŠČANJA NA SISTEMU S SINKERJEM .....	56
5.4.2	TESTI SPROŠČANJA NA SISTEMU S KROGLICAMI .....	59
6	SKLEP .....	60
7	VIRI IN LITERATURA .....	61

## **POVZETEK**

pH se vzdolž prebavnega trakta spreminja: od kislega v želodcu poskoči do skoraj nevtralnega že v dvanajstniku, naraste do rahlo bazičnega vzdolž tankega črevesa, v cekumu nekoliko upade, v debelem črevesu pa spet počasi naraste do nevtralnega. Namen magistrske naloge je bil na pretočnem sistemu simulirati značilne spremembe in nivoje pH v prebavnem traktu ter preveriti vpliv različnih sprememb pH na sproščanje učinkovine iz ogrodnih tablet. Z zaporedno uporabo več različnih medijev smo simulirali pH profile prebavnega trakta od želodca do debelega črevesa. Simulacije pH profilov in poskuse sproščanja na sistemu s sinkerjem smo izvajali pri pretoku 2 mL/min, s 40 mL medija v delovni čaši pri temperaturi 37 °C in hitrostjo vrtenja magnetnega mešala 100 rpm. Na sistemu s kroglicami smo poskuse sproščanja izvajali pri nižji hitrosti vrtenja magnetnega mešala 60 rpm. Kot želodčni medij smo uporabili različne koncentracije HCl. Hiter dvig pH na 6, ki nastopi ob prehodu v dvanajstnik, smo ponazorili z dovajanjem različnih koncentracij raztopine trinatrijevega fosfata v želodčni medij, počasno naraščanje pH (90 min) od 6 do platoja v drugi polovici tankega črevesa pa nadalje z dovajanjem fosfatnih in redčenih McIlvainovih pufrov različnih pH in koncentracij. Simulirali smo tri različne pH platoje: 7,0; 7,5; 8,0. Slediči padec pH za 1,5 enote, ki se pojavi ob vstopu v cekum, smo dosegli z uporabo razredčene ortofosforne kislino, po padcu pH pa smo z redčenimi McIlvainovimi pufri vzdrževali tri različne nivoje pH (5,4; 6,0; 6,6) do konca poskusov – simulacija prehoda skozi desno debelo črevo.

Ugotovili smo, da fosfatni pufri ne omogočajo simulacije počasnega kontinuiranega naraščanja pH od hitrega dviga do platoja, kar je posledica nizke pufrne kapacitete v tem pH območju. Kontinuirano naraščanje pH do vseh treh pH platojev smo dosegli z redčenimi McIlvainovimi pufri, ki imajo kot sestavljeni pufri širše pH območje pufranja. Z redčeno ortofosforno kislino smo uspešno simulirali oster padec pH, redčeni McIlvainovi pufri pa so omogočali vzdrževanje konstantnega pH od padca pH do konca poskusov. Razlike v pH med tremi različnimi nivoji končnega pH v distalnem tankem črevesu niso bistveno vplivale na sproščanje učinkovine: hitrost sproščanja je pri vseh rahlo upadla po simuliranem padcu pH v 180. min, ker je učinkovina pri nižjih pH slabše topna. Pri poskusih sproščanja na sistemu s kroglicami trenje kroglic ob tableto povzroča sprotno erozijo zunanjih nabreklih plasti tablete in omogoči hitrejše sproščanje tudi učinkovini iz notranjosti tablete, kar se izrazi v višjem % sproščene učinkovine v istem času v primerjavi s poskusi na sistemu s sinkerjem.

**Ključne besede:** simulacija pH profilov prebavnega trakta, gastrointestinalni trakt, pretočni sistem, sproščanje učinkovine.

## **ABSTRACT**

pH of the lumen content varies along the gastrointestinal tract. It rises from the acidic in the stomach to the nearly neutral in the duodenum, reaches slightly alkaline values in the distal small intestine, rapidly drops in caecum and rises back to neutral along the colon. The aim of our work was to simulate these characteristic changes and plateau of pH values in flow through system and to verify their impact on a drug release from the matrix tablet.

Gastrointestinal pH profiles were simulated using several different media successively. The beaker contained 40 mL of medium, thermostated at 37 °C. All the experiments were carried out at a flow rate of 2 mL/min and stirring rate 100 rpm except those, performed on a system with glass beads (60 rpm). HCl solutions of various concentrations served as a gastric medium. A sharp rise in pH, signifying gastric emptying, was achieved by introducing Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solutions (various concentrations) in HCl. A slow (90 min) and continuous rise in pH to the plateau, simulating proximal small intestine, and pH plateau, simulating distal small intestine, were achieved by introducing various phosphate and diluted McIlvaine buffers in a beaker. Three pH plateaus (7.0; 7.5; 8.0) were simulated, representing variability of pH in the distal small intestine. A drop of 1.5 pH units, signifying a passage from small intestine to caecum, was achieved with introduction of diluted phosphoric acid. Different pH levels (5.4; 6.0; 6.6 – according to the values in terminal small intestine) were then sustained for 60 min, simulating the transition through the beginning of the right colon.

Phosphate buffers appeared to be inappropriate medium for simulation of slow and continuous rise of pH from value 6 to the plateau, due to low buffer capacity in pH area 3–7. In contrast, using diluted McIlvaine buffers, consisting of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and citric acid, with a wider range of high buffer capacity, a gradual rise in pH was achieved. Diluted phosphoric acid has proven to be a suitable medium for simulation of a sharp pH drop. The constant pH, following the pH drop, was also maintained using diluted McIlvaine buffer solutions. Differences in pH between three pH plateaus of the distal small intestine did not have important impact on drug release from matrix tablets. The rate of drug release was seen to be slightly reduced after the simulation of pH drop at all pH profiles, as a consequence of lower drug solubility at lower pH (pKa of diclofenac: 3,80). Glass beads, used in four experiments, eroded the swollen layers of tablet and thus accelerated the drug release by allowing the drug from inner layers of tablet to release.

**Key words:** simulation of GI pH profiles, gastrointestinal tract, flow through system, drug release.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

**CK** – cekum (slepo črevo)

**DČ** – debelo črevo

**DDM** – duodenum (dvanajstnik)

**GIT** – gastrointestinalni trakt

**ICJ** – ileocecal junction (ileocekalna povezava)

**MO** – mikroorganizmi

**rpm** – Revolutions per minute (število obratov na minuto)

**RTK** – radiotelemetrična kapsula

**SD** – standardna deviacija (odklon)

**TI** – terminalni ileum

**TČ** – tanko črevo

**TNAF** – trinatrijev fosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

**ZU** – zdravilna učinkovina

# **1 UVOD**

pH vrednost v lumnu gastrointestinalnega trakta (GIT) pomembno vpliva na farmakokinetiko peroralnih FO: od pH so med drugim odvisni raztapljanje oblog in ogroj za prirejeno sproščanje, nabrekanje FO in hitrost sproščanja učinkovin iz le-teh. Pri načrtovanju FO s prirejenim sproščanjem potrebujemo podatke o pH profilu zdravega GIT ter o posebnostih, ki nastopijo v primeru različnih bolezenskih stanj.

## **1.1 pH V PREBAVNEM TRAKTU V STANJU NA TEŠČE**

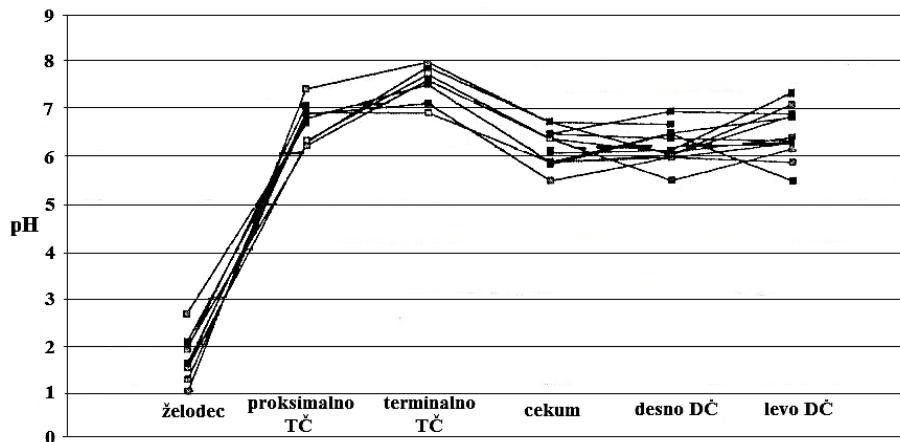
pH profil GIT se začne s kislim želodčnim okoljem, nadaljuje z nenadnim dvigom pH ob prehodu iz želodca v dvanajstnik (DDM) in počasnim naraščanjem pH vzdolž tankega črevesa (TČ). Sledi hiter padec pH ob vstopu v cekum (CK) ter rahlo naraščanje pH vzdolž debelega črevesa (DČ) [1]. Želodčna kislina sodeluje pri razgradnji hrane in ščiti pred zaužitimi mikroorganizmi (MO), učinkovito pufranje vsebine GIT v DDM pa pospešuje tvorbo micelov ter optimizira delovanje pankreatičnih encimov [2]. Ti postanejo funkcionalni šele, ko pH preseže 5,5. Sluznica v TČ protone iz lumna izmenjuje za natrijeve katione in kloridne anione za bikarbonatne, zato pH od jejunuma proti ileumu narašča [3]. V distalnem TČ se vzpostavi plato z relativno visokim pH in malo nihanji, ki se ohranja do konca TČ [4]. Po prehodu iz TI v CK (ileocekalno območje – ICJ) pride do ostrega padca pH [3]. MO namreč predvsem v CK in ascendentnem DČ povzročajo fermentacijo neabsorbiranih ogljikovih hidratov do kratkoverižnih maščobnih kislin, zaradi katerih je pH v CK več kot 1 enoto nižji kot v ileumu [1, 5, 6]. Vzdolž DČ in do rektuma se pH dvigne do nevtralnega ali rahlo bazičnega [7, 8, 9].

## **1.2 VARIABILNOST pH GIT**

### **1.2.1 INTERINDIVIDUALNA VARIABILNOST pH GIT**

V študijah [2–9] raziskovalci poročajo o značilnem hitrem dvigu pH vrednosti ob praznjenju vsebine želodca v DDM, Camilleri in sodelavci [1] pa pri štirih preiskovancih tega dviga pH niso opazili. V študiji [10] Ibekwe-ja in sodelavcev je interindividualna variabilnost pH v stanju na tešče prikrila morebitne razlike med pH profili v stanjih na tešče in s hrano. Pokazala se je tako v pH platuje ileuma (pH od  $6,7 \pm 0,9$  do  $7,9 \pm 0,1$ ) kot v CK in desnem DČ (pH od  $5,5 \pm 0,7$  do  $7,6 \pm 0,3$ ). Press in sodelavci so v študiji [11] odkrili precejšnjo variabilnost pH vzdolž celotnega GIT med kontrolnimi preiskovanci, kar prikazuje Slika 1. V študijah [8, 10] so pri prehodu skozi ICJ opazili postopen in neizrazit padec pH, pri nekaterih preiskovancih se padec niti ni pojavit, kar je v nasprotju s študijami [2–7], ki

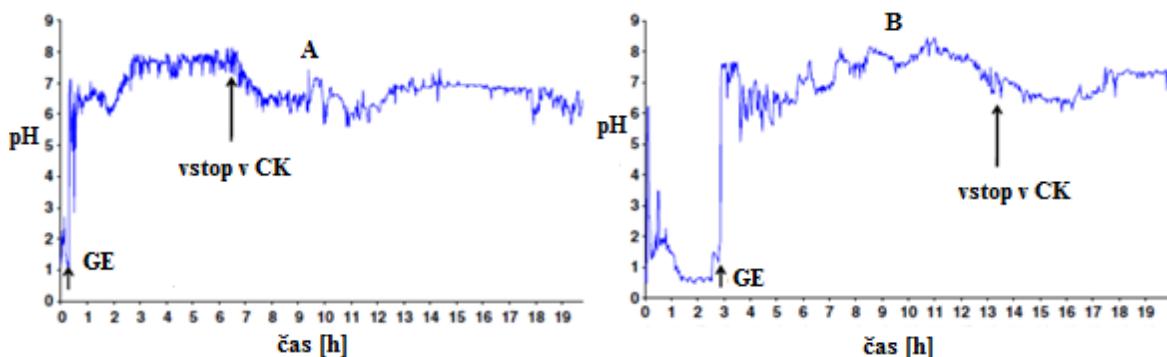
poročajo o nenadnem padcu pH. Možni vzroki za neizrazit padec pH so: ileocekalna zaklopka, ki dopušča refluks flore iz CK v TI (prisotnost bakterij v TI povzroči zakisanje vsebine črevesa že pred vstopom v CK), neobičajna prehrana, zaužitje obroka pred preiskavo ali posebnosti populacije MO v GIT pri posamezniku [1, 6, 12]. V študiji [6] Zaratejeve in sodelavcev je do padca pH pri različnih preiskovancih prišlo na različnih mestih blizu ICJ, pa tudi velikosti padca so se razlikovale: v primerih, ko je do padca pH prišlo v CK, je pH upadel za  $1,35 \pm 0,20$  enote, v primerih padca pH v ascendentnem DČ pa za  $1,7 \pm 0,1$  enote.



**Slika 1:** Individualni pH profili od želodca do levega debelega črevesa za 12 kontrol iz študije [11]. Prikazane so mediane pH vrednosti za posamezen predel GIT pri posamezniku (prirejeno po [11]).

### 1.2.2 INTRAINDIVIDUALNA VARIABILNOST pH GIT

V študiji [12] so pri več kot polovici od 13 preiskovancev, pri katerih so meritev pH GIT opravili dvakrat v nekaj dnevih, zaznali variiranje pH med dnevi v 7 od 10 segmentov, na katere so razdelili celotni GIT. Največje koeficiente variacije so izračunali za želodec, DDM, CK in rektum. Nivo pH v distalnem TČ je preko regulatornih mehanizmov zelo natančno uravnan, saj je bila tam variabilnost najmanjša. Veliko intraindividualno variabilnost so v študiji [10] dokazali z dvema preiskavama pH profila v stanju na tešče pri enemu preiskovancu v razmaku enega tedna (Slika 2).



**Slika 2:** Dva pH profila istega preiskovanca, izdelana v enotedenskem razmaku: A) na začetku študije, B) en teden kasneje, ki kažeta na veliko intraindividualno variabilnost pH GIT (prirejeno po [10]).

### **1.3 MERJENJE pH IN PREHODOV GIT Z RTK METODO**

Metoda z radiotelemetrično kapsulo (RTK) je validirana kot natančna metoda za meritve pH in časov prehodov v TČ in DČ [13]. RTK je inertna, neprebavljiva kapsula, ki v rednih intervalih meri intraluminalni pH, tlak in temperaturo, medtem ko prosto potuje skozi GIT. Lokacijo RTK se lahko (na 5 cm natančno) spremišča površinsko z uporabo radijskega detektorja: RTK je tam, kjer je prejeti signal najmočnejši [4, 7]. Ta način ni zanesljiv, ker je moč prejetega signala odvisna tudi od orientacije RTK, ne le od njene položaja [12]. Bolj natančna (na 0,5–1 cm) je tehnika z detektorjem kovin, ki zaznava kovinsko kroglico, pritrjeno na kapsulo, uporablja pa se tudi fluoroskopija [9, 12, 14, 15]. RTK podatke o meritvah z določeno frekvenco oddaja sprejemniku, ki ga preiskovanec nosi s seboj. Podatke se preko USB povezave prenese s sprejemnika na računalnik [1]. Pred uporabo je kapsulo potrebno aktivirati in umeriti v pufrih pri 37 °C [14]. Sodobne kapsule temeljijo na zunanjih steklenih elektrodi, v notranjosti pa imajo referenčno Ag/AgCl elektrodo. Vgrajena baterija lahko oskrbuje RTK z električno energijo vsaj 5 dni, kar zadostuje za opravljanje meritev po celotnem GIT [16]. Za izpraznjenje trdnih delcev (tudi RTK) iz želodca je potrebna aktivnost migracijskega motoričnega kompleksa, v TČ potuje RTK nemoteno, skozi ICJ pa lahko prehaja le ob premikih bolusa [1]. Zaradi primerljive velikosti s tabletami nam lahko RTK da dober vpogled v gastrointestinalni prehod takih tablet [14]. Po potrebi se lahko kapsulo priveže na nit, da se upočasni njen prehod skozi GIT; tako se lahko opravi več meritev v določenem predelu [17]. Po preiskavi se kapsulo sterilizira in z umeritvenimi pufri ponovno preveri točnost meritev. Ker so sprejemniki podatkov prenosni, preiskovancem omogočajo opravljanje vsakodnevnih aktivnosti; raziskave se lahko opravljajo v fizioloških pogojih [4]. Slabosti RTK metode so: tehnični zapleti, neuporabnost, če preiskovanec ne more požirati, težave s prehajanjem skozi GIT in relativno visoki stroški [1].

### **1.4 ŠTUDIJE S PODATKI O PADCU pH NA PREHODU IZ TERMINALNEGA TANKEGA ČREVESA V CEKUM**

Pri pregledu literature smo iskali strokovne članke s podatki o pH GIT pri zdravih odraslih v stanju na tešče. Posebej so nas zanimale ekstremne vrednosti pH v TI in CK. V vseh obravnavanih študijah so pH profil GIT določali z uporabo RTK; v primerih [3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15] z RTK Remote Control Systems, London (RCS), pri preiskavah [1, 2, 5, 6, 16, 18, 19] pa z RTK SmartPill Corporation, Buffalo, New York (SP). Pri študiji [10] so uporabili RTK Bravo®, pri študiji [20] pa RTK Rigel Research Ltd. Preiskovanci so bili,

razen pri študijah [2, 5, 17, 18], tešči čez noč pred preiskavo in do praznjenja želodca, ki so ga zaznali kot hiter dvig pH. Diete so predpisali v štirih preiskavah [6, 8, 16, 18].

Camilleri in sodelavci so v študiji [1] s scintigrafijo dokazali, da zaznani padec pHsovпада s prihodom z radioizotopom označene RTK v CK oziroma ascendentno DČ.

Gelfond in sodelavci [2] so pH profil GIT pri pacientih s cistično fibrozo primerjali z zdravimi kontrolami. Preiskovanci so kapsulo zaužili skupaj z obrokom. Pri štirih kontrolah se je vsebina že v prvi minuti po prihodu iz želodca v DDM napufrala do pH nad 6,0. Prehod iz ileuma v DČ so definirali s pojavom ostrega padca pH za več kot 1 enoto, po katerem pH ni več narastel na povprečni pH iz ileuma.

Preiskovanci v študiji Gilberta in sodelavcev [3] so bili ves čas raziskave v ambulanti. Prehod RTK iz želodca v DDM je pri vseh preiskovancih spremeljal nenaden porast pH nad 6. V 1. uri prehoda TČ so zaznavali kratkotrajne fluktuacije pH ter izmerili povprečen pH  $6,61 \pm 0,58$  (manj kot 1 % tega časa je bil pH nižji od 6). pH se je nato stabiliziral in postopoma naraščal do platoja. Sledil je nekajminutni oster padec pH, kar so smatrali za prihod RTK v CK; ob tem so se ponovno pojavila nihanja pH.

Evans in sodelavci so v 18-mesečni raziskavi [4] preiskovali 66 zdravih odraslih. Diete niso predpisali, ker so želeli dobiti podatke od ljudi vseh starosti z normalno evropsko dieto. Povprečni pH proksimalnega TČ (1. ura v črevesu) je bil  $6,6 \pm 0,5$ . V srednjem TČ (čas med prvo in zadnjo uro prehoda TČ) je bil pH precej konstanten:  $7,4 \pm 0,4$ . V distalnem TČ (zadnja ura pred padcem pH) je bil pH stabilen ( $7,5 \pm 0,4$ ), z malo fluktuacij. Prihod v CK so definirali z ostrim padcem pH na  $6,4 \pm 0,4$ , potem ko je bil le-ta nekaj časa na stabilni ravni iz ileuma. V desnem DČ so bile prisotne večje fluktuacije pH kot v ileumu. V DČ je pH počasi naraščal do  $7,0 \pm 0,7$  (levo DČ). Relativni položaj RTK so določali na podlagi zaznanih velikih sprememb pH vzdolž GIT. Lokacije RTK za posamezne časovne točke so vrisali na skico trebušnega predela, razdeljeno na devet sekcij; metoda je bila validirana z uporabo z radioizotopom označene kapsule in scintigrafijo.

Satish in sodelavci so v preiskavi [5] uporabili RTK in kapsulo z delci velike gostote, ki ne prepuščajo rentgenskih žarkov (markerji). Obe kapsuli so preiskovanci zaužili po predpisanim obroku. Lokacijo markerjev v GIT so dvakrat določili z rentgenom in rezultate primerjali z lokacijami RTK; dokazali so dobro ujemanje rezultatov obeh tehnik. Vstop v CK so določili s padcem pH za več kot 1 enoto, pod pogojem, da je ta nastopal več kot 30 min po praznjenju želodca in da je raven pH po padcu ostala enaka še vsaj 10 min.

Zarate in sodelavci so v študiji [6] skušali z RTK natančno določiti mesto, kjer nastopi padec pH. RTK so v GIT spremljali z dvojno scintigrafijo: RTK je bila označena s kontrastnim sredstvom *Cr[EDTA]*, njeno lokacijo pa so določali relativno na ozadje, označeno s kontrastnim sredstvom *In[DTPA]* (skozi nos so ga po katetru nadzorovano odmerjali direktno v ileum), ki je dobro orisalo anatomijsko v okolici ICJ. Najprej so vsakih 30 min opravili statično slikanje, po vstopu RTK v ileum (definirali so ga s stabilnim pH, višim od 7, ki se je vzpostavil ~ 4 h po praznjenju želodca) pa so začeli z dinamičnim snemanjem (preiskovanec je moral mirovati), ki so ga izvajali, dokler RTK ni prispela do hepatičnega zavoja (zavoj med ascendentnim in prečnim DČ). Slike so potrdile, da je RTK prešla iz TI v CK, zaznali so tudi padec pH za več kot 1 enoto; s stabilnega nivoja pH nad 7 na pH ~ 6. Dinamične slike so pokazale, kako je kontrastno sredstvo *In[DTPA]* prehajalo ICJ s premiki bolusa; z enim od teh je prešla tudi RTK. Lokacija RTK ob padcu pH je bila 3 cm distalno od ICJ (mediana), a so ti podatki nezanesljivi, ker gre za dvodimensionalno merjenje v trodimensionalnem sistemu. Padec pH je nastopil 7,5 min, najnižja vrednost pH pa je bila izmerjena 25 min (mediana) po prehodu RTK skozi ICJ. Ustrezne podatke so dobili pri 9 preiskovancih: pri petih je padec pH nastopil s prihodom RTK v CK, pri dveh ob premiku iz CK v ascendentno DČ, pri dveh pa šele v ascendentnem DČ. Raziskava je pokazala, da padec pH nastopi šele v DČ in ne ob prehodu ICJ, kot so pokazale starejše študije.

Pye in sodelavci so z raziskavo [7] za pH profil pri zdravih ugotovili naraščanje pH od proksimalnega proti distalnemu TČ, padec pH ob vstopu RTK v CK in ponovni porast pH, ko je kapsula potovala proti distalnemu DČ. Pri analizi pH profilov GIT niso odkrili statistično pomembnih razlik med obema spoloma in različnimi starostmi preiskovancev.

V študiji Pressa in sodelavcev [11] so preiskovali 12 zdravih kontrol in bolnike z ulcerativnim kolitisom ali vnetno boleznijo črevesja. Zanimale so jih vrednosti pH v predelih GIT, ključnih za sproščanje protivnetne ZU mesalazina (TI in DČ). Ta se vgraje v tablete, obložene z Eudragitom S, ki se raztopi pri pH nad 7 in tako omogoča ciljano dostavo. Ena kontrola je imela pH v TI nižji od 7, vsi bolniki pa so to raven presegli; polimerna obloga bi se raztopila in ZU bi se lahko sprostila. V CK so imele tri kontrole pH med 6 in 7, pri petih kontrolah pa je bil nižji od 6 (najnižji pH ~ 5,5). V desnem DČ je imelo vseh 12 kontrol pH nižji od 7, pri čemer je bil pH v sedmih primerih celo nižji od 6 (najnižji pH ~ 5,5) [11].

pH profile pacientov z enako boleznijo so preiskovali tudi Ewe in sodelavci [9] in jih primerjali s pH profili zdravih kontrol, da bi ugotovili, če bolezen zniža pH v TI in DČ. Pri

bolnikih so v TI izmerili enak pH kot pri kontrolah: ko je bila RTK v spodnjem desnem delu trebuha, so izmerili pH, višji od 7. Ugotovili so, da se je RTK dolgo zadrževala v CK [9].

Fallingborg in sodelavci [12] so pri vseh preiskovancih za želodec ugotovili vrednosti pH, nižje od 3, vzdolž TČ je pH narastel do 7,3 v distalnem TČ. Pri 17 od 39 preiskovancev se je pH že v zadnji uri prehoda TČ znižal za 0,1–0,8 enote (interval). Ob vstopu RTK v CK so zaznali padec pH za 0,5–2,5 enote (interval). V ascendentnem in prečnem DČ je bil pH skoraj enak kot v CK. Po vsaki meritvi pH so fluoroskopsko zaznavali lokacijo kapsule; pri nekaterih so zaznali retrogradno premikanje kapsule v DČ. Ugotovili so, da se je RTK 51 % časa prehoda DČ zadrževala v CK.

V preiskavi [14] so Fallingborg in sodelavci preiskovali GIT pri ljudeh z ileostomijo. V DDM je bila mediana izmerjenih pH 7,0, v proksimalnem TČ 6,3, vzdolž srednjega TČ se je dvignila do 7,3 v distalnem TČ. Mediana časa prehoda TČ je bila 10,3 h. RTK se je v DDM zadrževala 6 %, v proksimalnem TČ 5 %, v srednjem TČ 21 % in v distalnem TČ 68 % celotnega časa prehoda TČ. Ugotovili so, da se pH profili preiskovancev z ileostomijo ujemajo z rezultati preiskovancev z zdravim, intaktnim GIT.

V preiskavi Fallingborga in sodelavcev [15] so za kontrole določili čas prehoda TČ 8,0 h (4,5–10,1 h) (mediana in območje). Ugotovili so, da je bil pH 4,8 h (0,8–7,7 h) tega časa višji od 7,0 in kar 6,8 h (2,8–8,8 h) višji od 6,5.

Maqbool je s sodelavci [16] želel ugotoviti, če lahko RTK tudi ob uporabi zaviralca protonске črpalke zazna praznjenje želodca. Pet od desetih zdravih preiskovancev je 30 min pred zajtrkom jemalo 20 mg odmerke esomeprazola. pH želodca pri tistih, ki niso jemali esomeprazola, je bil  $1,88 \pm 0,27$ . RTK je zaznala spremembo pH ob prehodu iz želodca v DDM tako pri preiskovancih na terapiji z inhibitorjem protonске črpalke kot pri tistih brez terapije. Pri 9 od 10 preiskovancev so zaznali padec pH za več kot 1 enoto pri vstopu v CK; nastopil je več kot 90 min po praznjenju želodca, pH pa se je potem obdržal vsaj 10 min.

V raziskavi Meldruma in sodelavcev [17] sta dva zdrava preiskovanca RTK zaužila takoj po zajtrku. Ob prehodu v DDM je prišlo do hitrega dviga pH, nato pa se je naraščanje pH upočasnilo in se skozi jejunum in ileum nadaljevalo vse do ICJ, kjer je pH rahlo upadel in nato skozi celotno DČ ostal skoraj nevtralen. pH v CK je bil nižji kot v ostalem DČ.

Bown in sodelavci so v raziskavi [20] poudarili daljše zadrževanje RTK v začetnem delu DČ (cekum in ascendentno debelo črevo).

Podatke za pH v območju ICJ in DČ iz vseh navedenih študij prikazuje Preglednica I.

**Preglednica I:** pH vrednosti GIT v ileocekalnem območju in DČ za zdrave preiskovance v stanju na tešče. Navedeni so: referenca, število zdravih preiskovancev, spol (M/Ž) in starost preiskovancev (povprečje ± SD ali mediana in območje), metoda določanja pH in proizvajalec RTK (RCS – Remote Control Systems, London; SP – SmartPill® Corporation, Buffalo, New York), lokacija v GIT, kjer je bil nek pH izmerjen, ter dobljene vrednosti pH (povprečje ± SD ali mediana in območje).

Referenca	Število preiskovancev	Spol		Starost [leta]	Metoda	Lokacija v GIT	pH			
		M	Ž				Aritmetična sredina ± SD	Mediana	Območje	
									MIN	MAX
2	10			18 ± 3	RTK (SP)	prehod iz ileuma v CK	padec za več kot 1 enoto			
3	42			(20–80)	RTK (RCS)	TI CK	7,50 ± 0,46 6,37 ± 0,58			
4	72 (66)	51	21	26 (20–83)	RTK (RCS)	ileum desno DČ srednje DČ	7,49 ± 0,46 6,37 ± 0,58 6,61 ± 0,83			
5	81	42	39	Ž: 39 (18–66) M: 36 (20–72)	RTK (SP)	prehod iz TI v CK	padec za več kot 1 enoto, potem pa se pH ohrani več kot 10 min			
6	13	7	6	29 (26–53)	RTK (SP)	prehod iz ileuma v DČ	padec za 1,45 ± 0,20 s 7,6 ± 0,05 na 6,1 ± 0,1			
7	66	47	19	26 (21–82)	RTK (RCS)	distalno TČ desno DČ	7,5 ± 0,5 6,4 ± 0,6			
9	15	8	7	28 ± 3 (22–55)	RTK (RCS)	ileum TI CK / desno DČ	7,5 7,7 6,2			
11	12	6	6	27,8 ± 4,0	RTK (RCS)	terminalno TČ		7,50	6,8	7,88
						CK		6,05	5,3	6,55
						desno DČ		5,88	5,26	6,72
						levo DČ		6,12	5,2	7,07
12	39	18	21	33 (18–65)	RTK (RCS)	distalno TČ CK		7,3 5,7		
13					RTK	prehod iz ileuma v CK	padec za več kot 1 enoto, potem pa se pH ohrani več kot 5 min			
14	11	5	6	40 (26–62)	RTK (RCS)	distalno TČ		7,2		
15	13	6	7	44 (26–52)	RTK (RCS)	distalno TČ CK		7,4 5,8	6,6 5,3	8,1 6,3
16	10	5	5	53,4 ± 14,7	RTK (SP)	prehod iz ileuma v CK	padec za več kot 1 enoto, potem pa se pH ohrani več kot 10 min			
18	66	40	26	(18–65)	RTK (SP)	prehod iz ileuma v CK		padec za 1,3 enote (1,1–1,6)		
19	10	6	4	33	RTK (SP)	3. kvartil TČ 4. kvartil TČ	6,679 ± 0,320 6,884 ± 0,20			
20	11				RTK (Rigel research Ltd.)	spodnje TČ desno DČ		7,5 6,0	6,8 5,5	8,4 7,5

#### 1.4.1 ŠTUDIJE Z INDIVIDUALNIMI PODATKI O PADCU pH NA PREHODU IZ TERMINALNEGA TANKEGA ČREVESA V CEKUM

V štirih člankih smo zasledili tudi individualne podatke o izmerjenih pH, ki so nam dali boljši vpogled v ekstremne vrednosti pH, do katerih lahko pride v GIT posameznika.

Sasaki in sodelavci so v raziskavi [8] na podlagi pH profilov primerjali 4 paciente s Crohnovo boleznijo s 4 kontrolami. Pri slednjih se je pH ob prihodu RTK v DDM hitro dvignil z 1,5 na 6,5, od proksimalnega do distalnega TČ je pH počasi narastel na 7,5 in na tej ravni ostal do ICJ. Ob prehodu ICJ (rentgen je pokazal, da je bila RTK takrat v spodnjem desnem predelu trebuba) je pH v eni minuti padel na 6,5 ter se ohranil vzdolž desnega DČ.

V študiji [10] so Ibekwe in sodelavci preiskovali pH DČ, ki je pomembno mesto delovanja ZU za lokalno zdravljenje. Po aplikaciji kapsule so zaznali dvig pH ob praznjenju želodca (potrdili so ga s scintigrafijo) in naraščanje pH proti distальнemu TČ. Postopen padec pH ob vstopu v CK so zaznali le pri nekaterih preiskovancih; pri ostalih je pH ostal na ravni iz TI.

Individualni podatki za pH GIT iz štirih študij [8, 10, 14, 20] so zbrani v Preglednici II.

**Preglednica II:** Individualne pH vrednosti GIT v ileocekalnem območju in DČ za zdrave preiskovance v stanju na teče. Navedeni so: referenca, število zdravih preiskovancev, spol (M/Ž) in starost preiskovancev (mediana in/ali območje), metoda določanja pH, vrednosti pH v določenih predelih GIT (aritmetična sredina ± SD (aritmetična sredina je izračunana iz več zaporednih meritev v določenem območju GIT pri istem preiskovancu) ali mediana). Podatki za študijo 14 so odčitani iz diagrama in so navedeni v pošetnem tisku.

Referenca	Število preiskovancev	Spol		Starost [leta]	Metoda	Preiskovanec	pH v GIT aritmetična sredina ± SD [8, 10, 14] mediana [20]		
		M	Ž				distalno TČ	desno DČ	
8	4	3	1	21-34	RTK (RCS)	1	7,9 ± 0,1	7,0 ± 0,4	
						2	7,5 ± 0,2	6,7 ± 0,2	
						3	7,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2	
						4	7,4 ± 0,1	6,5 ± 0,4	
10	8	8	0	22-34	RTK (Bravo®)	distalno TČ	ascend. DČ		
						1	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,3	
						2	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,3	
						3	7,6 ± 0,2	7,1 ± 0,2	
						4	7,5 ± 0,2	6,5 ± 0,2	
						5	7,3 ± 0,3	6,2 ± 0,1	
						6	6,8 ± 0,3	5,5 ± 0,7	
						7	7,7 ± 0,2	/	
						8	6,7 ± 0,9	5,8 ± 0,2	
14	11	5	6	40 (26-62)	RTK (RCS)	distalno TČ			
						1	6,8		
						2	7,0		
						3	7,1		
						4	7,1		
						5	7,2		
						6	7,2		
						7	7,3		
						8	7,4		
						9	7,5		
						10	7,5		
20	3				RTK (Rigel research Ltd.)	distalno TČ			
						1	6,2	7,5	5,6
						2	6,4	7,7	7,3
						3	/	7,4	5,8

## **2 NAMEN**

Namen širšega sklopa dela, v okvir katerega sodi tudi ta magistrska naloga, je na podlagi podatkov iz člankov postaviti pH profil gastrointestinalnega trakta od želodca do debelega črevesa pri zdravem odraslem človeku ter ob tem upoštevati variabilnosti pH, ki se pojavljajo na določenih območjih GIT.

Namen tega magistrskega dela je s poskusi na pretočnem sistemu poiskati ustreerne medije (pufre, raztopine soli, kisline) in pogoje izvedbe za ponovljivo simulacijo pH profilov gastrointestinalnega trakta od želodca do debelega črevesa. Kriterije za simulacijo bomo oblikovali na osnovi podatkov, pridobljenih v zgoraj omenjenem širšem sklopu dela.

Pri pregledu literature se bomo pri tej magistrski nalogi osredotočili na podatke o padcu pH, ki nastopi na prehodu iz terminalnega tankega črevesa v slepo črevo (cekum). Posebej bomo upoštevali skrajne individualne vrednosti pH za območja, ki imajo pomembne vplive na obnašanje FO.

pH profil, ki ga bomo izoblikovali iz literturnih vrednosti za različne predele gastrointestinalnega trakta, bomo skušali simulirati na pretočnem sistemu z uporabo različnih medijev (pufri, raztopine soli in kisline). Pri optimizaciji črevesnega medija bomo izhajali iz umetnega črevesnega soka (fosfatni pufer pH = 6,8), ki mu bomo po potrebi spremenjali pH. Simulacijo pH profilov bomo izvajali pri pretoku 2 mL/min. Temperaturo medija, ki ga bomo z magnetnim mešalom (100 rpm) ves čas homogenizirali, bomo z električnim grelcem vzdrževali na 37 °C. S predhodno natančno nastavitevijo pretokov skozi cevke bomo poskrbeli, da bo volumen medija med poskusi ostal konstanten (40 mL). Najprej bomo z izvajanjem krajsih testnih poskusov poiskali ustrerene raztopine za dosego zahtevanih sprememb pH. Simulirati bomo poskušali hiter dvig pH za določeno vrednost ob prehodu iz želodca v dvanajstnik, počasno naraščanje pH do platoja, ki ga bomo tudi nekaj časa vzdrževali (simulacija tankega črevesa), hiter padec pH za ~ 1,5 enote ob vstopu v cekum in dokaj konstanten pH debelega črevesa.

Na že uspešno simuliranih pH profilih bomo izvedli še teste sproščanja z ogrodnimi tabletami z natrijevim diklofenakatom. Poskuse sproščanja bomo izvajali na pretočnem sistemu na dva načina: s sinkerjem pri hitrosti mešanja 100 rpm in s kroglicami pri hitrosti mešanja 60 rpm. S temi poskusi bomo preverili, ali padec pH na prehodu iz tankega v debelo črevo vpliva na sproščanje učinkovine iz tablet in koliko lahko kroglice z erodiranjem zunanjih plasti nabrekle tablete vplivajo na sproščanje učinkovine iz notranosti tablete.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI IN APARATURE**

##### **3.1.1 MATERIALI**

Za pripravo pufrov, raztopin soli, izdelavo tablet in izvajanje poskusov smo uporabili:

- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo 1 M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- klorovodikovo kislino, Titrisol® za pripravo 1 M HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- ortofosforno kislino 85%, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- dinatrijev hidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- trinatrijev fosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- citronsko kislino monohidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- natrijev diklofenakat, p.a., Sigma-Aldrich CO, St. Louis, ZDA;
- hidroksipropilmetylcelulozo – HPMC: Metolose 90SH 4000SR, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japonska;
- pufrsko raztopino pH = 7,00 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- pufrsko raztopino pH = 4,00 (20 °C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

##### **3.1.2 APARATURE**

Pretočni sistem za simuliranje pH profilov in izvajanje testov sproščanja (Slika 3 – levo):

- peristaltični črpalki IKA®-WERKE ISM817, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija (interni oznaki G1 in G2);
- silikonske pretočne cevke (debelina silikona 1,6 mm, notranji premer 3,2 mm, zunanji premer 6,4 mm), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemčija;
- kovinska mrežica z velikostjo odprtin 500 µm;
- stojali za peristaltični črpalki;
- magnetni mešali z električnima grelcema IKA®-RET CV, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija (interni oznaki G1 in G2);
- vodni kopeli;
- delovni čaši 150 mL (notranji premer 55 mm), Schott Duran, Nemčija;
- magneti (premer 8 mm, dolžina 25 mm (mali) in 45 mm (veliki));
- polipropilenski pokrovi za čaše z odprtinami;
- jeklena žička za izdelavo sinkerjev (debelina 0,81 mm);
- digitalni štoparici Hanhart 06A03, Hanhart 1882 GmbH, Gütenbach, Nemčija;

- pH-meter Mettler Toledo MP220, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- elektroda Mettler Toledo InLab®Expert Pro, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica.

Druge aparature in laboratorijski pribor:

- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA;
- digitalna tehnika Exacta 300EB, Exacta, Železniki, Slovenija;
- analizna tehnika Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica;
- avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- ultrazvočna kopel Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- ultrazvočna kopel Bandelin Sonorex RK514BH, Bandelin electronic, Berlin, Nemčija;
- vorteks stresalnik Lab Dancer, IKA®-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija;
- čaše 25 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL;
- polnilne bučke 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL;
- merilni valji 50 mL, 100 mL;
- polnilne pipete 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, Blaubrand, Nemčija;
- centrifugirke 10 mL;
- tehtiči, čolnički, spatule, žličke;
- brizge 5 mL, filtri za brizge.

### **3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN**

#### **3.2.1 KISLINE IN RAZTOPINE SOLI**

- **4,5 mM HCl:** v 1000 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo z avtomatsko pipeto prenesli 4,5 mL 1 M HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **10 mM HCl:** v 1000 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo s polnilno pipeto prenesli 10 mL 1 M HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **35 mM HCl:** v 1000 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo s polnilnima pipetama prenesli 35 mL 1 M HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **23 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** v 50 mL bučko smo kvantitativno prenesli 437,21 mg Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **55 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** v 50 mL bučko smo kvantitativno prenesli 1,04549 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **105 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** v 50 mL bučko smo kvantitativno prenesli 1,9959 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

- **210 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** v 50 mL bučko smo kvantitativno prenesli 3,99189 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **0,425 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / 0,85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** v 100 mL bučko, v kateri je bilo nekaj prečiščene vode, smo z avtomatsko pipeto odmerili 0,5 mL / 1,0 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.
- **0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** 28,392 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> smo kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko, dopolnili s prečiščeno vodo do oznake ter s pomočjo ultrazvoka (t = 15 min) raztopili.
- **0,1 M citronska kislina:** 4,2028 g citronske kisline monohidrata smo kvantitativno prenesli v 200 mL bučko in raztopili v prečiščeni vodi ter dopolnili do oznake.

### **3.2.2 FOSFATNI PUFRI**

Fosfatne pufre smo pripravljali iz različnih koncentracij raztopin KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> z dodajanjem ustreznih količin 1 M NaOH. Do oznake smo dopolnili s prečiščeno vodo. Pri vseh smo preverili pH, ki je lahko od željene vrednosti odstopal za največ 0,05 enote.

- **50 mM fosfatni pufer, pH = 6,0 / 6,8 / 7,0 / 8,0:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 6,0 / 6,8 / 7,0 / 8,0.
- **20 mM fosfatni pufer, pH = 6,0/ 6,8 / 7,0 / 8,0:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 2,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 6,0 / 6,8 / 7,0 / 8,0.
- **10 mM fosfatni pufer, pH = 7,5 / 8,0:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 7,5 / 8,0.
- **5 mM fosfatni pufer, pH = 8,0:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 8,0.
- **1 mM fosfatni pufer, pH = 7,5:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 0,136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 7,5.
- **0,2 mM fosfatni pufer, pH = 7,5:** v 1000 mL bučko smo kvantitativno prenesli 0,0272 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v prečiščeni vodi in dodali 1 M NaOH do pH = 7,5.

### **3.2.3 REDČENI MCILVAINOVI PUFRI**

Redčene McIlvainove pufre smo pripravljali iz dveh osnovnih raztopin: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (raztopina A) in 0,1 M citronska kislina (raztopina B). Izhajali smo iz tabele za pripravo koncentriranih McIlvainovih pufrov (Priloga 1), ki podaja razmerja volumnov raztopin A in B za pripravo pufra z določenim pH. Zaradi velikih redčitev smo morali ta razmerja za dosego določenih pH močno prilagajati, kar smo izvajali empirično s preizkušanjem

različnih volumskih razmerij ob konstantnem skupnem volumnu raztopin A in B. Do oznake smo dopolnili s prečiščeno vodo. Preverjali smo pH, ki je lahko od željene vrednosti odstopal za največ 0,05 enote.

### 3.2.3.1 Nepravilna postopka priprave redčenih McIlvainovih pufrov – poskusi, kjer smo te pufre uporabljali, imajo v svoji oznaki črko n

Na začetku smo imeli s pripravo redčenih McIlvainovih pufrov nekaj težav (poskusi **nM2–nM12**). Pufer pri poskusu **M1p** (prvotni pufer) smo pripravili iz 225 mL raztopine A in 25 mL raztopine B (skupaj 250 mL) in s prečiščeno vodo dopolnili do 1000 mL (4-kratno redčenje). Iz tega pufra smo izhajali pri pripravi pufrov za poskuse **nM2, nM3p, nM4, nM5, nM6, nM7p/1, nM7p/2, nM8p, nM9pS!, nM10pS, nM11pS, nM12S**, a priprave pufrov nismo izvedli pravilno. Prvotni pufer smo namreč pri teh poskusih redčili. Preden smo z vodo dopolnili točno do oznake, smo preverili pH in ga po potrebi (ob redčenju je pH padel) dvignili na 7,5: pri poskusih **nM2–nM6** z dodajanjem 1 M NaOH (postopek 1), kar ni vplivalo na razmerje med koncentracijama fosfata in citrata v pufru, pri poskusih **nM7p/1, nM7p/2, nM8p, nM9pS!, nM10pS, nM11pS** in **nM12S** pa kar z dodajanjem osnovne raztopine A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), s čimer smo nekoliko spremenili koncentracijo te komponente pufra in s tem razmerje med koncentracijama obeh komponent (postopek 2).

### 3.2.3.2 Pravilni postopki priprave redčenih McIlvainovih pufrov

Pri poskusih **M1pS–M12SK/2** smo pufre pripravljali po pravilnem postopku: vsota volumnov osnovnih raztopin A in B je bila za določeno redčenje konstantna pri vseh pH, po potrebi smo spremajali le razmerje med volumnoma raztopin A in B. S preizkušanjem smo dobili tisto razmerje, ki je potem, ko smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake, dalo ustrezni pH pufra. Recepture za pripravo teh pufrov prikazuje Preglednica III.

**Preglednica III:** Recepture za pripravo redčenih McIlvainovih pufrov pri poskusih **M1pS–M12SK/2**. Navedene so pH vrednosti pufrov, redčitve, volumni osnovnih raztopin A (0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in B (0,1 M citronska kislina), potrebni za pripravo določenega pufra, ter končni volumen pufra.

pH pufra	redčitev McIlvainovega pufra	V(raztopina A) [mL]	V(raztopina B) [mL]	skupni volumen raztopin A in B [mL]	končni volumen redčenega pufra [mL]
<b>5,4</b>	8-krat redčen	64,5	60,5	125,0	1000
<b>6,0</b>	8-krat redčen	14,7	10,3	25,0	200
<b>6,0</b>	4-krat redčen	30,0	20,0	50,0	200
<b>6,6</b>	8-krat redčen	17,1	7,9	25,0	200
<b>6,6</b>	4-krat redčen	35,0	15,0	50,0	200
<b>6,8</b>	80-krat redčen	9,1	3,4	12,5	1000
<b>6,8</b>	8-krat redčen	90,0	35,0	125,0	1000
<b>7,0</b>	80-krat redčen	9,75	2,75	12,5	1000
<b>7,5</b>	80-krat redčen	11,5	1,0	12,5	1000
<b>8,0</b>	40-krat redčen	24,4	0,6	25,0	1000

### **3.3 METODE**

#### **3.3.1 ANALIZA VZORCEV**

Analizo vzorcev pri testih sproščanja in izdelavi umeritvenih premic smo izvajali na UV-Vis spektrofotometru (kiveta: volumen 4 mL, dolžina stranice 1 cm) pod naslednjimi pogoji:

- maksimum absorpcije: 276 nm;
- kontrolna valovna dolžina: 400 nm (absorbanca pri 400 nm mora biti nižja od 0,01);
- spekter snemanja: od 200 do 400 nm.

Pri testih sproščanja smo vzorce iz zbirnih merilnih valjev prelili v 50 mL čaše, jih premešali, z avtomatskimi pipetami odpipetirali v centrifugirke in tolikokrat redčili z ustreznim pufrom, da smo dobili absorbance v območju umeritvenih premic. Redčene vzorce smo nekaj sekund homogenizirali na vorteks stresalniku, prelili v kiveto in izvedli meritev. Kot slepo raztopino smo pri vzorcih, zbranih pred simuliranim padcem pH, uporabljali pufer, s katerim smo pri poskusu dosegli pH plato. Pri vzorcih, zbranih po simuliranem padcu pH, smo za slepo raztopino uporabljali pufer, ki smo ga pri poskusu dovajali v čašo od simuliranega padca pH dalje. Ko smo pri poskusih sproščanja na sistemu s sinkerjem v valj zbrali zadnji vzorec, smo iz delovne čaše s pinceto odstranili magnet in sinker s tableto vred, preostali medij pa prelili v 50 mL čašo in stehtali; 4–5 mL le-tega smo potegnili v brizgo, nanjo namestili filter in prefiltrirali v epruveto (prvi mL filtrata smo zavrgli). Tako dobljeni vzorec je vseboval ZU, ki se je med poskusom sprostila in raztopila, a je s prečrpanimi vzorci nismo zajeli. Na ta način smo ocenili trend sproščanja ZU v primeru nadaljevanja poskusov. Delež sproščene ZU, ki vključuje dodatni vzorec, je v Preglednicah XXIII–XXIX naveden kot »+ ostanek«.

#### **3.3.2 UMERITVENE PREMICE**

Za izračunavanje koncentracije ZU v vzorcih pri testih sproščanja smo izdelali umeritvene premice v treh različnih redčenih McIlvainovih pufrih; ti v grobem definirajo celotno pH in koncentacijsko območje pufrov, uporabljenih pri poskusih sproščanja: 8-krat redčena McIlvainova pufra s pH 5,4 in 6,8 in 40-krat redčen McIlvainov pufer s pH 8,0. Pripravili smo šest standardnih raztopin znanih koncentracij Na-diklofenakata v vodi (*A, B, C, D, E, F*), za kar smo šestkrat natančno natehtali približno 40 mg ZU, jo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko, raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do oznake (Preglednica IV).

**Preglednica IV:** Zatehte standarda natrijevega diklofenakata pri pripravi standardnih raztopin *A, B, C, D, E, F* in njihove koncentracije (*se nadaljuje na naslednji strani*).

Standardna raztopina	m (Na-diklofenakat) [mg]	V (standardne razt.) [mL]	Konc. standardne razt. [mg/mL]
<i>A</i>	40,29	100	0,4029
<i>B</i>	40,92	100	0,4092
<i>C</i>	39,88	100	0,3988

<i>D</i>	39,23	100	0,3923
<i>E</i>	39,95	100	0,3995
<i>F</i>	40,76	100	0,4076

Pripravili smo različne redčitve standardnih raztopin natrijevega diklofenakata v redčenih McIlvainovih pufrih. V bučko smo najprej odpipetirali točno določen volumen standardne raztopine ter nato do oznake dopolnili z izbranim pufrom. V redčenih McIlvainovih pufrih pH 5,4 in pH 6,8 smo pripravili po devet redčitev standardnih raztopin ZU v območju koncentracij 0,001 mg/mL–0,02 mg/mL, kot je prikazano v Preglednici V.

**Preglednica V:** Postopek priprave devetih redčitev standardnih raztopin *A*, *B* in *C* v 8-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 5,4 in 8-krat redčenem McIlvainovem pufru 6,8 za izdelavo umeritvenih premic.

Redčenje	Stand. razt.	V (standardne raztopine) [mL]	V (redčene stand. razt. ZU) [mL]	Konc. ZU[mg/mL]
20x	<i>A</i>	2,5	50	0,020145
25x	<i>B</i>	2,0	50	0,016368
33,3x	<i>C</i>	1,5	50	0,011964
40x	<i>A</i>	1,25	50	0,0100725
50x	<i>B</i>	1,0	50	0,008184
80x	<i>C</i>	0,625	50	0,004985
100x	<i>A</i>	0,5	50	0,004029
200x	<i>B</i>	0,25	50	0,002046
400x	<i>C</i>	0,125	50	0,000997

V redčenem McIlvainovem pufru pH 8,0 smo pripravili osem redčitev standardnih raztopin ZU, kot je prikazano v Preglednici VI.

**Preglednica VI:** Postopek priprave osmih redčitev standardnih raztopin *D*, *E* in *F* v 40-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 8,0 za izdelavo umeritvene premice.

Redčenje	Stand. razt.	V (standardne raztopine) [mL]	V (redčene stand. razt. ZU) [mL]	Konc. ZU[mg/mL]
20x	<i>D</i>	2,5	50	0,020145
25x	<i>E</i>	2,0	50	0,016368
33,3x	<i>F</i>	1,5	50	0,011964
50x	<i>D</i>	1,0	50	0,008184
80x	<i>E</i>	0,625	50	0,004985
80x	<i>F</i>	0,625	50	0,004029
200x	<i>D</i>	0,25	50	0,002046
400x	<i>F</i>	0,125	50	0,000997

Iz le dveh redčitev (25x, 80x) standardne raztopine *E* smo pripravili orientacijsko umeritveno premico v 80-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 6,8. Z njo smo preverili, če spremembu koncentracije pufra pri istem pH vpliva na odziv analita v vzorcu. V območju pH okoli 6,8 smo namreč uporabljali od 4-krat do 80-krat redčene McIlvainove pufre, za vse pa smo želeli uporabljati isto umeritveno premico. Preglednica VII prikazuje postopek priprave redčitev.

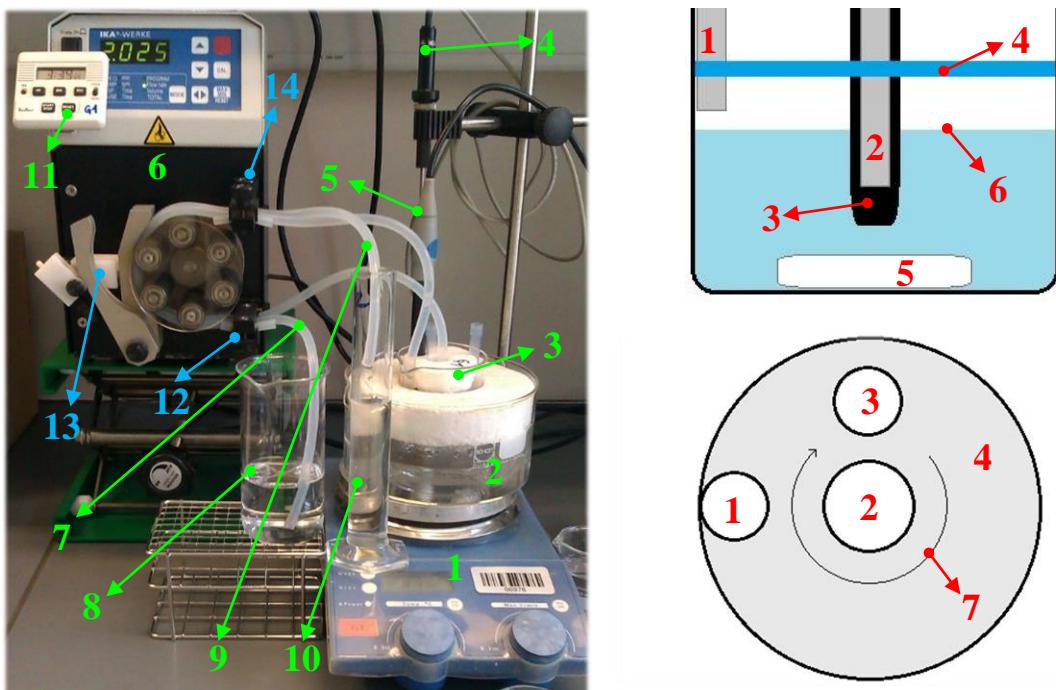
**Preglednica VII:** Postopek priprave dveh redčitev standardne raztopine *E* v 80-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 6,8 za izdelavo orientacijske umeritvene premice.

Redčenje	Stand. razt.	V (standardne raztopine) [mL]	V (redčene stand. razt. ZU) [mL]	Konc. ZU[mg/mL]
25x	<i>E</i>	2,0	50	0,016368
80x	<i>E</i>	0,625	50	0,004985

Razredčenim standardnim raztopinam smo izmerili absorbance in le-te podali v odvisnosti od koncentracije učinkovine v raztopini. S pomočjo linearne regresije smo določili enačbo premice in Pearsonov koeficient korelacije  $R^2$ .

### 3.3.3 IZVEDBA POSKUSOV NA PRETOČNEM SISTEMU

Pri poskusih simulacije pH profila in testih sproščanja smo uporabljali pretočna sistema G1 in G2, sestavljena iz komponent, predstavljenih v poglavju 3.1.2. Peristaltična črpalka je s konstantnim pretokom skozi dovodno cevko (zunanja cevka na rotorju glede na črpalko) dovajala svež medij v delovno čašo in iz nje skozi odvodno cevko (notranja cevka na rotorju glede na črpalko), na začetku katere je bila nameščena kovinska mrežica, črpala vzorec v zbirni merilni valj. Magnetno mešalo je zagotavljalo homogenost medija v čaši, z električnim grelcem pa smo posredno, preko vodne kopeli, vzdrževali željeno temperaturo le-tega. pH v čaši smo tekom poskusa spremljali s pH-metrom, katerega elektroda je bila ves čas potopljena v medij. Čas trajanja poskusa smo natančno merili s štoparico. Sestavljen pretočni sistem je prikazan na Sliki 3.



**Slika 3:** Pretočni sistem za simulacijo pH profilov in teste sproščanja. **Levo:** Razporeditev vseh sestavnih delov: 1) magnetno mešalo z električnim grelcem in termometrom, 2) vodna kopel, 3) delovna čaša s pokrovom z odprtinami, 4) tipalo termometra, 5) elektroda pH-metra, 6) peristaltična črpalka, 7) dovodna cevka, 8) čaša s svežim medijem, 9) odvodna cevka, 10) zbirni merilni valj, 11) štoparica, 12) spodnja vpenjalna vijaka, 13) srednja (glavna) vpenjalna vijaka, 14) zgornja vpenjalna vijaka. **Desno:** Naris in tloris čaše: 1) dovodna cevka (nad gladino medija, tik ob robu čaše), 2) odvodna cevka (segajoča v medij), 3) elektroda pH-metra, 4) polipropilenski pokrov čaše, 5) magnetno mešalo, 6) gladina medija v čaši, 7) smer vrtenja magnetnega mešala.

Na pretočnem sistemu smo izvedli več serij poskusov, ki smo jih različno označili:

- P: preliminarni poskusi nastavitev pretoka skozi cevke (Preglednica XII);
- T: testi hitrih dvigov pH (Preglednica VIII);
- F: poskusi simulacije pH profilov s fosfatnimi pufri (Preglednica IX);
- M: poskusi simulacije pH profilov z redčenimi McIlvainovimi pufri (Preglednica IX).

V vsaki seriji smo izvedli več poskusov, katerih oznake so sestavljene iz več znakov:

- 1, 2, 3 – zaporedne številke poskusov v seriji;
- /1 ali /2 – oznake paralelk poskusov;
- p – oznaka pri poskusih, ki vključujejo simulirani padec pH;
- n – oznaka za nepravilen postopek priprave redčenih McIlvainovih pufrov (glej 3.2.3);
- S – oznaka pri poskusih, kjer smo izvedli test sproščanja;
- ! – oznaka za poskus sproščanja, ki smo ga izvedli brez uporabe sinkerja.

**Primer:** M5pS/1 – peti poskus, izveden z redčenim McIlvainovim pufrom, pri katerem smo simulirali padec pH in izvedli test sproščanja (prva paralelka).

### 3.3.4 PRELIMINARNI POSKUSI

#### 3.3.4.1 Nastavitev pretoka skozi cevke

Pred izvajanjem poskusov smo morali peristaltični črpalki G1 in G2 natančno nastaviti. Na rotor vsake črpalke smo s tremi pari vpenjalnih vijakov (spodnji, glavni, zgornji) vpeli dve silikonski cevki. Začetka obeh smo potopili v čašo s prečiščeno vodo in vklopili črpalko. V programskih nastavivah pretoka na črpalkah smo poiskali tisto, ki je bila najbliže željenim 2 mL/min: 2,027 mL/min na G1 in 2,025 mL/min na G2. Zagnali smo črpalko in cevke s postopnim privijanjem posameznih vpenjalnih vijakov pričvrstili toliko, da je v njih nastal zadosten podtlak za črpanje. Nato smo začeli z 20-minutnimi testi pretokov. Konca obeh cevk smo vstavili v dva prazna stehtana merilna valja, zagnali črpalko in istočasno začeli meriti čas. Po 20 minutah smo črpalko ustavili in merilna valja s prečrpano vodo ponovno stehtali. Razliko med valja po meritvi in praznega merilnega valja smo delili s časom 20 min in tako dobili povprečni pretok. Glede na izračunane pretoke smo vijake pred naslednjim testom privili oziroma popustili, da bi vzpostavili čim bolj podobna pretoka v cevkah.

#### 3.3.4.2 Ocena količine $H_3PO_4$ za simulacijo padcev pH

Pred izvedbo poskusov **F19p–M10S** (Preglednica IX) smo ocenili volumen razredčene  $H_3PO_4$ , potreben za simulacijo določenega padca pH. Neposredno v čašo s 40 mL ustreznega pufra (tisti, s katerim smo pri določenem poskusu dosegli pH plato) smo z avtomatsko pipeto dodajali 50  $\mu$ L alikvote kisline izbrane koncentracije, dokler pH ni padel na željeno vrednost. Vsoto volumnov odpipetiranih alikvotov smo delili z vrednostjo za pretok in tako dobili približen čas, v katerem naj bi se v čašo prečrpalno dovolj kisline za simulacijo padca pH.

### **3.3.5 SIMULACIJA pH PROFILOV**

Z uporabo različnih medijev smo želeli *in vitro* ponazoriti pH profil GIT od želodca do DČ.

Na podlagi literaturnih podatkov smo sklenili pri simulaciji vzpostaviti naslednje pogoje:

- želodčni sok: različne koncentracije HCl s pH od 1 do 3;
- hitro ( $t = 2\text{--}3 \text{ min}$ ) naraščanje pH do vrednosti okoli 6;
- počasno ( $t = 90\text{--}120 \text{ min}$ ) naraščanje pH do treh platojev (pH 7,5 kot povprečen plato, pH 7,0 in 8,0 pa kot skrajni vrednosti) in vzdrževanje le-teh ( $t = 60 \text{ min}$ );
- hiter padec pH ( $t < 1 \text{ min}$ ) pH za približno 1,5 enote;
- konstanten pH od simuliranega padca pH do konca poskusa ( $t \geq 60 \text{ min}$ ).

Simulacijo pH profilov smo izvajali na pretočnih sistemih G1 in G2. Na peristaltični črpalki smo nastavili pretok, ki je bil najbližje 2 mL/min. Temperaturo električnega grelca smo nastavili na 37 °C, hitrost vrtenja magnetnega mešala pa na 60 rpm. V 150 mL delovno čašo smo nalili 40 mL HCl in jo na vodni kopeli termostatirali pri 37 °C. S črpanjem enake kisline smo napolnili obe cevki. Pretočni sistem smo sestavili, kot je prikazano na Sliki 3: v čašo smo dali mali magnet in nanjo namestili polipropilenski pokrov z odprtinami. Začetek dovodne cevke smo potopili v čašo z medijem za doseganje hitrega dviga pH, njen konec pa vstavili v odprtino na robu pokrova čaše. Začetek odvodne cevke smo skozi sredinsko odprtino na pokrovu potopili tik pod gladino kisline (nad magnet), njen konec pa vstavili v zbirni meritni valj. V tretjo odprtino na pokrovu smo namestili še elektrodo pH-metra (umerjen na pH 7), da je segala pod gladino medija, a bila nad magnetom (Slika 3 – desno). Na začetku poskusa smo istočasno zagnali črpalko in štoparico ter začeli z merjenjem pH raztopine v delovni čaši. Prvih nekaj minut smo meritve izvajali vsakih 30 s, ko se je naraščanje pH upočasnilo pa smo interval meritev pH postopoma podaljševali (1 min, 2 min, 5 min...). Ko smo ob menjavi medijev začetek dovodne cevke prestavliali iz ene čaše v drugo, smo pazili, da nam v dovodno cevko ni zašel zrak, ker bi to povzročilo zmanjšanje volumna raztopine v delovni čaši (črpalke med menjavo medijev nismo ustavljal). pH profil smo izrisali tako, da smo v diagram vnesli izmerjene vrednosti pH v odvisnosti od časa.

#### **3.3.5.1 Simulacija hitrega dviga pH**

Želodčno okolje smo simulirali z umetnim želodčnim sokom – HCl. Želeli smo posnemati stanje na tešče, zato smo izbirali med koncentracijami s pH, nižjim od 3; ta medij je služil kot izhodišče. Za simulacijo hitrega dviga pH na ~ 6, do katerega pride pri prehodu v DDM, smo pri poskusih uporabljali bazično raztopino trinatrijevega fosfata ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – TNAF) s pH ~ 11,9, ki smo jo točno določen čas dovajali v čašo z želodčnim medijem.

Raztopino TNAF smo vsakič tik pred uporabo dobro homogenizirali s stresanjem bučke. Pred simulacijo daljših pH profilov smo želeli s poskusi **T1–T14** izbrati primerne medije za simulacijo hitrega dviga.

Pretočni sistem smo za poskuse **T1–T14**, s katerimi smo testirali kombinacije različnih koncentracij HCl in TNAF [21], pripravili, kot je navedeno v poglavju 3.3.5. Izjema glede na poglavje 3.3.5 so bili poskusi **T5–T7**, kjer je bil pH-meter umerjen na 4 namesto na 7. Raztopino TNAF smo črpali v delovno čašo, v kateri je bilo 40 mL HCl. Ko je prišla v čašo prva kapljica raztopine TNAF (po ~ 2,5 min črpanja – čas polnjenja cevk), je začel pH v časi naraščati. Da bi natančno definirali hitri dvig, smo pH merili vsakih 30 s. Raztopino TNAF smo dovajali točno določen čas (Preglednica VIII), nato pa smo pri poskusih **T1–T7** začetek dovodne cevke vzeli iz čaše, da se je vanjo črpal zrak. Ko je v čašo pritekel ves TNAF, smo črpalko izključili in spremljali pH, da se je le-ta ustalil. Pri poskusih **T8–T14** smo po času, določenem za črpanje TNAF, začetek dovodne cevke iz čaše s TNAF prestavili v čašo z 10 mM fosfatnim puferjem pH 8,0 ter s črpanjem nadaljevali do konca poskusov (5 min).

**Preglednica VIII:** Seznam poskusov hitrega dviga pH. Navedene so oznake poskusov oziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ )

Oznaka poskusa	Sistem	Zaporedje uporabljenih medijev			Trajanje poskusov [min]
		1. HCl	2. dvig pH	3.	
<b>T1/1–T1/3</b>	<u>G1</u>	4,5 mM	23 mM TNAF		5
			0 min–2 min		
<b>T2/1–T2/3</b>	<u>G1</u>	4,5 mM	23 mM TNAF		5
			0 min–1 min 45 s		
<b>T3/1–T3/3</b>	<u>G1</u>	4,5 mM	23 mM TNAF		5
			0 min–1 min 50 s		
<b>T4/1–T4/3</b>	<u>G1</u>	4,5 mM	23 mM TNAF		5
			0 min–1 min 55 s		
<b>T5/1–T5/2</b>	<u>G1</u>	35 mM	0,21 M TNAF		5
			0 min–2 min		
<b>T6</b>	<u>G1</u>	35 mM	0,21 M TNAF		5
			0 min–1 min 30 s		
<b>T7/1–T7/3</b>	<u>G1</u>	35 mM	0,21 M TNAF		5
			0 min–1 min 45 s		
<b>T8</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–20 s	20 s–5 min	
<b>T9</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–25 s	25 s–5 min	
<b>T10</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–45 s	45 s–5 min	
<b>T11</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–35 s	35 s–5 min	
<b>T12</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–32 s	32 s–5 min	
<b>T13</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,105 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–1 min	1 min–5 min	
<b>T14</b>	<u>G1</u>	10 mM	0,105 M TNAF	10 mM fosfatni pufer, pH=8,00	5
			0 min–50 s	50 s–5 min	

### **3.3.5.2 Simulacija počasnega naraščanja pH do platojev**

Poskuse (Preglednica IX) smo po koncu črpanja TNAF za hiter dvig nadaljevali z dovajanjem medija za simuliranje počasnega naraščanja pH do platoja. Z naraščanjem pH smo želeli ponazoriti prehod skozi proksimalno, z vzdrževanjem pH platoja pa prehod skozi distalno tanko črevo in čas zadrževanja pred ileocekalnim sfinktrom. Sprva smo v ta namen uporabljali različne fosfatne pufre. Izbrali smo jih, ker se kot umetni črevesni sok pogosto uporablja 50 mM fosfatni pufer pH 6,8. Pufre smo postopoma redčili, da smo upočasnili naraščanje pH. Nekaj poskusov smo izvedli brez uporabe TNAF, saj smo skušali tudi hiter dvig pH simulirati kar s fosfatnimi pufri. Kasneje smo fosfatne pufre zamenjali s sestavljenimi redčenimi McIlvainovimi pufri, ki so sposobni pufranja v širšem pH območju kot fosfatni (pufrna kapaciteta je največja v bližini pKa raztopljene kisline/baze). Glede na rezultate pH profilov smo prilagajali koncentracije pufrov in čase dovajanja. Pri poskusih, kjer smo dosegli plato pH po željenem času (daljši od 90 min), smo konstantni pH vzdrževali vsaj 60 min.

### **3.3.5.3 Simulacija padca pH**

Zadrževanju na pH platoju pred ileocekalnim sfinktrom sledi padec pH, ki nastopi ob prehodu iz tankega črevesa v cekum. Ta padec smo najprej skušali simulirati s fosfatnim pufrom, a z njim nismo dosegli željene hitre spremembe pH. V nadaljevanju smo zato uporabili razredčeno ortofosforo kislino  $H_3PO_4$  (0,85 % ali 0,425 %). V raztopino smo tako uvajali fosfatne anione in se izognili prisotnosti drugih. Količino dovedene kisline smo spremenjali z variiranjem koncentracij in časov dovajanja kisline.

### **3.3.5.4 Simulacija konstantnega pH po simuliranem padcu**

V cekumu in desnem debelem črevesu se pH po padcu ponovno ustali. Po simuliranem padcu pH smo zato s pufri še najmanj 60 min vzdrževali konstanten pH. V ta namen smo uporabljali redčene McIlvainove pufre višjih koncentracij kot za dosego pH platoja, da bi preprečili morebitna nihanja pH.

V Preglednici IX je seznam poskusov simulacije pH profilov in sproščanja z njihovim potekom, uporabljenimi raztopinami in časi dovajanja le-teh. Pri vseh poskusih, razen pri poskusih M8S/3, M11pSK/1, M11pSK/2, M12SK/1 in M12SK/2, smo izvajali meritve pH in tako dobili pH profile.

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
<b>F1</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				70
				0 min–2 min	2 min–70 min				
<b>F2</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				80
				0 min–1 min 30 s	1 min 30 s–80 min				
<b>F3/1</b> <b>F3/2</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				80 45
				0 min–1 min	1 min–80 min / 45 min				
<b>F4</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				15
				0 min–1 min 4 s	1 min 4 s–15 min				
<b>F5/1</b> <b>F5/2</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	50 mM fosfatni pufer pH=8,00					80 80
				0 min–80 min					
<b>F6/1</b> <b>F6/2</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	50 mM fosfatni pufer pH=7,00	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				120 120
				0 min–60 min	60 min–120 min				
<b>F7/1</b> <b>F7/2</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	50 mM fosfatni pufer pH=6,00	50 mM fosfatni pufer pH=8,00				150 150
				0 min–60 min	60 min–150 min				
<b>F8</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	20 mM fosfatni pufer pH=8,00					65
				0 min–65 min					
<b>F9</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	20 mM fosfatni pufer pH=7,00	20 mM fosfatni pufer pH=8,00				150
				0 min–65 min	65 min–150 min				
<b>F10</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	20 mM fosfatni pufer pH=6,00	20 mM fosfatni pufer pH=8,00				115
				0 min–65 min	65 min–115 min				

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
<b>F11p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	50 mM fosfatni pufer pH=8,00	50 mM fosfatni pufer pH=6,00	20 mM fosfatni pufer pH=7,00	20 mM fosfatni pufer pH=8,00	20 mM fosfatni pufer pH=6,00	180
				0 min–4 min	4 min–12 min	12 min–32 min	32 min–118 min	118 min–180 min	
<b>F12p</b>	<u>G2</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	50 mM fosfatni pufer pH=6,80	50 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,80	50
				0 min–1 min 45 s	1 min 45 s–6 min	6 min–26 min	26 min–29 min	29 min–50 min	
<b>F13p</b>	<u>G2</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	20 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,80		100
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–60 min	60 min–62 min	62 min–100 min		
<b>F14p</b>	<u>G2</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	20 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	20 mM fosfatni pufer pH=6,80		70
				0 min–1 min 35 s	1 min 35 s–40 min	40 min–42 min	42 min–70 min		
<b>F15p</b>	<u>G2</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,00		250
				0 min–1 min 35 s	1 min 35 s–180 min	180 min–181 min	181 min–250 min		
<b>F16p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,02		135
				0 min–1 min 32 s	1 min 32 s–104 min	104 min–105 min	105 min–135 min		
<b>F17p</b>	<u>G2</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	10 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,02		160
				0 min–1 min 25 s	1 min 25 s–126 min	126 min–126 min 30 s	126 min 30 s–160 min		
<b>F18p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	35 mM	0,21 M TNAF	5 mM fosfatni pufer pH=8,00	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,02		65
				0 min–1 min 35 s	1 min 35 s–60 min	60 min–60 min 30 s	60 min 30 s–65 min		
<b>F19p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	0,105 M TNAF	10 mM fosfatni pufer pH=7,50	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,02		160
				0 min–55 s	55 s–115 min	115 min–115 min 24 s	115 min 24 s–160 min		
<b>F20p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	0,105 M TNAF	1 mM fosfatni pufer pH=7,50	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	50 mM fosfatni pufer pH=6,00		210
				0 min–55 s	55 s–155 min	155 min–155 min 12 s	155 min 12 s–210 min		

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH, za redčene McIlvainove pufre so navedeni redčitev pufra (v oklepaju), pH in razmerje koncentracij dinatrijevega hidrogenfosfata in citronske kisline v pufru. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), Mcilv. – redčen McIlvainov pufer.

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
<b>F21</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	0,2 mM fosfatni pufer pH=7,50				80
				0 min–1 min 45 s	1 min 45 s–80 min				
<b>F22</b>	<u>G2</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	0,2 mM fosfatni pufer pH=7,50				90
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–90 min				
<b>F23</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	0,2 mM fosfatni pufer pH=7,50				40
				0 min–1 min 42 s	1 min 42 s–40 min				
<b>M1p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (4x), pH=7,47 45 mM / 2,5 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$			100
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–92 min	92 min–93 min 15 s			
<b>nM2</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (20x), pH=7,50 9 mM / 0,5 mM				120
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–120 min				
<b>nM3p</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.”(100x), pH=7,50 1,8 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$			130
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–130 min	130 min–130 min 45s			
<b>nM4</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.”(200x), pH=7,50 0,9 mM / 0,05 mM				105
				0 min–1 min 45 s	1 min 45 s–105 min				
<b>nM5</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.”(400x), pH=7,50 0,45 mM / 0,025 mM				90
				0 min–1 min 43 s	1 min 43 s–90 min				
<b>nM6</b>	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.”(100x), pH=7,50 1,8 mM / 0,1 mM				170
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–170 min				

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH, za redčene McIlvainove pufre so navedeni redčitev pufra (v oklepaju), pH in razmerje koncentracij dinatrijevega hidrogenfosfata in citronske kisline v pufru. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), Mcilv. – redčen McIlvainov pufer.

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
nM7p/1	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,50 2,54 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$			170
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–170 min	170 min–170 min 27 s			
nM7p/2	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,50 2,54 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,00 30 mM / 10 mM		105
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–97 min	97 min–97 min 27 s	97 min 27 s–105 min		
nM8p	<u>G1</u>	brez tablete	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (40x), pH=7,50 5 mM / 0,21 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,00 30 mM / 10 mM		85
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–70 min	70 min–70 min 54 s	70 min 54 s–85 min		
nM9pS!	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,48 2,54 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,00 30 mM / 10 mM		180
				0 min–1 min 41 s	1 min 41 s–120 min	120 min–120 min 27 s	120 min 27 s–180 min		
nM10pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,48 2,54 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,00 30 mM / 10 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 27 s	180 min 27 s–240 min		
nM11pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,48 2,54 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	“Mcilv.” (4x), pH=5,80 30 mM / 11,25 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 36 s	180 min 36 s–240 min		
nM12S	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	“Mcilv.” (80x), pH=7,48 2,54 mM / 0,1 mM				200
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–200 min				
M1pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,98 4,88 mM / 0,06 mM	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,60 35 mM / 7,5 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 18 s	180 min 18 s–240 min		
M2pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,50 2,34 mM / 0,08 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,05 30 mM / 10 mM		260
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 27 s	180 min 27 s–260 min		
M3S/1	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,98 4,88 mM / 0,06 mM				205
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–205 min				

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH, za redčene McIlvainove pufre so navedeni redčitev pufra (v oklepaju), pH in razmerje koncentracij dinatrijevega hidrogenfosfata in citronske kisline v pufru. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), Mcilv. – redčen McIlvainov pufer.

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
M3S/2	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,95 4,88 mM / 0,06 mM				260
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–260 min				
M4pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,98 4,88 mM / 0,06 mM	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (4x), pH=6,60 35 mM / 7,5 mM		250
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–200 min	200 min–200 min 19 s	200 min 19 s–250 min		
M5pS/1	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,98 4,88 mM / 0,06 mM	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=6,60 17,1 mM / 3,95 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 20 s	180 min 20 s–240 min		
M5pS/2	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (40x), pH=7,98 4,88 mM / 0,06 mM	0,85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=6,60 17,1 mM / 3,95 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 20 s	180 min 20 s–240 min		
M6pS	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,50 2,28 mM / 0,11 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	“Mcilv.” (8x), pH=5,98 15 mM / 5,35 mM		220
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 27 s	180 min 27 s–220 min		
M7pS/1	<u>G1</u>	A	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,46 2,28 mM / 0,11 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=6,00 14,7 mM / 5,15 mM		300
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 30 s	180 min 30 s–300 min		
M7pS/2	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,50 2,3 mM / 0,1 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=6,00 14,7 mM / 5,15 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 28 s	180 min 28 s–40 min		
M8S/1	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,50 2,3 mM / 0,1 mM				100
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–100 min				
M8S/2	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,46 2,3 mM / 0,11 mM				240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–240 min				
M8S/3	<u>G2</u>	C	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,52 2,28 mM / 0,11 mM				240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–240 min				

**Preglednica IX:** Seznam poskusov simulacije pH profila in sproščanja. Navedene so oznake poskusov ozziroma njihovih paralelk, pretočni sistem, serija uporabljenih tablet, zaporedje uporabljenih medijev pri poskusu (pod posameznimi mediji so navedeni časovni intervali dovajanja le-teh v pretočno celico) in čas trajanja poskusov. Za fosfatne pufre sta navedena koncentracija in pH, za redčene McIlvainove pufre so navedeni redčitev pufra (v oklepaju), pH in razmerje koncentracij dinatrijevega hidrogenfosfata in citronske kisline v pufru. (*se nadaljuje na naslednji strani*)

Legenda: TNAF – trinatrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), Mcilv. – redčen McIlvainov pufer.

Oznaka poskusa	Sistem	Serija tablet	Zaporedje uporabljenih medijev						Trajanje poskusov [min]
			1. HCl	2. dvig pH	3.	4.	5.	6.	
<b>M9pS/1</b>	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	“Mcilv.” (8x), pH=5,48 12,9 mM / 6,05 mM		240
				0 min–1 min 39 s	1 min 39 s–180 min	180 min–180 min 19 s	180 min 19 s–240 min		
<b>M9pS/2</b>	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=5,40 12,9 mM / 6,05 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 22 s	180 min 22 s–240 min		
<b>M10S/1</b>	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM				240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–240 min				
<b>M10S/2</b>	<u>G1</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM				240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–240 min				
<b>M11pSK/1</b>	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=5,40 12,9 mM / 6,05 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 22 s	180 min 22 s–240 min		
<b>M11pSK/2</b>	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM	0,425 % $\text{H}_3\text{PO}_4$	Mcilv. (8x), pH=5,40 12,9 mM / 6,05 mM		240
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–180 min	180 min–180 min 22 s	180 min 22 s–240 min		
<b>M12SK/1</b>	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM				260
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–260 min				
<b>M12SK/2</b>	<u>G2</u>	B	10 mM	55 mM TNAF	Mcilv. (80x), pH=7,00 1,95 mM / 0,275 mM				300
				0 min–1 min 40 s	1 min 40 s–300 min				

### 3.3.6 IZDELAVA TABLET Z NATRIJEVIM DIKLOFENAKATOM

Za teste sproščanja smo na fakulteti (katedra za farmacevtsko tehnologijo) izdelali 400 mg ogrodne tablete s HPMC in ZU natrijevim diklofenakatom (25 %) v treh serijah (Preglednica X). Zatehtane prahove HPMC in ZU (pomožnih snovi nismo uporabljali) smo prenesli v plastično vrečko in s stresanjem le-te zmes prahov homogenizirali. Nato smo za vsako tableto posebej zatehtali 400 mg te zmesi v čolniček in jo ročno dozirali v matrico tabletirke.

**Preglednica X:** Parametri pri izdelavi treh serij 25% ogrodnih tablet z Na-diklofenakatom.

Serija	Število tablet	Zatehtti surovin [g]		Trdnost [N]	Nastavitev pečatov		Tlaki stiskanja [kN]
		Metolose 90SH 4000SR	Na-diklofenakat		Zgornji	Spodnji	
A	45	13,5	4,5	100–110	10,00	12,10	13,0–13,3
B	60	18,0	6,0	100–110	10,00	12,13	10,3–10,8
C	30	9,0	3,0	100–110	10,00	12,13	10,0–10,3

### 3.3.7 TESTI SPROŠČANJA

Priprava poskusov pri testih sproščanja je bila podobna kot pri simulacijah pH profilov. Enako kot pri simulaciji pH profilov smo želodčno okolje (HCl) uporabljali kot izhodišče poskusa, nismo pa posebej simulirali zadrževanja tablet v tem mediju (le prvih 2,5 min, dokler ni začel pH naraščati pod vplivom TNAF). Sproščanje smo izvajali pri vseh poskusih od poskusa **nM9pS!** dalje ob simulaciji pH profilov z redčenimi McIlvainovimi pufri. Teste sproščanja smo izvajali z dvema metodama: s sinkerji in s kroglicami. Pri poskusih s sinkerjem smo natančno stehtano tableto, nameščeno v sinker, postavili v čašo s 40 mL HCl, čašo pokrili, namestili dovodno in odvodno cevko ter elektrodo pH-metra na svoja mesta (glej Sliko 3 - desno) ter takoj zagnali poskus. Pri poskusih s kroglicami smo v čašo, v katero smo dali veliki magnet, zatehtali 20 g steklenih kroglic, nato pa vanjo nalili 40 mL HCl. Tik pred začetkom poskusa smo skozi odprtino za pH-meter na pokrovu čaše vanjo spustili še tableto. Pri poskusih s kroglicami nismo mogli merili pH, ker je zaradi vrtenja velikega magneta in sočasnega gibanja kroglic ter tablete obstajala nevarnost poškodbe elektrode pH-metra. Poskuse s sinkerjem smo izvajali z uporabo manjšega magneta pri 100 rpm, poskuse s kroglicami pa z večjim magnetom pri 60 rpm. Konec odvodne cevke smo vstavili v valj, v katerega se je zbiral vzorec. Vsakih 20 minut smo valj zamenjali in tako dobljene 20-minutne vzorce (prb. 40 mL) stehtali, da smo pridobivali točne podatke o masi vzorcev. Vzorce smo nato pripravili za analizo kot je opisano v poglavju 3.3.1. Pri analizi dobljene vrednosti absorbanc smo z enačbami umeritvenih premic preračunali v koncentracije ZU v vzorcih. Na podlagi teh koncentracij in mas vzorcev (preračunali smo jih v volumne) smo izračunali maso ZU v posameznem vzorcu in le-te sešteli. Iz teh podatkov in podatka o masi tablete ter vsebnosti smo nato izračunali odstotek sproščene ZU v odvisnosti od časa.

## 4 REZULTATI

### 4.1 UMERITVENE PREMICE

Enačbe umeritvenih premic v različnih pufrih in Pearsonove koeficiente korelacije, izračunane z uporabo linearne regresije, prikazuje Preglednica XI.

**Preglednica XI:** Podatki o enačbah umeritvenih premic in Pearsonovih koeficientih korelacije v različnih medijih. y – izmerjena absorbanca za posamezen vzorec [l], x – koncentracija ZU v vzorcu [mg/mL].

Pufir	Enačba premice	Koeficient korelacije R <sup>2</sup>
McIlvainov, 40x redčen, pH = 8,00	y = 32,659 x + 0,0003	0,9995
McIlvainov, 8x redčen, pH = 6,78	y = 32,218 x + 0,0053	0,9998
McIlvainov, 8x redčen, pH = 5,40	y = 31,504 x - 0,0035	0,9996
McIlvainov, 80x redčen, pH = 6,80	y = 32,328 x + 0,0057	1

### 4.2 PRELIMINARNI POSKUSI

#### 4.2.1 NASTAVITEV PRETOKA SKOZI CEVKE

Spremembe nastavitev, izvedene med poskusi nastavljanja črpalk, in masni pretoki ( $\Phi_m$ ), izračunani po 20-minutnih testih, so prikazani v Preglednici X, ločeno za črpalki G1 in G2.

**Preglednica XII:** Seznam poskusov nastavitev pretokov. Navedene so oznake poskusov, spremembe nastavitev vijakov na črpalkah pred posameznim poskusom, mase 20-minutnih vzorcev vode (m) [g], prečrpanih skozi dovodno in odvodno cevko, ter masni pretoki ( $\Phi$ ) [g/min], izračunani iz izmerjene mase vode v merilnem valju po koncu poskusa in časa 20 minut. (se nadaljuje na naslednji strani) G1/G2 – črpalki, (+/-) – privijanje/odvijanje vijakov, DO/OD – oznaki za vijke pri dovodni/odvodni cevki, glavni vijak – srednji od treh vijakov, s katerimi vpnero cevko na rotor.

G1					
Poskus	Spremembe nastavitev	dovodna cevka		odvodna cevka	
		m [g]	$\Phi$ [g/min]	m [g]	$\Phi$ [g/min]
P1/1	/	39,68	1,984	38,86	1,943
P1/2	/	39,72	1,986	38,86	1,943
P2	- glavni OD vijak za 0,25 obrata	39,76	1,988	38,78	1,939
P3	+ oba spodnja vijaka	39,86	1,993	38,82	1,941
P4	- glavni OD vijak za 0,25 obrata	39,76	1,988	38,90	1,945
P5/1	- glavni DO vijak za 0,25 obrata in - glavni OD vijak za 0,75 obrata	39,60	1,980	39,54	1,977
P5/2	/	39,42	1,971	39,50	1,975
P5/3	/	39,36	1,968	39,54	1,977
P6	+ glavni DO vijak za 0,25 obrata	39,42	1,971	39,50	1,975
P7	+ glavni DO vijak za 0,25 obrata	39,34	1,967	39,52	1,976
P8/1	- glavni DO vijak za 0,25 obrata in + glavni OD vijak za 0,25 obrata	39,38	1,969	39,48	1,974
P8/2	/	39,22	1,961	39,52	1,976
P9	- glavni DO vijak za 0,25 obrata	39,22	1,961	39,44	1,972
P10	+ oba spodnja vijaka za 1 obrat	39,30	1,965	39,44	1,972
P11/1	+ glavni OD vijak	39,32	1,966	39,10	1,955
P11/2	/	39,32	1,966	39,12	1,956
P12	- spodnji OD vijak	39,28	1,964	39,12	1,956
P13/1	- glavni OD vijak	39,26	1,963	39,24	1,962
P13/2	/	39,28	1,964	39,26	1,963
P14/1	+ oba spodnja vijaka	39,18	1,959	39,16	1,958
P14/2	/	39,20	1,960	39,12	1,956
P14/3	/	39,18	1,959	39,12	1,956
G2					
Poskus	Spremembe nastavitev	dovodna cevka		odvodna cevka	
		m [g]	$\Phi$ [g/min]	m [g]	$\Phi$ [g/min]
P15	/	39,02	1,951	40,80	2,040
P16	+ oba spodnja vijaka za 1 obrat	39,10	1,955	40,80	2,040
P17	+ glavni OD vijak za 0,25 obrata	39,00	1,950	40,36	2,018
P18	+ glavni OD vijak za 0,25 obrata in - spodnji DO vijak za 1 obrat	39,02	1,951	40,06	2,003
P19/1	+ glavni OD vijak za 0,25 obrata in - glavni DO vijak za 0,25 obrata	39,00	1,950	39,66	1,983
P19/2	/	39,08	1,954	39,68	1,984
P20/1	- glavni DO vijak za 0,25 obrata	39,44	1,972	39,70	1,985

P20/2	/	39,42	1,971	39,64	1,982
P20/3	/	39,44	1,972	39,66	1,983
P21	- glavni DO vijak	39,48	1,974	39,62	1,981
P22/1	- glavni DO vijak	39,46	1,973	39,66	1,983
P22/2	/	39,40	1,970	39,62	1,981
P23	+ glavni DO vijak in - spodnji DO vijak	39,40	1,970	39,62	1,981
P24/1	- spodnji DO vijak	39,44	1,972	39,62	1,981
P24/2	/	39,42	1,971	39,62	1,981
P25/1	- spodnji DO vijak	39,56	1,978	39,62	1,981
P25/2	/	39,56	1,978	39,60	1,980
P26/1	- spodnji DO vijak	39,54	1,977	39,54	1,977
P26/2	/	39,56	1,978	39,46	1,973
P26/3	/	39,58	1,979	39,56	1,978
P26/4	/	39,58	1,979	39,58	1,979
P26/5	/	39,58	1,979	39,60	1,980
P26/6	/	39,56	1,978	39,58	1,979

#### 4.2.2 OCENA KOLIČINE H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ZA SIMULACIJO PADCEV pH

S preliminarnimi poskusi ocenjene volumne kislinske H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, potrebne za simulacijo določenih padcev pH, in iz njih izračunane čase črpanja (za pretok smo upoštevali vrednost 2 mL/min) prikazuje Preglednica XIII.

**Preglednica XIII:** Podatki o preliminarnih poskusih ocene količine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Navedeni so pufri, s katerimi smo dosegli pH plato in vrednost le-tega, željeni pH po padcu, koncentracija uporabljene H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ocenjeni volumni razredčene H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, potrebni za doseganje željenih padcev pH, in iz njih izračunani časi črpanja.

pufer za dosegajočega platoja	pH platoja	pH po padcu	koncentracija H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	V(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) [µL]	t(črpanja) [s]
10 mM fosfatni	7,5	6,0	0,85 %	800	24
1 mM fosfatni	7,5	6,0	0,425 %	400	12
McIlvainov, 80x redčen	7,0	5,4	0,425 %	650	19
McIlvainov, 80x redčen	7,5	6,0	0,425 %	900	27
McIlvainov, 40x redčen	8,0	6,6	0,85 %	600	19

#### 4.3 SIMULACIJA pH PROFILOV

##### 4.3.1 TESTI HITREGA DVIGA pH

pH v odvisnosti od časa za teste hitrih dvigov pH T1–T14 prikazuje Preglednica XIV.

**Preglednica XIV:** pH v delovni časi v odvisnosti od časa ob dodajanju različnih koncentracij raztopin Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v različno koncentrirane HCl (poskusi T1–T14). Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici VIII. Pri poskusih z več paralelkami je navedena povprečna vrednost pH.

Čas [min]	pH													
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
0	2,64	2,65	2,66	2,65	1,88	1,86	1,87	2,37	2,35	2,36	2,36	2,35	2,30	2,30
1	2,65	2,65	2,65	2,65	1,88	1,87	1,87	2,37	2,35	2,36	2,36	2,36	2,30	2,30
2	2,66	2,66	2,66	2,65	1,91	1,89	1,89	2,38	2,36	2,47	3,13	2,53	2,41	2,33
2,25	2,71	2,68	2,69	2,69	1,95	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2,5	2,76	2,72	2,72	2,74	2,04	2,02	2,03	2,46	2,44	6,95	/	6,40	2,85	2,62
2,75	2,81	2,79	2,78	2,80	2,15	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3	2,90	2,86	2,87	2,87	2,33	2,32	2,33	2,57	2,63	7,5	6,9	6,87	3,5	3,26
3,25	2,96	2,96	2,95	2,99	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3,5	3,14	3,12	3,09	3,10	3,31	2,99	3,40	2,71	2,81	/	6,94	6,93	6,33	3,58
3,75	3,38	3,30	3,39	3,34	6,20	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4	4,24	3,69	3,88	3,86	6,59	3,27	6,18	2,87	3,04	7,56			6,36	3,71
4,25	6,11	4,85	5,90	/	/		6,30	/	/				/	/
4,5	6,39	5,12	6,02	6,26	6,80			3,08	3,26				6,45	3,93
4,75	6,48	5,22	6,03							/			/	/
5			6,04							/			6,52	4,33
5,5									5,16					5,09
6									5,89					5,47
6,5									6,17					
7									6,87					

#### 4.3.2 SIMULACIJA pH PROFILOV S FOSFATNIMI PUFRI

V Preglednicah XV–XVII so prikazani vsi pH profili, pri izdelavi katerih smo uporabljali fosfatne pufre. Preizkušali smo različne koncentracije HCl v kombinaciji z različnimi koncentracijami raztopin Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Uporabljali smo pufre različnih koncentracij in pH, med posameznimi poskusni smo spreminjali časovne točke menjave pufrov.

**Preglednica XV:** pH profili pri poskusih s fosfatnimi pufri, pri katerih smo na začetku v 10 mM HCl uvajali 55 mM raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pri poskusu F3, ki smo ga izvedli v dveh paralelkah, je navedena povprečna vrednost pH.

Čas [min]	pH						
	F1	F2	F3 (pH)	F4	F21	F22	F23
0	/	/	/	/	2,33	2,35	2,35
1	/	2,37	2,37	2,37	2,34	2,35	2,35
2	/	/	2,39	2,37	2,37	2,36	2,35
2,5	/	2,37	2,48	2,55	2,50	2,48	2,45
3	2,62	2,53	2,66	2,73	2,62	2,67	2,62
3,5	2,88	2,84	2,75	2,80	3,08	3,03	3,02
4	3,80	3,16	2,97	2,95	5,71	5,28	5,12
4,5	6,52	4,38	3,30	3,43	6,13	5,88	5,75
5	6,80	6,20	4,28	4,90	6,15	5,93	5,81
5,5	/	6,66	6,20	6,24	/	/	/
6	7,08	6,81	6,48	6,64	6,17	5,97	/
6,5	/	6,92	/	/	/	/	/
7	7,25	7,00	6,80	6,86	6,19	6,00	5,91
8	7,35	7,13	6,98	7,00	6,21	6,02	5,95
9	7,44	7,23	7,08	7,12	6,23	6,04	/
10	7,49	7,31	7,17	7,21	6,25	6,06	/
11	7,54	7,38	7,25	7,28	/	/	/
12	7,58	7,43	7,31	7,34	/	6,10	/
13	7,62	7,47	7,36	7,40	/	/	/
14	7,65	7,51	7,41	7,43	/	6,15	/
15	7,68	7,55	7,45	7,48	/	/	/
16	7,70	7,58	7,48		/	6,19	/
17	7,73	7,61	7,52		6,38	/	/
18	7,75	7,64	7,55		/	6,23	/
19	7,76	7,66	7,58		/	/	/
20	7,78	7,68	7,60		6,43	6,27	/
21	7,80	7,70	7,62		/	/	/
22	7,81	/	7,64		/	/	/
25	7,84	7,77	7,70		6,48	6,37	/
26	7,85	7,78	7,71		/	/	/
27	7,86	7,79	/		/	/	6,31
28	7,87	/	7,74		/	/	/
30	7,89	7,83	7,77		6,55	/	6,37
35	7,92	7,87	7,82		/	/	/
36	7,92	/	/		/	6,58	6,49
37	7,93	/	/		6,65	/	/
40	7,94	7,90	7,86		6,67	/	6,56
45	7,95	7,93	7,90		6,72	6,75	
50	7,96	7,94	7,91		6,77	/	
55	7,97	7,96	7,93		6,86	/	
60	7,98	7,96	7,94		6,92	6,98	
65	7,98	7,97	7,95		6,97	/	
70	7,98	7,97	7,96		/	/	
75		7,98	7,96		/	7,16	
77		/	/		7,12	/	
80		7,97	7,96			/	
90						7,27	

**Preglednica XVI:** pH profili pri poskusih s fosfatnimi pufri, pri katerih na začetku v 10 mM HCl nismo uvajali raztopine Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pri poskusih F5, F6 in F7, ki smo jih izvedli v več paralelkah, je navedena povprečna vrednost pH.

Čas [min]	pH						
	F5 (pH)	F6 (pH)	F7 (pH)	F8	F9	F10	F11p
0	/	2,37	2,38	2,38	2,33	2,37	2,37
1	2,39	2,37	2,38	/	/	/	2,37
2	2,40	2,37	2,38	2,39	2,33	2,37	2,38
2,5	2,45	2,41	2,39	2,40	2,33	2,38	2,43
3	2,51	2,46	2,43	2,43	2,35	2,38	2,49
3,5	2,60	2,51	2,46	2,46	2,38	2,40	2,58
4	2,71	2,57	2,50	2,50	2,40	2,42	2,67
4,5	2,81	2,65	2,53	2,53	2,43	2,44	2,80
5	2,99	2,74	2,57	2,57	2,46	2,46	2,95
5,5	3,19	2,82	2,61	2,62	2,49	2,48	3,17
6	3,63	2,91	2,64	2,67	2,53	2,49	3,45
6,5	5,38	3,05	2,68	2,73	2,56	2,52	3,90
7	6,19	3,18	2,72	2,80	2,60	2,54	4,37
7,5	6,46	3,35	2,76	2,86	2,64	2,56	5,16
8	6,61	3,62	2,79	2,95	2,68	2,58	5,51
8,5	6,72	4,20	2,83	3,03	2,72	2,61	5,61
9	6,83	5,51	2,87	3,15	2,77	2,63	5,68
9,5	6,91	5,96	2,91	3,27	2,82	2,65	5,73
10	6,96	6,13	2,95	3,47	2,87	2,67	5,77
10,5	/	6,25	2,98	3,80	2,93	2,69	5,79
11	7,05	6,34	3,02	4,54	2,97	2,71	5,82
11,5	7,09	6,40	3,05	5,85	3,06	2,73	5,83
12	7,13	6,45	3,09	6,12	3,12	2,75	5,85
12,5	7,15	6,47	3,13	6,32	3,19	2,78	5,87
13	7,19	6,54	3,16	6,43	3,29	2,81	5,88
13,5	/	6,57	3,20	6,52	3,40	2,83	5,89
14	7,26	6,60	3,24	6,61	3,57	2,85	5,90
14,5	/	6,62	3,27	6,68	3,71	2,87	5,91
15	7,30	6,65	3,31	6,74	4,05	2,89	5,97
15,5	/	6,67	3,35	/	/	/	6,03
16	7,35	6,68	3,39	6,83	5,49	2,94	6,07
16,5	/	/	3,43	/	/	/	6,12
17	7,38	6,72	3,47	6,92	5,90	2,98	6,15
17,5	/	/	3,51	/	/	/	6,19
18	7,42	6,74	3,56	6,99	6,11	3,03	6,21
18,5	/	/	3,60	/	/	/	6,26
19	7,45	6,77	3,64	7,03	6,23	3,08	6,28
19,5	/	/	3,71	/	/	/	/
20	7,49	6,79	3,76	7,09	6,32	3,12	6,33
21	7,51	/	3,89	/	/	/	6,37
22	7,54	/	4,04	7,18	6,45	3,22	6,42
23	7,57	/	4,25	/	/	/	6,45
24	7,59	/	4,52	7,26	6,54	3,31	6,49
25	7,61	6,85	4,84	/	/	/	6,52
26	/	/	5,10	7,32	6,60	3,42	6,55
27	/	/	5,27	/	/	/	/
28	7,67	/	5,37	7,38	6,67	3,54	6,60
29	/	/	5,46	/	/	/	/
30	7,70	6,89	5,52	7,47	6,71	3,68	6,65
32	/	/	5,62	7,49	6,75	3,83	6,69
34	/	/	5,69	7,53	6,77	4,07	6,72
35	7,77	6,92	5,72	/	/	/	6,76
36	/	/	5,74	7,57	6,80	4,41	6,80
38	/	/	5,78	7,60	6,82	4,94	6,88
40	7,82	6,93	5,81	7,63	6,84	5,28	6,95
41	/	6,94	5,83	/	/	5,38	/
42	/	6,94	5,84	/	/	5,46	7,00
43	7,85	6,95	5,85	/	/	5,53	/
44	/	6,99	5,86	/	/	5,58	7,06
45	7,87	7,02	5,87	7,70	6,87	5,62	/
46	/	7,05	/	/	/	/	7,12
47	/	7,08	/	/	/	/	/
48	/	7,11	/	/	/	5,73	7,17
49	/	7,13	/	/	/	/	/

50	7,90	7,16	5,91	7,76	6,90	5,78	7,22
55	7,93	7,29	5,93	7,80	6,92	5,86	7,34
60	7,95	7,39	5,95	7,84	6,93	5,92	7,43
62	/	/	5,96	/	/	/	7,46
63	/	/	6,05	/	/	/	/
64	/	/	6,20	/	/	/	7,49
65	/	7,48	6,32	7,87	6,94	5,96	/
66	/	/	6,42		6,94	5,97	7,52
67	/	/	6,49		6,95	5,97	/
68	/	/	6,56		6,96	6,05	7,55
69	/	/	6,63		6,99	/	/
70	/	7,56	6,68		7,01	6,35	7,58
72	7,98	/	6,77		7,12	6,52	7,61
74	/	/	6,85		7,14	6,66	7,63
75	7,98	/	/		/	6,72	/
76	/	/	6,92		7,18	6,77	7,65
78	/	/	6,99		7,23	6,86	7,68
80	7,99	7,68	7,04		7,27	6,94	7,70
85		/	7,18		/	7,12	/
90		7,80	7,29		/	7,22	7,78
95		7,80	7,39		/	7,33	/
100		7,83	7,47		/	7,44	7,84
110		7,87	7,61		/	7,60	7,88
118		/	/		/		7,90
120		7,92	/		/		7,90
125			7,76		/		7,37
130			/		/		7,10
150			7,90		7,84		6,57
180							6,20

**Preglednica XVII:** pH profili pri poskusih s fosfatnimi pufri, pri katerih smo na začetku v različno koncentrirane HCl uvajali 0,21 M ali 0,105 M raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (poskusi F12p–F20p). Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH									
	F12p	F13p	F14p	F15p	F16p	F17p	F18p	F19p	F20p	
0	1,96	1,95	1,85	1,87	1,92	1,92	1,92	2,30	2,35	
1	1,95	1,94	1,85	1,86	1,92	1,92	1,92	2,30	2,35	
2	1,97	1,96	1,87	1,88	1,92	1,93	1,91	2,32	2,38	
2,5	2,08	2,11	1,99	2,00	2,04	2,05	1,91	2,58	2,64	
3	2,38	2,40	2,3	2,23	2,31	2,4	2,03	3,95	4,16	
3,5	3,14	3,17	2,97	3,06	3,04	3,1	2,38	5,43	5,34	
4	6,31	5,72	5,59	5,37	5,47	3,74	5,39	5,78	5,70	
4,5	6,56	6,17	5,89	5,67	5,71	4,2	6,1	5,9	5,82	
5	6,60	6,34	6,02	5,83	5,81	4,9	6,15	6,03	5,91	
5,5	6,62	6,46	6,12	5,93	5,90	/	6,21	6,11	6,00	
6	6,63	6,54	6,2	6,01	5,97	5,51	6,25	6,19	6,01	
6,5	6,64	6,60	6,26	6,07	6,03	/	6,27	6,24	/	
7	6,65	6,64	6,31	6,13	6,08	5,76	6,29	6,3	6,07	
7,5	6,66	6,68	6,37	6,17	6,12	/	6,32	6,34	/	
8	6,67	6,72	6,41	6,20	6,17	5,93	6,33	6,39	6,11	
8,5	6,68	/	/	/	/	/	/	/	/	
9	6,72	6,78	6,49	6,28	6,25	6,05	/	6,47	6,15	
9,5	/	/	/	/	/	/	6,39	/	/	
10	6,81	6,83	6,56	6,35	6,32	6,15	6,40	6,53	6,20	
11	6,89	6,88	6,62	/	/	/	/	6,59	/	
12	6,95	6,92	6,68	6,45	6,44	6,33	/	6,64	6,28	
13	7,00	6,96	/	/	/	/	/	6,69	/	
14	7,04	7,00	6,78	6,56	6,54	6,46	/	6,73	6,34	
15	7,09	7,02	/	/	/	/	6,57	6,78	/	
16	7,14	7,06	6,86	6,64	6,63	6,57	/	6,82	6,40	
17	7,18	7,09	/	/	/	/	/	6,85	/	
18	7,22	7,12	6,95	/	6,73	6,67	/	6,88	6,46	
19	7,25	7,15	/	/	/	/	/	6,92	/	
20	7,29	7,18	7,00	6,81	6,80	6,75	/	6,95	6,52	
21	7,32	/	/	/	/	/	6,74	/	/	
22	7,35	/	/	6,87	/	/	/	7,00	/	
23	7,37	/	/	/	/	/	/	/	/	
24	7,4	/	/	/	/	/	/	/	/	
25	7,43	7,32	7,15	6,95	/	/	6,85	7,06	6,66	
26	7,45	/	/	/	/	/	/	/	/	

27	7,47	/	/	/	/	/	/	/	/	/
28	7,49	/	/	/	/	/	/	/	/	/
29	7,13	/	/	/	/	/	/	/	/	/
30	6,72	/	7,28	7,07	/	/	/	/	7,15	6,78
31	6,34	7,45	/	/	/	/	/	/	/	/
32	6,17	/	/	/	/	/	/	/	/	/
33	6,18	/	/	/	/	7,16	/	/	/	/
34	6,21	/	/	/	/	/	/	/	/	/
35	6,24	7,53	7,38	7,19	/	7,21	/	/		6,88
36	6,28	/	/	/	/	/	/	/		/
38	6,34	/	/	/	/	/	7,14	/		/
40	6,39	7,61	7,47	7,29	7,33	7,32	7,18	/		6,98
42	/	/	7,50	/	/	/	/	/		/
42,5	/	/	7,42	/	/	/	/	/		/
43	/	/	6,90	/	/	/	/	/		/
43,5	/	/	6,35	/	/	/	/	/		/
44	/	/	6,04	/	/	/	/	/		/
44,5	/	/	5,48	/	/	/	/	/		/
45	6,49	7,68	5,33	7,38	7,43	7,43	7,29	/		7,05
46	/	/	5,55	/	/	/	/	/		/
47	/	/	5,62	/	/	/	/	/		/
50	6,56	7,74	5,86	7,47	7,52	7,52	/	/		/
55		7,80	/	7,54	7,60	/	7,47	/		/
60		7,84	6,25	7,60	7,67	7,67	7,56	/		7,25
62		7,84	/	/	/	/	7,59	/		/
62,5		7,30	/	/	/	/	7,60	/		/
63		6,98	/	/	/	/	6,02	/		/
63,5		6,63	/	/	/	/	6,08	/		/
64		6,33	/	/	/	/	6,09	/		/
64,5		5,88	/	/	/	/	6,08	/		/
65		5,95	6,36	7,66	7,73	/	6,08	/		/
66		6,07	/	/	/	/		/		/
68		6,23	6,40	/	/	/		/		/
70		6,34		7,70	7,79	/		/		7,35
75		6,50		7,74	/	/		/		7,39
80		6,61		7,77	/	/		/		7,42
85		6,65		7,79	/	7,88		/		/
90		6,68		7,81	/	7,89		7,49		7,47
95		6,72		7,83	/	/		7,49		7,48
100		6,75		7,83	/	/		7,50		7,48
105				/	7,97	/		7,50		7,49
105,5				/	7,92	/		/		/
106				/	6,80	/		/		/
106,5				/	5,81	/		/		/
108				/	6,03	/		/		/
110				7,85	/	/		/		7,48
115				/	/	/		7,48		/
118				/	/	/		7,48		/
120				7,86	/	/		6,04		7,49
125				7,86	/	8,00		6,02		/
128				/	/	8,00		/		/
128,5				/	/	6,91		/		/
129				/	/	6,73		/		/
129,5				/	/	6,69		/		/
130				7,86	6,03	6,65		6,00		7,48
130,5				/		6,62		/		/
131				/		6,59		/		/
142				/		6,30		/		7,48
145				/		6,23		5,97		/
157,5				/		/		/		7,51
158				/		/		5,98		5,96
160				7,87		6,19				6,07
180				7,87						6,03
182,5				7,87						/
183				6,74						/
184				5,95						/
185				5,96						6,02
210				5,94						6,00
250				5,92						

### 4.3.3 SIMULACIJA pH PROFILOV Z REDČENIMI MCILVAINOVIMI PUFRI

V Preglednicah XVIII–XXII so prikazani vsi pH profili, pri izdelavi katerih smo uporabljali redčene McIlvainove pufre. Med posameznimi poskusi smo spremenjali časovne točke menjave pufrov. Pri vseh smo za hitri začetni dvig pH uporabljali 55 mM raztopino  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ .

**Preglednica XVIII:** pH profili pri poskusih z redčenimi McIlvainovimi pufri, kjer smo na začetku v 10 mM HCl uvažali 55 mM raztopino  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH								
	M1p	nM2	nM3p	nM4	nM5	nM6	nM7p/1	nM7p/2	nM8p
0	2,33	2,33	2,30	2,34	2,35	2,32	2,35	2,33	2,30
1	2,34	2,33	2,30	2,34	2,35	2,32	2,34	2,32	2,30
2	2,34	2,34	2,31	2,34	2,35	2,34	2,34	2,32	2,31
2,5	2,41	2,45	2,40	/	2,44	2,50	2,44	2,40	2,53
3	2,54	2,60	2,60	2,64	2,59	2,76	2,61	2,56	/
3,5	2,85	3,02	3,00	3,01	3,02	3,21	3,03	2,90	3,03
4	3,50	3,75	5,05	3,46	4,17	4,13	4,04	3,64	4,04
4,5	5,95	5,53	5,49	5,16	5,77	5,65	5,43	5,04	5,73
5	6,52	5,95	5,85	5,88	5,93	5,75	5,61	5,54	5,88
5,5	6,65	6,08	5,88	6,07	6,02	5,82	5,78	5,72	6,01
6	6,78	6,20	5,93	6,14	6,07	5,90	5,86	5,81	6,12
6,5	6,87	6,31	6,00	6,17	6,12	5,94	5,94	5,90	6,17
7	6,94	6,36	6,02	6,20	6,15	5,99	6,00	5,95	6,23
8	7,01	6,49	6,12	6,23	6,21	6,07	6,10	6,02	6,33
9	7,08	6,57	6,19	6,27	6,25	6,13	6,19	6,11	6,43
10	7,13	6,65	6,26	6,30	6,28	6,20	6,26	6,18	6,48
11	7,18	6,72	6,32	6,33	6,30	6,25	6,33	6,25	6,54
12	7,22	6,78	6,37	6,36	6,33	6,30	6,38	/	6,61
13	7,24	6,83	6,43	6,39	6,36	6,35	6,44	/	6,66
14	7,26	6,87	6,47	6,42	6,39	6,40	6,49	/	6,70
15	7,28	6,91	6,51	6,45	6,42	6,44	6,52	6,45	6,74
20	7,35	7,07	6,71	6,58	6,56	6,62	6,72	6,63	6,92
25	7,38	7,17	6,85	6,70	6,68	6,75	6,87	6,80	7,04
30	7,41	7,26	6,97	6,81	6,81	6,87	6,98	6,91	/
35	7,42	7,32	7,06	6,92	6,92	6,96	7,07	/	7,23
40	7,43	7,37	7,14	7,00	7,00	/	/	7,09	/
45	7,44	7,40	7,21	7,08	7,08	7,08	7,23	7,17	7,35
50	7,44	7,43	/	7,16	7,16	/	/	7,22	7,40
55	7,45	7,46	/	7,24	7,24	/	/	7,28	7,43
60	7,45	7,48	7,37	7,30	7,30	7,26	7,37	7,32	7,47
70	7,45	/	7,43	7,41	7,41	7,34	7,44	7,38	7,51
72	/	/	/	/	/	/	/	/	7,52
72,5	/	/	/	/	/	/	/	/	6,90
73	/	/	/	/	/	/	/	/	6,46
73,5	/	/	/	/	/	/	/	/	5,93
74	/	/	/	/	/	/	/	/	5,98
75	7,46	/	7,45	7,45	7,45	/	/	7,40	6,04
80	7,46	/	7,46	7,48	7,48	7,40	7,48	7,42	6,10
85	7,46	/	7,47	7,50	7,50	7,41	7,49	7,44	6,10
90	7,46	/	7,49	7,52	7,52	7,43	7,50	7,45	
94	7,46	/	/	/	/	/	/	/	
94,5	7,33	/	/	/	/	/	/	/	
95	7,26	7,53	7,50	7,54	7,54	/	/	7,46	
96	7,17	/	/	/	/	/	7,52	/	
97	7,10	/	/	/	/	/	/	7,47	
98	7,00	/	/	/	/	/	/	/	
99	6,89	/	/	/	/	/	/	7,46	
99,5	/	/	/	/	/	/	/	5,94	
100	/	/	7,51	7,55	7,55	/	/	6,06	
100,5	/	/	/	/	/	/	/	6,10	
105	/	/	7,51	7,56	7,56	7,45	/	6,15	
110		7,53	7,52			/	/		
120		7,53				/	/		
140						/	7,54		
170						7,45	7,55		

**Preglednica XIX:** pH profili pri poskusih z redčenimi McIlvainovimi pufri, kjer smo na začetku v 10 mM HCl uvajali 55 mM raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter vzpostavili plato pri pH 7,5. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH			
	nM9pS!	nM10pS	nM11pS	nM12S
0	2,34	2,37	2,28	2,35
1	2,34	2,37	2,28	2,35
2	2,35	2,38	2,29	2,36
2,5	2,44	2,43	2,40	2,47
3	2,70	2,61	2,62	2,64
3,5	3,10	2,95	3,06	3,01
4	/	4,70	5,62	4,23
4,5	6,00	6,25	6,07	5,73
5	6,08	6,28	6,12	5,95
5,5	6,13	6,32	6,17	6,04
6	6,17	6,35	6,21	6,10
6,5	6,20	6,38	6,26	6,15
7	6,24	6,40	6,29	6,19
8	6,30	6,45	6,35	6,27
9	6,36	6,49	6,40	6,33
10	6,40	6,53	6,45	6,38
11	6,45	6,57	6,50	6,43
13	6,54	6,64	6,59	6,52
15	6,61	6,70	6,67	6,60
20	6,78	6,85	6,83	6,77
25	6,90	6,96	6,95	6,90
30	6,99	7,04	7,04	7,00
40	7,13	7,20	7,19	7,15
50	7,24	7,30	7,30	7,27
60	7,32	7,37	7,37	7,36
80	7,39	7,45	7,45	7,46
100	7,44	7,49	7,48	7,50
120	7,45	7,51	7,50	7,52
122	7,45	/	/	/
122,5	7,30	/	/	/
123	5,94	/	/	/
123,5	6,02	/	/	/
124	6,04	/	/	/
130	6,06	7,52	7,51	7,52
140	6,02	7,54	7,51	7,53
160	5,98	7,54	7,52	7,53
180	5,96	7,54	7,51	7,53
182		7,31	7,51	/
182,5		6,71	7,21	/
183		6,04	6,59	/
183,25		6,03	6,27	/
183,5		6,06	6,12	/
184		6,09	5,96	/
185		6,12	5,90	/
190		6,13	5,89	7,53
200		6,10	5,86	7,53
240		6,05	5,81	

**Preglednica XX:** pH profili pri poskusih z redčenimi McIlvainovimi pufri, kjer smo na začetku v 10 mM HCl uvajali 55 mM raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter vzpostavili plato pri pH 7,0. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH			
	M9pS/1	M9pS/2	M10S/1	M10S/2
0	2,35	2,37	2,35	2,34
1	2,35	2,38	2,36	2,35
2	2,35	2,38	2,37	2,36
2,5	2,47	2,49	2,47	2,48
3	2,62	2,66	2,67	2,68
3,5	3,00	3,19	3,04	3,12
4	3,80	3,89	3,70	4,63
4,5	5,63	5,61	5,58	5,88
5	5,95	6,03	5,96	6,06
5,5	6,04	6,13	6,07	/
6	6,10	6,21	6,11	6,18
7	6,16	6,24	6,17	6,22
8	6,20	6,27	6,22	6,26
9	/	6,30	6,25	6,30
10	6,27	6,34	6,29	6,33
12	6,34	6,39	6,35	6,39
15	6,42	6,47	6,43	6,47
20	6,53	6,57	6,55	6,57
25	6,62	6,65	6,63	6,66
30	6,70	6,72	6,70	6,73
35	/	6,77	6,77	6,79
40	6,81	6,81	6,81	6,84
45	/	6,85	6,85	6,88
50	6,88	6,88	6,88	6,91
55	6,90	6,90	6,91	6,94
60	6,91	6,93	6,92	6,96
70	6,93	6,95	6,95	6,99
80	6,96	6,97	6,97	7,00
90	6,97	6,98	6,99	7,00
100	6,97	6,99	7,00	7,01
110	6,98	7,00	7,00	/
120	6,99	7,00	7,00	7,02
130	6,99	7,00	7,00	/
140	7,00	7,00	7,00	7,03
160	7,00	7,00	7,00	7,03
180	7,00	7,00	7,01	7,03
182	6,83	7,00	/	/
182,5	5,86	6,83	/	/
183	5,72	5,96	/	/
183,5	5,71	5,60	/	/
184	5,69	5,38	/	/
185	5,66	5,32	/	/
190	5,62	5,42	7,02	/
200	5,57	5,46	7,02	7,03
220	5,54	5,46	7,03	7,04
240	5,53	5,46	7,03	7,04

**Preglednica XXI:** pH profili pri poskusih z redčenimi McIlvainovimi pufri, kjer smo na začetku v 10 mM HCl uvajali 55 mM raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter vzpostavili plato pri pH 7,5. Pri poskusu M7pS/2 smo pH merili samo 130 min, poskus pa je tekel 240 min. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH					
	M2pS	M6pS	M7pS/1	M7pS/2	M8S/1	M8S/2
0	2,39	2,34	2,33	2,37	2,35	2,34
1	2,40	2,35	2,34	2,37	2,35	2,34
2	2,40	2,38	2,36	2,37	2,34	2,35
2,5	2,51	2,47	2,46	2,48	2,42	2,47
3	2,72	2,70	2,70	2,69	2,61	2,65
3,5	3,25	3,21	3,19	3,05	3,06	3,10
4	4,50	4,73	4,50	4,00	5,58	4,26
4,5	5,95	5,84	5,76	5,31	6,05	5,92
5	6,09	6,09	6,03	6,04	6,16	6,13
5,5	6,17	6,20	/	/	6,19	6,21
6	6,22	6,24	6,20	/	6,22	6,27
6,5	6,26	6,30	/	/	6,27	/
7	6,29	6,34	6,27	6,26	6,30	6,32
8	6,36	6,41	6,32	/	6,36	6,37
9	6,40	6,46	6,36	6,37	6,41	6,42
10	6,45	6,51	6,41	6,41	6,45	6,46
12	6,54	6,60	6,50	/	6,54	6,53
14	/	6,69	6,56	/	6,61	6,6
15	6,65	/	/	6,62	/	/
16	/	/	6,62	/	6,68	6,66
18	/	/	6,68	6,70	6,74	6,71
20	6,82	6,88	6,73	6,76	6,80	6,76
25	6,93	7,00	6,85	6,89	6,90	6,87
30	7,03	7,09	6,95	6,99	7,00	6,97
35	7,11	/	7,03	7,06	7,10	/
40	7,19	7,25	7,09	/	7,16	7,11
45	7,26	/	7,15	7,20	7,21	7,16
50	7,31	7,35	7,21	/	7,26	/
55	7,35	/	/	7,30	/	7,26
60	7,39	7,42	7,27	/	7,33	7,30
65	7,42	/	/	7,36	/	/
70	7,45	7,47	7,32	/	7,39	7,34
80	7,48	7,50	7,36	7,43	7,43	7,37
100	7,52	7,54	7,39	7,47	7,48	7,41
120	7,54	7,56	7,41	7,47		7,43
130	7,54	/	7,42	7,48		/
140	7,54	7,57	7,43			7,44
180	7,55	7,58	7,44			7,45
182	7,55	7,58	7,42			/
182,25	/	/	6,90			/
182,5	7,44	/	6,36			/
182,75	6,92	/	5,36			/
183	6,65	/	5,23			/
183,25	/	6,98	/			/
183,5	6,32	6,55	5,50			/
184	6,24	6,23	5,62			/
185	6,20	6,10	5,76			/
190	/	6,14	5,95			7,45
200	6,17	6,11	6,02			7,46
240	6,13	6,09	6,03			7,45
260	6,12		6,03			
300			6,05			

**Preglednica XXII:** pH profili pri poskusih z redčenimi McIlvainovimi pufri, kjer smo na začetku v 10 mM HCl uvajali 55 mM raztopino Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter vzpostavili plato pri pH 8,0. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX.

Čas [min]	pH					
	M1pS	M3S/1	M3S/2	M4pS	M5pS/1	M5pS/2
0	2,37	2,28	2,36	2,33	2,34	2,33
1	2,39	2,29	2,36	2,34	2,36	2,33
2	2,39	2,31	2,37	2,34	2,36	2,35
2,5	2,50	2,41	2,49	2,52	2,47	2,47
3	2,67	2,66	2,69	2,71	2,65	2,67
3,5	3,03	3,59	3,18	3,14	3,05	3,05
4	4,28	3,56	5,90	5,41	3,96	4,00
4,5	6,05	3,93	6,20	5,99	5,82	5,75
5	6,24	5,74	6,30	6,12	6,14	6,15
5,5	6,35	6,16	6,36	6,19	6,25	/
6	6,41	6,35	6,42	6,28	6,33	6,29
6,5	6,45	6,48	/	6,33	6,39	/
7	6,51	6,56	6,52	6,38	6,45	6,42
7,5	6,55	6,64	/	6,43	6,50	/
8	6,59	6,67	6,59	6,48	6,53	6,51
9	6,64	6,77	6,66	6,56	6,61	6,58
10	6,72	6,83	6,72	6,63	6,68	6,63
11	6,77	6,89	/	6,68	/	/
12	6,83	6,94	6,82	/	6,78	6,76
13	6,88	7,00	/	/	/	/
14	6,92	7,03	6,90	6,85	6,88	6,85
15	6,96	7,07	/	/	/	/
16	/	/	6,99	6,94	6,96	6,95
20	7,13	7,23	7,10	7,05	7,09	7,06
25	7,26	7,36	7,24	7,20	7,22	7,20
30	7,38	7,47	7,35	7,31	7,33	7,32
35	7,47	7,56	7,44	7,40	7,43	7,41
40	7,55	7,63	7,52	7,49	7,51	7,50
45	/	7,68	7,58	7,56	7,57	7,58
50	7,67	7,73	/	7,63	7,63	7,64
55	7,72	7,78	7,68	7,68	7,68	7,69
60	7,76	7,81	7,73	7,72	/	7,73
65	7,80	/	/	7,76	7,72	/
70	7,83	7,87	7,79	7,79	7,78	7,80
75	7,85	7,88	/	7,82	/	/
80	7,88	/	7,82	7,84	7,83	7,85
90	7,90	7,93	7,86	7,88	7,86	7,88
100	7,93	7,95	7,88	7,90	7,88	7,91
120	7,96	7,96	7,90	7,93	7,91	7,93
140	7,97	/	7,92	7,95	7,93	7,94
160	7,98	7,98	7,92	7,95	7,93	7,95
180	7,98	7,98	7,92	7,95	7,93	7,95
181,75	/	/	/	/	/	7,92
182	7,97	/	/	/	7,26	7,56
182,25	7,44	/	/	/	/	/
182,5	7,02	/	/	/	6,64	6,77
182,75	6,89	/	/	/	6,57	/
183	6,81	/	/	/	6,57	6,65
183,5	6,74	/	/	/	6,58	6,62
184	6,72	/	/	/	6,59	6,60
185	6,72	/	/	/	6,60	6,60
190	/	/	7,92	/	6,63	6,62
195	6,71	/	/	/	6,64	/
200	6,71	7,98	7,93	7,95	6,64	6,65
202	/	/	/	7,95	/	/
202,5	/	/	/	6,70	/	/
203	/	/	/	6,65	/	/
205	6,69	7,98	/	6,65	/	/
220	6,68		7,93	6,70	6,64	6,65
240	6,68		7,93	6,73	6,64	6,65
250			7,94	6,74		
260			7,93			

## 4.4 TESTI SPROŠČANJA

Preglednice XXIII–XXIX prikazujejo profile sproščanja natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet s HPMC ob simulaciji različnih pH profilov GIT. Poskuse sproščanja **M11pSK/1**, **M11pSK/2**, **M12SK/1** in **M12SK/2** (vsi pri platoju pH 7,0) smo izvedli na sistemu s steklenimi kroglicami, vse ostale poskuse sproščanja pa na sistemu s sinkerjem. Poskus **nM9pS!**, ki smo ga izvedli brez uporabe sinkerja, smo izločili iz obravnave.

### 4.4.1 PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 7,0

Preglednici XXIII in XXIV prikazujeta profile sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,0. Poskusi na sistemu s steklenimi kroglicami so prikazani v Preglednici XXIV.

**Preglednica XXIII:** Primerjava profilov sproščanja med poskusoma s pH platojem 7,0 s padcem (M9pS) in brez padca pH (M10S) na sistemu s sinkerjem. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta. Prikazane so paralelne poskusov ter povprečne vrednosti.

Čas [min]	% sproščene učinkovine					
	M9pS/1		Povprečje		M10S/2	
	serija B	serija B	serija B	serija B	serija B	Povprečje
20	0,62	0,59	0,61	0,63	0,69	0,66
40	3,49	3,58	3,54	3,56	3,61	3,59
60	7,11	7,27	7,19	7,27	7,18	7,23
80	10,87	10,87	10,87	10,90	10,72	10,81
100	13,97	14,11	14,04	14,27	14,04	14,16
120	17,00	17,07	17,04	17,39	17,15	17,27
140	19,81	19,82	19,82	20,26	19,96	20,11
160	22,44	22,35	22,40	22,91	22,60	22,76
180	24,84	24,75	24,80	25,42	25,06	25,24
200	27,07	27,00	27,04	27,78	27,39	27,59
220	28,98	28,92	28,95	30,04	29,65	29,85
240	30,60	30,56	30,58	32,20	31,84	32,02
+ ostanek	32,32	32,32	32,32	34,57	34,48	34,53

**Preglednica XXIV:** Primerjava profilov sproščanja med poskusoma s pH platojem 7,0 s padcem (M11pS) in brez padca pH (M12S) na sistemu s kroglicami. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta. Prikazane so paralelne poskusov ter povprečne vrednosti.

Čas [min]	% sproščene učinkovine					
	M11pSK/1		Povprečje		M12SK/2	
	serija B	serija B	serija B	serija B	serija B	Povprečje
20	0,99	0,99	0,99	1,04	0,82	0,93
40	4,84	5,00	4,92	5,12	4,77	4,95
60	9,39	9,51	9,45	9,75	9,47	9,61
80	13,63	13,74	13,69	14,08	13,92	14,00
100	17,40	17,53	17,47	17,92	17,94	17,93
120	20,79	20,98	20,89	21,46	21,54	21,50
140	23,99	24,21	24,10	24,66	24,78	24,72
160	26,97	27,22	27,10	27,74	27,78	27,76
180	29,79	30,02	29,91	30,68	30,65	30,67
200	32,46	32,53	32,50	33,53	33,40	33,47
220	34,79	34,75	34,77	36,28	36,06	36,17
240	36,88	36,72	36,80	38,93	38,66	38,80
260				41,49	41,12	41,31
280					43,54	43,54
300					45,86	45,86

#### 4.4.2 PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 7,5

Preglednice XXV–XXVII prikazujejo profile sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,5.

**Preglednica XXV:** Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,5 s padcem pH. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta.

Čas [min]	% sproščene učinkovine					
	nM10pS		M2pS		M6pS	
	serija A	serija A	serija A	serija A	serija A	serija B
20	0,57	0,60	0,38	0,64	0,49	0,61
40	3,59	3,67	2,74	3,75	3,12	3,42
60	7,33	7,43	6,07	7,61	6,54	7,09
80	10,86	11,12	9,49	11,47	10,01	10,76
100	14,16	14,68	12,76	14,98	13,28	14,20
120	17,19	17,89	15,81	18,16	16,28	17,32
140	19,97	20,80	18,62	21,06	18,90	20,13
160	22,60	23,38	21,28	23,79	21,35	22,63
180	25,10	25,80	23,74	26,22	23,74	24,99
200	27,44	28,13	26,04	28,73	26,04	27,28
220	29,41	30,01	27,89	30,81	28,10	29,27
240	31,06	31,54	29,43	32,63	29,77	31,05
260			30,77		31,43	
280					32,98	
300					34,35	
+ ostanek			32,22	34,46	35,38	32,73

**Preglednica XXVI:** Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,5 brez padca pH. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta.

Čas [min]	% sproščene učinkovine			
	nM12S		M8S/1	M8S/2
	serija A	serija B	serija B	serija C
20	0,69	0,77	0,65	0,55
40	3,79	4,21	3,58	3,57
60	7,68	8,32	7,30	7,51
80	11,31	12,11	11,13	11,45
100	14,68	15,55	14,26	15,10
120	17,70		17,27	18,44
140	20,40		20,08	21,44
160	22,87		22,70	24,18
180	25,30		25,01	26,71
200	27,59		27,40	29,07
220			29,58	31,30
240			31,67	33,43
+ ostanek	30,37	18,92	34,22	35,56

**Preglednica XXVII:** Primerjava profilov sproščanja med poskusoma s pH platojem 7,5 s padcem (M7pS) in brez padca pH (M8S). Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta. Prikazane so paralelne poskusov ter povprečne vrednosti.

Čas [min]	% sproščene učinkovine						
	M7pS/1		M7pS/2		Povprečje	M8S/1	M8S/2
	serija A	serija B	serija A	serija B		serija B	serija C
20	0,49	0,61	0,55	0,77	0,65	0,55	0,66
40	3,12	3,42	3,27	4,21	3,58	3,57	3,79
60	6,54	7,09	6,82	8,32	7,30	7,51	7,71
80	10,01	10,76	10,39	12,11	11,13	11,45	11,56
100	13,28	14,20	13,74	15,55	14,26	15,10	14,97
120	16,28	17,32	16,80		17,27	18,44	17,86
140	18,90	20,13	19,52		20,08	21,44	20,76
160	21,35	22,63	21,99		22,70	24,18	23,44
180	23,74	24,99	24,37		25,01	26,71	25,86
200	26,04	27,28	26,66		27,40	29,07	28,24
220	28,10	29,27	28,69		29,58	31,30	30,44
240	29,77	31,05	30,41		31,67	33,43	32,55
260	31,43		31,43				
280	32,98		32,98				
300	34,35		34,35				
+ ostanek	35,38	32,73		18,92	34,22	35,56	

#### 4.4.3 PROFILI SPROŠČANJA PRI POSKUSIH S pH PLATOJEM 8,0

Preglednici XXVIII–XXIX prikazujeta profile sproščanja pri poskusih s pH platojem 8,0.

**Preglednica XXVIII:** Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 8,0. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta.

Čas [min]	% sproščene učinkovine					
	M1pS serija A	M3S/1 serija A	M3S/2 serija B	M4pS serija A	M5pS/1 serija A	M5pS/2 serija B
20	0,65	0,42	0,56	0,73	0,55	0,68
40	3,62	3,93	3,35	3,96	3,58	3,69
60	7,39	7,94	7,09	8,00	7,19	7,41
80	11,17	11,68	10,85	11,95	10,80	10,99
100	14,66	15,01	14,28	15,56	13,96	14,28
120	17,77	17,93	17,42	18,86	17,06	17,29
140	20,55	20,56	20,24	21,52	19,71	20,09
160	23,18	23,01	22,81	23,97	22,16	22,67
180	25,55	25,31	25,22	26,27	24,50	25,04
200	27,77	27,48	27,50	28,44	26,75	27,21
205	/	28,00	/	/	/	/
220	29,64		29,68	30,59	28,75	29,08
240	31,25		31,74	32,65	30,49	30,77
260			33,73	34,63		
+ ostanek	32,85	30,19	36,13	36,53	32,16	32,84

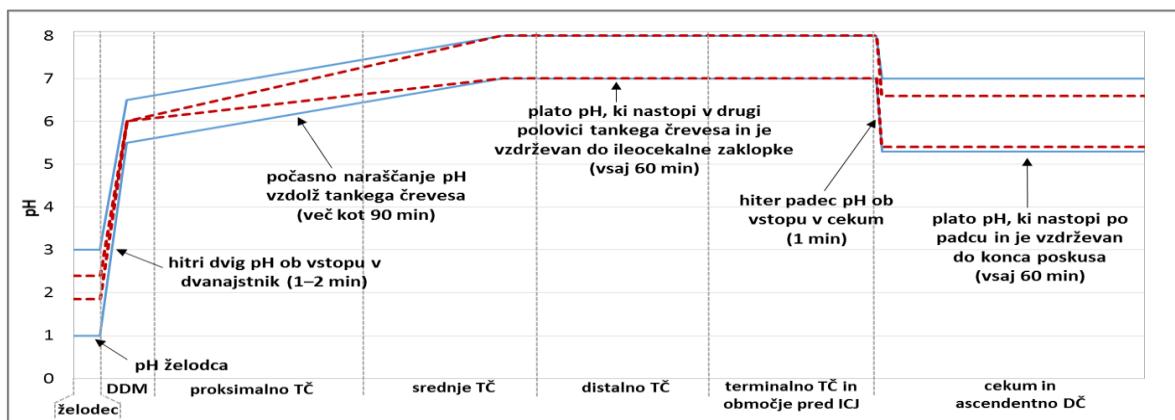
**Preglednica XXIX:** Primerjava profilov sproščanja med poskusoma s pH platojem 8,0 s padcem (M5pS) in brez padca pH (M3S). Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Pod oznako posameznega poskusa je navedena serija, iz katere je bila tableta. Prikazane so paralelke poskusov ter povprečne vrednosti.

Čas [min]	% sproščene učinkovine					
	M5pS/1 serija A	M5pS/2 serija B	Povprečje	M3S/1 serija A	M3S/2 serija B	Povprečje
20	0,55	0,68	0,62	0,42	0,56	0,49
40	3,58	3,69	3,64	3,93	3,35	3,64
60	7,19	7,41	7,30	7,94	7,09	7,52
80	10,80	10,99	10,90	11,68	10,85	11,27
100	13,96	14,28	14,12	15,01	14,28	14,65
120	17,06	17,29	17,18	17,93	17,42	17,68
140	19,71	20,09	19,90	20,56	20,24	20,40
160	22,16	22,67	22,42	23,01	22,81	22,91
180	24,50	25,04	24,77	25,31	25,22	25,27
200	26,75	27,21	26,98	27,48	27,50	27,49
205	/	/	/	28,00	/	28,00
220	28,75	29,08	28,92		29,68	29,68
240	30,49	30,77	30,63		31,74	31,74
260					33,73	33,73
+ ostanek	32,16	32,84		30,19	36,13	

## 5 RAZPRAVA

pH vrednost gastrointestinalnega trakta lahko močno vpliva na biorazpoložljivost peroralno apliciranih FO. Pri načrtovanju tistih peroralnih FO s prirejenim sproščanjem, kjer princip sproščanja temelji na spremembah pH vzdolž GIT, je nujno dobro poznavanje pH vrednosti GIT tako v stanju na tešče kot s hrano, interindividualnih razlik v pH ter skrajnih vrednosti pH, do katerih lahko pri posamezniku pride [17]. Z *in vitro* simulacijo pH profilov GIT in ustreznih časov zadrževanja v določenih predelih GIT lahko ponazorimo spreminjanje pH *in vivo* in s testi sproščanja preverimo vpliv na sproščanje ZU iz FO [22].

V okviru širšega sklopa dela smo po pregledu literature določili kriterije za simulacije pH profilov GIT na tešče, pri čemer smo upoštevali variabilnost pH v želodcu in TČ. Območje variabilnosti pH na prehodu iz TČ v CK in v DČ je še veliko širše od zastavljenega, kar smo ugotovili pri tej magistrski nalogi, ki je bila osredotočena prav na literaturne podatke o pH v tem območju [2–7, 9, 11–13, 15, 16, 18–20]. S simulacijami pri tem magistrskem delu smo zajeli le del zastavljenega območja pH in upoštevali le eno od možnosti za čase prehodov posameznih predelov GIT, ki lahko sicer močno variirajo (Slika 4).



**Slika 4:** Na podlagi literature določeni kriteriji za simulacijo pH profilov z značilnimi spremembami in upoštevano variabilnostjo pH v posameznih predelih GIT (površina med modrima črtama) in območje pH, znotraj katerega smo izvajali poskuse v okviru magistrskega dela (površina med rdečima črtama). Navedeni so časi prehodov določenih predelov GIT, ki smo jih simulirali pri tem magistrskem delu.

Na pretočnem sistemu smo ob pretoku 2 mL/min z zaporednim dovajanjem več različnih medijev v delovno čašo poskušali simulirati pH profile znotraj območja pH, zastavljenega v načrtu (Slika 4). Ves čas poskusov smo merili pH medija v čaši; njegovo homogenost smo zagotavljali z magnetnim mešalom (100 rpm). Simulacija dviga pH ob prehodu iz želodca v DDM je bila deloma že izvedena v diplomski nalogi [23] in ni bila glavni cilj te magistrske naloge; HCl je služila kot izhodišče za nadaljnjo simulacijo, zato njena koncentracija ni imela ključne vloge. Za ponazoritev hitrega dviga pH z 1–3 na ~ 6 smo tako testirali različne koncentracije HCl (40 mL), v katero smo uvajali raztopine Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> različnih koncentracij in

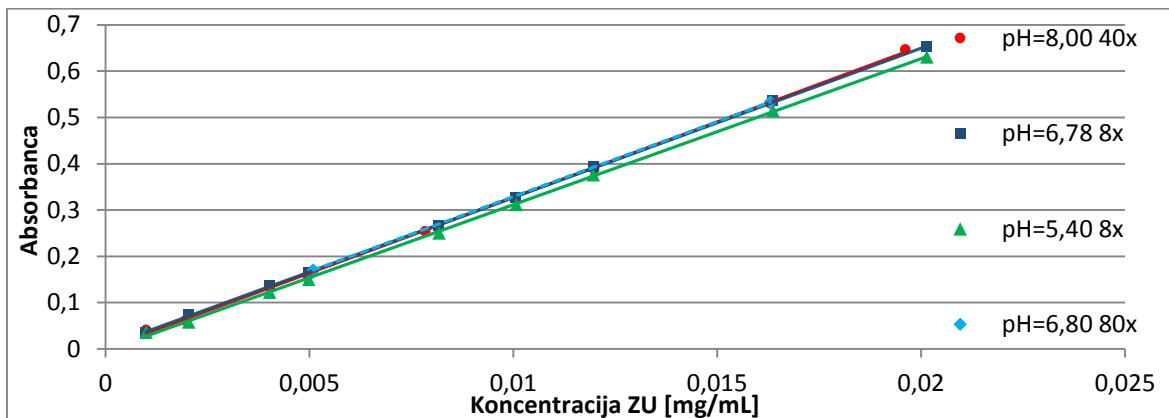
med temi kombinacijami iskali tako, ki bi omogočala ponovljivost simulacij [21]. Poskuse smo nadaljevali z uvajanjem fosfatnih ali redčenih McIlvainovih pufrov za doseganje počasnega (vsaj 90 min) naraščanja pH do platoja in 60-minutno vzdrževanje le-tega (simulacija prehoda TČ) in z dotekanjem redčene (0,85 % oz. 0,425 %) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> za simulacijo padca pH za ~ 1,5 enote, ki nastopi ob prehodu iz TČ v CK. Z uvajanjem pufrov smo nato 60 min vzdrževali konstanten pH (simulacija prehoda začetnega dela DČ). Z uporabo redčenih McIlvainovih pufrov smo najprej simulirali pH profil po sredini zastavljenega območja pH (dvig pH na ~ 6 – pH plato 7,5 – padec pH na 6 in vzdrževanje le-tega). Zaradi variabilnosti pH GIT smo simulirali tudi dva pH profila, pri katerih smo upoštevali podatke za skrajno nizke oz. skrajno visoke vrednosti pH GIT: za pH platoja v TČ smo določili pH 7,0 oz. 8,0, po padcu pH pa smo vzpostavili konstanten pH 5,4 oz. 6,6. Območja pH načrta, ki jih v nalogi nismo zajeli (Slika 4), bodo predmet raziskav magistrskih nalog v prihodnosti. Ob simulaciji treh zgoraj navedenih pH profilov smo na pretočnem sistemu izvedli teste sproščanja natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet. Izvajali smo jih na sistemu s sinkerjem ob uporabi majhnega magneta (100 rpm) in na sistemu s kroglicami ob uporabi velikega magneta (60 rpm). Pri daljših poskusih smo z natančnimi predhodnimi nastavtvami peristaltičnih črpalk uspeli v čaši ohranjati konstanten volumen medija 40 mL [23].

## 5.1 UMERITVENE PREMICE

Umeritvene premice smo izdelali s pomočjo standardov z zanimi koncentracijami natrijevega diklofenakata, katerim smo izmerili absorbance in le-te podali v odvisnosti od koncentracije. Pri tem nam je težave povzročalo raztopljanje ZU, ki je v medijih z bolj kislim pH (5,40) slabše topna. Zato standardnih raztopin nismo mogli pripraviti v izbranih pufrih (niti s pomočjo ultrazvoka nismo uspeli pripraviti bistre raztopine standarda). Tako smo standarde pripravili v prečiščeni vodi in jih nato do ustreznih koncentracij redčili s pufri. Umeritvena premica pri pH 5,40 ima manjši naklon od umeritvenih premic, pripravljenih v drugih pufrih (Slika 5). Zlasti pri višjih koncentracijah učinkovine smo v pufru pH 5,40 izmerili nekoliko nižjo absorbanco kot v pufrih pH 6,78 in 8,00. Vzrok za to je verjetno bližina pKa vrednosti učinkovine (3,80) [24] in pH pufra (5,40), zaradi česar lahko v raztopini prihaja do določenih vplivov na ionizacijo učinkovine. V raztopini ni bilo opaziti neraztopljenih delcev, vendar glede na težave s topnostjo ZU pri tem pH ne moremo popolnoma izključiti delnegaobarjanja učinkovine.

Sprememba koncentracije pufra pri istem pH ne vpliva na odziv analita v vzorcu, kar smo dokazali z izdelavo orientacijske umeritvene premice v 80-krat redčenem McIlvainovem

pufru pH 6,80 in s primerjavo le-te z umeritvenima preamicama, izdelanima v bolj koncentriranih McIlvainovih pufrih s pH 8,00 in 6,78; te tri premice se prekrivajo (Slika 5).



Slika 5: Umeritvene premice za natrijev diklofenakat v 40-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 8,00, 8-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 6,78 in 8-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 5,40 ter orientacijska umeritvena premica v 80-krat redčenem McIlvainovem pufru pH 6,80.

## 5.2 PRELIMINARNI POSKUSI

S preliminarnimi poskusi nastavitev pretokov skozi cevke na črpalki smo zagotovili ustrezone pogoje za izvajanje simulacij pH profilov in testov sproščanja ter si z oceno količine kisline, potrebne za padec pH, poenostavili simulacijo le-tega na pretočnem sistemu.

### 5.2.1 NASTAVITEV PRETOKA SKOZI CEVKE

Pretoke skozi dovodno in odvodno cevko na obeh peristaltičnih črpalkah smo natančno uravnali s testi **P1–P26** (glej 4.2.1), pri katerih smo skozi obe cevki 20 min črpali prečiščeno vodo v meritna valja. Količino te vode bi lahko izmerili zgolj z odčitavanjem volumna na meritnem valju, a odločili smo se za tehtanje. S tem smo dobili natančen podatek o masi prečrpane vode in posredno tudi o povprečnem pretoku v 20 min, kar nam je omogočilo, da smo črpalke optimalno nastavili in se s tem izognili spremjanju volumna medija v delovni čaši tekom poskusov. To je pogoj za uspešno delo na pretočnem sistemu. Pri nastavljanju pretokov smo imeli težave: vpenjalni vijaki na črpalkah nimajo meritne skale, zato je regulacija pretokov z njimi težavna. Pomagali smo si tako, da smo s flomastrom zarisovali položaj vijakov na nosilcu po vsaki spremembi, vendar so taki podatki subjektivni, ker privijanja ali popuščanja ni mogoče natančno kvantitativno opredeliti in s tem omogočiti ponovitev predhodnih nastavitev. Opisi sprememb nastavitev, ki smo jih izvajali pri poskusih **P1–P26** in so navedeni v poglavju 4.2.1, zato niso povsem natančni. Pri nastavljanju pretokov ni bilo jasne meje med ukrepom, ki je povečal pretok skozi določeno cevko, in ukrepom, ki je le-tega zmanjšal: pri poskusu **P2** je npr. popuščanje glavnega vijaka na odvodni cevki zmanjšalo pretok skoznjo, pri poskusu **P5/1** pa smo s popuščanjem istega

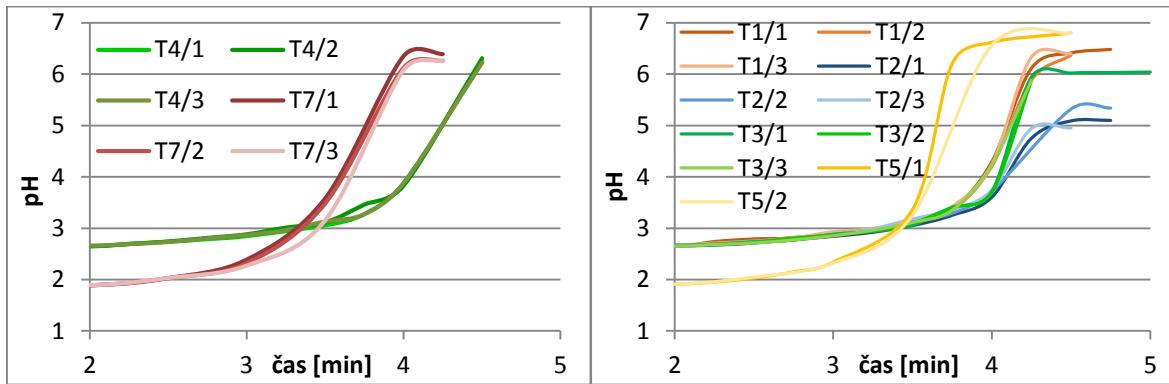
vijaka pretok precej povečali. Ta težava se je najbolj izrazila v mejnem položaju glavnih vijakov, ko so bili vijaki tako popuščeni, da so komaj še zagotavljali podtlak za črpanje. Že minimalna sprememba nastavitev je lahko v tem primeru povzročila izgubo podtlaka v cevkah. To se je pokazalo na dva načina: črpanje ni potekalo ali pa je bilo zelo neenakomerno. Mejni položaj smo med grobim nastavljanjem črpalk (že pred poskusom **P1**) dosegli, ko smo s popuščanjem glavnih vijakov skušali povečati pretok v cevkah. Pred finim nastavljanjem (poskusi **P1–P26**) smo se temu položaju skušali izogniti tako, da smo glavne vijke privili skoraj do konca in to stanje vzeli za novo izhodišče. Tako smo imeli v nadaljevanju več manevrskega prostora. Spreminjanje nastavitev spodnjih vijakov v nekaterih primerih ni imelo nobenega učinka (pri **P10** smo za cel obrat privili oba spodnja vijaka, pa se to na pretokih skoraj ni poznalo), v nekaterih pa smo z njihovo regulacijo precej vplivali na pretok (pri **P20/1** smo s popuščanjem spodnjega vijaka na dovodni cevki precej povečali pretok skozi to cevko). S poskusi **P1–P26** smo tako iskali kompromis med položaji vseh vijakov, ki bi zagotavljal konstanten pretok. Za obe cevki smo ga dosegli pri poskusu **P14** (G1) oz. **P26** (G2). Ob izvedbi več paralel teh dveh poskusov se namreč pretoki niso spremajali (G1: dovodna cevka – 1,959 g/min, odvodna cevka – 1,956 g/min, G2: dovodna cevka – 1,978 g/min, odvodna cevka – 1,979 g/min). Teh nastavitev med izvajanjem poskusov simulacije pH profilov in sproščanja nismo spremajali, smo pa konstantnost pretokov ves čas kontrolirali: na čaši smo s flomastrom označili nivo medija pred poskusom in nato opazovali, če se le-ta med poskusom spreminja. Pri poskusih sproščanja smo 20-minutne vzorce tehtali in na ta način posredno dobili natančno informacijo o pretoku skozi odvodno cevko. Nastavitev so nam omogočale nemoteno delo tudi pri 5-urnih poskusih.

## 5.3 SIMULACIJA pH PROFILOV

### 5.3.1 SIMULACIJA HITREGA DVIGA pH (ŽELODEC – DVANAJSTNIK)

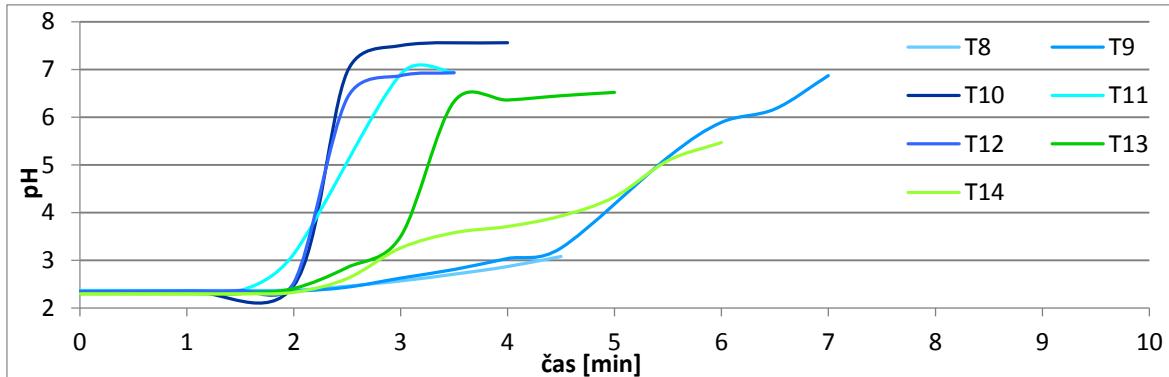
Za simulacijo hitrega dviga pH (ponazoritev praznjenja želodca) smo v HCl uvajali bazično raztopino  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (TNAF). Pri delu s TNAF smo morali biti pozorni, saj je pri črpanju letega pomembno natančno odmerjanje časa: že majhne napake so pomenile drugačen potek začetnega dela pH profila. Simulacija želodčnega medija in sledečega dviga pH ni bila glavni cilj te naloge (HCl je bila le izhodišče za simulacijo pH profila), zato smo v seriji poskusov **T1–T14** med različnimi koncentracijami HCl (4,5 mM, 10 mM in 35 mM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami TNAF (23 mM, 105 mM, 210 mM) [21] iskali par raztopin, ki bi omogočil ponovljive simulacije dvigov pH na 6,0 (natančni pogoji izvedbe so navedeni v Preglednici VIII). Koncentracija TNAF je morala biti dovolj visoka, da je v kombinaciji z

določeno koncentracijo HCl povzročila hiter dvig pH, a hkrati omogočala natančno odmerjanje (majhna variabilnost pretokov se ni smela odražati na pH profilih). Pri poskusu **T4** smo dosegli dobro ponovljivost hitrega dviga pH na ~ 6 s kombinacijo 4,5 mM HCl in 23 mM TNAF. Preizkusili smo tudi 35 mM HCl v kombinaciji z 210 mM TNAF, ki se je pri poskusih **T5–T7** izkazala za precej neprimerno: dvigi pH so bili občutljivi že na majhne spremembe pri dovajanju TNAF. pH profile poskusov **T1–T7** prikazuje Slika 6.



**Slika 6:** pH profili vseh paralelkih poskusov hitrih dvigov pH: T4 in T7 z dokaj dobro ponovljivostjo (levo) in T1, T2, T3, T5 s slabo ponovljivostjo (desno).

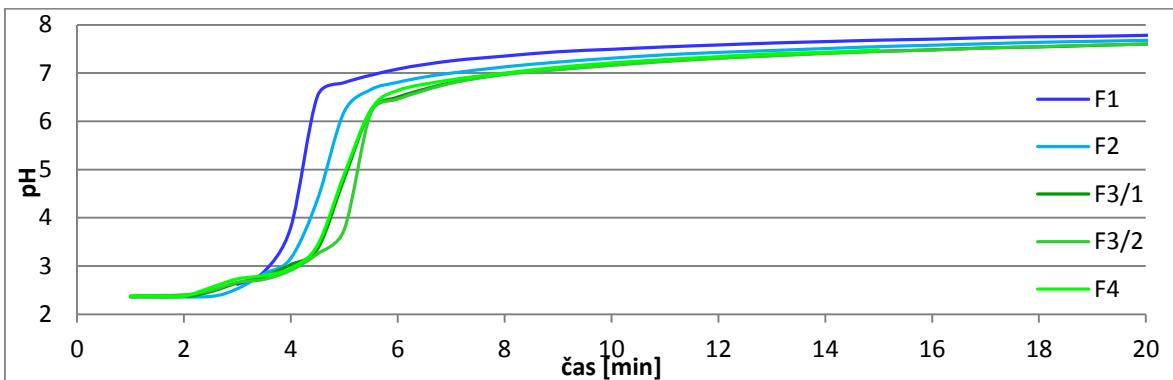
Testirali smo še 10 mM HCl v kombinaciji z 210 mM in 105 mM TNAF, a nam pri poskusih **T8–T14** s temi mediji ni uspelo vzpostaviti primernih pogojev za dvig pH na ~ 6 (Slika 7).



**Slika 7:** pH profili pri poskusih hitrih dvigov pH T8–T14.

S poskusi **F1–F4** smo preizkušali tudi preverjeno kombinacijo 10 mM HCl in 55 mM TNAF [23] (pogoji izvedbe so navedeni v Preglednici IX). Pri poskusih **F1–F3** smo s postopnim krajšanjem časa dovajanja TNAF (120 s, 90 s, 60 s) nadzorovano zmanjšali velikost hitrega dviga pH in določili čas črpanja TNAF, potreben za dosego dviga pH na ~ 6. Z drugo paralelko poskusa **F3** smo potrdili ponovljivost. Poskus **F4** je pokazal, da dvig pH ob uporabi kombinacije 10 mM HCl in 55 mM TNAF ni občutljiv na majhne spremembe pri dovajanju TNAF (Slika 8). Kot obvladljiv sistem smo jo zato uporabili tudi pri večini nadaljnjih poskusov. Od hitrega dviga dalje smo pri poskusih **F1–F4** dovajali 50 mM fosfatni pufer pH

8,0 kot medij za doseganje naraščanja pH do platoja, da bi simulirali prehod skozi TČ. Prvih 20 min pH profilov poskusov **F1–F4** je prikazanih na Sliki 8.

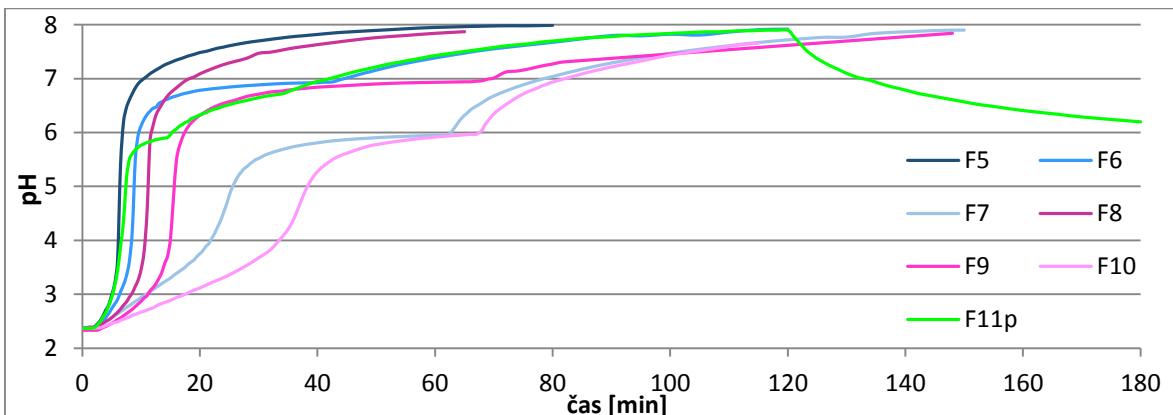


Slika 8: Pryih 20 min pH profilov pri poskusih F1–F4: vidno je postopno manjšanje velikosti dviga pH zaradi krajšanja časa dovajanja TNAF (120 s pri poskusu F1, 90 s pri poskusu F2 in 60 s pri poskusu F3).

### 5.3.2 SIMULACIJA NARAŠČANJA pH DO PLATOJA (TANKO ČREVO)

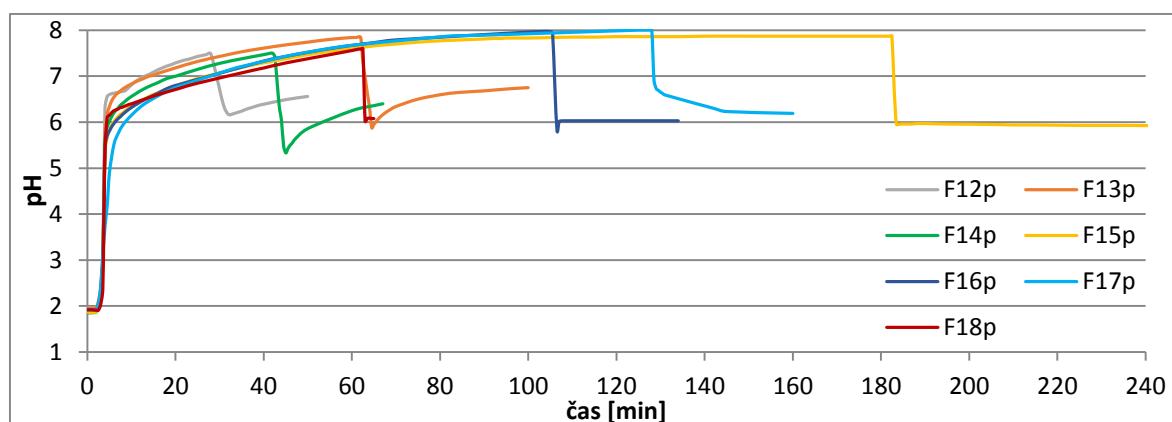
#### 5.3.2.1 Simulacija hitrega dviga pH in simulacija nadaljnjega počasnega naraščanja pH do platoja s fosfatnimi pufri

V tem sklopu poskusov smo z uporabo fosfatnih pufrov po hitrem dvigu pH na ~ 6 simulirali počasno dviganje pH proti platoju 8,0, ki predstavlja zgornjo mejo na podlagi člankov postavljenega intervala [7, 8, 15, 20]. Pri poskusih **F1–F4** (Slika 85.3.1) je pH ob dovajanju 50 mM fosfatnega pufra pH 8,0 glede na naše kriterije prehitro narastel proti 8. Poskuse **F5–F11p** (Slika 9) smo izvedli brez uporabe TNAF. Zanimalo nas je, če lahko tudi samo z uvajanjem fosfatnih pufrov dosežemo hiter začetni dvig pH, saj bi na ta način poenostavili izvedbo poskusov. Pri poskusu **F5** smo s 50 mM fosfatnim pufrrom pH 8,0 dosegli hiter dvig pH, a je le-ta v nadaljevanju poskusa prehitro naraščal proti 8. Pri poskusih **F6–F11** s fosfatnimi pufri nižjih koncentracij in nižjih pH nismo dosegli dovolj hitrih dvigov pH na 6, nadaljnje naraščanje pH pa je bilo pri poskusu **F8** še vedno prehitro. Pri ostalih poskusih zaradi zaporedne uporabe več različnih pufrov naraščanje pH proti 8 ni bilo kontinuirano.



Slika 9: pH profili poskusov F5–F11p, ki smo jih izvedli brez uporabe TNAF. Spreminjali smo koncentracije in pH uporabljenih fosfatnih pufrov.

Poskuse **F12p–F18p** smo začeli s hitrim dvigom pH ob uporabi kombinacije 35 mM HCl in 210 mM TNAF (Slika 10). Pri poskusu **F14p** smo dovedli ustrezno količino TNAF za željeni hiter dvig pH, a je pH od hitrega dviga dalje naraščal prehitro. Z dvakratnim redčenjem fosfatnega pufra pH 8,0 pri poskusu **F15p** glede na poskus **F14p** se je naraščanje pH precej upočasnilo; pH plato 7,8 smo dosegli po 90 min, kar ustreza kriteriju počasnega naraščanja. Pri poskusih **F16p** in **F17p** smo na začetku dovedli različni količini TNAF, a je 10 mM fosfatni pufer pH 8,0, ki smo ga dovajali v nadaljevanju poskusov, hitro izničil začetne razlike med obema pH profiloma (močan vpliv fosfatnega pufra pH 8,0).



**Slika 10:** pH profili poskusov F12p–F18p, pri katerih smo variirali čase dovajanja TNAF in uporabljali različne redčitve fosfatnih pufrov pH 8,0 za simulacijo naraščanja pH do platoja.

S poskusi **F19–F23** smo želeli ponazoriti pH profil s platojem 7,5 v TČ, o katerem poročajo v člankih [3, 4, 6, 7, 9, 11, 15, 20]. Za hitri dvig pH smo uporabili kombinacijo 10 mM HCl in 105 mM oz. 55 mM TNAF ter poskuse nadaljevali z uvajanjem fosfatnih pufrov pH 7,5 (pogoji izvedbe so navedeni v Preglednici IX). Kot že pri poskusih **F14p** in **F15p** se je tudi pri poskusih **F19p** in **F20p** izkazalo, da nižja koncentracija fosfatnega pufra, ki ga dovajamo od hitrega dviga dalje, pomeni počasnejše naraščanje pH neposredno po hitrem dvigu (do pH 7). Znižanje koncentracije pufra pa v tem primeru ni podaljšalo časa naraščanja pH do platoja, ki je bil pri obeh poskusih dosežen po ~ 90 min. Pri poskusih **F21–F23** smo z 0,2 mM pufri pH 7,5 upočasnili (glede na poskus **F20p**) tako naraščanje pH takoj po hitrem dvigu kot nadaljnje dviganje pH proti platoju; po oceni (ker smo poskuse izvajali krajsi čas) bi pH 7,5 dosegli pri času 120 min, kar je bil obetaven podatek. Težavo predstavljajo zelo nizke koncentracije teh pufrov, ki ob testih sproščanja zaradi vpliva ZU iz tablete najverjetneje ne bi mogli ohranjati konstantnega naraščanja in platoja pH.

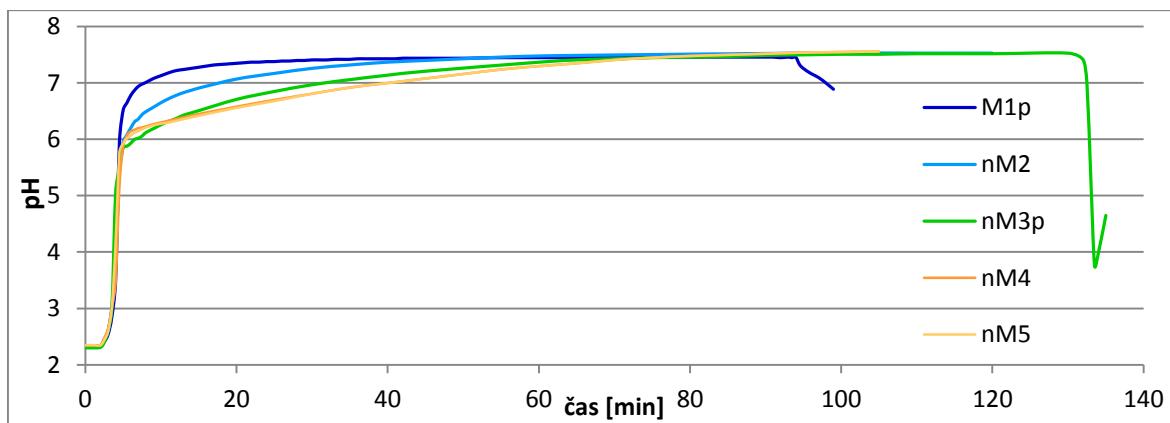
Z velikimi redčtvami fosfatnih pufrov smo uspeli doseči počasno naraščanje pH do platoja 8,0, vendar se je ta princip simulacije pH profilov izkazal za neuporabnega pri doseganju

nižjega platoja pH 7,5, kar posledično pomeni tudi neuporabnost za še nižji pH plato 7,0. Zato smo se v nadaljevanju odločili preizkušati še redčene McIlvainove pufre.

### 5.3.2.2 Simulacija hitrega dviga pH in simulacija nadaljnjega počasnega naraščanja pH do platoja z redčenimi McIlvainovimi pufri

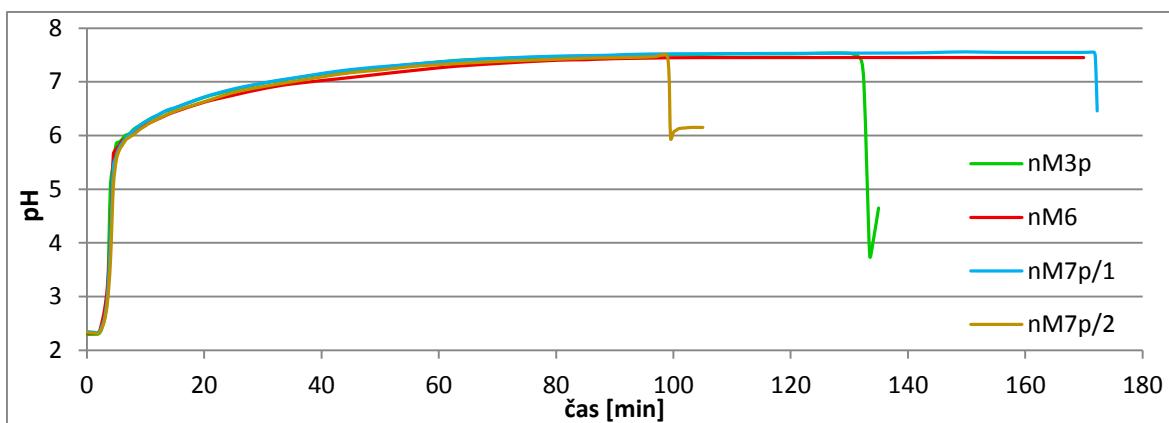
Koncentrirane McIlvainove pufre se pripravlja iz dveh osnovnih raztopin: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dinatrijeva sol fosforne kisline) in 0,1 M citronske kisline. S spremenjanjem volumskega razmerja med njima (ob konstantnem skupnem volumnu) se lahko pripravi McIlvainove pufre s pH v območju od 2,2 do 8 (Priloga 1). Tako fosforna kot citronska kislina imata po tri vrednosti pKa (2,12; 7,21; 12,67 ter 3,13, 4,76 in 6,40). Pufrna kapaciteta je največja, ko je vrednost pH enaka vrednosti pKa pufra. McIlvainovi pufri, ki imajo zaradi prisotne citronske kisline tri vrednosti pKa v območju od 3 do 7, so zato veliko bolj kot fosfatni sposobni pufranja pri pH vrednostih med 3 in 7. Prav to območje pH je bilo za simulacijo počasnega naraščanja pH proti platoju zelo pomembno. Pri poskusih smo uporabljali redčene McIlvainove pufre, saj smo že pri fosfatnih pufrih ugotovili, da z redčenjem upočasnimo naraščanje pH proti platoju. Z uporabo redčenih McIlvainovih pufrov smo izvedli 34 poskusov. Pogoji izvedbe poskusov so navedeni v Preglednici IX. Za simulacijo hitrega dviga pH smo uporabljali kombinacijo 10 mM HCl in 55 mM TNAF. Za pH platoja v TČ smo najprej simulirali vrednost 7,5, zavedeno v člankih [3, 4, 6, 7, 9, 11, 15, 20].

Poskus **M1p** smo izvedli s 4-krat redčenim McIlvainovim pufrom pH 7,5 (prvotni pufer), a je pH do platoja narastel prehitro. Pri poskusih **nM2–nM12** smo redčene McIlvainove pufre pripravljeni po dveh nepravilnih postopkih (glej 3.2.3.1), na kar opozarja črka n v oznakah poskusov. S 5- oziroma 25-krat redčenim prvotnim pufrom smo pri poskusih **nM2** in **nM3p** pH plato 7,5 dosegli po 60 oziroma 90 min. Z nadaljnjam (50x, 100x) redčenjem prvotnega pufra (poskusa **nM4** in **nM5**) naraščanja pH proti platoju nismo več upočasnili (Slika 11).



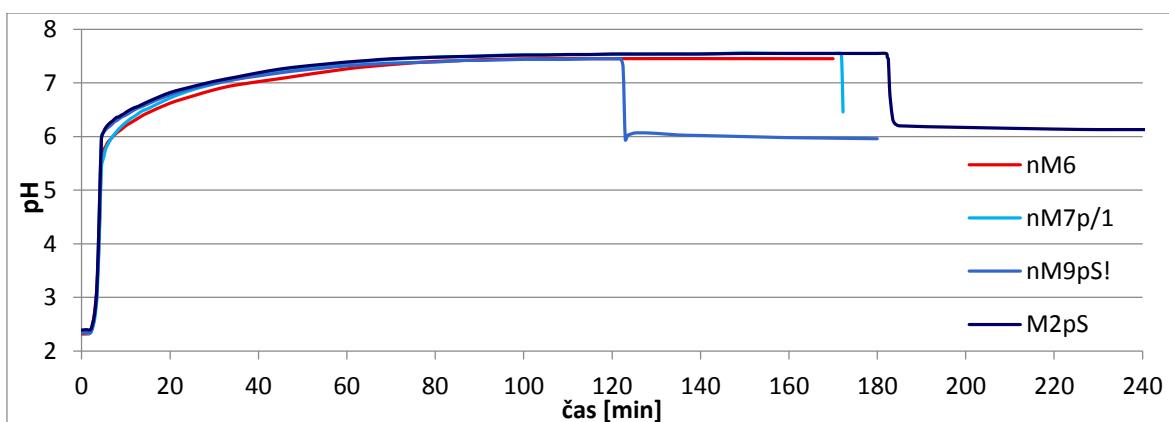
**Slika 11:** pH profili poskusov M1p–nM5, pri katerih smo z redčenjem t.i. prvotnega pufra skušali podaljšati čas naraščanja pH proti platoju 7,5. Redčenja McIlvainovih pufrov se povečujejo od M1p do nM5.

Optimizirali smo pufer iz poskusa **nM3p**, ki je dal dobre rezultate, a je bil bolj koncentriran kot tisti pri poskusih **nM4** in **nM5**. Poskus **nM6** je paralelka poskusa **nM3p**, pri paralelkah poskusa **nM7p** pa smo pufre pripravili po postopku 2 (glej 3.2.3.1). Razlika v pripravi pufrov med poskusi **nM3p** in **nM6** ter obema paralelkama poskusa **nM7p** na pH profilih ni vidna. Ponovljivost simulacije je bila pri teh štirih pH profilih dobra (Slika 12). Nepravilna postopka priprave sta sicer imela za posledico nekoliko nižjo celokupno koncentracijo pufra (postopek 1) oziroma nekoliko spremenjeno razmerje med fosfatom in citratom v pufru (postopek 2) glede na pravilno pripravljeni pufre, vendar se to na pH profilih ni pokazalo.



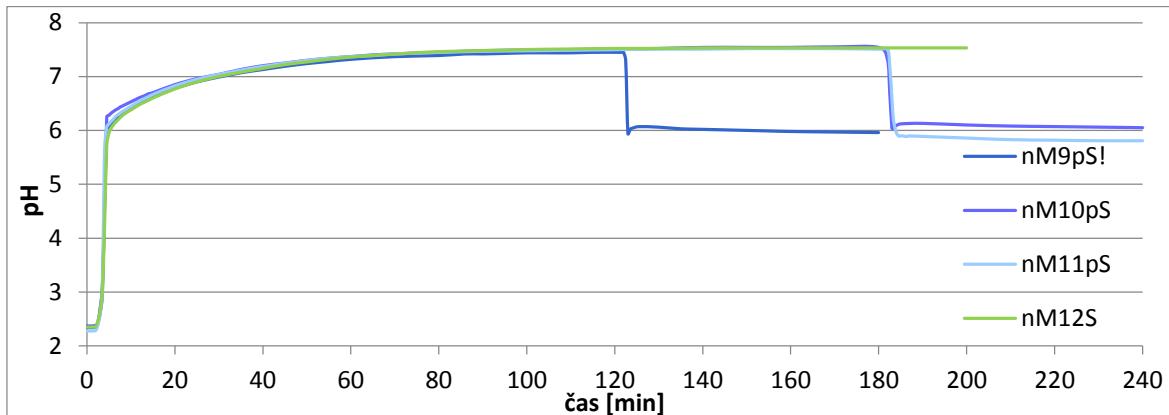
**Slika 12:** pH profili poskusov nM3p, nM6, nM7p/1 in nM7p/2, ki prikazujejo ponovljivost simulacij pH profilov ob uporabi redčenih McIlvainovih pufrov pH 7,5, pripravljenih po različnih postopkih (glej 3.2.3.1).

Pri poskusu **nM9pS!** smo preverili vpliv tablete na potek izdelanega pH profila. Na Sliki 13 so pH profili poskusov **nM6**, **nM7p/1**, **nM9pS!** in **M2pS**, katerih izvedba se je razlikovala po postopku priprave pufrov pH 7,5 (glej 3.2.3.3.2.3) in prisotnosti/odsotnosti tablete. Le-ta je mogoče nekoliko vplivala na hitri dvig pH: pri poskusih s tableto **nM9pS!** in **M2pS** je bil začetni dvig pH malo večji kot pri poskusih brez tablete. Tableta s svojo ZU kljub 80-kratni redčitvi McIlvainovega pufra pH 7,5 ni bistveno vplivala na nadaljnji potek pH profilov.

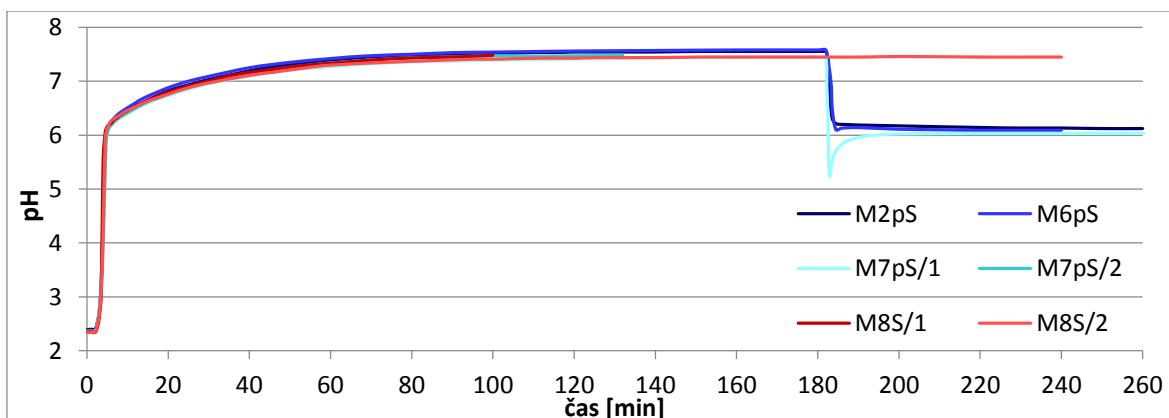


**Slika 13:** Primerjava pH profilov poskusov nM6 (1. postopek priprave redčenega McIlvainovega pufra – glej 3.2.3.1, brez tablete), nM7p/1 (2. postopek, brez tablete), nM9pS! (2. postopek, s tableto) in M2pS (pravilna priprava pufra – glej 3.2.3.2, s tableto).

Pri vseh poskusih od **nM9pS!** dalje smo izvajali teste sproščanja in hkrati, razen pri poskusih na sistemu s kroglicami, merili pH. Pri poskusih **nM10pS–nM12S** smo uporabili enak redčen McIlvainov pufer pH 7,5 kot pri poskusu **nM9pS!**, da smo preverili ponovljivost simulacije pH profila ob hkratnem izvajanju testov sproščanja. pH je pri poskusih **nM9pS!–nM12S** do platoja 7,5 naraščal ~ 100 min, kar ustreza zastavljenim kriterijem (Slika 14). Prekrivanje teh štirih pH profilov pomeni, da smo ponovljivost simulacij dosegli.

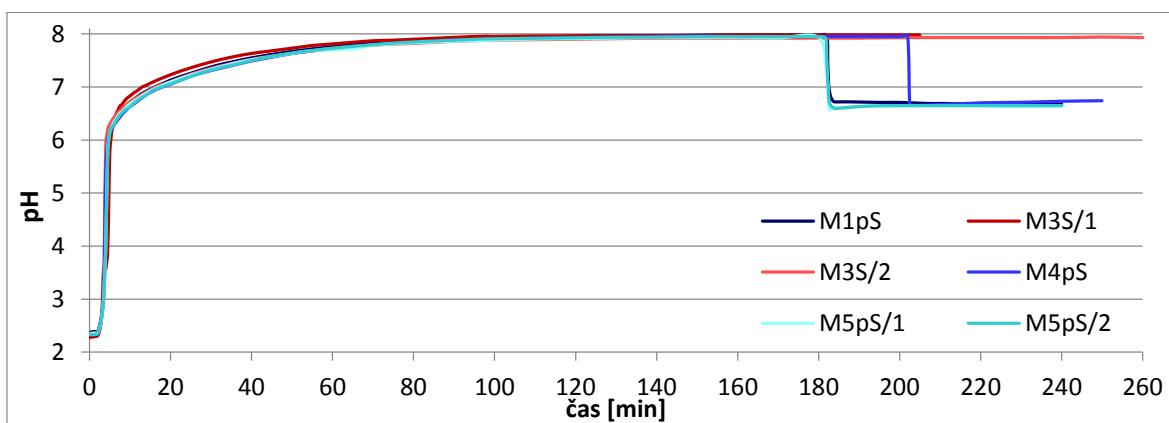


**Slika 14:** pH profili poskusov nM9pS!–nM12S s pH platojem 7,5. Z njimi smo preverili ponovljivost simulacij pH profilov pri poskusih sproščanja. Do 120. min je bila izvedba vseh poskusov enaka (glej Preglednico IX). Naraščanje pH do platoja 7,5 smo simulirali tudi z uvajanjem pravilno pripravljenih redčenih McIlvainovih pufrov (glej 3.2.3.2 in Preglednico IX). pH profili poskusov **M2pS**, **M6pS**, **M7pS/1**, **M7pS/2**, **M8S/1** in **M8S/2** ustrezano zastavljenemu kriteriju za počasno naraščanje pH, saj pH plato dosežejo po 100 min (Slika 15). Pufer, uporabljen za doseganje platoja pri poskusih **M2pS** in **M6pS**, ni bil svež, zato poskusa **M6pS** nismo obravnavali kot paralelko poskusa **M7pS**, čeprav so bili pogoji izvedbe teh dveh poskusov enaki. pH profila poskusov **M2pS** in **M6pS** nekoliko odstopata od pH profilov ostalih štirih poskusov (Slika 15), kar kaže na to, da starost pufra lahko vpliva na njegov pH.



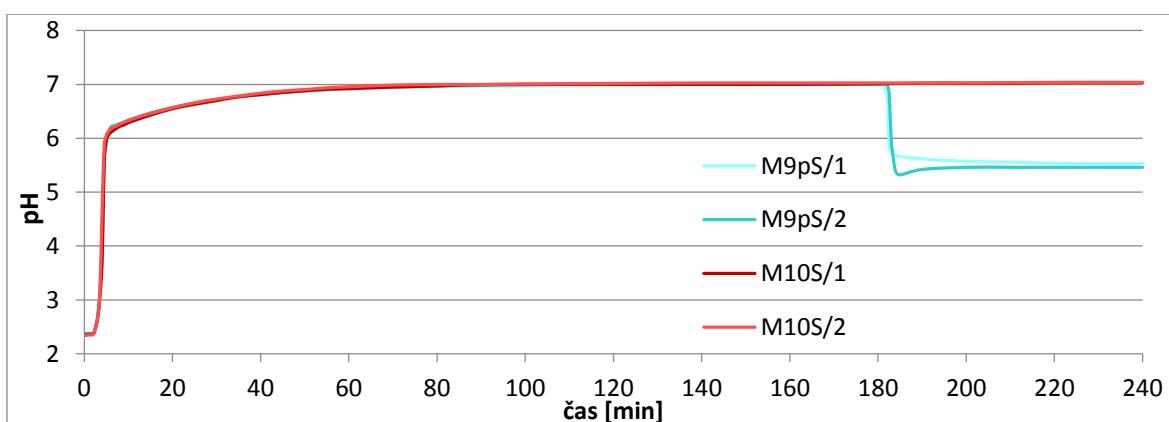
**Slika 15:** pH profili poskusov M2pS, M6pS, M7pS/1, M7pS/2, M8S/1 in M8S/2 s pH platojem 7,5, ki so bili do 180. min izvedeni pod enakimi pogoji. Pri poskusu M7pS/2 smo pH merili le 132 min, poskus pa je potekal 240 min.

Na podlagi literaturnih podatkov (tudi individualnih) o visokih vrednostih pH, doseženih v drugem delu tankega črevesa in pred ileocekalnim sfinktrom, smo kot zgornji kriterij za pH plato postavili vrednost 8,0 [7, 8, 15, 20]. Za doseganje le-tega v primernem času smo uporabili dvakrat bolj koncentrirane McIlvainove pufre kot pri poskusih s pH platoja 7,5 (Preglednica IX). pH profil poskusa **M1pS** se je počasi in kontinuirano dvigal proti pH platoju 8,0 in na platoju ostal konstanten do simuliranega padca pH. Po izvedbi so poskusu **M1pS** do 180. min (padec pH) enaki še poskus **M4pS** in paralelki poskusov **M5pS** in **M3S**; ti pH profili se do platoja prekrivajo, le pri paralelki **M3S/1** je pH od 8. do 100. min nekoliko višji kot pri ostalih poskusih (pH pufra je bil nekoliko višji, a znotraj dovoljenega intervala  $\pm 0,05$  enote), kar kaže na dobro ponovljivost tudi pri poskusih s pH platojem 8,0 (Slika 16).



**Slika 16:** pH profili poskusov M1pS, M3S/1, M3S/2, M4pS, M5pS/1 in M5pS/2 s pH platojem 8,0, ki so bili do 180. min izvedeni pod enakimi pogoji.

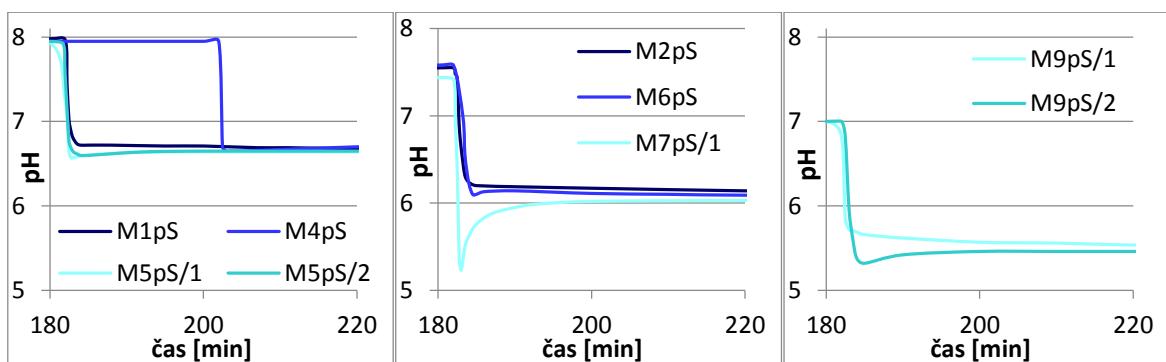
Za spodnji ekstrem pH platoja smo glede na literaturo določili vrednost 7,0 [10, 14, 19]. Ta pH plato smo vzpostavili pri vseh paralelkah poskusov **M9pS** in **M10S** (izvedba vseh štirih je bila do 180. min enaka). pH profili vseh štirih paralelk (Slika 17) so s postopnim naraščanjem pH plato 7,0 dosegli po  $\sim 90$  min in pri tem pH ostali konstantni. Z redčenimi McIlvainovimi pufri smo uspešno simulirali tudi naraščanje pH do najnižjega pH platoja 7,0.



**Slika 17:** pH profili poskusov M9pS/1, M9pS/2, M10S/1 in M10S/2 s pH platojem 7,0, ki so bili do 180. min izvedeni pod enakimi pogoji.

### 5.3.3 SIMULACIJA PADCA pH (TANKO ČREVO – CEKUM)

Za simulacijo padca pH, ki nastopi ob prehodu iz TČ v CK, smo po pregledu strokovnih člankov določili amplitudo ~ 1,5 enote [2, 5, 6, 9–13, 15, 16, 18, 20]. Tak padec pH smo simulirali pri vseh treh različnih pH profilih: s pH platoja 8,0 na 6,6, s 7,5 na 6,0 in s 7,0 na 5,4. Pri poskusu **F11p** (Slika 9) smo padec pH s platoja 8,0 simulirali kar z uvajanjem fosfatnega pufra pH 6,0, a je pH upadel prepočasi. Kot medij za simulacijo padca pH smo zato preizkusili kislino  $H_3PO_4$ . Pri poskusu **F12p** (Slika 10) smo z 0,85 %  $H_3PO_4$  dosegli izrazit padec pH. Na amplitudo padcev smo vplivali s spremenjanjem časov dovajanja kisline: krajši čas dovajanja  $H_3PO_4$  je pomenil manjši padec pH (poskusa **F16p** in **F17p** – Slika 10). Z uvajanjem enake količine kisline v dva različno koncentrirana pufra smo dosegli dva različno velika padca pH (poskusa **F17p** in **F18p** – Slika 10). S pomočjo preliminarnih poskusov določanja potrebne količine kisline (glej 3.3.4.2) smo velikost padca pri poskusih **od F19p** dalje lahko dokaj natančno uravnavali. Pri poskusih, kjer smo pH plato dosegli z bolj koncentriranim pufrom, smo uporabili bolj koncentrirano (0,85 %)  $H_3PO_4$  in obratno ter tako vedno zagotovili ustrezni padec pH. Pred poskusoma **nM9pS!** in **nM10pS** smo dobro ocenili količino kisline za simulacijo padca s 7,5 na 6,0 (Slika 14). S poskusoma **M2pS** in **M6pS** smo dosegli tudi solidno ponovljivost tega padca pH (Slika 18 – na sredini). Padec s pH platoja 8,0 smo simulirali in optimizirali pri poskusih **M1pS**, **M4pS**, **M5pS/1** in **M5pS/2** (Slika 18 – levo). Majhne razlike v času dovajanja kisline med poskusi so se že pokazale v različnih amplitudah padca pH: poskusa **M6pS** in **M7pS/1** (Slika 18 – na sredini). Manjša nihanja pH po padcu so lahko posledica lokalno nizkih vrednosti pH v čaši, ki jih je elektroda pH-metra zaznala, še preden se je celoten medij po dodatku kisline homogeniziral. Do tega bi lahko prišlo, ker je magnet mešal medij s sveže dovedeno kislino prav v smeri proti elektrodi, postavljeni blizu dovodne cevke (Slika 3 – desno).



**Slika 18:** Kratki odseki pH profilov (od 180. min do 220. min), ki natančno prikazujejo potek različnih padcev pH pri poskusih M1pS–M9pS in območja pH platojev, vzpostavljenih neposredno po simuliranem padcu pH. **Levo:** pH profili padcev pH s platoja 8,0 na pH 6,6. **Na sredini:** pH profili padcev pH s platoja 7,5 na pH 6,0. **Desno:** pH profili padcev pH s platoja 7,0 na pH 5,4.

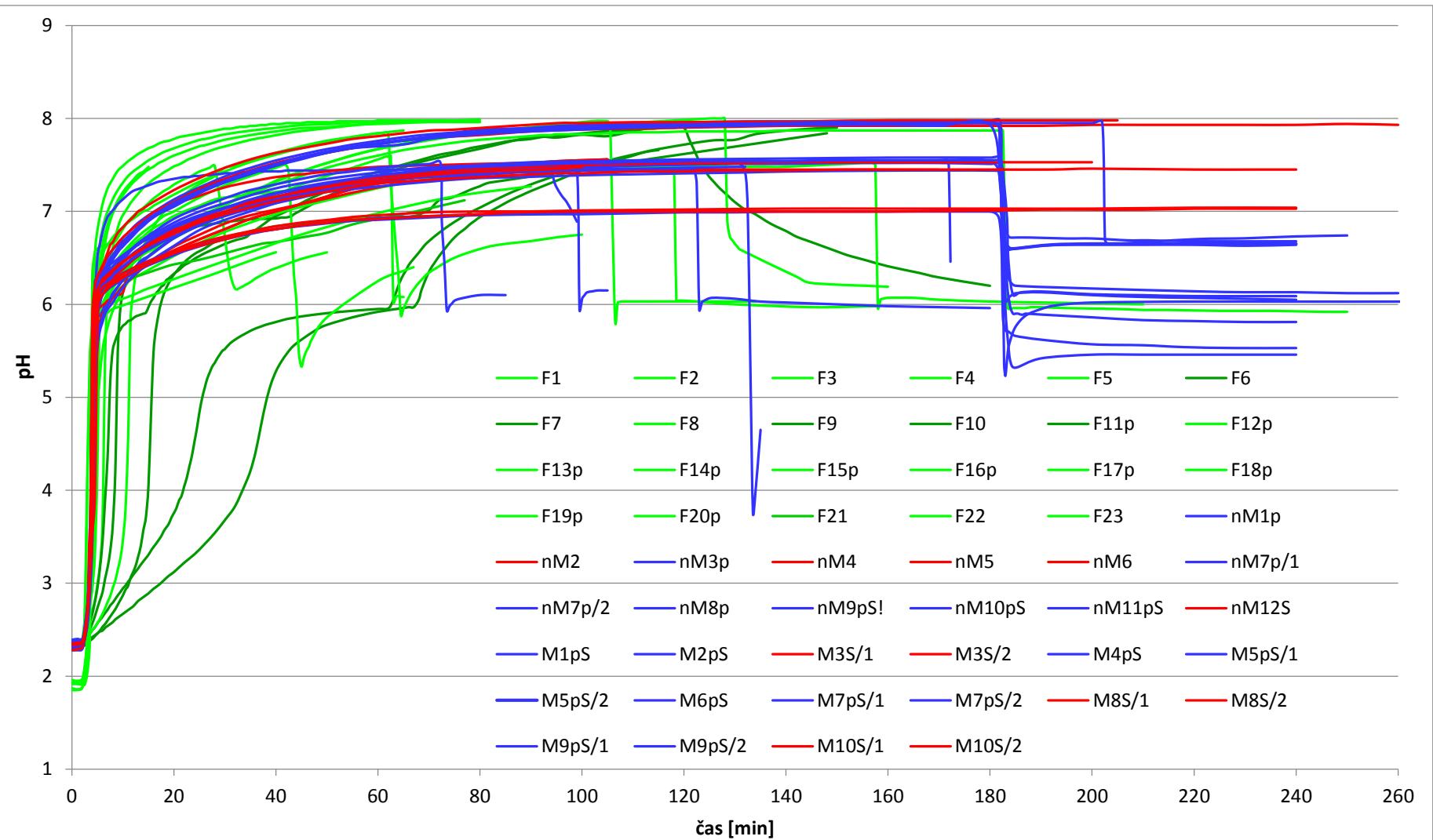
### **5.3.4 SIMULACIJA KONSTANTNEGA pH (DESNO DEBELO ČREVO)**

Velik del časa prehoda DČ, katerega mediana je 17,5 ur, predstavlja čas zadrževanja RTK v CK in desnem DČ [12, 20]. pH vrednost v tem predelu GIT je podobna tisti, ki se vzpostavi takoj po prihodu v CK [4, 11]. Čeprav pH vzdolž celotnega DČ počasi naraste, se v prvi uri zadrževanja FO v DČ (začetni del DČ) vrednost pH ne spremeni bistveno glede na pH v CK. Z redčenimi McIlvainovimi pufri smo zato želeli še 60 min po padcu vzdrževati konstanten pH, kar nam je pri večini poskusov dobro uspelo (Slike 13–18). Da bi preprečili morebitne fluktuacije pH, smo za simulacijo prehoda desnega DČ sprva uvajali le 4-krat redčene McIlvainove pufre, kasneje pa smo jih zamenjali z 8-krat redčenimi (Preglednica IV). S tem smo se nekoliko približali nizkim koncentracijam in kapacitetam pufrov, s katerimi smo simulirali naraščanje pH pred padcem. Pri večini simulacij je pH takoj po padcu za kratek čas zanihal od željene vrednosti in se nato približeval pH vrednosti pufra, ki smo ga dovajali od padca pH dalje. Ko se je pH ustalil, se nihanja do konca poskusov niso več pojavljala. pH v GIT od desnega DČ do rektuma nima več bistvenega vpliva na FO, ker se tam absorpcija ZU večinoma ne vrši več, zato simulacij pH profilov za ta del GIT nismo izvajali.

### **5.3.5 VSI pH PROFILI**

V tem magistrskem delu smo izvedli 52 daljših poskusov, pri katerih smo merili pH, in tako dobili pH profile, prikazane na Sliki 19 (zaradi boljše preglednosti je prikazanih le prvih 260 min, čeprav je poskus M7pS/1 trajal 300 min).

Preden smo uspeli simulirati željene pH profile, smo izvedli precej poskusov, katerih pH profili niso potekali v zastavljenem območju (prepočasen dvig pH, nevezno naraščanje pH proti platoju TČ), a so služili kot osnova za optimizacijo nadaljnji poskusov. Slika 19 razločno kaže, da pH profili, izdelani z uporabo redčenih McIlvainovih pufrov, neposredno po hitrem dvigu in do pH platoja TČ potekajo precej drugače (pH narašča počasneje in bolj enakomerno) kot pH profili, izdelani ob dovanjanju fosfatnih pufrov. To je posledica širšega območja pufranja McIlvainovih pufrov (glej 5.3.2.2), zaradi katerega smo jih tudi izbrali kot medij za simulacijo prehoda od DDM do konca TČ, potem ko smo ugotovili, da s fosfatnimi pufri ne moremo doseči postavljenih kriterijev. Oster padec pH s platoja v TČ na nižji pH plato v DČ smo z uvajanjem različnih redčitev fosforne kisline uspeli enako hitro simulirati pri vseh treh različnih pH profilih. Vzdrževanje konstantnega pH nam ni povzročalo težav niti pri simulaciji prehoda TČ niti pri simulaciji prehoda desnega DČ, kar potrjujejo platoji pH profilov na Sliki 19. S pH profili, ki smo jih uspeli simulirati po zastavljenih kriterijih, smo tako zajeli območje pH med rdečima črtama, prikazano na Sliki 4.



Slika 19: Vsi izdelani pH profili do 260. min izvajanja, ki prikazujejo celotno območje pH, zajeto s poskusi v okviru magistrske naloge (glej 5).

Legenda: F – poskusi, izvedeni z uporabo fosfatnih pufrov: pH profili so narisani z zeleno barvo, M – poskusi, izvedeni z uporabo McIlvainovih pufrov (glej poglavje 3.3.3): z rdečo barvo so narisani pH profili poskusov, kjer padca pH nismo simulirali, z modro barvo pa pH profili poskusov, kjer smo simulirali padec pH.

## 5.4 TESTI SPROŠČANJA

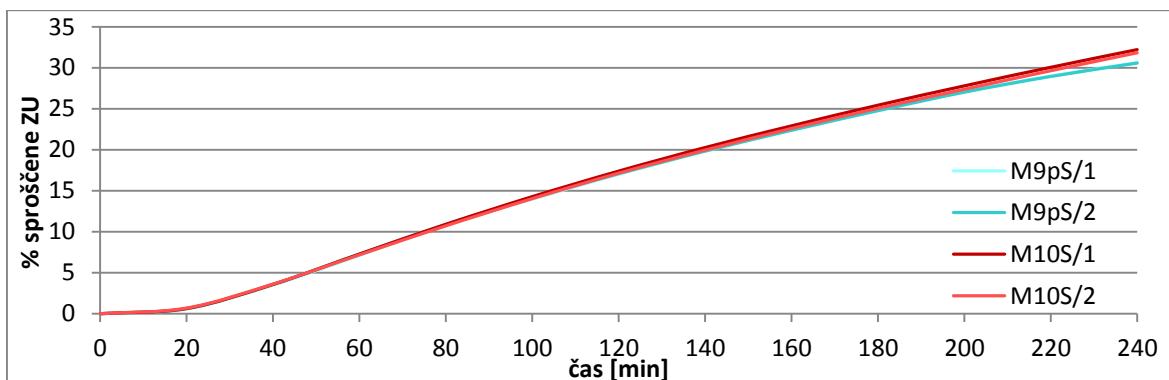
S testi sproščanja smo želeli predvsem preveriti vpliv padca pH, s katerim smo ponazorili prehod iz tankega črevesa v cekum, na sproščanje Na-diklofenakata iz ogrodnih tablet.

### 5.4.1 TESTI SPROŠČANJA NA SISTEMU S SINKERJEM

Na sistemu s sinkerjem smo teste sproščanja izvedli ob simulaciji treh različnih pH profilov, da bi ugotovili vpliv razlik v pH na hitrost sproščanja ZU. Ker je diklofenak kot kislina s pKa 3,80 [24] pri nižjih pH slabše topen, smo pričakovali, da se bo najpočasneje sproščal ob simulacijah pH profilov s platojem 7,0 in najhitreje pri tistih s pH platojem 8,0. Tablete so pri poskusih nabrekale in po določenem času je nabrekla plast zaobjela žičko sinkerja. S tem je tableta v sinkerju zavzela določeno lego, v kateri je ostala do konca poskusa.

#### 5.4.1.1 Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,0

Ob simulaciji pH profilov s platojem 7,0 smo izvedli dva poskusa sproščanja v dveh paralelkah: **M9pS** in **M10S**. Ponovljivost poskusov je bila dobra (Slika 20). Majhen upad hitrosti sproščanja po 180. min pri obeh paralelkah poskusa **M9pS** je posledica simuliranega padca pH na ~ 5,4, pri katerem je ZU slabše topna kot pri pH 7,0. Do 240. min je opazen trend večanja razlike v % sproščene ZU med poskusoma **M9pS** in **M10S**.

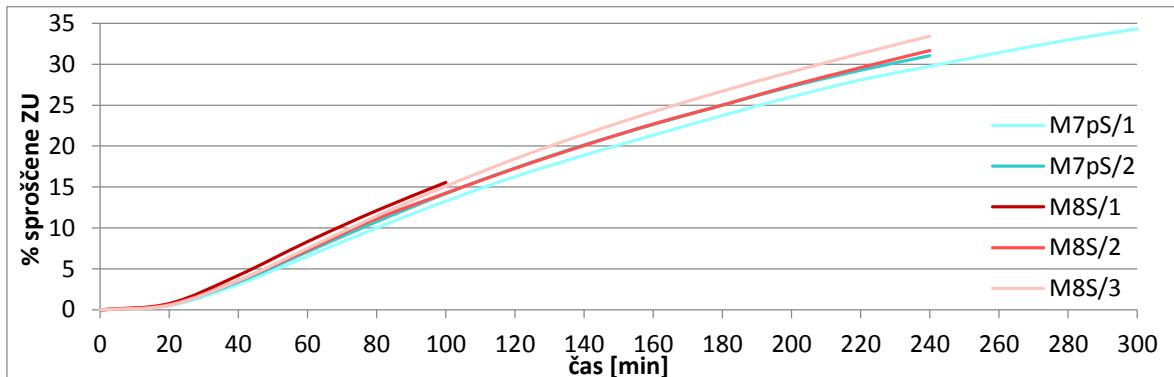


Slika 20: Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,0: M9pS/1 in M9pS/2 (oba s padcem pH) ter M10S/1 in M10S/2 (oba brez padca pH).

#### 5.4.1.2 Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 7,5

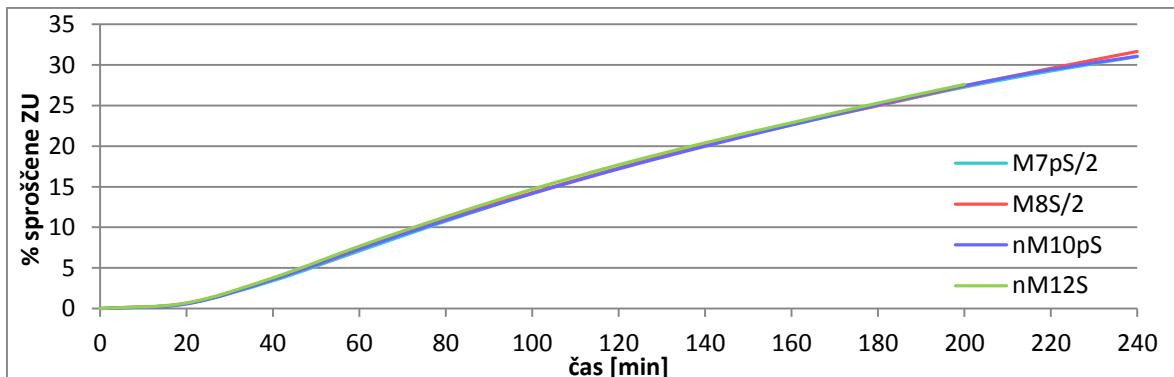
Ob simuliranih pH profilih s pH platojem 7,5 smo izvedli 2 poskusa sproščanja z več paralelkami (**M7pS** in **M8S** – Slika 21) in 6 poskusov z eno ponovitvijo (**nM9pS!**, **nM10pS**, **nM11pS**, **nM12S**, **M2pS** in **M6pS**). Poskus **nM9pS!** ni dal relevantnih rezultatov, ker je bil izведен brez uporabe sinkerja. Nekoliko različni hitrosti sproščanja ZU pri paralelkah poskusa **M7pS** sta najbrž posledica različnih serij (A in B) uporabljenih tablet; to lahko pomeni razlike v lastnostih tablet, ki pogojujejo nabrekanje le-teh in sproščanje ZU. Podobna razlika je namreč nastala tudi med paralelkama **M8S/2** in **M8S/3**, kjer sta bili tablet serij B

in C. V primerjavi s profili sproščanja iz poglavja 5.4.1.1 je pri profilih sproščanja za poskuse s pH platojem 7,5 vidna precejšnja razpršenost, ki je zabrisala tudi morebiten vpliv simuliranega padca pH na sproščanje ZU.



Slika 21: Profili sproščanja za poskuse M7pS/1 in M7pS/2 (oba s padcem pH) ter M8S/1, M8S/2 in M8S/3 (vsi trije brez padca pH) s pH platojem 7,5.

Poskus **nM10pS** smo izvedli enako kot poskus **M7pS/2**, poskus **nM12S** pa enako kot poskus **M8S/2**, le da smo redčena McIlvainova pufra pH 7,5 pri poskusih **M7pS/2** in **M8S/2** pripravili po pravilnem, pri poskusih **nM10pS** in **nM12S** pa po nepravilnem postopku (glej 3.2.3). Razlike v postopkih priprave pufrov se na profilih sproščanja niso izrazile (Slika 22).



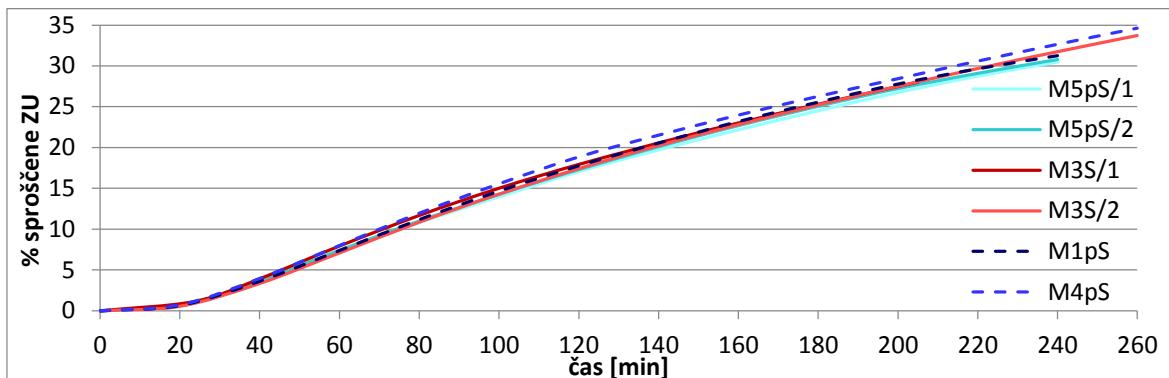
Slika 22: Profili sproščanja poskusov M7pS/2 in M8S/2 (pravilen postopek priprave redčenega McIlvainovega pufra pH 7,5) ter nM10pS in nM12S (nepravilen postopek priprave redčenega McIlvainovega pufra pH 7,5). Pri poskusih M7pS/2 in nM10pS smo v 180. min simulirali padec pH, pri poskusih M8S/2 in nM12S pa ne.

Veliko število razlik med profili sproščanja pri poskusih s pH platoja 7,5 je otežilo opredelitev njihovega vzroka. Možnosti je več: razlike v postopku priprave pufrov, različne serije tablet, manjše variabilnosti pretokov na pretočnih sistemih med posameznimi poskusi. Pri profilih sproščanja poskusov s pH platojem 7,5 tako nimamo jasnih zaključkov.

#### 5.4.1.3 Profili sproščanja pri poskusih s pH platojem 8,0

Šest poskusov sproščanja smo izvedli ob simulaciji pH profilov s platojem 8,0. Tudi tu se je sproščanje zaradi simuliranega padca pH v 180. min (8,0–6,6) pri paralelkah poskusa **M5pS** malo upočasnilo glede na paralelki poskusa **M3S**, kjer padca pH nismo simulirali (Slika 23). To je posledica manjše topnosti ZU pri nižjem pH. Razlika v koncentracijah McIlvainovih

pufrov pH 6,6, uporabljenih po padcu pH pri poskusih **M1pS** in obeh paralelkah poskusa **M5pS**, ne vpliva na sproščanje ZU (Slika 23).



Slika 23: Profili sproščanja poskusov M5pS/1, M5pS/2, M1pS in M4pS (vsi širje s padcem pH) ter M3S/1 in M3S/2 (oba brez padca pH) s pH platojem 8,0.

#### 5.4.1.4 Povprečni profili sproščanja poskusov na sistemu s sinkerjem

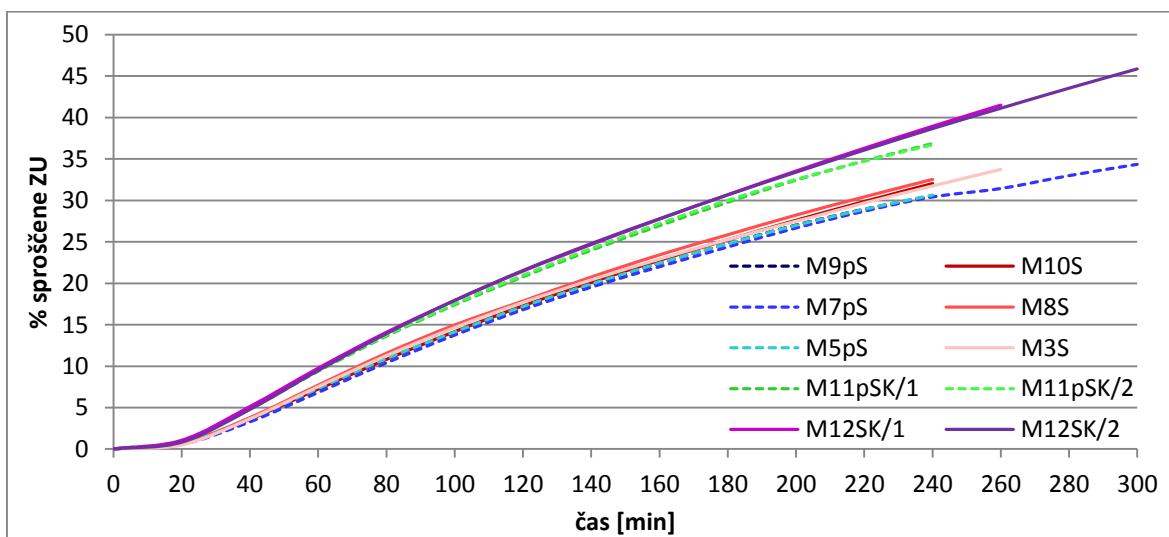
S primerjavo povprečnih profilov sproščanja poskusov na sistemu s sinkerjem smo želeli prikazati morebitne razlike v sproščanju, nastale zaradi simulacije različnih pH profilov. Opazimo lahko, da se je od 180. min dalje (točka simuliranega padca pH) sproščanje pri vseh poskusih, kjer smo ta padec simulirali, upočasnilo. Vsi povprečni profili sproščanja poskusov brez simuliranega padca pH se prekrivajo, prav tako tudi profili poskusov, pri katerih smo simulirali padec pH. Ne glede na to, kakšen pH smo vzpostavili na koncu TČ in po simuliranem padcu pH, je torej sproščanje ZU potekalo s podobno hitrostjo (Slika 24), saj je največja razlika v % sproščene ZU med poskusi po 240 min znašala le 2 %.

Pred poskusi sproščanja na sistemu s sinkerjem smo pričakovali, da bo med poskusi, pri katerih smo simulirali različne nivoje končnega pH v distalnem TČ, zaradi lastnosti diklofenaka (pKa vrednost 3,80) prišlo do opaznih razlik v % sproščene učinkovine in da se bo na profilih sproščanja videlo zmanjšanje hitrosti sproščanja po simuliranem padcu pH [24, 25]. Ugotovili smo, da se sproščanje diklofenaka kot modelne učinkovine med poskusi, pri katerih smo simulirali različne pH profile (trije različni nivoji pH tako v distalnem TČ kot v začetnem delu DČ), praktično ne razlikuje. Pri vseh treh različnih simuliranih pH profilih je opazen enak vpliv simuliranega padca pH na zmanjšanje hitrosti sproščanja ZU iz ogrodnih tablet. Pri učinkovinah z višjimi vrednostmi pKa (glede na diklofenak) bi lahko razlike med pH profili, ki smo jih v tej magistrski nalogi simulirali, imele precej večji vpliv na sproščanje, saj bi ob padcu pH na nižje vrednosti (npr. 5,4) njihova topnost in s tem hitrost sproščanja bolj upadla.

#### 5.4.2 TESTI SPROŠČANJA NA SISTEMU S KROGLICAMI

S poskusi sproščanja na sistemu s kroglicami smo želeli preveriti vpliv posnemanja gibanja v GIT na sproščanje ZU ter rezultate primerjati s tistimi, dobljenimi na sistemu s sinkerjem. Tableta je od začetka poskusov le s spodnjo ploskvijo drsela po kroglicah, zato je bila nabrekla plast na spodnji ploskvi precej tanjša kot na ostalih ploskvah. Šele ko je tableta nabreknila toliko, da se je njena relativna gostota zmanjšala in je zato delno lebdela nad kroglicami, je gibanje magneta in kroglic povzročilo obračanje tablete in s tem erodiranje nabreklih plasti okoli celotne tablete. Razlika v časih, pri katerih je prišlo do obračanja tablete, se na profilih sproščanja ni izrazila. Zaradi simuliranega padca pH se je pri poskusu **M11pSK** po 180. min sproščanje glede na poskus **M12SK** upočasnilo, kar je na Sliki 24 vidno kot zmanjšanje naklona krivulj obeh paralelkah poskusa **M11pSK**.

S Slike 24 lahko razberemo, da se ob uporabi kroglic ZU sprošča precej hitreje kot pri poskusih s sinkerjem. To je posledica erozije nabreklega HPMC sloja tablete zaradi trenja s kroglicami, kar omogoča, da se ZU tudi iz notranjosti tablete sprošča hitreje, ker je nabrekla plast, skozi katero mora ZU difundirati, tanjša kot pri poskusih s sinkerjem. Tako pri poskusih s simuliranim padcem pH kot pri poskusih brez padca pH se je na sistemu s kroglicami po 240 min sprostilo ~ 6 % več ZU v primerjavi s poskusi na sistemu s sinkerjem. Relativno se je torej pri poskusih s kroglicami v 4 h sprostilo kar za petino več ZU glede na poskuse s sinkerjem, kar kaže na velik vpliv mehanskih obremenitev (trenje kroglic ob tableto) in pomen ponazoritve pravilnega načina gibanja v GIT pri poskusih sproščanja.



**Slika 24:** Povprečni profili sproščanja vseh poskusov z več paralelkami na sistemu s sinkerjem: M5pS, M7pS in M9pS (poskusi s padcem pH) ter M3S, M8S in M10S (poskusi brez padca pH) in primerjava le-teh s profili sproščanja pri poskusih na sistemu s kroglicami: M11pSK/1 in M11pSK/2 (poskusa s simuliranim padcem pH) ter M12SK/1 in M12SK/2 (poskusa brez simuliranega padca pH). Profili poskusov, pri katerih smo simulirali padec pH, so narisani s prekinjeno črto, profili poskusov brez padca pH pa s polno črto.

## 6 SKLEP

V magistrskem delu smo uspeli simulirati pH profil prebavnega trakta na pretočnem sistemu po vnaprej postavljenih kriterijih. Ob simulacijah smo ugotovili naslednje:

- Potrebno je zagotoviti enake preteke skozi dovodno in odvodno cevko, da med poskusni pride do spreminjanja volumna medija v delovni čaši, kar bi prineslo lažne rezultate.
- Z natančnim delom ob uvajanju različnih koncentracij raztopin  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  v različno koncentrirane raztopine  $\text{HCl}$  je možno dobro simulirati hitri dvig pH. Najbolj primerna od preizkušenih je kombinacija 10 mM  $\text{HCl}$  in 55 mM raztopine  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ .
- pH ob uvajanju fosfatnih pufrov prehitro naraste od 6 proti platojem pH z višimi pH vrednostmi. Šele z velikimi redčitvami teh pufrov smo naraščanje pH proti 8 upočasnili dovolj, da je ustrezalo kriterijem; za doseganje pH platoja 7,5 pa se ta princip ni obnesel.
- Redčeni McIlvainovi pufri so se izkazali za uporaben medij pri simulacijah naraščanja pH od 6 proti različnim pH platojem (7,0; 7,5; 8,0). Osnovni McIlvainov pufer smo morali zelo razredčiti, da smo dosegli dovolj dolg čas naraščanja pH do platojev, vendar je pH profil tudi pri testih sproščanja ostal enak (vpliv tablete nanj je bil minimalen).
- Redčena fosforna kislina omogoča dobro simuliranje padca pH (prehod iz TČ v CK).
- Pri večini poskusov sproščanja (ne pri vseh), kjer smo simulirali padec pH, se je po padcu pH nakazalo zmanjšanje hitrosti sproščanja ZU v primerjavi s poskusi brez padca pH.
- Med povprečnimi profili sproščanja diklofenaka, dobljenimi ob simulaciji treh različnih nivojev končnega pH v distalnem TČ, do 180. min nismo ugotovili pomembnejših razlik. Padec pH je na hitrost sproščanja vplival enako ne glede na nivo pH v distalnem TČ: vsi trije profili poskusov s padcem kot tudi tisti brez padca se med seboj prekrivajo.
- Simulacija mehanskih sil v GIT ob uporabi steklenih kroglic poveča % sproščene ZU iz ogrodne tablete glede na poskuse na sistemu s sinkerjem, kjer ta dejavnik ni prisoten.

Končni rezultat te magistrske naloge je simulirani pH profil celotnega GIT (od želodca do DČ), ki pa potrebuje še precej dodelave. Ta magistrska naloga je prva na katedri s področja *in vitro* simulacije pH profila GIT na pretočnem sistemu, zato bo potrebnega še veliko dela, preden bomo zmožni približati se *in vivo* pogojem. Pri izbiri medijev za simulacije pH profila GIT bi bilo v prihodnje potrebno upoštevati pufrno kapaciteto posameznih predelov GIT ter v ta namen testirati še druge vrste pufrov. Poleg simulacije drugih pH platojev v TČ je nujna tudi simulacija drugačnih amplitud začetnih dvigov pH in padcev pH na prehodu v CK. Veliko možnosti je pri variiranju časov zadrževanja v določenem pH, čemur v tej magistrski nalogi nismo namenili veliko pozornosti.

## **7 VIRI IN LITERATURA**

1. Camilleri M, Thorne NK, Ringel Y et al.: Wireless pH-Motility Capsule for Colonic Transit: Prospective Comparison with Radiopaque Markers in Chronic Constipation. *Neurogastroenterology and Motility* 2010; 22 (8): 874–e233.
2. Gelfond D, Ma C, Semler J, Borowitz D: Intestinal pH and Gastrointestinal Transit Profiles in Cystic Fibrosis Patients Measured by Wireless Motility Capsule. *Digestive Diseases and Sciences* 2013; 58: 2275–2281.
3. Gilbert J, Kelleher J, Littlewood JM, Evans DF: Ileal pH in Cystic Fibrosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1988; 23 (suppl 143): 132–134.
4. Evans DF, Pye G, Bramley R, et al.: Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 1988; 29: 1035–1041.
5. Rao SC, Kuo B, McCallum RW, et al.: Investigation of Colonic and Whole-Gut Transit With Wireless Motility Capsule and Radiopaque Markers in Constipation. *Clinical Gastroenterology and hepatology* 2009; 7: 537–544.
6. Zarate N, Mohammed SD, O`Shaughnessy E, et al.: Accurate localization of a fall in pH within the ileocecal region: validation using a dual-scintigraphic technique. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010; 299: G1276–G1286.
7. Pye G, Evans DF, Ledingham S, Hardcastle JD: Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma. *Gut* 1990; 31: 1355–1357.
8. Sasaki Y, Hada R, Nakajima H, et al.: Improved Localizing Method of Radiopill in Measurement od Entire Gastrointestinal pH Profiles: Colonic Luminal pH in Normal Subjects and Patients with Crohn`s Disease. *American Journal of Gastroenterology* 1997; 92 (1): 114–118.
9. Ewe K, Schwartz S, Petersen S, Press AG: Inflammation Does Not Decrease Intraluminal pH in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44 (7): 1434–1439.
10. Ibekwe VC, Fadda HM, McConnell EL, et al.: Interplay Between Intestinal pH, Transit Time and Feed Status on the In Vivo Performance of pH Responsive Ileo-Colonic Release Systems. *Pharmaceutical Research* 2008; 25 (8): 1828–1835.
11. Press AG, Hauptmann IA, Hauptmann L, et al.: Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1998; 12: 673–678.

12. Fallingborg J, Christensen LA, Ingeman-Nielsen M, et al.: pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1989; 3 (6): 605–613.
13. Szarka LA, Camilleri M: Methods for the Assessment of Small-Bowel and Colonic Transit. *Seminars in Nuclear Medicine* 2012; 42: 113–123.
14. Fallingborg J, Christensen LA, Ingeman-Nielsen M, et al.: Gastrointestinal pH and transit times in healthy subjects with ileostomy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1990; 4: 247–253.
15. Fallingborg J, Pedersen P, Jacobsen BA: Small Intestinal Transit Time and Intraluminal pH in Ileocecal Resected Patients with Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43 (4): 702–705.
16. Maqbool S, Parkman HP, Friedenberg FK: Wireless Capsule Motility: Comparison of the SmartPill® GI Monitoring System with Scintigraphy for Measuring Whole Gut Transit. *Digestive Diseases and Sciences* 2009; 54: 2167–2174.
17. Meldrum SJ, Watson BW, Riddle HC, et al.: pH Profile of Gut as Measured by Radiotelemetry Capsule. *British Medical Journal* 1972; 2: 104–106.
18. Sarosiek I, Selover KH, Katz LA, et al.: The assessment of regional gut transit times in healthy controls and patients with gastroparesis using wireless motility technology. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2010; 31: 313–322.
19. Lalezari D: Gastrointestinal pH profile in subjects with irritable bowel syndrome. *Annals of Gastroenterology* 2012; 25: 333–337.
20. Bown RL, Gibson JA, Sladen GE, et al.: Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device. *Gut* 1974; 15: 999–1004.
21. Gorjan P: Optimizacija in vplivi pH vrednosti ter pretokov medijev na sproščanje iz gastrorezistentnih pelet [Diplomska naloga v izdelavi]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko Ljubljana.
22. 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 (1): 11–22.
23. Rizmal P: Vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v kislem mediju na sproščanje učinkovine ob povečanem pretoku [Diplomska naloga]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014.

24. Chuasawan B, Binjesoh V, Polli JE, et al.: Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98 (4): 1206–1219.
25. Klein S, Garbacz G, Pišlar M, et al.: The role of individual gastric emptying of pellets in the prediction of diclofenac *in vivo* dissolution. *Journal of Controlled Release* 2013; 166: 286–293.

**Priloga 1:** Tabela s podatki za pripravo koncentriranih McIlvainovih pufrov

Za pripravo 20 mL pufra z določenim pH se zmeša 0,2 M raztopino  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 0,1 M raztopino citronske kisline v volumskem razmerju, kot je navedeno v spodnji tabeli.

željeni pH	V(0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) [mL]	V(0,1 M citronska kislina) [mL]
2,2	0,40	19,60
2,4	1,24	18,76
2,6	2,18	17,82
2,8	3,17	16,83
3,0	4,11	15,89
3,2	4,94	15,06
3,4	5,70	14,30
3,6	6,44	13,56
3,8	7,10	12,90
4,0	7,71	12,29
4,2	8,28	11,72
4,4	8,82	11,18
4,6	9,35	10,65
4,8	9,86	10,14
5,0	10,30	9,70
5,2	10,72	9,28
5,4	11,15	8,85
5,6	11,60	8,40
5,8	12,09	7,91
6,0	12,63	7,37
6,2	13,22	6,78
6,4	13,85	6,15
6,6	14,55	5,45
6,8	15,45	4,55
7,0	16,47	3,53
7,2	17,39	2,61
7,4	18,17	1,83
7,6	18,73	1,27
7,8	19,15	0,85
8,0	19,45	0,55