

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KRANJC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



EVA KRANJC

**PROUČEVANJE ADSORPCIJE KARVEDILOLA NA POROZNI
SILICIJEV DIOKSID IZ RAZLIČNIH ORGANSKIH TOPIL**

**STUDYING ADSORPTION OF CARVEDILOL ON POROUS
SILICON DIOXIDE FROM DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku, mag. farm. za mnoge ustvarjalne ideje, potrpežljivost in čas, ki ga je namenil številnim termogravimetričnim meritvam. Zahvaljujem se tudi dr. Borutu Kovačiču, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju in nasvete pri obdelavi rezultatov.

Posebna zahvala gre tudi moji družini in vsem, ki so mi stali ob strani tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Eva Kranjc

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 Struktura in termodinamična osnova trdnih disperzij.....	3
1.2 Mehanizmi povečanja topnosti in raztapljanja ZU iz trdnih disperzij.....	5
1.3 Metode izdelave trdnih disperzij.....	7
1.4 Nosilci za izdelavo trdnih disperzij	8
1.4.1 Kristalni vodotopni nosilci	9
1.4.2 Amorfni vodotopni nosilci	10
1.4.3 Nevodotopni nosilci.....	11
1.5 Porozni nosilci za izdelavo trdnih disperzij	11
1.5.1 Izdelava trdnih disperzij s poroznim SiO ₂	12
1.5.2 Sproščanje učinkovin iz poroznega SiO ₂	12
1.5.3 Toksičnost poroznega SiO ₂	14
1.5.4 Sylysia [®] 350	15
1.6 Karvedilol	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Aparature.....	18
3.3 Metode dela.....	19
3.3.1 Priprava amorfnega karvedilola.....	19

3.3.2	Izdelava trdnih disperzij	19
3.3.3	Določanje gostote s helijevim piknometrom	22
3.3.4	Postopek sušenja poroznega SiO ₂	22
3.3.5	Porozni SiO ₂ pri različnih relativnih vlažnostih zraka	23
3.3.6	Termogravimetrična analiza (TGA)	24
3.3.7	Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	24
3.3.8	Preskus raztapljanja	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	Razvoj metode določanja vsebnosti karvedilola v trdni disperziji s poroznim SiO ₂ . 26	
4.1.1	Termogravimetrična analiza čistega karvedilola.....	27
4.1.2	Termogravimetrična analiza čistega poroznega SiO ₂	28
4.1.3	Termogravimetrična analiza trdne disperzije karvedilola v poroznem SiO ₂	33
4.2	Adsorpcija karvedilola na porozni SiO ₂ iz različnih organskih topil	34
4.2.1	Izbira organskih topil.....	34
4.2.2	Adsorpcija karvedilola na porozni SiO ₂ iz različnih organskih topil	36
4.2.3	Vpliv šibko vezane vode na adsorpcijo karvedilola na porozni SiO ₂	40
4.3	Določanje gostote s helijevim piknometrom	42
4.4	Raztapljanje karvedilola iz trdnih disperzij	46
5	SKLEP	54
6	LITERATURA.....	56

POVZETEK

Rezultat 50 let intenzivnih raziskav izboljševanja raztapljanja zdravilnih učinkovin, z vgrajevanjem le-teh v trdne disperzije, je razmeroma majhno število tržno dostopnih izdelkov. V zadnjem času so, poleg tradicionalnih vodotopnih nosilcev zdravilnih učinkovin, aktualni anorganski porozni nevodotopni nosilci, med katere uvrščamo tudi porozni silicijev dioksid.

Namen našega dela je bil proučiti adsorpcijo slabo vodotopnega karvedilola na porozni silicijev dioksid Sylysia® 350 iz različnih organskih topil preko izdelave niza trdnih disperzij različnih vsebnosti karvedilola z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine. Pri tem smo za pripravo raztopin uporabili različna topila (acetone, dioksan in tetrahidrofuran). Za opredelitev obsega adsorpcije karvedilola na porozni nosilec iz različnih topil smo izbrali in optimizirali termogravimetrično metodo določanja vsebnosti karvedilola v trdni disperziji s poroznim silicijevim dioksidom.

Dokazali smo, da izbrano organsko topilo vpliva na obseg adsorpcije karvedilola na porozni silicijev dioksid, vendar vsaj pri tistih topilih, v katerih je učinkovina dobro topna (acetone, dioksan in tetrahidrofuran), večjih razlik v adsorpciji nismo opazili, iz česar sklepamo, da so za obseg adsorpcije najpomembnejše interakcije med učinkovino in nosilcem. Na podlagi rezultatov obsega adsorpcije karvedilola na porozni silicijev dioksid smo za nadaljnjo izdelavo trdnih disperzij uporabili tetrahidrofuran, saj je bila adsorpcija karvedilola iz izbranega topila boljša kot iz ostalih dveh.

Z analizo vzorcev trdnih disperzij in čistega poroznega nosilca smo pokazali, da pravilna in natančna določitev prave gostote trdnih disperzij karvedilola v poroznem silicijevem dioksidu s helijevo piknometrijo ni mogoča.

Z izdelavo trdnih disperzij karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom Sylysia® 350 smo izboljšali hitrost raztapljanja slabo topnega karvedilola v fosfatnem pufru s pH 6,8. Ugotovili smo, da je sproščanje karvedilola neodvisno od vrste uporabljenega organskega topila, iz katerega se učinkovina adsorbira na porozni nosilec. Predpostavljamo, da je sproščanje karvedilola iz neurejenega poroznega silicijevega dioksida odvisno od interakcij med učinkovino in nosilcem. Sklepamo, da se na porozni nosilec veže vedno enaka množina učinkovine, ki se med raztapljanjem ne sprosti iz trdne disperzije. Za nedvoumno potrditev naše hipoteze so potrebne nadaljnje raziskave z uporabo večjega nabora različnih učinkovin.

ABSTRACT

The first solid dispersion technique had improved the dissolution of poorly water-soluble drugs in early 60's. Almost 50 years later with significant advances of solid dispersion knowledge, this technique still offers only few commercial products. This situation could change, as researchers are introducing new types of carriers. Namely, traditional water-soluble carriers are lately being replaced with water-insoluble porous carriers, such as porous silicon dioxide.

The aim of our work was to study the adsorption of poorly water-soluble carvedilol on Sylysia[®] 350, porous silicon dioxide from different organic solvents via preparation of series of solid dispersions with varying carvedilol contents. To load carvedilol in Sylysia[®] pores the method of adsorption from solution using different organic solvents – acetone, dioxane and tetrahydrofuran was used. In order to measure the degree of drug adsorption onto the porous carrier, we applied and optimized a thermogravimetric method for determination of carvedilol content in porous silicon dioxide.

The results showed that solvent selection affects carvedilol adsorption on porous silicon dioxide. Although adsorption of carvedilol from tetrahydrofuran was more efficient than in the case of acetone and dioxane, there were no major differences among these three organic solvents. Therefore we conclude that, in terms of drug loading into the porous carrier, affinity of the drug toward the carrier surface has to be considered as the most important factor. Since adsorption of the drug was the highest from tetrahydrofuran, this was the solvent of choice for preparing further solid dispersion formulations.

Analyses of various solid dispersion and pure porous silicon dioxide samples indicate that neither accurate nor precise determination of true density of carvedilol solid dispersions in porous silicon dioxide with helium pycnometry is possible.

Dissolution rate of poorly water-soluble carvedilol was improved in phosphate buffer (pH 6,8) by preparation of solid dispersions in Sylysia[®] 350, porous silicon dioxide. The results showed no significant differences in carvedilol dissolution from solid dispersions prepared with different organic solvents. We assume that release of carvedilol from non-ordered porous silicon dioxide is affected by drug-carrier interactions. We conclude that constant amount of carvedilol binds to porous carrier and that this amount is not released from solid dispersion during dissolution. To unambiguously confirm our hypothesis, further studies with various pharmacologically active substances are required.

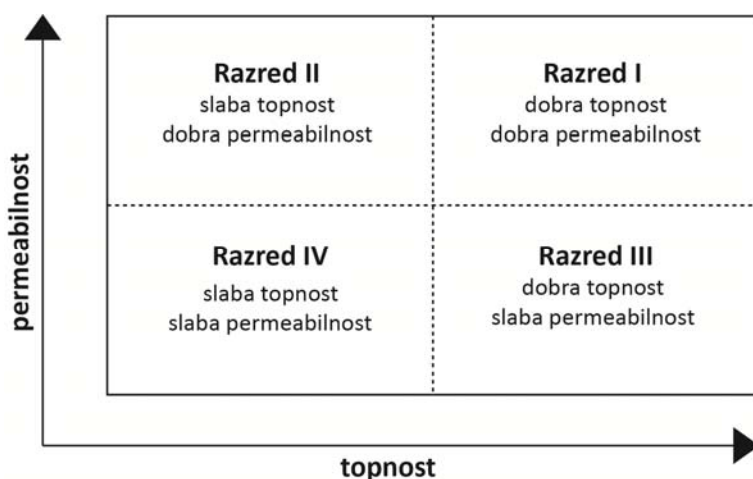
SEZNAM OKRAJŠAV

BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutics Classification System)
BU	biološka uporabnost
DMSO	dimetilsulfoksid
DN	Gutmannovo donorsko število (Gutmann donor number)
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)
GIT	gastrointestinalni trakt
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
H-vez	vodikova vez
ICH	Mednarodna konferenca za usklajevanje (International Conference on Harmonisation)
KAR	karvedilol
PAS	površinsko aktivna snov
PDE	dovoljena dnevna izpostavljenost (Permitted Daily Exposure)
PEG	polietilenglikol
PVP	polivinilpirolidon
RV	relativna vlažnost
TG	termogravimetričen <-na, -no>
TGA	termogravimetrična analiza (Thermogravimetric Analysis)
THF	tetrahidrofuran
T _g	temperatura steklastega prehoda
T _m	temperatura tališča
ZU	zdravilna učinkovina

1 UVOD

Z razvojem kombinatorne kemije in visokozmogljivostnih tehnik reševanja spojin se je povečala verjetnost za odkritje novih zdravilnih učinkovin (ZU). Farmacevtska kemija teži k odkrivanju spojin vodnic s čim večjo učinkovitostjo *in vitro*, kar najlažje dosežemo z uvedbo lipofilnih funkcionalnih skupin na izbrana mesta v molekuli in tako povečamo možnost za interakcije spojine s tarčo (1). Zaradi uporabe opisanega pristopa je skorajda polovica novo odkritih ZU težko vodotopnih ali celo nevodotopnih (2).

Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (angl. Biopharmaceutics Classification System – BCS) deli ZU v štiri razrede (slika 1) in upošteva, da je hitrost njihove absorpcije odvisna od njihove vodotopnosti in permeabilnosti skozi biološke membrane. Večina novo odkritih ZU spada po BCS v razred II – pri teh je glavni omejujoči dejavnik absorpcije slaba topnost v vodnih medijih (3). Trdimo lahko, da ZU z nepopolno absorpcijo izkazujejo nizko biološko uporabnost (BU) (4).



Slika 1: Razdelitev učinkovin po BCS. Slika je prirejena po (5).

Pri večini aplikacij se mora ZU absorbirati v sistemski krvni obtok, da lahko doseže mesto delovanja (izjeme so tiste ZU, ki jih apliciramo neposredno na mesto delovanja ali intravensko). Ker je večji del ZU namenjen peroralni aplikaciji (1), predstavlja povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja enega izmed najpomembnejših in vedno prisotnih izzivov za farmacevtsko tehnologijo (2). Za povečanje količine raztopljene ZU na mestu absorpcije uporabljamo različne metode povečanja vodotopnosti in hitrosti raztapljanja. Smernice za izboljšanje raztapljanja podaja modificirana Noyes-Whitney-eva enačba (enačba 1):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h} \quad (\text{En } 1),$$

kjer je dC/dt hitrost raztapljanja, A površina, ki je na voljo za raztapljanje, D difuzijski koeficient ZU, C_s ravnotežna topnost ZU v mediju, C koncentracija ZU ob času t ter h debelina difuzijske plasti.

Raztapljanje lahko izboljšamo s povečanjem površine, ki je na voljo za ta proces, tako da zmanjšamo velikost delcev in/ali izboljšamo močenje, z zmanjšanjem debeline difuzijske plasti, z zagotavljanjem pogojev »sink« (volumen medija je vsaj 3-krat večji od volumna, ki bi bil potreben, da se tvori nasičena raztopina ZU) in s povečanjem navidezne topnosti. Izmed danih možnosti je najtežje vplivati na hidrodinamske aspekte *in vivo*, saj je vzdrževanje pogojev »sink« odvisno od permeabilnosti sluznice gastrointestinalnega trakta (GIT) ter od sestave in volumna tekočine v lumnu GIT. Za povečanje permeabilnosti lahko uporabljamo določene pomožne snovi, vendar pa ta pristop ne daje najboljših rezultatov. Ena izmed možnosti je aplikacija ZU skupaj s hrano, saj se tako podaljša čas in poveča količina gastrointestinalne tekočine, ki sta na voljo za raztapljanje. Med vsemi pristopi je najbolj perspektivna uporaba formulacijskih pristopov za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih ZU (6).

Razvoj metod za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja gre v smeri razvoja **trdnih peroralnih farmacevtskih oblik**, ki imajo kar nekaj prednosti pred tekočimi: boljšo stabilnost, manjši volumen, natančno odmerjanje in enostavno proizvodnjo. **Izdelava trdnih disperzij** predstavlja enega izmed najbolj uspešnih pristopov, ki omogoča izdelavo trdnih peroralnih farmacevtskih oblik s težko vodotopnimi ZU. V trdno disperzijo lahko teoretično vgradimo katerokoli ZU (7, 8), kar pa ne velja za vse ostale tehnološke pristope – npr. tvorba soli je primerna le za ionogene ZU (9). Prav tako izkazujejo trdne disperzije boljše mehanske lastnosti kot npr. prahovi, ki jih pridobimo z mletjem (7, 8). Med univerzalne metode, ki so teoretično primerne za vse ZU, uvrščamo tudi izdelavo nanokristalov in nanosuspenzij, vendar se tu srečujemo s problemom nanotoksičnosti (10). Pri parenteralni aplikaciji dobro vodotopnih inkluzijskih kompleksov s ciklodekstrini ogroža zdravje pacienta nefrotoksičnost (11, 12). Slabost mikroemulzij in samomikroemulgirajočih sistemov pa je visoka vsebnost površinsko aktivnih snovi (PAS), ki so potencialno toksične (13). Razmeroma nova in obetavna metoda je izdelava farmacevtskih kokristalov, kjer pridobimo nove kristalne strukture ZU in s tem spremenimo njene lastnosti (topnost, hitrost raztapljanja, mehanske lastnosti, itd.), vendar pa to področje farmacevtske tehnologije še ni dovolj raziskano za rutinsko uporabo v industriji (14).

1.1 Struktura in termodinamična osnova trdnih disperzij

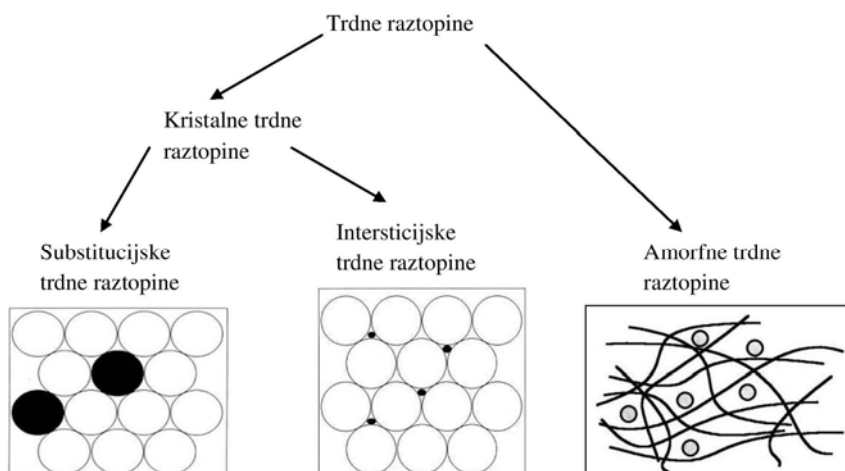
Trdna disperzija je disperzija vsaj dveh komponent v trdnem agregatnem stanju (15). Običajno gre za hidrofobno ZU dispergirano v hidrofilnem inertnem nosilcu. Govorimo o izdelavi trdnih disperzij kot o metodi za povečanje neravnotežne topnosti in hitrosti raztapljanja ZU (7, 16). Fizikalno-kemijske lastnosti trdnih disperzij imajo pomembno vlogo pri nadzorovanem sproščanju ZU iz farmacevtske oblike, pri čemer z izbiro nosilca prehajamo od povečanja do upočasnitve sproščanja (17, 18). Glede na dispergirano ZU in kristalnost/amorfno ogrodja lahko trdne disperzije razdelimo v več razredov:

- a. *evtektične zmesi* (kristalni delci ZU so dispergirani v kristalnem ogrodju);
- b. amorfni precipitati v/na kristalnem nosilcu;
- c. *trdne (kristalne) raztopine* (molekularno porazdeljena ZU v kristalnem ogrodju), ki jih nadalje delimo (slika 2):
 - glede na medsebojno mešanje topljenca (ZU) in topila (ogrodja):
 1. kontinuirane trdne raztopine (mešanje v vseh razmerjih, enofazni sistem),
 2. nekontinuirane trdne raztopine (delno mešanje, dvofazni sistem);
 - glede na način porazdelitve topljenca (ZU) v kristalni mreži topila (ogrodja):
 1. substitucijske kristalne trdne raztopine (molekule topila so v kristalni mreži zamenjane z molekulami topljenca),
 2. intersticijske kristalne trdne raztopine (molekule topljenca so vključene v intersticijski prostor molekul topila);
- d. *steklaste raztopine oz. amorfne trdne raztopine* (molekularno dispergirana ZU v amorfnem ogrodju) (slika 2);
- e. *steklaste suspenzije* (kristalni ali amorfni delci ZU so dispergirani v amorfnem ogrodju) (17, 18, 19, 20).

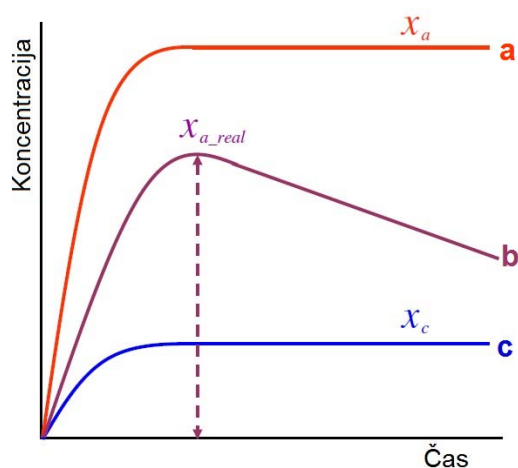
V trdni disperziji se lahko pojavi kombinacija zgoraj naštetih struktur (17). Pionirja trdnih disperzij, Sekiguchi in Obi, sta leta 1961 izdelala evtektično zmes v vodi težko topnega sulfatazola in vodotopnega nosilca sečnine, ki se po peroralni aplikaciji hitreje absorbira in izloči iz telesa kot sam sulfatazol (16, 21).

Kawakami je podal **termodinamično osnovo trdnih disperzij** na primeru homogenih amorfnih formulacij, saj so le-te v zadnjem času počele največ zanimanja s strani raziskovalcev. Amorfnosti so lahko, enako kot kristalne, urejene na kratkih razdaljah (v

odnosu do sosednjih molekul), na daljših razdaljah te urejenosti ni. Amorfne snovi zaradi višje Gibbsove proste energije in termodinamične nestabilnosti kristalizirajo (22, 23).



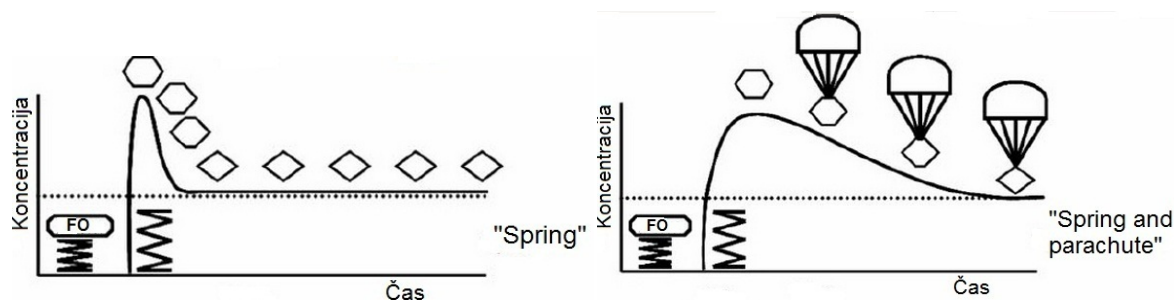
Slika 2: Delitev trdnih raztopin (6, 17, 18, 19).



Slika 3: Raztapljanje kristalne (c) in amorfne oblike ZU (b) ter idealen profil raztapljanja amorfne oblike ZU (a). Slika je prirejena po (22).

Povečana neravnotežna topnost in hitrost raztapljanja sta najpomembnejši lastnosti amorfne snovi (10, 23). S termodinamičnega stališča je topnost spojine pri določenem tlaku, temperaturi in volumnu samo ena in je definirana kot nasičena koncentracija spojine v raztopini, ko je ta v ravnovesju z njeno najbolj stabilno kristalno obliko. V primeru amorfne oblike je ta koncentracija povišana in govorimo o metastabilni/dinamični neravnotežni topnosti x_a . Večinoma nastaja kristalna oblika že ob suspendiranju delcev amorfne oblike v vodnem mediju, zato v profilu raztapljanja amorfne oblike ZU opazimo značilen vrh pri x_{a_real} in nato postopen padec koncentracije na topnost njene kristalne oblike x_c (slika 3) (22, 24). Z vgradnjo amorfne ZU v trdno disperzijo upočasnimo njeno

kristalizacijo ter tako ohranimo prenasičenje po raztopitvi trdne disperzije. Takšen pristop in pripadajoče profile raztapljanja v angleški literaturi imenujejo »spring and parachute« (slovensko »skok in padalo«) (slika 4) (25, 26, 27). Nenaden začetni skok (»spring«) v koncentraciji ZU lahko dosežemo z metodami, ki omogočajo prenasičenje glede na ravnotežno topnost kristalne ZU. Poleg trdnih disperzij in tvorbe amorfne ZU lahko uporabimo tudi kokristale, soli, nanosuspenzije, itd. (22, 24). Prenasičenje v raztopini vzdržujemo z izbiro ustreznih nosilcev trdnih disperzij (»parachuters«), ki zavirajo nukleacijo in/ali rast kristalov, ter tako onemogočajo kristalizacijo in zagotavljajo zadostno stabilnost raztopine, ki je potrebna za absorpcijo ZU (25, 27, 28).



Slika 4: Pristop »spring and parachute« (»skok in padalo«). Slika je prirejena po (27).

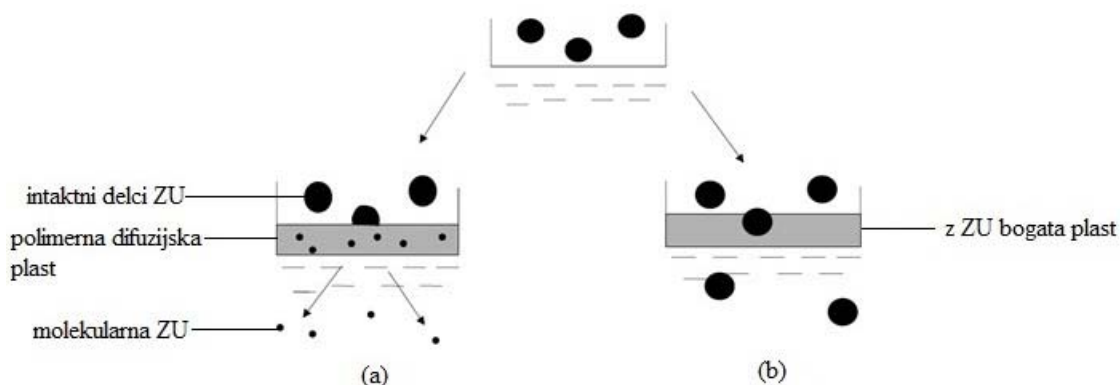
1.2 Mehanizmi povečanja topnosti in raztapljanja ZU iz trdnih disperzij

Presenetljivo je, da so se redki avtorji poglobili v osnove raztapljanja trdnih disperzij, tako da mehanizem raztapljanja trdnih disperzij še ni popolnoma razjasnjen (3, 29, 30, 31, 32). Razumevanje temeljnih lastnosti trdnih disperzij, med katere spadata mehanizem raztapljanja in sama struktura trdnih disperzij, nam lahko pomaga pri obvladovanju težav s stabilnostjo in izdelavo trdnih disperzij (31, 32). Craig je v preglednem članku opisal model raztapljanja trdnih disperzij z vodotopnimi polimernimi nosilci, ki razlikuje med z nosilcem nadzorovanim in z ZU nadzorovanim raztapljanjem (slika 5). Na raztapljajoči se površini se tvori plast bogata s polimerom, skozi katero mora difundirati ZU, da se lahko sprosti v medij. Kadar je vsebnost polimera v trdni disperziji visoka in ZU izkazuje dobro topnost v koncentrirani polimerni difuzijski plasti, gre za **z nosilcem nadzorovano raztapljanje** (slika 5a). Zanj je značilno povečanje hitrosti raztapljanja ZU in prekrivanje profilov raztapljanja tako ZU kot polimernega nosilca. Ko se delci ZU v polimerni difuzijski plasti raztopijo deloma ali v idealnem primeru do molekularnega nivoja, visoka

viskoznost upočasni hitrost difuzije in sproščanje postane odvisno od difuzije/raztapljanja polimera (3, 29, 31, 33, 34). Hitrost raztapljanja ZU tako izrazimo z enačbo 2:

$$G_{ZU} = \frac{A_{ZU} \times G_N}{A_N} \quad (\text{En 2}),$$

kjer je G_{ZU} hitrost raztapljanja ZU, G_N hitrost raztapljanja nosilca, A_{ZU} in A_N pa koncentraciji ZU in nosilca (29). Kadar je vsebnost ZU v trdni disperziji visoka in je ZU slabo topna v koncentrirani polimerni difuzijski plasti, takrat govorimo o **ZU nadzorovanem raztapljanju** (slika 5b). Polimer se s površine raztopi v medij hitreje kot ZU, pri čemer ostane z ZU bogata medfazna plast, ki uravnava hitrost raztapljanja preostalega trdnega dela (29). Zdravilna učinkovina se sprosti v medij v obliki intaktnih delcev, zato je njeno raztapljanje počasnejše, kot če proces nadzoruje polimer. Kadar raztapljanje nadzoruje ZU, so njene fizikalne lastnosti ključnega pomena. S spremembami nosilca pa vplivamo na raztapljanje trdne disperzije, v primeru ko je to nadzorovano z nosilcem (29, 31, 33). Raztapljanje večinoma poteka po obeh mehanizmih hkrati, tako da so pri načrtovanju formulacije pomembne tako lastnosti ZU kot tudi samega ogrodja (31).



Slika 5: Shematski prikaz dveh mehanizmov raztapljanja trdnih disperzij; (a) z nosilcem nadzorovano raztapljanje, (b) z ZU nadzorovano raztapljanje. Slika je prirejena po (31).

Čeprav gre za na videz enostavne farmacevtske oblike, je raztapljanje trdnih disperzij kompleksno, saj poteka hkrati več različnih procesov, na katere vplivajo številni dejavniki:

- lastnosti ZU (topnost, velikost delcev, kristalnost/amorfnost, poroznost delcev),
- lastnosti nosilca (hitrost raztapljanja, fizikalno stanje, molekulska masa, sposobnost močenja in solubilizacije),
- masno razmerje ZU/nosilec in interakcije med ZU in nosilcem,
- kristalizacija ZU med raztapljanjem ter

- struktura trdne disperzije (29–32).

Našteti dejavniki določajo kateri **mehanizmi povečanja topnosti in hitrosti raztapljanja ZU iz trdne disperzije** so ključni za raztapljanje izbrane disperzije. Izboljšanje raztapljanja je lahko posledica naslednjih vplivov:

1. zmanjšana velikost delcev ZU (povečata se specifična površina in hitrost raztapljanja);
2. izboljšano močenje ZU (izboljšana dispergirnost; odsotnost agregacije/aglomeracije);
3. večja poroznost delcev (omogoča hitrejšo raztapljanje hidrofobne ZU);
4. amorfna oblika ZU (izkazuje večjo neravnotežno topnost in hitrost raztapljanja);
5. odsotnost nukleacije in kristalizacije ZU (17, 18, 20, 30, 29, 35).

Večina raziskovalcev postavlja modele raztapljanja ZU iz trdnih disperzij, pri katerih so ogrodja sestavljena iz vodotopnih polimerov, ki pa niso edina možnost izbire nosilcev (18, 31–33). Prav tako večina študij mehanizmov raztapljanja poteka *in vitro*, pri čemer niso vključeni vsi biološki dejavniki, ki lahko vplivajo na mehanizem raztapljanja *in vivo* (36).

1.3 Metode izdelave trdnih disperzij

Metode izdelave trdnih disperzij so postavljene pred izziv – kako na molekularnem nivoju združiti ogrodje in ZU, pri čemer se ZU in nosilec navadno ne mešata. Metode izdelave razdelimo v dve kategoriji: **metode taljenja** (vključujejo taljenje nosilca in potekajo pri povišani temperaturi) in **metode raztapljanja** (vključujejo uporabo topil) (15–18, 21, 22).

Metode taljenja so primerne za termostabilne ZU in nosilce. Procesno temperaturo lahko znižamo z izbiro ustreznih nosilcev – namesto sladkorjev ($T_m > 100$ °C) uporabimo polietilenglikole (PEG), katerih tališča ne presežejo 65 °C (6, 17, 18, 21). Poglavitna prednost metod taljenja je odsotnost organskih topil, s čimer se izognemo njihovemu zaostajanju v produktu in problemu onesnaževanja okolja, neposredno zmanjšamo stroške, saj so ta topila draga ter zaobidemo obvezno uporabo ustrezne zaščitne opreme (21, 37).

Metode raztapljanja omogočajo pripravo trdnih disperzij s termolabilnimi ZU in z nosilci, ki imajo visoke vrednosti T_g oz. T_m . Pri razvoju metod raztapljanja se tehnologi spopadajo predvsem z dvema izzivoma. Prvega predstavlja raztapljanje lipofilne ZU in hidrofilnega ogrodja v istem netoksičnem topilu (6, 7, 18, 21). Večina parov ZU-nosilec izkazuje dobro

topnost v kloroformu ali diklorometanu, ki spadata, zaradi svoje toksičnosti po smernicah Q3C (R4) za rezidualna topila Mednarodne konference za usklajevanje (angl. International Conference on Harmonisation – ICH), v razred II. Da bi zmanjšali toksičnost in ohranili dobro topnost, se danes uporabljajo zmesi manj škodljivih topil, npr. etanol-acetona, etanol-vode, aceton-metanola, itd. (18, 38, 39). Drugi izziv je odstranjevanje topila do zakonsko določenih vrednosti, ki veljajo za rezidualna topila (6, 7, 18, 21, 37). Pri *sušenju z razprševanjem* (angl. spray drying) raztopino ZU in ogrodja razpršimo skozi šobo v komoro z vročim plinom (zrak, dušik). Zaradi velike specifične površine topilo hitro odpari in trdna disperzija se tvori v nekaj sekundah (18, 40). Pri *metodi odparevanja pri znižanem tlaku* topilo odparimo iz raztopine ZU in nosilca v vakuumskem sušilniku oz. z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom, kjer sušenje pospešimo z vrtenjem. Sušenje lahko pospešimo tudi s segrevanjem, vendar tako povečamo tveganje za separacijo faz zaradi povečane molekularne mobilnosti ZU in ogrodja (18). Če presežemo T_g polimernega nosilca, je rezultat lepljiv produkt, saj se polimer nad T_g nahaja v zmehčanem stanju (15). Sušenje pri znižanem tlaku je počasen proces, ki poteka v več korakih, saj moramo po postopni odparitvi topila trden produkt uprašiti in presejati, da dobimo delce želenih velikosti (41).

1.4 Nosilci za izdelavo trdnih disperzij

Izbira nosilca trdne disperzije predstavlja enega izmed ključnih korakov načrtovanja formulacije, pri čemer gre za kompromis med zadostno BU in ustrezno stabilnostjo (22, 36). Zaradi signifikantno večje BU amorfne oblike ZU v primerjavi s kristalno je danes razvoj trdnih disperzij usmerjen v amorfne *trdne disperzije druge* (ogrodje sestavljajo amorfni ali semikristalni polimerni nosilci), *tretje* (ogrodje sestavljajo pomožne snovi s površinsko aktivnimi lastnostmi ali zmes polimerov in PAS) in *nove generacije* (ogrodje sestavljajo porozni nosilci) (slika 6) (42). Najpomembnejša lastnost nosilca amorfne trdne disperzije je zmožnost vzpostavitve in vzdrževanja prenasičenja v *raztopini* znotraj časa absorpcije ZU (model »spring and parachute«) (22). Po drugi strani pa mora nosilec stabilizirati visokoenergijsko amorfno ZU v *trdnem* znotraj časa roka uporabnosti, kar lahko dosežemo z izbiro polimernih nosilcev z visokimi vrednostmi T_g ali z izbiro nosilca, ki ima v strukturi razpoložljive funkcionalne skupine za tvorbo H-vezi in/ali ionske vezi z ZU (7, 22, 36, 43). Za tiste ZU, ki izkazujejo visoko tendenco kristalizacije, so primernejša kristalna ogrodja *prve generacije trdnih disperzij*, znotraj katerih se ZU praviloma nahaja v

stabilnejši kristalni obliki (22, 36, 42). Večina avtorjev člankov med zahteve za nosilce trdnih disperzij s pospešenim sproščanjem še vedno uvršča vodotopnost, vendar je *razvoj nove generacije trdnih disperzij* s poroznimi nevodotopnimi nosilci to zahtevo presegel (7, 17, 36, 44). Nekatero zahtevo za nosilce so vezane na metodo izdelave, ostale pa so splošne, npr. odsotnost farmakološkega učinka (preglednica I) (36).

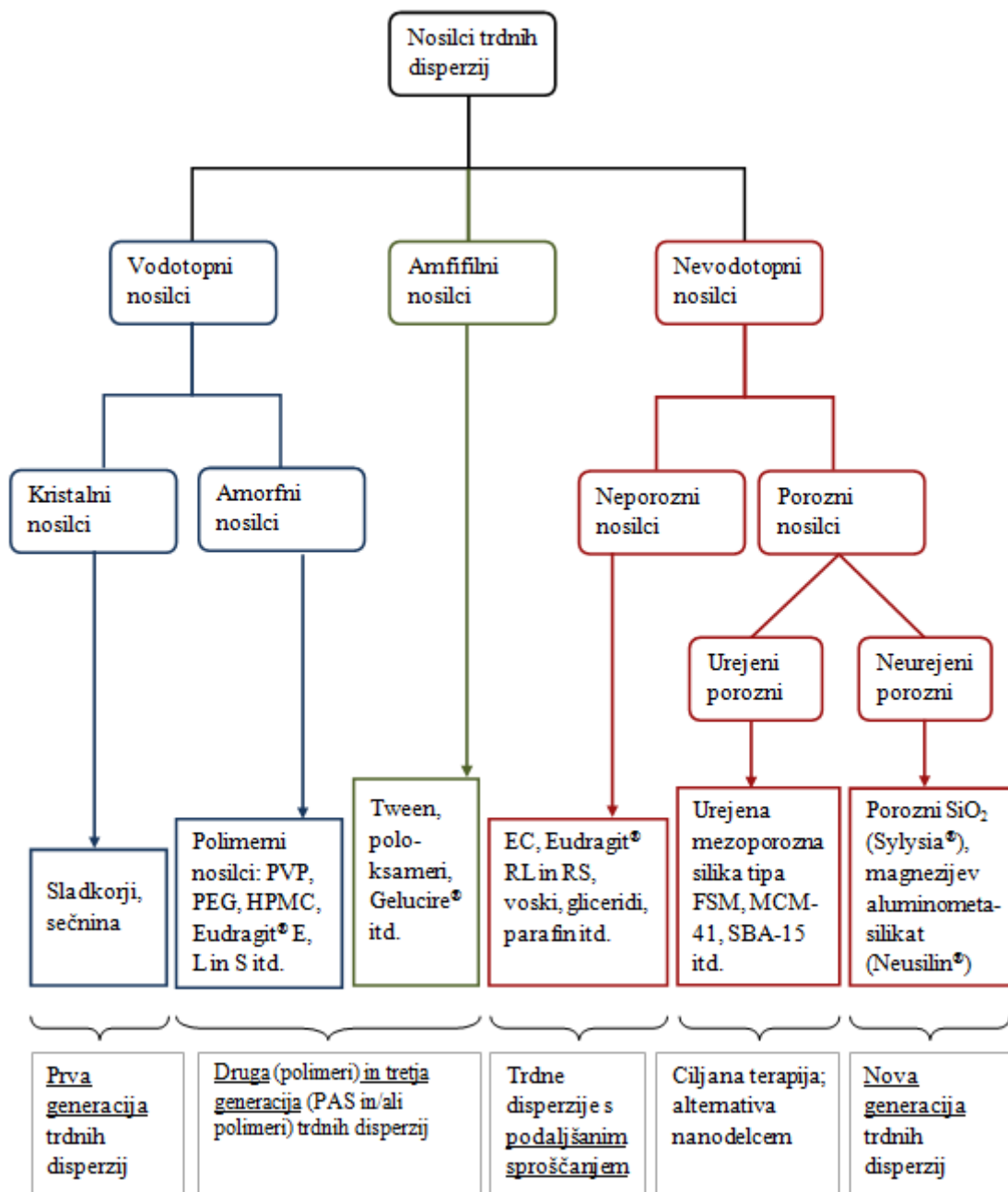
Preglednica I: Želene lastnosti nosilca trdnih disperzij. Prirejeno po (36).

Varnost	Inerten GRAS (angl. generally recognized as safe)
Izdelava	Metode taljenja: Termostabilen Termoplastičen (iztiskanje taline) Metode raztapljanja: Topen v organskih topilih
Raztapljanje	Vodotopen ali porozen nevodotopen Solubilizira ZU Vzpostavi in stabilizira prenasičenje
Stabilnost	Visok T_g Visoka krhkost Donor/akceptor H-vezi

Pri načrtovanju formulacije ni pomembna samo izbira ustreznega nosilca, ampak tudi razmerje ZU/nosilec, pri čemer si z vidika izboljšanja raztapljanja želimo čim manjšo vsebnost ZU, saj tako povečamo verjetnost za nastanek amorfnе disperzije. Vendar lahko vsebnost nosilca povečujemo samo do deleža, v katerega lahko vgradimo ustrezni odmerek ZU (6).

1.4.1 Kristalni vodotopni nosilci

Zdravilna učinkovina je v kristalnem ogrodju pogosto dispergirana v kristalni obliki, zato je izboljšanje njenega raztapljanja manjše kot v primeru amorfnе oblike in je posledica zmanjšanja velikosti delcev ter izboljšane močljivosti (45). Med kristalne vodotopne nosilce uvrščamo sečnino in sladkorje (manitol, sorbitol) (6). Čeprav je izdelava trdnih disperzij s sladkorji omejena zaradi njihovih visokih tališč ($T_m > 100\text{ °C}$) in slabe topnosti v organskih topilih, pa so ti zaradi visoke vodotopnosti in netoksičnosti še vedno zanimivi kandidati za nosilce (6). Vendar pa rezultati primerjalnih študij kažejo na obsoletnost teh nosilcev, saj novejši, polimerni, zagotavljajo boljše raztapljanje ZU kot sladkorji (46).



Slika 6: Delitev nosilcev trdnih disperzij.

1.4.2 Amorfni vodotopni nosilci

Amorfni nosilci so bolj zaželeni kot kristalni, saj obstaja večja verjetnost, da bo ZU molekularno dispergirana ali v amorfni obliki (45). Mednje uvrščamo naravne in sintezne polimere. Od sinteznih polimerov se v disperzijah najpogosteje uporabljajo polietilenglikol (PEG), polivinilpirolidon (PVP) in vodotopni polimetakrilati (Eudragiti®), od naravnih celulozni derivat hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) (6). Polietilenglikol zaradi

semikristalne strukture spodbuja kristalizacijo ZU, PVP pa je zaradi zmožnosti tvorbe H-vezi in visoke vrednosti T_g dober inhibitor kristalizacije v trdni disperziji in po raztapljanju le-te (32, 38, 53, 47, 48). Hidroksipropilmetilceluloza je eden izmed najboljših nosilcev za izdelavo trdnih disperzij, kar potrjuje število trdnih disperzij na trgu, ki ga vsebujejo (49).

1.4.3 Nevodotopni nosilci

Nevodotopne nosilce za izdelavo trdnih disperzij delimo na neporozne in porozne. **Neporozne nevodotopne nosilce** uporabljamo za izdelavo trdnih disperzij s podaljšanim sproščanjem. Delimo jih na *lipidne* (voski, parafin, gliceridi) in *nelipidne* (etilceluloza (EC), Eudragit[®] RL in RS, itd.) (50). **Porozne nevodotopne nosilce** uporabljamo za izdelavo trdnih disperzij s pospešenim in nadzorovanim sproščanjem.

1.5 Porozni nosilci za izdelavo trdnih disperzij

Rezultat 50 let intenzivnih raziskav na področju trdnih disperzij je še vedno razmeroma majhno število tržno dostopnih produktov. Da bi spremenili ta trend, raziskovalci uvajajo nove nosilce, in sicer s sintezo novih kopolimernih bifunkcionalnih vodotopnih nosilcev, ki imajo lastnosti hidrofilnih ogrodij in PAS (38, 44). V zadnjem času vedno več raziskav temelji na anorganskih poroznih nevodotopnih nosilcih, saj pri izdelavi trdnih disperzij z vodotopnimi nosilci pogosto nastanejo mehki in lepljivi produkti, s katerimi je težko rokovati, tako da jim moramo, npr. pred tabletiranjem, dodati različne pomožne snovi, ki izboljšajo njihove mehanske lastnosti (51). Prav porozni materiali se v farmaciji uporabljajo za izboljšanje stisljivosti in pretočnosti. Značilnost poroznih nosilcev so ozke pore, velika specifična površina, ki je na voljo za sorpcijo ZU in odsotnost nabrekanja v vodi (15). Nekateri avtorji uvrščajo vgrajevanje ZU v porozne nevodotopne materiale na področje nanotehnologije, spet drugi jih klasificirajo kot samostojne sisteme, pri čemer je, glede na definicijo, uvrstitev tega procesa med trdne disperzije povsem nesporna (52, 53).

Porozne nosilce po nomenklaturi IUPAC (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry) delimo glede na velikostni razred por na mikroporozne (pore med 0,3 in 2 nm), mezoporozne (pore med 2 in 50 nm) ter makroporozne (velikost por nad 50 nm). Za izdelavo trdnih disperzij uporabljamo iz skupine poroznih nevodotopnih nosilcev predvsem hidrofilne mezoporozne silikate, ki jih delimo na **urejene** in **neurejene** (44).

Med urejene uvrščamo različne vrste *silike*, npr. MCM-41, SBA-15 in FSM-16, za katere je značilna ozka porazdelitev velikosti por in njihova periodična geometrijska ureditev (54, 55). Zaradi strogo urejene porozne strukture, izkazujejo ti materiali nekatere kristalom podobne lastnosti, npr. ostre difrakcijske vrhove (51). Med neurejene porozne silikate, ki vsebujejo neurejene pore s široko porazdelitvijo velikosti, pa sodijo porozni silicijev dioksid (SiO_2) oz. *silikagel* (Sylsilia[®], Syloid[®]) in magnezijev aluminometasilikat (Neusilin[®]) (44, 56). Le peščica znanstvenih člankov je med seboj primerjala raztapljanje ZU iz urejenih in neurejenih silikatov.

1.5.1 Izdelava trdnih disperzij s poroznim SiO_2

Trdne disperzije s poroznim SiO_2 lahko pripravimo z metodami taljenja ali z metodami raztapljanja, pri čemer se najpogosteje uporabljata *sušenje z razprševanjem* in *metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku*. Razlika med izdelavo trdnih disperzij z metodo raztapljanja z vodotopnimi nosilci ali s poroznim nevodotopnim SiO_2 je ta, da v primeru uporabe slednjega v prvem koraku ne izdelamo raztopine ZU in nosilca, ampak pripravimo suspenzijo nosilca v raztopini ZU. Alternativna metoda izdelave je *adsorpcija ZU iz raztopine*, kjer porozni nosilec mešamo v raztopini ali suspenziji ZU do vzpostavitve ravnotežja. Nato s filtracijo od preostale raztopine ZU ločimo SiO_2 , na katerega se je adsorbirala ZU. Slabost te metode je uporaba velike količine topil, izguba neadsorbirane ZU in slabši izkoristek nalaganja ZU v pore. Modifikacija metode je *impregnacija nosilca z minimalno količino raztopine ZU*, ki je potrebna, da se porozni nosilec popolnoma omoči, pri čemer sprejme raztopljeno ZU na podlagi kapilarnih sil (15, 53).

Učinkovino lahko vgradimo v porozni SiO_2 že med njegovo sintezo. Eden od načinov sinteze je sol-gel postopek, ki vključuje izdelavo koloidne suspenzije tetraalilikilortosilikata, s sledečim kemijsko induciranim geliranjem in sušenjem (54, 57, 58).

1.5.2 Sproščanje učinkovin iz poroznega SiO_2

Z vgrajevanjem v vodi slabo topnih ZU v urejena ali neurejena hidrofilna mezoporozna ogrodja SiO_2 lahko dosežemo pospešeno sproščanje ZU. Z izdelavo inteligentnih dostavnih sistemov z ustrezno funkcionalizacijo površine urejenih mezoporoznih struktur, pa lahko dosežemo selektivno sproščanje ZU ob določenih stimulusih, kot so sprememba pH medija, prisotnost specifičnih ionov, reducentov, magnetnega polja ali UV svetlobe (55).

Več avtorjev je predstavilo različne mehanizme izboljšanja raztapljanja ZU iz poroznega SiO₂. Vgrajevanje ZU v porozni SiO₂ zniža njeno kristalnost. Vzrok leži v nanometrski velikosti por, ki so običajno le nekajkrat večje od premera molekule ZU (59). Zaradi omejitve prostora, ki je potreben za ureditev molekul v kristale, se ZU med izdelavo trdne disperzije pogosto obori v porah v amorfni obliki, ki izkazuje boljšo topnost kot kristalna oblika. Prostorska restrikcija onemogoči kristalizacijo ZU tudi med staranjem trdne disperzije, kar poveča fizikalno stabilnost amorfni trdnih disperzij. Pogoj za ustrezno stabilizacijo je, da je premer por manjši od kritične velikosti kristalizacijskega nukleusa ZU in da nismo preseгли kapacitete nosilca. Amorfno obliko dodatno stabilizirajo interakcije (H-vezi, van der Waalove sile) med ZU in površino poroznega SiO₂ (15, 53, 54, 59).

Z adsorpcijo ZU na veliko specifično površino mezoporoznega ogrodja se zmanjša velikost delcev ZU in poveča površina, ki je na voljo za njeno raztapljanje (enačba 1). Kadar se ZU adsorbira na površino v obliki monosloja oz. ko imamo molekularno disperzijo, je raztapljanje ZU najboljše, saj takrat med molekulami ZU ni hidrofobnih interakcij (54).

Izboljšanje raztapljanja je tudi posledica izboljšanja hidrofilnosti in močenja, kar so potrdili s primerjavo raztapljanja ZU iz dveh trdnih disperzij, izdelanih s hidrofilnim SiO₂ (Sylysia[®] 350) in hidrofobnim poroznim SiO₂ (Sylophobic[®] 200). Raztapljanje ZU se je izboljšalo le v primeru uporabe hidrofilnega nosilca (55).

Ker taka ogrodja ne nabrekajo, je sproščanje običajno uravnava difuzijsko in ga lahko opišemo s Fickovima zakonoma (55). Ob stiku z medijem za raztapljanje polarne molekule vode prodirajo v pore in izpodrinejo adsorbirano ZU s površine SiO₂ (53). V funkcionaliziranih ogrodjih urejene silike, kjer so prisotne močnejše in/ali specifične interakcije med steno por in ZU, nad difuzijsko kontrolo prevlada kinetika tvorbe/razpada kompleksov med funkcionalnimi skupinami na stenah por ter funkcionalnimi skupinami ZU (55). Kadar ZU vgrajujemo v nemodificiran porozni SiO₂ z namenom povečanja njenega raztapljanja, močne interakcije med ZU in površino nosilca niso zaželene (60).

Na hitrost sproščanja ZU iz poroznega ogrodja vpliva več dejavnikov: velikost in geometrija por ogrodja, specifične interakcije med ZU in steno por, struktura vgrajene ZU, metoda izdelave trdne disperzije in vrsta topila, ki ga uporabimo med izdelavo, delež kristalnosti ZU, masno razmerje ZU/nosilec, itd. (15, 51–54, 56). Eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki nadzira sproščanje ZU iz ogrodja, je velikost por

poroznega SiO₂. Raztapljanje ZU se običajno izboljšuje z večanjem premera por, saj to olajša difuzijo ZU v medij za raztapljanje. Če velikost por znatno povečamo, lahko ZU v porah zaradi odsotnosti prostorske restrikcije kristalizira, zaradi česar se njeno raztapljanje poslabša (53, 54). Drug ekstrem so izredno majhne pore. Kinnari in sodelavci so pri določanju vsebnosti ZU v trdnih disperzijah, izdelanih z itrakonazolom, ugotovili, da je polnjenje por silikagela z velikostjo por 19 nm (Syloid[®] 244), učinkovitejše kot polnjenje por silikagela z velikostjo por 3,2 nm (Syloid[®] AL-1). Kadar so pore le malo večje od velikosti molekule ZU, ima le-ta fizično onemogočen vstop v pore. Zdravilna učinkovina se tako veže le na zunanjo površino nosilca, pri čemer se poveča tveganje za nastanek njene kristalne oblike (56). Prednost mezoporoznih nosilcev pred mikro- in makroporoznimi je ta, da so pore dovolj majhne, da zaščitijo ZU pred kristalizacijo in ostalimi vplivi iz okolja in dovolj velike, da omogočijo ustrezen prenos mase med polnjenjem poroznega nosilca z ZU in med samim sproščanjem ZU (60).

Mellaerts in sodelavci so s primerjavo hitrosti in obsega absorpcije ZU *in vivo* pri psih iz tržno dostopne trdne disperzije itrakonazola v HPMC (Sporanox[®]) ter iz trdne disperzije, izdelane z vgradnjo itrakonazola v urejen porozni SiO₂ (SBA-15), dokazali, da med formulacijama ni bilo značilnih razlik (53). Ker pri raztapljanju ZU iz mezoporoznih silikatov nastane prenasočena raztopina, so formulaciji itrakonazola v SBA-15 dodali inhibitor precipitacije (HPMC) in tako izboljšali njegovo absorpcijo *in vivo* za 60 % (61).

1.5.3 Toksičnost poroznega SiO₂

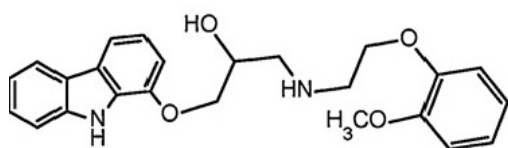
Medtem ko je kristalni SiO₂ toksičen, pa je njegova amorfna oblika, med katero uvrščamo tudi porozni SiO₂, pri Ameriški agenciji za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration – FDA) v primeru topikalne ali peroralne aplikacije uvrščena med netoksične oz. varne snovi. Čeprav je porozni SiO₂ biokompatibilen in celo bioaktiven, saj lahko tvori kemijske vezi s tkivom in stimulira rast kosti, številni avtorji preiskujejo citotoksičnost, ki lahko ogroža zdravje pacienta po parenteralni aplikaciji (53, 54, 57). V telesu se namreč SiO₂ metabolizira v silicijevo kislino (Si(OH)₄), ki je edina oblika, iz katere se lahko silicij absorbira. Silicijeva kislina je citotoksična v visokih koncentracijah, ki pa jih redko zaznamo, saj je njeno izločanje preko ledvic dovolj učinkovito (55, 59).

1.5.4 Sylysia[®] 350

Porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 je suh, bel, mikroniziran amorfen prašek z visoko poroznostjo in veliko specifično površino. Uporablja se kot pomožna snov v prehrambeni, farmacevtski in kozmetični industriji. Izdelan je iz kemijsko inertnega amorfnega silikagela visoke čistote (99,7 % SiO₂). Povprečna velikost delcev je 3,1–20,0 μm, povprečen premer por 25 nm, specifična površina pa 277,5 m²/g. V prehrambeni industriji jo uporabljamo kot aditiv za preprečevanje aglomeracije, vezavo vlage in modifikacijo viskoznosti. V farmaciji se dodaja zmesem za tabletiranje, saj izboljša pretočnost in stisljivost prahov (15, 62, 63, 64).

1.6 Karvedilol

Uporabili smo modelno učinkovino karvedilol (KAR) ((±)-[3-(9H-karbazol-4-iloksi)-2-hidroksipropil][2-(2-metoksifenoksi)etil]amin) (slika 7), ki sodi v skupino vazodilatirajočih neselektivnih zaviralcev adrenergičnih receptorjev α₁, β₁ in β₂ (65). Uporablja se za zdravljenje primarne hipertenzije, kroničnega srčnega popuščanja, kronične stabilne angine pectoris in po miokardnem infarktu. Običajni dnevni odmerek je 2 x 12,5 mg, največji priporočeni dnevni odmerek pa 2 x 25 mg (66). Kot večina β-simpatolitikov je tudi KAR racemat, pri čemer ima S(-) enantiomer približno 100-krat večjo afiniteto do β receptorjev, medtem ko oba stereoizomera enako učinkovito zavirata α₁ receptorje (66, 67). Zaradi obsežnega metabolizma prvega prehoda v jetrih, je BU učinkovine okoli 30 % (65).



Slika 7: Strukturna formula KAR (68).

Je bel do skoraj bel kristaliničen prašek, lahko topen v dimetilsulfoksidu (DMSO), topen v metanolu in metilenkloridu, zmerno topen v etanolu in izopropanolu, težko topen v etiletru in skoraj netopen v vodi (69). Zaradi prisotnosti sekundarnega amina na stranski verigi, je njegova topnost v alkalnem nizka (pri pH 9 < 1 μg/ml), plato pa doseže pri pH 5 (100 μg/ml). Pri pH 7 je njegova topnost okoli 23 μg/ml (62).

2 NAMEN DELA

Namen dela je proučiti adsorpcijo KAR na porozni silicijev dioksid (SiO_2) iz različnih topil preko načrtovanja, izdelave in vrednotenja trdnih disperzij.

1. Izdelali bomo trdne disperzije KAR s poroznim SiO_2 Sylysia[®] 350 s povprečno velikostjo por 25 nm in velikostjo delcev od 3,1 do 20,0 μm . V prvem sklopu bomo izdelali trdne disperzije z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine na porozni SiO_2 , pri čemer bomo za pripravo raztopin uporabili različna organska topila: aceton, 1,4-dioksan in tetrahidrofuran (THF). Z vsemi topili bomo pripravili raztopine različnih koncentracij KAR in nato izdelali trdne disperzije z različno vsebnostjo učinkovine. V drugem sklopu bomo s THF izdelali dve seriji trdnih disperzij, pri čemer bomo v prvi uporabili predhodno sušeni porozni SiO_2 , v drugi pa SiO_2 , izpostavljen visoki relativni vlažnosti (RV) zraka. Tako kot v prvem sklopu bomo tudi v drugem uporabili metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine. Za izdelavo trdnih disperzij z večjo vsebnostjo KAR pa bomo uporabili metodo odstranjevanja topila pri znižanem tlaku.
2. Za določitev obsega adsorpcije KAR iz različnih organskih topil na porozni nosilec bomo s termogravimetrično analizo (TGA) določali vsebnost učinkovine v trdnih disperzijah.
3. Namen vgrajevanja KAR v trdne disperzije je izboljšati njegovo raztapljanje. S preskusom raztapljanja po Ph. Eur. 6th Ed. bomo raziskali vpliv uporabe različnih topil pri izdelavi trdnih disperzij in vpliv sestave trdnih disperzij na raztapljanje KAR, vgrajenega v trdne disperzije s poroznim SiO_2 Sylysia[®] 350. Lastnosti trdnih disperzij bomo vrednotili tudi z določanjem gostote s helijevim piknometrom in tako ovrednotili ustreznost metode določanja helijeve gostote trdnih disperzij s poroznim SiO_2 .

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje materiale.

Učinkovina

- Karvedilol ((±)-[3-(9H-karbazol-4-iloksi)-2-hidroksipropil][2-(2-metoksifenoksi)etil]amin) podjetja Krka, tovarna zdravil d.d., Slovenija.

Porozni nosilec za pripravo trdnih disperzij

- Porozni silicijev dioksid Sylysia[®] 350 (Fuji Silysia Chemical Ltd., Japonska).

Organska topila za pripravo trdnih disperzij

- Aceton; CH₃COCH₃ (Merck KGaA, Nemčija).
- Metanol; CH₃OH (Merck KGaA, Nemčija).
- 1,4-dioksan; C₄H₈O₂ (Merck KGaA, Nemčija).
- Tetrahidrofuran; C₄H₈O (Merck KGaA, Nemčija).

Anorganske soli za pripravo nasičenih vodnih raztopin za vzdrževanje konstantne RV zraka

- Kalijev acetat; CH₃CO₂K (Merck KGaA, Nemčija).
- Magnezijev nitrat; MgNO₃ (Merck KGaA, Nemčija).
- Kalijev hidroksid; KOH (Merck KGaA, Nemčija).
- Kalijev klorid; KCl (Merck KGaA, Nemčija).

Kemikalije in reagenti za pripravo fosfatnega medija za preskus raztapljanja

- Prečiščena voda.
- Natrijev hidroksid; NaOH (Merck KGaA, Nemčija).
- Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat; NaH₂PO₄ x 2H₂O (Merck KGaA, Nemčija).

Filtri

- Durapore[®] Membrane filters, type 0,1 µm (Milipore, Irska).
- Minisart[®] RC 25, hidrofilni filtri, z velikostjo por 0,45 µm (Sartorius, Nemčija).

Priprava medija za preskus raztapljanja

Za preskus raztapljanja smo uporabili fosfatni pufer pH 6,8, ki smo ga pripravili tako, da smo zatehtali 6,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ v 1000 ml bučo in dodali prečiščeno vodo do oznake. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo pH raztopine uravnali z dodatkom vodne raztopine NaOH. Vodno raztopino NaOH smo pripravili z raztapljanjem 0,9 g NaOH v 100 ml prečiščene vode.

3.2 Aparature

Seznam aparaturne opreme, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

- Analizna tehtnica Mettler Toledo AG 245, Švica.
- Precizna tehtnica Vibra AJP, Shinko Denshi, Japonska.
- Tehtnica Exacta 300 EB, Tehtnica, Slovenija.
- Rotacijski vakuumski uparjevalnik: Buchi Rotavapor R-114, Švica.
- Vakuumski sušilnik Heraeus, Nemčija.
- Ultrazvočna kadička: Sonis 4, Iskra, Slovenija.
- Magnetno mešalo MM-531, Tehtnica, Slovenija.
- Magnetno mešalo Rotamix 560 MMH, Tehtnica, Slovenija.
- Merilnik pH vrednosti: pH METER, Mettler Toledo MA 235, Švica.
- Naprava z vesli za spremljanje raztapljanja: ERWEKA DT 6, Švica.
- UV spektrofotometer: Hewlett Packard, HP 8453, UV-visible spectroscopy system, Nemčija.
- Osebni računalnik Hewlett Packard Vectra XA povezan z UV spektrofotometrom.
- Termogravimeter Mettler Toledo TGA/DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, ZDA.
- Helijev piknometar AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA.

3.3 Metode dela

3.3.1 Priprava amorfnega karvedilola

Čisti amorfni KAR smo pridobili s taljenjem kristalne substance na parafinski oljni kopeli s konstantno temperaturo 130°C, kar je malo nad temperaturo tališča KAR. Staljeno učinkovino smo ohladili v zamrzovalniku. Strjeno učinkovino smo nato s pestilom zdrobili v terilnici.

3.3.2 Izdelava trdnih disperzij

Trdne disperzije smo izdelali po dveh metodah, in sicer z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine in z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Kot nosilec za pripravo vseh trdnih disperzij smo uporabili porozni SiO₂ Sylysia[®] 350, v katerega smo vgradili KAR. Za izdelavo trdnih disperzij smo izbrali ustrezna hlapna organska topila, v katerih je bila modelna učinkovina topna, nosilec pa je ostal neraztopljen, in sicer aceton, tetrahidrofuran (THF) in 1,4-dioksan. Z obema metodama smo pripravili trdne disperzije z različnimi razmerji KAR in poroznega nosilca. Izdelali smo jih s poroznim SiO₂, hranjenim pri sobnih pogojih, s predhodno sušenim SiO₂ ali pa s SiO₂, ki je bil najmanj dva tedna izpostavljen visoki, 85 % konstantni RV zraka. Postopek sušenja poroznega SiO₂ je opisan v poglavju 3.3.4, priprava okolja s konstantno RV pa v poglavju 3.3.5.

Metoda A: Izdelava trdnih disperzij z adsorpcijo učinkovine iz raztopine

V 100 ml merilno bučko z ravnim dnom smo zatehtali med 0,5 in 16,0 g KAR in dodali topilo do oznake. Kadar se učinkovina ni popolnoma raztopila (raztapljanje 3–4 g učinkovine v acetonu), smo raztapljanje olajšali z uporabo ultrazvočne kadičke. Vsaki od raztopin KAR smo nato dodali po 1,0 g poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 in suspenzijo mešali na magnetnem mešalu 3 ure pri sobnih pogojih, vse do vzpostavitve ravnotežja. Nato smo suspenzijo filtrirali pri znižanem tlaku skozi filter z velikostjo por 0,1 µm (Durapore[®] Membrane filters, type 0,1 µm, Milipore, Irska). Znižanje tlaka smo dosegli z vodno črpalko. Nastalo trdno disperzijo smo sušili pri sobni temperaturi, v vakuumskem sušilniku, 30 minut. Z metodo adsorpcije (ADS) smo tako pripravili trdne disperzije z uporabo THF (ADS THF), acetona (ADS ACT) in dioksana (ADS DIO), pri čemer smo uporabili porozni SiO₂, hranjen pri sobnih pogojih. V preglednici II so predstavljeni vzorci,

pripravljeni s THF. Ker smo z uporabo acetona in dioksana pripravili vzorce na enak način kot s THF, smo pripravili le preglednico za pripravo vzorcev s THF.

Preglednica II: Priprava vzorcev z metodo A, z uporabo THF s poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350, hranjenim pri sobnih pogojih.

Ime vzorca	KAR [g]	Sylysia [®] [g]	THF [ml]	Koncentracija KAR v raztopini [mg/ml]
ADS THF 0,5	0,5	1,0	100	5,0
ADS THF 1	1,0	1,0	100	10,0
ADS THF 1,5	1,5	1,0	100	15,0
ADS THF 2	2,0	1,0	100	20,0
ADS THF 2,5	2,5	1,0	100	25,0
ADS THF 3	3,0	1,0	100	30,0
ADS THF 3,5	3,5	1,0	100	35,0
ADS THF 4	4,0	1,0	100	40,0

Nato smo izdelali še trdne disperzije z uporabo izbranega topila THF in predhodno sušenega poroznega SiO₂ (ADS S; preglednica III) oz. poroznega SiO₂, ki je bil predhodno izpostavljen 85 % RV zraka (ADS 85RV; preglednica IV).

Preglednica III: Priprava vzorcev z metodo A, s predhodno sušenim poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350.

Ime vzorca	KAR [g]	sušena Sylysia [®] [g]	THF [ml]	Koncentracija KAR v raztopini [mg/ml]
ADS S 0,5	0,5	1,0	100	5,0
ADS S 1	1,0	1,0	100	10,0
ADS S 2	2,0	1,0	100	20,0
ADS S 3	3,0	1,0	100	30,0
ADS S 4	4,0	1,0	100	40,0
ADS S 6	6,0	1,0	100	60,0
ADS S 8	8,0	1,0	100	80,0

Preglednica IV: Priprava vzorcev z metodo A, s poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350, hranjenim pri 85 % RV zraka.

Ime vzorca	KAR [g]	Sylysia [®] , izpostavljena 85% RV [g]	THF [ml]	Koncentracija KAR v raztopini [mg/ml]
ADS 85RV 0,5	0,5	1,0	100	5,0
ADS 85RV 1	1,0	1,0	100	10,0
ADS 85RV 2	2,0	1,0	100	20,0
ADS 85RV 3	3,0	1,0	100	30,0
ADS 85RV 4	4,0	1,0	100	40,0
ADS 85RV 6	6,0	1,0	100	60,0
ADS 85RV 8	8,0	1,0	100	80,0
ADS 85RV 12	12,0	1,0	100	120,0
ADS 85RV 16	16,0	1,0	100	160,0

Metoda B: Izdelava trdnih disperzij z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku

Z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku smo pripravili trdne disperzije z visoko vsebnostjo KAR (med 67 % in 80 %) in s poroznim SiO₂, ki je bil predhodno dva tedna izpostavljen 85 % RV zraka. Za pripravo raztopin KAR smo uporabili samo eno organsko topilo, in sicer THF. V bučko z okroglim dnom smo zatehtali med 2,0 g in 4,0 g KAR in dodali po 50 ml THF. V raztopine učinkovine smo nato suspendirali 1,0 g poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350. Teh suspenzij nismo mešali z magnetnim mešalom, ampak smo takoj pričeli z odparevanjem topila s pomočjo rotacijskega vakuumskega uparjevalnika (Buchi Rotavapor R-114, Švica). Da bi pospešili odparevanje, se je bučka na rotacijskem vakuumskem uparjevalniku vrtela s hitrostjo 50 obratov/minuto in bila ves čas postopka pomočena v vodno kopel s temperaturo okoli 30 °C. Pazili smo, da temperatura kopeli ni preseгла 38 °C. Ta temperatura namreč predstavlja vrednost T_g amorfnega KAR. Med odparevanjem topila smo tlak postopno zniževali do končne vrednosti med 10 in 30 mbar. Ko je bila nastala trdna disperzija na videz suha (v obliki praška), smo jo še eno uro sušili pri končni vrednosti tlaka. Kljub nizki končni vrednosti tlaka pri sušenju z rotacijskim uparjevalnikom je analiza vsebnosti topila s termogravimetrijo pokazala višje rezidualne vrednosti kot pri analizah vsebnosti topila v trdnih disperzijah, izdelanih z metodo A. Zato

smo trdne disperzije dodatno sušili še v vakuumskem sušilniku Heraeus, 30 minut pri sobni temperaturi. Vzorci pripravljene z odparevanjem topila z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom imajo oznako RTV in so predstavljeni v preglednici V.

Preglednica V: Priprava vzorcev z metodo B in s TGA določene pripadajoče vsebnosti KAR v trdnih disperzijah.

Ime vzorca	KAR [g]	Sylysia®, izpostavljena 85% RV [g]	THF [ml]	vsebnost KAR [%]
RTV 2	2,0	1,0	50	67,4
RTV 3	3,0	1,0	50	75,0
RTV 4	4,0	1,0	50	80,5

3.3.3 Določanje gostote s helijevim piknometrom

V prazno kalibrirano celico za vzorec smo natehtali čim večjo količino vzorca. Kadar smo določali gostoto trdnih disperzij se je masa vzorca gibala med 1,000 in 2,000 g. Pri merjenju gostote čistega poroznega nosilca Sylysia® 350 pa je zatehtana masa variirala med 0,300 in 0,500 g. Med vsako meritvijo smo celico za vzorec sprali s prečiščeno vodo in etanolom ter jo nato osušili s sušilnikom z vročim zrakom, saj so točne in natančne natehte ključne za točne in natančne rezultate.

Znotraj vsake določitve gostote helijev piknometer (AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA) izvede tri meritve. Za eno meritev petkrat napolni celico za vzorec s helijem. Za vsak vzorec trdne disperzije smo izvedli najmanj dve paralelni meritvi. Pri merjenju gostote čistega poroznega nosilca Sylysia® 350, pa smo zaradi slabe ponovljivosti rezultatov med paralelnimi meritvami gostoto določili po petkrat.

3.3.4 Postopek sušenja poroznega SiO₂

Silikageli se že vrsto let uporabljajo kot sušilna sredstva, saj hitro in učinkovito vežejo vlago z zraka (63). Učinkovita vezava vode na veliko specifično površino poroznega SiO₂ Sylysia® 350 nam je povzročala kar nekaj težav pri merjenju prave gostote čistega nosilca,

zato smo razvili postopek sušenja, s katerim smo se lahko približali točni vrednosti prave gostote poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350. Stehtali smo maso celice za vzorec helijevega piknometra (AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA) in vanjo stresli vzorec poroznega nosilca. Vzorec smo nato sušili v vakuumskem sušilniku Heraeus, 30 minut pri temperaturi 200 °C. Prilagodili smo izenačevanje tlaka v sušilniku, in sicer smo namesto običajnega izenačevanja tlaka v sušilniku z atmosferskim zrakom, po končanem sušenju sušilnik preprihovali z inertnim dušikom. S tem smo izenačili tlak ter preprečili, da bi se med izenačevanjem tlaka z zrakom na porozni SiO₂ vezala zračna vlaga. Celico z vzorcem smo s pinceto vzeli iz sušilnika in jo pokrili s predhodno stehtanim Parafilomom[®] M. Stehtali smo celico s Parafilmom[®], odstranili Parafilm[®] in celico vstavili v piknometar. Zaradi neposredne bližine vseh treh aparatov – sušilnika, tehtnice in piknometra – smo minimizirali možnost vezave vode iz zraka na porozni SiO₂, saj je bil vzorec zraku izpostavljen zelo kratek čas.

S predhodno sušenim poroznimi SiO₂ smo pripravili tudi serijo trdnih disperzij z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine (metoda A; poglavje 3.3.2). Po 1,0 g poroznega SiO₂ smo natehtali v 100 ml bučke z ravnim dnom. Bučke s SiO₂ smo sušili na enak način kot smo ga opisali zgoraj (vakuumski sušilnik Heraeus, 30 minut, 200°C) in tlak postopoma izenačili z dušikom. Počasno izenačevanje tlaka je potrebno zato, da se steklovina deloma ohladi, saj smo sušenemu poroznemu nosilcu dodali ustrezno raztopino KAR v hlapnem topilu THF takoj po izenačitvi tlaka. Tako smo minimizirali čas izpostavljenosti poroznega SiO₂ atmosferskemu zraku.

3.3.5 Porozni SiO₂ pri različnih relativnih vlažnostih zraka

Da bi določili vpliv vsebnosti vode na rezultate določanja gostot s helijevim piknometrom, smo čisti porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 izpostavili različnim relativnim vlažnostim (RV) zraka.

Ena izmed najenostavnejših metod za pripravo okolja s kontrolirano RV je vzpostavitev ravnotežja v neprodušno zaprti posodi (eksikatorju) s prenasičeno raztopino anorganske soli. Pri določeni temperaturi ima prenasičena raztopina izbrane soli določen ravnotežni parni tlak, ki zagotavlja ravnotežno RV v izolirani atmosferi. Izbrali smo štiri različne soli, tako da smo lahko zagotovili območje RV od 9 % do 85 %. Izbrane soli in pripadajoče

ravnotežne RV pri 20 °C so naslednje: kalijev hidroksid 9 % RV; kalijev acetat 23 % RV; magnezijev nitrat 54 % RV in kalijev klorid 85 % RV (70). V vsakem od eksikatorjev smo tudi sprti preverjali vrednost zelene RV s higrometrom. Vzorce poroznega SiO₂ smo hranili pri izbranih RV dva tedna pri 20 °C tako, da se je vzpostavilo ravnotežje. Atmosfero brez RV (0 % RV) smo simulirali tako, da smo porozni SiO₂ sušili v vakuumskem sušilniku Heraeus s postopkom opisanim v poglavju 3.3.4. Vzorce smo analizirali s TGA (Mettler Toledo TGA/DSC 1, ZDA) in jim določili gostoto s helijevim piknometrom (AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA).

3.3.6 Termogravimetrična analiza (TGA)

Termogravimetrično analizo smo izvedli s termogravimetrom Mettler Toledo TGA/DSC 1 (ZDA), opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.30. Aparat simultano meri toplotni tok (diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. Differential Scanning Calorimetry – DSC) informativne narave) in spremembo mase vzorca, v odvisnosti od temperature oz. časa pri izotermnih pogojih (71). Pred meritvami smo instrument kalibrirali z uporabo indijevega standarda. S TGA smo določali vsebnost KAR v trdnih disperzijah. Med 5 in 10 mg vzorca trdne disperzije smo zatehtali v lonček (70 ali 150 µl) iz aluminijevega oksida, in sicer na 0,01 µg natančno (ločljivost tehtnice TGA) ter ga pokrili s pokrovčkom z manjšo odprtino. Lonček smo pred tehtanjem spirali s prečiščeno vodo in etanolom ter ga prežarili, saj lahko na ta način zagotovimo preprečitev izgube mase na račun ostankov vzorcev predhodnih meritev. Vzorce smo segrevali linearno. Hitrost segrevanja je bila 20 °C/min, od sobne temperature pa do 1.000 °C, v kisikovi atmosferi, s pretokom kisika 50 ml/min. Vsebnost učinkovine je sorazmerna upadu mase vzorca, s tem da smo pri izračunu vedno upoštevali vezano vodo oz. zaostalo organsko topilo. S TGA smo določali tudi vsebnost vode v poroznem SiO₂ Sylysia[®] 350, ki smo ga predhodno izpostavili različnim RV zraka.

3.3.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Termično analizo izbranih trdnih disperzij smo izvedli z uporabo diferenčnega dinamičnega kalorimetra Mettler Toledo DSC1 (ZDA), ki je opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30. Od 3 do 5 mg vzorca smo zatehtali v aluminijaste lončke za enkratno uporabo. Vzorce smo segrevali od –10 °C do 150 °C s hitrostjo 20 °C/min, v dušikovi atmosferi s pretokom dušika, 40 ml/min. Kalorimeter smo kalibrirali z indijem.

3.3.8 Preskus raztapljanja

S preskusom raztapljanja *in vitro* smo primerjali raztapljanje čistega amorfnega in čistega kristalnega KAR z raztapljanjem KAR iz trdnih disperzij različnih vsebnosti, izdelanih z uporabo različnih topil. V preskus raztapljanja smo poleg čiste amorfne in kristalne učinkovine vključili tudi naslednje vzorce trdnih disperzij, izdelanih z metodo adsorpcije iz raztopine:

- ADS THF 1, ADS THF 2, ADS THF 3 in ADS THF 4 (preglednica II);
- ADS ACT 1, ADS ACT 2, ADS ACT 3 in ADS ACT 4;
- ADS DIO 1, ADS DIO 2, ADS DIO 3 in ADS DIO 4.

Raztapljali smo prahove, ki so vsebovali 25 mg KAR, kar predstavlja največji enkratni terapevtski odmerek. Preskus raztapljanja smo izvedli po Ph. Eur. 6th Ed., poglavje 2.9.3., pri čemer smo uporabili aparaturo tipa 2, ki je opremljena z vesli (ERWEKA DT 6, Švica) (72). Kot medij za preskus raztapljanja smo izbrali fosfatni pufer pH 6,8, ki simulira črevesno tekočino.

V 900 ml fosfatnega pufru pH 6,8, s temperaturo 37 °C±0,5 smo zatehtali toliko trdne disperzije oz. čiste učinkovine, da je natehta vsebovala 25 mg KAR. Hitrost vrtenja vesel je bila 50 obratov/minuto. Deset mililitrske vzorce smo vzorčili z ročno brizgo ob časih 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60 in 120 minut.

Koncentracije KAR v odvzetih vzorcih smo določili spektrofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom (Hewlett Packard, HP 8453, UV-visible spectroscopy system, Nemčija). Absorbanco vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 332 nm, v kiveti iz kvarčnega stekla in s potjo žarka 1 cm. Na osnovi umeritvene premice KAR-medij za raztapljanje smo določili koncentracijo učinkovine v vzorcu. Pred meritvami s spektrofotometrom smo vzorce filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,45 µm (Minisart[®] RC 25, Sartorius, Nemčija). Tako smo zagotovili bistrost raztopine, saj se porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 v vodnem mediju ne raztaplja, kar bi motilo spektrofotometrične meritve.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Razvoj metode določanja vsebnosti karvedilola v trdni disperziji s poroznim SiO₂

Da smo lahko določili obseg adsorpcije KAR iz različnih organskih topil na porozni nosilec, je bilo najprej potrebno izbrati in optimizirati ustrezno metodo za določanje vsebnosti učinkovine v trdni disperziji s poroznim SiO₂. V začetnih fazah eksperimentalnega dela smo testirali 3 različne metode za določanje vsebnosti učinkovine v nevodotopnem poroznem SiO₂: metodo ekstrakcije, metodo odštevanja in termogravimetrično (TG) metodo.

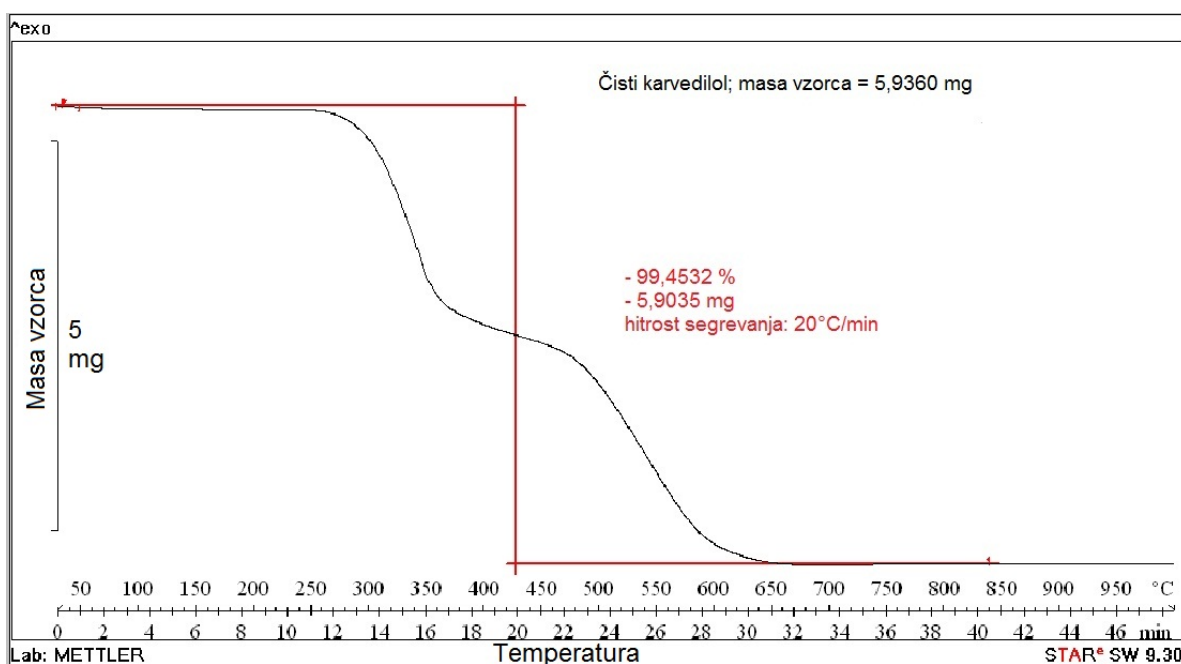
Pri metodi ekstrakcije smo natančno natehto trdne disperzije raztopili v metanolu in jo mešali na magnetnem mešalu 24 ur, da se je iz in s poroznega nosilca sprostila vsa učinkovina. Koncentracijo KAR smo določili spektrofotometrično. Glavna omejitev te metode je nepopolna ekstrakcija učinkovine iz poroznih delcev (60). To potrjujejo tudi naši rezultati. Z metodo ekstrakcije in s TGA smo določili vsebnost KAR v enakem vzorcu in v prvem primeru določili 25,5 %, s TGA pa 30,5 %. Slabost metode je tudi dodatna poraba organskih topil, ki jih uporabimo za ekstrakcijo in pa neupoštevanje morebitne vsebnosti rezidualnih topil pri natehti vzorca, kar vpliva na izmerjeno vrednost vsebnosti učinkovine. Gre tudi za časovno zamudno metodo, saj poteka v več korakih.

Z uporabo metode odštevanja smo se izognili koraku ekstrakcije in zmanjšali stroške porabe topil. Ta metoda je primerna za določanje vsebnosti učinkovine le, kadar izdelujemo trdne disperzije z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine, saj spektrofotometrično določimo koncentracijo učinkovine v supernatantu filtrata po končani adsorpciji. Da bi določili vsebnost učinkovine v porah nosilca, moramo dobljeni rezultat odšteti od začetne količine učinkovine v raztopini. Te metode nismo vključili v nadaljnje eksperimente zaradi nekompatibilnosti plastičnih epruvet, ki smo jih uporabljali za centrifugiranje filtrata z namenom pridobitve bistrega supernatanta, s THF. Za centrifugiranje bi sicer lahko uporabili steklene epruvete, a se za to nismo odločili, saj bi tako metodi dodali še en časovno zamuden korak, to je čiščenje steklovine. Tudi ta metoda je časovno potratna, saj poteka v več korakih.

S TGA merimo maso vzorca kot funkcijo temperature. Predvidevamo, da maso oz. vsebnost učinkovine lahko določimo, ker v izbranem temperaturnem območju (od sobne temperature do 1.000 °C) poteče popolna termična razgradnja in uparitev organske učinkovine, anorganski SiO₂ pa zaradi svoje termične stabilnosti ostaja intakten in ohrani svojo maso. Metoda določanja vsebnosti KAR v poroznem SiO₂ s TGA ima več prednosti pred prej omenjenima: za določitev vsebnosti ne potrebujemo organskih topil, meritev lahko izvedemo v enem koraku brez dodatne priprave vzorca, za meritev potrebujemo majhno količino vzorca (le nekaj miligramov), poleg spremljanja mase vzorca v odvisnosti od temperature lahko hkrati spremljamo tudi termične dogodke z informativnim DSC.

Da bi ocenili ustreznost TGA za določanje vsebnosti modelne učinkovine v poroznem SiO₂ Sylysia[®] 350, smo posneli termograme vzorcev čistega KAR, čistega poroznega SiO₂ in trdne disperzije KAR v omenjenem poroznem nosilcu.

4.1.1 Termogravimetrična analiza čistega karvedilola



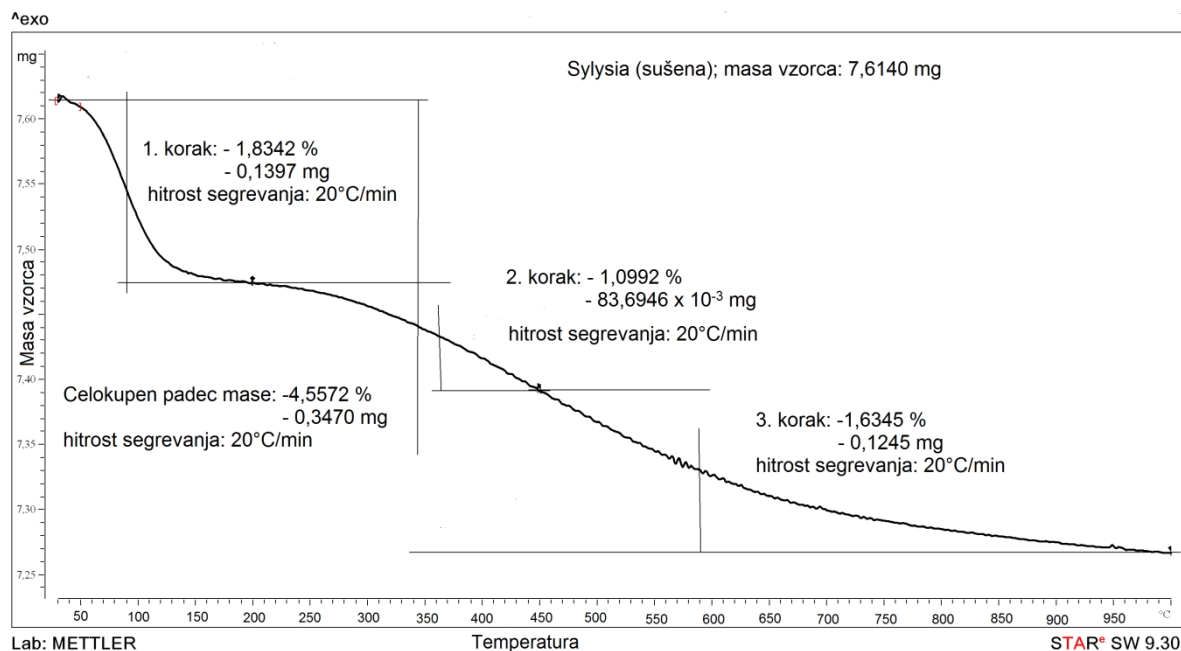
Slika 8: Termogravimetrična analiza čistega KAR v kisikovi atmosferi (pretok kisika 50 ml/min) s konstantno hitrostjo segrevanja (20 °C/min) od sobne temperature do 1.000 °C.

Za potrditev predpostavke o popolnem termičnem razpadu KAR pri pogojih TGA smo najprej analizirali čisto učinkovino. Iz termograma (slika 8), ki opisuje spreminjanje mase vzorca v odvisnosti od temperature, lahko razberemo, da pri pogojih TGA poteče popolna oksidativna razgradnja in uparitev KAR v kisikovi atmosferi, saj masa preiskovanega vzorca čiste učinkovine pade za 99,5 %, kar je skoraj celotna masa natehtanega vzorca. Pol odstotka zaostanka lahko predstavljajo anorganske nečistote v vzorcu, ki v danem temperaturnem intervalu ne razpadejo, oz. eksperimentalno napako. Obstaja tudi možnost, da manjši del hlapnih razpadnih produktov KAR zaradi ponovne kondenzacije ne odpari iz Al_2O_3 lončka, v katerega natehtamo vzorec za analizo.

4.1.2 Termogravimetrična analiza čistega poroznega SiO_2

Da bi lahko določili vsebnost KAR na podlagi upada mase v termogramu trdne disperzije, se masa preiskovanega vzorca poroznega SiO_2 Sylysia[®] 350 pri uporabljenih pogojih TGA ne sme spremeniti. Pričakujemo lahko le zmanjšanje mase zaradi zaostanka organskega topila v trdni disperziji ali zaradi šibko vezane vode iz zraka, in sicer v območju do 200 °C. Iz termograma čistega KAR lahko razberemo (slika 8), da se do 250 °C razgradnja učinkovine še ne prične oz. da njena masa ostaja konstantna, zato lahko upad mase zaradi odparevanja zaostalih topil odštejemo od natehte vzorca trdne disperzije oz. pri določanju vsebnosti KAR v disperziji upoštevamo le padeč mase v območju od 200 °C do 1.000 °C.

S termogravimetrom smo analizirali čisti porozni SiO_2 Sylysia[®] 350 pri enakih pogojih kot smo jih uporabili za TGA čistega KAR. Iz krivulje TGA razberemo, da masa vzorca čistega poroznega SiO_2 v temperaturnem intervalu od 200 °C do 1.000 °C ni konstantna, ampak se zmanjša v treh korakih (slika 9). Padeč mase v prvem koraku predstavlja 1,8 %, v drugem 1,1 % in v tretjem 1,6 % mase vzorca. Celokupen upad mase znaša 4,6 % in je posledica desorpcije vode.

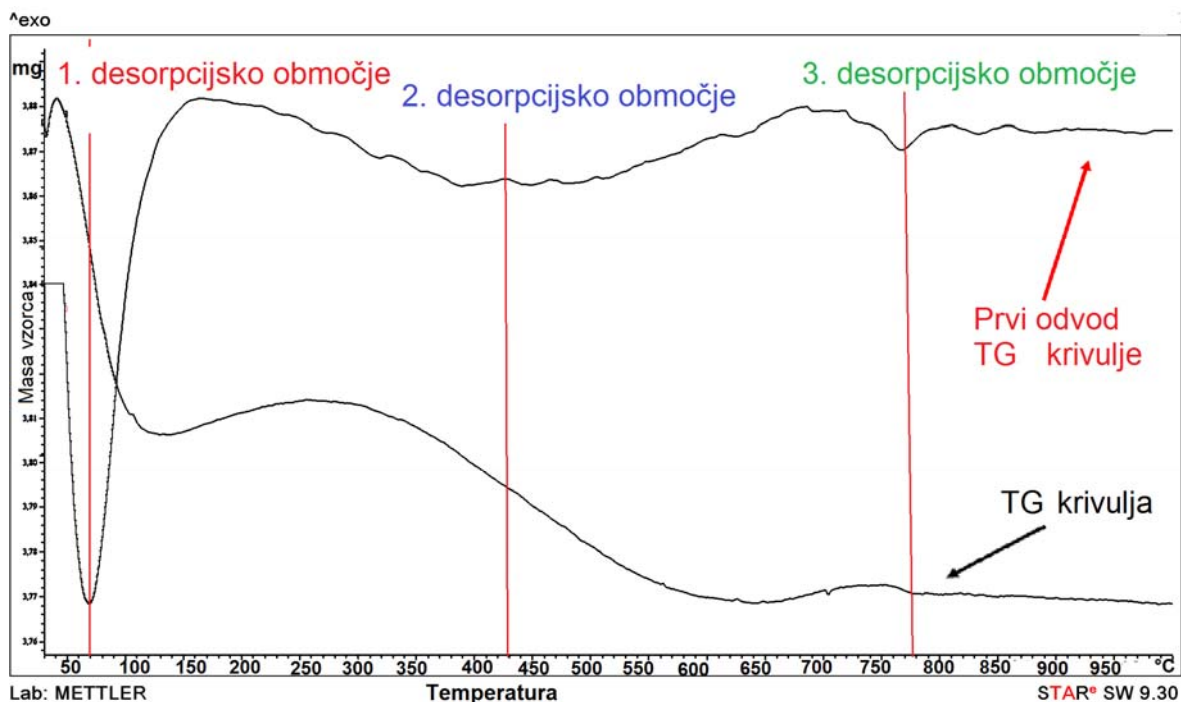


Slika 9: Termogravimetrična analiza čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 v kisikovi atmosferi (pretok kisika 50 ml/ min), s konstantno hitrostjo segrevanja (20 °C/min) od sobne temperature do 1.000 °C.

S programsko opremo termogravimetra smo TG krivuljo čistega poroznega SiO₂ odvajali, saj s prvim odvodom lažje opredelimo temperaturno območje posameznega koraka desorpcije vode. Prvi odvod TG krivulje je prikazal 3 izrazito ločene minimume, ki predstavljajo **3 desorpcijska območja vode** (slika 10):

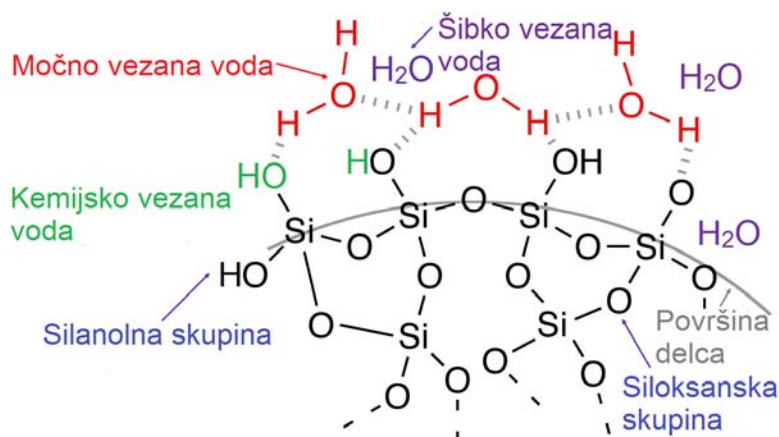
1. med 30 °C in 200 °C: desorpcija *šibko oz. fizikalno vezane vode*, ki je z van der Waalsovimi interakcijami vezana na silanolne skupine na površini Sylysie[®] (73);
2. med 200 °C in 450 °C: narava izgubljene mase v tem temperaturnem območju še ni popolnoma razjasnjena, a verjetno gre za s H-vezmi *močno vezano vodo* na površino SiO₂; ni pa izključeno, da se v tem območju lahko desorbira tudi tisti del vode, ki je ujet v zelo majhnih porah poroznega nosilca;
3. med 400 °C in 1.000 °C: eliminacija *kemijsko vezane vode*, ki nastane s kondenzacijo dveh silanolnih skupin v siloksansko skupino (74).

Poleg adsorpcije vode s H-vezmi v monosloju je možna tudi adsorpcija močno vezane vode v več slojih. Prav večslojna adsorpcija omogoča visoko kapaciteto poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 za vezavo večjih količin vode (74).



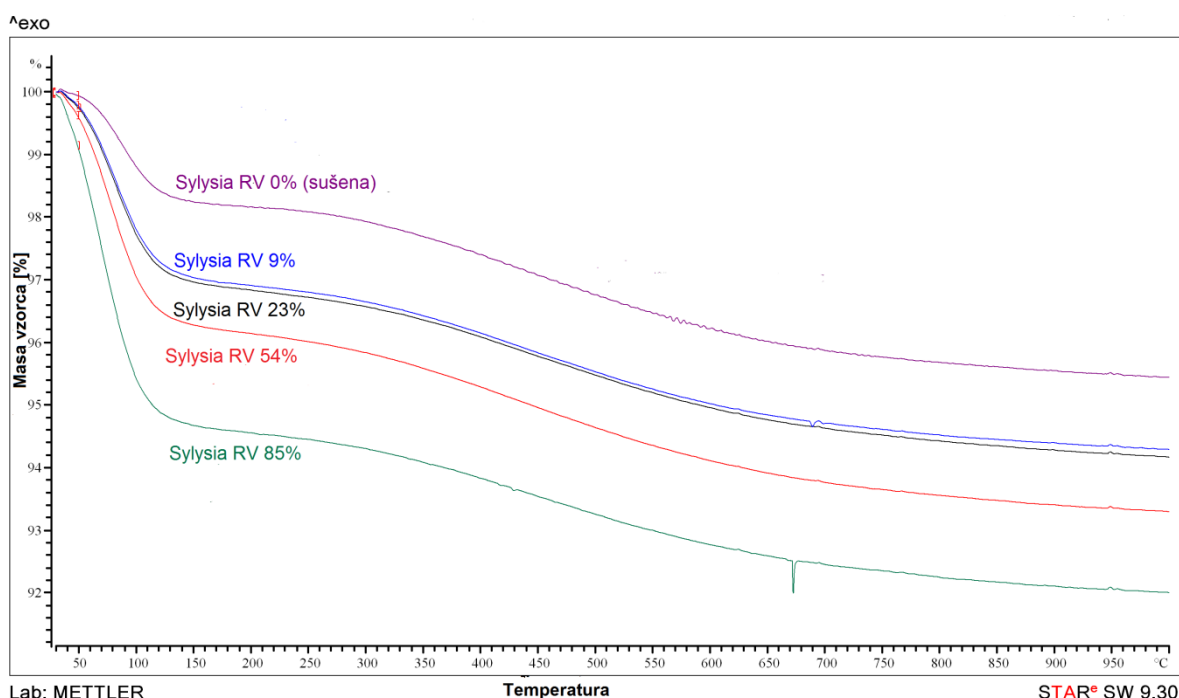
Slika 10: TG krivulja čistega poroznega SiO₂ Sylysia® 350 in njen prvi odvod.

Slika 11 prikazuje strukturo poroznega SiO₂ in vse tri različno vezane vrste vode (šibko, močno in kemijsko vezano), ki se desorbirajo med TGA. Na površini poroznega SiO₂ so prisotne silanolne skupine, ki so lahko izolirane, vicinalne (hidroksilne skupine na sosednjih silicijevih atomih) ali geminalne (hidroksilne skupine na istem silicijevem atomu). Kondenzacija kemijsko vezane vode običajno poteče med vicinalnima silanolnima skupinama. Silanolne skupine dajejo poroznemu SiO₂ polarni značaj in omogočajo tvorbo H-vezi z vodo, organskimi topili in učinkovinami.



Slika 11: Struktura silike s prikazom različno vezanih vrst vode, ki se desorbirajo med TGA. Slika je prirejena po (75).

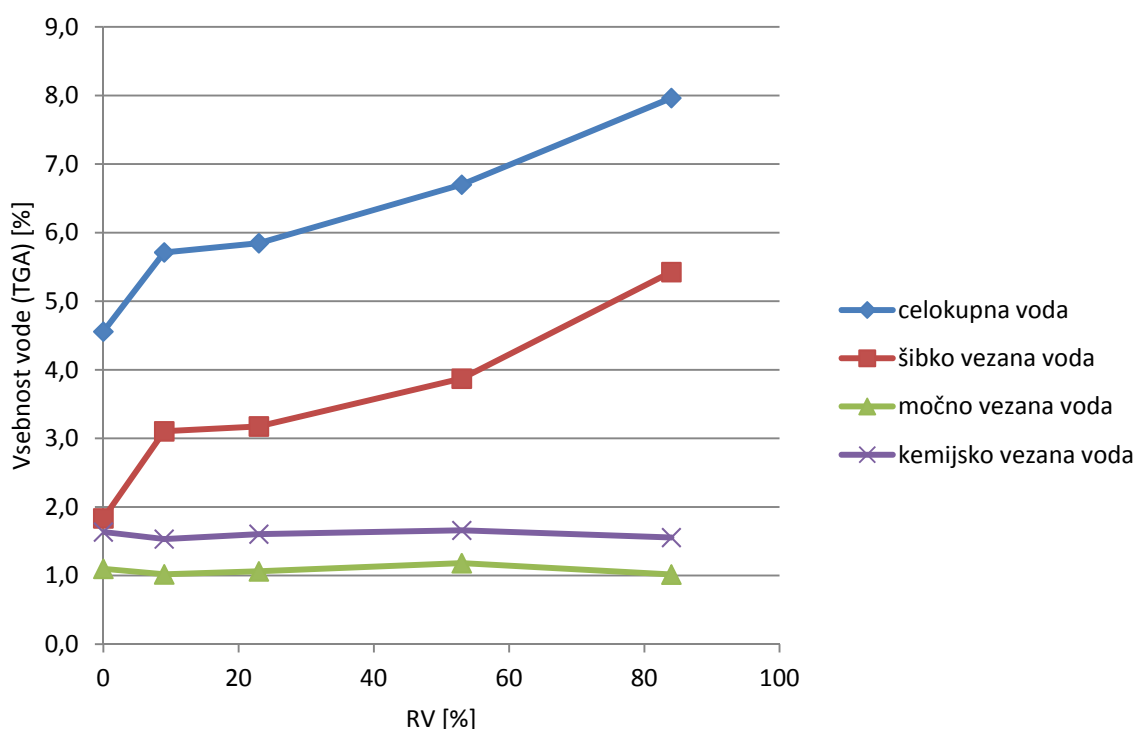
Z namenom opredelitve vpliva vezane vode na TG krivuljo čistega poroznega SiO₂, smo termogravimetrično analizirali različne vzorce čistega SiO₂ Sylysia[®] 350, ki smo jih do vzpostavitve ravnotežja hranili v eksikatorjih pri različnih RV zraka. Slika 12 prikazuje termograme vzorcev čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, ki so bili izpostavljeni 0 %, 9 %, 23 %, 54 % in 85 % RV zraka. Ker so bile mase vzorcev različne, smo jih za lažjo primerjavo na ordinati namesto v mg izrazili v odstotkih. Vidimo, da se celokupni upad mase povečuje z večanjem % RV, kar pomeni, da je vsebnost vode v vzorcih poroznega SiO₂, ki smo jih predhodno hranili pri višji RV, večja. Ti rezultati so pričakovani. Poleg tega pa lahko s primerjavo termogramov razberemo tudi, da so krivulje od temperature okoli 200 °C vzporedne, kar kaže na enak upad mase od te temperature dalje.



Slika 12: Termogravimetrične krivulje vzorcev čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, ki smo jih predhodno hranili v eksikatorjih pri različnih RV zraka.

Z integriranjem termogramov posameznih desorpcijskih območij smo določili vsebnosti različno vezane vode v vzorcih poroznega SiO₂, ki smo jih hranili pri različnih RV zraka. Rezultati so grafično prikazani kot vsebnost celokupne, šibko vezane, močno vezane in kemijsko vezane vode v čistem poroznem SiO₂ Sylysia[®] 350 v odvisnosti od RV zraka (slika 13). Vidimo, da sta deleža močno vezane vode in kemijsko vezane vode, ki se desorbirata med TGA, konstantna oz. da nista odvisna od RV zraka. Delež močno vezane

vode predstavlja 1,0 % celotne mase vzorca, delež kemijsko vezane pa 1,6 % (slika 13). Variabilni del predstavlja šibko vezana voda, ki se desorbira v temperaturnem območju do 200 °C. Čeprav se masa poroznega SiO₂ spreminja preko celotnega temperaturnega območja TGA, pa je TGA razmeroma primerna metoda za določitev vsebnosti KAR v poroznem SiO₂ Sylysia® 350, saj upad mase v termogramu trdne disperzije do temperature 200 °C lahko odštejemo od celokupne mase. Upad mase v prvem desorpcijskem območju vode lahko odštejemo, saj je KAR pri pogojih TGA do 250 °C intakten (slika 8).



Slika 13: Vsebnost s TGA določenih celokupne, šibko vezane, močno vezane in kemijsko vezane vode v poroznem SiO₂ Sylysia® 350 v odvisnosti od različnih RV zraka, pri katerih smo predhodno hranili vzorce poroznega SiO₂.

Zmanjšanje mase nad 200 °C zaradi desorpcije s H-vezmi vezane in tiste vode, ki nastane s kondenzacijo silanolnih skupin, pa je konstantno oz. neodvisno od pogojev, v katerih smo predhodno hranili analizirane vzorce. Ker je upad mase konstanten, bo torej ta napaka enaka za vse določitve vsebnosti učinkovine v trdnih disperzijah. Napaka pri določitvi vsebnosti KAR zaradi desorpcije vode od 200 °C do 1.000 °C ni velika, saj predstavlja le 2,5 % celotne mase vzorca čiste Sylysie®, medtem ko lahko vsebnost celokupne vode zaradi povečanja količine šibko vezane vode v vzorcu, hranjenim pri 85 % RV zraka, naraste na 8,0 %. Iz grafa je razvidno tudi, da vsebnost šibko vezane vode v poroznem

SiO₂, ki smo ga predhodno sušili z modificiranim postopkom v vakuumskem sušilniku s preprihovanjem z inertnim dušikom (poglavje 3.3.4), ne preseže vsebnosti močno in kemijsko vezane vode (slika 13). S tem smo dokazali, da z našim modificiranim postopkom sušenja lahko učinkovito osušimo vzorce poroznega SiO₂ Sylsisa[®] 350.

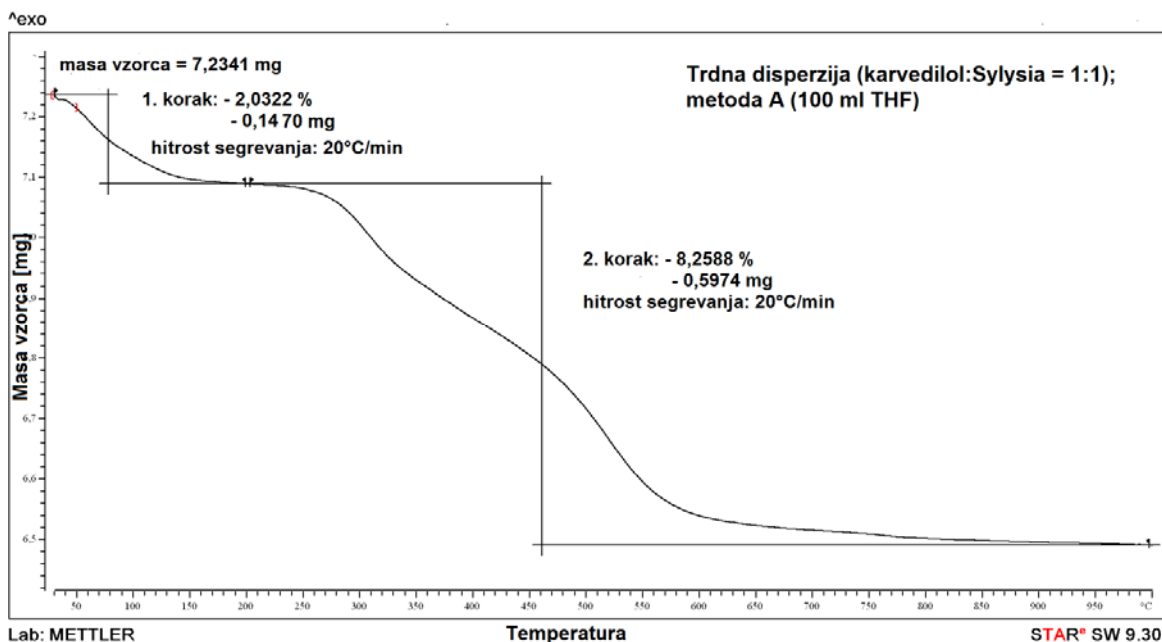
4.1.3 Termogravimetrična analiza trdne disperzije karvedilola v poroznem SiO₂

V prejšnjih dveh poglavjih smo opisali in dokazali relativno ustreznost TGA pri izbranih pogojih za določitev vsebnosti KAR v poroznem SiO₂ Sylsisa[®] 350. Ustreznost izbrane metode smo potrdili tudi tako, da smo izdelali trdno disperzijo z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku (metoda B) in s TGA določili vsebnost KAR v njej. Ker pri metodi B ni izgub učinkovine, smo pričakovali, da bo vsebnost učinkovine enaka razmerju med natehtano učinkovino ter vsoto natehtane učinkovine in poroznega SiO₂. To domnevo smo potrdili s TGA, saj je bila izmerjena vrednost blizu teoretične. V vzorcu trdne disperzije izdelane po metodi B, s pričakovano vsebnostjo KAR 66,7 % (vzorec RTV 2; preglednica V), smo tako s TGA določili vsebnost 67,4 %.

Slika 14 prikazuje rezultate TGA trdne disperzije. Pogoji analize trdne disperzije so bili enaki kot v primeru TGA čistega poroznega SiO₂ oz. čistega KAR. Termogram smo razdelili na dva dela, pri čemer se v 1. koraku, to je do 200 °C, desorbirajo šibko vezana voda in organska topila. V 2. koraku, to je od 200 do 1.000 °C, pa potečeta oksidativna razgradnja KAR in desorpcija močno in kemijsko vezane vode. Vsebnost KAR smo izračunali tako, da smo od natehtane mase vzorca odšteli upad mase v 1. koraku. Zmanjšanje mase v 2. koraku smo delili z natehto vzorca, ki smo ji odšteli vsebnost topil in šibko vezane vode ter tako dobili vsebnost KAR v trdni disperziji. Vsem vzorcem trdnih disperzij smo določili vsebnost KAR po zgoraj opisanem postopku. Vseh termogramov nismo priložili, saj nas zanima že izračunana vsebnost KAR v trdni disperziji.

Metodo določanja vsebnosti KAR s TGA bi lahko izboljšali, in sicer tako, da bi vzorce segrevali do temperature okoli 150 °C linearno, nato pa še izotermično, to je določen čas pri konstantni temperaturi. S tem bi zagotovili popolno odparitev šibko vezane vode in rezidualnih topil pod temperaturo začetka razgradnje KAR. Iz termograma čistega KAR je namreč razvidno, da ta popolnoma razpade do temperature okoli 650 °C (slika 8). Ni pa povsem jasno, ali končna temperatura (1.000 °C) TGA omogoča popolno odparitev KAR

oz. njegovih razpadnih produktov iz poroznega SiO₂ Syllysia® 350. Zato bi bilo smiselno vzorce trdnih disperzij tekom TGA segreti izotermično daljši čas pri temperaturi okoli 700 °C.



Slika 14: Termogravimetrično določanje vsebnosti KAR v trdni disperziji (vzorec ADS THF 1) s poroznim SiO₂ Syllysia® 350, v kisikovi atmosferi (pretok kisika 50 ml/ min), s konstantno hitrostjo segrevanja (20 °C/min) od sobne temperature do 1.000 °C.

4.2 Adsorpcija karvedilola na porozni SiO₂ iz različnih organskih topil

Adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ Syllysia® 350 iz različnih organskih topil smo proučevali preko izdelave trdnih disperzij z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine na porozni SiO₂ (metoda A), pri čemer smo za pripravo raztopin uporabili različna organska topila – aceton, dioksan in THF.


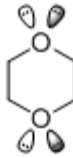

4.2.1 Izbira organskih topil

Izbira organskega topila je eden izmed najpomembnejših korakov optimizacije polnjenja poroznih nosilcev z ZU (59). Pri izbiri ustreznih organskih topil za izdelavo trdnih disperzij je prvi kriterij, ki mu moramo zadostiti, zadostna topnost učinkovine v posameznem topilu.

Za izdelavo trdnih disperzij z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine smo izbrali naslednja organska topila: metanol, aceton, THF in 1,4-dioksan. Izbrali smo jih na podlagi ustrezne topnosti KAR v njih, njihove relativne netoksičnosti, nizke temperature vrelišča, dostopnosti in vrednosti dielektričnih konstant. V eksperimentalno delo smo namreč želeli vključiti topila z različnimi dielektričnimi konstantami oz. z različno polarnostjo, da bi lahko določili vpliv polarnosti topila na adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ Sylysia® 350. V prvotni širši izbor topil smo vključili tudi dimetilsulfoksid (DMSO) in heksan, da bi zagotovili čim večji razpon vrednosti dielektričnih konstant. Vrednosti dielektričnih konstant izbranih topil, topnost KAR v njih in njihove ostale lastnosti so predstavljene v preglednici VI. Dimetilsulfoksid je univerzalno topilo z zelo visoko dielektrično konstanto, ki raztaplja večino ZU. Po ICH Q3 smernicah za rezidualna topila ga uvrščamo v razred III, v katerega sodijo topila z nizkim toksičnim potencialom v okviru dovoljene dnevne izpostavljenosti (PDE – angl. Permitted Daily Exposure), ki je za DMSO enaka ali večja od 50 mg/dan (38). Vendar je zaradi visoke temperature vrelišča (189 °C) odparevanje DMSO dolgotrajen, zahteven in drag proces, zato tega topila nismo uporabili za izdelavo trdnih disperzij. Nadomestili smo ga z metanolom, ki ima prav tako visoko dielektrično konstanto. Z njim smo izdelali le testno serijo trdnih disperzij, saj je topnost KAR v metanolu precej nižja kot v topilih ožjega izbora, to pa so aceton, 1,4-dioksan in THF (preglednica VI). Metanol smo nato izključili iz nadaljnjega eksperimentalnega dela, saj so zaradi majhne topnosti KAR njegove vsebnosti v trdnih disperzijah, izdelanih s tem topilom, nizke in je možno proučevanje adsorpcije KAR le v ozkem območju koncentracij. Namesto metanola smo izbrali aceton, v katerem je KAR približno 7-krat bolje topen, hkrati pa ima aceton še vedno razmeroma visoko dielektrično konstanto.

Z izdelavo trdnih disperzij z adsorpcijo KAR iz raztopine s heksanom smo želeli vključiti tudi topilo z nizko dielektrično konstanto. Vendar smo hitro ugotovili, da je KAR v heksanu praktično netopen, tako da smo heksan zamenjali z manj toksičnim dioksanom, katerega dielektrična konstanta je še vedno razmeroma nizka. Tetrahidrofuran ima dielektrično konstanto med vrednostima acetona in dioksana, hkrati pa se KAR v njem dobro topi. Porozni SiO₂ Sylysia® 350, s povprečno velikostjo por 25 nm in velikostjo delcev med 3,1 in 20,0 μm, se v izbranih topilih ne raztaplja.

Preglednica VI: Lastnosti organskih topil in topnost KAR v njih. ϵ – dielektrična konstanta; T_v – temperatura vrelišča; PDE – dovoljena dnevna izpostavljenost; DN – Gutmannovo donorsko število.

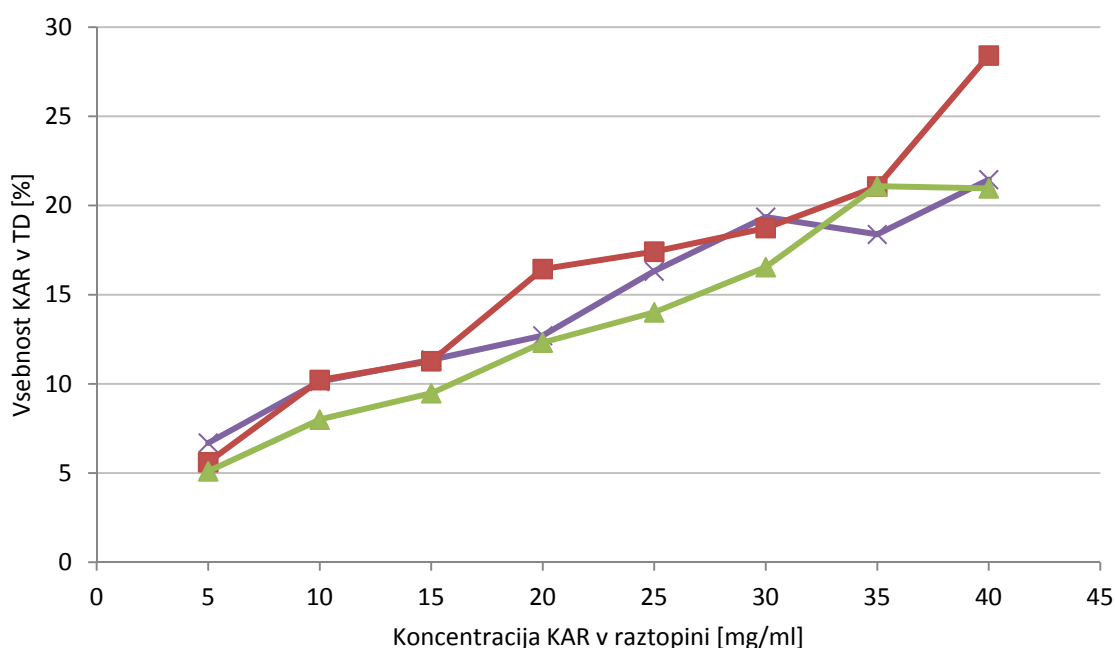
Topilo	Topnost KAR [mg/ml]	ϵ [-] [76]	T_v [°C]	PDE [mg/d] [38]	Struktura	DN [kJ/mol] [77]
Aceton	88,0	20,7	56,2	50,0		71,0
Dioksan	230,5 [78]	2,25	101,5	3,8		61,9
THF	186,0 [78]	7,58	65 - 66	7,2		83,7
Metanol	33,8 [79]	32,7	64,5	30,0	CH ₃ OH	
DMSO	≥ 80	46,7	189	50,0	(CH ₃) ₂ SO	
Heksan	netopen	1,89	69	2,9	C ₆ H ₁₄	

4.2.2 Adsorpcija karvedilola na porozni SiO₂ iz različnih organskih topil

Trdnim disperzijam, ki smo jih izdelali z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine z uporabo acetona (vzorci ADS ACT 0,5–ADS ACT 4), dioksana (vzorci ADS DIO 0,5–ADS DIO 4) in THF (vzorci ADS THF 0,5–ADS THF 4, preglednica II), smo termogravimetrično določili vsebnost KAR. Slika 15 prikazuje adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ Sylysia® 350 iz njegovih raztopin v acetonu, dioksanu in THF.

Vidimo, da se pri vseh treh organskih topilih adsorpcija v odvisnosti od koncentracije KAR v raztopini povečuje oz., da se z večanjem koncentracije učinkovine v raztopini povečuje tudi njena vsebnost v trdni disperziji. Če med seboj primerjamo adsorpcijo KAR iz

različnih topil na porozni SiO₂ Sylysia® 350, opazimo razlike v obsegu adsorpcije KAR le v primeru uporabe THF in dioksana. Adsorpcija KAR iz raztopine s THF je boljše kot pri dioksanu. V primeru uporabe acetona pa je večinoma med vrednostima adsorpcije iz prej omenjenih topil. Ugotovljene razlike v obsegu adsorpcije KAR na porozni SiO₂ iz THF in dioksana smo poskušali razložiti na osnovi razlik v lastnostih obeh topil (preglednica VI). Eden izmed razlogov za slabšo adsorpcijo KAR iz dioksana v primerjavi s THF, bi lahko bila boljše topnost učinkovine v dioksanu. Karvedilol je sicer lahko topen tako v dioksanu kot v THF, vendar je njegova topnost v prvem boljše. Res je, da mora biti učinkovina dobro topna v topilu zato, da lahko pripravimo dovolj visoko koncentracijo raztopine, iz katere se bo učinkovina adsorbirala na nosilec. Vendar ne izberemo vedno topila, v katerem učinkovina izkazuje najboljšo topnost, saj lahko zaradi močnih interakcij med njo in topilom ne dosežemo optimalnega polnjenja nosilca, ker učinkovina raje ostane v topilu kot da se adsorbira na nosilec.



Slika 15: Vsebnost KAR v trdnih disperzijah (TD), izdelanih z adsorpcijo učinkovine iz raztopine, z uporabo različnih organskih topil in v odvisnosti od koncentracije KAR v raztopinah. (■) Tetrahidrofuran, (▲) 1.4-dioksan, (×) aceton.

Verjetnejša razlaga za slabšo adsorpcijo KAR iz dioksana je kompetitivna adsorpcija topila in učinkovine, ko se oba vežeta na nosilec (59). Tetrahidrofuran in dioksan sta ciklična etra, ki zaradi izpostavljenega kisikovega atoma lažje tvorita H-vez s površino poroznega

SiO₂ kot aciklični etri. Iz primerjave skeletnih struktur dioksana in THF (preglednica VI) je razvidno, da lahko dioksan teoretično tvori največ 4 H-vezi, THF pa 2, kjer kot akceptor H-vezi nastopa nevezni elektronski par na kisikovem atomu, vodikov atom silanolne skupine na površini poroznega SiO₂ pa v vez vstopa kot donator H-vezi. Verjetnost tvorbe H-vezi je tako večja pri dioksanu kot pri THF, zato predvidevamo, da je dioksan močnejše adsorbiran na površino poroznega SiO₂ kot THF. Rezultat je slabša adsorpcija KAR, ko ta tekmuje za vezavo na nosilec z dioksanom, v primerjavi s THF. Boljša adsorpcija iz THF v primerjavi z dioksanom bi lahko bila tudi posledica prisotnosti močnejših H-vezi KAR z dioksanom (ne pa tudi s THF). Cepitev teh vezi ob adsorpciji učinkovine na porozni SiO₂ je energijsko neugodna, s čimer lahko razložimo tudi boljšo topnost KAR v dioksanu.

Z Gutmannovim donorskim številom (DN) merimo jakost Lewisove baze oz. kako dober elektronski donator je topilo (80, 81). Pogorelyi in sodelavci so proučevali adsorpcijo cimetove kisline na porozni SiO₂ Siliks[®] in ugotovili, da se njena adsorpcija manjša s povečevanjem DN organskega topila. Pri adsorpciji učinkovine iz topil z večjim DN obstaja večja verjetnost nastanka donor-akceptor kompleksov, s čimer se poveča zmožnost solvatacije topljenca ter zmanjša adsorpcija le-tega na nosilec (81). V našem primeru pa se je adsorpcija KAR na porozni SiO₂ povečevala z večanjem DN organskega topila. Tetrahidrofuran ima največjo vrednost DN, sledi mu aceton in nato dioksan (preglednica VI). V tem vrstnem redu sledi tudi adsorpcija KAR, in sicer od največje proti najmanjši. Vzrok za nasprotujoče si rezultate je najverjetneje v razliki med strukturama učinkovin. Cimetova kislina je karboksilna kislina s pK_a med 4,37 in 4,44, KAR pa šibka baza s pK_a 7,8 (82, 83). Topilo z večjo vrednostjo DN (THF) je boljša Lewisova baza in slabša kislina, kar pomeni, da se zmanjša možnost solvatacije bazičnega KAR in poveča obseg njegove adsorpcije na porozni SiO₂. Adsorpcija KAR iz dioksana je manjša kot iz THF, saj se poveča možnost solvatacije učinkovine, ker je dioksan slabša Lewisova baza in boljša kislina kot THF.

Charnay in sodelavci so opazili boljšo adsorpcijo ibuprofena na urejeno porozno siliko MCM 41 v primeru uporabe topil z nižjimi dielektričnimi konstantami (heksan in etanol) kot iz polarnih topil z visokimi dielektričnimi konstantami (DMSO, dimetilformamid, dimetilacetamid) (52). Naši rezultati se le deloma ujemajo z njihovimi. Adsorpcija KAR iz acetona ($\epsilon=20,7$) nikoli ni bila večja kot iz THF ($\epsilon=7,58$). Vzrok bi lahko bila kompetitivna adsorpcija; aceton ima višjo dielektrično konstanto oz. višjo polarnost kot THF in zato

lahko tekmuje s hidrofobnim KAR za adsorpcijo na hidrofilni neurejeni porozni SiO₂ Sylysia® 350. Če med seboj primerjamo adsorpcijo KAR iz THF in dioksana ($\epsilon=2,25$), pa opazimo večanje adsorpcije z večanjem dielektrične konstante, kar je v nasprotju z omenjenimi rezultati. Razlog za to je lahko v kemijskih lastnostih učinkovine (ibuprofen je namreč kislina) ali pa v različni urejenosti uporabljenega nosilca.

Dokazali smo, da izbrano organsko topilo vpliva na obseg adsorpcije KAR na porozni SiO₂, vendar vsaj pri tistih topilih, ki izkazujejo primerljivo in dobro topnost učinkovine (acetone, dioksan in THF), večjih razlik nismo opazili, iz česar sklepamo, da so za obseg adsorpcije najpomembnejše interakcije med učinkovino in nosilcem. Za nadaljnjo izdelavo trdnih disperzij smo se odločali med THF in dioksanom. Aceton smo iz nadaljnega izbora izključili, ker smo želeli z metodo adsorpcije iz raztopine pripraviti trdne disperzije višjih vsebnosti, česar z acetonom ne bi mogli doseči, saj je topnost KAR v njem precej nižja kot v THF in dioksanu. Izbiro THF pred dioksanom lahko podpremo z več razlogi:

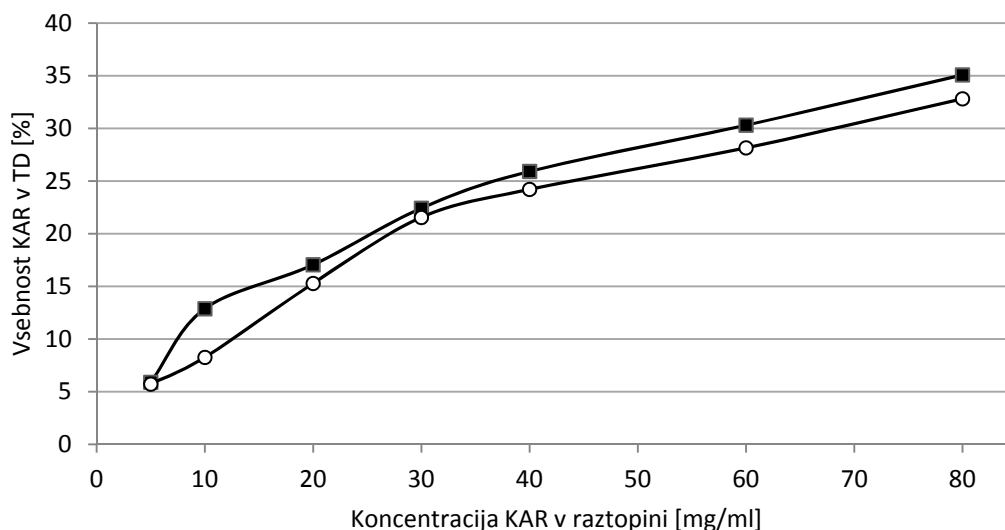
- Obseg adsorpcije KAR iz THF je večji kot iz dioksana. Predvsem pri uporabi metode adsorpcije iz raztopine si želimo čim boljše adsorpcijo učinkovine iz raztopine na stene por in na zunanjo površino poroznega SiO₂ Sylysia® 350. Večja kot je adsorpcija iz raztopine, večja bo vsebnost KAR v trdni disperziji in manjši del učinkovine zaostane v filtratu, ki ga zavržemo, tako da boljše adsorpcija predstavlja prednost tudi z vidika ekonomičnosti. Večja vsebnost KAR v trdni disperziji omogoča izdelavo tablet z nižjo maso, kar poveča complianco pacientov.
- Temperatura vrelišča THF je kar za 40 °C nižja kot T_v dioksana (preglednica VI), kar olajša odparevanje topila in zmanjša vsebnost njegovega zaostanka v trdni disperziji, ki lahko vpliva na kristalizacijo in razgradnjo učinkovine v času roka uporabnosti izdelka ali pa celo ogroža zdravje pacienta (59).
- Tako THF kot dioksan spadata v razred II rezidualnih topil, pri čemer je PDE za THF višji kot za dioksan (preglednica VI), to pa kaže na manjšo toksičnost THF.

Zaenkrat še ni na voljo univerzalnega modela, s katerim bi lahko predvideli ali ocenili obseg adsorpcije izbrane ZU na porozni nosilec iz različnih topil, saj je ta proces kompleksen oz. odvisen od več interakcij: topilo-topilo, topilo-ZU, ZU-ZU, topilo-površina poroznega nosilca in ZU-površina poroznega nosilca, pri čemer je najpomembnejša jakost tistih med ZU in nosilcem (59). Postavitev takega modela bi bila

možna le z dobro eksperimentalno osnovo. Da bi določili vplive različnih lastnosti organskih topil na adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ Sylysia[®] 350, bi morali izdelati trdne disperzije z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine s čim večjim naborom topil.

4.2.3 Vpliv šibko vezane vode na adsorpcijo karvedilola na porozni SiO₂

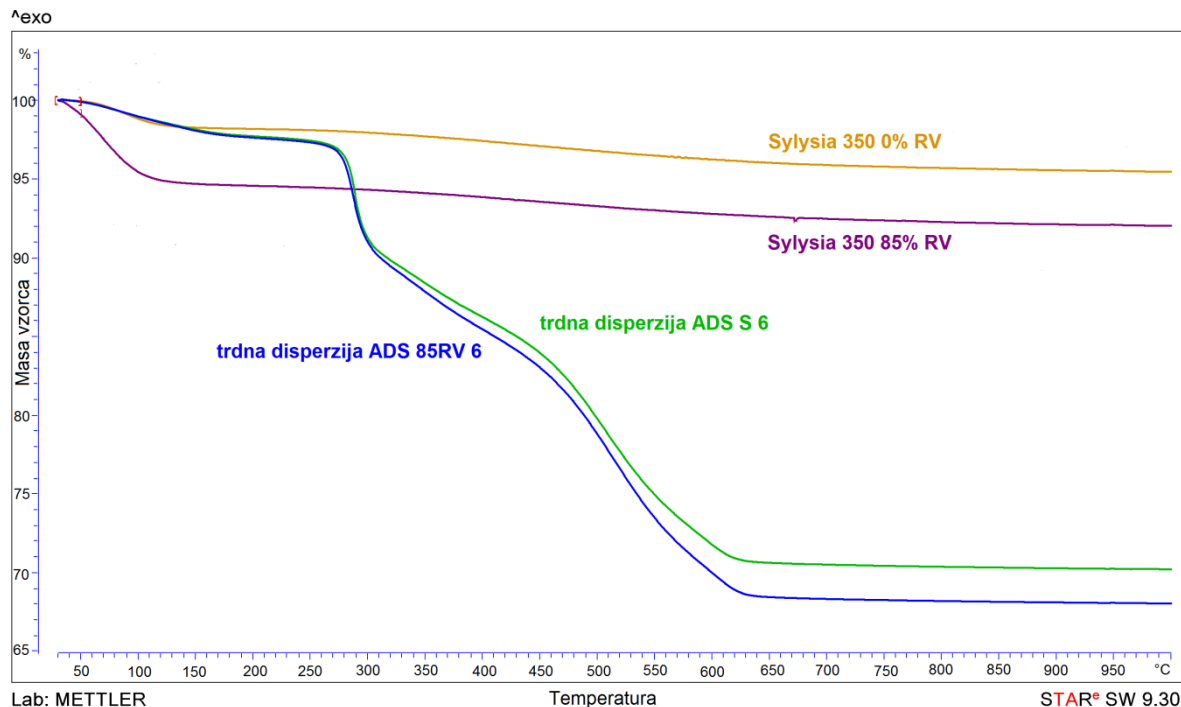
Površinska aktivnost in sorpcijske lastnosti hidrofilnega poroznega SiO₂ se lahko drastično spremenijo zaradi nastanka higroskopskega filma, ki je posledica fizisorpcije molekul vode na površino nosilca (84). Debelina filma oz. vsebnost šibko vezane vode je odvisna od RV pri kateri hranimo porozni nosilec, medtem ko sta vsebnosti močno in kemijsko vezane vode neodvisni od RV (slika 13). Vpliv vsebnosti šibko vezane vode na adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ smo določili z izdelavo in vrednotenjem dveh serij trdnih disperzij, pri čemer smo v prvi uporabili predhodno sušeni porozni SiO₂ z vsebnostjo šibko vezane vode 1,8 % (vzorci: ADS S 0,5 – ADS S 8; preglednica III), v drugi pa SiO₂, izpostavljen 85 % RV, z vsebnostjo šibko vezane vode 5,4 % (vzorci: ADS 85RV 0,5 – ADS 85RV 8; preglednica IV). Trdne disperzije smo izdelali z metodo adsorpcije KAR iz raztopine, pri čemer smo za pripravo raztopine uporabili topilo izbire, to je THF.



Slika 16: Adsorpcija KAR iz organskega topila (THF) na predhodno sušeni SiO₂ (○) in na SiO₂, izpostavljen visoki RV zraka (■); TD – trdna disperzija.

Slika 16 prikazuje adsorpcijo KAR iz THF na predhodno sušeni porozni nosilec in na nosilec, izpostavljen visoki RV zraka. Iz rezultatov bi lahko sklepali, da je adsorpcija učinkovine na porozni SiO₂ Sylysia[®] 350, ki ima na svoji površini večji delež šibko vezane

vode, večja kot adsorpcija na porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 z nižjo vsebnostjo šibko vezane vode. Ker smo pričakovali ravno obratno odvisnost, torej večjo adsorpcijo hidrofobnega KAR v primeru tanjšega vodnega filma na površini nosilca, smo iskali vzroke za nepričakovani rezultat. Slika 17 prikazuje primerjavo termogramov vzorcev trdnih disperzij ADS S 6 in ADS 85RV 6 ter čistega, predhodno sušenega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 in čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, izpostavljenega visoki RV zraka. V 1. desorpcijskem območju (do 200 °C) se termograma trdne disperzije ADS S 6 in ADS 85RV 6 popolnoma prekrivata in dobro sledita termogramu predhodno sušenega poroznega SiO₂. Termogravimetrična krivulja poroznega SiO₂, ki smo ga izpostavili 85 % RV zraka, je bila edina, v kateri smo opazili večji upad mase v 1. desorpcijskem območju. Iz posnetih termogramov sklepamo, da smo med pripravo trdnih disperzij z organskim topilom iz por in s površine poroznega SiO₂, ki smo ga predhodno hranili pri visoki RV zraka, izpodrinili vso šibko vezano vodo. Delež šibko vezane vode na poroznem SiO₂ torej ne vpliva na adsorpcijo KAR iz organskega topila. Adsorpcija učinkovine na porozni SiO₂ z večjo vsebnostjo šibko vezane vode je torej le navidezno večja (slika 16). Do ugotovljenih razlik je prišlo zaradi napake pri tehtanju poroznega nosilca, saj v primeru ko ta vsebuje več šibko vezane vode natehtamo manj suhe snovi kot pri sušenem poroznem SiO₂.



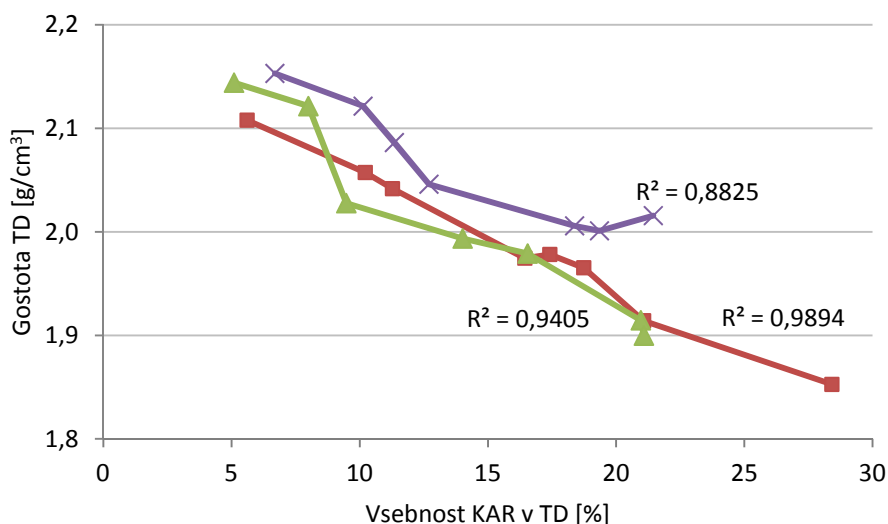
Slika 17: Primerjava termogramov vzorcev trdnih disperzij ADS S 6 (zeleni) in ADS 85RV 6 (modri) ter čistega, predhodno sušenega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 (rumeni) in čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, izpostavljenega visoki, 85 % RV zraka (vijolični).

4.3 Določanje gostote s helijevim piknometrom

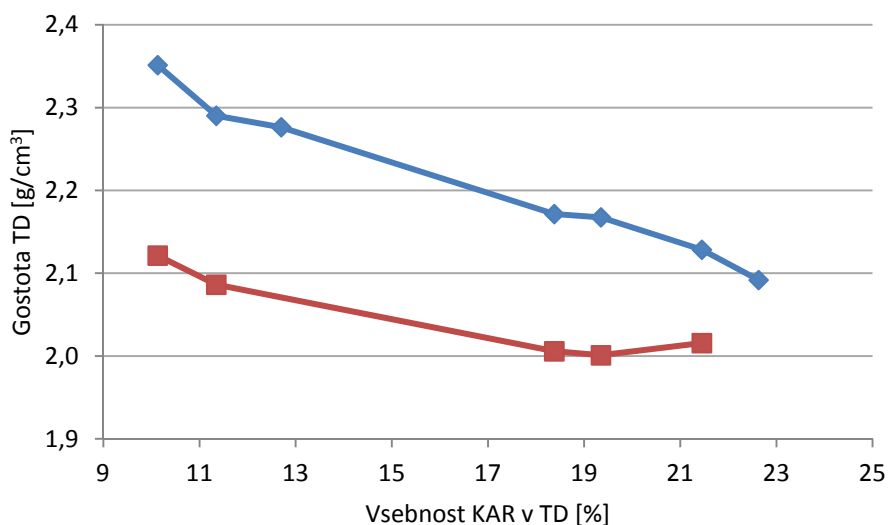
Z določanjem prave gostote trdnih disperzij različnih vsebnosti učinkovine s helijevim piknometrom smo prvotno želeli razlikovati med KAR, ki se na porozni SiO₂ adsorbira v monosloju in obliko, ki se adsorbira v več slojih oz. se izobori v amorfni in/ali kristalni obliki. Predpostavili smo namreč, da ima učinkovina adsorbirana v monosloju večjo gostoto kot izoborjena učinkovina. Opisanih oblik adsorbiranega KAR nismo mogli razlikovati med seboj, saj je analiza vzorcev trdnih disperzij in čistega poroznega SiO₂ pokazala, da pravilna in natančna določitev prave gostote s helijevo piknometrijo ni mogoča. V nadaljevanju predstavljamo rezultate in razlage, ki to trditev potrjujejo.

Analizirali smo trdne disperzije različnih vsebnosti KAR, izdelane z adsorpcijo iz treh različnih topil – acetona, dioksana in THF. Iz rezultatov meritev, predstavljenih na sliki 18 je razvidno, da se točke slabo prilegajo regresijskim premicam (linearna odvisnost med gostoto in vsebnostjo KAR je najboljša v primeru uporabe THF in najslabša pri acetonu). Razlog za to je **slaba ponovljivost** izmerjenih vrednosti gostot, ki smo jo opazili med različnimi serijami meritev, med paralelkami in celo znotraj posamezne določitve. S primerjavo gostote dveh serij trdnih disperzij, izdelanih z adsorpcijo iz raztopine učinkovine in acetona, ugotovimo, da s piknometrom določena gostota za trdno disperzijo enake vsebnosti KAR variira skoraj za 0,3 enote (slika 19). Trdni disperziji prve serije, z vsebnostjo KAR 10,1 %, smo določili gostoto 2,351 g/cm³, trdni disperziji identične vsebnosti KAR druge serije pa 2,121g/cm³. Ugotovljene razlike v gostotah torej niso posledica uporabe različnih topil (slika 18), temveč napake same metode.

Sun je v svojem članku poročal o visoki variabilnosti gostot aspartama, določenih s helijevim piknometrom, saj so izmerjene vrednosti med posameznimi serijami variirale med 1,266 g/cm³ in 1,381 g/cm³. Vzrok za variabilnost rezultatov so bile molekule vode, ki so se sprostile iz kristalne rešetke aspartama med meritvijo. Aspartam je namreč lahko prisoten v obliki hidrata (2/3 hidrat, 8/3 hidrat) ali v brezvodni obliki (85). S helijevim piknometrom določamo volumen vzorca po spremembi tlaka helija v celici z določenim volumnom (16). Težava nastane takrat, ko želimo določiti pravo gostoto trdnih snovi, ki vsebujejo vodo (amorfna ZU, hidrati ...). Taki prahovi namreč desorbirajo vodo, ko jih izpostavimo suhi helijevi atmosferi. Pare vode spremenijo tlak v celici in so vzrok za napačne rezultate (86).



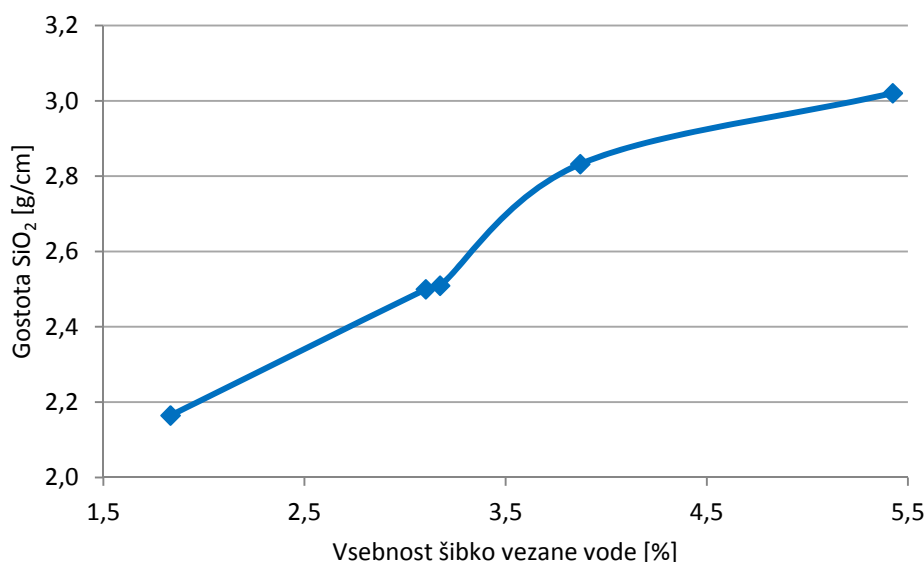
Slika 18: Gostota trdnih disperzij (TD), izdelanih z uporabo različnih topil – (■) THF, (▲) dioksan, (×) acetone – z metodo adsorpcije iz raztopine, v odvisnosti od vsebnosti KAR v trdni disperziji.



Slika 19: Odvisnost gostote trdne disperzije (TD) od vsebnosti KAR za dve različni seriji trdnih disperzij, izdelani z adsorpcijo učinkovine iz acetona.

Na podlagi do sedaj predstavljenih rezultatov vemo, da lahko porozni SiO₂ Sylsisa® 350 zaradi svoje hidrofilne narave in velike specifične površine veže precejšnjo količino vode. Delež celokupne vode je lahko tudi do 8 %, šibko vezane pa do 5,5 %. Helijevi atomi zaradi svoje majhnosti ($r=0,318 \text{ \AA}$) prodirajo tudi v najmanjše pore in tako pri povišanem tlaku desorbirajo šibko vezano vodo, ki bi lahko bila možen vzrok za **nepravilne** in **nenatančne določitve gostot** trdnih disperzij KAR v poroznem SiO₂. Vzorcem čistega

poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, ki smo jih hranili pri različnih RV zraka, smo določili gostoto. Vidimo, da izmerjena gostota poroznega SiO₂ narašča z večanjem vsebnosti nanj šibko vezane vode (slika 20). V literaturi so opisani primeri, ko se gostota trdnih snovi zaradi prisotnosti močno vezane vode, ki ima gostoto značilno večjo od 1, lahko dejansko poveča (87). Da pa bi se gostota poroznemu SiO₂ lahko povečala v tako velikem obsegu kot kažejo naši rezultati, bi morala imeti gostota vezane vode neskončno vrednost. Razlika med izmerjenima gostotama vzorca, hranjenega pri 0 % in tistega pri 85 % RV zraka, znaša namreč kar 0,855 g/cm³. S tem smo potrdili predpostavko, da šibko vezana voda v vzorcih samega poroznega SiO₂ in trdnih disperzij moti določanje prave gostote s helijevim piknometrom.

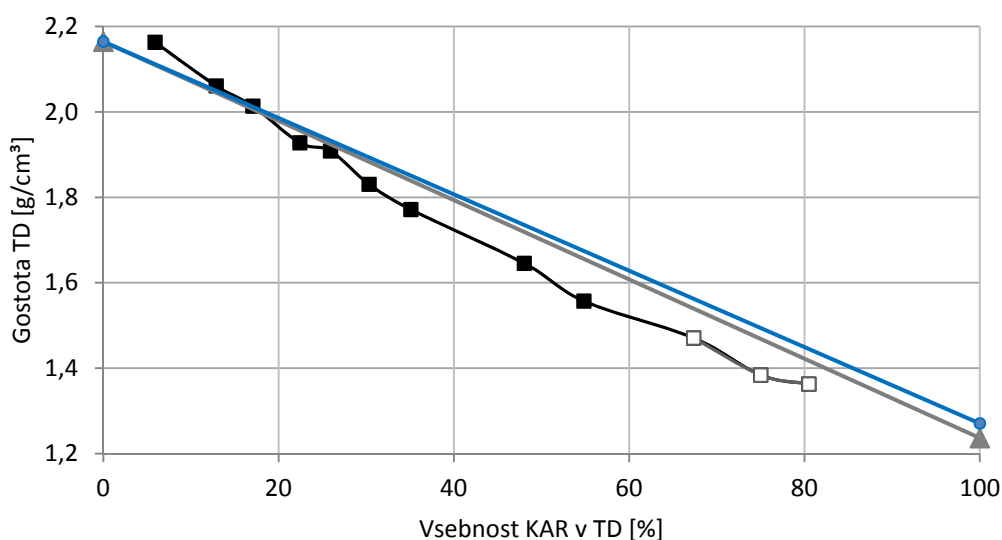


Slika 20: Gostota poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350, določena s helijevim piknometrom, v odvisnosti od vsebnosti nanj šibko vezane vode.

V primeru enokomponentnega sistema bi lahko s tehtanjem vzorca takoj po meritvi gostote določili korekcijski faktor za pravo gostoto, vendar v našem primeru to ni bilo izvedljivo, saj smo merili gostote trdnih disperzij različnih vsebnosti učinkovine, ki so binarni sistemi z variabilnimi razmerji med učinkovino in nosilcem (85).

Slika 21 prikazuje primerjavo eksperimentalne odvisnosti gostote trdnih disperzij, izdelanih z uporabo THF, od vsebnosti KAR v trdni disperziji in teoretičnih gostot zmesi poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 ter amorfnе/kristalne učinkovine v odvisnosti od vsebnosti amorfnega/kristalnega KAR v zmesi. Trdne disperzije nižjih vsebnosti KAR smo izdelali z

metodo adsorpcije (metoda A), tiste z višjimi vsebnostmi učinkovine pa z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku (metoda B). Pričakovali smo, da bo izmerjena gostota trdnih disperzij z vsebnostjo do 50 % učinkovine sledila teoretični premici amorfnega KAR, od vsebnosti 50 % dalje pa bo nekako med premico amorfne in kristalne učinkovine, saj je pri tej vsebnosti presežena kapaciteta nosilca in zato del učinkovine kristalizira (64). Izmerjeni gostoti amorfne in kristalne KAR sta $1,236 \text{ g/cm}^3$ in $1,271 \text{ g/cm}^3$. Ugotovili smo, da gostota pri nižjih vsebnostih učinkovine ne sledi teoretični odvisnosti in je večja od teoretičnih vrednosti (slika 21). Razlog za to je v napaki metode določanja gostote s helijevim piknometrom, ki je bolj izrazita pri nižjih vsebnostih hidrofobnega KAR oz. pri višjih vsebnostih hidrofilne Sylsysie[®]. Med izdelavo trdne disperzije z organskim topilom izpodrinemo šibko vezano vodo s površine nosilca (slika 17); prosto površino nato zasede hidrofobni KAR, ki onemogoča vezavo vode iz zraka. Z večanjem vsebnosti KAR se zmanjšujeta vsebnost vode v disperziji in posledično napaka meritve. Vidimo, da so vrednosti gostote trdnih disperzij pri višjih vsebnostih učinkovine celo nižje od teoretičnih (slika 21). To je posledica napake, ki smo jo naredili že pri postavitvi teoretične odvisnosti, saj smo za pravo gostoto čistega poroznega SiO₂ Sylsysia[®] 350 uporabili vrednost, ki smo jo določili predhodno sušenemu vzorcu, z vsebnostjo šibko vezane vode 1,8 %. Že v osnovi smo torej gostoto čistega poroznega SiO₂ zaradi napake helijeve piknometrije pri merjenju gostote prahovom, ki vsebujejo vodo, precenili.

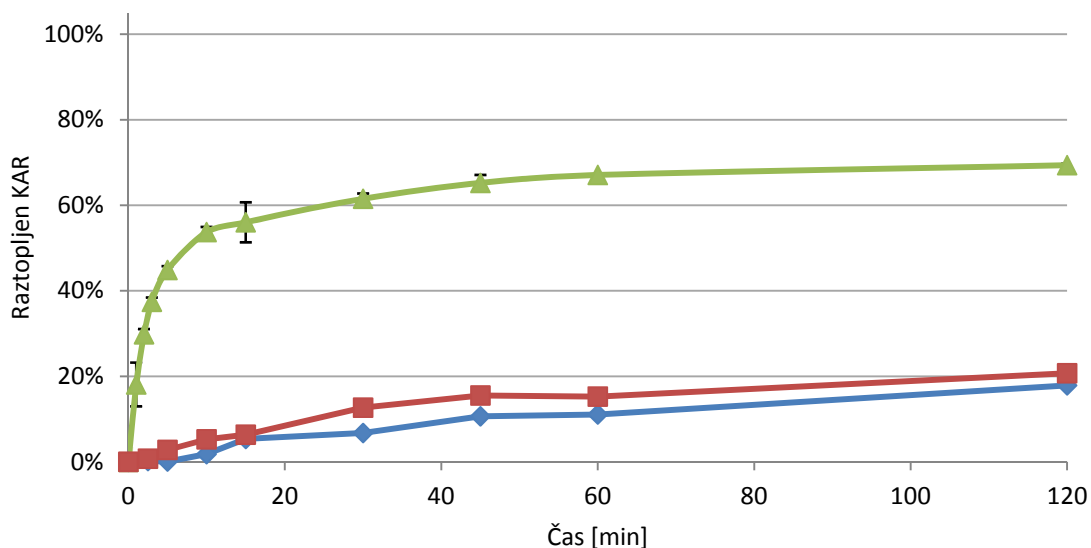


Slika 21: Primerjava gostote trdnih disperzij (TD), izdelanih z metodo A (■) oz. B (□), v odvisnosti od vsebnosti KAR v trdni disperziji in teoretične gostote zmesi, v odvisnosti od vsebnosti amorfne (siva)/kristalne (modra) KAR v zmesi.

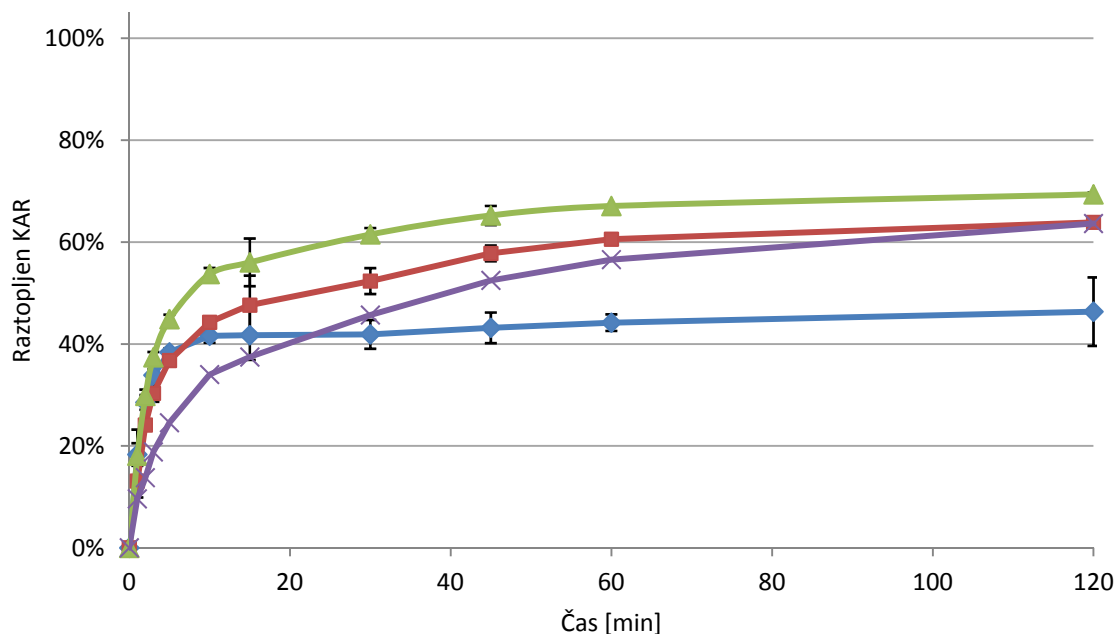
4.4 Raztapljanje karvedilola iz trdnih disperzij

Glavni cilj vgrajevanja KAR v trdne disperzije s poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350 je bilo izboljšanje raztapljanja in posledično povečanje njegove BU. Preskuse raztapljanja *in vitro* smo izvedli v fosfatnem pufru pH 6,8, brez dodatka PAS, s katero bi zagotovili pogoje »sink« in pri temperaturi 37±0.5 °C. S temi pogoji smo se približali biološkim pogojem in tako omogočili razlikovanje med raztapljanjem KAR iz trdnih disperzij različnih vsebnosti učinkovine, izdelanih z uporabo različnih organskih topil.

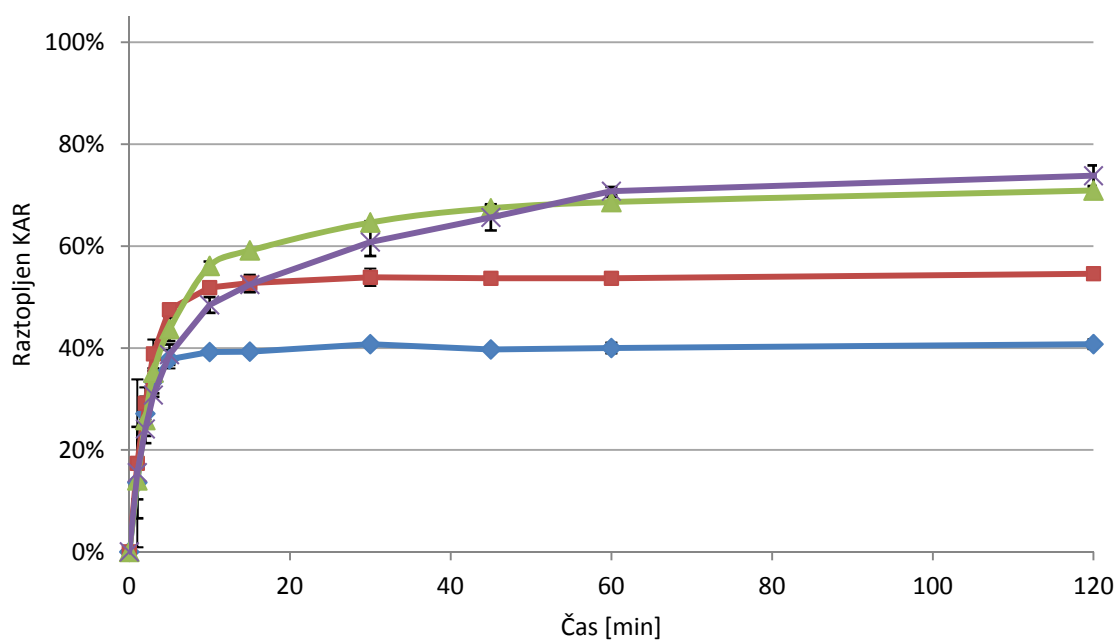
Iz slike 22 je razvidno, da se kristalna oblika čistega KAR raztaplja hitreje kot njegova amorfna oblika. Vzrok za to je njegova nizka vrednost T_g (38 °C), ki je skorajda enaka temperaturi medija za raztapljanje. Nad vrednostjo T_g se namreč amorfni KAR najverjetneje pretvori v kohezivno podhlajeno tekočino (64). Rezultati, ki jih prikazuje slika 22 dokazujejo, da smo z adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 dosegli bistveno izboljšano hitrost njegovega raztapljanja, v primerjavi s hitrostjo raztapljanja njegove amorfne/kristalne oblike. S termično analizo trdnih disperzij vključenih v preskus raztapljanja smo ugotovili, da je bila vsa učinkovina v vseh vzorcih v amorfni obliki (rezultati analize DSC niso prikazani). Temperatura, pri kateri smo izvajali preskus raztapljanja, samega raztapljanja KAR iz trdne disperzije ni poslabšala, saj je amorfna učinkovina v trdni disperziji stabilizirana s prostorsko restrikcijo. Zato je z vidika raztapljanja zaželen čim večji delež amorfnega KAR.



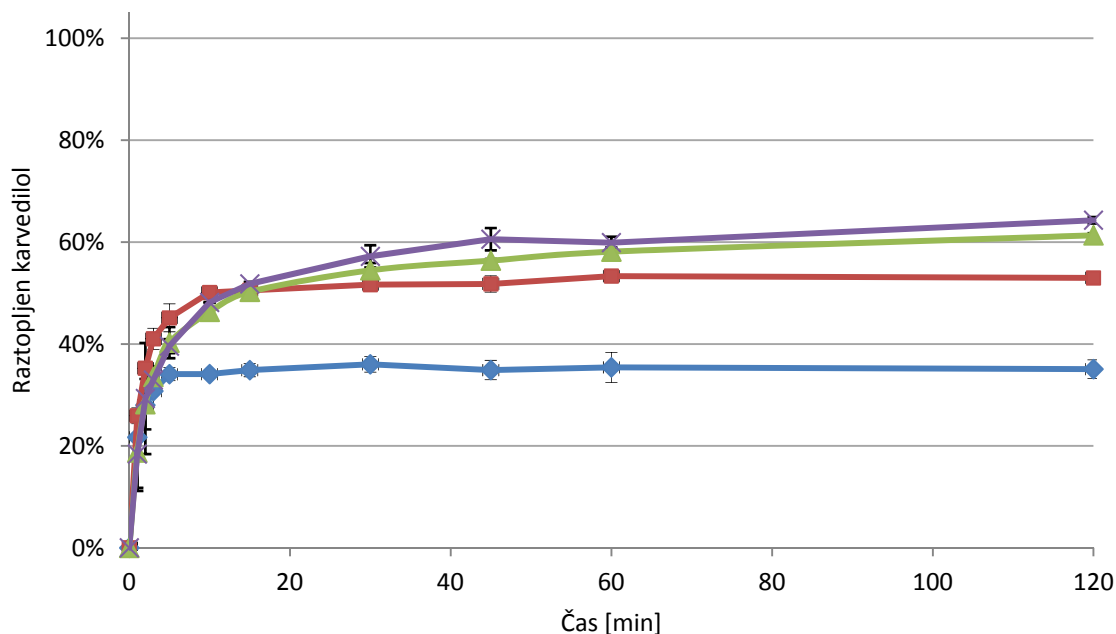
Slika 22: Profili raztapljanja kristalnega KAR (■), amorfnega KAR (◆) in KAR iz trdne disperzije (ADS DIO 3) s 16,6 % učinkovine (▲).



Slika 23: Profili raztapljanja trdnih disperzij z različno vsebnostjo KAR, izdelanih s THF, po metodi adsorpcije iz raztopine. Naraščajoče vsebnosti KAR v trdnih disperzijah: 10,2% (♦), 17,4% (■), 18,7% (▲), 28,4% (×).



Slika 24: Profili raztapljanja trdnih disperzij z različno vsebnostjo KAR, izdelanih z dioksanom, po metodi adsorpcije iz raztopine. Naraščajoče vsebnosti KAR v trdnih disperzijah: 8,0% (♦), 12,3% (■), 16,6% (▲), 21,0% (×).



Slika 25: Profili raztapljanja trdnih disperzij z različno vsebnostjo KAR, izdelanih z acetonom, po metodi adsorpcije iz raztopine. Naraščajoče vsebnosti KAR v trdnih disperzijah: 10,1% (♦), 12,7% (■), 19,4% (▲), 21,5% (✕).

Na slikah 23, 24 in 25 so grafično prikazani profili raztapljanja trdnih disperzij z različnimi vsebnostmi KAR v poroznem SiO₂ Syllysia® 350, izdelanih z adsorpcijo učinkovine iz raztopine v THF, dioksanu in acetonu. Pričakovali smo, da bodo vrednosti deleža sproščene učinkovine konvergirale k vrednosti 100%. Vidimo pa, da se med preskusom raztapljanja prav iz vseh trdnih disperzij sprosti le del KAR. S primerjavo profilov raztapljanja trdnih disperzij najnižjih vsebnosti učinkovine (med 8 in 10% – modre krivulje) smo ugotovili, da je, ne glede na uporabljeno vrsto topila, delež sproščenega KAR vedno okoli 40 %. Ta plato je bil dosežen v prvih 5 ali 10 minutah. Tudi ob vzorčenjih pri 180 in 240 minutah se koncentracija učinkovine v mediju za raztapljanje ni spremenila (rezultati niso prikazani), kar je še dodaten dokaz, da je delež sproščenega KAR dejansko dosegel svoj plato. Na osnovi teh rezultatov sklepamo, da je sproščanje KAR iz poroznega SiO₂ Syllysia® 350 odvisno od interakcij med učinkovino in nosilcem. Če sproščanje KAR ne bi bilo nadzorovano z interakcijami, potem bi bila njegova končna koncentracija (t.i. plato) odvisna izključno od količine učinkovine v trdni disperziji in od volumna raztopine. Najverjetneje se na določeno površino stene por poroznega SiO₂ **močno veže vedno enaka množina molekul učinkovine**, ki se med raztapljanjem ne sprostijo iz trdne disperzije. Delež sproščenega KAR, ki je bil med 40 in 70%, je bil praviloma večji pri trdnih

disperzijah z višjo vsebnostjo učinkovine. S povečevanjem vsebnosti učinkovine v trdni disperziji se je namreč manjšal delež močno vezanega KAR glede na njegovo celokupno vsebnost v trdni disperziji. S pomočjo deleža sproščene KAR lahko izračunamo delež nesproščene učinkovine, iz tega pa nadalje, na podlagi vsebnosti KAR v trdni disperziji izračunamo še vsebnost močno vezanega KAR v trdni disperziji. Izračunane vrednosti deleža močno vezane učinkovine so, neodvisno od celokupne vsebnosti KAR v trdni disperziji in neodvisno od vrste uporabljenega organskega topila, večinoma med 5 % in 7 %, kar potrjuje predpostavko o *konstantnem* deležu močno vezane učinkovine (preglednica VII). Za učinkovino, za katero smo ugotovili, da je močno vezana na površino nosilca, predvidevamo vezavo na nosilec v monosloju. Z uporabo naslednjih enačb (enačba 3 in 4), ki so jih uvedli Ohta in sodelavci, lahko izračunamo teoretično količino KAR, vezanega v monosloju (W (mg KAR/g nosilca)):

$$S_{KAR} = 2\sqrt{3} \times r^2 \quad (En\ 3),$$

$$W = \frac{S_{Sylaysia} \times M}{S_{KAR} \times N_A} \quad (En\ 4),$$

kjer je S_{KAR} (m^2) površina prereza molekule KAR, r (m) molekularni polmer KAR, $S_{Sylaysia}$ (m^2/g) specifična površina poroznega SiO_2 Sylaysia[®] 350, M (g/mol) molska masa KAR in N_A (mol^{-1}) Avogadrovo število (88). Za izračun smo uporabili polmer molekule raztopljenega KAR, ki so ga objavili Almedia in sodelavci (0,6 nm) in specifično površino poroznega SiO_2 Sylaysia[®] 350, določeno z Brunauer-Emmett-Tellerjevo metodo adsorpcije dušika ($277,5\ m^2/g$) (89, 90). Izračunana količina KAR, ki se teoretično veže v obliki monosloja na porozni SiO_2 Sylaysia[®] 350, je 150 mg/g nosilca, kar je enako 13 % vsebnosti KAR v trdni disperziji. Izračunana vrednost deleža močno vezane učinkovine v monosloju (13 %) je večja od naših rezultatov (večinoma med 5 in 7 %). Razlog za razlike med izračunano in eksperimentalno vrednostjo je najverjetneje način določitve specifične površine poroznega SiO_2 . Površina nosilca, ki je na voljo za adsorpcijo dušika, je namreč večja kot za adsorpcijo KAR, saj so molekule učinkovine večje od molekul dušika, zato slednje lažje prodirajo v manjše pore. Izračunan delež močno vezanega KAR v monosloju je zato precenjen.

Preglednica VII: Celokupna vsebnost KAR v trdni disperziji, deleži sproščenega in nesproščenega KAR med preskusi raztapljanja ter izračunane vsebnosti močno vezane učinkovine v posameznih vzorcih trdnih disperzij.

Vzorec	Celokupna vsebnost KAR [%]	Delež sproščenega KAR [%]	Delež nesproščenega KAR [%]	Vsebnost močno vezanega KAR [%]
ADS THF 1	10,2	46,3	53,7	5,5
ADS THF 2	17,4	63,9	36,1	6,3
ADS THF 3	18,7	69,4	30,6	5,7
ADS THF 4	28,4	66,6	33,4	9,5
ADS DIO 1	8,0	41,0	59,0	4,7
ADS DIO 2	12,3	55,4	44,6	5,5
ADS DIO 3	16,6	71,3	28,7	4,8
ADS DIO 4	21,0	73,2	26,8	5,6
ADS ACT 1	10,1	35,1	64,9	6,6
ADS ACT 2	12,7	53,0	47,0	6,0
ADS ACT 3	18,7	61,3	38,7	7,2
ADS ACT 4	21,5	65,4	34,7	7,4

Če primerjamo sproščanje KAR iz trdnih disperzij različnih vsebnosti učinkovine, opazimo (slika 23, 24, 25), da se krivulje v času do 10 minut praviloma prekrivajo ne glede na topilo, ki smo ga uporabili pri njihovi izdelavi. Izjema so le trdne disperzije z največjimi vsebnostmi KAR (med 20 in 28 % – vijolične krivulje), iz katerih se učinkovina sprošča najpočasneje (slika 23, 24, 25). Vzrok za manjšo hitrost sproščanja učinkovine v primerjavi s trdnimi disperzijami z nižjo vsebnostjo KAR je najverjetneje oboritev učinkovine v porah nosilca v obliki delcev, pri čemer se zmanjšata tako specifična površina kot prostornina por (90).

Poleg konstantnega deleža močno vezane učinkovine na površino nosilca bi lahko bil možen vzrok za to, da se iz trdnih disperzij ne sprosti celoten odmerek učinkovine tudi dejstvo, da med preskusom raztapljanja nismo zagotovili pogojev »sink«. Zato je lahko prišlo do omejevanja raztapljanja s topnostjo učinkovine v mediju. Pri pH 7 je topnost KAR 0,023 mg/ml, z uporabo proučevanih disperzij pa smo dosegli 100 % delež sproščene učinkovine pri pH 6,8 in pri njeni koncentraciji 0,028 mg/ml (62). Kljub določenemu

dvomu lahko našo hipotezo o raztapljanju, nadzorovanem z interakcijami oz. prisotnost interakcij med KAR in poroznim SiO₂ nosilcem, podpremo s tremi dodatnimi argumenti:

1. Dodatno težo dajejo naši predpostavki izsledki članka, ki so jih objavili avtorica Ukmar in sodelavci. Dokazali so, da je sproščanje iz *urejenih* mezoporoznih silikatnih ogrodij nadzorovano z interakcijami med učinkovino in poroznim ogrodjem z natančno definirano velikostjo in strukturo por (91). Dokazano je tudi, da sproščanje ni zgolj difuzijsko nadzorovano, temveč da imajo interakcije učinkovine s stenami silikatnega ogrodja izredno pomembno, če ne celo vodilno vlogo (92). Mi pa smo proučevali sproščanje iz *neurejenega* poroznega SiO₂. V literaturi zaenkrat nismo zasledili nobenega nedvoumnega dokaza za z interakcijami nadzorovano sproščanje učinkovine iz *neurejenega* mezoporoznega silikatnega ogrodja. Vsekakor bi potrditev naše hipoteze lahko imela daljnosežne posledice za razumevanje sproščanja učinkovin iz *neurejenih* mezoporoznih dostavnih sistemov in bi lahko pomembno vplivala na njihov nadaljnji razvoj.
2. Sylysia[®] 350 ima zaradi *neurejene* strukture velik delež por večjih od 20 nm (90). Ker v teh porah ni mogoča stabilizacija amorfnе učinkovine s prostorsko restrikcijo, lahko sklepamo, da so prisotni tudi drugi mehanizmi stabilizacije amorfnе oblike. Zaradi prisotnih akceptorjev in donorjev H-vezi tako v strukturi modelne učinkovine (hidroksilna, etrna, aminska skupina) kot tudi na površini nosilca (siloksanska in silanolna skupina) predvidevamo, da je eden izmed načinov stabilizacije tvorba H-vezi. Dodaten dokaz za obstoj interakcij med KAR in površino poroznega SiO₂, je torej dejstvo, da je bila vsa učinkovina v porah oz. na površini nosilca v vseh vzorcih, vključenih v preskus raztapljanja, v amorfni obliki (rezultati analize DSC niso prikazani).
3. Kadar med učinkovino in poroznim nosilcem ni prisotnih privlačnih/odbojnih interakcij ali steričnih restrikcij, raztopina z določeno koncentracijo učinkovine med izdelavo trdne disperzije prosto zapolni pore nosilca. Koncentracija učinkovine v porah je tako enaka koncentraciji v izhodni raztopini. Po odparitvi topila v porah nosilca ostane toliko učinkovine, kot jo določa zgolj njena

koncentracija učinkovine v uporabljeni raztopini. V tem primeru lahko teoretično vsebnost KAR v trdni disperziji izračunamo z enačbo 5:

$$q_{min}^{teor} = \frac{c_{KAR}V_p}{1 + c_{KAR}V_p} \quad (En\ 5),$$

kjer je c_{KAR} (g/ml) koncentracija KAR v izhodni raztopini učinkovine v organskem topilu in V_p volumen por (ml/g nosilca) (59). Tako izračunane teoretične vsebnosti se ne ujemajo z izmerjenimi (dejanskimi) vsebnostmi učinkovine v izdelanih disperzijah, določenih s TGA (preglednica VIII). Ker so slednje večje od izračunanih, lahko sklepamo, da so med poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350 in KAR prisotne *privlačne* interakcije. Interakcije med učinkovino in poroznim nosilcem ne vplivajo samo na raztapljanje/sproščanje KAR, ampak tudi na obseg njegove adsorpcije iz raztopine na/v porozni SiO₂ Sylysia[®] 350, kar smo opisali že v poglavju 4.2.

Preglednica VIII: Primerjava izmerjenih vsebnosti KAR v različnih vzorcih trdnih disperzij, vključenih v preskus raztapljanja, s teoretičnimi vsebnostmi, izračunanimi z enačbo 5.

Vzorec	C_{KAR} [g/ml]	Teoretična vsebnost [%]	Izmerjena vsebnost (TGA) [%]
ADS THF 1	0,01	1,7	10,2
ADS THF 2	0,02	3,4	17,4
ADS THF 3	0,03	5,0	18,7
ADS THF 4	0,04	6,6	28,4
ADS DIO 1	0,01	1,7	8,0
ADS DIO 2	0,02	3,4	12,3
ADS DIO 3	0,03	5,0	16,6
ADS DIO 4	0,04	6,6	21,0
ADS ACT 1	0,01	1,7	10,1
ADS ACT 2	0,02	3,4	12,7
ADS ACT 3	0,03	5,0	19,4
ADS ACT 4	0,04	6,6	21,5

Z interpretacijo profilov raztapljanja smo ugotovili, da je sproščanje KAR iz neurejenega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 neodvisno od vrste uporabljenega organskega topila, iz katerega se učinkovina adsorbira na porozni nosilec. Predpostavljamo, da je sproščanje KAR iz poroznega SiO₂ nadzorovano predvsem oz. tudi z interakcijami med učinkovino in nosilcem. Za nedvoumno potrditev naše hipoteze so potrebne nadaljnje raziskave.

5 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo proučevali adsorpcijo karvedilola (KAR) na porozni SiO₂ Sylysia[®] 350 iz različnih organskih topil preko izdelave niza trdnih disperzij različnih vsebnosti KAR z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine. Pri tem smo za pripravo raztopin KAR uporabili različna organska topila (acetone, dioksan in THF). Dokazali smo, da izbrano organsko topilo oz. njegove lastnosti (donorsko število, dielektrična konstanta, topnost učinkovine v topilu, itd.) vplivajo na obseg adsorpcije KAR na porozni SiO₂, vendar pa vsaj pri tistih topilih, ki izkazujejo primerljivo in dobro topnost učinkovine (acetone, dioksan in THF), večjih razlik v njeni adsorpciji nismo opazili. Zato sklepamo, da so za obseg adsorpcije KAR najpomembnejše interakcije med učinkovino in poroznim nosilcem. Na podlagi ugotovljenega obsega adsorpcije KAR na porozni SiO₂ smo za nadaljnjo izdelavo trdnih disperzij uporabljali THF, saj je adsorpcija učinkovine iz izbranega topila boljša kot iz ostalih dveh.

Z vrednotenjem trdnih disperzij, izdelanih s predhodno sušenim poroznim SiO₂ in SiO₂, hranjenim na visoki RV (85 %) zraka, smo dokazali, da med izdelavo trdnih disperzij z organskim topilom (THF) iz por in s površine poroznega SiO₂ izpodrinemo vso šibko vezano vodo. Delež šibko vezane vode na poroznem SiO₂ Sylysia[®] 350 torej ne vpliva na obseg adsorpcije KAR iz organskega topila (THF).

Za določitev obsega adsorpcije KAR iz različnih organskih topil na porozni nosilec smo za določanje vsebnosti učinkovine v trdni disperziji izbrali in optimizirali metodo TGA. S primerjavo termogramov čistega KAR, čistega poroznega SiO₂ in trdne disperzije KAR v poroznem nosilcu smo potrdili relativno ustreznost izbrane metode za določanje vsebnosti KAR v poroznem SiO₂ Sylysia[®] 350. Pri izbranih pogojih TGA je potekla popolna termična razgradnja in uparitev KAR, medtem ko je bil anorganski SiO₂ Sylysia[®] 350 pri izbranih pogojih razmeroma stabilen. Vsebnost učinkovine je sorazmerna upadu mase vzorca med TGA, pri čemer pa moramo upoštevati tudi vsebnost zaostalega topila in šibko vezane vode v trdni disperziji.

Z določanjem prave gostote trdnih disperzij različnih vsebnosti KAR s helijevim piknometrom smo prvotno želeli razlikovati med tistim delom učinkovine, ki se je na porozni SiO₂ adsorbiral v monosloju in tistim, ki se je adsorbiral v več slojih oz. se je izboril v amorfni in/ali kristalni obliki. Predpostavili smo namreč, da ima KAR, ki se je adsorbiral v monosloju večjo gostoto kot njegov izborjeni del. Pri razlikovanju med opisanimi oblikama nismo bili uspešni, saj smo z analizo vzorcev trdnih disperzij

ugotovili, da pravilna in natančna določitev prave gostote s to metodo ni mogoča. Vzrok za netočne in nenatančne določitve gostot je bila šibko vezana voda, ki lahko v vzorcih čistega poroznega SiO₂ Sylysia[®] 350 predstavlja do 5,4 % celotne mase vzorca. Helijevi atomi namreč zaradi svoje majhnosti prodirajo tudi v najmanjše pore in pri tem desorbirajo šibko vezano vodo. Vodna para spremeni tlak v celici, kar je vzrok za napačne rezultate. S helijevo piknometrijo torej vedno precenimo gostoto trdnih snovi, ki vsebujejo vodo.

Z izdelavo trdnih disperzij KAR s poroznim SiO₂ Sylysia[®] 350 smo izboljšali hitrost raztapljanja slabo topne učinkovine v fosfatnem pufru s pH 6,8, ki simulira črevesno tekočino. Ugotovili smo, da je sproščanje KAR neodvisno od vrste uporabljenega organskega topila, iz katerega se adsorbira učinkovina na porozni nosilec. Predpostavljamo, da je sproščanje KAR iz neurejenega poroznega SiO₂ odvisno od interakcij med učinkovino in poroznim nosilcem. Sklepamo, da se na porozni SiO₂ veže vedno enaka množina učinkovine, ki se med raztapljanjem ne sprosti iz trdne disperzije. Čeprav več argumentov govori v prid hipotezi o raztapljanju, nadzorovanem z omenjenimi interakcijami, pa bi bil lahko vzrok, da se iz trdnih disperzij ni sprostil celoten odmerek učinkovine tudi dejstvo, da med preskusom raztapljanja nismo zagotovili pogojev »sink«. Za nedvoumno potrditev naše hipoteze so potrebne nadaljnje raziskave, s čim večjim naborom različnih učinkovin. V kolikor bi našo hipotezo potrdili, bi to lahko imelo daljnosežne posledice za razumevanje sproščanja učinkovin iz neurejenih mezoporoznih dostavnih sistemov in bi pomembno vplivalo na njihov nadaljnji razvoj.

Ker predstavlja izbira organskega topila enega izmed najpomembnejših korakov optimizacije polnjenja poroznih nosilcev z izbrano ZU, bi bilo smiselno na osnovi eksperimentalnih rezultatov postaviti univerzalni model, s katerim bi lahko predvideli obseg adsorpcije posamezne učinkovine na določen porozni nosilec. Da bi lahko določili vpliv lastnosti organskih topil na adsorpcijo KAR na porozni SiO₂ in se tako približali postavitvi takega modela, pa bi bilo potrebno izdelati trdne disperzije z metodo adsorpcije učinkovine iz raztopine z uporabo večjega nabora različnih organskih topil.

6 LITERATURA

1. Lipinski A, Lombardo F, Dominy B W, Feeney P J: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 46, 3–26.
2. Shen SC, Ng WK, Chia L, Dong YC, Tan RBH: Stabilized amorphous state of ibuprofen by co-spray drying with mesoporous SBA-15 to enhance dissolution properties. *J Pharm Sci* 2010; 99, 1997–2007.
3. Chapter 1, Introduction: Production, stability, and dissolution of solid dispersions to improve the bioavailability of class II lipophilic drugs: 7-37. Dostopno na strani (23.4.2013): <http://tophqbooks.com/books/205391>
4. Irman Florjanc T, Korošec L, Stanovnik L: Izbrana poglavja iz farmakologije – priprava za praktično delo študentov. Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2008.
5. Aqueous Solubility: Measurement and Prediction Tools. Dostopno na strani (29.5.2012): <http://www.pharmainfo.net/reviews/aqueous-solubility-measurement-and-prediction-tools>
6. Leuner C, Dressman J: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 47–60.
7. Tiwari R, Tiwari G, Srivastava B, Rai AK: Solid dispersions: An overview to modify bioavailability of poorly water soluble drugs. *Int J PharmTech Res* 2009; 1: 1338–1349.
8. Monhanachandran PS, Sindhumol PG, Kiran TS: Enhancement of solubility and dissolution rate: An overview. *Pharm Globale (IJCP)* 2010; 1: 1–10.
9. Serajuddin Abu TM: Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 603–616.
10. Bansal S, Bansal M, Kumria M. Nanocrystals: Current strategies and trends. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2012; 3: 406–419.
11. Planinšek O: Nekatere metode za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin – 1. del. *Farm Vestn* 2001; 52: 221–230.

12. Solubilization of drugs by using cyclodextrins. Dostopno na strani (5.6.2012): <http://www.authorstream.com/Presentation/i.venkey-1187820-solubilization-of-drugs-by-using-cyclodextrins01/>
13. Rozman B, Bogataj M: Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo. *Farm Vestn* 2006; 57: 198–195.
14. Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F: Kokristali zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2010; 61: 30–36.
15. Kovačič B: Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
16. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2006.
17. Planinšek O: Nekatere metode za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin – 2. del. *Farm Vestn* 2002; 53: 117–127.
18. Dhirendra K, Lewis S, Udupa N, Atin K: Solid dispersions: A Review. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22: 234–246.
19. Solid dispersions: An overview. Dostopno na spletu (28.9.2012): <http://www.pharmainfo.net/reviews/solid-dispersions-overview>
20. Sharma A, Jain CP: Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. *Int J Drug Delivery* 2011; 3: 149–170.
21. Planinšek O: Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin. *Farm Vestn* 2009; 60: 169–175.
22. Kawakami K: Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Ad Drug Delivery Rev* 2012; 64: 480–495.
23. Planinšek O: Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin. *Farm Vestn* 2007; 58: 8–14.

24. Costa Matthews C, Sugano K: Supersaturable formulations. *Japan Society of Drug Delivery Systems* 2010; 25: 371–374.
25. Augustijns P, Brewster ME. Supersaturating drug delivery systems: fast is not necessarily good enough. *J Pharm Sci* 2012; 101: 7–9.
26. Warren DB, Benameur H, Porter CJH, Pouton CW: Using polymeric precipitation inhibitors to improve absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. *J Drug Targeting* 2010; 18: 704–731.
27. Tiekink ERT, Vittal JJ, Zaworotko MJ: *Organic crystal engineering (frontiers in crystal engineering)*, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex 2010, 78–81.
28. Brewster EM: Rational design and development of solid dispersions with amorphous drug for improving oral absorption – assessing and optimizing supersaturation in amorphous solids and dispersions. Dostopno na strani (19.11.2012): http://mediaserver.aaps.org/meetings/09AM/Slides/11.8.09_Sun/SC6.pdf
29. Alonzo DE, Gao YI, Zhou D, Mo H, Zhang GGZ, Taylor LS: Dissolution and precipitation behavior of amorphous solid dispersions. *J Pharm Sci* 2011; 100: 3316–3331.
30. Langham ZA, Booth J, Hughes LP, Reynolds GK, Wren SAC: Mechanistic insights into the dissolution of spray-dried amorphous solid dispersions. *J Pharm Sci* 2012; 101: 2798–2810.
31. Craig DQM: The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *Int J Pharm* 2002; 231: 131–144.
32. Karavas E, Georgarakis E, Sigalas MP, Avgoustakis K, Bikiaris D: Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66: 334–347.
33. Bansal SS, Kaushal AM, Bansal AK: Molecular and thermodynamic aspects of solubility advantage from solid dispersions. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 794–802.

34. Akbar Khan MS: Solid dispersions: Formulation, characterisation, permeability and genomic evaluation. Aston University, March 2010.
35. Drooge DJV, Hinrichs WLJ, Frijlink HW: Anomalous dissolution behaviour of tablets prepared from sugar glass-based solid dispersions. *J Controlled Release* 2004; 97: 441–452.
36. Janssens S, Van den Mooter G: Review: physical chemistry of solid dispersions. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1571–1586.
37. Homar M, Gašperlin M, Kreč J: Tehnologije s talinami. *Farm Vestn* 2003; 54: 697–703.
38. ICH Topic Q3C (R4). Impurities: Guideline for residual solvents. Dostopno na strani (17.4.2013):
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002674.pdf
39. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Mooter GVd: Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *Int J Pharm* 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.015>
40. Shah S et al.: Melt extrusion with poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.001>
41. Frizon F, Eloy JO, Donaduzzi CM, Mitsui ML, Marchetti JM: Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. *Powder Technol* 2013; 235: 532–539.
42. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P: Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today* 2007; 12: 1068–1075.
43. Papadimitriou SA, Barmpalexis P, Karavas E, Bikiaris DN: Optimizing the ability of PVP/PEG mixtures to be used as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt mixing technique using artificial neural networks: I. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 82: 175–186.

44. Fuji chemical industry Co., Ltd. Benefits of using the right carrier for solid dispersion systems. Dostopno na strani (21.4.2013): http://www.fujihealthscience.com/Fuji_Email_Blast_Neusilin_JAN21.pdf
45. Tran PHL, Tran TTD, Park JB, Lee BJ: Controlled release systems containing solid dispersions: strategies and mechanisms. *Pharm Res* 2011; 28: 2353–2378.
46. Kim EJ, Chun MK, Jang JS, Lee IH, Lee KR, Choi HK: Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent-wetting method. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 64: 200–205.
47. Dixit AK, Singh RP, Stuti S: Solid Dispersion. A Strategy for Improving the Solubility of Poorly Soluble Drugs. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2012; 3: 960–966.
48. Broman E, Khoo C, Taylor LS: A comparison of alternative polymer excipients and processing methods for making solid dispersions of a poorly water soluble drug. *Int J Pharmaceut* 2001; 222: 139–151.
49. Yamashita K, Nakate T, Okimoto K, Ohike A, Tokunaga Y, Ibuki R, Higaki K, Kimura T: Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *Int J Pharm* 2003; 267: 79–91.
50. Giri TK et al.: A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2012; 50: 147–159.
51. Challa Kumar: *Nanomaterials for medical diagnosis and therapy*. Willey-VCH, Weinheim, 2007: 288–297.
52. Charnay C, Begu S, Tourne-Peteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM: Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 533–540.
53. Vialpando M, Martens JA, Van den Mooter G: Potential of ordered mesoporous silica for oral delivery of poorly soluble drugs. *The Deliv* 2011; 2(8): 1079–1091.

54. Limnell T: Mesoporous silica and silicon-based materials as carriers for poorly water soluble drugs. Academic dissertation, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, 2011.
55. Mali G, Planinšek O, Ukmar T: Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij. *Farm vestn* 2009; 60: 313–318.
56. Kinnari P, Mäkilä E, Heikkilä T, Salonen J, Hirvonen J, Santos AH: Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica materials as drug carriers for itraconazole. *Int J Pharm* 2011; 414: 148–156.
57. Planinšek O: Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin. *Farm vestn* 2006; 57: 155–161.
58. Johansson EM: Controlling the pore size and morphology of mesoporous silica. Licentiate Thesis No. 1451, Linköping Studies in Science and Technology, 2010.
59. Ojanen S: Drug loading of mesoporous silicon particles. Master's Thesis, Faculty of Technology, Department of Chemical Technology. Lapperaanta, 2008.
60. Xu W, Riikonen J, Lehto VP. Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, 2012. Dostopno na spletu (5.5.2013): <http://www.sciencedirect.com/nukweb.nuk.uni-lj.si/science/article/pii/S0378517312008733>
61. Van Speybroeck M, Mols R, Mellaerts R, Thao Do Thi, Martens JA, Van Humbeeck J, Annaert P, Van den Mooter G, Augustijns P: Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 75: 354–365.
62. Zakrajšek M. Načrtovanje, izdelava in vrednotenje dostavnih sistemov z dvofaznim sproščanjem težko topne modelne učinkovine. *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
63. Sylysia FCP, Fuji Sylysia chemical industry Co., Ltd. Product information, Kozoji-cho, Kasugai-shi, Aichi-ken. Dostopno na strani (29.4.2013):

- <http://www.tcindustries.com/Principals/BROCHURES/fujibrochures/FCP%20Brochure.pdf>
64. Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O: Solid dispersions of carvedilol with porous silica. *Chem Pharm Bull* 2011; 59: 427–433.
65. Brunton LL, Parker KL, Blumenthal KL, Buxton ILO: *Goodman's & Gillman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, 2008: 175-187.
66. Coryol 25 mg. Baza podatkov o zdravilih. Dostopno na strani (24.4.2013): www.zdravila.net
67. Lüllmann H, Hein L, Mohr K, Bieger D: *Color Atlas of Pharmacology*, 3rd edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005: 96-99.
68. Shadjou N, Hasanzadeh M, Saghatforoush L, Mehdizadeh R, Jouyban A: Electrochemical behavior of atenolol, carvedilol and propranolol on copper-oxide nanoparticles. *Electrochimica Acta* 2011; 58: 336– 347.
69. Carvedilol. In: *European Pharmacopoeia*, 7th Ed.
70. Greenspan L: Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards (Physics and Chemistry)*, 1976; 81A: 89-96.
71. TGA/DSCA STARe System, Mettler Toledo, Product Brochure. Dostopno na (1.5.2013): http://us.mt.com/dam/mt_ext_files/Editorial/Generic/4/TGA_DSC_1_Product_Brochure_Editorial-Generic_1186143058785_files/51724559_tga_dsc1brosche.pdf
72. *European Pharmacopoeia* 6th Edition. 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms; 5811–5817.
73. Burneau A, Lepage J, Maurice G: Porous silica – water interactions. I. Structural and dimensional changes induced by water adsorption. *J Non-Cryst Solids* 1997; 217: 1–10.
74. Scott RPW. *Physical chemistry resources: Book 5. Thermal analysis*. Dostopno na (22.5.2013): http://physicalchemistryresources.com/Book5_Thermal_Analysis.pdf

75. Schematic silica gel surface. Dostopno na (3.6.2013):
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_silica_gel_surface.png
76. Dielectric constant of common solvents. Dostopno na (19.5.2013):
[http://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/dielectric_chart\[1\].pdf](http://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/dielectric_chart[1].pdf)
77. Gutmann acceptor-donor numbers. Dostopno na strani (20.5. 2013):
<http://colloidaldispersions.com/resources/presentations/Dispersions%20for%20Biodygnosics/Lecture%205%20Polymer%20adsorption.pdf>
78. Furek V. Razvoj metode za obarjanje zdravilne učinkovine v pretočnem mikroreaktorju z dodatkom netopila. Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
79. Carvedilol (CAS 72956-09-3). Dostopno na (19.5.2013):
<http://www.scbt.com/datasheet-200157-carvedilol.html>
80. Gutmann acceptor and donor numbers. Dostopno na strani (20.5.2013):
<http://www.stenutz.eu/chem/solv21.php?sort=2>
81. Pogorelyi V, Barvinchenko VN, Pakhlov EM, Smirnova OV: The effect of solvent nature on the adsorption interaction between cinnamic acid and silicone dioxide. *Colloid J*, 2005; 67: 172–176.
82. Truong VT. Effect of cinnamic acid-cyclodextrin inclusion complexes on populations of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in fruit juices. Master of Science In Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia, 2007.
83. Loftsson T, Vogensen SB, Desbos C, Jansook P. Carvedilol: Solubilization and Cyclodextrin Complexation: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9(2): 425–430
84. Staszczuk P, Jaroniec M, Gilpin RK: Thermoanalytical studies of water films on porous silicas at subambient and elevated temperatures. *Thermochim Acta* 1996; 287: 225–233.
85. Sun CC: A material-sparing method for simultaneous determination of true density and powder compaction properties – Aspartame as an example. *Int J Pharm* 2006; 326: 94–99.

86. Sun CC: A novel method for deriving true density of pharmaceutical solids including hydrates and water-containing powders. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 93: 646–653.
87. Picker KM, Jobst BM: True density of swellable substances at different relative humidities – a new approach to its determination. *Eur J Pharm Biopharm* 1996; 42 (1): 82–84.
88. Ohta KM, Fuji M, Takei T, Chikazawa M: Development of a simple method for the preparation of a silica gel based controlled delivery system with a high drug content. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26: 87–96.
89. Almeida DRP, Gasparro DM, Martinek TA, Fulop F, Csizmadia IG: Resolution of carvedilol's conformational surface via gas and solvent phase density functional theory optimizations and NMR spectroscopy. *J Phys Chem* 2004; A 108: 7719-7729.
90. Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F: Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm* 2011; 406: 41–48.
91. Ukmar T, Maver U, Kaučič V, Planinšek O, Gaberšček M, Godec A: Understanding controlled drug release from mesoporous silicates: Theory and experiment. *J Controlled Release* 2011; 155: 409–417.
92. Ukmar T: Proučevanje mehanizmov vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine iz urejenih mezoporoznih silikatov. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.