

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA POHLEN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA POHLEN

RAZVOJ IN EVALVACIJA PREFORMULACIJSKIH METOD ZA NAPOVEDOVANJE
STABILNOSTI TRDNIH DISPERZIJ, IZDELANIH S TEHNOLOGIJO IZTISKANJA
TALIN

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF PREFORMULATION STUDIES FOR
PREDICTING THE STABILITY OF SOLID DISPERSIONS PRODUCED BY HOT-MELT
EXTRUSION

Ljubljana, 2016

Raziskovalni del magistrske naloge sem opravil na Univerzi v Bonnu, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Roka Dreua, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Karla G. Wagnerja.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Roku Dreu, mag. farm. ter somentorju prof. dr. Karlu G. Wagnerju za strokovno vodenje in pomoč tako pri raziskovalnem delu, kot pri pisanju magistrske naloge. Poleg tega se zahvaljujem staršem, puncu ter prijateljem pri podpori v času študija in profesorjem ter asistentom za vse strokovne nasvete.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Roka Dreua, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Karla G. Wagnerja.

Mitja Pohlen

KAZALO

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1. UVOD	- 1 -
1.1 TRDNE DISPERZIJE	- 2 -
1.1.1 METODE IZDEVALE TRDNIH DISPERZIJ	- 3 -
1.1.1.1 METODE S TALJENJEM.....	- 4 -
1.1.1.2 METODE Z UPORABO TOPIL	- 7 -
1.1.1.3 METODA S TALJENJEM IN IZHLAPEVANJEM TOPILA (angl. Melting-solvent method)	- 10 -
1.1.2 MEHANIZEM SPROŠČANJA	- 11 -
1.1.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI TRDNIH DISPERZIJ	- 11 -
1.1.3.1 PREDNOSTI TRDNIH DISPERZIJ	- 11 -
1.1.3.2 SLABOSTI TRDNIH DISPERZIJ.....	- 12 -
1.1.4 ANALITSKE METODE ZA ANALIZO TRDNIH DISPERZIJ	- 12 -
1.1.4.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (angl. X-ray powder diffraction oz. XRPD)	- 13 -
1.1.4.3 MIKROSKOPSKE METODE	- 15 -
1.1.4.4 SPEKTROSKOPSKE METODE.....	- 15 -
2. NAMEN DELA.....	- 16 -
3. MATERIALI IN METODE	- 17 -
3.1 MATERIALI.....	- 17 -
3.2 NAPRAVE	- 19 -
3.3 METODE	- 20 -

3.3.1 TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH.....	- 20 -
3.3.2 IZTISKANJE TALIN - HME	- 22 -
3.3.3 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	- 23 -
3.3.4 POLARIZACIJSKI MIKROSKOP.....	- 25 -
3.3.5 PREIZKUS SPROŠČANJA.....	- 25 -
3.3.6 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA	- 28 -
3.3.7 STABILNOSTNE ŠTUDIJE	- 28 -
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	- 30 -
4.1 PRELIMINARNI PREIZKUSI.....	- 30 -
4.2 IZBOLJŠANJE TOPNOSTI IN STABILNOSTI Z DODATKOM POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI (PAS)	- 31 -
4.3 ISKANJE MEDOTE ZA NAPOVED SPROŠČANJA IN STABILNOSTI ZA METODO HME.....	- 33 -
4.3.1 PREVERJANJE VPLIVA KROGLIČNEGA MLETJA NA FIZIKALNE ZMESI..	- 33 -
4.3.2 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA S KOLLIDON® VA64	- 34 -
4.3.2.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI.....	- 34 -
4.3.2.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC PRI 25 °C in 60% RV	- 36 -
4.3.2.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV	- 38 -
4.3.3 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA V SOLUPLUS®.....	- 40 -
4.3.3.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI.....	- 40 -
4.3.3.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25° C in 60% RV	- 41 -
4.3.3.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV	- 43 -
4.3.4 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA, 5% SDS V KOLLIDON® VA64.....	- 45 -
4.3.4.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI.....	- 45 -
4.3.4.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25 °C in 60% RV	- 47 -
4.3.4.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV	- 49 -
4.3.5 30% DIPIRIDAMOLA, 5%SDS V SOLUPLUS®	- 50 -

4.3.5.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI.....	- 50 -
4.3.5.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25 °C in 60% RV	- 52 -
4.3.5.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV.....	- 54 -
4.3.6 PRIMERJAVA ALTERNATIVNIH METOD IZDELAVE Z VIDIKA PROFILA SPROŠČANJA IN STABILNOSTI.....	- 55 -
4.3.7 PRIMERJAVA UPORABLJENIH METOD VREDNOTENJA TRDNIH DISPERZIJ.....	- 56 -
4.4 PRIMERJAVA AMORFNIH DISPERZIJ	- 56 -
5. SKLEP.....	- 58 -
6. LITERATURA.....	- 59 -
PRILOGE.....	- 61 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Biofarmaceutski sistem klasifikacije. Povzeto po (6).....	- 1 -
Slika 2: Steklasta raztopina. Slika prikazuje molekularno disperzijo. Povzeto po (7).....	- 3 -
Slika 3: Proces iztiskanja talin. Povzeto po (6).....	- 5 -
Slika 4: Shema naprave za sušenje z razprševanjem. Prirejeno po (6)	- 9 -
Slika 5: Primer praškovne difrakcije. Povzeto po (6)	- 14 -
Slika 6: Dipiridamol. Povzeto po (18)	- 17 -
Slika 7: Kollidon® VA64. Povzeto po (7).....	- 18 -
Slika 8: Soluplus®. Povzeto po (7).....	- 18 -
Slika 9: Primeri zmesi natehtanih na stekelca.....	- 20 -
Slika 10: Primer pripravljene taline	- 21 -
Slika 11: Celoten sistem za izvedbo testa sproščanja(miniaturizirana aparatura USP 2)	- 25 -
Slika 12: Vesla s posodami in ogrevalnim blokom.....	- 26 -
Slika 13: Držala za DSC vzorce	- 27 -
Slika 14: Držalo za DSC vzorec s samim vzorcev v posodi za sproščanje.....	- 27 -
Slika 15: Umeritvena krivulja dipiridamola v mediju s pH = 2	- 28 -
Slika 16: 30% DPD; 5% SDS; KLVA64	- 31 -
Slika 17: 30% DPD; 5% SDS; SOLU	- 31 -
Slika 18: 30% DPD; 10% SPAN 65; KLVA64	- 31 -
Slika 19: 30% DPD; 10% SPAN 65; SOLU	- 31 -
Slika 20: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P407; KLVA64.....	- 32 -
Slika 21: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P407; SOLU	- 32 -
Slika 22: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P188; KLVA64.....	- 32 -
Slika 23: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P188; SOLU	- 32 -
Slika 24: Difraktogram fizikalne zmesi 30% DPD s KLVA64 pred (zelena) in po mletju (rdeča); modra krivulja predstavlja kristaliničen DPD	- 33 -
Slika 25: PLM slika HME vzorca ob času 0 (30% DPD; KLVA64	- 34 -
Slika 26: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih ob času 0 (30% DPD; KLVA64).....	- 34 -
Slika 27: PLM slika DSC vzorca ob času 0 (30% DPD; KLVA64).....	- 34 -
Slika 28: Rezultati preizkusov sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij 30% DPD v KLVA64 ob času čas 0; siva barva predstavlja profil raztapljanja fizikalne zmesi sistema-	- 35 -
Slika 29: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64).....	- 36 -

Slika 30: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64).....	- 36 -
Slika 31: PLM slika DSC vzorca (5 min temperiranja) čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64) ..	- 36 -
Slika 32: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij 30% DPD v KLVA64, 1 mesec 25 °C, 60% RV	- 37 -
Slika 33: PLM slika HME vzorca 2 dni ostri pogoji (30% DPD; KLVA64).....	- 38 -
Slika 34: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih;2 dni ostri pogoji (30% DPD; KLVA64) -	- 38 -
Slika 35: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD; KLVA64; 2 dni 40°C, 100% RV	- 39 -
Slika 36: PLM slika HME vzorca; čas 0 (30% DPD; SOLU)	- 40 -
Slika 37: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih; čas 0 (30% DPD; SOLU)	- 40 -
Slika 38: PLM slika DSC vzorca; čas 0 (30% DPD; SOLU).....	- 40 -
Slika 39: Profil sproščanja DPD za različne vzorce trdnih disperzij 30% DPD v SOLU, čas 0; siva barva predstavlja fizikalno mešanico.....	- 41 -
Slika 40: PLM slika HME vzorca; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU)	- 42 -
Slika 41: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU)	- 42 -
Slika 42: PLM DSC slika vzorca; čas 1 mesec(30% DPD; SOLU).....	- 42 -
Slika 43: Profili sproščanja, 30% DPD v SOLU, 1 mesec 25 °C,60% RV	- 43 -
Slika 44: PLM slika HME vzorca čas 2 dni ostri pogoji (30% DPD; SOLU)	- 43 -
Slika 45: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 2 dni ostri pogoji(30% DPD; SOLU) -	- 43 -
Slika 46: Test sproščanja, 30% DPD; SOLU; 2 dni 40 °C,100% RV	- 44 -
Slika 47: PLM slika HME vzorca čas 0 (30% DPD;5% SDS; KLVA64)	- 45 -
Slika 48: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64) ..	- 45 -
Slika 49: PLM slika DSC vzorca čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)	- 45 -
Slika 50: Profili sproščanja vzorcev trdnih disperzij 30% DPD, 5 %SDS v KLVA64; čas 0; siva barva predstavlja fizikalno zmes sistema.....	- 46 -
Slika 51: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)-slikano s strani	- 47 -
Slika 52: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)-slikano z odbojno svetlobo	- 47 -
Slika 53: PLM DSC vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64).....	- 47 -

Slika 54: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD, 5% SDS v KLVA64, 1 mesec 25 °C, 60% RV; siva barva predstavlja rezultat fizikalne zmesi.....	48 -
Slika 55: PLM slika HME vzorca 2 dni ostri pogoji (30% DPD; 5% SDS; KLVA64).....	49 -
Slika 56: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih 2 dni ostri pogoji (30% DPD;5% SDS; KLVA64)	49 -
Slika 57: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD;5% SDS v KLVA64; 2 dni 40°C, 100% RV	49 -
Slika 58: PLM HME vzorca čas 0 (30% DPD; 5%SDS; SOLU)	50 -
Slika 59: PLM DSC vzorca čas 0 (30% DPD; 5%SDS; SOLU)	50 -
Slika 60: PLM vzorca na steklenih nosilcih čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)	50 -
Slika 61: Profili sproščanja vzorcev trdnih disperzij , 30% DPD, 5% SDS v SOLU; čas 0; siva predstavlja fizikalno zmes sistema	51 -
Slika 62: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; SOLU); 50x povečava....	52 -
Slika 63: PLM slika DSC vzorca čas 1 mesec(30% DPD;5% SDS; SOLU).....	52 -
Slika 64: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; 5%SDS; SOLU)....	52 -
Slika 65: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD, 5% SDS v SOLU, 1 mesec 25 °C, 60% RV; siva barva predstavlja sistem fizikalne zmesi.....	53 -
Slika 66: PLM HME vzorca čas 2 dni ostri pogoji (30% DPD;5% SDS; SOLU).....	54 -
Slika 67: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 2 dni ostri pogoji(30% DPD; 5% SDS; SOLU)	54 -
Slika 68: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD;5% SDS v SOLU; 2 dni 40 °C, 100% RV	55 -
Slika 69: Primerjava profilov sproščanja ekstrudatov vseh štirih mešanic, rezultati ob času 0; svetlo modra barva predstvalja kristalinični DPD.....	57 -

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Metode povečevanja topnost in/ali hitrosti raztapljanja. Povzeto po (7)	2 -
Preglednica 2: Vrste trdnih disperzij. Povzeto po (7)	3 -
Preglednica 3: Metode izdelave trdnih disperzij(1, 3, 9)	4 -

Preglednica 4: Proces taljenja z iztiskanjem z možnimi spremembami sestavnih delov/procesov. Povzeto po (7)	- 5 -
Preglednica 5: Iskanje optimalne koncentracije ZU	- 21 -
Preglednica 6: Preizkusi solubilizacije in izboljšanja stabilnosti z uporabo surfaktantov ...	- 22 -
Preglednica 7: Uporabljene mešanice za iskanje alternativne napovedne metode	- 22 -
Preglednica 8: Uporabljeni temperaturni pogoji pri metodi taljenja z iztiskanjem	- 23 -
Preglednica 9: Temperaturni programi pri uporabi DSC kot analitske metode	- 23 -
Preglednica 10 :Temperaturni programi pri uporabi DSC kot preparativne in analizne metode	- 24 -
Preglednica 11: Parametri izvedbe preizkusa sproščanja.....	- 26 -
Preglednica 12: Rezultati preliminarne testa rekristalizacije	- 30 -
Preglednica 13: Prikaz mešljivosti različnih sistemov ZU in nosilnega polimera ter PAS .	- 31 -
Preglednica 14: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30% DPD; KLVA64)	- 34 -
Preglednica 15: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec(30% DPD; KLVA64)	- 36 -
Preglednica 16: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni (30% DPD; KLVA64)	- 38 -
Preglednica 17: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0(30% DPD; SOLU).....	- 40 -
Preglednica 18: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU).....	- 42 -
Preglednica 19: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni(30% DPD; KLVA64)	- 43 -
Preglednica 20: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64) .	- 45 -
Preglednica 21: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec (30% DPD;5% SDS; KLVA64)	- 47 -
Preglednica 22: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni (30% DPD; 5% SDS; KLVA64) ..	- 49 -
Preglednica 23: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)	- 50 -
Preglednica 24: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec(30% DPD;5% SDS; SOLU)	- 52 -
Preglednica 25: Analiza vzorcev trdnih disperzij, čas 2 dni (30% DPD; 5% SDS; SOLU)-	- 54 -

POVZETEK

V nalogi smo se lotili dveh problemov. Najprej smo želeli izbrano zdravilno učinkovino (dipiridamol) solubilizirati v izbranih polimerih (Kollidon® VA64 in Soluplus®) in jo stabilizirati (preprečiti rekristalizacijo) z uporabo različnih površinsko aktivnih snovi. Da bi potrdili solubilizacijo in zaznali pojav neželene rekristalizacije, smo uporabili metodo steklenih nosilcev in polarizacijski mikroskop, pri čemer smo ugotovili, da nobena od uporabljenih površinsko aktivnih snovi s sistemom ne tvori homogene taline, saj pride do fazne ločitve. V nadaljevanju smo se odločili razviti metodo, ki bi za napoved profila sproščanja in stabilnosti trdnih disperzij, dobljenih z metodo iztiskanja talin, uporabila miligramske količine ZU namesto gramskih. Za namen preverbe različnih pristopov smo uporabili prej omenjeno ZU in oba polimera, poleg tega pa še najbolj perspektivno površinsko aktivno snov iz prvega dela študije, natrijev lavril sulfat. Za izhodišča pri razvoju metod smo izbrali diferenčno dinamično kalorimetrijo kot preparativno in analizno metodo (vzorci smo po analizi pregledali z polarizacijskim mikroskopom ter uporabili v testu sproščanja) in metodo taljenja na steklenih nosilcih (analiza s polarizacijskim mikroskopom in nato uporaba v preizkusu sproščanja). Za vrednotenje fazne ločitve in rekristalizacije vzorca s časom shranjevanja smo izbrali metodi diferenčne dinamične kalorimetrije in polarizirajočega mikroskopa. Preizkus sproščanja smo za izdelane vzorce izvedli z uporabo miniaturizirane USP 2 naprave, pri čemer smo pri vzorcih izdelanih z dinamično diferenčno kalorimetrijo izdelali posebna držala, ki so hidrodinamični sili preprečevala premik vzorca. Da smo lahko alternativni metodi na miligramskem nivoju primerjali z dejanskim postopkom taljenja z iztiskanjem, smo vse preizkušane sestave proizvedli tudi s to metodo. Vse štiri produkte, ki smo jih dobili z metodo iztiskanja talin, smo ovrednotili z vidika profila sproščanja in stabilnosti. Ugotovili smo, da se predformulacijska metoda taljenja na steklenih nosilcih glede na izide vrednotenja vzorcev najbolj približa metodi taljenja z iztiskanjem, tako po profilu sproščanja kot po napovedovanju stabilnosti. Ugotovili smo, da je Kollidon® VA64 polimer, ki veliko bolj poveča topnost in hitrost raztapljanja dipiridamola, pri čemer dodatek natrijevega lavril sulfata hitrost raztapljanja celo zmanjša. Na drugi strani Soluplus® izkaže manjšo topnost in hitrost raztapljanja dipiridamola (v biološko relevantnem času za absorpcijo – 6 h), dodatek natrijevega lavril sulfata pa oba parametra izboljša. Z vidika stabilnosti oz. preprečevanju rekristalizacije je Soluplus® boljši nosilec, ki pri vzorcih v celoti prepreči rekristalizacijo tudi po izpostavitvi ostrejšim pogojem shranjevanja, medtem ko je pri Kollidon® VA64 rekristalizacija vgrajene zdravilne učinkovine popolna.

ABSTRACT

In the following study we tried to solve two problems. Firstly we tried to solubilize a model substance (dipyridamole) in two different polymers (Kollidon® VA64 and Soluplus®) and stabilize it with the use of different surfactants. To find out if the solubilization was successful and to detect recrystallization, we used melting on glass of the chosen mixtures and analyzing them with polarized light microscopy. We found out that none of the used mixtures with surfactants was compatible as all of them exhibited phase separation. Then we decided to develop a mini scale model for predicting the dissolution and stability behaviour of products produced with the hot-melt extrusion method. The method should use milligram quantities instead of gram quantities. For this purpose we used the above mentioned dipyridamole and the two polymers plus the surfactant which gave the best results in the first study, sodium lauryl sulphate. For the development of the methods we used melting on glass (analyzing with polarized light microscopy-PLM and afterwards dissolution testing) and DSC (thermal analysis, PLM and then dissolution testing). For the assessing of recrystallization and phase separation with storage we used polarized light microscopy and dynamic scanning calorimetry. For dissolution testing we used a miniaturized USP 2 apparatus. For the dissolution testing of the DSC samples we produced also glass holders which were able to keep the DSC pan in a steady position (preventing the hydrodynamic force to move the pan). To be able to compare the two alternative methods which used mg amounts with the hot-melt extrusion method in terms of sample stability and dissolution behaviour, we also extruded all mixtures with it. What we discovered after all the experiments is that the preformulation method »melting on glass« resembles the most the stability and dissolution behaviour of the products prepared with the hot-melt extrusion method. We also analyzed which of the four extrudates produced by the hot-melt extrusion gave the best results in terms of stability and improved metastable solubility and rate of dissolution. We discovered that polymer Kollidon® VA64 enhanced the drug solubility and dissolution rate the most, whereby adding the sodium lauryl sulphate decreased both the rate and the solubility. The mixtures with Soluplus® exhibited reduced rate of dissolution and solubility (in time span relevant for absorption - 6h), however the addition of sodium lauryl sulphate increased both. From the stability perspective (drug recrystallization inhibition) Soluplus® is a better matrix, which was demonstrated by a lack of drug recrystallization even in harsh conditions. On the other side, the recrystallization of the samples with Kollidon® VA64 was complete.

SEZNAM OKRAJŠAV

T_g - temperatura steklastega prehoda

T_T - temperatura taljenja

DSC - diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. **D**ifferential **s**canning **c**alorimetry)

PLM - polarizacijski mikroskop (angl. **P**olarization **l**ight **m**icroscope)

XRPD - rentgenska praškovna difrakcija (angl. **X**-ray **p**owder **d**iffraction)

DPD - dipiridamol

KLVA64 - Kollidon® VA64

SOLU - Soluplus®

SDS - natrijev lavril sulfat (angl. **S**odium **l**auryl **s**ulphate)

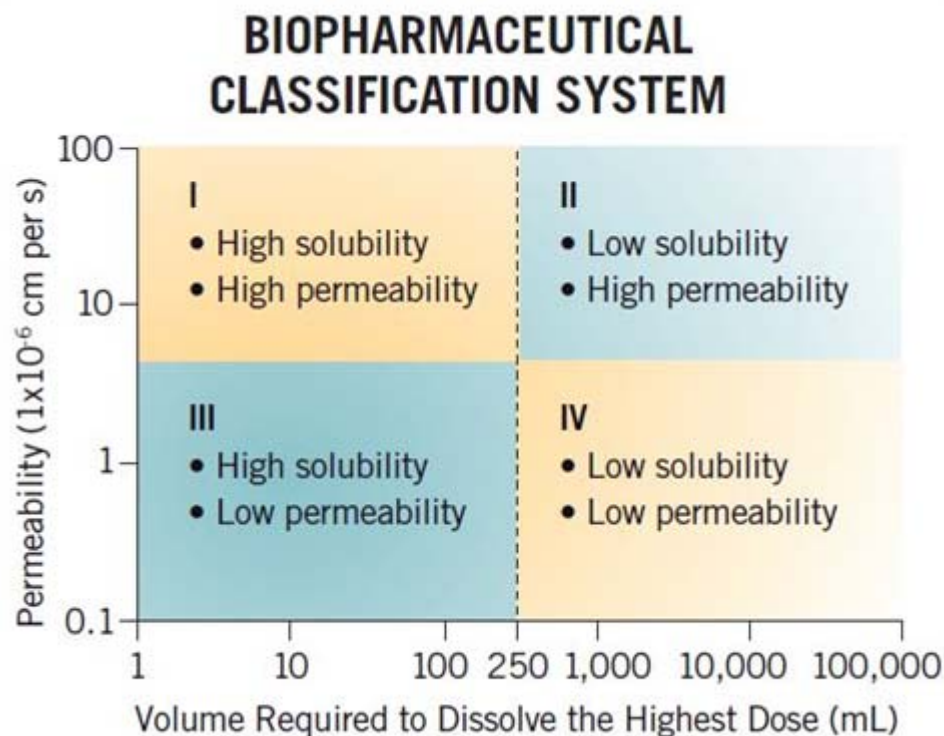
HME - iztiskanje talin (angl. **H**ot-**m**elt extrusion)

RV - relativna vlažnost

PAS - površinsko aktivna snov

1. UVOD

Kljub temu, da se pojavljajo novi načini aplikacije, ki so do pacienta bolj ali manj prijazni, ostaja peroralna pot dostave učinkovin najbolj uporabljana. Peroralna dostava zdravilne učinkovine je najbolj uporabljana predvsem zaradi visoke compliance bolnikov, lahke aplikacije, nizkih stroškov izdelave in prilagodljivosti procesa izdelave (1). V zadnjih desetletjih se vedno več novih odkritih spojin, potencialnih učinkovin uvršča med tiste z relativno slabimi biofarmaceutskimi lastnostmi, še posebej s slabo topnostjo (2). Takih učinkovin je več kot 40% (3). Da lahko učinkovine učinkovito in pregledno ločimo glede na njihove biofarmaceutske lastnosti, uporabljamo biofarmaceutski sistem klasifikacije (BCS) (4). Ta se je izkazal za trenutno najboljšega z vidika napovedovanja *in vivo* obnašanja učinkovine z uporabo *in vitro* modelov. Biofarmaceutski sistem klasifikacije deli učinkovine glede na topnost in permeabilnost na štiri razrede kot prikazuje Slika 1. Ameriška agencija za prehrano in zdravila (FDA) podaja naslednje vrednosti za ločitev učinkovin glede na topnost in permeabilnost. Slabo topna učinkovina je tista, katere največji odmerek ni topen v manj kot 250 mL pufru pri pH-ju med 1 - 6.8. Učinkovina je slabo permeabilna, ko se absorbira manj kot 85% odmerka (5).



Slika 1: Biofarmaceutski sistem klasifikacije. Povzeto po (6)

Učinkovinom, ki so dobro permeabilne, a slabo topne (spadajo v IIa ali IIb razred BCS), lahko biološko uporabnost povečamo tako, da jim povečamo hitrost raztapljanja in/ali topnost in tako zagotovimo, da bo dovolj učinkovine na voljo za prehod skozi gastrointestinalno prepreko. Da to storimo, obstaja več načinov kot prikazuje spodnja preglednica:

Preglednica 1: Metode povečevanja topnost in/ali hitrosti raztapljanja. Povzeto po (7)

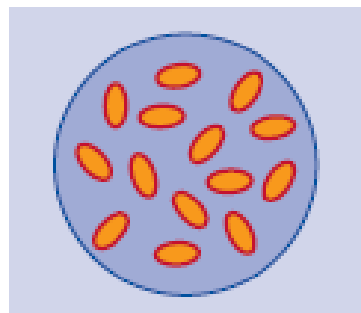
KEMIJSKA SPREMEMBA	FIZIKALNA SPREMEMBA	DOSTAVNI SISTEMI
Tvorba predzdravil	Sprememba polimorfne oblike	Polimerni dostavni sistemi, trdne disperzije
Tvorba soli	Tvorba ko-kristalov	Ciklodekstrini
	Amorfni sistemi	Miceli
	Zmanjšanje velikosti delcev	(Mikro)emulzije
		Samoemulgirajoči sistemi (SMEDDS)
		Liposomi
		Mikrodelci/nanodelci

Katera metoda je najbolj primerna, se odločimo na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, nosilca in pa namena uporabe (1, 3, 7).

1.1 TRDNE DISPERZIJE

Trdne disperzije so definirane kot trdne zmesi, kjer je ena ali več aktivnih komponent dispergiranih v inertnem nosilcu. Trdne disperzije glede na število faz in glede na amorfnost/kristaliničnost posameznih sestavin delimo na več tipov, ki so predstavljeni v Preglednici 2.

Večina formulacij, ki se trenutno nahaja na tržišču spada med amorfne trdne disperzije oz. kot so poimenovane v Preglednici 2, steklaste raztopine, zato lahko termin trdna disperzija uporabimo za le-te (8). Pri tej vrsti disperzij imamo običajno dve komponenti, amorfno učinkovino, ki je molekularno raztopljena v amorfnem nosilcu (ponavadi polimeru), s katerim tvori enofazni sistem, kot prikazuje Slika 2.



Slika 2: Steklasta raztopina. Slika prikazuje molekularno disperzijo. Povzeto po (7)

Preglednica 2: Vrste trdnih disperzij. Povzeto po (7)

TIP TRDNE DISPERZIJE	NOSILEC	UČINKOVINA	ŠTEVILO FAZ
1. Evtetik	kristaliničen	kristalinična	2
2. Amorfní precipitat v kristaliničnem nosilcu	kristaliničen	amorfná	2
3. Trdne raztopine	kristaliničen	molekularno dispergirana	1 ali 2
3.1 Eno- ali več- fazne	kristaliničen	molekularno dispergirana	1 ali 2
3.2 Substitucijske ali intersticijske	kristaliničen	molekularno dispergirana	1 ali 2
4. Steklaste suspenzije	amorfen	kristalinična	2
5. Steklaste suspenzije	amorfen	amorfná	2
6. Steklaste raztopine	amorfen	molekularno dispergirana	1

1.1.1 METODE IZDEVALE TRDNIH DISPERZIJ

Metode izdelave trdnih disperzij delimo v grobem v dve večji skupini, in sicer metode, ki temeljijo na taljenju in metode, ki temeljijo na evaporaciji topila. Poleg tega imamo še kombinirano metodo taljenja in evaporacije topila. V nadaljevanju bo sledil kratek opis vsake metode z večjim poudarkom na dveh metodah, ki sta se predvsem z vidika izdelave večjega obsega najbolj izkazali in sta tako z vidika farmacevtske industrije najbolj uporabni. To sta metodi iztiskanja talin in sušenja z razprševanjem.

Taljenje	Evaporacija topila	Taljenje in evaporacija topila
• Taljenje in nato strjevanje: • s stresanjem na hladni kopeli • s tekočim dušikom • z atomizacijo v zrak s temperaturo nižjo od T_g • v tankih slojih nanešene taline • Taljenje z iztiskanjem • Meltrex® • MeltDose® • KinetiSol® • Granuliranje s talino	• Hlapenje v sušilniku • Evaporacija pri znižanem tlaku • Sušenje z razprševanjem • Sušenje z liofilizacijo • Ko-precipitacija • Elektrostatsko sukanje • Razprševanje v tekoči dušik/mrzel zrak in liofilizacija • Sušenje z uporabo superkritičnih fluidov (CO_2 kot topilo oz. proti topilo) • Oblaganje pelet z raztopino ZU/polimera in sušenje v zračnem toku	• Raztopljena ZU zmešana s staljenim nosilcem

1.1.1.1 METODE S TALJENJEM

1) METODA TALJENJA OZ. FUZIJSKA METODA (angl. melting method, fusion method)

Metoda taljenja oz. imenovana tudi fuzijska metoda vključuje taljenje (navadno dvokomponentne mešanice) nad T_T in ohlajanje na različne načine. Ohlajanje in strjevanje mešanice lahko vršimo na različne načine, in sicer z uporabo tekočega dušika, atomizacije taline v zrak z znižano temperaturo, s stresanjem na ohlajeni kopeli ter nanašanjem taline v tankih slojih na podlago. Glavna prednost tovrstnih metod (metod s taljenjem) je odsotnost uporabe topil (npr. toksičnih, eksplozivnih) ter s tem povezana odsotnost zaostankov topil. Predpogoj za uporabo tovrstnih metod je mešanje ZU in polimera pri temperaturi taljenja ter termostabilnost uporabljenih komponent pri T_T (1, 3, 7).

2) METODA IZTISKANJA TALIN (angl. Hot-Melt Extrusion)

Metoda iztiskanja talin je metoda, ki je znana že nekaj časa, vendar se je v preteklosti uporabljala predvsem za izdelavo plastičnih materialov. V farmacevtski industriji se je metoda prvič pojavila v devetdesetih letih. Proces lahko razdelimo na 3 faze, torej (10):

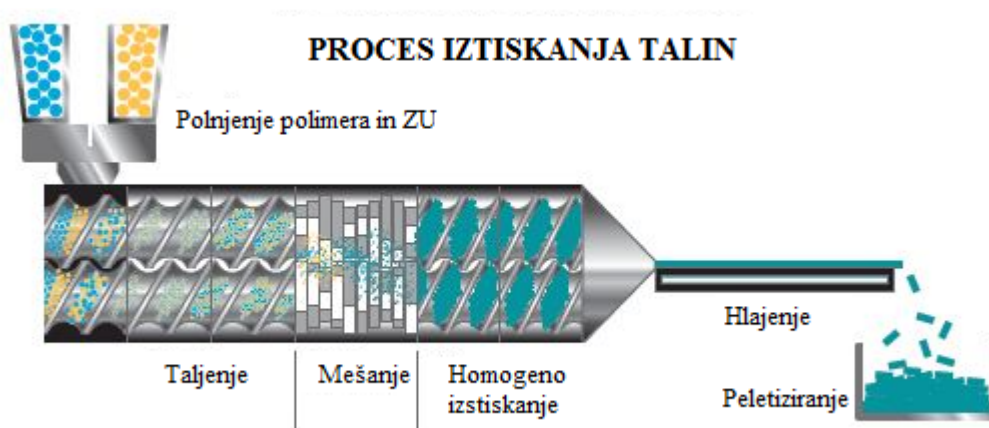
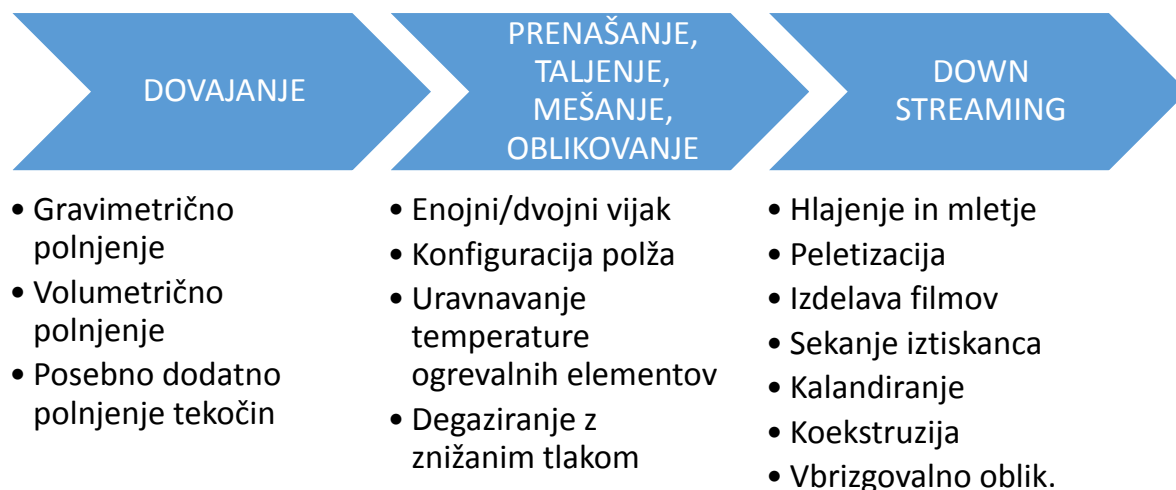
1. dovajanje materiala,
2. transport, taljenje, mešanje in oblikovanje z iztiskanjem.
3. Nadaljnja obdelava nastalega iztiskanca.

Energija, potrebna za tvorbo taline, je v primeru iztiskanja talin dovedena predvsem iz strižnih napetosti, ki jih povzročijo polži naprave za iztiskanje, nekaj pa tudi iz povišane temperature ogrevalnih elementov ekstruzijskega kanala. Končni produkt bo poleg izbire materialov odvisen tudi od uporabljenih procesnih elementov ter od nastavljivih parametrov. Ti so:

1. temperatura ogrevalnih elementov,
2. hitrost polžev,
3. hitrost polnjenja.

Preglednica 4 predstavlja možnosti, ki jih imamo pri prirejanju procesa, medtem ko je Slika 3 shematski prikaz, kaj se dogaja z zmesjo od polnjenja do končnega produkta, katerega lahko vgradimo v različne FO.

Preglednica 4: Proces taljenja z iztiskanjem z možnimi spremembami sestavnih delov/procesov. Povzeto po (7)



Slika 3: Proces iztiskanja talin. Povzeto po (6)

1. POLNJENJE

Dovajanje materiala vršimo na dva načina, in sicer volumetrično in gravimetrično. Za raziskovalne namene je volumetrično polnjenje dovolj natančno (natančnost med 1-5%). V kolikor želimo bolj točno dovajanje mešanice, uporabljamo gravimetrično polnjenje (do 1% natančnost), kjer imamo tudi možnost beleženja zgodovine polnjenja, kar potrebujemo v okolju z uvedeno dobro proizvodno prakso (7, 10).

2. TRANSPORT, TALJENJE, MEŠANJE, OBLIKOVANJE

Izbiramo lahko med napravami z enim ali dvema polžema. Izbira dveh polžev nam omogoča različne konfiguracije polža vzdolž osi. Med drugim lahko izbiramo tudi med tem ali se bosta vijaka vrtela v isti smeri ali v nasprotnih smereh. Najpogostejša izbira v farmacevtski industriji je dvovijačna naprava s polžema, ki se vrtita v nasprotnih smereh. To pa zato, ker izkazuje dvovijačni sistem v primerjavi z enovijačnim (7):

- lažje polnjenje zmesi,
- višji potencial gnetenja,
- višji potencial mešanja,
- krajše in bolj konstantne čase zadrževanja zmesi,
- manjšo verjetnost za pregrevanje.

Večina sistemov nam omogoča tudi spreminjanje (dodajanje, odzemanje) posameznih segmentov polža in na ta način vplivanje na gnetenje, mešanje ter posledično na lastnosti nastalega produkta (7).

Območje vijakov delimo glede na funkcijo, ki jo opravljajo, na sedem delov. Nekateri elementi opravljajo samo določeno nalogo, drugi pa kombinacijo različnih nalog. Funkcije posameznih segmentov polža vzdolž ekstruzijskega kanala so naslednje (7):

- 1) polnjenje praškaste zmesi (transport in stiskanje prahov, odstranjevanje zraka),
- 2) taljenje in plastifikacija (mehčanje polimera, pred-disperzija ZU),
- 3) prenašanje taline,
- 4) območje distributivnega mešanja (homogenost porazdelitve ZU v polimeru),
- 5) območje disperzivnega mešanja (razbitje morebitnih aglomeratov, solubilizacija ZU),
- 6) območje odstranjevanje hlapnih substanc (voda, rezidualni monomeri, topila),
- 7) območje povišanega tlaka (višanje tlaka z namenom dosega iztiskanja).

Na koncu ekstruzijskega kanala sledi ekstruzijska glava z iztisno matrico, s katero lahko izberemo poljubno obliko in debelino nastalih ekstrudatov.

3. POSTPROCESIRANJE

Ekstrudate v nadaljnjem postopku obdelamo. Ohladimo jih (npr. s stiskanjem s hlajenimi valji) ter režemo na delce poljubnih velikosti (peletiziranje, večji valji - tablete) oz. jih zmeljemo. V nadaljnjem postopku lahko pridobljene produkte tabletiramo (tablete s takojšnjim ali prirejenim sproščanjem) ali polnimo v kapsule. Z vbrizgovalnim oblikovanjem izdelamo implantate in transdermalne dostavne sisteme. Obstaja tudi možnost kalandiranja, se pravi direktne izdelave tabletam oz. kapsulam podobnih oblik. To dosežemo z dvema nasproti vrtečima si valjema, ki vsebujeta vdolbine želene velikosti in oblike končnega izdelka (3, 7).

Metodo taljenja z iztiskanjem odlikuje v primerjavi z ostalimi tehnologijami talin predvsem neprekinjeno delovanje, možnost on-line spremljanja spremenljivk, kratek čas zadrževanja ZU pri povišani temperaturi, učinkovitost, relativno enostaven prehod na proizvodnjo večjega obsega, zmanjšano število procesnih korakov in visoka gostota dobljenih produktov (3, 7).

Znotraj tehnologije iztiskanja talin so se razvile različne patentirane metode, kot so npr. Meltrex®, MeltDose®, KinetiSol®, kar priča o potencialu tehnologije na področju izdelave zdravil (9).

3) GRANULIRANJE S TALINO (angl. melt agglomeration)

Pri granuliranju s talino uporabljamo hitrovrteče mešalnike (angl. high shear mixer) ali vrtinčnoslojne granulatorje, poleg komore z razprševanjem od zgoraj pogosto še komoro z vrtečo tornjo ploščo (angl. rotary processor). Navadno je vrtinčnoslojni pristop bolj uporabljan zaradi lažjega spremljanja in nadzora temperature produkta. Sam proces lahko poteka na tri različne načine (3):

- Staljen nosilec in ZU dodamo segretim pomožnim snovem v mešalniku.
- Staljen nosilec dodamo segretim pomožnim snovem in ZU.
- Nosilec, pomožne snovi in ZU segrejemo nekoliko nad temperaturo tališča nosilca.

1.1.1.2 METODE Z UPORABO TOPIL

Metode z uporabo topil, kot že ime pove, temeljijo na raztapljanju ZU in polimera v ustreznem topilu, ki ga nato odstranimo. Da ga odstranimo lahko uporabimo odparevanje pri

sobni T, sušenje z razprševanjem, liofilizacijo, odparevanje pri znižanem tlaku, elektrostatsko sukanje, ko-precipitacijo ali uporabimo proti-topilo (9).

Prednost tovrstnih metod je, da ne uporabljamo visokih temperatur in so kot take primerne za termolabilne učinkovine. Poleg tega lahko v tem primeru uporabljamo nekatere polimere, ki za metodo taljenja niso primerni zaradi visoke T_T . Glavne slabosti pristopa pa so predvsem povezane z uporabo topil, ki so draga, lahko eksplozivna ter lahko ostajajo v končnem produktu (problem zaostanka topil). Poleg tega je problematična tudi fazna ločitev, ki lahko nastane pri izhlapevanju topila ter izbira topila, saj mora topiti tako ZU (navadno hidrofozna) kot polimer (hidrofilen). Najpogosteje uporabljena topila so metanol, etanol, etil acetat, voda, metilen klorid in aceton (3, 9). V nadaljevanju bo sledil kratek opis posameznih metod.

1) SUŠENJE PRI ZNIŽANEM TLAKU (angl. vacuum drying)

Ker se pri povišani temperaturi mobilnost molekul topljenca poveča in tako tudi verjetnost za njegovo fazno ločitev, lahko s sušenjem pri znižanem tlaku to preprečimo. Poleg tega nam nižji tlak (in posledično nižja T sušenja) prepreči morebiten razpad termolabilne ZU. Ker gre vseeno za relativno dolg proces, se lahko pri tem pojavi tudi rekristalizacija amorfnega precipitata (3).

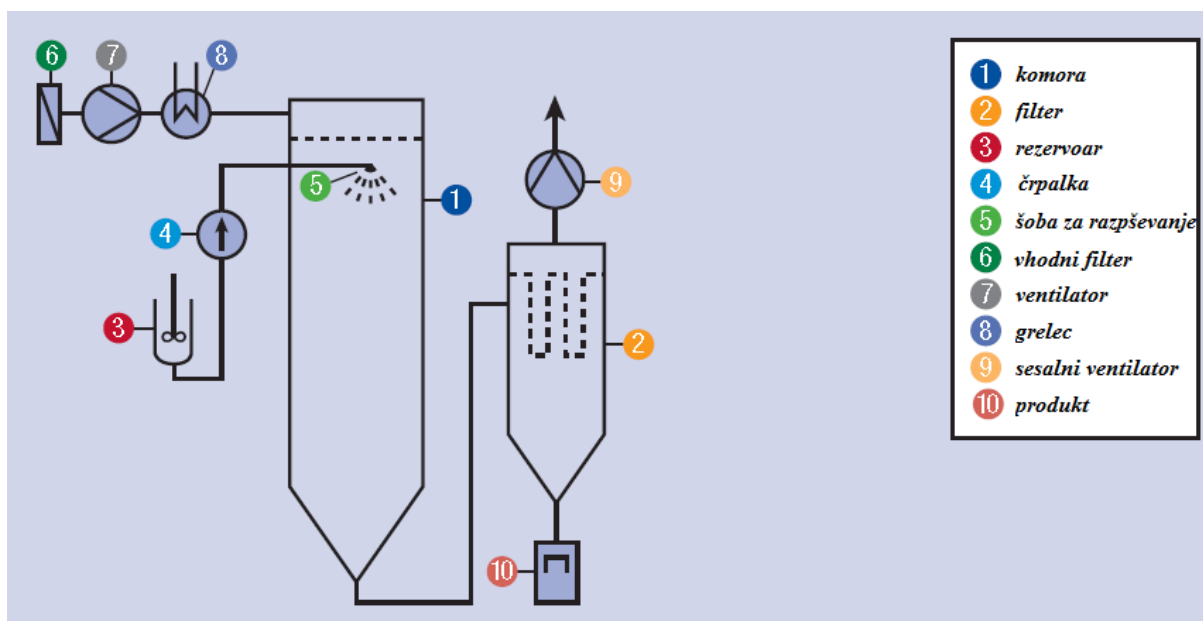
2) SUŠENJE Z RAZPRŠEVANJEM (angl. spray drying)

Sušenje z razprševanjem je najbolj uporabljana metoda med pristopi izdelave trdnih disperzij. Raztopino oz. disperzijo učinkovine in polimera v topilu preko črpalke dovajamo do šobe, kjer jo nato razpršujemo v sušilno komoro z zrakom povišane temperature. Kapljice, ki pri tem nastanejo, imajo veliko specifično površino, kar omogoča izhlapevanje topila v nekaj sekundah. Trden produkt, ki pri tem nastane, iz toka zraka odstranimo s cikloni oz. filtri. Ker se toplota, ki jo dovajamo, v večini porablja za izhlapevanje topila, je metoda relativno neobremenilna za ZU. Produkt, ki ga bomo dobili, je odvisen od izvedbe sušilne komore (sotočno razprševanje, protitočno razprševanje) ter od procesnih pogojev (3, 7, 9).

Metodo odlikujejo nizka termična obremenitev učinkovine, visoka zmogljivost, proces lahko teče kontinuirano. Postopek je enostopenjski od raztopine/suspenzije do končnega produkta; prašek, ki nastane lahko neposredno uporabimo za vgradnjo v trdne peroralne FO, odlikuje ga dobra homogenost trdne disperzije. Slabosti tehnologije vključujejo: visoke obratovalne stroške naprave in posledično visoke stroške materialov, težaven prehod iz proizvodnje

manjšega obsega na proizvodnjo večjega obsega z vidika zagotavljanja porazdelitve velikosti kapljice, občutljivost nastalega praška na vlago (3, 7).

Poleg klasičnega sušenja z razprševanjem obstaja tudi sušenje z razprševanjem v tekoči dušik oz. mrzel zrak (angl. spray freeze drying). Dobljene zmrznjene kapljice, ki jih dobimo po razprševanju, nato liofiliziramo. Takojšnja pretvorba raztopine/disperzije v trdno snov (vitifikacija) zmanjša možnost fazne ločitve in kristalizacije na najnižjo možno raven (3).



Slika 4: Shema naprave za sušenje z razprševanjem. Prirejeno po (6)

3) SUŠENJE Z ZAMRZOVANJEM - LIOFILIZACIJA (angl. freeze drying)

Pri sušenju z zamrzovanjem oz. liofilizaciji se termična obremenitev zmanjša na minimum, metoda je tako primerna za najbolj termolabilne ZU. Pri postopku je pomembna dovolj velika hitrost zamrzovanja, saj lahko napačno izbrana hitrost privede do ločitve faz trdne disperzije. Raztopino navadno potopimo v tekoči dušik, dokler ni popolnoma zamrznjena ter jo nato liofiliziramo. S to metodo dobimo zelo porozno strukturo produkta, kar pomeni, da imamo veliko specifično površino in posledično hitro raztapljanje, vendar je metoda problematična, ker ima večina uporabljenih topil zelo nizke temperature zamrzovanja, zaradi česar ne ostane zamrznjenih med sublimacijo. Poleg tega je zaželeno, da ima topilo visok parni tlak (3, 9).

4) SUŠENJE Z UPORABO SUPERKRITIČNIH FLUIDOV (angl. supercritical fluid technology)

Pri sušenju z razprševanjem najpogosteje uporabimo tekoči ogljikov dioksid kot topilo oz. proti-topilo s superkritičnimi lastnostmi. Superkritični fluid je tekoča oblika plina, ki ga

dobimo nad kritično temperaturo in kritičnim tlakom plina. Pri uporabi superkritičnega CO₂ kot topila najprej raztopimo ZU in polimer v CO₂ in nato razpršimo v prostor z nižjim tlakom. Sprememba tlakov povzroči spremembo superkritične faze CO₂ v plinasto fazo in nastanek delcev trdne disperzije. V primeru uporabe CO₂ kot proti-topila skozi šobo hkrati spustimo superkritični CO₂ in raztopino polimera v organskem topilu. Prehod organskega topila v CO₂ povzroči obarjanje delcev in nastanek trdne disperzije (3).

5) ELEKTROSTATSKO SUKANJE (angl. electrospinning)

Pri elektrostatskem sukanju raztopino ZU in polimera namestimo v brizgo z mikro iglo, na katero apliciramo visok električni potencial (med 5-30kV), kar posledično povzroči napetost na površini raztopine, ki zapušča iglo. Ko je električna sila večja od sile površinske napetosti, se ustvari tok raztopine proti zbiralu. Topilo raztopine na poti do zbirala zaradi visoke specifične površine niti efektivno izhlapeva, posledično dobimo na zbiralu vlakna trdne disperzije submikronskih do nanometrskih premerov. Lastnosti vlaken bodo odvisne od površinske napetosti raztopine, dielektrične konstante raztopine, volumskega toka kapljevine, moči električnega polja, razdalje med iglo in zbiralom kot tudi T, relativne vlage zraka in morebitnega zračnega toka (1, 11).

6) KO-PRECIPITACIJA (angl. co-precipitation)

Ko-precipitacija je metoda, kjer najprej raztopimo polimer in ZU v topilu, nato pa uporabimo protitopilo, ki povzroči obarjanje polimera in ZU in tvorbo amorfne trdne disperzije. Nastale delce imenujemo mikroobarjeni prašek (angl. microprecipitated bulk powder), ki ga s filtrom ločimo od protitopila ter speremo, da odstranimo morebitne ostanke topila. Po spiranju prašek še posušimo. Prednost metode je izogib višjim temperaturam med procesom ter to, da ni potrebno, da so topila/protitopila hlapna. Velja omeniti, da lahko včasih zaostanki topila oz. protitopila delujejo kot plastifikatorji in tako povzročijo hitrejšo kristalizacijo ene ali obeh faz trdne disperzije (3).

1.1.1.3 METODA S TALJENJEM IN IZHLAPEVANJEM TOPILA (angl. Melting-solvent method)

Pri tej metodi uporabljamo kombinacije obeh prej omenjenih skupin metod. Najprej ZU raztopimo v ustreznem topilu, nato pa raztopino pomešamo s staljenim polimerom, čemur sledi odstranitev topila in solidifikacija sistema. Za razliko od metod s taljenjem je tu

učinkovina krajši čas izpostavljena povišani temperaturi, zaradi česar zmanjšamo možnost termičnega razpada (3).

1.1.2 MEHANIZEM SPROŠČANJA

V splošnem poteka sproščanje pri trdnih disperzijah po mehanizmu supernasičenja in počasnega prehoda k ravnotežni topnosti učinkovine. Učinkovina tvori v prvem delu, zaradi višjega energijskega stanja v trdni disperziji, supernasičeno raztopino. Ko enkrat učinkovina doseže vrh, se začne počasen prehod k stanju ravnotežne topnosti učinkovine. K upočasnjem precipitiranju že raztopljene učinkovine pripomore polimer. Bolj kot je polimer učinkovit pri zaustavljanju precipitacije, bolj je del krivulje prehoda k ravnotežni topnosti položen (8). Glede na tip disperzije se lahko sproščanje odvija po treh različnih mehanizmih.

1. Učinkovina se hitro raztopi in tvori supernasičeno raztopino, nato pa se začne ponovno obarjati v obliki nanodelcev, kjer je amorfna ali kristalinična ZU ujeta v polimerni matriks.
2. V drugem primeru pride do počasnega sproščanja ZU in polimera. ZU je v neraztopljenih delcih v amorfnem stanju.
3. Tretji primer je enak kot drugi, le da pride v tem primeru na površini neraztopljenih delcev do kristalizacije (1, 8).

1.1.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI TRDNIH DISPERZIJ

1.1.3.1 PREDNOSTI TRDNIH DISPERZIJ

Glavna prednost trdnih disperzij je izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja zdravilne učinkovine. Amorfna učinkovina je v višjem energijskem stanju, zaradi česar ni potrebe po dodatni energiji pri njeni solvataciji, ki bi porušila strukturo kristalne rešetke (12).

Medtem, ko smo pri drugih metodah zmanjševanja delcev omejeni na velikost 2-5 μm , lahko dosežemo pri trdnih disperzijah fazo učinkovine velikostnega razreda molekul. Slabo topna učinkovina je tako raztopljena v vodi dobro topnem nosilcu. Na ta način se bo polimer hitro raztopil, učinkovina pa bo zaradi molekulske disperzije nudila veliko površino za raztapljanje (3, 12).

Ob pravilni izbiri polimera pri posamezni učinkovini lahko dosežemo boljšo stabilnost zaradi interakcij, ki jih polimer tvori z učinkovino (H-vezi, hidrofobne interakcije) (3). Poleg tega prepletene verige polimera ovirajo gibanje molekul ZU (1).

Ob pravilni izbiri polimera lahko tudi podaljšamo fazo povečane metastabilne topnosti. Če pride po tvorbi supernasičene raztopine do obarjanja, so delci, ki pri tem nastanejo, submikronskih velikosti in kot taki omogočajo hitro raztapljanje, v kolikor pride do zmanjševanja koncentracije zaradi absorpcije učinkovine *in vivo* (3).

Zvečanju topnosti pripomore lastnost nekaterih polimerov, da so površinsko aktivni in tako izboljšajo močenje ZU. Bolj bo polimer površinsko aktiven, boljše bo močenje (12).

Odvisno od uporabljene metode nam trdne disperzije omogočijo tudi izdelavo poroznih struktur (predvsem metode z izparevanjem topila). Poleg same uporabljene metode vpliva na poroznost tudi izbira polimera, in sicer linearni polimeri omogočijo nastanek bolj poroznih struktur (3, 12).

1.1.3.2 SLABOSTI TRDNIH DISPERZIJ

Dominantni problem, s katerim se srečujemo pri trdnih disperzijah in zaradi katerega na trgu ni več produktov s trdnimi disperzijami, je stabilnost amorfne učinkovine. Ker je učinkovina v amornem stanju v višjem energetske stanju, ima težnjo po prehodu v nižje energetske stanje, t.j. v kristalinično stanje. Glavna faktorja, ki vplivata na potek kristalizacije sta T shranjevanja in relativna vlaga. Vlaga vpliva z zniževanjem T_g amorfa, temperatura pa z večanjem gibljivosti molekul. Pri T, ki je za več kot 50 °C nižja od T_g, prihaja le do lokalne mobilnosti (gibajo se samo deli molekul). Pri višjih temperaturah pa imamo opravka s tako imenovano globalno mobilnostjo, kjer pride do gibanja celotnih molekul (3).

Drugi izziv, s katerim se srečujemo pri trdnih disperzijah, je povezan z uporabljenimi metodami za proizvodnjo le-teh. Pri metodah taljenja imamo pri povišani temperaturi težave s termolabilnimi ZU. V kolikor uporabimo eno izmed metod odparevanja topil, pa se srečamo z morebitnim zaostankom topil v končnem proizvodu ter z visokimi stroški proizvodnje zaradi uporabe velike količine topil (3).

Težavo povzročata tudi vzdrževanje metastabilne topnosti ter slaba *in vitro* - *in vivo* korelacija, zaradi kompleksnosti procesa nastanka supernasičene raztopine in nato obarjanja ter ponovnega raztapljanja ob absorpciji učinkovine (3).

1.1.4 ANALITSKE METODE ZA ANALIZO TRDNIH DISPERZIJ

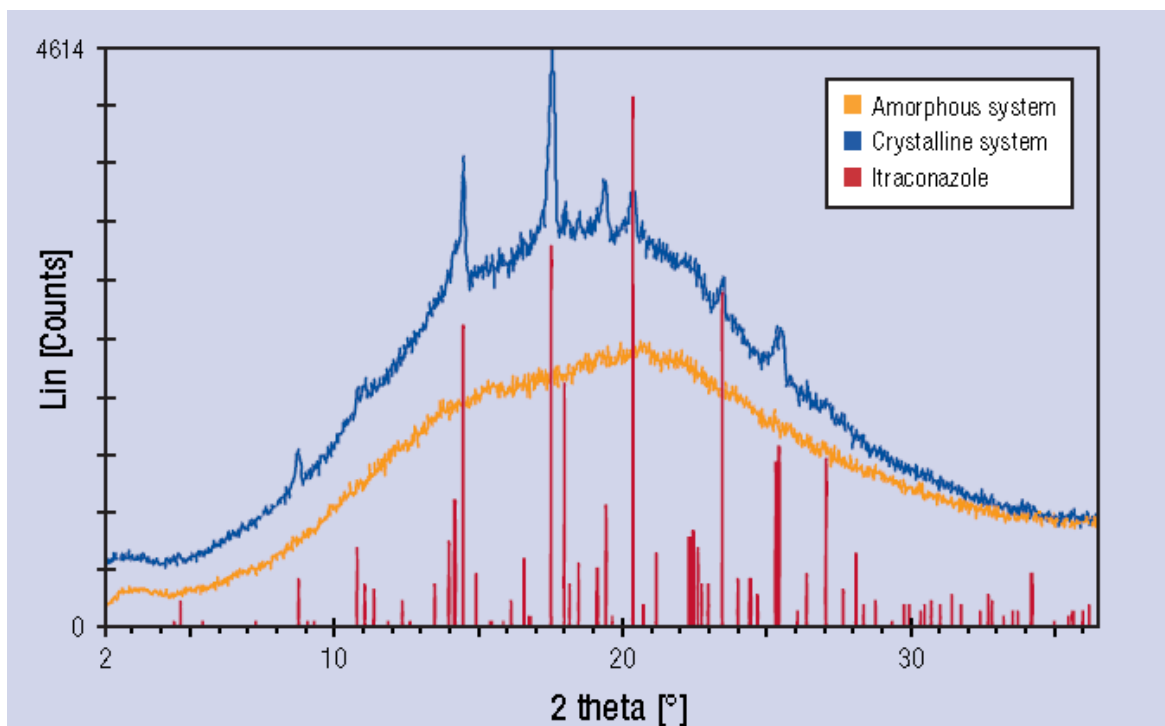
Glavna metoda, s katero vrednotimo izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja trdnih disperzij, je test sproščanja. Poleg prej navedenih lastnosti, ki so bistvene za biološko

uporabnost, želimo pri trdnih disperzijah preveriti tudi fizikalno stanje ZU (% kristaliničnosti), interakcije med ZU in polimerom (vpliv na stabilnost, hitrost raztapljanja, mehanizem raztapljanja) ter fizikalno in kemijsko stabilnost same trdne disperzije. Da dobimo celotno sliko trdne disperzije, moramo v večini primerov uporabiti vsaj dve metodi, velikokrat tudi veliko več. V nadaljevanju bo sledil opis največkrat uporabljenih analitskih metod (1, 3, 7).

1.1.4.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (angl. X-ray powder diffraction oz. XRPD)

Rentgenska praškovna difrakcija temelji na Braggovem zakonu, ki pravi, da se vpadni žarki po interakciji z vzorcem odbijejo pod kotom, ki je odvisen od razdalje med molekulami v vzorcu. V kolikor bo vzorec kristaliničen, bodo razdalje med molekulami enake, kar bo privedlo do ojačanja signala pri določeni vrednosti kota (konstruktivna interferenca). Dobimo tako imenovano območje prstnega odtisa določene snovi (angl. fingerprint region). V kolikor imamo amorfen vzorec, kjer so molekule porazdeljene naključno, bo prišlo do difuznega odboja vpadnega žarka na vse strani, kar bo pomenilo, da ne bo prišlo do značilnih vrhov (destruktivna interferenca). Ta lastnost rentgenske difrakcije nam omogoča, da lahko ločimo med amorfno in kristalinično snovjo ter razmerjem med njima pri istovrstni snovi. Poleg same kristaliničnosti lahko ločimo tudi med različnimi polimorfnimi oblikami, v kolikor do njih pride. Vseeno pa je metoda problematična pri manj kot 5-10% kristaliničnosti v vzorcu, saj ni dovolj občutljiva (1, 7, 13).

Na spodnji sliki (Slika št. 5) so prikazani trije različni sistemi. V rdečem imamo čisto kristalinično ZU, v modrem kristalinični sistem fizikalne zmesi z nosilcem, v rumenem pa amorfno trdno disperzijo. Kot vidimo se vrhovi pri fizikalni zmesi obdržijo (relativne intenzitete ter položaj), vendar so absolutne intenzitete manjše, medtem ko pri amorfnem sistemu ti popolnoma izginejo (7).



Slika 5: Primer praškovne difrakcije. Povzeto po (6)

1.1.4.2 TERMOANALITIČNE IN TERMOGRAVITEMTRIČNE ANALIZE

Najpogostejše termične analize v povezavi s trdnimi disperzijami so DSC oz. diferenčna dinamična kalorimetrija, njena izpeljanka mDSC oz. modulirana diferenčna dinamična kalorimetrija ter TGA oz. termogravimetrična analiza. Slednje se uporablja predvsem za določanje hidratov/solvatov ter temperature degradacije (5, 14).

DSC meri razliko toplotne kapacitete med vzorcem in referenco v odvisnosti od T in časa. Omogoča nam določitev T_g , T_f ter procesov faznega prehoda, kot so kristalizacija in fuzija. Čeprav gre za relativno občutljivo metodo, ne moremo zaznati manj kot 2% kristaliničnosti (3).

Nadgradnja DSC tehnike je mDSC. Pri tej izvedbi T ni konstantna (izotermni pogoji) oz. se linearno spreminja (dinamični pogoji), ampak osnovnemu programu dodamo sinusoidno nihanje temperature, ki je superponirano na izbrani časovno opredeljen temperaturni gradient. Ker niha temperatura, posledično niha tudi toplotni tok. Iz mDSC termograma dobimo tako tri signale, celokupni toplotni tok, reverzibilni in ireverzibilni toplotni tok. Metoda je zaradi tega bolj občutljiva, ima večjo resolucijo kot klasičen DSC ter nam omogoča ločitev relaksacij, kristalizacij, evaporacij in termičnih razpadov (ireverzibilni procesi) ter taljenja in steklastega prehoda (reverzibilni procesi), tudi če se tej prekrivajo (3, 15).

1.1.4.3 MIKROSKOPSKE METODE

Med mikroskopske metode za analizo trdnih disperzij uvrščamo polarizacijski mikroskop (angl. PLM-polarized light microscopy), vrstični elektronski mikroskop (angl. SEM-scanning electron microscopy) in mikroskop na atomsko silo (AFM-atomic force microscopy).

PLM se uporablja, ker nam omogoča hitro in učinkovito detekcijo majhnih količin kristalov v vzorcu. Uporablja se predvsem v začetnih fazah razvoja trdnih disperzij, še posebej v povezavi z uporabo metode z nanašanjem filmov (angl. film casting method) (16).

SEM uporablja snop hitrih elektronov za analizo vzorca. Iz dobljenega posnetka dobimo informacije o strukturnih lastnostih površine vzorca (16). Za analizo površine lahko uporabimo tudi AFM analize, ki je sicer počasnejša metoda, uporablja pa tipalo na ročici za »tipanje« vzorca (med tipalom in vzorcem se tvorijo šibke sile, ki uklonijo ročico) (7).

1.1.4.4 SPEKTROSKOPSKE METODE

Furierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija (angl. FTIR-furier transform infrared spectroscopy), ramanska spektroskopija ter jedrska magnetna resonanca trdne snovi (angl. ssNMR-solid state nuclear magnetic resonance) so najpogostejše uporabljene spektroskopske metode za analizo trdnih disperzij (7).

FTIR in ramanska spektroskopija se uporabljata za identifikacijo polimerov, faznih prehodov, rekristalizacije, ovrednotenja vzorcev različnih metod za proizvodnjo trdnih disperzij in predvsem za razumevanje jakosti in vrste interakcij med ZU in nosilcem. Poleg tega ima ramanska spektroskopija še nekatere prednosti, in sicer nam omogoča vpogled v notranjo strukturo molekul in kristalov ter lahko (v kombinaciji z nekaterimi metodami za analizo rezultatov) zazna kristaliničnost vse do 0.2% (3, 9, 17).

SsNMR nam, za razliko od prej omenjenih metod, omogoča razlikovati med tem ali imamo amorfne domene ZU oz. skupke znotraj amorfnega polimera (trdna disperzija) oziroma ali je ZU homogeno molekularno dispergirana (trdna raztopina). V prvem primeru bomo dobili različne relaksacijske čase za ZU in polimer, medtem ko bomo v drugem primeru dobili samo en relaksacijski čas. Iz relaksacijskih časov lahko nadalje sklepamo tudi na velikost amorfnih domen (7, 9).

2. NAMEN DELA

Cilj magistrske naloge bo najprej najti kombinacijo in delež učinkovine (dipiridamol, II. razred BCS) z enim ali več nosilnih polimerov za tvorbo amorfne trdne disperzije, v kateri bomo poizkusili to učinkovino (dipiridamol) dodatno solubilizirati oz. stabilizirati z uporabo površinsko aktivnih snovi. Vzorce trdnih disperzij bomo v tem preliminarnem izboru pripravili s tehniko taljenja na steklenih nosilcih. Izbrano/izbrane trdne disperzije bomo nato izdelali s tehnologijo iztiskanja talin. Preverili bomo, ali imajo trdne disperzije izboljšano topnost in hitrost raztapljanja v primerjavi s fizikalnimi zmesmi ter poiskali razlike med tistimi z in tistimi brez surfaktanta. Poleg tega bomo preučevali stabilnost z vidika rekristalizacije ter fazne ločitve.

Ker velikokrat nimamo na voljo večjih količin ZU (za metodo taljenja z iztiskanjem potrebujemo vsaj cca. 30 g zmesi) želimo poiskati metodo, s katero bomo proizvedli amorfno trdno disperzijo, ki bo z uporabo zelo majhnih količin surovin (ZU in polimera) v čim boljši meri napovedala sproščanje in stabilnost produktov dobljenih z metodo iztiskanja talin (tako imenovani mini-scale modeli oz. modeli majhnega obsega). Uporabljene metode priprave vzorcev trdnih disperzij bodo metoda taljenja na steklenih nosilcih ter DSC metoda.

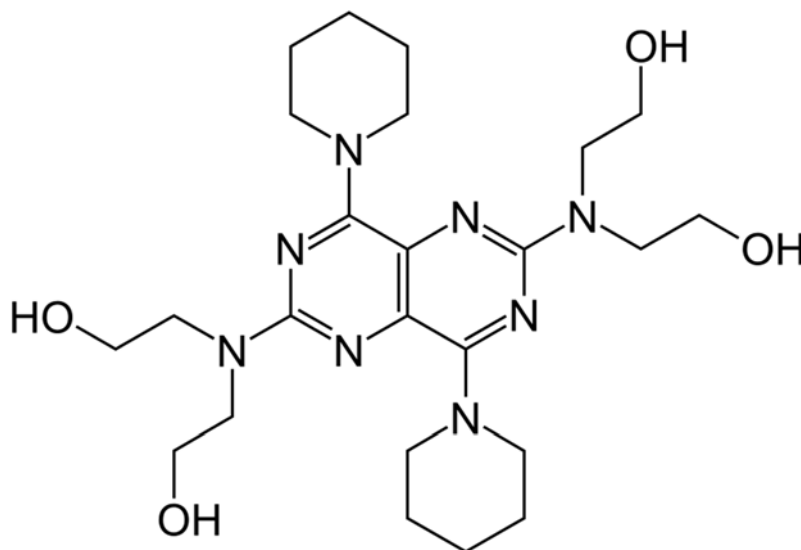
Izbrana učinkovina 2. razreda BCS bo dipiridamol, izbrana polimera Kollidon® VA64 in Soluplus® ter različni surfaktanti. Za preliminarne teste bomo uporabili metodo taljenja na stekelcih oz. steklenih nosilcih.

Za preverjanje sproščanja bomo uporabili posebej oblikovano napravo za sproščanje, v kateri lahko uporabimo manjše količine vzorcev (mini-diss). Za DSC vzorce bomo poskušali izdelati držala, ki bodo držala DSC posodico z vzorcem na mestu. Da bi preverili vpliv krogličnega mletja na fizikalno zmes, bomo uporabili XRPD. Za opazovanje stabilnosti z vidika fazne ločitve ter rekristalizacije bomo uporabili DSC ter polarizacijski mikroskop. Pospešeni stabilnostni študiji bomo izvedli pri bolj milih (25 °C in 60% RV) in pri bolj ostrih (40 °C in 100% RV) pogojih.

3.MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

- Zdravilna učinkovina
 - o Dipiridamol



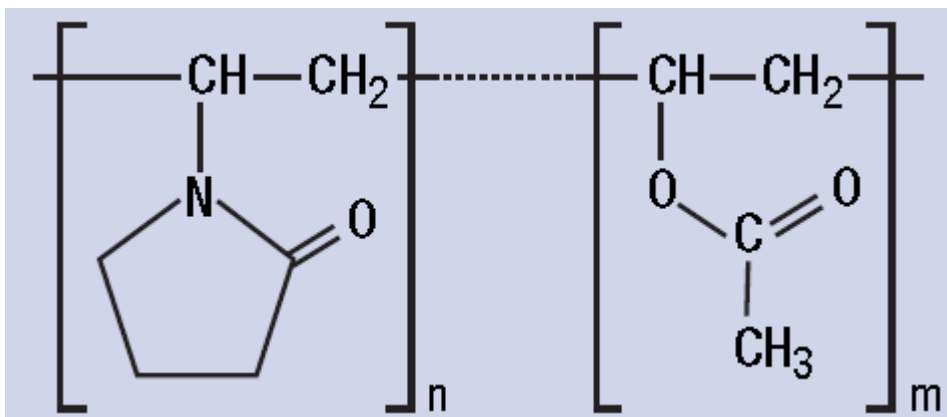
Slika 6: Dipiridamol. Povzeto po (18)

Dipiridamol je rahlo rumen, kristaliničen prašek. Je praktično netopen v vodi, dobro topen v acetonu in topen v brezvodnem etanolu (19).

Po literaturi je temperatura taljenja dipiridamola med 163 °C in 166 °C (20). Je šibka baza s pKa vrednostjo 6,4, zaradi česar je topnost zelo odvisna od pH-ja. Je dobro topen v kislem območju do pH-ja 4, ko pa se bližamo fiziološkemu pH-ju, se topnost drastično zmanjša. Je relativno dobro permeabilen, zaradi česar ga uvrščamo v 2. razred BCS sistema (21). Ima dve polimorfni obliki, pri čemer je prva oblika stabilna pri sobni temperaturi, po taljenju in ponovni ohladitvi na sobno temperaturo, pa dobimo polimorf številka II (22).

Dipiridamol se z ostalimi antikoagulantmi uporablja za preprečevanje tromboze pri pacientih, ki so imeli predhodno možgansko ishemijo ali ishemično kap zaradi tromboze. Mehanizem delovanja dipiridamola je večplasten. Temelji na zaviranju privzema adenoze v eritrocite, trombocite in endotelijske celice. To povzroči lokalno povečanje adenoze, ki z delovanjem na trombocitni receptor A2 spodbuja tvorbo cikličnega adenozinmonofosfata (cAMP). Poleg tega inhibira encim fosfodiesterazo v različnih tkivih. Na ta način v manjši meri zmanjša razgradjo cAMP-ja, po drugi strani pa preko zaviranja gvanozinmonofosfat-fosfodiesteraze povzroči relaksacijo gladkih mišic endotelija žil. Dipiridamol poveča tudi sproščanje aktivatorja tkivnega plazminogena (tPA) ter sintezo prostaciklina in s tem dodatno zmanjšuje trombogenost subendotelijskih struktur (23).

- Polimeri
 - o Kollidon® VA64



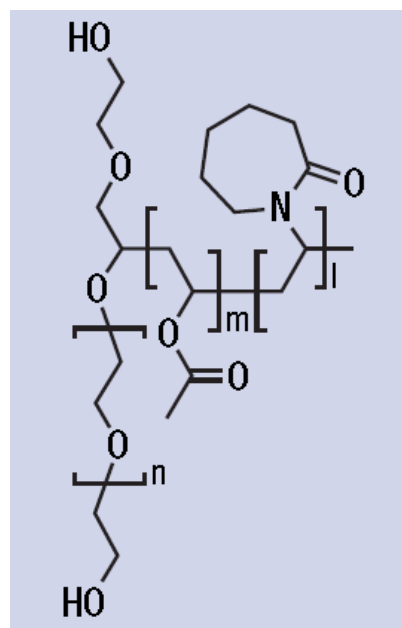
Slika 7: Kollidon® VA64. Povzeto po (7)

Kollidon® VA64 dobimo s polimerizacijo šestih delov *N*-vinilpirolidona in štirih delov vinil acetata. Monomeri prvega so hidrofilni, medtem ko je vinil acetat lipofilen in v vodi netopen. Kljub temu je razmerje med obema monomeroma tako, da zagotavlja dobro topnost v vodi. Najdemo ga kot bel ali rahlo rumenkast prašek (7).

V farmacevtski industriji ima široko uporabo, in sicer ga uporabljajo v tehnologiji iztiskanja talin, pri proizvodnji granul in tablet z vlažnim granuliranjem, kot suho vezivo pri tabletiranju in za tvorbo filmskih oblog. Ker je dobro topen v vodi je večinoma uporabljan za proizvodnjo FO s hitrim sproščanjem, moč pa ga je uporabljati tudi pri FO s prirejenim sproščanjem (7).

o Soluplus®

Soluplus® je graft kopolimer polivinilkaprolaktama, polivinil acetata in polietilen glikola z molekulsko maso 6000. Monomeri so v razmerju 13:57:30. Najdemo ga v obliki belih do rahlo rumenih granul. Je slabše topen v vodi v primerjavi s Kollidon® VA64 (topnost v vodi je 25 % w/w %). Soluplus® je bil razvit za namene metode iztiskanja talin, ga pa najdemo tudi kot tvorca ogrodja za trdne disperzije pridobljene s tehniko sušenja z razprševanjem oz. z drugimi tehnikami izhlapevanja topila, dodatno pa še kot solubilizatorja in stabilizatorja emulzij. Glavna prednost so predvsem njegove solubilizacijske lastnosti (7).



Slika 8: Soluplus®. Povzeto po (7)

- Površinsko aktivne snovi
 - o Natrijev lavril sulfat, Ph.Eur.6.0
 - o Makrogol 1500, Ph.Eur. 7.7
 - o Span 65, (sorbitan tristearat), Sigma
 - o Kolliphor P188,(blok kopolimer etilen oksida (a)-propilen oksida (b)-etilen oksida (a); a = 80, b = 27), Sigma
 - o Kolliphor P407, (blok kopolimer etilen oksida (a)-propilen oksida (b)-etilen oksida (a); a = 101, b = 56), BASF Ludwigshafen
- Ostale uporabljene snovi
 - o KCL 99,5%
 - o KH₂PO₄ 98% Ph. Eur., USP, BP
 - o Na₂HPO₄ brezvodni 99%

3.2 NAPRAVE

- Objektna stekelca, krovna stekelca dimenzij 18×18 mm (kvadratna) ter okrogla premera 10 mm
- Analitska tehtnica, AG204, Mettler Toledo
- Pečica Memert
- Kroglični mlin, MM400, Retsch
- Steklene kroglice za mletje premera 4 mm
- 2 ml temne stekleničke za mletje, ki smo jih napolnili do 1/3 volumna (400 mg zmesi)
- Klimatska komora s pogoji 25 °C in 60% relativne vlažnosti
- Diferenčni dinamični kalorimeter, 2STARe system, Mettler toledo
- Rentgenski praškovni difraktometer, X'Pert, PANalytical
- Polarizacijski mikroskop, DM2700M, Leica
- Polarizacijski mikroskop, DMRX, Leica
- Minimizirana USP 2 naprava za sproščanje (opis sledi v nadaljevanju) Boehringer Ingelheim
- UV/VIS spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technologies, Nemčija
- Dvovijačna naprava za iztiskanje talin z 12 mm vijaki, razvit v sodelovanju med ThreeTec in Boehringer Ingelheim
- 9 mm volumetrični vijačni polnilec ZD9 FB, ThreeTec

- Aparat za konvekcijsko mešanje praškov, Turbula mixer, Willy A. Bachofen AG
- Fotoaparati, DSC-HX9V, Sony

3.3 METODE

Pripravljali smo trikomponentne mešanice praškov, ki so se razlikovale v deležu ZU ter deležu in vrsti surfaktanta, medtem ko se je količina polimera (Soluplus® oz. Kollidon® VA64) prilagajala prvim.

3.3.1 TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH

Taljenje na steklenih nosilcih je bila obenem preparativna tehnika za preliminarne poizkuse določitve najustreznejše zmesi (maksimalnega deleža ZU glede na polimer), za poizkuse iskanja ustreznega surfaktanta za solubilizacijo ZU kot tudi metoda modela majhnega obsega za napovedovanje stabilnosti in profila sproščanja ekstrudatov, pridobljenih z metodo iztiskanja talin. Po preliminarnih preizkusih smo določili štiri mešanice učinkovine, nosilca in površinsko aktivne snovi, ki smo jih nato uporabljali za vrednotenje ustreznosti ostalih metod - modelov majhnega obsega za napovedovanje stabilnosti in profila sproščanja pri produktih dobljenih z metodo iztiskanja talin.

Priprave vzorcev smo se lotili tako, da smo najprej natehtali posamezne komponente (400 mg zmesi) v 2 mL stekleničke (napolnjenost stekleničk je bila do cca. 1/3 volumna). V stekleničke smo nato dodali 2 stekleni kroglici in jih vpeli v kroglični mlin. Mletje ter mešanje smo opravljali 3× po 5 min s frekvenco 30 Hz. Med posameznimi cikli smo preverili, ali se je kaj zmesi prilepilo na stene oz. dno stekleničk ter v kolikor je do tega prišlo, stekleničke ročno stresali toliko časa, dokler zmes ni odstopila.

Ker smo, kot bo v naslednjih poglavjih opisano, test sproščanja namenoma izvajali v non-sink pogojih (t.j. nad topnostjo učinkovine) smo, da bi to dosegli, določili, da bo teža vzorcev med 9.5 mg in 12 mg. Tako smo torej natehtali zmleto zmes na sredino krovnih stekelc, ki so bila položena na objektna stekelca (objektna stekelca so bila izbrana kot podlaga zaradi lažjega rokovanja



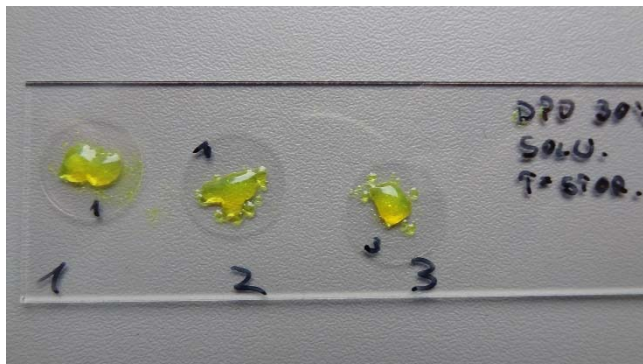
Slika 9: Primeri zmesi natehtanih na stekelca

pri taljenju ter z namenom lažjega pregleda pod mikroskopom). Ključno je bilo, da smo zagotovili, da v kupčku zmesi ni bilo praznih prostorov oz. je bilo le-teh čim manj, saj bi povzročili nastanek praznin/mehurčkov v talini.

Po pripravi zmesi smo vzorce za 20 min postavili v pečico na 160 °C.

Temperatura 160 °C je bila izbrana po predhodnih preizkusih, pri čemer smo se držali načela, da smo tako pri metodi taljenja na steklenih nosilcih kot pri metodi iztiskanja talin, bili najmanj 40

°C nad temperaturo steklastega prehoda nosilnega polimera (običajno se metoda iztiskanja talin izvaja med 20 °C in 40 °C nad T_g (6)).



Slika 10: Primer pripravljene taline

Čas 20 min smo izbrali zaradi tega, da bo metoda taljenja na steklenih nosilcih kar se da primerljiva z metodo iztiskanja talin (HME) z vidika časa zmesi pri povišani temperaturi. Čas pri HME je večini primerov od 0,5 do 5 min, vendar smo bili mi pri taljenju na steklenih nosilcih primorani uporabiti daljši čas (v nasprotnem primeru ni prišlo do popolnega taljenja v pečici (7)). Pri čemer pa smo zaradi tega hitrost obračanja vijakov v ekstruderju zmanjšali (50 rpm) in tako vsaj približno zagotovili enak čas zadrževanja zmesi pri povišani temperaturi.

Izvedeni eksperimenti:

1. Preliminarni preizkusi iskanja najbolj optimalne koncentracije ZU

Preglednica 5: Iskanje optimalne koncentracije ZU

%ZU	KLVA64	SOLUPLUS
10%	90%	90%
20%	80%	80%
30%	70%	70%
40%	60%	60%

2. Preizkusi solubilizacije in izboljšanja stabilnosti z uporabo surfaktantov

Preglednica 6: Preizkusi solubilizacije in izboljšanja stabilnosti z uporabo surfaktantov

%ZU	% in vrsta SURFAKTANTA	POLIMER
30%	5%SDS	KLVA64
30%	5%SDS	SOLU
30%	10% SPAN 65	KLVA64
30%	10% SPAN 65	SOLU
30%	5% KOLLIPHOR P407	KLVA64
30%	5% KOLLIPHOR P407	SOLU
30%	5% KOLLIPHOR P188	KLVA64
30%	5% KOLLIPHOR P188	SOLU

3. Iskanje najboljšega modela majhnega obsega za napoved stabilnosti in profila sproščanja produktov dobljenih z metodo HME

Preglednica 7: Uporabljene mešanice za iskanje alternativne napovedne metode

%ZU	% in vrsta SURFAKTANTA	POLIMER
30%	/	KLVA64
30%	/	SOLU
30%	5%SDS	KLVA64
30%	5%SDS	SOLU

3.3.2 IZTISKANJE TALIN - HME

Metoda HME je bila opisana že v uvodu, zato se bomo tu omejili le na kratek opis naprave za iztiskanje – ekstruderja, pripravljenih zmesi, parametrov, ki smo jih nastavili ter tistih, ki smo jih spremljali.

Poizkuse smo izvajali na ekstruderju ThreeTec z vijaki premera 12 mm (razvit v sodelovanju med Boehringer Ingelheim in ThreeTec). Premer iztisnega kanala - šobe na koncu ekstruderja je bil 2 mm. Blok z ekstruzijsko cevjo in polžema je bil razdeljen na 5 con, katerim smo lahko poljubno nastavljali temperaturo. Ekstruder smo polnili z volumetričnim vijačnim polnilcem s polžema premera 9 mm (ZD9 FB; ThreeTec). Pred vsakim poizkusom smo najprej pripravili mešanice, in sicer tako, da smo po natehtanju sestavin le-te zmešali na konvekcijskem mešalniku Turbula mixer 2 min. Nato smo izdelali umeritveno premico polnjenja v odvisnosti od hitrosti vrtenja polžev polnilca, tako da smo lahko hitrost polnjenja nastavili na približno 1 g/min (23).

Z namenom zagotavljanja podaljšanega časa zadrževanja zmesi pri povišani temperaturi cca. 20 min, smo nastavili hitrost vrtenja polžev na 50 vrtljajev na minuto (RPM). Navor, ki smo ga spremljali na pogonski gredi, je bil v vseh poizkusih med 3-4 Nm. Temperature različnih področij bloka ekstruderja so podane v Preglednici 8.

Preglednica 8: Uporabljeni temperaturni pogoji pri metodi taljenja z iztiskanjem

Fizikalna zmes	T1	T2	T3	T4	T5
30% DPD, KLVA64	120 °C	140 °C	150 °C	150 °C	150 °C
30% DPD, 5% SDS, KLVA64	120 °C	140 °C	150 °C	150 °C	150 °C
30% DPD, SOLU	120 °C	130 °C	140 °C	140 °C	140 °C
30% DPD, 5% SDS, SOLU	120 °C	130 °C	140 °C	140 °C	140 °C

Z metodo HME smo pripravili štiri zmesi, ki so navedene v preglednici 7. Po končani izdelavi dolgih iztiskancev premera 2 mm, smo le te peletizirali na pelete dolžine 2 mm (površina pelete je bila 18.9 mm²). Del pelet smo analizirali takoj, del smo jih dali na staranje za 1 mesec (mili pogoji – 25 °C in 60% RV), del pa na staranje za 2 dni pod ostrimi pogoji (40 °C in 100% RV) shranjevanja.

3.3.3 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Diferenčno dinamično kalorimetrijo smo izvajali z dvema namenoma. Prvi namen je bil analitski. Želeli smo preveriti, ali je v pridobljenih ekstrudatih vsa ZU raztopljena (ali je talilni vrh ZU odsoten), ali je ves surfaktant raztopljen (ali je talilni vrh SDS-a odsoten) ter ali je prišlo do znižanja temperature steklastega prehoda polimera (plastifikatorski učinek DPD-ja oz. surfaktanta). To smo storili tako pri vzorcih ob času nič, kot pri tistih vzorcih, ki smo jih starali 1 mesec pri 25 °C in 60% relativne vlažnosti.

Preglednica 9: Temperaturni programi pri uporabi DSC kot analitske metode

SEGMENT	30%DPD; KLVA64	30%DPD;5% SDS; KLVA64	30%DPD; SOLU	30%DPD;5%SDS; SOLU
1(ekvilibracija)	25,0 °C, 2,00 min	25,0 °C, 2,00 min	-50,0 °C, 2,00 min	-50,0 °C, 2,00 min
2(1.cikel seg.)	25,0..170,0 °C, 10,00 K/min	25,0..220,0 °C, 10,00 K/min	-50,0..180,0 °C, 10,00 K/min	-50,0..210,0 °C, 10,00 K/min
3(vzdrževanje T)	170,0 °C, 1,00 min	220,0 °C, 1,00 min	180,0 °C, 1,00 min	180,0 °C, 1,00 min
4(ohlajanje)	170,0..25,0 °C, -10,00 K/min	220,0..25,0 °C, -10,00 K/min	180,0..-50,0 °C, -10,00 K/min	180,0..-50,0 °C, -10,00 K/min
5(vzdrževanje T)	25,0 °C, 1,00 min	25,0 °C, 1,00 min	-50,0 °C, 1,00 min	-50,0 °C, 1,00 min

6(2. cikel seg.)	25,0..170,0 °C, 10,00 K/min	25,0..220,0 °C, 10,00 K/min	-50,0..180,0 °C, 10,00 K/min	-50,0..210,0 °C, 10,00 K/min
------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Drugi namen DSC metode je bil preparativni. Preizkusili smo, ali lahko izvedemo DSC

preizkus, pri čemer uporabimo fizikalne zmesi kot vzorec, ki ga v prvem ciklu pretvorimo v amorfno trdno disperzijo, nato pa v drugem ciklu dobimo kritične informacije (T_g , T_T , talilne entalpije), pri čemer pa vzorcev po analizi ne zavržemo, ampak jih dodatno analiziramo glede morebitne prisotnosti kristalov (metoda DSC ne zazna manj kot 2% kristaliničnost vzorca) z metodo polarizacijskega mikroskopa ter jih uporabimo kot model majhnega obsega za napovedovanje sproščanja produktov pridobljenih z metodo HME.

Pri tej metodi smo tudi poskusili poustvariti podobne pogoje kot pri metodi izdelave trdnih disperzij s HME. Tako smo, da bi zagotovili ustrezen čas pri povišani temperaturi (angl. Annealing time), se pravi čas, ki je potreben za tvorbo homogene taline, najprej povišano temperaturo vzdrževali 5 min (skupni čas pri povišani temperaturi je bil 10 min, ker je potrebno upoštevati še čas, ko se vzorec segreva in ohlaja) nato pa 20 min (skupni čas 25 min) in opazovali, ali prihaja pri različnih časovnih protokolih do kakšnih razlik. Del DSC vzorcev smo analizirali takoj, del pa smo jih dali na staranje za 1 mesec (pogoji 25 °C in 60% RV). Vse DSC preizkuse smo izvajali z $1\times$ preluknjanimi pokrovi, da smo zagotovili, da se vzorci nahajajo v samogenerirajoči atmosferi (celice smo prepihovali z dušikom).

Preglednica 10: Temperaturni programi pri uporabi DSC kot preparativne in analizne metode

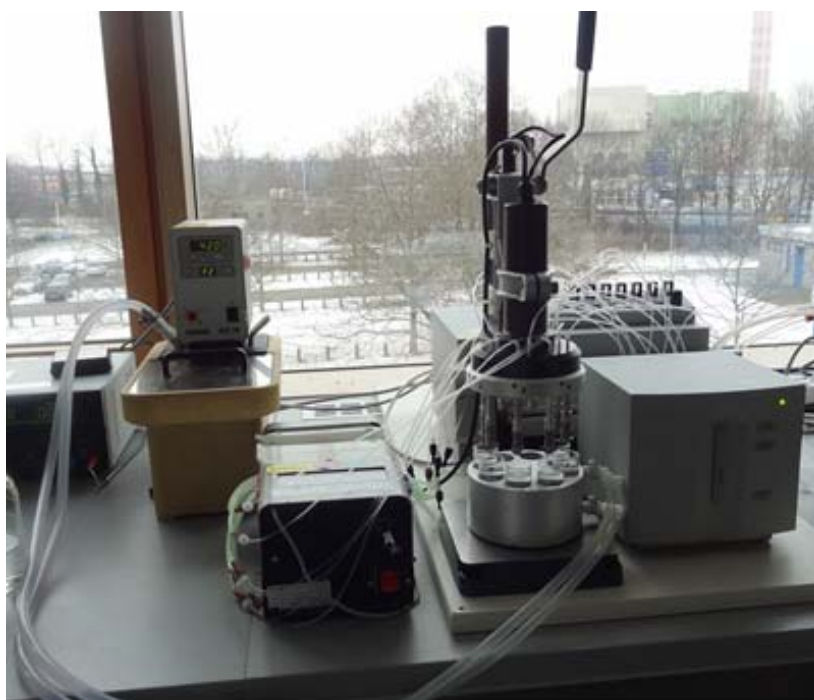
SEGMENT	30% DPD; KLVA64	30% DPD;5% SDS; KLVA64	30% DPD; SOLU	30% DPD; 5% SDS; SOLU
1(ekvilibracija)	[1] 25,0 °C, 2,00 min	[1] 25,0 °C, 2,00 min	[1] 0,0 °C, 2,00 min	[1] 0,0 °C, 2,00 min
2(segrevanje)	[2] 25,0..160,0 °C, 10,00 K/min	[2] 25,0..160,0 °C, 10,00 K/min	[2] 0,0..155,0 °C, 10,00 K/min	[2] 0,0..155,0 °C, 10,00 K/min
3(vzdrževanje T)	[3] 160,0 °C, 20,00 min	[3] 160,0 °C, 20,00 min	[3] 155,0 °C, 50,00 min	[3] 155,0 °C, 50,00 min
4(ohlajanje)	[4] 160,0..25,0 °C, -10,00 K/min	[4] 160,0..25,0 °C, -10,00 K/min	[4] 155,0..0,0 °C, -10,00 K/min	[4] 155,0..0,0 °C, - 10,00 K/min
5(vzdrževanje T)	[5] 25,0 °C, 1,00 min	[5] 25,0 °C, 1,00 min	[5] 0,0 °C, 1,00 min	[5] 0,0 °C, 1,00 min
6(2. cikel seg.)	[6] 25,0..170,0 °C, 10,00 K/min	[6] 25,0..170,0 °C, 10,00 K/min	[6] 0,0..170,0 °C, 10,00 K/min	[6] 0,0..170,0 °C, 10,00 K/min

3.3.4 POLARIZACIJSKI MIKROSKOP

Polarizacijski mikroskop smo uporabljali za preverjanje morebitne kristaliničnosti v sledovih pri ekstrudatih (te DSC analiza vzorcev ne zazna). Poleg tega je bila to glavna metoda za ugotavljanje kristaliničnosti (ter tudi morebitne rekristalizacije po stabilnostnem testu) pri preliminarni metodi taljenja na steklenih nosilcih. Uporabljali smo dva mikroskopa: Leica DM2700M in Leica DMRX. Slikali smo pri 3 različnih povečavah, in sicer $10\times$, $20\times$ in $50\times$. V kolikor ni omenjeno drugače, so slike v nadaljevanju $10\times$ povečave. Uporabljali smo tako odbojno (pri DSC vzorcih v lončkih je bila ta edina možna) kot presevno svetlobo. Poleg tega smo vzorce analizirali tako s polarizacijskim filtrom kot brez njega. Analizirane vzorce smo slikali. Lastnost kristaliničnih snovi, da svetlobo, ki potuje skozi njih različno uklonijo (anizotropija), izkoriščamo z namenom ločevanja kristalov od okolice. PLM je sestavljen iz dveh ključnih elementov-polarizatorja in analizatorja, ki sta postavljena pravokotno en na drugega. Žarek se pri potovanju skozi polarizator polarizira v določeni smeri. V primeru, da je vzorec med polarizatorjem in analizatorjem izotropen (npr. Amorfna snov), kar pomeni, da bistveno ne spremeni poti žarka, bo slika na drugi strani brez svetlobe (žarek bo pripotoval pravokotno na analizator). Pri kristalih imamo anizotropen vzorec, kar privede do velikega kontrasta med temnim ozadjem in svetlimi kristali, katere zlahka zaznamo (25).

3.3.5 PREIZKUS SPROŠČANJA

Preizkus sproščanja smo izvajali na pomanjšani aparaturi 2 po ameriški farmakopeji (razvita pri Boehringer Ingelheim). Posode, v kateri poteka test sproščanja so premera 22 mm in višine 69 mm. Veslo je široko 20 mm in visoko 8 mm. Izvajali smo online merjenje po predhodno določenih časovnih intervalih z uporabo



Slika 11: Celoten sistem za izvedbo testa sproščanja (miniaturizirana aparatura USP 2)

pretočnega UV/VIS spektrometra Agilent 8453 (Agilent Technologies, Nemčija). Ker smo želeli non-sink pogoje smo uporabili maso vzorcev med 9.5 in 12 mg (v kateri je bilo 30% dipiridamola) (24). Pogoji izvedbe testov sproščanja so navedeni v Preglednici 11.

Preglednica 11: Parametri izvedbe preizkusa sproščanja

Parameter	Medij	V medija	T medija	Hitrost vrtenja	Čas meritve
Vrednost	Fosfatni pufer pH = 5.5 0.05 M	20 ml	37 °C	75 RPM	6 h

Priprava medija za sproščanje (0,05 M fosfatnega pufera s pH = 5.5): Medij smo pripravili tako, da smo zmešali 96.4 mL raztopine I in 3.6mL raztopine II.

raztopina I: Raztopimo 13.61 g kalijevega dihidrogenfosfata v 1000mL vode

raztopina II: Raztopimo 35.81 g dinatrijevega hidrogenfosfata v 1000mL vode

Način, kako smo izvedli test sproščanja, je bil deloma tudi odvisen od vrste vzorca, ki smo ga pripravili.

1. Fizikalne zmesi

Fizikalne zmesi smo natehtali na kvadratna krovna stekelca velikost 18×18 mm in jih na začetku testa stresli (brez samega stekelca) v posodo za sproščanje.

2. Stekelca

Stekelca s staljenim vzorcem smo s pinceto previdno prijeli in jih v 15 sekundah z vzorcem obrnjenim navzgor potopili na dno posode za sproščanje. Zaradi prileganja okroglega krovnega stekelca dnu posode, so se stekelca obdržala na mestu kljub hidrodinamičnim silam. Površina posameznega vzorca je bila cca. 20 mm².



Slika 12: Vesla s posodami in ogrevalnim blokom

3. DSC vzorci

Za DSC vzorce smo naročili posebna steklena držala (Slika 13), ki so držala DSC lonček na dnu posode za sproščanje. Vzorce smo po DSC pripravi odprli (odstranili preluknjan pokrov), steklena držala pa predhodno potopili v medij za sproščanje. Ob začetku preizkusa smo s pinceto v 15 s namestili vse vzorce v sredino držal in zagnali protokol preizkusa sproščanja. Površina posameznega vzorca je bila cca. 20 mm².



Slika 13: Držala za DSC vzorce



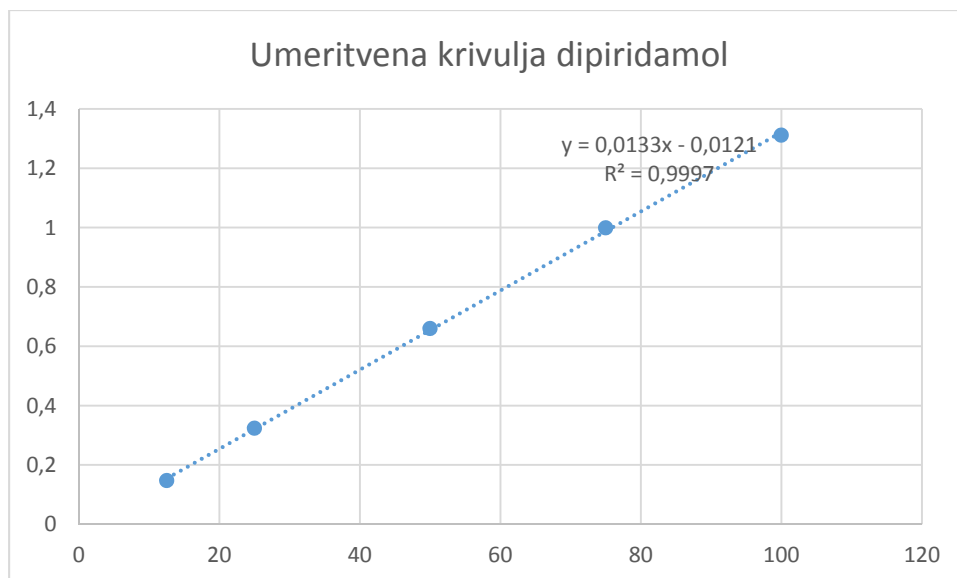
Slika 14: Držalo za DSC vzorec s samim vzorci v posodi za sproščanje

4. Ekstrudati

Ekstrudate smo predhodno peletizirali in nato 2 peleti natehtali na krovna stekelca (skupna masa med 9.5 in 12 mg), jih v 15 s vstavili na dno posode z medijem ter zagnali preizkus. Površina posameznega vzorca je bila cca. 18.9 mm² (površina valja višine 2 mm in premera 2 mm).

Vzorce smo s preizkusom sproščanja vedno vrednotili v 3 paralelah.

Pred samim začetkom analiziranja vzorcev smo pripravili umeritveno premico za dipiridamol. Pripravili smo jo s pomočjo pufera s pH = 2, da smo imeli zagotovljene dovolj visoke koncentracije učinkovine. Pufer smo pripravili na sledeč način: 6.57 g KCl smo raztopili v destilirani vodi, dodali 119 ml 0.1 M HCl ter dopolnili z destilirano vodo do oznake 1 L. Standardne raztopine smo pripravili tako, da smo pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 100 µg/ml ter jo redčili na 75, 50, 25, 12.5 µg/ml. Dobili smo naslednjo umeritveno premico, ki je podana na Sliki 15.



Slika 15: Umeritvena krivulja dipiridamola v mediju s $pH = 2$

S pomočjo umeritvene premice smo izračunali koncentracijo dipiridamola v raztopinah posameznih vzorcev iz preizkusa sproščanja. Rezultat smo nato podali kot časovno odvisnost deleža raztopljenega dipiridamola.

3.3.6 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

Rentgensko praškovno difrakcijo smo izvedli na fizikalnih zmesih pred (uporabili smo fizikalne zmesi uporabljene pri metodi HME) in po krogličnem mletju (fizikalne zmesi pripravljene po postopku opisanem v poglavju 3.3.1), da smo videli, ali mletje vpliva na amorfnost/polimorfnost/kristaliničnost dipiridamola.

Meritve smo izvedli na rentgenskem difraktometru X'Pert, PANalytical s $Cu K\alpha$ radiacijo. Difraktogram smo dobili pri 40 Kv in 40 mA. Skeniranje je potekalo v 2θ med 3° in 45° s hitrostjo $2^\circ/\text{min}$.

3.3.7 STABILNOSTNE ŠTUDIJE

Izvajali smo pospešeni stabilnostni študiji, in sicer eno z bolj ostrimi pogoji, drugo pa z bolj milimi pogoji. Za vzorce smo vzeli vzorce pridobljene s tehniko taljenja na steklenih nosilcih ter vzorce pridobljene s tehniko HME (pri prvi študiji) ter dodatno še DSC vzorce pri drugi stabilnostni študiji.

Pri prvi stabilnostni študiji so bili pogoji, katerim so bili izpostavljeni vzorci $T = 40^\circ\text{C}$, $RV = 100\%$. Vzorce smo na teh pogojih pustili 2 dneva. Da smo zagotovili take pogoje, smo vzeli

eksikator, ga napolnili s cca. 100 mL vode ter dodali 3 žlice Na_2HPO_4 in pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč (da smo dobili nasičeno raztopino Na_2HPO_4 je morale nekaj soli ostati še neraztopljene). Nato smo eksikator zaprli in postavili na 40 °C ter pustili vsaj 12 ur, da se je zrak znotraj eksikatorja nasitil z vodno paro in prišel v fazo ravnotežja. Po najmanj 12 urah smo vstavili vzorce. Namen tovrstne študije je bil vzorce izpostaviti relativno zelo ostrim pogojem, da ugotovimo kateri polimer bolj stabilizira amorfno učinkovino ter primerjati, kakšne profile sproščanja dajo vzorci po izpostavitvi takšnim pogojem. V tej študiji smo uporabili samo HME vzorce ter vzorce na steklenih nosilcih, ker se je izkazalo, da so slednji najbolj uspešni pri napovedovanju rezultatov prvih, kot bo vidno v nadaljevanju.

Druga študija je potekala en mesec v klimatski komori s pogoji 25 °C in 60% RV, pri čemer smo starali HME vzorce, vzorce na steklenih nosilcih in DSC vzorce.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRELIMINARNI PREIZKUSI

Preliminarne preizkuse smo izvedli z metodo taljenja na steklenih nosilcih. Pripravili smo fizikalne zmesi kot je opisano v poglavju 3.3.1. Sestavine smo natehtali v 2 mL stekleničke in vzorce mleli s krogličnim mlinom. Nato smo 10 mg vsake zmesi natehtali na krovno stekelce ter vzorce talili 20 min pri 160 °C. Taline smo po ohladitvi postavili za 2 dni na 40 °C, 100% RV ter takoj nato ovrednotili s polarizacijskim mikroskopom. Rezultati preliminarnih preizkusov so navedeni v preglednici 12.

Preglednica 12: Rezultati preliminarne testa rekristalizacije

%ZU	KLVA64	SOLUPLUS
10	posamezni kristali	/
20	več posameznih kristalov	/
30	popolnoma kristalinično	malo kristalov
40	popolnoma kristalinično	veliko kristalov

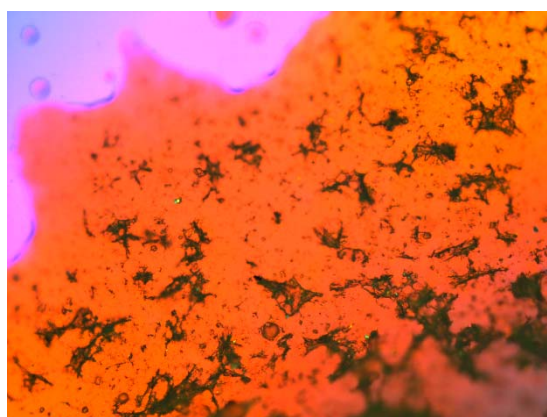
Želeli smo identificirati najvišjo koncentracijo ZU, kjer se pojavi kristaliničnost v večji meri. To se je zgodilo pri 30% pri Kollidon® VA64 in pri 40% pri Soluplus®. Na podlagi teh rezultatov in zaradi tega, ker je lahko pri HME tehnologiji problematično, če vzamemo večje deleže ZU v zmesi, smo se odločili, da bomo nadaljnje poizkuse izvajali s 30% dipiridamola tako v primeru KLV64 kot SOLUPLUS-a.

4.2 IZBOLJŠANJE TOPNOSTI IN STABILNOSTI Z DODATKOM POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI (PAS)

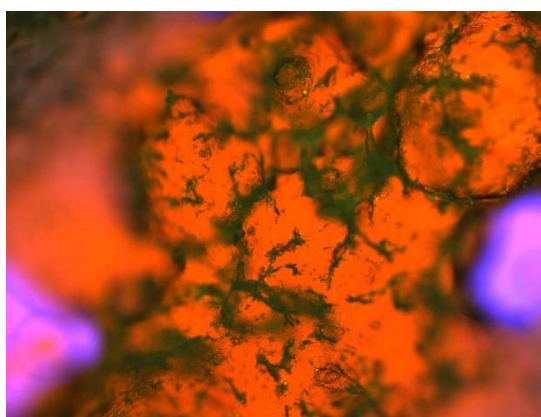
Izbrane kombinacije po taljenju in rezultati pregleda pod polarizacijskim mikroskopom so podani v Preglednici 13 in slikah 16 do 23.

Preglednica 13: Prikaz mešljivosti različnih sistemov ZU in nosilnega polimera ter PAS

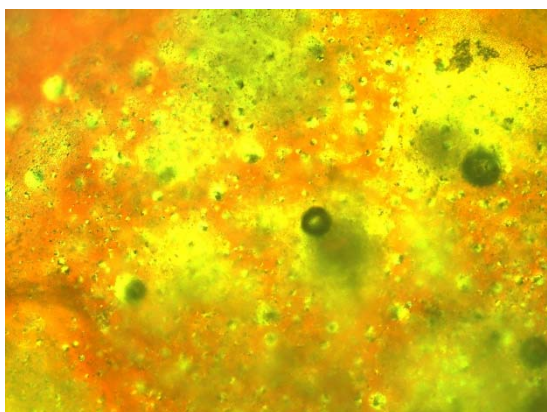
%ZU	% in vrsta SURFAKTANTA	POLIMER	MEŠANJE
30%	5%SDS	KLVA64	Se ne meša
30%	5%SDS	SOLU	Se ne meša
30%	10% SPAN 65	KLVA64	Se ne meša
30%	10% SPAN 65	SOLU	Se ne meša
30%	5% KOLLIPHOR P407	KLVA64	Se ne meša
30%	5% KOLLIPHOR P407	SOLU	Se ne meša
30%	5% KOLLIPHOR P188	KLVA64	Se ne meša
30%	5% KOLLIPHOR P188	SOLU	Se ne meša



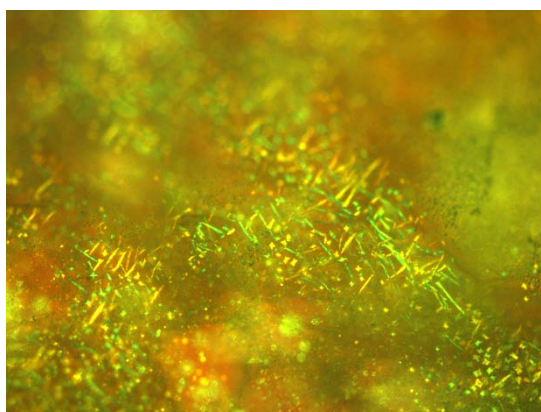
Slika 16: 30% DPD; 5% SDS; KLVA64



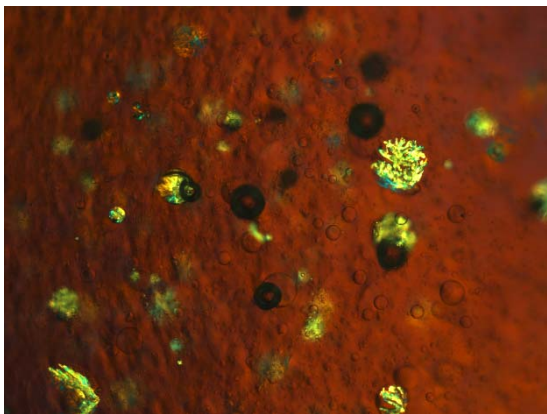
Slika 17: 30% DPD; 5% SDS; SOLU



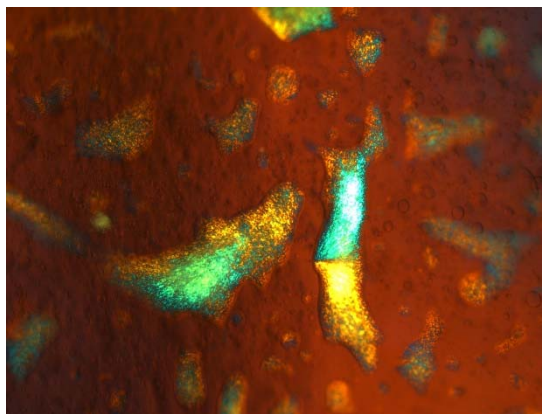
Slika 18: 30% DPD; 10% SPAN 65; KLVA64



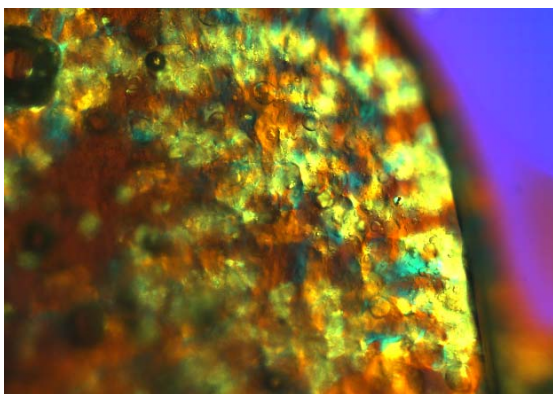
Slika 19: 30% DPD; 10% SPAN 65; SOLU



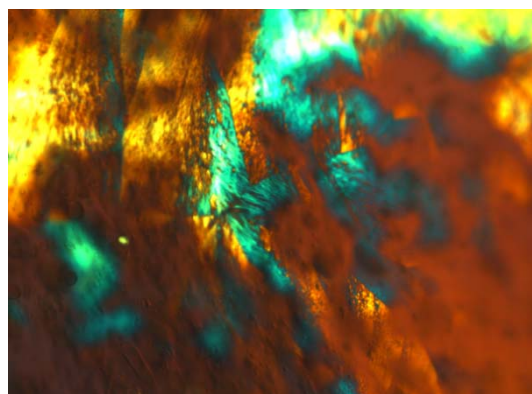
Slika 20: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P407; KLVA64



Slika 21: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P407; SOLU



Slika 22: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P188; KLVA64



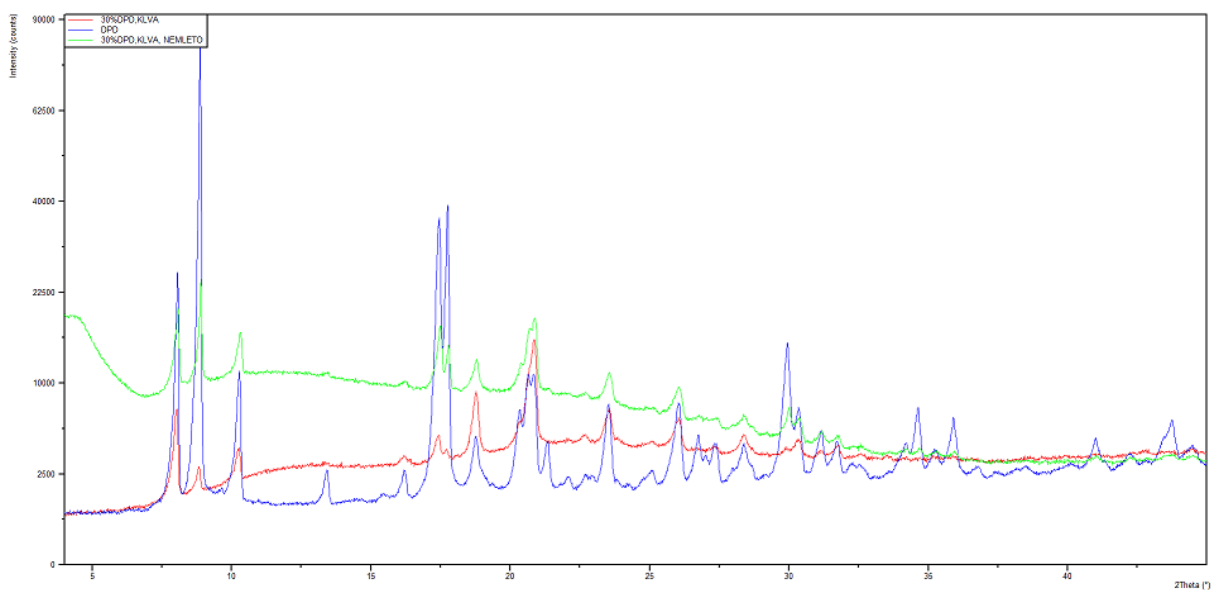
Slika 23: 30% DPD; 5% KOLLIPHOR P188; SOLU

Vse slike so bile posnete pri 10× povečavi s polarizacijskim filtrom. Kot vidimo iz slik, nobena zmes ni bila homogena, zato smo se odločili, da nadaljujemo z delom v smeri iskanja metode omejenega obsega, ki bo zadovoljivo napovedala stabilnost in profil sproščanja produktov dobljenih z metodo HME. Da bi imeli kar se da reprezentativen vzorec, smo vzeli oba polimera ter enega najbolj reprezentativnih PAS - natrijev lavril sulfat. Čeprav slednji ni tvoril homogene zmesi pri taljenju na stekelcih, smo na ta način želeli tudi preveriti ali je morda potrebna strižna sila HME postopka, da bi prišlo do tvorbe homogene trdne disperzije.

4.3 ISKANJE MEDOTE ZA NAPOVED SPROŠČANJA IN STABILNOSTI ZA METODO HME

4.3.1 PREVERJANJE VPLIVA KROGLIČNEGA MLETJA NA FIZIKALNE ZMESI

Ker smo želeli izločiti vpliv krogličnega mletja na kristaliničnost dipiridamola pri preučevanih zmesih, smo izvedli XRPD analizo, ki je pokazala sledeče. Pri nobeni od štirih mešanic nismo zaznali, da bi mletje vplivalo na kristaliničnost dipiridamola. Smo pa pri vseh štirih fizikalnih zmesih opazili pojav, da se je položaj vrhov sicer ohranil, a so se spremenile relativne intenzitete nekaterih vrhov. Primer takšnega difraktograma ene od fizikalnih zmesi je prikazan na Sliki 24 (ostale najdemo v dodatni prilogi): modra krivulja predstavlja čisti kristalinični dipiridamol, zelena nemleti vzorec (30% DPD v KLVA64), rdeča pa mleti vzorec. Na ordinatni osi se nahaja intenziteta, na abscisi pa kot pod katerim se določen signal pojavi.



Slika 24: Difraktogram fizikalne zmesi 30% DPD s KLVA64 pred (zelena) in po mletju (rdeča); modra krivulja predstavlja kristaliničen DPD

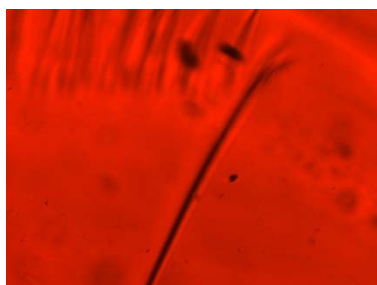
4.3.2 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA S KOLLIDON® VA64

4.3.2.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI

Ko smo vzorce s KLVA64 pripravili s posameznimi metodami, smo najprej ob času nič preverili ali smo uspeli vso učinkovino pretvoriti v amorfno obliko (preverjali smo odsotnost kristalov), in sicer s polarizacijskim mikroskopom in z DSC metodo. Rezultati teh vrednotenj so zbrani v preglednici 14 in na slikah 25 do 27.

Preglednica 14: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30 % DPD; KLVA64)

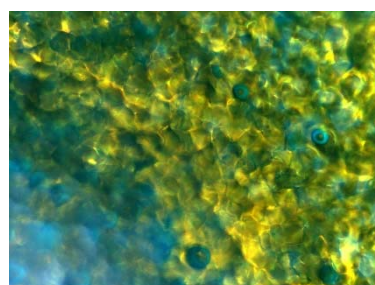
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda 5 min temperiranja	4. DSC pripravljalna metoda 20 min temperiranja
POLARIZACIJSKI MIKR.	Odsotnost kristalov	Odsotnost kristalov	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi
DSC	Odsotnost talilnega vrha, 87 °C	/	Odsotnost talilnega vrha, Tg = 90 °C	Odsotnost talilnega vrha, Tg = 90 °C



Slika 25: PLM slika HME vzorca ob času 0 (30% DPD; KLVA64)



Slika 26: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih ob času 0 (30% DPD; KLVA64)

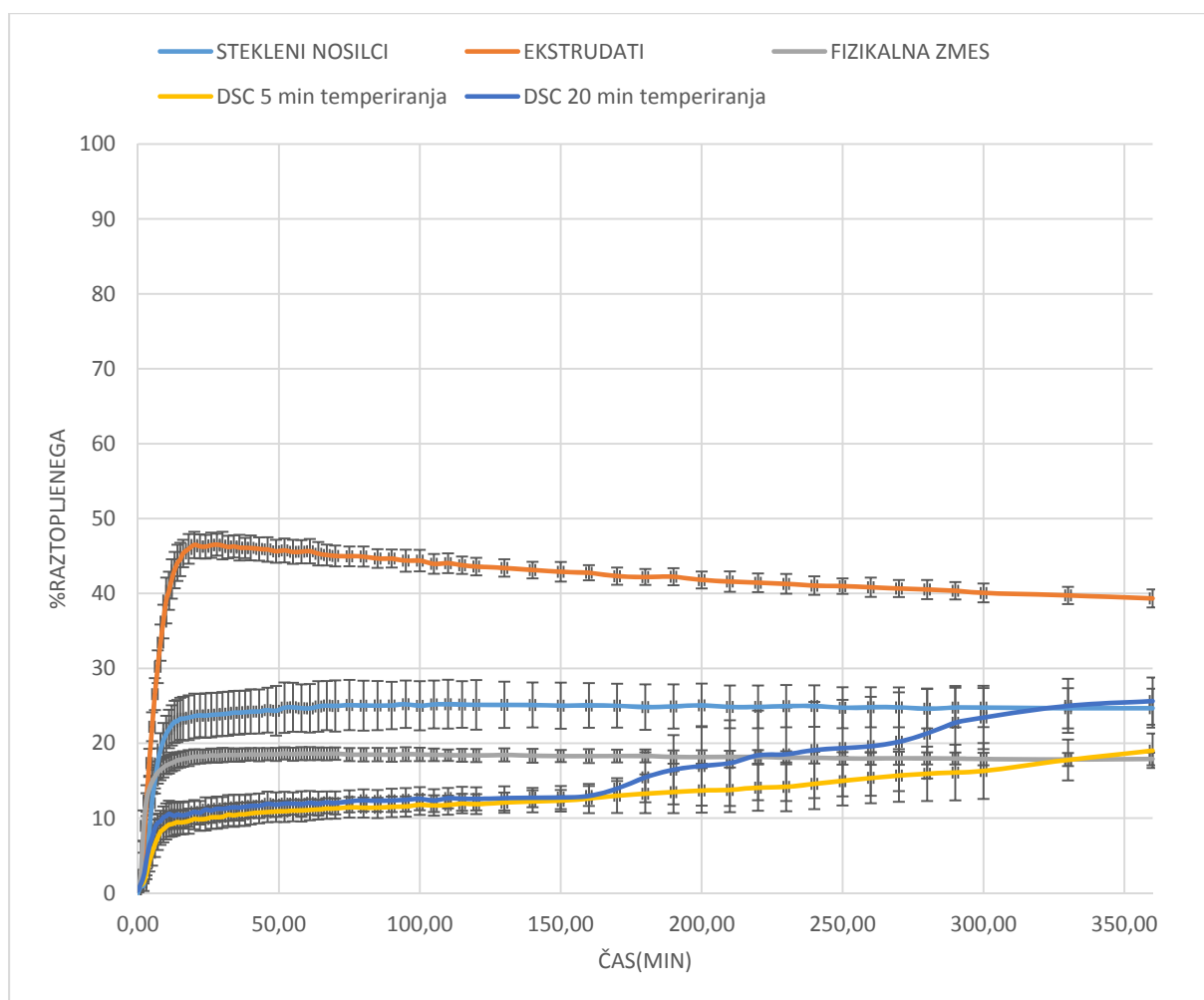


Slika 27: PLM slika DSC vzorca ob času 0 (30% DPD; KLVA64)

Kot vidimo iz slik 25 do 27, nobeden od vzorcev ni vseboval kristalov dipiridamola. Pri DSC vzorcu opazimo izgled nehomogenosti vzorca, pri čemer ni bilo razlike, ali smo vzorec vzdrževali 5 min ali 20 min pri povišani temperaturi.

Pri DSC meritvah nismo ne pri HME ne pri DSC vzorcih dobili talilnega vrha učinkovine, tako lahko trdimo, da je bila amorfizacija dipiridamola uspešna. Smo pa pri metodi HME dobili $T_g = 87\text{ }^{\circ}\text{C}$, medtem ko smo pri DSC vzorcih dobili $T_g = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ni razlik med različnimi časi temperiranja pri višji temperaturi). Nižja T_g vzorca dobljenega s HME je lahko posledica »zgodovine« vzorca-se pravi izpostavitvi strižnim silam in posledično lokalno višjim temperaturam.

Po analizi vzorcev z mikroskopom in z DSC metodo smo izvedli še preizkus sproščanja.



Slika 28: Rezultati preizkusov sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij 30% DPD v KLVA64 ob času čas 0; siva barva predstavlja profil raztapljanja fizikalne zmesi sistema

Če upoštevamo topnost dipiridamola, ki smo jo eksperimentalno določili in znaša $26,47\text{ }\mu\text{g/ml}$ ter ob predpostavki, da smo imeli približno $3000\text{ }\mu\text{g}$ dipiridamola v vzorcu, bi teoretično pričakovali, da je delež raztopljenega čistega dipiridamola enak $17,64\%$. Iz Slike 28 lahko najprej razberemo, da fizikalna zmes s polimerom le malo izboljša topnost DPD (velikostni red 1%). Poleg tega lahko ugotovimo, da so amorfne disperzije pridobljene z HME metodo in metodo steklenih nosilcev z vidika metastabilne topnosti boljše kot sama kristalinična

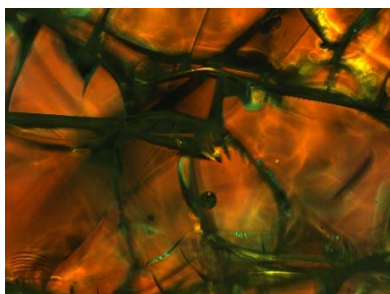
učinkovina v fizikalni zmesi, pri čemer še posebej odstopajo HME produkti. Površina je pri preiskovanih vzorcih sicer enaka, tako da lahko razlog za različno topnost/hitrost raztapljanja iščemo drugje. S temi rezultati lahko potrdimo, da amorfizacija učinkovine bistveno izboljša topnost ZU. Metoda, ki se je v tem primeru najbolj približala rezultatu HME vzorcev je metoda taljenja na steklenih nosilcih, čeprav je rezultat metastabilne topnosti skoraj $2\times$ manjši kot bi pričakovali. Vzorci izdelani z DSC, ne glede na izbrani čas temperiranja, v začetni fazi niso dali primerljivih rezultatov. Na sredini raztapljanja pa so se ti vzorci odlepili od dna DSC posodice, kar je privedlo do povečanja površine in posledično izenačitve topnosti (v primeru 20 min temperiranja) z vzorci na steklenih nosilcih.

4.3.2.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC PRI 25 °C in 60% RV

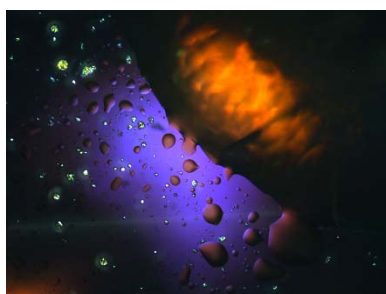
Rezultati enomesečne stabilnostne študije vzorcev shranjenih pri milih pogojih (25 °C in 60% RV) so zbrani v Preglednici 15.

Preglednica 15: Analiza vzorcev trdnih disperzij; 1 mesec(30% DPD; KLVA64)

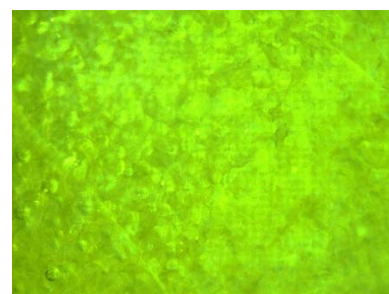
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda
POLARIZACIJSKI MIKR.	Odsotnost kristalov, vzorci so zelo razpokali	Opazimo začetek tvorbe kristalizacijskih jeder	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi
DSC	Odsotnost talilnega vrha, prvi cikel seg. Tg = 76.6 °C, drugi cikel seg. Tg = 87.7 °C	/	Odsotnost talilnega vrha, prvi cikel seg. Tg = 76.7 °C, drugi cikel seg. Tg = 88.8 °C



Slika 29: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64)



Slika 30: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64)

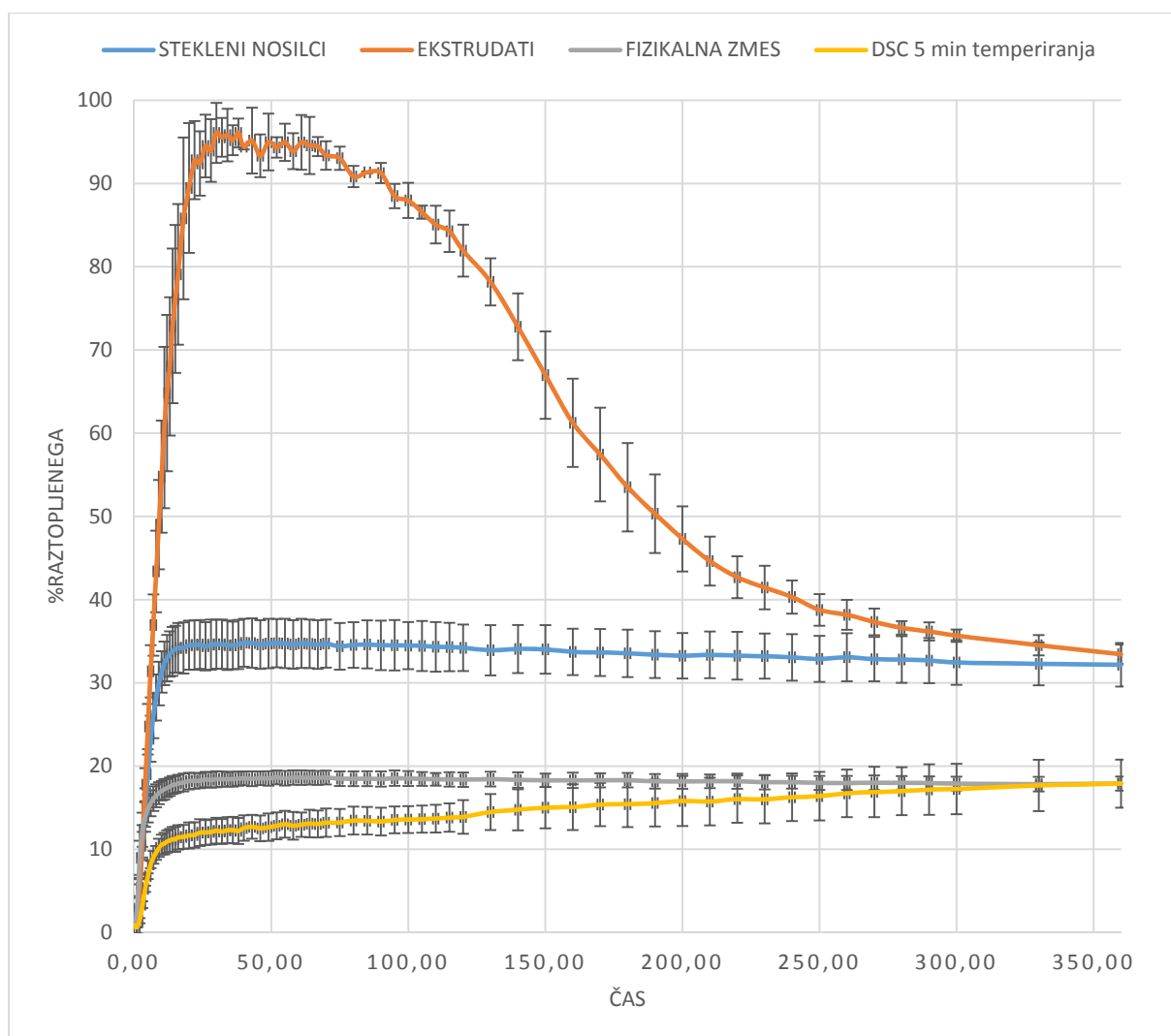


Slika 31: PLM slika DSC vzorca (5 min temperiranja) čas 1 mesec (30% DPD; KLVA64)

PLM analiza je po 1 mesecu pokazala, da so HME vzorci (Slika 29) zelo razpokali (povečanje površine), kar bi lahko pomenilo, da bo zaradi večje površine tudi večja možnost kristalizacije, vendar temu ni bilo tako. Pri vzorcih na steklenih nosilcih (Slika 30) opazimo začetek tvorbe kristalov, ki pa so večinoma omejeni na robove vzorca. Izgled DSC vzorcev se časom staranja ni spremenil (Slika 31).

Pri DSC metodi ne opazimo talilnega vrha pri nobenem od obeh vzorcev, imata pa oba vzorca, v primerjavi s časom 0, nižji Tg, kar lahko pripisujemo plastifikatorskemu učinku vode. Kljub veliki razliki (razpokanost ekstrudatov) v površini je absorpcija vode v obeh primerih enaka (enako znižanje Tg).

Rezultati sproščanja po 1 mesecu so nam dali sledeče rezultate.



Slika 32: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij 30%DPD v KLVA64, 1 mesec 25 °C, 60% RV

Test sproščanja v kombinaciji z rezultati PLM kaže, da so razpoke, ki so nastale med staranjem vzorcev HME, pripeljale do velikega povečanja površine in posledično

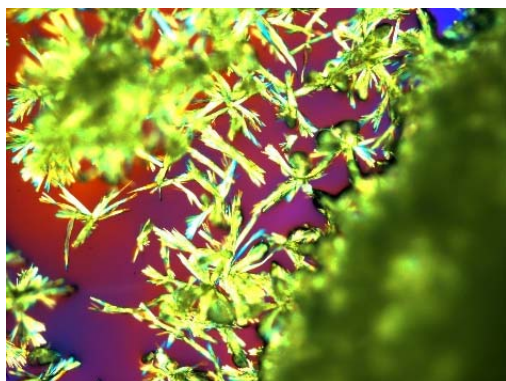
metastabilne topnosti (skoraj 100% raztapljanje). Najvišja topnost je dosežena pri času 30 min (96%) in traja do 67 min (94%), nato pa se začne dipiridamol obarjati in topnost upadati, dokler se praktično ne izenači z rezultati sproščanja vzorcev na steklenih nosilcih. Ti po 1 mesecu staranja, kljub rahlemu povečanju kristaliničnosti, dajo za 10% boljše rezultate z vidika topnosti in so na koncu po 6 h izenačeni s HME vzorci (dobra napovedna vrednost). To lahko deloma pripišemo razpokam, ki so se tudi pojavile v talini, deloma pa absorpciji vode, ki je predhodno »omočila« vzorec. DSC vzorci dajo enake rezultate profila raztapljanja po 1 mesecu kot ob času 0.

4.3.2.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV

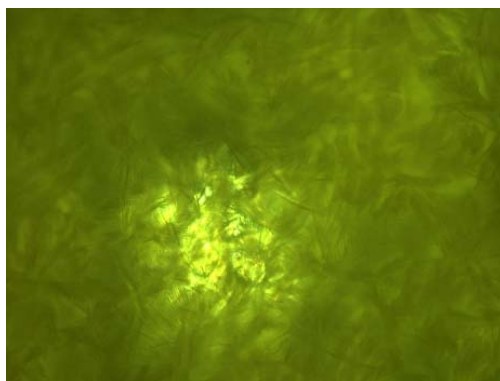
V primeru stabilnostne študije pri ostrih pogojih smo za analizo uporabili samo PLM, ker se je ta izkazal kot dovolj zanesljiva in predvsem hitra metoda za ugotavljanje prisotnosti kristalov. Predhodno velja omeniti, da je na vzorce s KLVA64 voda imela tako velik plastifikatorski učinek, da so se ekstrudati razlezli (izgubili so svojo prvotno obliko). Rezultati po PLM analizi so podani v preglednici 16.

Preglednica 16: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni (30%DPD;KLVA64)

VZOREC	1.HME	2. STEKLENI NOSILCI
PLM	Popolnoma kristalinično	Popolnoma kristalinično



Slika 33: PLM slika HME vzorca 2 dni ostri pogoji (30% DPD; KLVA64)

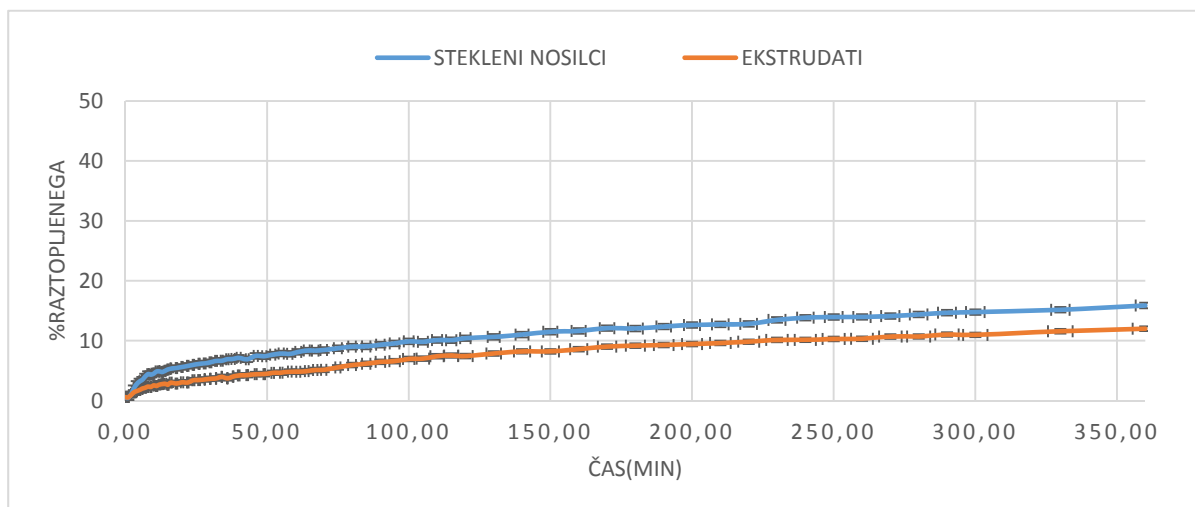


Slika 34: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih; 2 dni ostri pogoji (30% DPD; KLVA64)

Vzorca se med sabo po PLM analizi ne razlikujeta. Pri obeh je prišlo do praktično popolne kristalizacije vzorca. Preverili smo, kako se popolnoma kristaliničen vzorec obnaša, če je ujet v matriks nosilca.

Kot je razvidno iz diagrama sproščanja (Slika 35), se obe vrsti staranih vzorcev pri sproščanju obnašata zelo podobno (dobra napovedna vrednost metode steklenih nosilcev za HME

vzorci), pri čemer le-ti dosežejo počasnejše sproščanje celo v primerjavi s fizikalno zmesjo z učinkovino. Topnost ekstrudatov po 360 min je v primerjavi s tistimi ob času nič, 27% nižja.



Slika 35: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD; KLVA64; 2 dni 40 °C, 100% RV

4.3.3 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA V SOLUPLUS®

4.3.3.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI

Vzorci DPD s SOLUPLUS so takoj po izdelavi dali rezultate, ki so zbrani v Preglednici 17 in slikah 36 do 38.

Pri nobenem od vzorcev ne opazimo kristalov s PLM. Pri DSC vzorcu ne opazimo talilnega vrha učinkovine, zanimivo pa je, da so Tg pri posameznih metodah zelo različne.

Preglednica 17: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0(30%DPD;SOLU)

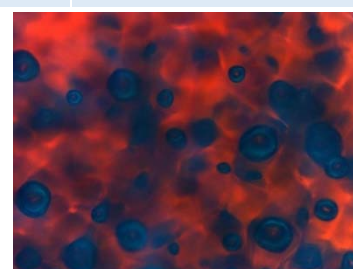
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda 5 min temperiranja	4. DSC pripravljalna metoda 20 min temperiranja
POLARIZACIJSKI MIKR.	Odsotnost kristalov	Odsotnost kristalov	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi
DSC	Odsotnost talilnega vrha, prvi cikel seg. Tg = 43.8 °C, drugi cikel seg. Tg = 44.9 °C	/	Odsotnost talilnega vrha, drugi cikel seg. Tg = 67.9 °C,	Drugi cikel seg.; 20 min temperiranja Tg = 56.9 °C



Slika 36: PLM slika HME vzorca; čas 0 (30% DPD; SOLU)



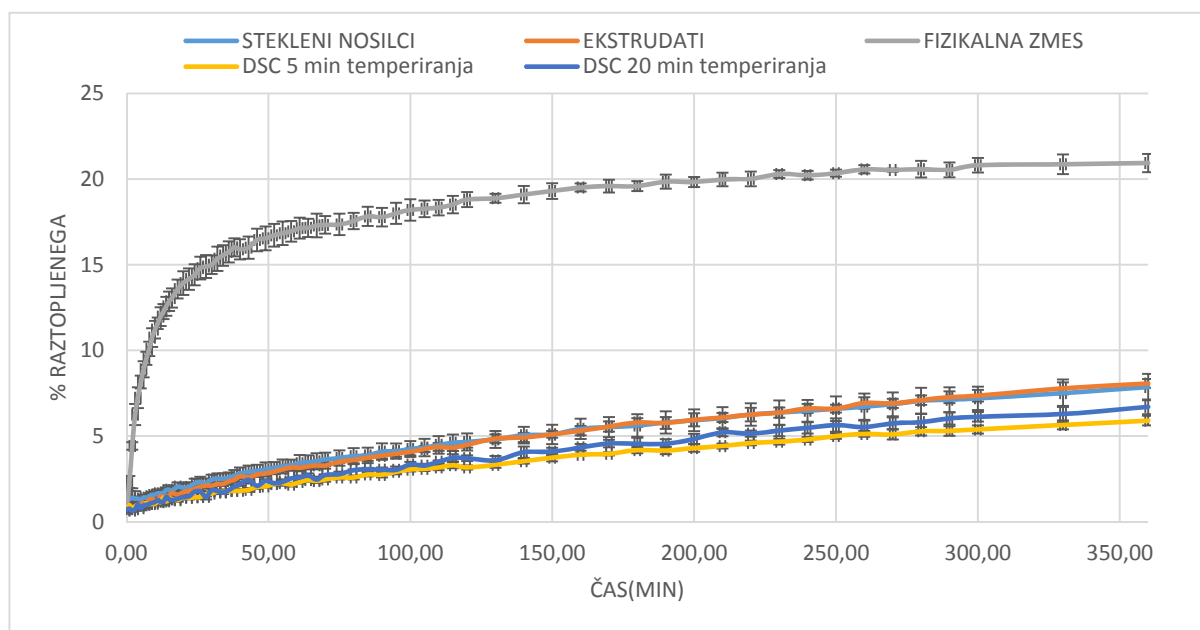
Slika 37: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih; čas 0 (30% DPD; SOLU)



Slika 38: PLM slika DSC vzorca; čas 0 (30% DPD; SOLU)

Iz diagrama sproščanja (Slika 39) je razvidno, da je pri vzorcih s SOLU fizikalna mešanica tista, ki daje najhitrejši profil sproščanja in delež sproščene učinkovine po 6 h (SOLU je amfifilna snov in ima zato dober solubilizacijski potencial). V primerjavi s samo učinkovino (17.64% sproščene ZU v 360 min), je fizikalna zmes s SOLU za 3.26% boljša. Ekstrudati s

SOLU dajejo z vidika izboljšanja topnosti in hitrosti raztapljanja nepričakovno nizke rezultate (kljub temu, da naj bi dosegli s SOLU takojšnje sproščanje (7)). Lahko pa na diagramu sproščanja opazimo, da so vzorci vseh metod priprave trdnih disperzij zelo blizu, zato lahko zaključimo, da imajo za to zmes vse dobro napovedno vrednost, pri čemer posebej izstopa metoda steklenih nosilcev, saj se njena krivulja s profilom HME popolnoma prekriva.

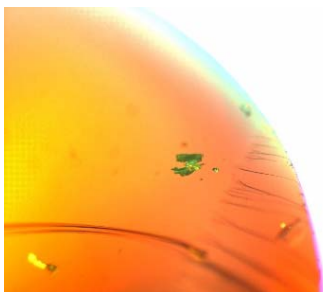


Slika 39: Profil sproščanja DPD za različne vzorce trdnih disperzij 30% DPD v SOLU, čas 0; siva barva predstavlja fizikalno mešanico.

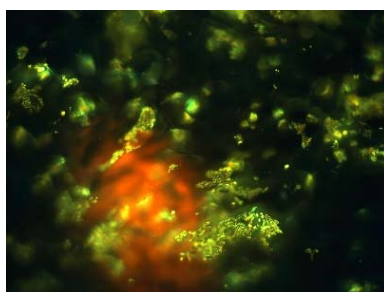
4.3.3.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25 °C in 60% RV

Iz slik PLM (slike 40 do 42) lahko vidimo, da se pri HME metodi po 1 mesecu pojavijo posamezni kristali. Pri vzorcih na steklenih nosilcih je bilo pri dveh od štirih vzorcev opaziti pojav velike rekristalizacije. Lahko bi sklepali na nehomogenost pripravljenih vzorcev (pojav višje koncentracije ZU v dveh vzorcih, kjer se pojavi rekristalizacija), čeprav pri nobenem od ostalih vzorcev tega ni bilo opaziti. Pri DSC analizi HME vzorcev nismo opazili talilnega vrha (Preglednica 18), kar še enkrat več dokaže, da samo uporaba DSC metode za vrednotenje amorfnosti trdne disperzije ni dovolj. DSC meritve so pokazale, da se je T_g pri HME vzorcih po 1 mesecu zvišala (vzorec je takoj po analizi še pod vplivom vnesenega striga, ki je bil apliciran med samo proizvodnjo), pri DSC vzorcih pa znižal (plastifikatorski učinek vode, ki se je adsorbirala med staranjem).

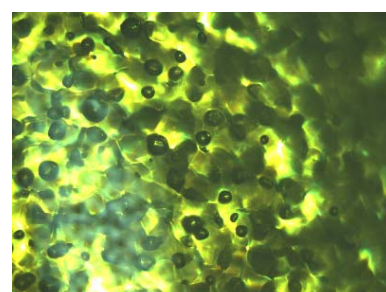
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda
POLARIZACIJSKI MIKR.	Prisotnost posameznih kristalov	Odsotnost kristalov pri dveh vzorcih, prisotnost kristalov pri drugih dveh vzorcih	Odsotnost kristalov, vendar izgled nehomogene zmesi
DSC	Odsotnost talilnega vrha, prvi cikel seg. Tg = 51.0 °C, drugi cikel seg. Tg = 51.5 °C	/	Odsotnost talilnega vrha, drugi cikel seg. 5 min temperiranja Tg = 53.5 °C



Slika 40: PLM slika HME vzorca; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU)

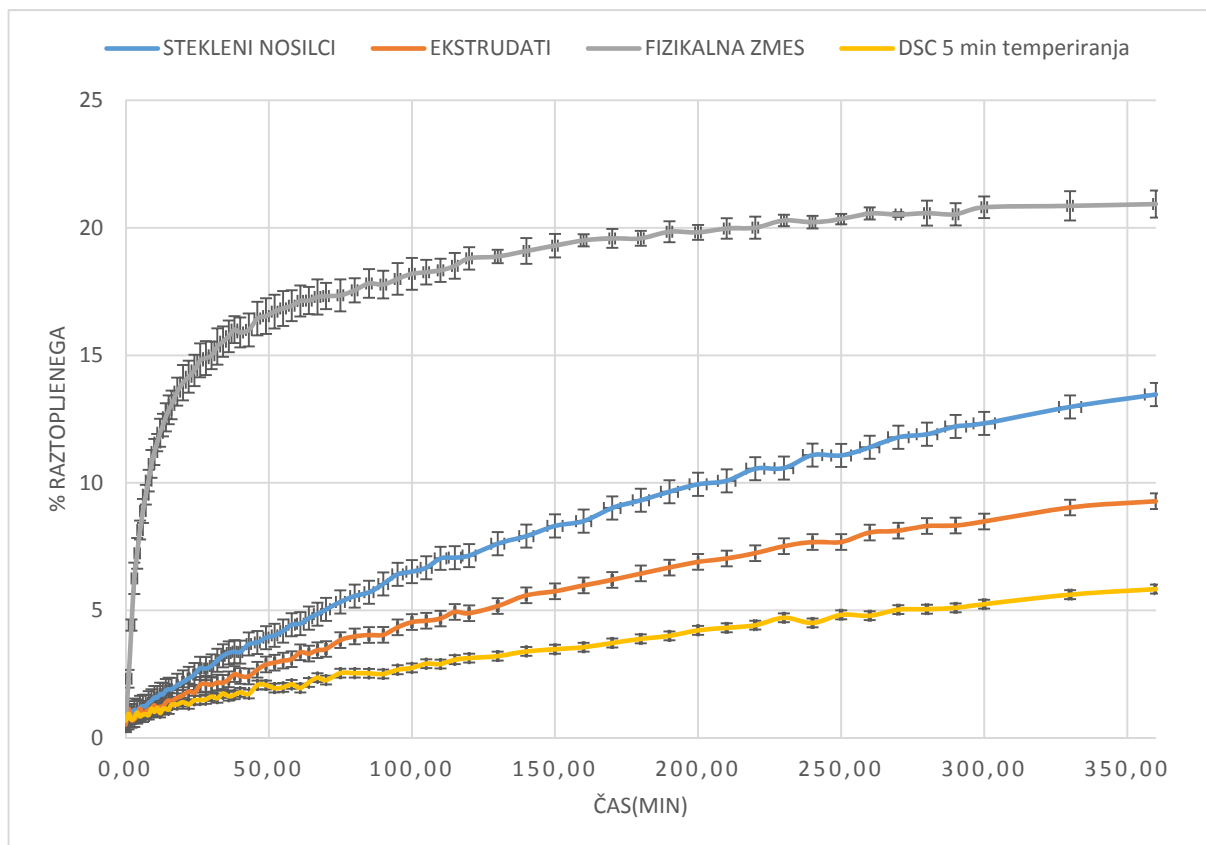


Slika 41: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU)



Slika 42: PLM DSC slika vzorca; čas 1 mesec (30% DPD; SOLU)

Rezultati preizkusa sproščanja pokažejo, da se je tako pri vzorcih na steklenih nosilcih kot pri ekstrudatih topnost s časom staranja povečala, pri čemer je sprememba večja pri vzorcih na steklenih nosilcih. Razloge bi lahko iskali pri vodi, ki se je absorbirala in tako predhodno omočila vzorce. V tem primeru sta se obe metodi omejenega obsega (DSC, stekleni nosilci) podobno približali HME v profilu sproščanja, vendar z odstopanjem navzdol in navzgor. Profil sproščanja izdelan z DSC ostaja tudi po staranju praktično enak tistemu ob času 0.

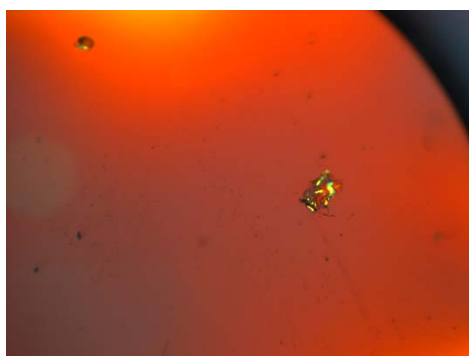


Slika 43: Profili sproščanja , 30% DPD v SOLU, 1 mesec 25 °C, 60 % RV

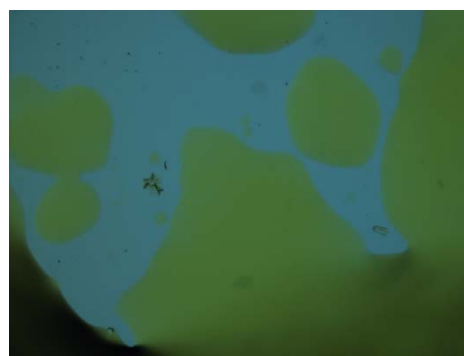
4.3.3.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV

Preglednica 19: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni(30% DPD; KLVA64)

VZOREC	1.HME	2. STEKLENI NOSILCI
PLM	Posamezni kristali	Skoraj popolna odsotnost kristalov

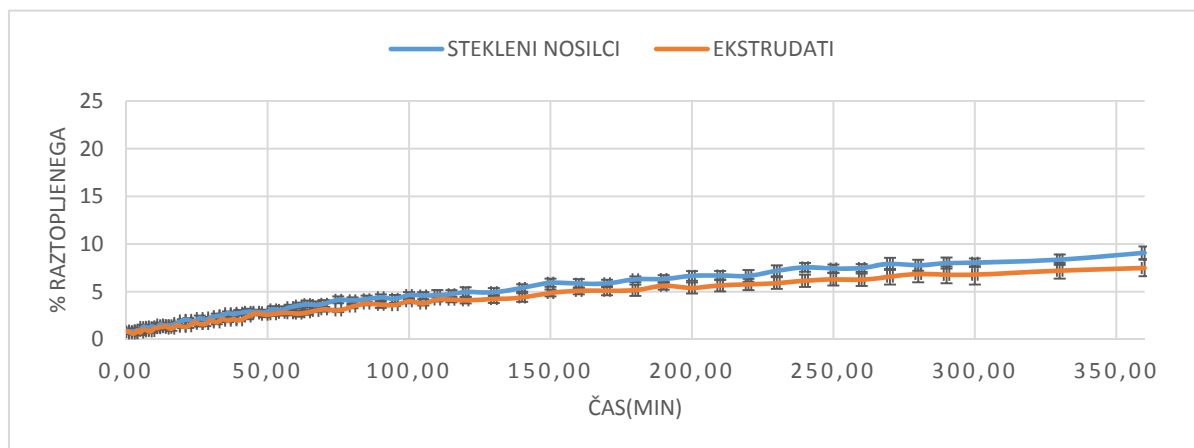


Slika 44: PLM slika HME vzorca čas 2 dni ostri pogoji (30% DPD; SOLU)



Slika 45: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 2 dni ostri pogoji(30% DPD; SOLU)

Pri vzorcih s SOLU v primerjavi z vzorci s KLVA64 po 2 dneh na ostrih pogojih ni bilo opaziti praktično nič kristalov (Preglednica 19 ter Sliki 44 in 45). Posamezni kristali so se sicer pojavili pri vzorcih HME, vendar je bilo teh zanemarljivo malo.



Slika 46: Test sproščanja, 30% DPD; SOLU; 2 dni 40 °C, 100% RV

Odsotnost kristaliničnosti potrjuje tudi preizkus sproščanja, saj se rezultati sproščanja po dvodnevem staranju vzorcev v primerjavi s časom nič praktično ne razlikujejo. Sta si pa vzorca obeh metod omejenega obsega zelo podobna po profilu sproščanja.

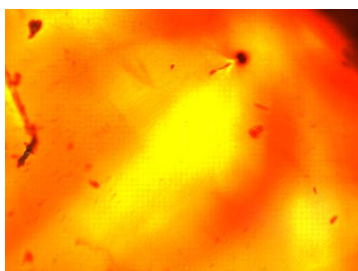
4.3.4 DISPERZIJE 30% DIPIRIDAMOLA, 5% SDS V KOLLIDON® VA64

Ker smo želeli preveriti tudi vpliv tretje komponente na napovedno vrednost preizkušanih metod, smo obema kombinacijama dodali še tretjo komponento, natrijev lavril sulfat. Najprej velja omeniti, da je za vgraditev natrijevega lavril sulfata potrebna strižna sila, ki jo dosežemo samo pri HME, saj v nasprotnem primeru ne dobimo homogenega sistema (Preglednica 20).

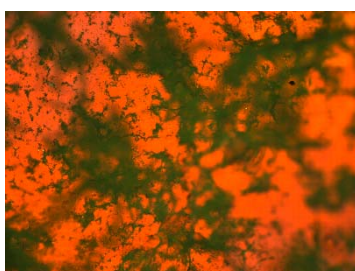
4.3.4.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI

Preglednica 20: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda 5 min temperiranja	3. DSC pripravljalna metoda 20 min temperiranja
POLARIZACIJSKI MIKR.	Odsotnost kristalov	Kristali (najverjetneje SDS)	Kristali (najverjetneje SDS)	Kristali (najverjetneje SDS)
DSC	Odsotnost talilnega vrha DPD ali SDS, prvi cikel seg. Tg = 59.2 °C, drugi cikel seg. Tg = 79.7 °C	/	Talilni vrh pri 75.2 °C, drugi cikel seg. Tg = 82.7 °C	Odsotnost talilnega vrha, drugi cikel seg. Tg = 84.2 °C



Slika 47: PLM slika HME vzorca čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)



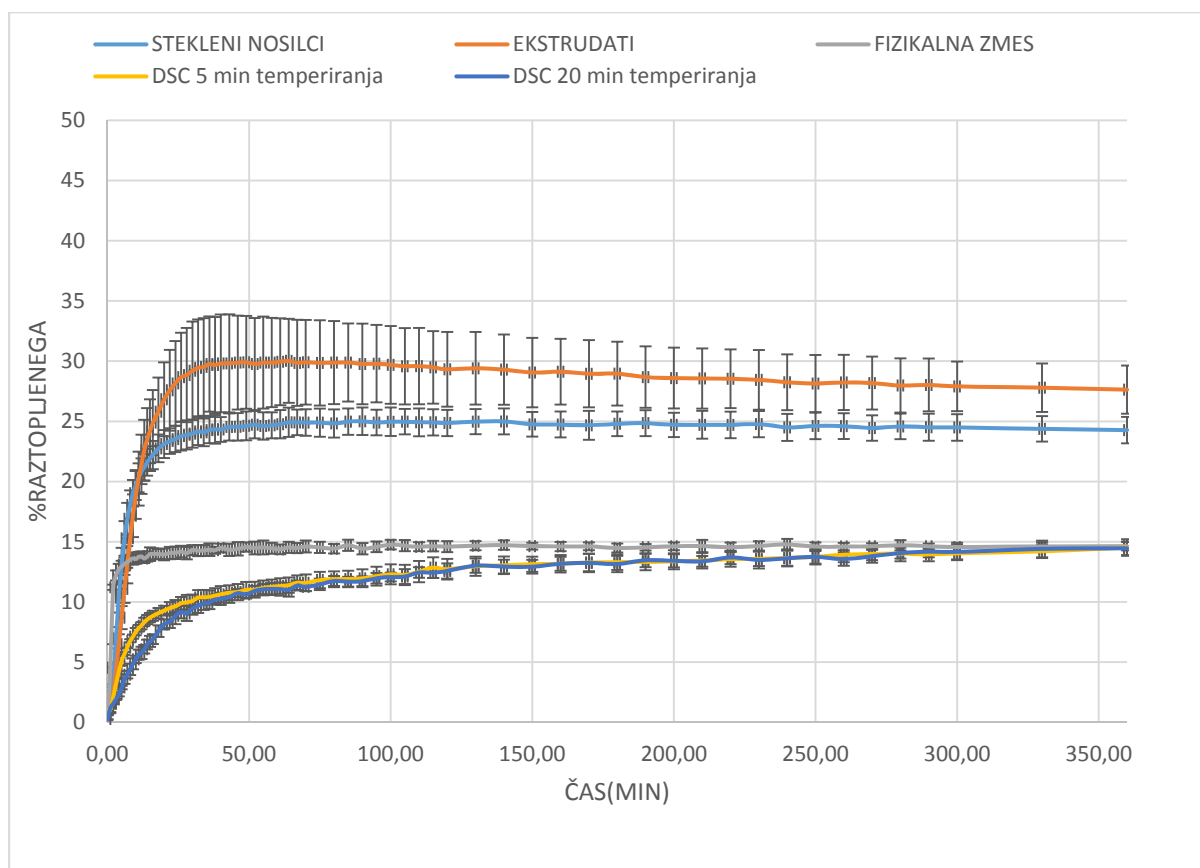
Slika 48: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)



Slika 49: PLM slika DSC vzorca čas 0 (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

Kar opazimo pod mikroskopom je, da edino metoda HME zagotovi homogenost vzorcev, kar lahko pripišemo strižni sili, ki je udeležena pri HME. Pri ostalih dveh metodah vidimo s PLM kristale, ki so najverjetneje SDS. Tg-ji, ki jih dobimo z DSC-jem so zelo podobni, le pri prvem ciklu segrevanja ekstrudatov je opaziti veliko nižjo Tg, kar je posledica zgodovine vzorca (strižnih sil, katerim je bil podvržen vzorec). V vseh primerih pa so rezultati Tg nižji

kot pri vzorcih, kjer imamo samo DPD in KLVA64, kar kaže na to, da deluje SDS kot plastifikator in da se je del SDS-a raztopil. Pri DSC metodi, kjer smo izvajali temperiranje le 5 min opazimo tudi majhen talilni vrh (ki se sicer prekriva s signalom steklastega prehoda). Tu gre lahko za nečistoto (morda natrijev sulfat), ki jo je vseboval vzorec SDS-a.



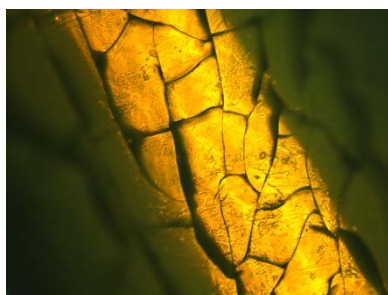
Slika 50: Profili sproščanja vzorcev trdnih disperzij 30% DPD, 5% SDS v KLVA64; čas 0; siva barva predstavlja fizikalno zmes sistema

Iz diagrama sproščanja (Slika 50) lahko vidimo, da se metoda steklenih nosilcev zelo približa ekstrudatom. SDS smo kot površinsko aktivno snov dodali, da bi izboljšali močljivost in topnost dipiridamola. Izkazalo pa se je ravno obratno, saj je bila učinkovina v ekstrudatih s SDS-om v povprečju za 15 % slabše topna v primerjavi s tistimi brez SDS-a. DSC metodi se med sabo nista razlikovali in sta izkazovali najnižje hitrosti raztapljanja ter topnost primerljivo s fizikalno zmesjo. Lahko vidimo, da je v tem primeru tvorba amorfne disperzije poslabšala topnost in hitrost raztapljanja.

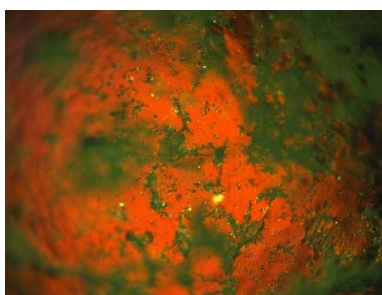
4.3.4.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25 °C in 60% RV

Preglednica 21: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

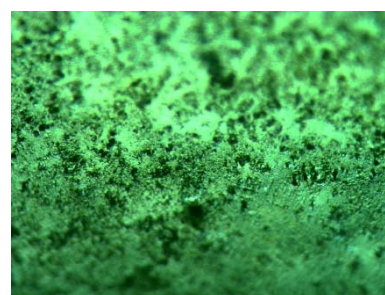
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda
POLARIZACIJSKI MIKROSKOP	Odsotnost kristalov, velika razpokanost/poroznost vzorca	Kristali, najverjetneje SDS, morda tudi DPD	Kristali, najverjetneje SDS
DSC	Odsotnost talilnega vrha, drugi cikel seg. Tg = 79.2 °C	/	Talilni vrh SDS-a pri 199.1 °C, drugi cikel seg. 5 min temperiranja Tg = 80.5 °C



Slika 51: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)-slikano s strani

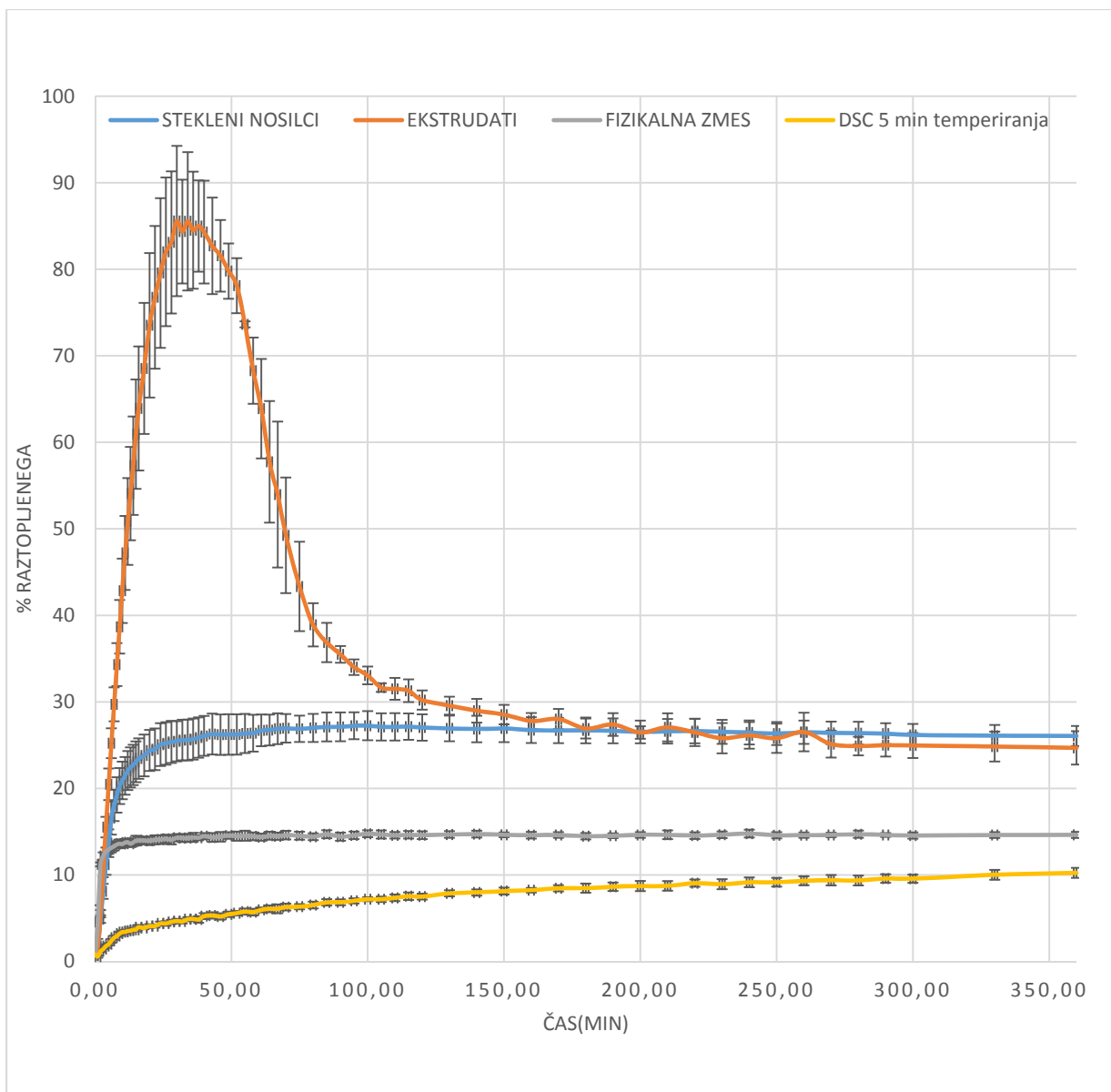


Slika 52: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)-slikano z odbojno svetlobo



Slika 53: PLM DSC vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

Tako kot pri vzorcih brez SDS-a, opazimo pri staranemu vzorcu ekstrudata veliko razpokanost (Slika 51) in kot se bo videlo v rezultatih sproščanja, to prinese veliko povečanje površine in posledično hitro sproščanje. Pri vzorcih na steklenih nosilcih in DSC vzorcih (Sliki 52 in 53) opazimo pod mikroskopom kristale, ki najverjetneje pripadajo SDS-u. DSC analiza je pokazala odsotnost talilnega vrha tako učinkovine kot SDS-a pri ekstrudatih. Pri DSC vzorcih pa vidimo talilni vrh pri 199.1 °C, ki najverjetneje pripada SDS-u ($T_T = 198.4$ °C), kar je tudi za pričakovati, saj PLM pokaže kristaliničnost vzorca.



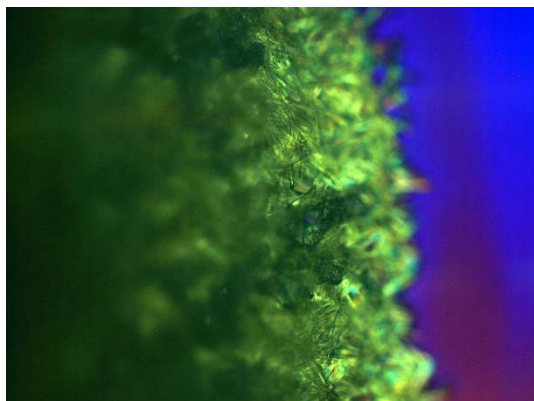
Slika 54: Preizkus sproščanja različnih vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD, 5% SDS v KLVA64, 1 mesec 25 °C, 60% RV; siva barva predstavlja rezultat fizikalne zmesi

Pri diagramu sproščanja opazimo enak pojav, kot se pojavi tudi pri vzorcih s polimerom brez SDS-a. Zaradi razpokanosti vzorca je ta zelo porozen, kar privede do hitrega sproščanja in povečanja metastabilne topnosti, vendar se enako hitro dipiridamol tudi obori. V primerjavi z vzorci brez SDS-a je to tu veliko bolj izrazito. Pričakovali bi, da bo SDS s tvorbo micelov in vključevanjem učinkovine v njih podaljšal čas povečane metastabilne topnosti, vendar je ravno obratno, saj ga skrajša. Razen prvega dela, ko pride do izraza velika razlika v specifični površini med ekstrudati in vzorci s steklenimi nosilci, vidimo, da sta si krivulji v drugem delu zelo podobni (praktično se prekrivata). Iz tega lahko zaključimo, da metoda steklenih nosilcev daje v tem primeru zelo primerljive rezultate.

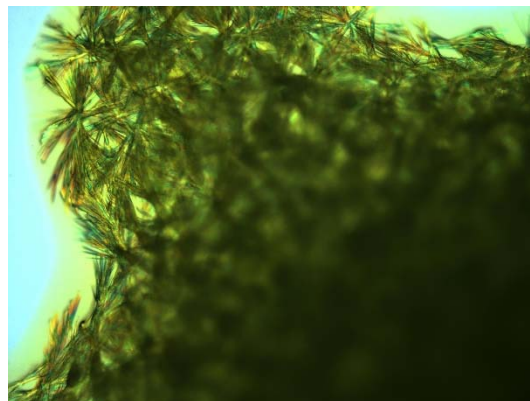
4.3.4.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40°C in 100% RV

Preglednica 22: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 2 dni (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

VZORCI	1.HME	2. STEKLENI NOSILCI
PLM	Popolna kristalizacija	Popolna kristalizacija

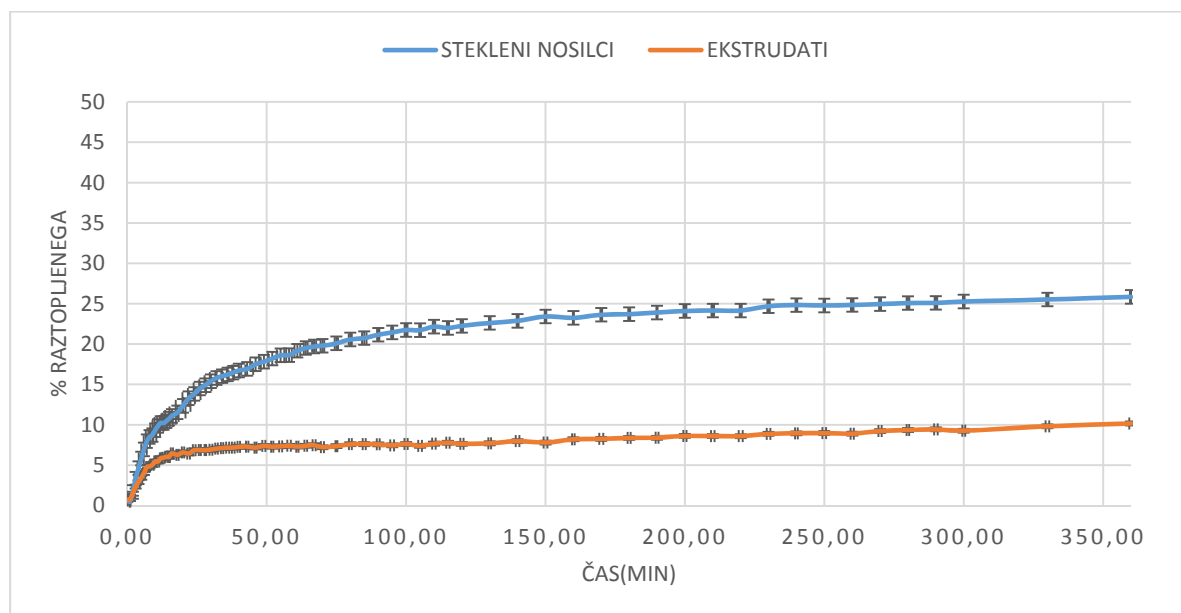


Slika 55: PLM slika HME vzorca 2 dni ostri pogoji (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)



Slika 56: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih 2 dni ostri pogoji (30% DPD; 5% SDS; KLVA64)

Iz PLM slik obeh vzorcev (Sliki 55 in 56) lahko vidimo, da je prišlo do popolne kristalizacije dipiridamola.



Slika 57: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30 % DPD; 5 % SDS v KLVA64; 2 dni 40 °C, 100% RV

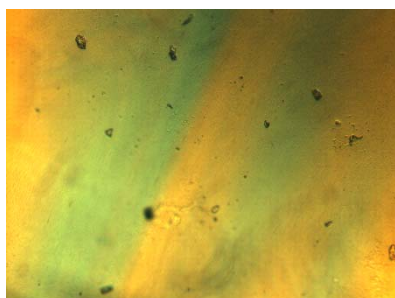
Iz diagrama sproščanja opazimo zelo zanimiv pojav, saj se kljub kristalizaciji topnost vzorcev na steklenih nosilcih ni spremenila, medtem ko se je pri ekstrudatih le-ta zelo zmanjšala.

4.3.5 30% DIPIRIDAMOLA, 5% SDS V SOLUPLUS®

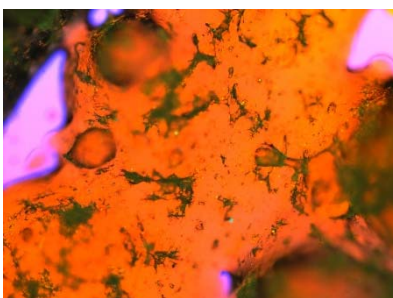
4.3.5.1 VZORCI TAKOJ PO IZDELAVI

Preglednica 23: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)

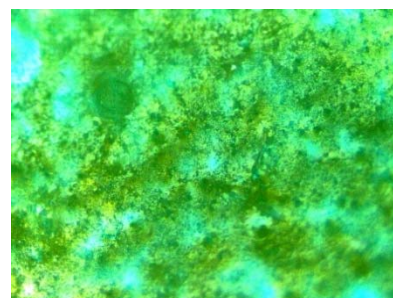
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda 5 min prileganja	4. DSC pripravljalna metoda 20 min prileganja
POLARIZACIJSKI MIKR.	Odsotnost kristalov	Kristali (najverjetneje SDS)	Kristali (najverjetneje SDS)	Kristali (najverjetneje SDS)
DSC	Odsotnost talilnega vrha, prvi cikel seg. Tg = 41.7 °C, drugi cikel seg. Tg = 48.4 °C	/	Majhen talilni vrh pri 88.2 °C (verjetno nečistota), drugi cikel seg. Tg = 63.6 °C,	Talilni vrh pri 88.1 °C (manjši-verjetno nečistota) in 185.7 °C (večji –verjetno SDS), drugi cikel seg. Tg = 59.1 °C



Slika 58: PLM HME vzorca čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)

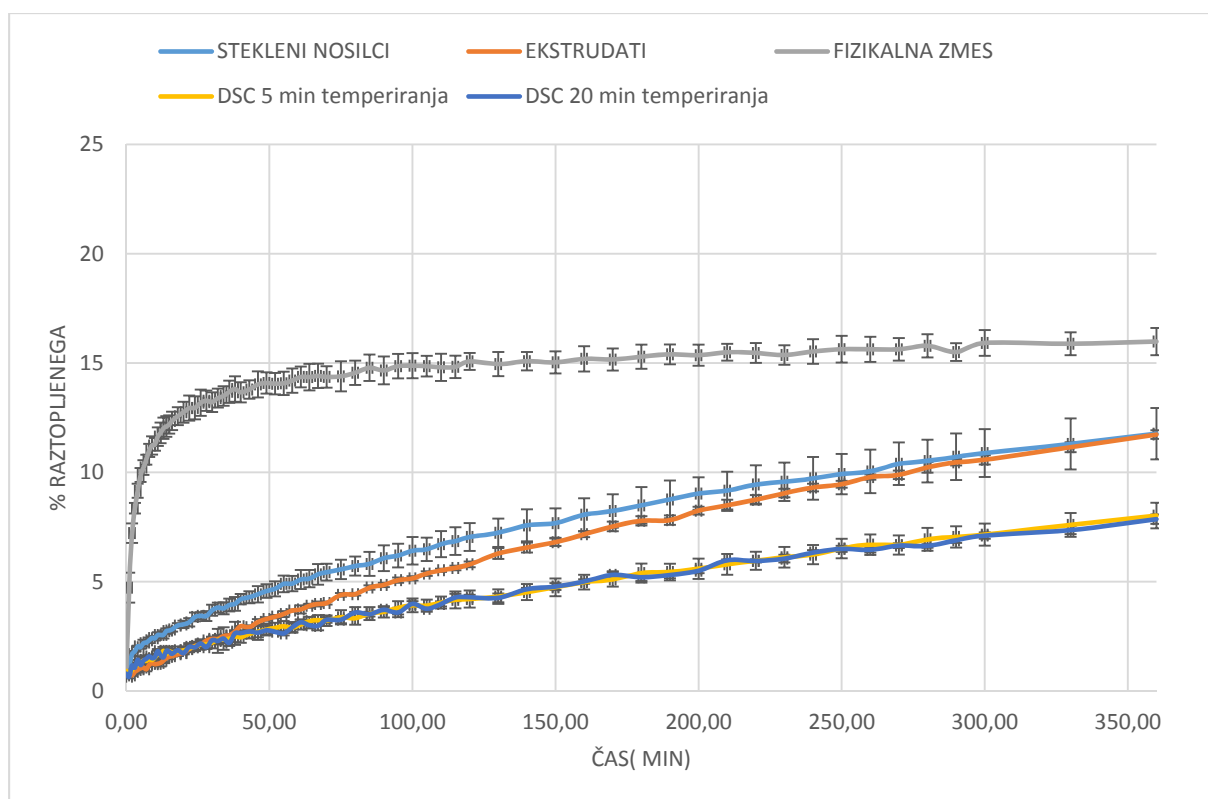


Slika 59: PLM vzorca na steklenih nosilcih čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)



Slika 60: PLM DSC vzorca čas 0 (30% DPD; 5% SDS; SOLU)

Pregled pod mikroskopom (Slike 58 – 60) pokaže enake rezultate kot pri drugem polimeru (KLVA64). Vzorec z metodo HME je brez kristalov, medtem ko vsebujeta ostala dva vzorca kristale pripadajoče SDS-u. Potrditev slednjega dobimo tudi po DSC analizi, saj pri HME vzorcih nimamo talilnega vrha, medtem ko imamo le-tega pri DSC vzorcih. In sicer imamo v DSC vzorcih celo dva. Tisti pri 88 °C je najverjetneje nečistota SDS-a, medtem ko je tisti pri 185.7 °C pripada SDS. Slednjega pri vzorcu s 5 min temperiranja nimamo, saj smo te analize vršili samo do temperature 170 °C (iskali smo samo talilni vrh učinkovine).



Slika 61: Profili sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD, 5% SDS v SOLU; čas 0; siva predstavlja fizikalno zmes sistema

Preizkus sproščanja nam pokaže, da so za razliko od polimera KLVA64, pri SOLU rezultati sproščanja boljši z SDS-om kot brez (za 4%). Kot pri večini ostalih primerov so se tudi tu vzorci na steklenih nosilcih najbolj približali profilu sproščanja vzorcev HME, medtem ko se oba DSC vzorca enako razlikujeta glede na HME vzorce.

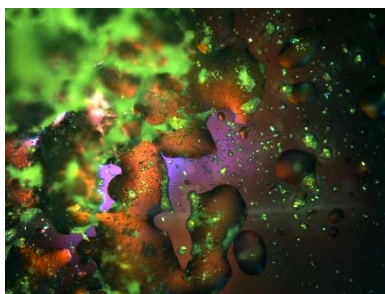
4.3.5.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 1 MESEC NA 25 °C in 60% RV

Preglednica 24: Analiza vzorcev trdnih disperzij; čas 1 mesec(30% DPD;5% SDS; SOLU)

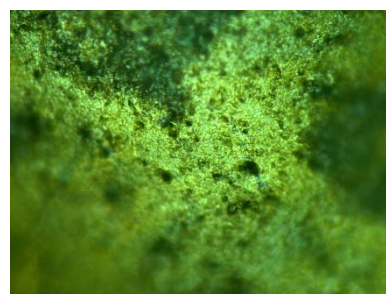
ANALIZNE METODE	1. HME	2. TALJENJE NA STEKLENIH NOSILCIH	3. DSC pripravljalna metoda
POLARIZACIJSKI MIKR.	Prisotnost kristalov(najverjetneje SDS)	Prisotnost kristalov(najverjetneje SDS), morda tudi DPD	Prisotnost kristalov(najverjetneje SDS)
DSC	Dva talilna vrha, prvi pri 130.7 °C, drugi pri 173.2 °C, prvi cikel seg. Tg = 50.2 °C, drugi cikel seg. Tg = 51.2 °C	/	Dva talilna vrha, prvi pri 118.5 °C, drugi pri 186.2 °C, prvi cikel seg. Tg = 52.07 °C, drugi cikel seg. Tg = 53.8 °C



Slika 62: PLM slika HME vzorca čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; SOLU); 50x povečava

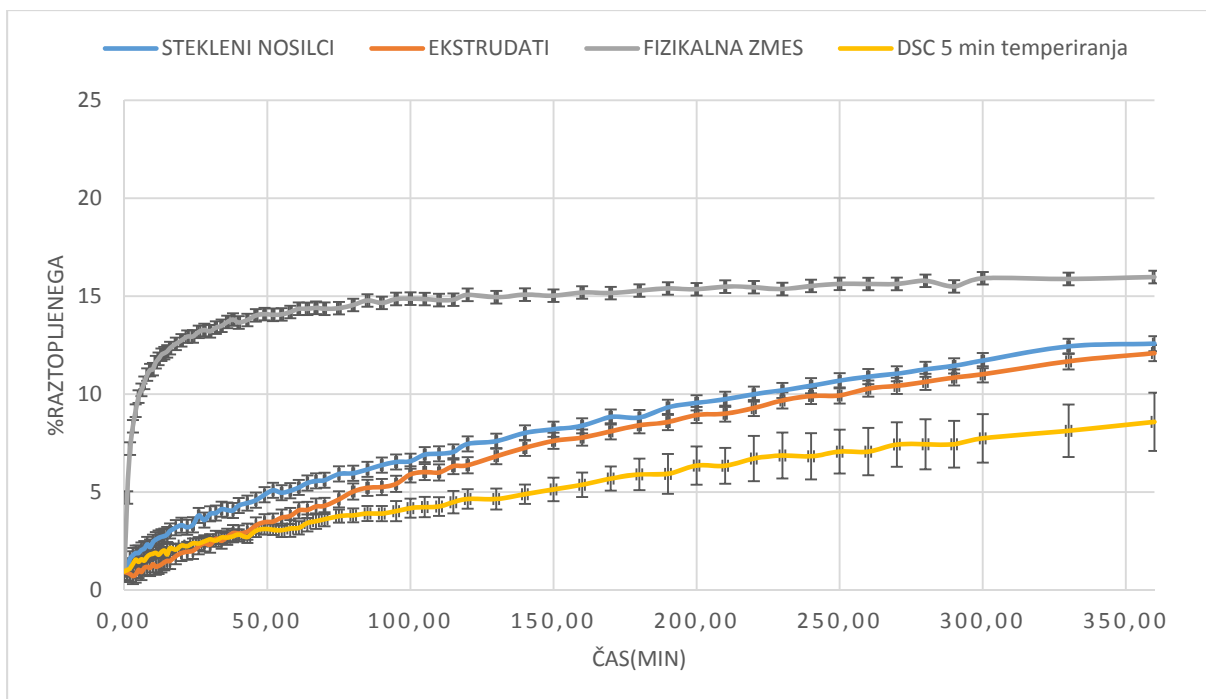


Slika 63: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 1 mesec (30% DPD; 5% SDS; SOLU)



Slika 64: PLM slika DSC vzorca čas 1 mesec(30% DPD; 5% SDS; SOLU)

Iz slik 62 do 64 lahko vidimo, da je pri vseh treh vzorcih prišlo do kristalizacije. To lahko vidimo tudi iz DSC meritev, saj imamo tako pri HME vzorcih kot pri DSC vzorcih dva talilna vrha, ki najverjetneje pripadata SDS-u in nečistoti v njem. Tg vrednost HME in DSC disperzij se s staranjem vzorca poenoti, verjetno zaradi relaksacije molekul in absorbcije vode kot plastifikatorja.



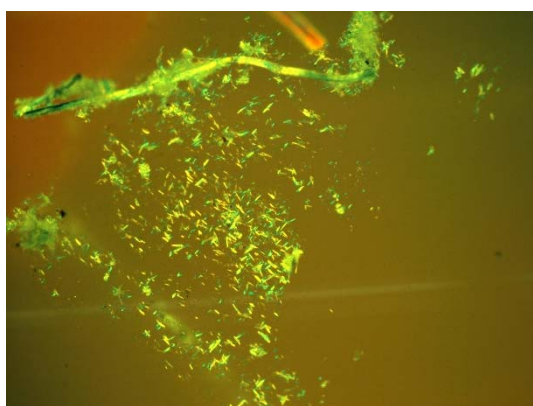
Slika 65: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30% DPD, 5% SDS v SOLU, 1 mesec 25 °C, 60% RV; siva barva predstavlja sistem fizikalne zmesi

Iz preizkusa sproščanja (Slika 65) lahko vidimo, da so vzorci, kar se tiče profila sproščanja, obdržali svoje lastnosti, saj je profil sproščanja v vseh treh primerih enak kot pred staranjem vzorcev. To je po eni strani presenetljivo, saj je prišlo do rekristalizacije, vendar je to verjetno predvsem rekristalizacija SDS-a in ne učinkovine, tako da je to razlog za enak profil sproščanja. Ker se profil sproščanja ni spremenil, se je tudi v tem primeru, kot pri času nič, vzorcem HME najbolj približala metoda s steklenimi nosilci.

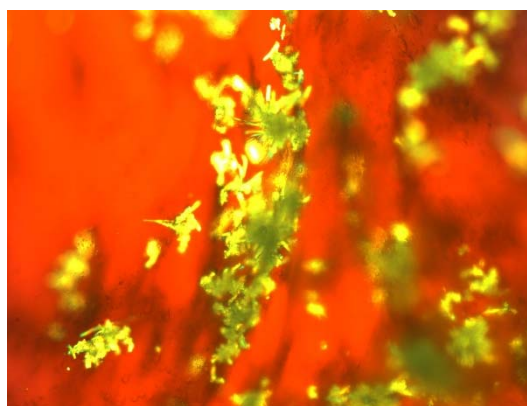
4.3.5.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA 2 DNI NA 40 °C in 100% RV

Preglednica 25: Analiza vzorcev trdnih disperzij, čas 2 dni (30% DPD; 5% SDS; SOLU)

VZORCI	1.HME	2. STEKLENI NOSILCI
PLM	Posamezna območja kristalov, ki pa so neenakomerno in redko pojavljajo, lahko SDS ali DPD	Prišlo je do kristalizacije preko celotnega vzorca



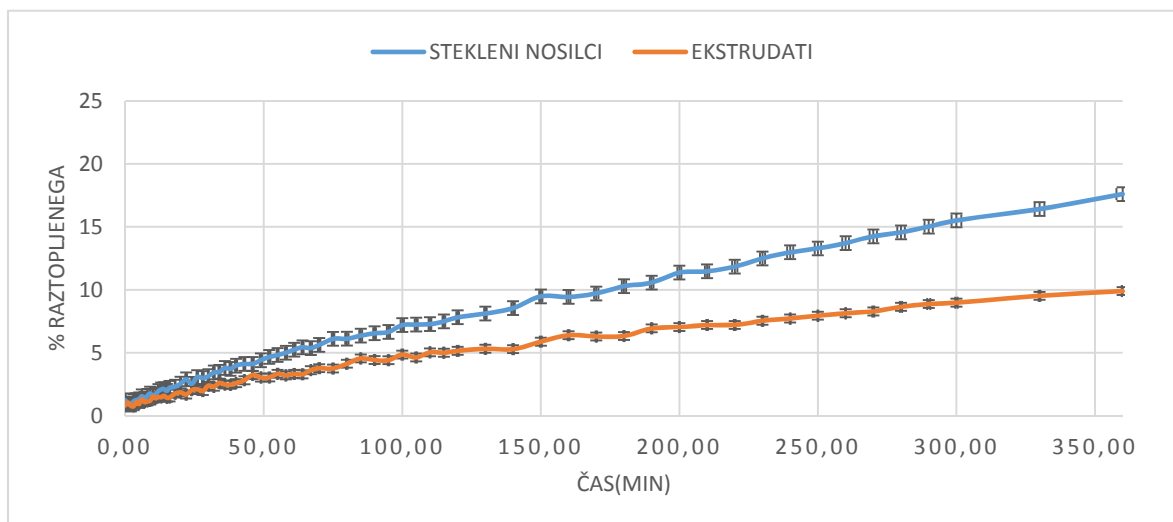
Slika 66: PLM slika HME vzorca čas 2 dni ostri pogoji (30% DPD; 5% SDS; SOLU)



Slika 67: PLM slika vzorca na steklenih nosilcih čas 2 dni ostri pogoji(30% DPD; 5% SDS; SOLU)

Iz Slike 66 in 67 lahko vidimo, da je v obeh primerih prišlo do kristalizacije, pri čemer je bila kristalizacija v primeru steklenih nosilcev veliko večja in bolj enakomerno razporejena po celotni površini, medtem ko je v primeru HME vzorcev ta obsegala posamezna področja povečane kristalizacije. V tem primeru je najverjetneje prišlo do kristalizacije tako SDS-a kot dipiridamola.

Pri rezultatih sproščanja je opaziti zanimiv pojav. In sicer je prišlo pri ekstrudatih do rahlega (2%) znižanja topnosti, medtem ko je pri steklenih nosilcih prišlo do povečanja topnosti za 5% v primerjavi s časom 0. Fenomena, zakaj je v prvem primeru prišlo do zmanjšanja, v drugem pa do zvečanja topnosti, ne znamo razložiti.



Slika 68: Preizkus sproščanja vzorcev trdnih disperzij, 30 % DPD; 5 % SDS v SOLU; 2 dni 40 °C, 100% RV

4.3.6 PRIMERJAVA ALTERNATIVNIH METOD IZDELAVE Z VIDIKA PROFILA SPROŠČANJA IN STABILNOSTI

Rezultati testov sproščanja so pokazali, da se je v sedmih od osmih primerov metoda omejenega obsega z rabo steklenih nosilcev najbolj približala rezultatom ekstrudatov (v enem primeru sta bili obe alternativni metodi omejenega obsega izenačeni). V petih od osmih primerov smo dobili dobro korelacijo med profiloma sproščanja HME vzorca in vzorca na steklenem nosilcu (v treh primerih sta si bili krivulji praktično enaki). Dobri rezultati so bili dokumentirani tako ob času 0, kot po stabilnostnih testih. Pričakovati je bilo, da bosta obe alternativni metodi (metoda steklenih nosilcev in DSC metoda) dali primerljive rezultate. To bi lahko sklepali po podobni površini in zelo podobni pripravi (enaka temperatura za taljenje in čas taljenja). Presenetljivo smo ugotovili, da temu ni bilo tako. Razloge za to lahko iščemo v različni dinamiki segrevanja in ohlajanja oz. v različni zgodovini priprave vzorca. Taljenje pri steklenih nosilcih je bilo izvedeno tako, da smo vzorce dali v že segreto pečico in jih po taljenju nemudoma dali na sobno temperaturo, medtem ko je pri DSC vzorcih, vzorec bil 2x postopoma segrevan in vsakič tudi postopoma ohlajen. Po drugi strani je presenetljivo, da je metoda steklenih nosilcev dala tako primerljive rezultate z metodo HME, čeprav imamo pri slednji poleg temperaturne komponente še komponento strižne sile, kot posledico vrtenja polžev v ekstruzijski cevi. Strig je bil v našem primeru potreben tudi za tvorjenje homogene taline (za uspešno raztapljanje SDS-a v polimeru), vendar raztopitev SDS ni bistveno vplivala na profil sproščanja v nobenem od preučevanih HME primerov.

Tudi z vidika stabilnosti se je metoda steklenih nosilcev obnesla najboljše pri napovedovanju profilov sproščanja HME vzorcev. Pri obeh alternativnih metodah smo imeli težavo, ker je bilo za tvorbo homogene zmesi s SDS-om potrebno uporabiti strižno silo, to je bilo doseženo samo z uporabo HME metode. Pri DSC metodi se je pokazalo, da čeprav na termogramu opazimo en Tg, kar bi nam dalo misliti, da gre za homogeno disperzijo, temu najverjetneje ni tako. Pregled z mikroskopom je dal vtis, da gre za nehomogeno disperzijo, ki je sicer v celoti amorfna, vendar ne homogena.

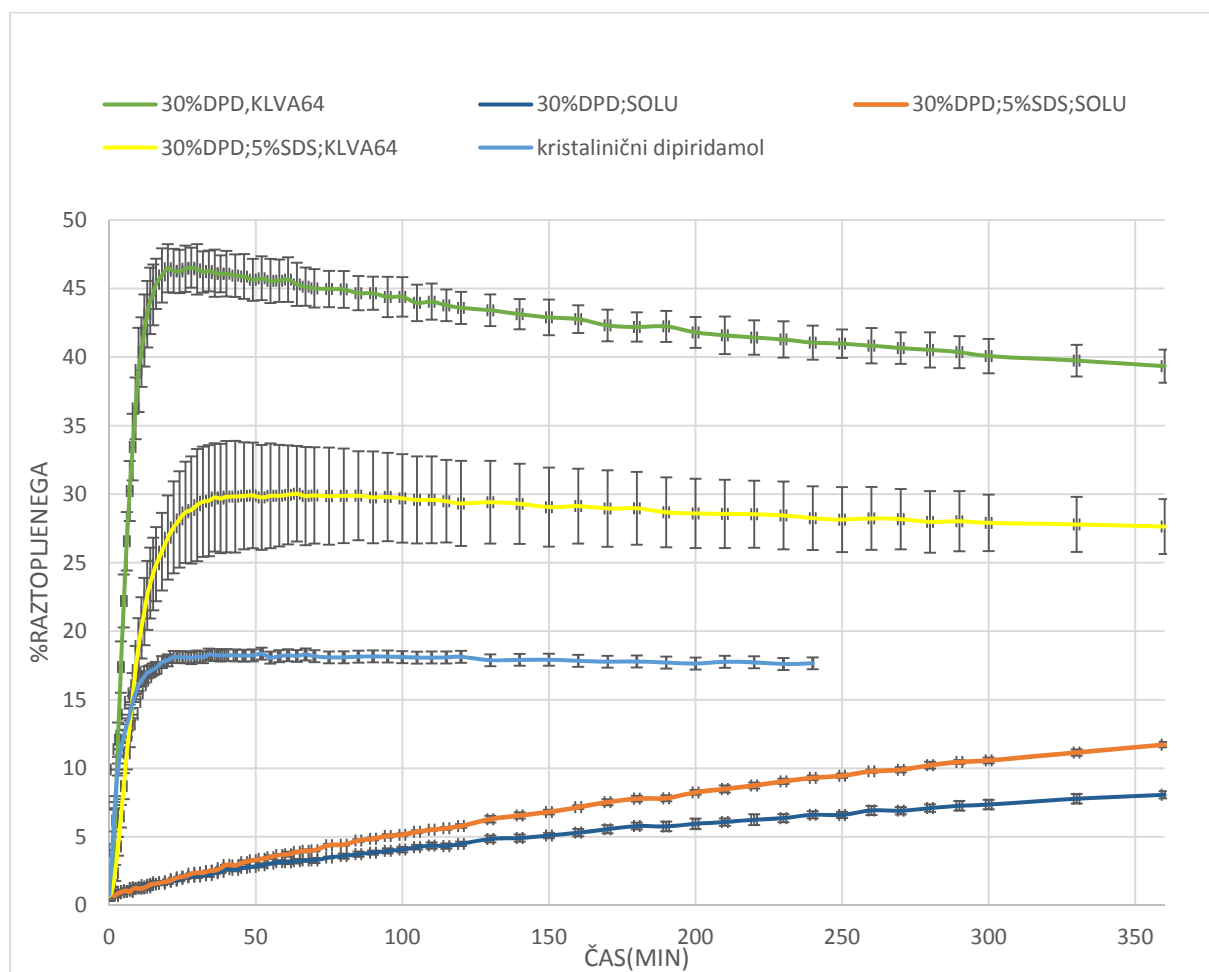
4.3.7 PRIMERJAVA UPORABLJENIH METOD VREDNOTENJA TRDNIH DISPERZIJ

Pri delu smo uporabili dve metodi za vrednotenje trdnih disperzij. PLM se je izkazala kot hitra in enostavna metoda za ugotovitev morebitne kristaliničnosti in same morfologije vzorca (razložili smo lahko drastično kratkotrajno povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja pri vzorcih s KLVA64 po 1 mesecu staranja). Poleg tega se je PLM v kombinaciji z metodo steklenih nosilcev v preliminarni študiji pokazala kot dobra metoda za napoved mešanja dveh komponent. Iz DSC analize, ki je bila narejena v BASF je vidno, da je Kolliphor P188 samo delno topen v KLVA64 (talilni vrh Kolliphorja P188 je viden v termogramu), kar smo tudi mi potrdili z analizo pod mikroskopom (7). Z metodo PLM lahko poleg tega identificiramo še tako majhne deleže kristaliničnosti. DSC se je po drugi strani izkazala kot dobra metoda za ugotavljanje obsežnejše kristalizacije snovi in kot nujna metoda, v kolikor želimo dobiti Tg zmesi, s katero lahko nato lažje izberemo ustrezno temperaturo za metodo HME. Problema, s katerima smo se srečali pri interpretaciji DSC meritev, sta bila še določitev nižje Tg pri ekstrudatih takoj po izdelavi (zaradi velikega vnosa mehanske energije) ter vsebnost vode pri staranih vzorcih, ki je vplivala na Tg. Prvi problem bi lahko morda rešili tako, da bi vzorce pustili nekaj dni »počivati« na ustreznih pogojih, da bi se talina relaksirala. Drugemu problemu bi se lahko ognili na ta način, da bi vzorce postavili v komoro z znižanim % RV, da bi se absorbirana voda odstranila, kar bi bilo smiselno, če bi želeli preveriti ali je razlika v Tg v primerjavi s časom nič, posledica npr. relaksacije taline in ne absorbcije vode.

4.4 PRIMERJAVA AMORFNIH DISPERZIJ

V diagramu sproščanja na Sliki 69 so podani profili sproščanja ekstrudatov takoj po izdelavi ter sama kristalinična učinkovina, pri čemer je pri slednji predpostavljen odmerek 3 mg dipiridamola na 10 mg zmesi (poizkus smo izvedli tako, da smo dali presežno količino dipiridamola, to je cca 5 mg). Iz profilov sproščanja lahko ugotovimo, da izdelava trdnih

disperzij z uporabo KLVA64 izboljša tako metastabilno topnost kot hitrost raztapljanja dipiridamola, pri čemer dodatek SDS-a kot surfaktanta poslabša navedene lastnosti. Nasprotno izdelava trdnih disperzij s SOLU v primeru DPD upočasni sproščanje, kljub temu, da proizvajalec navaja, da uporaba le-tega pri trdnih disperzijah v splošnem privede do hitrega sproščanja in izjemnega povečanja topnosti (7). Dodatno zanimivo je, da v primeru SOLU dodatek SDS-a rahlo izboljša topnost trdnih disperzij. Razlog za to bi lahko bil, da SDS, ki je dobro topen v vodi, omogoči le-tej lažji dostop do učinkovine znotraj polimernega matriksa. V primeru KLVA64 pa ima SDS najverjetneje negativen učinek zaradi počasnejšega raztapljanja v primerjavi s samim polimerom.



Slika 69: Primerjava profilov sproščanja ekstrudatov vseh štirih mešanic, rezultati ob času 0; svetlo modra barva predstavlja kristalinični DPD

Z vidika stabilnosti so se vse kombinacije relativno dobro obnesle. Kljub pospešenemu testu stabilnosti pod milimi pogoji ni v nobenem primeru prišlo do kristalizacije dipiridamola. V primeru bolj ostrih pogojev pa se je pokazala lastnost SOLU kot polimera, ki tvori veliko interakcij z učinkovino. Za razliko od KLVA64, v katerem je dipiridamol po 2 dneh na 40 °C in 100% RV popolnoma kristaliziral, je v SOLU ta ostal popolnoma v amorfni obliki.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo najprej poskušali učinkovino razreda II. BCS sistema dodatno solubilizirati v polimerih z uporabo surfaktantov. To nam ni uspelo, saj uporabljeni surfaktanti niso bili topni v izbranih polimerih. V nadaljevanju smo poskušali razviti metodo omejenega obsega, ki bi na najboljši možen način napovedala profil sproščanja in stabilnost produktov, izdelanih z metodo HME, pri čemer bi takšna metoda uporabljala miligramske količine ZU in ne gramskih. Alternativni metodi omejenega obsega sta bili DSC metoda in metoda taljenja na steklenih nosilcih. Za namene preizkusa sproščanja smo uporabljali posebej izdelano miniaturizirano napravo za sproščanje po USP 2. Pri metodi steklenih nosilcev smo lahko vzorce neposredno uporabili, v primeru DSC metode pa smo morali predvideti izdelavo posebnih steklenih držal, ki so držala DSC posodice na dnu posod za sproščanje. Kot najboljša v napovedovanju, tako profila sproščanja kot stabilnosti, se je izkazala metoda steklenih nosilcev. Pri slednji bi lahko, da bi še bolj izboljšali ponovljivost, uporabili obroče nameščene na steklene nosilce, ki bi omejili razprostiranje taline in na ta način točno definirali površino taline posameznega vzorca.

V nalogi smo vrednotili tudi dva polimerna nosilca trdnih disperzij, Kollidon® VA64 in Soluplus®, z in brez natrijevega lavril sulfata, z vidika izboljšanja topnosti slabo topne učinkovine in fizikalne stabilnosti v amorfni trdni disperziji. Izkazalo se je, da KLVA64 bolj poveča metastabilno topnost in hitrost raztapljanja, vsaj v okviru relevantnega časa za absorpcijo *in vivo*. Medtem ko je SOLU boljši tvorec ogrodja disperzije, z vidika zagotavljanja stabilnosti v primeru preprečevanja rekristalizacije dipiridamola.

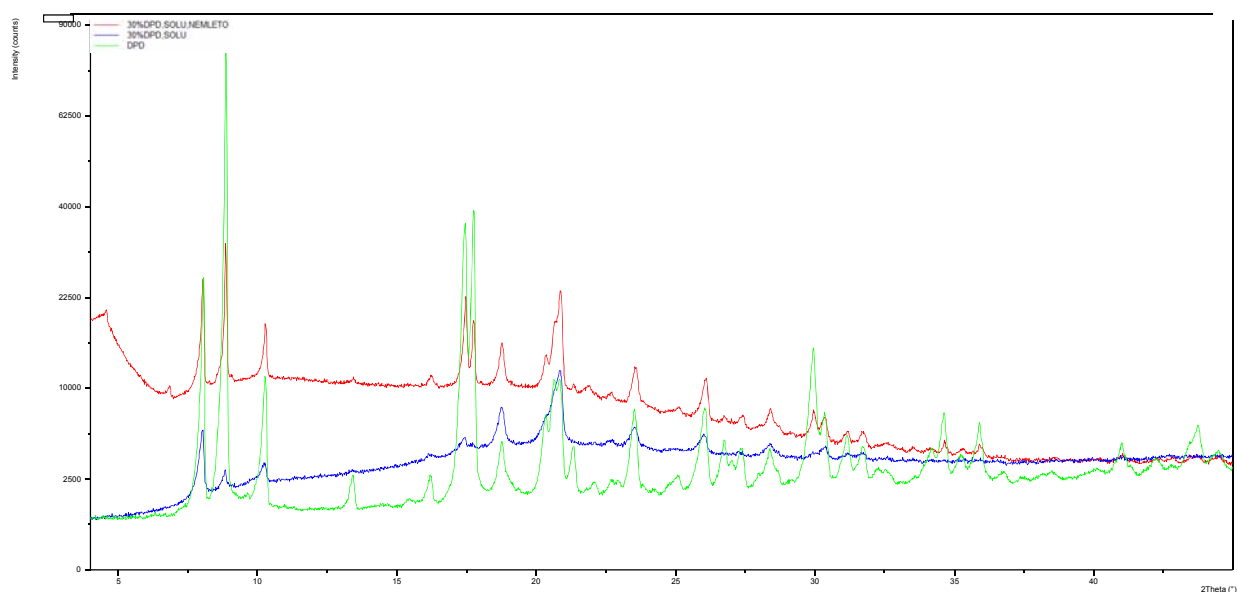
Za analizo izdelanih trdnih disperzij smo uporabili polarizacijski mikroskop in metodo dinamične diferenčne kalorimetrije. Izkazalo se je, da je uporaba prvega nujna v kolikor želimo zaznati majhne količine kristalinične snovi in oceniti homogenost disperzije, medtem ko je DSC manj občutljiv za zaznavo manjših deležev kristaliničnosti, vendar je nenadomestljiv za namene določanja Tg. Zaključimo lahko, da smo lahko s kombinacijo teh dveh metod za analizo amorfnih trdnih disperzij in z metodo XRPD, za analizo fizikalnih zmesi, hitro in zadostno ovrednotili mešanje različnih snovi v talini (fazno ločitev) in kristalizacijo. Metoda PLM se je v kombinaciji z metodo steklenih nosilcev pokazala kot zadovoljiva metoda za začetno iskanje perspektivne kombinacije zmesi, ko imamo na voljo veliko število različnih kombinacij substanc in si želimo hitrih in zanesljivih rezultatov z majhno porabo surovin.

6. LITERATURA

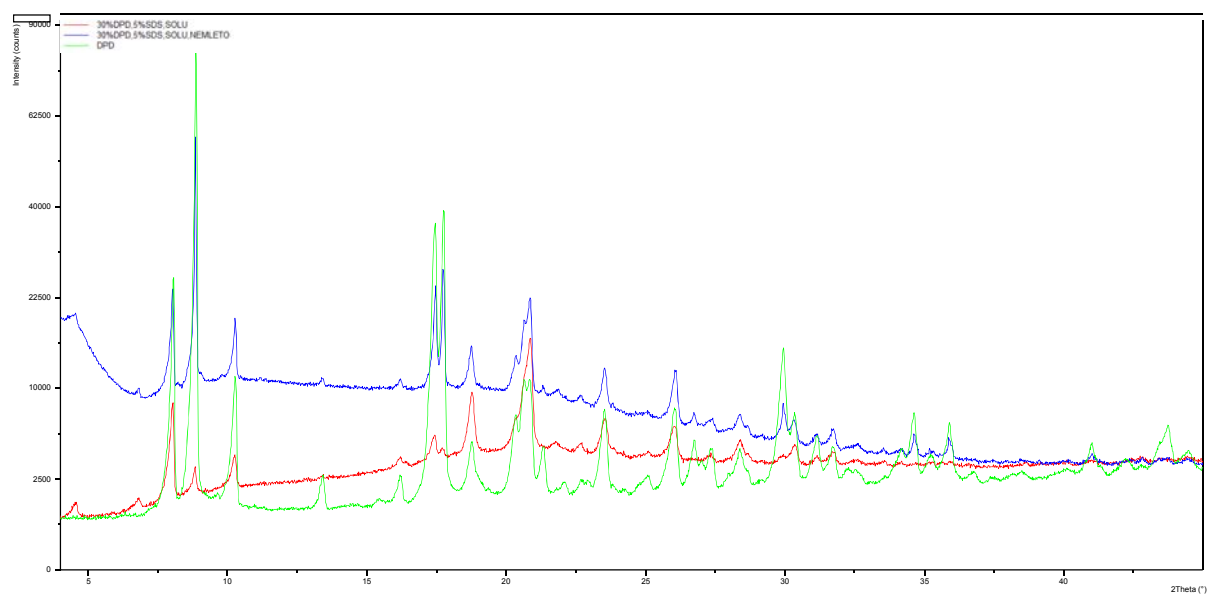
1. Baghel S, Cathcart H, O'Reilly NJ. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. *J Pharm SCI*. 2016; 1-18.
2. Buckley ST, Frank KJ, Fricker G, Brandl M: Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to "enabling formulations". *Eur J Pharm Sci*. 2013; 50: 8-16.
3. Vo CL, Park C, Lee BJ. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013; 85: 799-813.
4. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995; 12: 413-420.
5. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>, dostopano 1.3.2016.
6. <http://www.particlesciences.com>, dostopano 1.3.2016.
7. Kolter K., Karl M., Gryczke A. Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers. Extrusion Compendium 2nd Revised and Enlarged Edition. BASF SE. Ludwigshafen. Oktober 2012.
8. Huang Y, Dai WG. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharm Sin B* 2014; 4: 18-25.
9. P. Kanaujia, P. Poovizhi, W.K. Ng, R.B.H. Tan. Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs. *Powder Technol*, November 2015; 285: 2-15.
10. http://www.ktron.com/industries_served/pharmaceutical/pharmaextrusion.cfm, dostopano 1.3.2016.
11. Moheman A, Alam MS, Mohammad A. Recent trends in electrospinning of polymer nanofibers and their applications in ultra thin layer chromatography. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016; 229:1-24.
12. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today* 2007;12: 1068-1075.

13. Ashish Chauhan, Priyanka Chauhan. Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology. J Anal Bioanal Tech 2014; 212:1-5.
14. https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74542GDE_DSCBeginnersGuide.pdf. Dostopano 1.3.2016.
15. Knopp MM, Löbmann K, Elder DP, Rades T, Holm R. Recent advances and potential applications of modulated differential scanning. Eur J Pharm Sci 2016; 87: 164-173.
16. Newman A. Pharmaceutical amorphous solid dispersions. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, 2015.
17. Widjaja E, Kanaujia P, Lau G, Ng WK, Garland M, Saal C, Hanefeld A, Fischbach M, Maio M, Tan RB. Detection of trace crystallinity in an amorphous system using Raman microscopy and chemometric analysis. Eur J Pharm Sci. 2011; 42:45-54.
18. <https://en.wikipedia.org/wiki/Dipyridamole>. Dostopano 1.3.2016.
19. Dipyridamole. European Pharmacopoeia 6.0. 1731.
20. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2997.html?rid=356ede21-4150-43d6-98b1-ccff23de8d45>. Dostopano 1.3.2016.
21. Taniguchi C, Inoue R, Kawabata Y, Yamashita K, Wada K, Yamauchi Y, Yamada S, Onoue S. Novel formulations of dipyridamole with microenvironmental pH-modifiers for improved dissolution and bioavailability under hypochlorhydria. Int J Pharm 2012; 434: 148-154.
22. Berbenni V., Marini A., Bruni G., Maggioni A., Cogliati P. Thermoanalytical and spectroscopic characterization of solid state dipyridamole. J Therm Anal Calorim 2002; 68: 413-422.
23. SmPC ASASANTIN. Dostopano na strani www.cbz.si. Dostopano 1.3.2016.
24. Zecevic DE, Wagner KG. Rational Development of Solid Dispersions via Hot-Melt Extrusion Using Screening, Material Characterization, and Numeric Simulation Tools. J Pharm Sci 2013;102: 297-310.
25. <http://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy>. Dostopano 22.7.

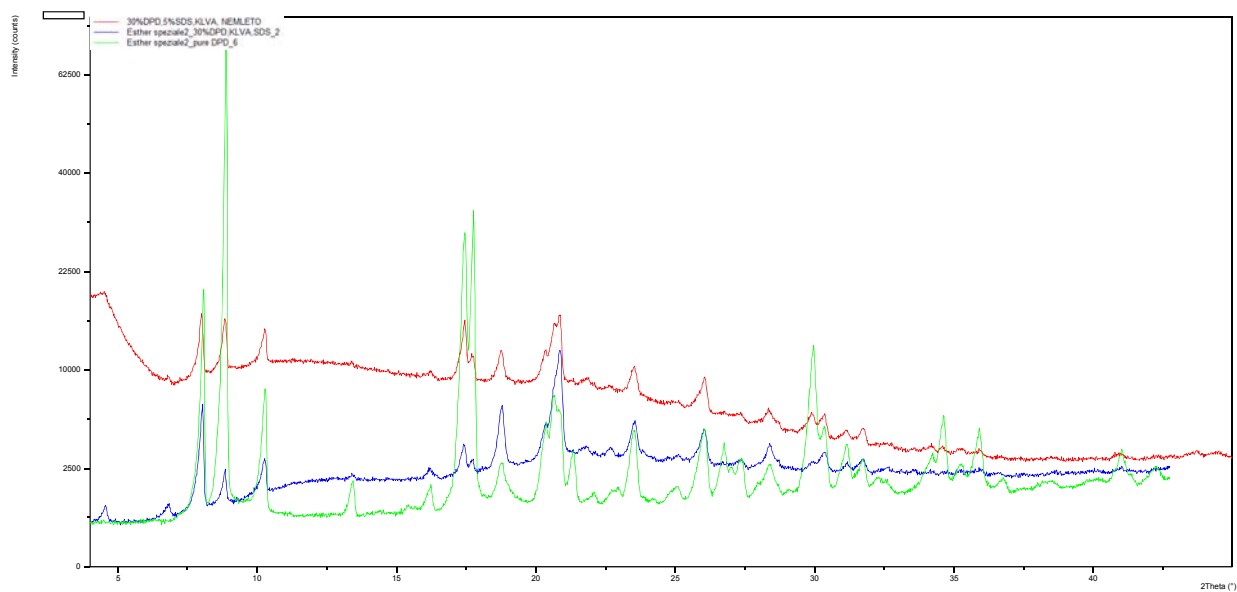
PRILOGE



Slika 1: Difraktogram fizikalne zmesi 30% DPD s SOLU pred (rdeča) in po mletju (modra); zelena krivulja predstavlja kristaliničen DPD



Slika 2: Difraktogram fizikalne zmesi 30% DPD, 5% SDS s SOLU pred (modra) in po mletju (rdeča); zelena krivulja predstavlja kristaliničen DPD



Slika 3: Difraktogram fizikalne zmesi 30% DPD, 5% SDS s KLVA64 pred (rdeča) in po mletju (modra); zelena krivulja predstavlja kristaliničen DPD