

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK DRAGOVAN

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



ROK DRAGOVAN

**PROUČEVANJE SPROŠČANJA ŠTIRIH MODELNIH ZDRAVILNIH  
UČINKOVIN IZ POROZNEGA SILICIJEVEGA DIOKSIDA**

**STUDYING RELEASE OF FOUR MODEL DRUGS FROM POROUS  
SILICON DIOXIDE**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal 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 vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi pomagali pri izvedbi magistrske naloge.*

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

## **Izjava**

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

Rok Dragovan

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

**VSEBINA**

<b>POVZETEK .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 TRDNE DISPERZIJE.....	2
1.1.1 Definicija .....	2
1.1.2 Mehanizmi povečanja topnosti in raztapljanja ZU iz trdnih disperzij.....	2
1.1.3 Slabosti trdnih disperzij .....	3
1.1.4 Fizikalna stabilnost amorfnih trdnih disperzij .....	3
1.1.5 Metode izdelave trdnih disperzij .....	4
1.1.6 Nosilci za pripravo trdnih disperzij .....	4
1.2 POROZNI NOSILCI ZA IZDELAVO TRDNIH DISPERZIJ.....	5
1.2.1 Izdelava poroznega silicijevega dioksida .....	5
1.2.2 Struktura poroznega SiO <sub>2</sub> .....	7
1.2.3 Izdelava TD iz poroznih nosilcev .....	9
1.2.4 Sproščanje učinkovin iz poroznega SiO <sub>2</sub> .....	11
1.2.5 Fizikalno-kemijska karakterizacija mezoporoznih nosilcev.....	14
1.2.6 Toksičnost poroznega SiO <sub>2</sub> .....	15
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>18</b>
3.1 Materiali.....	18
3.2 Aparature .....	22
3.3 Metode dela.....	24
3.3.1 Izdelava trdnih disperzij .....	24
3.3.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	24

3.3.3	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR).....	25
3.3.4	Merjenje stičnega kota vode in njene hitrosti pronicanja .....	25
3.3.5	Morfologija delcev .....	25
3.3.6	HPLC metode .....	26
3.3.7	Določanje vsebnosti ZU v trdnih disperzijah .....	28
3.3.8	Določanje absolutne topnosti ZU v mediju za raztapljanje.....	28
3.3.9	Preskus raztapljanja .....	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1	DSC analiza .....	30
4.2	FTIR analiza .....	34
4.2.1	FTIR analiza celekoksiba .....	34
4.2.2	FTIR analiza glibenklamida .....	35
4.2.3	FTIR analiza indometacina.....	36
4.2.4	FTIR analiza irbesartana.....	37
4.3	Morfologija delcev .....	39
4.4	Merjenje stičnega kota vode in njene hitrosti pronicanja .....	40
4.5	Sproščanje zdravilnih učinkovin iz trdnih disperzij.....	41
4.5.1	Sproščanje celekoksiba.....	41
4.5.2	Sproščanje glibenklamida.....	43
4.5.3	Sproščanje indometacina .....	44
4.5.4	Sproščanje irbesartana .....	46
4.5.5	Primerjava sproščanja proučevanih ZU.....	47
4.6	Določanje kinetike sproščanja .....	51
<b>5</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>59</b>

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Strukture silanolnih in siloksanskih skupin na površini amorfnega silikagela.....	8
<b>Slika 2:</b> Metoda radikalske polimerizacije: a) Selektivna adsorpcija vinilnih monomerov na površino mezopor in b) naknadna termalna polimerizacija.....	9
<b>Slika 3:</b> a) Nemodificiran nosilec: ibuprofen se veže s šibkimi vodikovimi vezmi med silanolnimi skupinami nosilca in karboksilno skupino ZU. b) Nosilec z vezanimi amino skupinami: ibuprofen je na stene nosilca vezan z ionsko vezjo med amonijevo skupino in karboksilat. ....	12
<b>Slika 4:</b> Strukturne formule učinkovin: a) celekoksib, b) glibenklamid, c) indometacin, d) irbesartan. ....	20
<b>Slika 5:</b> DSC termogrami trdnih disperzij celekoksiba v razmerjih CLX : Syloid = 1 : 3 in CLX : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega CLX. ....	31
<b>Slika 6:</b> DSC termogrami trdnih disperzij GLB v razmerjih GLB : Syloid = 1 : 3 in GLB : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega GLB.....	31
<b>Slika 7:</b> DSC termogrami trdnih disperzij IMC v razmerjih IMC : Syloid = 1 : 3 in IMC : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega IMC. ....	32
<b>Slika 8:</b> DSC termogrami trdnih disperzij IBS v razmerjih IBS : Syloid = 1 : 3 in IBS : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega IBS. ....	33
<b>Slika 9:</b> FTIR spektri celekoksiba, fizikalne zmesi v razmerju CLX : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju CLX : Syloid = 1 : 3 in Syloida <sup>®</sup> 244 FP.....	35
<b>Slika 10:</b> FTIR spektri glibenklamida, fizikalne zmesi v razmerju GLB : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju GLB : Syloid = 1 : 3 in Syloida <sup>®</sup> 244 FP. ....	36
<b>Slika 11:</b> FTIR spektri indometacina, fizikalne zmesi v razmerju IMC : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju IMC : Syloid = 1 : 3 in Syloida <sup>®</sup> 244 FP.....	37
<b>Slika 12:</b> FTIR spektri irbesartana, fizikalne zmesi v razmerju IBS : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju IBS : Syloid = 1 : 3 in Syloida <sup>®</sup> 244 FP .....	38
<b>Slika 13:</b> Elektronsko mikroskopske slike osnovnih delcev A) celekoksiba, B) glibenklamida, C) indometacina, D) irbesartana. ....	39
<b>Slika 14:</b> Elektronsko mikroskopska slika osnovnih delcev Syloida <sup>®</sup> 244 FP. ....	40
<b>Slika 15:</b> Profili raztapljanja kristalnega CLX, CLX iz fizikalnih zmesi in CLX iz trdnih disperzij .....	42
<b>Slika 16:</b> Primerjava količin sproščenega kristalnega CLX, CLX iz fizikalnih zmesi in CLX iz trdnih disperzij po 24 h. ....	42

<b>Slika 17:</b> Profili raztapljanja kristalnega GLB, GLB iz fizikalnih zmesi in GLB iz trdnih disperzij .....	43
<b>Slika 18:</b> Primerjava količin sproščene kristalnega GLB, GLB iz fizikalnih zmesi in GLB iz trdnih disperzij po 24 h.....	44
<b>Slika 19:</b> Profili raztapljanja kristalnega IMC, IMC iz fizikalnih zmesi in IMC iz trdnih disperzij .....	45
<b>Slika 20:</b> Primerjava količin sproščene kristalnega IMC, IMC iz fizikalnih zmesi in IMC iz trdnih disperzij po 24 h.....	45
<b>Slika 21:</b> Profili raztapljanja kristalnega IBS, IBS iz fizikalnih zmesi in IBS iz trdnih disperzij .....	46
<b>Slika 22:</b> Primerjava količin sproščene kristalnega IBS, IBS iz fizikalnih zmesi in IBS iz trdnih disperzij po 24 h.....	47
<b>Slika 23:</b> Primerjava deležev sproščene kristalne ZU in ZU iz trdnih disperzij po 2h.....	50
<b>Slika 24:</b> Primerjava deležev sproščene kristalne ZU in ZU iz trdnih disperzij po 24h.....	51
<b>Slika 25:</b> Količina zdravilne učinkovine, ki se je sprostila v »hipni« fazi in je posledično nismo upoštevali pri določanju kinetike sproščanja. ....	53
<b>Slika 26:</b> Grafična primerjava kinetik sproščanja za CLX 1:3 TD.....	54
<b>Slika 27:</b> Grafična primerjava kinetik sproščanja za GLB 1:3 TD.....	54
<b>Slika 28:</b> Grafična primerjava kinetik sproščanja za IMC 1:3 TD.....	55
<b>Slika 29:</b> Grafična primerjava kinetik sproščanja za IBS 1:3 TD.....	55

## POVZETEK

Večina novih zdravilnih učinkovin je slabo topnih v vodi, kar zmanjšuje njihovo absorpcijo in učinkovitost. Izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja teh učinkovin je torej nujno, če želimo zagotoviti visoko biološko uporabnost. Vgrajevanje težko topnih zdravilnih učinkovin v mezoporozne materiale je vedno bolj aktualna strategija za izboljšanje raztapljanja. V naši raziskavi smo preučili primernost uporabe Syloida<sup>®</sup> 244 FP za izboljšanje hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin.

V mezoporozni nosilec smo vgradili štiri težko topne modelne učinkovine, imenovane celekoksib, glibenklamid, indometacin in irbesartan, ki se med seboj močno razlikujejo v kemijski zgradbi. Za vsako učinkovino smo z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku izdelali dve trdni disperziji v masnem razmerju učinkovina : Syloid = 1 : 2 in učinkovina : Syloid = 1 : 3. Vsebnost učinkovine v trdni disperziji smo določili z metodo ekstrakcije, koncentracijo učinkovine v končni raztopini pa smo izmerili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. S pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije smo izračunali, kakšen delež amorfne oblike učinkovine vsebujejo izdelane disperzije. Morebitne vodikove vezi, ki se lahko tvorijo med nosilcem in učinkovino, smo dokazali z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo.

Z izdelavo trdnih disperzij indometacina in irbesartana s Syloidom<sup>®</sup> 244 FP smo izboljšali hitrost raztapljanja teh učinkovin v fosfatnem pufru s pH 6,8. V primeru trdnih disperzij celekoksiba in glibenklamida je prišlo do upočasnitve sproščanja. Ugotovili smo, da kemijska struktura zdravilne učinkovine vpliva na interakcije z nosilcem in posledično tudi na sproščanje. Vpliv interakcij se poveča s povečanjem deleža nosilca v disperziji, saj se tako večji delež učinkovine nahaja na površini mikro- in mezopor nosilca. Učinkovine so se tako iz trdnih disperzij, ki so vsebovale večji del nosilca, sproščale počasneje, v nekaterih primerih pa je velik del učinkovine ostal nesproščen.

Na podlagi profilov sproščanja smo predpostavili, da se učinkovina iz mezoporoznega nosilca sprošča v treh fazah. V prvi fazi se sprosti učinkovina, ki se nahaja na zunanji površini nosilca, sproščanje le-te je zelo hitro. V drugi fazi poteka raztapljanje in sproščanje manjših amorfnih in kristalnih delcev znotraj mezopor, v tretji fazi pa se sprosti učinkovina iz monosloja na notranji površini nosilca. Sproščanje v tej fazi je močno upočasnjeno zaradi interakcij učinkovine s površino nosilca.



**ABSTRACT**

A majority of newly developed drugs exhibits poor aqueous solubility, which decreases the drugs' absorption and effectiveness. The improvement of solubility and dissolution rate of these drugs is, therefore, necessary to ensure the high bioavailability. The incorporation of the poorly soluble drugs into mesoporous materials is an increasingly used strategy for the enhancement of their dissolution. In this research, we studied the suitability for the use of Syloid<sup>®</sup> 244 FP, to increase the dissolution rate in poorly soluble drugs.

We incorporated four poorly soluble model drugs (celecoxib, glibenclamide, indomethacin and irbesartan) into mesoporous carrier. The four drugs differ greatly in their chemical structure. For each of the drugs, two solid dispersions in weight ratio drug : Syloid = 1 : 2 and drug : Syloid = 1 : 3 were made using the solvent evaporation method. The drug content in solid dispersions was determined by the extraction method. The concentration of the drug in the final solution was measured by high performance liquid chromatography. With the help of differential scanning calorimetry we have calculated the proportion of an amorphous drug form in the dispersion. The possible hydrogen bonds that may have formed between the drug and the carrier were analysed by Fourier transform infrared spectroscopy.

We increased the dissolution rate of indomethacin and irbesartan in Phosphate buffer, pH 6,8 through the formation of solid dispersions with Syloid<sup>®</sup> 244 FP. In solid dispersions with celecoxib and glibenclamide the release rate was decreased. We established that the chemical structure of the drugs has an effect on the interactions with the carrier and consequently on the release as well. The impact of interactions increases according to the increase of the proportion of the carrier in dispersion, because bigger proportion of the drug stays on the surface of the micro- and mesopores. The release of the drugs from the solid dispersions with the bigger proportion of the carrier was slower and in some cases a big part of the drug was not released at all.

On the grounds of the release profiles we assumed that the drug releases from the mesoporous carrier in three different phases. In the first phase, only the drug present on the outer surface of the carrier was released – the release rate in this stage was accelerated. In the second phase, the dissolution and release of the small amorphous and crystal particles from mesopores takes place. And finally, in the third phase, the drug from the monolayer on the inner part of the surface was released. The release rate in the latter phase was decreased due to the interactions between the drug and the surface of the carrier.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutics Classification System)
BU	biološka uporabnost
CLX	celekoksib
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
FZ	fizikalna zmes
GLB	glibenklamid
H-vez	vodikova vez
IBS	irbesartan
IMC	indometacin
PAS	površinsko aktivna snov
PSA	velikost polarne površine (Polar Surface Area)
PSiO <sub>2</sub>	porozni silicijev dioksid
SDS	natrijev dodecil sulfat
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
TD	trdna disperzija
T <sub>g</sub>	temperatura steklastega prehoda
T <sub>m</sub>	temperatura tališča
VDW	van der Waalove vezi
XRPD	rentgenska praškovna difrakcija (X-ray Powder Diffraction)
ZU	zdravilna učinkovina

## 1 UVOD

Peroralna dostava zdravil je ena izmed najenostavnejših in najlažjih. Zaradi dobre stabilnosti, manjšega volumna, natančnega odmerjanja in enostavne proizvodnje imajo trdne peroralne oblike veliko prednost pred tekočimi. To je eden izmed glavnih razlogov, da je večina novih zdravilnih učinkovin (ZU) v razvoju zdravil namenjenih za uporabo v trdnih oblikah, ki dosegajo visoke in ponovljive plazemske koncentracije. Vendar pa je večina novih ZU slabo topnih v vodi, kar zmanjšuje njihovo absorpcijo in učinkovitost. Po biofarmacevtski klasifikaciji zdravil (BCS) slabo topne ZU razvrstimo na dobro in slabo permeabilne skozi membrano stene gastrointestinalnega trakta oz. v BCS razred II in IV. Z izboljšanjem topnosti učinkovin, ki jih uvrščamo v razred II, lahko torej povečamo njihovo biološko uporabnost (1, 2). Za lažje razumevanje načinov in mehanizmov izboljšanja raztapljanja nam je v pomoč modificirana Noyes-Whitney-eva enačba:

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

kjer je  $dC/dt$  hitrost raztapljanja,  $A$  je površina, ki je na voljo za raztapljanje,  $D$  je difuzijski koeficient ZU,  $C_s$  je ravnotežna topnost ZU v mediju,  $C$  je koncentracija ZU ob času  $t$  in  $h$  je debelina difuzijske plasti. Hitrost raztapljanja lahko torej povečamo s povečanjem površine, ki je na voljo za raztapljanje, z izboljšanjem močenja, z zmanjšanjem debeline difuzijske plasti, z zagotavljanjem »sink« pogojev ali s povečanjem navidezne topnosti (3, 4, 5). Raztapljanje v vodi težko topnih ZU lahko izboljšamo z uporabo različnih kemijskih in fizikalnih metod. Med kemijske sodita tvorjenje soli in sinteza topnih predzdravil. Med fizikalne pa štejemo: zmanjševanje velikosti delcev (mikronizacija, nanosuspenzije, nanokristali), tvorbo amorfne oblike ZU, izdelavo polimorfov ter psevdopolimorfov, kompleksacijo oziroma solubilizacijo z uporabo PAS ali ciklodekstrinov, tvorbo emulzij in mikroemulzij ter izdelavo trdnih disperzij (1, 3). Kemijski pristopi niso vedno mogoči, tvorjenje soli je namreč mogoče le za šibko bazične ali kisle ZU, ne pa tudi za nevtralne substance. Uporaba mikronizacije je eden izmed pogosto uporabljenih pristopov za zmanjševanje delcev in posledično povečanje površine, vendar pa je v primerjavi s tvorbo trdnih disperzij veliko manj učinkovit, saj so delci, ki nastanejo, še vedno preveliki, da bi občutno povečali BU, velikokrat pa se zgodi, da pride med delci do aglomeracije. Poleg povečanja površine trdne disperzije tudi izboljšajo močenje in preprečijo kristalizacijo zdravilne učinkovine (1, 3, 4, 6).

## 1.1 TRDNE DISPERZIJE

### 1.1.1 Definicija

Trdne disperzije so disperzije ene ali več aktivnih komponent v inertnem nosilcu, ki je v trdnem agregatnem stanju (4). Učinkovina je lahko v kristalnem ali amornem ogrodju dispergirana molekularno, v obliki amornih delcev ali v obliki kristalnih delcev. Glede na dispergirano ZU in kristalnost ali amornost ogrodja lahko delimo trdne disperzije na **evtektične zmesi** (kristalni delci ZU dispergirani v kristalnem ogrodju); **trdne raztopine** (molekularno porazdeljena ZU v kristalnem ogrodju); **steklaste raztopine** (molekularno dispergirana ZU v amornem ogrodju) in **steklaste suspenzije** (kristalni ali amorni delci ZU dispergirani v amornem ogrodju) ter **amorfne precipitate v/na kristalnem nosilcu** (5). Trdne raztopine lahko nadalje delimo glede na medsebojno mešanje ZU in nosilca na **kontinuirane trdne raztopine**, kjer se mešata v vseh razmerjih in pride do nastanka enofaznega sistema ter na **nekontinuirane trdne raztopine**, kjer pride le do delnega mešanja in nastanka dvofaznega sistema. Glede na način porazdelitve ZU v kristalni mreži nosilca pa jih delimo na **substitucijske kristalne trdne raztopine**, v katerih so molekule nosilca v kristalni mreži zamenjane z molekulami učinkovine in na **intersticijske kristalne trdne raztopine**, kjer so molekule učinkovine vključene v intersticijski prostor med molekulami nosilca (3, 5).

### 1.1.2 Mehanizmi povečanja topnosti in raztapljanja ZU iz trdnih disperzij

Na mehanizem in hitrost sproščanja učinkovine iz trdne disperzije vplivajo različni dejavniki. Kateri bodo prevladovali, je odvisno predvsem od sestave in načina proizvodnje trdne disperzije. Molekularne disperzije predstavljajo zadnjo stopnjo v procesu zmanjševanja delcev. Na ta način se maksimalno poveča površina delca, ki je na voljo za raztapljanje, posledično se poveča tudi hitrost raztapljanja in topnost ZU (7). Specifično površino ZU lahko povečamo tudi tako, da za izdelavo TD uporabimo porozen nosilec, na katerega se lahko učinkovina adsorbira (8). Velik del k izboljšanju topnosti prispeva tudi boljše močenje, ki se pojavi tako pri nosilcih s površinsko aktivnostjo, kot tudi pri tistih, ki le-te nimajo, saj je vsak delec ZU v celoti obdan z vodotopnim nosilcem, ki se v stiku z vodo hitro raztopi (5). ZU se v TD pogosto nahaja v amornih obliki. Za raztapljanje učinkovine, ki se nahaja v amornem stanju, je potrebno manj energije, ker se ta med

procesom raztapljanja ne porablja za razpad kristalne strukture (7, 9, 10). Pomembno vlogo pri povečevanju hitrosti raztapljanja ima tudi odsotnost agregacije in aglomeracije kristalov čiste hidrofobne ZU. Ta je namreč v TD obdana z nosilcem, ki preprečuje približevanje in združevanje delcev. Na hitrost raztapljanja lahko vpliva tudi solubilizacijski učinek nosilca v mikrookolju, ki se v okolici učinkovine popolnoma raztopi (5). Najpogostejše interakcije med učinkovino in nosilcem so van der Waalsove (VDW) in vodikove vezi. Slednje lahko sproščanje učinkovine pospešijo s stabilizacijo amorfnе oblike, lahko pa ga upočasnijo z ujetjem ZU v pore nosilca (11, 12).

### 1.1.3 Slabosti trdnih disperzij

Kljub temu da raziskave na področju trdnih disperzij potekajo že več kot 50 let, je na trgu na voljo zgolj nekaj tovrstnih izdelkov. Glavni razlog za to so nekatere slabosti trdnih disperzij, med katere štejemo slabo ponovljivost fizikalno-kemijskih lastnosti, drage in težavne metode priprave TD, težave pri inkorporiranju v nadaljnje formulacije, težko izvedljivo industrijsko proizvodnjo ter fizikalna in kemijska nestabilnost učinkovine in formulacije (1, 4). K slabi implementaciji TD v industrijski farmaciji še dodatno pripomore slaba predvidljivost njihove topnosti in raztapljanja zaradi pomanjkljivega razumevanja obnašanja molekul znotraj TD (12).

### 1.1.4 Fizikalna stabilnost amorfnih trdnih disperzij

Profil sproščanja trdnih disperzij mora ostati med shranjevanjem nespremenjen. Če je učinkovina v obliki molekulske disperzije prenasičena, ali se nahaja v amorfnih obliki, lahko s staranjem kristalizira (4). Za optimalno stabilnost amorfnih trdnih disperzij mora biti molekularna mobilnost čim nižja. Trdne disperzije, ki vsebujejo tudi kristalne delce ZU, so veliko bolj nestabilne. Kristalni delci namreč tvorijo jedra, ki predstavljajo izhodišče za nadaljnjo kristalizacijo. V popolnoma homogenih TD je učinkovina molekularno razpršena, posledično mora ZU pred začetkom kristalizacije migrirati skozi ogrodje, zato je v teh TD fizikalna stabilnost nadzorovana tako s kristalizacijo ZU, kot tudi z migracijo. Na stabilnost vpliva tudi masno razmerje med učinkovino in nosilcem. Z višanjem deleža nosilca povečamo difuzijsko razdaljo med molekulami, zmanjšamo tveganje za prenasičenost TD in zvišamo delež ZU, ki je v neposrednem stiku z nosilcem, s čimer povečamo stabilnost TD. Kadar povečamo vsebnost učinkovine, ki ima  $T_g$  nižjo od nosilca, povišamo mobilnost molekul in posledično zmanjšamo stabilnost. Z zvišanjem

deleža močno hidrofobne učinkovine zmanjšamo higroskopnost sistema in s tem tudi količino vode, ki bi lahko ob povišani relativni vlažnosti prodrla v TD, jo zmeščala ter tako povzročila kristalizacijo ZU (1, 12).

### **1.1.5 Metode izdelave trdnih disperzij**

Glede na postopek izdelave razdelimo metode za izdelavo trdnih disperzij v dve kategoriji. Prva obsega uporabo povišane temperature, druga pa uporabo topil. V prvo kategorijo spadajo metoda preprostega taljenja, metoda iztiskanja taline in metoda razprševanja s strjevanjem, vsem trem pa je skupno taljenje nosilca. Pri teh metodah je zelo pomembno, da sta učinkovina in nosilec stabilna pri povišani temperaturi. Med metode, ki obsegajo uporabo topil, spadajo sušenje z razprševanjem, sušenje z zamrzovanjem oz. liofilizacija, metoda obarjanja z uporabo superkritičnih fluidov in metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku (3, 7, 13, 14). Glavna omejitev teh metod je nezadostna topnost učinkovine in nosilca v istem topilu. Temu problemu se lahko izognemo z uporabo sotopil, lahko pa v organskem topilu raztopimo zgolj ZU in ji nato dodamo staljen nosilec (4).

### **1.1.6 Nosilci za pripravo trdnih disperzij**

Nosilec za pripravo trdnih disperzij mora biti dobro topen v vodi, poleg tega pa mora imeti tudi veliko intrinzično hitrost raztapljanja. Biti mora netoksičen, fizikalno, kemijsko in termično stabilen in ne sme imeti farmakološkega učinka. Nosilci, ki jih uporabljamo pri izdelavi TD z metodami taljenja, morajo imeti nizko tališče, s čimer se izognemo visokim temperaturam pri pripravi disperzije. Pri taljenju fizikalne zmesi ne sme priti do kemijskih interakcij z ZU in posledično spremembe strukture ZU, pri ohlajanju taline pa morajo hitro in popolnoma kristalizirati. V tekoči fazi se morata nosilec in učinkovina dobro mešati. Nosilec za pripravo TD z metodo raztapljanja mora biti topen v različnih organskih topilih. Pomembno je tudi, da po odstranitvi topila ZU in nosilec sočasno kristalizirata, saj v nasprotnem primeru ne pride do nastanka evtektične zmesi. Nosilci, ki jih pogosteje uporabljamo za izdelavo trdnih disperzij, so polietilenglikoli, polivinilpirolidoni, celulozni derivati (metil celuloza, hidroksipropilmetil celuloza, celulozni acetat ftalat ...) askorbinska in citronska kislina, poliakrilati, polimetakrilati, urea, sladkorji (laktoza, glukoza, fruktoza ...) in alkoholi sladkorjev (manitol, sorbitol, ksilitol ...), različni sopolimeri in PAS (Tween<sup>®</sup>, fosfolipidi, holesterol in njegovi estri ...) (3, 5, 15). Vse večjo pozornost pa v farmacevtski industriji posvečajo poroznim nosilcem, ki zaradi visoke specifične površine,

prilagodljive poroznosti in biološke kompatibilnosti sodijo med najbolj perspektivne nosilce za izdelavo trdnih disperzij (16).

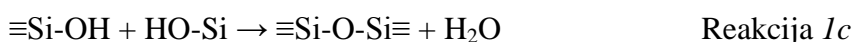
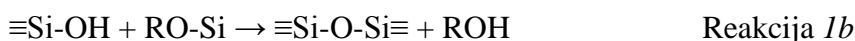
## 1.2 POROZNI NOSILCI ZA IZDELAVO TRDNIH DISPERZIJ

Med porozne nosilce uvrščamo porozne silicijeve materiale, porozen silicijev dioksid, porozne kalcijeve in aluminijeve silikate, zeolite in porozno keramiko (17, 18). Po IUPAC nomenklaturi jih glede na velikostni razred por delimo na mikroporozne s porami dimenzij med 0,3 in 2 nm, mezoporozne s porami velikosti med 2 in 50 nm in makroporozne materiale z velikostjo por nad 50 nm (19). V mikroporah se adsorpcijski potenciali nasprotnih sten zaradi neposredne bližine prekrivajo, zato se z večanjem radija por do neke točke večajo tudi interakcije med nosilcem in adsorbentom. Količina adsorbirane ZU je v tem primeru nadzorovana z deležem volumna por, ki je dostopen molekulam učinkovine. V primeru mezoporoznih nosilcev adsorpcijski potencial sten nosilca ni največji na sredini pore in posledično je adsorpcija ZU v takšne materiale nadzorovana tako z interakcijami med adsorbentom in steno por kot tudi z interakcijami med samimi molekulami adsorbenta. V makroporoznem razredu so pore tako široke, da se obnašajo podobno kot ravne površine (20). Mikroporozni nosilci se v farmaciji uporabljajo za doseganje nadzorovanega sproščanja ZU (21). Najpogosteje uporabljeni so mezoporozni materiali, s katerimi lahko dosežemo tako pospešeno kot tudi nadzorovano sproščanje, zato jim bomo v nadaljevanju posvetili nekoliko več pozornosti. Zaradi kemijske inertnosti pri fizioloških pogojih in biokompatibilnosti predstavljajo mezoporozni nosilci dobro alternativo klasičnim polimernim nosilcem. Med sproščanjem ti sistemi ne nabrekajo in ne erodirajo, zato struktura ostane definirana in nespremenjena (19).

### 1.2.1 Izdelava poroznega silicijevega dioksida

**Porozni silicijev dioksid** ( $\text{PSiO}_2$ ) ali siliko pripravimo s kemijsko sintezo. Končni produkt so lahko delci z urejeno ali neurejeno strukturo por (22). Metoda proizvodnje poroznega silicijevega dioksida temelji na sol-gel procesu. Proces sestavlja tvorba koloidne suspenzije silike, imenovane sol, iz katere se po geliranju tvori ogrodje medsebojno povezanih por. Sledi sušenje in nastanek končnega produkta imenovanega kserogel. Priprava silicijevega dioksida s sol-gel procesom nudi veliko možnosti za pripravo različnih gelov. Gel se tvori iz alkoksidnih prekurzorjev  $\text{Si(OR)}_4$ , najpogosteje iz tetraetilortosilikata (TEOS,  $\text{Si(OCH}_2\text{CH}_3)_4$ ) ali natrijevega metasilikata ( $\text{SiO}_2 \cdot x \text{Na}_2\text{O}$ ) (20, 23). Postopek priprave

PSiO<sub>2</sub> iz TEOS se prične s hidrolizo alkoksida, ki poteka v prisotnosti bazičnega ali kislega katalizatorja (Reakcija 1a). V prvem koraku nastanejo silanolne skupine (Si-OH), temu sledi kondenzacija, pri kateri silanolne skupine reagirajo z alkoksidom (Reakcija 1b) ali z drugimi silanolnimi skupinami (Reakcija 1c). Tako nastanejo reaktivne siloksanske vezi (≡Si-O-Si≡). Vsak silicijev atom lahko tvori do štiri siloksanske vezi in tako postopoma tvori omrežje por. Stranska produkta reakcije sta voda in alkohol, ki ju odstranimo med postopkom sušenja, imenovanim kalciniranje (angl. calcination), ki sledi kondenzaciji (24).



PSiO<sub>2</sub> iz natrijevega metasilikata pripravimo s Kistlerjevo reakcijo (Reakcija 2). Silikatu dodamo HCl, nastalemu produktu pa moramo v nadaljevanju še odstraniti vodo. Odstranjevanje lahko poteka pri kritičnih pogojih ( $T_{\text{kr H}_2\text{O}} = 374^\circ\text{C}$ ,  $P_{\text{kr H}_2\text{O}} = 221 \text{ bar}$ ), lahko pa zmesi dodamo metanol ter tako vodo odstranimo pri blažjih pogojih ( $T_{\text{kr MeOH}} = 243^\circ\text{C}$ ,  $P_{\text{kr MeOH}} = 63,8 \text{ bar}$ ) (25).



Strukturo in lastnosti končnega produkta lahko nadzorujemo s spreminjanjem molarne razmerja med vodo in alkoksidom, pH, pogojev sušenja, z vrsto katalizatorja in njegovo koncentracijo, s sintranjem pri povišani temperaturi, z uporabo alkil substituiranih alkoksidov ali dodatkom drugih snovi (20, 23, 24, 25).

Produkt opisanih metod je PSiO<sub>2</sub> z neurejeno strukturo por. Sinteza silike z urejeno strukturo por poteka po zelo podobnem postopku, s to razliko, da reakcijski zmesi dodamo površinsko aktivno snov (PAS), ki tvori micelle, okoli katerih se spontano uredi silicijev dioksid in tako tvori urejeno omrežje por. Postopek po navadi poteka v treh korakih: 1) najprej v kislih ali bazičnih pogojih raztopimo PAS in počakamo, da se uredi; 2) sledi dodatek alkoksida in tvorba omrežja por; 3) v tretjem koraku z metodo kalcinacije pri visoki temperaturi ali z metodo ekstrakcije z organskim topilom odstranimo PAS (26, 27). Najpogostejše uporabljene PAS so kationski surfaktant CTAB in triblok kopolimera P123 ter F127, ki ustrezajo mezoporoznim materialom MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41), SBA-14 (Santa Barbara Material No. 15) in SBA-16 (22, 27, 28).



## 1.2.2 Struktura poroznega SiO<sub>2</sub>

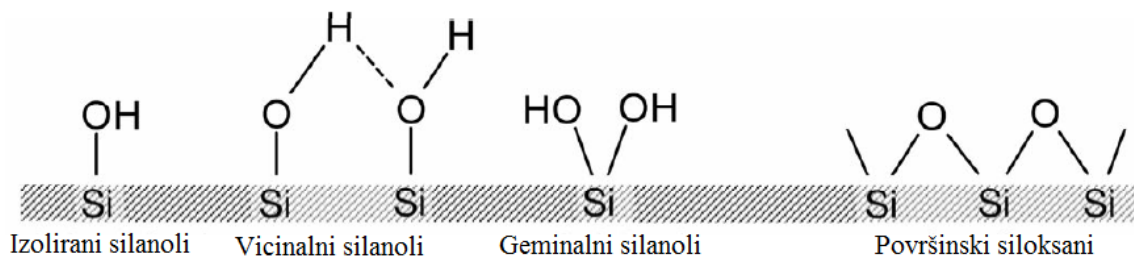
### 1.2.2.1 Morfologija por poroznega SiO<sub>2</sub>

Sestava poroznega materiala in metoda izdelave močno vplivata na morfologijo por. Velikost por lahko sega od nekaj nanometrov do več mikrometrov, največkrat pa uporabljamo nosilce z velikostjo por med 10 in 20 nm (26). Neurejeni P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> imajo nepravilno oblikovane pore s široko porazdelitvijo velikosti. Urejeni P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> pa imajo ozko porazdelitev velikosti por, ki so med sabo nepovezane. Struktura por je periodično geometrijsko urejena v obliki dvodimenzionalne simetrije z vzporednim cilindričnim potekom por (20). Ena izmed najpomembnejših lastnosti P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> je možnost spreminjanja velikosti por od 1,5 nm do več 10 nm s spreminjanjem dolžine verige PAS, uporabo različnih polimernih PAS in dodatkom nabrekajočih substanc (8). Spreminjanje dolžine alkilne verige PAS je najlažji in najpogosteje uporabljen način, vendar zaradi omejene razpoložljivosti surfaktantov ni vedno mogoč. Nabrekajoče substance, kot sta trimetilbenzen in heksan, prodrejo v jedra micelov amfifilnih PAS in povečajo velikost ogrodja (26). P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> lahko zaradi različnih lastnosti PAS tvori tako 2D kot 3D strukture. MCM-41 in SBA-15 imata 2D heksagonalno strukturo, MCM-48 pa 3D kubično strukturo por (8). Zaradi stroge urejenosti por izkazujejo ti materiali nekatere kristalom podobne lastnosti, kot so visoka trdnost in ostri difrakcijski vrhovi pri majhnih kotih (19). Na velikost in morfologijo por P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> vpliva tudi vrsta uporabljenega katalizatorja. In sicer vpliva katalizator na pH reakcijske zmesi, ta pa na relativno razmerje med hitrostjo reakcije hidrolize in kondenzacije. Delci SiO<sub>2</sub> so pri nizkem pH pozitivno nabiti in pri visokem pH negativno nabiti. Šibko bazični sol vsebuje velik delež deprotoniranih silanolnih skupin (SiO<sup>-</sup>), ki pospešijo hitrost kondenzacije in povzročijo nastanek razvejanih struktur. Geliranje teh struktur povzroči nastanek mezoporoznega kserogela. Pri pH vrednosti okrog izoelektrične točke (pH = 2–3) nastajajo linearne in razvejane mikroporozne strukture. Če pa znižamo pH pod vrednost izoelektrične točke, so delci zopet mezoporozni. Razlog za to so protonirane silanolne skupine SiOH<sup>2+</sup>, ki so dobro izstopajoče in tako pospešijo reakcijo kondenzacije (21, 25).

### 1.2.2.2 Lastnosti površine poroznega SiO<sub>2</sub>

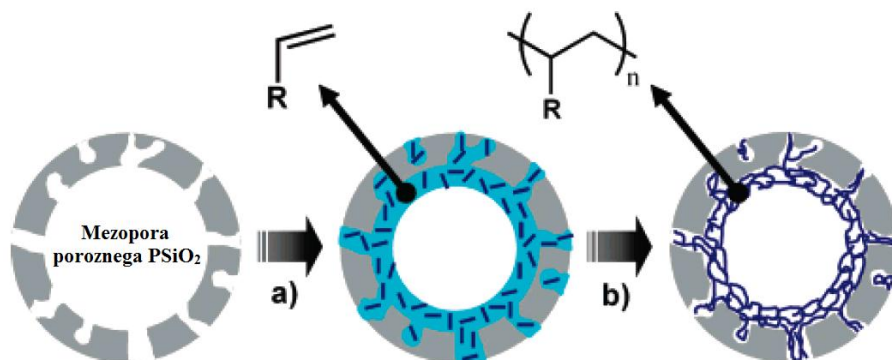
Na površini P<sub>SiO</sub><sub>2</sub> se nahajajo silanolne skupine. Te so lahko nastale med izdelavo silikagela ali pa so produkt procesa rehidroksilacije površine, ki poteče, ko dehidroksilirano površino silikagela izpostavimo vodi. Silanolne skupine lahko razdelimo

na izolirane, geminalne (silandiole) ter na vicinalne, ki so sestavljene iz OH skupin, medsebojno povezanih z vodikovimi vezmi (Slika 1). Na površini lahko najdemo še eno vrsto skupin, imenovano površinski siloksani (29).



**Slika 1:** Strukture silanolnih in siloksanskih skupin na površini amorfne silikagela (30).

Reaktivne silanolne skupine (Si-OH) omogočajo pripenjanje različnih funkcionalnih skupin in s tem spreminjanje površinskih lastnosti nosilca. Tako lahko omogočimo njegovo uporabo v najrazličnejše namene, med katere spadajo selektivna adsorpcija težkih in žlahtnih kovin, imobilizacija encimov za biokatalizo in imobilizacija velikih kelacijskih skupin (31). Za izdelavo dostavnih sistemov za ZU največkrat pripenjamo disociirajoče skupine, spojine, občutljive na spremembo temperature, in elektrostatsko ali magnetno aktivne spojine ter tako dosežemo podaljšano sproščanje ali ciljano dostavo učinkovine (19, 21). Površino  $\text{PSiO}_2$  lahko modificiramo že med izdelavo kserogela z metodo, imenovano kokondenzacija (angl. co-condensation). Alkoksidnemu prekursorju dodamo določeno količino substituiranega alkoksida ( $(\text{RO})_3\text{SiR}'$ ) in na ta način zmanjšamo stopnjo premreženja, število silanolnih skupin na površini, spremeni pa se tudi reaktivnost površine. V primeru uporabe alkil substituiranih alkoxidov se poveča hidrofobnost površine, njena velikost in premer por pa naraščata z daljšanjem alkilne verige (25). Druga metoda funkcionalizacije površine nosilca je sililacija (angl. silylation). Tudi ta zajema uporabo substituiranih alkoxidov, a s to razliko, da poteka na že pripravljenem silikagelu in nam omogoča doseganje večje gostote funkcionalnih skupin na površini silikagela v primerjavi z metodo kokondenzacije (32). Med sodobnejše metode modifikacije površine silikagela sodi radikalska polimerizacija (Slika 2), pri kateri sprva z impregnacijo silikagela v organskem topilu v pore naložimo vinilne monomere, premreževalne spojine in radikalske iniciatorje, temu sledi odstranitev topila in polimerizacija pri povišani temperaturi ter tako nastanek enakomerne polimerne obloge na površini poroznega nosilca (33).



**Slika 2:** Metoda radikalne polimerizacije: a) Selektivna adsorpcija vinilnih monomerov na površino mezopor in b) naknadna termalna polimerizacija (33).

### 1.2.3 Izdelava TD iz poroznih nosilcev

#### 1.2.3.1 Metode izdelave TD iz poroznih nosilcev

ZU lahko vgradimo v TD že med sintezo gela. Učinkovino dodamo k silicijevemu alkoksidu pred hidrolizo ali v hidrolizirano sol obliko, njeno vgrajevanje pa poteče med postopkom kondenzacije. Dosežemo lahko visoko vsebnost učinkovine. Slabost te metode je možnost razpada učinkovine med sintezo silikagela (25). Med najpogostejše metode izdelave TD iz že izdelanih poroznih nosilcev pa štejemo: metodo imerzije v organskem topilu, metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, metodo impregnacije in metodo taljenja. Izbira metode vpliva na končno vsebnost ZU ter na porazdelitev molekul v porah in nosilcu (26). Najpogosteje uporabljena je metoda imerzije, ki poteka v več korakih. V prvem koraku porozni nosilec potopimo v koncentrirano raztopino učinkovine, ki s pomočjo kapilarnih sil začne prodirati v pore nosilca. Sledi difuzija molekul ZU v pore nosilca in njihova adsorpcija na stene por. Zadnji korak je izolacija napolnjenih delcev nosilca s filtracijo suspenzije. Slabosti te metode so nizka končna vsebnost, dolgotrajnost postopka in izguba prebitne učinkovine (25, 34, 35). Metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku se od metode imerzije razlikuje po tem, da napolnjene delce odstranimo z odparitvijo topila pri znižanem tlaku ter tako ustvarimo koncentracijski gradient, ki je poleg kapilarnega vleka dodatna gonilna sila za nalaganje ZU v pore nosilca. Posledica tega je višja učinkovitost nalaganja ZU v pore nosilca (25, 34). Pri metodi impregnacije uporabimo zelo koncentrirano raztopino ZU v organskem topilu. Volumen raztopine ZU je enak volumnu por nosilca, kar je ena glavnih razlik v primerjavi z metodo imerzije. Metoda impregnacije je metoda izbora v primerih, ko imamo na voljo majhne količine ZU. Prednost te metode je

tudi dejstvo, da lahko vnaprej določimo količino ZU, za katero želimo, da se naloži v pore nosilca. Če želimo visoko vsebnost ZU v nosilcu, lahko metodo večkrat ponovimo. Slabosti metode sta pogosta neenakomerna porazdelitev učinkovine v porah in možnost rekristalizacije prebitne učinkovine na površini poroznega nosilca po odparitvi topila (36). Metoda taljenja je precej podobna metodi impregnacije. Učinkovino in nosilec segrejemo na temperaturo, ki je višja od tališča ( $T_m$ ) ZU. Učinkovina nato prodre v pore nosilca. Slabosti metode sta visoka delovna temperatura, ki lahko privede do razpada ZU, in visoka viskoznost staljene ZU, ki lahko zmanjša količino naložene ZU v pore, povzroči nehomogeno razporeditev učinkovine po površini por in rekristalizacijo molekul ZU na površini delca (26, 37).

### ***1.2.3.2 Vplivi na nalaganje učinkovine v pore poroznega nosilca***

**Velikost por** ima zelo pomemben vpliv na končno vsebnost ZU v TD. Mezopore delujejo kot sita in na ta način preprečujejo prevelikim molekulam, da bi se absorbirale v nosilec. (36, 38). Razmerje med premerom por in premerom molekule mora biti večje kot 1, zato da lahko molekule prehajajo v pore. Če pa želimo zapolniti vso površino por in doseči visoko vsebnost ZU v TD, mora biti razmerje premerov vsaj 3 (8, 26).

**Vpliv velikosti površine nosilca in volumna por** je odvisen od razporejanja molekul. Molekule ZU, ki se fizikalno adsorbirajo na površino mezoporoznih nosilcev, lahko tvorijo monosloj ali pa se razporedijo v več slojev. V primeru monosloja, se kapaciteta za adsorpcijo ZU povečuje z večanjem površine nosilca. Volumen por v tem primeru ne vpliva na kapaciteto nosilca. Tvorjenje monosloja lahko opišemo z Langmuirjevo izotermo. Če pa se med molekulami učinkovine pojavljajo interakcije oz. če pri izdelavi TD uporabimo visoko koncentracijo ZU, se ta porazdeli v več slojev. V tem primeru na kapaciteto nosilca vplivata tako površina nosilca kot tudi volumen por (8, 26).

**Lastnosti površine nosilca** imajo velik vpliv na adsorpcijo učinkovine v pore nosilca. Kemijske in fizikalne medpovršinske interakcije med molekulami ZU in površino nosilca so ena izmed glavnih gonilnih sil za nalaganje učinkovine v pore nosilca. Mednje spadajo ionska vez, vodikova vez, elektrostatske in hidrofobne interakcije. Nemodificirani mezoporozni nosilci imajo na površini veliko OH skupin, zato v tem primeru vodikove vezi predstavljajo glavni način interakcij med ZU in nosilcem (26). S funkcionalizacijo površine običajno povišamo afiniteto nosilca do ZU, lahko pa pride tudi do nasprotnega

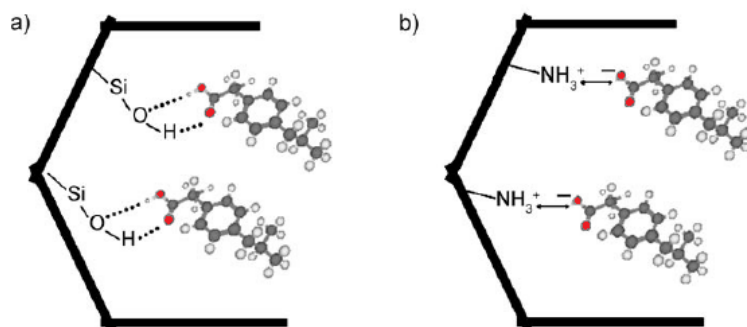
učinka. Alkil substituirani alkoksidi povečajo hidrofoben značaj površine, kar lahko povzroči zmanjšanje količine adsorbirane hidrofilne ZU (38, 39).

**Lastnosti topila** igrajo pomembno vlogo pri nalaganju ZU v pore nosilca. Nemodificirani  $\text{PSiO}_2$  imajo polarno površino. Zelo polarna topila, kot je na primer dimetilsulfoksid (DMSO), tekmujejo z molekulami učinkovine za adsorpcijo na nosilec in tako zmanjšujejo delež učinkovine, ki se je adsorbirala na površino nosilca (26). Pomemben vpliv lastnosti topila so dokazali tudi Hata in sodelavci, ki so preučevali adsorpcijo taksola v pore urejenega mezoporoznega silikagela iz različnih topil (38). Ugotovili so, da se je taksol dobro adsorbiral iz topil, ki slabo tvorijo vodikove vezi in imajo posledično nizko afiniteto do učinkovine, medtem ko je bila adsorpcija iz topil z visokimi sposobnostmi tvorbe vodikovih vezi zanemarljivo majhna. Kot topilo lahko uporabimo tudi vodo. V tem primeru je adsorpcija nadzorovana z elektrostatskimi interakcijami in je močno odvisna od pH raztopine. Površina nemodificiranega  $\text{PSiO}_2$  je pri  $\text{pH} \geq 2$  negativno nabita. Posledica tega je zelo slaba adsorpcija organskih kislin pri pogojih, ko sta tako nosilec kot ZU negativno nabita (40, 41).

#### 1.2.4 Sproščanje učinkovin iz poroznega $\text{SiO}_2$

Na profil sproščanja učinkovin iz poroznega  $\text{SiO}_2$  vplivajo velikost in arhitektura por, specifične interakcije med ZU in steno por ter struktura vgrajene zdravilne učinkovine (19, 25). Sproščanje je običajno regulirano difuzijsko, zato ga lahko opišemo s Fickovima zakonoma. Če pa so v sistemu prisotne močnejše interakcije med ZU in steno por, lahko nad difuzijsko kontrolo prevlada kinetika tvorbe ali razpada kompleksov med funkcionalnimi skupinami ZU in funkcionalnimi skupinami na stenah por (39). Večanje velikosti por do neke mere pospešuje hitrost difuzije učinkovine iz nosilca, če pa so te prevelike, lahko ZU začne kristalizirati. Najpomembnejši faktor izboljšanja hitrosti raztapljanja učinkovine iz poroznih nosilcev, je zmanjševanje mrežne energije kristalne oblike ZU s tvorbo amorfne oblike ZU. Molekule ZU so v poroznih nosilcih ujete v porah, ki so le nekajkrat širše od njihovega premera. Kristalizacija ZU v porah ne more poteči, dokler je velikost pore manjša od kritične velikosti jedra kristala. V nosilcih, ki nimajo medsebojno povezanih por, mora nukleacija poteči znotraj vsake pore posebej. Za kristalizacijo velike količine ZU je tako potrebna visoka stopnja nukleacije. Če ta poteka počasi, je lahko ZU v takih nosilcih stabilna, kljub temu da so pore večje od kritične

velikosti jedra kristala. Kristalizacija ZU lahko poteče tudi na zunanji površini delca ter tako destabilizira amorfno obliko učinkovine v delcu. Tudi če učinkovina znotraj por kristalizira, se to nikoli ne zgodi v celoti. Med kristalom in steno pore se namreč vedno nahaja  $\delta$ -plast učinkovine, ki nikoli ne kristalizira. Ker je ta plast lahko debela nekaj nm, lahko manjše pore vsebujejo visok delež amorfne oblike ZU (26). Zaradi velike specifične površine poroznih nosilcev se velik del ZU nahaja v stiku s površino nosilca. Interakcije, ki se pojavljajo med nosilcem in ZU, še dodatno stabilizirajo amorfno obliko, lahko pa vplivajo tudi na kinetiko sproščanja ZU. Če želimo hitro sproščanje ZU iz nosilca, potem med molekulami učinkovine ne sme biti močnih interakcij. Na površini mezoporozne silike je velika gostota silanolnih skupin, ki že same po sebi reagirajo z učinkovino, lahko pa na njih vežemo druge funkcionalne skupine, ki tvorijo vezi z ZU. Posledica interakcij med nosilcem in ZU je lahko pospešeno ali nadzorovano sproščanje (8). Več avtorjev je poskušalo doseči podaljšano sproščanje ibuprofena z vezavo amino skupine na silikagel. Med karboksilno skupino ZU in nosilcem so se tako namesto vodikovih, tvorile ionske vezi (Slika 3). Ugotovili so, da je za izrazitejšo upočasnitev sproščanja potrebno doseči visoko gostoto amino skupin na površini, saj v nasprotnem primeru prevlada učinek silanolnih skupin. To je bilo mogoče doseči z metodo sililacije, medtem ko z metodo kokondenzacije niso dobili želenih rezultatov (31, 42).



**Slika 3:** a) Nemodificiran nosilec: ibuprofen se veže s šibkimi vodikovimi vezmi med silanolnimi skupinami nosilca in karboksilno skupino ZU. b) Nosilec z vezanimi amino skupinami: ibuprofen je na stene nosilca vezan z ionsko vezjo med amonijevo skupino in karboksilatom (8).

Upočasnjeno sproščanje lahko dosežemo tudi z vezavo hidrofobnih skupin na površino nosilca. V tem primeru ne pride nujno do povečanja interakcij med ZU in površino, glavni

razlog za upočasnjeno transport ZU iz nosilca je oteženo prehajanje vodnega medija v pore (8, 40). Hidrofobne verige na površini silikagela pa lahko po drugi strani povzročijo tudi pospešeno sproščanje, kadar njihova vezava prepreči tvorbo močnih interakcij med ZU in nosilcem. Otsuka in sodelavci so na ta način dosegli pospešeno sproščanje hidrofobne učinkovine filokinona. Na površino silikagela so pripeli različne lipofilne skupine v različnih koncentracijah. Ugotovili so, da je vezava funkcionalne skupine na nosilec sterično preprečila tvorbo vodikovih vezi med ZU in silanolnimi skupinami silikagela. Z višanjem koncentracije reagenta za modifikacijo površine in z daljšanjem njegove verige sta se povečevali hitrost in količina raztopljene zdravilne učinkovine. Ugotovili so tudi, da se je učinkovina sprostila v dveh fazah, obe pa sta ustrezali kinetiki prvega reda. Prva faza je bila hitra, v njej se je sprostila ZU, ki je bila na površino nosilca vezana z VDW vezmi. Druga faza je bila počasnejša, ker se je v tem delu sprostila ZU, ki je bila na površino silikagela vezana z vodikovimi vezmi (11).

#### 1.2.4.1 Kinetike sproščanja ZU iz poroznega $\text{SiO}_2$

Pogost cilj vgrajevanja ZU v porozne nosilce je povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja ZU. Raztapljanje z ZU napolnjenega poroznega nosilca po navadi poteka v naslednjih štirih korakih: 1) vodni medij se s pomočjo kapilarnih sil absorbira v pore nosilca; 2) molekule ZU se raztopijo v vodnem mediju; 3) zaradi koncentracijskega gradienta poteče difuzija molekul ZU iz por nosilca; 4) difuzija molekul v medij za sproščanje (26). Kinetiko raztapljanja ZU iz poroznih materialov najboljše obrazložimo z uporabo kinetike Prvega reda, Higuchijevega ali Korsmejer-Pepassevega modela:

1. Enačba Prvega reda:  $f = 1 - e^{-k_1 t}$  (Enačba 2),

$f$  je delež sproščene učinkovine ob času  $t$  in  $k_1$  je konstanta prvega reda (43, 44).

2. Higuchijeva enačba:  $Q = k_h \sqrt{t}$  (Enačba 3),

$Q$  je kumulativna količina sproščene ZU v času  $t$  in  $k_h$  je Higuchijeva konstanta (26, 43).

3. Korsmejer-Pepas-ova enačba:  $F = \frac{M_t}{M} = kt^n$  (Enačba 4),

$F$  je delež sproščene učinkovine ob času  $t$ ,  $M_t$  predstavlja kumulativno maso sproščene ZU ob času  $t$ ,  $M$  pa začetno količino ZU v nosilcu. Konstanta  $k$  in indeks  $n$  določata mehanizem sproščanja (26, 43).

Higuchijeva enačba se uporablja za opis kinetike raztapljanja iz netopnih nosilcev, ko je raztapljanje nadzorovano z difuzijo. V to kategorijo spada tudi večina mezoporoznih nosilcev, vendar sproščanje iz teh nosilcev po večini poteka v dveh ali več korakih (26, 45). Pri sproščanju itakonazola iz mezoporoznega nosilca se je prvih 80% učinkovine sprostito hitreje in je ustrezalo Higuchijevi enačbi. Preostali del učinkovine se je zaradi močnih interakcij s površino nosilca sprostil veliko počasneje (22). Korsmeyer-Peppas-ov model bolj celovito opiše kinetiko raztapljanja iz mezoporoznih nosilcev, predvsem po zaslugi parametra  $n$ . Kadar je  $n$  manjši od 0,5, kinetika raztapljanja temelji na Fickovi difuziji, če pa je vrednost parametra  $n$  med 0,5 in 1, lahko sklepamo, da je transport ZU iz nosilca sterično oviran. Za določitev parametra  $n$  lahko uporabimo le tiste vrednosti na profilu sproščanja, pri katerih se je sprostito manj kot 60 % začetne učinkovine (35, 43). Heikillä in sodelavci so uporabili Korsmeyer-Peppasov model za primerjavo profilov sproščanja ibuprofena iz mezoporoznih materialov TCPSi, MCM-41, SBA-15 in TUD-1. Ugotovili so, da je vrednost parametra  $n$  odvisna od radija in dostopnosti por nosilca. Mezoporozni material TUD-1 je imel večje in bolj dostopne pore od MCM-41 in SBA-15, posledično je bil parameter  $n$  pri tem materialu najbližje vrednosti 0,5. Mezoporozni nosilec TCPSi je imel kljub najširšim poram najvišjo vrednost parametra  $n$ . Vzrok za to je bila prisotnost kristalov učinkovine na površini nosilca, ki so upočasnili sproščanje ibuprofena. Ker je Korsmeyer-Peppasov model primeren le za prvih 60 % sproščanja učinkovine, so zaradi lažje določitve in primerjave hitrosti sproščanja uporabili tudi prvi red sproščanja (35, 44).

## **1.2.5 Fizikalno-kemijska karakterizacija mezoporoznih nosilcev**

### ***1.2.5.1 Karakterizacija praznih mezoporoznih nosilcev***

Dve najpomembnejši karakteristiki mezoporoznih nosilcev sta kemijska sestava njihove površine ter struktura por. Za analizo kemijske sestave se najpogosteje uporabljajo spektroskopske metode, kot so jedrska magnetna spektroskopija (NMR), ramanska spektroskopija in infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR) (20, 46, 47). Strukturo por najpogosteje analiziramo z elektronsko mikroskopijo (SEM - Scanning Electron Microscopy) ali z merjenjem sorpcije dušika. SEM se uporablja predvsem za opazovanje oblike por, sorpcija dušika pa za merjenje premera in volumna por (45, 46). Pore urejenih mezoporoznih nosilcev lahko analiziramo z metodo rentgenske praškovne difrakcije (XRPD). Rezultati nam podajo podatke o pravilnosti strukture in povprečni



razdalji med središči por. Iz tega podatka lahko ob predpostavki, da poznamo velikost por, izračunamo debelino sten v porah. Pomembna lastnost nosilca je tudi vrednost Zeta potenciala pri določeni pH vrednosti, saj nam pomaga predvideti, pri katerih pogojih bosta najboljše potekli adsorpcija in desorpcija učinkovine iz oz. na nosilec. Določimo ga s pomočjo elektrokemičnih titracij (40).

#### **1.2.5.2 Karakterizacija napolnjenih mezoporoznih nosilcev**

Pri analizi napolnjenih mezoporoznih nosilcev se osredotočamo predvsem na interakcije med ZU in nosilcem, vsebnost ZU in fizikalne lastnosti ZU v TD. Interakcije v TD lahko analiziramo s FTIR ali z določitvijo adsorpcijskih izoterm opazovane ZU (16, 40). Vsebnost ZU lahko določimo z uporabo različnih metod, med katerimi sta najpogosteje uporabljeni metodi termogravimetrija (TG) in ekstrakcija. Pri TG opazujemo maso vzorca kot funkcijo temperature. Maso ZU lahko določimo, ker ta razpade pri veliko nižjih temperaturah kot nosilec. Pri metodi ekstrakcije nosilec, ki vsebuje ZU, raztapljamo v topilu. Paziti moramo, da se iz nosilca sprosti vsa učinkovina. Iz koncentracije ZU v topilu nato določimo vsebnost ZU v nosilcu. Najpogostejše uporabljena metoda za določanje koncentracije ZU v topilu je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Njeni prednosti sta natančnost in možnost določitve prisotnosti razgradnih produktov ZU. Poleg HPLC se lahko pri molekulah, ki močno absorbirajo ultravijolično ali vidno svetlobo, uporablja tudi UV/vis spektroskopija (28). Če se kristali učinkovine nahajajo na površini delcev, lahko ti preprečijo sproščanje učinkovine iz por in tako zmanjšajo hitrost raztapljanja ZU. Lokacijo kristalov učinkovine lahko na podlagi velikosti kristala določimo z XRPD in diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Pri XRPD se s povečanjem kristala, poveča širina vrha. Pri DSC metodi se kristali znotraj delcev ločijo od tistih na površini po tem, da se ne pojavijo na normalni talilni endotermi, ampak povzročijo širšo talilno endotermo pri nekoliko nižji temperaturi. ZU, ki se nahaja v porah, ima namreč nižjo temperaturo tališča zaradi višjega tlaka učinkovine v vdolbinah z ukrivljeno površino (48). Če je vsa učinkovina v amorfni obliki, na termogramu ni vidne talilne endoterme (36).

#### **1.2.6 Toksičnost poroznega SiO<sub>2</sub>**

Na toksičnost poroznega SiO<sub>2</sub> vplivajo velikost delcev, koncentracija, oblika, kristalnost in vrsta ter količina funkcionalnih skupin na površini delca (26). Medtem ko je kristalni silicijev dioksid toksičen, povzroča namreč silikoze, ki so posledica vdihavanja delcev

SiO<sub>2</sub>, se amorfna oblika uporablja tudi v farmacevtske namene. Ob stiku z vodo se SiO<sub>2</sub> počasi razgradi v silicijevo kislino (Si(OH)<sub>4</sub>). Ta vstopa v limfni ali krvni obtok ter se izloči z urinom, skozi jetra ali pa jo fagocitirajo makrofagi. Pri nizkih koncentracijah je izločanje skozi ledvice dovolj učinkovito, da prepreči toksične koncentracije, prav tako ne pride do akumulacije razpadnih produktov v perifernih organih (19, 25). Funkcionalizacija mezoporozne silike s PEG polimeri poveča njeno biokompatibilnost. Ta proces namreč prepreči nanodelcem, da bi se absorbirali v jetra, vranico in pljuča, podaljša razpolovno dobo in upočasni biološko razgradnjo (26).

## 2 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela:

1. Izdelali bomo trdne disperzije štirih modelnih učinkovin s poroznim nosilcem z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Kot modelne učinkovine bomo uporabili celekoksib, glibenklamid, indometacin in irbesartan. Porozni nosilec bo predstavljal Syloid<sup>®</sup> 244 FP. Za vsako učinkovino bomo izdelali dve TD z različno sestavo in sicer v razmerju ZU : Syloid = 1 : 2 in ZU : Syloid = 1 : 3. Vsebnost zdravilnih učinkovin v izdelanih TD bomo določili z metodo ekstrakcije.
2. Strukturo izdelanih trdnih disperzij bomo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR). Z DSC analizo bomo določili prisotnost in delež amorfne oblike ZU v TD. S FTIR pa bomo preučili morebitne interakcije med ZU in nosilcem znotraj TD.
3. Morfologijo delcev ZU in Syloida bomo preučili z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Z meritvami stičnega kota in hitrosti pronicanja bomo poskušali ugotoviti, ali je vgradnja ZU v TD izboljšala njihovo močenje.
4. S preskusom raztapljanja po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. bomo preverili, ali smo z vgradnjo ZU v TD izboljšali njihovo raztapljanje. Rezultate bomo primerjali z raztapljanjem čiste učinkovine in fizikalne zmesi. S primerjavo profilov sproščanja ZU bomo raziskali vpliv kemijske strukture ZU na sproščanje iz poroznega nosilca. Na podlagi teh ugotovitev bomo ocenili primernost uporabe Syloida<sup>®</sup> 244 FP za izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali spodaj naštetе materiale.

##### Modelne učinkovine:

##### - **Celekoksib**

Modelna učinkovina celekoksib (4-{5-(4-metilfenil)-3-(triflourometil)-1H-pirazol-1-il}benzensulfonamid, CLX; Sigma Aldrich, Nemčija) (Slika 4) spada v skupino selektivnih inhibitorjev encima ciklooksigenaze 2 (COX-2), imenovanih koksibi, ki so podskupina nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID). Encim COX-2 je induciran pri vnetnih procesih in je odgovoren za proizvodnjo prostaglandinov, ki povečajo občutljivost nociceptorjev, povišajo telesno temperaturo in s povzročanjem vazodilatacije in povišane žilne permeabilnosti še dodatno promovirajo vnetje. Uporablja se za zdravljenje osteoartroze, revmatoidnega artritisa in ankilozirajočega spondilitisa. Priporočeni odmerek je 200 mg enkrat dnevno ali v dveh deljenih odmerkih (49, 50). Učinkovina je visoko lipofilna, približno 97 % se je veže na plazemske beljakovine, BU pa znaša 40%. Najvišjo koncentracijo v plazmi doseže 2 do 4 ure po zaužitju, njen razpolovni čas pa znaša približno 11 ur. Nekaj učinkovine se izloči nespremenjene, večina pa se izloči kot primarni alkohol, ustrezna karboksilna kislina in njen glukuronidni konjugat (51). Celekoksib je bel ali rahlo rumen kristaliničen prašek. Je praktično netopen v vodi in delno topen v etanolu in metanolu. Po BCS klasifikaciji ga uvrščamo v razred II (10).

##### - **Glibenklamid**

Modelna učinkovina glibenklamid (5-kloro-N-{2-(4-(cikloheksilkarbamoil-sulfamoil)fenil)-2-metoksibenzamid, GLB; Sigma Aldrich, Nemčija) (Slika 4) spada v drugo generacijo sulfonilurei. Uporablja se za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Glibenklamid zniža krvni sladkor s stimuliranjem izločanja inzulina iz beta celic v trebušni slinavki. Sulfoniluree delujejo tako, da blokirajo ATP-občutljive kalijeve kanale, sledi depolarizacija membrane beta celic in influks  $\text{Ca}^{2+}$  ionov skozi napetostno občutljive kalcijeve kanale, kar povzroči sekrecijo inzulina (50, 51). Odmerek za bolnike z dobro glikemično urejenostjo je po navadi 5–10 mg enkrat na dan, dnevni odmerek pa naj ne bi presegel 15 mg učinkovine (52). Učinkovina se dobro absorbira iz

gastrointestinalnega trakta, njena biološka uporabnost (BU) znaša okrog 90 %, skoraj v celoti (99,8 %) se veže na plazemske proteine. Najvišjo koncentracijo v plazmi doseže 2 do 4 ure po zaužitju, njen razpolovni čas pa znaša približno 4 ure (51). Glibenklamid se v jetrih popolnoma presnovi. Glavni presnovek je 4-transhidroksiglibenklamid, dodatni pa 3-cis-hidroksiglibenklamid. Presnovki lahko pripomorejo k hipoglikemičnemu učinku glibenklamida (52). Glibenklamid je bel do skoraj bel kristaliničen prašek. Je praktično netopen v vodi, slabo topen v metilen kloridu in delno topen v etanolu in metanolu (53). Po BCS klasifikaciji ga uvrščamo v razred II (54).

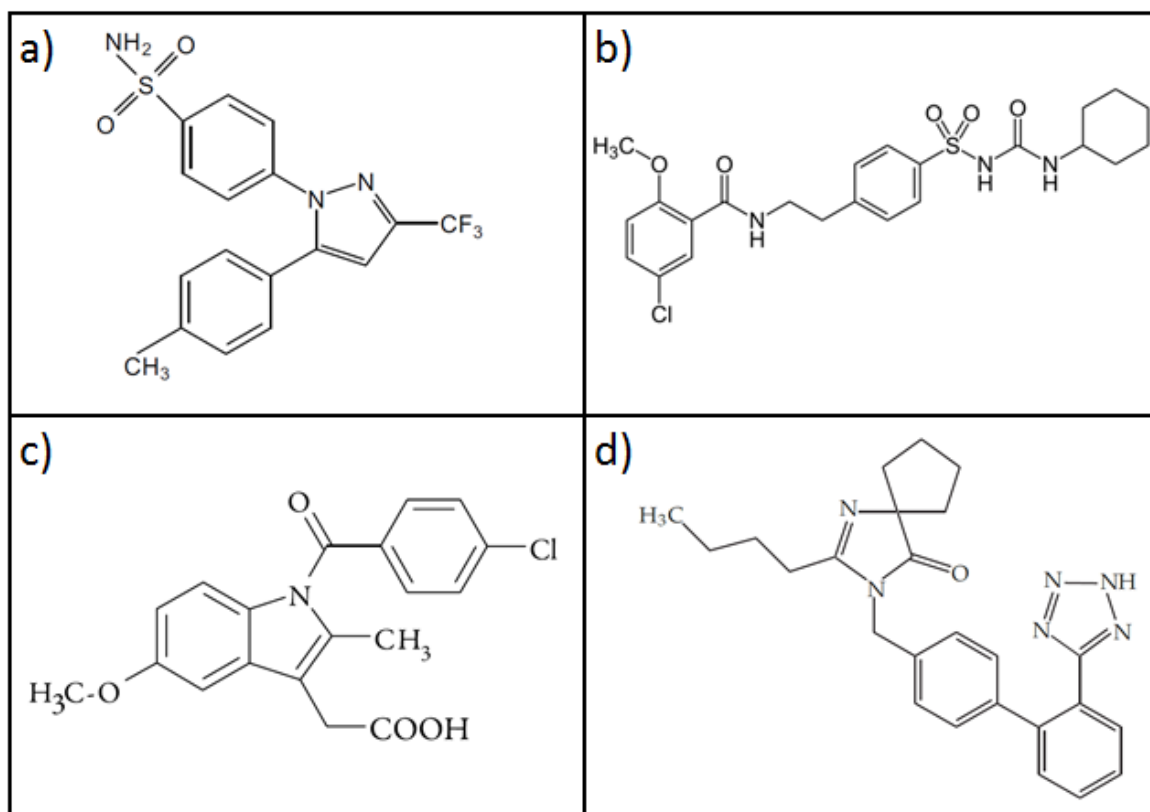
#### - **Indometacin**

Modelna učinkovina indometacin (2-{1-[(4-klorofenil)karbonil]-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il}ocetna kislina, IMC; Sigma Aldrich, Nemčija) (Slika 4) je nesteroidna protivnetna učinkovina (NSAID) iz skupine derivatov indolocetne kisline, ki deluje protivnetno, analgetično in antipiretično. Delovanje indometacina temelji na inhibiciji sinteze prostaglandinov preko blokade encima ciklooksigenaza. Indometacin prav tako inhibira migracijo polimorfonuklearnih levkocitov, ki sodelujejo pri vnetnem procesu. Uporablja se za zdravljenje revmatičnih bolezni, kot sta revmatoidni artritis in spondiloartritis, ter za zdravljenje osteoartroze, artropatij, zunajsklepnega revmatizma in nekaterih bolečinskih stanj. Začetni odmerek v prvem tednu zdravljenja je 50–75 mg (2–3 kapsule) dnevno, ki ga lahko po potrebi vsak teden povišamo za 25–50 mg dnevno dokler ne dosežemo želenega učinka. Najvišji dnevni odmerek znaša 200 mg. Zelo visok odstotek (35–50 %) pacientov, ki prejemajo indometacin, izkusi enega ali več neželenih učinkov, med katerimi so najpogostejše bolezni prebavil (51, 55). Učinkovina se zelo dobro absorbira iz gastrointestinalnega trakta, njena BU znaša skoraj 100 %, 90 % pa se je veže na plazemske proteine. Najvišjo koncentracijo v plazmi doseže 1,3 ure po zaužitju, njen razpolovni čas pa znaša približno 2,4 ure (51). Indometacin je bel ali rumen kristaliničen prašek. Je praktično netopen v vodi in delno topen v etanolu (53). Po BCS klasifikaciji ga uvrščamo v razred II (2).

#### - **Irbesartan**

Modelna učinkovina irbesartan (2-butyl-3-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on, IBS; Sigma Aldrich, Nemčija) (Slika 4) je selektiven nepeptidni antagonist na AT<sub>1</sub> receptorju angiotenzina II. Z blokado učinkov angiotenzina II v telesu pride do sprostitve gladkih mišic in posledično vazodilatacije, povečanega izločanja vode in soli skozi ledvice,

zmanjšane volumna plazme in manjše celične hipertrofije. Uporablja se za zdravljenje esencialne hipertenzije, indiciran pa je tudi za zdravljenje bolezni ledvic pri bolnikih s hipertenzijo in sladkorno boleznijo tipa 2. Najpogostejši stranski učinki so hipotenzija, hiperkaliemija in zmanjšana funkcija ledvic. Običajen priporočen začetni in vzdrževalni odmerek za zdravljenje hipertenzije znaša 150 mg enkrat dnevno. Vzdrževalni odmerek za zdravljenje bolezni ledvic pa znaša 300 mg dnevno. Irbesartan se dobro absorbira, BU znaša med 60 in 80 %. Večina učinkovine (90 %) se po absorpciji iz GIT veže na plazemske proteine. Najvišjo koncentracijo v plazmi doseže 1,5 do 2 ure po administraciji, njen razpolovni čas pa se giblje med 11 in 15 ur (51). Irbesartan se delno metabolizira do glukoronidnega konjugata, ki se nato skupaj z nespremenjeno učinkovino izloči skozi ledvice (20 %) in z žolčem (80 %). Irbesartan je bel do skoraj bel kristaliničen prašek. Je praktično netopen v vodi, slabo topen v metanolu in delno topen v metilen kloridu (53). Po BCS klasifikaciji ga uvrščamo v razred II (16).



**Slika 4:** Strukturne formule učinkovin: a) celekoksib (56), b) glibenklamid (57), c) indometacin (58), d) irbesartan (6).

Porozen nosilec za pripravo trdnih disperzij

Porozni silicijev dioksid Syloid<sup>®</sup> 244 FP (Grace GmbH, Nemčija) je mikroniziran sintezni amorfni silikagel z visoko poroznostjo, veliko specifično površino in neurejeno strukturo por. Izdelan je iz kemijsko inertnega amorfnega silikagela visoke čistote (99,4 % SiO<sub>2</sub>). Povprečna velikost delcev znaša 5,5 μm, povprečen volumen por 1,5 cm<sup>3</sup>/g, povprečen premer por 19 nm, gostota 96,1 kg/m<sup>3</sup> in specifična površina 314 m<sup>2</sup>/g. Ima odlično kompatibilnost z zdravilnimi učinkovinami in visoko adsorpcijska sposobnost za ZU in tekočine, zato se lahko uporablja kot sušilno sredstvo za povečanje stabilnosti ZU, ki so občutljive na vlago; omogoča pa tudi pospešeno sproščanje ZU. (46, 59, 60). Na površini Syloida se nahajata dva tipa funkcionalnih skupin. V prvega sodijo izolirani silanoli (≡Si-OH) in silandioli, ki so odgovorni za hidrofilni značaj površine Syloida, v drugega pa sodijo siloksanske vezi (≡Si-O-Si≡), ki so odgovorne za hidrofobni značaj površine silikagela (46).

Topilo za pripravo trdnih disperzij

- Etanol; CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (Merck KGaA, Nemčija).

Kemikalije in reagenti za pripravo fosfatnega medija za preskus raztapljanja

- Prečiščena voda.
- Natrijev hidroksid; NaOH (Merck KGaA, Nemčija).
- Kalijev dihidrogen fosfat; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Nemčija)
- Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Nemčija)
- Površinsko aktivna snov natrijev dodecil sulfat (SDS); NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija)

Filter

- Minisart<sup>®</sup> RC 25, hidrofilen filter, pore velikosti 0,45 μm (Sartorius, Nemčija).

Topila in reagenti za pripravo mobilnih faz za HPLC

- Prečiščena voda
- Acetonitril; CH<sub>3</sub>CN (Merck KGaA, Nemčija)
- Ortofosforna kislina 85 %; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Nemčija)
- Metanol; MeOH (Merck KGaA, Nemčija)
- Koncentrirana klorovodikova kislina 37 %; HCl (Merck KGaA, Nemčija)

Reagent za FT-IR:

- Kalijev bromid: KBr (Fluka Chemie, Sigma-Aldrich)

**Priprava medijev za preskus raztapljanja**Medij 1: Fosfatni pufer pH = 6.8

6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo zatehtali v 1000 ml bučo in dopolnili s prečiščeno vodo do 900 ml. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo uravnali pH raztopine z dodatkom vodne raztopine NaOH. Nato smo bučo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Vodno raztopino NaOH smo pripravili z raztapljanjem 0,9 g NaOH v 100 ml prečiščene vode.

Medij 2: Fosfatni pufer pH = 6.8 + 1 % SDS

6,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 10 g SDS smo zatehtali v 1000 ml bučo in dopolnili s prečiščeno vodo do 900 ml. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo uravnali pH raztopine z dodatkom vodne raztopine NaOH. Nato smo bučo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Vodno raztopino NaOH smo pripravili z raztapljanjem 0,9 g NaOH v 100 ml prečiščene vode.

**3.2 Aparature**

Seznam aparaturn, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu:

- Analizna tehtnica Mettler Toledo AG 245, Švica.
- Analizna tehtnica Mettler Toledo XS 205 Dual range, Švica.
- Analizna tehtnica AND GH-300, ZDA.
- Rotacijski vakuumski uparjevalnik: Buchi Rotavapor R-114, Švica.
- Ultrazvočna kadička: Sonis 2, Iskra, Slovenija.
- Ultrazvočna kadička: Sonis 4, Iskra, Slovenija.
- Magnetno mešalo MM-531, Tehnica, Slovenija.
- Magnetno mešalo IKA<sup>®</sup> RCT basic safety control, IKA, Nemčija.
- Merilnik pH vrednosti: pH METER, Mettler Toledo MA 235, Švica.



- Naprava z vesli za spremljanje raztapljanja: ERWEKA DT 6, Švica.
- Diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential scanning calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo Star® software v9.39, Švica.
- FT-IR spektrofotometru Spectrum BX Perkin Elmer, Yokohama, Japonska.
- Vrstični elektronski mikroskop SEM Supra 35 VP (Carl Zeiss, Nemčija).
- Hidravlična stiskalnica Specac, UK.
- HPLC sistem naslednje konfiguracije:
  - Razplinjevalec: WellChrom K-5004, Knauer, Nemčija;
  - Črpalka: Knauer K-501, Knauer, Nemčija;
  - Injektor: Knauer 079 s šestimi odprtini; Knauer, Nemčija;
  - Detektor: LKB Bromma 2151 z možnostjo spremembe valovne dolžine, LBK Bromma, Švedska;
  - Integrator: računalniški program Barspec Data System (BDS) 1.12, Barspec System Inc., ZDA.

### 3.3 Metode dela

#### 3.3.1 Izdelava trdnih disperzij

Trdne disperzije smo pripravili z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Za vsako učinkovino smo izdelali dve TD z različno sestavo in sicer v masnem razmerju ZU : Syloid = 1 : 2 in ZU : Syloid = 1 : 3 (Preglednica I). Topilo za pripravo raztopin je bil etanol. V erlenmajerico smo natehtali med 0,1 g in 1,65 g ZU in dodali toliko etanola, da se je vsa učinkovina raztopila. Raztopino smo nato mešali 10 minut na magnetnem mešalu ter jo prelili v bučko z okroglim dnom, v katero smo že pred tem zatehtali Syloid. Nastalo suspenzijo smo mešali 10 minut. Potem smo pričeli z odparevanjem topila s pomočjo rotacijskega vakuumskega uparjevalnika (Buchi Rotavapor R-114, Švica). Hitrost vrtenja bučke je bila 50 obratov/minuto, temperatura vodne kopeli pa je znašala 50 °C. Med odparevanjem topila smo tlak postopno zniževali do končne vrednosti med 10 in 13 mbar.

**Preglednica I:** Pogoji izdelave trdnih disperzij. Simbol  $m_{ZU}$  predstavlja maso učinkovine, uporabljene za izdelavo TD.  $V_{\text{etanola}}$  in  $c_{ZU}$  pa volumen uporabljenega etanola in koncentracijo učinkovine v etanolu pred začetkom rotavapiranja.

TD	$m_{ZU}$ [g]	$V_{\text{etanola}}$ [g]	$c_{ZU}$ [mg/ml]	Končni tlak [mbar]
CLX:Syloid=1:2	~0,50	15	33,33	12
CLX:Syloid=1:3	~0,25	10	25,00	13
GLB:Syloid=1:2	~0,10	30	3,33	12
GLB:Syloid=1:3	~0,10	30	3,33	13
IMC:Syloid=1:2	~0,50	60	8,33	10
IMC:Syloid=1:3	~0,50	80	6,25	10
IBS:Syloid=1:2	~1,65	200	8,25	10
IBS:Syloid=1:3	~1,65	200	8,25	10

#### 3.3.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Termično analizo izbranih trdnih disperzij smo izvedli z uporabo diferenčnega dinamičnega kalorimetra Metler Toledo DSC1 (ZDA), ki je opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30. Od 3 do 5 mg vzorca smo zatehtali v aluminijaste posodice za enkratno uporabo. Vzorce smo segrevali v dušikovi atmosferi s pretokom dušika 40 ml/min. Hitrost segrevanja in temperaturno območje za posamezno ZU ter pripadajoče TD sta navedena v Preglednica II. Kalorimeter je bil kalibriran z indijem.

**Preglednica II:** Pogoji izvedbe DSC.

Učinkovina	Hitrost segrevanja [°C/min]	Temperaturno območje
<b>Celekoksib</b>	10	-10 °C do 170 °C
<b>Glibenklamid</b>	10	-10 °C do 180 °C
<b>Indometacin</b>	10	-10 °C do 170 °C
<b>Irbesartan</b>	20	0 °C do 200 °C

**3.3.3 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR)**

Meritve smo izvedli s spektrofotometrom Spectrum BX, proizvajalca Perkin Elmer, Yokohama, Japonska. Vzorce smo pripravili tako, da smo 2 mg ZU zmešali s 198 mg KBr v kovinski terilnici. Zmes smo nato stisnili v Specac krožni hidravlični stiskalnici s premerom 13 mm. Čas stiskanja je znašal 10 sekund, sila pa 100 kN. Izdelanim ploščicam smo nato izmerili transmitanco. Vsak spekter je povprečje 64 meritev izmerjenih pri spektralni ločljivosti 4 cm<sup>-1</sup> v območju 4000–500 cm<sup>-1</sup>. Spektre smo analizirali s programsko opremo Spectrum v5.3.1.

**3.3.4 Merjenje stičnega kota vode in njene hitrosti pronicanja**

Stični kot in hitrost pronicanja vode smo izmerili z merilnikom stičnega kota Krüss DSA 100. Stični kot nas je zanimal pri vzorcih ZU, hitrost pronicanja pa pri trdnih disperzijah in Syloidu. Oba postopka smo izvedli pri sobni temperaturi. Zatehtali smo 150 mg vzorca in ga stisnili s Specac krožno hidravlično stiskalnico s premerom 13 mm. Čas stiskanja je znašal 10 sekund, sila stiskanja ZU je bila 30 kN tone, sila stiskanja TD pa 20 kN. Na izdelane ploščice smo nanесли kapljice vode z volumnom 0,3 µL in nato s pomočjo programske opreme določili stični kot oz. čas, ki ga je kapljica porabila, da je v celoti poniknila v vzorec.

**3.3.5 Morfologija delcev**

Morfologijo delcev učinkovin in Syloida<sup>®</sup> 244 FP smo preučevali z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Vzorce smo prilepili na dvostranski ogljikov lepilni trak in jih analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM Supra 35 VP (Carl Zeiss, Nemčija) pri napetosti 1 kV.

### 3.3.6 HPLC metode

Vsebnosti vseh štirih ZU v vzorcih smo določili s HPLC-jem. Vsaka izmed učinkovin je imela svojo HPLC metodo.

#### 3.3.6.1 HPLC metoda za določanje celekoksiba

Metodo smo povzeli po članku (61). Uporabili kolono ODS 250 x 4.6 (BIA d.o.o. Ljubljana) namesto kolone ODS 250 x 4.6 HPLC (Thermo, Velika Britanija), ker slednje nismo imeli na zalogi. Mobilna faza je bila sestavljena iz acetonitrila in vode (60:40 v/v), pretok je znašal 1 ml/min, volumen injiciranja pa 20 µL. Celekoksib smo določali pri 258 nm. Retencijski čas celekoksiba je bil ~7,6 min. Umeritvena premica je bila linearna v koncentracijskem območju 0,1–200 mg/L,  $R^2$  je znašal 0,9999. Odstotek RSD je znašal manj kot 2. Koncentracije vzorcev smo izračunali glede na dnevno pripravljen standard.

Standard smo pripravili tako, da smo na dve decimalni mesti natančno natehtali okrog 10 mg celekoksiba v 100 ml bučko in jo dopolnili z etanolom. Raztopino smo nato 15 minut mešali na magnetnem mešalu in jo zatem za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Sledilo je redčenje v razmerju 1 : 20 v 20 ml bučki, tako smo dobili raztopino celekoksiba s koncentracijo približno 5 mg/L, ki smo jo nato filtrirali skozi 0,45 µm Minisart® RC 25 filter.

#### 3.3.6.2 HPLC metoda za določanje glibenklamida

Uporabili smo kolono ODS 250 x 4,6 mm (BIA d.o.o. Ljubljana). Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 %  $H_3PO_4$  pH=5,4, acetonitrila in metanola v razmerju 35 : 41 : 24. Pretok je znašal 1 ml/min, volumen injiciranja pa 20 µL. Glibenklamid smo določali pri 210 nm. Retencijski čas glibenklamida je bil ~5,2 min. Umeritvena premica je bila linearna v koncentracijskem območju 0,5–10 mg/L,  $R^2$  je znašal 0,9999. Odstotek RSD je znašal manj kot 2. Koncentracije vzorcev smo izračunali glede na dnevno pripravljen standard.

Standard smo pripravili tako, da smo na dve decimalki natančno natehtali okrog 10 mg glibenklamida v 100 ml bučko in jo dopolnili z metanolom. Raztopino smo nato 15 minut mešali na magnetnem mešalu in jo zatem za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Sledilo je redčenje v razmerju 1 : 20 v 20 ml bučki, tako smo dobili raztopino glibenklamida s koncentracijo približno 5 mg/L, ki smo jo nato filtrirali skozi 0,45 µm Minisart® RC 25 filter.

### 3.3.6.3 HPLC metoda za določanje indometacina

Metodo smo povzeli po članku (34). Uporabili smo kolono A Luna 100 Å C18 RP, 150 x 4,6 mm; 3 µm (Phenomenex). Mobilna faza je bila sestavljena iz acetonitrila in 0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v razmerju 60 : 40. Pretok je znašal 1,5 ml/min, volumen injiciranja pa 20 µL. Indometacin smo določali pri 320 nm. Retencijski čas indometacina je bil ~3,44 min. Umeritvena premica je bila linearna v koncentracijskem območju 0,1–100 mg/L, R<sup>2</sup> je znašal 0,9999. Odstotek RSD je znašal manj kot 2. Topilo za standarde je bila mešanica prečiščene vode in etanola v razmerju 50 : 50. Koncentracije vzorcev smo izračunali glede na dnevno pripravljen standard.

Standard smo pripravili tako, da smo na dve decimalki natančno natehtali okrog 10 mg indometacina v 100 ml bučko in jo dopolnili z mešanico prečiščene vode in etanola v razmerju 50:50. Raztopino smo nato 15 minut mešali na magnetnem mešalu in jo zatem za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Sledilo je redčenje v razmerju 1 : 4 v 100 ml bučki, tako smo dobili raztopino indometacina s koncentracijo približno 25 mg/L, ki smo jo nato filtrirali skozi 0,45 µm Minisart<sup>®</sup> RC 25 filter.

### 3.3.6.4 HPLC metoda za določanje irbesartana

Metodo smo povzeli po članku (6). Uporabili smo kolono X Bridge C18 150 x 4,6 mm, 5 µm (Waters) namesto kolone Lichrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e, 5 µm (Merck, Nemčija), ker slednje nismo imeli na zalogi. Mobilna faza je bila sestavljena iz KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=2,5, metanola in acetonitrila v razmerju 15 : 75 : 10. Pretok je znašal 0,7 ml/min, volumen injiciranja pa 10 µL. Irbesartan smo določali pri 275 nm. Retencijski čas irbesartana je bil ~2,80 min. Umeritvena premica je bila linearna v koncentracijskem območju 1,5–250 mg/L, R<sup>2</sup> je znašal 0,9990. Odstotek RSD je znašal manj kot 2. Koncentracije vzorcev smo izračunali glede na dnevno pripravljen standard.

Standard smo pripravili tako, da smo natehtali na dve decimalki natančno okrog 15 mg irbesartana v 100 ml bučko in jo dopolnili z metanolom. Raztopino smo nato 15 minut mešali na magnetnem mešalu in jo zatem za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Temu je sledila filtracija skozi 0,45 µm Minisart<sup>®</sup> RC 25 filter.

### 3.3.7 Določanje vsebnosti ZU v trdnih disperzijah

Vsebnost ZU v trdnih disperzijah smo določili z metodo ekstrakcije. Na dve decimalni mesti natančno smo natehtali med 7,5 in 15 mg TD ter jo raztopili v organskem topilu, v katerem je učinkovina dobro topna (Preglednica III). Raztopino smo nato mešali 24 ur in ji določili vsebnost s HPLC-jem. Postopek smo ponovili v dveh paralelah.

**Preglednica III:** Priprava vzorcev za določanje vsebnosti ter pripadajoče vsebnosti ZU v TD.

Trdna disperzija	Natehta [mg]	Topilo	V <sub>topila</sub> [ml]	Vsebnost (%)
CLX:Syloid=1:2	~10	Etanol	100	30,67
CLX:Syloid=1:3	~10	Etanol	100	26,25
GLB:Syloid=1:2	~10	Etanol	100	33,43
GLB:Syloid=1:3	~10	Etanol	100	25,94
IMC:Syloid=1:2	~7,5	Etanol:H <sub>2</sub> O=50:50	100	36,14
IMC:Syloid=1:3	~10	Etanol:H <sub>2</sub> O=50:50	100	28,46
IBS:Syloid=1:2	~15	Metanol	250	37,83
IBS:Syloid=1:3	~15	Metanol	250	29,41

### 3.3.8 Določanje absolutne topnosti ZU v mediju za raztapljanje

Absolutno topnost ZU v mediju za raztapljanje smo določili pri temperaturi  $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ . V 250 ml medija smo natehtali presežek ZU (Preglednica IV) in jo ob konstantnem mešanju raztapljali 24 ur. Koncentracijo učinkovine v raztopini smo določili s HPLC-jem. Postopek smo ponovili v dveh paralelah.

**Preglednica IV:** Priprava vzorcev za določanje absolutne topnosti ZU v mediju za raztapljanje in pripadajoče absolutne topnosti ZU.

Učinkovina	Natehta [mg]	Medij za raztapljanje	Temp. [°C]	Abs. topnost [mg/ml]
<b>Celekoksib</b>	~250	0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8 + 1% SDS	37°C ± 0,5	609,1
<b>Glibenklamid</b>	~50	0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8 + 1% SDS	37°C ± 0,5	79,6
<b>Indometacin</b>	~300	0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8	37°C ± 0,5	728,8
<b>Irbesartan</b>	~350	0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8	37°C ± 0,5	636,5

### 3.3.9 Preskus raztapljanja

Z »in vitro« preskusom raztapljanja smo primerjali raztapljanje čistih kristalnih učinkovin (CLX, GLB, IMC in IBS), njihovih fizikalnih zmesi in trdnih disperzij. Kot medij za preskus raztapljanja smo izbrali 0,05 M fosfatni pufer s pH = 6,8, ki simulira črevesno tekočino. Pufri smo zaradi zagotavljanja »sink« pogojev v primeru celekoksiba in glibenklamida dodali še 1 % SDS. V 900 ml medija za raztapljanje s temperaturo  $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  smo zatehtali toliko trdne disperzije, fizikalne zmesi ali čiste učinkovine, da je natehta vsebovala maso ZU, ki predstavlja enkratni terapevtski odmerek (Preglednica V). Hitrost vrtenja vesel je bila 50 obratov na minuto. 5 ml vzorce smo vzorčili z ročno brizgo ob časih 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 in 1440 minut in jih po vzorčenju filtrirali skozi  $0,45\ \mu\text{m}$  Minisart<sup>®</sup> RC 25 filter. Vzorce celekoksiba in irbesartana smo morali pred določitvijo vsebnosti redčiti (Preglednica V) zaradi premočnega odziva. Vsebnost posamezne ZU v vzorcu smo določili s pripadajočo HPLC metodo. Preskus raztapljanja smo izvedli po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed., poglavje 2.9.3. (62), pri čemer smo uporabili aparaturo tipa 2, ki je opremljena z vesli (Erweka DT 6, Švica).

**Preglednica V:** Mase ZU, ki so jo vsebovale natehte TD, FZ ali čiste učinkovine, vrste medija za raztapljanje posameznih vzorcev in postopek redčenja.

Učinkovina	Masa ZU [mg]	Medij za raztapljanje	Redčenje	Topilo za redčenje
<b>Celekoksib</b>	~50 mg	0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8 + 1% SDS	1/10	Acetonitril:H <sub>2</sub> O=60:40
<b>Glibenklamid</b>	~5 mg	0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8 + 1% SDS	/	/
<b>Indometacin</b>	~25 mg	0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8	/	/
<b>Irbesartan</b>	~150 mg	0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8	1/10	Metanol

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 DSC analiza

S pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo želeli dokazati prisotnost amorfne oblike ZU v trdni disperziji in izračunati njen delež. Splošno je lahkotnost tvorbe amorfne oblike neke snovi definirana z razmerjem  $T_g/T_t$ . Pri dobrih tvorcih amorfne oblike je to razmerje višje od 0,7 (9). V Preglednica VI lahko vidimo, da so  $T_g/T_t$  razmerja uporabljenih učinkovin v območju 0,74–0,76, iz česar lahko sklepamo, da so vse uporabljene učinkovine dobri tvorci amorfne oblike. Temperatura steklastega prehoda ( $T_g$ ) je pomemben indikator stabilnosti amorfne oblike, in sicer če je  $T_g$  vsaj 50 °C višja od temperature shranjevanja, potem je mobilnost molekul dovolj nizka, da je amorfna oblika stabilna (63). V Preglednica VI so navedene  $T_g$  vseh uporabljenih ZU. Vidimo lahko, da le irbesartan tvori amorfno obliko, ki je stabilna pri temperaturi shranjevanja. Vgradnja ZU v TD lahko zviša stabilnost amorfne oblike z zmanjšanjem mobilnosti molekul.

**Preglednica VI:** Temperaturi tališča in steklastega prehoda ter razmerje med njima.

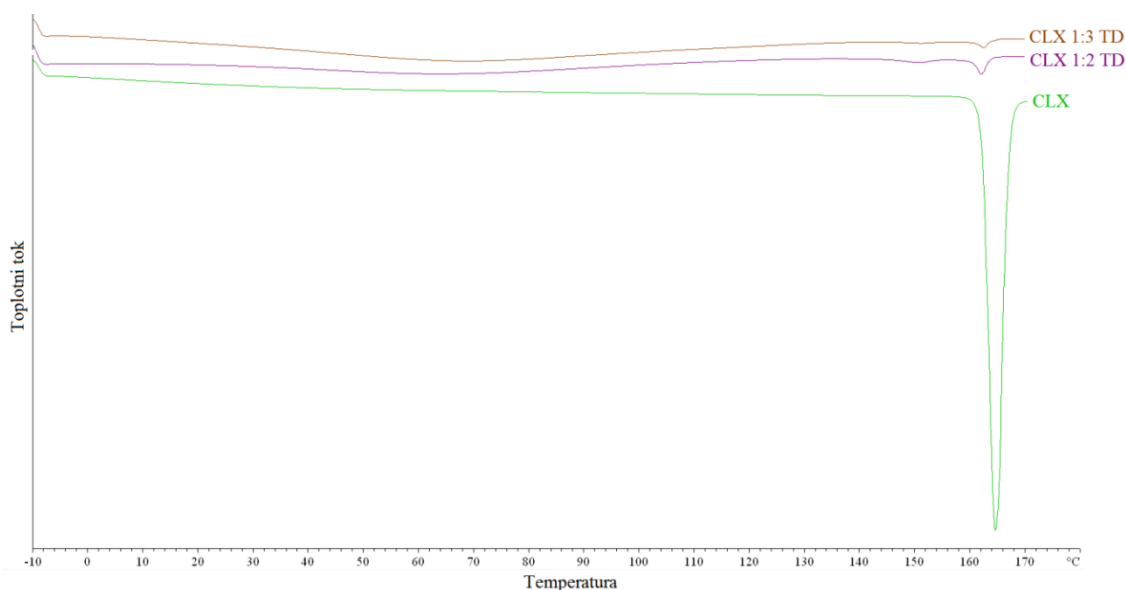
Učinkovina	$T_t$ [°C]	$T_g$ [°C]	$T_g/T_t$
Celekoksib	162 <sup>10</sup>	50 <sup>10</sup>	0,74
Glibenklamid	177 <sup>10</sup>	58 <sup>10</sup>	0,74
Indometacin	162 <sup>10</sup>	50 <sup>10</sup>	0,74
Irbesartan	180 <sup>74</sup>	72 <sup>9</sup>	0,76

Na termogramu celekoksiba (Slika 5) lahko tako na krivulji kristalne učinkovine kot tudi na krivuljah obeh trdnih disperzij opazimo talilni prehod v območju 163–165 °C. Iz tega lahko sklepamo, da se v obeh TD del učinkovine nahaja v kristalni obliki. S pomočjo Enačbe 5, ki so jo uporabili že Khanfar in sodelavci (16), lahko izračunamo  $W$ , ki predstavlja delež ZU v TD, ki se nahaja v kristalni obliki.  $\Delta H_{TD}$  in  $\Delta H_{SD}$  (J/g) sta talilni entalpiji vzorca trdne disperzije in čiste ZU,  $w$  pa predstavlja vsebnost ZU v trdni disperziji, določeno z metodo ekstrakcije.

$$W = 100 \times \frac{\Delta H_{TD}}{\Delta H_{SD} \times w} \quad (\text{Enačba 5})$$

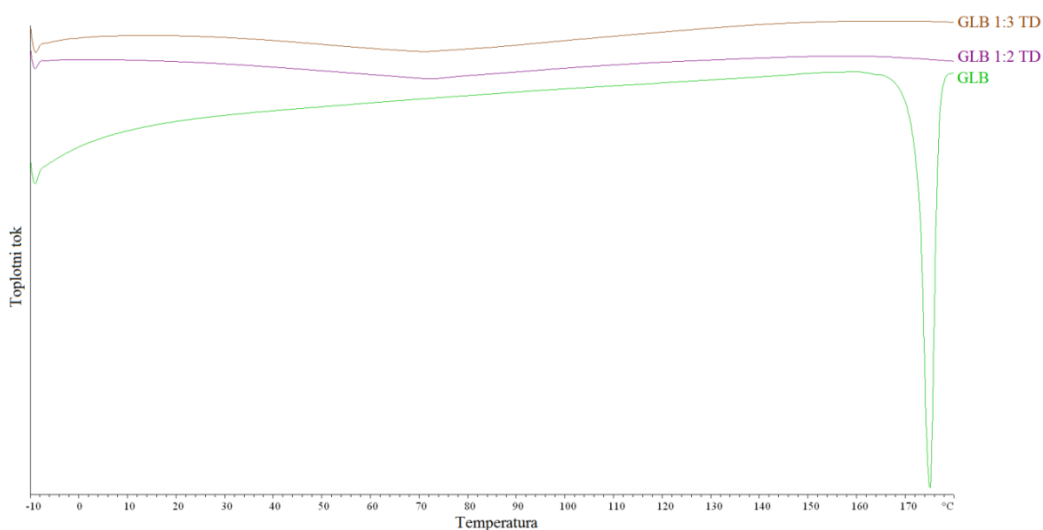


Izračunali smo, da se v CLX 1 : 2 TD 8,5 % učinkovine nahaja v kristalni obliki, medtem ko se v CLX 1 : 3 TD v kristalni obliki nahaja 5,2 % učinkovine. Velika večina učinkovine v obeh TD je torej v amorfni obliki.



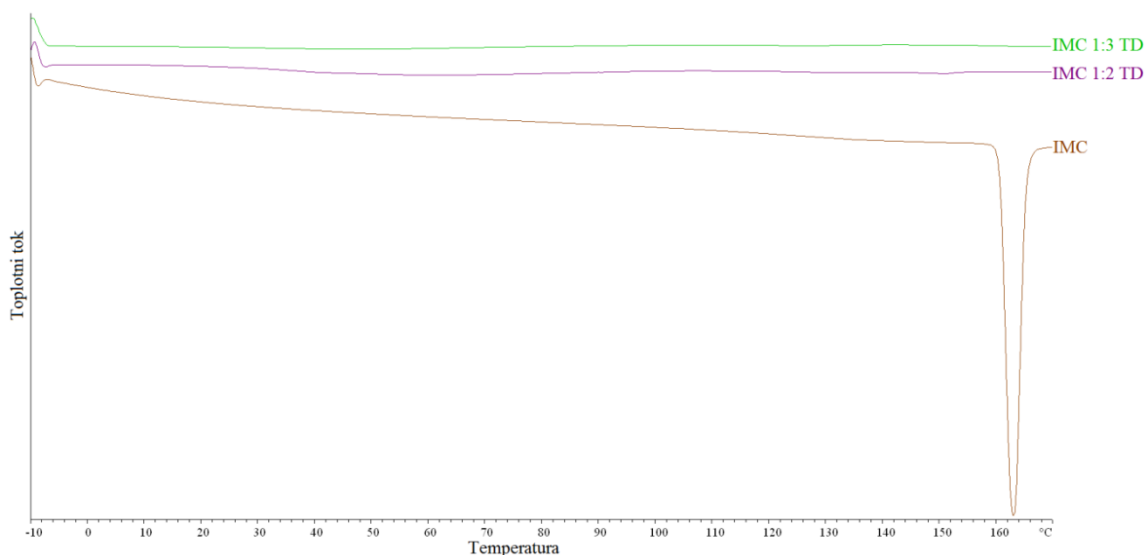
**Slika 5:** DSC termogrami trdnih disperzij celekoksiba v razmerjih CLX : Syloid = 1 : 3 in CLX : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega CLX.

Na termogramu kristalnega glibenklamida (Slika 6) lahko vidimo ozek talilni vrh pri 173 °C. Ta vrh je odsoten na krivuljah obeh TD. Iz tega lahko sklepamo, da se celotna učinkovina v obeh pripravljenih trdnih disperzijah nahaja v amorfni obliki.



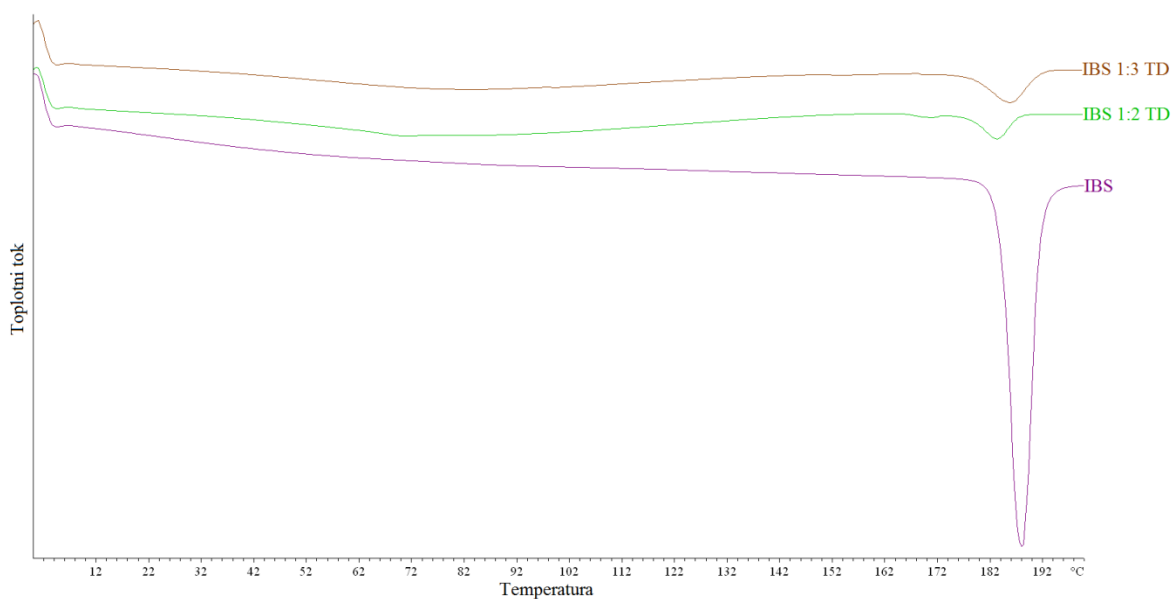
**Slika 6:** DSC termogrami trdnih disperzij GLB v razmerjih GLB : Syloid = 1 : 3 in GLB : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega GLB.

Na termogramu indometacina (Slika 7) lahko na krivulji kristalne učinkovine opazimo ozek talilni vrh pri 163 °C. Na krivuljah trdnih disperzij tega vrha ne opazimo. Iz tega lahko sklepamo, da se učinkovina v obeh pripravljenih trdnih disperzijah nahaja v amorfni obliki.



**Slika 7:** DSC termogrami trdnih disperzij IMC v razmerjih IMC : Syloid = 1 : 3 in IMC : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega IMC.

Na termogramu irbesartana (Slika 8) lahko na vseh treh krivuljah vidimo talilni prehod v območju 184–188 °C. Na podlagi tega lahko ugotovimo, da se v obeh TD del učinkovine nahaja v kristalni obliki. S pomočjo Enačbe 5 smo izračunali, da se v IBS 1 : 2 TD 19,4 % učinkovine nahaja v kristalni obliki, medtem ko se v IBS 1 : 3 TD v kristalni obliki nahaja 40,9 % učinkovine. Obe TD torej vsebujeta precej velik delež kristalne oblike ZU. Na podlagi tega lahko sklepamo, da se med molekulami irbesartana in nosilcem ne pojavijo interakcije, ki bi bile dovolj močne, da bi stabilizirale amorfno obliko, poleg tega pa ima izmed vseh uporabljenih ZU irbesartan daleč najslabšo topnost v etanolu, ki smo ga uporabili kot topilo za izdelavo TD. Kristalizacija bi tako lahko potekla zaradi prepočasnega odstranjevanja topila in posledično premajhnega koncentracijskega gradienta za nalaganje učinkovine v pore nosilca. Visok delež kristalne oblike irbesartana bi lahko bil tudi posledica termično inducirane kristalizacije med izvedbo diferenčne dinamične kalorimetrije, ki sta jo v svoji raziskavi dokazala Chawla in Bansal (9), za natančnejšo določitev deleža irbesartana, ki kristalizira med samo izvedbo DSC analize, bi morali postopek izvesti pri nižji hitrosti segrevanja.



**Slika 8:** DSC termogrami trdnih disperzij IBS v razmerjih IBS : Syloid = 1 : 3 in IBS : Syloid = 1 : 2 ter kristalnega IBS.

Na podlagi rezultatov DSC analize lahko sklepamo, da se večina učinkovine v vseh izdelanih trdnih disperzijah nahaja v amorfni obliki. To je lahko posledica majhne velikosti por nosilca, interakcij ZU z nosilcem in hitre evaporacije topila. Na podlagi dejstva, da je velik del por Syloida<sup>®</sup> 244 FP večji od 20 nm, kar pomeni, da bi učinkovina znotraj por lahko kristalizirala, do česar je v primeru TD celekoksiba in irbesartana v manjši meri tudi prišlo, lahko sklepamo, da interakcije igrajo pomembno vlogo pri preprečevanju kristalizacije ZU. To še dodatno potrjuje dejstvo, da je priprava TD potekala pri temperaturi 50 °C, kolikor znaša tudi  $T_g$  celekoksiba in indometacina, vendar sta učinkovini kljub temu ostali v amorfni obliki.

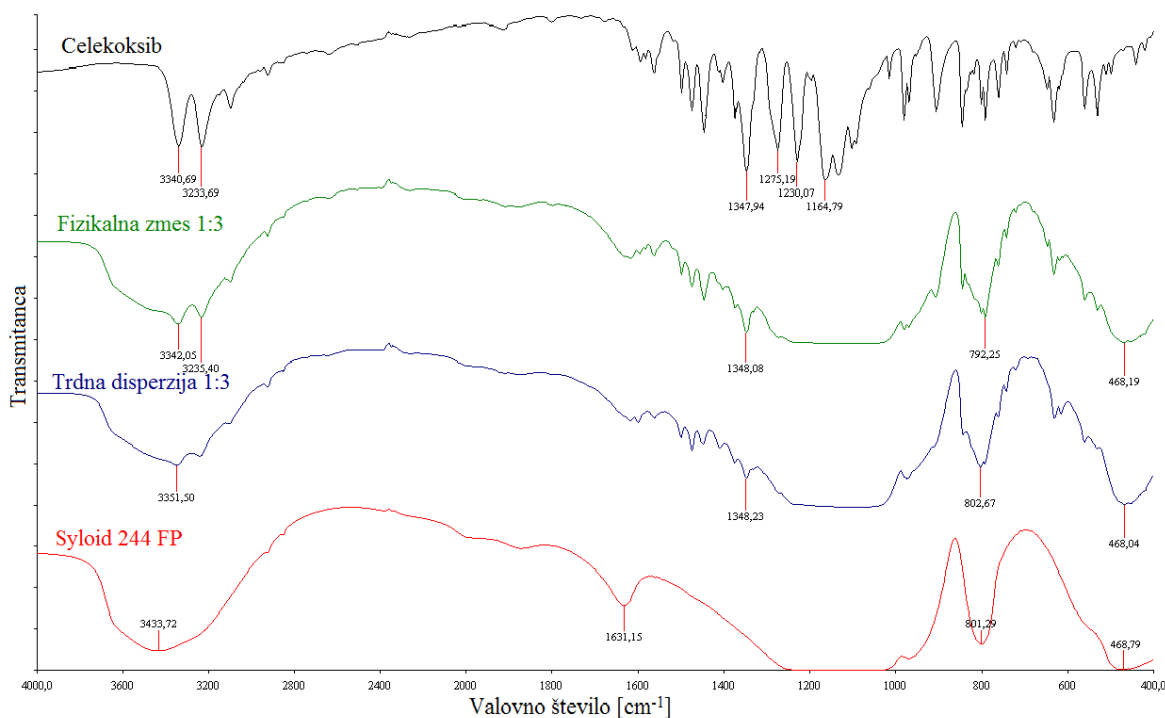
## 4.2 FTIR analiza

Intermolekularne interakcije znotraj amorfnih ZU imajo direkten vpliv na molekularno mobilnost. Poleg tega pa interakcije, predvsem vodikove vezi, vplivajo tudi na strukturno relaksacijo,  $T_g$  in topnost. S pomočjo FTIR spektrov smo poskušali obrazložiti in dokazati prisotnost interakcij med ZU in nosilcem.

### 4.2.1 FTIR analiza celekoksiba

Celekoksib vsebuje več funkcionalnih skupin, ki imajo lahko vlogo donorjev ali akceptorjev protonov ter tako tvorijo vodikove vezi. Sulfonamidna skupina ima lahko vlogo donorja protona ( $\text{NH}_2$ ) kot tudi akceptorja protona ( $\text{SO}_2$ ). Zlasti sposobnost odvzema elektrona kisikovih atomov na  $\text{SO}_2$  skupini povzroči delokalizacijo elektronov na dušikovem atomu, posledica tega je pozitivna polarizacija na dušikovem atomu in olajšanje oddajanja protonov. Med ostale proton akceptorske skupine celekoksiba štejemo dušikov atom v pirazolni skupini in fluoridni atom v  $\text{CF}_3$  skupini. Syloid<sup>®</sup> 244 FP vsebuje OH skupine, ki lahko delujejo tako kot akceptorji protonov kot tudi donorji protonov. V spektru Syloida ima O-H vez širok vrh v območju  $3700\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ . Za Syloid pa sta značilna tudi širok vrh med  $1250\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  in vrh pri  $801\text{ cm}^{-1}$ , ki predstavljata Si-O vez. Vrh pri  $1631\text{ cm}^{-1}$  pripada vodnim molekulam, ki so se zadržale v porah Syloida. Na podlagi pozicije vezi na FTIR spektrih so Andrews in sodelavci opisali vodikove vezi med celekoksibom in PVP v trdni disperziji (63). Ugotovili so, da premik vezi proti nižji frekvenci valovnega števila pomeni krepitev vodikovih vezi, medtem ko pozitiven premik k višji frekvenci kaže na slabitev vodikovih vezi. Na FTIR spektrih (Slika 9) lahko vidimo razlike med spektri trdne disperzije in spektri kristalne ZU in fizikalne zmesi.  $\text{NH}_2$  skupina kristalnega celekoksiba ima dvojni vrh pri valovnih številih  $3341\text{ cm}^{-1}$  in  $3234\text{ cm}^{-1}$ . Simetrično nihanje C-F vezi se pojavi pri  $1230\text{ cm}^{-1}$ , asimetrično pa pri  $1275\text{ cm}^{-1}$ . S=O vez ima vrhova pri valovnih številih  $1348\text{ cm}^{-1}$  in  $1165\text{ cm}^{-1}$ , ki pripadata asimetričnemu in simetričnemu nihanju (63). Na spektru TD lahko vidimo pozitiven premik N-H vezi ( $11\text{ cm}^{-1}$ ) glede na kristalen celekoksib. Vrhovi S=O vezi TD pa so ostali na enaki poziciji. Na podlagi spektrov lahko torej ugotovimo, da se med celekoksibom in nosilcem ne tvorijo močne vodikove vezi. Pozitiven premik N-H vezi je posledica oslabitve intermolekularnih interakcij med molekulami ZU zaradi pretvorbe kristalne oblike celekoksiba v amorfno.

Opazimo lahko tudi, da so vrhovi na spektru TD širši ter nižji od vrhov FZ, vzrok za to je višja stopnja neurejenosti, ki je značilna za amorfno obliko ZU.

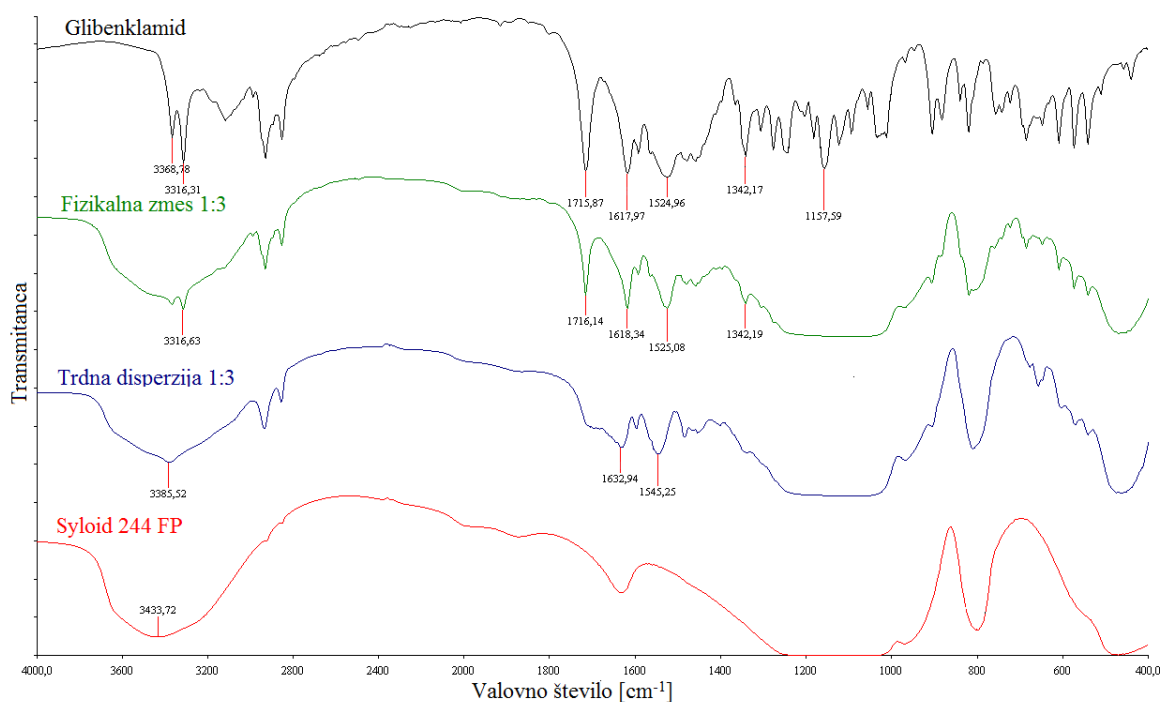


**Slika 9:** FTIR spektri celekoksiba, fizikalne zmesi v razmerju CLX : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju CLX : Syloid = 1 : 3 in Syloida<sup>®</sup> 244 FP.

#### 4.2.2 FTIR analiza glibenklamida

Glibenklamid ima izmed vseh obravnavanih ZU največ skupin, ki lahko sodelujejo pri tvorbi vodikovih vezi. Med proton akceptorske štejemo amidno, SO<sub>2</sub>, ureo, etrno in Cl skupino. Amidna in urea skupina imata tudi vlogo donorja protonov. Na FTIR spektru kristalnega glibenklamida (Slika 10) lahko pri frekvencah 3316 cm<sup>-1</sup> in 1618 cm<sup>-1</sup> vidimo nihanje N-H in C=O vezi amidne skupine. Vrhovi, ki pripadajo urea skupini, se nahajajo pri 3369 cm<sup>-1</sup> (nihanje N-H vezi), 1716 cm<sup>-1</sup> (C=O) in 1525 cm<sup>-1</sup> (striženje N-H vezi), vzdolžno nihanje SO<sub>2</sub> skupine pa lahko vidimo pri frekvencah 1342 cm<sup>-1</sup> (asimetrično) in 1158 cm<sup>-1</sup> (simetrično) (65). Vrhove značilne za amidno in SO<sub>2</sub> skupino lahko opazimo tudi na spektru fizikalne zmesi, medtem ko se na spektru trdne disperzije izmed vrhov, ki smo jih predhodno identificirali že pri kristalnem glibenklamidu, pojavi zgolj vrh značilen za N-H vez uree, in sicer pri frekvenci 1545 cm<sup>-1</sup>. Naši rezultati se skladajo z rezultati, ki so jih v članku objavili Chauhan in sodelavci (54). Ti so glibenklamid vgradili v porozni

silicijev dioksid imenovan Aerosil<sup>®</sup> 200, ki je po lastnostih površine zelo podoben Syloidu<sup>®</sup> 244 FP. Na podlagi izginotja vrhov značilnih za amidno vez in SO<sub>2</sub> skupino ter pozitivnemu premiku N-H vezi uree so sklepali, da je prišlo do oslabitve intermolekularnih vodikovih vezi ter okrepitve vodikovih vezi med amidno in SO<sub>2</sub> skupino glibenklamida in silanolnimi skupinami nosilca. Na spektru TD se je pojavil nov vrh pri 1633 cm<sup>-1</sup>, ki ga lahko pripišemo C=N vezi. Ta vez je nastala zaradi tvorbe enola, vanjo je vključena amidna skupina, ki je stabilizirana z arilnim etrom. Pretvorba keto oblike glibenklamida v enolno je posledica pretvorbe kristalnega glibenklamida amorfno obliko, še dodatno pa jo potrjuje izginotje vrha, ki predstavlja N-H vez amidne skupine na spektru TD. Pojav so že opisali v nekaterih drugih člankih (66, 67). Na podlagi FTIR spektrov lahko torej sklepamo, da se med glibenklamidom in Syloidom<sup>®</sup> 244 FP tvorijo vodikove vezi, širši in nižji vrhovi na spektru TD ter pretvorba glibenklamida v enolno obliko pa so značilni za amorfno obliko učinkovine.

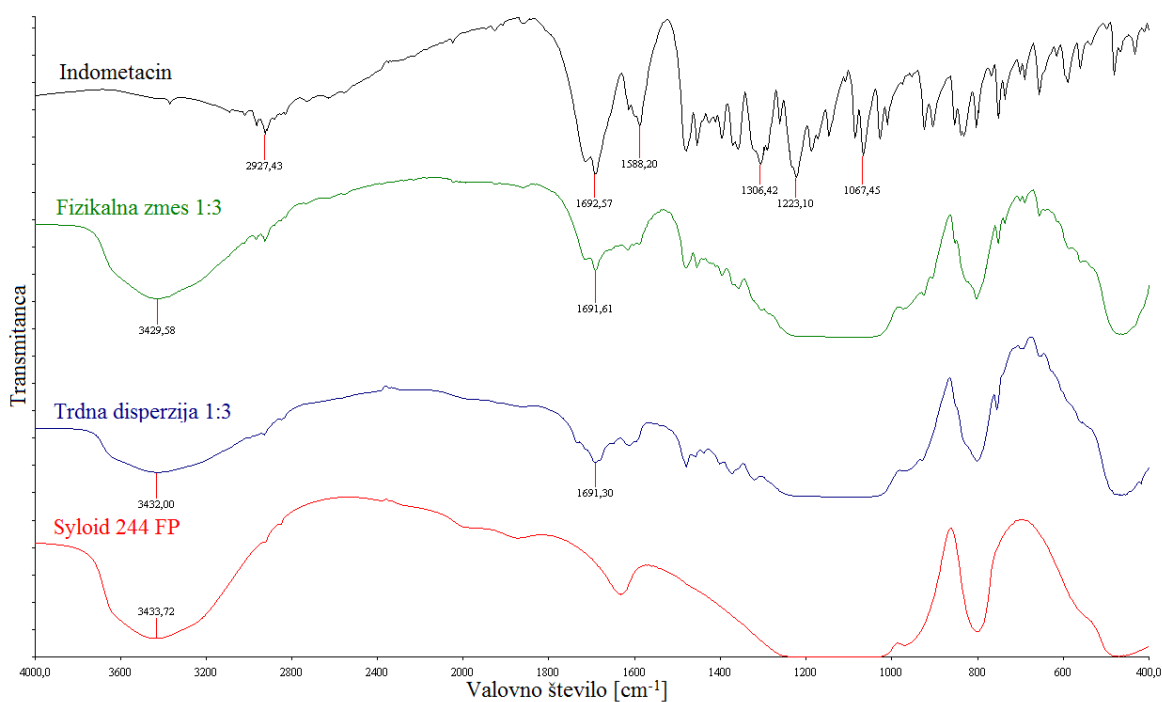


**Slika 10:** FTIR spektri glibenklamida, fizikalne zmesi v razmerju GLB : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju GLB : Syloid = 1 : 3 in Syloida<sup>®</sup> 244 FP.

#### 4.2.3 FTIR analiza indometacina

Molekula indometacina vsebuje številne akceptorje vodikovih vezi, med katere spadajo amidna, eterna, Cl in karboksilna skupina, ki jo uvrščamo tudi med donorje vodikove vezi.

Na FTIR spektru kristalnega indometacina (Slika 11) lahko pri valovnem številu  $2927\text{ cm}^{-1}$  vidimo širok vrh karboksilne O-H vezi, pri  $1715\text{ cm}^{-1}$  pa se nahaja značilen vrh C=O vezi karboksilne kisline. Nihanje amidne C=O vezi se pojavi pri  $1692\text{ cm}^{-1}$ . Med ostale pomembne vrhove štejemo vrh C-O vezi karboksilne kisline pri valovnem številu  $1306\text{ cm}^{-1}$ , vrh C-O vezi etrne skupine pri  $1223\text{ cm}^{-1}$  ter vrh C-Cl vezi pa pri  $1068\text{ cm}^{-1}$  (2). Na spektru trdne disperzije vidimo širok vrh O-H vezi pri  $3432\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada silanolni skupini Syloida. Poleg tega pa lahko opazimo še vrh pri  $1691\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada amidni C=O vezi. Vidimo lahko, da so vrhovi trdne disperzije zgolj rahlo zamaknjeni proti nižjim frekvencam v primerjavi s kristalnim indometacinom in fizikalno zmesjo. Na podlagi FTIR spektrov torej ne moremo z gotovostjo sklepati o krepitvi vodikovih vezi med indometacinom in Syloidom. Lahko pa na podlagi širših in nižjih vrhov TD v primerjavi s kristalnim indometacinom in fizikalno zmesjo ugotovimo, da se naša učinkovina verjetno nahaja v amorfni obliki.

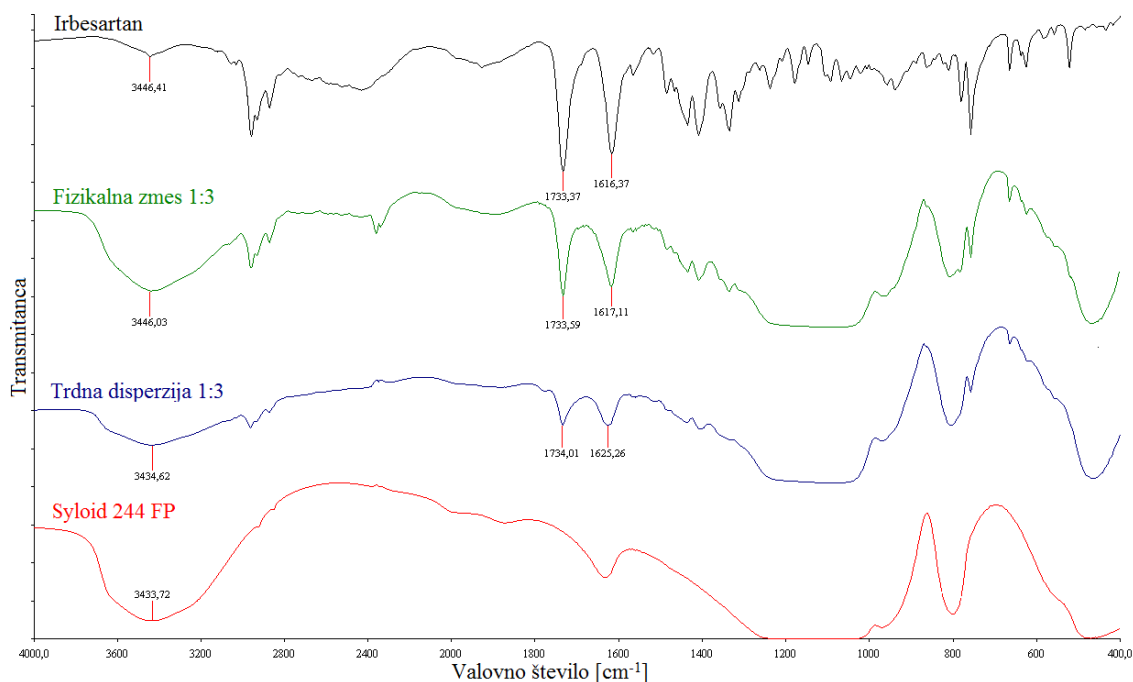


**Slika 11:** FTIR spektri indometacina, fizikalne zmesi v razmerju IMC : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju IMC : Syloid = 1 : 3 in Syloida<sup>®</sup> 244 FP.

#### 4.2.4 FTIR analiza irbesartana

Prav tako kot predhodno obravnavane ZU tudi irbesartan vsebuje več funkcionalnih skupin, ki imajo lahko vlogo proton donorjev ali akceptorjev ter tako tvorijo vodikove

vezi. Karbonilna in imidazolna skupina imata vlogo proton akceptorja, medtem ko ima tetrazolna skupina tako vlogo donorja kot tudi vlogo akceptorja protona. Širok vrh na spektru kristalnega irbesartana (Slika 12) pri valovnem številu  $3446\text{ cm}^{-1}$  predstavlja N-H vez, pri  $1733\text{ cm}^{-1}$  lahko opazimo nihanje C=O vezi, vrh pri  $1616\text{ cm}^{-1}$  pa pripada aromatskim C=N skupinam (16). Na spektru TD lahko vidimo, da se je vrh, ki pripada N-H vezi zamaknil za  $11\text{ cm}^{-1}$  proti nižji frekvenci glede na vrh kristalnega irbesartana. Poleg tega se je vrh, ki predstavlja aromatske C=N skupine, zamaknil za  $9\text{ cm}^{-1}$  k višji frekvenci valovnih števil, medtem ko se vrh C=O nahaja na enaki frekvenci. Teh premikov ni bilo mogoče opaziti na spektru fizikalne zmesi. Na podlagi premika vrha N-H vezi k višjim vrednostim lahko sklepamo, da je prišlo do krepitev vodikovih vezi med N-H skupino irbesartana in OH skupino nosilca. Posledica tega je oslabitev vodikovih vezi med molekulami učinkovine. Na spektru se to kaže kot pozitiven premik vrha, ki predstavlja aromatske C=N skupine. Prav tako kot pri predhodnih ZU lahko tudi pri irbesartanu opazimo, da so vrhovi v spektru TD širši ter nižji od vrhov FZ in kristalnega irbesartana, vzrok za to je amorfna oblika ZU znotraj TD.

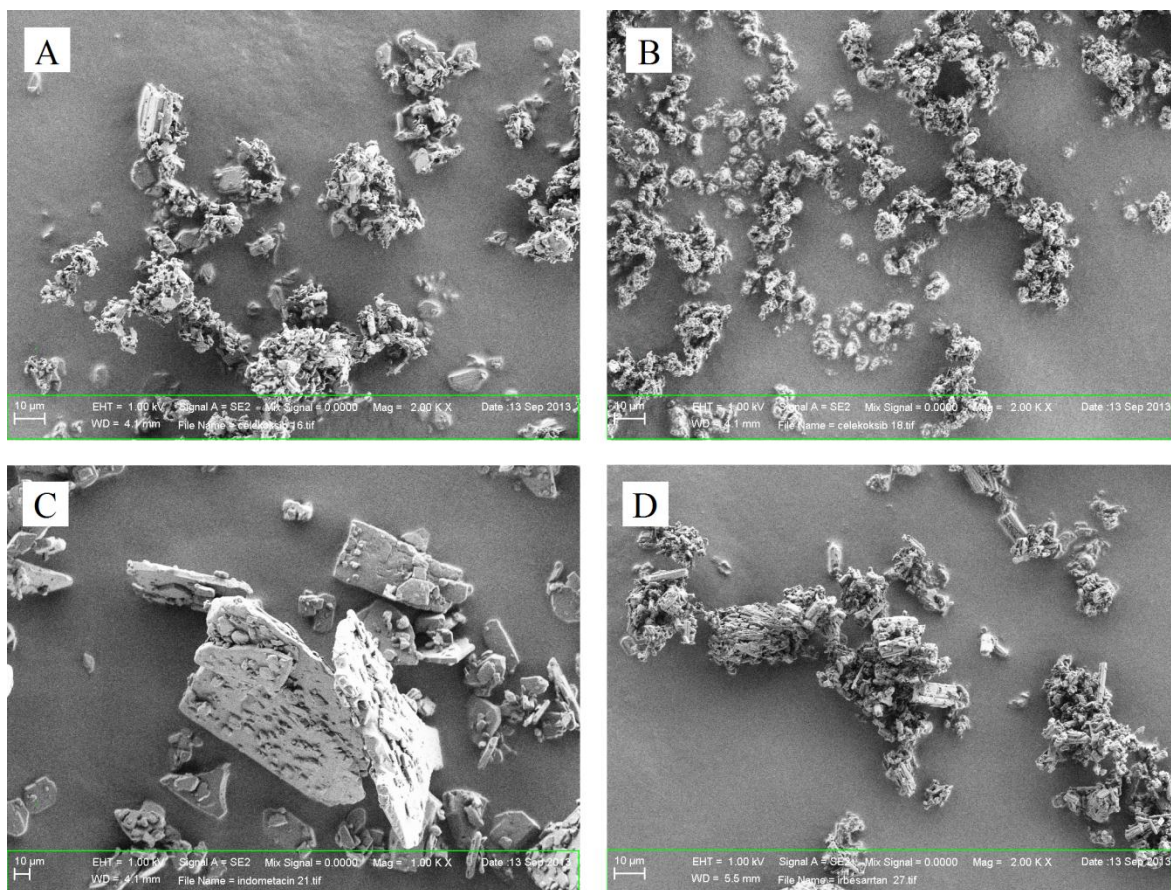


**Slika 12:** FTIR spektri irbesartana, fizikalne zmesi v razmerju IBS : Syloid = 1 : 3, trdne disperzije v razmerju IBS : Syloid = 1 : 3 in Syloida<sup>®</sup> 244 FP

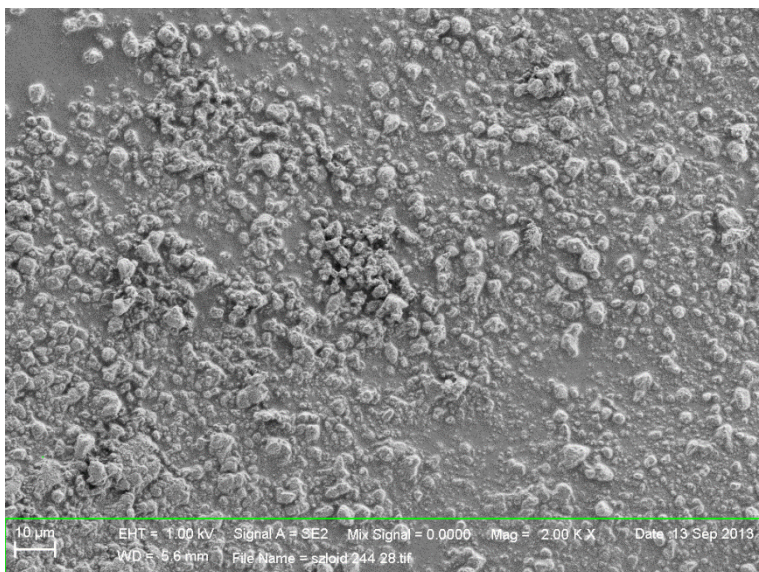


### 4.3 Morfologija delcev

Na Slika 13 lahko vidimo kristalne delce vseh štirih zdravilnih učinkovin. Kristali celekoksiba, glibenklamida in irbesartana so veliki med 5  $\mu\text{m}$  pa do nekaj 10  $\mu\text{m}$ , izstopajo pa kristali indometacina, ki so veliki od nekaj 10  $\mu\text{m}$  pa do več kot 100  $\mu\text{m}$ . Na Slika 14 lahko vidimo osnovne delce Syloida, ki so veliki med 3  $\mu\text{m}$  in 6  $\mu\text{m}$ . Kristali znotraj posameznih učinkovin se močno razlikujejo v velikosti, medtem ko so delci Syloida približno enako veliki in hkrati tudi veliko manjši od osnovnih delcev učinkovin. Delci Syloida imajo torej višje razmerje med površino in volumnom delcev, kar lahko pripomore k večji hitrosti raztapljanja učinkovine, ki je vgrajena v nosilec. Zaradi manjše variacije v velikosti delcev Syloida v primerjavi z delci učinkovine lahko pričakujemo, da se bodo posamezne paralele TD pri testu raztapljanja med seboj manj razlikovale kot pa paralele ZU.



**Slika 13:** Elektronsko mikroskopske slike osnovnih delcev A) celekoksiba, B) glibenklamida, C) indometacina, D) irbesartana.



**Slika 14:** Elektronsko mikroskopska slika osnovnih delcev Syloida<sup>®</sup> 244 FP.

#### 4.4 Merjenje stičnega kota vode in njene hitrosti pronicanja

Z merjenjem stičnega kota med kapljicami vode in učinkovinami ter njihovimi trdnimi disperzijami smo želeli ugotoviti, ali se ZU med seboj bistveno razlikujejo v močenju in ali se močenje z vgrajevanjem ZU v porozni nosilec izboljša. V Preglednica VII lahko vidimo izmerjene stične kote med posameznimi ZU in kapljicami vode. Pod dobro močene snovi štejemo tiste, ki imajo stični kot manjši od  $90^\circ$ . Po tem kriteriju so vse štiri učinkovine dobro močene, vendar lahko vidimo, da glibenklamid nekoliko odstopa od ostalih treh ZU, saj je ravno na meji med dobro in slabo močenimi substancami.

**Preglednica VII:** Stični koti med kapljicami vode in zdravilnimi učinkovinami.

Učinkovina	Stični kot [°]
<b>Celekoksib</b>	67,9
<b>Glibenklamid</b>	88,4
<b>Indometacin</b>	72,8
<b>Irbesartan</b>	63,9

Med merjenjem stičnih kotov med kapljicami vode in trdnimi disperzijami smo ugotovili, da kapljice zelo hitro pronicajo v trdne disperzije, natančna določitev stičnih kotov tako ni bila mogoča. TD smo zato namesto po vrednostih stičnega kota razporedili po času pronicanja kapljic (Preglednica VIII). Pronicanje je posledica visoke poroznosti nosilca. Če tekočina hitro pronica v snov, lahko sklepamo, da je močenje dobro. Prisotnost hidrofobne

učinkovine znotraj nosilca je v primerjavi s praznim nosilcem nekoliko upočasnila pronicanje vode. Pojav je bil najbolj opazen pri glibenklamidu, iz česar lahko sklepamo, da je ta TD najslabše močena in bi lahko posledično imela nižjo hitrost raztapljanja. Prisotnost hidrofobne ZU na površini nosilca lahko namreč upočasni difuzijo vode v pore nosilca. Izboljšano močenje ZU vgrajenih v TD je bilo opaziti tudi med testom raztapljanja. Vse ZU so po tem, ko smo jih stresli v medij, plavale na površini, medtem ko so se delci trdnih disperzij takoj potopili na dno posode.

**Preglednica VIII:** Čas pronicanja kapljic vode v trdne disperzije v razmerju 1 : 3 in Syloid® 244 FP.

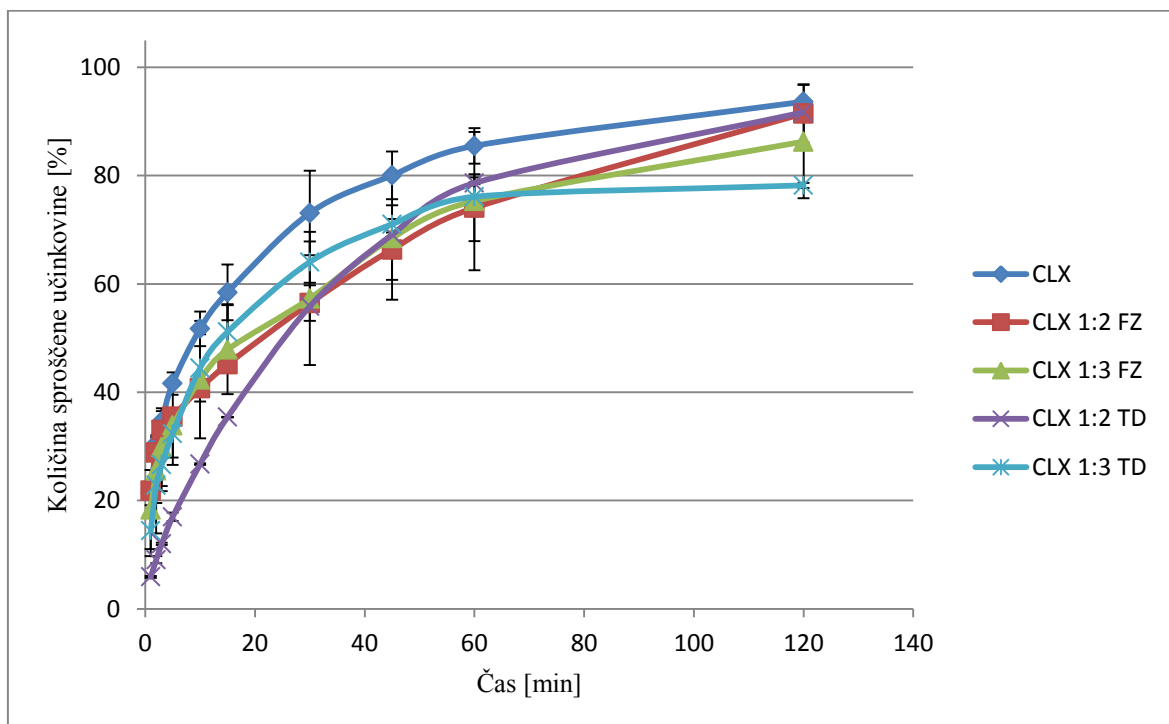
Vzorec	Čas pronicanja [s]
CLX 1:3 TD	4,6
GLB 1:3 TD	35,5
IMC 1:3 TD	7,7
IBS 1:3 TD	3,0
Syloid 244 FP	2,8

## 4.5 Sproščanje zdravilnih učinkovin iz trdnih disperzij

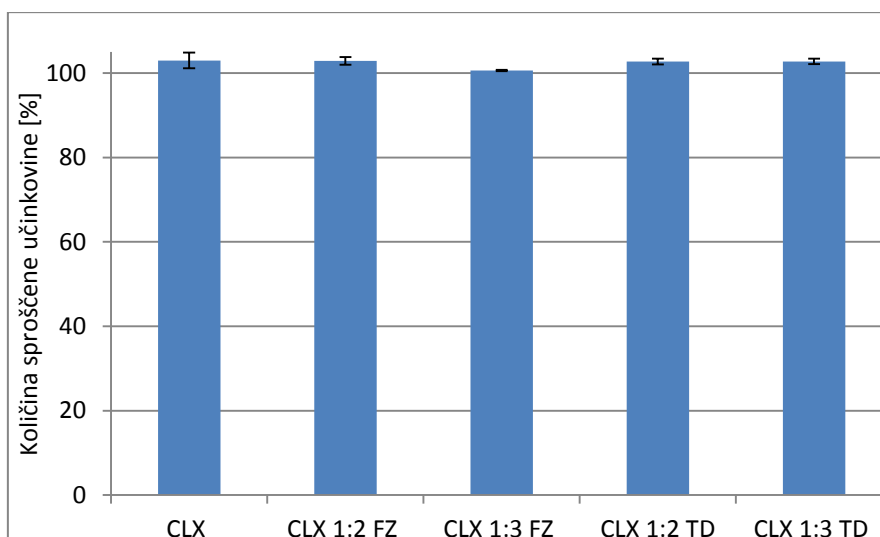
### 4.5.1 Sproščanje celekoksiba

Na podlagi profilov sproščanja, ki jih vidimo na Slika 15, lahko sklepamo, da z vgradnjo celekoksiba v trdne disperzije nismo povišali hitrosti raztapljanja. Kljub drugačnim pričakovanjem se je kristalna oblika učinkovine raztapljala hitreje kot amorfna. Razloge za slabšo topnost amorfne oblike celekoksiba od pričakovane so v članku navedli Gupta in sodelavci (10, 68). Teoretično so napovedali 7- do 21-krat višjo topnost amorfne oblike od kristalne, v praksi pa so določili zgolj 30 % višjo topnost, ki pa se je po 20 minutah izenačila s topnostjo kristalne oblike. Ob stiku amorfne celekoksiba z medijem poteče s topilom pospešena kristalizacija celekoksiba, ki je razlog za slabšo topnost. V prvih nekaj minutah je bilo sproščanje iz TD počasnejše tudi od sproščanja iz fizikalnih zmesi. Razlog za ta pojav je razlika v procesu priprave FZ in TD. Med pripravo TD učinkovina pod vplivom kapilarnih sil pronica globoko v pore nosilca, medtem ko se pri pripravi FZ učinkovina adsorbira zgolj na zunanjo površino nosilca in na površino začetnih delov por. Hitrejše sproščanje FZ lahko torej razložimo z lokalizacijo adsorbirane ZU; molekule učinkovine adsorbirane na površini (FZ) se bodo ob stiku z medijem nemudoma raztopile,

medtem ko molekule znotraj nosilca (TD) potrebujejo nekaj časa, da difundirajo iz por. Pri TD v razmerju 1 : 3 lahko vidimo, da se je po eni uri sprostito približno 75 %, po tej točki pa se je učinkovina sproščala še počasneje. Kot lahko vidimo na Slika 16 se je po 24 urah iz vseh formulacij sprostita vsa učinkovina.



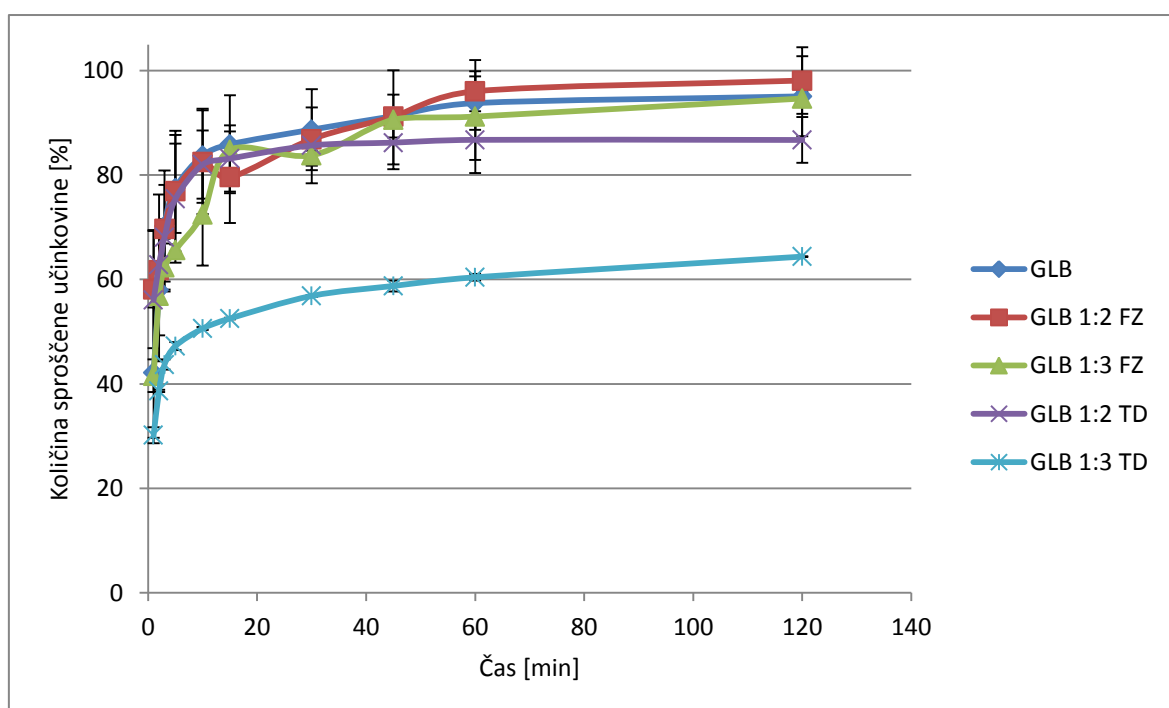
**Slika 15:** Profili raztapljanja kristalnega CLX, CLX iz fizikalnih zmesi in CLX iz trdnih disperzij. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.



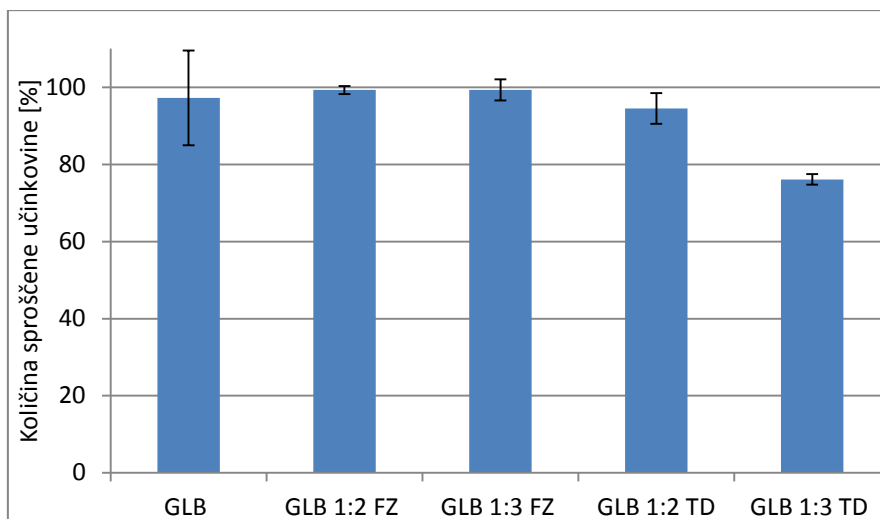
**Slika 16:** Primerjava količin sproščene kristalnega CLX, CLX iz fizikalnih zmesi in CLX iz trdnih disperzij po 24 h. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

#### 4.5.2 Sproščanje glibenklamida

Z vgradnjo glibenklamida v trdne disperzije nismo povečali njegove hitrosti raztapljanja (Slika 17). Hitrost sproščanja je v začetku hitrejša iz TD v primerjavi s FZ, vendar pa se sproščanje iz TD že po 5 minutah močno upočasni, velik del glibenklamida pa se ne sprosti tudi po 24h (Slika 18). Delež nesproščene učinkovine se povečuje z deležem Syloida v TD. Vzrok za močno upočasnitev sproščanja so interakcije med nosilcem in učinkovino, ki smo jih dokazali s FTIR spektroskopijo. Neenakomerna velikost delcev, slabo močenje in dejstvo, da ima izmed vseh uporabljenih ZU glibenklamid najmanjši odmerek (5 mg) so razlogi, da se paralele sproščanja kristalnega glibenklamida med seboj močno razlikujejo. Z vgradnjo v TD smo močno zmanjšali variabilnost med vzorci in na ta način dosegli večjo ponovljivost rezultatov, kar je kritičnega pomena pri vgrajevanju TD v nadaljnje formulacije.



**Slika 17:** Profili raztapljanja kristalnega GLB, GLB iz fizikalnih zmesi in GLB iz trdnih disperzij. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

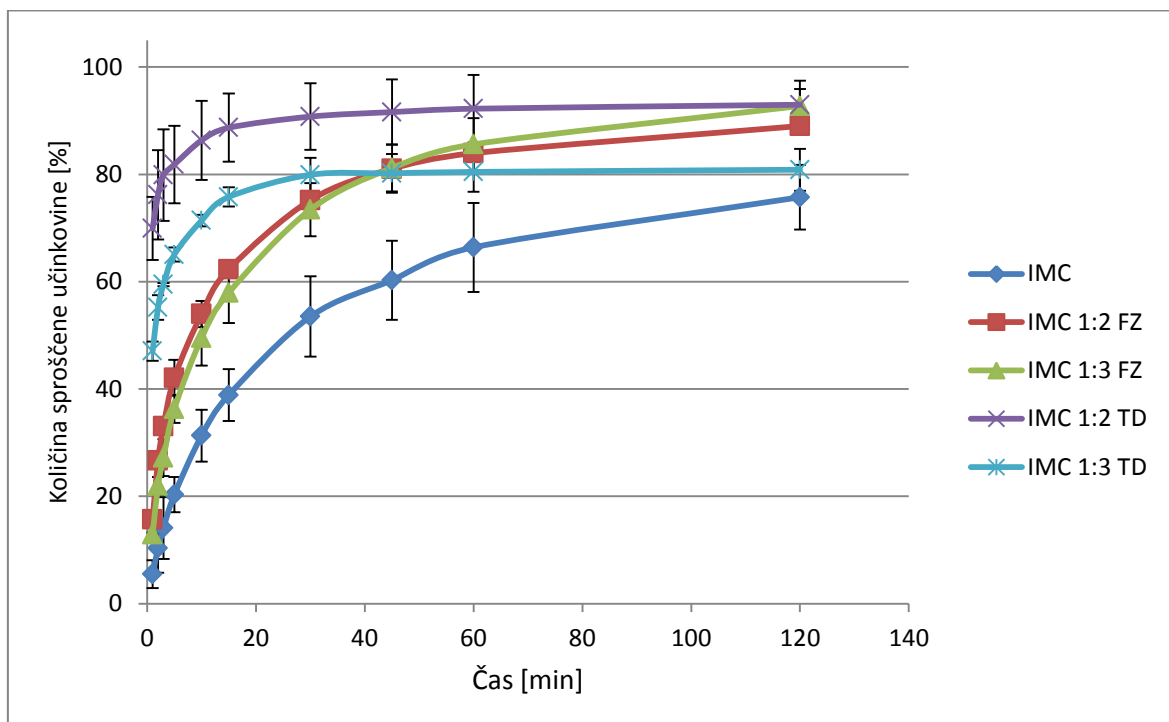


**Slika 18:** Primerjava količin sproščene kristalnega GLB, GLB iz fizikalnih zmesi in GLB iz trdnih disperzij po 24 h. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

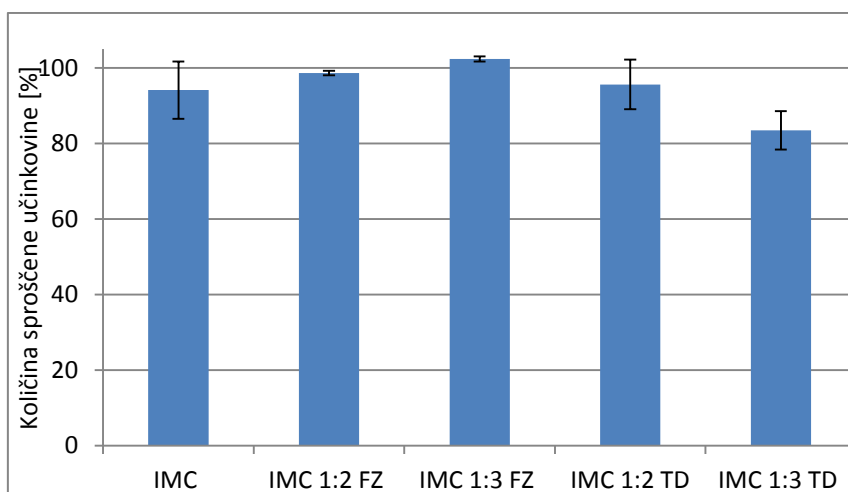
#### 4.5.3 Sproščanje indometacina

Na Slika 19 lahko vidimo, da smo z vgradnjo indometacina v porozni nosilec povečali njegovo hitrost raztapljanja. Povečana hitrost raztapljanja indometacina iz FZ in TD je verjetno posledica adsorpcije ZU na nosilec in posledično boljšega močenja, v primeru TD pa k temu pripomore tudi amorfnost oblika ZU. Vidimo, da se je v prvi pol uri sprostil 80 % indometacina v primeru TD 1 : 3 ter 90 % indometacina v primeru TD 1 : 2. Delež sproščene učinkovine pa tudi po 24 urah ni bistveno narasel (Slika 20). Z večanjem deleža silikagela v TD se je povečal tudi delež nesproščene učinkovine. Podobne rezultate so dobili tudi Linnell in sodelavci. Ugotovili so, da se je po 1 uri raztapljanja TD Syloida® 244 FP EU s 30 % vsebnostjo indometacina v fosfatnem pufru s pH = 5,5 sprostil zgolj 75 % učinkovine, nato pa je prišlo do upočasnitve sproščanja (34). V prvi pol uri se je iz fizikalnih zmesi sprostil manj ZU kot iz TD (Slika 19), vendar se je, kot lahko vidimo na Slika 20, po 24 urah iz obeh fizikalnih zmesi sprostila vsa učinkovina. Kot smo že omenili pri predhodno obravnavanih trdnih disperzijah, se večina učinkovine v FZ nahaja v porah nosilca temveč na površini, posledično je tudi manjši delež učinkovine v stiku s površino nosilca. Watanabe in sodelavci so na podlagi premikov vrhov na NMR spektrih dokazali, da se med karboksilno skupino indometacina in Syloidom tvorijo vodikove vezi (37). Te lahko stabilizirajo amorfnost oblika indometacina, kar ima za posledico hitrejše sproščanje, vendar lahko tudi pripomorejo k ujetju indometacina v pore nosilca. Teh interakcij nam ni uspelo dokazati s FTIR spektroskopijo, vendar lahko na podlagi profilov

sproščanja sklepamo, da so v določeni meri kljub temu prisotne. To se nakazuje iz opazanja, da se hitrost sproščanja indometacina zmanjšuje z višanjem deleža Syloida v TD, hkrati pa se povečuje tudi delež nesproščene ZU.



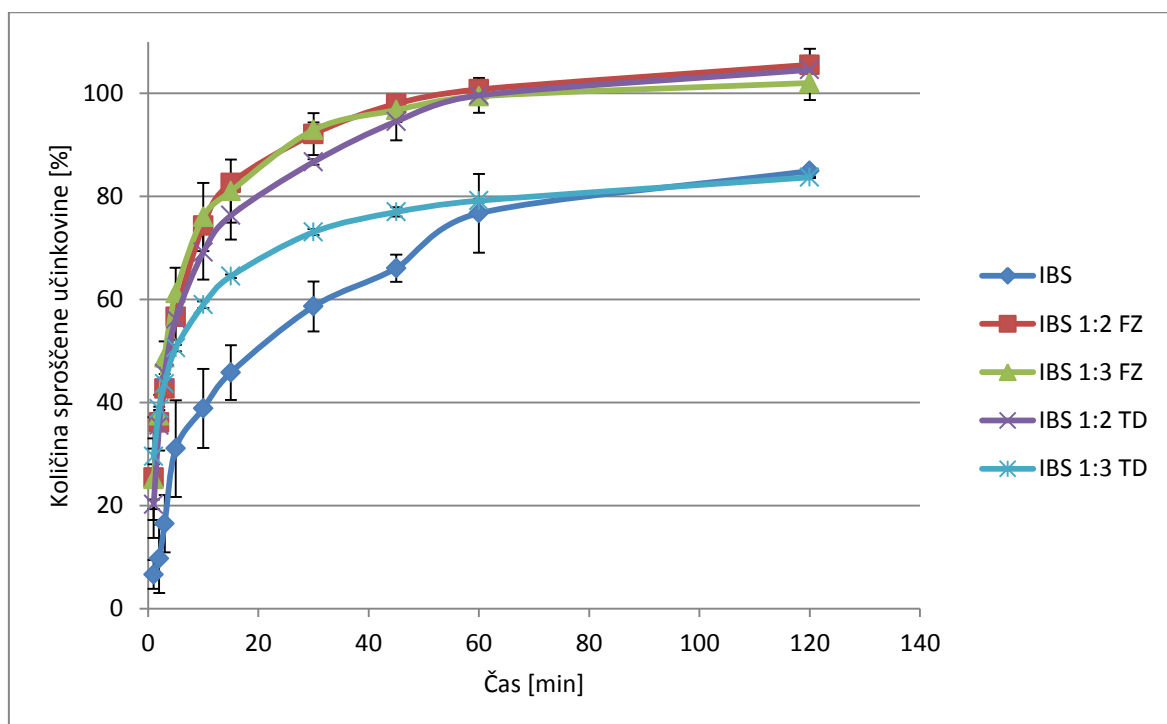
**Slika 19:** Profili raztapljanja kristalnega IMC, IMC iz fizikalnih zmesi in IMC iz trdnih disperzij. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.



**Slika 20:** Primerjava količin sproščene kristalnega IMC, IMC iz fizikalnih zmesi in IMC iz trdnih disperzij po 24 h. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

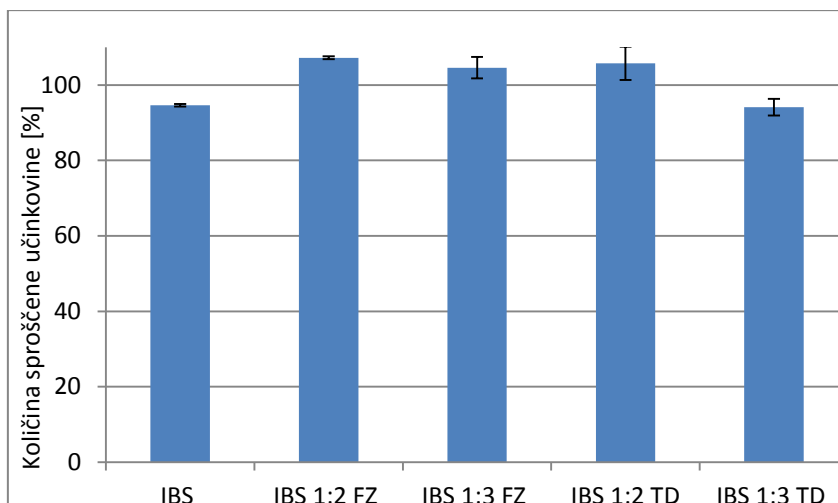
#### 4.5.4 Sproščanje irbesartana

Iz Slika 21 je razvidno, da smo z vgradnjo irbesartana v TD povečali njegovo hitrost raztapljanja. Eden izmed razlogov za boljše raztapljanje je pretvorba večine irbesartana v amorfno obliko. Chawla in Bansal sta ugotovila, da je topnost amorfne oblike irbesartana pri pH = 6,8 kar sedemkrat večja od topnosti kristalne oblike (9). Opazimo lahko tudi, da se učinkovina iz fizikalne zmesi (FZ) v razmerju IBS : Syloid = 1 : 3 sprošča hitreje kot TD z enako vsebnostjo ZU. To je posledica pojava lokalizacije ZU, ki smo ga opisali že pri predhodnih učinkovinah. Na Slika 22 lahko vidimo, da se je po 24 urah sprostil več kot 95 % učinkovine iz vseh vzorcev. ZU torej ni ostala ujeta v porah nosilca. Na podlagi počasnejšega sproščanja ZU iz TD v primerjavi z FZ lahko sklepamo, da so vodikove vezi med ZU in nosilcem, ki smo jih dokazali s FTIR spektroskopijo upočasnile sproščanje učinkovine. K temu so verjetno pripomogle tudi ozke pore Syloida, ki so upočasnile difuzijo ZU v medij.



**Slika 21:** Profili raztapljanja kristalnega IBS, IBS iz fizikalnih zmesi in IBS iz trdnih disperzij. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.





**Slika 22:** Primerjava količin sproščene kristalnega IBS, IBS iz fizikalnih zmesi in IBS iz trdnih disperzij po 24 h. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

#### 4.5.5 Primerjava sproščanja proučevanih ZU

Topnost in hitrost raztapljanja učinkovin, ki smo jih vgradili v trdne disperzije so izboljšali že nekateri drugi avtorji (celekoksib - 64, 68, 69; glibenklamid - 54, 70, 71; irbesartan - 6, 16, 80; indometacin - 2, 34, 63, 71). Za lažjo primerjavo in boljše razumevanje mehanizmov in profilov sproščanja posameznih učinkovin smo morali najprej poznati njihove fizikalno-kemijske lastnosti. Zanimala nas je predvsem velikost molekul, število donorjev in akceptorjev vodikove vezi, delež polarne površine, porazdelitveni koeficient molekul in pa tudi delež učinkovine v trdni disperziji, ki se nahaja v stiku z nosilcem.

Hidrofobnost neke spojine lahko opišemo z logaritmom porazdelitvenega koeficienta ( $\log P_{o/v}$ ), ki predstavlja logaritem razmerja molarnih koncentracij neionizirane spojine v oktanolu in vodi. Določimo ga lahko eksperimentalno s porazdelitveno ali kromatografsko metodo, lahko pa ga tudi izračunamo kot vsoto hidrofobnih prispevkov posameznih strukturnih fragmentov te molekule (72). Na podlagi  $\log P_{o/v}$  lahko sklepamo, kakšen tip interakcij lahko tvori določena molekula ali njen fragment. Negativne vrednosti kažejo na to, da je molekula hidrofilna oz. polarna in bo posledično najboljše interagirala z drugimi polarnimi molekulami. Pozitivne vrednosti predstavljajo hidrofobne molekule. Z velikostjo  $\log P_{o/v}$  se poveča tudi moč potencialnih interakcij (73).  $\log P_{o/v}$  vrednosti proučevanih ZU so navedene v Preglednica IX, pridobili smo jih iz podatkovne baze Drugbank (74). Na podlagi teh vrednosti lahko sklepamo, da so vse štiri učinkovine močno hidrofobne in

posledično zelo slabo topne v vodi. Nekoliko izstopa irbesartan, ki je glede na LogP izmed vseh učinkovin najbolj hidrofoben.

**Preglednica IX:** Fizikalno kemijske lastnosti ZU.  $S_{H_2O}$  je topnost ZU v vodi,  $S_{medij}/m_{ZU}$  pa je razmerje med topnostjo ZU v mediju in maso ZU, ki smo jo zatehtali pri testu raztapljanja.

Učinkovina	Mol. masa	pKa	logP	$S_{H_2O}$ [mg/l]	$S_{medij}/m_{ZU}$
<b>Celekoksib</b>	381,37	11,1 <sup>64</sup>	3,90 <sup>74</sup>	3,3 <sup>74</sup>	12,18
<b>Glibenklamid</b>	494,00	5,3 <sup>67</sup>	4,70 <sup>74</sup>	4,0 <sup>74</sup>	15,92
<b>Indometacin</b>	357,79	4,5 <sup>67</sup>	4,27 <sup>74</sup>	0,94 <sup>74</sup>	29,15
<b>Irbesartan</b>	428,53	4,7 <sup>16</sup>	6,00 <sup>74</sup>	14,6 <sup>74</sup>	4,24

Med pomembne lastnosti zdravilnih učinkovin spada tudi velikost polarne površine (angl. polar surface area - PSA). Na podlagi PSA lahko predvidimo permeabilnost določene ZU v telesu. ZU, ki imajo PSA manjši od 140 Å<sup>2</sup>, bodo imele dobro permeabilnost (75, 76). V naši raziskavi nas je zanimalo, ali obstaja povezava med velikostjo oz. deležem polarne površine ZU in profilom sproščanja ZU iz trdne disperzije. Za izračun PSA smo uporabili program ChemAxon, ki so ga v svojih člankih uporabili že nekateri drugi avtorji (77, 78). Podatke lahko vidimo v Preglednica X. Opazimo, da se deleži PSA med posameznimi ZU bistveno ne razlikujejo, nekoliko odstopata le indometacin in irbesartan, na podlagi česar lahko sklepamo, da bosta imeli ti molekuli najšibkejše VDW interakcije s površino nosilca.

**Preglednica X:** Lastnosti ZU predvidene v programu ChemAxon.

Učinkovina	Premer [nm]	H-vez don./akc.	Polarna površina [Å <sup>2</sup> ]	Nepolarna površina [Å <sup>2</sup> ]	Delež polarne površine [%]
<b>Celekoksib</b>	1,24	1/3	77,98	407,44	16,06
<b>Glibenklamid</b>	1,49	3/5	113,60	579,39	16,39
<b>Indometacin</b>	1,23	1/4	68,53	407,52	14,40
<b>Irbesartan</b>	1,42	1/5	87,13	549,72	13,68

Z uporabo spodnjih enačb, ki so jih predstavili Ohta in sodelavci (36), smo izračunali teoretično količino zdravilne učinkovine vezane v monosloju;  $W$  (mg ZU/g nosilca):

$$S_{ZU} = 2\sqrt{3} \times r^2 \quad (\text{Enačba 6})$$

$$W = \frac{S_{\text{Syloid}} \times M}{S_{ZU} \times N_A} \quad (\text{Enačba 7})$$

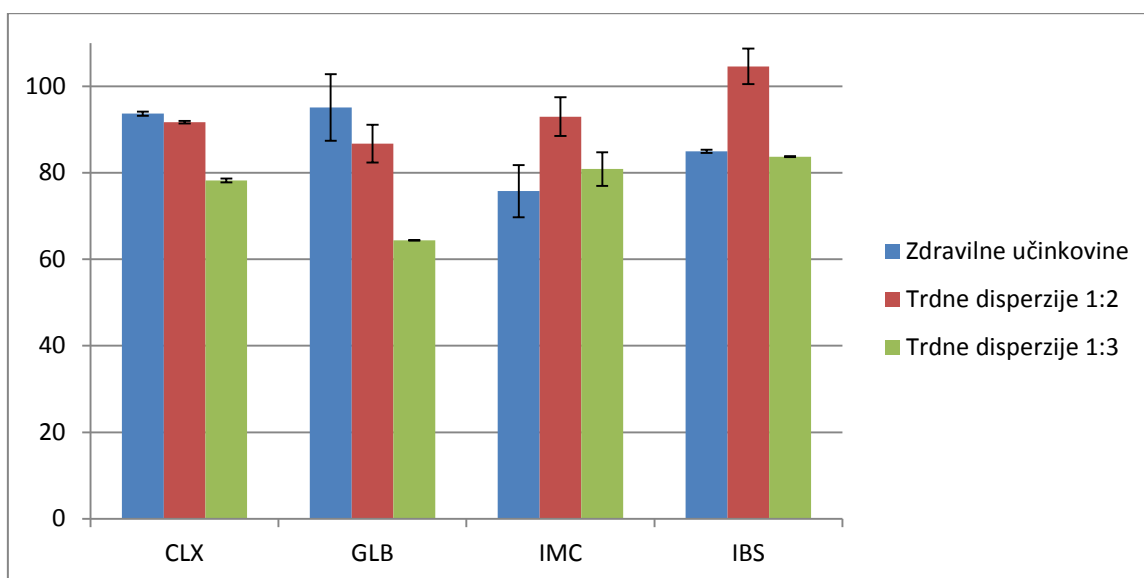
kjer je  $S_{ZU}$  ( $\text{m}^2$ ) površina prereza molekule ZU,  $r$  (m) je polmer molekule ZU,  $S_{\text{Syloid}}$  ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) je specifična površina Syloida<sup>®</sup> 244 FP,  $M$  (g/mol) je molska masa ZU in  $N_A$  ( $\text{mol}^{-1}$ ) Avogadrovo število. Polmere molekul smo izračunali iz podatka o VDW površini molekule, ki smo ga pridobili s programom ChemAxon, pri izračunu polmera pa smo predpostavili, da ima molekula obliko krogle. Podatek o površini Syloida<sup>®</sup> 244 FP so objavili Jesionowski in sodelavci (46), določili so ga z Brunauer-Emmett-Tellerjevo metodo adsorpcije dušika. Teoretične deleže ZU v monosloju v posamezni TD smo izračunali glede na vsebnost ZU v TD in jih označili z  $\alpha_{1:2}$  in  $\alpha_{1:3}$  (Preglednica XI).

**Preglednica XI:** Delež ZU, ki se teoretično veže v obliki monosloja na porozni  $\text{SiO}_2$ .

Učinkovina	$r$ [nm]	$M$ [g/mol]	$W$ [mg/g]	$\alpha_{1:2}$ [%]	$\alpha_{1:3}$ [%]
<b>Celekoksib</b>	0,62	381,37	148,66	33,60	41,77
<b>Glibenklamid</b>	0,74	494,00	134,88	26,86	38,51
<b>Indometacin</b>	0,62	357,79	142,21	25,13	35,75
<b>Irbesartan</b>	0,71	428,53	127,32	20,93	30,56

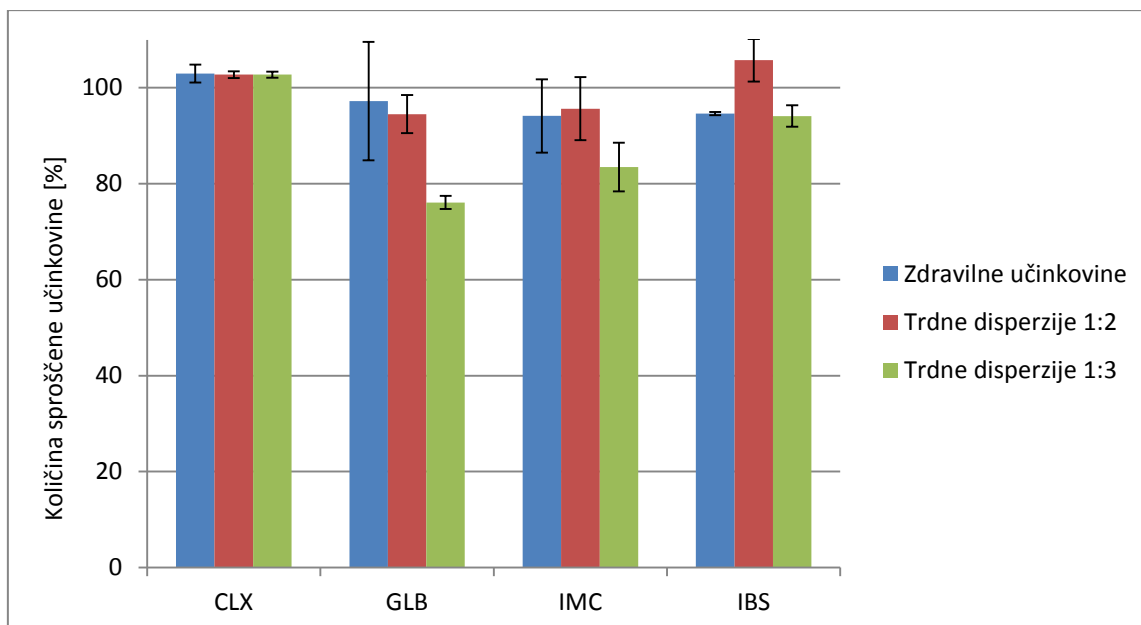
Na Slika 23 lahko vidimo, da nam je z vgradnjo učinkovine v trdno disperzijo v primeru indometacina in irbesartana uspelo povečati njeno hitrost raztapljanja. Razlogi za hitrejše sproščanje so višja specifična površina, molekularna disperzija oz. amorfna oblika učinkovine in boljše močenje. Pričakovali bi torej, da bo sproščanje hitrejše tudi v primeru celekoksiba in glibenklamida vendar do tega ni prišlo. Slabšo topnost amorfne oblike celekoksiba smo že omenili v predhodnem poglavju, vendar pa to ni edini razlog za počasnejše sproščanje iz TD. V Preglednica IX so našteje pKa vrednosti vseh učinkovin. Vidimo lahko, da imajo glibenklamid, indometacin in irbesartan pKa v območju 4,5–5,3, kar pomeni, da je pri pH vrednosti 6,8 večji delež teh učinkovin ioniziran, in sicer negativno nabit. Nad pH 2 je negativno nabita tudi površina silike, pri tej vrednosti se namreč deprotonirajo izolirani silanoli (40, 41). Posledica tega je odboj med učinkovino in nosilcem, kar lahko pospeši desorpcijo učinkovine in poveča hitrost raztapljanja (71). pKa vrednost celekoksiba znaša 11,1, kar pomeni, da je molekula celekoksiba pri pH 6,8

neionizirana, zaradi česar ne pride do hitre desorpcije. Kljub temu pa se po 24 urah iz trdne disperzije sprosti ves celekoksib. Interakcije med nosilcem in celekoksibom torej niso bile dovolj močne, da bi ta ostal ujet v porah nosilca. To smo dokazali tudi s FTIR analizo, saj med celekoksibom in nosilcem nismo zaznali vodikovih vezi. Zanimiva je tudi ugotovitev, da so deleži sproščene učinkovine po 2h in tudi 24h manjši pri trdnih disperzijah z večjo vsebnostjo Syloida. Pričakovali bi, da se z večanjem deleža poroznega nosilca izboljša močenje in poveča specifična površina, ki je na voljo za raztapljanje, ter posledično poviša hitrost raztapljanja, vendar temu ni tako. Razloga za to sta daljši čas difuzije skozi pore nosilca in interakcije med Syloidom in ZU, ki s povišanjem deleža silikagela pridejo bolj do izraza, poveča se namreč delež učinkovine, ki je v stiku s površino nosilca (Preglednica XI).



**Slika 23:** Primerjava deležev sproščene kristalne ZU in ZU iz trdnih disperzij po 2h. Intervali napak predstavljajo standardno deviacijo.

Na Slika 24 lahko vidimo, da se je izmed vseh izdelanih trdnih disperzij, najmanjši delež učinkovine sprostil iz TD glibenklamida v sestavi GLB : Syloid = 1 : 3. Razlogov za takšen rezultat je kar nekaj. V Preglednica IX lahko vidimo, da ima izmed vseh ZU glibenklamid največji premer, delež polarne površine in tudi največ funkcionalnih skupin, ki lahko tvorijo vodikove vezi. Velik premer prispeva k večji sterični oviranosti pri difuziji iz por. Polarna površina pa pripomore k močnejšim VDW interakcijam. Poleg tega smo že pri testu hitrosti pronicanja ugotovili, da je to najpočasnejše ravno pri TD, ki vsebujejo glibenklamid.



**Slika 24:** Primerjava deležev sproščene kristalne ZU in ZU iz trdnih disperzij po 24h.

#### 4.6 Določanje kinetike sproščanja

Profilom sproščanja kristalne učinkovine, fizikalne zmesi in trdne disperzije vseh štirih ZU smo določili kinetiko sproščanja. Ugotovili smo, da v primeru fizikalnih zmesi in trdnih disperzij takoj po začetku raztapljanja pride do efekta hipnega sproščanja. Velik del učinkovine se tako sprosti že v prvi minuti, medtem ko se preostanek učinkovine sprošča veliko počasneje. Na podlagi ekstrapolacije premice deleža sproščene učinkovine v odvisnosti od korena časa do časa 0 smo določili delež učinkovine, ki se sprosti v času hipnega sproščanja (Slika 25). Tega deleža nato pri določanju kinetike nismo upoštevali. Primeren model sproščanja ZU smo določili s pomočjo AIC kriterija (Akaike Information Criterion), ki so ga v svoji raziskavi uporabili že Locatelli in sodelavci (79). Uporabili smo verzijo AIC kriterija, ki je primeren za majhno število vzorcev ( $AIC_C$ ) in ga izračunamo po sledeči enačbi:

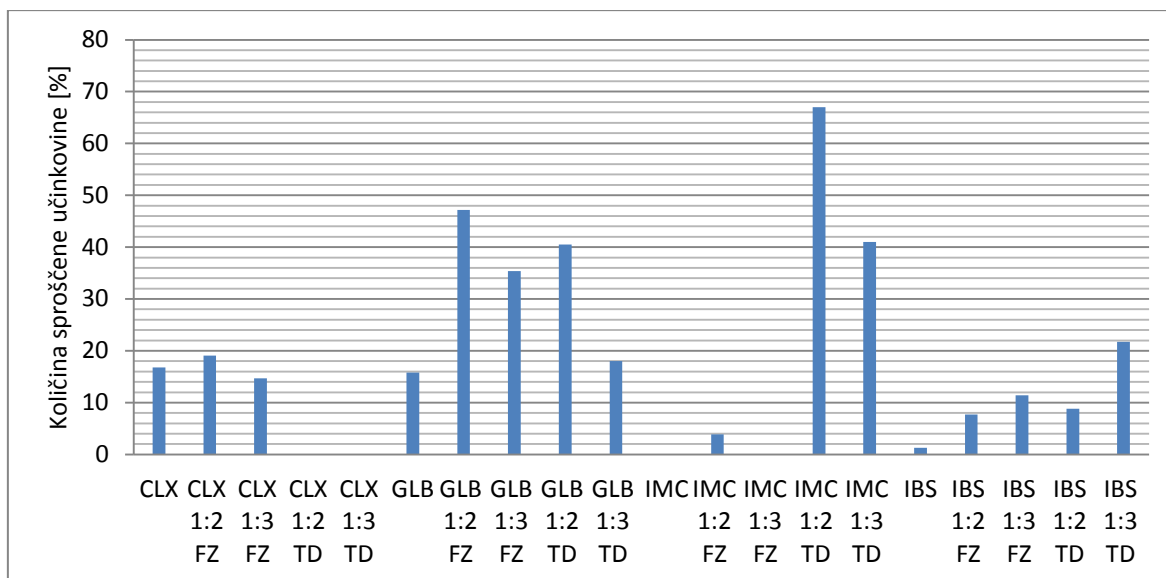
$$AIC_C = n \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [Q_{op}(t_i) - Q_{pred}(t_i)]^2 \right) + \frac{2pn}{(n-p-1)} \quad (\text{Enačba 8})$$

kjer parameter  $n$  predstavlja število vzorčenj,  $p$  je število parametrov modela,  $Q_{op}(t_i)$  in  $Q_{pred}(t_i)$  pa sta opazovana in predvidena količina sproščene ZU pri času  $t$ .  $AIC_C$  kriterij predstavlja relativno verjetnost modela, z njegovo pomočjo lahko ocenimo relativni delež

izgubljenih informacij, kadar z določenim modelom opišemo nek proces. Nižja vrednost  $AIC_C$  torej kaže na boljše prilaganje modela (Preglednica XII). Vrednosti parametrov za posamezen model smo določili s pomočjo programa Reševalnik, ki je del programa Microsoft Excel 2010.

**Preglednica XII:** Določanje kinetike sproščanja. Osenčena polja pripadajo najnižjim  $AIC_C$  vrednostim za posamezen vzorec.

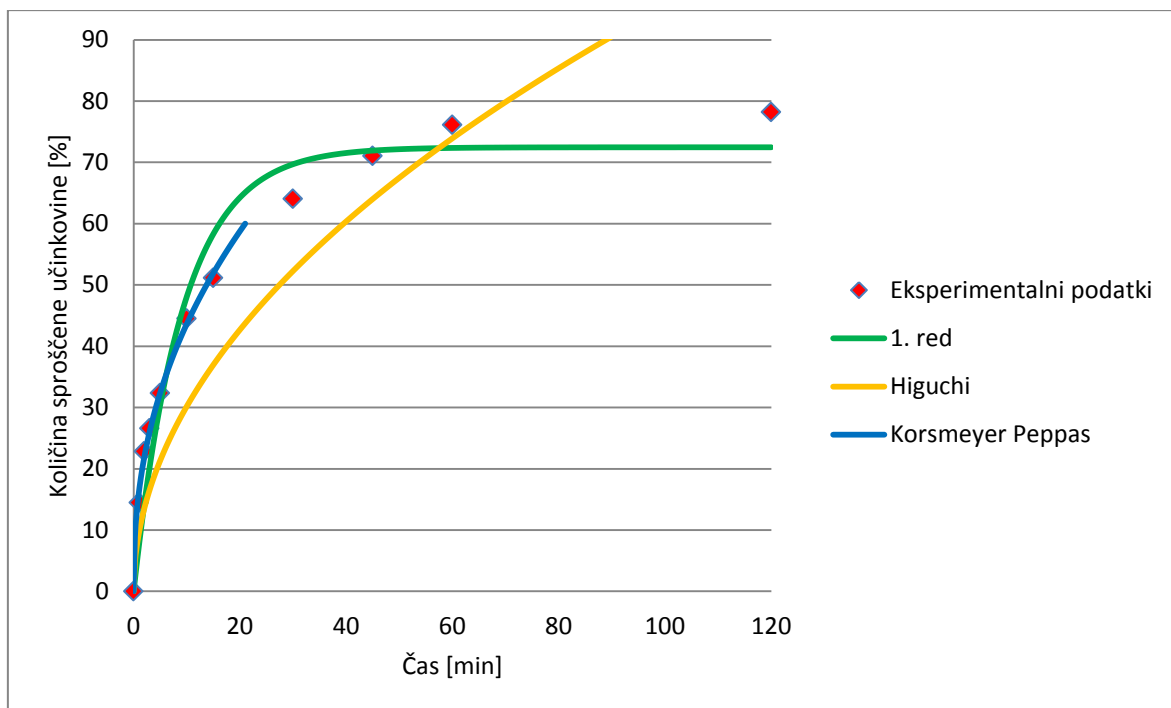
Vzorec	Prvi red		Higuchi		Korsmeyer peppas		
	$AIC_C$	$K$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$AIC_C$	$K$ ( $\%/ \text{min}^{-0.5}$ )	$AIC_C$	$K$	$n$
CLX	13,834	0,362	12,288	16,873	6,724	23,387	0,343
CLX 1:2 FZ	16,630	0,051	6,435	6,990	9,317	6,556	0,518
CLX 1:3 FZ	16,517	0,064	8,086	8,003	11,058	8,459	0,484
CLX 1:2 TD	10,133	0,051	11,078	9,170	-8,926	5,794	0,666
CLX 1:3 TD	12,260	0,257	6,740	13,995	6,455	16,241	0,429
GLB	12,262	0,598	24,371	22,759	/	/	/
GLB 1:2 FZ	17,774	0,200	24,723	6,311	18,031	17,230	0,244
GLB 1:3 FZ	16,804	0,204	17,674	9,606	16,754	16,295	0,329
GLB 1:2 TD	7,944	0,354	17,132	10,846	14,511	20,308	0,261
GLB 1:3 TD	9,788	0,411	16,121	9,106	12,870	17,556	0,249
IMC	8,789	0,074	9,202	9,341	12,418	8,797	0,519
IMC 1:2 FZ	10,804	0,259	8,797	17,129	11,037	19,560	0,437
IMC 1:3 FZ	9,695	0,207	4,805	15,363	8,981	15,522	0,495
IMC 1:2 TD	8,133	0,208	19,802	3,386	15,587	9,434	0,239
IMC 1:3 TD	8,955	0,189	13,939	7,377	14,114	12,039	0,348
IBS	12,264	0,114	12,317	11,212	16,012	10,763	0,515
IBS 1:2 FZ	10,033	0,232	5,867	20,891	9,354	19,399	0,543
IBS 1:3 FZ	6,716	0,233	9,552	20,504	13,945	18,495	0,560
IBS 1:2 TD	9,309	0,254	10,096	19,493	14,889	18,143	0,542
IBS 1:3 TD	14,795	0,141	19,104	8,874	16,662	15,480	0,338



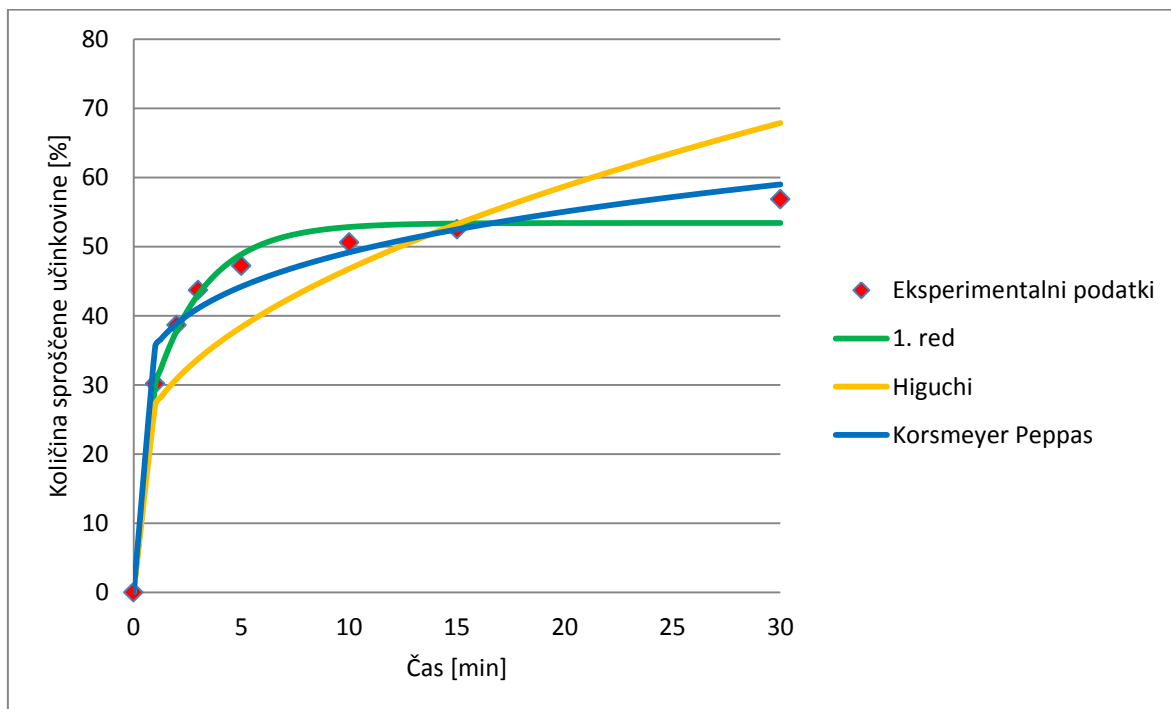
**Slika 25:** Količina zdravilne učinkovine, ki se je sprostila v »hipni« fazi in je posledično nismo upoštevali pri določanju kinetike sproščanja.

Kot smo že omenili v uvodnem poglavju, lahko na podlagi parametra  $n$ , ki ga izračunamo s pomočjo Korsmeyer-Peppasove enačbe, določimo mehanizem sproščanja učinkovine iz trdnih disperzij. In sicer kadar je  $n$  manjši od 0,5, sproščanje poteka po Fickovi difuziji, kadar pa se nahaja med 0,5 in 1 lahko mehanizem sproščanja opišemo kot ne-Fickova, anomalna difuzija. Pri vseh TD je parameter manjši od 0,5, razen v primeru 1 : 2 CLX TD in 1 : 2 IBS. Obe trdni disperziji vsebujeta kristalne delce ZU, zato predvidevamo, da so kristali na površini začetkov por upočasnili difuzijo ZU iz por nosilca.

Na podlagi  $AIC_C$  vrednosti, ki so navedene v Preglednica XII, lahko sklepamo, da sproščanje kristalnih učinkovin in trdnih disperzij glibenklamida, indometacina in irbesartana najboljše opišemo s kinetiko prvega reda. Izjema je celekoksib, ki ustreza Korsmeyer-Peppasovemu modelu. Na Slika 26 lahko vidimo prileganje različnih kinetik sproščanja z eksperimentalnimi podatki za TD v razmerju 1 : 3. Pri disperzijah glibenklamida, indometacina in irbesartana pride tudi do hipnega v prvi minuti sproščanja.

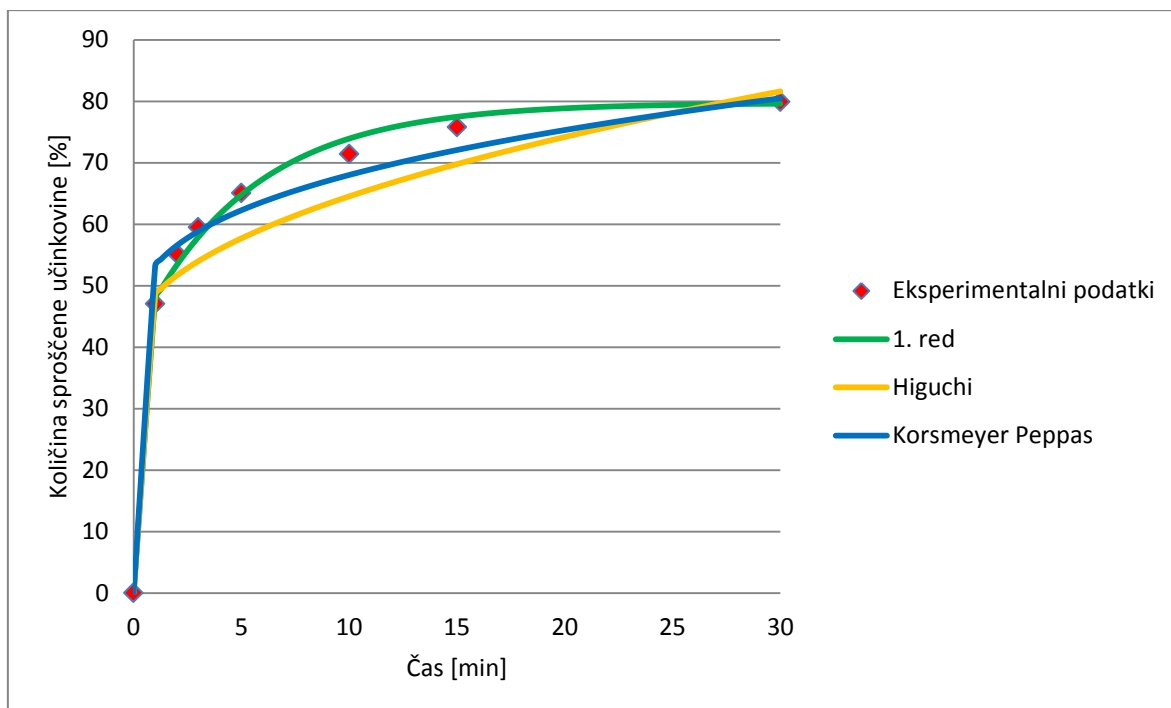


**Slika 26:** Grafična primerjava kinetik sproščanja za CLX 1:3 TD. S Korsmeyer-Peppasovo kinetiko lahko kadar ne pride do hipnega sproščanja opišemo zgolj prvih 60% sproščanja.

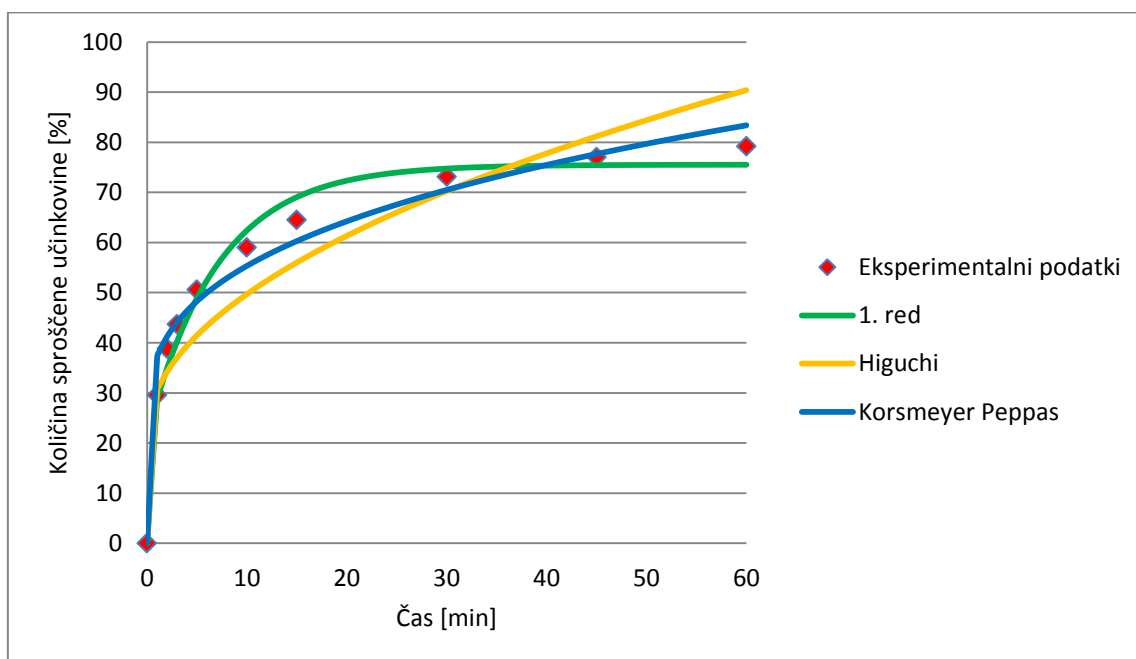


**Slika 27:** Grafična primerjava kinetik sproščanja za GLB 1:3 TD.





**Slika 28:** Grafična primerjava kinetik sproščanja za IMC 1:3 TD.



**Slika 29:** Grafična primerjava kinetik sproščanja za IBS 1:3 TD.

Na podlagi profilov in kinetik sproščanja smo predvideli, da sproščanje ZU iz trdnih disperzij, ki vsebujejo Syloid<sup>®</sup> 244 FP, poteka v treh fazah. V prvi fazi, ki smo jo poimenovali »hipna« faza, se sprosti učinkovina, ki se nahaja na zunanji površini delcev Syloida. V tem delu, ki obsega prvo minuto sproščanja, se sprosti med 10 % in 65 % učinkovine, delež je odvisen od vrste ZU in njene vsebnosti. Ta faza največ pripomore k hitrejšemu raztapljanju iz trdnih disperzij v primerjavi s kristalno učinkovino. V primeru TD celekoksiba je ne opazimo zaradi slabše topnosti amorfne oblike celekoksiba in dejstva, da je molekula celekoksiba pri pH = 6,8 v neionizirani obliki. V drugi fazi poteka raztapljanje manjših amorfnih in kristalnih delcev iz mezopor. Ta del traja od prve minute pa do 30 minute v primeru TD indometacina, 60 minute v primeru TD glibenklamida in irbesartana oz. do 120 minute v primeru TD celekoksiba. V tretji fazi poteka desorpcija in sproščanje učinkovine, ki se nahaja v monosloju na površini mezopor in mikropor nosilca. V tej fazi je sproščanje učinkovine upočasnjeno zaradi interakcij med površino poroznega nosilca in molekulami ZU. Adsorpcijski potenciali nasprotnih sten mikropor se zaradi neposredne bližine prekrivajo, zato so interakcije med molekulami učinkovine in površino nosilca še močnejše, k upočasnitvi sproščanja pa prispevajo tudi ozke pore, ki ovirajo difuzijo učinkovine. To je najbolj opazno v primeru trdnih disperzij glibenklamida in indometacina v razmerju 1 : 3 pri katerih lahko vidimo, da se tudi po 24 urah ni sprostila vsa učinkovina. Glibenklamid tvori najmočnejše interakcije s površino nosilca v primerjavi z drugimi uporabljenimi ZU, posledično lahko pri tej ZU opazimo najboljše ujemanje med deležem glibenklamida v TD 1 : 3, ki se nahaja v monosloju (38,5 %) (Preglednica XI) in deležem glibenklamida, ki se je sproščal v tretji fazi (39,6 %) in je v določeni meri ostal nesproščen. Pri ostalih treh učinkovinah je delež učinkovine v monosloju višji od deleža učinkovine, ki se je sproščala v tretji fazi. Razloga za to sta delna desorpcija učinkovine v prvih dveh fazah sproščanja in šibkejše interakcije ZU s površino nosilca.

## 5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo preučevali sproščanje štirih modelnih učinkovin iz mezoporoznega nosilca z neurejeno strukturo por, imenovanega Syloid<sup>®</sup> 244 FP. Pri tem smo uporabili slabo topne učinkovine z raznoliko kemijsko strukturo, za vsako zdravilno učinkovino (ZU) smo izdelali trdne disperzije (TD) z dvema različnima koncentracijama učinkovine. Dokazali smo, da kemijska struktura ZU vpliva na interakcije s površino nosilca in posledično tudi na sproščanje. Prisotnost interakcij, med katere štejejo predvsem vodikove vezi, smo potrdili s FTIR spektroskopijo.

S pomočjo termične analize smo dokazali, da se večji del učinkovine v vseh izdelanih TD nahaja v amorfni obliki. Nekoliko višji delež kristalne oblike v primerjavi z ostalimi TD so imele disperzije irbesartana, ki je najslabše topen etanolu, ki smo ga uporabili pri njihovi izdelavi, iz česar lahko sklepamo, da je dobra topnost v topilu za izdelavo TD predpogoj za amorfizacijo učinkovine. K čim bolj popolni amorfnosti pripomorejo tudi interakcije ZU s površino nosilca, ki preprečijo kristalizacijo učinkovine med izdelavo TD.

Z izdelavo TD smo izboljšali raztapljanje indometacina in irbesartana in tako potrdili primernost uporabe Syloida<sup>®</sup> 244 FP za izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin. Pri tem smo ugotovili, da je pogoj za izboljšanje topnosti ZU veliko boljša topnost amorfne oblike v primerjavi s kristalno, pomembno pa je tudi, da je ZU pri pogojih raztapljanja negativno nabita. Tako namreč pospešimo desorpcijo s površine poroznega nosilca zaradi odboja med negativno nabito površino nosilca in učinkovino. K izboljšanju raztapljanja prispevajo tudi povečanje specifične površine in boljše močenje učinkovine, ki smo ga dokazali z merjenjem pronicanja kapljice vode.

Ugotovili smo, da se učinkovina iz TD disperzij sprošča v treh fazah, izmed katerih je prva faza (imenovana tudi »hipna« faza) tista, ki je odgovorna za boljše raztapljanje učinkovine iz TD v primerjavi s kristalno učinkovino. Kadar želimo povečati hitrost raztapljanja ZU, moramo maksimirati delež učinkovine, ki se sprosti v tej fazi. To nam je uspelo v primeru TD indometacina v razmerju 1 : 2. V prvih 20 minutah se je pri tej TD sprostilo dvakrat več indometacina v primerjavi z raztapljanjem kristalne učinkovine. Delež sproščene ZU je že po 30 min dosegel 90 %. Indometacin je torej najboljši primer izboljšanja raztapljanja težko topnih učinkovin z vgrajevanjem v TD s poroznim nosilcem. Ima dobro topnost amorfne oblike, ki je znotraj nosilca stabilizirana s pomočjo interakcij s površino nosilca,

visok delež indometacina se sprostí že v »hipni« fazi, ob pravšnji koncentraciji nosilca pa lahko preprečimo, da bi se učinkovina nahajala v mikroporah nosilca in tako zagotovimo njeno popolno sproščanje. Za potrditev predpostavke o mehanizmu sproščanja težko topnih učinkovin iz mezoporoznih nosilcev in boljše razumevanje interakcij, ki se tvorijo med učinkovino in površino nosilcev so potrebne nadaljnje raziskave z večjim naborom učinkovin.

## 6 LITERATURA

1. 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 (4): 1338–1349.
2. Wang F, Hui H, Barnes TJ, Barnett C, Prestidge CA. Oxidized mesoporous silicon microparticles for improved oral delivery of poorly soluble drugs. *Mol Pharm* 2009; 7 (1): 227-236.
3. Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 47–60.
4. Planinšek O. Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin. *Farm Vestn* 2009; 60: 169–175.
5. Planinšek O. Nekaterne metode za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin – 2. del. *Farm Vestn* 2002; 53: 117–127.
6. Chawla G, Bansal AK. Improved dissolution of a poorly water soluble drug in solid dispersions with polymeric and non-polymeric hydrophilic additives. *Acta Pharm* 2008; 58: 257–274.
7. Dhirendra K, Lewis S, Udupa N, Atin K. Solid dispersions: A Review. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22 (2): 234–246.
8. Vallet-Regi M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int* 2007; 46: 7548–7558.
9. Chawla G, Bansal AK. A comparative assessment of solubility advantage from glassy and crystalline forms of a water insoluble-drug. *Eur J Pharm Sci* 2007; 32: 45-57.
10. Gupta P, Chawla G, Bansal AK. Physical stability and solubility advantage from amorphous celecoxib: the role of thermodynamic quantities and molecular mobility. *Mol Pharm* 2004; 1 (6): 406-413.
11. Otsuka M, Tokumitsu K, Matsuda Y. Solid dosage form preparations from oily medicines and their drug release. Effect of degree of surface-modification of silica gel on the drug release from phytonadione-loaded silica gels. *J Controlled Release* 2000; 67: 369-384.
12. Bansal SS, Kaushal AM, Bansal AK. Molecular and thermodynamic aspects of solubility advantage from solid dispersions. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 794–802.

13. Kovačič B. Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
14. Yeo SD, Kiran E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J Supercrit Fluids* 2005; 34: 287-308.
15. 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.
16. Khanfar M, Farres MM, Salem MS, Qandil AM. Mesoporous silica based macromolecules for dissolution enhancement of irbesartan drug using pre-adjusted pH method. *Microporous Mesoporous Mater* 2013; 173: 22-28.
17. Gaburro Z, Daldosso N, Pavesi L: Porous Silicon. Dostopno na strani (29.8.2013): <http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=14&ved=0CD8QFjADOAo&url=http%3A%2F%2Fwww.science.unitn.it%2F~semicon%2Farchive%2Fencyclo.pdf&ei=5YAfUvraGqGu4ASFvIHwCg&usq=AFQjCNHozlt4yjfeArkgXNzGMpFowv-hgA&bvm=bv.51495398,d.bGE>
18. Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm* 2011; 406: 41-48.
19. Mali G, Planinšek O, Ukmar T. Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij. *Farm vestn* 2009; 60: 313–318.
20. Qian KK, Bognera RH. Application of mesoporous silicon dioxide and silicate in oral amorphous drug delivery systems. *J Pharm Sci* 2012; 101: 444–463.
21. Barbé C, Barlett J, Kong L, Finnie K, Lin HQ, Larkin M, Calleja S, Bush A, Calleja G. Silica particles: a novel drug-delivery system. *Adv Mater* 2004; 16 (21): 1959-1966.
22. 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.
23. Ahola M, Korteso P, Kangasniemi I, Kiesvaara J, Yli-Urpo A. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *Int J Pharm* 2000; 195: 219–227.

24. Radin S, Ducheyne P, Kamplain T, Tan BH. Silica sol–gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 313–320.
25. Planinšek O. Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin. *Farm vestn* 2006; 57: 155–161.
26. Xu W, Riikonen J, Lehto VP. Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2012; 453: 181-197.
27. Ukmar T. Proučevanje mehanizmov vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine iz urejenih mezoporoznih silikatov. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
28. Speybroeck MV, Barillaro V, Thi TD, Mellaerts R, Martens J, Humbeeck JV, Vermant J, Annaert P, Mooter GVD, Augustijns P. Ordered mesoporous silica material SBA-15: a broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs. *J Pharm Sci* 2009; 98 (8): 2648-2658.
29. Zhuravlev LT. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 2000; 173: 1-38.
30. Linnell 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.
31. Song SW, Hidajat K, Kawi S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* 2005; 21: 9568-9575.
32. Rosenholm JM, Czuryzkiewicz T, Kleitz F, Rosenholm JB, Lindén M. On the nature of the bronsted acidic groups on native and functionalized mesoporous siliceous SBA-15 as studied by benzylamine adsorption from solution. *Langmuir* 2007; 23 (8): 4315–4323.
33. Choi M, Kleitz F, Liu D, Lee HY, Ahn WS, Ryoo R. Controlled polymerization in mesoporous silica toward the design of organic-inorganic composite nanoporous materials. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 1924-1932.
34. Linnell T, Santos HA, Mäkilä E, Heikkilä T, Salonen J, Murzin DY, Kumar N, Laaksonen T, Peltonen L, Hirvonen J. Drug delivery formulations of ordered and nonordered mesoporous silica: comparison of three drug loading methods. *J Pharm. Sci* 2011; 100 (8): 3294–3306.

35. Heikkilä T, Salonen J, Tuura J, Hamdy MS, Mul G, Kumar N, Salmi T, Murzin DY, Laitinen L, Kaukonen AM, Hirvonen J, Lehto VP. Mesoporous silica material TUD-1 as a drug delivery system. *Int J Pharm* 2007; 331: 133-138.
36. 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.
37. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F, Ikeda M, Isobe T, Senna M. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm* 2001; 226: 81-91.
38. Hata H, Saeki S, Kimura T, Sugahara Y, Kuroda K. Adsorption of taxol into ordered mesoporous silicas with various pore diameters. *Chem Mater* 1999; 11: 1110-1119.
39. Smirnova I, Suttiruengwong S, Arlt W. Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems. *J Non-Cryst Solids* 2004; 350: 54-60.
40. Rosenholm JM, Lindén M. Towards establishing structure-activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. *J Controlled Release* 2008; 128: 157-164.
41. Rosenholm JM, Czuryzkiewicz T, Kleitz F, Rosenholm JB, Lindén M. On the nature of the bronsted acidic groups on native and functionalized mesoporous siliceous SBA-15 as studied by benzylamine adsorption from solution. *Langmuir* 2007; 23 (8): 4315-4323.
42. Muñoz B, Rámila A, Pérez-Pariente J, Díaz I, Vallet-Regí M. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chem Mater* 2003; 15 (2): 500-503.
43. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13: 123-133.
44. Heikkilä T, Salonen J, Tuura J, Kumar N, Salmi T, Murzin DY, Hamdy MS, Mul G, Laitinen L, Kaukonen AM, Hirvonen J, Lehto VP. Evaluation of mesoporous TCPSI, MCM-41, SBA-15 and TUD-1 materials as API carriers for oral drug delivery. *Drug Delivery* 2007; 14: 337-347.
45. Popovici RF, Seftel EM, Mihai GD, Popovici E, Voicu VA. Controlled drug delivery system based on ordered mesoporous silica matrices of captopril as angiotensin-converting enzyme inhibitor drug. *J Pharm Sci* 2011; 100 (2): 704-714.



46. Jesionowski T, Pokora M, Sobaszekiewicz K, Pernak J. Preparation and characterization of functionalized precipitated silica Syloid 244 using ionic liquids as modifiers. *Surf Interface Anal.* 2004; 36: 1491–1496.
47. Babonneau F, Yeung L, Steunou N, Gervais C, Ramila A, Vallet-Regi M. Solid state NMR characterisation of encapsulated molecules in mesoporous silica. *J Sol-Gel Sci Technol* 2004; 31: 219-223.
48. Lehto VP, Vähä-Heikkilä K, Paski J, Salonen J. Use of thermoanalytical methods in quantification of drug load in mesoporous silicon microparticles. *J Therm Anal Calorim* 2005; 80: 393-397.
49. Celebrex 100 mg trde kapsule, SMPC. Centralna baza zdravil. Dostopno na strani (30.9.2013): [www.cbz.si](http://www.cbz.si)
50. Lüllmann H, Hein L, Mohr K, Bieger D. *Color Atlas of Pharmacology*, 3rd edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
51. Brunton LL, Parker KL, Blumenthal KL, Buxton ILO. *Goodman's & Gillman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, 2008.
52. Daonil 5 mg tablete, SMPC. Centralna baza zdravil. Dostopno na strani (30.9.2013): [www.cbz.si](http://www.cbz.si)
53. Glibenclamide, Indomethacin and Irbesartan. In: *European Pharmacopoeia*, 7th Ed.
54. Chauhan B, Shimpi S, Paradkar A. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolizedglycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26: 219-230.
55. Indometacin Belupo 25 mg trde kapsule, SMPC. Centralna baza zdravil. Dostopno na strani (1.10.2013): [www.cbz.si](http://www.cbz.si)
56. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38 (3): 225-242.
57. Lakshmi KS, Rajesh T. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of glipizide, rosiglitazone, pioglitazone, glibenclamide and glimepiride in pharmaceutical dosage forms and human plasma. *J Iran Chem Soc* 2011; 8 (1): 31-37.
58. Ruidiaz MA, Delgado DR, Mora CP, Yurquina A, Martínez F. Estimation of the indomethacin solubility in ethanol + water mixtures by the extended Hildebrand solubility approach. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 2010; 39 (1): 79-95.

59. Syloid 244 FP Pharmaceutical Excipient, Datasheet. Dostopno na strani (2.10.2013):  
[www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M317\\_Syloid\\_244FP.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M317_Syloid_244FP.pdf)
60. Syloid FP Pharmaceutical Excipient, Technical Note. Dostopno na strani (2.10.2013):  
[www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M309\\_Syloid\\_Tech\\_Note\\_USver\\_LR.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M309_Syloid_Tech_Note_USver_LR.pdf)
61. Zvonar A, Rozman B, Bešter Rogač M, Gašperlin M. The influence of microstructure on celecoxib release from a pharmaceutically applicable system: Mygliol 812<sup>®</sup>/Labrasol<sup>®</sup>/Plurol Oleique<sup>®</sup>/Water mixtures. *Acta Chim Slov* 2009; 56: 131–138.
62. European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> Edition. 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms; 256-263.
63. Forster A, Hempenstall J, Rades T. Characterization of glass solutions of poorly watersoluble drugs produced by melt extrusion with hydrophilic amorphous polymers. *J Pharm Pharmacol* 2010; 53: 303-315.
64. Andrews GP, Abu-Diaka O, Kusmantob F, Hornsby P, Huia Z, Jones DS. Physicochemical characterization and drug-release properties of celecoxib hot-melt extruded glass solutions. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 1580–1590.
65. Panagopoulou-Kaplani A, Malamataris S. Preparation and characterisation of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. *Int J Pharm* 2000; 195: 239-246.
66. Wojnarowska Z, Grzybowska K, Adrjanowicz K, Kaminski K, Paluch M, Hawelek L, Wrzalik R, Dulski M. Study of the amorphous glibenclamide drug: analysis of the molecular dynamics of quenched and cryomilled material. *Mol Pharm* 2009; 7 (5): 1692–1707.
67. Patterson JE, Michael BJ, Forster AH, Lancaster RW, Butler JM, Rades T. The Influence of Thermal and Mechanical Preparative Techniques on the Amorphous State of Four Poorly Soluble Compounds. *J Pharm Sci* 2005; 94 (9): 1998-2112.
68. Gupta P, Kakumanu VK, Bansal AK. Stability and solubility of celecoxib-PVP amorphous dispersions: A molecular perspective. *Pharm Res* 2004; 21 (10): 1762-1769.

69. Zhao P, Jiang H, Jiang T, Zhi Z, Wu C, Sun C, Zhang J, Wang S. Inclusion of celecoxib into fibrous ordered mesoporous carbon for enhanced oral bioavailability and reduced gastric irritancy. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 639-647.
70. Bartsch SE, Griesser UJ. Physicochemical properties of the binary system glibenclamide and polyethylene glycol 4000. *J Therm Anal Cal* 2004; 77: 555-569.
71. Speybroeck MV, Mellaerts R, Thi TD, Martens JA, Humbeeck JV, Annaert P, Mooter GVD, Augustijns P. Preventing release in the acidic environment of the stomach via occlusion in ordered mesoporous silica enhances the absorption of poorly soluble weakly acidic drugs. *J Pharm Sci* 2011; 100 (11): 219-230.
72. Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A. Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko - skripta. Fakulteta za farmacijo, katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Ljubljana, 2001.
73. Kellogg GE, Abraham DJ. Hydrophobicity: is  $\text{LogP}_{o/w}$  more than the sum of its parts? *Eur J Med Chem* 2000; 35: 651-661.
74. Drugbank. Dostopno na strani (2.11.2013): [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)
75. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002; 45: 2615-2623.
76. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm R* 1997; 14 (5): 568-571.
77. Brink T, Exner TE. pKa based protonation states and microspecies for protein–ligand docking. *J Comput Aided Mol Des* 2010; 24: 935–942.
78. Onișor C, Blăniță G, Coroș M, Bucșa M, Vlassa M, Sârbu C. A comparative study concerning chromatographic retention and computed partition coefficients of some precursors of peraza crown ethers. *Cent Eur J Chem* 2010; 8 (6): 1203-1209.
79. Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M. Gastric emptying of pellets under fasting conditions: a mathematical model. *Pharm Res* 2009; 26 (7): 1607-1617.
80. Boghra RJ, Kothawade PC, Belgamwar VS, Nerkar PP, Tekade, AR, Surana SJ. Solubility, dissolution rate and bioavailability enhancement of irbesartan by solid dispersion technique. *Chem Pharm Bull* 2011; 59 (4): 438-441.