

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA FAŠALEK

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA FAŠALEK

**VPLIV TEMPERATURE NA VELIKOST DELCEV PRI
MLETJU V KROGLIČNEM MLINU
INFLUENCE OF TEMPERATURE ON PARTICLE SIZE
DURING BALL MILLING**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala v Leku farmacevtski družbi d.d., v Razvojnem centru Slovenija, na področju Farmacevtska tehnologija, skupina Novih dostavnih sistemov, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in pod somentorstvom dr. Miha Homarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Kerču, mag. farm. za spodbudo pri delu, somentorju dr. Mihi Homarju, mag. farm. za strokovno vodenje in vsestransko pomoč pri eksperimentalnem delu ter za nasvete pri pisanju diplomske naloge. Posebna zahvala gre tudi Ani Miklavžin, za nesebično pomoč pri delu v laboratoriju ter za ustvarjanje prijetnega vzdušja med delom.

Prav tako se zahvaljujem vsem svojim najbližjim za spodbudo in podporo pri doseganju tega cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorja dr. Miha Homarja, mag. farm.

Lucija Fašalek

VSEBINA

1	UVOD	1
1 1.	NANOSUSPENZIJE.....	2
1 1.1.	NASIČENA TOPNOST IN HITROST RAZTAPLJANJA	3
1 1.2.	IZDELAVA NANOSUSPENZIJ	4
	Precipitacijska metoda.....	5
	Homogenizacija z visokim tlakom	6
	Mletje.....	7
1 2.	STABILNOST NANOSUPENZIJ	10
1 3.	VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJ	13
1 3.1	METODE ZA MERJENJE VELIKOSTI DELCEV	13
	Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) in laserska difrakcija (LD).....	14
	Vrstečna elektronska mikroskopija (SEM)	15
1 4.	DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC).....	15
1 5.	VISKOZNOST IN MERJENJE VISKOZNOSTI	15
1 6.	UPORABA NANOSUSPENZIJ	17
1 7.	NAČRTOVANJE EKSPERIMENTOV (DoE - design of experiments)....	19
2	NAMEN DELA	22
3	MATERIALI IN METODE	23
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4 1.	MLETJE FENOFIBRATA.....	32
4 1. 1.	Nanosuspenzija fenofibrata in HPMC	34
4 1. 2.	Nanosuspenzija fenofibrata in HPC.....	36
4 1. 3.	Nanosuspenzija fenofibrata in Kollidona	37
4 2.	MLETJE EZETIMIBA.....	43
4 2. 1.	Nanosuspenzija ezetimiba in HPMC.....	43
4 2. 2.	Nanosuspenzija ezetimiba in Poloxamera	46
4 2. 3.	Nanosuspenzija ezetimiba in Kollidona	47
4 3.	MLETJE CELEKOKSIBA	50
4 3. 1.	Nanosuspenzija celekoksiba in HPMC	51
4 3. 2.	Nanosuspenzija celekoksiba in Poloxamera.....	52
4 3. 3.	Nanosuspenzija celekoksiba in Kollidona.....	53

4 4.	EKSPERIMENTALNI NAČRT ZA MLETJE CELEKOKSIBA.....	56
4 5.	PREGLED MLETJA FENOFIBRATA, EZETIMIBA IN CELEKOKSIBA.....	59
5	SKLEP	69
6	LITERATURA	70

POVZETEK

V zadnjih letih močno narašča število na novo sintetiziranih učinkovin, ki so težko topne v vodi. Zato se farmacevtska industrija sooča s problemi, kako povečati topnost in s tem biološko uporabnost tem učinkovinam. Priprava nanosuspenzij je eden od formulacijskih pristopov za povečanje topnosti. Nanosuspenzije so koloidno disperzni sistemi delcev učinkovine nanometrskih velikosti v vodnem mediju. Poznamo več metod za izdelavo nanosuspenzij, med njimi so: precipitacijska metoda, homogenizacija z visokim tlakom in mletje. Slednje je, zaradi svoje univerzalnosti, enostavnosti in lahkega prenosa v proizvodnjo, ena izmed najpogostejše uporabljenih metod.

Nanosuspenzije težko topnih učinkovin smo izdelali z mokrim mletjem v krogličnem planetarnem mlinu. Ta mlin nima vgrajenega sistema za vzdrževanje konstantne temperature, zato se med mletjem zaradi velikega vnosa energije poveča temperatura v posodi za mletje. Učinkovino v obliki suspenzije smo zmleli s pomočjo kroglic, pri tem pa smo spreminjali začetno temperaturo v posodi za mletje. Po končanem mletju smo izmerili temperaturo v posodi za mletje in velikost delcev. Zbrane podatke smo statistično obdelali. Ugotovili smo, da začetna temperatura nima večjega vpliva na velikost delcev in na končno temperaturo.

S pomočjo računalniškega programa OriginPro 8.5 smo postavili modele gibanja temperature v posodi med mletjem. Ugotovili smo, da temperatura nekaj časa narašča, nato pa se ustali. Na primeru ene učinkovine in stabilizatorja smo postavili tudi eksperimentalni načrt z uporabo statističnih orodij za eksperimentalno načrtovanje in optimizacijo (Design of Experiments), s katerimi smo tudi analizirali pridobljene podatke.

ABSTRACT

Recently more and more drugs that are poorly soluble in water have been synthesised. Therefore pharmaceutical industry is trying to find new solutions to enhance solubility and thus bioavailability of these drugs. New formulation approaches are therefore needed and nanosuspensions are one of these novel drug delivery systems. Nanosuspensions are colloidal dispersion systems of nanosized drug particles in water media. Many different techniques exist for production of nanosuspensions, including precipitation, ball milling and high pressure homogenization. Ball milling is most commonly used, because it is simple, universal and easy to scale up.

Nanosuspensions of poorly soluble drugs were produced by planetary ball mill. The system for maintaining constant temperature is not installed in this type of mill, therefore the temperature in milling vessel is increased due to high energy input during milling. Drug suspensions with different starting temperature in milling vessel were produced by wet ball milling. Particle size and temperature were measured after milling. No major influence of initial temperature, in milling vessel, was found on particle size and final temperature.

Models of temperature in the vessel were set up using a computer program OriginPro 8.5. From these models it was found out that the temperature rises for a while and then stabilises. In a case of one drug and stabilizer the plan of experimental work was prepared using design of experiments (DoE), which is a statistical tool used for experimental planning and optimising. This tool was also used to analyse acquired data.

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutical Classification System)
CMCNa	natrijeva karboksimetilceluloza
COX	ciklooksigenaza
DoE	načrtovanje eksperimentov (Design of Experiments)
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)
GIT	gastrointestinalni trakt
HPC	hidroksipropilceluloza
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
PAS	površinsko aktivne snovi
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (Photon Correlation Spectroscopy)
PDI	polidisperzni indeks
PVP	polivinilpirolidon
rpm	obrti na minuto (Revolutions Per Minute)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy)

1 UVOD

V zadnjih letih močno narašča število na novo sintetiziranih učinkovin, ki so težko topne v vodi kot tudi v organskih topilih. Topnost učinkovine v vodi je ključna za njeno delovanje, ne glede na način aplikacije. Kar 40% vseh potencialnih novih učinkovin je slabo topnih v vodi, zato povečanje topnosti tem učinkovinam predstavlja izziv za farmacevtsko industrijo (1).

Biološka uporabnost učinkovine je odvisna predvsem od njene topnosti in permeabilnosti preko lipofilnih membran. Samo raztopljene učinkovine lahko preidejo celično membrano in dosežejo mesto delovanja. Glede na biološko uporabnost razdelimo učinkovine v štiri razrede biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema (Biopharmaceutical Classification System – BCS). V razred I sodijo učinkovine, ki imajo dobro topnost in dobro permeabilnost, v razred II učinkovine, ki imajo slabo topnost in dobro permeabilnost, v razred III učinkovine z dobro topnostjo in slabo permeabilnostjo ter v razred IV učinkovine, ki imajo slabo topnost in slabo permeabilnost (2).

Z novimi spojinami, ki nimajo dovolj velike biološke uporabnosti, tudi ni mogoče izvajati farmakoloških testiranj, s katerimi bi dokazali njihovo učinkovitost. Pogosto se zgodi, da odkrijejo novo, v vodi težko topno učinkovino, ki izkazuje *in vitro* primerno aktivnost, vendar jo nato zavržejo kot neuporabno, ker je ne morejo oblikovati v farmacevtsko obliko za nadaljnja testiranja *in vivo* (3). Zato se poslužujemo različnih tehnik za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja. Najbolj direkten pristop za povečanje topnosti je tvorba soli. Pri tvorbi soli predstavljajo problem neionizirajoče učinkovine, zato se pri teh poslužujemo sprememb fizikalnih lastnosti topljenca ali topila. Med tradicionalne pristope za povečanje topnosti spadajo: zmanjšanje velikosti delcev topljenca, uravnavanje pH topila, dodatek sotopil, dodatek površinsko aktivnih snovi (PAS) in uporaba oljnih raztopin. Med novejšje pristope pa uvrščamo uporabo mikroemulzij, samoemulgirajočih sistemov, trdnih disperzij (vključujoč stabilne amorfne oblike), liposomov, vgradnjo v inkluzijske komplekse s ciklodekstrini in uporabo superkritičnih tekočin za zmanjšanje velikosti delcev (supercritical fluid process – SCF). Pri tej metodi učinkovino raztopimo v superkritični tekočini, po rekristalizaciji učinkovine pa dobimo precej manjše delce (5-2 μm). Vendar imajo tudi te novejšje metode svoje omejitve in niso primerne za vse učinkovine. Npr. učinkovina mora imeti ustrezno molekulsko maso, da jo lahko vgradimo v ciklodekstrine oziroma mora biti topna v organskih topilih za uporabo metode sotopil (2,

4). Omejena uporabnost teh metod se kaže tudi z majhnim številom takih produktov na trgu (5).

Ena od tradicionalnih metod za povečanje hitrosti raztapljanja je mikronizacija, ki je primerna predvsem za učinkovine II razreda BCS, t.j. učinkovine s slabo topnostjo in dobro permeabilnostjo. Mikronizacija pomeni zmanjšanje velikosti delcev praškaste substance na približno 2-5 μm , dejanski razpon velikosti delcev pa je med 0,1 in 25 μm , od tega je le majhen delež delcev manjši od 1 μm . Mikronizacijo delcev lahko dosežemo npr. z mletjem. Posledica mikronizacije učinkovine je povečanje hitrosti raztapljanja s povečanjem površine delcev. Z mikronizacijo učinkovine lahko povečamo hitrost raztapljanja, ne moremo pa povečati njene nasičene topnosti. Pri učinkovinah z zelo nizko topnostjo, pa tudi s povečano hitrostjo raztapljanja ne moremo doseči dovolj velike biološke uporabnosti, zato se vse bolj poslužujemo nanonizacije t.j. izdelave nanokristalov. Nanokristali so delci učinkovine velikosti pod 1 μm (običajno med 200 in 500 nm). Nanokristale pridobivamo v tekočem disperznem mediju z mletjem ali z obarjanjem, končen produkt pa imenujemo nanosuspenzija (6). Nanokristali se razlikujejo od nanodelcev. Nanodelci so polimerni koloidni nosilci učinkovin, trdni lipidni nanodelci pa so lipidni nosilci učinkovin. Nanokristali so kristali učinkovine nanometrskih velikosti, brez kakršnegakoli nosilca (7).

1 1. NANOSUSPENZIJE

Nanosuspenzije so koloidne disperzije delcev učinkovine nanometrskih velikosti, stabilizirane so s površinsko aktivnimi snovmi (PAS) ali s polimeri. Definiramo jih lahko tudi kot dvofazne sisteme, ki jih tvorijo delci učinkovine, manjši od 1 μm , dispergirani v vodnem mediju. Nanosuspenzije so primerna oblika za učinkovine, ki so netopne v vodi, netopne v vodi in organskih topilih, imajo visok porazdelitveni koeficient (logP), visoko temperaturo tališča in delujejo v visokih odmerkih (4). Poleg stabilizatorjev lahko vsebujejo še druge pomožne snovi kot so: pufri, soli in sladkorji. Pri večini nanosuspenzij je koncentracija učinkovine okrog 400 mg/ml (8). Prednosti nanosuspenzij so: povečana nasičena topnost, povečana hitrost raztapljanja in adhezivne lastnosti nanokristalov. Na splošno kažejo majhni delci povečane adhezivne lastnosti, zaradi povečane stične površine se izboljšajo medsebojne interakcije. Primer iz vsakdanjega življenja je, če pecivo potresemo s sladkorjem. Kristalni sladkor bo zdrsel s peciva, medtem ko bo sladkor v

prahu ostal na njem. Povečana adhezija ima v biofarmaciji veliko prednosti, med drugim tudi povečanje biološke uporabnosti. Po drugi strani, pa ima povečana adhezivnost lahko tudi neugodne stranske učinke npr. nastanek razjed na sluznici (3). Adhezivnost lahko še povečamo z dodatkom mukoadhezivnih polimerov in s tem še izboljšamo biološko uporabnost, zaradi zadrževanja na mestu absorpcije. Mukoadhezivni polimer lahko uporabimo kot stabilizator ali pa ga dodamo k že pripravljeni nanosuspenziji (5).

1 1.1. NASIČENA TOPNOST IN HITROST RAZTAPLJANJA

Topnost je specifična značilnost posamezne snovi. Odvisna je od temperature in od kristalne strukture snovi. Poleg temperature in kristalne strukture na topnost vpliva tudi velikost delcev (5). Odvisnost topnosti od velikosti delcev pride do izraza šele v nanometrskem območju. Pri večini prahov v farmaciji pa so delci znatno večji od 1 μm , zato velikost delcev nima vpliva na topnost. Drugače pa je pri nanosuspenzijah, kjer do povečanja topnosti ne pride samo zaradi povečanja površine, temveč tudi zaradi povečanja medfazne napetosti trdno/tekoče, ki je posledica povečane ukrivljenosti površine manjših delcev. Povečanje topnosti z zmanjševanjem velikosti delcev opisuje Ostwald-Freundlichova enačba (3):

$$\log \frac{C_r}{C_\infty} = \frac{2\gamma V}{2,303RT\rho r} \quad \text{enačba 1}$$

C_r	topnost (g/ml)
C_∞	topnost velikih delcev trdne učinkovine (g/ml)
γ	medfazna energija delcev v topilu (N/m)
V	molarni volumen trdnih delcev (l/mol)
R	plinska konstanta (Nm/molK)
T	absolutna temperatura (K)
ρ	gostota trdne snovi (g/cm ³)
r	polmer delcev (cm)

Povečanje nasičene topnosti ima za posledico tudi povečanje hitrosti raztapljanja, v skladu z Noyes-Whitneyevo enačbo (enačba 2). Hitrost raztapljanja pomeni hitrost prehoda

substance iz trdnega v raztopljeno stanje, kjer je na voljo za absorpcijo. Hitrost raztapljanja je primarno funkcija površine. Zmanjšanje velikosti delcev poveča specifično površino in posledično se poveča hitrost raztapljanja (3).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DS}{hV} (c_s - c) \quad \text{enačba 2}$$

c_s	topnost učinkovine (mol/l)
c	raztopljena učinkovina v času t (mol/l)
h	debelina difuzijske plasti (cm)
V	volumen (l)
S	površina delcev (cm ²)
D	difuzijski koeficient učinkovine (cm ² /s)

Izpeljava Noyes-Whitneyeve enačbe temelji na prvem Fickovem zakonu, ki pravi, da je hitrost raztapljanja trdnega delca proporcionalna difuzijskemu koeficientu, površini raztapljajoče se snovi in koncentracijskemu gradientu, ki se vzpostavi na določeni razdalji. Difuzijski koeficient je količina substance, ki difundira skozi določeno površino v eni sekundi pod vplivom koncentracijskega gradienta (9).

1 1.2. IZDELAVA NANOSUSPENZIJ

Poznamo dve metodi izdelave nanosuspenzij, in sicer »bottom up« tehnologije in »top down« tehnologije. Pri »bottom up« tehnologiji učinkovino raztopimo v nekem topilu, to raztopino pa dodamo v ne-topilo, kar povzroči obarjanje delcev učinkovine. To metodo imenujemo tudi metoda precipitacije. Pri »top down« tehnologijah pa gre za razbitje večjih delcev na manjše, zato jih imenujemo tudi dezintegracijske metode. Med »top down« tehnologije spadajo: mokro mletje, homogenizacija z visokim tlakom ter kombinacija precipitacijske metode in homogenizacije z visokim tlakom (Nanoedge tehnologija). Dezintegracijske metode se v farmaciji bolj pogosto uporabljajo kot precipitacijska metoda. Med druge metode izdelave spada še uporaba emulzij in mikroemulzij kot predlog pri izdelavi nanosuspenzij, pri tem gre za podoben postopek kot pri precipitacijski metodi (10).

Precipitacijska metoda

Pri tej metodi učinkovino raztopimo v organskem topilu npr. v acetonu, tetrahidrofuranu ali v N-metil-2-pirolidinu, da dobimo nasičeno raztopino. To raztopino dodamo ne-topilu, ki se meša z organskim topilom. Kot ne-topilo ponavadi uporabimo vodo. Ker učinkovina ni topna v ne-topilu, se prične obarjati. Na ta način ne moremo oblikovati učinkovin, ki niso topne v organskih topilih, niti v vodi. Raziskave so pokazale, da so za ta način priprave nanosuspenzij primerne le tiste učinkovine, katerih topnost v vodi je manjša kot 10^{-3} - 10^{-4} mol/l (3). Proces obarjanja mora biti dobro nadzorovan, nastale delce pa je potrebno stabilizirati, da preprečimo tvorbo mikrodolcev. Kot stabilizatorji se najpogosteje uporabljajo: hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), polivinilpirolidon (PVP), Tween 80, Poloxamer 188 in lecitin. Za doseglo najboljšega učinka ponavadi uporabimo več stabilizatorjev hkrati. Izbira stabilizatorjev, topila in mešanje raztopine so ključni dejavniki, ki vplivajo na velikost in stabilnost nastalih nanokristalov. Velikost nastalih delcev učinkovine pri obarjanju je obratno sorazmerna s topnostjo učinkovine v mediju za obarjanje. Mešanje je ključen korak za hiter nastanek enakomerne nasičene raztopine, ki vpliva na nastanek enakomerno velikih nanokristalov učinkovine. Drugi ključni parametri tega procesa so: koncentracija učinkovine, volumsko razmerje topila in ne-topila, temperatura in viskoznost (1). Prednosti te metode so: enostavnost postopka, nizki stroški opreme in enostaven prenos metode iz laboratorija v proizvodnjo. Glavna slabost te metode je v tem, da mora biti učinkovina topna v vsaj enem topilu, ta pa se mora mešati z ne-topilom. Slabost je tudi uporaba organskih topil, ki so lahko toksična za človeka in okolje ter uporaba PAS kot stabilizatorjev, da preprečimo Ostwaldovo rast kristalov (10).

Obstaja tudi kombinacija precipitacijske metode in homogenizacije z visokim tlakom. Nanosuspenzijo pridobljeno s precipitacijo homogeniziramo z visokim tlakom, da dobimo še manjše delce in se izognemo nadaljnji rasti kristalov. Kot ne-topilo uporabimo vodo, kot topilo pa se najpogosteje uporablja metanol, etanol ali izopropanol, ki se meša z vodo. Pred homogenizacijo je potrebno popolnoma odstraniti topilo, kar je v laboratorijskem merilu enostavno, problem pa je pri velikih količinah v proizvodnji (4).

Homogenizacija z visokim tlakom

Homogenizacija z visokim tlakom je druga najpogostejše uporabljena dezintegracijska metoda. Poznamo dva principa homogenizacije, in sicer mikrofluidizacijo in homogenizacijo z batnimi homogenizatorji (piston-gap homogenisers).

Pri mikrofluidizaciji pride do zmanjšanja delcev zaradi strižnih sil. Curek suspenzije z visoko hitrostjo (do 1000 m/s) in pod visokim tlakom (4000 barov) vodimo skozi homogenizacijsko komoro. Poznamo dva tipa komor, »Z tip« in »Y tip« homogenizacijske komore. Pri »Z tipu« komore curek suspenzije spremeni smer, kar povzroči trk delcev in nastanek velikih strižnih sil ter posledično zmanjšanje delcev. Pri »Y tipu« komore pa se curek suspenzije razdeli na dva curka, ki potem frontalno trčita drug v drugega, kar povzroči razbitje delcev. Slabost te metode je, da je časovno zelo potratna, saj je potrebno suspenzijo večkrat spustiti skozi mikrofluidizator, da doseženo zadostno zmanjšanje delcev. Patenti navajajo, da je potrebno spustiti suspenzijo skozi mikrofluidizator tudi do petinsedemdesetkrat, končni produkt pa vseeno vsebuje velik delež mikrododelcev (6).

Zaradi slabosti mikrofluidizacije in problemov povezanih z mletjem učinkovin, so sredi devetdesetih let razvili homogenizacijo z batnimi homogenizatorji. Pri tem tipu homogenizatorjev teče curek suspenzije z visoko hitrostjo in pod visokim tlakom skozi tanko odprtino homogenizatorja. Pri APV LAB 40 homogenizatorju je ta odprtina premera 3 cm nato pa se zmanjša na 25 μm . Zmanjšanje premera curka povzroči dvig dinamičnega tlaka in posledično, v skladu z Bernoullijevo enačbo, padec statičnega tlaka tekočine. Zaradi padca statičnega tlaka pod parni tlak tekočine pri sobni temperaturi, prične tekočina vreti. V tekočini se pojavijo mehurčki, ki implodirajo, ko suspenzija zapusti odprtino in se vzpostavi normalen tlak. Ta pojav imenujemo kavitacija. Do zmanjšanja delcev pride zaradi sil, ki nastanejo med kavitacijo. Velikost delcev je odvisna od števila homogenizacijskih ciklov, temperature, trdnosti delcev in uporabljenega tlaka (6). Prednosti te metode so: enostavnost, uporabljene suspenzije imajo lahko zelo nizko kot tudi zelo visoko koncentracijo, uporabna je za učinkovine, ki so slabo topne v vodi in v organskih topilih, možna pa je tudi aseptična priprava nanosuspenzij. Draga oprema, veliko število homogenizacijskih ciklov, ter morebitna predhodna mikronizacija učinkovine pa so glavne slabosti te metode (10).

Odvisno od temperature, pri kateri poteka homogenizacija in od vrste disperznega medija, poznamo dve metodi homogenizacije z batnimi homogenizatorji. Najprej so razvili DissoCube tehnologijo, kjer kot disperzni medij uporabimo vodo. Kasneje so razvili še

Nanopure tehnologijo, kjer homogenizacija poteka v nevodnem mediju oz. v mediju, ki vsebuje zelo majhen delež vode. Prednosti te metode so, da je pri odstranitvi homogenizacijskega medija, izparevanje poteka hitreje in pod milejšimi pogoji. Ta metoda je primerna tudi za učinkovine, ki so občutljive na hidrolizo (6).

Mletje

Mletje je najbolj pogosto uporabljena metoda za zmanjševanje velikosti delcev. V osnovi poznamo dva tipa mletja, suho in mokro mletje. Suho mletje običajno pomeni mikronizacijo. Nanosuspenzije pa so izdelane z mokrim mletjem. Poznamo več različnih krogličnih mlinov za nanomletje (npr. planetarni kroglični mlin, mešajoči kroglični mlin). Posodo za mletje napolnimo s kroglicami, učinkovino, vodo ali ustreznim pufrom in stabilizatorjem. Med vrtenjem posode prihaja do trkov in trenja med kroglicami, sile, ki pri tem nastanejo pa so dovolj velike, da povzročijo zmanjšanje delcev do nanometrskih velikosti. Kroglice so iz različnih materialov (steklo, cirkonijev oksid, premrežena polistirenska smola) in različnih velikosti (0,5-1 mm) (11). V literaturi zasledimo, da se v nekaterih primerih poleg kroglic kot pomožna snov za izboljšanje mletja, lahko uporablja tudi dodatek natrijevega klorida (12). Čas mletja je lahko zelo različen, od nekaj ur pa do nekaj dni. Odvisen je od trdote učinkovine, velikosti serije, želene končne velikosti delcev in od tipa mlina. Nanokristali nastanejo pri nizkih obratih mletja (npr. 80-90 rpm) in dolgih časih mletja (npr. 1-5 dni) ali pa pri visokih obratih (npr. 1800-4800 rpm) in kratkih časih mletja (npr. 30-60 min). Zaradi dolgih časov mletja lahko pride do erozije materialov in s tem do kontaminacije vzorca, lahko pa se pojavijo tudi problemi s stabilnostjo vzorca (11).

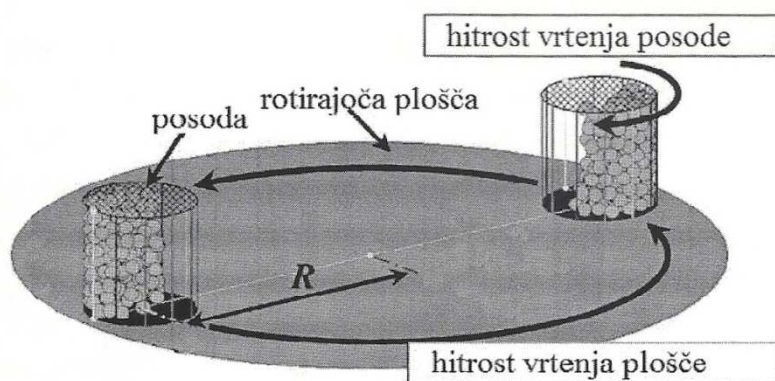
Med mletjem potekata v posodi za mletje dva nasprotna procesa: drobljenje učinkovine na manjše delce in rast delcev zaradi medsebojnih trkov. Po določenem času delci dosežejo svojo končno velikost, ki je z nadaljnjim mletjem ne moremo več zmanjšati. V nekaterih primerih daljši časi mletja vodijo celo v postopno povečevanje velikosti delcev in v povečanje heterogenosti vzorca (11).

Med mletjem prihaja tudi do fizikalnih sprememb učinkovine. Sile med mletjem so lahko tako velike, da destabilizirajo kristalno rešetko in postopoma vodijo najprej v nastanek amorfnih predelov v nanokristalu, nato pa še do popolne pretvorbe v amorfnu obliko. Število amorfnih predelov je odvisno od lastnosti posamezne učinkovine, stabilizatorja in od parametrov procesa. Amorfnih predeli povečajo površinsko energijo

sistema, kar ponavadi vodi v zmanjšano fizikalno in kemijsko stabilnost. Zato nastanek amorfnih predelov ni zaželen, prav tako pa ne moremo določiti njihovo število in lokacijo v delcu (11). Iz literature je razvidno, da je pri planetarnem krogličnem mlinu stopnja amorfnosti pri visokih hitrostih mletja (npr. 500 rpm in več) odvisna od velikosti kroglic; pri nizkih hitrostih mletja (npr. manj kot 300 rpm) pa velikost kroglic nima vpliva. Stopnja amorfnosti je večja pri majhnih kroglicah (13).

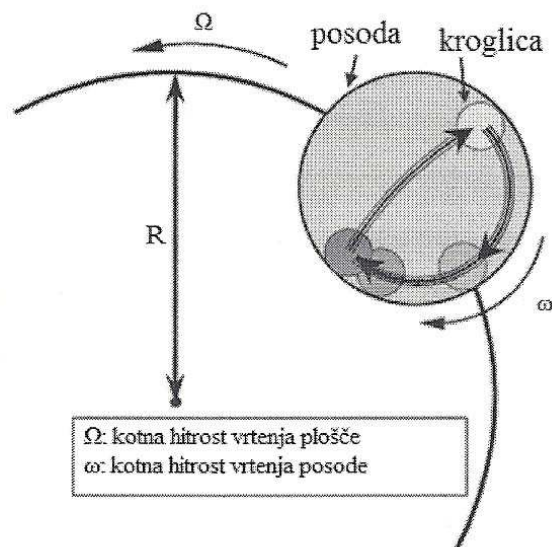
Mletje poteka pri kontrolirani temperaturi, kar je pomembno pri termolabilnih učinkovinah in pri učinkovinah z nizko temperaturo tališča. Med mletjem se namreč poveča temperatura v posodi za mletje. Eden od možnih mehanizmov zmanjševanja delcev naj bi bila tudi tvorba razpok v delcih, nadaljnje širjenje teh razpok in nazadnje razpad delca zaradi spremembe temperature (11).

Pri planetarnem krogličnem mlinu je posoda s kroglicami in vzorcem nameščena na rotirajočo ploščo, ki se vrti okoli svoje osi. Tudi posoda za mletje se vrti okoli svoje osi, kar prikazuje slika 1. To je analogno vrtenju zemlje okoli sonca (14).



Slika 1: Shematski prikaz vrtenja posode v krogličnem planetarnem mlinu

Posodo mlina napolnimo s kroglicami (cca. 10-50% volumna) in s suspenzijo učinkovine (2-30% volumna). Do zmanjšanja delcev pride zaradi strižnih sil, ki nastanejo med vrtenjem mlina in zaradi sil, ki nastanejo med trki kroglic in delcev (11). Paziti moramo, da meljemo pri hitrostih, ki so bistveno nižje od kritične hitrosti. Kritična hitrost je definirana kot razmerje med hitrostjo vrtenja plošče in hitrostjo vrtenja posode, pri katerem pride do efekta centrifugalne sile. Kroglice oz. medij, ki ga meljemo, se zaradi centrifugalne sile prilepijo na stene posode in drobilni učinek izgine (14). Smer gibanja kroglic v posodi prikazuje slika 2.



Slika 2: Smer gibanja kroglic v posodi

Učinek mletja je odvisen od materiala in velikosti kroglic, deleža kroglic in suspenzije v posodi, hitrosti in časa mletja, odvisen pa je tudi od lastnosti učinkovine in od izbranega stabilizatorja (3). Iz literature je razvidno, da daljši kot so časi in višje kot so hitrosti mletja, manjša je končna velikost delcev (14). Velikost kroglic vpliva na stopnjo zmanjševanja delcev samo pri visokih hitrostih mletja. Pri manjših kroglicah opazimo večjo stopnjo zmanjševanja delcev kot pri večjih, zaradi večjega števila trkov med kroglicami. Obstaja pa seveda tudi maksimalna velikost vhodnih delcev glede na uporabljeno velikost kroglic, kar nam v praksi onemogoča, da bi stopnjo zmanjševanja delcev uravnavali v enem koraku z izbiro minimalne velikosti kroglic (13).

Da preprečimo rast kristalov in stabiliziramo nanosuspenzijo, uporabimo stabilizatorje. Učinkovit stabilizator mora biti sposoben omočiti kristal učinkovine in zagotoviti sterično ali ionsko bariero (8). Za dosego stabilizacije se mora stabilizator adsorbirati na površino delca. Ta adsorpcija je dosežena z ionskimi interakcijami, vodikovimi vezmi, van der Waalsovimi vezmi, z ion-dipol interakcijami ali pa s hidrofobnimi interakcijami (11). V odsotnosti stabilizatorja bi prišlo do aglomeracije ali do agregacije delcev učinkovine. Proces izbire stabilizatorja je empiričen, izbrati moramo tak stabilizator, da čim bolj pripomore k zmanjšanju velikosti delcev in čim bolj stabilizira suspenzijo. Fizikalno stabilne nanosuspenzije dobimo, če sta učinkovina in stabilizator v razmerju od 20:1 do 2:1. Premalo stabilizatorja povzroči aglomeracijo in agregacijo delcev, preveč stabilizatorja pa pospeši Ostwaldovo rast. Za optimalno delovanje lahko izberemo tudi

kombinacijo ionskega in neionskega stabilizatorja, ki s svojim sinergističnim delovanjem še bolj izboljšata stabilnost nanosuspenzije (8). Pri izbiri ustreznega stabilizatorja ima ključno vlogo tudi njegova viskoznost, večja viskoznost suspenzije po eni strani podaljša čas mletja, medtem ko po drugi strani z bolj viskozniimi suspenzijami dosežemo boljšo fizikalno stabilnost.

Pomembno vlogo pri izbiri stabilizatorja imajo tudi morebitne interakcije med funkcionalnimi skupinami učinkovine in stabilizatorja. Močne ionske interakcije, vodikove vezi in šibke van der Waalsove ali Londonove interakcije lahko pospešijo ali ovirajo nastanek nankristalov. Iz literature je razvidno, da sta PVP in HPMC najbolj učinkovita pri učinkovinah, ki nimajo polarnih funkcionalnih skupin. Poleg interakcij pa je pomembna tudi površinska energija. Pri učinkovini in stabilizatorju s približno enako površinsko energijo naj bi dobili delce z ozko porazdelitvijo velikosti. Vendar pa vpliv površinske energije še ni povsem razjasnjen. Omeniti pa je potrebno še hidrofobne lastnosti stabilizatorja, saj te verjetno prav tako vplivajo na učinkovitost stabilizatorja. Površina delca, pridobljenega z mokrim mletjem, je namreč hidrofobna, zato imajo bolj hidrofobni stabilizatorji večjo afiniteto do delcev. Tako je na delcih adsorbiranih več molekul stabilizatorja, ki pripomorejo k večji stabilnosti nanosuspenzije (11).

Primerni kandidati za pripravo fizikalno stabilne nanosuspenzije so celulozni derivati (HPMC, hidroksipropilceluloza – HPC), polisorbati (Tween 80®), blok polimeri (npr. Poloxameri) ter polivinil pirolidoni. Med ionskimi stabilizatorji pa se najpogosteje uporablja natrijev lavrilsulfat (11).

Prednosti mletja so, da je ta metoda uporabna tako za v vodi slabo topne učinkovine kot tudi za učinkovine, ki so slabo topne v organskih topilih. Prenos iz laboratorija na večje serije v proizvodnjo je enostaven, variacije med serijami pa so majhne (11). Slabost metode je kontaminacija vzorca z materialom mlina, kar moramo upoštevati pri validaciji metode. Mletje lahko traja tudi več dni, kar je časovno potratno in lahko povzroči nastanek nestabilnih amorfnih oblik. Ko metodo in formulacijo optimiramo, pa so razlike med serijami zelo majhne (7).

1 2. STABILNOST NANOSUPENZIJ

Stabilnost je ključnega pomena za zagotovitev varnosti in učinkovitosti zdravil. Pri intravenski aplikaciji nanosuspenzij lahko večji delci ($> 5\mu\text{m}$) povzročijo zamašitev

kapilar, zato moramo spremljati velikost in distribucijo velikosti delcev. Pri nanosuspenzijah se najpogosteje pojavijo problemi s fizikalno stabilnostjo. Pojavi, ki spadajo pod fizikalno (ne)stabilnost so: sedimentacija, aglomeracija, rast kristalov in sprememba kristalnega stanja učinkovine. Do spremembe kristalnega stanja lahko pride med izdelavo nanosuspenzij. Pri »top down« tehnologijah nastanejo delno amorfne nanosuspenzije, pri »bottom up« tehnologijah pa lahko dobimo tudi popolnoma amorfne delce. Delci v amorfni obliki so nestabilni in se sčasoma spremenijo v kristalno obliko. Prav tako pa lahko pride do spremembe ene polimorfne oblike v drugo. Ta sprememba je odvisna od temperature, disperznega medija, stabilizatorja in od prisotnosti delcev v kristalni obliki (15).

Idealno stanje, pri katerem so delci enakomerno razporejeni v suspenziji in ne tvorijo aglomeratov, je težko dosegljivo zato je pomembno, da se suspenzija s stresanjem redispergira. Hitrost sedimentacije opisuje Stokesov zakon (enačba 3) ki pravi, da na sedimentacijo vplivajo velikost delcev, viskoznost disperznega medija ter razlika v gostoti med delcem in medijem. Večji delci se posedajo hitreje kot manjši. Hitrost sedimentacije lahko upočasnimo s povečanjem viskoznosti disperznega medija in z izbiro medija, ki ima podobno gostoto kot delci učinkovine (15).

$$v = \frac{2r^2(\rho_d - \rho_m)g}{9\eta} \quad \text{enačba 3}$$

r	Stokesov radij delca (cm)
g	gravitacijski pospešek (cm/s ²)
ρ_d	gostota delca (g/cm ³)
ρ_m	gostota disperznega medija (g/cm ³)
η	viskoznost disperznega medija (g/cms)

Z zmanjševanjem delcev se poveča tudi njihova površinska energija, kar je termodinamsko neugodno, zato delci težijo k zmanjšanju skupne površine in s tem k zmanjšanju presežka proste energije. Delci zato težijo k združevanju v flokule t.j. v rahle aggregate, kjer so delci med seboj povezani s šibkimi Van der Waalsovimi vezmi. V posebnih primerih, ko delci tvorijo na dnu vsebnika trden sediment, pogačo, pa so le-ti povezani z močnejšimi vezmi in tvorijo aglomerate. Take suspenzije imenujemo

deflokulirane suspenzije. Pogačo je tudi z močnim stresanjem zelo težko redispergirati, zato je manj problematična uporaba flokuliranih suspenzij. Delci v flokulah so zelo šibko povezani, med njimi je prisotno še nekaj medija, zato že s stresanjem lahko razbijemo flokule in dobimo suspenzijo z začetno velikostjo delcev (16).

Prehod sistema v energijsko ugodnejše stanje je možen z zmanjševanjem površine delcev ali z zmanjšanjem medfazne napetosti. Medfazno napetost lahko znižamo z dodatkom PAS. Ponavadi se medfazne napetosti ne da znižati na nič in suspenzije izkazujejo pozitivno medfazno napetost, zato delci težijo k flokulaciji. Kontrolirano flokulacijo lahko dosežemo z elektroliti, PAS in polimeri. Elektroliti delujejo kot flokulacijske pomožne snovi z znižanjem energetske bariere med delci in z znižanjem zeta potenciala, kar poveča nastanek flokulov. PAS (ionske in neionske) poleg tega, da delujejo kot stabilizatorji v suspenzijah, pripomorejo tudi k flokulaciji, pri tem pa je pomembna izbira ustrezne koncentracije. Polimeri so dolgoverižne molekule z visoko molekulsko maso. Del verige se adsorbira na površino delca, del pa je usmerjen v disperzni medij. Povezovanje med verigami, ki so usmerjene v medij, vodi v nastanek flokulov (16).

Čeprav je sedimentacija eden ključnih procesov pri koloidnih suspenzijah, najdemo v literaturi malo s tem povezanih študij. Razloga sta predvsem v tem, da se pri izdelavi nanosuspenzij uporabljajo stabilizatorji, ki preprečijo aglomeracijo delcev, kar ublaži sedimentacijo ter to, da je sedimentacija majhnih nanodelcev zelo počasna. Poleg tega pa večino vodnih nanosuspenzij pretvorimo v trdne farmacevtske oblike, kjer sedimentacija nima pomena (15).

Povečanje temperature pogosto vodi v flokulacijo sterično stabiliziranih suspenzij z neionskimi PAS. Če suspenzijo segrevamo, se odbojne sile, ki izhajajo iz steričnih interakcij, lahko znižajo zaradi dehidracije polioksietilenskih skupin PAS. Privlačne sile se povečajo, kar poveča flokulacijo delcev. Med zmrzovanjem zaradi tvorbe ledu delci prav tako premagajo odbojne sile in tvorijo agregate. Ti agregati ostanejo tudi ko se led stali. Velikost agregatov je obratno sorazmerna s hitrostjo zmrzovanja. Destabilizacijski proces v suspenzijah je poleg agregacije tudi rast delcev zaradi sprememb v temperaturi. Rast delcev je pomembna, kadar je hitrost raztapljanja učinkovine močno odvisna od temperature. Pri povečani temperaturi se poveča hitrost raztapljanja, kar vodi v nastanek prenasičene raztopine, to pa spodbuja rast kristalov (16).

Do Ostwaldove rasti kristalov pride zaradi sprememb v velikosti in v porazdelitvi velikosti delcev v suspenzijah. Pri tem pojavu gre za rast večjih delcev na račun manjših.

Manjši delci imajo večjo nasičeno topnost kot večji, kar povzroči večjo koncentracijo raztopljene učinkovine okoli manjših kot okoli večjih delcev. Zaradi koncentracijskega gradienta molekule učinkovine difundirajo od manjših k večjim delcem. To povzroči nastanek prenasičenosti okoli večjih delcev, zato učinkovina začne kristalizirati. Okoli manjših delcev pa nastane nenasičena raztopina, zato se ti počasi začnejo raztapljati. Da zmanjšamo razlike v nasičeni topnosti med delci, je pomembna ozka porazdelitev delcev po velikosti, zato težimo k izdelavi nanosuspenzij s čim ožjo porazdelitvijo velikosti delcev. Uporaba stabilizatorjev prav tako upočasni Ostwaldovo rast kristalov, vendar moramo paziti, da stabilizatorji ne povečajo topnosti učinkovine (15).

Dispergiranje praškastih delcev v medij je pomemben korak pri pripravi suspenzij. Zaradi adsorbiranega zraka na površini delcev le-ti plavajo na površini disperznega medija in jih je težko vmešati. Temu so zlasti podvrženi fino mleti prahovi, ki se ne omočijo tudi če jih vmešamo globoko pod gladino medija. Z dodatkom PAS se zniža medfazna napetost, posledično stični kot med delci in medijem, odstrani se zrak z delca, kar v končni fazi olajša močenje delcev (16).

Nanosuspenzije morajo imeti ustrezno fizikalno, kemijsko in mikrobiološko stabilnost, da so primerne za farmacevtsko uporabo. Maksimalno fizikalno stabilnost dosežemo, če poenotimo velikost delcev. Velikost in oblika delcev pa sta odvisni od parametrov procesa in od lastnosti učinkovine in stabilizatorja (10).

1 3. VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJ

Po izdelavi je potrebno nanosuspenzije ustrezno vrednotiti. Velikost in porazdelitev velikosti delcev, naboj delcev (Zeta potencial), kristalna oblika ter nasičena topnost in hitrost raztapljanja so lastnosti nanosuspenzij, ki jih najpogosteje vrednotimo (10).

1 3.1 METODE ZA MERJENJE VELIKOSTI DELCEV

Z merjenjem velikosti delcev vrednotimo njihovo velikost, agregacijo in rast kristalov. Porazdelitev velikosti delcev v disperziji je osnovni standard kakovosti farmacevtskih suspenzij. Velikost delcev vpliva tudi na biološko uporabnost (3). Za ugotavljanje velikosti delcev obstajajo številne metode, ki se med seboj razlikujejo po principu merjenja, merilnem območju, potrebni količini vzorca in načinu njegove priprave. Osnova metod so

različne lastnosti delcev (npr. mehanske, optične, elektronske), ki jih izkoriščamo za merjenje njihove velikosti.

Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) in laserska difrakcija (LD)

Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) ali dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS) se uporablja za določanje povprečnega polmera in porazdelitve velikosti delcev nanometrskih velikosti. Metoda nam omogoča meritev delcev od 0,6 nm do 6 μm . Ta metoda temelji na merjenju nihanja jakosti sipanja laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Gre za naključno gibanje delcev v disperznem mediju zaradi trkov delcev z molekulami medija. Pri manjših delcih je to gibanje bolj izrazito kot pri večjih. Ker je to gibanje naključno, je zgornja meja velikosti delcev, ki jih s to metodo še lahko merimo, omejena s sedimentacijo delcev, ta pa je odvisna od velikosti delcev kot tudi od razlike v gostoti med delcem in medijem. Meritev mora potekati pri konstantni temperaturi, saj temperatura vpliva na hitrost gibanja delcev ter na viskoznost medija, ta pa vpliva na sedimentacijo delcev. Rezultat meritve sta povprečna velikost delcev (hidrodinamski premer) in širina porazdelitve delcev. Merilo za širino porazdelitve je polidisperzni indeks (PDI), ki ima vrednosti od 0 do 1. Bolj ko je PDI blizu 0, bolj monodisperzni so delci. Vrednosti bližje 1 pa pomenijo bolj polidisperzno porazdelitev. Vrednosti PDI nižje od 0,1 kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti delcev, vrednosti PDI večje od 0,3 pa na večjo heterogenost (17). Prednosti PCS metode so enostavna priprava vzorca, hitra meritev, za meritev potrebujemo zelo malo vzorca, enostavnost, učinkovitost in avtomatiziranost metode. Problem te metode je, da je včasih potrebno vzorec razredčiti, kar ima za posledico spremembo sistema (17, 18). Omejitev te metode je tudi v tem, da je primerna samo za meritve velikosti delcev v suspenzijah ne pa tudi za praškaste vzorce. Merilno območje PCS je zelo majhno, zato ne moremo detektirati večjih delcev ($> 6 \mu\text{m}$), v te namene se pogosto uporablja PCS v kombinaciji z lasersko difrakcijo (LD). Laserska difrakcija ima večje merilno območje (20 nm – 2000 μm) in je primerna tako za meritve velikosti v suspenzijah kot tudi za praškaste vzorce. Metoda temelji na sipanju laserske svetlobe, ko ta zadene delec. LD je, zaradi velikega merilnega območja, še posebej primerna za določitve velikosti delcev v pulmonalnih in parenteralnih nanosuspenzijah. Z nobeno od teh dveh metod ne moremo določiti oblike delcev (15).

Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Obliko delcev določimo z elektronskim mikroskopiranjem. Uporabljamo predvsem tri vrste elektronske mikroskopije: vrstična elektronska mikroskopija (scanning electron microscopy – SEM), transmisijška elektronska mikroskopija (transmission electron microscopy – TEM) in mikroskopija na atomsko silo (atomic force microscopy – AFM). Vsaka od teh metod ima svoje specifičnosti (15).

Vrstična elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy – SEM) omogoča opazovanje prevodnih materialov. Če preiskovani vzorec ni dovolj prevoden, ga naprašimo s tanko plastjo prevodnega materiala. Vzorec nanodelcev moramo najprej posušiti v vakuumu, nanj naprašiti plast ogljika in zlata (če ni dovolj prevoden) s pomočjo katodne evaporacije v enakomernem sloju približno 20 nm, nakar dobimo sliko po obsevanju z elektroni. Elektrone proizvajamo v elektrodni puški (volframova katoda), ki nato potujejo v vakuumu proti anodi. Elektroni se s pomočjo elektronskih leč zbirajo v fokusiranem elektronskem curku, ki se z uporabo odklonskih leč vodi po preiskovanem vzorcu v vzporednih vodoravnih črtah. Elektrone s površine vzorca vodimo v detektor, kjer s pomočjo ojačitve signala dobimo sliko. Zaradi načina delovanja metode imajo SEM slike tridimenzionalni videz in omogočajo predvsem opazovanje površine vzorcev. Prednost SEM je, da nam poleg velikosti poda tudi obliko delcev, pomanjkljivost pa je v zahtevni pripravi vzorca (19).

1 4. DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) se uporablja za določanje sprememb v kristalni strukturi nanosuspenzij. Diferenčni dinamični kalorimeter sestavljajo grelec, posodica z vzorcem in referenca (prazna posodica). Vzorec segrevamo s stalno hitrostjo. Rezultat segrevanja vzorca je DSC-krivulja, diagram odvisnosti toplotnega toka od temperature. Sam vzorec lahko energijo porablja ali sprošča, kar je mogoče zaznati v primerjavi z referenco in nam omogoča študij teh procesov (20).

1 5. VISKOZNOST IN MERJENJE VISKOZNOSTI

Viskoznost oz. dinamična viskoznost (η , Pas oz. $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) je fizikalna količina, ki podaja odziv tekočine na strižno deformacijo. Določena je kot razmerje med strižno

napetostjo in strižno hitrostjo in podaja notranje trenje tekočin. Pri laminarnem toku tekočine, ki teče ob ravni steni so plasti tekočine vzporedne s steno in se urejeno gibljejo druga ob drugi. Hitrost posameznih plasti se v tekočini razlikuje, počasnejše plasti zaradi trenja zadržujejo hitrejše, te pa vlečejo počasnejše. Pravimo, da v tekočini delujejo strižne sile. Velja, da je velikost strižne sile premosorazmerna površini stične ploskve med plastmi in strižni hitrosti, ki opisuje, kako se s krajem spreminja hitrost v smeri pravokotno na steno. Takim sistemom pravimo Newtonski sistemi. Pri ne-Newtonskih tekočinah pa strižna napetost in prirastek hitrosti nista premosorazmerna. To velja za koloidne raztopine, emulzije, suspenzije, mazila in podobne produkte.

Viskoznost je odvisna od temperature, za tekočine po navadi velja, da imajo pri višji temperaturi nižjo viskoznost. Odvisnost viskoznosti tekočin od temperature podaja enačba, (enačba 4) ki je analogna Arrheniusovi enačbi v kemijski kinetiki.

$$\eta = Ae^{E_v/RT} \quad \text{enačba 4}$$

- A konstanta, ki je odvisna od molekulske mase in molarne volumna tekočine
E_v aktivacijska energija (J)
R plinska konstanta (8,314472 J K⁻¹ mol⁻¹)
T temperatura (K)

Aktivacijska energija je energija, ki povzroči tok med molekulami. Izparilna energija je energija, ki je potrebna za izparetje ene molekule tekočine. V tekočini tako nastane prazen prostor, ki ga zapolnijo druge molekule, ki imajo tako na voljo več prostora za gibanje. Ugotovili so, da je aktivacijska energija enaka eni tretjini izparilne energije, saj molekula za tok v tekočini potrebuje le eno tretjino prostora (16).

Pri polimernih raztopinah je viskoznost odvisna od koncentracije in velikosti (t.j. molske mase) polimera. Viskoznost polimerov narašča eksponentno z njihovo koncentracijo. Do povečanja viskoznosti pride, ker se celotna polimerna veriga obda s topilom. Ko se polimer premakne, se plasti topila, ki so naložene na verigo polimera premaknejo zraven. Poveča se obseg pretoka, posledično se poveča tudi sila upora pretoka oz. viskoznost raztopine. Z merjenjem viskoznosti raztopin polimerov lahko sklepamo tudi na molsko maso polimerov (16).

Viskoznost merimo z viskozimetrom. Poznamo več tipov viskozimetrov, katerega izberemo za meritev, pa je odvisno od pričakovane viskoznosti in tega, ali imamo opravka z Newtonsko ali ne-Newtonsko tekočino. Tako poznamo kapilarne viskozimetre, viskozimetre s padajočo kroglico, vibracijske viskozimetre, rotacijske viskozimetre in viskozimetre v obliki posodice. Vibracijski viskozimeter sestavljata dve tanki senzorični ploščici, ki ju poganja elektromagnetna sila, ki vzdržuje stalno amplitudo valovanja. Ti ploščici sinusno nihata v resonanci v nasprotnih smereh. Zaradi upora tekočine ploščici nihata z vedno manjšo frekvenco in amplitudo, če nanju ne deluje nobena druga sila. Viskozimeter izmeri električni tok ki je potreben, da ploščici nihata vedno z enako frekvenco in amplitudo, na podlagi te meritve pa izračuna viskoznost tekočine (21).

1 6. UPORABA NANOSUSPENZIJ

Nanosuspenzije lahko apliciramo kot take ali pa jih vgradimo v različne farmacevtske oblike. Na novo sintetizirane v vodi težko topne učinkovine apliciramo v obliki nanosuspenzij pri testiranju farmakološke aktivnosti. Nadaljnje pretvorbe pa niso potrebne, saj v tem primeru ni potrebna dolgoročna stabilnost. Večina stabilizatorjev, ki so primerni za intravensko aplikacijo, stabilizira nanosuspenzijo vsaj nekaj dni. Nanosuspenzije lahko apliciramo parenteralno, vendar moramo pri tem spremljati velikost delcev, saj delci večji od 5 μm lahko zamašijo kapilare in s tem povzročijo nastanek embolije. Za izdelavo parenteralnih nanosuspenzij je najbolj primerna homogenizacija z visokim tlakom, ker omogoča aseptično pripravo in ker nanosuspenzije, izdelane na tak način, vsebujejo zelo malo mikrodeltcev. Parenteralna aplikacija nanosuspenzij nam omogoča tudi dajanje zelo visokih odmerkov, saj uporaba nanosuspenzij za slabo topne učinkovine zmanjša volumen injiciranja. Nanosuspenzije lahko uporabimo tudi za reformulacijo že obstoječih farmacevtskih oblik, ki kot pomožne snovi vsebujejo nezaželeni snovi. Tako odstranimo toksikološko manj sprejemljive snovi (22).

Zaradi svojih adhezivnih lastnosti in ker lahko s spremembo stabilizatorja vplivamo na *in vivo* lastnosti nanosuspenzij, jih lahko uporabljamo tudi za tarčno zdravljenje različnih bolezni (6). Adhezivnost lahko povečamo z dodatkom polimerov in PAS. Pri intravenski aplikaciji nanosuspenzij lahko z modifikacijo površine delcev s polimeri ali PAS povečamo adsorpcijo na plazemske proteine. To je pomembno pri učinkovinah, ki delujejo na retikuloendotelni sistem. Lastnosti in količina polimerov oz. PAS adsorbiranih na

nanodelcu vplivajo na to, koliko proteinov se bo adsorbiralo na delec, to pa vpliva na prevzem delcev v fagocitne celice (5).

Pri peroralni aplikaciji nanosuspenzij se močno poveča absorpcija učinkovine iz gastrointestinalnega trakta (GIT) in s tem tudi biološka uporabnost. Razloga za to sta povečana topnost in povečane adhezivne lastnosti delcev (5). Zaradi povečane adhezivnosti se zmanjšajo tudi razlike v biološki uporabnosti, ki so posledica prisotnosti hrane v GIT (8). Povečano adhezivnost izkoriščajo tudi pri zdravljenju okužb s paraziti v GIT, primer je okužba s *Cryptosporidium parvum*. Ta okužba je najbolj pogosta pri ljudeh, okuženih z virusom HIV, ki so imunsko oslabljeni; znak okužbe pa je huda driska. Peroralne nanosuspenzije se v tem primeru kažejo kot najbolj učinkovite, ker se delci učinkovine adsorbirajo na epitelij GIT, kjer se nahaja parazit. Adsorpcija na steno GIT pa tudi podaljša zadrževanje učinkovine na mestu delovanja, kar je problematično zaradi driske. Peroralne nanosuspenzije se uporabljajo tako za izboljšanje biološke uporabnosti učinkovin kot tudi za zdravljenje okužb GIT s paraziti in bakterijami. Zaradi svojih adhezivnih lastnosti se uporabljajo tudi za tarčno zdravljenje raka na debelem črevesu (5).

Nanosuspenzije lahko pretvorimo tudi v kako drugo farmacevtsko obliko, na primer v prahove ali granulato, ki jih nato lahko polnimo v želatinske ali HPMC kapsule, ali pa iz njih stisnemo v tablete. Vodne nanosuspenzije lahko uporabimo kot tekočino za granuliranje ali pri izdelavi pelet. Nadalje lahko nanosuspenzije tudi liofiliziramo ali pa sušimo z razprševanjem. Liofilizat nato hidriramo v vodi in apliciramo (7). Z liofiliziranjem in sušenjem z razprševanjem se izognemo problemu povezanih s stabilnostjo (15).

Vodne nanosuspenzije lahko uporabljamo tudi za pulmonalno dostavo učinkovin. Lastnosti nanokristalov omogočajo hitro difuzijo in raztapljanje učinkovine na mestu delovanja ter podaljšan čas delovanja, kar je ugodno za zdravljenje mnogih pljučnih bolezni. Poleg tega pa nanosuspenzije skoraj ne vsebujejo mikrodeltcev, ki bi se nalagali v ustih in v žrelu ter povzročali s tem povezane neželene učinke (4).

V primeru očesnih kapljic se podaljša zadrževanje učinkovine na očesu zaradi adhezivnih lastnosti. V primeru dermatikov temelji uporaba nanosuspenzij na povečanju nasičene topnosti, zaradi česar učinkovine boljše prodirajo v kožo (7). Vodne nanosuspenzije pa lahko uporabimo tudi neposredno oralno (nanos s čopičem v usta), pri čemer dodamo sredstva za povečanje viskoznosti ali pripravimo gel (3).

1 7. NAČRTOVANJE EKSPERIMENTOV (DoE - design of experiments)

Za dosego optimalnega rezultata pri razvoju produkta ali procesa moramo ugotoviti pomembne dejavnike, ki vplivajo na sam produkt in na proces. To lahko dosežemo s spremembo vsakega dejavnika posebej. Ta pristop imenujemo COST (changing one separate factor at a time). Na žalost pa ta pristop ni vedno učinkovit in nas ne pripelje vedno do optimalnega rezultata. Spreminjanje samo enega dejavnika nas ne vodi do optimalnega rezultata, še posebej kadar prihaja do interakcij med dejavniki, ki vplivajo na produkt. Rešitev je, da izvedemo premišljeno pripravljen set eksperimentov, pri katerih istočasno spreminjamo vse dejavnike, ki naj bi vplivali na ta poskus. To lahko izvedemo z uporabo statističnih metod za načrtovanje eksperimentov – DoE (23). Pri tradicionalnem COST pristopu je potrebno izvesti veliko poskusov, pri tem pa dobimo zelo malo informacij o sistemu, ki ga proučujemo. Načrtovanje eksperimentov pa nam ponuja organiziran pristop pri izvajanju poskusov in nam da bolj natančne informacije o preučevanem sistemu ob izvedbi manj poskusov. Uporaba DoE omogoča tudi, da se odziv loči od šuma ozadja kar omogoči oceno napake, ki izhaja iz dejavnikov na katere nimamo vpliva (24). DoE se uporablja v različnih industrijskih panogah: v avtomobilski industriji, kemični industriji, industriji polimerov, farmacevtski, papirni, biotehnični, prehranski industriji, marketingu ter v nekaterih drugih industrijskih panogah. Uporablja se pri razvoju novih procesov in produktov, pri optimizaciji procesov in produktov, za ugotavljanje dejavnikov, ki vplivajo na produkt ali proces, za testiranje robustnosti procesa in pri zmanjševanju stroškov procesa.

Preden izvedemo eksperiment določimo dejavnike, ki bojo vplivali na rezultat, kakšni bodo odzivi in njihovo število. Določimo standardne pogoje izvedbe (optimalno točko) za preiskovane faktorje. Definiramo tudi najvišje in najnižje vrednosti faktorjev glede na optimalno točko. Določimo tudi cilj poskusa: ali bomo testirali robustnost procesa, reševali faktorje, ki vplivajo na rezultat, ali pa bomo izvedli optimizacijo procesa. Nato postavimo eksperimentalni načrt in izvedemo poskuse. Poskuse lahko izvedemo zaporedno ali paralelno. Izbira eksperimentalnega načrta je odvisna od predpostavljenega modela, ta pa je odvisen od cilja poskusa. Obstaja več vrst eksperimentalnih načrtov. Najbolj pogosto se uporabljajo faktorski načrti, ki so tudi najbolj enostavni za razumevanje. Če proučujemo set poskusov, kjer naj bi na rezultat poskusa vplivali trije faktorji, lahko postavimo dvostopenjski faktorski načrt. Tak načrt si lahko predstavljamo v obliki kocke, kjer oglišča

kocke predstavljajo vse možne kombinacije vrednosti (visoke in nizke) faktorjev. Kocka pa predstavlja eksperimentalno območje, ki ga proučujemo. Najprej določimo center kocke, izberemo si neke standardne pogoje, nato pa glede na te vrednosti simetrično določimo še ostale vrednosti faktorjev, oglišča kocke. Poskus s standardnimi pogoji večkrat ponovimo, da določimo variabilnost eksperimenta. Na takem kubičnem modelu temelji vrsta drugih načrtov z eksperimentalnimi točkami v kotih, centru kocke, centrih stranic itd.. V primeru, ko proučujemo vpliv več kot treh faktorjev, uporabimo isti princip, le da eksperimentalno območje predstavlja hiper-kocka. Po končanem eksperimentalnem delu dobljene podatke obdelamo z analizo regresije. Regresijske koeficiente najlažje predstavimo v obliki stolpčnega diagrama (regression coefficient plot), iz katerega lahko razberemo, kako je določen faktor vplival na odziv in če je ta vpliv statistično signifikanten. Razberemo pa lahko tudi vpliv med posameznimi faktorji. Potem postavimo model, ki simulira odnos med spremembami v faktorjih in spremembami v odzivih. Ponavadi to naredimo z uporabo matematičnega polinomskega modela. Poznamo tri tipe polinomskih modelov, to so linearni, interakcijski in kvadratni model. Kateri model bomo izbrali, je odvisno od tega, ali želimo proučevani proces optimizirati, testirati robustnost procesa ali pa rešetati faktorje, ki vplivajo na odziv. V primeru optimizacije izberemo kvadratni model, ki je najbolj kompleksen in zahteva največ poskusov. Za rešetanje se uporabljata interakcijski ali linearni model, pri testiranju robustnosti pa linearni model. Interakcijski model zahteva manj poskusov, linearni pa še manj. Model nam pokaže, kateri faktorji so pomembni in kako z delovanjem eden na drugega vplivajo na odziv. Rezultate modela lahko pretvorimo v grafične prikaze (response countour plot), ki jih lahko uporabimo za določitev optimalne točke izvajanja eksperimentov. Pomagajo pa nam tudi pri odločanju o morebitnih nadaljnjih eksperimentih (23).

Za izdelavo eksperimentalnega načrta obstajajo številni računalniški programi, tako da ni potrebno podrobno znanje statistike. Glavnih pet je: MODDE (Umetrics), Design Expert (Statease), Fusion AE (S-Matrix), JMP (SAS Institute) in The Unscrambler X (CAMO). Vsebujejo vrsto eksperimentalnih načrtov in so primerni za rešetanje faktorjev, optimizacijo in testiranje robustnosti procesa. Omogočajo pa tudi predstavitev rezultatov na različne načine v obliki grafov. Vsi programi so zasnovani tako, da vodijo uporabnika skozi načrtovanje eksperimentov in analizo rezultatov na kar se da enostaven in logičen način (24). Bistvo načrtovanja eksperimentov je torej v tem, da načrtujemo poskuse,

rezultate teh poskusov analiziramo z namenom postavitve dobrega modela ter iz tega modela ustvarimo grafične prikaze sistema (23).

2 NAMEN DELA

Namen dela je ovrednotiti vpliv temperature na velikost delcev pri mletju v planetarnem krogličnem mlinu Retsch PM 100. Med procesom mletja se posoda s kroglicami in suspenzijo vrti pri visoki hitrosti. Zaradi gibanja kroglic v posodi pride do trkov in trenja med kroglicami ter med kroglicami in stenami posode, sile, ki pri tem nastanejo, pa so dovolj velike, da pride do zmanjšanja velikosti delcev v suspenziji. Ta mlin nima vgrajenega sistema za vzdrževanje konstantne temperature, zato temperatura vzorca med mletjem zaradi trenja med samimi kroglicami ter trenja med kroglicami in stenami posode močno naraste.

V diplomski nalogi bomo poskušali ovrednotiti vpliv začetne temperature v posodi za mletje na temperaturo vzorca po končanem mletju in na velikost delcev v nanosuspenziji. Vzorce bomo predhodno termično obdelali, jih zmleli pod enakimi pogoji ter vrednotili vpliv začetne temperature na velikost delcev. Pri enem vzorcu bomo ovrednotili tudi vpliv vsakokratnega segrevanja in ohlajanja vzorca, med procesom mletja, na velikost delcev. Učinkovino v obliki prahu bomo najprej dispergirali v vodni raztopini stabilizatorja z magnetnim mešalom. Nato bomo izmerili začetno temperaturo v posodi za mletje, po končanem mletju bomo spet izmerili temperaturo v posodi in velikost delcev. Začetna temperatura bo imela tri nivoje: ohlajanje ($5-10^{\circ}\text{C}$), sobna temperatura ($20-25^{\circ}\text{C}$) in segrevanje na $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Temperaturo bomo izmerili s kontaktnim in IR termometrom. Velikost in porazdelitev velikosti delcev pa bomo spremljali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) in vrstične elektronske mikroskopije (SEM).

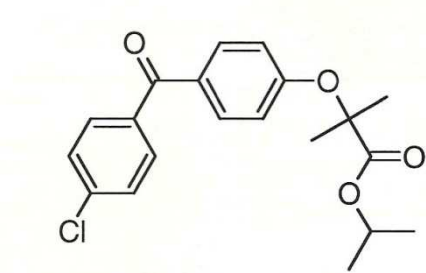
Vpliv temperature na velikost delcev pri mletju bomo vrednotili na primeru treh učinkovin (fenofibrat, ezetimib in celekoksib) z različnimi stabilizatorji (HPMC, Poloxamer 188 in Kollidon VA 64). Za kombinacijo celekoksiba in Kollidona bomo pripravili tudi eksperimentalni načrt, kjer bomo s pomočjo računalniškega programa MODDE ocenili vpliv začetne temperature, deleža kroglic ter hitrosti vrtenja mlina na končno temperaturo in velikost delcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. UČINKOVINE

3.1.1. Fenofibrat

Fenofibrat (slika 3) se uporablja za zdravljenje hiperlipoproteinemij. Je derivat fibrične kisline in spada v skupino fibratov. Je bel prašek z molekulsko formulo $C_{20}H_{21}ClO_4$ in molsko maso 360,831 g/mol. Ima dolg razpolovni čas (20 ur) in nizko temperaturo tališča, ta je med 79 in 82°C. Topnost fenofibrata v vodi je 0,4 µg/ml (25, 26).

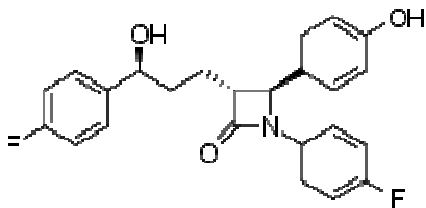


Slika 3: Fenofibrat (propan-2-il 2-{4-[(4-kloropentil)karbonil]fenoksi}-2-metilpropanat)

Je agonist na PPARs receptorjih, ki nadzirajo ekspresijo genov za lipoproteinske lipaze, ki povečajo privzem LDL v jetrih. Aktivacija PPARs receptorja povzroči tudi povečano sintezo apolipoproteina AI in AII, ki vodita v znižanje koncentracije VLDL in LDL ter zvišanje koncentracije HDL v krvi (26).

3.1.2. Ezetimib

Ezetimib (slika 4) se uporablja za zdravljenje hiperholesterolemij. Spada v skupino azetidinonskih inhibitorjev absorpcije holesterola. Je bel prašek, njegova molekulska formula je $C_{24}H_{21}F_2NO_3$, molska masa pa 409,4 g/mol. Ima visoko temperaturo tališča (163°C) in je dobro topen v etanolu, metanolu in acetonu. Topnost v vodi pa je 0,01 mg/ml.

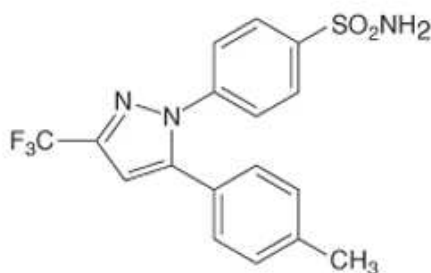


Slika 4: Ezetimib ((3R,4S)-1-(4-fluoropentil)-3-[(3S)-3-(4-fluoropentil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksipentil)azetidin-2-on)

Deluje v enterocitih dvanajstnika tako, da inhibira absorpcijo holesterola. Ne vpliva pa na absorpcijo v maščobah topnih vitaminov, trigliceridov in žolčnih kislin. Navadno se ga predpisuje v kombinaciji s statini za zdravljenje hiperholesterolemij (27, 28).

3 1.3. Celekoksib

Celekoksib (slika 5) uvrščamo med nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID). Je bel kristaliničen prašek, s topnostjo v vodi manj kot 0,007 mg/ml, v bazičnih raztopinah pa se topnost močno poveča. Njegova molekulska formula je $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$, molska masa pa 381,37 g/mol. Temperatura tališča je 161.3-162.2°C (29).



Slika 5: Celekoksib (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzensulfonamid)

Deluje kot selektivni inhibitor encima COX-2 (ciklooksigenaza). Ciklooksigenaza katalizira pretvorbo arahidonske kisline v prostaglandine in tromboksane. V telesu se pojavlja v treh oblikah: COX-1, COX-2 in COX-3. Encim COX-1 je stalno prisoten v večini tkiv in sodeluje pri agregaciji trombocitov, pri zaščiti želodčne sluznice in pri ohranjanju ledvične funkcije. COX-2 pa je inducibilen encim, kar pomeni da se izraža le ob določenih dražljajih. Izraža se v vnetnih celicah ob prisotnosti vnetnih mediatorjev (citokinov in tumorje nekrozirajočega faktorja). Encim COX-3 pa najdemo v možganih. Celekoksib inhibira COX-2 in se uporablja za zdravljenje revmatoidnega artritisa in osteoartritisa (26).

3 2. STABILIZATORJI

3 2.1 Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

Hidroksipropilmetilceluloza (Pharmacoat 603, Shin Etsu, Japonska) je polsintezni polimer O-metil in O-(2-hidroksipropil) celuloze. Razlikuje se glede na viskoznost in stopnjo substitucije. Je bel do kremasto bel prašek, brez vonja in okusa. Topen je v hladni

vodi ter v mešanici vode in etanola, v etanolu ni topen. V farmaciji se uporablja v peroralnih, očesnih in dermalnih pripravkih, kjer ima vlogo veziva ali stabilizatorja. Pri nanosuspenzijah deluje kot sterični stabilizator (30).

3 2.2 Hidroksipropilceluloza (HPC)

Hidroksipropilceluloza (Klucel EF, Hercules, USA) je polisaharid iz linearno povezanih *D*-glukoz z delno *O*-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami. Molska masa je 60000-1200000 g/mol. Je rahlo higroskopen bel, rumenkasto bel ali sivkasto bel zrnat ali vlaknast prah brez vonja in okusa. Uporablja se kot polimer za filmske obloge in vezivo v tabletah ali tvori ogrodje za podaljšano sproščanje iz tablet. Uporablja se tudi pri mikrokapsuliranju, v transdermalnih obližih in v farmacevtskih oblikah za oko, v kozmetiki pa se uporablja kot stabilizator (30).

3 2.3 Hidroksietilceluloza (HEC)

Hidroksietilceluloza (Natrosol G Pharm in Natrosol 250 LNF, Hercules, USA) je polsintezni polimer celuloze z delno *O*-hidroksietiliranimi hidroksilnimi skupinami. Razlikuje se glede na viskoznost in stopnjo substitucije. Je bel, rumenkasto bel ali sivkasto bel higroskopen prah brez vonja in okusa. Uporablja se kot stabilizator, vezivo v tabletah, polimer za izdelavo oblog za tablete, zgoščevalo v farmacevtskih oblikah za dermalno aplikacijo in za oko, je tvorilec gelov, uporablja pa se tudi kot ogrodje za podaljšano sproščanje pri tabletah (30).

3 2.4 Natrijeva karboksimetilceluloza (CMCNa)

Karboksimetilceluloza (Hercules, USA) je polsintezni polimer celuloze z delno *O*-karboksimetiliranimi hidroksilnimi skupinami. Pogosto se uporablja v obliki natrijeve soli. V farmaciji se uporablja kot sredstvo za povečanje viskoznosti, kot razgrajevalo v tabletah in kapsulah, vezivo v tabletah in kot zgoščevalo. Je rumenkasto bel prašek brez vonja (30).

3 2.5 Poloksamer 188

Poloxamer 188 (Lutrol F 68, BASF, Nemčija) je blok kopolimer polietilena in polipropilena. Je bel ali skoraj bel voskast prah ali kosmiči. Njegova približna molska masa je 2090 – 2360 g/mol. Uporablja se kot emulgator (30).

3 2.6 Kopovidon

Kopovidon (Kollidon VA 64, BASF, Nemčija) je kopolimer vinilpirolidona in vinilacetata v masnem razmerju 3:2. Je bel ali rumenkasto bel prašek z dobrimi pretočnimi lastnostmi, z rahlim značilnim vonjem in brez okusa. Uporablja se kot suho vezivo pri direktnem tabletiranju, vezivo pri vlažnem granuliranju in pri filmskih oblogah tablet (30).

3 2.7 Eudragit

Eudragit EPO (Degussa, Nemčija) je kationski kopolimer dimetilaminometakrilata in metakrilnih estrov. Spada v skupino polimerov, ki jim pravimo polimetakrilati. Je bel prašek z značilnim vonjem aminov. Ni topen v vodi, topen je v etanolu, propanolu, izopropanolu, etilacetatu, acetonu, diklorometanu in v 1M HCl (31).

3 2.8 Arabski gumi

Arabski gumi (Gumi arabicum, Alland & Robert Gommès et résines naturelles, Francija) je posušen izloček iz zarezanih debel afriških akcij, ki ga v glavnem sestavljajo kisli polisaharidi. Glavnino predstavlja kisli arabinogalaktan v obliki kalcijeve, kalijeve ali magnezijeve soli z molekulsko maso med 240000 in 580000 g/mol. Je v obliki prahu brez vonja. Uporablja se kot zgoščevalo, stabilizator, emulgator, suspendirajoče sredstvo in kot vezivo v tabletah (30).

3 2.9 Natrijev lavrilsulfat (SDS)

Natrijev lavrilsulfat (Texapon K12, Cognis GmbH, Nemčija) je zmes natrijevih alkilsulfatov, med katerimi prevladuje natrijev lavrilsulfat. Je anionska površinsko aktivna snov, uporablja se kot sredstvo za močenje, drsilo pri tabletah in kapsulah in kot emulgator. Je bel prah z molekulsko formulo $C_{12}H_{25}SO_4Na$ (30).

3 2.10 Polivinilpirolidon K25 (PVP)

Polivinilpirolidon (ISP, Švica) je linearni polimer N-vinil-2-pirolidona. Glede na število povezanih monomernih enot ima različno K vrednost. Višja K vrednost kaže na višjo stopnjo polimerizacije in na večjo viskoznost vodne raztopine. Uporablja se kot vezivo v tabletah, kapsulah in zrnih za direktno tabletiranje, kot solubilizator v farmacevtskih oblikah za peroralno in zunanjo uporabo, kot stabilizator v peroralnih in dermalnih suspenzijah, omogoča vlaženje v farmacevtskih oblikah za oko. Uporablja pa se

tudi kot polimer za filmsko oblaganje. Je umazano bel prašek z dobrimi pretočnimi lastnostmi (30).

3 2.11 Arabinogalaktan

Arabinogalaktan (Ametis, Rusija) je polimer naravnega izvora. Je kisli polisaharid sestavljen iz arabinoze in galaktoze. Uporablja se kot vezivo pri tabletiranju, kot emulgator in kot stabilizator. Je kremasto bel sipek prašek (30).

3 3. NAPRAVE ZA IZDELAVO IN VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJ

Analitska tehtnica, XP 205, Mettler Toledo, Švica

Precizna tehtnica, BP 1200, Sartorius laboratory, Nemčija

Planetarni kroglični mlin, PM 100, Retsch, Nemčija

Kontaktni termometer, HI 9063, Hanna, Nemčija

IR termometer, 63, Fluke, ZDA

Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

Vrstični elektronski mikroskop JEOL JSM-7001F, Jeol Japonska

Magnetno mešalo, MST digital, IKA, Nemčija

Vibroviskozimeter, SV-10, AND, Japonska

3 4. PRIPRAVA NANOSUSPENZIJ

Nanosuspenzije smo pripravili z mokrim mletjem v planetarnem krogličnem mlinu Retsch PM 100 (Retsch, Nemčija). Najprej smo poiskali primerne stabilizatorje, pri katerih smo dobili najmanjše velikosti delcev. Določili smo tudi čas mletja in vpliv napolnjenosti posode.

Natehtali smo ustrezne količine stabilizatorja (0,8 g oz. 1,23 g pri suspenzijah s fenofibratom) in vode (14 g) ter mešali z magnetnim mešalom, dokler se stabilizator ni v celoti raztopil. Nato smo dodali ustrezno količino učinkovine (4 g oz. 6,4 g za fenofibrat), da smo dobili razmerje stabilizatorja proti učinkovini 1:5 (oz. 1:5,2 za suspenzije s fenofibratom). Končna suspenzija je vsebovala 21% (oz. 30% za fenofibrat) učinkovine. Tako pripravljeno suspenzijo smo natehtali v posodo za mletje (25 oz. 12,5 g). Volumen

posode pri vseh poskusih je bil 50 ml. V posodo smo dodali tudi 100 g kroglic iz cirkonijskega oksida velikosti 0,6 – 0,8 mm. Posodo smo vpeli v mlin in mleli toliko časa, da je bila velikost delcev manjša od enega mikrometra in se z nadaljnjim mletjem ni več bistveno zmanjševala. Hitrost vrtenja mlina pri vseh poskusih je bila 500 rpm. Imeli smo tri nivoje začetne temperature v posodi: sobna temperatura (20-25°C), ohlajanje (5-10°C) in segrevanje na $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Nizko začetno temperaturo vzorca smo dosegli tako, da smo suspenzijo skupaj s kroglicami in posodo za mletje pustili čez noč v hladilniku. V primeru visoke začetne temperature pa smo suspenzijo v posodi skupaj s kroglicami segrevali na $45 \pm 2^\circ\text{C}$ na vroči plošči. Med posameznimi mletji smo mlin s tekočim dušikom ohladili na sobno temperaturo (20-25°C).

Za suspenzije s celekoksibom in Kollidonom smo pripravili eksperimentalni načrt. V posodo za mletje smo natehtali 12,5 g suspenzije, dodali različne količine kroglic in mleli 30 min pri različnih hitrostih. Vzorce smo pred mletjem termično obdelali, tako da smo imeli tri nivoje začetne temperature: sobna temperatura (20-25°C), ohlajanje (5-10°C) in segrevanje na $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Mleli smo po naključnem vrstnem redu, ki ga je izbral računalniški program MODDE, da bi se izognili morebitnim napakam, ki bi lahko izvirale iz zaporedja eksperimentov.

3 5.MERJENJE TEMPERATURE

Pred mletjem smo s kontaktnim termometrom izmerili temperaturo v posodi za mletje. Temperaturo vzorca smo izmerili tudi z IR termometrom na treh različnih točkah ter izračunali povprečje meritev. IR termometer deluje tako, da meri toplotno sevanje, ki ga oddaja telo. To sevanje vodi do detektorja, kjer se pretvori v električni signal in na zaslonu se prikaže temperatura. Na meritev močno vpliva temperatura prostora, zato IR termometer vsebuje še senzor za temperaturo prostora, ta pa se pred prikazom temperature telesa kompenzira. IR termometri torej merijo temperaturo brez kontakta (32). Pred mletjem smo izmerili še temperaturo milna na treh različnih točkah z IR termometrom in temperaturo prostora z alkoholnim termometrom. Po končanem mletju smo prav tako izmerili temperaturo v posodi za mletje s kontaktnim in IR termometrom ter temperaturo mlina.

3 6.DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV V NANOSUSPENZIJAH

Velikost delcev smo izmerili s PCS metodo z napravo Zetasizer Nano ZS. Vzorce smo pred meritvijo ustrezno redčili: 0,1 ml nanosuspenzije smo redčili z 1 ml prečiščene in filtrirane vode. Vodo smo prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 μm , da smo odstranili morebitno prisotne prašne delce. Z razredčenim vzorcem smo napolnili kiveto. Pred meritvijo smo aparaturo nastavili na želene pogoje merjenja. Kiveto smo vstavili v aparaturo, ta pa nam je preko računalniške obdelave podala povprečno velikost delcev in polidisperzni indeks (PDI). Meritve smo izvajali pri 25°C. V programu smo izbrali ustrezni disperzni medij – vodo ter vnesli ustrezni lomni količnik disperznega medija (1,330 za vodo). Vrednost za viskoznost prečiščene vode pri 25°C je že v programu. Meritve smo izvajali v polistirenski kiveti za enkratno uporabo. Za vsak vzorec smo izvedli tri meritve in izračunali povprečne vrednosti.

SEM slike smo posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL JSM-7001F. Vzorce smo pripravili tako, da smo približno 500 mg nanosuspenzije redčili z 10 ml prečiščene vode. Razredčene vzorce smo centrifugirali 20 min pri 20000 obratih. Vzorce smo redčili in centrifugirali zato, da smo odstranili stabilizator, ki bi na slikah prekril delce in onemogočil določitev njihove velikosti in oblike. Med centrifugiranjem so se delci posedli, stabilizator pa se je raztopil v vodi, ki smo jo odlili. Usedlino smo nanесли na aluminijasto folijo in pustili da se posuši. Nato smo posneli slike pri napetosti 1kV in iz njih določili velikost delcev.

3 7.MERJENJE VISKOZNOSTI

Viskoznost suspenzij pred mletjem smo izmerili z vibracijskim viskozimetrom SV-10 (AND, Japonska). S tem viskozimetrom lahko določamo viskoznost tekočin od 0,3 do 10000 mPas pri temperaturi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in 45-60% relativni vlažnosti. Meritve smo izvajali v polikarbonatni posodici volumna 10 ml pri sobni temperaturi.

Izmerili smo tudi viskoznost nekaterim raztopinam stabilizatorjev pri različnih temperaturah. Pripravili smo vodne raztopine stabilizatorjev v enakih koncentracijah kot pri mletju. Raztopino smo nalili v posodico za merjenje viskoznosti in jo pustili čez noč v hladilniku, da je dosegla temperaturo 5-10°C nato smo ji izmerili viskoznost. Posodico z vzorcem smo postopoma segrevali na vodni kopeli in merili viskoznost pri različnih temperaturah.

3 8. OBDELAVA PODATKOV

Za preverjanje vpliva začetne temperature na velikost delcev smo uporabili statistični test, enofaktorska ANOVA. Ker pa ANOVA test lahko uporabimo samo pri vzorcih z enako varianco, smo predhodno z Hartleyevim testom testirali še enakost varianc. Če smo s Hartleyevim testom ugotovili, da je F eksperimentalni manjši od F kritični pomeni, da med variancami niso prisotne statistično signifikantne razlike; zato lahko uporabimo enofaktorsko ANOVA. Kot ničelno hipotezo smo postavili, da je velikost delcev pri vseh nivojih temperature enaka. Alternativna hipoteza pa pravi, da je velikost delcev pri vseh nivojih temperature različna. Stopnja tveganja je bila v vseh primerih 5% ($\alpha = 0,05$). Če smo dobili vrednost P večjo kot α , pomeni da ni prisotnih statistično signifikantnih razlik. V primerih ko smo z ANOVA testom dokazali prisotnost statistično signifikantnih razlik med velikostmi, smo naknadno izvedli še Scheffejev test pri $\alpha = 0,05$; z ANOVA testom namreč ne moremo ugotoviti pri katerih temperaturah so prisotne razlike v velikosti. Rezultate smo prikazali v preglednicah, kjer je z 1 označena signifikantna razlika med velikostjo delcev pri različnih temperaturah. Oznaka 0 pa pomeni, da se velikost pri danih temperaturah statistično signifikantno ne razlikuje.

Vpliv napolnjenosti posode pa smo preverili z dvostranskih t testom z enakima variancama pri $\alpha = 0,05$. Enakost varianc smo predhodno testirali z F testom. Kot ničelno hipotezo smo postavili, da napolnjenost posode ne vpliva na velikost delcev. Alternativna hipoteza pa pravi, da napolnjenost posode vpliva na velikost delcev.

Pri tri urnih mletjih vzorcev pri začetni sobni temperaturi smo na vsake 30 min izmerili temperaturo v posodi. Iz zbranih podatkov smo s pomočjo računalniškega programa OriginPro 8.5 postavili model, ki prikazuje gibanje temperature v posodi med mletjem. Za modelno funkcijo smo v programu izbrali eksponentno funkcijo, ki ima asimptoto, nato pa je program z analizo regresije postavil model.

Ustreznost modela je prikazana s koeficientoma prilagojen R^2 in reduciran χ^2 . Prilagojen R^2 podobno kot R^2 prikazuje ujemanje modela s podatki. R^2 zavzema vrednosti od 0 do 1, kjer vrednost 1 pomeni dobro ujemanje modela s podatki, vrednost 0 pa nezmožnost postavitve modela. Če povečamo število poskusov, se vrednost R^2 bolj približa vrednosti 1, kar pa ne pomeni, da smo s tem dosegli boljše ujemanje modela s podatki. Zato je za napoved ustreznosti modela bolj uporaben prilagojen R^2 , kjer je upoštevano še število prostostnih stopenj. Prilagojen R^2 lahko zavzema vrednosti od 1 do minus neskončno. Če je vrednost prilagojenega R^2 ena, to pomeni dobro ujemanje modela

s podatki. Negativne vrednosti pa pomenijo, da se model ne ujema s podatki (33). Drugi koeficient, ki opisuje primernost modela, je χ^2 . Definiran je kot vsota kvadratov razmerij med razliko dobljenih odzivov in odzivov dobljenih iz modela in standardno deviacijo. Pri dobrem modelu je to razmerje enako 1, kar pomeni, da modelna krivulja pri vsaki točki seka območje njene standardne deviacije. Zato je pri dobrem ujemanju modela s podatki χ^2 enak številu podatkov. Pri reduciranem χ^2 pa je upoštevano še število prostostnih stopenj, ki je definirano kot razlika med številom podatkov in številom koeficientov modela. Reduciran χ^2 zavzema vrednosti od 1 naprej, kjer vrednost 1 pomeni zelo dobro ujemanje modela s podatki. Vrednosti večje od ena pa pomenijo, da krivulja modela seka premalo eksperimentalnih točk in ne služi kot dober opis dogajanja v sistemu (34).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

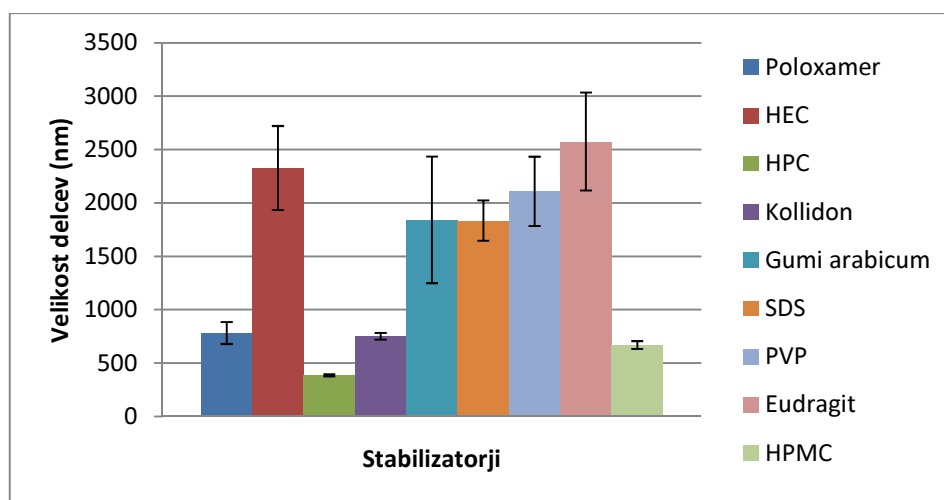
4.1. MLETJE FENOFIBRATA

Pripravili smo suspenzije fenofibrata in različnih stabilizatorjev v razmerju 1 : 5,2 za stabilizator in učinkovino. Raztopini hidroksietilceluloze (Natrosol G Pharm) in karboksimetilceluloze sta bili preveč viskozni, da bi lahko vmešali fenofibrat. Ostalim suspenzijam smo pred mletjem izmerili viskoznost pri sobni temperaturi (preglednica I). Iz literature je razvidno, da naj bi v bolj viskoznih suspenzijah med mletjem prišlo do večjih strižnih sil, zaradi katerih pride do zmanjšanja velikosti delcev, in s tem do učinkovitejšega mletja. Nanokristale naj bi dobili samo pri mletju suspenzij, ki imajo viskoznost večjo kot 50 mPas (11). Glede na rezultate viskoznosti smo se odločili, da bomo zmleli suspenzije, ki kot stabilizator vsebujejo: Poloxamer, hidroksietilcelulozo - HEC (Natrosol 250 LNF), hidroksipropilcelulozo – HPC, Kollidon, Arabski gumi, natrijev lavrilsulfat, polivinilpirolidon – PVP, Eudragit, hidroksipropilmetilcelulozo – HPMC in arabinogalaktan.

Preglednica I: Viskoznosti suspenzij pri sobni temperaturi z različnimi stabilizatorji

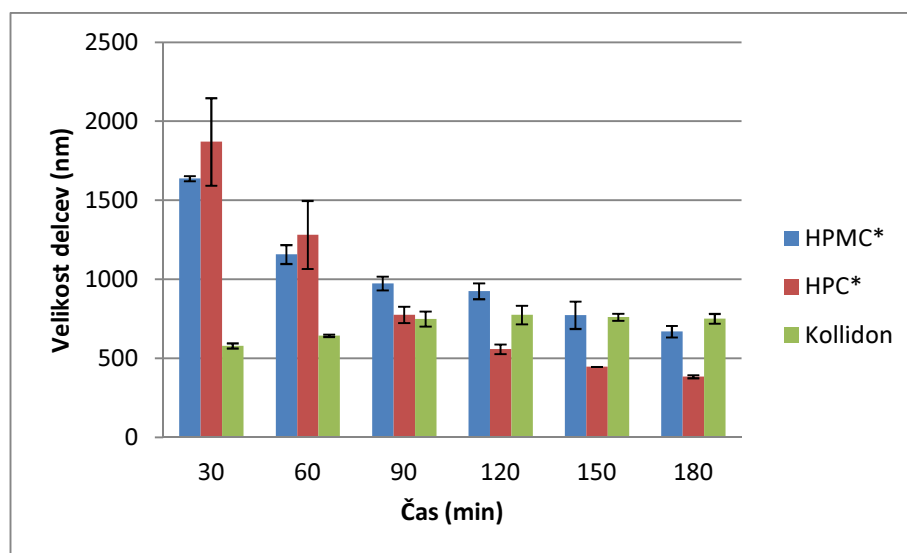
Stabilizator	Viskoznost (mPas)
Poloxamer	penasta suspenzija, ne da se izmeriti
HEC (Natrosol 250 LNF)	preveč viskozno za meritev z vibroviskozimetrom
HPC	858 ± 43
Kollidon	15,0 ± 1,2
Arabski gumi	37,2 ± 0,3
Natrijev lavrilsulfat	penasta suspenzija, ne da se izmeriti
PVP	12,8 ± 0,6
Eudragit	2,04 ± 0,01
HPMC	77,1 ± 17
Arabinogalaktan	preveč viskozno za meritev z vibroviskozimetrom

12,5 g suspenzije smo mleli tri ure in na vsakih 30 min izmerili velikost delcev in temperaturo v posodi. Na osnovi rezultatov (slika 6) smo se odločili, da bomo za nadaljnje poskuse izbrali naslednje stabilizatorje: HPMC, HPC, Poloxamer in Kollidon, ker smo z uporabo teh stabilizatorjev dobili najmanjše delce. Ugotovili smo tudi, da pri mletju suspenzije s Kollidonom prav tako dobimo delce ustrezne velikosti, čeprav je viskoznost suspenzije manjša od 50 mPas. Iz tega lahko sklepamo, da na učinkovitost mletja poleg viskoznosti suspenzije vplivajo tudi lastnosti stabilizatorja (11).



Slika 6: Povprečna velikost delcev fenofibrata po treh urah mletja z uporabo različnih stabilizatorjev

Suspenziji s HPMC in HPC moramo mleti tri ure, da dosežemo velikost delcev manjšo od 1 μm in da se ta z nadaljnjim mletjem bistveno ne zmanjšuje več (slika 7). Pri ostalih stabilizatorjih pa tudi po treh urah mletja ne dobimo ustrezne končne velikosti delcev. Pri suspenziji z natrijevim lavrilsulfatom je med mletjem prišlo do oblaganja kroglic, v posodi smo po končanem mletju našli nekaj kroglic obloženih s suspenzijo. Med mletjem suspenzije z arabinogalaktanom se je le-ta rožnato obarvala in postala še bolj viskozna, velikost delcev pa se ni zmanjšala, zato smo mletje po eni uri prekinili.



Slika 7: Velikost delcev v odvisnosti od časa pri mletju fenofibrata z različnimi stabilizatorji. (*Meritve velikosti po 30, 60 in 90 min mletja suspenzije s HPMC ter meritve velikosti po 30 in 60 min mletja suspenzije s HPC niso zanesljive)

Ugotovili smo tudi, da se suspenzija s Kollidonom zmelje že v pol ure, z nadaljnjim mletjem pa ne dosežemo več zmanjšanja delcev, temveč se velikost delcev celo poveča (preglednica II). Razlog je lahko v tem, da med mletjem prihaja do trkov med delci, to pa povzroči agregacijo in s tem rast delcev (11).

Preglednica II: Povprečna velikost delcev pri suspenziji s Kollidonom

Čas (min)	Velikost (nm)	PDI
0		
30	579,9 ± 16,3	0,224 ± 0,120
60	644,3 ± 7,5	0,183 ± 0,090
90	749,7 ± 47,1	0,060 ± 0,021
120	775,4 ± 59,1	0,188 ± 0,141
150	761,3 ± 22,8	0,125 ± 0,026
180	751,9 ± 30,7	0,132 ± 0,026

4 1. 1. Nanosuspenzija fenofibrata in HPMC

Pripravili smo suspenzijo HPMC in fenofibrata v razmerju 1 : 5,2. Masa suspenzije je bila 25 g čas mletja pa tri ure. Za vsak nivo temperature smo naredili dve mletji in izračunali povprečno vrednost za temperaturo. Po mletju smo izmerili še velikost delcev (preglednica III).

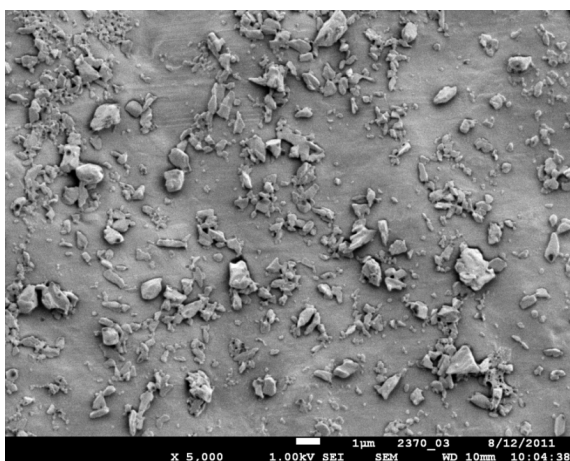
Preglednica III: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij fenofibrata s HPMC pri mletju 25 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	13,7 ± 6,8°C*	24,1 ± 1,5	38,5 ± 9,5
T začetna IR (°C)	9,0 ± 3,0°C*	21,8 ± 0,9	38,7 ± 1,5
T končna kontaktni (°C)	39,2 ± 2,1	31,0 ± 2,9	34,4 ± 4,5
T končna IR (°C)	35,5 ± 2,0	34,9 ± 1,2	33,5 ± 0,8
Velikost delcev (nm)	707,1 ± 43,8	737,2 ± 59,9	705,7 ± 28,3
PDI	0,307 ± 0,035	0,325 ± 0,099	0,291 ± 0,022

Pri vzorcih, ki smo ju ohlajali nismo izmerili pričakovane začetne temperature (5-10°C). Ker pa sta bila ta vzorca tretirana enako kot ostali vzorci, lahko to napako verjetno pripišemo nepravilnemu delovanju kontaktnega termometra, dejanska temperatura pa je v območju temperatur ostalih vzorcev, tretiranih na enak način. Vpliv začetne temperature na velikost delcev smo preverili s statističnim testom, enofaktorska ANOVA. Z Hartleyevim

testom smo predhodno dokazali enakost varianc ($F_{\text{eks}} = 4,47$, $F_{\text{krit}} = 4,85$). Ugotovili smo, da med velikostmi delcev pri različnih temperaturah ni statistične razlike ($P = 0,30$).

Iz rezultatov je razvidno, da začetna temperatura ne vpliva na velikost delcev in na PDI ter, da je končna temperatura pri vseh vzorcih približno enaka. Čas mletja je bil tri ure, kar je dovolj dolgo, da se izniči vpliv začetne temperature na končno temperaturo. V vseh treh primerih dobimo relativno visok PDI, kar kaže na heterogenost v velikosti delcev. Heterogenost opazimo tudi pri SEM sliki vzorca mletega pri začetni sobni temperaturi (slika 8). Iz SEM slike vidimo tudi, da delci niso enakomernih oblik. Z elektronskim mikroskopom smo določili tudi velikost delcev, ta je bila 577 ± 305 nm ($N=16$). Tudi iz visoke standardne deviacije vidimo, da so delci precej heterogeni in neenakomernih oblik.



Slika 8: SEM slika nanosuspenzije fenofibrata in HPMC mlete pri začetni sobni temperaturi

Nato smo preverili še vpliv napolnjenosti posode oz. mase vzorca na velikost delcev pri začetni sobni temperaturi. V posodo za mletje smo natehtali polovico manj (12,5 g) suspenzije. Masa kroglic, čas mletja in hitrost vrtenja mlina pa so ostali nespremenjeni. Po končanem mletju smo izmerili temperaturo v posodi in velikost delcev (preglednica IV).

Preglednica IV: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev za 12,5 g suspenzije fenofibrata in HPMC mlete pri začetni sobni temperaturi

T začetna kontakti (°C)	24,0 ± 0,7
T začetna IR (°C)	23,2 ± 0,7
T končna kontakti (°C)	38,1 ± 1,0
T končna IR (°C)	35,3 ± 2,7
Velikost delcev (nm)	677,7 ± 33,2
PDI	0,315 ± 0,053

Z dvostranskim t testom z enakima variancama smo ugotovili, da napolnjenost posode statistično signifikanto vpliva na velikost delcev ($P = 0,04$). Predhodno smo dokazali še enakost varianc z F testom ($P = 0,10$). Vpliv mase suspenzije na učinkovitost mletja so ugotovili tudi Mio in ostali, ki so dokazali, da je mletje bolj učinkovito, če je masa suspenzije čim manjša (35). Zaradi manjše porabe materiala in ker je bila razlika med vrednostnima P in α zelo majhna, smo se odločili, da bomo za nadaljnja mletja uporabili 12,5 g suspenzije. Vrednost P je zelo blizu vrednosti α , kar pomeni, da bi ob postavitvi nižje meje tveganja sprejeli ničelno hipotezo, ki pravi, da napolnjenost posode nima vpliva na velikost delcev. Ob upoštevanju zelo majhne razlike med vrednostnima P in α in ob upoštevanju standardnih deviacij obeh vzorcev, lahko sklepamo, da so razlike v velikostih delcev minimalne in jih lahko zanemarimo.

4 1. 2. Nanosuspenzija fenofibrata in HPC

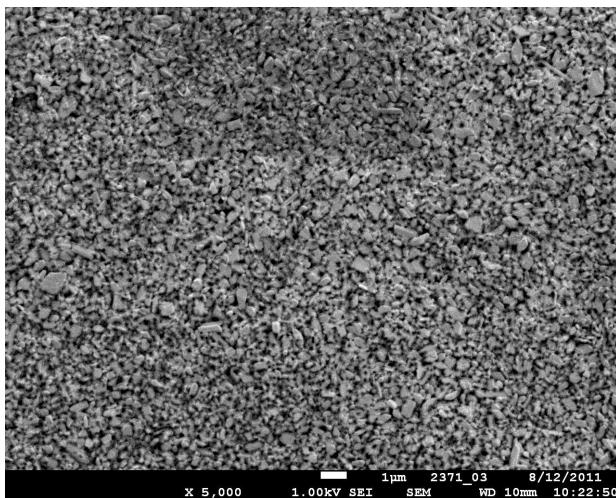
Nato smo pripravili suspenzije, kjer smo kot stabilizator uporabili HPC. Razmerje stabilizator, učinkovina je bilo 1 : 5,2. Rezultati pa so prikazani v preglednici V. Posneli smo tudi SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 8).

Preglednica V: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspensij fenofibrata in HPC za 12,5 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontakti (°C)	$8,8 \pm 2,0$	$24,7 \pm 4,5$	$45,1 \pm 0,4$
T začetna IR (°C)	$8,3 \pm 0,9$	$24,4 \pm 3,4$	$37,9 \pm 0,6$
T končna kontakti (°C)	$42,6 \pm 0,3$	$40,7 \pm 4,5$	$43,9 \pm 0,9$
T končna IR (°C)	$39,7 \pm 0,9$	$41,7 \pm 0,8$	$42,1 \pm 0,9$
Velikost delcev (nm)	$420,2 \pm 21,0$	$391,6 \pm 10,3$	$402,7 \pm 12,6$
PDI	$0,151 \pm 0,056$	$0,129 \pm 0,034$	$0,118 \pm 0,045$

Iz rezultatov vidimo, da začetna temperatura vzorca ne vpliva na velikost delcev, kar smo dokazali tudi z ANOVA testom ($P = 0,24$). Predhodno smo dokazali tudi enakost varianc ($F_{\text{eks}} = 4,7$, $F_{\text{krit}} = 10,8$) Tudi končna temperatura je pri vseh vzorcih približno enaka. HPC ima podobno kemijsko strukturo kot HPMC, zato iz tega lahko sklepamo, da se vzorci podobno obnašajo. Oba polimera delujeta kot sterična stabilizatorja. Del verige se adsorbira na delec, del pa štrli stran in predstavlja sterično oviro, ki preprečuje agregacijo delcev (36). Pri nanosuspenziji s HPC dobimo manjše delce z manjšim PDI, kot pri

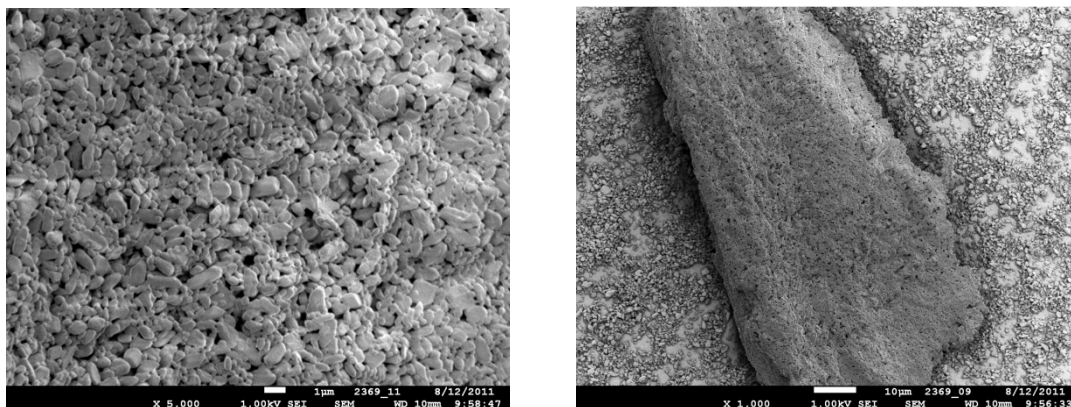
nanosuspenziji s HPMC, kar kaže na boljšo stabilizacijo delcev. Tudi iz SEM slike (slika 9) je razvidno, da so v tem primeru delci manjši, bolj enakomernih oblik in velikosti.



Slika 9: SEM slika nanosuspenzije fenofibrata in HPC mlete pri začetni sobni temperaturi

4 1. 3. Nanouspenzija fenofibrata in Kollidona

Na enak način kot prej smo pripravili še nanosuspenzije s fenofibratom in Kollidonom. V tem primeru je bil čas mletja le 30 min. Rezultati so zbrani v preglednici VI. Posneli smo tudi SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 10).



Slika 10: SEM slike nanosuspenzije fenofibrata in Kollidona mlete pri začetni sobni temperaturi. Leva slika prikazuje vzorec pri 5000kratni povečavi, desna pa pri 1000kratni. Na desni sliki je prikazan agregat.

Iz SEM slik je razvidno, da dobimo delce enakomernih oblik in velikosti. Prisotno pa je tudi nekaj agregatov, ki so nastali ali med mletjem učinkovine, ali v nanosuspenziji med shranjevanjem, ali pa med pripravo vzorca.

Preglednica VI: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij fenofibrata in Kollidona za 12,5 g suspenzije

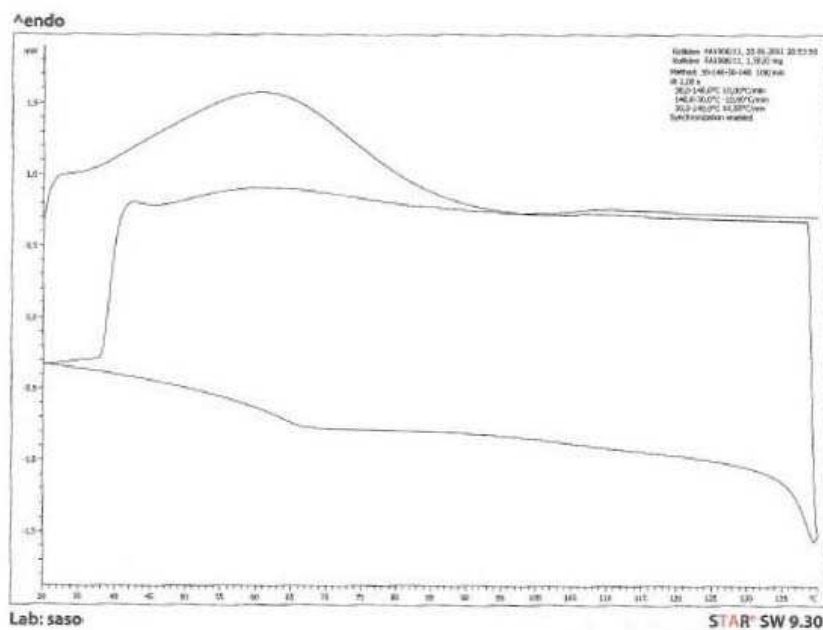
	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontakti (°C)	9,5 ± 0,4	25,2 ± 0,5	45,0 ± 0,4
T začetna IR (°C)	8,4 ± 0,9	24,4 ± 0,5	41,7 ± 0,6
T končna kontakti (°C)	30,4 ± 0,7	30,9 ± 4,4	35,4 ± 1,8
T končna IR (°C)	28,7 ± 0,4	31,0 ± 0,5	33,5 ± 1,8
Velikost delcev (nm)	583,7 ± 41,5	575,0 ± 14,5	988,4 ± 111,2
PDI	0,237 ± 0,028	0,232 ± 0,081	0,199 ± 0,119

Iz rezultatov je razvidno, da je končna temperatura pri vseh vzorcih približno enaka, kar pomeni, da je tudi 30 min mletja dovolj dolgo, da se izniči vpliv začetne temperature na končno temperaturo. Pri vzorcu, ki je bil pred mletjem segret na $45 \pm 2^\circ\text{C}$ opazimo večje delce kot pri ostalih dveh. Signifikantne razlike med velikostmi delcev nam pokaže tudi ANOVA test ($P = 2,40795\text{E-}8$). Vendar z ANOVA testom ne moremo ugotoviti, pri katerih temperaturah so prisotne razlike v velikosti, zato izvedemo še Scheffejev test. Rezultati tega testa so prikazani v preglednici VII, kjer je z 1 označena signifikantna razlika med velikostjo delcev pri različnih temperaturah. Oznaka 0 pa pomeni, da se velikost pri danih temperaturah statistično signifikantno ne razlikuje.

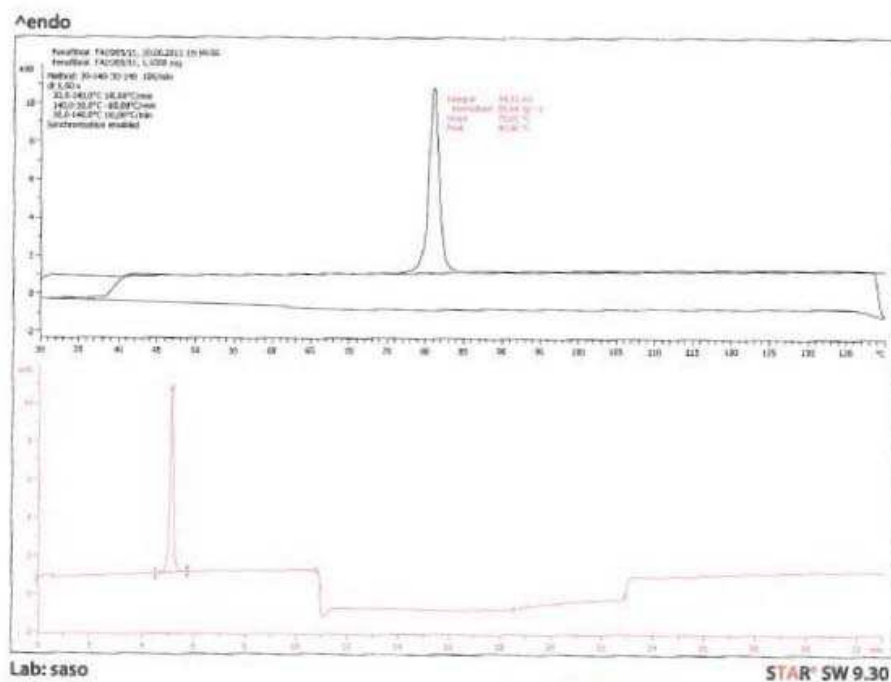
Preglednica VII: Scheffejev test za testiranje razlik med velikostmi delcev nanosuspenzije fenofibrata in Kollidona pri različnih začetnih temperaturah

	MeanDiff	F Value	Prob	Alpha	Sig
ohlajanje sobna T	8,68333	0,02374	0,97657	0,05	0
segrevanje sobna T	413,4	53,81305	1,43E-07	0,05	1
segrevanje ohlajanje	404,71667	51,57614	1,89E-07	0,05	1

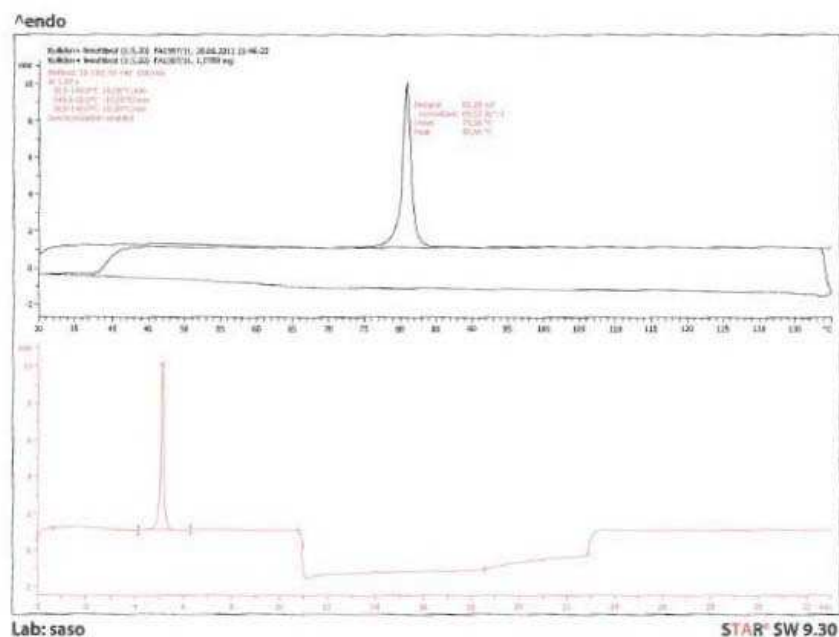
S Scheffejevim testom smo dokazali, da se velikost delcev pri vzorcu, ki smo ga predhodno segrevali statistično signifikantno razlikuje od ostalih dveh. Pri vzorcu, ki je bil pred mletjem segret na $45 \pm 2^\circ\text{C}$ opazimo večje delce kot pri ostalih dveh. Možno je, da je med mletjem prišlo do taljenja fenofibrata in s tem do zlepljanja delcev. Fenofibrat ima temperaturo tališča $79\text{--}82^\circ\text{C}$, med mletjem pa ne dosežemo tako visoke temperature, tako da lahko to možnost izključimo. Da preverimo kaj se je med segrevanjem zgodilo naredimo DSC vzorca (slike 11, 12 in 13). Naredili smo DSC Kollidona, fenofibrata in zmesi Kollidona in fenofibrata v enakem razmerju kot pri mletju.



Slika 11: DSC-krivulja Kollidona, segrevanje, ohlajanje, ponovno segrevanje



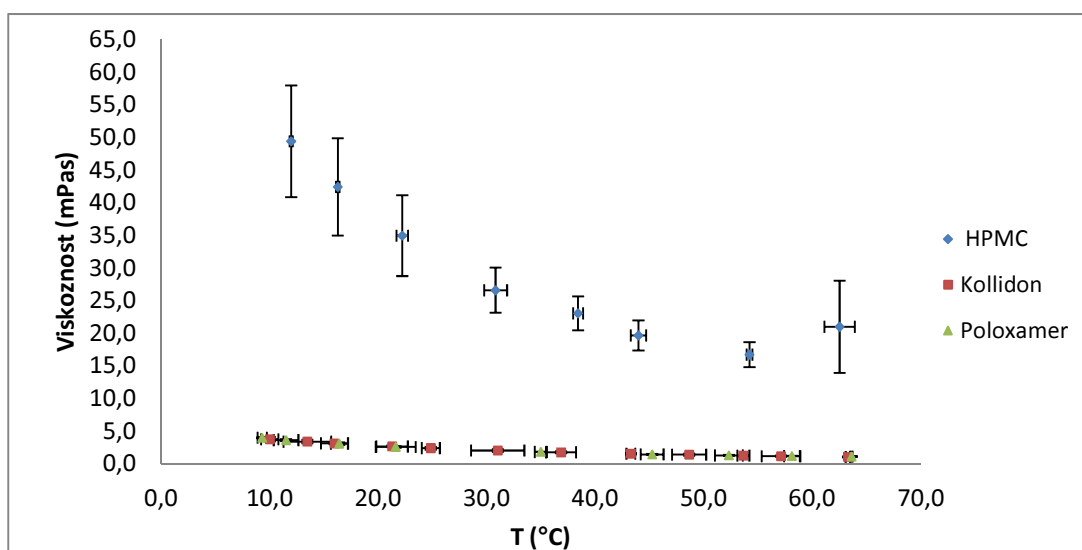
Slika 12: DSC-krivulja fenofibrata, segrevanje, ohlajanje, ponovno segrevanje



Slika 13: DSC-krivulja zmesi Kollidona in fenofibrata, segrevanje, ohlajanje, ponovno segrevanje

Iz DSC-krivulj vidimo, da med segrevanjem zmesi Kollidona in fenofibrata ne pride do sprememb. Temperatura tališča fenofibrata se ne spremeni. Zato lahko sklepamo, da povečana velikost delcev pri segretem vzorcu ni posledica interakcije med fenofibratom in Kollidonom pri povišani temperaturi.

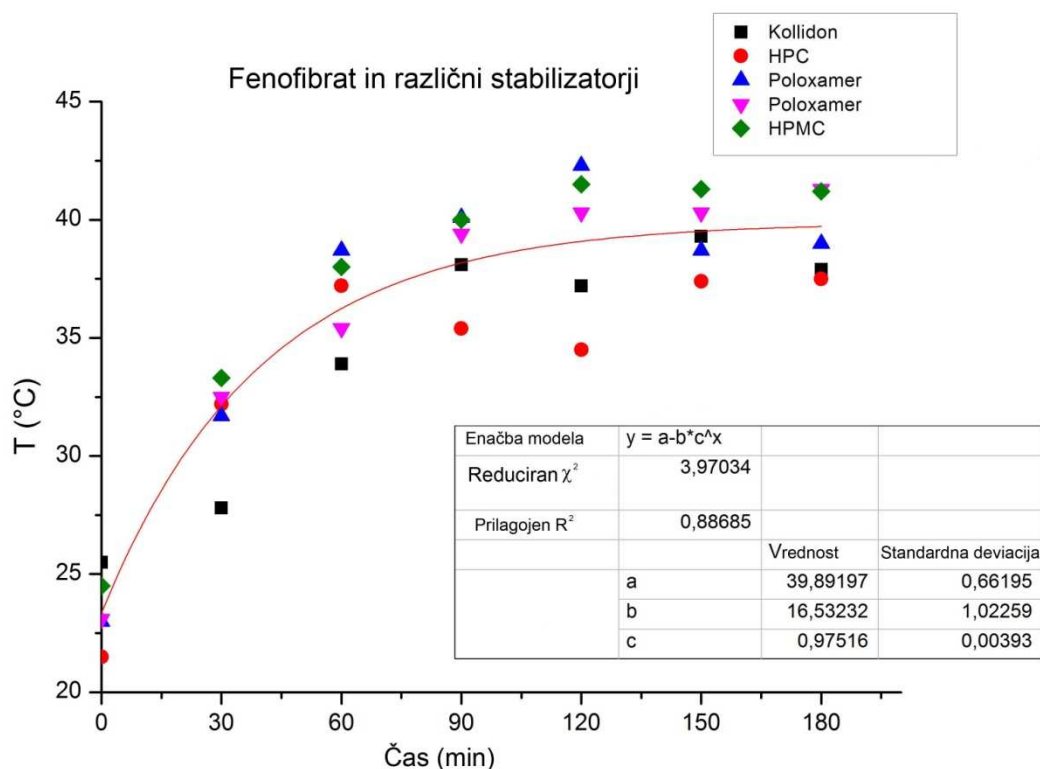
Po mletju je suspenzija postala na videz bolj viskozna, zato smo izmerili viskoznost raztopine Kollidona, v enaki koncentraciji kot smo jo uporabili pri mletju, pri naraščajoči temperaturi. Za primerjavo smo izmerili še viskoznosti HPMC in Poloxamera (slika 14).



Slika 14: Viskoznost raztopin stabilizatorjev v odvisnosti od temperature

Viskoznost se s povečanjem temperature zmanjšuje, kar je znano tudi iz literaturnih podatkov (16). Ker je sprememba viskoznosti v odvisnosti od temperature pri Kollidonu podobna kot pri Poloxameru in ker pri Poloxameru ne opazimo sprememb v velikosti delcev, lahko sklepamo, da v tem primeru viskoznost ni razlog za povečano velikost delcev. Po drugi strani pri HPMC lahko opazimo spremembo v viskoznosti v odvisnosti od temperature, ne opazimo pa spremembe velikosti delcev. Sklepamo lahko, da spremembe viskoznosti v merjenem območju nimajo večjega vpliva na končno velikost delcev.

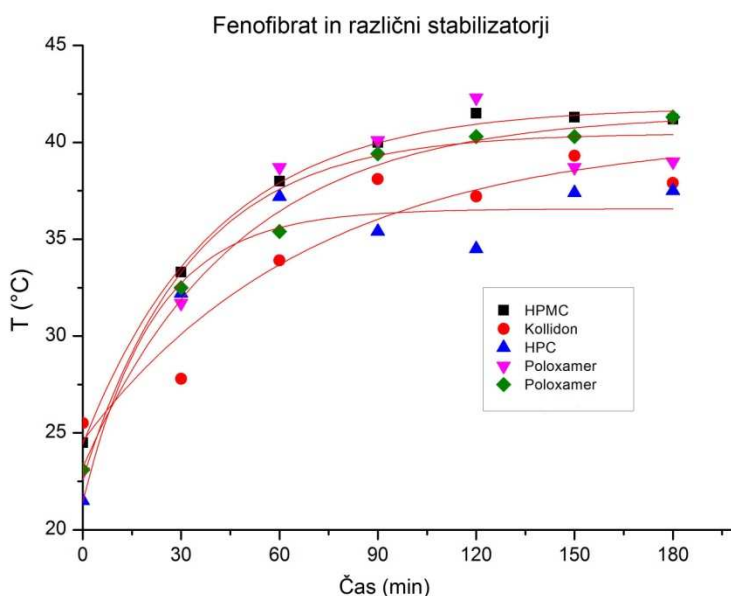
Pri tri urnem mletju vzorca pri začetni sobni temperaturi smo pri izbranih stabilizatorjih na vsake 30 min izmerili temperaturo v posodi. Opazili smo, da temperatura nekaj časa narašča nato pa se ustali (slika 15). Postavili smo model gibanja temperature v posodi med mletjem.



Slika 15: Temperatura v posodi med mletjem vzorca fenofibrata z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

Matematična enačba modela je: $y = a - b \cdot c^x$. Vrednosti koeficientov a, b, in c pa so prikazane v preglednici na sliki 15. Vrednost prilagojenega R^2 je 0,88685, kar je blizu 1, zato lahko rečemo, da je model dober. Vendar pa sam R^2 ni dovolj za oceno primernosti modela, zato moramo pogledati še vrednost reduciranega χ^2 . V našem primeru je ta

vrednost 3,97034, kar je več kot 1, to pa pomeni, da model ni dober. Iz obeh vrednosti teh koeficientov torej lahko sklepamo, da postavljeni model ni najboljši, je pa dovolj dober za grobo oceno. Boljši so modeli, ki jih postavimo za vsak stabilizator posebej (slika 16), kar je razvidno tudi iz vrednosti koeficientov prilagojenega R^2 reduciranega χ^2 , ki so prikazane v preglednici VIII. Vse vrednosti prilagojenega R^2 so blizu 1 kar pomeni, da so modeli dobri. Vrednosti reduciranega χ^2 pa se razlikujejo od 1. Izstopa drugi model za Poloxamer kjer sta vrednosti obeh koeficientov najbližje vrednosti 1, zato lahko rečemo, da je ta model najboljši. Pri prvem modelu za Poloxamer in pri modelu za Kollidon pa se vrednosti koeficientov najbolj razlikujejo od 1, zato nista najbolj primerna za opis dogajanja v sistemu.



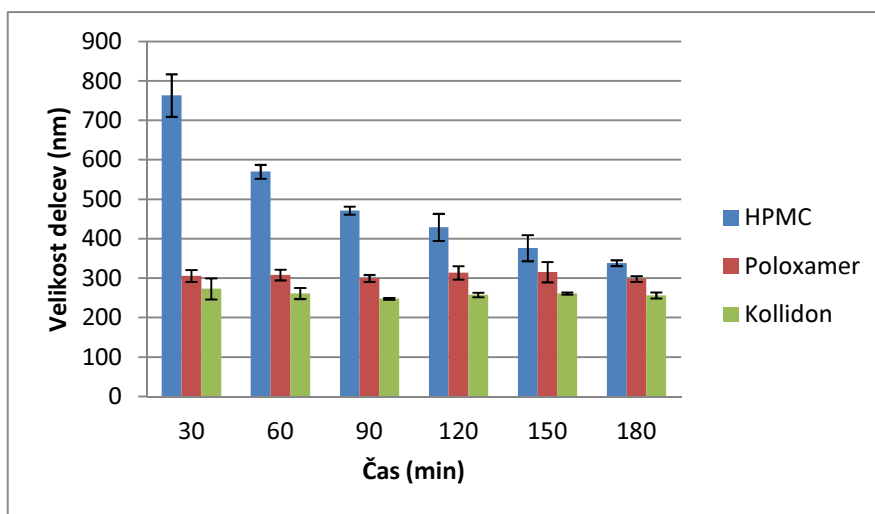
Slika 16: Temperatura v posodi med mletjem vzorca fenofibrata z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

Preglednica VIII: Parametri matematičnega modela $y = a - b * c^x$ za vsak stabilizator posebej

	a	b	c	Reduciran χ^2	Prilagojen R^2
HPMC	41,80961 ± 0,28801	17,39173 ± 0,44155	0,9754 ± 0,0016	0,14763	0,99625
Kollidon	40,41465 ± 2,69031	15,82087 ± 2,722	0,98585 ± 0,00646	3,20394	0,89358
HPC	36,56468 ± 0,79957	15,11808 ± 1,6978	0,95529 ± 0,01387	2,33183	0,92825
Poloxamer	40,47509 ± 1,21106	17,84401 ± 2,12954	0,97014 ± 0,00902	3,56848	0,91988
Poloxamer	41,47696 ± 0,62844	18,25521 ± 0,85481	0,97877 ± 0,0026	0,5206	0,98778

4 2.MLETJE EZETIMIBA

Na podlagi izkušenj pri mletju fenofibrata smo se odločili, da bomo pri mletju ezetimiba uporabili HPMC, Poloxamer in Kollidon kot stabilizatorje. Pripravili smo suspenzije izbranih stabilizatorjev in ezetimiba v razmerju 1 : 5 ter jih mleli tri ure. Na vsakih 30 min smo izmerili temperaturo v posodi in velikost delcev. Čas mletja posameznega vzorca za nadaljnje poskuse smo določili kot čas, ko se je velikost delcev zmanjšala na 200 do 350 nm. Suspenzije s HPMC moramo mleti tri ure, da dosežemo velikost delcev manjšo kot 350 nm pri suspenzijah s Kollidonom in Poloxamerom pa zadostuje že 30 min (slika 17).



Slika 17: Velikost delcev v odvisnosti od časa pri mletju ezetimiba z različnimi stabilizatorji

4 2. 1. Nanosuspenzija ezetimiba in HPMC

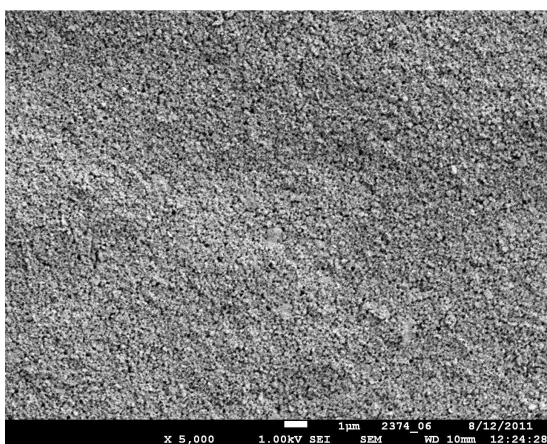
Pripravili smo suspenzije ezetimiba in HPMC. Mleli smo 25 g suspenzije, čas mletja pa je bil tri ure. Rezultati so prikazani v preglednici IX. Posneli smo tudi SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 16).

Preglednica IX: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspensij ezetimiba in HPMC pri mletju 25 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	7,0 ± 0,0	23,1 ± 0,6	45,3 ± 1,1
T začetna IR (°C)	6,8 ± 0,4	22,3 ± 0,5	39,6 ± 1,4
T končna kontaktni (°C)	42,9 ± 2,2	42,3 ± 0,8	42,1 ± 0,2
T končna IR (°C)	40,5 ± 2,1	40,1 ± 0,7	38,1 ± 2,0
Velikost delcev (nm)	339,9 ± 22,4	305,1 ± 20,6	322,7 ± 32,7
PDI	0,163 ± 0,017	0,144 ± 0,028	0,148 ± 0,023

Iz preglednice vidimo, da začetna temperatura nima vpliva na velikost delcev, delci so v vseh treh primerih približno enako veliki, kar smo dokazali tudi z ANOVA testom ($P = 0,10$). Dokazali smo tudi statistično nesignifikantnost razlike med variancami ($F_{\text{exp.}} = 2,5$, $F_{\text{krit.}} = 10,8$). Tudi PDI je približno enako velik. Delci so manjši kot pri nanosuspenziji fenofibrata in HPMC, čeprav smo uporabili enak stabilizator, enako količino kroglic in tudi čas mletja je bil enak. S tem smo potrdili literaturne podatke, da na velikost delcev vplivajo tudi lastnosti učinkovine. Tudi končna temperatura je v vseh treh primerih približno enaka.

Iz SEM slike (slika 18) je razvidno, da so delci približno enakih oblik in velikosti. Homogenost velikosti delcev je razvidna tudi iz nizkega PDI.



Slika 18: SEM slika nanosuspenzije ezetimiba in HPMC mlete pri začetni sobni temperaturi

Preverili smo tudi, če količina suspenzije vpliva na velikost delcev. V posodo za mletje smo natehtali polovico manj suspenzije (12,5 g), čas mletja in masa kroglic sta bila enaka kot prej (preglednica X).

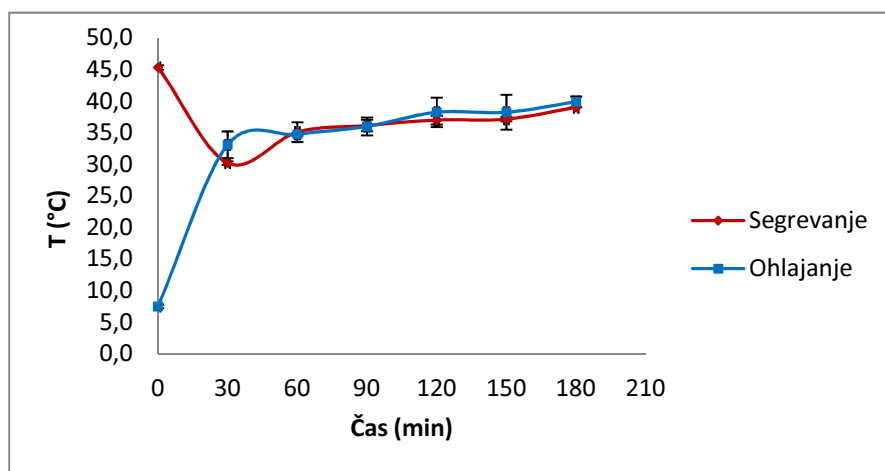
Preglednica X: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij ezetimiba in HPMC pri mletju 12,5 g suspenzije

T začetna kontaktni (°C)	22,6 ± 0,4
T začetna IR (°C)	22,1 ± 0,7
T končna kontaktni (°C)	39,3 ± 1,5
T končna IR (°C)	36,5 ± 0,9
Velikost delcev (nm)	344,7 ± 11,5
PDI	0,166 ± 0,026

Z dvostranskim t testom z enakima variancama smo dokazali, da napolnjenost posode statistično signifikantno vpliva na velikost delcev ($P = 0,002$). Predhodno smo dokazali še

enakost varianc z F testom ($P = 0,11$). V nadaljevanju smo eksperimente izvedli z manjšo napolnjenostjo posode. Kljub temu, da napolnjenost posode vpliva na velikost delcev, je ta vpliv majhen (delci so bili veliki $305,1 \pm 20,6$ oz. $344,7 \pm 11,5$ nm), kar nam še vedno omogoča delno primerjanje podatkov prodobljenih z različnimi napolnjenostmi posode.

Glede na to, da začetna temperatura pri testiranem vzorcu nima vpliva na velikost delcev, smo želeli preveriti še, kaj se zgodi, če vzorec tekom mletja ohlajamo oz. segrevamo. Vzorec smo mleli tri ure in na vsake pol ure posodo za mletje skupaj s suspenzijo in kroglicami segreli na 45°C , kot je bila začetna temperatura. Enako smo naredili tudi pri hladnem vzorcu le, da smo posodo za mletje na vsakih 30 min hladili s tekočim dušikom na 7°C . Preden smo posodo ohladili oz. segreli smo izmerili še temperaturo suspenzije (slika 19). Ugotovili smo, da se vsebina posode že po pol ure segreje oz. ohladi na temperaturo okoli 37°C , ki je bolj ali manj konstantna tekom celotnega mletja. Ohlajanje oz. segrevanje vzorca na vsakih 30 min tako ne pripomore k temu, da je temperatura v posodi približno enaka začetni temperaturi vzorca. Da bi to dosegli, bi morali uporabiti mlin z vgrajenim sistemom za vzdrževanje konstantne temperature.



Slika 19: Temperatura vzorca v posodi za mletje po 30 min mletja in po vsakokratnem predhodnem segrevanju na 45°C oz. ohlajanju na 7°C

Po končanem mletju smo izmerili tudi velikost delcev (preglednica XI). Vpliv vsakokratnega segrevanja oz. ohlajanja smo preverili z dvostranskim t testom za vzorca z neenakimi variancami. Z F testom smo ugotovili, da vzorca nimata enakih varianc ($P = 0,02$), zato smo uporabili dvostranski t test za vzorca z neenakima variancama. Kot ničelno hipotezo smo postavili, da se velikosti delcev pri omenjenih vzorcih ne razlikujejo, kot

alternativno pa, da se velikosti razlikujejo. Ugotovili smo, da se velikosti delcev pri teh dveh vzorcih statistično signifikantno ne razlikujejo ($P = 0,10$).

Preglednica XI: Povprečna velikost delcev pri vzorcu, ki smo ga ohlajali oz. segrevali na vsakih 30 min mletja

	Ohlajanje	Segrevanje
Velikost delcev (nm)	$366,9 \pm 28,9$	$343,6 \pm 4,8$
PDI	$0,183 \pm 0,056$	$0,130 \pm 0,039$

Niti vsakokratno segrevanje niti ohlajanje torej nimata vpliva na velikost delcev. V tem primeru je v posodi dejansko prihajalo do nihanja temperature. Vzorec smo najprej ohladili, nato se je mlel pol ure, temperatura v posodi je v tem času narastla, potem pa smo ga spet ohladili, temperatura je padla. To se je dogajalo tri ure, skozi celotno mletje. Analogno se je zgodilo tudi med segrevanjem. Taka nihanja v temperaturi torej nimajo vpliva na končno velikost delcev, kar smo potrdili tudi s t testom.

4 2. 2. Nanosuspenzija ezetimiba in Poloxamera

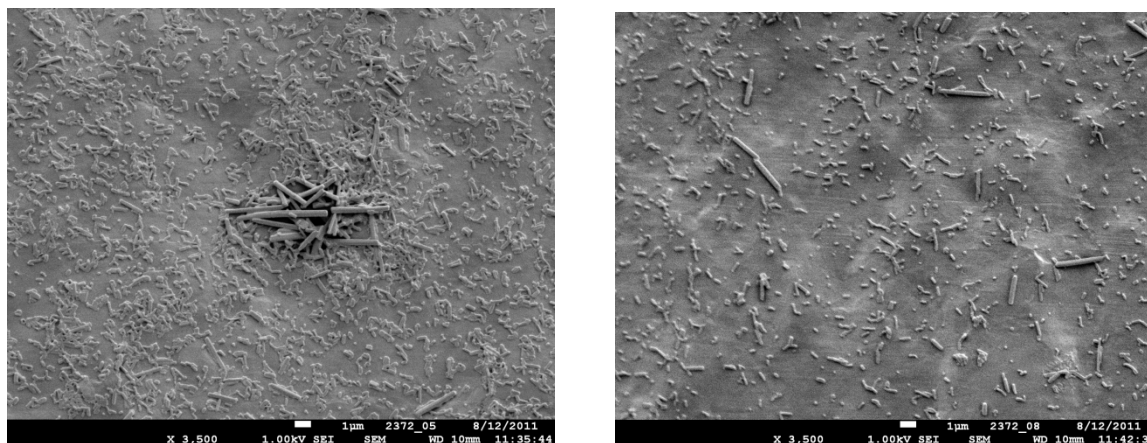
Na enak način kot prej smo pripravili še suspenzijo s Poloxamerom. Zaradi manjše porabe materiala in ker imajo drugi parametri večji vpliv na velikost delcev, kot napolnjenost posode, smo tokrat zmleli le 12,5 g suspenzije. Najprej smo naredili eno tri urno mletje pri začetni sobni temperaturi, kjer smo na vsake pol ure merili velikost delcev in temperaturo v posodi. Iz tega poskusa smo ugotovili, da za dosego ustrezne velikosti delcev zadostuje že 30 min mletje (preglednica XII).

Preglednica XII: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij ezetimiba in Poloxamera pri mletju 12,5 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	$7,9 \pm 0,6$	$22,6 \pm 0,4$	$44,5 \pm 0,4$
T začetna IR (°C)	$6,8 \pm 0,7$	$22,2 \pm 0,6$	$41,9 \pm 1,3$
T končna kontaktni (°C)	$40,5 \pm 0,1$	$38,2 \pm 0,6$	$42,05 \pm 2,8$
T končna IR (°C)	$37,3 \pm 1,1$	$38,3 \pm 2,2$	$40,8 \pm 0,8$
Velikost delcev (nm)	$302,9 \pm 10,8$	$306,1 \pm 15,1$	$303,8 \pm 7,8$
PDI	$0,199 \pm 0,033$	$0,222 \pm 0,030$	$0,240 \pm 0,033$

Iz preglednice XII je razvidno, da tudi v tem primeru začetna temperatura ne vpliva na velikost delcev, kar smo dokazali tudi z ANOVA testom ($P = 0,88$). Dokazali smo tudi statistično nesignifikantnost razlik med variancami ($F_{\text{eksp.}} = 3,7$, $F_{\text{krit}} = 10,8$).

Na SEM sliki (slika 18) pa opazimo drugačno obliko delcev, kot pri nanosuspenziji s HPMC. Delci so igličaste oblike in niso homogeni, med njimi opazimo nekaj večjih delcev, ki so povezani v skupke. To pomeni, da stabilizator vpliva tako na velikost kot tudi na obliko delcev. Možno pa je tudi, da je prišlo do prekristalizacije med shranjevanjem nanosuspenzije ali med pripravo vzorca za SEM.



Slika 20: SEM slike nanosuspenzije ezetimiba in Poloxamra mlete pri začetni sobni temperaturi

4 2. 3. Nanosuspenzija ezetimiba in Kollidona

Ugotovili smo, da za mletje ezetimiba s Kollidonom zadostuje že 30 min. Rezultati so prikazani v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij ezetimiba in Kollidona pri mletju 12,5 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	10,1 ± 1,2	22,8 ± 0,8	45,3 ± 0,1
T začetna IR (°C)	8,8 ± 0,7	22,2 ± 0,7	41,5 ± 1,1
T končna kontaktni (°C)	39,0 ± 0,1	39,7 ± 2,6	42,7 ± 0,4
T končna IR (°C)	36,1 ± 0,7	38,0 ± 1,3	39,0 ± 2,5
Velikost delcev (nm)	369,4 ± 35,7	299,0 ± 32,9	295,3 ± 18,0
PDI	0,296 ± 0,053	0,189 ± 0,075	0,175 ± 0,054

Z ANOVA testom smo pokazali, da so prisotne statistično signifikantne razlike med velikostmi delcev pri različnih temperaturah ($P = 3,122E-05$). Predhodno smo s Hartleyevim testom dokazali še enakost varianc ($F_{\text{eks}} = 4,0$, $F_{\text{krit}} = 18,7$).

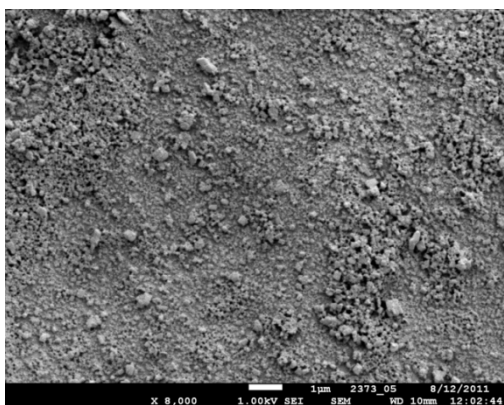
Z ANOVA testom smo ugotovili, da so prisotne razlike med velikostmi delcev, ne moremo pa ugotoviti, pri katerih temperaturah so prisotne razlike v velikosti, zato izvedemo še Scheffejev test. Rezultati tega testa so prikazani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Scheffejev test za testiranje razlik med velikostmi delcev nanosuspenzije ezetimiba in Kollidona pri različnih temperaturah

	MeanDiff	F Value	Prob	Alpha	Sig
ohlajanje sobna T	92,08333	19,93234	5,97E-05	0,05	1
segrevanje sobna T	17,93333	0,75599	0,48662	0,05	0
segrevanje ohlajanje	-74,15	12,92465	5,46E-04	0,05	1

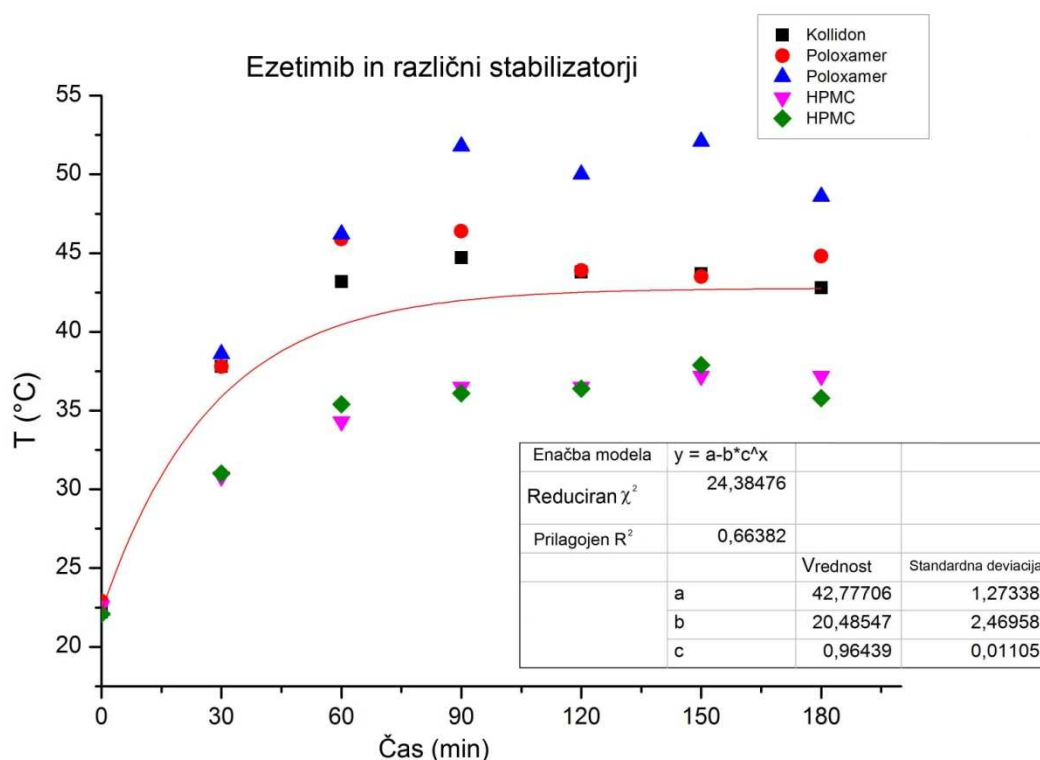
S Scheffejevim testom smo ugotovili, da se velikost delcev pri vzorcih iz hladilnika statistično signifikantno razlikuje od velikosti delcev pri ostalih dveh nivojih temperature. Največje razlike med velikostmi delcev so prisotne med velikostmi pri vzorcih iz hladilnika in pri vzorcih pri sobni temperaturi. Čeprav smo statistično dokazali vpliv temperature na velikost delcev, ta sprememba velikosti realno gledano ni tako pomembna, ker imajo drugi parametri (npr. čas mletja) večji vpliv na velikost delcev.

Posneli smo tudi SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 21) iz katerih je razvidno, da smo po mletju dobili delce enakomernih oblik. Med približno enako velikimi delci najdemo tudi nekaj večjih.



Sika 21: SEM slika nanosuspenzije ezetimiba in Kollidona mlete pri začetni sobni temperaturi

Tudi v tem primeru smo postavili model, ki prikazuje gibanje temperature v posodi med mletjem (slika 22). Izbrali smo enako enačbo modela, kot v prejšnjem primeru, koeficienti pa so prikazani v preglednici na sliki 20.

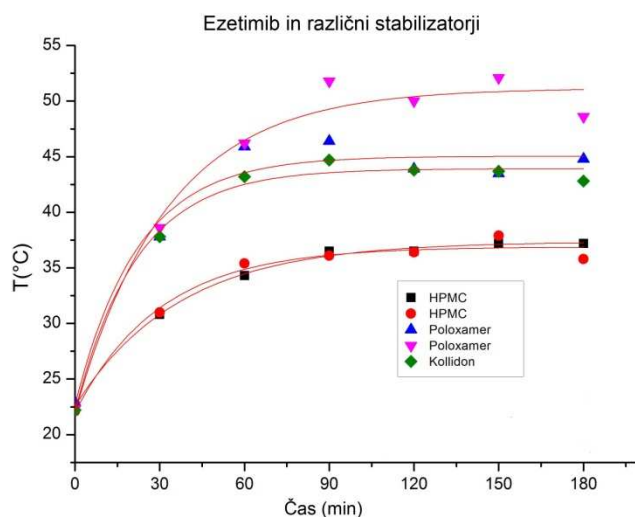


Slika 22: Temperatura v posodi med mletjem vzorca ezetimiba z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

Iz vrednosti R^2 in χ^2 (preglednica na sliki 22) vidimo, da izbrani model ne opisuje dovolj dobro gibanja temperature. Prilagojen R^2 je precej manjši od ena, reduciran χ^2 pa je precej večji od ena, kar pomeni da se izbrani model ne prilega podatkom dovolj dobro. Razlogi za to so lahko preveliko sipanje podatkov, zato smo postavili model za vsak stabilizator posebej (slika 23). V tem primeru se postavljeni modeli bolje prilagajajo podatkom, kar je razvidno iz vrednosti koeficientov R^2 in χ^2 v preglednici XV. Pri vseh modelih so vrednosti koeficientov prilagojenega R^2 približno enake in zelo blizu vrednosti 1, kar pomeni, da so modeli dobri. Vrednosti koeficientov χ^2 pa se precej razlikujejo, zato lahko oceno o ustreznosti modela podamo predvsem na osnovi vrednosti koeficientov χ^2 . Najboljši je model za Kollidon, saj je vrednost koeficienta χ^2 najbližje vrednosti 1 ($\chi^2 = 0,84774$). Najslabši pa je drugi model za Poloxamer, ker je vrednost koeficienta χ^2 najbolj oddaljena od ena ($\chi^2 = 3,72974$).

Preglednica XV: Parametri matematičnega modela $y = a - b * c^x$ za vsak stabilizator posebej

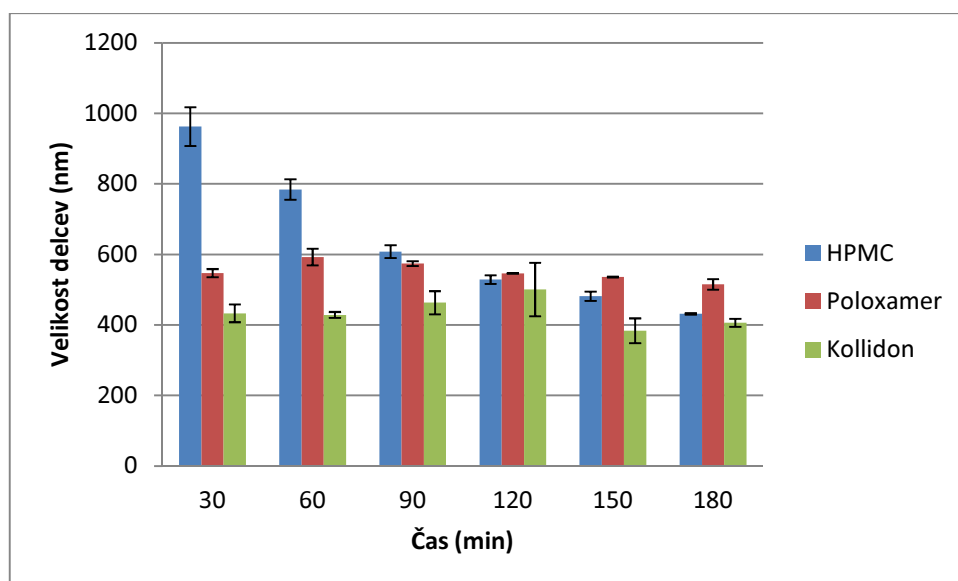
	a	b	c	Reduciran χ^2	Prilagojen R^2
HPMC	$37,36421 \pm 0,19133$	$14,77608 \pm 0,31241$	$0,97324 \pm 0,00144$	0,07545	0,99737
HPMC	$36,89752 \pm 0,51093$	$14,87148 \pm 0,94644$	$0,9674 \pm 0,00528$	0,71146	0,97624
Poloxamer	$45,05263 \pm 0,99198$	$22,34927 \pm 2,09547$	$0,956 \pm 0,01132$	3,54978	0,94925
Poloxamer	$51,15445 \pm 1,23342$	$29,10308 \pm 2,17637$	$0,96998 \pm 0,00569$	3,72974	0,96748
Kollidon	$43,92386 \pm 0,48279$	$21,80399 \pm 1,02378$	$0,95548 \pm 0,00576$	0,84774	0,98694



Slika 23: Temperatura v posodi med mletjem vzorca ezetimiba z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

4 3.MLETJE CELEKOKSIBA

Pripravili smo suspenzije celekosiba s HPMC, Poloxamerom in Kollidonom v razmerju 1 : 5. V posodo za mletje smo natehtali 12,5 g suspenzije, vzorce smo mleli tri ure. Na vsake 30 min smo izmerili temperaturo v posodi in velikost delcev. Ugotovili smo, da moramo suspenzijo s HPMC mleti tri ure za dosego želene velikosti delcev. Pri suspenzijah s Poloxamerom in Kollidonom pa zadostuje že 30 min (slika 24).



Slika 24: Velikost delcev v odvisnosti od časa pri mletju celekoksiba z različnimi stabilizatorji

4 3. 1. Nanouspenzija celekoksiba in HPMC

Čas mletja vzorcev je bil tri ure. Za vsak temperaturni nivo smo naredili dve mletji in izračunali povprečne vrednosti za temperaturo in velikost delcev (preglednica XVI).

Preglednica XVI: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij celekoksiba in HPMC pri mletju 12,5 g suspenzije

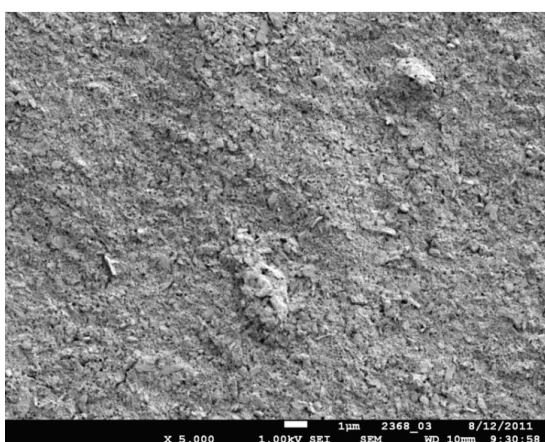
	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	10,2 ± 0,8	24,0 ± 2,3	45,4 ± 0,1
T začetna IR (°C)	8,8 ± 0,4	23,9 ± 1,6	39,7 ± 1,1
T končna kontaktni (°C)	46,2 ± 0,9	40,9 ± 2,7	41,9 ± 3,0
T končna IR (°C)	42,6 ± 1,4	38,6 ± 2,1	39,1 ± 2,6
Velikost delcev (nm)	365,7 ± 16,4	451,2 ± 24,9	450,7 ± 19,1
PDI	0,191 ± 0,029	0,222 ± 0,045	0,226 ± 0,022

Iz rezultatov je razvidno, da so delci pri vzorcu iz hladilnika malo manjši kot pri ostalih dveh. To smo preverili z ANOVA testom, ki je pokazal statistično signifikantne razlike med vzorci ($P = 2,32E-06$). Predhodno smo dokazali še enakost varianc ($F_{\text{eksp}} = 2,3$). Za ugotovitev, med katerimi nivoji temperature so prisotne razlike v velikosti delcev smo naredil še Scheffejev test. Rezultati so prikazani v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Scheffejev test za testiranje razlik med velikostmi delcev nanosuspezij celekoksiba in HPMC pri različnih temperaturah

	MeanDiff	F Value	Prob	Alpha	Sig
ohlajanje sobna T	-85,56667	26,25371	1,26E-05	0,05	1
segrevanje sobna T	-0,48333	8,38E-04	0,99916	0,05	0
segrevanje ohlajanje	85,08333	25,95795	1,35E-05	0,05	1

S Scheffejevim testom smo ugotovili, da se velikost delcev pri vzorcih iz hladilnika statistično signifikantno razlikuje od velikosti delcev pri ostalih dveh nivojih temperature. Posneli smo tudi SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 25) iz katerih je razvidno, da so delci enakomerno veliki in zlepljeni med sabo.



Slika 25: SEM slika nanosuspenzije celekoksiba in HPMC mlete pri začetni sobni temperaturi

4 3. 2. Nanospenzija celekoksiba in Poloxamera

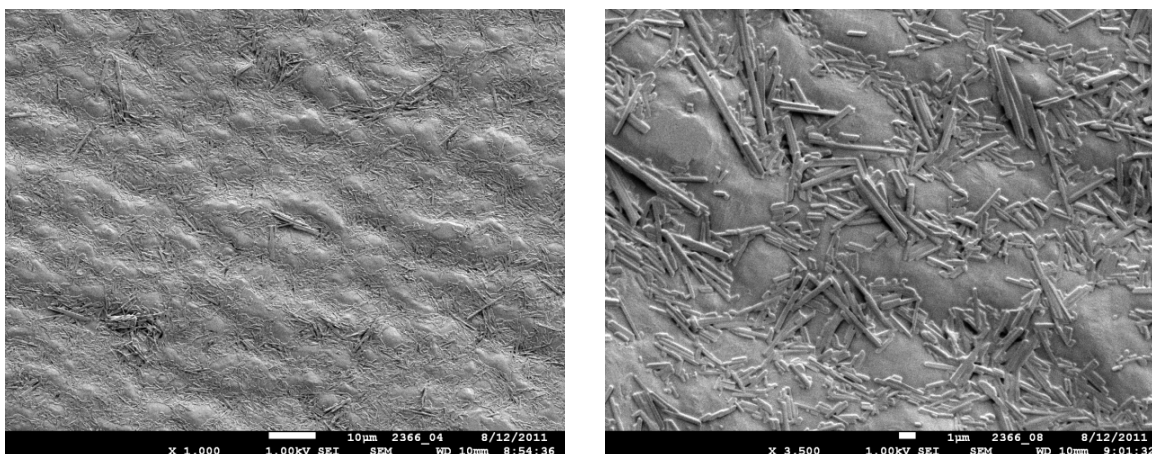
Nanosuspenzije smo pripravili na enak način kot prej, le da je bil v tem primeru čas mletja 30 min. Rezultati so prikazani v preglednici XVIII. Posneli smo še SEM slike za vzorec pri začetni sobni temperaturi (slika 26).

Preglednica XVIII: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij celekoksiba in Poloxamera pri mletju 12,5 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontakti (°C)	9,9 ± 1,3	26,3 ± 3,0	44,7 ± 0,0
T začetna IR (°C)	7,9 ± 0,7	25,5 ± 2,5	40,0 ± 3,6
T končna kontakti (°C)	43,0 ± 2,5	45 ± 2,8	44,0 ± 1,1
T končna IR (°C)	39,6 ± 1,8	41,4 ± 2,5	40,4 ± 1,0
Velikost delcev (nm)	587,5 ± 17,7	578,3 ± 35,4	601,3 ± 20,9
PDI	0,280 ± 0,020	0,262 ± 0,029	0,273 ± 0,017

Vpliv temperature na velikost delcev smo preverili z ANOVA testom, ki je pokazal, da se velikosti delcev pri različnih temperaturah statistično signifikantno ne razlikujejo ($P = 0,33$). Predhodno smo dokazali tudi enakost varianc ($F_{\text{eks}} = 4,00$, $F_{\text{krit}} = 10,8$).

Podobno kot pri ezetimibu in Poloxameru smo tudi v tem primeru dobili delce v obliki iglic. Sklepamo lahko, da tudi stabilizator (v tem primeru Poloxamer) vpliva na obliko delcev učinkovine v nanosuspenziji. Možno pa je tudi, da je prišlo do prekrystalizacije učinkovine med shranjevanjem nanosuspenzije ali med pripravo vzorca. Na SEM sliki opazimo poleg manjših tudi nekaj večjih delcev, ki so povezani v skupke. S SEM smo določili tudi velikost delcev, ki je bila precej večja kot pri PCS metodi ($2,221 \pm 1,582 \mu\text{m}$). Razlog za tako odstopanje velikosti lahko pripišemo razliki v samih metodah. SEM namreč zajame majhno število delcev, ki niso v reprezentativnem območju. Poleg tega pa je pri merjenju delcev v obliki iglic s SEM odvisno tudi, kako izmerimo delce, vzdolžno ali prečno, medtem ko PCS metoda obravnava delce kot popolne krogle.



Slika 26: SEM slike nanosuspenzije celekoksiba in Poloxamera, mlete pri začetni sobni temperaturi. Leva slika prikazuje vzorec pri 1000kratni povečavi, desna pa pri 3500kratni povečavi.

4 3. 3. Nanospenzija celekoksiba in Kollidona

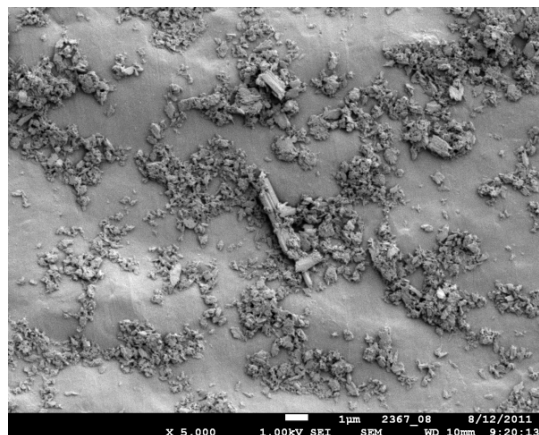
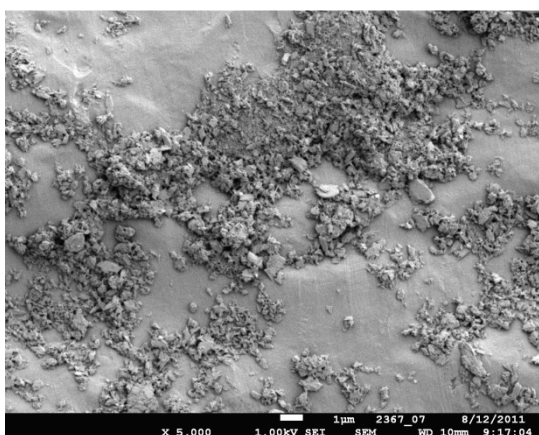
Vpliv temperature smo preverili še pri suspenziji s Kollidonom. Čas mletja je bil 30 minut. Rezultati so prikazani v preglednici XIX. Za vzorec pri začetni sobni temperaturi smo posneli tudi SEM slike (slika 27).

Preglednica XIX: Povprečna začetna in končna temperatura ter povprečna velikost delcev nanosuspenzij celekoksiba in Kollidona pri mletju 12,5 g suspenzije

	Ohlajanje	Sobna T	Segrevanje
T začetna kontaktni (°C)	8,5 ± 0,1	25,7 ± 0,4	45,3 ± 0,1
T začetna IR (°C)	8,5 ± 1,1	26,0 ± 0,6	40,0 ± 3,0
T končna kontaktni (°C)	36,0 ± 0,4	40,3 ± 1,3	39,0 ± 2,3
T končna IR (°C)	8,5 ± 1,1	26,0 ± 0,6	40,0 ± 3,0
Velikost delcev (nm)	451,3 ± 12,3	457,4 ± 32,6	427,2 ± 12,1
PDI	0,222 ± 0,035	0,219 ± 0,033	0,218 ± 0,033

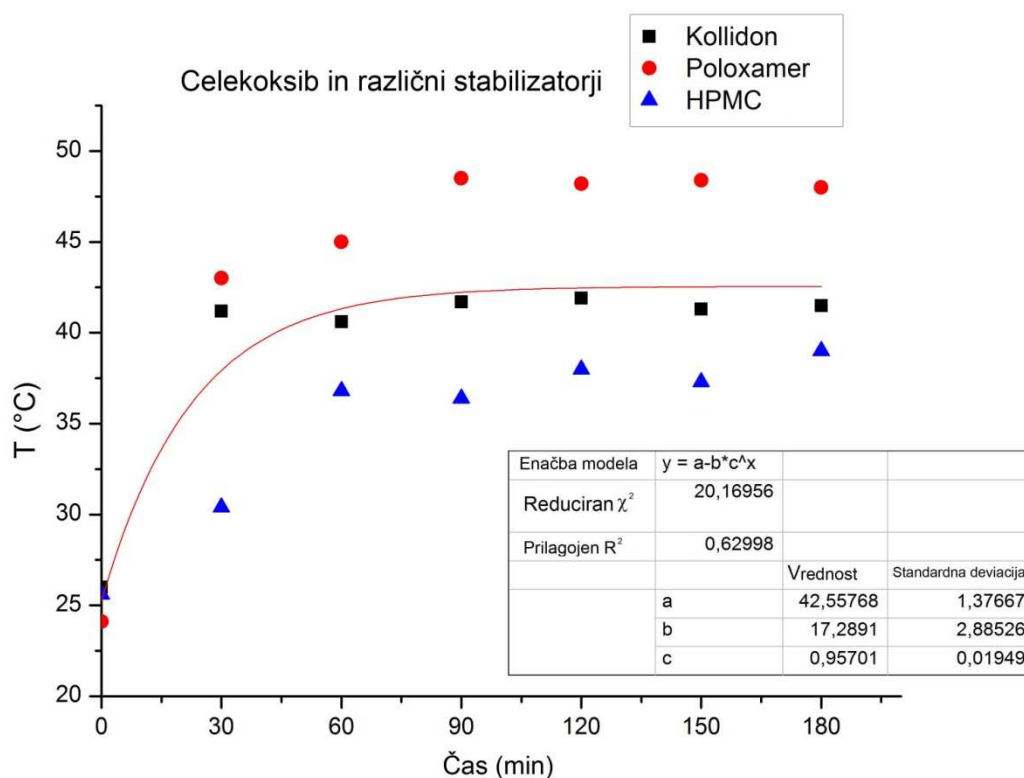
Z ANOVA testom smo dokazali, da razlike med velikostmi delcev pri različnih temperaturah niso statistično signifikantne ($P = 0,06$). Predhodno smo dokazali tudi statistično nesignifikantnost razlik med variancami ($F_{\text{eks}} = 7,3$, $F_{\text{krit}} = 10,8$).

Na SEM slikah opazimo, da so delci različnih oblik in velikosti, med okroglimi delci je tudi nekaj igličastih. S SEM smo določili tudi velikost delcev, ta je 647 ± 241 nm in se precej razlikuje od velikosti dobljene s PCS. Glavni razlog je razlika v samih metodah merjenja.



Slika 27: SEM slike nanosuspenzije celekoksiba in Kollidona mlete pri začetni sobni temperaturi. Obe sliki prikazujeta vzorec pri 5000kratni povečavi, na desni sliki opazimo igličast delec.

Postavili smo še model, ki prikazuje gibanje temperature v posodi med mletjem celekoksiba z izbranimi stabilizatorji (slika 28). Izbrali smo enako enačbo modela kot v prejšnjih dveh primerih, koeficienti enačbe modela pa so prikazani v preglednici na sliki 28.



Slika 28: Temperatura v posodi med mletjem vzorca celekoksiba z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

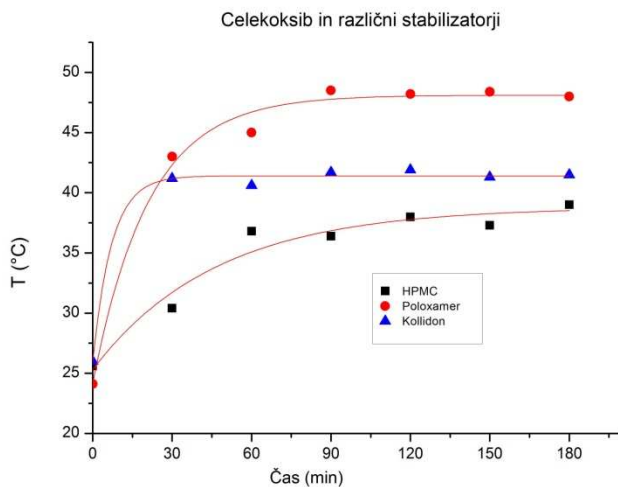
Izbrani model ne opisuje dovolj dobro temperature med mletjem, ker je vrednost prilagojenega R^2 precej manjša od ena, vrednost reduciranega χ^2 pa je precej višja od ena. Da bi dobili boljše ujemanje modela s podatki, bi le ti morali biti bolj enotni, zato smo postavili model še za vsak stabilizator posebej (slika 29). V tem primeru so vrednosti koeficientov R^2 in χ^2 bližje vrednosti 1, kar pomeni da je ujemanje modela s podatki boljše. Parametri teh modelov so prikazani v preglednici XX.

Preglednica XX: Parametri matematičnega modela $y = a - b \cdot c^x$ za vsak stabilizator posebej

	a	b	c	Reduciran χ^2	Prilagojen R^2
HPMC	$38,79641 \pm 1,0806$	$13,48994 \pm 1,4721$	$0,97874 \pm 0,00607$	1,54551	0,93591
Poloxamer	$48,11173 \pm 0,52176$	$23,93493 \pm 1,11909$	$0,95383 \pm 0,00605$	1,01444	0,98705
Kollidon	$41,40539 \pm 0,22444$	$15,40521 \pm 0,54696$	$0,86911 \pm 0,06934$	0,24882	0,99266

Iz preglednice je razvidno, da so vse vrednosti koeficientov R^2 približno enake in zelo blizu vrednosti 1, tako da so ob upoštevanju samo tega kriterija vsi modeli dobri. Vrednosti koeficientov χ^2 pa se razlikujejo. Izpostavimo lahko modela za Poloxamer in HPMC, ki

imata vrednosti χ^2 zelo blizu 1, tako da lahko rečemo da sta ta dva modela izmed vseh najbolj primerna za opis gibanja temperature v posodi med mletjem.



Slika 29: Temperatura v posodi med mletjem vzorca celekoksiba z različnimi stabilizatorji pri začetni sobni temperaturi

4.4. EKSPERIMENTALNI NAČRT ZA MLETJE CELEKOKSIBA

Za mletje suspenzije celekoksiba in Kollidona smo naredili eksperimentalni načrt. Pripravili smo suspenzije stabilizatorja in učinkovine v razmerju 1 : 5. V posodo za mletje smo natehtali 12,5 g suspenzije in ustrezno količino kroglic ter mleli 30 min pri različnih hitrostih mletja, spreminjali pa smo tudi začetno temperaturo. Tako smo preverili vpliv hitrosti vrtenja mlina, začetne temperature in mase kroglic na končno temperaturo, velikost delcev in PDI. Parametri mletja so prikazani v preglednici XXIV.

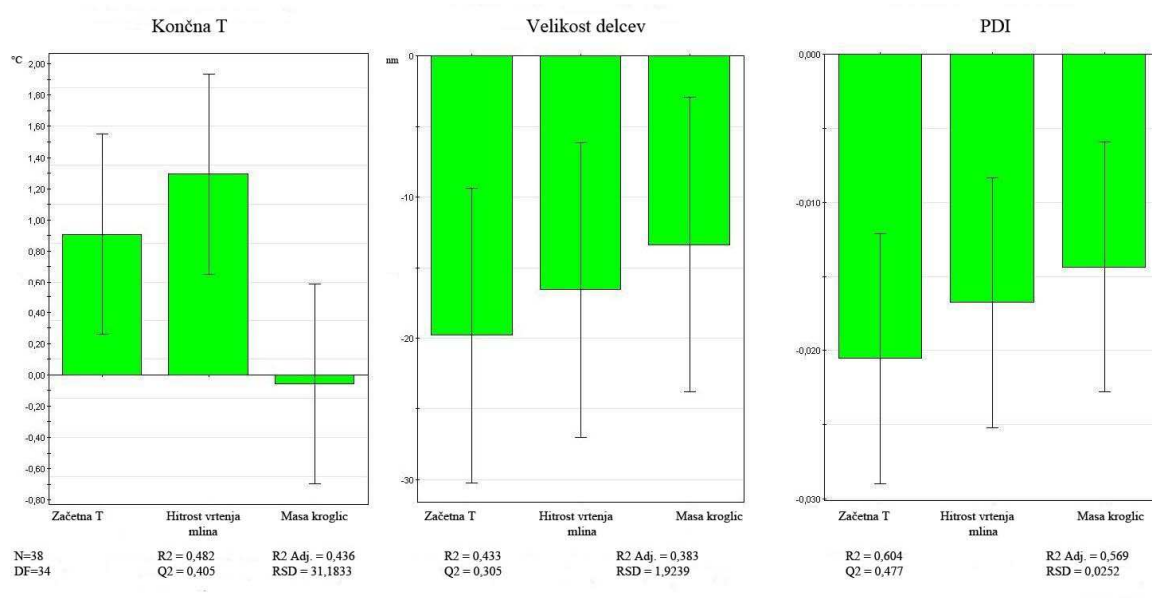
Preglednica XXIV: Parametri mletja celekoksiba s Kollidonom

Suspenzija	Vrstni red mletja	Začetna T (°C)	Obrati (rpm)	Masa kroglic (g)	Velikost delcev (nm)	Končna T (°C)	PDI
N1	6	8	450	75	554,3	33	0,365
N2	3	8	500	100	462,2	35	0,267
N3	7	8	550	125	413,3	37,5	0,189
N4	5	25	450	100	461,1	37,3	0,245
N5	8	25	500	125	413,4	36,2	0,174
N6	1	25	550	75	460,1	43,2	0,202
N7	10	45	450	125	400,8	33,5	0,175
N8	11	45	500	75	372,8	39	0,190
N9	2	45	550	100	442,9	43,6	0,184
N10	12	25	500	100	338,8	37,9	0,175
N11	4	25	500	100	440,9	38,2	0,203
N12	9	25	500	100	424,9	38	0,232
N13	13	25	500	100	432,9	41,2	0,197
N14	14	25	500	100	481,8	39,3	0,241
N15	15	8	500	100	447,2	36,3	0,201
N16	16	8	500	100	455,3	35,7	0,242
N17	17	45	500	100	423,8	40,6	0,225
N18	18	45	500	100	430,5	37,4	0,210
C19	20	8	450	125	469,9	38,3	0,221
C20	19	45	500	100	401,5	34,8	0,186
C21	21	8	450	75	486,8	32,5	0,257
C22	22	8	550	125	453,1	37,4	0,182
C23	23	45	450	125	430,5	36,1	0,237
C24	24	8	450	125	495,9	36	0,234
C25	25	8	550	75	447,3	37,2	0,222
C26	26	8	550	75	442,7	37,7	0,231
C27	27	45	450	75	466,0	36,8	0,236
C28	28	45	450	75	491,8	35,4	0,258
C29	29	45	550	75	423,9	41,2	0,182
C30	30	45	550	125	401,7	39,2	0,166
C31	31	45	550	125	413,3	38,2	0,171
C32	32	45	500	100	385,2	39,2	0,185
C33	37	8	450	75	515,4	35,4	0,253
C36	36	8	450	125	489,4	35,8	0,234
C37	35	45	550	75	434,2	37,5	0,192
C38	38	45	500	100	397,9	39,6	0,169

Z uporabo računalniškega programa MODDE smo postavili model. Vrednosti parametrov modela so prikazane z regresijskimi koeficienti in kažejo, kako izbrani parametri vplivajo na končno temperaturo, velikost delcev in PDI. Regresijski koeficienti

so prikazani v obliki stolpčnega diagrama (slika 30). Večji kot je stolpec, večji je vpliv določenega parametra. Nezanesljivost koeficientov je podana z intervali zaupanja, njihovo območje pa je odvisno od kvalitete eksperimentalnega načrta, ustreznosti modela in števila prostostnih stopenj. Velja, da boljši ko je model, več ko imamo poskusov in manjša je relativna standardna deviacija modela, ožji so intervali zaupanja. Na grafu so podani z navpičnimi omejenimi črtami.

Ustreznost modela preverimo s pokazatelji uporabnosti modela. Ti so ujemanje modela s podatki (R^2), napovedna moč modela (Q^2), veljavnost in ponovljivost modela. R^2 zavzema vrednosti od 0 do 1, kjer vrednost 1 pomeni zelo dobro ujemanje modela s podatki, vrednost 0 pa predstavlja nezmožnost postavitve modela. Vrednost R^2 je navidezno bližje 1, če v model vključimo več podatkov. Zato sam R^2 ni zadosten pokazatelj veljavnosti modela. Napovedna moč modela (Q^2) je zato veliko boljši pokazatelj uporabnosti modela. Ta je veliko bolj realna in uporabna, ker prikazuje cilj modeliranja, to je napoved novih eksperimentov. Q^2 zavzema vrednosti od 1 pa do minus neskončno, pri čemer višje vrednosti pomenijo boljši model. Da je model ustrezen, morata biti vrednosti R^2 in Q^2 čim bližje 1, razlika med njima pa ne sme biti večja od 0,2 do 0,3. Večja razlika kaže na neustreznost modela. Na splošno lahko rečemo, da je model dober, če je Q^2 večji od 0,5, če pa je večji od 0,9 pa lahko rečemo, da je model odličen (23).



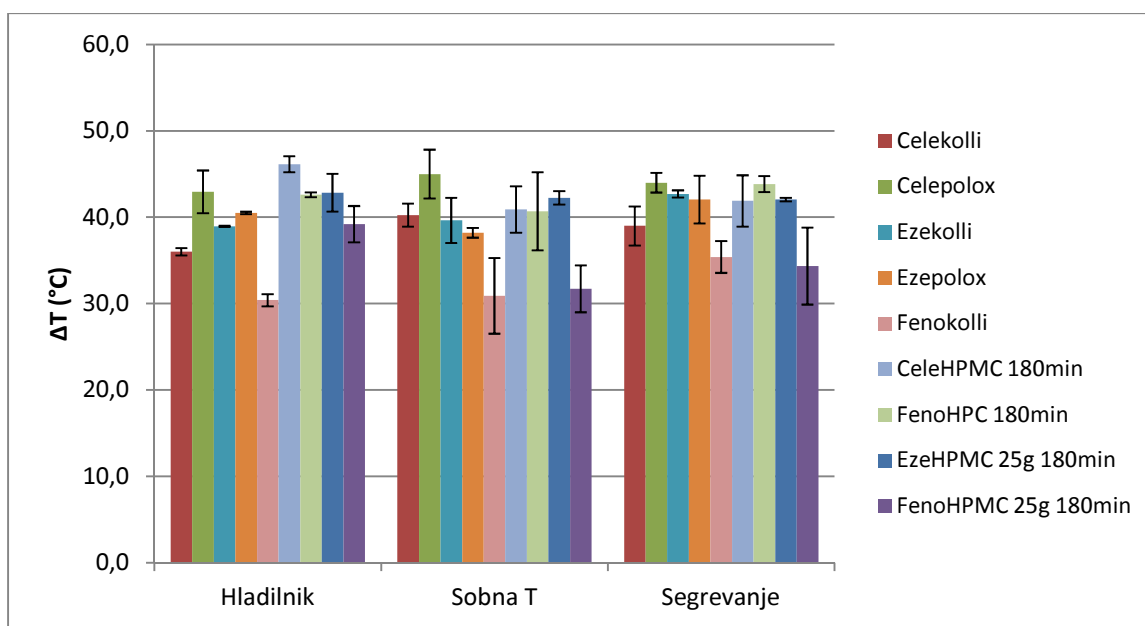
Slika 30: Vpliv parametrov mletja na velikost delcev, končno temperaturo in PDI

V našem primeru smo postavili tri modele, za končno temperaturo, velikost delcev, in za PDI. V vseh treh primerih so podani regresijski koeficienti s 95% intervalom zaupanja. Prvi model nam pokaže, da večja začetna temperatura in višja hitrost vrtenja mlina pomenita večjo končno temperaturo. Vpliv mase kroglic pa je statistično nesignifikanten, ker interval zaupanja vsebuje vrednost 0. V tem primeru je vrednost R^2 enaka 0,433, Q^2 pa je 0,305. Vrednost Q^2 je manjša od 0,5 kar pomeni, da model ni ustrezen, tudi razlika med Q^2 in R^2 je manjša kot 0,2. Iz drugega modela vidimo, da imata začetna temperatura in hitrost vrtenja mlina večji vpliv na velikost delcev kot masa kroglic. In sicer pri večji začetni temperaturi, večji hitrosti vrtenja mlina in večji masi kroglic dobimo manjše delce. Vendar ta model ni dovolj dober, da bi to z neko gotovostjo lahko trdili. Ujemanje modela s podatki ima vrednost 0,482, napovedna moč modela pa je 0,405. Q^2 je manj kot 0,5 zato ne moremo reči, da je model dober. Razlika med Q^2 in R^2 pa je 0,077 kar je precej manj kot 0,2, kar tudi kaže na neustreznost modela. Najboljši je tretji model, ki prikazuje vpliv začetne temperature, hitrosti vrtenja mlina in mase kroglic na PDI. Vrednost Q^2 je v tem primeru 0,477 kar je zelo blizu 0,5 in pomeni da je model dober. Razlika med Q^2 in R^2 je 0,127, kar je tudi boljše kot v prejšnjem primeru.

Glavni razlog, zakaj imajo modeli slabo napovedno moč, je majhna razlika v končni velikosti delcev in končni temperaturi. Vsi končni parametri so približno enaki v razponu. Razpon delcev je 338,8-554,3 nm, standardna deviacija iz sredinske točke je 38,5 nm, končna temperatura je v razponu 32,5-43,6°C, standardna deviacija iz sredinske točke je 2,4°C, PDI pa je v razponu 0,166-0,365, standardna deviacija iz sredinske točke je 0,039. Zato imajo vsi postavljeni modeli le majhen napovedni razpon, zunaj teh vrednosti pa niso zanesljivi. To potrjuje naše ugotovitve z navadnim pristopom, da začetna temperatura nima večjega vpliva na končno velikost delcev.

4 5.PREGLED MLETJA FENOFIBRATA, EZETIMIBA IN CELEKOKSIBA

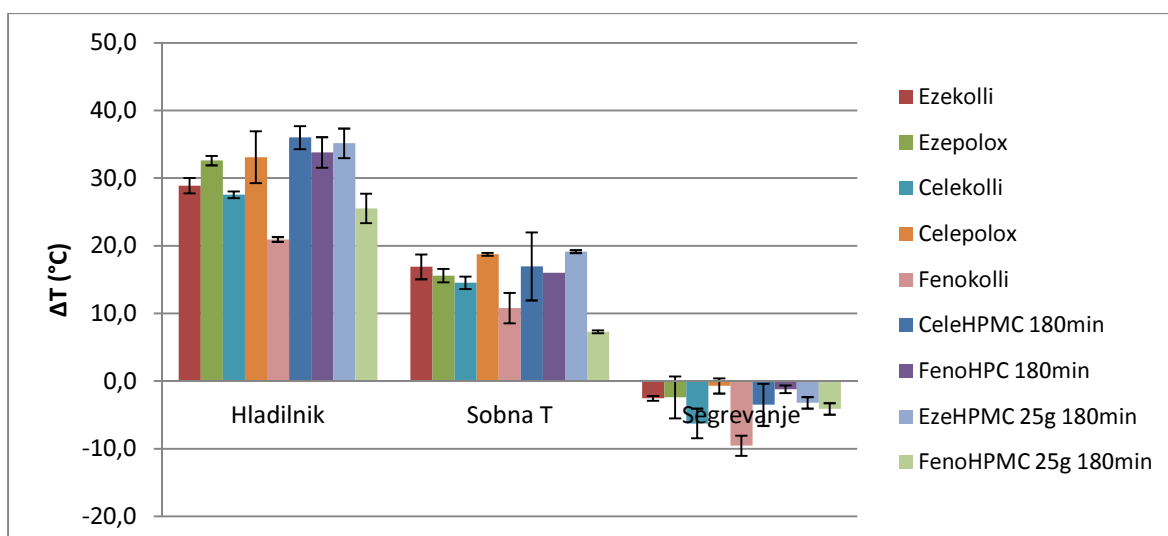
Na koncu smo zbrali podatke iz vseh mletij in pogledali še kolikšna je bila končna temperatura, tako pri triurnih kot pri 30 minutnih mletjih (slika 31). Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne deviacije.



Slika 31: Končna temperatura pri vseh mletjih učinkovin z izbranimi stabilizatorji

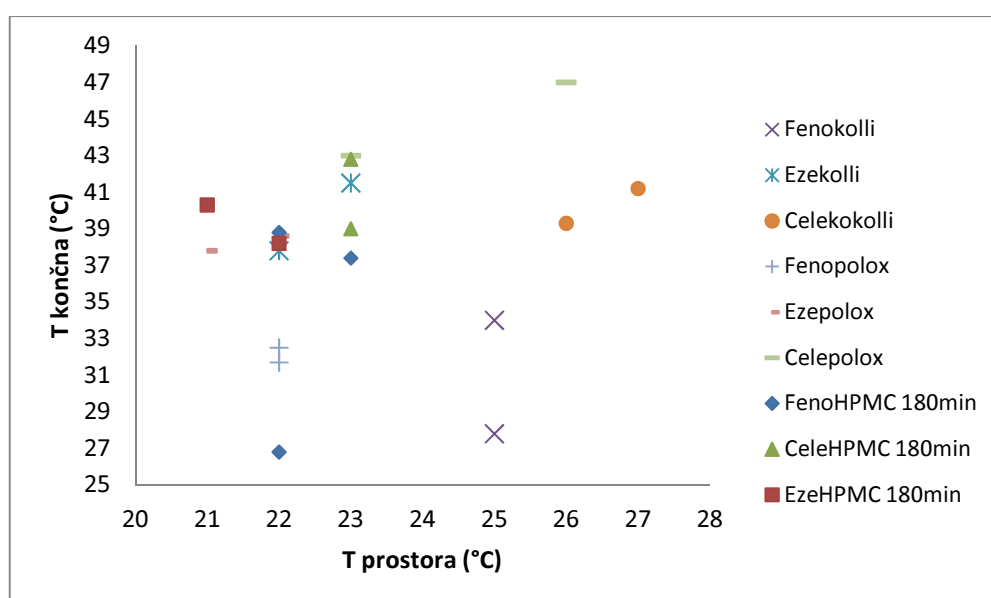
Morebitne razlike v končnih temperaturah smo preverili z ANOVA testom. Predhodno smo testirali še enakost varianc s Hartleyevim testom ($F = 2,95$, $F_{krit} = 2,00$). Kot ničelno hipotezo smo postavili, da med temperaturami niso prisotne razlike, kot alternativno pa, da so prisotne razlike med temperaturami. ANOVA test nam je pokazal, da med končnimi temperaturami ni statistično signifikantnih razlik ($P = 0,10$). Zaključimo lahko, da je bila končna temperatura v vseh primerih približno enaka in to ne glede na začetno temperaturo, čas mletja, količino suspenzije v posodi, izbrano učinkovino in stabilizator.

Za vse vzorce smo izračunali še spremembo temperature od začetka pa do konca mletja (slika 32). Pri vzorcih iz hladilnika opazimo največjo spremembo temperature. Pri njih je bila začetna temperatura najnižja, končna temperatura je bila pri vseh vzorcih približno enaka, zato je sprememba temperature pri vzorcih iz hladilnika največja. Najmanjšo spremembo temperature opazimo pri vzorcih, ki smo jih pred mletjem segrevali. Ti so imeli najvišjo začetno temperaturo, ki je bila blizu končni temperaturi.



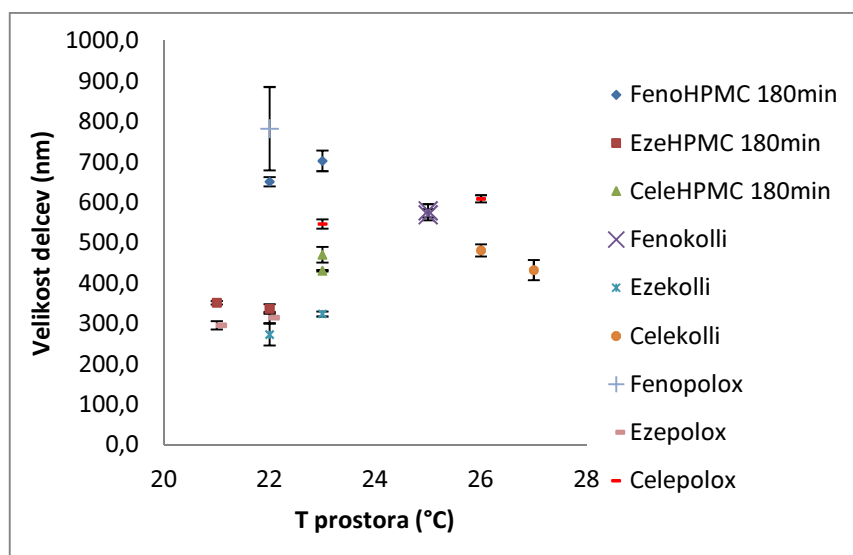
Slika 32: Sprememba temperature pri vseh mletjih učinkovin z izbranimi stabilizatorji

Preverili smo tudi vpliv zunanje temperature na končno temperaturo (slika 33). Pri izračunu smo uporabili samo rezultate meritev vzorcev, ki smo jih mleli pri začetni sobni temperaturi. Vidimo, da zunanja temperatura nima vpliva na končno temperaturo. Na sliki 33 ne opazimo nobenega trenda, ampak so točke enakomerno razporejene. Izračunali smo tudi Pearsonov korelacijski koeficient ($R = 0,098$), ki lahko zavzema vrednosti od -1 do 1. Vrednosti blizu 1 oz. -1 pomenijo korelacijo. V našem primeru Pearsonov korelacijski koeficient je manjši od ena, kar pomeni, da med zunanjo in končno temperaturo ni korelacije.



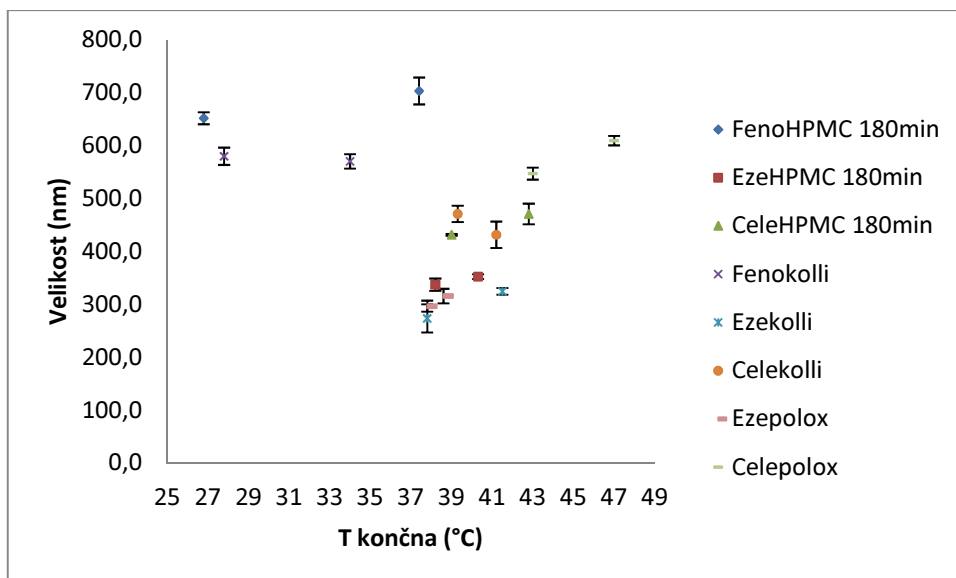
Slika 33: Vpliv zunanje temperature na končno temperaturo

Preverili smo tudi vpliv zunanje temperature na velikost delcev (slika 34). Korelacijski koeficient je precej manjši od 1 ($R = 0,088$), zato v tem primeru ni korelacije med temperaturo prostora in velikostjo delcev. V tem primeru je težko pričakovati korelacijo, ker imamo opravka z različnimi učinkovinami, ki imajo različne velikosti delcev.

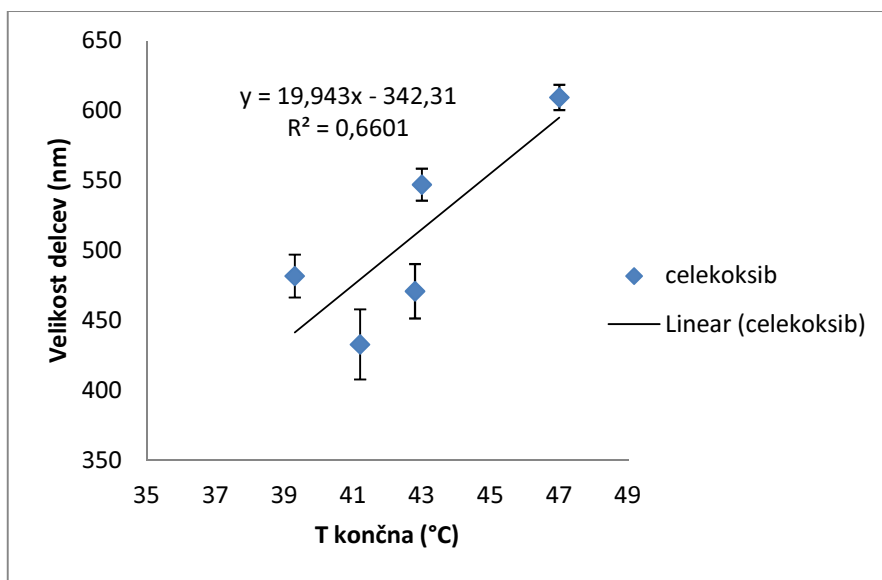


Slika 34: Vpliv zunanje temperature na velikost delcev

Preverili smo še vpliv končne temperature na velikost delcev (slika 35). Izračunali smo korelacijski koeficient ($R = -0,070$), ki nam pove, da ni korelacije med končno temperaturo in velikostjo delcev. Pri izračunu smo uporabili samo rezultate meritev vzorcev, ki so bili mleti pri začetni sobni temperaturi. Vpliv končne temperature na velikost delcev smo preverili še pri vsaki učinkovini posebej. Korelacija med končno temperaturo in velikostjo delcev je samo pri celekoksibu (slika 36) ($R = 0,812$), vendar je ta relativno majhna. Za potrditev korelacije bi morali narediti še kak poskus. Pri ostalih učinkovinah pa ni korelacije ($R_{\text{fenofibrat}} = 0,741$, $R_{\text{ezetimib}} = 0,583$). Vpliv končne temperature na velikost delcev smo preverili tudi za vsak stabilizator posebej. Med končno temperaturo in velikostjo delcev pri vsakem stabilizatorju posebej pa ni korelacije ($R_{\text{HPMC}} = -0,373$, $R_{\text{Poloxamer}} = 0,400$, $R_{\text{Kollidon}} = -0,685$).

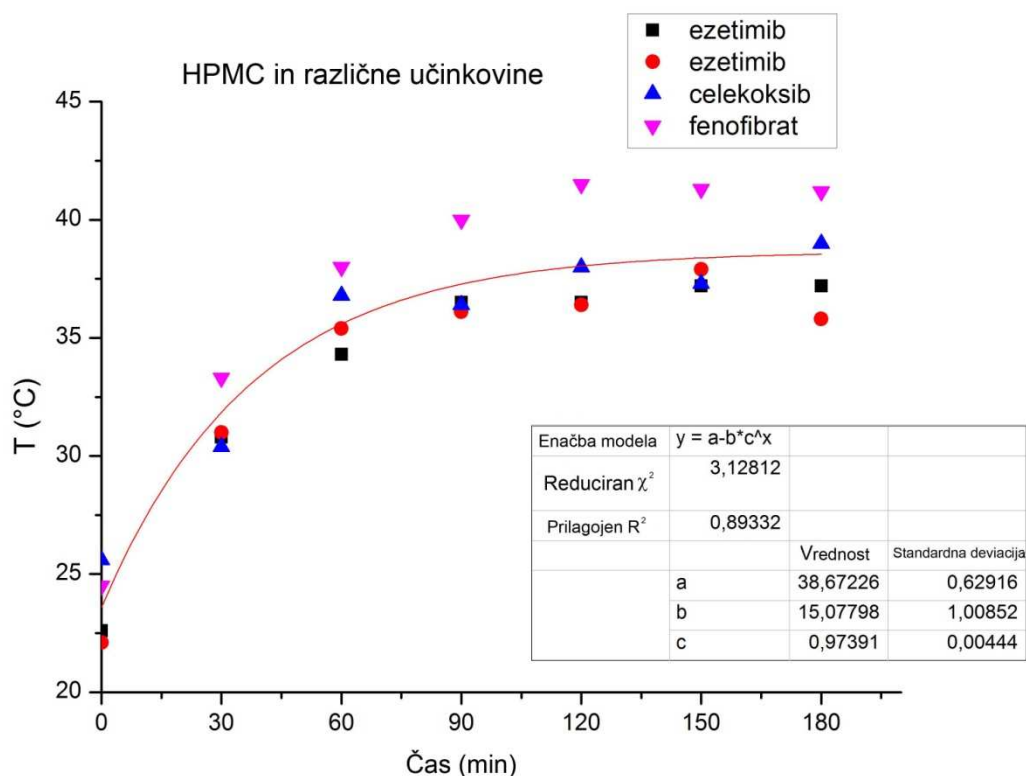


Slika 35: Vpliv končne temperature na velikost delcev



Slika 36: Vpliv končne temperature na velikost delcev pri mletju celekoksiba z različnimi stabilizatorji

Postavili smo tudi modele gibanja temperature v posodi med mletjem za stabilizatorje z različnimi učinkovinami. V vseh primerih smo kot modelno funkcijo izbrali eksponentno funkcijo z asimptoto. Matematična enačba modela je v vseh primerih enaka: $y = a - b * c^x$, koeficienti enačbe pa so prikazani v preglednicah na posamezni sliki (slike 37, 39 in 41).

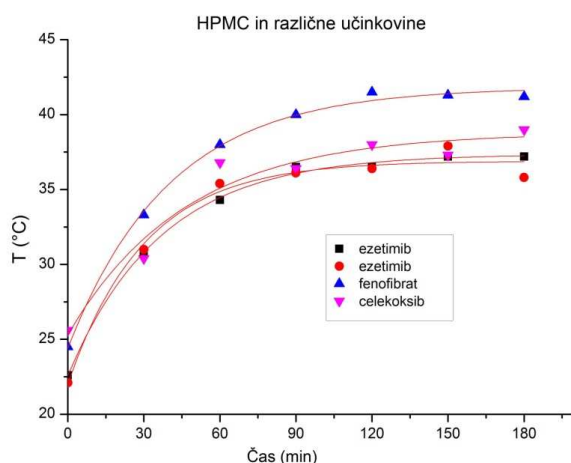


Slika 37: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s HPMC pri začetni sobni temperaturi

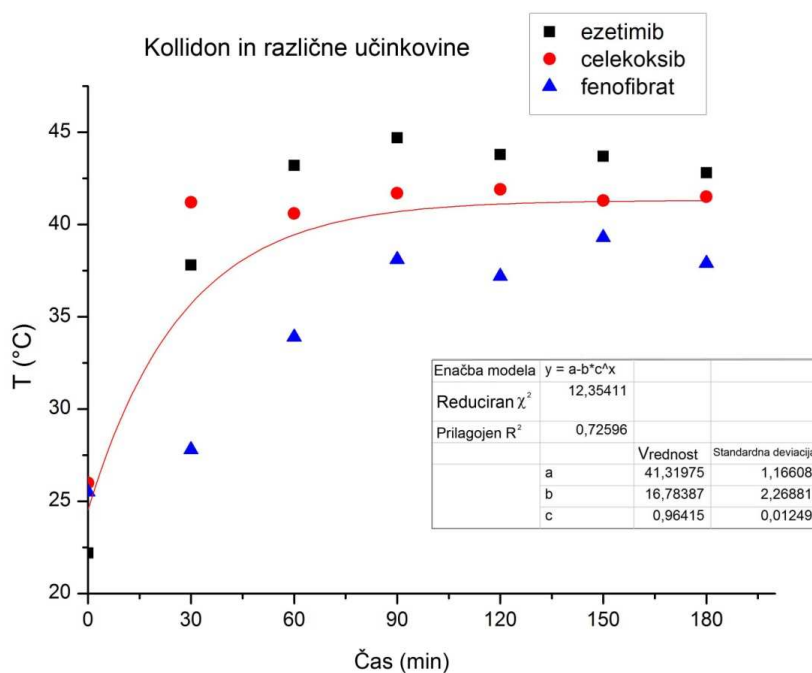
Vrednost prilagojenega R^2 je v tem primeru 0,89332 (slika 37), kar je približno enako 1 in pomeni, da je model dober. Vendar pa je vrednost reduciranega χ^2 3,12812, kar je več kot 1 in pomeni, da model vendarle ni tako dober. Na grafu opazimo tudi odstopanje vrednosti pri merjenju temperature pri suspenziji s fenofibratom. Zato postavimo model za vsako učinkovino posebej (slika 38), ki boljše opisuje gibanje temperature v posodi za mletje, kar je razvidno tudi iz vrednosti koeficientov prilagojenega R^2 in reduciranega χ^2 (preglednica XXI). Vse vrednosti R^2 so zelo blizu vrednosti 1, zato so s tega stališča vsi modeli dobri, vrednosti χ^2 pa so precej različne. Najboljši je drugi model za ezetimib, ker sta vrednosti obeh koeficientov najbližje 1. Omeniti velja, da so ti modeli isti kot modeli gibanja temperature v posodi med mletjem ene učinkovine z različnimi stabilizatorji, le da smo v tem primeru osredotočeni na stabilizator.

Preglednica XXI: Parametri matematičnega modela $y = a - b * c^x$ za vsak stabilizator posebej

	a	b	c	Reduciran χ^2	Prilagojen R^2
ezetimib	$37,36421 \pm 0,19133$	$14,77608 \pm 0,31241$	$0,97324 \pm 0,00144$	0,07545	0,99737
ezetimib	$36,89752 \pm 0,51093$	$14,87148 \pm 0,94644$	$0,9674 \pm 0,00528$	0,71146	0,97624
fenofibrat	$41,80961 \pm 0,28801$	$17,39173 \pm 0,44155$	$0,9754 \pm 0,0016$	0,14763	0,99625
celekoksib	$38,79641 \pm 1,0806$	$13,48994 \pm 1,4721$	$0,97874 \pm 0,00607$	1,54551	0,93591

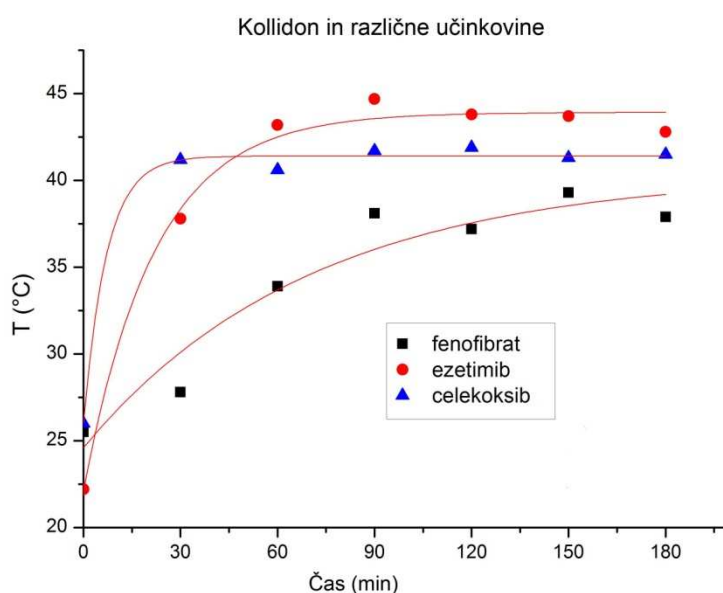


Slika 38: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s HPMC pri začetni sobni temperaturi



Slika 39: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s Kollidonom pri začetni sobni temperaturi

Iz vrednosti prilagojenega R^2 in reduciranega χ^2 na sliki 39, sklepamo, da tudi ta model ne opisuje dovolj dobro gibanja temperature v posodi med mletjem različnih učinkovin s Kollidonom. Obe vrednosti namreč nista niti približno enaki 1, vrednost prilagojenega R^2 je 0,72596, vrednost reduciranega χ^2 pa 12,35411. Tudi v tem primeru postavimo še model za vsako učinkovino posebej (slika 40), ki bolje opisuje gibanje temperature v posodi med mletjem različnih učinkovin s Kollidonom. Vrednosti prilagojenega R^2 in reduciranega χ^2 so prikazane v preglednici XXII. Iz preglednice je razvidno, da je najboljši model za ezetimib, ker sta vrednosti obeh koeficientov najbližje vrednosti ena. Model za fenofibrat pa je najslabši, ker se vrednosti obeh koeficientov najbolj razlikujeta od 1.

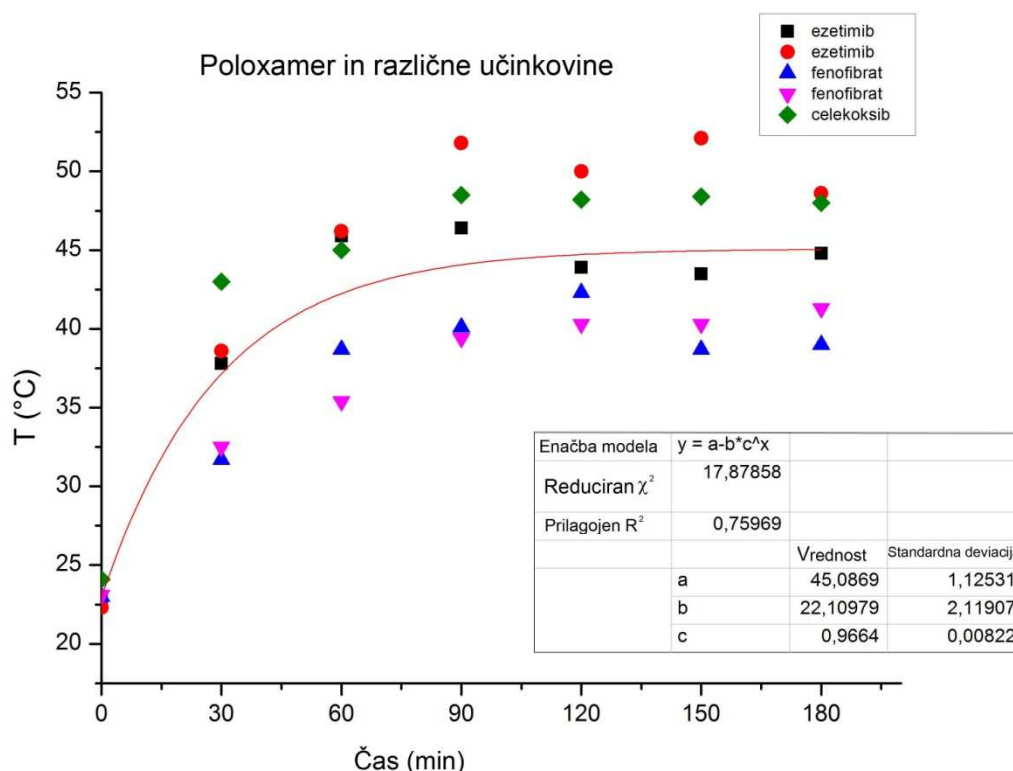


Slika 40: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s Kollidonom pri začetni sobni temperaturi

Preglednica XXII: Parametri matematičnega modela $y = a - b * c^x$ za vsak stabilizator posebej

	a	b	c	Reduciran χ^2	Prilagojen R^2
fenofibrat	$40,41465 \pm 2,69031$	$15,82087 \pm 2,722$	$0,98585 \pm 0,00646$	3,20394	0,89358
ezetimib	$43,92386 \pm 0,48279$	$21,80399 \pm 1,02378$	$0,95548 \pm 0,00576$	0,84774	0,98694
celekoksib	$41,40539 \pm 0,22444$	$15,40521 \pm 0,54696$	$0,86911 \pm 0,06934$	0,24882	0,99266

Postavili smo še model za gibanje temperature v posodi za Poloxamer in različne učinkovine (slika 41).

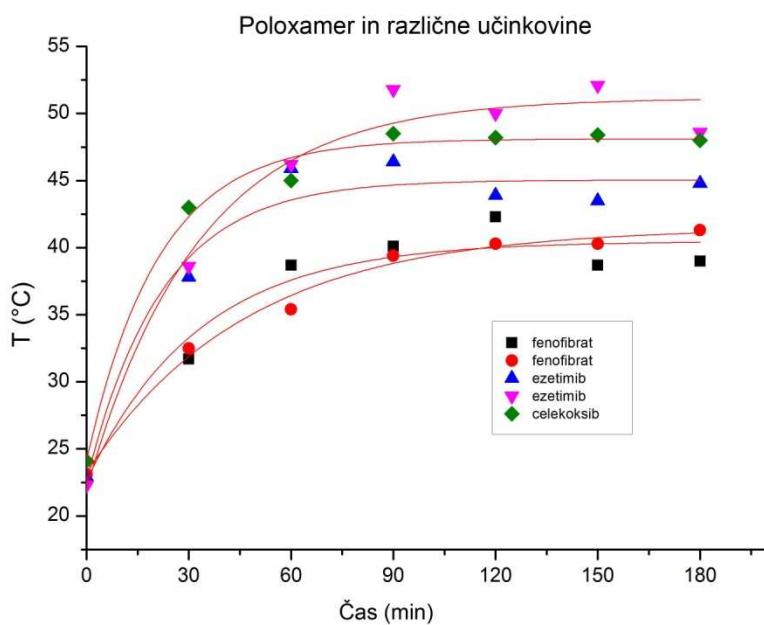


Slika 41: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s Poloxamerom pri začetni sobni temperaturi

Tudi v tem primeru smo dobili relativno slab model, ker vrednosti prilagojenega R^2 in reduciranega χ^2 nista približno enaki 1. Vrednost prilagojenega R^2 je 0,75969, vrednost reduciranega χ^2 pa 17,87858. Postavili smo še model za vsako učinkovino posebej (slika 42), ki je veliko boljši kar je razvidno tudi iz vrednosti koeficientov R^2 in χ^2 (preglednica XXIII), ki sta bližje vrednosti 1. Vse vrednosti koeficientov R^2 so zelo blizu 1, tako da so ob upoštevanju samo tega kriterija vsi modeli dobri. Vrednosti reduciranega χ^2 pa se med seboj precej razlikujejo. Najboljši je model za celekosib, modela za ezetimib in prvi model za fenofibrat pa niso ustrezni zaradi previsokih vrednosti χ^2 .

Preglednica XXIII: Parametri matematičnega modela $y = a - b * c^x$ za vsak stabilizator posebej

	a	b	c	reduciranega χ^2	prilagojenega R^2
fenofibrat	$40,47509 \pm 1,21106$	$17,84401 \pm 2,12954$	$0,97014 \pm 0,00902$	3,56848	0,91988
fenofibrat	$41,47696 \pm 0,62844$	$18,25521 \pm 0,85481$	$0,97877 \pm 0,0026$	0,5206	0,98778
ezetimib	$45,05263 \pm 0,99198$	$22,34927 \pm 2,09547$	$0,956 \pm 0,01132$	3,54978	0,94925
ezetimib	$51,15445 \pm 1,23342$	$29,10308 \pm 2,17637$	$0,96998 \pm 0,00569$	3,72974	0,96748
celekoksib	$48,11173 \pm 0,52176$	$23,93493 \pm 1,1909$	$0,95383 \pm 0,00605$	1,01444	0,98705



Slika 42: Temperatura v posodi med mletjem različnih učinkovin s Poloxamerom pri začetni sobni temperaturi

5 SKLEP

Nanosuspenzije smo pripravili z mokrim mletjem v planetarnem krogljčnem mlinu. Ugotovili smo, da je potreben čas mletja za doseg delcev nanometrskih velikosti pri suspenzijah s HPMC in HPC tri ure, pri Poloxameru in Kollidonu pa zadostuje že 30 min. Iz SEM slik smo ugotovili, da stabilizator vpliva tako na velikost kot tudi na obliko delcev. Pri suspenzijah Poloxamera in celekoksiba ter Poloxamera in ezetimiba opazimo igličaste delce. Dokazali smo, da začetna temperatura nima velikega vpliva na velikost delcev, čeprav so opazne manjše razlike. Največji vpliv začetne temperature na velikost delcev smo opazili samo pri suspenziji fenofibrata in Kollidona, kjer smo pri povišani začetni temperaturi dobili večje delce. Vendar pa z nadaljnjimi raziskavami nismo našli vzroka za ta pojav. V prihodnosti bi lahko naredili še kak poskus, da bi ugotovili zakaj v tem primeru pride do tako velikega povečanja delcev.

Na primeru suspenzije ezetimiba in HPMC smo ugotovili, da tudi vsakokratno segrevanje oz. ohlajanje vzorca med mletjem nima vpliva na velikost delcev. Tudi končna temperatura je pri vseh vzorcih približno enaka. Na njo pa ne vplivata niti temperatura prostora, niti čas mletja.

Iz postavljenih modelov za gibanje temperature v posodi vidimo, da temperatura nekaj časa narašča nato pa se ustali. Vendar pa ti modeli niso najboljši, predvsem zaradi slabe ponovljivosti meritev.

Tudi z mletjem po eksperimentalnem načrtu in po postavitvi modela na primeru celekoksiba in Kollidona, ne moremo potrditi velikega vpliva začetne temperature na velikost delcev. V tem primeru nam model pokaže, da ima začetna temperatura vpliv na velikost delcev, vendar sta napovedna moč modela in ujemanje modela s podatki preslaba, da bo to lahko zagotovo trdili, hkrati pa je interval velikosti delcev, kjer velja model relativno ozek.

6 LITERATURA

1. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J: Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today* 2011; 16 (7/8): 354-360.
2. Sharma A, Jain CP: Techniques to enhance of poorly soluble drugs: a review. *Journal of Global Pharma Technology* 2010; 2 (2): 18-28.
3. Saje V, Kristl J: Nanosuspenzije kot obetaven pristop za oblikovanje težko topnih zdravilnih učinkovin. *Farmacevtski Vestnik* 2001; 52: 145-152.
4. Parasanna L, Giddam Ashwini K: Nano-suspension Technology: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2010; 2: 35-40.
5. Müller RH, Jacobs C, Kayser O: Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47: 3-19.
6. Neeti R, Murugesan Senthil K, Nanjaian M: Solubility: Particle Size Reduction is a Promising Approach to Improve the Bioavailability of Lipophilic Drugs. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research* 2011; 1: 8-18.
7. Chingunpituk J: Nanosuspension Technology for Drug Delivery. *Walailak Journal Sci and Tech* 2007; 4 (2): 139-153.
8. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER: Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 18: 113-120.
9. Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, skripta za vaje URL: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko__IF_/Vaje/Topnost_hitrost_raztapljanja.pdf (dostop: avgust 2010)
10. Revichandran R: Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems. *Nanobiotechnol* 2009; 5: 17-33.
11. Peltonen L, Hirvonen J: Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 62: 1569-1579.
12. Mochalin VN, Sagar A, Gour S, Gogotsi Y: Manufacturing Nanosized Fenofibrate by Salt Assisted Milling. *Pharmaceutical Research* 2009; 26 (6): 1365-1370.

13. Junya K, Fumio S: Correlation of powder characteristics of talc during Planetary Ball Milling with the impact energy of the balls simulated by the Particle Element Method. *Powder Technology* 1998; 98: 166-170.
14. Hiroshi M, Junya K, Fumito S, Kantaro K: Optimum revolution and rotational directions and their speeds in planetary ball milling. *International Journal of Mineral Processing* 2004; 74: 85-92.
15. Libo W, Jian Z, Wiwik W: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63 (6): 456-469.
16. Marin A: *Physical Pharmacy* Fourth Edition, Williams and Wilkins, USA, 1993: 386, 393, 477-489, 565-569.
17. Malvern Instruments Ltd: *Zetasizer Nano Series User Manual* MAN0317 Issue 5.0, United Kingdom, August 2009; 2-4.
18. Malvern instruments, Dynamic light scattering URL: http://www.malvern.com/LabEng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm, povzeto (dostop: september 2011)
19. Luykx DMAM, Peters RJB, van Ruth SM, Bouwmeester: A Review of Analytical Methods for the Identification and Characterization of Nano Delivery Systems in Food *J Agric Food Chem* 2008; 56: 8231–8247.
20. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba difernčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm Vest* 2001; 52: 173-185.
21. AND instruments Ltd: *SV series Sine-wave Vibro Viscometer Users Handbook* Version 1.11E, Japan, August 2006; 8.
22. Müller RH, Peters K: Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 160: 229-237.
23. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wiström C, Wold S: *Design of Experiments Principles and Application* 3rd revised and enlarged edition, Unimetrics Academy, Sweden, 2008: 7-53, 75-101, 323-334.
24. Tye H: Application of statistical »design of experiments« methods in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2004; 9: 485-491.
25. Karmarkar AB, Gonjari ID, Hosmani A, Dhabale PN, Bhise SB: Use of melt solidification technique for preparation of fenofibrate beads: a technical note. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2009; 4 (2): 291-297.

26. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry Fifth Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 580-604 in 751-794.
27. Saranjit S, Baljinder S, Rakesh B, Lalit W, Rahul S: Stress degradation studies on ezetimibe and development of validated stability-indicating HPLC assay. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006; 41: 1037-1040.
28. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's pharmacology, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 325-330.
29. Primo FT, Fröhlich PE: Celecoxib Identification Methods. Acta Farm. Bonaerense 2005; 24 (3): 421-425.
30. Bevc B: Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi. Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
31. Röhm GmbH & Co. KG Pharma Polymers, Specifications and test methods for EUDRAGIT® E 100, EUDRAGIT® E PO and EUDRAGIT® E 12,5 URL: http://80.241.206.189/en/pharmapolymers/eudragit/quality/spezifikationen_neu.Par.0001.TRow.0017.TCell.0002.File.tmp/7.1.01_INFO7.1e_E100_EPO_E12_5_200409.pdf (dostopno: september 2011)
32. Omega Engineering Technical Reference, Introduction to Infrared Thermometers URL: <http://www.omega.com/prodinfo/infraredthermometer.html>, (dostopno: september 2011)
33. Goodness-of-Fit Statistics URL: <http://web.maths.unsw.edu.au/~adelle/Garvan/Assays/GoodnessOfFit.html> (dostopno: september 2011)
34. Chi-Square Curve Fitting URL: http://www.physics.csbsju.edu/stats/chi_fit.html, (dostopno: september 2011)
35. Mio H, Kano J, Saito F: Scale-up method of planetary ball mill. Chemical Engineering Science 2004; 59: 5909-5916.
36. Bhakay A, Merwade M, Bilgili E, Dave RN: Novel aspects of wet milling for the production of microsuspensions and nanosuspensions of poorly water-soluble drugs. Drug Development and Industrial Pharmacy 2011: 1-14.