

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA KOMPERŠAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

LJUBLJANA, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA KOMPERŠAK

OBLIKOVANJE LIOFILIZATOV Z DOBRO PRETOČNOSTJO IN STISLJIVOSTJO

**DESIGN OF LYOPHILISATES WITH GOOD FLOWABILITY AND
COMPRESSIBILITY**

LJUBLJANA, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratorijih Razvojnega centra Slovenija, Lek farmacevtska družba d.d., pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Mihe Homarja, mag. farm.

Zahvala

Na tem mestu bi se najlepše zahvalila sodelavcem skupine FT5 v Lekovem Razvojnem centru. Moja zahvala gre predvsem somentorju dr. Mihi Homarju, mag. farm., za vodenje praktičnega dela in pomoči pri interpretaciji rezultatov ter Ani Miklavžin za pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre družini, mojemu Alenu ter vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani in naredili moja študentska leta nepozabna.

Nenazadnje se lepo zahvaljujem tudi farmacevtskemu podjetju Lek d.d., da so mi omogočili nastanek diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag.farm. in somentorstvom dr. Mihe Homarja, mag. farm.

Aleksandra Komperšak

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	OSNOVE LIOFILIZACIJE	1
1.2	OPIS PROCESA LIOFILIZACIJE	2
1.2.1	PROCES ZAMRZOVANJA.....	2
1.2.2	PRIMARNO IN SEKUNDARNO SUŠENJE.....	6
1.2.3	PAKIRANJE IN SHRANJEVANJE LIOFILIZIRANEGA MATERIALA	7
1.3.	POMOŽNE SNOVI PRI LIOFILIZACIJI	7
1.3.1	SREDSTVA ZA POVEČANJE TRDNEGA DELEŽA (POLNILA).....	8
1.3.2	SREDSTVA ZA ZAŠČITO MED ZAMRZOVANJEM IN SUŠENJEM.....	8
1.4.	PRETOČNE LASTNOSTI PRAHOV	9
1.4.1	DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PRETOČNOST PRAHOV	9
1.5	METODE ZA IZBOLJŠANJE PRETOČNIH LASTNOSTI	11
1.5.1	DODATEK DRSIL	11
1.6.	METODE MERJENJA PRETOČNOSTI	13
1.6.1	PRETOČNI ČAS.....	13
1.6.2	CARROV INDEKS IN HAUSNERJEVO RAZMERJE	14
1.6.3	NASIPNI KOT	16
1.7	TABLETE	17
1.7.1	IZDELAVA TABLET	18
2	NAMEN DELA	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI.....	22
3.2	NAPRAVE.....	27
3.3	METODE DELA	28
3.3.1	IZDELAVA RAZTOPIN IN SUSPENZIJ ZA LIOFILIZACIJO.....	28
3.3.2	LIOFILIZACIJA	31
3.3.3	PRETOČNOST IN NASIPNI KOT LIOFILIZATOV.....	32
3.3.4	CARROV INDEKS IN HAUSNERJEVO RAZMERJE	33
3.3.5	IZDELAVA TABLET	33
3.3.6	OBDELAVA PODATKOV	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1	IZGLED POGAČE LIOFILIZATOV	35

4.2 PRETOČNI ČAS IN NASIPNI KOT	36
4.2.1 IZBIRA POMOŽNIH SNOVI	37
4.2.2 IZBIRA PLACEBO FORMULACIJE Z NAJBOLJŠIMI PRETOČNIMI LASTNOSTMI.....	38
4.2.3 VPLIV TEMPERATURE NA PRETOČNOST LIOFILIZATOV	42
4.2.4 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH V BUČKAH IN VIALAH	43
4.2.5 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH Z RAZLIČNIMI MASNIMI DELEŽI TRDNIH SNOVI	46
4.2.6 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV Z NATRIJEVIM ALENDRONATOM.....	47
4.2.7 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV Z BSA.....	53
4.3 CARROV INDEKS IN HAUSNEREJEVO RAZMERJE.....	56
4.4 IZDELAVA TABLET	60
5 SKLEP.....	62
6 LITERATURA:.....	63
7 PRILOGA	67

POVZETEK

Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je postopek, s katerim odstranimo vodo iz materialov, ki bi jih s segrevanjem poškodovali, hkrati pa ohranimo njihovo strukturo in sestavo. Liofilizati so običajno rahli, nepretočni praški, ki niso primerni za izdelavo tablet oz. kapsul. V nalogi smo ovrednotili vplive različnih pomožnih snovi dodanih pred ali po liofilizaciji, kot tudi vpliv različnih procesnih parametrov tega postopka na pretočnost in stisljivost liofilizatov.

Izdelali smo placebo vzorce ter trem od njih, ki so imeli najboljšo pretočnost, dodali modelno zdravilno učinkovino (natrijev alendronat) ali visokomolekularno modelno molekulo (goveji serumski albumin). Vsem liofilizatom smo določili pretočne lastnosti z merjenjem pretočnih časov, s posrednim merjenjem nasipnih kotov in s Carrovim indeksom. Ocenili smo tudi zmožnost pretvorbe liofilizatov v končno farmacevtsko obliko – tablete.

Testirali smo vpliv temperature okolja med fazo liofilizacije. Ugotovili smo, da liofilizacija pri 0 °C in 30 °C ni mogoča. Vzorce smo pripravljali pri 21 °C in jih liofilizirali v bučkah ali vialah ter ugotovili, da imajo tisti v bučkah boljše pretočne lastnosti od tistih pripravljenih v vialah. Kot najboljši pomožni snovi za izboljšanje pretočnosti liofilizatov, ki smo ju dodali po liofilizaciji, sta se izkazali laktoza in Aerosil®. Najboljše pretočne lastnosti vzorcev z dodatki pred liofilizacijo pa smo določili v primerih dodanih kombinacij saharoze in Aerosila® ter manitola s PEG 6000.

Testirali smo vzorce različnih koncentracij (masnih deležev suhih snovi) in ugotovili, da imajo liofilizati z nižjo koncentracijo (1,7% - 2,6%) boljše pretočne lastnosti, kot tisti z višjo (3,4% - 5,1%). Dodatki učinkovine natrijevega alendronata ali BSA so vzorcem večinoma še izboljšali pretočne čase.

Zaradi premajhnih volumnov vzorca smo rezultate nasipnih kotov obravnavali kot informativne. Liofilizate smo uspešno stisnili v tablete, težave pa smo imeli le z nihanjem njihove trdnosti. Gledano na vse teste, se je kot najboljši vzorec izkazal vzorec saharoze in Aerosila® pripravljen s koncentracijo 1,7% (m/m).

ABSTRACT

Lyophilization or freeze-drying is a process that removes water from materials, which would be damaged by heating, while maintaining their structure and composition. Lyophilisates are usually light, non-flowable powders, which are not suitable for compression into tablets or filling into capsules, since they exhibit poor flowability and compressibility. In this work we evaluated the impact of various excipients added before or after lyophilization, as well as the impact of freeze-drying process parameters on flow and compressibility of lyophilisates.

Soluble, low molecular active substance (sodium alendronate) on high molecular model molecule (bovine serum albumin) were added to three samples with the best flowability. Flow properties of all lyophilisates were determined by measuring their flow times, angles of repose and Carr index. The ability of lyophilisate conversion into the final dosage form, i.e. tablets, was also assessed.

The effect of drying temperature on the flowability of lyophilisates was tested. Samples were lyophilized at 0 °C, 21 °C and 30 °C. Lyophilization at 0 °C and 30 °C was not possible, since no lyophilisates were formed. Samples prepared in flasks had better flow properties than those prepared in vials. We found out that the best excipients for improving the fluidity of lyophilisates are lactose and Aerosil®. Samples with various solid content were tested. We discovered that lyophilisates with lower content of solids (1,7% - 2,6%) have better flow properties than those with higher solid content (3,4% - 5,1%). By adding and testing different excipients we achieved adequate flowability and compressibility and successfully compressed lyophilisates into tablets. Looking at all the tests performed, the best of the tested samples contained sucrose and Aerosil® with a concentration of 1,7% (m/m).

SEZNAM OKRAJŠAV

T ₀	trojna točka
P	tlak
T	temperatura
PEG	polietilenglikol
PS	pomožna snov
BSA	goveji serumski albumin
BET	metoda absorbcije dušika
MAN	manitol
SAH	saharoza
AERO	Aerosil 200®
PEG	polietilenglikol 6000
MCC	mikrokristalna celuloza
Dod. uč.vzor. št.	dodatek učinkovine-številka vzorca
vzor. št.	vzorec številka
št.vzor.	številka vzorca

1 UVOD

1.1 OSNOVE LIOFILIZACIJE

Sušenje z zamrzovanjem ali liofilizacija je proces sušenja, ki se uporablja predvsem za temperaturno zelo občutljive (termolabilne) materiale, ki bi pri uporabi drugih postopkov sušenja izgubili bistvene ali želene lastnosti (1). Poteka tako, da vzorec najprej zamrznemo do potrebne temperature. Sledi odstranitev vode iz vzorca s sublimacijo ter kasneje z desorpcijo, oboje pod znižanim tlakom (2). Gre za pogosto uporabljen proces na področju farmacije, saj je kar 50 % biofarmacevtikov na trgu pripravljenih s to metodo (1).

Material ob uporabi pravilnega postopka ohrani strukturo in sestavo, kakršno je imel pred liofilizacijo. Povečamo mu mikrobiološko stabilnost ter zavremo kemijske in fizikalne spremembe ter tako omogočimo stabilizacijo izdelka za čas distribucije in shranjevanja (1). Ker je liofilizacija vakuumski proces, pri katerem ni prisotnega kisika, so preprečene tudi vse oksidativne reakcije. Na mestih, kjer so bili ledeni kristali, ostanejo le še prazne pore, zato je takšen material zelo porozen in higroskopen. To pomeni, da se ob dodatku topila to takoj reabsorbira in se material povrne v prvotno stanje pred liofilizacijo (1,2).

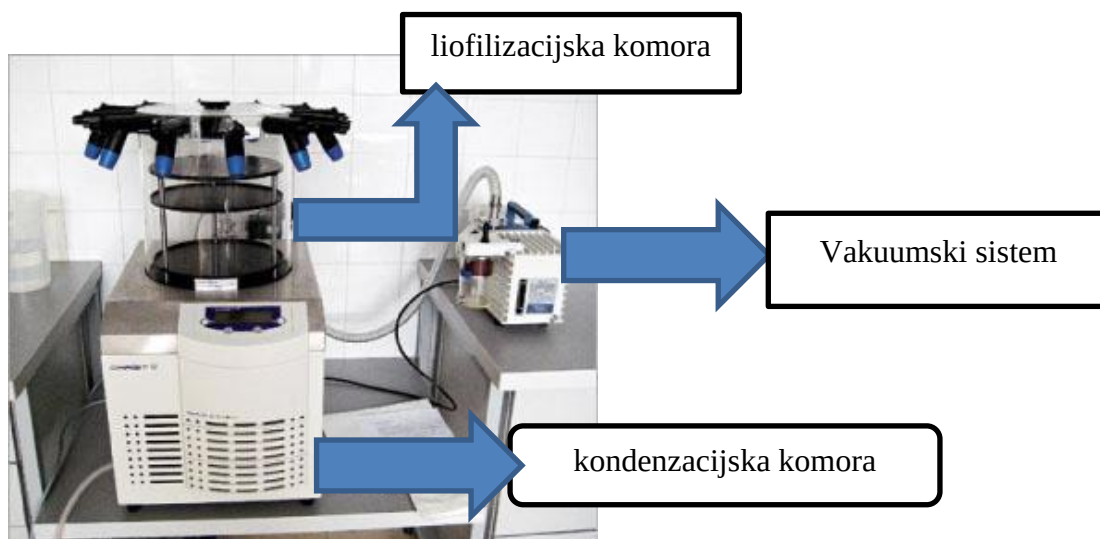
Proces liofilizacije je razmeroma počasen in drag, zato ga uporabljamo predvsem v primerih, ko ima njegova uporaba za nastali produkt visoko dodano vrednost. Liofiliziran material je higroskopen, kar moramo upoštevati pri kasnejšem rokovanju, saj nase hitro veže vodo iz okolice (3,4).

Liofilizacijo so začeli uporabljati že pred 1. svetovno vojno, in sicer za konzerviranje serumov, virusa stekline, bakterij in podobno. Med prvimi sta jo začela izvajati Flosdorf in Mudd za sušenje krvne plazme, in sicer okoli leta 1935. V 2. svetovni vojni so jo začeli uporabljati za izdelavo antibiotikov, po njej pa je bila tehnika že razširjena v medicini, veterini in farmaciji. Na ta način so sušili hormone, vakcine ter humano mleko za občutljive otroke. V naslednjih letih se je postopno uveljavila za konzerviranje najrazličnejših snovi in bakterijskih kultur ter prodrla tudi na številna druga področja (5).

1.2 OPIS PROCESA LIOFILIZACIJE

Proces liofilizacije je sestavljen iz treh stopenj: 1. zamrzovanja materiala; 2. primarnega sušenja, pri katerem se odstrani prosta voda s sublimacijo in 3. sekundarnega sušenja, pri katerem se z desorpcijo odstrani še preostala vezana voda.

Proces poteka v liofilizatorju. Poznamo več izvedb liofilizatorjev. Sestava aparata, ki smo ga uporabljali pri našem delu je prikazana na sliki 1. Njegovi sestavni deli liofilizatorja so: liofilizacijska in kondenzacijska komora ter vakuumski sistem. Poglavitna funkcija liofilizacijske komore je zagotavljanje ustreznega okolja (tlak in temperatura) za pripravo končnega izdelka tekom celotnega postopka. V njej so police, na katere položimo vsebnike z raztopino. Kondenzacijska komora pa služi odstranitvi vodne pare iz komore, pri čemer vakuumski sistem zagotavlja potreben tlak (6).



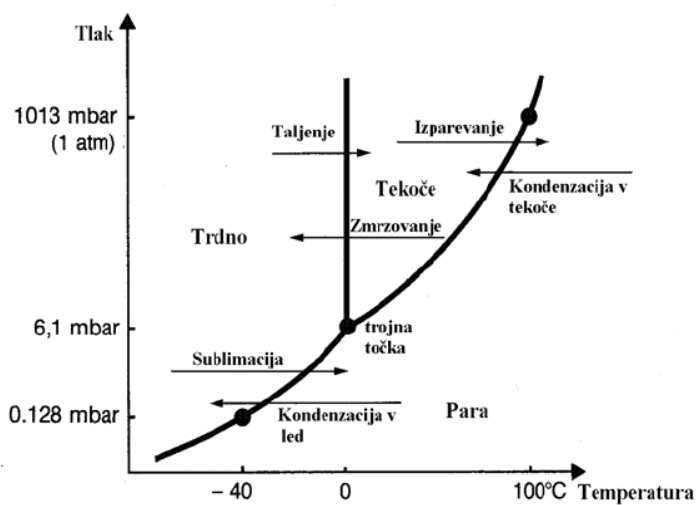
Slika 1:Liofilizator

1.2.1 PROCES ZAMRZOVANJA

Zamrzovanje je kompleksen in hkrati tudi najpomembnejši del liofilizacije. Hitrost zamrzovanja vpliva tako na hitrost sublimacije v fazi primarnega sušenja, kot tudi na kakovost dobljenega produkta. Pri hitrejšem zamrzovanju nastanejo manjši kristali ledu, ki vodijo do nastanka manjših por, to pa posledično podaljša čas sublimacije (1,2).

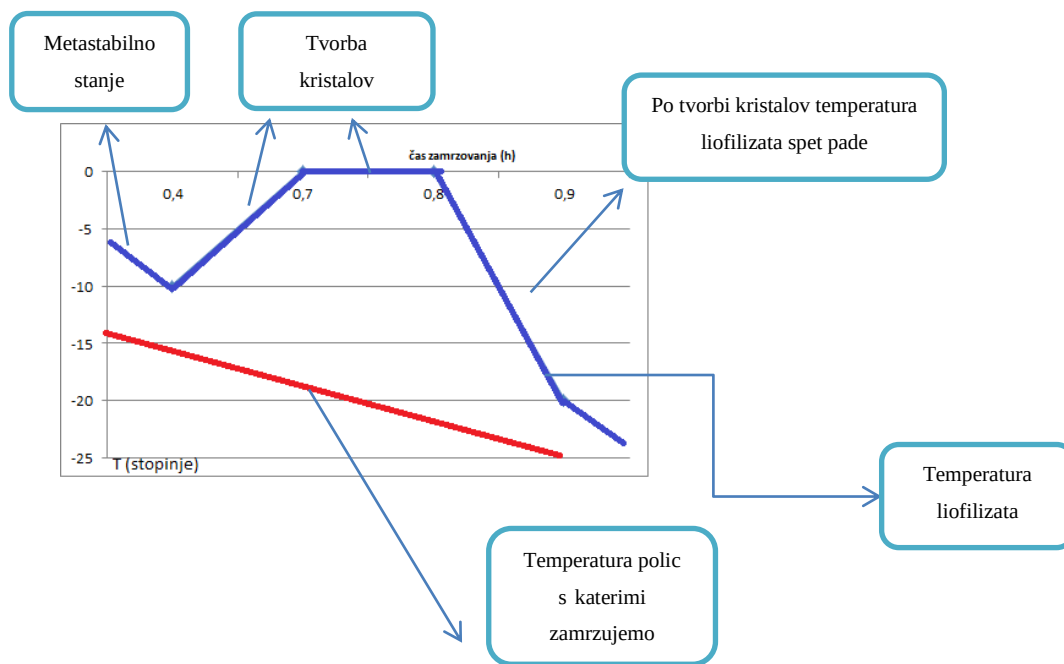
Na začetku zamrzovanja pride najprej do podhladitve raztopine. To je metastabilno stanje med tekočo in trdno fazo, v katerem tekočini znižamo temperaturo pod temperaturo

ledišča, ne da bi pri tem postala trdna. Poteka v območju med 10 do 15 stopinj pod trojno točko (slika 2). Zamrzovanje se začne, ko je temperatura dovolj nizka, da ima sistem dovolj aktivacijske energije za tvorbo stabilnih nukleacijskih jeder. Po tvorbi le - teh se začno vodne molekule z vodikovimi vezmi spontano povezovati v skupke. Zaradi tvorbe kristalov vodnih molekul pride do nastanka dveh faz: ledu in krio-koncentrirane raztopine, ki je sestavljena iz pomožnih snovi, same učinkovine, soli....(1). Da bi zagotovili popolno pretvorbo v trdno stanje, moramo raztopino oz. disperzijo ohladiti pod temperaturo evtektičnega zamrzovanja, v kolikor so v njej prisotne pomožne snovi, ki kristalizirajo, oz. pod temperaturo steklastega prehoda, če se nahaja v amorfem stanju (7).



Slika 2: Fazni diagram vode (10).

Pri tvorbi kristalov vodnih molekul se sprosti energija (eksotermna reakcija) in temperatura vzorca naraste do trojne točke (T_0). V njej sta tekoča, parna in trdna faza v ravnotežju, kar je prikazano na sliki 2. Po končani tvorbi kristalov temperatura produkta spet pade (1,2,7). Temperaturni potek zamrzovanja prikazuje slika 3.



Slika 3: Temperaturni potek zamrzovanja liofilizata. Z rdečo črto je označena temperatura polic, z modro pa spreminjanje temperature liofilizata med fazo zamrzovanja.

Za zamrznjen produkt uporabljamo izraz zamrznjena pogača. Za njeno idealno strukturo je značilno, da tvorijo ledeni kristali v njej kanalčke, po katerih bo med primarnim sušenjem voda nemoteno sublimirala. V primeru da ledeni kristali ne tvorijo kanalčkov in so razpršeni, bo sublimacija zelo omejena (1, 2, 10).

Struktura pogače je torej odvisna od velikosti kristalov in s tem od hitrosti ohlajanja, stopnje podhladitve in koncentracije topljencev v izhodni raztopini (1, 2).

VPLIV STOPNJE PODHLADITVE RAZTOPINE

Večja ko je podhladitev, večja količina vode bo imela temperaturo nižjo od trojne točke (T_0). Pri tem nastane tudi več kristalnih jeder, ki pa se pri rasti ovirajo in zato nastanejo manjši kristali enake velikosti (homogena pogača). Kristali imajo tako manjše pore, zaradi česar se podaljša čas primarnega sušenja (8).

Pri majhni stopnji podhladitve, bo seveda manjša količina vode pod T_0 . Zaradi tega nastane manj kristalnih jeder, ki se med rastjo ne ovirajo, zato bodo nastali veliki kristali. Preostala

voda bo zamrznila pri temperaturi trojne točke, zato bo nastala heterogena struktura pogače (1, 2, 6, 10).

VPLIV HITROSTI OHLAJANJA RAZTOPINE

Pri hitrem ohlajanju pride do velike podhladitve in posledično do nastanka majhnih kristalov nepravilnih oblik, pri počasnem pa do nastanka velikih kristalov pravilnih oblik (1, 2, 6, 10).

VPLIV KONCENTRACIJE TOPLJENCEV V RAZTOPINI

Čista voda začne zamrzovati malo pod 0 °C, z večanjem koncentracije topljencev v njej pa temperatura ledišča pada (7). Večja ko je koncentracija topljencev, manjša je stopnja podhladitve. Zaradi tega nastane manj kristalnih jeder, ki se med rastjo ne ovirajo, zato nastanejo veliki kristali, preostala voda pa zamrzne pri temperaturi trojne točke in nastane pogača s heterogeno strukturo (1, 2, 6, 10).

Veliki kristali so zaželeni v tekočih neživih raztopinah zato, da dobimo po osušitvi večje pore, ki med samim sušenjem dobro prevajajo paro, pri rehidraciji pa snov hitro prejme vodo. Nasprotno je potrebno raztopine z živimi celicami zamrzniti hitro, da veliki kristali ne bi poškodovali celičnih membran in celične strukture (6, 7).

- VRSTE ZAMRZOVANJA MATERIALA

Za zamrzovanje lahko uporabljamo več tehnik. Glede na mesto zamrzovanja razlikujemo zamrzovanje v samem liofilizatorju na temperaturno reguliranih policah ali pa izven liofilizacijske komore.

Glede na način zamrzovanja pa poznamo statično in dinamično zamrzovanje (4, 7).

- STATIČNE METODE ZAMRZOVANJA

Pri statični metodi postavimo material na hlajene plošče ali pa ga potapljamo v hladilne kopeli, pri čemer vzorcev ne vrtimo. Hladilne kopeli pripravimo z mešanjem alkohola in suhega ledu v različnih razmerjih, odvisno od tega, kakšno hitrost ohlajanja želimo (6, 7).

Najbolj pogosto je zamrzovanje na ploščah. Ta postopek je v večini primerov zelo enostaven in ne zahteva dodatnih naprav. Industrijski in nekateri laboratorijski aparati imajo že v sami komori nameščene police na katerih lahko material zamrzujemo in kasneje

tudi liofiliziramo. Pri tem se izognemo dodatnemu prenašanju in možnosti poškodb materiala. Plošče so navadno hlajene preko hladilnega agregata s hladilnim plinom in imajo vgrajeno temperaturno regulacijo (4).

- DINAMIČNE (ROTACIJSKE) METODE ZAMRZOVANJA

Pri tej metodi se material vrti v kopeli. Primerna je predvsem za liofilizacijo večje količine tekočine v eni posodi. Produkt hitro zamrzne in tvori tanko plast na steni posode, ki se zaradi velike površine tudi hitro osuši. Zelo hitro zamrzovanje, ki je zaželeno npr. pri proteinskih raztopinah pa dosežemo s potopitvijo v hladilno kopel (6, 7).

1.2.2 PRIMARNO IN SEKUNDARNO SUŠENJE

Osnovni cilj procesa primarnega sušenja je odstranitev vode iz zamrznjene raztopine s sublimacijo ledenih kristalov, ki pa je možna le, če temperaturo in tlak znižamo na vrednost pod trojno točko ($T=0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=6,1\text{ mbar}$) (slika 2).

Ko je raztopina popolnoma zamrznjena, sledi zmanjšanje tlaka v sušilni komori in postopno zviševanje temperature (3, 11). Toplota, prenesena v sistem se porablja za sublimacijo ledu. Vodna para iz sušilne komore prehaja v kondenzator, kjer kondenzira in se odstranjuje iz sistema.

Hitrost sublimacije se spreminja med celotno fazo primarnega sušenja. Na začetku, ko se voda odstranjuje s površine vzorca je sublimacija hitra, s časom pa se sublimacijska površina pomika globlje, zato ima H_2O vedno daljšo in zahtevnejšo pot. Upornost sublimacije narašča z debelino vzorca in je tesno povezana z načinom zamrzovanja, od katerega so odvisne velikosti kristalov in kasneje tudi por, skozi katere led sublimira. Gonilna sila procesa je razlika med parnim tlakom ledu na mestu sublimacije in parcialnim tlakom vode v sušilniku (4). Odstranjeni ledeni kristali tvorijo mrežo por v vzorcu, po katerih lahko uhaja vodna para iz nižjih plasti (3, 11).

Nižja ko je temperatura pri procesu primarnega sušenja, počasnejše je sušenje, s tem pa se poveča tudi cena procesa. Za farmacevtike in biološke materiale uporabljamo tlake med 0,02 in 0,2 mbara ter temperaturo med -55 in $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konec sublimacije spremlja bolj ali manj očitien padec tlaka, ki je posledica prenehanja nastanjanja par topila (7).

Po končanem primarnem sušenju je v vzorcu še vedno prisotne nekaj vode (približno 10-15%), ki jo predstavlja rezidualna prosta H_2O . Ta je med zamrzovanjem ostala

nezamrznjena in je zato ni bilo mogoče odstraniti s sublimacijo. Rezidualna voda ostane adsorbirana v ali pa na površini pogače. Odstranimo jo šele v fazi sekundarnega sušenja z desorpcijo iz vzorca, ki poteka pri zvišani temperaturi. Temperaturo sušenja lahko dvignemo nad temperaturo tališča vode, vendar ne višje od 30 °C za biološke materiale in ne višje od 50 °C za živila in manj občutljive materiale. Temperatura sušenja mora biti vedno pod temperaturo steklastega prehoda suhega matriksa (3, 11). Ta del liofilizacije je precej dolgotrajen in ni točno časovno določen. Konča se, ko dosežemo optimalno stopnjo rezidualno vlage v produktu (7).

1.2.3 PAKIRANJE IN SHRANJEVANJE LIOFILIZIRANEGA MATERIALA

Po končanem sekundarnem sušenju vsebuje material 1-3% vode, pri čemer v večini primerov tako nizka vsebnost ne predstavlja ovire za dolgotrajno shranjevanje. Material, ki smo ga osušili s postopkom liofilizacije, je izredno porozen, hkrati pa ima veliko sposobnost adsorpcije vode in plinov iz zraka. Zato moramo po končanem sušenju zagotoviti primerno pakiranje, ki preprečuje prehajanje plinov med produktom in njegovo okolico (4).

1.3. POMOŽNE SNOVI PRI LIOFILIZACIJI

Poleg lasnosti učinkovine so za doseganje kakovostnega, funkcionalnega in stabilnega produkta ključne tudi lastnosti prisotnih pomožnih snovi. Te imajo različne funkcije, npr. regulacije pH, zaščite produkta med zamrzovanjem in sušenjem, zaščite produkta pred oksidacijo ali pa imajo vlogo polnil (2, 9, 11).

Na proteine pomembno vplivajo lastnosti raztopine (temperatura, vsebnost soli, pH in drugo). Majhne spremembe povzročajo večinoma reverzibilne spremembe konformacije, velike pa denaturacijo. Obsežnost omenjenih sprememb je odvisna od načina zamrzovanja, narave in koncentracije sestavin v raztopini, hitrosti hlajenja, najnižje dosežene temperature in njenega trajanja, seveda pa tudi od načina odtajanja.

1.3.1 SREDSTVA ZA POVEČANJE TRDNEGA DELEŽA (POLNILA)

Uporabimo jih pri formulacijah z majhnimi koncentracijami zdravilnih učinkovin in ostalih pomožnih snovi, da dobimo po sušenju bolj trdno pogačo. Največkrat uporabljamo sladkorje, in sicer manitol, laktozo, saharozo in sorbitol. Za proteinske formulacije so posebej primerni neredukcijski sladkorji, s katerimi preprečimo potencialno Maillardovo reakcijo s proteini. Takšni sladkorji so manitol, trehaloza in saharoza. Uporabimo pa lahko tudi aminokisline (glicin, arginin in histidin) ter nekatere polimere (polietilenglikol) (2, 11).

1.3.2 SREDSTVA ZA ZAŠČITO MED ZAMRZOVANJEM IN SUŠENJEM

Snovi, ki zaščitijo učinkovino pred stresom med zamrzovanjem imenujemo krioprotektanti. Lioprotektanti pa ščitijo učinkovino pred dehidracijo med sušenjem.

Pri zamrzovanju pride do ločitve dveh faz, in sicer ledu in kriokoncentrirane raztopine. Nastali visoko koncentriran kompleks lahko povzroči agregacijo ali celo ireverzibilno zlepljanje delcev. Zato v disperzijo dodamo krioprotektante, ki pod temperaturo steklastega prehoda tvorijo steklast matriks, v katerega se ulovijo delci, s tem pa je preprečena njihova agregacija in omogočena njihova zaščita pred mehanskimi poškodbami nastajajočih ledenih kristalov. Najpogosteje uporabljeni krioprotektanti so sladkorji: glukoza, saharoza, trehaloza in manitol (2, 9, 11).

Lioprotektanti pa so polarne snovi, ki izpodrivajo odstranjeno vodo in tvorijo vodikove vezi na specifičnih mestih proteina, kjer so bile prej vezane vodne molekule. Poleg vzpostavitve kovalentnih vezi se posamezne aminokisline povezujejo še s šibkimi vodikovimi vezmi (s posredovanjem vode, ki se veže na polarne aminokislinske ostanke), kar daje aminokislinskim verigam sekundarno prostorsko strukturo. Le primarna struktura in žveplov mostovi so razmeroma stabilni, sicer pa je konformacija proteina nestabilna, saj je zelo odvisna od okoliške vode. Pri uporabi lioprotektantov zato ostaneta struktura in oblika proteina nespremenjeni, kljub odstranitvi vode. Najpogosteje se v ta namen uporabljata manitol in glicin (2, 9).

Učinkovitost krio-/lioprotektantov je večja v disperzijah z višjo koncentracijo delcev. Obe vrsti protektantov imata tudi funkcijo polnila, saj predstavljata večino mase liofilizata, pri čemer zagotavljata ustrezno konsistenco liofilizacijske pogače (2).

1.4. PRETOČNE LASTNOSTI PRAHOV

Preprosta definicija pretočnosti prahov je njihova zmožnost da tečejo. Pretočnosti ne moremo gledati kot enodimenzionalen pojav, saj je tok prahov kompleksen, njegovo obnašanje pa večdimenzionalno in odvisno od številnih lastnosti tako samega prahu kot njegovega okolja. Zato je ustrežnejša trditev, da je pretočnost zmožnost prahov, da tečejo na želeni način v specifičnem delu opreme oz. okolja (12).

Pretočne lastnosti prahov so že kar nekaj časa predmet obsežnih raziskav v farmacevtski industriji. Njihova natančna določitev je nujno potrebna, da zadostimo zahtevam kakovosti končnih farmacevtskih oblik, predvsem tablet in kapsul, in sicer v smislu enakomernosti mase, vsebnosti učinkovine in učinkovitosti proizvodnje, kjer je zaželeno čim hitrejšo polnjenje v matrične vdolbine oz. telesa kapsul (13, 14, 15).

1.4.1 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PRETOČNOST PRAHOV

Preučevanje in razumevanje pretočnih lastnosti prahov je zahteven in zamuden postopek, in sicer zaradi številnih fizikalnih, kemijskih in okoljskih spremenljivk, ki določajo odziv snovi na njihovo premikanje. Tovrstne dejavnike lahko razdelimo v dve skupini: na lastnosti samih prahov in na zunanje dejavnike (preglednica I) (16).

Preglednica I: Dejavniki, ki vplivajo na pretočne lastnosti prahov (lioofilizator) (16).

LASTNOSTI PRAHOV	ZUNANJI DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA OBNAŠANJE PRAHOV
- velikost delcev - porazdelitev velikosti - oblika - površinska morfologija - kohezivnost - tendenca k segregaciji - površinska obloga - interakcije med delci - obraba - sposobnost okrevanja po zbitju - nagnjenost k elektrostatičnemu naboju	- hitrost toka - pogoji zbitosti - tresljaji - temperatura - vlaga - elektrostatični naboj - zračnost (angl. aeration) - pogoji skladiščenja in transporta - vplivi površine vsebnika

V nadaljevanju bomo najpogostejše dejavnike podrobneje predstavili.

- **Velikost delcev**

V splošnem velja, da se z zmanjševanjem velikosti delcev slabšajo pretočne lastnosti zaradi prevlade kohezivnih sil nad gravitacijskimi.

Le delci, ki so večji od 250 μm , so prosto tekoči. Za tiste, manjše od 250 μm , pa velja zmanjšana sposobnost toka zaradi kohezije. Pri manjših velikostih začno namreč šibke van der Waalsove privlačne sile prevladovati nad gravitacijskimi. To razmerje se veča z manjšanjem delcev, torej manjši so delci, večje so privlačne sile med njimi. van der Walsova sila je šibka privlačna medmolekulska sila, ki deluje med sosednjima molekulama in atomoma zaradi njunih induciranih električnih dipolov.

Za izboljšanje njihove pretočnosti majhnim delcem dodajamo snovi nanometerskih velikosti (osnovni delec SiO_2), ker povečajo razdaljo med delci in s tem zmanjšajo privlačne sile, ali pa jih pa z granuliranjem preoblikujemo v večje delce, ki so hkrati tudi bolj gladki in bolj pravilnih oblik (15,16).

- **Oblika in površinska morfologija delcev**

Oblika delcev vpliva na njihovo pretočnost zaradi stične površine med njimi. Optimalni so okrogli delci, saj imajo minimalno stično površino in s tem minimalno trenje. Hrapavi pa se mehansko bolj zatikajo, kot tisti z gladkimi površinami (15,16).

- **Tresljaji**

Stresanje prahov z velikim razponom velikosti delcev povzroči potovanje manjših proti dnu. Ta pojav imenujemo segregacija ali razslojevanje (15,16).

- **Vlaga**

Vlaga vpliva na prahove različno. Kako in v kakšni meri se bo vezala, je povezano s kemijskimi in fizikalnimi lastnostmi posameznih prahov. Ti postanejo zaradi prisotnosti vlage kohezivnejši in manj prosto tekoči (15,16).

- **Elektrostatski naboj**

Delci lahko z mletjem, drgnjenjem ali medsebojnimi trki pridobijo statični naboj. Njihov površinski naboj se lahko tvori tudi pri sejanju, mešanju ali gibanju skozi lij. V stiku s kovinsko posodo se delci praviloma nabijejo negativno, v stiku s plastičnimi površinami pa pozitivno (15,16).

1.5 METODE ZA IZBOLJŠANJE PRETOČNIH LASTNOSTI

Pretočnost majhnih delcev lahko izboljšamo na dva načina, in sicer z granulacijo, pri čemer dobimo večje delce bolj gladkih površin, ali paz dodajanjem drsil.

1.5.1 DODATEK DRSIL

Drsila so pomožne snovi, ki jih dodajamo prahovom za izboljšanje njihovih procesnih lastnosti, zlasti pri tabletiranju in kapsuliranju.

Delimo jih v tri skupine (17):

- maziva: zmanjšujejo trenje med tableto in steno matrične vdolbine,
- antiadhezivi: preprečujejo lepljenje tabletirne zmesi na pečate,

- prava drsila: že v majhnih količinah bistveno izboljšajo pretočne lastnosti.

Z vidika vodotopnosti jih razdelimo na hidrofilna in hidrofobna. Hidrofilna drsila (npr. natrijev stearil fumarat) so slabša, saj nimajo antiadhezivnih lastnosti in ne bistveno izboljšajo pretočnosti. Zato se pogosteje uporabljajo hidrofobna (npr. magnezijev stearat, smukec). Številna hidrofobna drsila delujejo hkrati tudi kot maziva in antiadhezivi. Glavna slabost hidrofobnih drsil je, da lahko upočasnijo sproščanje učinkovine iz tablete (17, 18).

Pretočne lastnosti prahov lahko bistveno izboljšamo že z majhnim deležem drsil. Skupno vsa drsila imajo majhne velikosti delcev, zaradi česar so izrazito nagnjena k tvorjenju aglomeratov, obenem pa se delci in agregati drsil močno vežejo na večje delce zmesi prahov in tako izboljšujejo njihove pretočne lastnosti.

V ta proces je vpletenih več mehanizmov:

- zmanjšanje trenja: adsorpcija manjših delcev nanometrskih velikosti drsil na površino granulata in v interpartikularne pore, rezultat je zmanjšana hrapavost površine in zmanjšano trenje med delci;

- adsorpcija plinov in hlapov: delci drsil absorbirajo pline in hlapce iz okolice, ki bi se v nasprotnem primeru vezali na delce granulata in povzročili sprijemanje delcev;

- ločitev delcev: delci drsila se adsorbirajo na delce granulata, s tem se fizično poveča razdalja med delci, rezultat pa so zmanjšane van der Waalsove privlačne sile(19);

- antistatični učinek: drsila razpršijo statični naboj delcev, na katere se vežejo (smukec, magnezijev stearat, PEG) (20);

Optimalna vsebnost drsil v celotni zmesi prahov je okoli 1% (m/m%), pri čemer pa velja pravilo, da je potrebno za vsako drsilo posebej določiti optimalno koncentracijo, kajti njegova prevelika količina lahko celo zmanjša pretok. V preglednici II so predstavljena najpogostejša drsila z optimalnimi koncentracijami (18,19). Z uporabo več drsil hkrati lahko še dodatno izboljšamo pretočnost prahov (20).

Preglednica II: Najpogostejše uporabljena drsila in njihove optimalne koncentracije (21)

Drsilo:	Optimalna koncentracija (%)
KALCIJEVI SILIKATI	0,5-2
CELULOZA	1-2
MAGNEZIJEV KARBONAT	1-3
MAGNEZIJEV OKSID	1-3
MAGNEZIJEV SILIKAT	0,5-1
KOLOIDNI SILICIJEV DIOKSID	0,05-0,5
SMUKEC	1-10

1.6. METODE MERJENJA PRETOČNOSTI

Zelo široka uporaba prahov v industrijski farmaciji je spodbudila razvoj številnih metod za določanje pretočnosti prahov. V literaturi zasledimo veliko razprav in povezav med različnimi postopki merjenja pretoka prahov. Evropska farmakopeja navaja točno izvedbo, dimenzije opreme in način izražanja rezultatov meritev, in sicer v poglavju Pretočnost prahov (2.9.36. »Powder flow«). Tu so opisane štiri metode, ki so najpogostejše uporabljajo:

- meritve pretočnega časa
- meritve nasipnega kota
- določitve Carrovega indeksa in Hausnerjevega razmerja
- metoda strižne celice (22)

1.6.1 PRETOČNI ČAS

Pretočni čas določimo s pomočjo lij, ki mu zapremo spodnjo odprtino in vanj nasujemo preiskovano snov. Ko odprtino odpremo, začnemo meriti čas, dokler vsa snov ne izteče. Čas izrazimo na 100 g prahu, rezultate pa podamo na desetinko sekunde natančno (23).

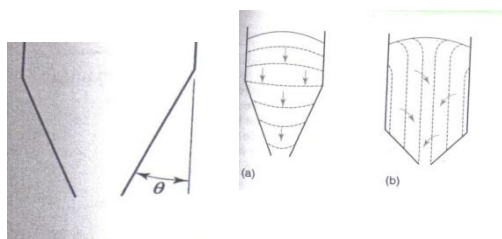
Pretok skozi lij je odvisen od:

- širine odprtine lij (tok je premosorazmeren z odprtino)

- naklona spodnjega dela lij (prikazano na sliki 4) - če je njegov kot med 0° in 20° , prašek pada prosto, pri kotu večjem od 50° ta ne pada prosto (15),

- materiala lij (plastika, steklo ali kovina) (23).

Delci lahko tečejo skozi lij na dva načina. Lahko padajo v skoraj vodoravnih linijah in v tem primeru tisti delci, ki smo jih nasuli zadnje, tudi zadnji zapustijo odprtino lij. Ta način imenujemo »masni pretok« (angl. mass flow). Drugi način pa je tako imenovan »lijasti pretok« (angl. funnel flow), pri katerem prašek ne pada prosto, temveč začne teči iz nasipne sredine. Obe vrsti pretoka sta predstavljeni na sliki 4. Vrsta pretoka je odvisna od adhezije/kohezije med delci, njihove adhezije na površino posode ter naklona spodnjega dela lij (15).



Slika 4: Kot lij, masni pretok (a) in lijasti pretok (b)

1.6.2 CARROV INDEKS IN HAUSNERJEVO RAZMERJE

Pretočne lastnosti prahov lahko ocenimo tudi na podlagi Carrovega indeksa in Hausnerjevega razmerja. Osnovni princip te metode je, da izmerimo nasipni volumen in končni volumen vzorca prahov. Nasipni volumen vključuje vse intra- in interpartikularne prostore. Merjenje nasipnega volumna poteka tako, da v 250 ml merilni valj previdno nasujemo 100 g prahu in nato odčitamo nasipni volumen. Ob stresanju se delci razporedijo tako, da zavzamejo najmanjši volumen, vendar pa med njimi še vedno ostane nekaj praznega prostora, napolnjenega z zrakom. Volumen po stresanju imenujemo zbiti volumen. Ob upoštevanju mase dobimo nasipno in zbito gostoto (15, 22, 39).

S podatki o zbitem volumnu oz. gostoti lahko izračunamo Carrov indeks in Hausnerjevo razmerje, s pomočjo enačb 1 in 2 (22).

$$\text{Carrov indeks} = 100 \times \frac{V_{\text{nasipni}} - V_{\text{zbiti}}}{V_{\text{nasipni}}} = 100 \times \frac{\rho_{\text{zbita}} - \rho_{\text{nasipna}}}{\rho_{\text{zbita}}} \quad (\text{enačba 1})$$

$$\text{Hausnerjevo razmerje} = \frac{V_{\text{nasipni}}}{V_{\text{zbiti}}} = \frac{\rho_{\text{zbita}}}{\rho_{\text{nasipna}}} \quad (\text{enačba 2})$$

V_{nasipni} nasipni volumen prahov ρ_{nasipna} nasipna gostota prahov

V_{zbiti} zbiti volumen prahov ρ_{zbita} zbita gostota prahov

Carrov indeks in Hausnerjevo razmerje sta merili interakcij med delci. V splošnem velja, da večja kot je sprememba volumna oz. gostote prahov po stresanju, slabše so njihove pretočne lastnosti. Ph. Eur. 7 navaja sedem razredov pretočnih lastnosti, glede na vrednosti Carrovega indeksa in Hausnerjevega razmerja, ki so predstavljene v preglednici III. Pri tem je potrebno upoštevati, da morata biti premer valja, v katerem merimo nasipni in zbiti volumen ter število udarcev pri zbijanju praška skozi celoten proces meritev ves čas enaka. Paziti moramo tudi, da so mase preiskovanih prahov približno enake in da ni večjih rotacij vzorca med zbijanjem. Ti pogoji so namreč pomembni za ponovljivost meritev (22).

Preglednica III: Razredi pretočnih lastnosti, v odvisnosti od Carrovega indeksa in Hausnerjevega razmerja, po Ph. Eur.7

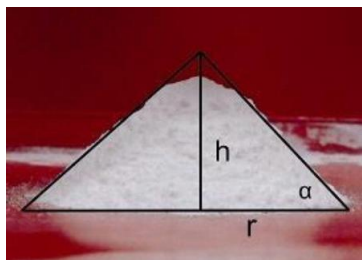
Carrov indeks	Pretočne lastnosti	Hausnerjevo razmerje
1-10	odlične	1,00-1,11
1-15	dobre	1,12-1,18
16-20	zmerne	1,19-1,25
21-25	sprejemljive	1,26-1,34
26-31	slabe	1,35-1,45
32-37	zelo slabe	1,46-1,59
>38	zelo, zelo slabe	>1,60

1.6.3 NASIPNI KOT

Merjenje nasipnega kota je posredna metoda za ugotavljanje kvantitativnih pretočnih lastnosti prahov, in je povezana z interpartikularno kohezijo delcev. Uporabljajo jo v različnih panogah znanosti. Velikost nasipnega kota je povezana s trenjem med delci ob gibanju. Za določanje nasipnega kota (α) moramo zmeriti višino (h) in polmer (r) stožca oz. trikotnika (slika 5), ki ga nasujejo delci prahu.

S podatki, ki jih tako dobimo lahko izračunamo nasipni kot s pomočjo enačbe 3:

$$\tan(\alpha) = \frac{h}{r} \quad (\text{enačba 3})$$



Slika 5: Prikaz določitve nasipnega kota (24)

Večje kot so privlačne sile med delci, ostrejši kot stožca oz. trikotnika tvorijo praški. Večje kot so privlačne sile med delci, slabše so pretočne lastnosti prahov. Večji kot je nasipni kot, slabše so pretočne lastnosti. Farmakopeja (Ph. Eur.7) navaja sedem razredov pretočnih lastnosti glede na izmerjen nasipni kot (preglednica IV) (22).

Preglednica IV: Razredi pretočnih lastnosti, v odvisnosti od izmerjenega nasipnega kota, po Ph. Eur.7

Pretočne lastnosti	kot (°)
odlične	25-30
dobre	31-35
zmerne	36-40
spremenljive	41-45
slabe	46-45
zelo slabe	56-65
zelo, zelo slabe	>66

1.7 TABLETE

Tablete so trdne farmacevtske oblike, ki vsebujejo enkratni odmerek ene ali več zdravilnih učinkovin. Izdelujemo jih tako, da enovito prostornino delcev stisnemo v tableto. Namenjene so predvsem peroralni uporabi. Nekatere zaužijemo cele, druge prej prežvečimo, raztopimo ali dispergiramo v vodi, nekatere pa zadržimo v ustih toliko časa, da razpadejo (25). Poleg ene ali več zdravilnih učinkovin lahko vsebujejo še pomožne snovi:

- polnila (za dopolnitev mase tablete) - škrob, laktoza, saharoza...;
- veziva: - koloidne raztopine: želatine, celuloznih etrov...;
- suha veziva: mikrokristalna celuloza...;
- razgrajevala (omogočajo razpad tablete):
 - z nabrekanjem: škrobi, alginska kislina, derivati celuloze;
 - z razvijanjem plina: citronska kislina, vinska kislina, Na-hidrogen karbonat, Ca-karbonat;
- prava drsila (za izboljšanje pretočnih lastnosti mase);
- maziva (za zmanjšanje trenja med granulatom in steno tabletirke);
- antiadhezive (za preprečevanje lepljenja na pečate);
- druge pomožne snovi (vlažila, barvila...) (17).

Tablete so običajno pravilni okrogli trdni valji, katerih spodnja in zgornja površina je ravna ali izbočena, robova pa sta lahko prirezana. Lahko imajo črte ali razdelilne zareze, simbol ali druge oznake. Tablete so lahko tudi obložene.

Razlikujemo več vrst tablet za peroralno uporabo:

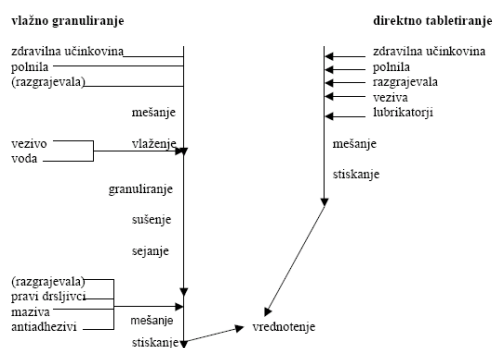
- neobložene,
- obložene,
- šumeče,
- tablete za peroralne raztopine,
- tablete za peroralne suspenzije,
- gastrozistentne tablete,
- tablete s prirejenim sproščanjem,
- tablete za lokalno uporabo v ustih.

Glede na način sproščanja zdravilne učinkovine pa jih delimo na:

- farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem,
- farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem (25).

1.7.1 IZDELAVA TABLET

Uspešen proces tabletiranja temelji na poznavanju osnovnih fizikalno-kemijskih lastnosti prahov, ki definirajo obnašanje delcev med procesom stiskanja. Za uspešnost postopka sta pomembni predvsem pretočnost in stisljivost praška (26). Proces izdelave tablet je v osnovi razdeljen na proces granulacije (vlažno ali suho granuliranje) ali proces neposrednega tabletiranja. Podrobnejši opis izdelave tablet je prikazan na sliki 6 (27).



Slika 6 : Tehnološki postopki pri izdelavi tablet (28)

- Granuliranje

Granulacija je proces aglomeracije, s katero se manjši delci združijo v večje kohezivne aglomerate, zaradi česar se jim izboljšata pretočnost in gostota, posledično pa tudi njihova stisljivost. Postopek vlažne granulacije se uporablja pogosteje kot postopek suhe granulacije. Pri prvem kot agregacijsko sredstvo uporabimo granulacijsko tekočino, pri drugem pa tako, da za izdelavo granul izvedemo visokotlačne obremenitve. Dobimo trde kompakte oz. brikete, ki jih nato z drobljenjem in sejanjem pretvorimo v ustrezne granule (29).

- Neposredno tabletiranje

Neposredno stiskanje je proces stiskanja prahov brez posebne predhodne obdelave. Snovi, ki so primerne za tovrstno stiskanje, morajo imeti dobre pretočne lastnosti in dobro stisljivost.

Prednost neposrednega tabletiranja je krajši čas izdelave in posledično nizki proizvodni stroški. Manjše so tudi težave s stabilnostjo na vlago občutljivih učinkovin, ki bi v nasprotnem primeru prišle v stik z granulacijsko tekočino.

Slabosti takega tabletiranja pa so problemi z razslojevanjem. Delež učinkovine je namreč omejen na 30% in zato ta postopek ni primeren za slabo pretočne praške. Materiali z majhno nasipno gostoto lahko privedejo do nastanka pretankih tablet (17, 27).

Snovi za neposredno tabletiranje morajo imeti ustrezne pretočne lastnosti ter dobro stisljivost.

Pomožne snovi ki se uporabljajo pri tovrstnem stiskanju tablet:

Ogljikovi hidrati: laktoza, dekstroza, sorbitol, manitol, škrob...,

Celulozni derivati: mikrokristalna celuloza,

Anorganske substance: kalcijev sulfat... (17).

- Proces stiskanja tablet

Tablete oblikujemo s stiskanjem v tabletirkah. Bistveni deli takega aparata so zgornji in spodnji pečat, matrica in polnilni lijak. Spodnji pečat se v matrici spusti, v matrico pa se nato natrese tabletirna zmes, ki jo zgornji pečat stisne v tableto. Nato se dvigne spodnji pečat, čolniček pa dvignjeno tableto odstrani skozi vodilo in ponovno napolni matrično vdolbino.

Po principu delovanja ločimo tabletirke na udarec (ekscentrične) in rotirke. Pri ekscentričnih tabletirkah se giblje polnilni lijak, tableta pa se stisne z zgornjim pečatom. Pri rotirkah se gibljejo matrice, tableto pa stiskata oba pečata. Razlika je tudi v zmogljivosti. Rotirka namreč lahko v enem ciklu stisne naenkrat toliko tablet, kolikor je pečatov, ekscentrična pa le eno tableto hkrati (17, 27).

Pri tabletiranju se večkrat pojavijo različne težave, ki izvirajo iz pomanjkljive priprave granulata oz. neustrezne tabletirne zmesi (pri direktnem stiskanju) ali neustrezne nastavitve tabletirke. Možni vzroki za težave pri tabletiranju so prikazani v preglednici V.

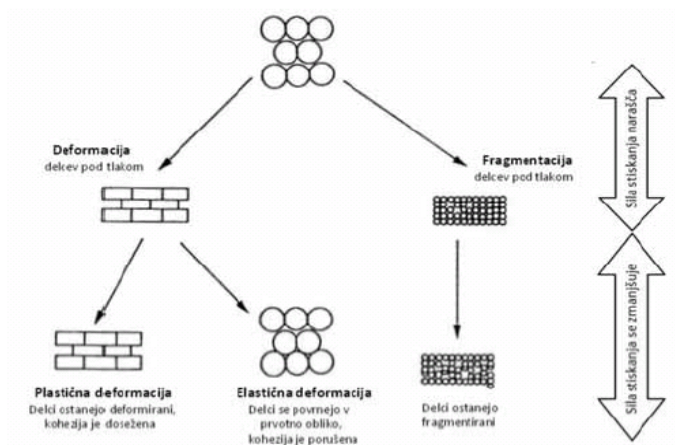
Preglednica V : Možni vzroki za težave pri tabletiranju (17, 27, 30).

TEŽAVE	VZROKI
veliko odstopanje v masi	neenakomeren granulat, nepretočen ali slabo pretočen granulat
nezadostna trdnost	↓ tlak, ↓ veziva
lepljenje na pečate	↓ drsljivcev, ↓ tlak, prevlažen granulat
razslojevanje table	↑ tlak, presuh granulat, premalo veziva
nezadostna razpadnost	↑ tlak, ↑ veziva, ↓ razgrejeval

(↓-premalo/premajhen, ↑-preveč/prevelik)

V začetni fazi tabletiranja, med vsutjem prahu v matrično vdolbino, pride zaradi nizkega tlaka stiskanja do zmanjšanja navideznega volumna zmesi, in sicer zaradi preurejanja delcev ter posledične odstranitve zraka med njimi. Manjši delci se porazdelijo v prazne prostore med večjimi, zaradi česar gostota delcev naraste . Pri povečanem tlaku, ko zgostitev zaradi preurejanja delcev ni več možna, pa pride do reverzibilne elastične deformacije na stičnih ploskvah. S tem se delci prilagodijo naraščajoči obremenitvi. Ko naraščajoča sila stiskanja postopoma postane močnejša od intramolekularnih sil, pride do ireverzibilne plastične deformacije, kot je prikazano na sliki 7. Če pa silo stiskanja še povečujemo, pride v končni fazi do fragmentacije oz. loma delcev (26).

Za tabletiranje je ugodneje, če so delci pravilnih, okroglih oblik, saj tisti z izrazito nepravilnimi oblikami med stiskanjem oblikujejo prazne prostore, v katere se ujame zrak. To pa lahko povzroči manjšo trdnost tablet (26).



Slika 7: Različni mehanizmi deformacije delcev (26)

2 NAMEN DELA

Liofilizati so običajno rahli, nepretočni praški, ki niso primerni za izdelavo tablet oz. kapsul. V okviru naloge bomo zato ovrednotili vplive različnih pomožnih snovi dodanih pred ali po liofilizaciji, kot tudi vplive različnih procesnih parametrov samega postopka na pretočnost in stisljivost liofilizatov. Izdelali bomo placebo vzorce, ter vzorce z modelno, dobro topno nizkomolekularno zdravilno učinkovino (natrijev alendronat) ter visokomolekularno modelno molekulo (goveji serumski albumin).

Vsem liofilizatom bomo določili pretočne lastnosti, in sicer z merjenjem pretočnih časov ter s posrednimi metodami ugotavljanja nasipnih kotov in Carrovega indeksa. Rezultate bomo interpretirali ter jih med seboj primerjali z dvostranskim t-testom. Ocenili bomo tudi zmožnost pretvorbe liofilizatov v končno farmacevtsko obliko – tablete.

Skušali bomo določiti tiste pomožne snovi in njihove koncentracije ter procesne parametre, ki izboljšajo pretočnost in stisljivost liofilizatov z uporabljenima modelnima učinkovinama ter omogočajo izdelavo kvalitetnih tablet oz. kapsul.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

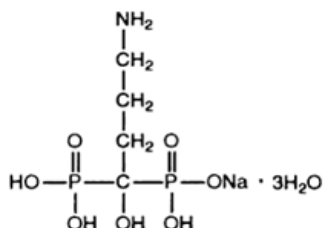
Učinkovine:

Natrijev alendronat, Gedeon Richter, Madžarska

Je kristaliničen nehigroskopen prašek. Topen je v vodi, zelo težko topen v alkoholu ter skoraj netopen v kloroformu. Molska masa je 325,12 g/mol. (slika 8)

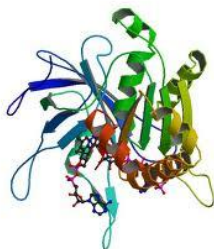
pKa učinkovine: pK₁ = 0,8
 pK₂ = 2,2
 pK₃ = 6,3
 pK₄ = 10,9

Njegova molekulska formula je C₄ H₁₂ N Na O₇ P₂·3H₂O, temperatura tališča pa 260 °C. Uvrščamo ga med bisfosfonate. Uporablja se za zdravljenje osteoporoze, ker zavira raztapljanje hidroksiapatita in s tem resorpcijo kosti. Poveča se kostna masa, s tem pa se posledično zmanjša možnost zlomov kolka, zapestja in vretenc (31, 32).



Slika 8: Natrijev alendronat: natrijev (4-amino-1-hidroksibutiliden) bisfosfonat

Goveji serumski albumin –BSA, Sigma-Aldrich, ZDA



Slika 9: Model tridimenzionalne strukture-govejega serumskega albumina (BSA)

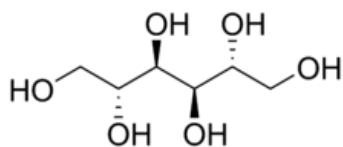
Goveji serumski albumin (slika 9) je globularni protein, prisoten v krvni plazmi govedi. Je glavni plazemski protein in ima dobro vezavno sposobnost za vodo, Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , maščobne kisline, hormone, bilirubin in tudi nekatere zdravilne učinkovine. Njegova osnovna funkcija je regulacija osmotskega tlaka v krvi, poleg tega pa je tudi glavni prenašalec Zn^{2+} (40, 41).

Predstavlja približno polovico beljakovin v plazmi in je najbolj stabilna in topna beljakovina v plazmi. Molekula je zgrajena iz 583 aminokislinskih ostankov, njena molekulska masa je 66,5 Kda, njena izoelektrična točka v vodi pri 25 °C pa je 4,7 (33, 34).

Pomožne snovi:

D-Manitol, Sigma-Aldrich, ZDA

Manitol (slika 10) je dostopen v obliki belega kristaliničnega praška ali granul in je lahko topen v vodi. V farmaciji se uporablja kot polnilo pri izdelavi tablet, saj ni higroskopen. Zato je uporaben tudi v kombinaciji z učinkovinami občutljivimi na vlago in kot sredstvo proti sprijemanju. Se enostavno suši, zato se uporablja za izdelavo granulatov. Pogosto ga uporabljajo pri liofilizaciji, saj kristalizira in zato tvori homogeno pogačo, s čimer izboljša videz liofiliziranega izdelka (35, 37).

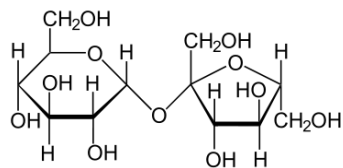


Slika 10: Manitol- $\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$ – heksan-1,2,3,4,5,6-heksol

Saharoza, Suedzucker AG, Nemčija

Je disaharid, sestavljen iz glukoze in fruktoze (slika 11). Je bel kristaliničen prah s sladkim okusom. Uporablja se kot popravljalet okusa, sladilo v žvečljivih tabletah in pastilah, polnilo za tablete in kapsule, jedro praznih tablet, vezivo, zgoščevalo, konzervans ali kot suspendirajoče sredstvo. Na področju liofilizacije se uporablja kot stabilizator, ki ščiti

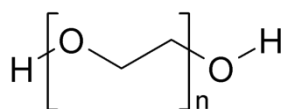
proteine pred stresnimi pogoji med zamrzovanjem (krioprotektant) in sušenjem (lioprotektant) (35, 37).



Slika 11: Struktura saharoze

Polietilenglikol 6000 -PEG 6000, Clariant GMBH, Nemčija

Je polietilenglikol (slika 12) z molsko maso 7.000-9.000 g/mol. Je bela ali skoraj bela trdna snov z voskastim ali parafinskim videzom. Uporablja se v dražirnih prevlekah kot mehčalo, suspendirajoče sredstvo in za povečanje viskoznosti. Na področju liofilizacije se uporablja kot sredstvo za povečanje volumna in kot stabilizator (35, 37).



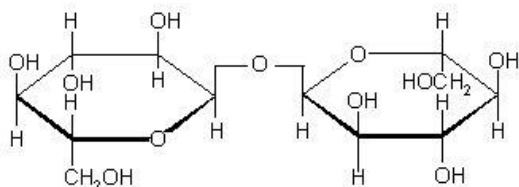
slika 12: Struktura polietilenglikola 6000 ($n > 3$)

NaCl, Merck KGAA, Nemčija

Sol je bel kristaliničen prah, slanega okusa in dobro topen v vodi. Je pogosto uporabljena sestavina tekočih farmacevtskih izdelkov, predvsem raztopin, v katerih primarno uravnava izotoničnost (35).

Trehaloza, Sigma-Aldrich, ZDA

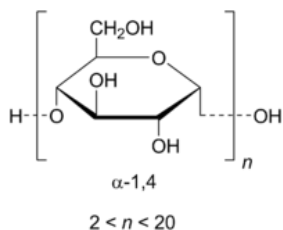
Je nereducirajoči sladkor sestavljen iz dveh glukoznih enot med katerima se tvori vez 1,1 α (slika 13). Trehaloza je odporna na kislno hidrolizo, in prenese visoko temperaturo. V farmaciji se uporablja kot zaščitno sredstvo za proteine (35, 37).



Slika 13: Struktura trehaloze

Maltodekstrin, Merkur trgovina in storitve, Slovenija

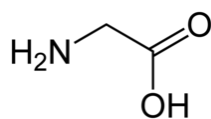
Sestavljen je iz zmesi glukoze, oligosaharidov in polisaharidov, zgrajenih iz D-glukoznih enot, povezanih z glikozidnimi vezmi 1,4- α in 1,6- α (slika 14). Nastane po hidrolizi škroba. Ima obliko belega higroskopskega prahu ali zrnca s sladkim okusom, je brez vonja in je topen v vodi. Uporablja se kot popravljač okusa, polnilo v tabletah in kapsulah, vezivo v tabletah ter kot zgoščevalac v raztopinah (35, 37).



Slika14: Struktura maltodekstrina

Glicin, Sigma-Aldrich, ZDA

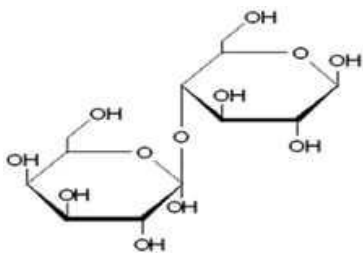
Glicin je kemijsko 2-amino očetna kislina (slika 15). Je bel kristaliničen prah, ki je dobro topen v vodi. Na področju liofilizacije se uporablja kot pomožna snov, ki lahko kristalizira med zamrzovanjem ter tako izboljša fizikalno stabilnost pogače liofilizata (10).



slika 15: Struktura glicina

Laktoza, sušena z razprševanjem, DMV Fronterra excipients, Nizozemska

Je mešanica amorfne laktoze in monohidrata laktoze. Laktoza je disaharid, zgrajen iz glukoze in galaktoze, ki sta povezani z glikozidno vezjo 1,4- β (slika 16). Je bel do umazano bel kristaliničen prah, brez vonja in rahlo sladkega okusa. Uporablja se kot polnilo v tabletah, vezivo ter kot sredstvo za izboljšanje pretočnih lastnosti pri neposrednem tabletiranju (35).



Slika 16: Struktura laktoze

Mikrokristalna celuloza (Avicel® PH 200) , FMC BioPolymer, ZDA

Mikrokristalna celuloza s povprečno velikostjo delcev 200 μm , izboljša pretočne lastnosti tabletne zmesi pri neposrednem stiskanju ter pomaga zagotavljati enakomernost vsebnosti in mase tablet (35).

Koloidni silicijev dioksid (Aerosil®200), Evonik Degussa GmbH, Nemčija

Je zelo hidrofobno drsilo. Velikost njegovih delcev je 20 nm, specifična površina pa $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET). Optimalna koncentracija tega drsila je 0,5-2,0 %.

Zaradi majhne velikosti delcev obloži granulat, in s tem zmanjša njegovo trenje. Deluje tudi kot lovilec vlage in plinov ter poveča razdaljo med delci in s tem zmanjša privlačne sile med njimi. Z zvišanjem njegove koncentracije povečujemo trdnost tablet (21, 38).

Sintetični amorfni silikat (Syloid®244 FP), Grace Division, Grčija

Na voljo je v obliki belega pretočnega praška. Ima zelo visoko čistoto in je brez okusa in vonja. Njegova vsebost pH je med 5,0-8,0. Velikost njegovih delcev je med 3,5-12 μm . Je porozen, ima veliko specifično površino in zato veliko afiniteto do vlage. Zato ohranja praške suhe in pretočne in je še posebej primeren za tiste peroralne oblike, ki vsebujejo zdravilno učinkovino občutljivo na vlago (36).

Smukec, Imerys Talc Italy S.p.A, Italija

Je kristaliničen prah brez vonja, ki je masten na dotik. Gre za prečiščen, uprašen, hidriran magnezijev silikat, v katerem so lahko prisotne tudi majhne količine aluminijevega silikata in železa. Hitro se prime na kožo.

V farmaciji se uporablja kot drsilo za tablete in kapsule, mazivo, polnilo v tabletah in kapsulah. Je tudi pogosta sestavina dermalnih farmacevtskih oblik in kozmetičnih izdelkov (35, 37).

Magnezijev stearat, Mallinckrodt chemical inc., ZDA

Je zmes magnezijevih soli različnih organskih kislin, v katerih prevladujeta stearat in palmitat. Ima obliko drobnega, oborjenega ali zmletega belega ali svetlo rumenega prahu. Je masten na otip in se hitro prilepi na kožo. Uporablja se kot mazivo, antiadheziv ter drsilo pri tabletah in kapsulah (35, 37).

Prečiščena voda, Lek d.d, Slovenija

Če ni drugače utemeljeno in predpisano je prečiščena voda namenjena izdelavi zdravil, izjema so tista zdravila, pri katerih je zahtevana sterilnost in apirogenost. Pridobivamo jo iz pitne vode z destilacijo, ionsko izmenjavo, reverzno osmozo ali s katerim drugim ustreznim postopkom (25).

3.2 NAPRAVE

Liofilizator Lio 5P, Kambič, Slovenija

Tabletirka EK-O, Korsch, Nemčija

Aparatura za merjenje pretočnosti, Pharmatest PTGS, Nemčija

Mehanski stresalnik, Erweka SVM, Erweka, Nemčija

Aparatura za merjenje trdnosti tablet HC 97, Kraemer, Nemčija

Analitska tehtnica, XP 205, Mettler Toledo, Švica

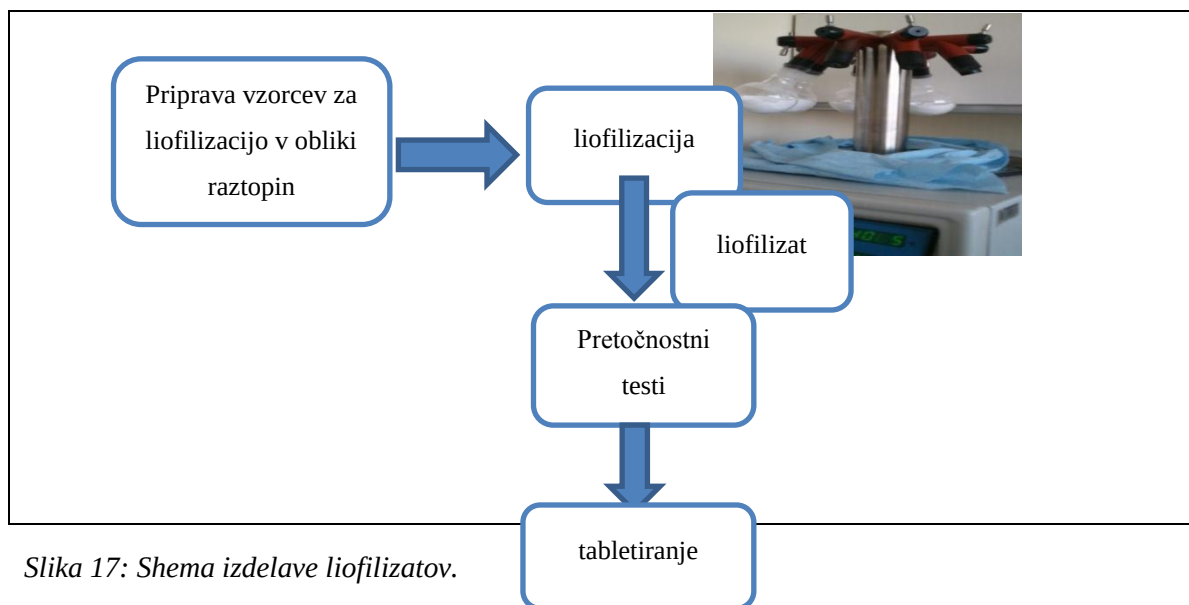
Precizna tehtnica, BP 1200, Sartorius laboratory, Nemčija

Magnetno mešalo, MST digital IKA, Nemčija

3.3 METODE DELA

Pripravili smo vzorce v obliki raztopin oz. suspenzij, ki smo jih liofilizirali. Dobljenim liofilizatom smo nato z različnimi testi določili pretočne lastnosti. Najboljše med njimi smo na koncu stisnili v tablete.

Potek našega dela je predstavljen v obliki sheme na sliki 17.



Slika 17: Shema izdelave liofilizатов.

3.3.1 PRIPRAVA RAZTOPIN IN SUSPENZIJ ZA LIOFILIZACIJO

Za liofilizacijo moramo najprej pripraviti ustrezne raztopine oz. suspenzije. Mi smo jih pripravili s 100 ml vode in z različnimi dodatki. Sestava vseh preučevanih vzorcev so zbrane v preglednicah od VI do VIII.

Za pripravo ustreznega liofilizata je pomemben dodatek sredstev za povečanje trdnega deleža, za kar smo uporabili sladkorje (manitol, saharoza, maltodekstrin, trehaloza...), glicin ter polimer PEG 6000. Sladkorji služijo tudi kot stabilizatorji. Poleg omenjenih sestavin smo uporabili še polnili (laktoza in Avicel®), drsili (Aerosil® in Syloid®) in sol (natrijev klorid). Pripravili smo vzorce z manitolom in dodatkom bodisi ene (dvokomponentni vzorci) ali dveh snovi (trikomponentni vzorci) ter tudi vzorce brez manitola (preglednica VI). Za manitol smo se odločili, ker je to sladkor, ki se najpogosteje uporablja za liofilizacijo, saj med postopkom kristalizira in zato tvori homogeno pogačo, ki izboljša videz liofiliziranega izdelka. Tistim placebo vzorcem, ki so imeli najboljše pretočne čase smo dodali še 10% (m/m, glede na vsebnost suhe snovi) zdravilne

učinkovine, in sicer bodisi natrijevega alendronata ali BSA (preglednici VII in VIII). Po 50 ml vsake raztopine oz. suspenzije vzorca smo nato z merilnim valjem prelili v ustrezno število bučk. Po 5 ml vzorcev pa smo s pipeto prenesli v ustrezno število vial. Vse pripravljene vzorce smo nato liofilizirali.

Preglednica VI: Placebo vzorci.

Številka vzorca	IME VZORCA	SESTAVA VZORCA	KONCENTRACIJA SUHE SNOVI V VZORCU (mg/ml)	DELEŽ SUHE SNOVI V VZORCU (m/m) (%)	VSEBNIK ZA LIOFILIZACIJO (VIALE/BUČKE)
1	MAN	3400 mg MANITOLA 100 ml VODE	34mg/ml	3,4%	BUČKA
2	MAN+SAH+NaCL 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg NaCL 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
3	MAN+SAH+AERO 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
4	MAN+NaCL 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg NaCL 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
5	MAN+SYLOID 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SYLOID 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
6	MAN+AERO 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
7	MAN+TREHALOZA 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg TREHALOZE 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
8	MAN+PEG 0,5:0,5	850 mg MANITOLA 850 mg PEG 6000 100 ml VODE	17 mg/ml	1,7%	VIALE
9	MAN+AERO 1:2	1700 mg MANITOLA 3400 mg AEROSILA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
10	TREHALOZA+AERO 1:1	1700 mg TREHALOZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
11	MALTODEKSTRIN+AERO 1:1	1700 mg MALTODEKSTRINA 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
12	GLICIN+AERO 1:1	1700 mg GLICINA 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
13	SAH+AERO 1:1	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
14	MAN+SAH 1:1	1700 mg MANITOL 1700 mg SAHAROZA 100 ml VODE	34mg/ml	3,4%	VIALE
15	MAN+AERO 1:0,5	1700 mg MANITOLA 850 mg AEROSILA 100 ml VODE	25,5 mg/ml	2,6%	VIALE
16	MAN+LAKTOZA 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg LAKTOZA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE

17	MAN+SAH+TREHALOZA 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg TREHALOZA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
18	MAN+SAH +LAKTOZA 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg LAKTOZE 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
19	MAN+SAH +PEG 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg PEG 6000 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
20	MANITOL+AVICEL200 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg AVICEL200 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	VIALE
21	MANITOL+AVICEL200 1:2	1700 mg MANITOLA 3400 mg AVICEL200 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	VIALE
22	MAN+SAH+AERO 1:1:1-21°C	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	BUČKE
23	SAH+AERO 1:1-21°C	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	BUČKE
24	MAN+SAH+AERO 1:1:1-27°C	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	BUČKE
25	SAH+AERO 1:1-27°C	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	BUČKE
26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	51 mg/ml	5,1%	BUČKE
27	SAH+AERO 1:1	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	BUČKE
28	MAN+PEG 0,5:0,5	850 mg MANITOLA 850 mg PEG 6000 100 ml VODE	17 mg/ml	1,7%	BUČKE
29	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	850 mg MANITOLA 850 mg SAHAROZE 850 mg AEROSILA 100 ml VODE	25,5 mg/ml	2,6%	BUČKE
30	SAH+AERO 0,5:0,5	850 mg SAHAROZA 850 mg AEROSIL 100 ml VODE	17 mg/ml	1,7%	BUČKE
31	MAN+PEG 1:1	1700 mg MANITOLA 1700 mg PEG 6000 100 ml VODE	34 mg/ml	3,4%	BUČKE

Preglednica VII: Vzorci z Natrijevim alendronatom

Številka vzorca	IME VZORCA	SESTAVA VZORCA	KONCENTRACIJA SUHE SNOVI V VZORCU (mg/ml)	DELEŽ SUHE SNOVI V VZORCU (m/m) (%)	VSEBNIK ZA LIOFILIZACIJO (VIALE/BUČKE)
32	MAN+SAH+AERO 1:1:1+10% Na ALENDRONAT	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 510 mg Na alendronat 100 ml VODE	56 mg/ml	5,6%	BUČKE

33	SAH+AERO 1:1+ 10% Na ALENDRONAT	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 340 mg Na alendronat 100 ml VODE	37 mg/ml	3,7 %	BUČKE
34	MAN +PEG 1:1+ 10% Na ALENDRONAT	1700 mg MANITOLA 1700 mg PEG 6000 340 mg Na alendronat 100 ml VODE	37 mg/ml	3,7%	BUČKE
35	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5+ 10% Na ALENDRONAT	850 mg MANITOLA 850 mg SAHAROZE 850 mg AEROSILA 255 mg Na alendronat 100 ml VODE	28 mg/ml	2,8%	BUČKE
36	SAH+AERO 0,5:0,5+10% Na ALENDRONAT	850 mg SAHAROZE 850 mg AEROSILA 170 mg Na alendronat 100 ml VODE	19 mg/ml	1,9 %	BUČKE
37	MAN+PEG 0,5:0,5+ 10% Na ALENDRONAT	850mg MANITOLA 850 mg PEG 6000 170mg Na alendronat 100 ml VODE	19 mg/ml	1,9%	BUČKE

Preglednica VIII: Vzorci z BSA

Številka vzorca	IME VZORCA	SESTAVA VZORCA	KONCENTRACIJA SUHE SNOVI V VZORCU (mg/ml)	DELEŽ SUHE SNOVI V VZORCU (m/m) (%)	VSEBNIK ZA LIOFILIZACIJO (VIALE/BUČKE)
38	MAN+SAH+AERO 1:1:1+10% BSA	1700 mg MANITOLA 1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 510 mg BSA 100 ml VODE	56 mg/ml	5,6%	BUČKE
39	SAH+AERO 1:1 +10% BSA	1700 mg SAHAROZE 1700 mg AEROSILA 340 mg BSA 100 ml VODE	37 mg/ml	3,7%	BUČKE
40	MAN+ PEG 1:1+10% BSA	1700 mg MANITOLA 1700 mg PEG 6000 340 mg BSA 100 ml VODE	37 mg/ml	3,7%	BUČKE
41	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5+10% BSA	850mg MANITOLA 850 mg SAHAROZE 850 mg AEROSILA 255 mg BSA 100 ml VODE	28 mg/ml	2,8%	BUČKE
42	SAH+AERO 0,5:0,5+10% BSA	850 mg SAHAROZE 850 mg AEROSILA 170 mg BSA 100 ml VODE	28 mg/ml	2,8%	BUČKE
43	MAN+PEG 0,5:0,5 +10% BSA	850 mg MANITOLA 850 mg PEG 6000 170 mg BSA 100 ml VODE	19 mg/ml	1,9%	BUČKE

3.3.2 LIOFILIZACIJA

Po opisani pripravi raztopin oz. suspenzij smo le-te liofilizirali v liofilizatorju Lio 5P (Kambič, Slovenija). Tik pred liofilizacijo smo vzorce v vialah in bučkah zamrznili v tekočem dušiku. To smo storili tako, da smo viala s pinceto pomakali v tekoči dušik, bučke pa smo ob potapljanju vanj ves čas vrteli, da se je vzorec enakomerno zamrzoval. Viala smo le delno pokrili s čepi, da smo omogočili sublimacijo vode, jih postavili na pladnje in

jih takoj prenesli v liofilizator. Bučke pa smo nataknili na posebne nastavke liofilizatorja (slika 18). Liofilizator oz. njegov kondenzator se je pred tem že ohladil na delovno temperaturo (-100 °C). Takoj po namestitvi vzorcev smo vklopili vakuumsko črpalko, ki je vzpostavila tlak približno 0,03 mbar. Ker liofilizator ni imel možnosti regulacije tlaka in temperature, so vsi eksperimenti potekali pri omenjenih pogojih. Čas liofilizacije je bil 24 ur tako za vzorce v vialah in bučkah. Po končanem postopku smo bučke sneli z nastavkov, jih pokrili s parafilmom ter jih postavili v eksikator. Enako smo storili tudi z vzorci liofiliziranimi v vialah. Liofilizate smo ovrednotili in razvrstili glede na njihov izgled. Pri konstantni zunanji temperaturi v laboratoriju, ki se je gibala med 20 in 22 °C. Dva vzorca pa smo pripravili pri ekstremnih pogojih. Nižjo temperaturo liofilizacije smo dosegli z odprtjem okna med časom celotne liofilizacije (temperatura zunanjega zraka okoli 0 °C). Visoko temperaturo (27-30 °C) pa smo dosegli s povečanim gretjem.



Slika 18: Nastavek za bučke liofilizatorja Lio 5P.

3.3.3 PRETOČNOST IN NASIPNI KOT LIOFILIZATOV



Slika 19: Aparatura Pharmatest PTGS za merjenje pretočnosti in nasipnega kota.

Pretočne lastnosti smo določili z aparaturo za merjenje pretočnih časov (slika 19). Ker sami liofilizati niso bili pretočni, smo jim dodajali pomožne snovi, in sicer polnila in drsila. Kot polnili smo uporabili laktozo in mikrokristalno celulozo (Avicel® PH-200), kot drsili pa koloidni silicijev dioksid (Aerosil® 200) in smukec.

Vsakemu vzorcu smo najprej dodali prvi odmerek pomožnih snovi (PS), in sicer enak masni delež polnila kot je bila masa liofilizata (100% polnila). Drugi dodatek PS je bil 1% (m/m) drsila, tretji pa 400% (m/m) polnila in 1% (m/m) drsila. Po vsakem dodatku PS smo zmesi praškov premešali v pateni in jih presejali skozi sito velikosti 0,7 mm. Za tehtanje smo uporabljali analitsko tehtnico. Dobljenim praškom smo po vsakem dodatku PS izmerili pretočne lastnosti, in sicer tako, da smo vsakega od njih vsuli v lij ter merili čas, ko je ves iztekel iz njega. Za lažje iztekanje smo uporabili mešalo, ki je enakomerno mešalo praškasto zmes. Nato smo prašek, ki je stekel iz lija na pladenj, stehali. Sočasno s pretočnim časom smo na isti napravi merili tudi nasipni kot. Laser je meril kot stranice stožca, ki se je oblikoval na ravnini iztoka iz lija. Za vsako serijo (različen dodatek PS) smo naredili tri ponovitve, kot to predpisuje Ph. Eur. 7 v poglavju 2.9.16 –Flowability. Pretočne čase smo za 100 g praška podali na desetinko sekunde natančno ter v stopinjah za nasipni kot. Po vsaki od treh meritev posameznega vzorca smo lij spihali s stisnjenim zrakom, med poskusi z različnimi vzorci pa še sprali z vodo in etanolom.

3.3.4 CARROV INDEKS IN HAUSNERJEVO RAZMERJE

Vsak vzorec smo vsuli v 100 ml valj in mu določili nasipni volumen (V_{nasipni}). Evropska farmakopeja za izvedbo tega testa predpisuje 250 ml valj, mi pa smo zaradi majhnih volumnov vzorca uporabili 100 ml. Merilni valj z vsakim posameznim vzorcem smo postavili na mehanski stresalnik in ga pretresli s 1.250 udarci. Nato smo odčitali zbiti volumen vzorca (V_{zbiti}). Iz dobljenih rezultatov smo s pomočjo enačb, navedenih v poglavju 1.6.2, izračunali Carrov indeks in Hausnerjevo razmerje.

3.3.5 IZDELAVA TABLET

Iz vzorcev, ki smo jim določili najboljše pretočne lastnosti, smo izdelali tablete, in sicer z metodo neposrednega stiskanja v tabletirki Korsch. Uporabili smo okrogel pečat s premerom 9 mm in ravno površino. S spreminjanjem lege zgornjega pečata smo dosegli

želeno trdnost tablet, s spreminjanjem lege spodnjega pa njihovo ustrezno maso. Tablete smo izdelali iz zmesi liofilizatov z dodatki treh pomožnih snovi, in sicer vsebovala liofilizat in 500% polnila (laktoze) in 2% drsila (Aerosila) (m/m). Da smo preprečili lepljenje na pečate smo zmesi za tabletiranje dodali še 2% (m/m) magnezijevega stearata ter z njim namazali tudi zgornji pečat. Končno zmes smo zaradi majhne mase v tabletirko polnili ročno. Glede na lastnosti prahov in tablet (razmerje med premerom in debelino tablet) je bila ciljna masa tablet med 300 in 400 mg, trdnost pa približno 60 N. Vsaki tableti smo stehali maso s precizno tehniko, ter izmerili njeno debelino in trdnost. V vsaki seriji smo stisnili 15 tablet ter določili povprečne vrednosti omenjenih parametrov ter njihove SD in RSD.

3.3.6 OBDELAVA PODATKOV

Rezultate smo podali v obliki srednjih vrednosti s standardnimi odkloni.

Vse podatke smo tudi statistično obdelali, pri čemer smo uporabili dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$. Enakost varianc smo predhodno preverili z F-testom.

Postavili smo ničelno hipotezo, in sicer, da se primerjajoča vzorca ne razlikujeta v pretočnih lastnostih, pri čemer bo vrednost p večja od 0,05. Za alternativno hipotezo pa velja, da se primerjana vzorca razlikujeta v pretočnih lastnostih, ko je vrednost p manjša od 0,05.

Vzorci smo primerjali med seboj glede na dodatke različnih drsil in polnil, uporabo različnih liofilizacijskih pogojev in glede na sam postopek liofilizacije.

Preverili smo tudi korelacijo med rezultati pretočnih lastnosti vzorcev, pridobljenimi z različnimi metodami merjenja (pretočni čas, Hausnerjevo razmerje, nasipni kot). V ta namen smo uporabili linearno regresijo. Determinacijski koeficient (R^2) je merilo moči povezanosti. Njegove vrednosti so lahko od 0 do 1. Vrednost 1 pomeni popolno ujemanje med podatki, vrednost 0 pa, da statistična korelacija med podatki ne obstaja.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZGLED POGAČE LIOFILIZATOV

Po končani liofilizaciji smo ovrednotili izgled pogače, in sicer ko so bili vzorci še v bučkah oz. vialah vsakega od vzorcev. Nato smo vsakega od vzorcev vsuli v pateno in ga homogeno premešali ter ocenili izgled liofilizata. Vsa opažanja smo predstavili v preglednici IX.

Preglednica IX: Izgled pogače in liofilizata

Št.vzor ca	IME VZORCA	IZGLED POGAČE	IZGLED LIOFILIZATA
1	MAN	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
2	MAN+SAH+NaCL 1:1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
3	MAN+SAH+AERO 1:1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓↓elektrostatičen
4	MAN+NaCL 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
5	MAN+SYLOID 1:1	Rahla, puhasta	↓↓delci, ↓↓elektrostatičen
6	MAN+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓↓delci, ↓↓elektrostatičen
7	MAN+TREHALOZA 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
8	MAN+PEG 0,5:0,5	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
9	MAN+AERO 1:2	Rahla, puhasta	↓↓delci, ↓↓elektrostatičen
10	TREHALOZA+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
11	MALTODEKSTRIN+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
12	GLICIN+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
13	SAH+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
14	MAN+SAH 1:1	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
15	MAN+AERO 1:0,5	Rahla, puhasta	↓↓delci, ↓↓elektrostatičen
16	MAN+LAKTOZA 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↑elektrostatičen
17	MAN+SAH+TREHALOZA1:1:1	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↑elektrostatičen
18	MAN+SAH +LAKTOZA 1:1:1	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
19	MAN+SAH +PEG 1:1:1	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
20	MANITOL+AVICEL200 1:1	Zbita pogača, ↑↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↑elektrostatičen
21	MANITOL+AVICEL200 1:2	Zbita pogača, ↑↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↑elektrostatičen
22	MAN+SAH+AERO 1:1:1-21°C	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
23	SAH+AERO 1:1-21°C	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
24	MAN+SAH+AERO 1:1:1-27°C	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
25	SAH+AERO 1:1-27°C	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
27	SAH+AERO 1:1	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
28	MAN+PEG 0,5:0,5	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
29	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen

30	SAH+AERO 0,5:0,5	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
31	MAN+PEG 1:1	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
32	MAN+SAH+AERO 1:1:1+10% Na ALENDRONAT	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
33	SAH+AERO 1:1+10% Na ALENDRONAT	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
34	MAN +PEG 1:1:+ 10% Na ALENDRONAT	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
35	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5+ 10%Na ALENDRONAT	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
36	SAH+AERO 0,5:0,5+10% Na ALENDRONAT	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
37	MAN+PEG 0,5:0,5+10% Na ALENDRONAT	Zbita pogača, ↑kosmiči	Trdi ↑kosmiči, ↓elektrostatičen
38	MAN+SAH+AERO 1:1:1+10%BSA	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
39	SAH+AERO 1:1+10%BSA	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
40	MAN+ PEG 1:1+10%BSA	Vzorca nismo mogli liofilizirati	
41	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5+10%BSA	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
42	SAH+AERO 0,5:0,5+10% BSA	Rahla, puhasta	↓delci, ↓elektrostatičen
43	MAN+PEG 0,5:0,5 +10% BSA	Vzorca nismo mogli liofilizirati	

(↑-večji/bolj, ↓-manjši/manj, ↓↓-najmanjši/najmanj)

4.2 PRETOČNI ČAS IN NASIPNI KOT

Pri izvedbi metode za merjenje pretočnih časov in nasipnih kotov smo imeli na začetku težave s samim pretokom liofilizatov in ponovljivostjo rezultatov. Med delci liofilizatov so bili zaradi njihove majhnosti prisotne močne privlačne sile, poleg tega pa so se adherirali na stene lija in niso iztekali v celoti. Da bi vsaj delno odpravili to težavo, smo uporabili mešalo in tako dosegli popolno iztekanje praškov iz lija.

Zaradi velikosti laboratorijske aparature za liofilizacijo smo bili omejeni s količinami vzorcev, zato smo meritve izvajali z razmeroma majhnimi količinami vzorcev. To pa je bil vzrok za visoko variabilnost rezultatov. Po vsakem dodatku pomožnih snovi smo izvedli po tri meritve. Rezultate smo podali v obliki srednjih vrednosti na 100 g praška. Boljšo pretočnost so imeli vzorci s krajšim pretočnim časom.

Vzporedno s pretočnim časom smo izmerili tudi nasipni kot vsakega vzorca. Laser je meril kot plašča stožca, ki se oblikuje na ravnini iztoka iz lija. Tudi v tem primeru smo za vsak vzorec izvedli tri meritve. Večje kot so privlačne sile med delci, ostrejši kot stožca oz. trikotnika tvorijo praški. Večji kot je nasipni kot, slabše so pretočne lastnosti. Zaradi premajhnih volumnov vzorcev smo izmerjene nasipne kote obravnavali le informativno, zato te rezultate predstavljamo v prilogi.

Ker smo želeli dokazati, da je dodatek PS statistično značilno izboljšal pretočni čas, vrednost p mora biti pri tem manjša od 0,05, smo izvedli dvostranski t -test z $\alpha=0,05$. Vsak od dodatkov PS, ki je povzročil značilno spremembo pretočnega časa, smo v preglednici X pobarvali modro.

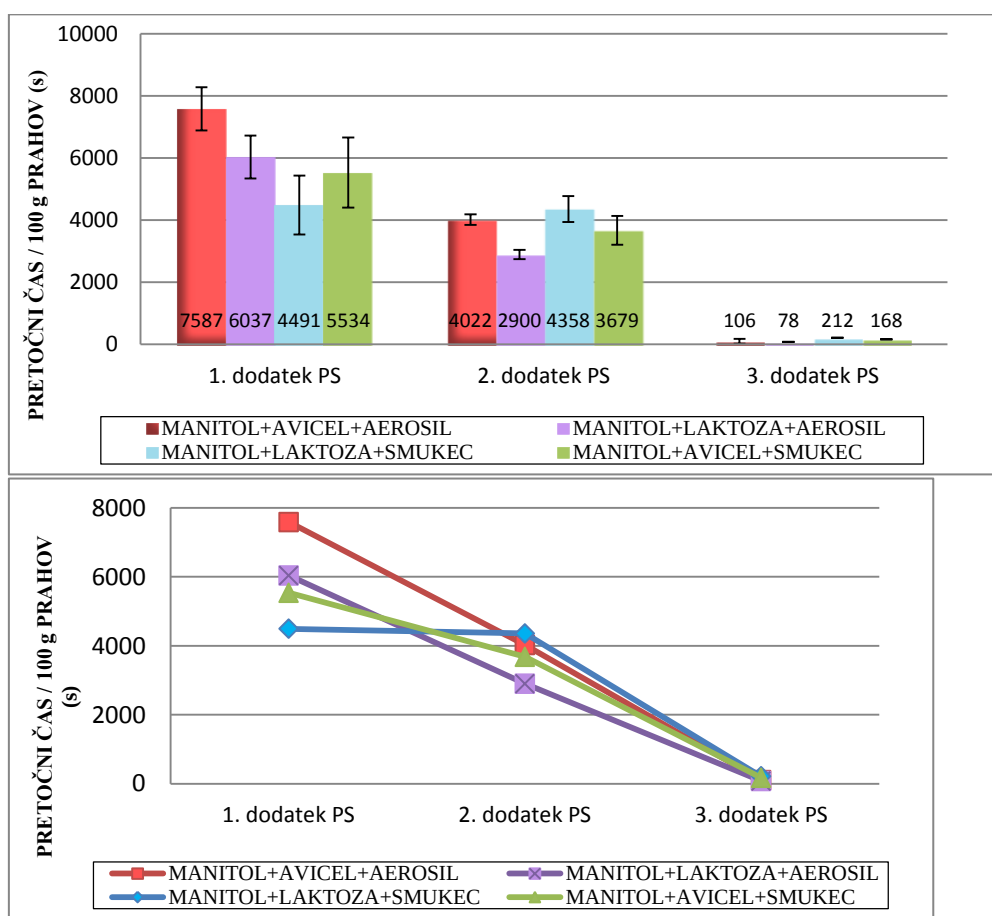
4.2.1 IZBIRA POMOŽNIH SNOVI

Primerjali smo vplive polnil, in sicer laktoze pridobljene s sušenjem z razprševanjem (laktoza SD) in mikrokristalne celuloze (Avicel 200®) v kombinaciji z drsiloma, smukcem in Aerosilom 200®, ki smo jih v različnih razmerjih dodajali liofiliziranemu manitolu. Želeli smo namreč ugotoviti katera kombinacija PS daje najbolj pretočne prahove. Sam liofilizat manitola ni imel pretočnih lastnosti, saj zaradi svoje narave ni sipljiv. V preglednici X lahko vidimo, da se je manitolu po 3. dodatku vseh štirih kombinacij PS statistično značilno izboljšal pretočni čas. Po 1. dodatku (100% polnila glede na maso manitola, slika 20) je imel najboljši pretočni čas vzorec manitola z dodatkom laktoze in smukca. Po 2. dodatku 1% drsila, glede na maso manitola in polnila ter po 3. dodatku 400% polnila in 1% drsila (polnilo glede na začetno maso manitola, drsilo pa glede na končno maso zmesi) pa je imel najboljši pretočni čas vzorec manitola z dodatkom laktoze in Aerosilia®. Poleg tega je dosegal tudi največjo stopnjo ponovljivosti meritev. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih kot pomožne snovi uporabili prav to kombinacijo PS.

Kot smo že omenili smo zaradi premajhnih volumnov vzorca nasipne kote obravnavali kot informativne. Te rezultate in njihove komentarje prikazujemo v prilogi te naloge.

Preglednica X: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva drsil na izboljšanje pretočnega časa. (Vsak dodatek PS, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnega časa smo v tabeli pobarvali modro).

Vzorc št. 1 (manitolu) smo dodali štiri različne kombinacije PS.	p-vrednosti		Primerjava pretočnih časov med 1. in 2. dodatkom PS	Primerjava pretočnih časov med 2. in 3. dodatkom PS
	Naziv vzorca			
1/1	MANITOL+AVICEL+AEROSIL	0,0009	0,0000	
1/2	MANITOL+AVICEL+SMUKEC	0,0576	0,0057	
1/3	MANITOL+LAKTOZA+AEROSIL	0,0015	0,0009	
1/2	MANITOL+LAKTOZA+SMUKEC	0,8339	0,0033	



Slika 20: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo vzorcev manitola po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

4.2.2 IZBIRA PLACEBO FORMULACIJE Z NAJBOLJŠIMI PRETOČNIMI LASTNOSTMI

Po izbiri kombinacije najboljšega polnila in drsila smo želeli ugotoviti, kateri placebo liofilizat bo imel najboljše pretočne lastnosti po dodatku prej omenjenih pomožnih snovi (laktose in Aerosila®). Med pregledom strokovne literature smo naredili izbor najpogostejše uporabljenih pomožnih snovi za liofilizacijo (sladkorji, polimeri, aminokisline...). Ugotovili smo, da je to manitol. Vzorce smo nato pripravljali tako, da smo manitolu dodali le eno (dvokomponentni vzorci) ali pa dve PS (trokomponentni vzorci). Štiri dvokomponentne vzorce pa smo pripravili tudi brez manitola. Zanimalo nas je namreč kako sprememba koncentracije trdnih snovi vpliva na kakovost liofilizata v smislu njegove

pretočnosti. Zato smo pripravili vzorce z različnimi koncentracijami trdnih snovi in tako dobili njihov nabor, ki je prikazan v preglednici XI. Vse te vzorce smo liofilizirali v vialah. Nekateri liofilizati so tvorili velike skupke, ki smo jih težko homogeno zmešali s polnilom, zato smo jih izločili iz našega izbora potencialnih formulacij primernih za tabletiranje, saj jim nismo mogli izmeriti pretočnih lastnosti.

Preglednica XI: Povprečni pretočni časi placebo vzorcev po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

Št. vzorca	$t_{\text{PRETOČNI}}/100\text{g (s)}$	1. dodatek PS	2. dodatek PS	3. dodatek PS
	ime vzorca			
2.	MAN+SAH+NaCL 1:1:1	4855,77	4551,28	26,67
3.	MAN+SAH+AERO 1:1:1	393,33	360,00	27,00
4.	MAN+NaCL 1:1	1716,67	1507,14	157,71
5.	MAN+SYLOID 1:1	2122,22	1930,56	134,44
6.	MAN+AERO 1:1	4705,42	4325,00	407,41
7.	MAN+TREHALOZA 0,5:0,5	6050,00	5800,00	202,22
8.	MAN+PEG 0,5:0,5	1460,00	1426,67	187,65
9.	MAN+AERO 1:2	2680,70	2640,35	228,79
10.	TREHALOZA+AERO 1:1	5583,33	5516,67	245,61
11.	MALTODEKSTRIN+AERO 1:1	1686,40	1594,30	185,79
12.	GLICIN+AERO 1:1	2430,77	2423,08	278,21
13.	SAH+AERO 1:1	756,86	778,43	116,56
14.	MAN+SAH 1:1	1415,16	1479,09	132,13
15.	MAN+AERO 1:0,5	2042,42	2030,30	255,76
16.	MAN+LAKTOZA 1:1	ZELO SLABO TEČE	ZELO SLABO TEČE	1324,40
17.	MAN+SAH +TREHALOZA 1:1:1	NI BILO MOGOČE IZMERITI		
18.	MAN+SAH+LAKTOZA 1:1:1	NI BILO MOGOČE IZMERITI		
19.	MAN+SAH+PEG 1:1:1	NI BILO MOGOČE IZMERITI		
20.	MANITOL+AVICEL ₂₀₀ 1:1	ZELO SLABO TEČE	ZELO SLABO TEČE	216,89
21.	MANITOL+AVICEL ₂₀₀ 1:2	ZELO SLABO TEČE	ZELO SLABO TEČE	169,67

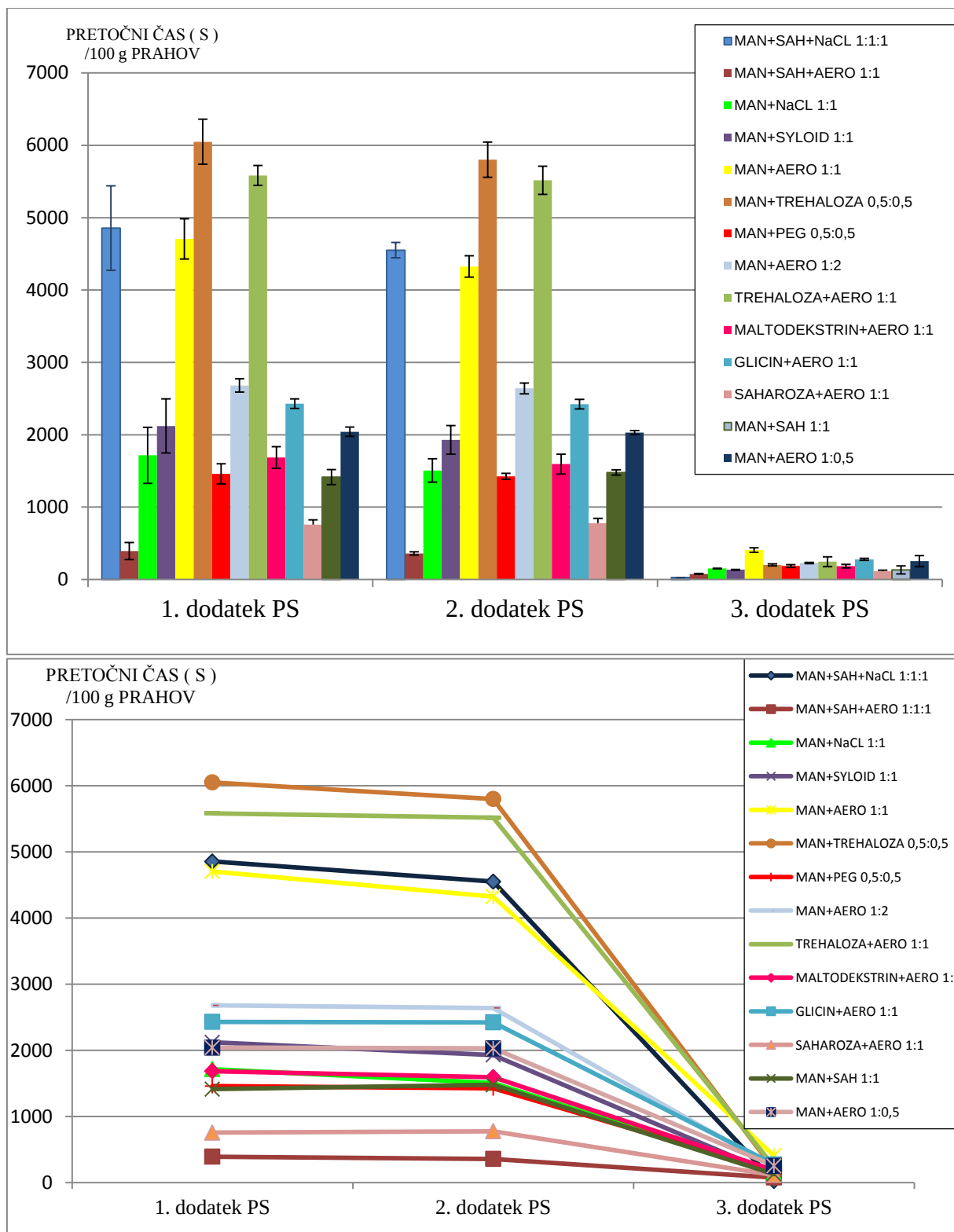
Z dvostranskim t-testom (preglednica XII) smo ugotovili, da je prišlo do statistično značilnega izboljšanja pretočnosti šele po tretjem dodatku PS.

Preglednica XII: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva drsil na izboljšanje pretočnega časa. (Vsak dodatek PS, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnega časa smo v tabeli pobarvali modro).

ŠT. VZORCA	p-vrednosti		Primerjava pretočnih časov med 1. in 2. dodatkom PS	Primerjava pretočnih časov med 2. in 3. dodatkom PS
	Ime vzorca			
1.	MAN+SAH+NaCL 1:1:1		0,4634	0,0002
2.	MAN+SAH+AERO 1:1:1		0,6763	0,0000
3.	MAN+NaCL 1:1		0,4357	0,0047
4.	MAN+SYLOID 1:1		0,4877	0,0040
5.	MAN+AERO 1:1		0,1046	0,0000
6.	MAN+TREHALOZA 1:1		0,3344	0,0000
7.	MAN+PEG 0,5:0,5		0,7128	0,0000
8.	MAN+AERO 1:2		0,5855	0,0003
9.	TREHALOZA+AERO 1:1		0,6534	0,0000
11.	MALTODEKSTRIN+AERO 1:1		0,4779	0,0001
12.	GLICIN+AERO 1:1		0,9329	0,0000
13.	SAH+AERO 1:1		0,7115	0,0024
14.	MAN+SAH 1:1		0,3672	0,0000
15.	MAN+AERO 1:0,5		0,7780	0,0000

(vzorci 16-21 niso bili pretočni)

Izbrali smo tri vzorce z najkrajšim pretočnim časom in največjo ponovljivostjo meritev. Kot najboljši (slika 21) se je izkazal placebo vzorec manitola, s saharozo in Aerosilom® (MAN+SAH+AERO 1:1:1), temu je sledil tisti s saharozo in Aerosilom® (SAH+AERO 1:1), tretji najboljši pa je bil sestavljen iz manitola in PEG 6000 (MAN+PEG 0,5:0,5). Te tri formulacije smo nato uporabili za nadaljnje raziskave.



Slika 21: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij z različnimi dodatki pomožnih snovi.

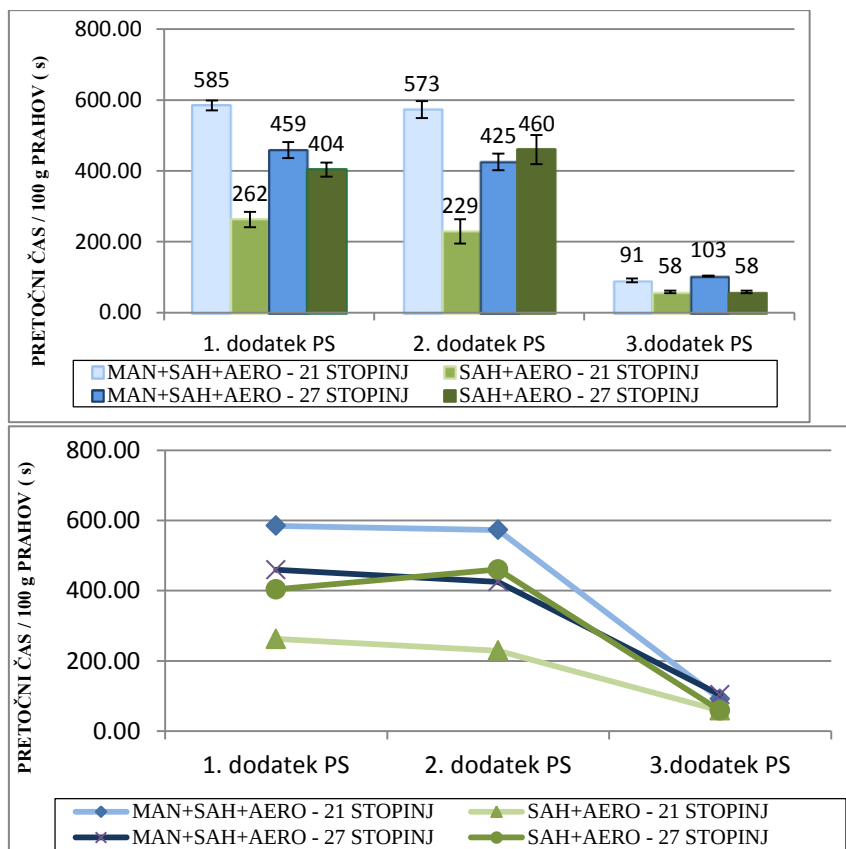
4.2.3 VPLIV TEMPERATURE NA PRETOČNOST LIOFILIZATOV

Ker liofilizacija v bučkah ne omogoča ustrezne kontrole temperature (T) in ker na uspešnost postopka neposredno vpliva T okolja, smo želeli preveriti prav vpliv te na lastnosti liofilizata. Zato smo naredili poskus pri ekstremno nizki in visoki T okolja. Pri T okoli 0 °C liofilizacija ni potekla. Domnevamo, da zato, ker je bila T okolja prenizka, da bi lahko potekla sublimacija. Pri T nad 30 °C pa so se zamrznjeni vzorci talili, še preden je bila sublimacija kočana, tako da postopek liofilizacije prav tako ni bil uspešen. Zato smo T znižali na 27 °C, pri čemer je liofilizacija potekala normalno. Za primerjavo smo vzeli vzorca z enako sestavo, pripravljena pri 21 °C, tako kot tudi vsi ostali preizkušeni vzorci. Ugotovili smo (preglednica XIII), da se mešanice manitola, saharoze in Aerosila® (MAN+SAH+AERO1:1:1), pripravljene pri različnih T, statistično značilno razlikujejo v pretočnosti ob dodatkih vseh vrst PS. Pretočna časa mešanice saharoze in Aerosila® (SAH+AERO1:1) pa sta se statistično značilno razlikovala le po prvih dveh dodatkih PS.

Preglednica XIII: Vrednosti p dvostranskega t-testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva temperature na pretočni čase po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek PS, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro.).

Št. vzorca	Naziv vzorca	p-vrednosti		
		Primerjava pretočnih časov med vzorci pri 21°C in 27°C po 1. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci pri 21°C in 27°C po 2. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci pri 21°C in 27°C po 3. dodatku PS
22 in 24	MAN+SAH+AERO 1:1:1 21°C /27°C	0,0012	0,0016	0,0235
23 in 25	SAH+AERO 1:1 21°C /27°C	0,0012	0,0017	1,0000

Z mešanico (slika 22) manitola, saharoze in Aerosila® (MAN+SAH+AERO1:1:1) smo dosegli boljšo pretočnost pri višjih T, z vzorcem saharoze in Aerosila® (SAH+AERO1:1) pa pri nižji T. Kljub boljšim rezultatom v primeru vzorca z manitolom, saharozo in Aerosilom® pri višji T, pa smo se odločili, da bomo zaradi težkega doseganja tako visoke T in ponovljivosti procesa tekom celotnega časa liofilizacije vse vzorce pripravljali pri T=21 °C.



Slika 22 Povprečni pretočni časi in standardne napake vzorcev pripravljenih pri različnih temperaturah po dodatkih pomožnih snovi (PS).

4.2.4 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH V BUČKAH IN VIALAH

Da bi izdelali večji volumen liofiliziranega praška, smo izbrane vzorce z najboljšimi pretočnimi lastnostmi iz prejšnjih poskusov pripravili v bučkah. Preveriti smo želeli tudi, kakšna je korelacija pretočnosti posameznega liofilizata izdelanega v bučki in viali.

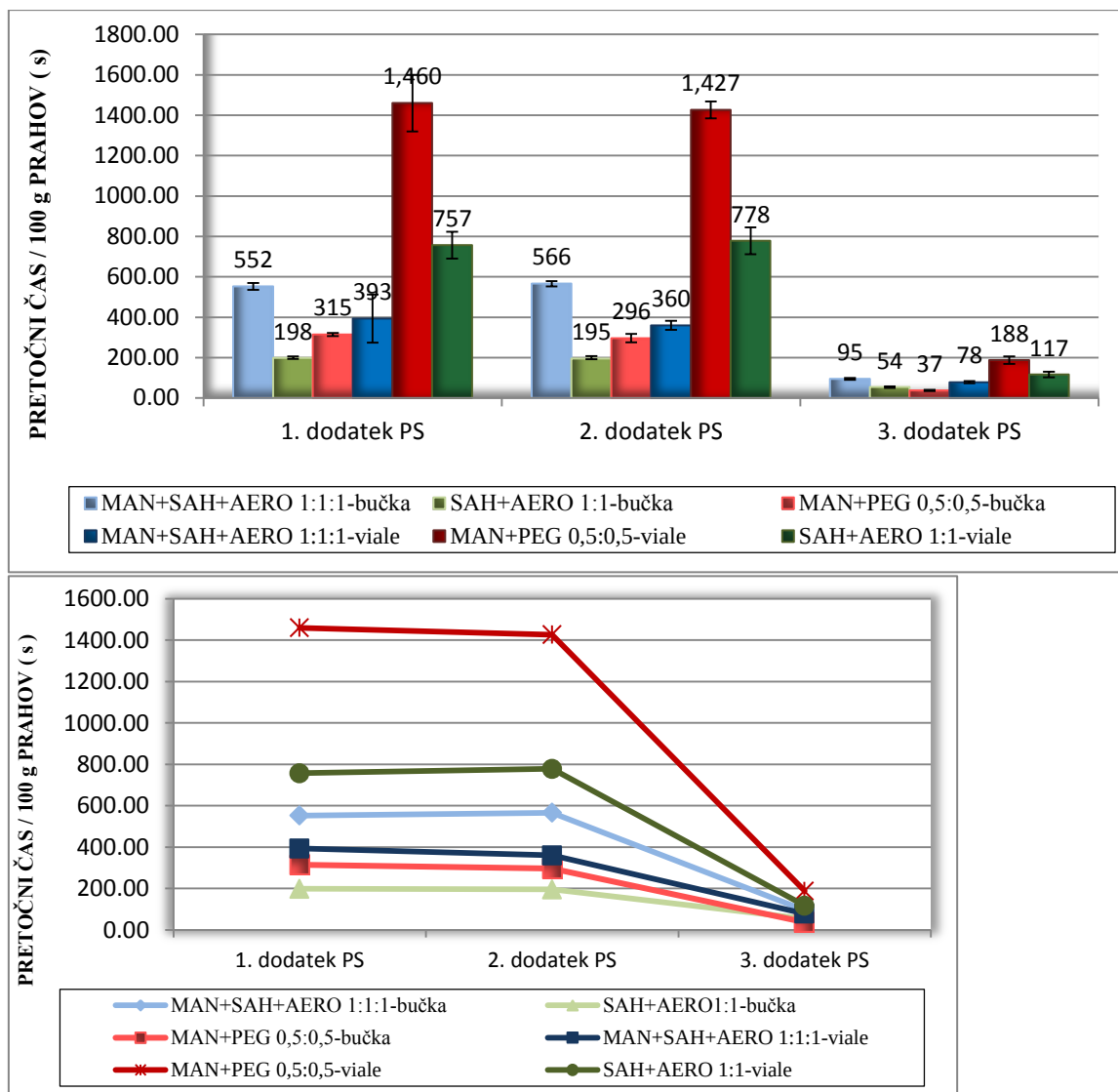
Iz preglednice XIV je razvidno, da se pretočni časi vzorcev, pripravljenimi v vialah in bučkah med seboj statistično značilno razlikujejo, in sicer po vseh dodatkih PS, razen v primeru mešanice manitola, saharoze in Aerosila® (MAN+SAH+AERO 1:1:1), kjer se to zgodi le po prvem dodatku polnila (dodatek 100% polnila).

Preglednica XIV: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva različnih vsebnikov za izdelavo vzorcev na pretočne čase po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

Št. vzorca	p-vrednosti Naziv vzorca	Primerjava pretočnih časov med vzorci pripravljenimi v viali in bučki, po 1. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci pripravljenimi v viali in bučki, po 2. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci pripravljenimi v viali in bučki, po 3. dodatku PS
3 in 26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	0,1425	0,0002	0,0141
8 in 27	SAH+AERO 1:1	0,0044	0,0001	0,0015
13 in 28	MAN+PEG 0,5:0,5	0,0048	0,0000	0,0045

Iz slike 23 je razvidno, da so pretočni časi vzorcev, pripravljeni v bučkah krajši od tistih pripravljenih v vialah, razen v primeru vzorca manitola, saharoze in Aerosila® (MAN+SAH+AERO 1:1:1).

Liofilizati pripravljeni v bučkah, so bili že na videz boljši. Bili so manj elektrostatični, saj so se ob mešanju slabše adherirali na stene bučk, patene in pestila. Bili so tudi manj pršeci. Kot smo zapisali že v uvodu je struktura pogače in s tem velikost in oblika delcev v liofilizatu odvisna od hitrosti ohlajanja, stopnje podhladitve in koncentracije topljencev v začetni raztopini. Ker se koncentracije topljencev v raztopinah enakih vzorcev pripravljenih v vialah in bučkah niso razlikovale, je do opaženih razlik po našem mnenju lahko prišlo le zaradi različne hitrosti zamrzovanja. Viale in bučke smo zamrzovali na enak način in sicer smo jih vrteli v tekočem dušiku, da so njihove vsebine zamrzovale postopoma. Viale smo zaradi manjšega volumna med vrtenjem v tekočem dušiku potopljali skoraj cele naenkrat, medtem ko smo bučke vanj potopljali le delno, da smo vzorce lahko v njih postopoma zamrzovali. Zaradi tega domnevamo, da je vsebina v vialah zamrznila hitreje. Ker pri hitrem ohlajanju pride do velike podhladitve in zato do nastanka manjših kristalov ter posledično manjših delcev. Ti imajo zaradi svoje majhnosti močnejše privlačne sile in zato nastajajo delci nepravilnih oblik.



Slika 23: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij pripravljenih v vialah in bučkah, po dodatkih pomožnih snovi (PS.)

4.2.5 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH Z RAZLIČNIMI MASNIMI DELEŽI TRDNIH SNOVI

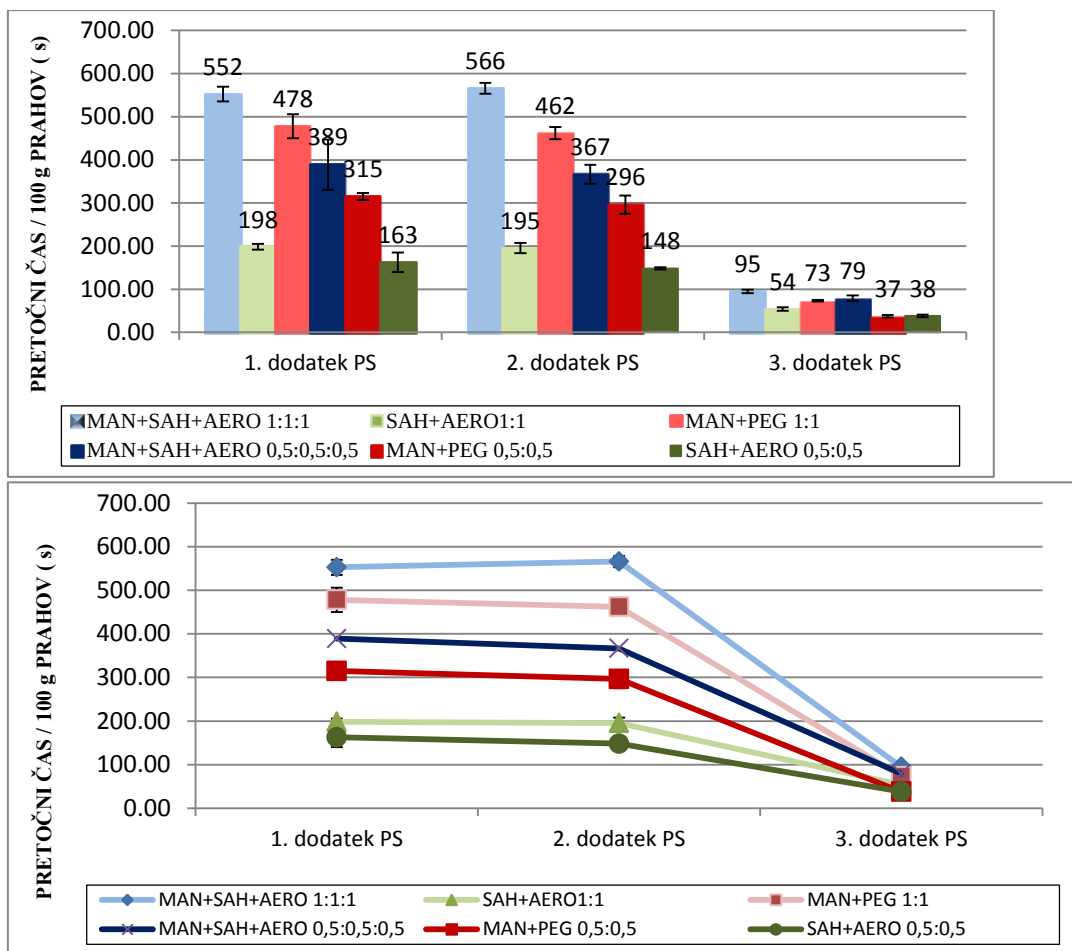
Preglednica XV prikazuje značilne razlike med pretočnimi časi posameznih formulacij, pripravljenih z različnimi masnimi deleži trdnih snovi, in sicer za vse vzorce, razen za mešanico saharoze in Aerosila® (SAH+AERO) po 1. dodatku polnila.

Preglednica XV: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vplivov masnih deležev trdnih snovi na pretočne čase po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek PS, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro.)

Št. vzorca	p-vrednosti Naziv vzorca	Primerjava pretočnih časov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 1. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 2. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 3. dodatku PS
26 in 29	MAN+SAH+AERO	0,0096	0,0002	0,0227
27 in 30	MAN+PEG	0,0006	0,0004	0,0007
28 in 31	SAH+AERO	0,0585	0,0026	0,0053

Na sliki 24 lahko vidimo, da imajo vsi testirani vzorci, pripravljeni z večjim masnim deležem trdnih snovi, daljše pretočne čase in s tem slabše pretočne lastnosti.

Predvidevamo, da pride med fazo zamrzovanja do manjšega obsega podhladitve zaradi večje koncentracije pomožnih snovi, kar zmanjša temperaturo zmrzišča, zato nastanejo manjši kristali. To vodi v nastanek manjših delcev, ki imajo slabše pretočne lastnosti.



Slika 24: Povprečni pretočni časi in standardne napake formulacij, pripravljenih z različnimi masnimi razmerji trdnih snovi po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

4.2.6 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV Z NATRIJEVIM ALENDRONATOM

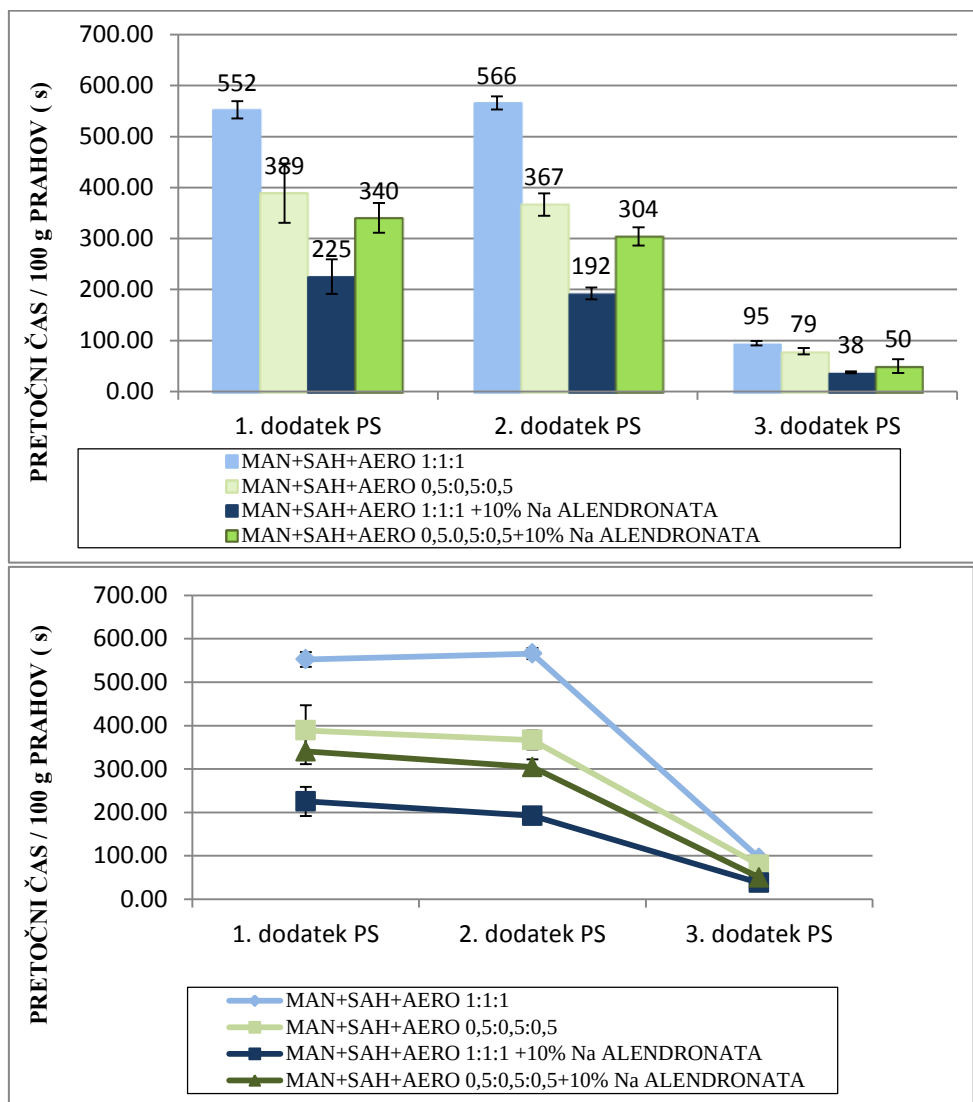
Želeli smo ugotoviti korelacije med placebo formulacijami in liofilizati, ki so vsebovali nizkomolekularno učinkovino natrijev alendronat. Placebo liofilizat smo zato dodali 10 % (m/m) natrijevega alendronata. Preglednica XVI prikazuje izboljšanje pretočnosti vseh testiranih vzorcev po dodatku natrijevega alendronata, z izjemo mešanice saharoze in Aerosila®, ki je vsebovala polovični masni delež trdnih snovi (SAH+AERO 0,5:0,5).

Preglednica XVI: Razlike v pretočnih časih placebo vzorcev in vzorcev z dodano učinkovino natrijev alendronat.

IME VZORCEV	Dodatek PS	t _{pretočni} placebo vzorca (s)	t _{pretočni} vzorca z dodatkom učinkovine natrijev evega alendronata (s)	Razlika v pretočnih časih (s)	Razlika v pretočnih časih (%)	Povprečje razlik po vseh treh dodatkih (%)
MAN+SAH+AERO 1:1:1	1.	552	225	↓ 327	60	↓ 64
Placebo vzor. Št 26	2.	566	192	↓ 374	66	
Z dod uč. Vzor št. 32	3.	95	38	↓ 57	60	
MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	1.	389	340	↓ 49	13	↓ 22
Placebo vzor. Št 29	2.	367	304	↓ 63	17	
Z dod uč. Vzor št. 33	3.	79	50	↓ 29	37	
SAH+AERO 1:1	1.	198	100	↓ 98	50	↓ 48
Placebo vzor. Št 27	2.	195	86	↓ 109	56	
Z dod uč. Vzor št. 34	3.	54	33	↓ 21	39	
SAH+AERO 0,5:0,5	1.	163	181	↑ 18	11	↑ 26
Placebo vzor. Št 30	2.	148	159	↑ 11	7	
Z dod uč. Vzor št. 35	3.	38	61	↑ 23	60	
MAN+PEG 1:1	1.	478	259	↓ 219	46	↓ 44
Placebo vzor. Št 31	2.	462	265	↓ 197	43	
Z dod uč. Vzor št. 36	3.	73	42	↓ 31	42	
MAN+PEG 0,5:0,5	1.	315	211	↓ 104	33	↓ 22
Placebo vzor. Št 28	2.	296	212	↓ 84	28	
Z dod uč. Vzor št. 37	3.	37	35	↓ 2	5	

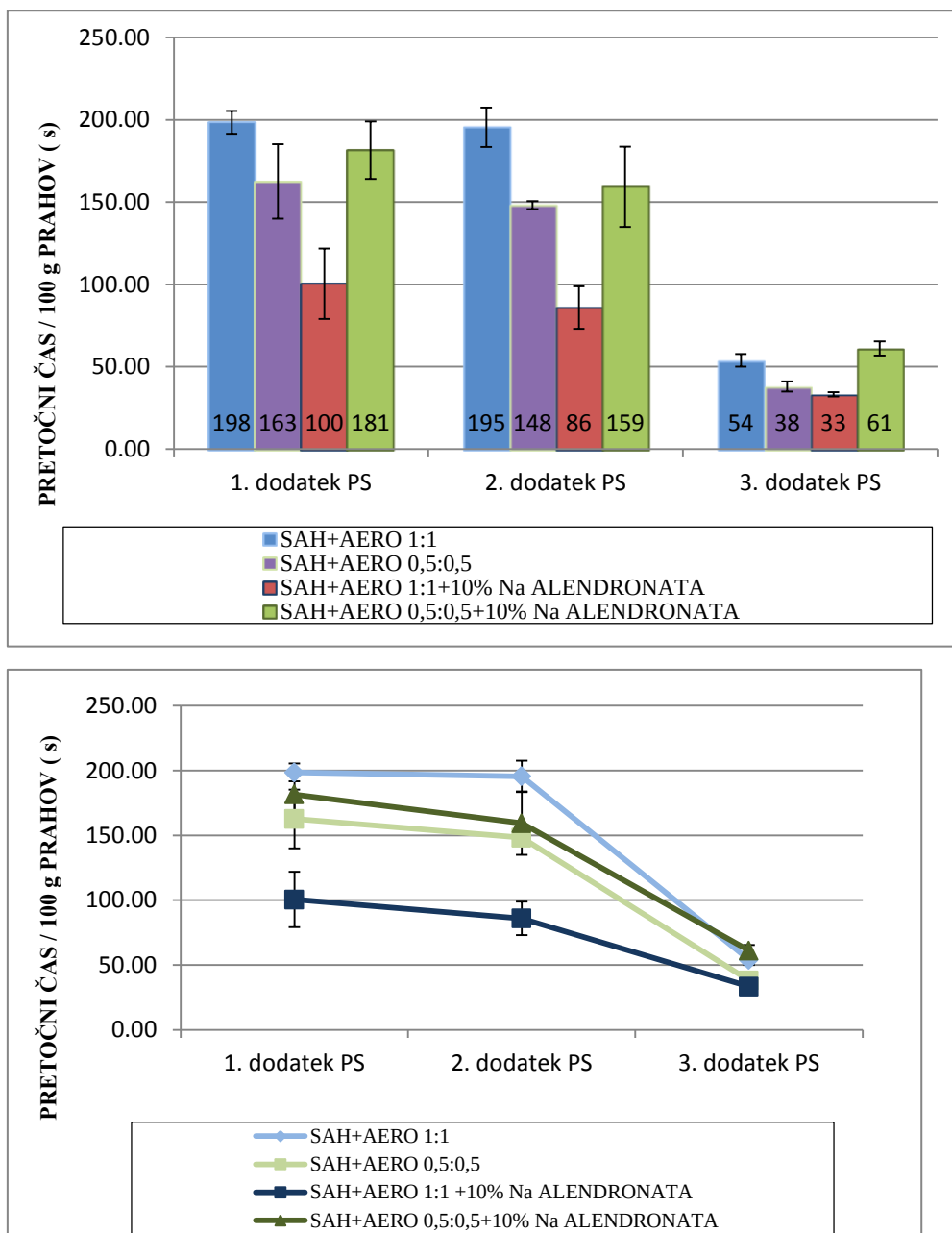
(↑-predstavlja povečanje pretočnega časa za določeno razliko, ↓- predstavlja zmanjšanje pretočnega časa za določeno razliko)

Mešanicam manitola, saharoze in Aerosila® smo z dodatkom izbrane učinkovine izboljšali pretočnost (slika 25, preglednica XVI). Vzorcem ki smo jih pripravljali z večjimi masnimi deleži trdnih snovi (MAN+SAH+AERO 1:1:1), se je v primerjavi s placebo vzorci, povprečni pretočni čas izboljšal za 64%, tistim, pripravljenim z manjšimi masnimi deleži (MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5) pa nekoliko manj, in sicer v povprečju za 22%. Največje izboljšanje smo zaznali po 3. dodatku PS. Vzorci z dodanim natrijevim alendronatom pa so imeli slabšo ponovljivost meritev v primerjavi s placebo vzorci.



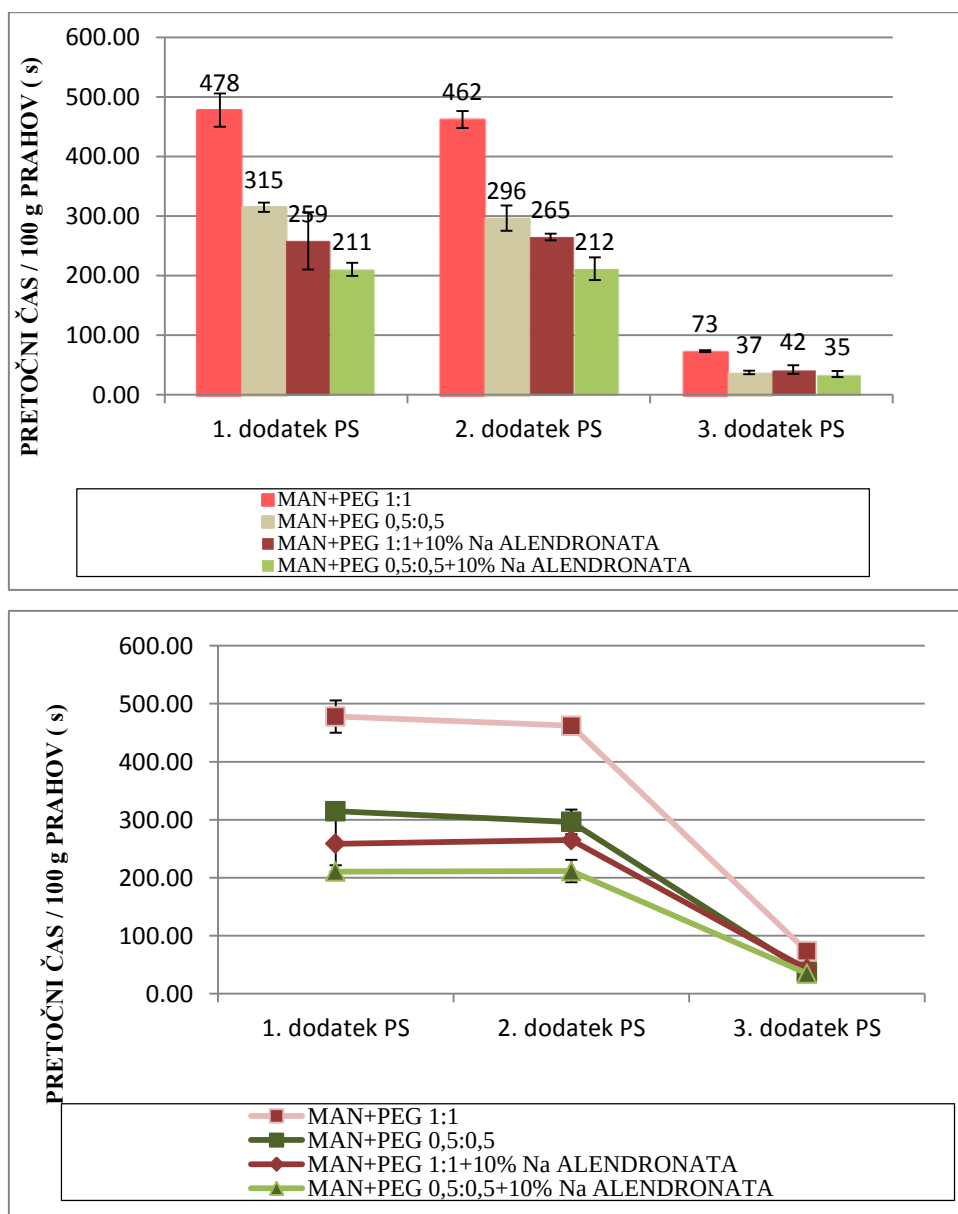
Slika 25: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij z manitolom, saharozo in Aerosilom® ter enakih formulacij z dodatkom natrijevega alendronata po dodatkih pomožnih snovi (PS).

Pretočnost vzorca s saharozo in Aerosilom® se je po dodatku učinkovine izboljšala pri formulaciji z večjim masnim deležem trdnih snovi (SAH+AERO 1:1), in sicer povprečno za 48% (slika 26, preglednica XVI), pri vzorcu z manjšim masnim deležem (SAH+AERO 0,5:0,5) pa povprečno za 26%. Vzorci z dodanim natrijevim alendronatom so imeli slabše ponovljivosti meritev kot placebo formulaciji.



Slika 26: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij saharoze in Aerosila® ter enakih vzorcev po dodatku natrijevega alendronata po dodatkih pomožnih snovi (PS).

Vzorcu z manitolom in PEG 6000 (slika 27, preglednica XVI) se je pretočnost po dodatku učinkovine zmanjšala za 44%, in sicer pri formulaciji z večjim masnim deležem trdnih snovi (MAN+PEG 1:1), pri tisti z manjšim masnim deležem (MAN+PEG 0,5:0,5) pa za 22%. Vzorci z dodanim natrijevim alendronatom so imeli tudi v teh preizkusih slabšo ponovljivost kot placebo formulaciji.



Slika 27: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij z manitolom in PEG-om ter enakih vzorcev po dodatku natrijevega alendronata po dodatkih pomožnih snovi (PS).

S t-testom smo tudi dokazali, da v mešanicah saharoze in Aerosila® (SAH+AERO 0,5:0,5), ki so vsebovale polovične masne deleže trdnih snovi, po 1. in 2. dodatku PS ni prišlo do statistično značilnih razlik med vzorci z učinkovino in brez nje (preglednica XVII).

Pri vseh ostalih vzorcih pa smo ugotovili statistično značilno izboljšanje pretočnosti, in sicer po 2. in 3. dodatku PS, razen pri mešanici manitola in PEG (MAN+PEG 0,5:0,5), ki je vsebovala polovični masni delež trdnih snovi.

Preglednica XVII: Vrednosti p dvostranskega t-testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva dodatka Na alendronata na pretočne čase po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

Št. vorca	Naziv vzorca	p-vrednosti	Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in vzorci z natrijevim alendronatom, po 1. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in vzorci z natrijevim alendronatom, po 2. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in vzorci z natrijevim alendronatom, po 3. dodatku PS
26 in 32	MAN+SAH+AERO 1:1:1 placebo/ natrijev alendronat		0,0001	0,0000	0,0000
29 in 33	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat		0,2673	0,0184	0,0252
27 in 34	SAH+AERO 1:1 placebo/ natrijev alendronat		0,0016	0,0004	0,0010
30 in 35	SAH+AERO 0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat		0,3175	0,5116	0,0017
31 in 36	MAN+PEG 1:1 placebo/ natrijev alendronat		0,0024	0,0000	0,0019
28 in 37	MAN+PEG 0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat		0,0002	0,0068	0,4720

4.2.7 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV Z BSA

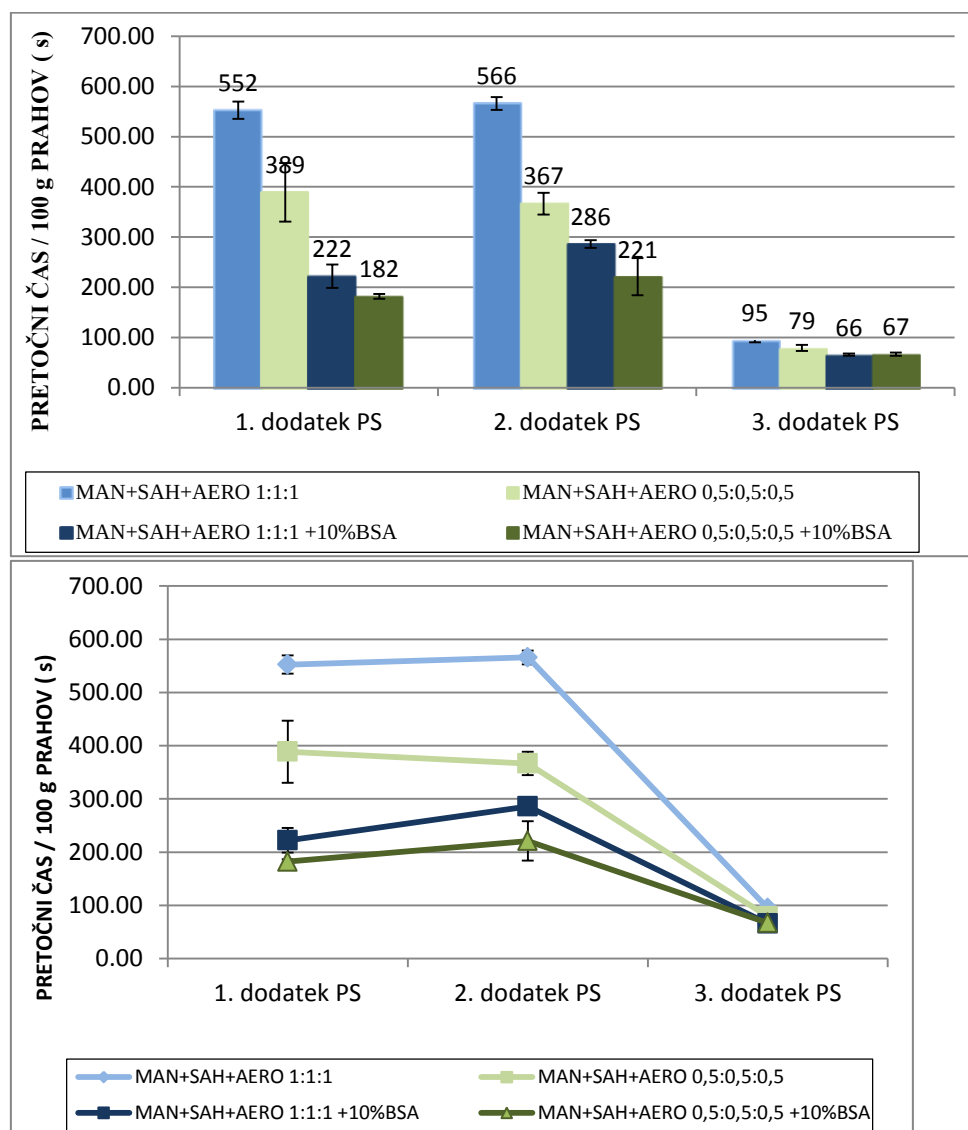
Placebo liofilizatom smo dodali tudi po 10 % (m/m) BSA. Liofilizacija vzorca z manitolom, PEG in BSA ni uspela. Domnevamo, da so vzrok za to velike molekule PEG in BSA, ki so povzročile kolaps med postopkom liofilizacije.

Preglednica XVIII: Razlike v pretočnih časih placebo vzorcev in enakih formulacij z dodano modelno učinkovino BSA.

NAZIV VZORCEV	Dodatek PS	t _{pretočni} placebo vzorca (s)	t _{pretočni} vzorca z dodatkom BSA (s)	Razlika pretočnih časov (s)	Razlika pretočnih časov (%)	Povprečje razlik po vseh treh dodatkih PS (%)
MAN+SAH+AERO 1:1:1	1.	552	222	↓ 330	60	↓47
Placebo vzor. št 26	2.	566	286	↓ 280	50	
Z dod uč. vzor št. 38	3.	95	66	↓ 29	31	
MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	1.	389	182	↓ 207	53	↓36
Placebo vzor. št 29	2.	367	221	↓ 146	40	
Z dod uč. vzor št. 39	3.	79	67	↓ 12	15	
SAH+AERO 1:1	1.	198	315	↑ 117	59	↑48
Placebo vzor. št 27	2.	195	301	↑ 106	54	
Z dod uč. vzor št. 40	3.	54	74	↑ 20	37	
SAH+AERO 0,5:0,5	1.	163	519	↑ 356	218	↑255
Placebo vzor. št 30	2.	148	468	↑ 320	216	
Z dod uč. vzor št. 41	3.	38	164	↑ 126	331	

(↑-predstavlja povečanje pretočnega časa za določeno razliko, ↓- predstavlja zmanjšanje pretočnega časa za določeno razliko)

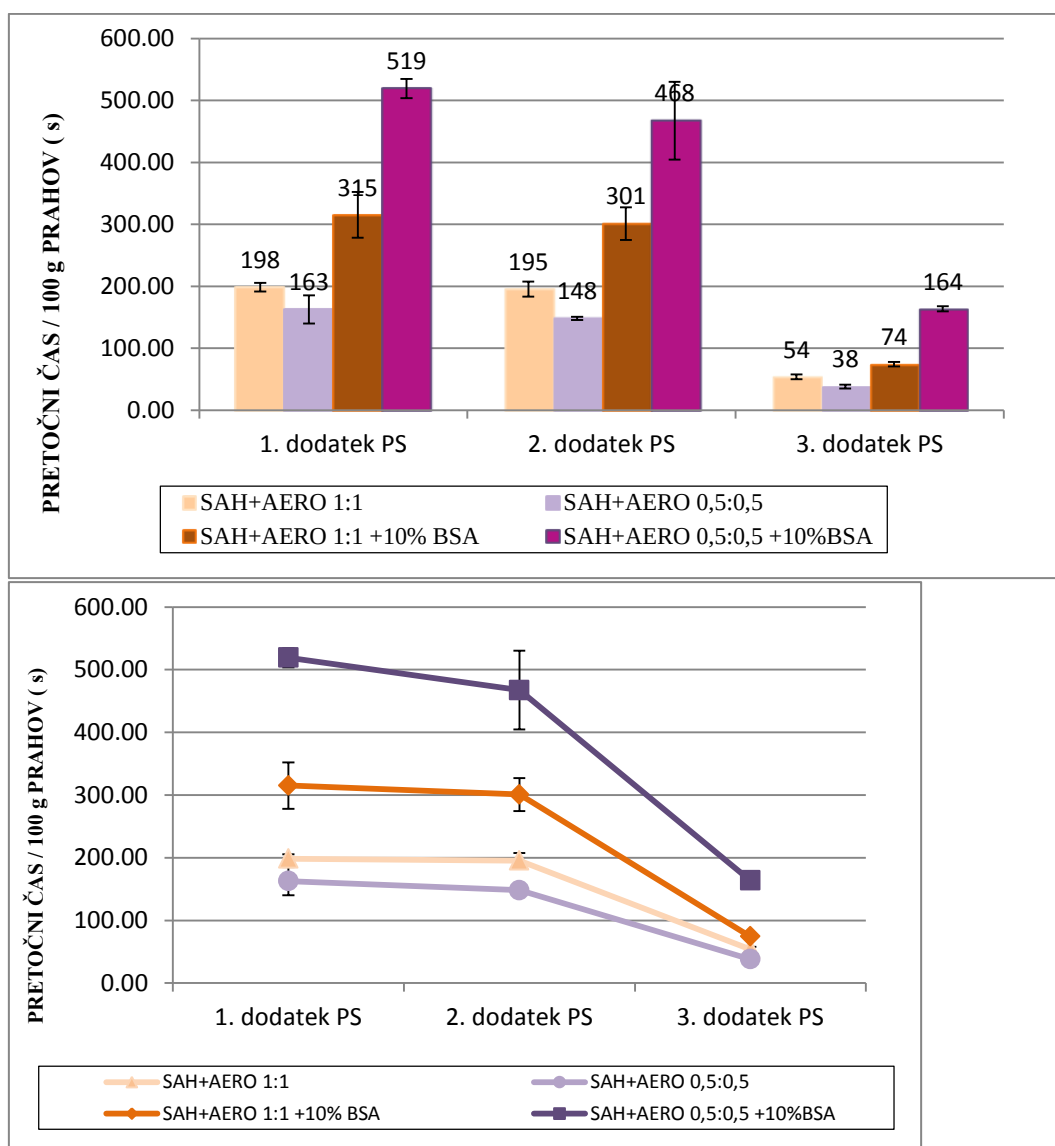
Mešanici manitola, saharoze in Aerosila® se je po dodatku modelne učinkovine BSA bistveno izboljšala pretočnost (slika 28, preglednica XVIII). Pri tem se je vzorcu, ki je vseboval večji masni delež trdnih snovi (MAN+SAH+AERO 1:1:1) povprečni pretočni čas izboljšal za 47%, tistemu s polovičnim masnim deležem (MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5) pa nekaj manj, in sicer 36%. Največjo razliko v pretočnih časih med obema formulacijama (placebo in tisto z dodanim BSA) smo zaznali po 1. dodatku PS.



Slika 28: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij manitola, saharoze in Aerosila® ter enakih mešanic z dodatkom BSA po dodatkih pomožnih snovi (PS).

Liofilizatom vzorcev, ki so vsebovali saharozo in Aerosil®, je dodatek BSA bistveno poslabšal pretočnost. Vzorcju z večjim masnim deležem (SAH+AERO 1:1) (slika 29, preglednica XVIII) se je povprečni pretočni čas po dodatku BSA v primerjavi s placebo poslabšal za 48%. Pri tem smo največjo razliko med pretočnimi časi placebo vzorcev in enakih formulacij z dodanim BSA, zaznali po 1. dodatku PS.

Liofilizatom vzorcev s polovičnimi masnimi deleži (SAH+AERO 0,5:0,5) pa se je pretočnost po dodatku BSA zmanjšala za kar 255%. Največjo razliko med pretočnimi časi placebo vzorcev in formulaciji z dodanim BSA smo zaznali po 3. dodatku PS.



Slika 29: Povprečni pretočni časi in standardne napake placebo formulacij saharoze in Aerosila® ter enakih mešanic z dodatkom BSA po dodatkih pomožnih snovi (PS).

S t-testom smo dokazali (preglednica XIX), je dodatek BSA povzročil statistično značilno razliko v pretočnosti vseh testiranih vzorcev.

Preglednica XIX: Vrednosti p dvostranskega t-testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo jih uporabili za testiranje vpliva BSA na pretočne čase po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro.)

Št. vzorca	Naziv vzorca	p-vrednosti		
		Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom BSA, po 1 dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in z dodatkom BSA, po 2 dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom BSA, po 3. dodatku PS
26 in 38	MAN+SAH+AERO 1:1:1-placebo/bsa	0,0000	0,0000	0,0004
29 in 39	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5 placebo/bsa	0,0249	0,0042	0,0372
27 in 40	SAH+AERO 1:1 placebo/bsa	0,0058	0,0032	0,0027
30 in 41	SAH+AERO 0,5:0,5 placebo/bsa	0,0000	0,0126	0,0000

4.3 CARROV INDEKS IN HAUSNERJEVO RAZMERJE

Carrov indeks in Hausnerjevo razmerje izračunamo iz podatkov nasipne in zbite gostote oz. nasipnega in zbitega volumna praška. Razlika gostot oz. volumnov nam služi kot ocena pretočnih lastnosti. Nasipna gostota je odvisna od gostote samih delcev in njihove ureditve oz. razporeditve v merilnem valju. S stresanjem praška v valju pa se delci preurejajo in zbližajo med seboj, zato se nasipni volumen zmanjša. Do razlik med nasipnim in zbitim volumnom lahko pride zaradi različnih interakcij med delci, ki slabijo njihove pretočne lastnosti. Pri prahovih, ki dobro tečejo, so te sile manjše, kar delcem omogoča, da lažje zdrsijo drug mimo drugega in tako že brez stresanja dosežejo bolj zbito stanje, zato so razlike med njihovimi nasipnimi in zbitimi volumni manjše. Zaradi tega imajo prahovi z dobrimi pretočnimi lastnostmi manjši Carrov indeks in Hausnerjevo razmerje.

V preglednici XX smo zbrali nasipne in zbite volumne preučevanih vzorcev ter pripadajoče Carrove indekse in Hausnerjeva razmerja. Manjši kot je Carrov indeks, boljše so pretočne lastnosti vzorcev, enako pa velja tudi za vrednosti Hausnerjevega razmerja. Vidimo, da se izračuni Carrovega indeksa in Hausnerjevega razmerja med preučevanimi

vzorci razlikujejo. Med placebo vzorci je imel najmanjši Carrov indeks vzorec, ki je vseboval saharozo in Aerosil® (SAH+AERO 0,5:0,5) s polovičnim masnim deležem (CI=14,6%; HR=1,17), sledil mu je enak vzorec (SAH+AERO 1:1) s celim masnim deležem (CI=14,7%;HR=1,17). Najslabše pretočne lastnosti pa je imel vzorec z manitolom, saharozo, in Aerosilom® (MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5) (CI=21,9; HR=1,28) z polovičnim masnim deležem.

Preglednica XX: Nasipni in zbiti volumni preučevanih vzorcev ter pripadajoči Carrovi indeksi in Hausnerjeva razmerja.

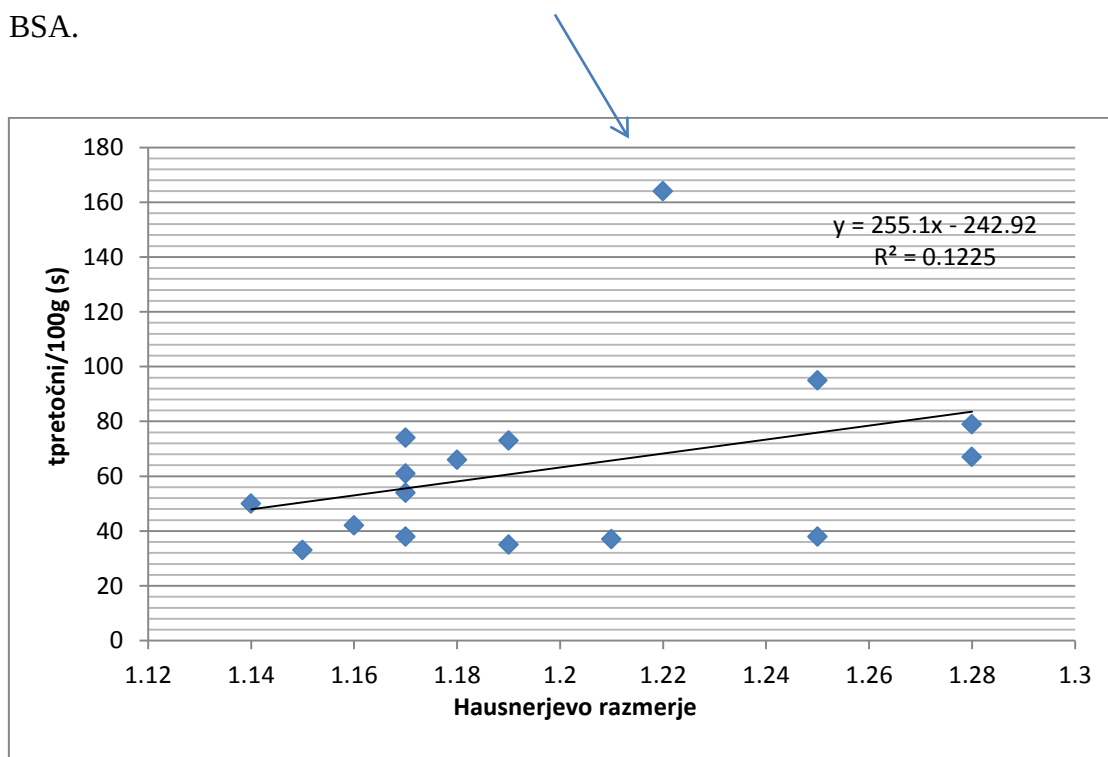
Št.vzor.	LIOFILIZAT	V _{nasipni} (ml)	V _{zbiti} (ml)	ΔV (ml)	Carrov indeks (%)	Hausnerj evo razmerje	t PRETOČNI/ 100g (s)	Nasipni kot (°)
26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	40,0	32,0	8,0	20,0	1,25	95	27
27	SAH+AERO 1:1	24,0	20,5	3,5	14,6	1,17	54	20
31	MAN+PEG 1:1	16,0	13,5	2,5	15,6	1,19	73	21
29	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	32,0	25,0	7,0	21,9	1,28	79	27
30	SAH+AERO 0,5:0,5	34,0	29,0	5,0	14,7	1,17	38	22
28	MAN+PEG 0,5:0,5	17,0	14,0	3,0	17,6	1,21	37	14
	NATRIJEV ALENDRONAT+							
32	MAN+SAH+AERO 1:1:1	38,0	30,5	7,5	19,7	1,25	38	25
34	SAH+AERO 1:1	84,0	73,0	11,0	13,1	1,15	33	25
36	MAN+PEG 1:1	18,0	15,5	2,5	13,9	1,16	42	25
33	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	28,0	24,5	3,5	12,51	1,14	50	26
35	SAH+AERO 0,5:0,5	38,0	32,5	5,5	14,5	1,17	61	26
37	MAN+PEG 0,5:0,5	18,5	15,5	3,0	16,2	1,19	35	26
	BSA+							
38	MAN+SAH+AERO 1:1:1	59,5	50,5	9,0	15,1	1,18	66	30
40	SAH+AERO 1:1	63,0	54,0	9,0	14,3	1,17	74	25
39	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	25,0	19,5	5,5	22,0	1,28	74	27
41	SAH+AERO 0,5:0,5	33,0	27,0	6,0	18,2	1,22	164	28

Po dodatku natrijevega alendronata je pokazal najboljšo pretočnost vzorec manitola, saharoze, in Aerosila® s polovičnimi masnimi deleži (MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5) (CI=12,5%; HR=1,14), enaka formulacija (MAN+SAH+AERO 1:1:1), ki je vsebovala cele masne deleže, pa je imela največji indeks (CI =19,7%; HR=1,25) in zato tudi najslabše

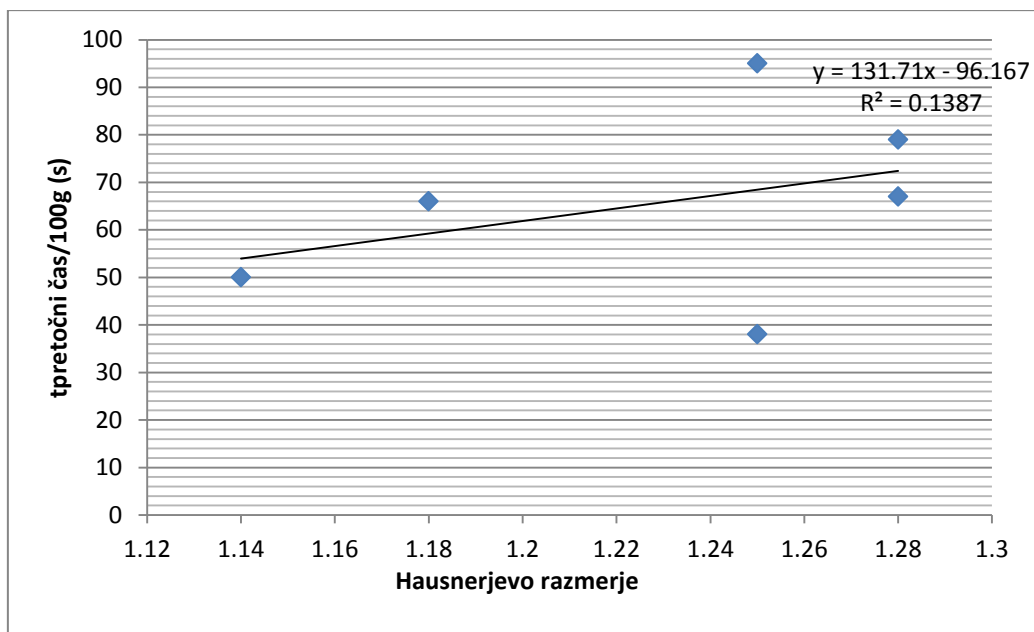
pretočne lastnosti. Med vzorci, ki smo jim dodali BSA, pa je imela najboljšo pretočnost formulacija s celima masnima deležema saharoze in Aerosila® (SAH+AERO 1:1) (CI=14,3; HR=1,17).

Preverili smo tudi korelacijo med rezultati pretočnosti vzorcev, ki smo jih določili z različnimi metodami merjenja (pretočni čas, Hausnerjevo razmerje, nasipni kot). Uporabili smo linearno regresijo. Merilo povezanosti je determinacijski koeficient (R^2). Njegove vrednosti so lahko od 0 do 1, pri čemer $R^2=1$ kaže na popolno ujemanje med podatki, $R^2=0$ označuje da statistična korelacija med podatki ne obstaja.

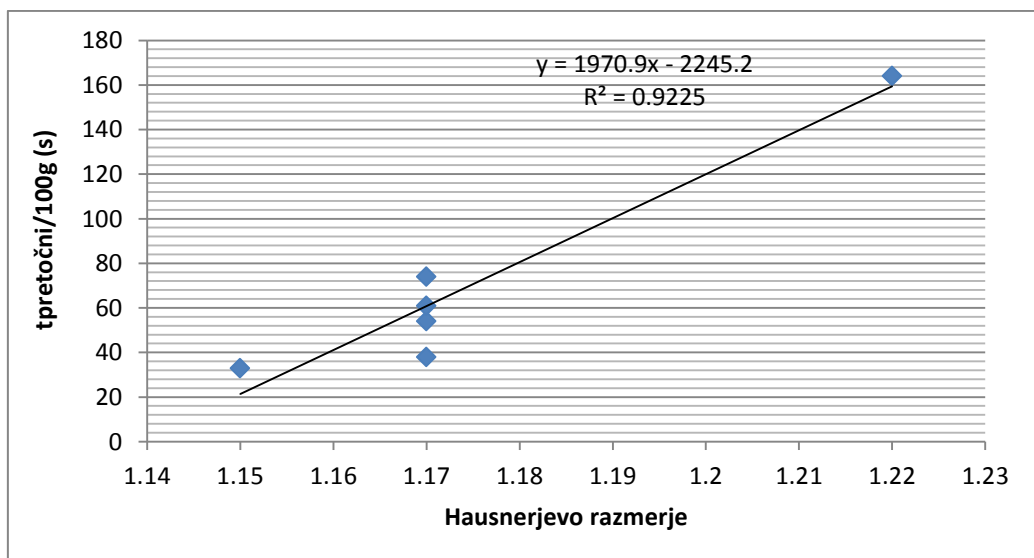
Če primerjamo statistično korelacijo med rezultati izmerjenih pretočnih časov ter posredno določenih Hausnerjevih razmerij, lahko ugotovimo, da obstaja največja povezanost med vzorci, ki vsebujejo saharozo in Aerosil® (slika 32) ($R^2=0,9225$). Formulacije z manitolom, saharozo in Aerosilom® kažejo minimalno povezanost (slika 31) ($R^2=0,1378$), tiste z manitolom in PEG 6000 pa nobene (slika 33) ($R^2=0,0023$). Primerjava vseh vzorcev med seboj je prav tako pokazala slabo korelacijo (slika 30) ($R^2=0,1125$). Pri tem smo opazili veliko odstopanje predvsem pri meritvah vzorca s saharozo in Aerosilom® po dodatku BSA.



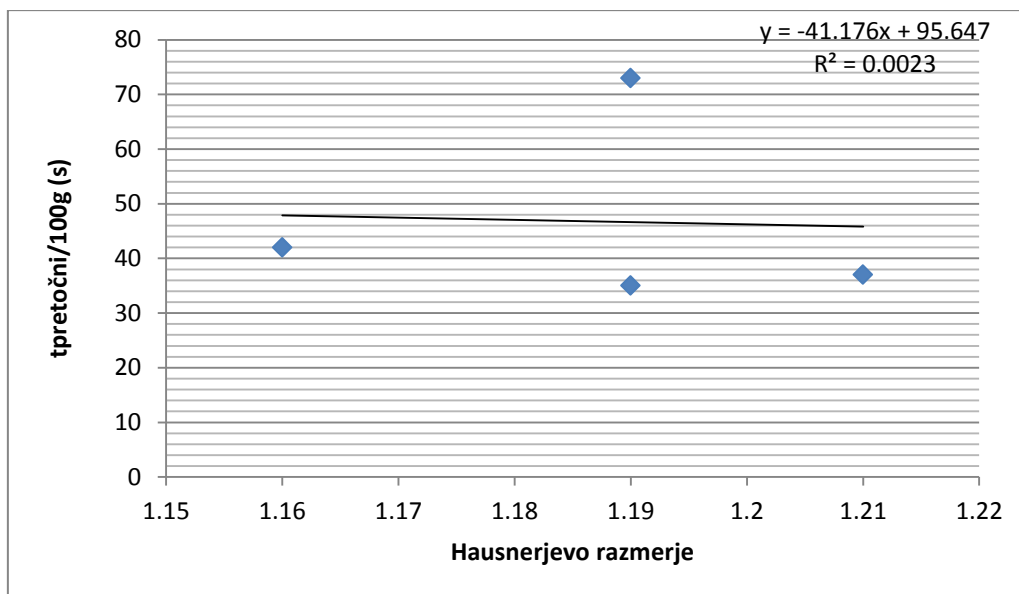
Slika 30: Korelacija med Hausnerjevimi razmerji in pretočnimi časi vseh vzorcev (26-41).



Slika 31: Korelacija med Hausnerjevimi razmerji in pretočnimi časi vzorcev, pripravljenih z manitolom, saharozo in Aerosilom®.



Slika 32: Korelacija med Hausnerjevimi razmerji in pretočnimi časi vzorcev, pripravljenih s saharozo in Aerosilom®.



Slika 33: Korelacija med Hausnerjevimi razmerji in pretočnimi časi vzorcev, pripravljenih s manitolom in PEG 6000.

Vidimo, da so povezave med posameznimi metodami slabe, kar je najverjetneje posledica majhnih količin vzorcev in posledičnih napak pri meritvah. Kljub temu pa se nakazuje pričakovani trend korelacije.

4.4 IZDELAVA TABLET

Liofilizatov brez dodatkov pomožnih snovi nismo mogli neposredno stisniti v tablete. Ugotovili smo namreč, da se močno lepijo na pečate in se težko polnijo v matrice zaradi njihove slabe pretočnosti. Zaradi slabe stisljivosti pa so imele tablete nesprejemljivo trdnost. Zato smo za izdelavo tablet izbrali formulacije s predhodno ugotovljenimi najboljšimi lastnostmi, ki smo jim že dodali pomožne snovi (500% polnila in 2% drsila (m/m)). Iz rezultatov, zbranih v preglednici XXI je razvidno, da so se tablete močno razlikovale glede na njihovo trdnost. Največja odstopanja v tej lastnosti smo zaznali pri uporabi formulacije z manitolom in PEG 6000 (MAN+PEG 0,5:0,5), po dodatku natrijevega alendronata. Domnevamo, da je bil vzrok za to v različnih oblikah in velikosti delcev, zaradi česar so se ti različno razporejali v matrični vdolbini že med samim vsipavanjem, nato pa tudi med stiskanjem. Sicer pa je bila enakomernost tabletnih mas dobra, kar kaže na njihovo ustrezno pretočnost, ki je potrebna za izdelavo tablet. Dodatek

učinkovine v liofilizatorju pa ni imel posebnega vpliva na kateregakoli od merjenih parametrov tablet.

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti mase, debeline in trdnosti tablet, ter vrednostmi pripadajočih SD in RSD.

Št. Vzor.	Naziv vzorca	Masa (mg)	SD (mg)	RSD (%)	Debelina (mm)	SD (mg)	RSD (%)	Trdnost (N)	SD (N)	RSD (%)
26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	377,1	±8,85	5,76	±0,029	61,2	±12,6			
			2,35		0,50		20,56			
27	SAH+AERO 1:1	401,2	±6,73	5,71	±0,038	103,1	±14,0			
			1,68		0,66		13,54			
31	MAN+PEG 1:1	328,5	±11,02	5,24	±0,063	54,4	±14,9			
			3,36		1,20		27,33			
29	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	368,4	±7,84	5,79	±0,034	44,5	±11,3			
			2,13		0,59		25,31			
30	SAH+AERO 0,5:0,5	370,7	±6,84	5,29	±0,063	121,0	±28,6			
			1,85		1,19		23,66			
28	MAN+PEG 0,5:0,5	393,5	±10,36	5,59	±0,064	93,4	±28,4			
			2,63		1,14		30,36			
	NATRIJEV ALENDRONAT+									
32	MAN+SAH+AERO 1:1:1	380,6	±7,34	5,72	±0,058	66,4	±13,7			
			1,93		1,01		20,67			
34	SAH+AERO 1:1	380,7	±10,29	5,56	±0,092	93,8	±23,7			
			2,70		1,65		25,30			
36	MAN+PEG 1:1	328,6	±11,03	5,26	±0,063	93,8	±9,2			
			3,36		1,19		9,81			
33	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	378,4	±9,45	5,76	±0,029	62,5	±17,2			
			2,50		0,50		27,51			
35	SAH+AERO 0,5:0,5	372,9	±8,09	5,76	±0,062	57,0	±13,7			
			2,17		1,07		23,98			
37	MAN+PEG 0,5:0,5	366,6	±14,69	5,33	±0,139	70,8	±22,9			
			4,01		2,60		32,39			
	BSA+									
38	MAN+SAH+AERO 1:1:1	352,1	±15,07	5,60	±0,041	46,7	±11,1			
			4,28		0,73		23,68			
40	SAH+AERO 1:1	384,4	±11,64	5,68	±0,094	88,3	±20,9			
			3,03		1,65		23,72			
39	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5	341,8	±8,94	5,57	±0,025	39,8	±6,7			
			2,61		0,44		16,83			
41	SAH+AERO 0,5:0,5	378,0	±5,32	5,70	±0,060	83,6	±15,7			
			1,41		1,05		18,81			

5 SKLEP

Ugotovili smo, da liofilizacija pri skrajnih zunanjih temperaturah 0°C in 30°C ni mogoča. Zato smo vzorce pripravljali pri 21°C. Vzorci, ki smo jih pripravili v bučkah so imeli boljše pretočne lastnosti kot tisti, pripravljeni v vialah. Ker smo testirali formulacije z različnimi koncentracijami oz. masnimi deleži trdnih snovi, smo ugotovili, da imajo liofilizati z manjšimi koncentracijami (1,7%-2,6%) boljše pretočne lastnosti, kot tisti z višjimi (3,4%-5,1%).

Testirali smo tudi različne pomožne snovi (PS), ki smo jih vzorcem dodali pred ali po liofilizaciji. Najboljše pretočne lastnosti po dodatkih PS pred liofilizacijo smo določili vzorcema, ki sta vsebovala saharozo in Aerosil® ter manitol z dodanim PEG 6000. Kot najprimernejši dodatek PS po liofilizaciji pa se je izkazala kombinacija laktoze in Aerosila®. Po tem, ko smo različnim formulacijam dodali učinkovino natrijevega alendronata ali goveji serumski albumin (BSA), so se jim v večini primerov pretočni časi izboljšali.

Preizkušeni vzorci z najboljšo pretočnostjo so pri liofilizaciji tvorili rahlo pogačo ter majhne nenaeelektrene delce liofilizata.

Ugotovili smo tudi, da obstajajo le majhne stopnje korelacije med rezultati pretočnosti, ki smo jih določili z različnimi metodami (pretočni čas, nasipni kot, Hausnerjevo razmerje). Izjema je bil le vzorec, ki je vseboval saharozo in Aerosil®, saj je kazal odlično ujemanje med omenjenimi rezultati.

Liofilizate smo uspešno stisnili v tablete, težave smo imeli le z nihanjem njihovih trdnosti. Zaključimo lahko, da smo z dodatki ustreznih pomožnih snovi v določenih razmerjih dosegli sprejemljive do zmerne pretočne lastnosti liofilizatov, ki so nam omogočili njihovo neposredno stiskanje v tablete. Gledano v celoti se je kot najboljši liofilizirani vzorec izkazala formulacija s saharozo in Aerosilom®, s koncentracijo 1,7% (m/m), pripravljena pri temperaturi okolice 21°C.

6 LITERATURA

1. Kasper JC, Friess W: The freezing step in lyophilization. Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011; 78; 248-263.
2. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H: Freeze drying of nanoparticles: formulation, process nad storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 2006; 1688-713.
3. Aulton ME: *The Design and Manufacture of Medicines. Aulton's Pharmaceutics 3th*, Churchill Livingstone, 2007; 425-440.
4. Kambič, Laboratorijska oprema: Navodilo za uporabo Liofilizatorja Lio 5PLT, November 2009.
5. Povh B: Osnove liofilizacije (I del). Inštitut za elektrotehniko in vakuumsko tehniko Ljubljana, 1998; Vakuumist 18/4.
6. Jennings TA: *Lyophilization Introduction and basic principles Introduction*, CRC Press LLC, Florida, 2002; 1-13.
7. Povh B: Osnove liofilizacije (II del.). Inštitut za elektrotehniko in vakuumsko tehniko Ljubljana, 1999; Vakuumist 19/1.
8. Swarbrick J: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3th*, volume 2, Informa Healthcare, 2007 ;1807-1819.
9. Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H: Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63, 2006; 87-94.
10. Poje T: Razvoj in vrednotenje liofiliziranega izdelka z modelno peptidno učinkovino. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2008.
11. Anhorn MG, Mehler H, Langer K: Freeze Drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. *International Journal Of Pharmaceutics* 363, 2008; 162-169.
12. Prescott JK, Barnum RA: On Powder Flowability. *Pharmaceutical Technology*, 2000; 60-84.

13. Nalluri V, Kuentz M: Flowability characterization of drug-excipient blends using novel powder avalanching method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010; 74: 388-396.
14. Pingali CK, Serantes K, Foroughi R, Muzzio JF: Practical methods for improving flow properties of active pharmaceutical ingredients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2009; 35 (12): 1460-1469.
15. Aulton ME: *The Design and Manufacture of Medicines. Aulton's Pharmaceutics 3th*, Churchill Livingstone, 2007; 168-179.
16. Brezovnik U: Primerjava različnih metod merjenja pretočnih lastnosti vzorcev laktoze in mikrokristalne celuloze. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011.
17. Dreu R, Ilić I: Seminar iz vaj pri predmetu farmacevtska tehnologija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
18. Pingali K, Mendez R, Lewis D, Michniak-Kohn B, Cuitino alberto. Muzzio F: Mixing order of glidant and lubricant-Influence on powder and tablet properties. *International Journal of Pharmaceutics* 409, 2011; 269-277.
19. Hentzschel CM, Alnaief M, Smirnova I, Sakmann A, Leopold CS: Tableting properties of silica aerogel and other silicates. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2012; 38 (4) :462-467.
20. Zhou Q, Armstrong B, Larson I, Stewart PJ, Morton DAV: *Improving Powder flow Properties of Cohesive Lactose Monohydrate Powder by Intensive Mechanical Dry Coating*. Wiley InterScience, 2009.
21. Swarbrick J: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3th*, volume 2, Informa Healthcare, 2007; 3659-3672.
22. *European Pharmacopoeia 7th Edition*, Methods of analysis: 2.9.36 Powder Flow 308-311.
23. *European Pharmacopoeia 7th Edition*, Methods of analysis: 2.9.16 Flowability 272-273.
24. Rabzelj J: Preučevanje pretočnih lastnosti zmesi praškov z različnimi velikostnimi razredi, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani, 2011.

25. Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 2.2. Ministrstvo za zdravje, Agencija republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2007; 628-630.
26. Bunjevec M, Vrečar F, Ilić I, Baumgartner S: Pomen Heckelove analize za preučevanje kompresibilnosti zmesi za tabletiranje. Farmacevtski vestnik 2009; 60 ;327-335.
27. Aulton ME, Alderborn G: The Design and Manufacture of Medicines, Aulton's Pharmaceutics 3th. Churchill Livingstone, 2007; 441-481.
28. Srčič S: Interno gradivo za vaje industrijske farmacije. Fakulteta za farmacijo, 2009.
29. Summers M. P, E.Aulton,: The Design and Manufacture of Medicines. Aulton's Pharmaceutics 3th. Churchill Livingstone, 2007; 410-423.
30. Ohta K.M, Fuji M, Takei T, Chikazawa M: Effect of geometric structure and surface wettability of glidant in tablet hardness. International Journal of Pharmaceutics 262, 2003; 75-82.
31. Bioportfolio: Na-alendronat . Dostopno na internetu:
<http://www.bioportfolio.com/resources/drug/21685/Alendronate-Sodium.html>
 (26.9.2012)
32. Karamustafa F, Celebi N: Bisphosphonates and Alendronate. Phar. Sci.,31, 2006; 31-42.
33. PDB-Protein Data Bank; dostopno internetu:
<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=37> (26.9.2012)
34. Princeton Biomolecules: <http://www.pbcpeptide.com/BSA.htm> (26.9.2012)
35. Rowe RC, Sheskey JP, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients^{6th}, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press , 2009.
36. Grace Davision Discovery Science: Pharmaceutical Excipients Syloid ®244FP;
 Dostopno na internetu:
http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M317_Syloid244FP.pdf (26.9.2012)
37. Bevc B: Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi.
 Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakultete za farmacijo, 2010.

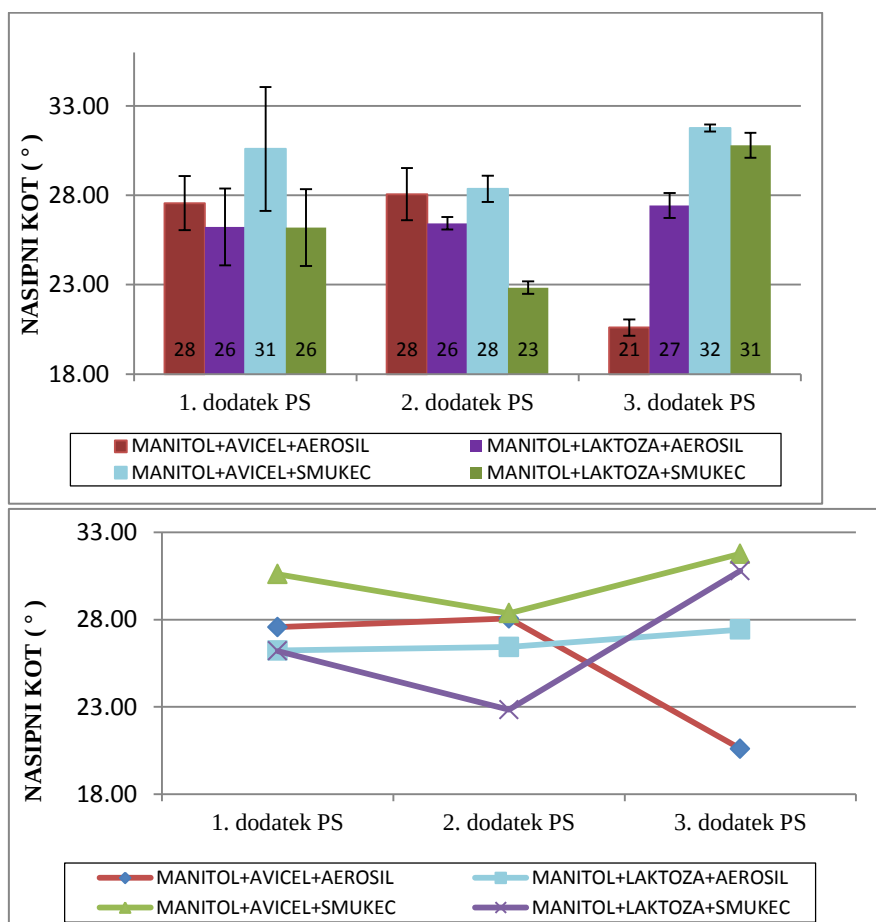
38. Ewonik industries: Aerosil®. Dostopno na internetu: <http://www.aerosil.com/lpa-productfinder/page/productsbytext/detail.html> (26.8.2012)
39. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, 2007.
40. Presečnik M: Študij vezave polifenolov na goveji serumski albumin z diferenčno kalorimetrijo. Diplomski naloga, Biotehnična fakulteta . Univerza v Ljubljani, 2010.
41. Lu J, Stewart AJ, Sadler PJ, Pinheiro TJ, Blindauer CA: Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. Biochemical Society transactions, 36, 2008 ;1317-1321;

7 PRILOGA

Zaradi premajhnih volumnov vzorcev so rezultati nasipnih kotov le informativni. Večina vzorcev je že po 1. dodatku PS pridobila odlične pretočne lastnosti, nato pa smo z nadaljnim dodajanjem PS dosegali vedno slabše rezultate.

Najboljše pretočne lastnosti (slika 34) je imel vzorec manitola z dodano laktozo in Aerosilom®.

1 IZBIRA POMOŽNIH SNOVI



Slika 34 Povprečni nasipni koti in standardne napake vzorcev manitola po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

Preglednica XXII: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva drsil na nasipne kote. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

Vzorcu št. 1 (manitolu) smo dodajali štiri različne kombinacije PS.	p-vrednosti	Primerjava nasipnih kotov med 1. in 2. dodatkom PS	Primerjava nasipnih kotov med 2. in 3. dodatkom PS
Št. vzorca	Naziv vzorca		
1/1	MAN+AVICEL+AEROSIL	1,5839	0,0010
1/2	MAN+AVICEL+SMUKEC	0,1467	0,0002
1/3	MAN+LAKTOZA+AEROSIL	0,8816	0,0920
1/2	MAN+LAKTOZA+SMUKEC	0,1750	0,0000

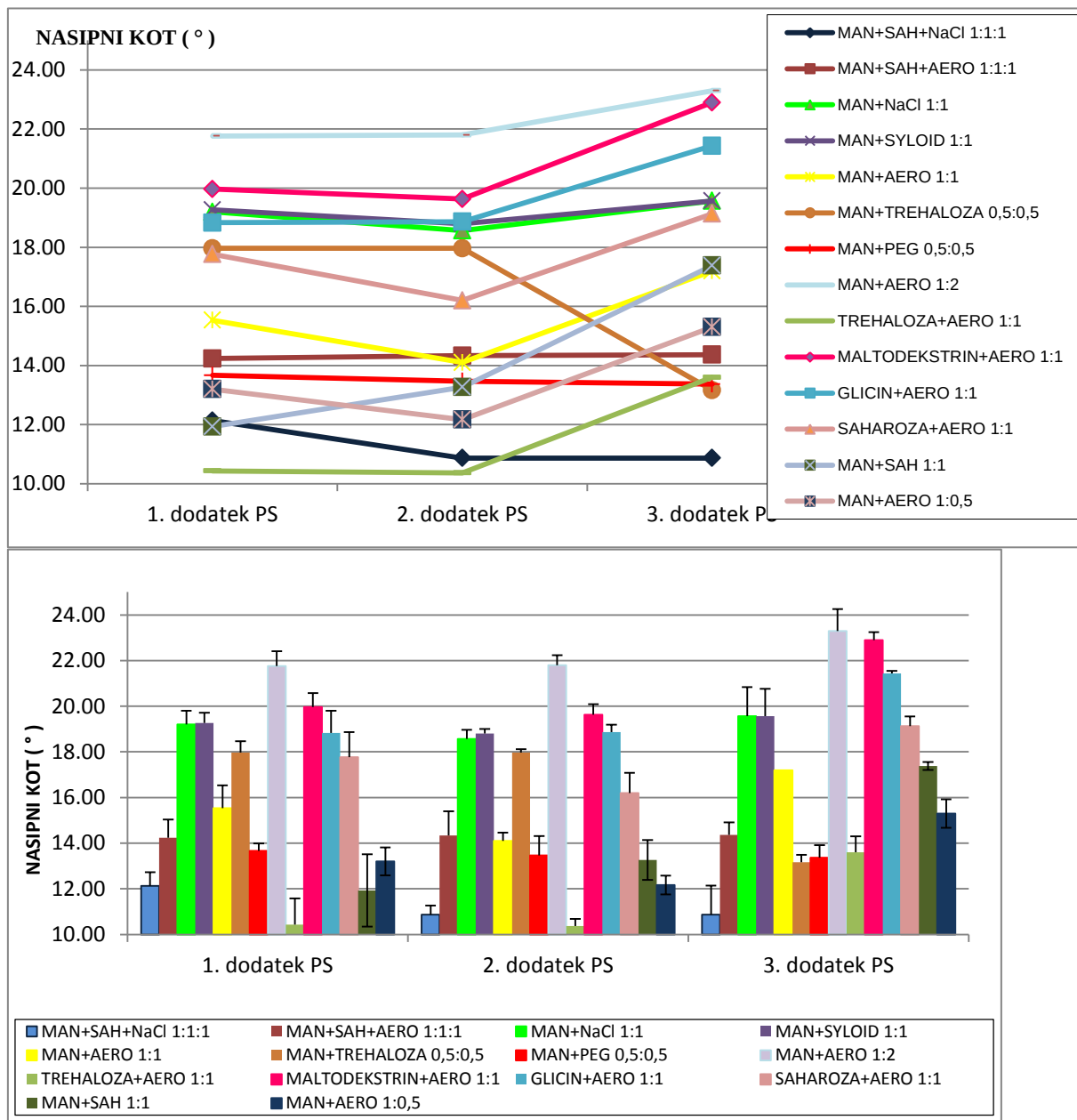
2 IZBIRA PLACEBO FORMULACIJE Z NAJBOLJŠIMI PRETOČNIMI LASTNOSTMI

Preglednica XXIII: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva drsil na nasipne kote. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

ŠT. VZORCA	p-vrednosti	Primerjava nasipnih kotov med 1. in 2. dodatkom PS	Primerjava nasipnih kotov med 2. in 3. dodatkom PS
Naziv vzorca			
1.	MAN+SAH+NaCL 1:1:1	0,1545	1,0000
2.	MAN+SAH+AERO 1:1:1	0,9029	1,0000
3.	MAN+NaCL 1:1	0,2040	0,2648
4.	MAN+SYLOID 1:1	0,1766	0,3340
5.	MAN+AERO 1:1	0,0801	0,0035
6.	MAN+TREHALOZA 1:1	1,0000	0,0000
7.	MAN+PEG 0,5:0,5	0,7226	0,8726
8.	MAN+AERO 1:2	0,9443	0,0684
9.	TREHALOZA+AERO 1:1	0,9276	0,0019
11.	MALTODEKSTRIN+AERO 1:1	0,4894	0,0006
12.	GLICIN+AERO 1:1	0,9577	0,0002
13.	SAH+AERO 1:1	0,1277	0,0066
14.	MAN+SAH 1:1	0,2705	0,0013
15.	MAN+AERO 1:0,5	0,0721	0,0019

Z metodo nasipnih kotov se tudi po tretjem dodatku PS pretočnost vseh vzorcev ni statistično značilno izboljšala (preglednica XXIII).

Najboljše pretočne lastnosti je imel vzorec s trehalozo in Aerosilom® (TREHALOZA+AERO 1:1) (slika 35), sledi ji kombinacija manitola, saharoze in NaCl (MAN+SAH+NaCl 1:1:1). Na tretjem mestu pa je bil vzorec, ki je vseboval manitol in Aerosil® (MAN+AERO 1:1).



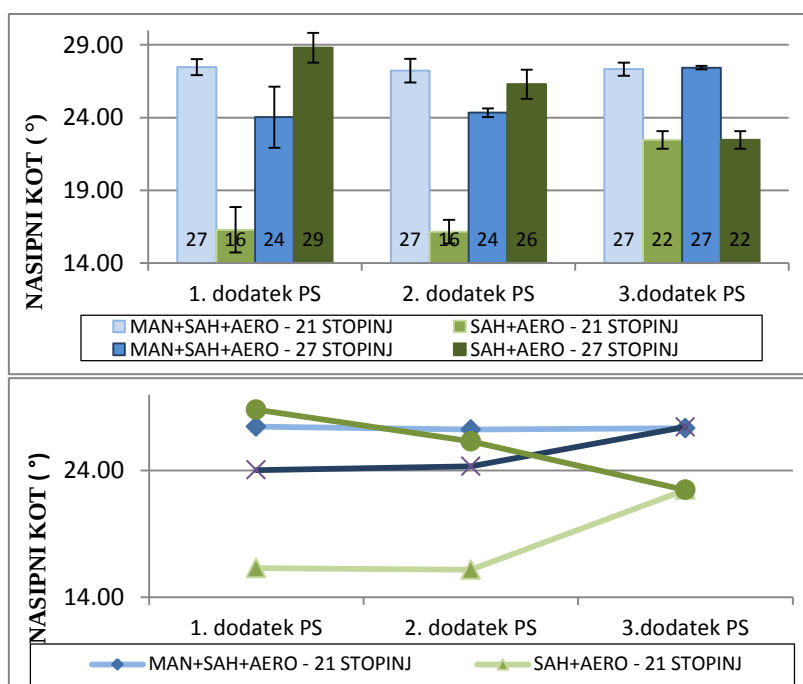
Slika 35: Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

3 VPLIV TEMPERATURE NA PRETOČNOST LIOFILIZATOV

Pri primerjavi nasipnih kotov (preglednica XXIV) smo ugotovili statistično značilne razlike po 2. dodatku PS v obeh primerjanih vzorcih, po 1. dodatku PS pa le pri vzorcu s saharozo in Aerosilom® (SAH+AERO). Na osnovi rezultatov, določenih z metodo nasipnih kotov pa ne moremo trditi, da ima posamezen liofilizat, ki smo ga pripravili pri nižji ali. višji temperaturi boljše pretočne lastnosti (slika 36).

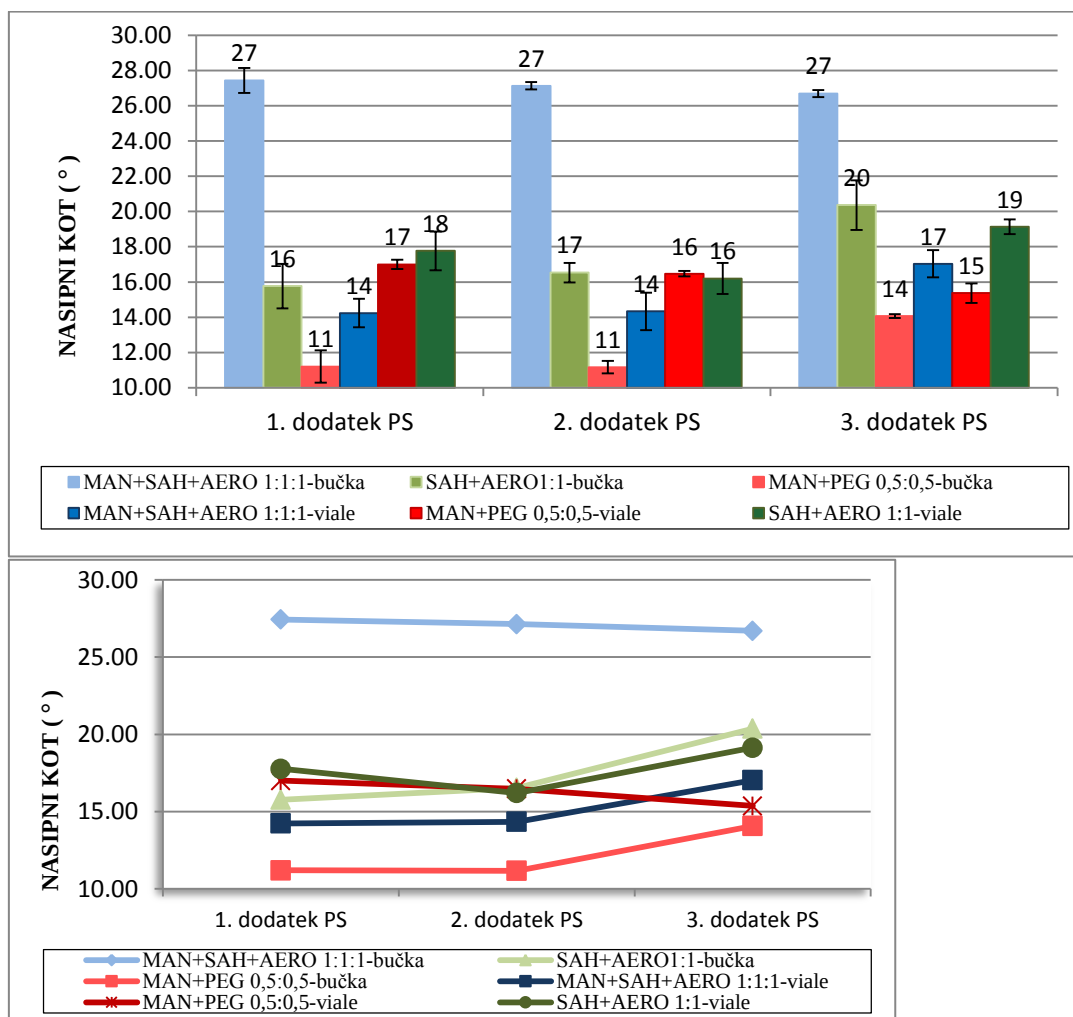
Preglednica XXIV: Vrednosti p dvostranskega t-testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje temperature na nasipne kote po različnih dodatkih PS (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

Št vzorca	Naziv vzorca	p-vrednosti		
		Primerjava nasipnih kotov vzorcev pripravljenih pri 21°C in 27°C po 1. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov vzorcev pripravljenih pri 21°C in 27°C po 2. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov vzorcev pripravljenih pri 21°C in 27°C po 3. dodatku PS
22 in 24	MAN+SAH+AERO 1:1:1 21°C /27°C	0,0520	0,0045	0,7287
23 in 25	SAH+AERO 1:1 21°C /27°C	0,0003	0,0002	1,0000



Slika 36: Povprečni nasipni koti in standardne napake vzorcev pri različnih T okolja in po dodatkih pomožnih snovi (PS).

4 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH V BUČKAH IN VIALAH



Slika 37: Povprečni nasipni koti in standardne napake formulacij pripravljenih v bučkah in vialah, po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

Slika 37 prikazuje velika odstopanja meritev nasipnih kotov manitola, saharoze in Aerosila® v bučki (MAN+SAH+AERO-bučka). To je bila daleč najslabša meritev. Vzorec manitola in PEG pripravljen v bučki (MAN+PEG-bučka), pa je zagotavljal najboljše meriteve. Dejstvo je, da z meritvami nasipnih kotov nismo mogli potrditi, da imajo liofilizati, pripravljeni v bučkah oz. vialah boljše oz. slabše pretočne lastnosti.

S t-testom (preglednica XXV) smo ugotovili, da se od ostalih statistično značilno razlikuje le vzorec s kombinacijo manitola, saharoze in Aerosila® (MAN+SAH+AERO) in to po vseh dodatkih PS

Preglednica XXIV: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva različnih vsebnikov pri izdelavi vzorcev na nasipne kote po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro).

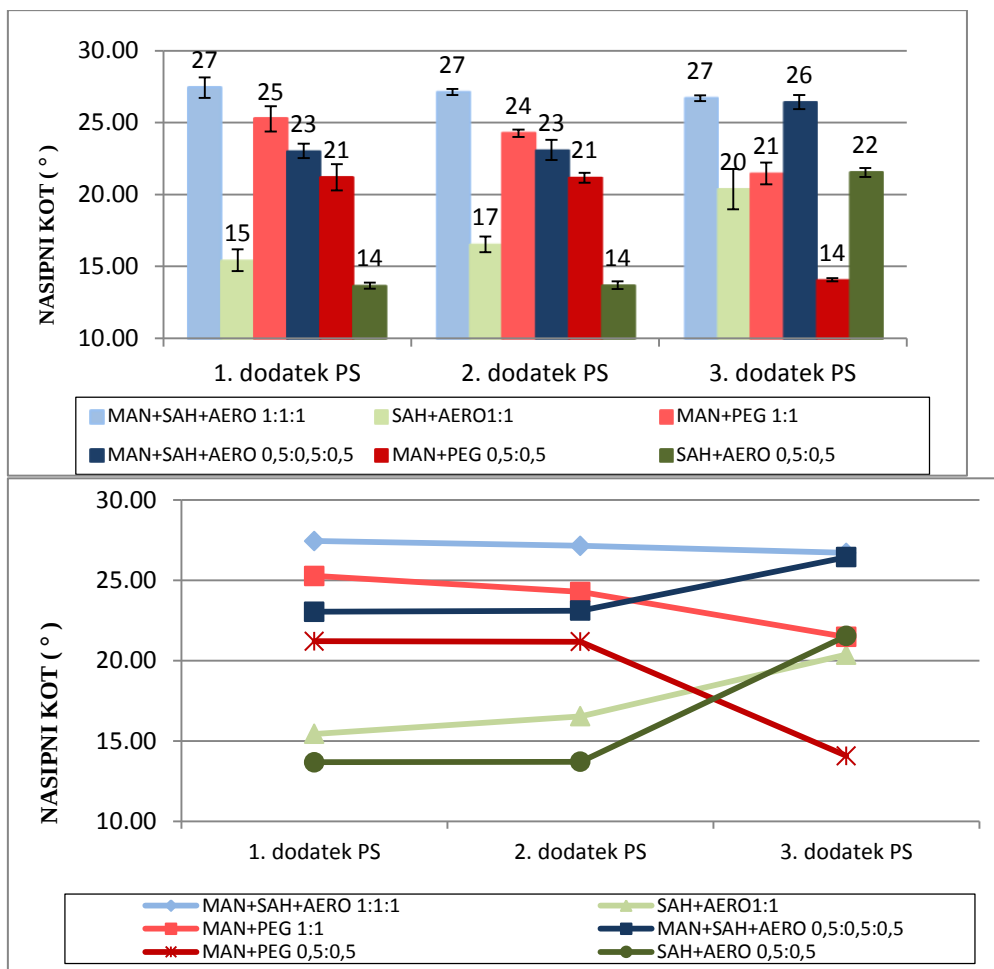
Št. vzorca	p-vrednosti Naziv vzorca	Primerjava nasipnih kotov med vzorcev pri pripravljenim v viali in bučki po 1. dodatku PS	Primerjava pretočnih časov med vzorcev pripravljenim v viali in bučki po 2. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med vzorcev pri pripravljenim v viali in bučki po 3. dodatku PS
3 in 26	MAN+SAH+AERO 1:1:1	0,0000	0,0000	0,0000
8 in 27	SAH+AERO 1:1	0,1071	0,0029	0,2186
13 in 28	MAN+PEG 0,5:0,5	0,0005	0,0000	0,0161

5 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH Z RAZLIČNIMI MASNIMI DELEŽI TRDNIH SNOVI

Formulacije pripravljene s polovičnim masnim deležem njihovih sestavin so imele manjši nasipne kote in s tem boljše pretočne lastnosti (slika 38).

Preglednica XXVI: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva masnih deležev na nasipni kot po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro.)

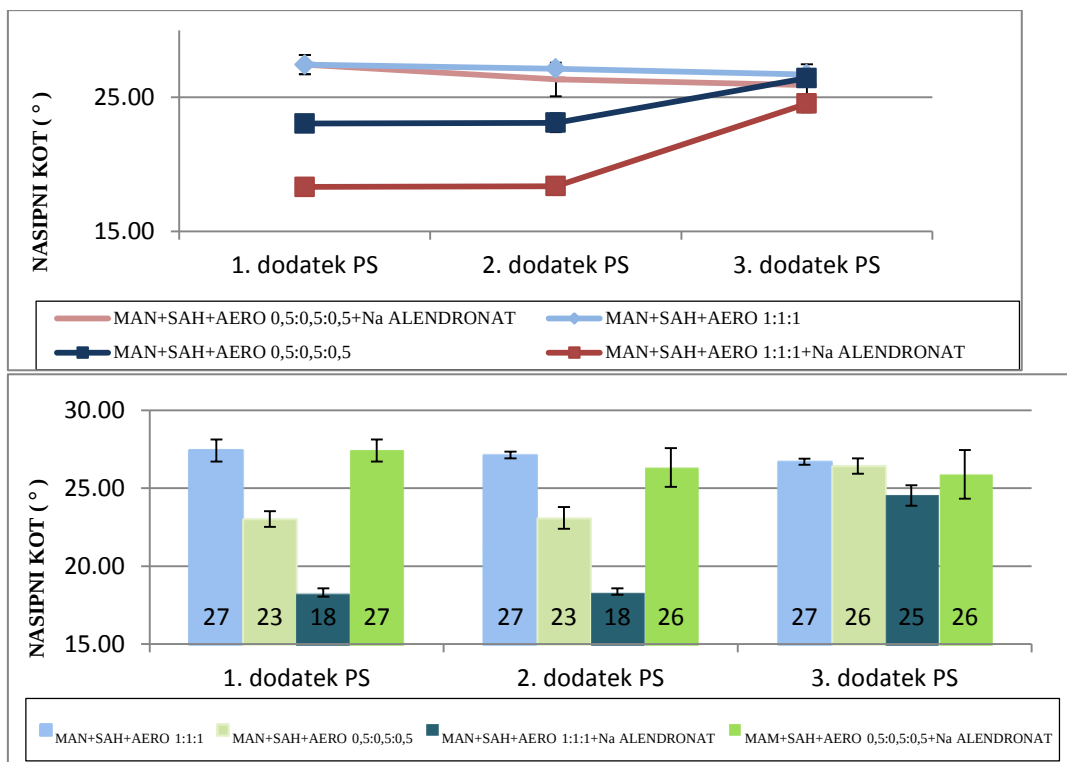
Št. vzorca	p-vrednosti Naziv vzorca	Primerjava nasipnih kotov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 1. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 2. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med vzorci z različnimi masnimi deleži po 3. dodatku PS
26 in 29	MAN+SAH+AERO	0,0009	0,0007	0,7838
27 in 30	MAN+PEG	0,0051	0,0002	0,0030
28 in 31	SAH+AERO	0,0181	0,0013	0,4006



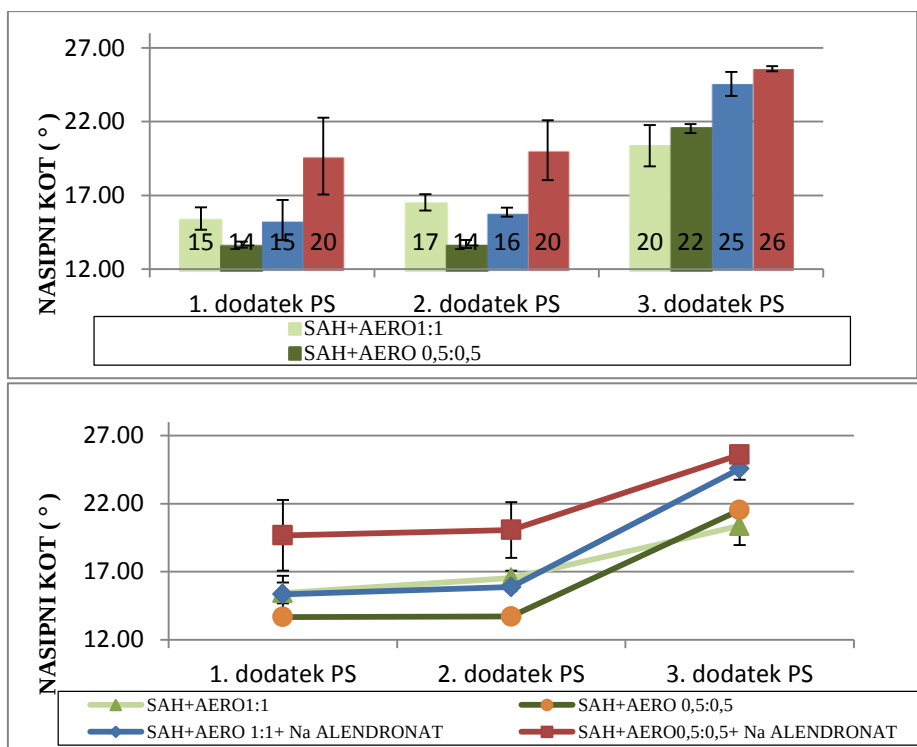
Slika 38: Povprečni nasipni koti in standardne napake formulacij z različnimi masnimi razmerji sestavin po dodatkih različnih pomožnih snovi (PS).

6 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH Z NATRIJEV ALENDRONATOM

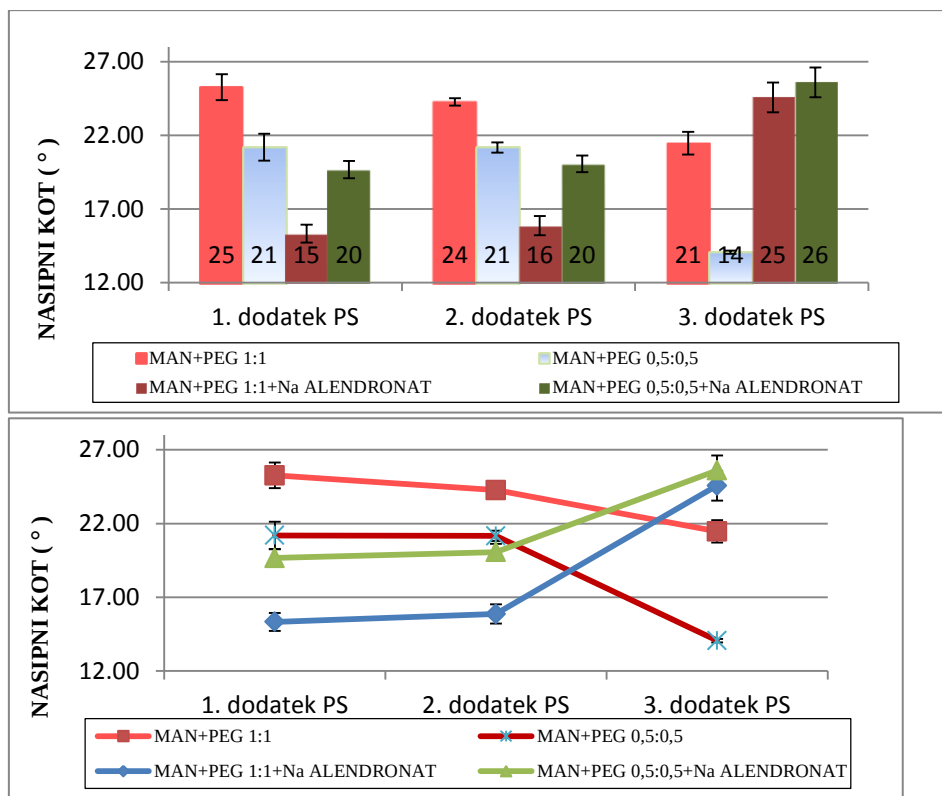
Z metodo nasipnih kotov nismo mogli določiti vpliv dodatka natrijevega alendronata na pretočnost vzorca, saj se je ta ob vsakem nadaljnjem dodatku PS še poslabšala (slika 39).



Slika 39: Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij manitola, saharoze in Aerosila® ter enakih mešanic z natrijevim alendronatom po dodatkih pomožnih snovi (PS).



Slika 40: Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij saharoze in Aerosila® ter enakih mešanic z natrijevim alendronatom po dodatkih pomožnih snovi (PS).



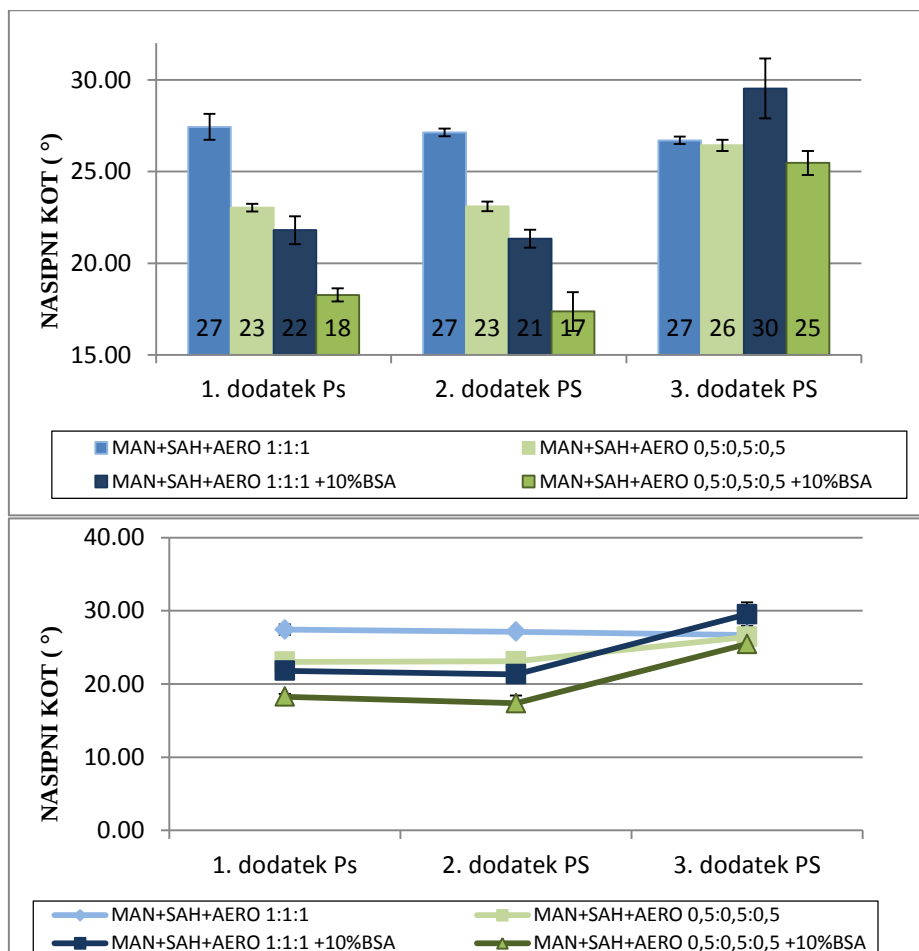
Slika 41: Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij manitola in PEG-a ter enakih mešanic z natrijevim alendronatom po dodatkih pomožnih snovi (PS).

Preglednica XXVII: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva prisotnosti natrijevega alendronata na nasipne kote po različnih dodatkih PS.

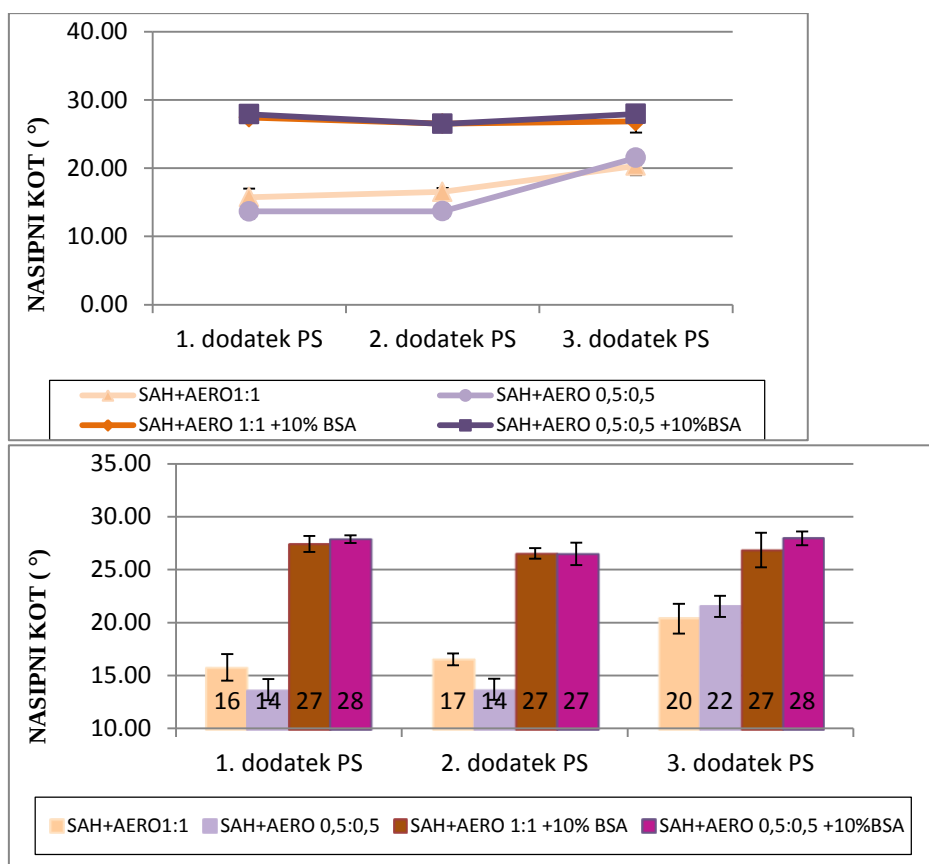
Št. vorca	Naziv vzorca	p-vrednosti		
		Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom natrijevega alendronata, po 1. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom natrijevega alendronata, po 2. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom natrijevega alendronata, po 3. dodatku PS
26 in 32	MAN+SAH+AERO 1:1:1 placebo/ natrijev alendronat	0,0000	0,0000	0,0057
27 in 33	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat	0,0009	0,0174	0,6029
28 in 34	SAH+AERO 1:1 placebo/ natrijev alendronat	0,91682	0,16044	0,01099
29 in 35	SAH+AERO 0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat	0,01640	0,03080	0,00019
31 in 36	MAN+PAG 1:1 placebo/ natrijev alendronat	0,0020	0,0038	0,0009
32 in 37	MAN+PAG 0,5:0,5 placebo/ natrijev alendronat	0,4179	0,2648	0,2263

7 PRIMERJAVA PRETOČNOSTI PLACEBO LIOFILIZATOV IN LIOFILIZATOV PRIPRAVLJENIH Z BSA

Z dodatkom BSA smo izboljšali pretočnosti placebo vzorcev (sliki 42, 43). S t-testom smo dokazali statistično značilne razlike pri skoraj vseh preučevanih vzorcih z dodanim BSA (preglednica XXVIII).



Slika 42: Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij manitola, saharoze in Aerosila® ter enakih formulacij z BSA po dodatkih pomožnih snovi (PS).

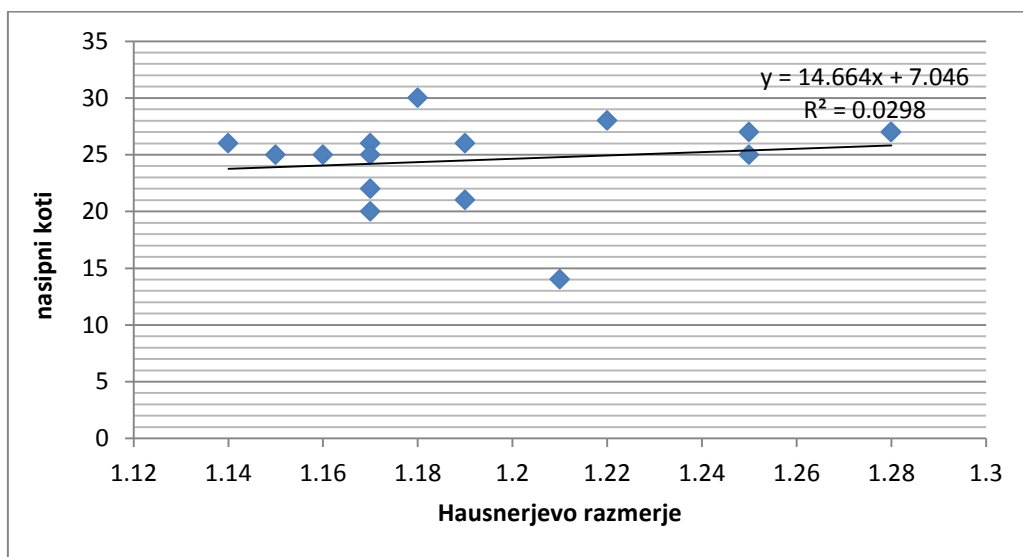


Slika 43 Povprečni nasipni koti in standardne napake placebo formulacij saharoze in Aerosila® ter enakih mešanic z BSA po dodatkih pomožnih snovi (PS).

Preglednica XXVIII: Vrednosti p dvostranskega t -testa z enakima variancama, pri $\alpha=0,05$, ki smo ga uporabili za testiranje vpliva prisotnosti BSA na nasipne kote po različnih dodatkih PS. (Vsak dodatek pomožnih snovi, ki je povzročil statistično značilno spremembo pretočnih lastnosti smo v tabeli pobarvali modro.)

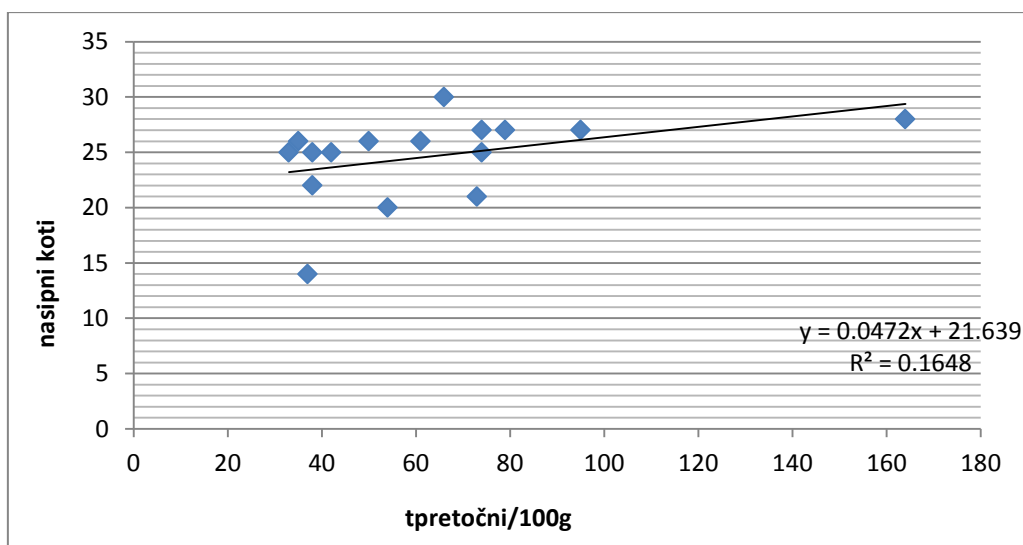
Št. vzorca	p-vrednosti	Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom BSA, po 1. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom BSA, po 2. dodatku PS	Primerjava nasipnih kotov med placebo vzorci in vzorci z dodatkom BSA, po 3. dodatku PS
Naziv vzorca				
26 in 38	MAN+SAH+AERO 1:1:1-placebo/bsa	0,0033	0,0000	0,0001
27 in 39	MAN+SAH+AERO 0,5:0,5:0,5 placebo/bsa	0,0001	0,0116	0,1321
28 in 40	SAH+AERO 1:1 placebo/bsa	0,0002	0,0000	0,0064
29 in 41	SAH+AERO 0,5:0,5 placebo/bsa	0,0000	0,0000	0,0001

Če primerjamo korelacijo rezultatov nasipnih kotov in Hausnerjevimi razmerji (slika 44) vseh vzorcev, ugotovimo da je povezanost uporabljenih metod zelo majhna ($R^2=0,0298$).



Slika 44 Korelacija med Hausnerjevimi razmerji in nasipnimi koti za vse preiskušene vzorce.

Korelacija med izmerjenimi vzorci pretočnih časov in nasipnih kotov (slika 45) je bila pav tako majhna ($R^2=0,1648$).



Slika 45: Korelacija med pretočnimi časi in nasipnimi koti za vse preiskušene vzorce (št. 26-41).