

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA LAPUH

**VPLIV IZBRANIH POGOJEV NA PRENASIČENJE IN SPROŠČANJE
NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA IZ TABLET S TAKOJŠNJIM
SPROŠČANJEM**

**THE IMPACT OF CHOSEN PARAMETERS ON SUPERSATURATION AND
RELEASE OF DICLOFENAC SODIUM FROM IMMEDIATE RELEASE
TABLETS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala 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 magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem Greti Cof, dipl. ing. kem. tehn. in Tjaši Felicijan, mag. farm. za pomoč in praktične nasvete pri laboratorijskem delu.

Velika zahvala gre moji družini za vso podporo in vzpodbudne besede med študijem. Hvala vam.

Izjava

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

Martina Lapuh

VSEBINA

I. POVZETEK	IV
II. ABSTRACT	VI
III. SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1 KAJ JE SUPERSATURACIJA?	1
1.2 SUPERSATURACIJA <i>IN VIVO</i>	2
1.3 <i>IN VITRO</i> TESTI	2
1.3.1 IZBIRA TEMPERATURE	2
1.3.2 IZBIRA MEDIJA ZA SPROŠČANJE	2
1.3.3 IZBIRA NAPRAVE	3
1.3.4 <i>IN VITRO</i> VPLIVI NA SUPERSATURACIJO, OPAŽENI V ČLANKIH	5
2. NAMEN DELA	10
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI IN APARATURE	11
3.1.1 MATERIALI	11
3.1.2 APARATURE	11
3.2 METODE	12
3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN	12
3.2.2 PRIPRAVA MEDIJA ZA SPROŠČANJE	13
3.2.3 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA	13
3.2.4 DOLOČANJE ENAČB UMERITVENIH PREMICE	13
3.2.5 PRELIMINARNI POSKUSI – STABILIZACIJA VZORCA	14
3.2.6 STISKANJE TABLET	14
3.2.7 TESTI SPROŠČANJA	15
3.2.8 IZRAČUN PROFILOV SPROŠČANJA	17
3.2.9 PRIPRAVA MEDIJEV ZA DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI UČINKOVINE	18
3.2.10 PRIPRAVA VZORCEV ZA DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI ...	18
3.2.11 TESTI DOLOČANJA RAVNOTEŽNE TOPNOSTI	18
4. REZULTATI	20
4.1 ENAČBA UMERITVENE PREMICE	20

4.2	PRELIMINARNI POSKUSI	20
4.3	TESTI SPROŠČANJA	23
4.4	DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA	30
5.	RAZPRAVA	32
5.1	PRELIMINARNI POSKUSI	32
5.2	TESTI SPROŠČANJA	34
5.2.1	OBLIKA PROFILOV SPROŠČANJA	34
5.2.2	VPLIV RAZLIČNIH VOLUMNOV MEDIJA	34
5.2.3	VPLIV HITROSTI MEŠANJA	40
5.2.4	VPLIV IZBIRE METODE.....	43
5.3	TESTI DOLOČANJA RAVNOTEŽNE TOPNOSTI	47
5.4	MOŽNOSTI ZA NADALJNJE POSKUSE	49
6.	ZAKLJUČKI.....	50
7.	VIRI IN LITERATURA	52

I. POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo preučevali vpliv spreminjanja parametrov sproščanja na sproščanje natrijevega diklofenakata (Na-DIC) iz tablet s takojšnjim sproščanjem, ki so pod izbranimi pogoji omogočili tudi doseg stanja prenasičenosti, kar je kasneje vodilo do pojava obarjanja učinkovine. V tabletah, ki smo jih izdelali sami, smo poleg učinkovine med pomožnimi snovmi uporabili Avicel PH 200, ki ima vlogo polnila in polimer (PVP), ki vpliva na doseg stanja prenasičenosti Na-DIC. PVP, zelo hidrofilen polimer, namreč s svojim hitrim raztapljanjem v mediju za sproščanje verjetno vpliva tudi na pospešeno raztapljanje učinkovine in omogoča vzpostavitev stanja prenasičenosti Na-DIC v mediju za sproščanje. Vse teste sproščanja smo izvajali v štirikrat redčenem McIlvainovem pufru pH=4 (DMB, pH=4), z izbiro različnih volumnov medija (500, 750 in 900 mL), različne hitrosti mešanja (50, 75 in 100 rpm) in različnih metod sproščanja (USP I s košaricami z odprtino por 10 in 40 mesh, USP II in USP II z uporabo sinkerjev) smo dosegli različno hitrost sproščanja Na-DIC iz tablet v okoliški medij, različne največje dosežene koncentracije Na-DIC, pa tudi hitrost obarjanja se je razlikovala glede na izbrane preučevane parametre. Ne glede na izbrani parameter, se je koncentracija Na-DIC ob koncu poskusov sproščanja približala isti koncentraciji, za katero menimo, da bi lahko bila blizu ravnotežni topnosti Na-DIC v preučevanem mediju za sproščanje. V manjšem volumnu medija (500 mL) sicer dosežemo največje koncentracije Na-DIC, vendar je delež učinkovine, ki se sprosti iz tablet, tu manjši kot v primeru sproščanja v večjem volumnu medija (900 mL). Glede na izrisane grafe, ki ponazarjajo potek sproščanja, je čas vzdrževanja stanja prenasičenosti v 500 mL medija za sproščanje najkrajši, prav tako je obarjanje v tem volumnu najhitrejše. Pri manjši hitrosti mešanja veslastega mešala smo naleteli na težave, ki so se kazale s slabšo ponovljivostjo med paralelami. Verjetno so posledica pojava kupčka iz že razpadle tablete na še nerazpadli tableti, na dnu posode, kar ovira nadaljnje sproščanje učinkovine iz tablete – gre za t.i. učinek mrtve cone («conning» efekt). Te težave smo delno odpravili z uporabo obteževalcev, v katere smo vstavili tableto.

Ob koncu smo želeli določiti še ravnotežno topnost Na-DIC v vzorcih z različnim začetnim masnim razmerjem Na-DIC : PVP. Kljub slabi ponovljivosti med paralelami v začetnih točkah stresanja smo opazili, da dodatek polimera poveča topnost Na-DIC. Koncentracija Na-DIC s časom stresanja najprej narašča, potem pa pade do vrednosti, ki najverjetneje predstavlja ravnotežno topnost Na-DIC v določenem mediju. V primeru stresanja vzorca,

kjer učinkovini ni bil dodan polimer, je bila koncentracija raztopljenega Na-DIC ves čas stresanja približno enaka. Izmerjena koncentracija Na-DIC v vzorcu brez dodatka polimera je po koncu stresanja ob upoštevanju eksperimentalne napake primerljiva s koncentracijo Na-DIC po štirih urah sproščanja.

Ključne besede: natrijev diklofenakat, prenasičenje, obarjanje, *in vitro* testi sproščanja, topnost

II. ABSTRACT

In master's thesis we studied the impact of changing the dissolution parameters on the release of diclofenac sodium (Na-DIC) from immediate release tablets that under specific conditions enable the obtainment of the supersaturation state, and later the occurrence of the drug precipitation. Tablets used in dissolution tests were made at the Faculty of Pharmacy. Beside the active ingredient they also contained excipients, i.e. Avicel PH 200, which has the role of the filler and the polymer (PVP) which affects the achievement of the state of supersaturation of Na-DIC. Due to its rapid dissolution in the testing medium, PVP, which is a hydrophilic polymer, may also contribute to the rapid dissolution of the active ingredient, and therefore enable the establishment of the supersaturation of Na-DIC in the dissolution medium. All dissolution tests were performed in a four times diluted McIlvaine buffer pH = 4 (DMB, pH = 4). With a selection of different volumes of the medium (500, 750, and 900 mL), various stirring rates (50, 75 and 100 rpm) and different dissolution methods (USP I, with the basket sizes of 10 and 40 mesh, USP II and USP II, where we used sinkers) we achieved different release rates of Na-DIC, different maximum concentrations of Na-DIC and the precipitation rate of Na-DIC varied according to the selected parameters as well. Regardless to the selected parameters, the concentration of Na-DIC at the end of the release experiments was close to the concentration, which we believe is the equilibrium solubility of Na-DIC in the studied medium. In a smaller volume of the medium (500 mL), we achieved the highest concentrations of Na-DIC, but the released fraction of the drug was lower than in the case of the release in the larger volume of the medium (900 mL). According to the plotted graphs that illustrate the release of Na-DIC from tablets, the time of maintaining the state of supersaturation in 500 mL of the medium is the shortest, but precipitation of the drug in this volume is the fastest. At the lower stirring rate we encountered problems which reflected in poor repeatability of the parallels. These problems, partially resolved by using sinkers in which we inserted the tablet, are likely to reflect in the occurrence of a number of dissolved particles on the top of non-disintegrated tablet at the bottom of the vessel. Therefore, so called conning effect could hinder the release of the drug from the tablets.

Lastly we wanted to determine the equilibrium solubility of Na-DIC in samples with different initial weight ratio of Na-DIC: PVP. Despite the low repeatability between parallels, especially at the beginning of the experiment, we noticed that the addition of the

polymer increases the solubility of Na-DIC. The concentration of Na-DIC in the presence of PVP first increases and then decreases to the value that is probably close to the equilibrium solubility of Na-DIC in the tested medium. In the experiment where no polymer was added, the concentration of dissolved Na-DIC was maintained approximately the same throughout the experiment. Taking into consideration the experimental error, the concentration of the Na-DIC in the sample in which the polymer was not added, was at the end of the experiment comparable with the concentration of Na-DIC after four hours of dissolution testing.

Key words: diclofenac sodium, supersaturation, precipitation, *in vitro* dissolution tests, equilibrium solubility

III. SEZNAM OKRAJŠAV

API - učinkovina (active pharmaceutical ingredient)

BCS - biofarmacevtska klasifikacija učinkovin (Biopharmaceutics Classification System)

BU – biološka uporabnost

DMB – redčen McIlvainov pufer (Diluted McIlvaine Buffer)

FeSSGF – Umetni želodčni medij, ki simulira pogoje na tešče (Fed State Simulated Gastric Fluid)

FeSSIF-V₂ – Umetni črevesni sok, ki simulira pogoje s hrano – verzija 2 (Fed State Simulated Intestinal Fluid Version 2)

FO – farmacevtska oblika

GIS – Naprava za sproščanje, ki ponazarja prehod učinkovine skozi GIT (gastrointestinal simulator)

GIT – gastrointestinalni trakt

HPMC – hidroksipropil metilceluloza, hipromeloza

HPMCAS – hipromeloza acetat sukcinat

IVIVC – *in vitro/in vivo* korelacija

m/m % - masno/masni delež

Na-DIC – natrijev diklofenakat

PAS – površinsko aktivna snov

PS – pomožna snov

PVP – polivinilpirolidon

RPM – število obratov na minuto (Revolution per minute)

SD – stopnja prenasičenja (supersaturation degree)

SLS – natrijev lavril sulfat (sodium lauryl sulfate)

SEDDS – samoemulgirajoči dostavni sistemi (Self-emulsifying drug delivery systems)

SDDS – dostavni sistemi, ki omogočajo prenasičenje (Supersaturating drug delivery systems)

SSD – Naprava za sproščanje, ki ponazarja prehod učinkovine skozi GIT (Simulated stomach duodenum model)

USP – Farmakopeja Združenih držav Amerike (The United States Pharmacopeia)

1. UVOD

Z razvojem na področju odkrivanja novih učinkovin se v zadnjem desetletju srečujemo predvsem z na novo odkritimi učinkovinami, ki jih omejuje slaba topnost v vodi. Glede na to lastnost, se je pojavila potreba po novih pristopih, ki temeljijo na izboljšanju topnostnih lastnosti učinkovin. S povečanjem topnosti sicer dobro permeabilne učinkovine, namreč vplivamo na njeno večjo absorpcijo in posledično večjo biološko uporabnost. Sprva so se z namenom izboljšanja topnostnih lastnosti učinkovin izoblikovali sistemi, ki so temeljili na izboljšanju topnosti učinkovine, kar so dosegli s kristalno modifikacijo učinkovine (metastabilni polimorfi soli, kokristalov), uporabo trdnih FO z dodatkom PAS, zmanjšanjem velikosti delcev (mikro-, nanodelci), amorfizacijo (amorfne disperzije), izoblikovali so tudi sisteme, ki temeljijo na lipidih. V zadnjem času pa so se začeli osredotočati tudi na dostavne sisteme, ki temeljijo na dosegu prenasičenja (SDDS – Supersaturating drug delivery systems). Ti so zelo učinkovit pristop za povečanje biološke razpoložljivosti za posamezne učinkovine, predvsem tiste, ki jih po BCS klasifikaciji razvrščamo v drugi razred (slaba topnost, dobra permeabilnost). Učinkovino lahko vgradimo v takšno farmacevtsko obliko, ki bo ob stiku z vodnim okoljem gastrointestinalnega trakta (GIT) učinkovini lahko omogočila vzpostavitev in tudi zadrževanje v stanju prenasičenosti. Z dodatkom pomožnih snovi lahko stanje prenasičenosti vzdržujemo v metastabilnem stanju tako dolgo, da se absorbira večja količina sproščene učinkovine (1, 2, 3, 4).

1.1 KAJ JE SUPERSATURACIJA?

Supersaturacija oz. prenasičenje predstavlja stanje, v katerem je koncentracija topljenca v raztopini večja, kot bi bila v primeru dosega njegove ravnotežne topnostne koncentracije v istem mediju. Stopnjo supersaturacije (S) podamo kot razmerje med koncentracijo topljenca v mediju (C) in njegovo ravnotežno topnostjo (C_s) v istem mediju (4).

Enačba 1

$$S = \frac{C}{C_s}$$

Zelo pomembno je, da ločimo med prenasičenjem in solubilizacijo. V nasprotju s solubiliziranim stanjem je stanje prenasičenosti termodinamsko nestabilno in močno teži k obarjanju, ki predstavlja potencialno oviro pri povečani biološki razpoložljivosti SDDS. V primeru, da prenasičeno raztopino lahko dalj časa vzdržujemo v metastabilnem stanju, je

prenasičenje iz vidika povečane absorpcije veliko boljši pristop od solubilizacije. V stanju prenasičenja se namreč učinkovina nahaja v prosti obliki, kar ji omogoča prost prehod v in skozi epitelij (2). Ena od slabosti solubilizacije je tudi uporaba surfaktantov, saj ti ob večji dnevni izpostavljenosti za pacienta predstavljajo določena negativna tveganja.

1.2 SUPERSATURACIJA *IN VIVO*

Prenasičenje se lahko, kakor je bilo že omenjeno, pojavi ob stiku FO z vodnim okoljem gastrointestinalnega trakta, tako v želodcu kot tudi v tankem črevesu. Slabo topne šibke baze so tipično dobro topne v želodcu v teščem stanju, s preходом v tanko črevo, kjer se lahko nahajajo v prenasičenem stanju, pa njihova topnost pogosto drastično pade. Ravno obratno je v primeru šibko kislih učinkovin, pri katerih lahko ob stimulaciji prenasičenja v želodcu, pričakujemo, da se bo že v želodcu povečala količina raztopljene učinkovine, povečana topnost učinkovine pa bo nastopila z njenim preходом v tanko črevo. Tako je v primeru prenasičenja v želodcu s preходом večje količine raztopljene učinkovine iz želodca v nevtralnemu okolje tankega črevesa tu ustvarjena večja gonilna sila za absorpcijo (2, 4).

Prenasičenje je *in vivo* pomembno tudi pri absorpciji učinkovin, ki zapadejo predsystemskega metabolizmu. Za ketokonazol so ugotovili, da z dosegom prenasičenja v duodenumu lahko namreč z večjo količino učinkovine zasitimo jetrne encime, ki so sicer sposobni metabolizirati učinkovino, in tako dosežemo večjo BU učinkovin (5).

1.3 *IN VITRO* TESTI

1.3.1 IZBIRA TEMPERATURE

Priporočljiva delovna temperatura je 37 °C, saj je takšna tudi *in vivo* temperatura v telesu.

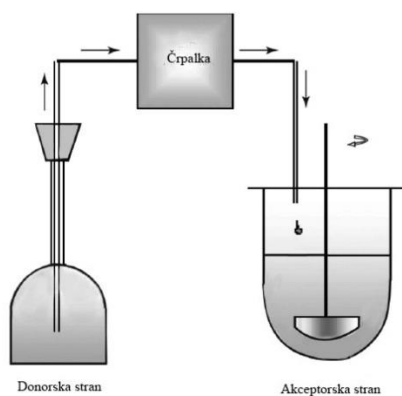
1.3.2 IZBIRA MEDIJA ZA SPROŠČANJE

Kot je znano z uporabo preprostih vodnih raztopin pufrov kot medijev za testiranja sproščanja, ne moremo vedno popolnoma predvideti *in vivo* obnašanja testiranih FO v želodcu in črevesju. Z namenom boljše napovedi dogajanja *in vivo* so razvili nove biorelevantne medije, ki simulirajo pogoje v tankem črevesju in v želodcu ob pogojih s hrano in na tešče. Čeprav napovedi še sedaj niso optimalne, se je z uporabo novih biorelevantnih medijev vseeno močno izboljšala IVIVC. Komponente hrane namreč lahko vplivajo na izločanje snovi, ki so normalno prisotne v GIT, predvsem žolčnih soli in fosfolipidov, te pa imajo med drugim, tudi vpliv na kinetiko precipitacije. (2, 6).

1.3.3 IZBIRA NAPRAVE

Napravi za sproščanje USP I in II sta standardni in pogosto uporabljeni napravi pri testiranju sproščanja učinkovine iz trdnih farmacevtskih oblik (29). V želji po boljši *in vivo* napovedi dogajanja so raziskovalci predstavili izpopolnjene modele, s pomočjo katerih lahko bolje ovrednotimo pojav prenasičenja in posledičnega obarjanja, ki nastopita ob uporabi slabše topnih učinkovin. Ti modeli poleg uporabe biorelevantnih medijev in ponazoritve hidrodinamike v GIT ponazorijo še pH gradient, ki mu je učinkovina izpostavljena predvsem ob prehodu iz želodca v duodenum, nekateri pa z vključitvijo dodatnih prostorov podrobneje ponazarjajo nadaljni prehod učinkovine vzdolž tankega črevesa, upoštevajo pa tudi permeabilnost učinkovine in praznjenje tako želodca kot črevesja. Primeri izpopolnjenih naprav, ki jih lahko uporabimo za boljšo *in vivo* napoved, so GIS (gastrointestinal simulator), TIM, ASD (artificial stomach-duodenum) (7).

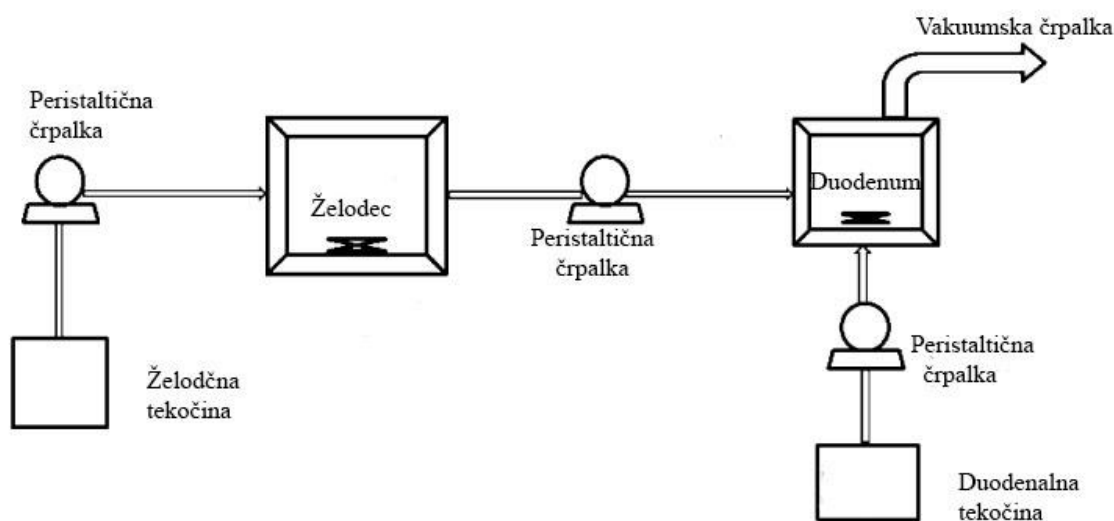
Kostewitz je s sodelavci predstavil model, ki predstavlja prehod iz želodca v tanko črevo in tako omogoča boljšo *in vivo* napoved obnašanja preiskovane učinkovine. Napoved se nanaša predvsem na obnašanje v vodi slabo topne šibko bazične učinkovine dipiridamola, ki se v kislem želodčnem okolju popolnoma raztopi, problem pa nastopi z njenim prehodom v nevtralnno intestinalno okolje. S pomočjo peristaltične črpalke zagotovimo različne pretoke, s čimer ponazorimo različno hitrost prehoda učinkovine iz želodca v proksimalno tanko črevo. V prvem prostoru je učinkovina raztopljena v simuliranem želodčnem mediju, v drugem prostoru, ki predstavlja intestinalni del, pa se nahaja medij, ki ponazarja pogoje v tem delu prebavnega trakta. Vpliv gibanja črevesja predstavimo z različno hitrostjo vrtenja vesla v prostoru, ki predstavlja intestinalni del. Koncentracijo učinkovine so merili v prostoru, ki predstavlja akceptorsko stran – simulirano proksimalno tanko črevo (9).



Slika 1: *In vitro* model, ki ga je predstavil Kostewitz s sodelavci z namenom ponazoritve prehoda učinkovine iz želodca v proksimalno tanko črevo (9).

Ta model ima tudi določene pomanjkljivosti, in sicer ne ponazarja prehoda učinkovine iz duodenalnega prostora. Učinkovina se tako kopiči v posodi, ki predstavlja duodenum, dobljene izmerjene koncentracije pa niso relevantne, saj se v *in vivo* situaciji predvsem učinkovine z dobro permeabilnostjo hitro absorbirajo iz duodenuma v kri in je tako njihova koncentracija na preučevanem mestu manjša, posledično je tudi obarjanje zaradi nižje stopnje prenasičenja manj izrazito in supersaturacija je lahko vzdrževana dalj časa (10).

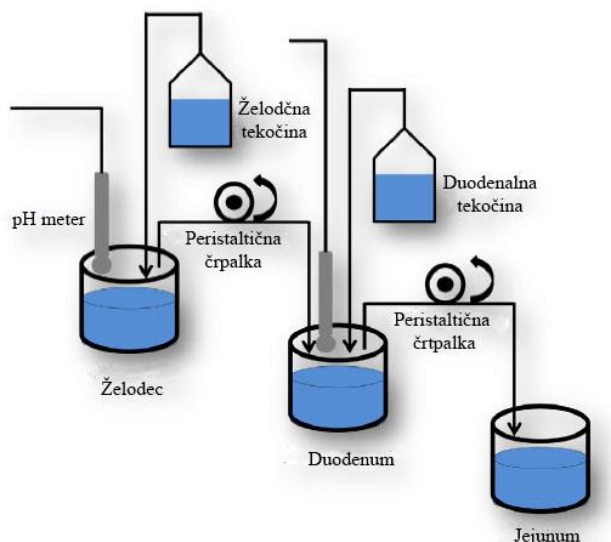
Nadgradnja Kostevitzewega modela je npr. štiriprostorni model SSD – simulated stomach duodenum model –, kjer so poleg upoštevanja praznjenja duodenalnega prostora in prehoda učinkovine iz želodčnega prostora v duodenalni prostor ponazorili še izločanje želodčne kisline v želodec in izločanje duodenalnih tekočin v duodenalni prostor. S pomočjo treh peristaltičnih črpalk namreč simulirajo konstantno izločanje želodčne kisline v želodec in sekrecijo duodenalnih tekočin v duodenum, ena peristaltična črpalka pa služi simulaciji praznjenja želodca. S pomočjo vakuumske črpalke ponazarjajo odstranjevanje učinkovine iz duodenuma, s čimer je v duodenalnem prostoru tudi zagotovljen konstanten volumen (8).



Slika 2: Model, ki simulira prehod učinkovine skozi GIT po per os aplikaciji – SSD model (simulated stomach duodenum model) (8)

Še boljši sistem od prejšnjega je sistem GIS (Gastrointestinal simulator), saj poleg simulacije prehoda učinkovine iz želodca v duodenum, upošteva še nadaljnji prehod učinkovine iz duodenuma v jejunum. Model je bil predstavljen z namenom boljše IVIVC in tako vsebuje tri prostore, ki predstavljajo želodec, duodenum in jejunum. Vsak prostor vsebuje drugačen volumen medija, ima drugačen pH in takšne lastnosti, ki so čim bolj podobne tistim v *in vivo*

situaciji. S pomočjo peristaltičnih črpalk ponazarjajo prehode učinkovine med prostori ki ponazarjajo želodec, duodenum in jejunum, prav tako pa črpalke uporabijo za simulacijo izločanja želodčne kisline v želodec in sekrecije duodenalnih sokov v duodenum (11).



Slika 3: Model, ki je ki je nadgradnja SSD modela in prav tako ponazarja prehod učinkovine skozi GIT trakt (11)

Pomembno je, da v naprave, s katerimi preučujemo sproščanje učinkovin in želimo z njihovo pomočjo dodobra predvideti obnašanje učinkovine *in vivo*, vključimo tudi absorpcijski prostor. Vloga absorpcijskega prostora je namreč simulacija absorpcije učinkovine iz gastrointestinalnega trakta, ki poteka tudi v *in vivo* situaciji. Z odstranjevanjem raztopljene učinkovine bi tako pravilneje ovrednotili prenasičenje in obarjanje ter posledično dosegli boljšo *IVIVC* (7, 11).

1.3.4 IN VITRO VPLIVI NA SUPERSATURACIJO, OPAŽENI V ČLANKIH

Beverneage s sodelavci je v svoji raziskavi, z metodo z zamenjavo topila vzpostavil željeno stopnjo supersaturacije ($SD - \text{Supersaturation degree} = 20$) in spremljal vzdrževanje stanja prenasičenosti skozi čas za različne učinkovine. Ugotovil je, da je čas, v katerem se učinkovina zadržuje v stanju prenasičenosti, različen **od učinkovine** do učinkovine, prav tako je čas vzdrževanja prenasičenosti odvisen od izbire **preučevanega medija**. Ugotovil je, da je topnost nekaterih preučevanih učinkovin v izbranem mediju obratno sorazmerna s sposobnostjo vzdrževanja učinkovine v stanju prenasičenosti v istem mediju. To pomeni, da boljša topnost učinkovine v izbranem mediju predstavlja manjši potencial za vzdrževanje

stanja prenasičenosti v enakem mediju. To so dokazali na primeru etranivira in lovirida, medtem ko so za itakonazol ugotovili, da se je lahko kljub njegovi povečani topnosti ob simulaciji pogojev s hrano, v teh pogojih sposoben dlje časa vzdrževati v stanju prenasičenosti, kar pomeni da zanj ne velja, da se z večanjem topnosti v izbranem mediju zmanjša sposobnost vzdrževanja stanja prenasičenosti (12).

V drugi raziskavi je Beverneage še enkrat pokazal da je stabilnost stanja prenasičenosti odvisna od preučevanega medija in učinkovine. Z željo po stabilizaciji prenasičene raztopine je k učinkovini dodal še **polimerne inhibitorje precipitacije** (HPMC-AS, HPMC-E5, HPMC-E50, HPMC-E4M, HPMC-P in PVP). Ugotovil je, da od teh svojo vlogo najbolj upravičita HPMC in HPMC-AS, pa še to le v primeru danazola, lovirida in etranavira, medtem ko pri fenofibratu in ritonaviru stanja prenasičenosti nista sposobna vzdrževati. Po izsledkih te raziskave, jemanje preiskovanih učinkovin z hrano ali brez nje nima vpliva na sposobnost polimera, da vzdržuje stanje prenasičenosti. V *in vitro* testih namreč ob dodatku polimernega inhibitorja precipitacije k isti učinkovini v medij, ki je ponazarjal pogoje na tešče in pogoje s hrano, ni prišlo do opaznejših razlik v sposobnosti polimera, da vzdržuje stanje supersaturacije (13).

Kakor so že prej opazili Beverneage in sodelavci (12), je tudi Devraj s sodelavci (14) na primeru fenofibrata opazil, da večja stopnja solubilizacije negativno vpliva na sposobnost vzdrževanja stanja prenasičenosti učinkovine. Vpliv **prebave** je preučeval z *in vitro* testi, in sicer tako da je v medij, ki simulira stanje ob obroku s hrano, dodal še pankreatin. Tako za SEDDS kot tudi za ostale FO, ki temeljijo na lipidih, velja, da ob dispergiriranosti v vodnem okolju GIT in izpostavljenosti lipidov in surfaktantov pankreatičnim encimom ter komponentam žolča pride do izgube solubilizacijske kapacitete, ki se kaže z nastankom supersaturiranega stanja. Do višje stopnje prenasičenja pride v primeru tistih učinkovin, ki v mediju predhodno dosežejo večjo solubilizacijo, večja stopnja prenasičenja pa vodi v intenzivnejše obarjanje (14).

Kostewitz s sodelavci je s pomočjo lastnega modela s simulacijo prehoda učinkovine iz želodca v duodenum preučeval obarjanje šibko bazičnih učinkovin (dipiridamol in dve testni spojini) v duodenalnem prostoru. Ne glede na to, da je vsa učinkovina v prostoru, ki predstavlja želodec, popolnoma raztopljena, pride do njenega obarjanja v prostoru, ki predstavlja duodenum. Hitrost obarjanja je močno odvisna od **pretoka raztopine učinkovine** iz želodčnega v duodenalni prostor. Ko se obarjanje prične, je intenzivnejše v

primeru višjih pretokov. Tako hitrejša praznjenja želodca vodi do višjih koncentracij učinkovin v intestinalnem delu, ki pa zaradi pospešenega obarjanja vodijo do hitrejšega padca do ravnotežne topnosti učinkovine. V primeru počasnejšega praznjenja želodca učinkovina počasneje prihaja v intestinalni del, ker pa bi sočasno lahko potekala še absorpcija iz duodenuma, predpostavljajo, da bi bilo obarjanje v tem primeru manj intenzivno ali pa do njega sploh ne bi prišlo, zato bi se stanje prenasičenosti lahko vzdrževalo v večjem obsegu (9).

Do enakih rezultatov je prišel tudi Wagner s sodelavci, ki je za šibko bazično učinkovino A ugotovil, da je pri počasnejšem praznjenju želodca čas, potreben za dosego najvišje koncentracije učinkovine daljši, prav tako je obarjanje nastopilo kasneje. V primeru hitrejšega praznjenja prostora, ki simulira želodec, pa je v simuliranem duodenumu prišlo do dosežene najvišje koncentracije učinkovine, a je ta naglo padla. Plato, ki ga doseže učinkovina po koncu obarjanja je enak (doseže ravnotežno topnost), ne glede na hitrost praznjenja želodčnega prostora. Dokazal je tudi, da ima **hrana** določen vpliv na prenasičenje in obarjanje preiskovane učinkovine v tankem črevesu. V simuliranih pogojih ob obroku s hrano je bila dosežena enaka stopnja supersaturacije, ne glede na hitrost praznjenja želodčnega prostora, prav tako v teh pogojih ni prišlo do obarjanja učinkovine v času štirih ur. Različne hitrosti praznjenja želodčnega prostora so se odražale le v času, ki je bil potreben za dosego najvišje dosežene koncentracije. Ta čas je bil ob najhitrejšem praznjenju želodčnega prostora najkrajši (15).

Mitra s sodelavci je s pomočjo SSD (simulated stomach duodenum) modela želel preučiti vpliv hitrosti praznjenja želodca, dodatka surfaktantov v FO in velikosti odmerka šibko bazične učinkovine, dipiridamola, na obseg supersaturacije in precipitacije. Ugotovil je, da se **spremembe pH** vrednosti v duodenalnem prostoru, ki so lahko tudi odraz različne **hitrosti praznjenja želodca**, kažejo z različno hitrostjo obarjanja učinkovine. V primeru hitrejšega praznjenja želodca je bila v prvi uri dosežena večja stabilnost supersaturiranega stanja v duodenalnem prostoru, saj se je s hitrejšim prehodom želodčnih tekočin pH vrednost v duodenalnem prostoru manjšala. S časom (po 75') se je pH v duodenalnem prostoru znižal tudi v primeru počasnejšega praznjenja želodca, kar se je odražalo v manjši intenziteti obarjanja in upočasnjeni hitrosti padanja koncentracije učinkovine k ravnotežni topnosti. Z aplikacijo dipiridamola v obliki suspenzije in raztopine v prostor, ki simulira želodec, so potrdili hipotezo, da na preprečitev obarjanja dipiridamola vpliva zaustavitev rasti kristalov

in ne zaustavitev nastanka kristalnih jeder. **Surfaktanti**, kot je npr. SLS, se namreč adsorbirajo na površino dipiridamola in tako z vzpostavitvijo sterične ovire za nadaljnjo rast kristalov otežujejo obarjanje dipiridamola (8).

Berlin (16) s sodelavci je pri testih sproščanja z USP II ugotovil, da se je v pogojih, ki simulirajo stanje v želodcu na tešče, raztopila vsa šibko bazična učinkovina (atazanavir), medtem ko se v enakih pogojih v simuliranem intestinalnem delu vsa učinkovina ni sprostila. Ne glede na velikost odmerka, je koncentracija učinkovine v preiskovanem mediju, ki ponazarja intestinalni del ob stanju na tešče (FaSSIF-V2), presegla njeno ravnotežno topnost. Največje koncentracije učinkovine, ki so jih dosegli med sproščanjem, se večajo z **odmerkom** učinkovine v FO, kar pripisujejo **spremembi pH-ja** medija. Ker se učinkovina nahaja v obliki sulfata, predvidevajo, da se z aplikacijo večjega odmerka učinkovine (večje količine sulfata) s časom zmanjša pH medija v posodi za sproščanje, kar pripomore k raztapljanju šibko bazičnega atazanavirja. Ne glede na to, da je bila koncentracija učinkovine najvišja v primeru najvišjega odmerka učinkovine, je bil delež sproščene učinkovine takrat najmanjši. Ob aplikaciji največjega odmerka učinkovine pa je po določenem času sproščanja celo prišlo do obarjanja. Ob pogojih, ki simulirajo stanje v želodcu s hrano, se je uspela sprostiti skoraj celotna količina odmerka (96%), kljub temu da so bile dosežene koncentracije nad mejo ravnotežne topnosti. Sčasoma (po 60') je prišlo do obarjanja učinkovine, ki je po 240' dosegla ravnotežno topnost. Do podobnih rezultatov so prišli s simulacijo pogojev s hrano v duodenalnem delu, le da je bil delež sproščene učinkovine zaradi višjega pH-ja občutno nižji (6,6 %). S pomočjo Kostewitzzevega modela in simulacijo pogojev na tešče so v nasprotju s prejšnjimi raziskovalci (Wagner (13), Mitra (12)) ugotovili, da je stopnja supersaturacije podobna, ne glede na hitrost praznjenja želodca, enako kot prej pa so ugotovili, da hitrejše praznjenje želodca vodi do hitrejšega dosega največje koncentracije. Deleži sproščene učinkovine so večji v primeru manjšega odmerka učinkovine. Ugotovil je, da bi bile komponente, prisotne v zaužiti hrani, skupaj z atazanavirjem lahko ključne za dosego supersaturiranega stanja. S simulacijo pogojev s hrano so namreč opazili vpliv beljakovin, prisotnih v mleku, na obarjanje atazanavirja. V simuliranih pogojih (FeSSGEm/FeSSIF-V2), ki ne vsebujejo mlečnih beljakovin, se je atazanavir po dosegu maksimalnega stanja supersaturacije pričel obarjati, dokler ni dosegel ravnotežne topnosti. V primeru simuliranih pogojev (FeSSGF/FeSSIF-V2), zaradi prisotnosti mlečnih beljakovin do obarjanja ni prišlo. Glede na to da beljakovine, prisotne v

mleku, povečajo topnost atazanavirja, ta v tem mediju svoje topnosti sploh ni presegel, tako da ni prišlo ne do prenasičenja ne do obarjanja (16).

Pinnamaneni s sodelavci je preučeval vpliv **pepsina** na supersaturacijo soli šibko bazične učinkovine A. Ugotovili so, da je pepsin sposoben vzdrževati supersaturirano stanje soli te šibko bazične učinkovine, saj onemogoča njeno pretvorbo v prosto bazo. To lastnost pepsina so dokazali s pomočjo Ramanove spektroskopije. V vzorcu, odvzetem iz medija za sproščanje, ki je vseboval pepsin, ni bilo prisotnega vrha, ki bi nakazoval prisotnost proste baze, medtem ko je na spektru, posnetem v vzorcu brez pepsina, vrh bil prisoten (17).

2. NAMEN DELA

Dostavni sistemi, ki temeljijo na dosegju prenasičenja predstavljajo učinkovit pristop za povečanje biološke razpoložljivosti za posamezne, predvsem slabo topne učinkovine. Namen diplomske naloge je preučiti vpliv različnih parametrov na sproščanje in doseg stanja prenasičenosti natrijevega diklofenakata (Na-DIC) iz tablet s takojšnjim sproščanjem. Testirali bomo vpliv različnih mehanskih obremenitev, ki jih bomo dosegli z izbiro različnih naprav za sproščanje – naprave za sproščanje s košarico velikosti por 10 in 40 mesh, naprave za sproščanje z veslastim mešalom ter naprave z veslastim mešalom, pri čemer bomo tableto vstavili v sinker. Poleg tega bomo teste sproščanja izvajali pri različnih hitrostih vrtenja mešala oz. košarice – 50, 75 in 100 rpm – in ob uporabi različnih volumnov medija za sproščanje – 500, 750 in 900 mL DMB pH=4.

Ker bo koncentracija učinkovine v posodi za sproščanje nad mejo njene ravnotežne topnosti, kar bo težilo k njenemu obarjanju, moramo še pred pričetkom izvajanja poskusov sproščanja odvzetemu vzorcu zagotoviti pogoje, v katerih bo njegova koncentracija enaka od časa odvzema vzorca pa do časa, ko bomo vzorcu izmerili absorbanco. S tem bomo namreč lahko preko izmerjene koncentracije učinkovine v odvzetem vzorcu določili vsaj približno tolikšno koncentracijo učinkovine v raztopljenem stanju, kot se ob času odvzema vzorca nahaja v posodi za sproščanje.

Določiti želimo tudi ravnotežno topnost natrijevega diklofenakata v mediju za sproščanje. S tem namenom bomo pripravili disperzije z različnimi izhodiščnimi masnimi razmerji Na-DIC:PVP in v njih določali koncentracijo natrijevega diklofenakata po določenem času stresanja. Poskušali bomo določiti ravnotežne topnosti Na-DIC v posameznih vzorcih in jih primerjali med sabo ter z vrednostmi doseženih koncentracij Na-DIC po koncu testov sproščanja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN APARATURE

3.1.1 MATERIALI

- Polivinilpirolidon (PVP), Kollidon®17PF, BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija
- Natrijev diklofenakat, p.a. Sigma-Aldrich CO, St.Louis, ZDA
- Mikrokristalna celuloza (MCC), Avicel PH 200, FMC Biopolymer Philadelphia, PA, ZDA
- Mg-stearat, Lex, d.o.o., Koper, Slovenija
- Dinatrijev hidrogenfosfat, p.a. Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, p.a. Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Citronska kislina monohidrat, p.a. Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidroksid, Tritisol® za pripravo 1M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Puferska raztopina pH=4 ($\pm 0,02$; 20°C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Puferska raztopina pH=7 ($\pm 0,02$; 20°C), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Deionizirana voda

3.1.2 APARATURE

- Analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica
- Digitalna tehtnica Exacta 300EB, Exacta, Železniki, Slovenija
- Naprava za testiranje sproščanja VanKel VK 7000 Series, Vankel Technology, ZDA z avtomatskim vzorčevalnikom
- Uporaba košarice (USP I) z velikostjo por 10 in 40 mesh ter uporaba samo veslastega mešala (USP II) in veslastega mešala skupaj z obteževalci (USP II + sinker)
- Filtri full flow, 10 micron, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA
- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA
- Avtomatske pipete Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Polnilne pipete različnih volumnov, Blaubrand, Nemčija
- Tabletirka na udarec, Kilian SP300, KILLIAN Tableting GmbH, Cologne Nemčija
- Centrifuga Centrifuge 5415R, Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija

- Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Vortex stresalnik Lab Dancer, IKA®-WERKE GmbH & Co., KG, Staufen, Nemčija
- Magnetno mešalo Rotamix 550 mmh, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH-meter, MA 5750, Iskra, Kranj, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- Naprava za določanje trdnosti tablet, Vanderkamp, Vankel Edison NJ, ZDA
- Centrifugirke
- Steklovina, pribor

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

- **0,125 M citronska kislina:** 26,27 g citronske kisline monohidrata smo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko in raztopili v destilirani vodi in z destilirano vodo dopolnili do oznake.
- **0,1 M NaOH:** V 1000 mL merilno bučko z nekaj destilirane vode smo nalili standardno raztopino (Titrisol®) za pripravo 1 M NaOH in dopolnili z destilirano vodo do oznake. V 200 mL merilno bučko, v kateri je bilo že nekaj destilirane vode smo s polnilno pipeto prenesli 20 mL 1 M NaOH in z destilirano vodo dopolnili do oznake.
- **0,25 M Na₂HPO₄:** 35,49 g Na₂HPO₄ smo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko, dodali nekaj prečiščene vode in s pomočjo magnetnega mešala raztopili Na₂HPO₄. Nato smo raztopino do oznake dopolnili z destilirano vodo.
- **0,4 M Na₂HPO₄:** 56,78 g Na₂HPO₄ smo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko, dodali nekaj prečiščene vode in s pomočjo magnetnega mešala raztopili Na₂HPO₄. Nato smo raztopino do oznake dopolnili z destilirano vodo.
- **0,2 M Na₂HPO₄:** v 50 mL merilno bučko smo odmerili 50 mL pripravljene 0,4 M raztopine Na₂HPO₄ nato smo odmerjeno količino kvantitativno prenesli v 100 mL merilno bučko. V 50 mL bučko smo nato nalili nekaj destilirane vode, poplaknili bučko in vsebino zlili v 100 mL merilno bučko ter jo dopolnili do oznake z destilirano vodo.
- **0,05 M fosfatni pufer s pH = 8:** 6,90 g NaH₂PO₄ monohidrata smo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko in raztopili v vodi, nakar smo raztopini dodali približno 45 mL 1M NaOH ter z destilirano vodo dopolnili skoraj do oznake. Pripravljeni

raztopini smo izmerili pH in ga s pomočjo 1M NaOH uravnali na pH=8. pH smo merili s pomočjo predhodno na pH=7 umerjenega pH metra. Ko je bil pH uravnan smo z destilirano vodo dolili do oznake.

3.2.2 PRIPRAVA MEDIJA ZA SPROŠČANJE

V pomoč pri pripravi pufru nam je bila tabela za pripravo koncentriranih McIlvainovih pufov (21). Štirikrat redčen McIlvainov pufer pH=4 (DMB pH=4) smo tako pripravljali iz dveh osnovnih raztopin, in sicer iz 0,125 M citronske kisline in 0,25 M Na₂HPO₄. Za pripravo 5 L DMB pH=4 smo v 5 L bučko nalili 635 mL 0,125 M citronske kisline in 365 mL 0,25 M Na₂HPO₄ ter dopolnili z destilirano vodo malo pod nivojem oznake. Pripravljene raztopine smo s pomočjo predhodno na pH=4 umerjenega pH metra, izmerili pH in ga nato, če je bilo potrebno, z nekaj kapljicami 0,125 M citronske kisline ali 0,25 M Na₂HPO₄ uravnali na pH=4. Raztopino s pravilno uravnanim pH-jem smo nato z destilirano vodo dopolnili do oznake.

3.2.3 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

Koncentracijo natrijevega diklofenakata smo določali z UV-VIS spektroskopijo (v 4 mL kivetu z dolžino stranice 1 cm) na podlagi absorpcijskega maksimuma učinkovine, ki je pri valovni dolžini 276 nm. Kontrolna absorbanca merjena pri 400 nm je morala biti manjša od 0,01. Za brisanje ozadja smo uporabili slepi vzorec (medij brez učinkovine), ki je bil pripravljen v enakem razmerju med medijem za sproščanje in 0,1 M NaOH, kakor kasneje stabiliziran vzorec z učinkovino. Spektre vzorca smo posneli v območju valovne dolžine 200 – 400 nm in nato odčitali absorbanco pri izbrani valovni dolžini (276nm).

3.2.4 DOLOČANJE ENAČB UMERITVENIH PREMICE

Za določanje enačbe umeritvene premice smo uporabili isti medij, kot je bil uporabljen v naših poskusih sproščanja. Tako smo si najprej pripravili osnovno raztopino z volumskim razmerjem 2+1= 0,1 M NaOH + DMB pH=4. V izogib napakam, ki nastanejo med tehtanjem smo si pripravili tri osnovne raztopine natrijevega diklofenakata s približno koncentracijo 100 mg/L. Tako smo na analitski tehtnici natančno natehtali približno 10 mg natrijevega diklofenakata in natehto kvantitativno prenesli v 100 ml bučko, jo z že prej pripravljenim medijem dopolnili nekje do polovice, ter si z ultrazvočno kadičko pomagali pri raztapljanju natrijevega diklofenakata. Ko je bila učinkovina raztopljena, smo jo z medijem dopolnili do oznake. Osnovne raztopine smo ponovno redčili, in sicer tako, da smo iz njih pripravili 8

raztopin s koncentracijami med 1 mg/L in 30 mg/L. Koncentracije učinkovine v tako pripravljenih raztopinah smo določali spektrofotometrično - z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 276 nm - in tako izdelali umeritveno premico. Koncentracije smo nanašali na x-os, na y-os pa smo nanašali izmerjene absorbance. Skozi dobljene točke smo potegnili premico in s pomočjo linearne regresije izračunali enačbo premice ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

3.2.5 PRELIMINARNI POSKUSI – STABILIZACIJA VZORCA

Izraz stabilizacija vzorca se v okviru preliminarnih poskusov nanaša na zagotovitev konstantne koncentracije natrijevega diklofenakata v odvzetem vzorcu, saj smo želeli preprečiti nadaljnje obarjanje prenasičene raztopine. Pod pogoji, ki smo jih uporabili v testih sproščanja, je namreč dosežena koncentracija natrijevega diklofenakata presegala njegovo ravnotežno topnost, zaradi česar je prišlo do obarjanja učinkovine. S stabilizacijo vzorca, pa smo želeli zagotoviti pogoje, v katerih se natrijev diklofenakat ne bi obarjal. Vzorce, odvzete s pomočjo avtomatskega vzorčevalnika, smo poskušali stabilizirati na načine, ki so prikazani v *Tabeli I*. Z merjenjem absorbance istega vzorca v določenih časovnih točkah po stabilizaciji pa smo preverili, ali smo vzorec uspešno stabilizirali ali ne. V primeru, da smo istemu vzorcu izmerili približno enako absorbanco kakor takoj po stabilizaciji, tudi po 30' in 60' od stabilizacije vzorca, smo stabilizacijo ovrednotili za uspešno.

Tabela I: Prikaz načina stabilizacije vzorca in izmerjen pH slepe raztopine, kjer smo namesto vzorca uporabili samo medij za sproščanje

POGOJI STABILIZACIJE	pH slepe raztopine
VZOREC + 0,4M Na ₂ HPO ₄ = 1 + 2	8,0
VZOREC + 0,2M Na ₂ HPO ₄ = 1 + 2	7,74
VZOREC + fosfatni pufer pH = 8 = 1 + 2	6,92
VZOREC + 0,1M NaOH = 2,5 + 1	7,10
VZOREC + 0,1M NaOH + DEST. VODA = 2,5 + 1 + 3,5	6,9
VZOREC + 0,1M NaOH = 2,5 + 4,5	
VZOREC + 0,1M NaOH = 1 + 2	12,49

3.2.6 STISKANJE TABLET

Tablete, ki smo jih uporabljali pri testih sproščanja, smo po sledeči recepturi izdelali sami:

- × 12,5 m/m % Natrijev diklofenakat
- × 77,5 m/m % Avicel PH 200

- × 10 m/m % Kollidon 17PF
- × + 0,5% Mg-stearata na celokupno maso.

Po pravilu rastočih mas smo v pateni homogeno zmešali potrebne substance za izdelavo tablet in nato homogeniziranje prahov nadaljevali s stresanjem zmesi v plastični vrečki. Ročno smo na tehtič zatehtali približno maso ene tablete (400 mg) in jo s tehtičem ročno prenesli v matrico tabletirke. Tabletirali smo z 12 mm pečatom z ravnimi robovi pod sledečimi pogoji:

Odmik pečatov: spodnji pečat = 12,0 mm, zgornji pečat = 9,6 mm, sila stiskanja = 7,0-8,0 kN, trdnost = 80-100 N.

V preliminarnih poskusih smo prav tako uporabili tablete, ki smo jih stisnili sami. Te tablete so bile manjše (masa ene tablete je bila 300 mg), vendar so vsebovale iste snovi in v enakem masnem razmerju, kakor tiste tablete, ki smo jih uporabili v nadaljnjem delu naloge. Tablete, ki so bile uporabljene v okviru preliminarnih poskusov so označene z oznakami **T₁-T₁₀**.

3.2.7 TESTI SPROŠČANJA

Teste sproščanja smo izvajali s pomočjo klasičnih naprav za sproščanje USP I in II, pri čemer smo uporabili košarice z različno velikostjo odprtine por, pri različnih volumnih medija in različnih hitrostih vrtenja veslastega mešala oziroma košarice. Na *Sliki 4* je prikazana naprava s katero smo izvajali teste sproščanja.



Slika 4: Naprava za testiranje sproščanja, s pomočjo katere smo izvajali teste sproščanja

V *Tabeli II* so prikazani izbrani parametri, ki smo jih spreminjali med samimi testi sproščanja.

Tabela II: Izbira parametrov sproščanja, ki smo jih testirali v določenih poskusih

IZBRANA METODA	HITROST MEŠANJA	VOLUMEN MEDIJA	OZNAKA POSKUSA
USP I (10 mesh)	50 rpm	500 mL	<i>POSKUS 1</i>
		750 mL	<i>POSKUS 2</i>
		900 mL	<i>POSKUS 3</i>
	100 rpm	500 mL	<i>POSKUS 4</i>
		750 mL	<i>POSKUS 5</i>
		900 mL	<i>POSKUS 6</i>
USP I (40 mesh)	50 rpm	500 mL	<i>POSKUS 7</i>
		750 mL	<i>POSKUS 8</i>
		900 mL	<i>POSKUS 9</i>
	100 rpm	500 mL	<i>POSKUS 10</i>
		750 mL	<i>POSKUS 11</i>
		900 mL	<i>POSKUS 12</i>
USP II	50 rpm	500 mL	<i>POSKUS 13</i>
		750 mL	<i>POSKUS 14</i>
		900 mL	<i>POSKUS 15</i>
	75 rpm	900 mL	<i>POSKUS 16</i>
	100 rpm	500 mL	<i>POSKUS 17</i>
		750 mL	<i>POSKUS 18</i>
900 mL		<i>POSKUS 19</i>	
USP II + sinker	50 rpm	900 mL	<i>POSKUS 20</i>
	100 rpm	900 mL	<i>POSKUS 21</i>

Na vzorčevalniku naprave za sproščanje smo izbrali program po katerem smo izvajali posamezen poskus. V programu smo navedli časovne točke vzorčenja (po 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 120, 180 in 240 minutah od začetka sproščanja), volumen vzorčenja (4 mL), hitrost vrtenja vesel oz. košarice (50, 75, 100 rpm). Pred prvimi poskusi sproščanja s posamezno metodo pa smo s pomočjo kalibracijskih kroglic preverili nastavitve višine vesla oz. nosilca za košarico.

Pri vseh metodah sproščanja smo najprej v merilni valj odmerili predpisan volumen medija in ga nato prelili v posodo za sproščanje ter počakali, da se je medij segrel na delovno temperaturo – 37 °C. Ko je bil medij ogret na delovno temperaturo, smo v medij za sproščanje dodali še tablete in na podlagi izbranega programa začeli z izvajanjem testov sproščanja.

Takoj po vzorčenju smo v že prej pripravljene centrifugirke z 2 mL 0,1 M NaOH odpipetirali 1 mL vzorca. Tako stabiliziran vzorec smo še stresli s pomočjo Vortex-a in določili koncentracijo učinkovine na podlagi izmerjene absorbance.

3.2.8 IZRAČUN PROFILOV SPROŠČANJA

S pomočjo enačbe umeritvene premice in s pomočjo izmerjene absorbance, ki smo jo izmerili stabiliziranemu vzorcu, smo po spodaj napisanih enačbah (*enačba 2 – enačba 7*) izračunali koncentracijo učinkovine v raztopljenem stanju v določeni časovni točki. Pri računanju koncentracij smo upoštevali redčenje vzorcev in v enačbo dodali korekturo, ki upošteva zmanjševanje volumna v posodi za sproščanje zaradi odvzetega medija in odvzete učinkovine.

Splošna enačba umeritvene premice:

$$A = k * c + b \quad (\text{enačba 2})$$

A – izmerjena absorbanca merjenega vzorca

b – presečišče umeritvene premice z ordinatno osjo

k – naklon umeritvene premice

c (mg/L) – koncentracija učinkovine v raztopljenem stanju v n-tem vzorcu v določeni časovni točki odvzema vzorca

Iz zgornje enačbe izrazimo koncentracijo učinkovine v določeni časovni točki:

$$c = \frac{A-b}{k} \quad (\text{enačba 3})$$

Ob upoštevanju korekture zaradi redčenja vzorca, *enačbo 3* pomnožimo s 3

$$c = 3 * \frac{A-b}{k} \quad (\text{enačba 4})$$

Ker po odvzemu vzorca med samim sproščanjem odvzetega volumna nismo nadomeščali s svežim medijem dodamo k enačbi še korekturo, s katero upoštevamo nenadomeščanje medija.

$$V_n = V_m - V_{vz}(n - 1) \quad (\text{enačba 5})$$

V_m – začetni volumen medija

V_{vz} – volumen odvzetega vzorca (4 mL)

V_n – volumen medija po (n – 1)-tem odvzemu vzorca

n – zaporedni odvzem vzorca

Maso raztopljenih učinkovine v določeni časovni točki sproščanja izračunamo po spodnji enačbi:

$$mn = cn * V_n + V_{vz}(c_1 + c_2 + c_3 + \dots + c_{(n-1)}) \quad (\text{enačba 6})$$

mn – masa raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca
cn – koncentracija raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca
c1, c2, c3 ..., – izračunane koncentracije učinkovine v posodi za sproščanje v določenih časovnih točkah

Na koncu sledi še izračun deleža učinkovine (%), ki se v času odvzema vzorca nahaja v raztopljenem staju.

$$\% = \frac{mn}{D} * 100 \quad (\text{enačba 7})$$

D – odmerek natrijevega diklofenakata v tableti

mn – masa raztopljene učinkovine v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca

3.2.9 PRIPRAVA MEDIJEV ZA DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI UČINKOVINE

Pripravili smo si po 50 mL osnovnih raztopin PVP-ja v DMB pH=4. Ker smo teste topnosti izvajali v 1,5 mL raztopine različnih razmerij med PVP-jem in učinkovino, smo v 50 mL merilne bučke najprej kvantitativno prenesli zatehte Kollidona 17PF in jih nato do oznake dopolnili z DMB pH=4. Za predpisana razmerja med učinkovino in PVP-jem smo zatehtali količine PVP-ja, kot so prikazane v *Tabeli III*.

Tabela III: Zatehte in koncentracije PVP-ja za pripravo 50 mL osnovne raztopine PVP-ja

Razmerje DIC:PVP	Zatehta PVP-ja v 50 mL bučki	Koncentracija PVP-ja v 50 mL bučki
1:0	0 mg	0 mg/mL
1:4	133,33 mg	2,67 mg/mL
1:16	533,33 mg	10,67 mg/mL

3.2.10 PRIPRAVA VZORCEV ZA DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI

V centrifugirke smo natančno zatehtali prebitne količine natrijevega diklofenakata (približno 0,8 – 1,0 mg) in jih dopolnili z 1,5 mL ustrezne osnovne raztopine PVP-ja, s čimer smo približno dosegli željena izhodiščna masna razmerja med učinkovino in polimerom.

3.2.11 TESTI DOLOČANJA RAVNOTEŽNE TOPNOSTI

Teste določanja topnosti smo izvajali s prebitno količino natrijevega diklofenakata v raztopni z različnim razmerjem PVP : Na-DIC. Glede na to, da je bil ustvarjen velik presežek, prav tako so nas zanimale predvsem končne vrednosti teh testov, smo zatehtali okrog 1 mg

natrijevega diklofenakata (0,8 – 1,0 mg). K vsaki zatehti učinkovine smo nato dodali še 1,5 mL tiste osnovne raztopine PVP-ja, s katero smo dobili željeno razmerje DIC : PVP. Nato smo centrifugirke z disperzijo učinkovine in polimera dali stresati na stresalnik. Stresali smo pod sledečimi pogoji: 37 °C, 30 rpm in amplitudi stresa = 2. V času po 30', 60', 90', 120', 6h in 24h od začetka stresa, smo stresalnik ustavili, ven pobrali centrifugirke z željeni paralelami in dali aparat naprej stresat. Centrifugirke smo centrifugirali 10 min pri 10000 x g in 37 °C. Nato smo odpipetirali supernatant in ga redčili v takem razmerju z DMB pH=4 in 0,1 M NaOH da smo ohranili enako razmerje med pufrom in 0,1 M NaOH, kot smo ga imeli pri stabilizaciji odvzetega vzorca v testih sproščanja. S pomočjo spektrofotometra smo preko merjenja absorbance določali topnost učinkovine po določenem času stresa.

4. REZULTATI

4.1 ENAČBA UMERITVENE PREMICE

Enačbo umeritvene premice v raztopini z volumskim razmerje DMB pH = 4 + 0,1 M NaOH = 1 + 2 in kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije smo izračunali z uporabo linearne regresije.

V *Tabeli IV* so podane izmerjene absorbance za standardne raztopine vzorca, glede na katere smo nato določili umeritveno premico (*enačba 8*), kjer **A** predstavlja izmerjeno absorbanco za posamezen vzorec pri valovni dolžini 276 nm, **c** (mg/L) koncentracijo Na-DIC v raztopljenem stanju v n-tem vzorcu v določeni časovni točki odvzema vzorca.

Tabela IV: Določanje umeritvene premice za natrijev diklofenakat. Podane so izmerjenene absorbance (A) pri valovni dolžini 276 nm v standardnih raztopinah znane koncentracije (c) natrijevega diklofenakata z volumskim razmerjem DMB pH = 4 + 0,1M NaOH = 1 + 2.

c (mg/L)	A
1,15	0,036
2,86	0,089
4,82	0,155
11,48	0,369
14,30	0,456
19,28	0,613
28,69	0,919
28,59	0,916

Enačba umeritvene premice: $A = 0,0321 * c - 0,0012$ (*enačba 8*)

Kvadrat koeficienta korelacije: $R^2 = 1$

4.2 PRELIMINARNI POSKUSI

V *Tabelah V – XII* je predstavljena ponovljivost izmerjene absorbance stabiliziranega vzorca.

Tabela V: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_1 po principu: $1 + 2 = \text{vzorec} + 0,4M \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 8,00. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet v različnih časovnih točkah sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A						
	Takoj	30'	60'	90'	120'	150'	180'
5	0,048	0,046	0,037	0,048	0,051	0,048	0,059
10	0,095	0,096	0,074		0,09	0,095	0,084
15	0,205	0,206		0,203	0,201	0,202	0,197
20	0,323	0,326	0,3	0,305	0,303	0,304	0,295
30	0,307	0,309	0,3	0,303	0,303	0,308	0,3
40	0,268	0,256	0,267	0,266	0,26	0,265	0,257
60	0,192	0,186	0,189	0,188	0,191	0,182	0,186
120	0,125	0,11	0,113	0,11	0,111	0,112	
180	0,102	0,094	0,087	0,085			
240	0,076	0,086					

Tabela VI: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_2 po principu: $1 + 2 = \text{vzorec} + 0,4M \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 8,00. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet v različnih časovnih točkah sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A						
	Takoj	30'	60'	90'	120'	150'	180'
5	0,044	0,046	0,03	0,042	0,05	0,044	0,043
10	0,076	0,075	0,06	0,088	0,0787	0,081	0,079
15	0,106	0,107		0,119	0,119	0,122	0,122
20	0,214	0,219	0,216	0,225	0,223	0,227	0,224
30	0,32	0,326	0,32	0,327	0,328	0,339	0,333
40	0,296	0,278	0,292	0,295	0,291	0,304	0,301
60	0,211	0,205	0,250	0,213	0,218	0,214	0,213
180	0,107	0,093	0,095	0,1			
240	0,083	0,084					

Tabela VII: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_3 in T_4 po principu: $1 + 2 = \text{vzorec} + 0,2M \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 7,74. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet v različnih časovnih točkah sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A									
	T_3					T_4				
	Takoj	30'	60'	120'	180'	Takoj	30'	60'	120'	180'
5	0,032	0,034	0,033		0,031	0,029	0,033	0,035		0,035
10	0,074	0,076	0,076		0,073	0,072	0,066	0,065		0,074
15	0,127	0,131	0,13	0,126	0,123	0,091	0,096	0,097	0,094	0,098
20	0,31	0,311	0,305	0,303	0,302	0,162	0,163	0,16	0,166	0,174
30	0,316	0,3	0,298	0,298	0,312	0,312	0,31	0,308	0,31	0,327
40	0,266	0,26	0,257	0,255	0,266	0,294	0,294	0,29	0,291	0,306
60	0,178	0,173	0,175	0,172	0,164	0,209	0,213	0,212	0,211	0,206
120	0,093	0,107	0,091	0,083	0,086	0,113		0,116	0,107	0,113
180	0,07	0,078	0,063	0,072		0,071	0,085	0,065	0,079	
240	0,067	0,058	0,06			0,073	0,074	0,076		

Tabela VIII: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_5 po principu: $1 + 2 = \text{vzorec} + 0,05M \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 6,9. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet po 30' in 60' od začetka sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A						
	Takoj	5'	10'	15'	20'	30'	60'
30'	0,286	0,284	0,287	0,271	0,278	0,292	0,292
60'	0,184	0,179	0,195	0,192	0,194	0,193	0,206

Tabela IX: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_6 po principu: $2,5 + 1 = \text{vzorec} + 0,1M \text{ NaOH}$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 7,10. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet po 30' in 60' od začetka sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A						
	Takoj	5'	10'	15'	20'	30'	60'
30'	0,286	0,284	0,287	0,271	0,278	0,292	0,292
60'	0,184	0,179	0,195	0,192	0,194	0,193	0,206

Tabela X: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_7 in T_8 po principu: $2,5 + 4,5 = \text{vzorec} + 0,1M \text{ NaOH}$. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet v različnih časovnih točkah sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A					
	T_7			T_8		
	Takoj	30'	60'	Takoj	30'	60'
5	0,035	0,029	0,035	0,041	0,031	0,037
10	0,072	0,063	0,068	0,087	0,084	0,086
15	0,1	0,094	0,098	0,13	0,127	0,131
20	0,251	0,256	0,261	0,331	0,334	0,338
30	0,324	0,329	0,332	0,307	0,31	0,315
40	0,286	0,289	0,292	0,257	0,262	0,264
60	0,192	0,197	0,207	0,177	0,178	0,185
120	0,112	0,118	0,117	0,112	0,118	0,117
180	0,095	0,098	0,095	0,092	0,094	0,093
240	0,084	0,083		0,083	0,08	

Tabela XI: Stabilizacija odvzetega vzorca pri testu sproščanja za T_9 in T_{10} po principu: $1 + 2 = \text{vzorec} + 0,1M \text{ NaOH}$, pri čemer je bil pH slepe raztopine 12,49. Podane so absorbance, izmerjene po določenem času od stabilizacije vzorca, ki je bil odvzet v različnih časovnih točkah sproščanja.

Čas sproščanja (min)	Izmerjena A					
	T_9			T_{10}		
	Takoj	30'	60'	Takoj	30'	60'
5	0,16	0,165	0,168	0,157	0,162	0,159
10	0,376	0,377	0,378	0,335	0,334	0,335
15	0,445	0,446	0,446	0,445	0,446	0,446
20	0,46	0,464	0,462	0,471	0,469	0,467
30	0,47	0,479	0,48	0,479	0,474	0,471
40	0,422	0,42	0,428	0,429	0,425	0,428
60	0,236	0,234	0,238	0,25	0,247	0,248
120	0,071	0,072	0,076	0,072	0,073	0,079
180	0,059	0,064	0,069	0,054	0,061	0,055
240	0,058	0,053	0,053	0,059	0,047	0,052

4.3 TESTI SPROŠČANJA

Profili sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet so predstavljeni v *Tabelah XI – XXXI*. Pod posameznimi pogoji smo naredili 3-5 paralel, v primeru slabe ponovljivosti med paralelami pa še kakšno več. Na podlagi rezultatov za posamezne časovne točke smo določili povprečje, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV).

Tabela XII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 50 rpm v 500 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P1 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 1						
Čas (min)	Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)					
	P1 – 1	P1 – 2	P1 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	18,63	20,07	21,32	20,01	1,35	6,73
10	56,08	55,30	64,20	58,53	4,93	8,42
15	67,85	66,16	69,22	67,74	1,53	2,26
20	53,46	53,75	56,45	54,55	1,65	3,03
30	22,30	23,08	23,86	23,08	0,78	3,37
40	11,08	11,06	11,39	11,18	0,19	1,66
60	8,17	8,84	8,83	8,61	0,39	4,48
120	7,20	7,25	8,04	7,50	0,47	6,29
180	7,98	7,60	7,52	7,70	0,25	3,22
240	7,64	6,99	7,52	7,38	0,35	4,68

Tabela XIII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 50 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P2 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 2						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P2 – 1	P2 – 2	P2 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	23,94	30,88	36,61	30,48	6,34	20,81
10	66,19	73,16	75,42	71,59	4,81	6,71
15	64,95	71,91	76,66	71,17	5,89	8,28
20	54,32	64,21	71,43	63,32	8,59	13,56
30	37,17	46,01	53,23	45,47	8,04	17,68
40	23,67	30,90	34,31	29,63	5,44	18,35
60	14,17	18,31	18,88	17,12	2,57	15,03
120	11,20	13,87	14,30	13,12	1,68	12,81
180	9,72	11,73	12,30	11,25	1,35	12,02
240	9,32	11,33	12,30	10,98	1,52	13,81

Tabela XIV: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 50 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P3 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 3							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P3 – 1	P3 – 2	P3 – 3	P3 – 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	12,98	18,83	15,94	22,34	17,52	4,00	22,83
10	48,50	50,46	52,65	57,44	52,26	3,84	7,36
15	77,32	82,46	81,11	82,64	80,88	2,47	3,05
20	79,32	81,45	81,78	83,31	81,47	1,64	2,01
30	73,84	73,11	77,27	76,81	75,26	2,09	2,78
40	60,62	60,15	67,64	72,83	65,31	6,07	9,30
60	39,39	39,15	44,48	55,18	44,55	7,50	16,84
120	19,57	19,72	20,94	21,85	20,52	1,08	5,25
180	18,26	16,77	19,30	16,61	17,74	1,28	7,22
240	16,97	14,97	18,00	14,82	16,19	1,55	9,57

Tabela XV: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 100 rpm v 500 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P4 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 4						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P4 – 1	P4 – 2	P4 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	41,37	40,76	41,29	41,14	0,33	0,80
10	78,64	76,82	68,64	74,70	5,33	7,13
15	72,22	68,74	56,87	65,94	8,05	12,21
20	58,85	53,62	39,81	50,76	9,84	19,38
30	18,78	19,08	18,64	18,83	0,23	1,20
40	9,92	10,84	11,82	10,86	0,95	8,77
60	8,50	8,59	9,42	8,84	0,51	5,75
120	7,62	7,88	8,19	7,89	0,28	3,60
180	6,31	6,55	6,79	6,55	0,24	3,64
240	6,40	6,55	6,53	6,49	0,08	1,28

Tabela XVI: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 100 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P5 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 5							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P5 – 1	P5 – 2	P5 – 3	P5 – 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	36,24	47,78	38,65	38,80	40,37	5,08	12,57
10	79,39	82,22	75,88	77,71	78,80	2,69	3,41
15	78,98	78,89	73,13	73,41	76,10	3,27	4,30
20	70,60	70,75	63,68	61,96	66,75	4,59	6,88
30	47,26	47,70	44,89	41,65	45,38	2,77	6,11
40	27,16	29,69	31,35	27,46	28,92	1,97	6,83
60	15,82	17,48	19,23	17,01	17,38	1,41	8,12
120	10,99	12,35	12,13	11,48	11,74	0,62	5,28
180	9,92	11,01	10,93	10,27	10,53	0,52	4,97
240	9,52	10,21	10,00	9,61	9,83	0,32	3,30

Tabela XVII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 10 mesh pri 100 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P6 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 6							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P6 – 1	P6 – 2	P6 – 3	P6 – 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	21,67	25,22	23,75	28,17	24,70	2,74	11,07
10	55,83	80,23	62,70	74,86	68,41	11,14	16,28
15	79,51	88,29	82,09	84,80	83,67	3,76	4,50
20	79,51	87,63	82,09	83,96	83,30	3,42	4,10
30	70,42	78,64	74,96	78,29	75,58	3,82	5,05
40	57,59	66,54	63,09	66,16	63,34	4,13	6,53
60	34,18	38,66	39,62	43,00	38,86	3,64	9,36
120	16,57	18,62	19,19	19,30	18,42	1,27	6,88
180	13,81	16,01	16,26	16,35	15,61	1,20	7,72
240	13,33	14,05	13,67	13,25	13,58	0,37	2,71

Tabela XVIII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 50 rpm v 500 ml medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P7 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 7							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P7 – 1	P7 – 2	P7 – 3	Povprečje	SD	KV (%)	
0	0	0	0	0,00	0,00		
5	16,38	28,76	24,84	23,33	6,33	27,12	
10	40,74	60,98	65,79	55,84	13,29	23,81	
15	53,81	59,52	62,60	58,64	4,46	7,60	
20	45,86	46,25	51,01	47,70	2,87	6,01	
30	24,39	21,17	23,53	23,03	1,67	7,25	
40	13,92	13,26	13,38	13,52	0,35	2,62	
60	10,70	10,44	10,11	10,42	0,29	2,82	
120	8,79	9,65	9,76	9,40	0,53	5,63	
180	8,97	9,57	10,02	9,52	0,53	5,56	
240	8,80	9,65	9,94	9,46	0,59	6,27	

Tabela XIX: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 50 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P8 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 8						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P8 – 1	P8 – 2	P8 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	35,25	32,34	29,97	32,52	2,64	8,12
10	72,57	75,83	76,96	75,12	2,28	3,04
15	72,71	75,69	77,24	75,21	2,30	3,06
20	67,04	69,68	69,24	68,65	1,42	2,06
30	48,61	50,09	51,40	50,04	1,40	2,79
40	33,02	34,20	33,53	33,58	0,60	1,77
60	18,19	18,40	19,28	18,62	0,58	3,11
120	13,99	12,93	13,61	13,51	0,54	3,97
180	15,20	13,61	14,42	14,41	0,80	5,52
240	17,61	14,15	15,22	15,66	1,77	11,31

Tabela XX: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 50 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P9 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 9						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P9 – 1	P9 – 2	P9 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	16,08	12,34	16,83	15,08	2,41	15,95
10	40,30	42,71	45,32	42,78	2,51	5,87
15	73,89	77,65	73,86	75,14	2,18	2,90
20	84,33	83,34	81,25	82,97	1,57	1,89
30	76,25	73,85	77,57	75,89	1,89	2,49
40	60,99	63,74	58,58	61,10	2,58	4,22
60	40,74	40,65	37,86	39,75	1,64	4,12
120	18,79	17,82	20,03	18,88	1,11	5,87
180	17,33	15,86	18,06	17,08	1,12	6,57
240	16,53	14,07	15,93	15,51	1,28	8,28

Tabela XXI: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 100 rpm v 500 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P10 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 10						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P10 – 1	P10 – 2	P10 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	50,50	66,51	38,10	51,70	14,25	27,55
10	77,49	73,03	71,28	73,93	3,20	4,33
15	69,02	69,39	59,86	66,09	5,40	8,17
20	51,05	50,96	42,20	48,07	5,09	10,58
30	17,64	18,45	19,81	18,63	1,10	5,89
40	10,71	11,79	12,70	11,73	1,00	8,50
60	8,95	9,41	10,53	9,63	0,81	8,43
120	8,60	9,32	9,75	9,22	0,58	6,30
180	8,25	9,58	9,84	9,22	0,85	9,21
240	8,25	9,58	9,84	9,22	0,85	9,21

Tabela XXII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 100 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P11 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 11						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P11 – 1	P11 – 2	P11 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	40,55	44,24	37,36	40,72	3,45	8,46
10	78,81	83,24	79,67	80,57	2,35	2,92
15	75,60	77,96	75,53	76,36	1,38	1,81
20	65,90	67,03	61,81	64,91	2,75	4,23
30	45,63	44,06	39,69	43,13	3,08	7,13
40	30,41	28,33	26,66	28,47	1,88	6,59
60	18,13	16,91	16,80	17,28	0,74	4,28
120	12,71	12,04	11,70	12,15	0,51	4,22
180	13,78	12,31	11,83	12,64	1,02	8,06
240	12,58	11,90	11,70	12,06	0,46	3,81

Tabela XXIII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP I z velikostjo por košarice 40 mesh pri 100 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P12 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 12								
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)								
Čas (min)	P12 – 1	P12 – 2	P12 – 3	P12 – 4	P12 – 5	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	21,89	19,70	18,01	32,09	29,00	24,14	6,11	25,30
10	63,02	53,78	46,55	74,51	76,95	62,96	13,06	20,74
15	84,59	79,52	79,48	82,88	79,66	81,23	2,37	2,92
20	84,59	79,36	78,98	77,71	73,76	78,88	3,89	4,93
30	76,80	71,74	66,39	62,60	58,32	67,17	7,30	10,87
40	62,46	59,20	54,19	45,90	43,13	52,98	8,32	15,71
60	36,52	40,65	33,51	27,64	26,17	32,90	6,05	18,40
120	17,73	23,99	16,84	16,01	16,08	18,13	3,35	18,47
180	14,64	21,22	14,40	13,56	13,61	15,49	3,24	20,93
240	12,70	19,60	12,78	12,59	12,30	13,99	3,14	22,45

Tabela XXIV: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 50 rpm v 500 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P13 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 13								
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)								
Čas (min)	P13 – 1	P13 – 2	P13 – 3	P13 – 4	P13 – 5	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	15,99	18,63	21,60	16,31	11,88	16,88	3,59	21,25
10	30,09	44,00	45,29	39,35	27,80	37,31	7,99	21,41
15	36,58	56,35	52,44	51,15	32,53	45,81	10,55	23,03
20	37,41	52,06	48,67	48,01	32,26	43,68	8,42	19,28
30	36,31	35,55	36,24	35,31	28,51	34,38	3,31	9,63
40	32,06	21,25	21,20	21,27	23,62	23,88	4,69	19,65
60	20,50	11,79	12,93	12,91	15,98	14,82	3,54	23,86
120	9,39	8,34	8,83	8,90	9,83	9,06	0,57	6,28
180	7,98	7,99	8,12	8,72	8,68	8,30	0,37	4,47
240	7,02	7,30	7,33	7,14	6,84	7,13	0,20	2,86

Tabela XXV: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 50 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P14 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 14						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P14 – 1	P14 – 2	P14 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	21,09	17,20	22,51	20,27	2,75	13,56
10	56,14	45,02	51,80	50,99	5,60	10,99
15	63,75	66,40	62,82	64,32	1,86	2,89
20	59,76	64,59	54,64	59,66	4,98	8,35
30	47,71	54,50	43,19	48,47	5,69	11,75
40	36,42	42,82	31,95	37,06	5,46	14,74
60	20,71	24,63	18,44	21,26	3,13	14,72
120	11,29	12,26	10,58	11,38	0,84	7,42
180	10,09	10,23	10,71	10,34	0,33	3,17
240	9,29	9,69	9,64	9,54	0,22	2,31

Tabela XXVI: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 50 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P15 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 15										
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)										
Čas (min)	P15 – 1	P15 – 2	P15 – 3	P15 – 4	P15 – 5	P15 – 6	P15 – 7	POVPR.	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	13,46	13,42	15,77	17,67	16,54	18,81	18,35	16,29	2,20	13,51
10	31,42	36,20	34,21	42,86	37,41	43,43	41,85	38,20	4,63	12,13
15	46,13	58,21	50,54	58,07	64,72	62,77	55,56	56,57	6,53	11,55
20	51,12	70,49	54,23	67,05	69,56	68,91	57,89	62,75	8,10	12,91
30	53,77	72,31	56,57	69,54	70,89	71,72	58,72	64,79	8,06	12,44
40	55,26	72,64	61,89	69,21	70,06	71,88	57,40	65,48	7,19	10,97
60	56,90	63,80	58,91	59,36	59,53	63,04	43,94	57,92	6,62	11,43
120	33,86	25,66	30,26	24,39	24,47	25,06	22,37	26,58	4,01	15,10
180	18,41	17,22	18,63	14,96	15,67	16,63	16,03	16,79	1,38	8,21
240	15,33	15,44	20,09	13,02	15,18	12,10	11,98	14,74	2,81	19,04

Tabela XXVII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 75 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P16 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 16							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P16 – 1	P16 – 2	P16 – 3	P16 – 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	14,77	13,36	16,58	20,99	16,42	3,32	20,21
10	40,39	30,52	45,77	49,63	41,58	8,29	19,93
15	71,91	55,90	72,82	76,14	69,19	9,04	13,07
20	77,22	74,57	75,83	80,96	77,14	2,76	3,58
30	72,09	71,44	73,16	77,65	73,59	2,80	3,81
40	60,25	61,62	63,88	66,14	62,97	2,59	4,11
60	32,74	36,37	39,30	39,45	36,97	3,15	8,52
120	16,61	17,56	19,59	17,93	17,92	1,25	6,95
180	12,23	13,36	13,05	13,39	13,01	0,54	4,17
240	11,26	11,75	11,26	11,45	11,43	0,23	2,03

Tabela XXVIII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 100 rpm v 500 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P17 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 17							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P17 - 1	P17 - 2	P17 - 3	P17 - 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	23,30	28,37	25,25	23,07	25,00	2,45	9,81
10	61,51	65,08	60,93	53,59	60,28	4,82	8,00
15	66,89	78,40	77,29	70,63	73,30	5,48	7,48
20	56,67	67,68	67,48	60,47	63,08	5,43	8,61
30	30,62	41,57	38,21	32,89	35,82	4,98	13,90
40	17,21	22,59	19,63	17,72	19,29	2,43	12,62
60	12,09	14,39	12,39	11,23	12,52	1,34	10,66
120	9,77	11,08	10,26	9,27	10,10	0,77	7,66
180	9,77	10,11	9,47	8,56	9,48	0,67	7,02
240	8,46	9,23	8,86	8,21	8,69	0,45	5,18

Tabela XXIX: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 100 rpm v 750 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P18 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 18							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P18 - 1	P18 - 2	P18 - 3	Povprečje	SD	KV (%)	
0	0	0	0	0,00	0,00		
5	31,02	23,66	25,97	26,88	3,76	13,99	
10	69,27	65,22	66,79	67,09	2,04	3,04	
15	78,12	68,41	63,59	70,04	7,40	10,57	
20	71,38	56,41	50,04	59,27	10,95	18,48	
30	51,53	35,14	31,06	39,24	10,84	27,61	
40	31,80	21,90	20,25	24,65	6,24	25,33	
60	17,31	13,22	12,50	14,34	2,60	18,11	
120	11,26	9,58	8,30	9,71	1,48	15,25	
180	9,65	7,56	7,63	8,28	1,19	14,32	
240	9,52	7,43	8,03	8,33	1,07	12,90	

Tabela XXX: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II pri 100 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P19 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 19							
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)							
Čas (min)	P19 - 1	P19 - 2	P19 - 3	P19 - 4	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00	
5	23,19	18,38	21,43	23,24	21,56	2,28	10,58
10	61,49	45,88	51,62	55,81	53,70	6,60	12,29
15	79,97	81,71	78,46	84,89	81,26	2,76	3,40
20	81,14	84,19	79,98	86,39	82,92	2,91	3,52
30	77,98	80,08	74,96	83,25	79,06	3,49	4,41
40	69,03	66,66	62,96	73,35	68,00	4,35	6,40
60	40,32	38,80	37,26	41,51	39,47	1,84	4,67
120	18,15	16,90	15,31	15,69	16,51	1,29	7,79
180	16,19	15,29	13,50	13,74	14,68	1,28	8,73
240	15,87	14,32	13,18	13,09	14,11	1,30	9,18

Tabela XXXI: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II in uporabo sinkerjev pri 50 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P20 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 20						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P20 – 1	P20 – 2	P20 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	17,93	21,89	15,44	18,42	3,25	17,64
10	54,38	64,18	42,41	53,66	10,90	20,32
15	75,38	79,50	71,92	75,60	3,80	5,02
20	76,88	75,65	74,08	75,54	1,41	1,86
30	68,06	61,96	65,65	65,22	3,07	4,71
40	54,64	46,51	53,15	51,43	4,33	8,41
60	33,85	27,82	32,35	31,34	3,14	10,02
120	16,61	14,65	16,38	15,88	1,07	6,74
180	14,15	12,36	12,97	13,16	0,91	6,95
240	12,36	11,21	12,17	11,91	0,62	5,16

Tabela XXXII: Delež sproščene učinkovine pri metodi sproščanja z USP II in uporabo sinkerjev pri 100 rpm v 900 mL medija za sproščanje. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) za posamezne časovne točke. Oznaka P21 pomeni oznako poskusa, druga številka pa predstavlja paralelo.

POSKUS 21						
Delež učinkovine v raztopljenem stanju (%)						
Čas (min)	P21 – 1	P21 – 2	P21 – 3	Povprečje	SD	KV (%)
0	0	0	0	0,00	0,00	
5	21,55	34,03	29,55	28,38	6,32	22,29
10	66,38	80,64	71,63	72,88	7,21	9,90
15	82,88	82,80	78,34	81,34	2,60	3,20
20	78,52	82,14	78,34	79,67	2,14	2,69
30	69,34	66,81	70,20	68,78	1,76	2,56
40	50,57	50,57	54,49	51,88	2,27	4,37
60	28,90	29,01	32,77	30,23	2,20	7,29
120	16,06	17,63	17,70	17,13	0,93	5,42
180	13,27	14,88	14,44	14,20	0,83	5,84
240	12,95	14,23	14,60	13,93	0,87	6,24

4.4 DOLOČANJE RAVNOTEŽNE TOPNOSTI NATRIJEVEGA DIKLOFENAKATA

Za natrijev diklofenakat smo želeli določiti ravnotežno topnost v vzorcu, ki je vseboval samo natrijev diklofenakat raztopljen v DMB pH=4 in v vzorcih z različnimi izhodiščnimi masnimi razmerji med natrijevim diklofenakatom in polimerom. Na podlagi izmerjenih koncentracij natrijevega diklofenakata v posameznih časovnih točkah smo določili povprečje, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV), ki so prikazani *Tabelah XXXII – XXXIV*.

Tabela XXXIII: Koncentracija natrijevega diklofenakata (mg/L) po določenih časih stresanja prebitne količine natrijevega diklofenakata v DMB pH=4 pri 37°C, 30 rpm in amplitudi stresanja = 2. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) paralel za posamezne časovne točke.

Na-DIC:PVP 1:0	Koncentracija Na-diklofenakata (mg/L) po določenem času stresanja				
	30'	60'	90'	360'	24h
	3,57	3,1	2,45	5,63	3,94
	3,38	3,38	4,5	5,53	4,22
	3,57	2,73	3,01	5,63	4,41
	6,47	5,91	5,25		
	6,56	6,28	6,75	4,91	
	6,65	6	6,47	6,28	
POVPR.	5,03	4,57	4,74	5,60	4,19
SD	1,67	1,66	1,77	0,49	0,24
KV (%)	33,27	36,28	37,26	8,69	5,64

Tabela XXXIV: Koncentracija natrijevega diklofenakata (mg/L) po določenih časih stresanja vzorca z željenim izhodišnim masnim razmerjem natrijevega diklofenakata in polimera Na-DIC:PVP=1:4 v DMB pH=4 pri 37°C, 30 rpm in amplitudi stresanja = 2. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) paralel za posamezne časovne točke.

Na-DIC:PVP 1:4	Koncentracija Na-diklofenakata (mg/L) po določenem času stresanja				
	30'	60'	90'	360'	24h
	98,94	78,52	75,91	21,98	22,64
	56,88	37,59	26	27,87	27,68
	74,17	36,09	29,55	25,25	27,96
	111,87	87,96	27,59		
	112,8	87,96	32,54		
POVPR.	90,93	65,62	38,32	25,03	26,09
SD	22,01	23,76	18,92	2,41	2,44
KV (%)	24,20	36,20	49,38	9,62	9,37

Tabela XXXV: Koncentracija natrijevega diklofenakata (mg/L) po določenih časih stresanja vzorca z željenim izhodišnim masnim razmerjem natrijevega diklofenakata in polimera Na-DIC:PVP=1:16 v DMB pH=4 pri 37°C, 30 rpm in amplitudi stresanja = 2. Prikazani so še povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) paralel za posamezne časovne točke.

Na-DIC:PVP 1:16	Koncentracija Na-diklofenakata (mg/L) po določenem času stresanja				
	30'	60'	90'	360'	24h
	124,95	126,98	115,45	21,06	21,98
	121,99	136,79	127,6	26,67	24,69
	125,11	126,51	112,49	27,13	24,79
	147,38	142,55	118,26		
POVPR.	129,86	133,21	118,45	24,95	23,82
SD	11,77	7,83	6,54	3,38	1,59
KV (%)	9,06	5,88	5,52	13,54	6,69

5. RAZPRAVA

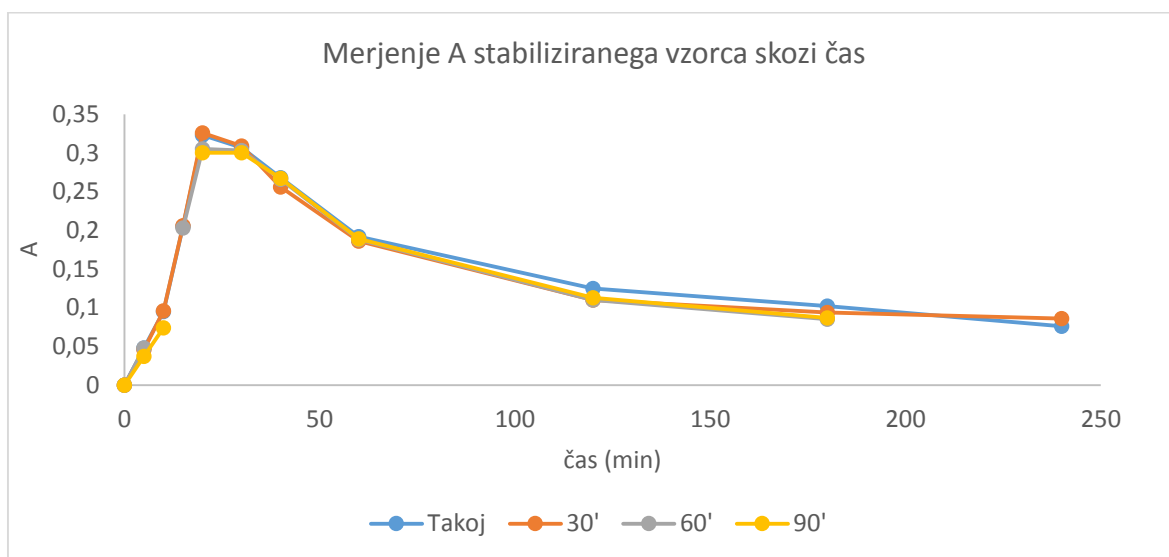
5.1 PRELIMINARNI POSKUSI

Natrijev diklofenakat (Na-DIC), katerega koncentracijo smo merili med poskusom sproščanja, je vgrajen v tablete, ki takoj po začetku sproščanja razpadejo, s čimer učinkovini omogočijo hitro sprostitvev v okoliški medij in hitro raztapljanje. Dodatek polimera (PVP), kot pomožne snovi, pa nam je omogočil doseg koncentracije Na-DIC nad mejo njegove topnosti. Ker natrijev diklofenakat že vse od začetka sproščanja v mediju za sproščanje tvori stanje prenasičenosti, skozi celoten čas testiranja sproščanja teži k obarjanju. Zaradi koncentracij Na-DIC nad mejo njegove ravnotežne topnosti v mediju za sproščanje je njegovo obarjanje zelo intenzivno in poteka že med testom sproščanja v posodi za sproščanje ter se nadaljuje tudi v epruveti, v katero odvezamemo vzorec. Preko določanja koncentracije Na-DIC v odvzetem vzorcu želimo določiti koncentracijo Na-DIC v posodi za sproščanje ob odvzemu vzorca, a se zavedamo, da je izračunana koncentracija v odvzetem vzorcu kljub upoštevanju korekcije zaradi redčenja vzorca nižja od tiste v posodi za sproščanje. Ker se Na-DIC nahaja v prenasičeni raztopini, prihaja do njegovega obarjanja tako v posodi za sproščanje, kakor tudi kasneje v cevkah avtomatskega vzorčevalnika in tudi v epruveti v katero odvezamemo vzorec. Med vzorčenjem tako pride do krajše časovne razlike med časom vzorčenja in merjenjem koncentracije učinkovine, kar vpliva na, zaradi izobarjanja učinkovine, določeno manjšo koncentracijo Na-DIC.

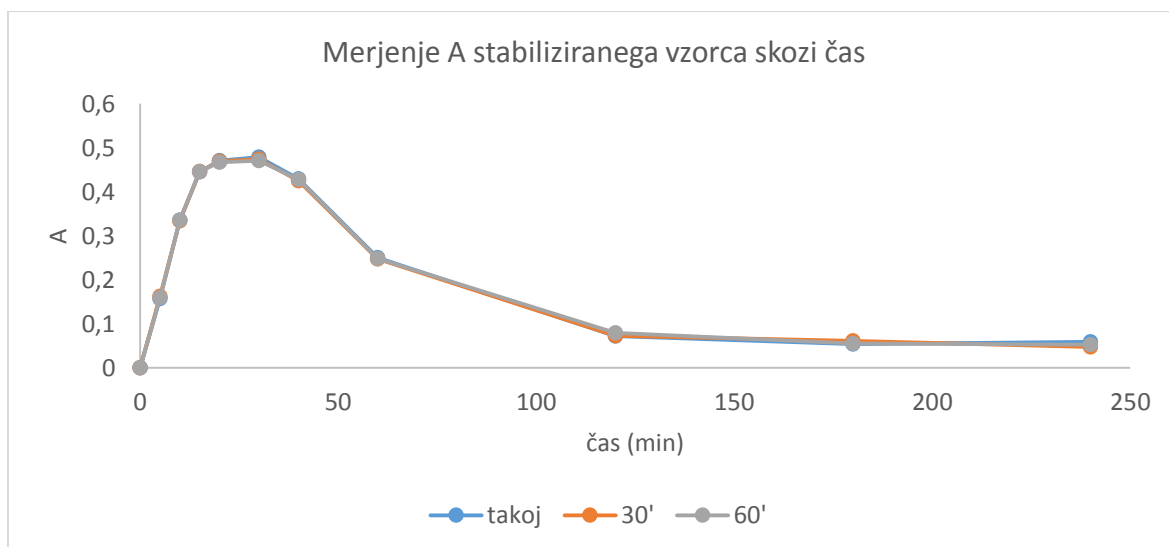
Takoj po avtomatskem vzorčenju v določenih časovnih točkah testov sproščanja smo odvzeti vzorec redčili po vnaprej določenih postopkih, ki so prikazani v *Tabeli I*. Želeli smo doseči ustrezen pH raztopine stabiliziranega vzorca in zmanjšati koncentracijo Na-DIC v stabiliziranem vzorcu. Z dvigom pH-ja v stabilizirani raztopini odvzetega vzorca smo povečali topnost natrijevega diklofenakata, saj je ta bolj topen pri višjem pH-ju. Z redčenjem te raztopine pa smo zmanjšali koncentracijo učinkovine v stabilizirani raztopini odvzetega vzorca. Koncentracija natrijevega diklofenakata v odvzetem vzorcu je namreč presegala njegovo ravnotežno topnost, zato je ta težil k obarjanju. S stabilizacijo smo tako dosegli, da je bila koncentracija Na-DIC v vzorcu, preko katerega smo z merjenjem absorbance določili koncentracijo Na-DIC v posodi za sproščanje, ob upoštevanju korekcije zaradi redčenja odvzetega vzorca nižja, vendar vseeno blizu tisti ob odvzemu vzorca v posodi za sproščanje.

Glede na dobljene rezultate preliminarnih poskusov, smo kot medij za stabilizacijo izbrali 0,1 M NaOH, s katerim smo redčili vzorec v volumskem razmerju 1 + 2 = VZOREC + 0,1M NaOH. Prav tako je bil pH stabilizirane raztopine (12,49) primerljiv s pH-jem (12,00), ki so ga v članku uporabili Garbacz (18) in sodelavci za stabilizacijo vzorca z diklofenakatom.

Na spodnjih slikah (*Slika 5 in Slika 6*) je preko izrisanih profilov sproščanja prikazana ponovljivost izmerjenih absorbanc stabiliziranega vzorca. Iz slike 6, kjer je vzorec stabiliziran na način, ki smo ga izbrali za končno stabilizacijo, je razvidna boljša ponovljivost kot iz *Slike 5*.



Slika 5: Določanje uspešnosti stabilizacije vzorca preko merjenja A istega vzorca skozi čas. Vzorec smo stabilizirali po principu 1 + 2 = vzorec + 0,4M Na₂HPO₄.



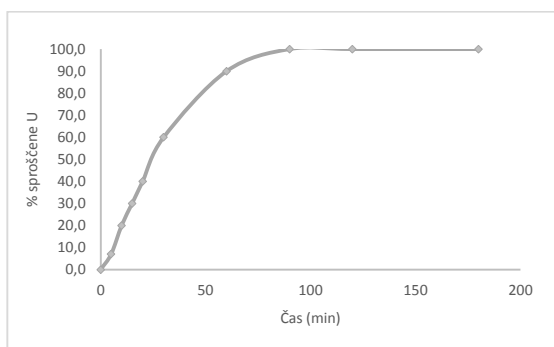
Slika 6: Določanje uspešnosti stabilizacije vzorca preko merjenja A istega vzorca skozi čas. Vzorec smo stabilizirali po principu 1 + 2 = vzorec + 0,1 M NaOH.

5.2 TESTI SPROŠČANJA

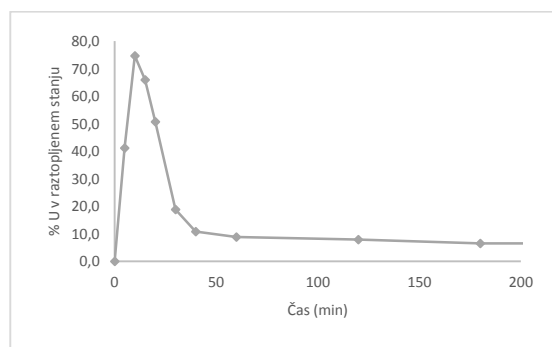
5.2.1 OBLIKA PROFILOV SPROŠČANJA

Povprečni profili sproščanja, ki smo jih izrisali na podlagi dobljenih rezultatov testov sproščanja, se razlikujejo od običajnih profilov, ki jih dobimo pri testiranju sproščanja učinkovine iz FO. Pogosto namreč pri testih sproščanja učinkovine iz FO učinkovina po sprostitvi in raztopitvi v okoliškem mediju tam tudi ostane v raztopljenem stanju. Pri naših testih sproščanja, kjer smo z izbiro takšne FO, ki nam je omogočala doseg stanja supersaturacije, dosegli koncentracije učinkovine nad mejo njene topnosti v preučevanem mediju, prihaja do kasnejšega obarjanja učinkovine. Obarjanje poteka, dokler koncentracija učinkovine ne doseže svoje ravnotežne topnosti v preiskovanem mediju. Zaradi obarjanja prihaja do zmanjševanja deleža sproščene učinkovine v raztopljenem stanju, kar se odraža s padcem na profilih sproščanja. Iz poskusov naše naloge delež sproščene učinkovine sicer lahko kvantificiramo, vendar je pravilnost dobljenih rezultatov vprašljiva, saj se sproščena učinkovina sproti obarja in tako ne vemo, kolikšen delež učinkovine se je po prehodu iz tablete dejansko uspel raztopiti v okoliškem mediju.

Na spodnjih slikah sta prikazana dva profila sproščanja. Na *Sliki 7* je prikazana običajna oblika profila sproščanja, na *Sliki 8* pa je izrisan profil, ki smo ga dobili pri naši nalogi.



Slika 7: Običajna oblika profila sproščanja učinkovine iz FO



Slika 8: Oblika profila sproščanja učinkovine iz FO pri naši nalogi

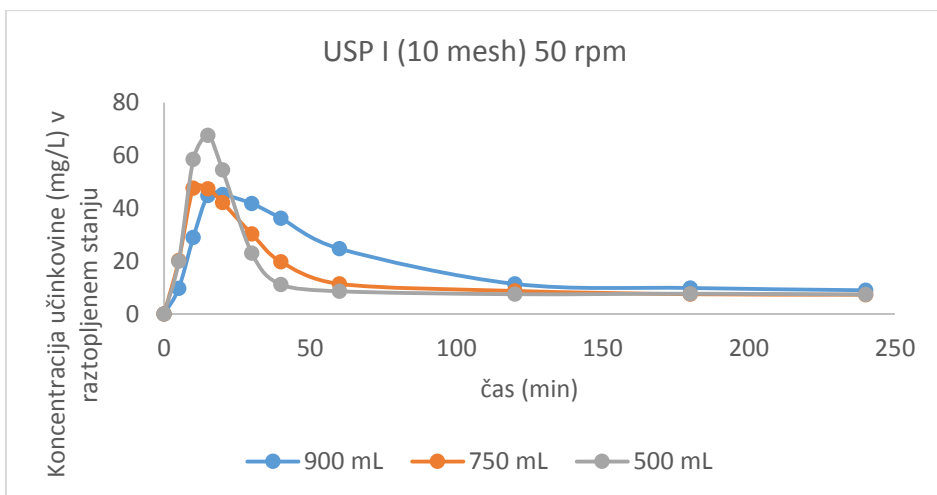
5.2.2 VPLIV RAZLIČNIH VOLUMNOV MEDIJA

Da bi lahko preučili vpliv volumna medija na sproščanje natrijevega diklofenakata, smo teste sproščanja izvajali v različnih volumnih medija pri enaki hitrosti mešanja in uporabi iste naprave za testiranje sproščanja.

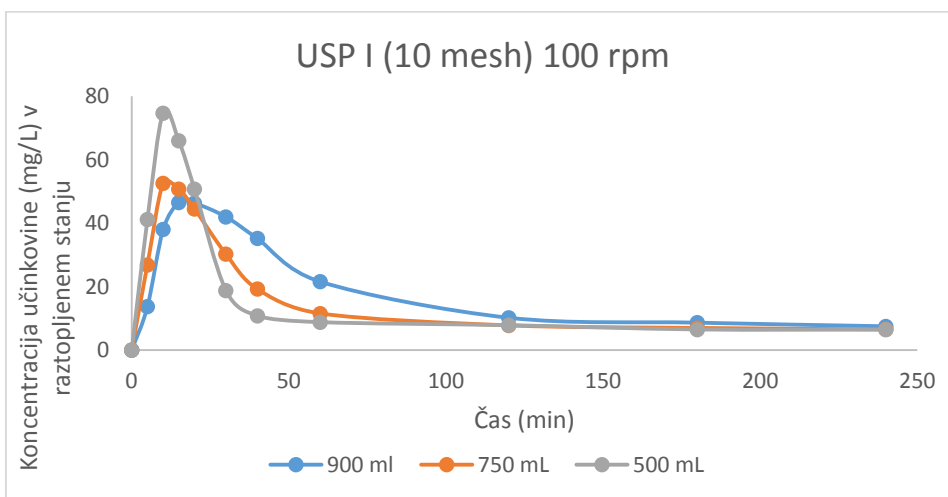
Pri pregledu in analizi dobljenih rezultatov je potrebno biti poleg deleža sproščene učinkovine, ki se nahaja v raztopljenem stanju, pozoren še na dosežene koncentracije učinkovine v raztopljenem stanju, saj je pri preučevanju vzpostavitve in vzdrževanja stanja supersaturacije zelo pomembna koncentracija učinkovine, ne le delež učinkovine, ki se sprosti iz FO. Kljub večjemu deležu sproščene učinkovine v okoliški medij, je namreč lahko dosežena koncentracija raztopljene učinkovine v tem mediju manjša. Tako se je na primer v večjem volumnu medija uspel sprostiti večji delež učinkovine, vendar so bile dosežene koncentracije učinkovine v raztopljenem stanju tu manjše. Prav tako je iz grafov, ki ponazarjajo koncentracijo raztopljene učinkovine in ne deleža sproščene učinkovine, moč razbrati večji vpliv volumna medija, v katerem poteka sproščanje, na dosego večjega stanja prenasičenosti.

Uporabili smo takšne tablete, ki takoj po začetku sproščanja razpadejo, predvsem zaradi prisotnosti polimera, ki zaradi svojih hidrofilnih lastnosti preko hitrega raztapljanja v okoliškem mediju tudi učinkovini omogoči takojšnje sproščanje iz tablete in nadaljnje raztapljanje v mediju za sproščanje. Hiter prehod učinkovine v okoliški medij, ki se kaže s porastom koncentracije učinkovine v raztopljenem stanju, je najbolj izrazit v manjših volumnih medija za sproščanje. To vidimo na *Slikah 9 – 14*, ki ponazarjajo časovno odvisnost spreminjanja koncentracije učinkovine. Iz naraščajočega dela krivulje (0-20') vidimo, da smo v manjšem volumnu medija (500 mL) s hitrejšim sproščanjem dosegli višjo stopnjo supersaturacije kot v večjih volumnih medija (900 mL). Z grafov razberemo tudi, da je bila koncentracija učinkovine v raztopljenem stanju dalj časa vzdrževana v primeru sproščanja v večjem volumnu medija.

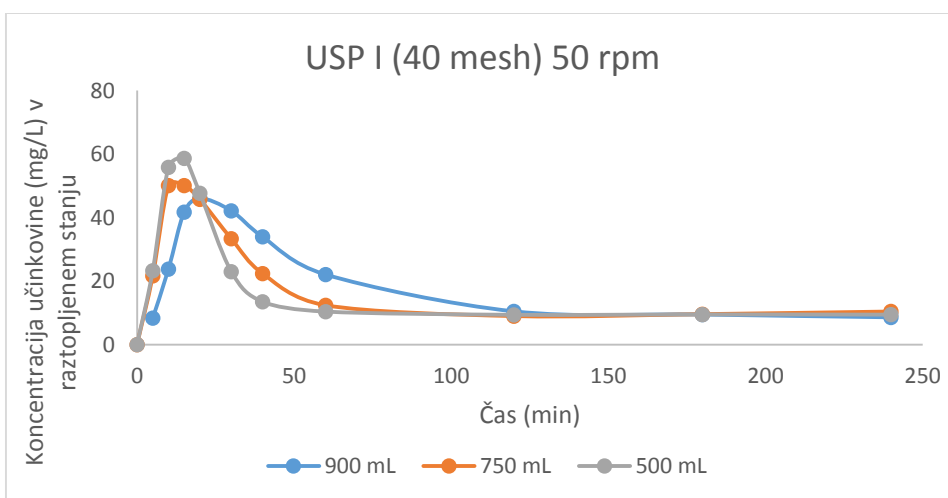
Razlike v doseženi največji koncentraciji učinkovine med različnimi volumni medija za sproščanje so bolj opazne pri višji hitrosti vrtenja košaric ali mešala (100 rpm), kot pri nižji hitrosti mešanja (50 rpm), kar je razvidno iz *Slik 10, 12 in 14*, kjer je ponazorjen vpliv izbire volumna na sproščanje Na-DIC, ob uporabi hitrejšega vrtenja veslastega mešala oz. košarice.



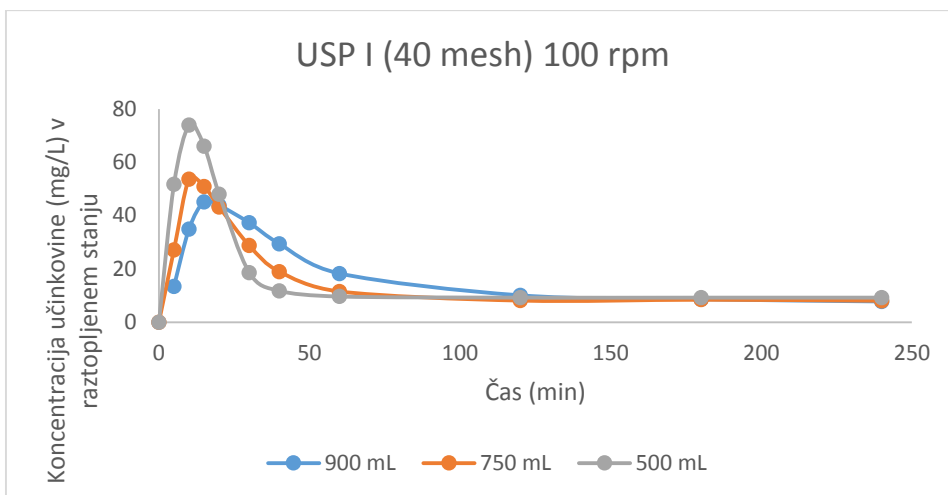
Slika 9: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP I (10 mesh) pri 50 rpm v različnih volumnih medija.



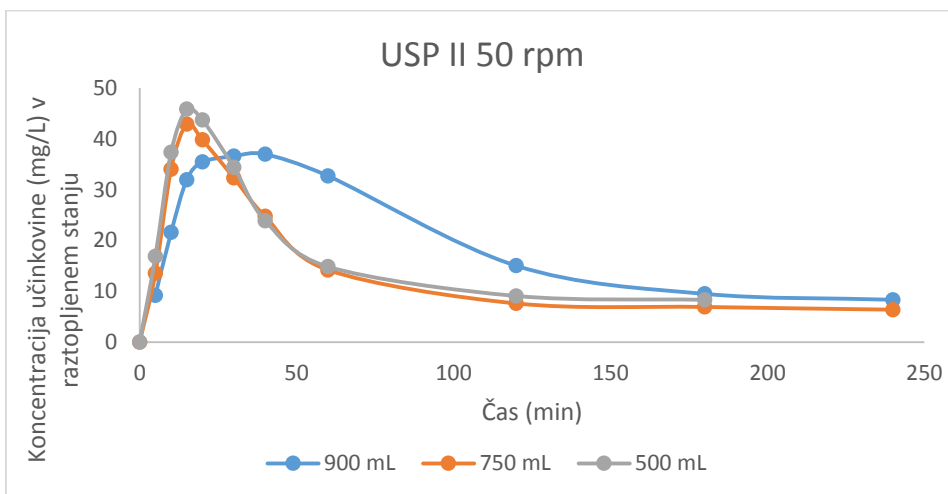
Slika 10: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP I (10 mesh) pri 100 rpm v različnih volumnih medija



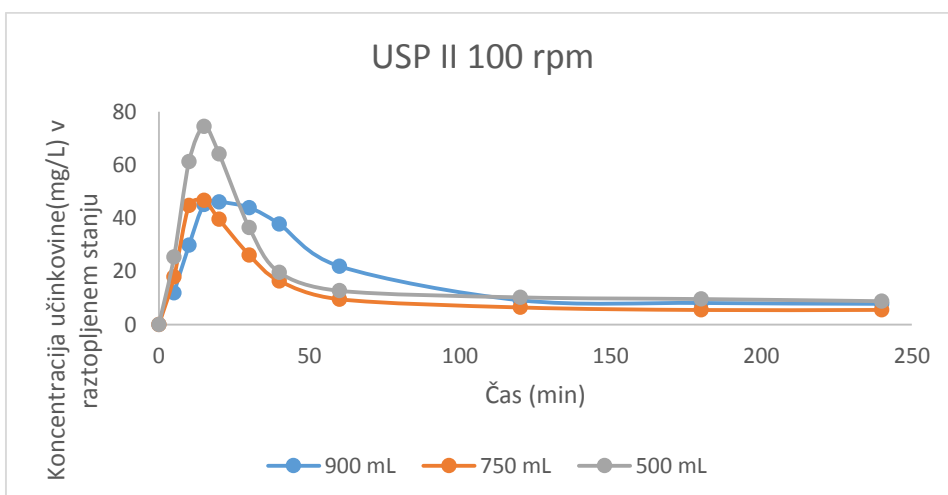
Slika 11: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP I (40 mesh) pri 50 rpm v različnih volumnih medija



Slika 12: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP I (40 mesh) pri 100 rpm v različnih volumnih medija

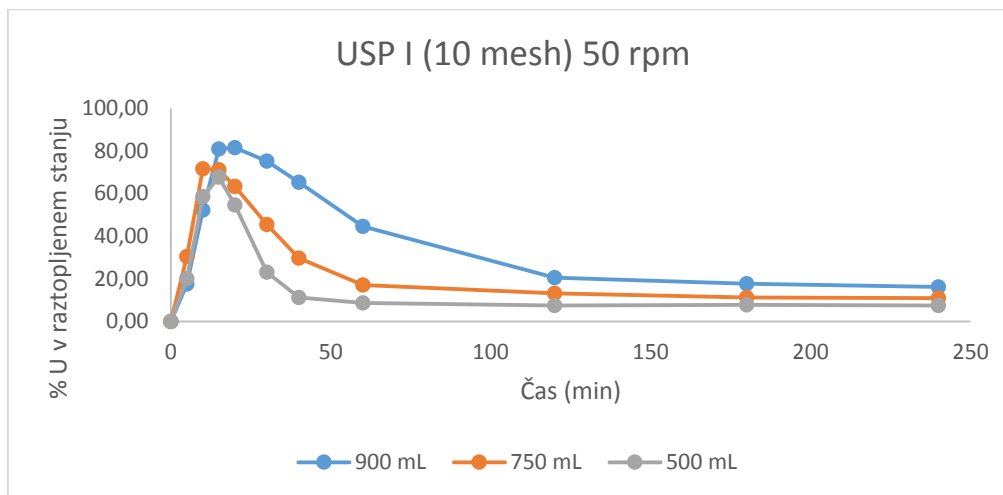


Slika 13: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP II pri 50 rpm v različnih volumnih medija

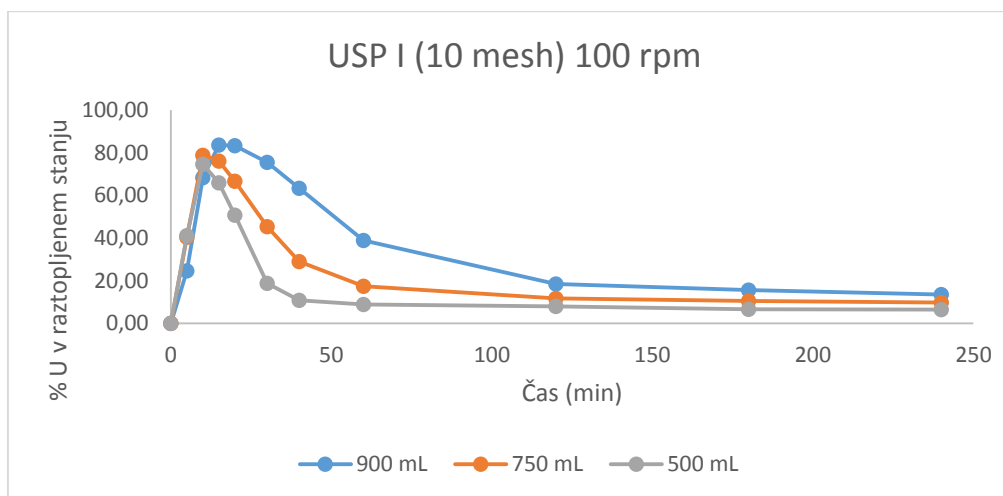


Slika 14: Graf, ki predstavlja povprečni koncentracijski profil sproščanja za USP II pri 100 rpm v različnih volumnih medija

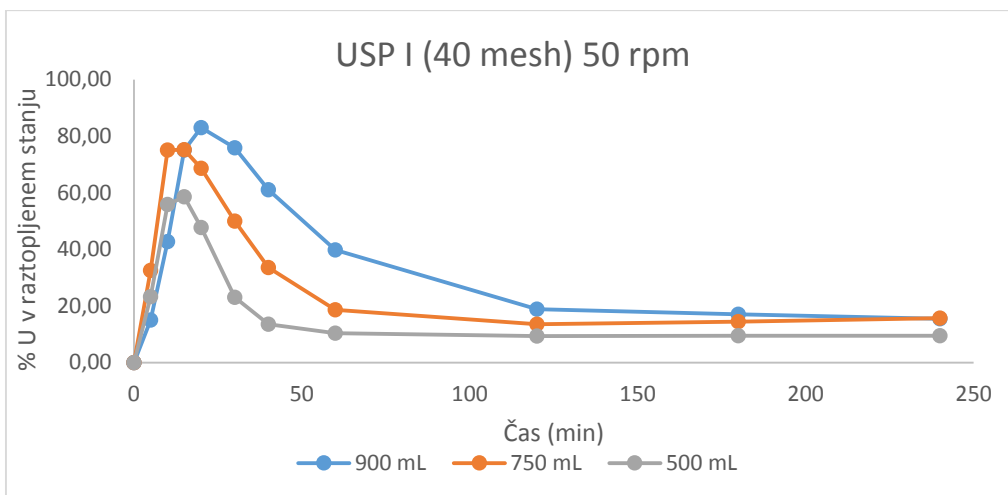
Iz Slik 15 – 20, kjer je grafično prikazana časovna odvisnost spreminjanja deleža učinkovine v raztopljenem stanju, lahko razberemo, da je delež sproščene učinkovine največji v primeru sproščanja v največjem volumnu medija. Prav tako je v primeru sproščanja v večjem volumnu medija, čas, v katerem je večji delež učinkovine v raztopljenem stanju, daljši.



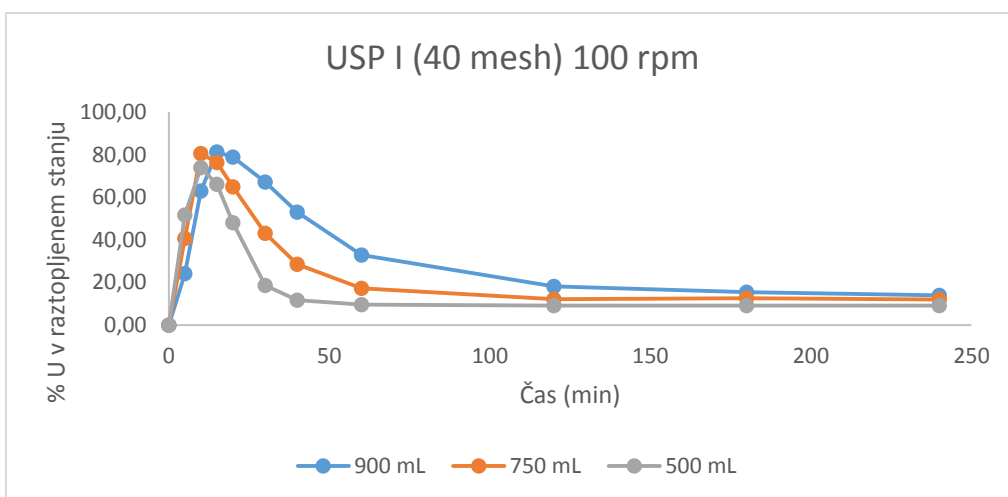
Slika 15: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo USP I (10 mesh) pri 50 rpm in različnih volumnih medija



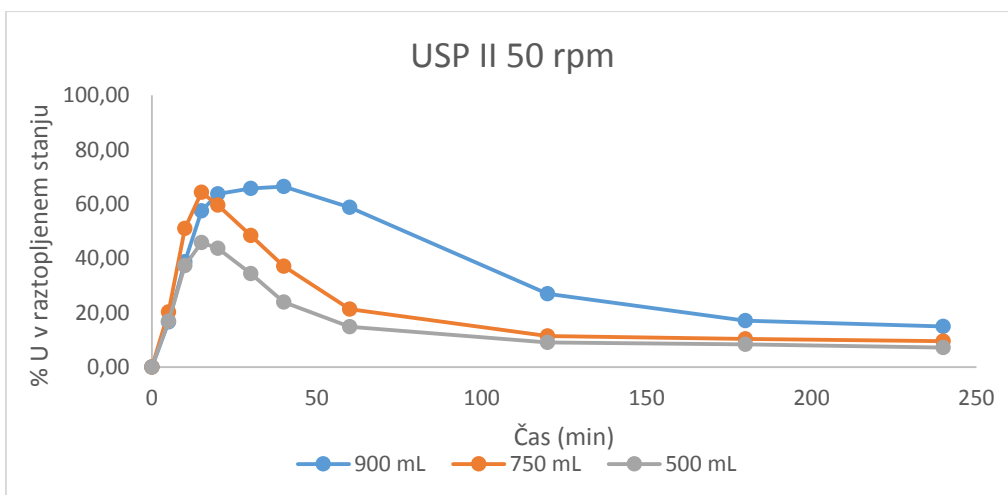
Slika 16: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo USP I (10 mesh) pri 100 rpm in različnih volumnih medija



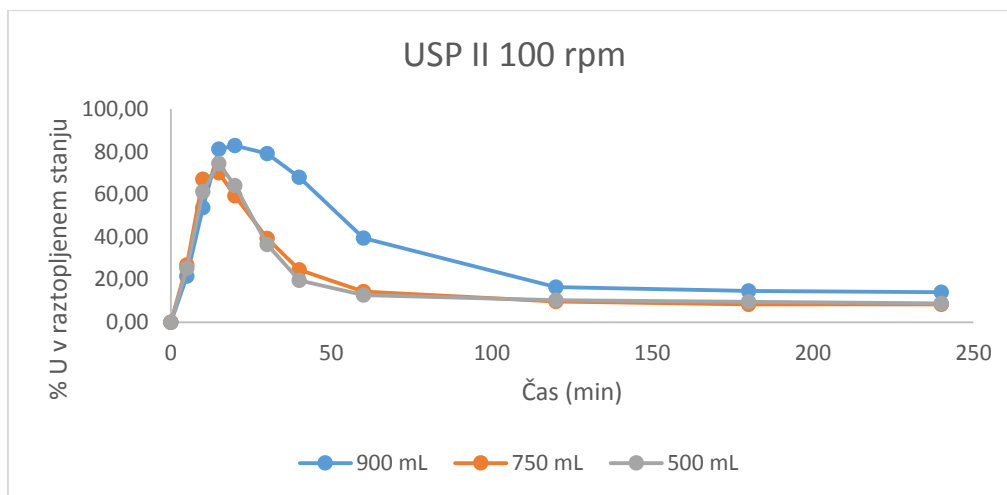
Slika 17: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo USP I (40 mesh) pri 50 rpm in različnih volumnih medija



Slika 18: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo z USP I (40 mesh) pri 100 rpm in različnih volumnih medija



Slika 19: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo z USP II pri 50 rpm in različnih volumnih medija



Slika 20: Graf, ki predstavlja povprečni profil spreminjanja deleža raztopljene učinkovine skozi čas sproščanja z uporabo z USP II pri 100 rpm in različnih volumnih medija

5.2.3 VPLIV HITROSTI MEŠANJA

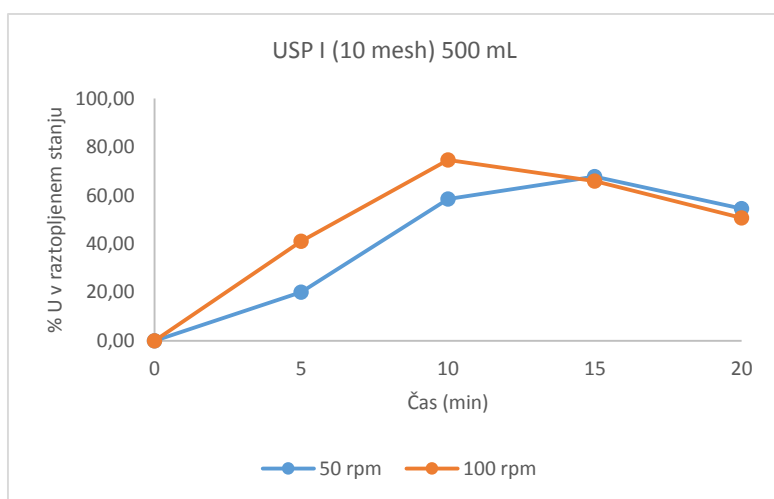
Pri testih sproščanja z USP I ali II je eden glavnih parametrov hitrost vrtenja košarice oz. mešala, ki mora biti prilagojena za posamezno testiranje. Z uporabo nižjih hitrosti mešanja se izognemo mehanskim poškodbam tablete, do katerih bi lahko prišlo zaradi trkov tablete ob dno posode pri višjih hitrostih vrtenja mešala. Vseeno pa z uporabo nižjih hitrosti mešanja lahko dobimo nehomogen vzorec, kar se kaže v slabši ponovljivosti izmerjenih rezultatov. Z uporabo višjih hitrosti mešanja res dosežemo boljše homogenizacijo vzorca, vendar se zaradi hitrega sproščanja učinkovine iz medija lahko skrijejo vplivi mehanizmov, ki stojijo za sproščanjem iz FO, kar se kaže v drugačnih oblikah profilov, kot bi jih dobili sicer.

Ob uporabi iste metode sproščanja in enakega volumna medija smo preučevali vpliv spremembe hitrosti vrtenja veslastega mešala oz. košarice na profile sproščanja natrijevega diklofenakata iz tablet s takojšnjim sproščanjem.

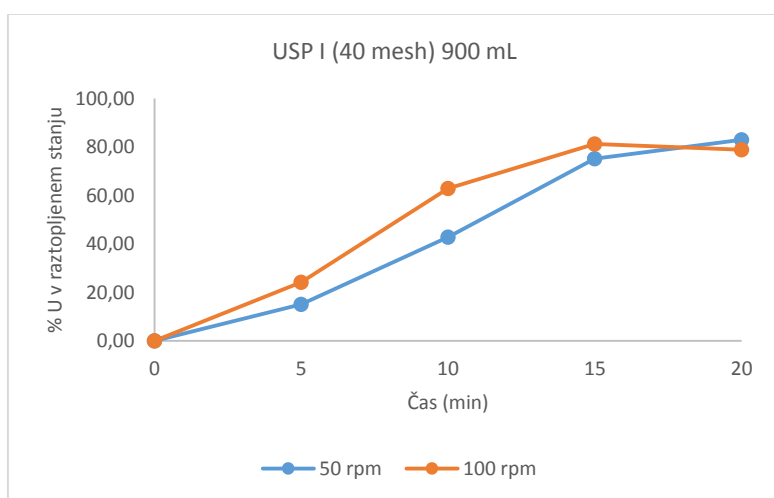
O vplivu izbire hitrosti vrtenja mešala na tableto smo se lahko prepričali že z opazovanjem preiskovane tablete v napravi za sproščanje. Ob večji hitrosti vrtenja veslastega mešala (100 rpm) se je tableta na začetku sproščanja gibala po dnu posode, medtem ko je pri izbiri nižje hitrosti mešanja na dnu posode obstala. Z opazovanjem tablete, predvsem v začetnem delu testov sproščanja, je bilo videti, kakor da se je na dno posode tableta prilepila, sproščanje učinkovine iz še nerazpadle tablete pa je dodatno motil tudi kupček že razpadle tablete, ki se je posedel in obstal na še nerazpadli tableti. Glede na obliko kupčka sklepamo, da je šlo za še nerazpadlo tableto, na katero se je posedel kupček že razpadle tablete. Ali je ta kupček predstavljal samo pomožne snovi in v kolikšni meri je vplival na prehod učinkovine v

okoliški medij, ne moremo zagotovo vedeti, vendar s primerjavo izmerjenih koncentracij učinkovine v istih časovnih točkah in ob uporabi različnih hitrosti vrtenja veslastega mešala vidimo, da je bila pri višjih hitrostih mešanja dosežena večja koncentracija raztopljene učinkovine.

Iz vseh povprečnih profilov sproščanja je razvidno, da v primeru uporabe višjih hitrosti mešanja pride do hitrejšega sproščanja učinkovine iz tablet. Ta trend pa je bil najbolj izrazit na profilih sproščanja dobljenih z uporabo metode sproščanja s košarico. Iz *Slik 21 in 22* se vidi, kako na začetku sproščanja zaradi večje hitrosti vrtenja košarice sproščanje poteka hitreje, kot pri manjši hitrosti vrtenja. Odraz višje hitrosti sproščanja je v večjem deležu učinkovine, ki se nahaja v raztopljenem stanju.



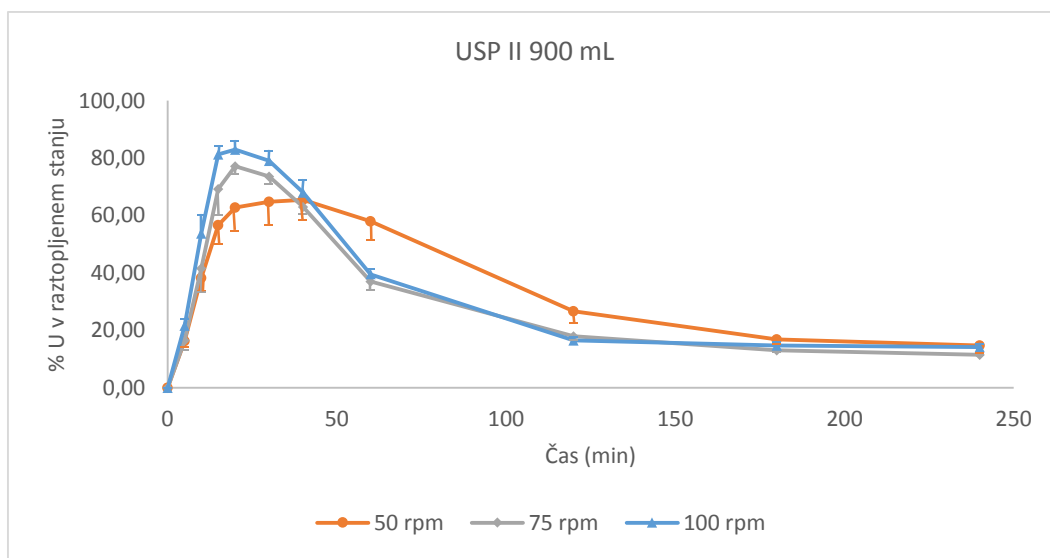
Slika 21: Povprečni profili sproščanja v prvih 20', dobljeni z USP I (10 mesh) v 500 mL medija pri različnih hitrostih mešanja



Slika 22: Povprečni profili sproščanja v prvih 20', dobljeni z USP I (40 mesh) v 500 mL medija pri različnih hitrostih mešanja

Ob uporabi metode z veslastim mešalom smo imeli precej težav pri sproščanju, ki so se kazale s slabšo ponovljivostjo med paralelami in so bile še posebej izrazite v primeru uporabe nižjih hitrosti vrtenja mešala. Na *Sliki 23*, kjer je ponazorjeno sproščanje v 900 mL medija ob različnih hitrostih mešanja veslastega mešala, lahko vidimo, kako se s povečanjem hitrosti mešanja izboljšuje ponovljivost med paralelami. Standardne deviacije oz koeficienti variacije za posamezne časovne točke sproščanja so namreč ob izbiri hitrejšega vrtenja veslastega mešala manjši. Tako so v času od 15' do 60' testiranja sproščanja, pri hitrosti vrtenja veslastega mešala 100 rpm koeficienti variacije v intervalu od 3 % do 6 %, medtem ko je ta interval ob počasnejšem mešanju veslastega mešala – 50 rpm med 11 % in 12 %, kar je prikazano tudi v tabelah, kjer so zbrani rezultati posameznih poskusov.

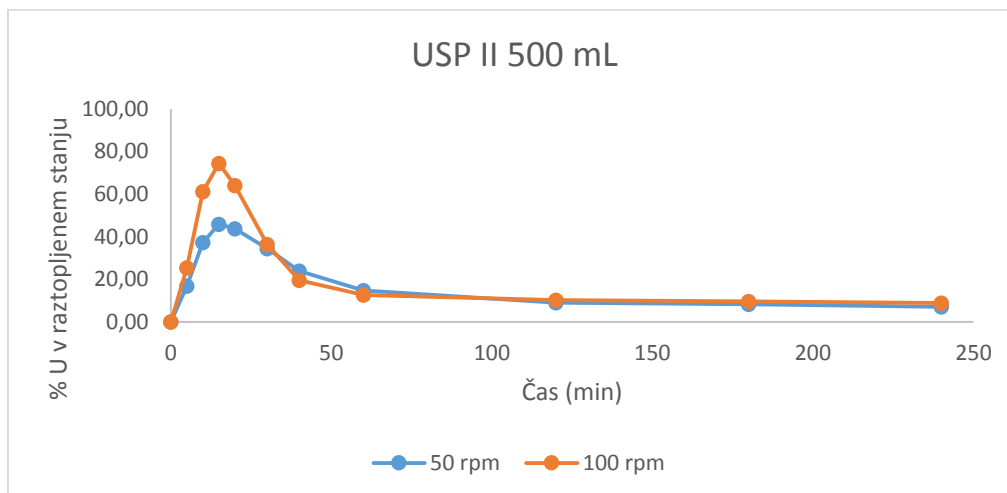
Na istem grafu (*Slika 23*) lahko opazimo tudi trend vpliva dosežene koncentracije na obarjanje. V primeru nižje hitrosti vrtenja veslastega mešala, kjer je bilo sproščanje učinkovine iz tablet počasnejše, smo dosegli manjšo največjo koncentracijo raztopljenega Na-DIC, čemur je sledila manjša hitrost obarjanja. Tako je bil čas, ko se je učinkovina nahajala nad mejo svoje ravnotežne topnosti, najdaljši v primeru najnižje hitrosti mešanja.



Slika 23: Povprečni profili sproščanja, dobljeni z USP II v 900 mL medija pri različnih hitrostih mešanja. Podani so še standardni odkloni za posamezne časovne točke.

Na *Sliki 24* je predstavljeno sproščanje v 500 mL medija z uporabo različnih hitrosti vrtenja veslastega mešala. Pri uporabi teh parametrov sproščanja je bil najbolj opazen vpliv izbire hitrosti vrtenja veslastega mešala na dosego maksimalne koncentracije raztopljene učinkovine v mediju za sproščanje. Maksimalni delež učinkovine v raztopljenem stanju je

bil v primeru uporabe nižje hitrosti mešanja – 50 rpm – za približno polovico manjši kot ob hitrejšem mešanju – 100 rpm.



Slika 24: Povprečni profili sproščanja, dobljeni z USP II v 500 mL medija pri različnih hitrostih mešanja

5.2.4 VPLIV IZBIRE METODE

Za preučevanje vpliva izbire metode za sproščanje smo teste sproščanja izvajali v istih volumnih medija in ob enaki hitrosti vrtenja veslastega mešala oz. košarice.

USP I in II sta zlata standarda pri testiranju sproščanja učinkovin iz trdnih FO. Uporabljamo ju predvsem v študijah kontrole, pred študijami bioekvivalence in splošno pri razvoju trdnih FO. V okviru naše naloge smo za izvajanje testov sproščanja uporabili veslasto mešalo in košarice z velikostjo odprtin 10 in 40 mesh.

Večje razlike v maksimalnem deležu sproščene učinkovine in za to potrebnem času, ki sta odraz izbire metode za sproščanje, se kažejo v primeru testiranja sproščanja ob uporabi manjših volumnov medija in nižjih hitrosti mešanja. Ne glede na izbiro metode, pa je po koncu sproščanja koncentracija učinkovine v vseh primerih približno enaka. Menimo, da je koncentracija učinkovine ob koncu sproščanja blizu njene ravnotežne topnosti v tem mediju.

V primeru, ko tableto vstavimo v košarico, se ta v posodi za sproščanje nahaja višje kot v primeru testov sproščanja z veslastim mešalom, kjer je tableta na dnu posode. Med sproščanjem je tableta, ki jo vstavimo v košarico, v času dokler ne razpade, popolnoma v stiku z okoliškim medijem, ko začne razpadati pa lahko sile tokov razpadle delce tablete ponesejo po večji površini posode. Iz teh razpadlih delcev se učinkovina lahko nemoteno

sprošča v okoliški medij, kar ji je ob uporabi metode z veslastim mešalom zaradi pojava kupčka oteženo.

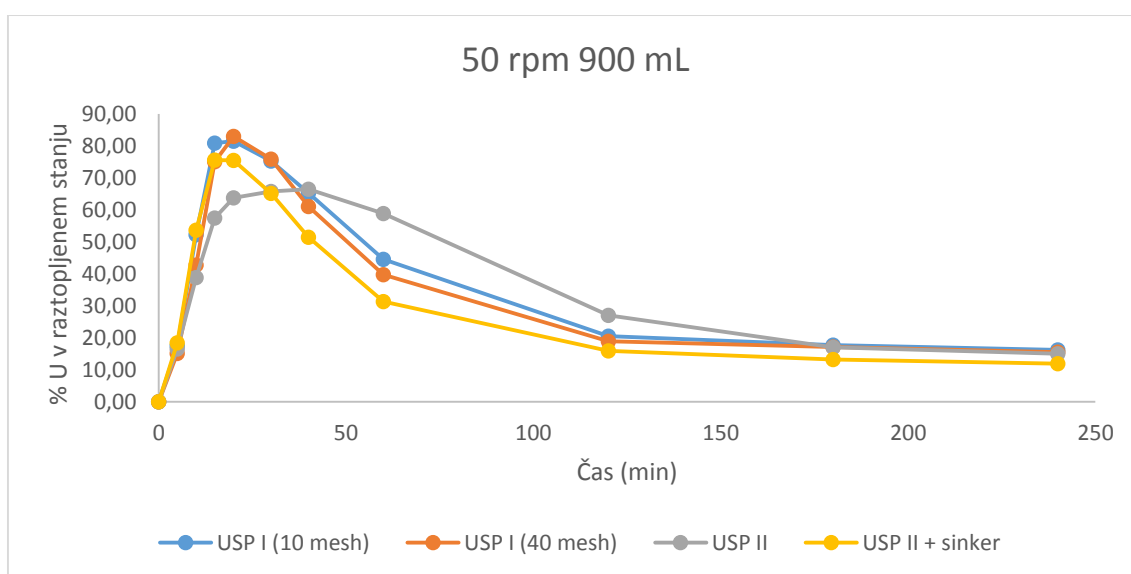
V primeru sproščanja z USP II predvsem pri nižji hitrosti mešanja – 50 rpm – pogosto pride do težav zaradi neenakomernega porazdeljevanja raztopljene učinkovine, kakor tudi razpadle FO v mediju za sproščanje, saj se na dnu posode v večjem obsegu izoblikuje področje, kjer tokovnic praktično ni. Zaradi tega je onemogočeno homogeno porazdeljevanje učinkovine po celotni posodi, in tako se učinkovina, kakor tudi FO zadržujeta predvsem pri dnu posode, v kateri poteka sproščanje. Gre za tako imenovano »mrtvo cono« (20), ki se kaže z nastankom kupčka nerazpadle FO na dnu posode. Tableta tako obstane na dnu posode, poleg težav s sproščanjem učinkovine v okoliški medij zaradi nepopolnega stika tablete z okoliškim medijem pa se na tableti ustvari še dodaten kupček, saj ga tokovnice niso sposobne odstraniti s tablete. Tvorijo ga razpadli delci tablete, ki se zaradi slabše hidrodinamike posedejo nanjo, ko ta še ni razpadla, na njej obstanejo in otežujejo nadaljnje sproščanje učinkovine iz nje. Vse te težave se kažejo v slabši ponovljivosti med paralelami in manjšem deležu raztopljene učinkovine. S tako imenovanim »conning efektom« se srečujejo tudi v industriji in razvoju, zato v člankih v izogib temu efektu predlagajo povečanje hitrosti mešanja ali uporabo posebnih modificiranih posod (PeakTM vessels) (19) ali mešal (19, 20).

Kot je bilo že omenjeno, je do težav prihajalo ob uporabi USP II predvsem pri nižji hitrosti vrtenja mešala (50 rpm). Zaradi manjše sile tokov, ki delujejo na tableto, so se namreč že razpadli delci tablete posedli na še nerazpadlo tableto in ovirali nadaljnji razpad in sproščanje učinkovine iz nje. Možen vzrok slabe ponovljivosti za to metodo smo med potekom sproščanja v USP II in 900 ml videli v stalnem kontaktu tablete z dnom posode, zato smo naredili še nekaj poskusov pod istimi pogoji, tokrat z uporabo sinkerjev. Vendar pa je verjetnost, da bi stalen kontakt ene površine tablete z dnom posode v tako veliki meri vplival na sproščanje učinkovine iz tablete, majhna. Ker je spodnja površina tablete v stalnem kontaktu z dnom posode, je s te strani onemogočen stik medija za sproščanje s tableto in posledično pride do oteženega sproščanja učinkovine iz tablete. Vendar to ne bi smelo imeti tako velikega vpliva na sproščanje učinkovine iz tablete, saj je tableta kmalu po začetku sproščanja zaradi hitrega raztapljanja močno hidrofilnega polimera razpadla. Vseeno smo z uporabo sinkerjev dobili boljšo ponovljivost med serijami in tudi delež maksimalne sproščene učinkovine je bil večji. Medtem ko je tableta ujeta v sinker, je namreč z vseh strani

obdana z medijem, kar omogoča hitrejše sproščanje učinkovine iz nje, sam sinker pa tudi otežuje posedanje razpadlega dela tablete na še nerazpadlega.

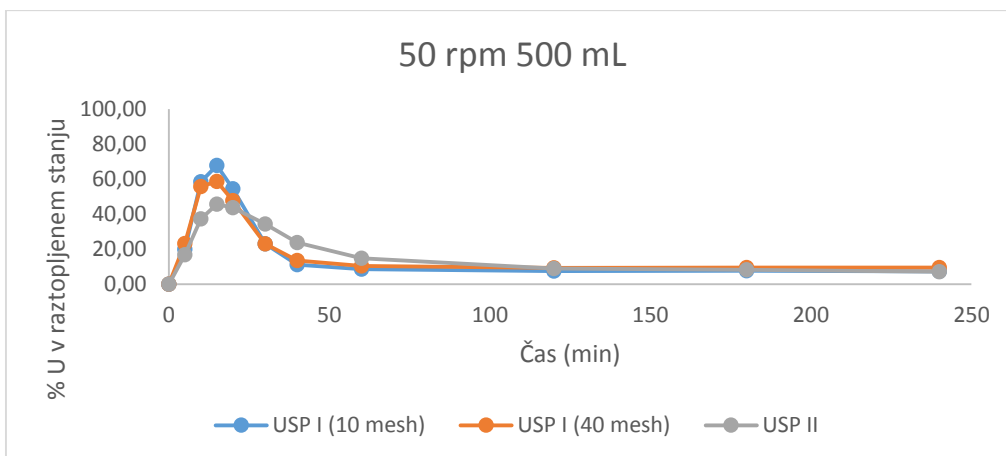
Na *Sliki 25* je preko izrisanega povprečnega profila sproščanja ponazorjeno, kako smo pri sproščanju z USP II in z uporabo sinkerjev dosegli večjo največjo koncentracijo raztopljenе učinkovine v primerjavi s sproščanjem pod enakimi pogoji in brez uporabe sinkerjev. Se je pa v primeru sproščanja z uporabo sinkerjev obarjanje pričelo prej, na kar najverjetneje vpliva doseg višje največje koncentracije učinkovine v raztopljenem stanju.

Na *Sliki 25* prav tako lahko opazimo največje razlike v profilih sproščanja Na-DIC, ki so posledica izbire metode za sproščanje.

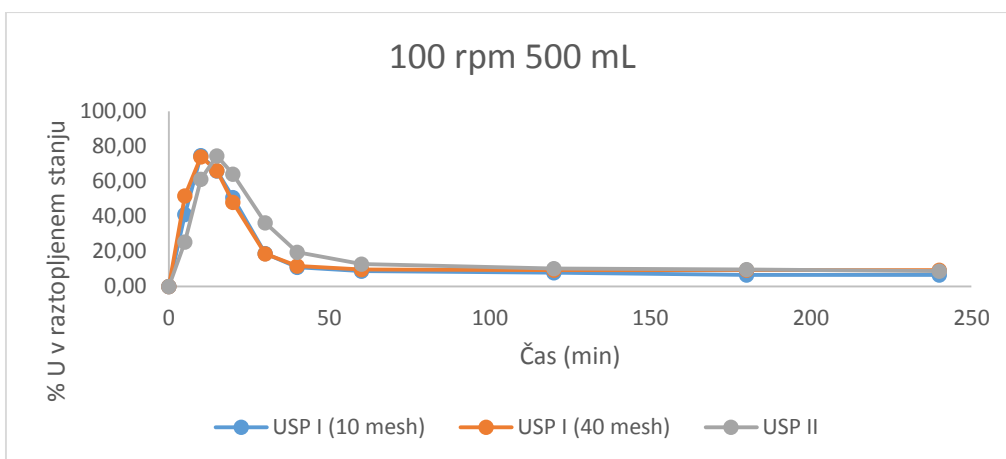


Slika 25: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 50 rpm v 900 mL medija

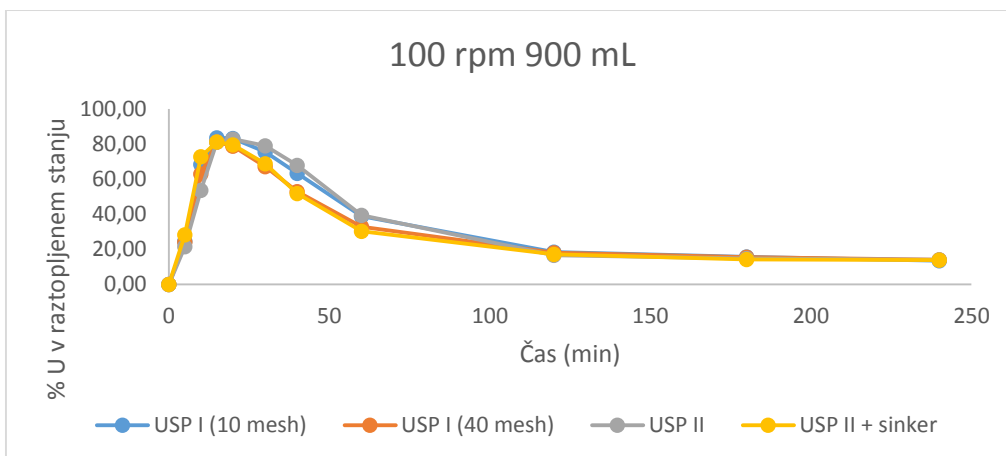
Na *Slikah 26 – 30* je grafično ponazorjen vpliv izbire metode za testiranje sproščanja na dosežen delež sproščene učinkovine v raztopljenem stanju. Podane so primerjave profilov sproščanja uporab različnih metod za testiranje sproščanja ob uporabi enakega volumna medija in enake hitrosti mešanja.



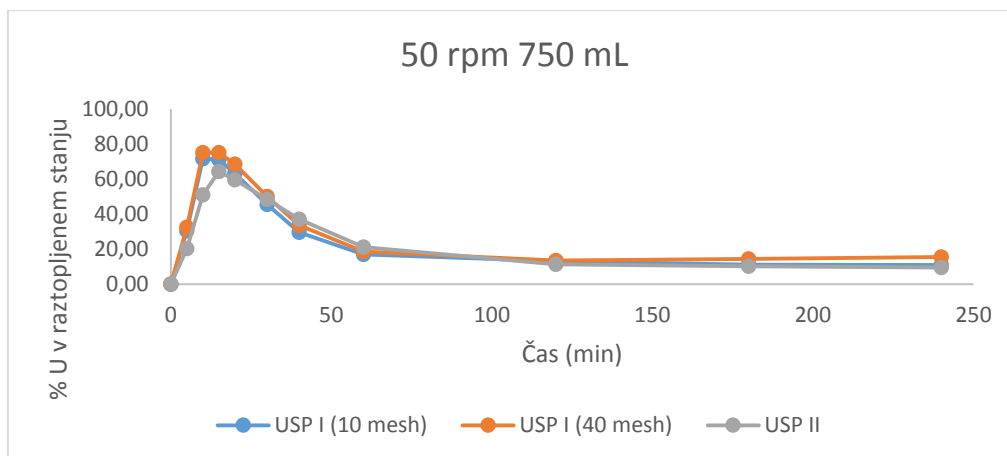
Slika 26: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 50 rpm v 500 mL medija



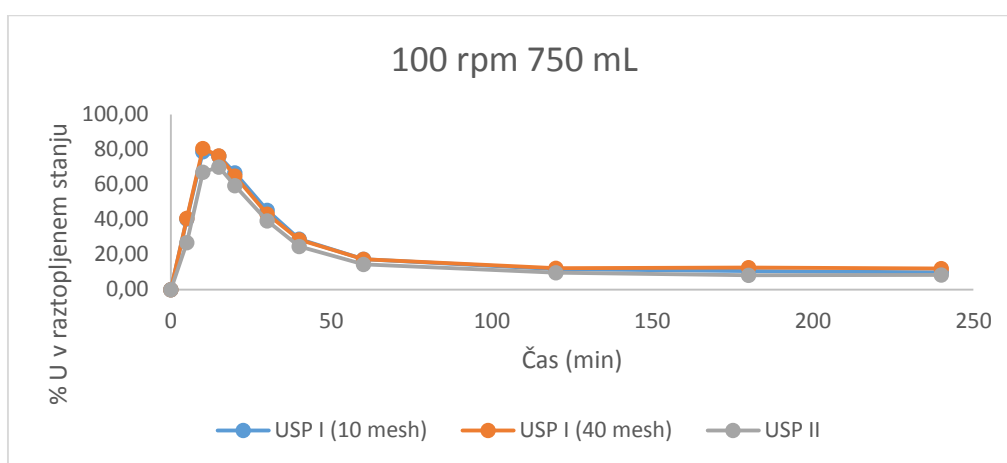
Slika 27: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 100 rpm v 500 mL medija



Slika 28: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 100 rpm v 900 mL medija



Slika 29: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 50 rpm v 750 mL medija



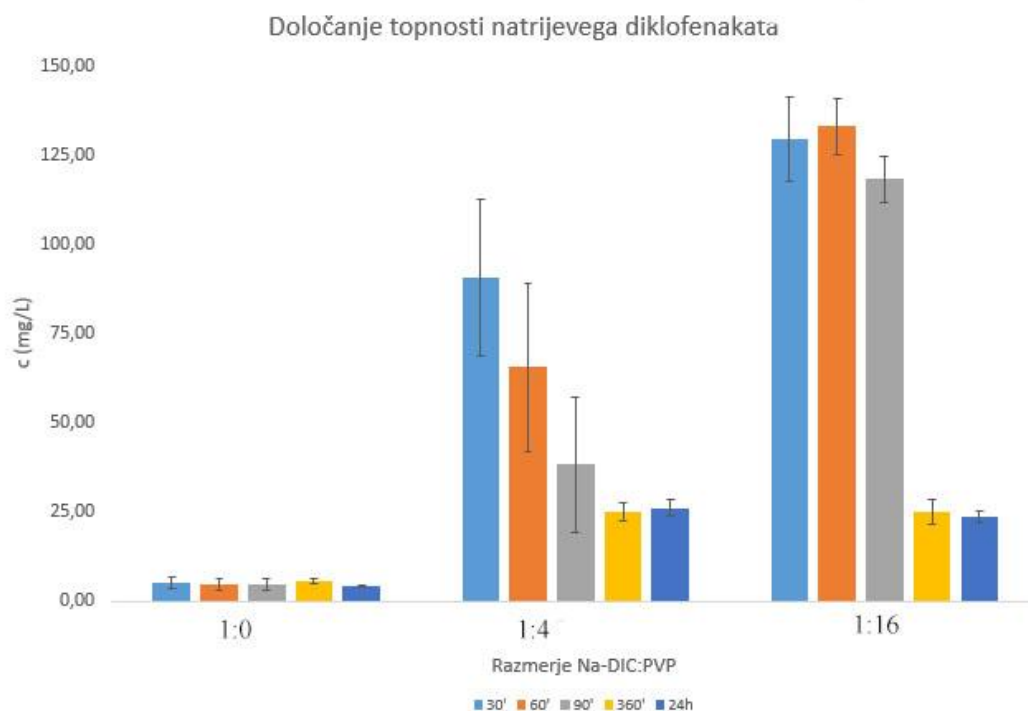
Slika 30: Povprečni profili sproščanja, dobljeni s pomočjo različnih metod pri hitrosti vrtenja 100 rpm v 750 mL medija

5.3 TESTI DOLOČANJA RAVNOTEŽNE TOPNOSTI

S testi določanja topnosti smo v disperziji z različnim izhodiščnim masnim razmerjem med Na-DIC in PVP-jem želeli določiti ravnotežno topnost Na-DIC. Prav tako smo s spremljanjem spreminjanja koncentracije raztopljenega Na-DIC skozi čas stresanja želeli določiti kdaj se vzpostavi ravnotežje. Čas stresanja smo omejili na 24 ur, saj nas je zanimalo, ali se bo v tem času v vzorcu uspelo vzpostaviti ravnotežno stanje in bomo lahko določili ravnotežno topnost Na-DIC v posameznem vzorcu. Ob upoštevanju možnosti za eksperimentalno napako predvidevamo, da smo blizu ravnotežni topnosti Na-DIC v preučevanem mediju, saj je bila določena koncentracija učinkovine v končnih točkah stresanja v končnih časovnih točkah vzorčenja primerljiva med sabo. Da bi se prepričali, ali smo ravnotežno stanje dejansko dosegli, bi bilo smiselno podaljšati čas stresanja in koncentracijo Na-DIC v vzorcu določiti še po 36 in 48 urah stresanja. V primeru, da bi bila

določena koncentracija Na-DIC primerljiva z določenima koncentracijama Na-DIC po 6h in 24h stresanja, bi lahko trdili, da je prišlo do vzpostavitve ravnotežnega stanja in da smo uspeli določiti ravnotežno topnost Na-DIC v preiskovanih medijih.

Na spodnji sliki (*Slika 31*) preko izrisanega grafa lahko vidimo povprečne vrednosti koncentracij Na-DIC v vzorcih z različnim izhodiščnim razmerjem Na-DIC:PVP za različne časovne točke stresanja. Prikazana je tudi variabilnost med samimi paralelami.



Slika 31: Graf ki prikazuje koncentracijo raztopljenega natrijevega diklofenakata v vzorcih z različnim začetnim masnim razmerjem Na-DIC:PVP v določenih časovnih točkah stresanja

Kljub slabi ponovljivosti med dobljenimi rezultati, predvsem v začetnem času stresanja, se na njihovi podlagi vseeno opazi trend, kjer vidimo, da se z večjim dodatkom polimera (masno razmerje Na-DIC: PVP = 1:16) koncentracija raztopljenega diklofenakata močno poveča, predvsem v začetnem času stresanja, z daljšim časom stresanja (po 6-24 h) pa ta močno pade na ustaljeno vrednost, za katero menimo da je blizu ravnotežni topnosti Na-DIC v tem mediju. Glede na končne vrednosti Na-DIC v vzorcih, kjer je bil prisoten polimer (izhodiščno masno razmerje API : PVP = 1 : 4 in 1 : 16), nampram vzorcem, kjer polimera ni bilo, sklepamo, da prisotnost polimera poveča topnost Na-DIC v izbranem mediju.

V vzorcu, kjer diklofenakatu ni bil dodan polimer, je bila koncentracija raztopljenega Na-DIC, z upoštevanjem eksperimentalne napake, približno enaka ves čas stresanja. Do večjega

odstopanja sicer pride v vzorcih odvzetih v času po 6h in 24h stresanja. Da bi ugotovili, ali gre za eksperimentalno napako in smo ravnotežno topnost vseeno že dosegli, bi morali, kakor je bilo že rečeno, čas stresanja podaljšati in ponovno izmeriti koncentracijo Na-DIC v novi časovni točki.

Povprečna končna koncentracija Na-DIC, ki smo jo po koncu testov sproščanja izmerili pri testih sproščanja (7,7 mg/L), je malo nad končno povprečno koncentracijo Na-DIC, ki smo jo v vzorcu brez dodanega polimera (4,19 mg/L) izmerili po 24ih urah stresanja. Z ozirom na možnost eksperimentalne napake in dejstvo, da je bil v tabletah, ki smo jih uporabili pri testih sproščanja, učinkovini dodan še polimer – razmerje Na-DIC : PVP = 1 : 0,8 – ki, kakor je bilo videti iz poskusov določanja topnosti, poveča topnost Na-DIC, sklepamo da je bila končna koncentracija Na-DIC ob koncu testov sproščanja blizu ravnotežni topnosti Na-DIC v mediju za sproščanje. Da bi se prepričali ali je bila ravnotežna topnost dosežena, bi lahko podaljšali čas sproščanja, in spremljali konstantnost izmerjenih koncentracij. Lahko pa bi določali topnost Na-DIC v vzorcu, kjer bi bilo masno razmerje med Na-DIC in ostalimi PS enako njihovemu masnemu razmerju v tableti.

5.4 MOŽNOSTI ZA NADALJNJE POSKUSE

Poskuse smo izvajali na klasičnem aparatu za sproščanje z vesli in košarico. Glede na težave, na katere smo naleteli med izvajanjem naloge, bi bilo smiselno v nadaljnjih poskusih uporabiti modifikacije, s katerimi se bi tem težavam izognili. Lahko bi uporabili modificirane posode za sproščanje, s katerimi se bi izognili »conning« efektu, ob uporabi nižjih hitrosti mešanja pa bi tableto vstavili v sinkerje, s čimer bi preprečili morebitno lepljenje tablete na posodo, prav tako bi ji omogočili celoten stik z okoliškim medijem, ob tem pa bi bilo olajšano tudi sproščanje učinkovine iz tablete.

Ker na modelu za sproščanje, ki smo ga uporabili v nalogi, ne moremo ponazoriti prehoda učinkovine skozi GIT, ki pa ima, glede na dobljene rezultate raziskovalcev v člankih, ki so bili predstavljeni v uvodnem delu naloge, pomembno vlogo pri vzpostavitvi in vzdrževanju stanja prenasičenosti, bi bilo smiselno teste supersaturacije izvesti še s pomočjo modificiranih naprav za sproščanje. Z njihovo pomočjo namreč lahko ponazorimo prehod učinkovine iz želodca v tanko črevo in pH gradient, ki mu je učinkovina ob tem izpostavljena. Z uporabo takšnih metod bi se zagotovo bolj približali *in vivo* situaciji in si zagotovili boljše obete za dobro *IVIVC*.

6. ZAKLJUČKI

V magistrski nalogi smo preučevali vpliv spreminjanja parametrov sproščanja na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s takojšnjim sproščanjem, ki so pod izbranimi pogoji omogočili tudi doseg stanja prenasičenosti, kar je kasneje vodilo do pojava obarjanja učinkovine.

Profili sproščanja, ki smo jih izrisali glede na dobljene koncentracije pri testih sproščanja v naši nalogi, se razlikujejo od običajnih profilov sproščanja. Količina sproščene učinkovine namreč v začetku sproščanja močno naraste in tudi preseže njeno ravnotežno topnost v izbranem mediju, čemur sledi padec do ustaljene vrednosti.

Z nalogo smo pokazali, da izbor metode za sproščanje in izbira parametrov sproščanja, kot sta volumen medija in hitrost vrtenja veslastega mešala oz. košarice vplivajo na sproščanje učinkovine iz tablet, in vzpostavitev ter vzdrževanje stanja prenasičenosti. Tako je v izrisanih profilih sproščanja moč videti razlike v maksimalni doseženi koncentraciji učinkovine v raztopljenem stanju, hitrosti sproščanja učinkovine iz tablet in trajanju stanja prenasičenosti.

Z uporabo višjih hitrosti vrtenja veslastega mešala in košarice lahko preko hitrejšega sproščanja učinkovine iz FO dosežemo večje koncentracije učinkovine v raztopljenem stanju vendar pa se s povečanjem hitrosti mešanja, čas v katerem se učinkovina zadrži v večji stopnji supersaturacije, zmanjša.

Metoda, z vidika ponovljivosti najprimernejša za preučevanje supersaturacije v našem primeru sproščanja iz tablet s takojšnjim sproščanjem, je USP I, USP II pa le ob uporabi sinkerjev. V primeru uporabe USP II brez sinkerjev bi bilo smiselno uporabiti modificirane posode, s pomočjo katerih se izognemo »conning« efektu. V primeru uporabe USP II, bi se sicer lahko tudi z dvigom hitrosti vrtenja veslastega mešala, izognili težavam pri sproščanju, ki se kažejo s slabšo ponovljivostjo med paralelami.

Z izbiro različnih volumnov medija za sproščanje, smo dosegli različne maksimalne deleže sproščene učinkovine. Ti so bili največji v večjem volumnu (900 mL), vseeno pa so bile najvišje dosežene koncentracije učinkovine v mediju za sproščanje dosežene v manjšem volumnu medija (500 mL).

Pri testih topnosti smo, kljub slabši ponovljivosti v začetnih točkah stresanja, v vzorcih vseeno opazili določene trende, ki nakazujejo, da dodatek polimera poveča topnost Na-DIC v preučevanem mediju. V vzorcih, kjer učinkovini ni bil dodan polimer, je bila koncentracija raztopljenega Na-DIC z upoštevanjem eksperimentalne napake, ves čas stresanja približno enaka.

Glede na primerljivost določenih končnih koncentracij Na-DIC ob koncu stresanja, predvidevamo, da smo blizu ravnotežni topnosti Na-DIC v preučevanih medijih. Da bi se prepričali ali je ravnotežno stanje dejansko vzpostavljeno, pa bi bilo smiselno podaljšati čas stresanja in uvesti novo časovno točko merjenja koncentracije Na-DIC po 36 in 48 urah stresanja.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Xu S, Dai WG: Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 453(1): 36-43.
2. Bevernage J, Brouwers J, Brewster ME et al.: Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: strategies and issues. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 453(1): 25-35.
3. Augustijns P, Brewster ME: Supersaturating drug delivery systems: fast is not necessarily good enough. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2012; 101(1): 7-9
4. Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P.: Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 98(8): 2549-72.
5. Higashino H, Hasegawa T, Yamamoto M et. al.: In vitro-in vivo correlation of the effect of supersaturation on the intestinal absorption of BCS Class 2 drugs. *Molecular Pharmaceutics* 2014; 11(3): 746-54.
6. Jantratid E, Janssen N, Reppas C et al.: Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharmaceutical Research* 2008; 25(7): 1663-76.
7. Matsui K, Tsume Y, Amidon GE et al.: In Vitro Dissolution of Fluconazole and Dipyridamole in Gastrointestinal Simulator (GIS), Predicting in Vivo Dissolution and Drug-Drug Interaction Caused by Acid-Reducing Agents. *Molecular Pharmaceutics* 2015; 12 (7): 2418-28.
8. Mitra A, Fadda HM: Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Molecular Pharmaceutics* 2014; 11(8): 2835-44.
9. Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U et al.: Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2004; 56(1): 43-51.
10. Carlert S, Pålsson A, Hanisch G et al.: Predicting intestinal precipitation - a case example for a basic BCS class II drug. *Pharmaceutical Research* 2010; 27(10): 2119-30.

11. Tsume Y, Takeuchi S, Matsui K et al.: In vitro dissolution methodology, mini-Gastrointestinal Simulator (mGIS), predicts better in vivo dissolution of a weak base drug, dasatinib. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 76: 203-212.
12. Bevernage J, Brouwers J, Vertzoni M et al.: Drug supersaturation in simulated and human intestinal fluids representing different nutritional states. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(11): 4525-34.
13. Bevernage J, Brouwers J, Augustijns P et al.: Excipient-mediated supersaturation stabilization in human intestinal fluids. *Molecular Pharmaceutics* 2011; 8(2): 564-70
14. Devraj R, Williams HD, Warren DB et al.: Choice of nonionic surfactant used to formulate type IIIA self-emulsifying drug delivery systems and the physicochemical properties of the drug have a pronounced influence on the degree of drug supersaturation that develops during in vitro digestion. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2014; 103(4): 1050-63.
15. Wagner C, Jantratid E, Kesisoglou F et al.: Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 82(1): 127-38.
16. Berlin M, Ruff A, Kesisoglou F et al.: Advances and challenges in PBPK modeling – Analysis of factors contributing to the oral absorption of atazanavir, a poorly soluble weak base. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015; 93: 267-80.
17. Pinnamaneni S, Jayawickrama DA, Li J et al.: Effect of pepsin on maintaining the supersaturation of the HCl salt of a weakly basic drug: a case study. *Pharmaceutical Development and Technology* 2015; 24: 1-10.
18. Garbacz G, Wedemeyer RS, Nagel S et al.: Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 70(2): 421-8.
19. Mirza T, Joshi Y, Vivilecchia R et al.: Evaluation of Dissolution Hydrodynamics in the USP, Peak™ and Flat-Bottom Vessels Using Different Solubility. *Dissolution Technologies* 2005; 11-16.
20. Gray V, Kelly G, Xia M et al.: The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharmaceutical Research* 2009; 26(6): 1289-302.

21. McIlvaine's Buffer system

http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=McIlvaine_buffer, dostop

7.1.2016