

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ MIHORKO

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ MIHORKO

LIOFILIZACIJA NANODELCEV Z RAZPRŠEVANJEM V TEKOČI DUŠIK

SPRAY-FREEZE-DRYING OF NANOPARTICLES

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljajal v Leku farmacevtski družbi d.d., v Razvojnem centru Slovenija na področju Farmaceutska tehnologija, pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se podjetju Lek farmacevtska družba d.d., ki je omogočilo nastanek magistrske naloge, mentorju prof. dr. Janezu Kerču, mag. farm. in somentorici doc. dr. Mateji Cegnar, mag. farm. za nasvete in napotke pri eksperimentalnem delu in pisanju naloge, Aleksandri Komperšak za pomoč pri delu v laboratoriju ter družini in prijateljem za vso podporo in spodbudo med študijem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

Andrej Mihorko

KAZALO

1	Uvod	1
1.1	Nanodelci	1
1.1.1	Polielektrolitni kompleksi	1
1.1.2	Hitosan.....	2
1.1.3	Hondroitin sulfat.....	3
1.2	Določanje velikosti in zeta potenciala nanodelcev	3
1.2.1	Dinamično sipanje svetlobe – velikost	3
1.2.2	Elektroforetsko sipanje svetlobe – zeta potencial.....	4
1.3	Liofilizacija	4
1.3.1	Postopek liofilizacije	5
1.3.2	Liofilizacija z razprševanjem v tekoči dušik (Spray-freeze-drying, SFD).....	8
1.4	Pretočne lastnosti praškastega produkta	9
1.4.1	Nasipni kot.....	11
1.4.2	Carrov indeks.....	12
1.5	Tablete	13
1.6	Vrstična elektronska mikroskopija	14
2	Namen dela	15
3	Materiali in metode.....	16
3.1	Materiali.....	16
3.2	Aparature	16
3.3	Metode	16
3.3.1	Priprava 0,25 % očetne kisline	16
3.3.2	Priprava raztopine hitosana v 0,25 % očetni kislini (2 mg/ml)	17
3.3.3	Priprava raztopine hondroitin sulfata v 0,25 % očetni kislini (2 mg/ml)	17
3.3.4	Izdelava nanodelcev in dodatek pomožnih snovi	17

3.3.5	Določanje velikosti in zeta potenciala nanodelcev	19
3.3.6	Liofilizacija z razprševanjem v tekoči dušik (Spray-freeze-drying, SFD)....	20
3.3.7	Določanje pretočnih lastnosti liofilizatov.....	20
3.3.8	Redispergiranje liofilizatov	21
3.3.9	Tabletiranje liofilizatov	21
3.3.10	Redispergiranje tablet.....	21
3.3.11	Slikanje liofilizatov z vrstičnim elektronskim mikroskopom	21
4	Rezultati in razprava.....	22
4.1	Velikost nanodelcev pred in po dodatku pomožnih snovi.....	22
4.2	Liofilizacija disperzij nanodelcev z razprševanjem v tekoči dušik	26
4.2.1	Pretočne lastnosti liofilizatov	26
4.3	Redispergiranje liofilizatov.....	31
4.4	Slikanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom	38
4.5	Sposobnost tabletiranja liofilizatov	42
4.6	Redispergiranje tablet	49
4.7	Izbira najboljše formulacije	54
5	Sklep.....	56
6	Literatura	59

POVZETEK

Nanodelci predstavljajo učinkovit dostavni sistem za vnos proteinskih učinkovin. Zaradi milih pogojev izdelave je metoda polielektrolitnega kompleksiranja zelo primerna za vgradnjo proteinov v nanodelce, ki jih moramo za dolgotrajno stabilnost posušiti. Najprimernejši postopek sušenja proteinov in nanodelcev je liofilizacija. Liofilizati, ki nastanejo pri klasični liofilizaciji, so v obliki pogače in so predvsem zaradi slabih pretočnih lastnosti in težavnega rokovanja neprimerni za nadaljnjo uporabo npr. tabletiranje. V magistrski nalogi smo nanodelce oz. polielektrolitne komplekse izdelali iz hondroitin sulfata in hitosana, jim dodali različne pomožne snovi in njihove kombinacije ter jih posušili s spremenjenim postopkom liofilizacije, s predhodnim razprševanjem v tekoči dušik. Nastalim liofilizatom smo določili pretočne lastnosti z merjenjem nasipnega kota in Carrovega indeksa. Liofilizate, bodisi v praškasti obliki ali stisnjene v tablete, smo redispergirali v vodi in vrednotili ohranjene lastnosti nanodelcev. Pri izboru najboljše formulacije smo zahtevali, da se liofilizati in tablete v vodi popolnoma redispergirajo. Hkrati smo želeli, da ima liofilizat ustrezne pretočne lastnosti, da je z njim mogoče rokovati in ga stisniti v tablete, lastnosti nanodelcev pa se čim manj spremenijo glede na njihove lastnosti v začetni disperziji.

Najboljše pretočne lastnosti so imeli liofilizati z manitolom, bodisi samim ali v kombinaciji z dekstranom. Najslabšo pretočnost so imeli liofilizati s trehalozo, saharozo in nekaterimi polimeri, ki so se zaradi higroskopnosti in vezave vlage raztapljali na zraku. Po redispergiranju liofilizatorov sta velikost nanodelcev najboljše ohranili amorfni pomožni snovi trehaloza in saharoza, med kombinacijami sladkorjev pa kombinacija manitola in dekstrana. Višja koncentracija pomožnih snovi je po pričakovanjih bolje zaščitila nanodelce. Najustreznejše tablete smo stisnili iz liofilizatorov z dekstranom ter kombinacije manitola in dekstrana. Tablete s temi liofilizati so se popolnoma redispergirale nazaj v nanodelce, njihova velikost je bila celo manjša kot pred liofilizacijo, kar bi lahko kazalo na določene spremembe pri tabletiranju ali delno disociacijo kompleksov. Ostali liofilizati so bili težavni za rokovanje in tabletiranje. Kombinacija manitola in dekstrana v koncentraciji 4 % je bila najustreznejša formulacija glede na parametre, ki smo jih vrednotili pri našem delu.

Ključne besede: polielektrolitni kompleksi, liofilizacija z razprševanjem, pretočne lastnosti liofilizatorov, tabletiranje liofilizatorov

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are an effective delivery system for administration of protein drugs. Polyelectrolyte complexation represents a suitable method for formulating protein drugs in nanoparticles, because it avoids conditions that can be harmful for proteins. To achieve long term stability nanoparticles have to be dried. The most suitable method for drying nanoparticles and proteins is lyophilization or freeze-drying. Lyophilisates obtained by classical freeze-drying have a cake-like structure, which is difficult to handle and unsuitable for further processing, such as tableting, having very poor flow properties. In this thesis nanoparticles or polyelectrolyte complexes were prepared from chondroitin sulfate and chitosan, and various excipients in different concentrations and combinations were added into dispersions, which were finally dried by a modified method of freeze-drying - spray-freeze-drying (SFD). Flowability of obtained lyophilisates was determined by measuring their angles of repose and Carr index. Lyophilisates, either as powder or compressed in tablets, were redispersed in water. Lyophilisates with good flowability, that are easy to handle and can be compressed in tablets were selected as the best formulation. The tablets had to fully redisperse in water releasing nanoparticles with preserved properties close to those of initial dispersion before SFD. Lyophilisates containing mannitol, either alone or in combination with dextran, had the best flowability. Lyophilisates containing trehalose, sucrose and some polymers had the poorest flowability and were very hygroscopic, slowly dissolving when exposed to air humidity. Trehalose and sucrose and combination of mannitol and dextran proved to be the most efficient excipients preserving nanoparticle size after reconstitution of lyophilisates in water. As expected, higher concentration of excipients provided better protection of NPs during SFD. Tablets compressed from lyophilisates containing dextran and combination of mannitol and dextran were the most suitable and completely redispersed into NPs after reconstitution in water. Nanoparticle size was even smaller than that of the initial dispersion, which could indicate some changes of NPs during tableting or partial dissociation of complexes. Other lyophilisates were difficult to handle and tableting. Combination of mannitol and dextran in concentration 4% was selected as the best formulation that met our requirements.

Keywords: polyelectrolyte complexes, spray-freeze-drying, flowability of lyophilisates, tableting lyophilisates

SEZNAM OKRAJŠAV

DLS	dinamično sipanje svetlobe (Dynamic Light Scattering)
ELS	elektroforetsko sipanje svetlobe (Electrophoretic Light Scattering)
ND	nanodelci
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (Photon Correlation Spectroscopy)
PdI	polidisperzni indeks
PEC	polielektrolitni kompleksi
PEG	polietilenglikol
Pop. red.	popolnoma redispergirani liofilizat
PVP	polivinilpirolidon
R _{20 min}	razmerje med velikostjo nanodelcev, izmerjeno 20 minut po redispergiranju liofilizata, in velikostjo nanodelcev pred liofilizacijo
R _{24 ur}	razmerje med velikostjo nanodelcev, izmerjeno po 24 urah mešanja od redispergiranja liofilizata, in velikostjo nanodelcev pred liofilizacijo
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy)
SFD	liofilizacija z razprševanjem v tekoči dušik (Spray-freeze-drying)
Z-Ave	povprečna velikost delcev (Z-Average)

1 UVOD

Za zdravljenje različnih bolezni uporabljamo vedno več proteinov in peptidov. Njihova aplikacija je večinoma omejena na invazivne parenteralne poti, saj imajo proteini pri peroralni aplikaciji zelo nizko biološko uporabnost. Ta je posledica nestabilnosti proteinov v gastrointestinalnem traktu in njihovi slabi permeabilnosti skozi sluznico prebavnega trakta. Vzroka nestabilnosti proteinov sta kislo okolje v želodcu in prisotnost proteolitičnih encimov, slaba permeabilnost pa je posledica zgradbe proteinov, ki so preveliki, da bi prehajali paracelično (med epitelijskimi celicami), in preveč hidrofilni, da bi lahko prehajali transcelično (pasivno skozi celične membrane). Nekaj od naštetih omejitev lahko rešimo z vgradnjo proteinov v nanodelce (1).

1.1 Nanodelci

Nanodelci (ND) so trdni koloidni delci velikosti od 1 do 1000 nm (2, 3). Vgradnja proteinov v nanodelce lahko podaljša biološki razpolovni čas proteina in omogoči prirejeno sproščanje, možna pa je tudi ciljana dostava proteina v tarčno tkivo (2). Za farmacevtsko uporabo so najbolj zanimivi nanodelci iz biokompatibilnih polimerov, ki jih lahko izdelamo z različnimi metodami, kot so emulzijsko difuzijska metoda, metoda odparevanja topila, metoda nanoprecipitacije itd (3, 4). Pomanjkljivost večine teh metod je, da zahtevajo uporabo organskih topil, visokih temperatur in ostrih pogojev izdelave, zato niso primerne za vgradnjo občutljivih biomolekul, kot so proteini. Drugačna je metoda polielektrolitnega kompleksiranja, pri kateri naravni ali sintezni polielektroliti v vodnem okolju in pri sobni temperaturi spontano interagirajo v komplekse in tvorijo nanodelce (4).

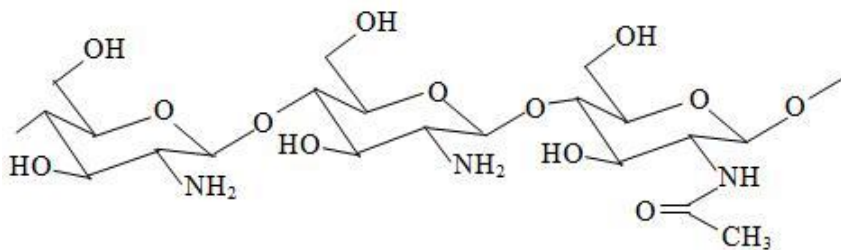
1.1.1 Polielektrolitni kompleksi

Polielektrolitni kompleksi (PEC) nastanejo spontano pri mešanju vodnih raztopin vsaj dveh polielektrolitov z nasprotnima nabojema, negativno nabitega polianiona in pozitivno nabitega polikationa. Najpomembnejše sile pri tvorbi nanodelcev so močne elektrostatske interakcije med nasprotno nabitimi polimeri, pri povezovanju pa so pomembne tudi vodikove vezi, hidrofobne interakcije in van der Waalove sile (2). Pri nastanku PEC potekata dva procesa, difuzijsko prepletanje verig polimerov, ki je kinetičen pojav, ter termodinamsko preurejanje že nastalih povezav (2). Na nastanek in stabilnost PEC vplivajo stopnja ionizacije nasprotno nabitih polielektrolitov, gostota in porazdelitev naboja na

polimernih verigah, rigidnost polimernih verig, razmerje med polimeri, vrstni red dodajanja polimerov, temperatura, intenziteta mešanja, ionska moč in pH raztopin polielektrolitov (2, 5). Zelo pomemben je pH, ki mora zagotavljati ustrezne naboje polielektrolitov. Polikationi morajo imeti pozitiven naboj, polianioni pa negativnega (5). Za farmacevtsko uporabo morajo biti polimeri biokompatibilni. To lastnost imajo nekateri polisaharidi in naravni biopolimeri, kakršna sta hitosan in hondroitin sulfat (1).

1.1.2 Hitosan

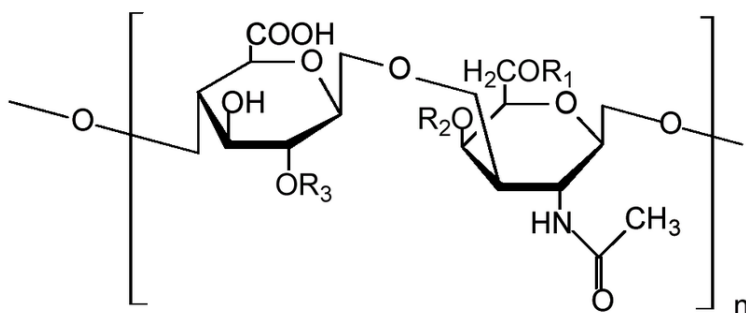
Hitosan je naravni polimer, sestavljen iz glukozamina in N-acetil glukozamina (slika 1). Je biokompatibilen in netoksičen. Pridobivajo ga z delno deacetilacijo hitina, ki je v naravi pogosto prisoten polisaharid (6). Pogoji deacetilacije določajo molekulsko maso polimera in stopnjo deacetilacije, od katerih je odvisna topnost hitosana. Načeloma je hitosan dobro topen v kislih raztopinah, kar mu omogočajo številne amino skupine, ki se lahko protonirajo. Tako nastane pozitivno nabit polisaharid, ki lahko tvori močne elektrostatske interakcije z negativno nabitimi makromolekulami, npr. glikoproteini na površini sluznice, kar omogoča bioadhezijo. Polega tega hitosan poveča prepustnost tesnih stikov med epiteljskimi celicami in lahko tako pospeši absorpcijo zdravilnih učinkovin, tudi proteinov in peptidov, iz prebavnega trakta (7). Bioadhezivnost in pospeševanje absorpcije sta zaželeni lastnosti pri peroralni aplikaciji proteinov, zato je hitosan zelo primeren polimer za tvorbo PEC, v katere lahko vgradimo proteine (1).



Slika 1: Struktura hitosana

1.1.3 Hondroitin sulfat

Hondroitin sulfat je naravni glikozaminoglikan. Tvori izvencelični matriks hrustanca in omogoča njegove mehanske lastnosti. Je anionski polielektrolit, sestavljen iz ponavljajočih disaharidnih enot beta-1,4-D-glukuronske kisline in beta-1,3-N-acetil-galaktozamina, ki so sulfatirane na različnih mestih, odvisno od izvora polimera (slika 2). Peroralno se uporablja za zdravljenje simptomov osteoartritisa, deluje pa tudi protivnetno (8).



Slika 2: Struktura hondroitin sulfata. Sulfatne skupine ($-SO_3H$) so lahko pripete na mesta R_1 , R_2 ali R_3 .

1.2 Določanje velikosti in zeta potenciala nanodelcev

1.2.1 Dinamično sipanje svetlobe – velikost

Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) ali dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS) je metoda, s katero lahko določamo velikost delcev v tekočini. Primerna je za določanje velikosti delcev v submikronskem območju, ki so v tekočem mediju podvrženi Brownovemu gibanju. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev zaradi trkov z molekulami topila in je odvisno od velikosti delcev. Večji delci izkazujejo počasnejše Brownovo gibanje, manjši delci pa hitrejša. Z DLS merimo hitrost nihanja jakosti sipanja svetlobe, ki je odvisna od Brownovega gibanja delcev v tekočini in torej od njihove velikosti. DLS inštrument določi, koliko časa je nihanje jakosti v korelaciji. Pri manjših delcih traja korelacija le kratek čas, ker se hitreje premikajo, pri večjih delcih pa je ta čas daljši, saj se premikajo počasneje, zato se signal spreminja počasneje. S pomočjo korelacijske funkcije se izračuna povprečna velikost delcev (Z-average) in ocena širine porazdelitve velikosti, t.i. polidisperzni indeks (PdI) (9). PdI lahko zavzema vrednosti med 0 in 1, pri čemer vrednost 0 pomeni, da so delci monodisperzni. Vrednost PdI med 0,1 in 0,2 pomeni ozko porazdelitev velikosti delcev, vrednost nad 0,5 pa kaže na široko porazdelitev velikosti delcev v vzorcu, na njihovo polidisperznost (10).

1.2.2 Elektroforetsko sipanje svetlobe – zeta potencial

Na površini delcev je določen naboj, ki je lahko pozitiven ali negativen, odvisno od funkcionalnih skupin na površini delca. Zaradi tega naboja se okoli delca ustvari električni dvojni sloj. Tik ob površini je sloj trdno vezanih ionov nasprotnega naboja, kot je na površini delca, ki se imenuje Sternov sloj. Okoli Sternovega sloja je difuzni sloj, v katerem so ioni bolj gibljivi. Na določeni razdalji od delca ioni niso več dovolj močno vezani na delec, da bi se premikali skupaj z njim. Zeta potencial je potencialna razlika med potencialom na tej razdalji od površine delca in potencialom v mediju daleč stran od delca. S pomočjo zeta potenciala lahko ocenimo stabilnost koloidnega sistema. V primeru dovolj velikega pozitivnega ali negativnega zeta potenciala se namreč delci odbijajo med seboj in torej ne prihaja do njihovega združevanja. Za elektrostatsko stabilen koloidni sistem načeloma veljajo delci z zeta potencialom višjim od 30 mV oziroma nižjim od -30 mV. Zeta potencial merimo z metodo elektroforetskega sipanja svetlobe (ELS). V vzorcu ustvarimo električno polje, ki povzroči gibanje nabitih delcev proti nasprotno nabiti elektrodi. S pomočjo sipanja svetlobe lahko izmerimo hitrost njihovega gibanja, kar nam ob poznavanju pogojev meritve omogoča izračun zeta potenciala (11).

1.3 Liofilizacija

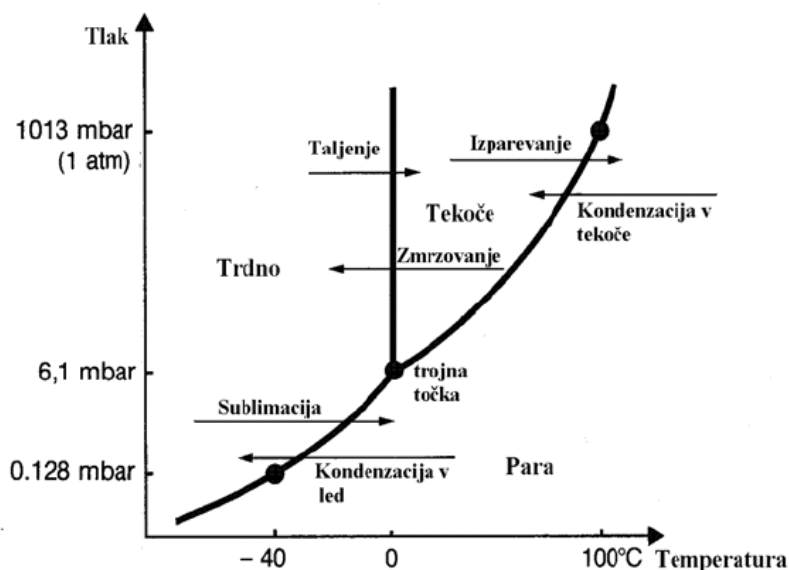
Uporabo nanodelcev, tudi PEC, omejuje njihova nestabilnost v vodni disperziji pri shranjevanju skozi daljše časovno obdobje. Ločimo fizikalno nestabilnost, ki se kaže kot agregacija nanodelcev in kemično nestabilnost, kot je hidroliza polimerov. Stabilnost lahko izboljšamo z odstranitvijo vode, vendar večina postopkov sušenja ni primerna za sušenje tako občutljivih sistemov, kot so proteini in nanodelci (12). Najprimernejši postopek sušenja je liofilizacija, kjer vzorec najprej zamrzemo in nato pod znižanim tlakom s sublimacijo in desorpcijo odstranimo vodo. Pri tem vzorca ni potrebno segrevati, zato je primeren za sušenje termo-občutljivih snovi. Proces liofilizacije je relativno počasen in drag, zato ga uporabljamo samo za izdelke z visoko dodano vrednostjo (12). Po končani liofilizaciji zavzemajo posušeni vzorci enako prostornino kot začetne disperzije, saj namesto vode ostanejo v produktu prazne pore. Vzorci so zato zelo porozni in higroskopni, kar lahko oteži nadaljnje rokovanje z njimi. Prednost te poroznosti pa je hitro redispergiranje vzorcev v prvotno vodno disperzijo (13). Med liofilizacijo sicer prihaja do različnih stresnih dejavnikov, ki lahko destabilizirajo sistem, predvsem sta to zamrzovanje in dehidracija. Med zamrzovanjem pride do ločitve faz v led in krio-koncentrirano fazo. V

primeru disperzije nanodelcev krio-koncentrirana faza vsebuje nanodelce in druge komponente v formulaciji, kot so surfaktanti, pufri, nevgrajena učinkovina, polimeri itd. Visoka koncentracija snovi v tej fazi lahko povzroči agregacijo in v nekaterih primerih tudi ireverzibilno združevanje delcev. Poleg tega kristalizacija ledu lahko povzroči mehanski stres na nanodelce, kar lahko vodi v njihovo destabilizacijo. Da to preprečimo, moramo v formulacijo pred zamrzovanjem dodati ustrezne pomožne snovi, ki zaščitijo nanodelce (12). Glede na to, ali med zamrzovanjem pomožne snovi kristalizirajo ali pa tvorijo amorfnost, ločimo polnila in stabilizatorje. Polnila so pomožne snovi, ki kristalizirajo med fazo zamrzovanja in omogočajo tvorbo mehansko močne pogače. Kristali polnila imobilizirajo nanodelce ter tako preprečijo njihovo združevanje in jih lahko zaščitijo pred mehanskim stresom kristalov ledu. Pogosto uporabljeni polnila sta manitol in glicin (1, 12). Stabilizatorji med zamrzovanjem ne kristalizirajo, ampak tvorijo amorfnost, ki lahko tvori vodikove vezi z nanodelci ali proteini. To omogoča stabilizacijo proteinov ali nanodelcev s t.i. mehanizmom nadomeščanja vode. Med odstranjevanjem vode se tvorijo vodikove vezi med stabilizatorji in polarnimi skupinami na površini nanodelcev, kar omogoča ohranjanje njihove strukture. To je možno samo, če so pomožne snovi v amorfnem stanju, zato je kristalizacija stabilizatorjev nezaželena. Kot stabilizatorje ponavadi uporabljamo različne sladkorje. Za povečanje stabilnosti nanodelcev lahko uporabimo tudi neionske surfaktante. Ti se vežejo na površino nanodelcev in preprečijo njihovo agregacijo med rehidracijo liofilizata. V primeru, da se polimer veže na dva delca, pa lahko pride do tvorbe mostov med delci, kar poveča agregacijo nanodelcev (1, 12). Izbira ustreznih pomožnih snovi je tako zelo pomembna, vendar ni pravila, katera pomožna snov bo dala določenemu sistemu najboljše lastnosti. Najboljšo kombinacijo in količino pomožnih snovi je potrebno poiskati s preizkušanjem (1, 12).

1.3.1 Postopek liofilizacije

Med postopkom liofilizacije prvotno tekočo raztopino ali disperzijo zamrzujemo, nato zmanjšamo tlak in odstranimo vodo s sublimacijo, zato lahko liofilizacijo razdelimo na tri faze: zamrzovanje, primarno sušenje in sekundarno sušenje. V osnovi sušenje temelji na razumevanju in uporabi faznega diagrama za vodni sistem. Na sliki 3 je fazni diagram vode. Na njem so tri ločena področja, ki predstavljajo posamezno fazo vode, torej tekočo, trdno in plinasto. Pri določenih pogojih (tlaku in temperaturi) sta istočasno možni dve fazi,

kar predstavljajo črte. Trojna točka je posebno stanje, kjer istočasno obstajajo vse tri faze. To je pri tlaku 610 Pa in 0,0075 °C (13).



Slika 3: Fazni diagram vode (14)

Pri stalnem tlaku nad trojno točko se pri povečevanju temperature voda iz trdnega stanja najprej spremeni v tekočo in nato pri nadaljnjem povečanju še v plinasto fazo. Če pa ohranjamo tlak pod trojno točko, bo led med segrevanjem sublimiral in tako direktno prešel v plinasto fazo. Sublimacija bo torej potekala samo pri temperaturi, nižji od 0 °C in dovolj nizkem tlaku, ki ga je potrebno vzdrževati s takojšnjim odstranjevanjem nastale vodne pare. Med liofilizacijo farmacevtskih izdelkov seveda ne poteka sublimacija čiste vode, ampak so v vodi raztopljene tudi druge snovi, ki znižajo trojno točko sistema, zato mora postopek potekati pri še nižji temperaturi. Liofilizacija tako poteka v posebnih aparataturah, ki jih imenujemo liofilizatorji (13).

1.3.1.1 Zamrzovanje

Zamrzovanje je prvi korak liofilizacije. Med zamrzovanjem suspenzijo ohladimo, da se tvorijo kristali ledu (12). Od hitrosti zamrzovanja je odvisna stopnja podhladitve in posledično velikost kristalov ledu in s tem tudi velikost por, ki nastanejo po odstranitvi ledu s sublimacijo. Podhladitev je metastabilno stanje raztopine ali disperzije, ki je ohlajena pod temperaturo ledišča, vendar je še vedno v tekočem stanju. Jedra ledu namreč za tvorbo potrebujejo aktivacijsko energijo, ki pa jo sistem doseže pri temperaturi, ki je nižja od temperature ledišča (15). S hitrim zamrzovanjem dosežemo večjo podhladitev, pri

kateri nastane več jeder ledu. Ko ta jedra rastejo, se začnejo fizično ovirati med sabo in tako nastanejo manjši kristali ledu in večja specifična površina ledu. Tvorba manjših kristalov ledu lahko zmanjša mehanski stres na nanodelce in lahko omeji njihovo agregacijo. Najhitrejšo zamrzovanje in s tem največjo podhladitev lahko dosežemo z zamrzovanjem v tekočem dušiku (12). Pri počasnejšem zamrzovanju pa pride do manjše podhladitve in tvorbe večjih kristalov ledu, saj nastane manj jeder in se tako manj ovirajo pri rasti. Počasnejše ohlajanje je možno pri liofilizatorjih, ki omogočajo zamrzovanje na njihovih predhodno ohlajenih policah (12).

S tvorbo kristalov ledu se povečuje koncentracija topljencev v vodni fazi, kar poveča viskoznost in upočasni kristalizacijo. Pride do ločitve faz v led in krio-koncentrirano fazo. Visoka koncentracija snovi v krio-koncentrirani fazi lahko povzroči agregacijo nanodelcev, kar lahko omejimo z izbiro ustreznih pomožnih snovi. Ta koncentrirana tekoča faza se nato strdi in lahko nastane amorfna, kristalna ali pa kombinirana amorfno-kristalna faza. Pri tem majhen delež vode ne zmrzne in torej ostane v tekočem stanju, večinoma adsorbirana na trdno fazo. To vodo imenujemo vezana voda (12).

1.3.1.2 Primarno sušenje

Po končanem zamrzovanju se lahko začne primarno sušenje, to je odstranjevanje zamrznjene vode s sublimacijo. Da lahko ta poteče, morata biti tlak in temperatura v sušilni komori liofilizatorja pod trojno točko sistema. Dovolj nizek tlak v sušilni komori vzdržujejo vakuumske črpalke. Pri sublimaciji se porablja toplota, ki jo vzorec dobi iz okolice, pri liofilizatorjih, ki to omogočajo, pa jo lahko dovedemo tudi z dvigom temperature polic. Odstranjevanje kristalov ledu s sublimacijo ustvari odprto mrežo por, ki omogočijo odstranjevanje vode iz notranjosti produkta. Nastala vodna para tako prehaja na površino vzorca, od koder se nato prenese do kondenzatorja liofilizatorja, kjer kondenzira. Velikost por je odvisna od načina oziroma hitrosti zamrzovanja vzorca, kar vpliva tudi na čas primarnega sušenja, ki je sicer običajno najdaljši del liofilizacije. Ob koncu primarnega sušenja tlak v liofilizatorju pade, saj je ves led sublimiral in tako ne morejo več nastajati vodne pare (12).

1.3.1.3 Sekundarno sušenje

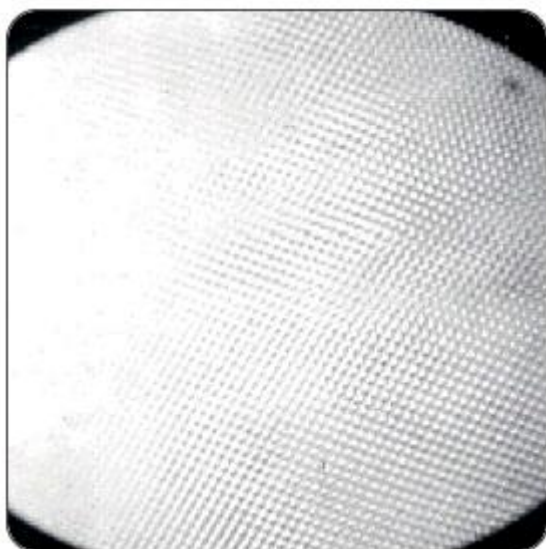
Med primarnim sušenjem s sublimacijo iz vzorca ni mogoče odstraniti vode, ki ni zmrznila in torej ni v trdnem stanju. To je vezana voda, ki je adsorbirana na površino trdnih snovi. Ponavadi je prisotna v dovolj veliki količini, da lahko povzroči hiter razpad produkta med

shranjevanjem pri sobni temperaturi. Odstranimo jo med sekundarnim sušenjem z desorpcijo. Ta poteka pri višji temperaturi, da se dovede dovolj energije. Temperatura je lahko tudi višja od tališča ledu, saj je v tej fazi sublimacija že potekla in v vzorcu ni več ledu. Za farmacevtske izdelke je zaželena končna vsebnost vlage 1 % ali manj (12).

1.3.2 Liofilizacija z razprševanjem v tekoči dušik (Spray-freeze-drying, SFD)

Pri klasični liofilizaciji ne nastanejo ločeni delci, ampak tako imenovana liofilizacijska pogača. Tak liofilizat ima slabe pretočne lastnosti, poleg tega je ponavadi zelo higroskopen in elektrostatičen, kar otežuje rokovanje z njim. Če ga želimo uporabiti v nadaljnjih tehnoloških operacijah in dobiti posamezne delce, je potrebno to pogačo naknadno razstaviti v dodatnem koraku, kar pa vodi do delcev s široko distribucijo velikosti. Sferične delce določene velikosti lahko dobimo s postopkom liofilizacije z razprševanjem v tekoči dušik (spray-freeze-drying, SFD), ki je modifikacija liofilizacije. Pri SFD tako neposredno pred prvim korakom liofilizacije, zamrzovanjem, disperzijo razpršujemo z ultrazvočno šobo, da nastanejo posamezne kapljice določene velikosti. Kapljice padejo v posodo s tekočim dušikom in takoj zmrznejo. V nadaljevanju postopek poteka enako kot navadna liofilizacija. Po končanem razprševanju počakamo, da dušik izpari, nastali zamrznjen produkt pa prenesemo v liofilizator, kjer poteče odstranjevanje vode. Delci, ki nastanejo s SFD, so tako kot pri navadni liofilizaciji porozni in krhki, na kar lahko v določeni meri vplivamo z dodatkom polnil ali stabilizatorjev v prvotno tekočo disperzijo. Velikost delcev je v določeni meri odvisna od površinske napetosti in viskoznosti tekočine, najbolj pa od frekvence delovanja ultrazvočne šobe (16, 17).

Med razprševanjem z ultrazvočno šobo poteka fenomen, ki ga imenujemo ultrazvočna atomizacija. Če prekrijemo ravno površino s tanko plastjo tekočine, ki jo nato spravimo v vibrirajoče gibanje, kjer je smer vibracij pravokotna na površino, tekočina absorbira del vibracijske energije, ki se pretvori v stoječe valovanje. To valovanje, ki ga imenujemo tudi kapilarno valovanje, povzroči, da se tekočina na površini oblikuje v mrežo valov, ki imajo enakomerno izmenjujoče se hribe in doline (18). Če povečamo amplitudo vibracij, se poveča tudi amplituda valovanja, hribi postanejo večji in doline globlje. Valovi so stabilni, dokler ne dosežemo kritične amplitude, kjer postane višina vala previsoka. Posledično se val zruši in majhne kapljice se ločijo od vrhov propadajočih valov (18). Na sliki 4 je prikazano stoječe valovanje tekočine na atomizacijski površini šobe.



Slika 4: Stoječe valovanje tekočine na atomizacijski površini šobe (18)

Velikost nastalih kapljic je odvisna od valovne dolžine stoječega valovanja oziroma od frekvence delovanja ultrazvočne šobe. Pri šobah z višjo frekvenco delovanja nastanejo manjše kapljice, pri tistih z nižjo frekvenco pa večje. Za nastanek kapljic z želeno velikostjo in ozko porazdelitvijo velikosti moramo natančno nadzorovati amplitudo vibriranja. Energija za atomizacijo v kapljice je pod kritično amplitudo premajhna, če pa je amplituda prevelika, pride do pojava kavitacije, kjer se tekočina od površine trga v delih, ki so neenakomerne velikosti. Da dobimo želeno amplitudo, potrebujemo natančen nadzor dovedene energije. Za to skrbijo viri napajanja, na katerih določimo želeno energijo, ki je pri ultrazvočni atomizaciji ponavadi nižja od 15 W (18).

1.4 Pretočne lastnosti praškastega produkta

Najpogostejša uporaba prahov v farmaciji je pri izdelavi tablet in kapsul. Za pravilno izdelavo teh farmacevtskih oblik morajo imeti prahovi ustrezne lastnosti, predvsem so pomembne njihove pretočne lastnosti oziroma njihova pretočnost, s čimer označujemo sposobnost prahov, da tečejo. V industrijski proizvodnji farmacevtskih izdelkov je namreč veliko korakov, kjer je potreben prenos prahov iz ene lokacije ali vsebnika v drugega, kjer lahko neustrezna pretočnost prahov ovira take prenose (13).

Pri tabletiranju in polnjenju kapsul so pretočne lastnosti še posebej pomembne, saj lahko v teh procesih uporabimo samo prahove, ki popolnoma in dovolj hitro napolnijo matrico oziroma kapsulo. Le tabletiranje prahov z ustreznimi pretočnimi lastnostmi omogoča ponovljivo polnjenje tabletirne matrice, ki je pogoj za tablete z ustrezno enakomernostjo mase, vsebnostjo učinkovine in konstantnimi mehanskimi lastnostmi (13).

Delci se sprijemajo med sabo in na druge površine zaradi prisotnosti medmolekulskih sil. Ločimo adhezijo in kohezijo. Kohezija je interakcija med podobnimi površinami, recimo med delci, adhezija pa med različnimi površinami, recimo delci in steno posode. Kohezijske sile med delci v prašku so večinoma nespecifične kratkosežne van der Waalsove sile, ki so v veliki meri odvisne od velikosti delcev, pa tudi od vlažnosti zraka v okolju. Kohezijo lahko povečajo tudi sile površinske napetosti tekočin, adsorbiranih na površino delcev ali pa elektrostatske sile, ki nastanejo zaradi trenja med delci (13).

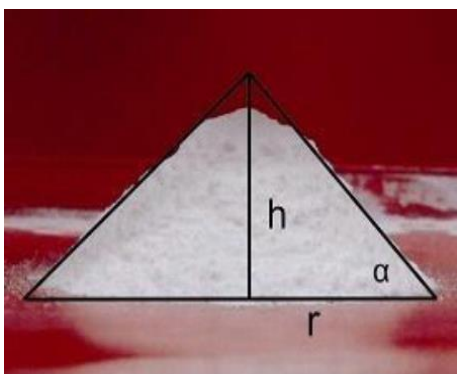
Med lastnostmi delcev, ki vplivajo na pretočnost prahov, so najpomembnejši njihova velikost, oblika in gostota. Manjši delci z zelo velikim razmerjem med površino in maso delcev so bolj kohezivni kot večji delci, pri katerih je gravitacijska sila močnejša od privlačnih medmolekulskih sil. Velja, da delci, večji kot 250 μm , dobro tečejo, pri delcih, manjših od 100 μm , pa se poveča kohezivnost in zmanjša pretočnost (13). Delci, manjši od 10 μm , so ponavadi preveč kohezivni, da bi prosto tekli, razen v obliki večjih aglomeratov oz. skupkov. Na pretočnost vpliva tudi oblika delcev, najbolje tečejo delci okrogle oblike. Taki delci imajo minimalno površino stika med sabo, zato je tudi možnost interakcij med delci najmanjša. Načeloma bolje tečejo tudi delci z večjo gostoto. Prahovi navadno tečejo zaradi vpliva sile gravitacije, ki ima večji vpliv na delce z večjo gostoto (13).

Na pretočnost ima vpliv tudi geometrija pakiranja delcev. Bolj so delci tesno eden ob drugem, manjša je poroznost takega praška in slabša pretočnost. Prašku lahko izboljšamo geometrijo pakiranja z vibracijami. Geometrijo pakiranja lahko ocenimo z navidezno gostoto in poroznostjo praška. Navidezna gostota praška je vedno manjša od prave gostote delcev, saj za izračun navidezne gostote upoštevamo tudi prostor med delci. Prašek ima lahko več navideznih gostot, odvisno od geometrije pakiranja delcev in torej prostornine praznin med delci. Z vibracijami zmanjšamo prostornino med delci in torej prašku povečamo navidezno gostoto, povečajo se stiki med delci in zato se poveča kohezivnost in zmanjša pretočnost. Na geometrijo pakiranja vplivajo velikost in distribucija velikosti delcev (manjši delci lahko zapolnijo praznine med večjimi delci, zato ima prašek z delci različnih velikosti večjo navidezno gostoto), oblika delcev, površinske lastnosti delcev (elektrostatske sile na površini povečajo kohezivnost) ter ravnanje s praškom v predhodnih procesih, predvsem če je bil izpostavljen vibracijam (13).

Za merjenje pretočnih lastnosti prahov obstajajo različne metode. Merjenje nasipnega kota in Carrovega indeksa sta eni bolj enostavnih in zato tudi pogosteje uporabljanih takšnih metod (13).

1.4.1 Nasipni kot

Če prašek spustimo skozi lij, bo nastal stožec, katerega naklon je odvisen od kohezivnosti praška. Delci se namreč premikajo, dokler je nasipni kot stožca dovolj velik, da je sila težnosti delca večja od privlačnih sil do ostalih delcev. Delci se ustavijo, ko je naklon dovolj majhen, da prevladajo kohezivne sile. Na ta način nastane stožec z določenim naklonom, kar imenujemo nasipni kot in je lastnost kohezivnosti praška. Nasipni kot je tako večji pri bolj kohezivnih praških, kar se kaže tudi v slabših pretočnih lastnostih. Majhen nasipni kot nastane pri manj kohezivnih praških, ki imajo tudi boljšo pretočnost (13).



Slika 5: Nasipni kot (19)

Za izračun nasipnega kota (α) uporabimo enačbo 1, kjer je h oznaka za višino in r oznaka za polmer nastalega stožca, kar lahko vidimo tudi na sliki 5 (13).

$$\text{Enačba 1: } \tan \alpha = \frac{h}{r}$$

V Preglednici I vidimo razrede pretočnih lastnosti glede na nasipni kot, kot jih določa Ph.Eur.7. V splošnem velja, da mora biti nasipni kot manjši od 45° , da lahko pretočne lastnosti ocenimo kot dovolj dobre za uporabo v farmacevtski proizvodnji (13, 20).

Preglednica I: Pretočne lastnosti glede na izmerjen nasipni kot, kot jih določa Ph.Eur. (20).

Nasipni kot ($^\circ$)	Pretočne lastnosti
25-30	Odlične
31-35	Dobre
36-40	Zmerne
41-45	Sprejemljive
46-55	Slabe
56-65	Zelo slabe
>66	Zelo, zelo slabe

1.4.2 Carrov indeks

Druga pogosto uporabljana metoda za oceno pretočnih lastnosti je določanje Carrovega indeksa, ki ga lahko z enačbo 2 izračunamo, če poznamo nasipno (ρ_{nasipna}) in zbito (ρ_{zbita}) gostoto praška, oziroma njegov nasipni (V_{nasipni}) in zbiti (V_{zbiti}) volumen:

$$\text{Enačba 2: } \textit{Carrov indeks} = 100 \times \frac{V_{\text{nasipni}} - V_{\text{zbiti}}}{V_{\text{nasipni}}} = 100 \times \frac{\rho_{\text{zbita}} - \rho_{\text{nasipna}}}{\rho_{\text{zbita}}}$$

Nasipni volumen poleg delcev v prašku vključuje tudi ves prostor med njimi. Izmerimo ga tako, da prašek previdno nasujemo v merilni valj in odčitamo volumen, ki ga zavzema. Nato valj vpnemo na aparaturo za stresanje in ga izpostavimo določenemu številu tresljajev. Za ponovljivost rezultatov in možnost primerjanja različnih vzorcev moramo vedno uporabiti enak valj in isto število tresljajev ter vedno enako maso praška. Med stresanjem se delci razporedijo, zato prašek po končanem stresanju zavzema manjši volumen kot na začetku. Ta volumen imenujemo zbiti volumen in ga uporabimo za izračun Carrovega indeksa po enačbi 2 (13, 21).

Oceno pretočnih lastnosti iz Carrovega indeksa prikazuje Preglednica II (20).

Preglednica II: Pretočne lastnosti glede na Carrov indeks, kot jih določa Ph.Eur. (20).

Carrov indeks (%)	Pretočne lastnosti
1-10	Odlične
11-15	Dobre
16-20	Zmerne
21-25	Sprejemljive
26-31	Slabe
32-37	Zelo slabe
>38	Zelo, zelo slabe

Velja, da so pretočne lastnosti ugodne, če je Carrov indeks manjši od 20 % in slabe, če je večji od 21 %. Večja razlika med nasipno in zbito gostoto in posledično večji Carrov indeks je namreč znak večje kohezivnosti praška. Pri bolj kohezivnih praških je gravitacijska sila šibkejša od privlačnih sil med delci, zato se ti med vsipanjem praška v merilni valj razporedijo tako, da ta zavzema velik nasipni volumen. Med stresanjem delcev se razdalje med delci povečajo, kar zmanjša vpliv privlačnih sil med delci in omogoči, da prašek zasede manjši, zbiti volumen, ki je odvisen predvsem od porazdelitve velikosti, oblike in gostote delcev (21).

1.5 Tablete

Tablete so najpogostejša farmacevtska oblika za peroralno aplikacijo zdravil. Popularne so zaradi več razlogov:

- Peroralna aplikacija je najbolj enostaven in varen način vnosa zdravil v telo
- V primerjavi s tekočimi farmacevtskimi oblikami so tablete fizikalno in kemično stabilnejše
- Omogočajo natančno odmerjanje
- Niso problematične za rokovanje, lahko jih pripravimo na več načinov
- Lahko jih proizvajamo v velikem številu, omogočajo kontrolo kakovosti (13).

Izdelamo jih s stiskanjem praškov na tabletirki. Poznamo dve vrsti tabletirk, tabletirko na udarec ali ekscenter in rotirko. Rotirko uporabljamo v industrijski proizvodnji tablet, tabletirko na udarec pa večinoma uporabljamo v razvoju. Stiskanje tablet s tabletirko na udarec poteka tako, da se prah iz čolnička usuje v matrico, čolniček se umakne, nato se spusti zgornji pečat in stisne prah. Zgornji pečat se nato dvigne, sledi mu tudi spodnji pečat, ki tako dvigne stisnjeno tableto. Čolniček se zopet približa in odmakne tableto, spodnji pečat se spusti, kar omogoči prašku iz čolnička, da spet napolni matrico in postopek se ponovi. Masa tablete je odvisna od nastavitve višine spodnjega pečata, nastavev zgornjega pečata pa določa debelino in trdnost stisnjenih tablet. Nižje ko se spusti zgornji pečat, večja je sila stiskanja in posledično je večja tudi trdnost tablete (13).

Med stiskanjem se v tabletni zmesi dogajajo različni procesi. Ob začetku stiskanja poteka prerazporeditev delcev v matrici, posledično se povečuje nasipna gostota zmesi. S povečevanjem sile se razdalje med delci zmanjšajo, povečajo pa se privlačne van der Waalsove sile, ki so ene glavnih povezav med delci pri tabletiranju. Tabletna zmes mora imeti ustrezne lastnosti, da nastanejo take povezave, ki se ohranijo tudi po koncu stiskanja, pravimo, da mora imeti ustrezno stisljivost. Pri stisljivosti tablet ločimo dva pojma in sicer kompresibilnost in kompaktilnost. Kompresibilnost je sposobnost tabletno zmesi, da med stiskanjem zmanjša volumen oziroma poroznost. Kompaktilnost pa je lastnost tabletno zmesi, da pri stiskanju nastane trden kompak, ki ne razpade po koncu stiskanja. Oboje je zelo pomembno za izdelavo tablet z ustreznimi lastnostmi (21). Če tabletiramo praške z neustreznimi pretočnimi lastnostmi ali slabo stisljivostjo, se lahko pojavijo številne težave, kot so neenakomernost mase tablet, premalo trdne ali krušljive tablete, razplastitev tablete, prijemanje praška na pečate idr. (13).

1.6 Vrstična elektronska mikroskopija

Vrstično elektronsko mikroskopijo (angleško Scanning electron microscopy oz. SEM) uporabljamo za opazovanje objektov, ki so premajhni za opazovanje z optičnim mikroskopom. SEM kot vir valovanja namesto vidne svetlobe uporablja snop elektronov, ki imajo veliko manjšo valovno dolžino, kar teoretično omogoča 100 000-krat boljšo ločljivost (22).

Vrstični elektronski mikroskop je sestavljen iz elektronske puške, elektro-magnetnih leč, detektorja in vakuumske črpalke. Elektronska puška je vir prostih elektronov in se nahaja v zgornjem delu mikroskopa. Elektro-magnetne leče zbirajo elektrone v ozek snop, ki ga aparat nato po vrsticah premika po površini preparata. Ob stiku elektronov s površino pride do izbijanja elektronov iz površine preparata, kar zazna detektor. Signal se prenaša na ekran, kjer slika nastaja istočasno s premikanjem snopa elektronov po površini preparata. Znotraj mikroskopa mora biti vakuum, da ne pride do interakcij med elektroni in molekulami v zraku, kar lahko pokvari kvaliteto slike. Potreben vakuum zagotavlja vakuumska črpalka.

Pogoj za opazovanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom je prevodnost vzorca. Ob stiku snopa elektronov s površino namreč pride do izbijanja elektronov iz površine vzorca, kar pri neprevodnih vzorcih pomeni kopičenje pozitivnega naboja, ki lahko popači sliko. Neprevodne vzorce moramo zato pred opazovanjem napršiti z dobro prevodno kovino, kot je zlato ali platina (22).

2 NAMEN DELA

Produkt, ki ga dobimo pri klasični liofilizaciji, je zaradi higroskopnosti, slabih pretočnih lastnosti in težavnega rokovanja neprimeren za nadaljnje tehnološke postopke, kot je tabletiranje. V magistrski nalogi bomo poskusili izboljšati postopek liofilizacije polielektrolitnih nanodelcev s predhodnim razprševanjem disperzije v tekoči dušik, da bi dobili liofilizat, ki ga bomo lahko stisnili v tableto. Pri tem bomo uporabili različne pomožne snovi in njihove kombinacije. Cilj naloge je izbrati tiste pomožne snovi oziroma njihovo kombinacijo, ki bo omogočila nastanek liofilizata, primerne za nadaljnje rokovanje (z ustreznimi pretočnimi lastnostmi) in ki bo čim bolj ohranila lastnosti nanodelcev (predvsem njihovo velikost) po razprševanju v tekoči dušik, liofilizaciji in tabletiranju.

V magistrski nalogi bomo izdelali polielektrolitne nanodelce, ki nastanejo spontano ob mešanju raztopin dveh polimerov z nasprotnima nabojema. Uporabili bomo hondroitin sulfat kot polianion in hitosan kot polikation. Pred dodatkom pomožnih snovi bomo izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. V disperzijo bomo nato dodali različne pomožne snovi. Uporabili bomo manitol, trehalozo, dekstran, maltodekstrin in saharozo, bodisi posamično ali v različnih kombinacijah in koncentracijah ter z dodatkom polimerov (Poloksamer 188, PEG 6000, PVP K-25 in Polisorbat 80). Disperzijam nanodelcev s pomožnimi snovmi bomo ponovno izmerili velikost in zeta potencial. Disperzije bomo nato razprševali z ultrazvočno šobo v tekoči dušik in nastali zmrznjen produkt liofilizirali. Liofilizatom bomo določili pretočne lastnosti z merjenjem nasipnega kota in Carrovega indeksa, pri čemer bomo opazovali tudi njihovo obnašanje pri rokovanju. Vse liofilizate bomo redispergirali v vodi in izmerili velikost nanodelcev in njihov zeta potencial. Liofilizate z najboljšimi lastnostmi bomo poskusili stisniti v tablete, nastale tablete redispergirali v vodi in ponovno vrednotili lastnosti nanodelcev. Nekatere liofilizate bomo slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom in tako vizualno preverili, kakšni delci so nastali.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Hitosan (50 - 190 kDa, stopnja deacetilacije 75 – 85 %), Sigma-Aldrich, ZDA

Hondroitin sulfat, Sigma-Aldrich, ZDA

100 % očetna kislina, Merck, Nemčija

D-Manitol, Sigma-Aldrich, ZDA

Trehaloza, Sigma-Aldrich, ZDA

Dekstran T10, Pharmacosmos, Danska

Maltodekstrin, Merkur trgovina in storitve, Slovenija

Saharoza, Suedzucker AG, Nemčija

Poloksamer 188, BASF, Nemčija

Polietilenglikol 6000 (PEG 6000), Clariant GMBH, Nemčija

Polivinilpirolidon K-25 (PVP K-25), ISP Global Technologies, Nemčija

Polisorbat 80, Croda Chocques SAS, Francija

Demineralizirana voda, Lek, Slovenija

3.2 Aparature

Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

Liofilizator Lio 5P, Kambič, Slovenija

Ultrazvočna šoba Sono-tek 25 kHz, Sono-tek, ZDA

Tabletirka EK-O, Korsch, Nemčija

Mehanski stresalnik Erweka SVM, Erweka, Nemčija

Magnetno mešalo MST digital IKA, Nemčija

Vrstični elektronski mikroskop JSM-7001F, Jeol, Japonska

3.3 Metode

3.3.1 Priprava 0,25 % očetne kisline

0,25 % očetno kislino smo pripravili z redčenjem 100 % očetne kisline z demineralizirano vodo. V 500 ml bučko smo prenesli 498 ml vode, s pipeto dodali 1,192 ml 100 % očetne kisline, s pomočjo kapalke z vodo dopolnili do oznake ter rahlo premešali. pH tako pripravljene raztopine je bil 3,1. Raztopino smo shranjevali pri sobni temperaturi.

3.3.2 Priprava raztopine hitosana v 0,25 % očetni kislini (2 mg/ml)

V čašo smo natehtali 400 mg hitosana in z merilnim valjem dodali 200 ml 0,25 % očetne kisline. Nato smo čašo postavili na magnetno mešalo in pustili mešati čez noč (hitrost mešanja približno 300 obratov/min). Naslednje jutro smo raztopino prefiltrirali skozi 5 µm filter in jo shranjevali v hladilniku.

3.3.3 Priprava raztopine hondroitin sulfata v 0,25 % očetni kislini (2 mg/ml)

V čašo smo natehtali 200 mg hondroitin sulfata in z merilnim valjem dodali 100 ml 0,25 % očetne kisline. Nato smo čašo postavili na magnetno mešalo in pustili mešati čez noč (hitrost mešanja približno 300 obratov/min). Naslednje jutro smo raztopino prefiltrirali skozi 5 µm filter in jo shranjevali v hladilniku.

3.3.4 Izdelava nanodelcev in dodatek pomožnih snovi

Nanodelce smo izdelali z metodo polielektrolitnega kompleksiranja iz polimerov hitosana in hondroitin sulfata. Vnaprej smo pripravili raztopini hitosana in hondroitin sulfata v 0,25 % očetni kislini v koncentraciji 2 mg/ml. V 100 ml čašo smo odpipetirali 28 ml raztopine hondroitin sulfata. Ob mešanju na magnetnem mešalu (hitrost mešanja približno 300 obratov/min) smo nato po kapljicah dodali 13 ml raztopine hitosana ter po 30 minutah mešanja izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Nato smo disperziji nanodelcev dodali pomožne snovi za liofilizacijo, mešali na magnetnem mešalu 30 minut ter ponovno izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev.

Kot pomožne snovi smo najprej uporabili manitol, trehalozo, dekstran, maltodekstrin in saharozo. Na začetku smo naredili formulacije s posameznimi pomožnimi snovmi v koncentracijah 1 %, 2 % in 4 %. V nadaljevanju smo naredili še formulacije, kjer smo kot pomožne snovi uporabili dva sladkorja, šlo je za kombinacije manitola z ostalimi sladkorji (trehalozo, saharozo, dekstranom in maltodekstrinom). Naredili smo tudi kombinacijo manitola in dekstrana, kjer je bila skupna koncentracija pomožnih snovi 3 %. V zadnji fazi smo naredili še formulacije z dodanimi polimeri. Ti so vsebovali enak delež manitola, dekstrana ter enega od naslednjih polimerov: Poloksamer 188, PEG 6000, PVP K-25 in Polisorbat 80. Vse narejene formulacije in njihova sestava so prikazani v Preglednici III.

Preglednica III: Narejene formulacije in njihova sestava (poleg navedenih pomožnih snovi je vsaka formulacija vsebovala še 82 mg nanodelcev).

Oznaka formulacije	Masa pomožne snovi 1	Masa pomožne snovi 2	Masa pomožne snovi 3	Masni delež nanodelcev v suhem produktu (%)
brez pomožnih snovi	/	/	/	100
1 % manitol	410 mg manitola	/	/	16,6
1 % trehaloza	410 mg trehaloze	/	/	16,6
1 % dekstran	410 mg dekstrana	/	/	16,6
1 % maltodekstrin	410 mg maltodekstrina	/	/	16,6
1 % saharoza	410 mg saharoze	/	/	16,6
2 % manitol	820 mg manitola	/	/	9
2 % trehaloza	820 mg trehaloze	/	/	9
2 % dekstran	820 mg dekstrana	/	/	9
2 % maltodekstrin	820 mg maltodekstrina	/	/	9
2 % saharoza	820 mg saharoze	/	/	9
4 % manitol	1640 mg manitola	/	/	4,8
4 % trehaloza	1640 mg trehaloze	/	/	4,8
4 % dekstran	1640 mg dekstrana	/	/	4,8
4 % maltodekstrin	1640 mg maltodekstrina	/	/	4,8
4 % saharoza	1640 mg saharoze	/	/	4,8
2 % (manitol + dekstran)	410 mg manitola	410 mg dekstrana	/	9
2 % (manitol + maltodekstrin)	410 mg manitola	410 mg maltodekstrina	/	9
2 % (manitol + trehaloza)	410 mg manitola	410 mg trehaloze	/	9
3 % (manitol + dekstran)	615 mg manitola	615 mg dekstrana	/	6,3
4 % (manitol + dekstran)	820 mg manitola	820 mg dekstrana	/	4,8
4 % (manitol + maltodekstrin)	820 mg manitola	820 mg maltodekstrina	/	4,8
4 % (manitol + saharoza)	820 mg manitola	820 mg saharoze	/	4,8
4 % (manitol + trehaloza)	820 mg manitola	820 mg trehaloze	/	4,8
2 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	273 mg manitola	273 mg dekstrana	273 mg Poloksamera 188	9
2 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	273 mg manitola	273 mg dekstrana	273 mg PVP K-25	9

3 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	410 mg manitola	410 mg dekstrana	410 mg PEG 6000	6,3
3 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	410 mg manitola	410 mg dekstrana	410 mg PVP K-25	6,3
3 % (manitol + dekstran + polisorbata 80)	410 mg manitola	410 mg dekstrana	410 mg Polisorbata 80	6,3
3 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	410 mg manitola	410 mg dekstrana	410 mg Poloksamera 188	6,3
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	547 mg manitola	547 mg dekstrana	547 mg PVP K-25	4,8
4 % (manitol + dekstran + polisorbata 80)	547 mg manitola	547 mg dekstrana	547 mg Polisorbata 80	4,8
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	547 mg manitola	547 mg dekstrana	547 mg Poloksamera 188	4,8
4 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	547 mg manitola	547 mg dekstrana	547 mg PEG 6000	4,8

3.3.5 Določanje velikosti in zeta potenciala nanodelcev

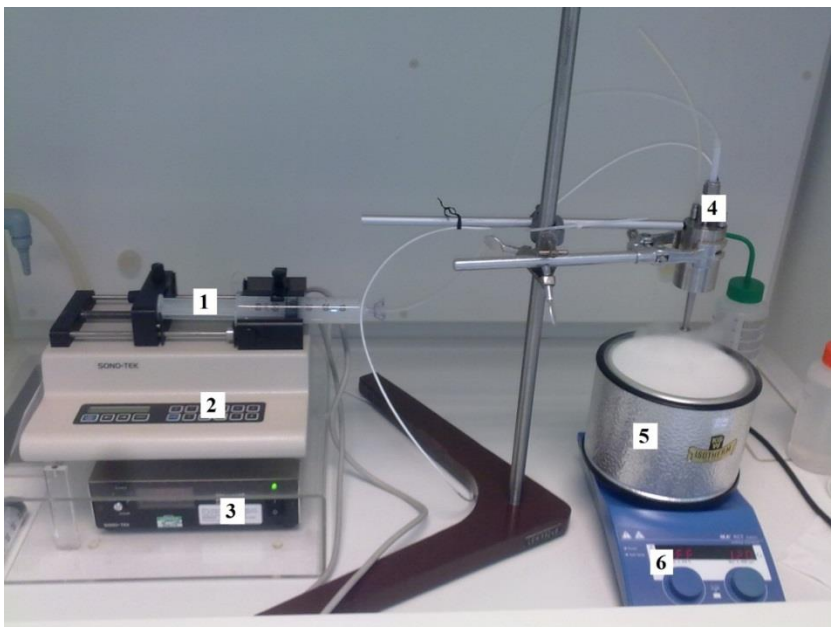
Velikost in zeta potencial nanodelcev smo določali z napravo Zetasizer Nano ZS (4mW He-Ne laser, 633nm). Velikost smo določali z metodo DLS. V polistirensko kiveto za enkratno uporabo smo odpipetirali 1 ml disperzije, kiveto vstavili v aparaturo, v računalniškem programu kot topilo izbrali vodo in nastavili temperaturo meritev na 25 °C. Pri teh pogojih je program kot lomni količnik vode upošteval vrednost 1,330 in kot viskoznost vode 0,8872 cP.

Zeta potencial smo izmerili z metodo elektroforetskega sipanja svetlobe (ELS). Po meritvi velikosti nanodelcev smo v kiveto vstavili potopno celico za merjenje zeta potenciala. V računalniškem programu smo izbrali, da zeta potencial merimo s potopno celico v polistirenski kiveti pri temperaturi 25 °C. Pri teh pogojih je program kot lomni količnik vode upošteval vrednost 1,330, kot viskoznost vode 0,8872 cP in kot dielektrično konstanto vode 79.

Programska oprema Zetasizerja omogoča tudi kontrolo kakovosti meritve in opozarja na ustreznost disperzije za DLS merjenje. Opozorilo izpiše po končani meritvi kot »results meet quality criteria« ali »good«, če je bila disperzija ustrezna za meritev oziroma »results do not meet quality criteria« ali »not good«, če je bila disperzija neustrezna. Vzrok neustreznosti disperzije je največkrat prevelika polidisperznost nanodelcev, kar se kaže tudi v velikem polidisperznem indeksu.

3.3.6 Liofilizacija z razprševanjem v tekoči dušik (Spray-freeze-drying, SFD)

Za SFD smo disperzijo prenesli v brizgo in razprševali z ultrazvočno šobo Sono-tek 25 kHz s pretokom 2 ml/min in močjo ultrazvoka 2 W v Dewarjevo posodo (volumen posode 680 ml), ki je vsebovala približno 500 ml tekočega dušika. Dewarjeva posoda je stala na magnetnem mešalu, ves čas razprševanja smo mešali s hitrostjo 120 obratov/min (slika 6). Po končanem razprševanju smo prenesli vsebino Dewarjeve posode na pladnje za liofilizacijo in liofilizirali čez noč. Uporabili smo Liofilizator Lio 5P LT, liofilizacija je potekala približno 18 ur pri temperaturi $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tlaku 0,003 mbar. Po končani liofilizaciji smo pladnje z liofilizati prenesli v eksikator, kjer je bila relativna vlažnost med 20 % in 30 %. Po enem dnevu smo liofilizate prenesli v prahovke, ki smo jih tudi v nadaljevanju hranili v eksikatorju.



Slika 6: Razprševanje v tekoči dušik. 1 – brizga z disperzijo, 2- črpalka, 3 – vir napajanja, 4- ultrazvočna šoba, 5 – Dewarjeva posoda s tekočim dušikom, 6 – magnetno mešalo.

3.3.7 Določanje pretočnih lastnosti liofilizatov

Pretočne lastnosti liofilizatov smo določali z dvema metodama, z določanjem nasipnega kota ter Carrovega indeksa. Pred določanjem nasipnega kota smo liofilizate presejali skozi sito z velikostjo odprtin 1 mm. 200 mg liofilizata smo nato prenesli v steklen lij s premerom 4,8 cm, ki je bil vpet v stojalo tako, da je bil najnižji del lija 2,5 cm nad delovno površino. Med polnjenjem smo pod lijem držali kartico, ki smo jo nato odmaknili. Liofilizat je stekel iz lija in tvoril stožec. Če liofilizat ni sam stekel iz lija, smo ga premešali s spatulo ter to pri rezultatih tudi ustrezno označili. Višino (h) in premer (2r) nastalega stožca smo izmerili z ravnilom. Z enačbo 1 smo nato izračunali nasipni kot:

Enačba 1: $\tan \alpha = \frac{h}{r}$

Za določanje Carrovega indeksa smo 200 mg liofilizata prenesli v 25 ml merilni valj ter odčitali nasipni volumen (V_{nasipni}). Nato smo merilni valj z liofilizatom stresali na mehanskem stresalniku Erweka SVM s 1250 udarci. Po koncu stresanja smo spet odčitali volumen liofilizata (V_{zbiti}) ter z enačbo 2 izračunali Carrov indeks:

Enačba 2: $\text{Carrov indeks} = 100 \times \frac{V_{\text{nasipni}} - V_{\text{zbiti}}}{V_{\text{nasipni}}} = 100 \times \frac{\rho_{\text{zbita}} - \rho_{\text{nasipna}}}{\rho_{\text{zbita}}}$

3.3.8 Redispergiranje liofilizatov

Liofilizate smo redispergirali v 2 ml vode. V vialo smo prenesli tako količino liofilizata, da je bila koncentracija nanodelcev 2 mg/ml, kot po izdelavi. Po dodatku 2 ml vode smo disperzijo 20 minut mešali na magnetnem mešalu (hitrost mešanja približno 300 obratov/min) ter nato izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Meritve smo ponovili še po 24 urah mešanja. Zabeležili smo tudi, če se je liofilizat v celoti redispergiral ali pa so bili prisotni agregati.

3.3.9 Tabletiranje liofilizatov

Liofilizate, ki so se redispergirali v celoti, smo stisnili v tablete. Uporabili smo tabletirko na udarec Korsch EK-O z ravnimi pečati premera 9 mm. Liofilizate smo v matrico napolnili ročno s spatulo. Tudi stiskanje smo izvedli ročno. Za vsak liofilizat smo stisnili dve tableti, eno z maso približno 150 mg in drugo z maso približno 100 mg.

3.3.10 Redispergiranje tablet

Glede na maso tablete smo izračunali volumen vode za redispergiranje tablete, da bo koncentracija nanodelcev 2 mg/ml. Tableto smo dali v izračunan volumen vode v viali in mešali na magnetnem mešalu (hitrost mešanja približno 300 obratov/min). Po eni uri mešanja smo izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev, kar smo ponovili še po 24 urah mešanja. Preverili smo tudi, če so tablete popolnoma razpadle.

3.3.11 Slikanje liofilizatov z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Liofilizate smo nanесли na dvostranski trak iz ogljika (premera 12 mm) in jih slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Jeol JSM-7001F (pospeševalna napetost 1,5 kV, detekcija sekundarnih elektronov). Povečava mikroskopa je bila med 100-kratno in 2500-kratno.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Velikost nanodelcev pred in po dodatku pomožnih snovi

Izdelavo vsake disperzije smo začeli z izdelavo nanodelcev. Med mešanjem raztopine hondroitin sulfata na magnetnem mešalu smo po kapljicah dodali raztopino hitosana. Pri tem so zaradi interakcij med pozitivno nabitim hitosanom in negativno nabitim hondroitin sulfatom (zeta potencial hondroitin sulfata v 0,25 % očetni kislini je bil -29,1 mV pri pH-ju raztopine 2,53) nastali polielektrolitni kompleksi (PEC). Zaradi vedno večje koncentracije PEC, ki so nastali z dodajanjem raztopine hitosana, je prišlo do zamotnitve disperzije. Končni videz disperzije nanodelcev je bila bela motna disperzija. Po koncu dodajanja raztopine hitosana smo disperzijo na magnetnem mešalu mešali še približno 30 minut. Nato smo izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev, v disperzije dodali pomožne snovi in po 30 minutah mešanja ponovno izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev.

Najprej smo kot pomožne snovi uporabili posamezne sladkorje manitol, trehalozo, dekstran, maltodekstrin in saharozo v koncentracijah 1 %, 2 % in 4 %. Rezultati meritev teh disperzij so predstavljeni v Preglednici IV.

Preglednica IV: Velikost in zeta potencial nanodelcev v disperzijah s posameznimi sladkorji (pred in po dodatku sladkorja).

Disperzija ND + Pomožna snov	Pred dodatkom pomožnih snovi			Po dodatku pomožnih snovi			Razmerje velikosti nanodelcev po in pred dodatkom pomožnih snovi
	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	
1 % manitol	217	0,228	-18,4	218	0,212	-18	1,00
1 % trehaloza	211	0,242	-18,2	237	0,269	-18,1	1,13
1 % dekstran	219	0,202	-17,6	235	0,252	-16,2	1,07
1 % maltodekstrin	234	0,287	-18	254	0,310	-16,1	1,08
1 % saharoza	237	0,253	-17,8	245	0,253	-18,1	1,03
2 % manitol	218	0,216	-18,1	229	0,216	-17,9	1,05
2 % trehaloza	222	0,225	-17,9	233	0,263	-18,3	1,05

2 % dekstran	244	0,326	-19,2	252	0,222	-16,4	1,03
2 % maltodekstrin	264	0,302	-18	292	0,332	-14,7	1,10
2 % saharoza	199	0,220	-18,2	215	0,224	-18,7	1,08
4 % manitol	230	0,285	-17,6	251	0,232	-17,9	1,09
4 % trehaloza	242	0,27	-18,5	272	0,306	-16,1	1,13
4 % dekstran	227	0,307	-17,8	291	0,210	-13,8	1,28
4 % maltodekstrin	237	0,325	-17,3	482	0,398	/*	2,04
4 % saharoza	226	0,241	-20,5	254	0,247	-16,6	1,12

* - neuspešna meritev

Dodatek sladkorja ni značilno vplival na velikost in zeta potencial nanodelcev, razen pri 4 % maltodekstrinu, pri katerem se dodan maltodekstrin ni popolnoma raztopil, tudi če smo podaljšali čas mešanja. Prisotnost neraztopljenih delcev maltodekstrina je verjetno vzrok za večjo izmerjeno velikost in polidisperznost nanodelcev ter najverjetneje tudi za neuspešno meritev zeta potenciala. Vsi ostali sladkorji ter maltodekstrin v koncentracijah 1 % in 2 % so se kmalu po dodatku v disperzijo popolnoma raztopili.

Zaradi dobrih pretočnih lastnosti liofilizatov z manitolom, kar je opisano v poglavju 4.2.1 Pretočne lastnosti liofilizatov, smo v nadaljevanju naredili disperzije s kombinacijo manitola in ostalih sladkorjev. Skupna koncentracija pomožnih snovi je bila 2 % in 4 %, za kombinacijo manitola in dekstrana pa smo naredili še disperzijo s koncentracijo 3 % pomožnih snovi. Rezultati meritev teh disperzij so predstavljeni v Preglednici V.

Preglednica V: Velikost in zeta potencial nanodelcev v disperzijah s kombinacijami manitola z ostalimi sladkorji (pred in po dodatku sladkorjev).

Disperzija ND + Pomožne snovi	Pred dodatkom pomožnih snovi			Po dodatku pomožnih snovi			Razmerje velikosti nanodelcev po in pred dodatkom pomožnih snovi
	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	
2 % (manitol + dekstran)	211	0,220	-21,1	233	0,205	-17,2	1,10
2 % (manitol + maltodekstrin)	229	0,260	-18,8	255	0,280	-15,6	1,11
2 % (manitol + trehaloza)	242	0,298	-17,6	246	0,268	-20,8	1,02
3 % (manitol + dekstran)	246	0,270	-18,9	263	0,243	-16,5	1,07
4 % (manitol + maltodekstrin)	234	0,257	-18,9	306	0,396	-12,3	1,30
4 % (manitol + saharoza)	231	0,228	-19	422	0,432	-16,4	1,83
4 % (manitol + dekstran)	234	0,254	-18,2	364	0,287	-15,1	1,56
4 % (manitol + trehaloza)	255	0,281	-18,9	308	0,398	-16,2	1,21

Dodatek pomožnih snovi v koncentraciji 2 % in 3 % ni bistveno vplival na velikost in zeta potencial nanodelcev. Velikost nanodelcev se je nekoliko povečala po dodatku pomožnih snovi v koncentraciji 4 %, najbolj pri kombinaciji manitola in saharoze. Pri 4 % kombinaciji manitola in maltodekstrina se je dodan maltodekstrin raztopil in tako ni motil meritev kot pri disperziji s 4 % maltodekstrinom. Razlog je manjša koncentracija maltodekstrina v disperziji s kombinacijo manitola in maltodekstrina. Pri slednji smo izmerili tudi zeta potencial, ki se je v primerjavi z ostalimi disperzijami po dodatku pomožnih snovi nekoliko spremenil, lahko da je prišlo do adsorpcije molekul maltodekstrina na nanodelce (sprememba zeta potenciala kaže na neko spremembo na površini nanodelcev).

Kombinacija manitola in dekstrana je v nadaljnjem vrednotenju (poglavji 4.2.1 Pretočne lastnosti liofilizatov in 4.3 Redispergiranje liofilizatov) imela najboljše lastnosti, zato smo

v nadaljevanju naredili še kombinacije manitola in dekstrana s polimeri: Poloksamer 188, PEG 6000, PVP K-25 in Polisorbat 80 (Preglednica VI).

Preglednica VI: Velikost in zeta potencial nanodelcev pred in po dodatku manitola, dekstrana in različnih polimerov. Dodane so tudi vrednosti za kombinacijo manitola in dekstrana.

Disperzija ND + Pomožne snovi	Pred dodatkom pomožnih snovi			Po dodatku pomožnih snovi			Razmerje velikosti nanodelcev po in pred dodatkom pomožnih snovi
	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	
2 % (manitol + dekstran)	211	0,220	-21,1	233	0,205	-17,2	1,10
2 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	225	0,247	-18,3	291	0,353	-16,2	1,29
2 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	234	0,260	-17,5	268	0,290	-14,9	1,15
3 % (manitol + dekstran)	246	0,270	-18,9	263	0,243	-16,5	1,07
3 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	228	0,201	-18,2	281	0,198	-15,1	1,23
3 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	230	0,229	-18,4	334	0,277	-14,9	1,45
3 % (manitol + dekstran + polisorbat 80)	232	0,240	-19,2	309	0,432	-16,5	1,33
3 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	244	0,323	-19,2	323	0,281	-15,2	1,32
4 % (manitol + dekstran)	234	0,254	-18,2	364	0,287	-15,1	1,56
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	206	0,204	-18,2	279	0,206	-15,7	1,35
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	231	0,273	-18,5	465	0,410	-14,2	2,01
4 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	223	0,240	-21	304	0,211	-13,8	1,36
4 % (manitol + dekstran + polisorbat 80)	229	0,255	-17,9	316	0,396	-15,6	1,38

V splošnem je dodatek polimera k manitolu in dekstranu povečal velikost nanodelcev (disperzije z 2 % in 3 % pomožnih snovi). Povečanje velikosti po dodatku polimerov lahko razložimo z njihovo adsorpcijo na površino nanodelcev. Pri disperzijah s 4 % pomožnih snovi takega porasta nismo zaznali, z izjemo disperzije s poloksamerom, ki je najbolj od vseh povečal velikost nanodelcev. Pri koncentraciji 4 % je že sama kombinacija manitola in dekstrana bolj povečala velikost nanodelcev kot pri nižjih koncentracijah. Izmerjena večja velikost nanodelcev po dodatku sladkorjev v koncentraciji 4 % je lahko posledica nenatančnih parametrov oz. konstant, upoštevanih pri meritvah z DLS-aparaturu. Pri naših meritvah je aparatura za izračun velikosti vedno upoštevala isto vrednost za viskoznost, čeprav se je z večanjem koncentracije sladkorjev povečala tudi viskoznost disperzije (zeta potencial se je po dodatku pomožnih snovi približno enako zmanjšal pri vseh disperzijah).

4.2 Liofilizacija disperzij nanodelcev z razprševanjem v tekoči dušik

Disperzije nanodelcev z dodanimi pomožnimi snovmi smo razprševali z ultrazvočno šobo v tekoči dušik v Dewarjevi posodi. Po koncu razprševanja smo vsebino Dewarjeve posode prenesli na pladnje za liofilizacijo, počakali, da je dušik izparel, nato pa pladnje prenesli v sušilno komoro liofilizatorja, kjer je preko noči potekla liofilizacija. Po končani liofilizaciji smo pladnje z liofilizati prenesli v eksikator, kjer smo vzdrževali nizko vsebnost vlage v zraku. Po enem dnevu smo liofilizate iz pladnjev prenesli v prahovke, ki smo jih do nadaljnjega dela shranjevali v eksikatorju.

4.2.1 Pretočne lastnosti liofilizatov

Pretočne lastnosti liofilizatov smo proučevali z dvema metodama, z merjenjem nasipnega kota in z merjenjem Carrovega indeksa. Poleg pretočnih lastnosti smo opazovali tudi obnašanje liofilizatov ob rokovanju. Ti so bili med delom izpostavljeni zraku, zato so nekateri vezali vlago iz zraka. Intenzivnost vezanja je bila različna, nekateri so se samo združevali v granule, drugi so se na zraku raztapljali, pri nekaterih pa znakov vezanja vlage nismo opazili. Liofilizati, ki so se raztapljali na zraku, niso bili primerni za tabletiranje zaradi predolgega časa izpostavitve na zraku. Določen problem pri rokovanju je predstavljala elektrostatičnost nekaterih liofilizatov, ki so se prijemale na površine. Izgube pri takih liofilizatih so bile večje kot pri liofilizatih, ki niso bili elektrostatični.

V preglednici VII so predstavljene pretočne lastnosti liofilizatov s posameznimi sladkorji. Dodan je tudi komentar glede na njihovo obnašanje ob rokovanju.

Preglednica VII: Pretočne lastnosti in obnašanje liofilizatov s posameznimi sladkorji.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Nasipni kot (°)	Potrebno mešanje s spatulo	Carrov indeks (%)	Obnašanje pri rokovanju
1 % dekstran	21,4	NE	20,0	Združevanje v granule je zmanjšalo elektrostatičnost.
1 % maltodekstrin	15,9	NE	14,3	Združevanje v granule je odstranilo elektrostatičnost.
1 % manitol	12,9	NE	9,1	Močno elektrostatičen liofilizat, ni združevanja v granule.
1 % trehaloza	24,8	DA	50,0	Močno vezanje vlage, združevanje v granule in raztapljanje. Prijemanje na stene lija.
1 % saharoza	/	/	/	Pretočnih lastnosti nismo mogli izmeriti, ker je liofilizat tako hitro vezal vlago in se raztopil.
2 % dekstran	31,5	NE	31,3	Rahlo združevanje v granule, ni elektrostatičen.
2 % maltodekstrin	22,7	NE	20,0	Združevanje v granule je odstranilo elektrostatičnost.
2 % manitol	20,3	NE	18,8	Močno elektrostatičen liofilizat, ni združevanja v granule.
2 % trehaloza	44,2	DA	33,3	Močno vezanje vlage, združevanje v granule in raztapljanje.
4 % dekstran	42,8	DA	22,6	Močno elektrostatičen, prijemanje na stene lija.
4 % maltodekstrin	26,1	NE	31,3	Prijemanje na stene lija, zmerna elektrostatičnost.
4 % manitol	7,9	NE	9,1	Močno elektrostatičen liofilizat, ni združevanja v granule.
4 % saharoza	35,4	DA	42,9	Močno vezanje vlage, hitro pride do zlepljanja, liofilizat ni več rahel ali v granulah, ampak v enem zlepljenem kosu. Prijemanje na stene lija.
4 % trehaloza	38,4	DA	47,4	Prijemanje na stene lija, zmerna elektrostatičnost.

Pri posameznih sladkorjih so imeli najboljše pretočne lastnosti liofilizati z manitolom. Liofilizatu 4 % manitol smo izmerili najmanjši nasipni kot in najmanjši Carrov indeks med vsemi narejenimi liofilizati s posameznimi sladkorji. Razlika med manitolom in ostalimi sladkorji je lahko posledica dejstva, da manitol pri liofilizaciji kristalizira, medtem ko ostali sladkorji tvorijo amorfnost. Drugo najboljše pretočnost so imeli liofilizati nanodelcev z maltodekstrinom, pri vseh treh koncentracijah in pri obeh metodah

določevanja pretočnosti. Liofilizati z dekstranom so imeli povprečne pretočne lastnosti, razen liofilizata 4 % dekstran, katerega smo morali pri določevanju nasipnega kota pomešati s spatulo, da je stekel iz lija. To smo morali storiti tudi pri liofilizatih nanodelcev s trehalozo in saharozo. Slabo pretočnost teh liofilizotov smo večinoma potrdili z merjenjem Carrovega indeksa, ki je bil pri vseh med višjimi. Izjema je liofilizat 4 % dekstran, ki je imel dokaj nizek Carrov indeks.

Pri rokovanju so se liofilizati z manitolom obnašali drugače kot ostali liofilizati. Bili so zelo elektrostatični in pri nobenem nismo opazili znakov vezanja vlage iz zraka, kot je združevanje v granule. Liofilizati, ki so vsebovali amorfne pomožne snovi, so v določenem obsegu vezali vlago. Intenzivnost vezanja vlage je bila zelo različna, od liofilizotov, ki so se samo rahlo združevali v granule, do takih, ki so se na zraku raztopili. Rahlo združevanje v granule je v nekaterih primerih odstranilo elektrostatičnost, npr. pri liofilizatih z maltodekstrinom (1 % in 2 %). Zelo intenzivno vezanje vlage, kjer so se liofilizati na zraku raztopili, smo opazili pri liofilizatih s trehalozo in saharozo, ki so imeli tudi najslabše pretočne lastnosti. Liofilizat 1 % saharoza je tako hitro vezal vlago, da se je pri kratkem rokovanju raztopil (nasipnega kota in Carrovega indeksa nismo uspeli izmeriti). Posebno obnašanje smo opazili pri liofilizatu 4 % saharoza, ki se je na zraku zlepil v trden skupek in se počasi raztopil.

Med liofilizati s posamičnimi sladkorji smo opazili razliko med liofilizati z manitolom na eni strani, ki so bili elektrostatični in imeli dobre pretočne lastnosti, ter liofilizati z amorfnimi pomožnimi snovmi na drugi, ki so v različnem obsegu vezali vlago ter v splošnem imeli slabšo pretočnost. V nadaljevanju smo zato naredili formulacije, kjer smo kot pomožne snovi uporabili kombinacije manitola z ostalimi sladkorji (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Pretočne lastnosti in obnašanje liofilizatorjev s kombinacijami manitola z nekaterimi drugimi sladkorji.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Nasipni kot (°)	Potrebno mešanje s spatulo	Carrov indeks (%)	Obnašanje pri rokovanju
2 % (manitol + dekstran)	23,7	NE	12,5	Rahlo združevanje v granule, ni elektrostatičen.
2 % (manitol + maltodekstrin)	21,8	NE	15,0	Rahlo združevanje v granule, kar odstrani elektrostatičnost.
3 % (manitol + dekstran)	17,6	NE	12,5	Liofilizat je zmerno elektrostatičen, opazno je rahlo združevanje v granule.
4 % (manitol + dekstran)	9,7	NE	10,5	Ni elektrostatičen, združevanje v granule je komaj opazno.
4 % (manitol + maltodekstrin)	26,1	NE	18,2	Zmerno elektrostatičen liofilizat, opazno je združevanje v granule.
4 % (manitol + saharoza)	27,1	NE	11,1	Ni elektrostatičen, zelo hitro veže vlago, hitro pride do zlepljanja, liofilizat ni več rahel ali v granulah, ampak v enem zlepljenem kosu.

Med temi liofilizati smo najboljše pretočne lastnosti izmerili liofilizatom s kombinacijo manitola in dekstrana. Njihova pretočnost se je izboljševala s povečevanjem koncentracije pomožnih snovi. Med vsemi narejenimi liofilizati je imel manjši nasipni od liofilizata 4 % (manitol + dekstran) samo liofilizat s samim manitolom (4 %). Pri liofilizatih s to kombinacijo smo opazili rahlo združevanje v granule, kar je zelo zmanjšalo ali celo povsem odstranilo elektrostatičnost, ki je bila značilna za liofilizate nanodelcev s samim manitolom. Podobno obnašanje smo opazili tudi pri liofilizatih z manitolom in maltodekstrinom, ki so imeli nekoliko slabšo pretočnost. Drugače velja za liofilizate s kombinacijama manitola in saharoze ter manitola in trehaloze, ki so intenzivno vezali vlago in se raztapljali. Pri kombinaciji manitola in saharoze smo poleg raztapljanja opazili tudi zlepljanje liofilizata v en trden kos, podobno kot pri liofilizatu 4 % saharoza. Najhitreje so vezali vlago in se raztopili liofilizati s kombinacijo manitola in trehaloze. Ti so se raztopili že takoj po koncu liofilizacije, med prenosom iz liofilizatorja v eksikator. To je bilo zelo kmalu po izenačitvi tlaka v sušilni komori liofilizatorja, ob njihovem prvem stiku z zrakom, zato tem liofilizatom nismo uspeli določiti pretočnih lastnosti.

Zaradi dobre pretočnosti in sprejemljivih lastnosti pri rokovanju smo za nadaljnje delo izbrali kombinacijo manitola in dekstrana. Tej kombinaciji smo dodali polimere. Pretočne lastnosti teh liofilizatov so predstavljene v Preglednici IX.

Preglednica IX: Pretočne lastnosti in obnašanje liofilizatov s kombinacijo manitola in dekstrana s polimeri.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Nasipni kot (°)	Potrebno mešanje s spatulo	Carrov indeks (%)	Obnašanje pri rokovanju
2 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	26,1	NE	16,7	Ni elektrostatičen, na stene lija se ne prijemlje, opazno je rahlo združevanje v granule.
2 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	17,8	NE	30,8	Liofilizat ni elektrostatičen, opazno je rahlo združevanje v granule.
3 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	19,3	NE	12,0	Sprva zelo elektrostatičen, rahlo združevanje v granule odstrani elektrostatičnost.
3 % (manitol + dekstran + polisorbitat 80)	22,6	NE	11,1	Močno elektrostatičen liofilizat, opazno je rahlo združevanje v granule, kar pa ne odstrani elektrostatičnosti.
3 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	17,9	NE	12,9	Elektrostatičen liofilizat, vlage ne veže in se ne združuje v granule.
3 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	31,8	DA	33,3	Liofilizat močno veže vlago, se združuje v granule in se raztaplja.
4 % (manitol + dekstran + PEG)	13,4	NE	13,8	Liofilizat ni elektrostatičen, združevanje v granule je komaj opazno.
4 % (manitol + dekstran + polisorbitat 80)	24,6	NE	25,0	Elektrostatičen liofilizat, veže vlago in se združuje v granule in se raztaplja.
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	22,1	NE	6,7	Liofilizat ni elektrostatičen, vlage ne veže in se ne združuje v granule.
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	34,3	NE	42,9	Liofilizat ni elektrostatičen, vendar veže vlago, se združuje v večje granule in se raztaplja.

Z dodatkom polimerov smo želeli preveriti, če lahko kombinaciji manitola in dekstrana še izboljšamo lastnosti. Noben liofilizat s polimeri ni imel tako dobrih pretočnih lastnosti (merjeno z metodo nasipnega kota) kot sama kombinacija manitola in dekstrana, najbolj se ji je približal liofilizat 4 % (manitol + dekstran + PEG). Sledili so liofilizati s polimeroma poloksamer 188 in polisorbato 80, najslabše pretočne lastnosti pa smo izmerili liofilizatom s polimerom PVP K-25 (3 % in 4 %). Slaba pretočnost teh dveh liofilizotov je bila posledica intenzivne vezave vlage, zaradi katere so se liofilizati raztapljali. Raztapljanje smo opazili tudi pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran + polisorbato 80). Pri ostalih liofilizatih s polimeri smo opazili samo združevanje v granule, ki je pri liofilizatu 3 % (manitol + dekstran + PEG) odstranilo elektrostatičnost, medtem ko je liofilizat 3 % (manitol + dekstran + polisorbato 80) tudi po vezavi vlage ostal elektrostatičen. Pri nekaterih liofilizatih s polimeri nismo opazili elektrostatičnosti niti pred nastankom granul, npr. pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran + PEG). Med liofilizati s polimeri je bil liofilizat s PEG zaradi dobrih pretočnih lastnosti, odsotnosti elektrostatičnosti in majhnega združevanja v granule najprimernejši za nadaljnje delo.

4.3 Redispergiranje liofilizotov

Med postopkom liofilizacije so bili nanodelci izpostavljeni različnim stresnim pogojem, ki lahko povzročijo njihovo agregacijo. Da bi to preprečili oz. omejili, smo uporabili različne pomožne snovi. Manitol je polnilo, ker med liofilizacijo kristalizira (1, 23). Nastali kristali manitola z imobilizacijo nanodelcev preprečujejo njihovo agregacijo. Trehaloza, saharoza, dekstran in maltodekstrin med liofilizacijo tvorijo amorfnost, zato so stabilizatorji (1, 12, 24). Nanodelce pred agregacijo ščitijo z mehanizmom nadomeščanja vode, z vodikovimi vezmi ohranjajo njihovo strukturo. Liofilizati, pri katerih so pomožne snovi dovolj učinkovito zaščitile nanodelce pred agregacijo, so se v vodi popolnoma redispergirali, nastala je bela motna disperzija, podobna disperziji pred liofilizacijo. Pri nekaterih pa je nastala motna disperzija, v kateri so bili prisotni tudi delci, vidni s prostim očesom, meritve z DLS-aparaturjo pa so praviloma pokazale veliko polidisperznost nanodelcev. Taki liofilizati se niso popolnoma redispergirali, ker so bile pomožne snovi neustrezne oz. jih je bilo premalo, da bi med liofilizacijo učinkovito zaščitile nanodelce pred agregacijo. Zaradi agregacije nanodelcev se izgubijo prednosti, ki jih prinaša nanometrski dostavni sistem, zato je bilo popolno redispergiranje liofilizotov nujen pogoj

pri naši izbiri najboljše formulacije. Formulacije, pri katerih se liofilizati niso popolnoma redispergirali, smo izločili iz izbora za nadaljnje delo.

Za redispergiranje smo iz prahovke v vialo prenesli tako količino liofilizata, da smo po redispergiranju v 2 ml vode dobili enako koncentracijo nanodelcev kot v začetni disperziji (2 mg/ml), dodali 2 ml vode in mešali na magnetnem mešalu (hitrost mešanja približno 300 obratov/min). Po 20 minutah mešanja smo izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Disperzije smo nato pustili mešati 24 ur ter nato ponovno izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Izmerjeno velikost smo primerjali glede na velikost nanodelcev pred liofilizacijo, torej velikost, ki je bila izmerjena po dodatku pomožnih snovi v prvotno disperzijo. V preglednicah, kjer so predstavljeni rezultati meritev, je ta primerjava velikosti predstavljena v stolpcih z oznakama $R_{20 \text{ min}}$ in $R_{24 \text{ ur}}$. $R_{20 \text{ min}}$ je razmerje med velikostjo nanodelcev, izmerjeno 20 minut po redispergiranju liofilizata, in velikostjo nanodelcev pred liofilizacijo. $R_{24 \text{ ur}}$ pa je razmerje med velikostjo nanodelcev, izmerjeno po 24 urah mešanja od redispergiranja liofilizata, in velikostjo nanodelcev pred liofilizacijo. V preglednicah smo zabeležili tudi, če so se liofilizati popolnoma redispergirali. Liofilizati, ki so se popolnoma redispergirali, pri katerih s prostim očesom nismo opazili delcev, imajo v stolpcu Popolnoma redispergirani (oz. Pop. red.) oznako DA. Tisti liofilizati, ki se niso popolnoma redispergirali, pri katerih smo lahko s prostim očesom v disperziji videli delce oz. agregate, imajo v istem stolpcu oznako NE. Preglednica X prikazuje velikosti in zeta potenciale nanodelcev po redispergiranju liofilizatov s posameznimi sladkorji.

Preglednica X: Velikost in zeta potencial nanodelcev po redispergiranju liofilizatov s posameznimi sladkorji.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Pred liofilizacijo		20 minut po redispergiranju v vodi					24 ur po redispergiranju v vodi				
	Z-Ave (nm)	Pdl	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	R _{20 min}	Pop. red.	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	R _{24 ur}	Pop. red.
1 % manitol	218	0,212	832	0,377	-43,1	3,82	NE	730	0,372	-43,8	3,35	NE
1 % trehaloza	237	0,269	492	0,441	-31,9	2,07	NE	418	0,330	-32,1	1,76	NE
1 % dekstran	235	0,252	556	0,257	-33,5	2,37	NE	542	0,276	-33,4	2,31	NE
1 % maltodekstrin	254	0,310	597	0,519	-27,8	2,35	NE	421	0,548	-27,2	1,66	NE
1 % saharoza	245	0,253	557	0,646	-29,7	2,27	NE	554	0,433	-29,5	2,26	NE
2 % manitol	229	0,216	890	0,438	-34,3	3,88	NE	1029	0,313	-35,2	4,49	NE
2 % trehaloza	233	0,263	438	0,620	-23,2	1,88	NE	296	0,283	-23,7	1,27	NE
2 % dekstran	252	0,222	387	0,356	-26,9	1,54	DA	412	0,287	-26,5	1,64	DA
2 % maltodekstrin	292	0,332	464	0,493	-16,9	1,59	NE	410	0,462	-14,6	1,41	NE
2 % saharoza	215	0,224	661	0,518	-20,4	3,08	NE	615	0,486	-21,7	2,86	NE
4 % manitol	251	0,232	401	0,252	-30,9	1,60	DA	626	0,185	-31,3	2,50	DA
4 % trehaloza	272	0,306	277	0,275	-21,4	1,02	DA	266	0,239	-22,6	0,98	DA
4 % dekstran	291	0,210	407	0,392	-21,4	1,40	DA	334	0,255	-21,9	1,15	DA
4 % maltodekstrin	482	0,398	670	0,518	/*	1,39	NE	769	0,515	/*	1,60	NE
4 % saharoza	254	0,247	323	0,293	-17,3	1,27	DA	312	0,328	-19,1	1,23	DA

* - neuspešna meritev

Med liofilizati nanodelcev s posameznimi sladkorji se veliko liofilizatov ni popolnoma redispergiralo, prisotni so bili s prostim očesom vidni agregati. Takšni so bili vsi liofilizati, narejeni iz disperzij z 1 % in 2 % pomožnih snovi, razen liofilizata 2 % dekstran. Vzrok slabega redispergiranja teh liofilizatov je premajhna količina pomožnih snovi. V disperziji

je bila premajhna koncentracija sladkorjev, da bi učinkovito zaščitila nanodelce pred agregacijo med postopkom liofilizacije. Disperzije redispergiranih liofilizatov nanodelcev s saharozo (1 %) in maltodekstrinom (1%, 2%, 4%) so bile tudi zelo polidisperzne. Formulacija 2 % dekstran je tako imela najmanjšo koncentracijo pomožnih snovi, pri kateri se je liofilizat popolnoma redispergiral. Ugodno je, če je koncentracija ali delež pomožnih snovi v formulaciji čim manjši, saj to omogoča vgradnjo večje količine nanodelcev v določeno količino liofilizata.

Liofilizati, narejeni iz disperzij s 4 % koncentracijo sladkorjev, so se popolnoma redispergirali, izjema je bil liofilizat z maltodekstrinom, kar smo pričakovali, saj se maltodekstrin v tej koncentraciji že pred liofilizacijo ni v celoti raztopil. Najmanjši porast velikosti smo po redispergiranju izmerili liofilizatu s trehalozo, kjer je velikost nanodelcev ostala skoraj enaka kot pred liofilizacijo. Tudi nizek polidisperzni indeks in skoraj nespremenjen zeta potencial kažejo na to, da so se lastnosti nanodelcev v tej formulaciji zelo dobro ohranile. Podobno velja tudi za liofilizate s saharozo in dekstranom, kjer so bile te spremembe nekoliko večje. Vsi trije sladkorji imajo med liofilizacijo vlogo stabilizatorjev, tvorijo amorfnost. Pri vseh so se po liofilizaciji in redispergiranju v vodi lastnosti nanodelcev dobro ohranile. Med liofilizati, narejenimi iz disperzij s 4 % posameznih sladkorjev, se je velikost nanodelcev po redispergiranju najbolj povečala pri liofilizatu z manitolom, ki se je še dodatno povečala po 24 urah mešanja, kar je lahko posledica agregacije nanodelcev v tej disperziji.

Velikost nanodelcev se je praviloma zmanjšala po 24 urah mešanja, z izjemo liofilizata 2 % dekstran. Zeta potencial redispergiranega liofilizata z manitolom je bil zelo drugačen kot v disperziji pred liofilizacijo, kar lahko kaže na določeno spremembo na površini nanodelcev, ki se je zgodila med razprševanjem ali liofilizacijo. Pri redispergiranju liofilizatov, pripravljenih z ostalimi sladkorji, tako velike spremembe v zeta potencialu ni bilo.

V Preglednici XI so predstavljene velikosti in zeta potenciali nanodelcev po redispergiranju liofilizatov, pripravljenih s kombinacijami manitola z nekaterimi drugimi sladkorji.

Preglednica XI: Velikost in zeta potencial nanodelcev po redispergiranju liofilizatov z manitolom v kombinaciji z nekaterimi drugimi sladkorji.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Pred liofilizacijo		20 minut po redispergiranju v vodi					24 ur po redispergiranju v vodi				
	Z-Ave (nm)	Pdl	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	R _{20 min}	Pop. red.	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	R _{24 ur}	Pop. red.
2 % (manitol + dekstran)	233	0,205	747	0,509	-21,4	3,21	NE	607	0,443	-20	2,61	NE
2 % (manitol + maltodekstrin)	255	0,280	453	0,473	-25,8	1,78	NE	408	0,424	-24,7	1,60	NE
3 % (manitol + dekstran)	263	0,243	453	0,355	-25,1	1,72	DA	435	0,442	-24,2	1,66	DA
4 % (manitol + maltodekstrin)	306	0,396	796	0,592	-14,1	2,60	NE	438	0,565	-16,6	1,43	NE
4 % (manitol + saharoza)	422	0,432	319	0,270	-20,2	0,76	DA	307	0,255	-22,5	0,73	DA
4 % (manitol + dekstran)	364	0,287	424	0,208	-26,6	1,17	DA	394	0,199	-26,6	1,08	DA

Med liofilizati, pripravljenimi s kombinacijami manitola z nekaterimi drugimi sladkorji, so se popolnoma redispergirali samo trije liofilizati: 3 % (manitol + dekstran), 4 % (manitol + dekstran) in 4 % (manitol + saharoza). Pri formulacijah z 2 % pomožnih snovi je bilo, podobno kot pri formulacijah s posameznimi sladkorji, pomožnih snovi premalo, da bi zagotovile zadostno zaščito med liofilizacijo. Liofilizati z maltodekstrinom se tudi v kombinaciji z manitolom niso popolnoma redispergirali, zato smo maltodekstrin izločili iz izbora najprimernejših pomožnih snovi. Velikost nanodelcev se je po redispergiranju teh liofilizatov najbolj ohranila pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran), pri katerem smo izmerili tudi nizek Pdl, kar kaže na ozko porazdelitev velikosti nanodelcev po redispergiranju liofilizata. Pri liofilizatu 3 % (manitol + dekstran) je bila velikost nanodelcev nekoliko večja, Pdl pa precej večji kot pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran). Formulacija 4 % (manitol + saharoza) je bila edina formulacija brez polimerov, kjer je bila velikost nanodelcev v redispergirani disperziji manjša kot v prvotni disperziji pred liofilizacijo, kar je lahko posledica delne disociacije kompleksov med razprševanjem ali liofilizacijo.

Preglednica XII prikazuje izmerjene velikosti in zeta potenciale nanodelcev po redispergiranju liofilizatov, pripravljenih s kombinacijami manitola, dekstrana in različnih polimerov.

Preglednica XII: Velikost in zeta potencial nanodelcev po redispergiranju liofilizatov, pripravljenih z manitolom, dekstranom in različnimi polimeri. Dodane so tudi vrednosti za kombinacije manitola in dekstrana.

Liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Pred liofilizacijo		20 minut po redispergiranju v vodi					24 ur po redispergiranju v vodi				
	Z-Ave (nm)	PdI	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	R _{20 min}	Pop. red.	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	R _{24 ur}	Pop. red.
2 % (manitol + dekstran)	233	0,205	747	0,509	-21,4	3,21	NE	607	0,443	-20	2,61	NE
2 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	291	0,353	534	0,387	-29,2	1,84	NE	490	0,417	-28,4	1,69	NE
2 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	268	0,290	547	0,426	-27,4	2,04	NE	495	0,428	-25,6	1,84	NE
3 % (manitol + dekstran)	263	0,243	453	0,355	-25,1	1,72	DA	435	0,442	-24,2	1,66	DA
3 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	281	0,198	838	0,542	-22,6	2,98	NE	598	0,447	-24,6	2,13	NE
3 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	334	0,277	575	0,425	-22,6	1,72	NE	512	0,362	-27,9	1,53	NE
3 % (manitol + dekstran + polisorbitat 80)	309	0,432	516	0,520	-23,9	1,67	NE	416	0,478	-27,2	1,34	NE
3 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	323	0,281	530	0,324	-27,1	1,64	NE	466	0,289	-26,5	1,44	NE
4 % (manitol + dekstran)	364	0,287	424	0,208	-26,6	1,17	DA	394	0,199	-26,6	1,08	DA
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	279	0,206	441	0,367	-21,2	1,58	DA	422	0,278	-23,1	1,51	DA

4 % (manitol + dekstran + polisorbitat 80)	316	0,396	1002	0,762	/*	3,17	NE	999	0,561	/*	3,16	NE
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	465	0,410	552	0,448	-23,7	1,19	DA	410	0,411	-21,4	0,88	DA
4 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	304	0,211	569	0,458	-21,1	1,87	DA	537	0,428	-22,4	1,76	DA

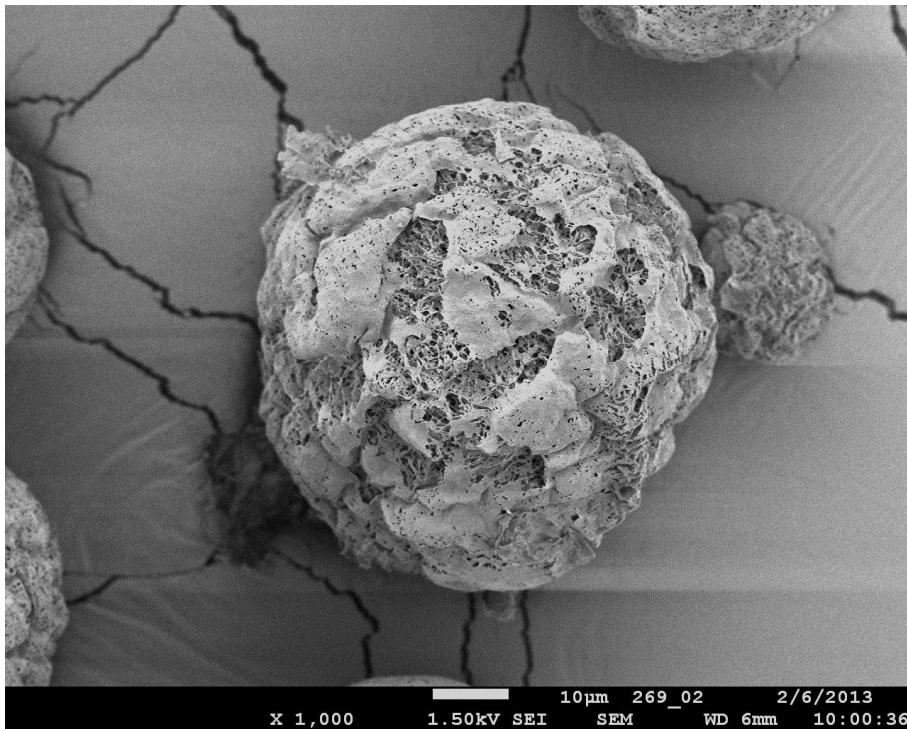
* - neuspešna meritev

Noben liofilizat, narejen iz disperzij s kombinacijami manitola in dekstrana s polimeri, v skupni koncentraciji pomožnih snovi 2 % ali 3 %, se ni popolnoma redispergiral v vodi. Liofilizati, narejeni iz disperzij s 4 % pomožnih snovi, so se povečini redispergirali v celoti, izjema je liofilizat s polisorbitatom 80, ki je po redispergiranju dajal mikronske delce z veliko polidisperznostjo. Kljub ustreznemu redispergiranju liofilizatorov, narejenih iz disperzij s 4 % pomožnih snovi s polimeri, ti niso tako dobro ohranili lastnosti nanodelcev kot sama kombinacija manitola in dekstrana. Velikost in polidisperznost nanodelcev je bila pri vseh redispergiranih liofilizatih s polimeri večja kot pri kombinaciji manitola in dekstrana brez polimerov. Najmanjšo polidisperznost in velikost nanodelcev med liofilizati s polimeri smo izmerili pri liofilizatu s PVP-jem, največjo pa pri liofilizatu s PEG. Pri skoraj vseh liofilizatih smo zasledili, da pri daljšem času redispergiranja liofilizatorov v vodi (24 ur) dobimo manjše delce kot pri krajšem času (20 minut). Rezultati so pričakovani, saj daljši časi omogočajo učinkovitejše redispergiranje in razpad agregatov v nanodelce. Zmanjšanje velikosti pod velikost nanodelcev pred liofilizacijo, kar smo izmerili pri liofilizatu s poloksamerom, pa lahko kaže na delno disociacijo polimernih verig iz kompleksov.

4.4 Slikanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom

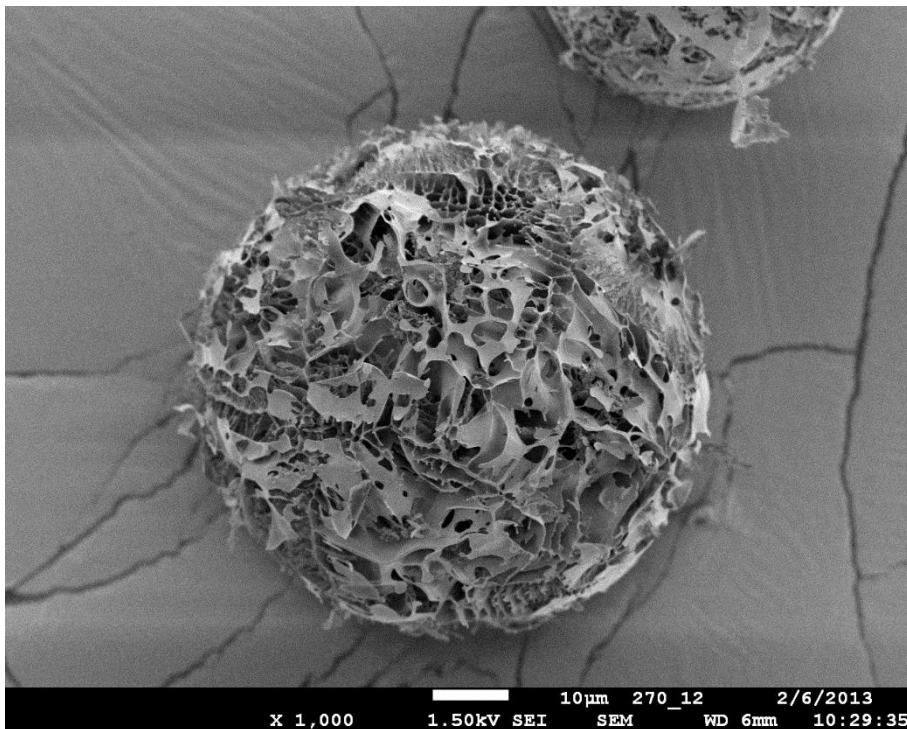
Nekatere liofilizate, ki so se popolnoma redispergirali, smo slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Zanimale so nas oblika in morfologija nastalih delcev pri SFD ter razlike glede na uporabljene pomožne snovi. Na podlagi teh ugotovitev lahko morda ustrezneje razložimo razlike v pretočnih lastnostih liofilizatov in njihovem redispergiranju.

Pri liofilizatu 4 % manitol so nastali sferični delci s porozno strukturo in površino, na kateri se izmenjujejo zapolnjeni in odprti porozni deli (slika 7). Delci so imeli premer približno 60 μm . Liofilizat je imel zelo dobre pretočne lastnosti, kar je lahko posledica lepe okrogle oblike in delno zapolnjene površine delcev, ki med seboj lahko neovirano tečejo. Zaradi poroznosti se je liofilizat hitro in popolnoma redispergiral v vodi.



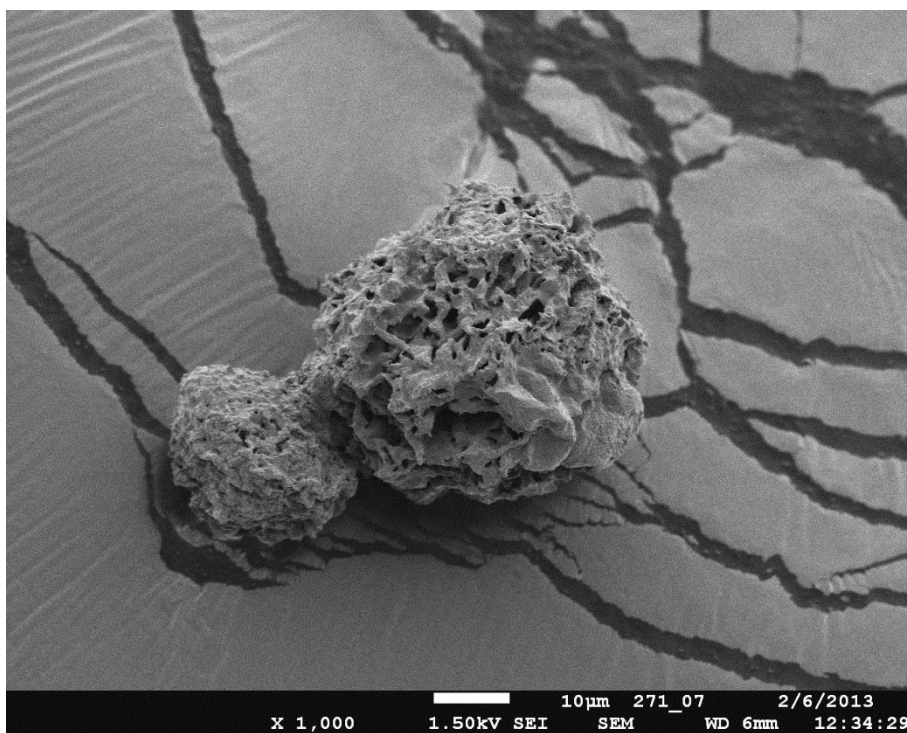
Slika 7: Liofilizat 4 % manitol

Delci liofilizata 4 % dekstran so sferični (premer približno 70 μm), površina teh delcev ima navzven odprte pore, zato ni gladka (slika 8). Slednje je lahko vzrok slabših pretočnih lastnosti tega liofilizata, ki smo ga morali med merjenjem nasipnega kota pomešati s spatulo, da je stekel. V primerjavi z liofilizatom nanodelcev z manitolom, kjer je bil porozen samo del površine delca, se lahko takšni delci pri premikanju bolj ovirajo med sabo. Velika poroznost delcev in odprte pore pa omogočata lažje redispergiranje liofilizatov v vodi, s čimer lahko razložimo popolno redispergiranje liofilizata, narejenega iz disperzije z dekstranom v zelo nizki koncentraciji 2 %.



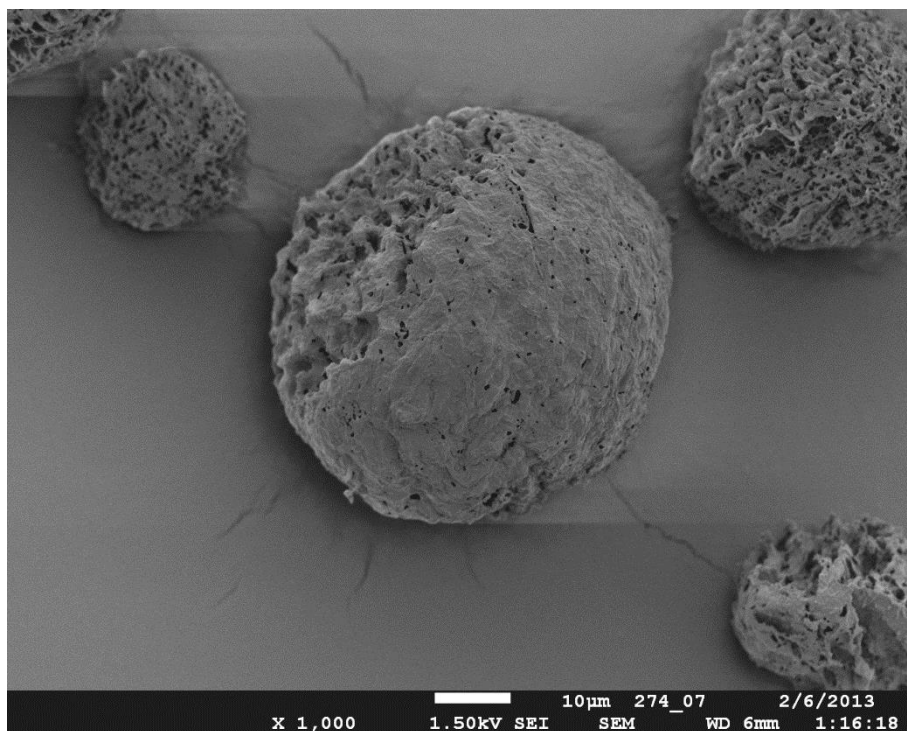
Slika 8: Liofilizat 4 % dekstran

Na sliki 9 liofilizata 4 % (manitol + dekstran) sta prikazana dva delca, ki sta različnih velikosti (večji ima premer približno 40 μm , manjši pa približno 20 μm). V primerjavi z delci liofilizatov s posameznima manitolom in dekstranom so delci liofilizata s kombinacijo teh dveh snovi manjši in manj pravilno sferični. Opazimo lahko porozno strukturo delcev, z bolj ali manj zapolnjeno površino, kar omogoča popolno redispergiranje v vodi. Liofilizat je imel zelo dobre pretočne lastnosti.



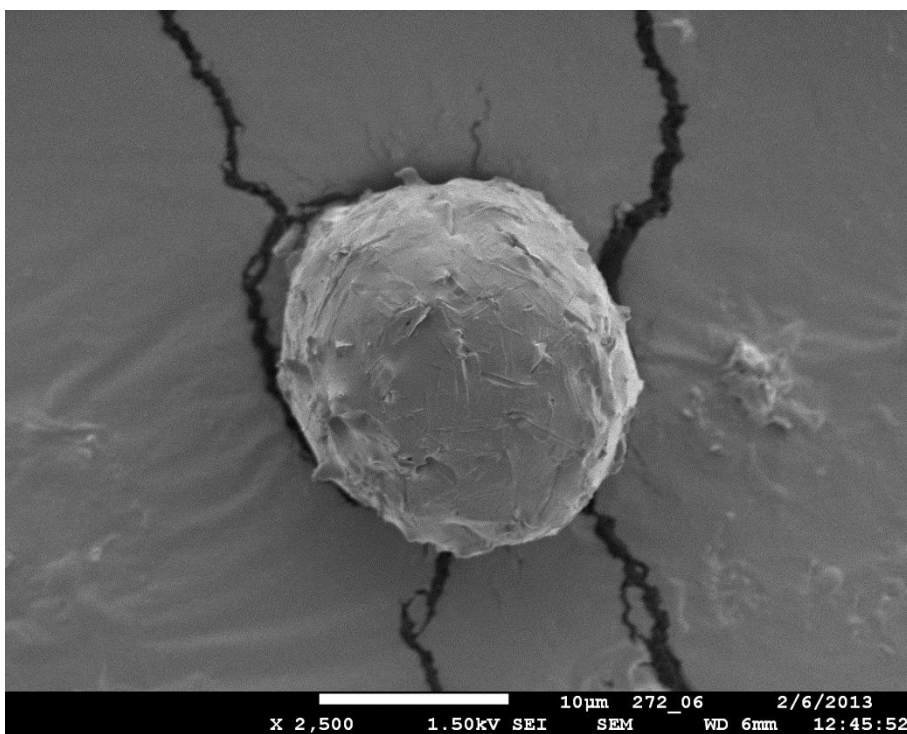
Slika 9: Liofilizat 4 % (manitol + dekstran)

Z dodatkom polimera PEG h kombinaciji manitola in dekstrana so nastali sferični delci z bolj zapolnjeno površino, opazimo pa tudi njihovo porozno strukturo (slika 10). V primerjavi z delci liofilizata manitola in dekstrana brez polimera so delci bolj sferični, imajo manj odprtih por in so nekoliko večji (premer delca na sliki je približno 50 μm). Taki delci se pri premikanju ne ovirajo med sabo, kar je lahko vzrok za dobre pretočne lastnosti liofilizata. Liofilizat se je v vodi zaradi porozne strukture popolnoma redispergirala.



Slika 10: Liofilizat 4 % (manitol + dekstran + PEG)

Na sliki 11 so delci liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PVP), ki so sferični z gladko in zlito površino. Slednje je najverjetneje posledica vezave vlage in raztapljanja liofilizata na zraku, kar smo opazili pri rokovanju z njimi. To se je odrazilo tudi v slabih pretočnih lastnostih. Velikost delcev je veliko manjša v primerjavi z delci ostalih liofilizatorov, saj je premer delca na sliki približno 20 μm . Čeprav poroznosti delca ne opazimo, se je liofilizirat v vodi popolnoma redispergiriral.



Slika 11: Liofilizat 4 % (manitol + dekstran + PVP)

4.5 Sposobnost tabletiranja liofilizatorov

Liofilizate, ki so se popolnoma redispergirali, smo stisnili v tablete. Ker je bilo takih liofilizatorov dokaj malo, smo poskusili v tablete stisniti vse, čeprav so nekateri imeli slabe pretočne lastnosti ali so se raztapljali na zraku. Iz vsakega liofilizata smo stisnili dve tableti, ena je imela maso približno 150 mg, druga pa približno 100 mg. Polnjenje matrice in stiskanje smo izvedli ročno, saj polnjenje s čolničkom zaradi majhne količine liofilizatorov ni bilo možno. Tablete smo zaradi velikega nasipnega volumna liofilizatorov stisnili v več korakih. To smo izvedli tako, da smo s spatulo prenesli liofilizat v matrico, zgornji pečat spustili do polovice, ga dvignili in v matrico spet prenesli liofilizat. To smo ponavljali, dokler nismo v matrico prenesli zelene mase liofilizata. Zgornji pečat smo nato ročno spustili do konca in stisnili tableto.

Pri veliko liofilizatih smo opazili, da se je liofilizat prijel na enega ali oba pečata. Drsil in maziv, ki bi preprečili prijemanje na pečate, k liofilizatom nismo dajali, ker bi lahko motili določanje velikosti nanodelcev po redispergiranju liofilizatorov v vodi. Prijemanje liofilizata na pečate je bilo najbolj opazno pri tabletiranju liofilizata 4 % trehaloza, kjer se je liofilizat močno prijel na oba pečata, tableta pa se je posledično razplastila (slika 12).



Slika 12: Tableta iz liofilizata 4 % trehaloza

Liofilizat s trehalozo je bil povsem neprimeren za tabletiranje, stisnjene tablete so bile že na videz neustrezne. Že pri določanju pretočnih lastnosti liofilizatorov smo ugotovili, da so imeli liofilizati nanodelcev s trehalozo slabo pretočnost in so se raztapljali na zraku, s slabo sposobnostjo za tabletiranje pa se je trehaloza tudi dokončno izkazala kot neprimerna pomožna snov. Kot amorfnna pomožna snov je dobro ohranila velikost nanodelcev med liofilizacijo, vendar pa so bile vse ostale lastnosti liofilizatorov s trehalozo neustrezne.

Prijemanje liofilizata na pečate smo opazili tudi med tabletiranjem liofilizata 4 % manitol. Od dveh tablet, stisnjenih iz tega liofilizata, se je ena tableta razplastila, ker se je del liofilizata prijel na zgornji pečat. Pri stiskanju druge tablete do razplastitve ni prišlo. Obe tableti sta imeli krušljive robove (slika 13), kar kaže na slabo kompaktilnost liofilizata z manitolom. Liofilizati, ki so vsebovali samo manitol, so bili zelo elektrostatični, zato so bile izgube liofilizata pri rokovanju z njim tudi med tabletiranjem velike.



Slika 13: Tableta iz liofilizata 4 % manitol

Liofilizata 2 % dekstran in 4 % dekstran smo brez težav stisnili v tablete, noben se med tabletiranjem ni prijel na pečat. Tablete se niso razplastile, tudi robovi niso bili krušljivi (slika 14).



Slika 14: Tableta iz liofilizata 2 % dekstran

Ugotovili smo, da je bil dekstran zelo primerna pomožna snov. V primerjavi z liofilizati z manitolom so bili liofilizati z dekstranom manj elektrostatični, glede na ostale preizkušene amorfne pomožne snovi pa niso tako intenzivno vezali vlage iz zraka, da bi prišlo do njihovega raztapljanja. Kot amorfna pomožna snov je dobro ohranil lastnosti nanodelcev po redispergiranju liofilizatov. Tabletiranje liofilizatov nanodelcev z dekstranom je potekalo brez težav, stisnjene tablete niso imele vidnih pomanjkljivosti. Med liofilizati s posameznimi sladkorji so imeli liofilizati z dekstranom najboljše lastnosti.

Liofilizati s saharozo so se ob stiku z vlago iz zraka obnašali drugače kot liofilizati z ostalimi preizkušenimi amorfnimi pomožnimi snovmi. Niso se združevali v granule, ampak so se zlepili v en kos, ki se je nato raztopil. To smo opazili tudi pri tabletiranju liofilizata s kombinacijo manitola in saharoze. Ker se je zlepil v en kos, je imel liofilizat 4 % (manitol + saharoza) slabo stisljivost, saj se liofilizat ni mogel enakomerno razporediti po matrici, zato sta nastali tableti imeli krušljive robove in neravne površine (slika 15).



Slika 15: Tableta iz liofilizata 4 % (manitol + saharoza)

Liofilizat 4 % (manitol + dekstran) smo brez težav stisnili v tableti, ki sta bili trdni in brez krušljivih robov (slika 16). Enako velja tudi za tableti, stisnjeni iz liofilizata 3 % (manitol + dekstran).



Slika 16: Tableta iz liofilizata 4 % (manitol + dekstran)

Opazili smo, da s kombinacijo manitola in dekstrana lahko izboljšamo pomanjkljivosti liofilizatorov, ki so vsebovali samo manitol ali dekstran. Pri tabletiranju liofilizata z manitolom sta nastali tableti s krušljivimi robovi, ena se je tudi razplastila. Pri liofilizatu z dekstranom tega nismo opazili, podobno je bilo tudi pri tabletiranju liofilizata 4 % (manitol + dekstran). Liofilizati nanodelcev z manitolom so bili elektrostatični, zato so bile izgube liofilizatorov ob rokovanje z njimi velike. Pri liofilizatih, ki so vsebovali obe pomožni snovi, smo opazili manjšo elektrostatičnost in posledično tudi manjše izgube pri rokovanju. Slabosti samega dekstrana so bile nekoliko slabše pretočne lastnosti liofilizatorov, medtem ko so imeli liofilizati z manitolom zelo dobro pretočnost, kar velja tudi za liofilizate s kombinacijo manitola in dekstrana. Pri tabletiranju smo opazili, da so pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran) nastale bolj ustrezne tablete kot pri liofilizatu 4 % manitol, bile so zelo podobne tabletam iz liofilizata 4 % dekstran, ki so bile trdne in brez krušljivih robov. Pomanjkljivosti liofilizatorov s samim manitolom ali samim dekstranom so se tako izboljšale s kombinacijo teh dveh pomožnih snovi, pri kateri pa hkrati nismo zaznali pretiranega poslabšanja katere od prednosti posamezne pomožne snovi.

Kombinaciji manitola in dekstrana smo dodali polimere z namenom, da bi še izboljšali lastnosti liofilizatorov s to kombinacijo. Dodatek PEG je odstranil elektrostatičnost in olajšal rokovanje z liofilizatom, ni pa izboljšal sposobnosti tabletiranja, saj se je tabletirna masa

obnašala slabše kot pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran). Med tabletiranjem liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PEG) se je liofilizat prijel na pečat, zato se je tableta ob robu razplastila (slika 17). Pri stiskanju druge tablete prijemanja liofilizata na pečat in razplastitve tablete nismo opazili.



Slika 17: Tableta iz liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PEG)

Podobno kot dodatek PEG h kombinaciji manitola in dekstrana je tudi dodatek poloksamera zmanjšal elektrostatičnost liofilizata, vendar hkrati poslabšal obnašanje tabletirne mase. Obe tableti, ki smo jih stisnili iz liofilizata 4 % (manitol + dekstran + poloksamer), sta se razplastili, ker se je liofilizat prijel na zgornji pečat. Za razliko od tablete s PEG sta se tableti s poloksamerom razplastili po celotni površini tablete (slika 18).



Slika 18: Tableta iz liofilizata 4 % (manitol + dekstran + poloksamer)

Tabletiranje liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PVP) je potekalo brez težav. Tableti sta bili trdni in brez krušljivih robov, so pa bile vidne različne plasti zaradi stopenjskega stiskanja tablete (slika 19).



Slika 19: Tableta iz liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PVP)

Že med določanjem pretočnih lastnosti smo opazili, da je liofilizat 4 % (manitol + dekstran + PVP) hitro vezal vlago iz zraka in se raztapljal, ni pa bil elektrostatičen. Podobno obnašanje liofilizata smo opazili tudi med tabletiranjem. Posledica vezave vlage so bile tudi vidne različne plasti, ki so nastale zaradi stopenjskega stiskanja tablete. Tabletirna masa se je zaradi intenzivne vezave vlage stisnila že pri tako nizki sili stiskanja, kot jo je povzročil spust pečata samo do polovice. Take tablete so na pogled neustrezne in verjetno obstaja večja verjetnost razplastitve, čeprav pri našem rokovanju z njimi tega nismo opazili. Dodatek PVP h kombinaciji manitola in dekstrana razen zmanjšane elektrostatičnosti ni izboljšal lastnosti liofilizata. Velikost nanodelcev po redispergiranju liofilizata je bila večja, pretočne lastnosti in sposobnost za tabletiranje liofilizata pa slabše. Poleg tega se je liofilizat na zraku delno raztopil.

4.6 Redispergiranje tablet

Redispergiranje tablet smo izvedli med mešanjem na magnetnem mešalu v takem volumnu vode, da je bila koncentracija nanodelcev enaka kot v začetni disperziji (2 mg/ml). Za razliko od redispergiranja liofilizatov, ki je poteklo takoj, smo morali za popoln razpad tablet počakati nekaj časa. Po eni uri mešanja na magnetnem mešalu (hitrost mešanja približno 300 obratov/min) smo izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Disperzije smo nato pustili mešati 24 ur in nato ponovno izmerili velikost in zeta potencial nanodelcev. Iz vsakega liofilizata smo stisnili dve tableti, velikosti in zeta potenciali nanodelcev po redispergiranju tablet so predstavljeni v preglednicah XIII in XIV.

Preglednica XIII: Velikost in zeta potencial nanodelcev po redispergiranju tablet z maso približno 150 mg.

Stisnjen liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Po eni uri mešanja				Po 24 urah mešanja			
	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	Popolnoma redispergirana	Z-Ave (nm)	Pdl	Zeta (mV)	Popolnoma redispergirana
2 % dekstran	230	0,345	-17,9	DA	216	0,314	-17,8	DA
4 % dekstran	164	0,232	-13,3	DA	168	0,267	-22,4	DA
4 % manitol	317	0,475	-31,8	NE	226	0,294	-32,1	NE
3 % (manitol + dekstran)	455	0,597	-18,9	NE	418	0,44	-19,4	NE
4 % (manitol + dekstran)	294	0,297	-26,3	DA	294	0,32	-25	DA
4 % (manitol + saharoza)	189	0,376	-22,1	DA	185	0,361	-22,1	DA
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	401	0,551	-13,4	NE	308	0,446	-19,8	NE
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	480	0,556	-17,4	NE	454	0,601	-17,2	NE
4 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	443	1	-21,9	NE	400	0,594	-20,8	NE

Preglednica XIV: Velikost in zeta potencial nanodelcev po redispergiranju tablet z maso približno 100 mg.

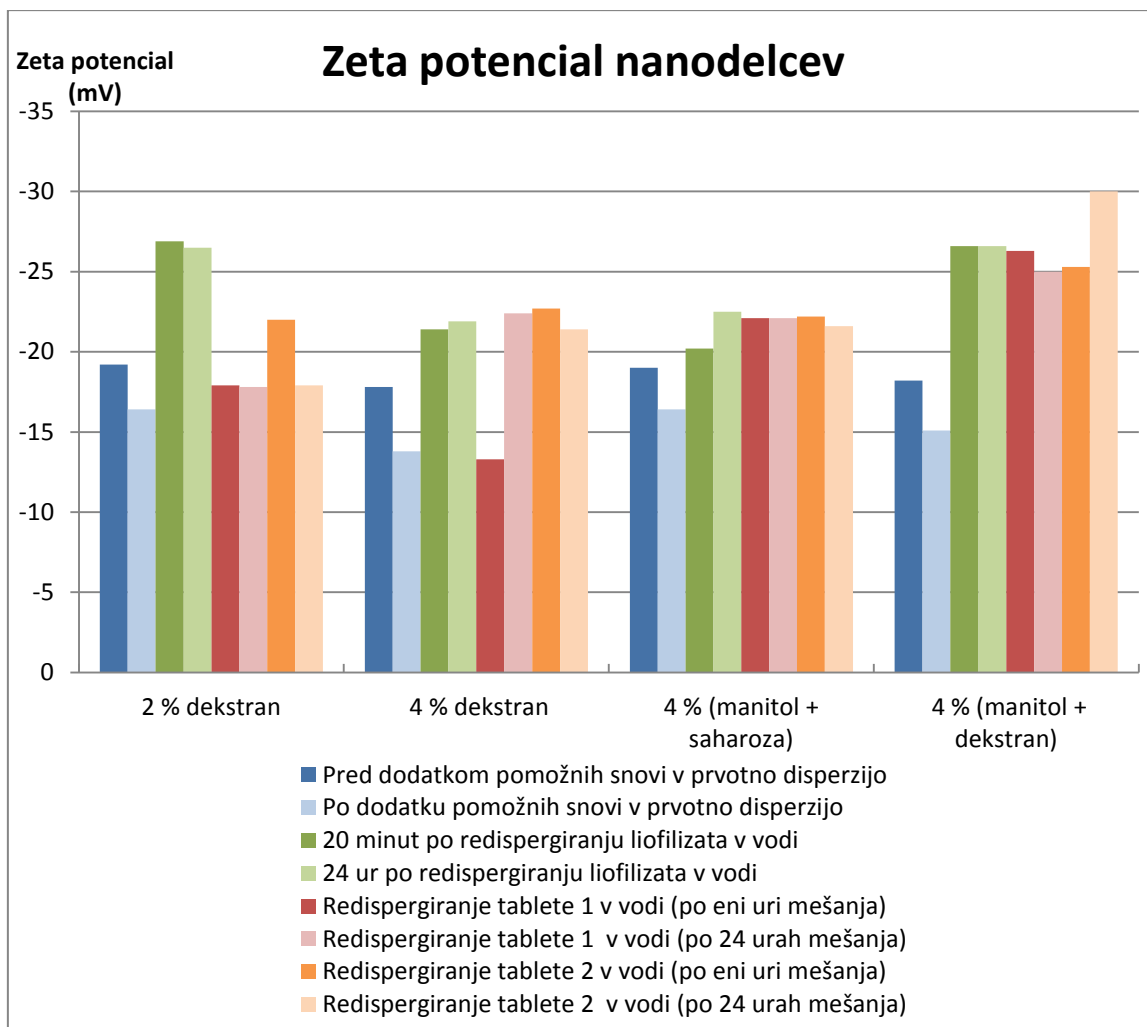
Stisnjen liofilizat ND s pomožnimi snovmi	Po eni uri mešanja				Po 24 urah mešanja			
	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	Popolnoma redispergirana	Z-Ave (nm)	PdI	Zeta (mV)	Popolnoma redispergirana
2 % dekstran	234	0,382	-22	DA	215	0,283	-17,9	DA
4 % dekstran	173	0,318	-22,7	DA	172	0,255	-21,4	DA
4 % manitol	224	0,257	-30,7	NE	208	0,249	-30	NE
3 % (manitol + dekstran)	399	0,459	-20,6	NE	345	0,445	-21,7	NE
4 % (manitol + dekstran)	306	0,343	-25,3	DA	278	0,311	-30	DA
4 % (manitol + saharoz)	189	0,293	-22,2	DA	171	0,343	-21,6	DA
4 % (manitol + dekstran + PVP K-25)	285	0,408	-24,1	DA	250	0,395	-22,8	DA
4 % (manitol + dekstran + poloksamer 188)	429	0,456	-19,1	NE	373	0,53	-20,4	NE
4 % (manitol + dekstran + PEG 6000)	506	0,601	-19,7	NE	445	0,507	-19,1	NE

Čeprav so se vsi liofilizati, ki smo jih stisnili v tablete, pred tabletiranjem popolnoma redispergirali, smo po redispergiranju nekaterih tablet v disperziji opazili večje delce oz. agregate. Podobno kot pri redispergiranju liofilizatov smo tudi pri redispergiranju tablet kot nujen pogoj za izbiro najboljše formulacije postavili popolno redispergiranje tablet. Formulacije, pri katerih se tablete niso popolnoma redispergirale, smo zato izločili iz izbora. Med tabletiranjem smo liofilizate izpostavili sili stiskanja, zato so se zmanjšale razdalje med delci ter posledično tudi med nanodelci. Zaradi mehanske obremenitve je lahko prišlo do združevanja nanodelcev v večje agregate, ki so se nato težje redispergirali v vodi. Liofilizati, ki se po tabletiranju niso popolnoma redispergirali, so bili liofilizati 4 % manitol, 3 % (manitol + dekstran), 4 % (manitol + dekstran + poloksamer), 4 % (manitol + dekstran + PEG) ter ena tableta liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PVP). Sam manitol ni dovolj dobro zaščitil nanodelcev pred agregacijo med tabletiranjem (medtem ko sta se liofilizata s kombinacijama manitola z dekstranom in saharozo po tabletiranju

popolnoma redispergirala). Pri liofilizatu 3 % (manitol + dekstran) je bila količina pomožnih snovi verjetno premajhna za zadostno zaščito nanodelcev pred agregacijo med tabletiranjem, saj sta se obe tableti liofilizata 4 % (manitol + dekstran) popolnoma redispergirali. Sposobnost redispergiranja tablet se je z dodatkom polimera h kombinaciji manitola in dekstrana poslabšala, saj se nobena tableta iz liofilizatov s poloksamerom in PEG ni popolnoma redispergirala. Pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran + PVP) se je ena tableta popolnoma redispergirala, druga pa ne. Pri kombinacijah s polimeri je bila količina manitola in dekstrana manjša, kot pri kombinaciji s samo tema dvema snovema, saj je bila v vseh primerih v začetni disperziji skupna koncentracija pomožnih snovi 4 %. Glede na to, da se je pri liofilizatu s polimerom PVP ena tableta popolnoma redispergirala, druga pa ne, je možno, da je bila količina pomožnih snovi še zadostna za zaščito pred agregacijo.

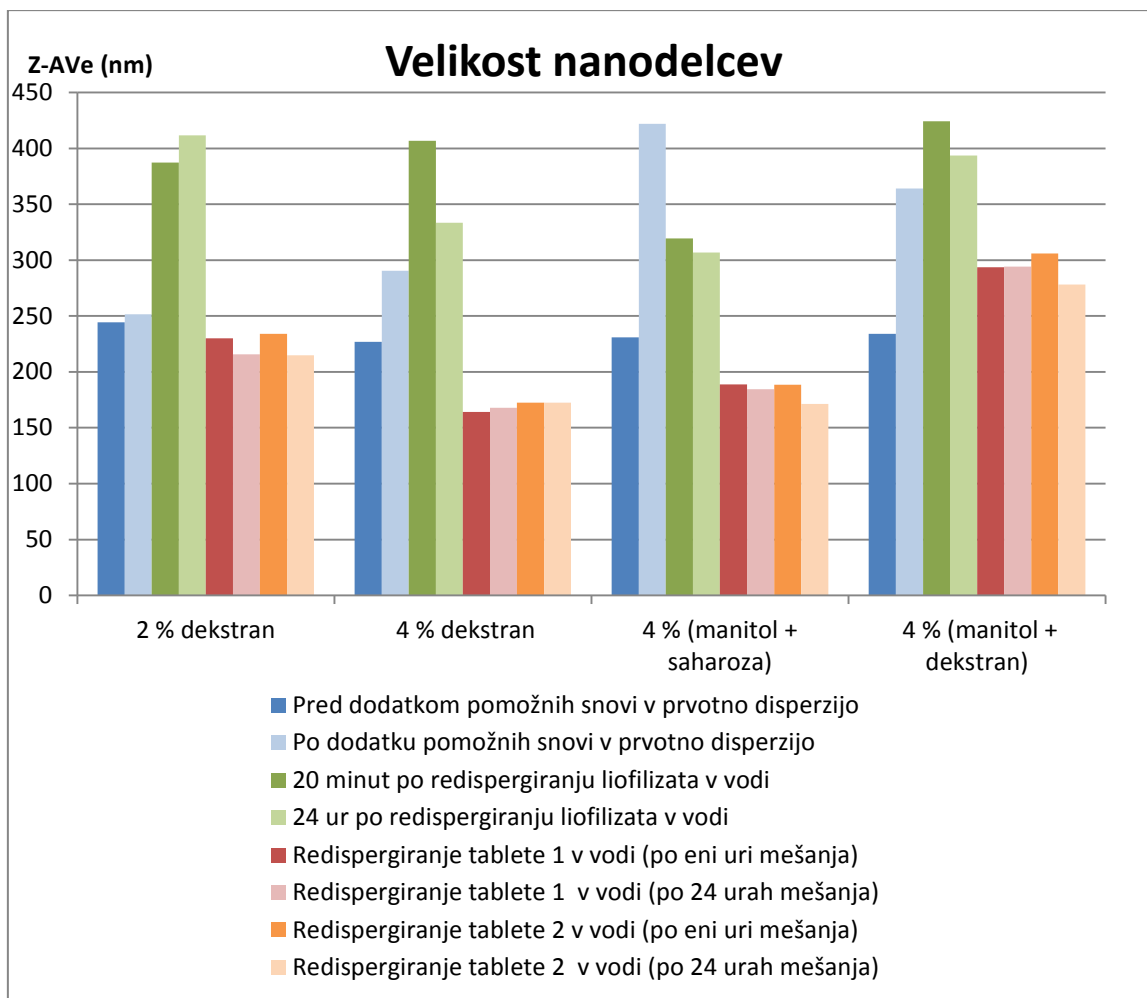
Največjo polidisperznost nanodelcev smo izmerili pri tabletah, ki se niso popolnoma redispergirale. Največjo polidisperznost med tabletami, ki so se popolnoma redispergirale, so imeli nanodelci pri edini popolnoma redispergirani tableti liofilizata 4 % (manitol + dekstran + PVP). Najmanjšo polidisperznost so imeli nanodelci po redispergiranju tablet formulacije 4 % dekstran, sledile so tablete formulacij 2 % dekstran in 4 % (manitol + dekstran).

Zeta potenciali izbranih formulacij (pri katerih sta se obe tableti popolnoma redispergirali) po vsakem koraku našega dela so prikazani na sliki 20. Zeta potencial je bil po redispergiranju tablet formulacij 4 % dekstran in 4 % (manitol + dekstran) približno enak kot pred tabletiranjem oz. po redispergiranju liofilizatov. Drugače velja za formulacijo 2 % dekstran, ki je imela zeta potencial po redispergiranju tablet manjši kot pred tabletiranjem, hkrati pa približno enako visok kot v prvotni disperziji pred liofilizacijo. Zeta potencial formulacije 4 % (manitol + saharoza) se je po redispergiranju tako liofilizatov kot tablet najmanj spremenil in je ostal na približno enaki ravni, kot smo ga izmerili v prvotni disperziji nanodelcev. Glede na prvotno disperzijo se je zeta potencial po redispergiranju tablet najbolj spremenil pri formulaciji 4 % (manitol + dekstran).



Slika 20: Zeta potenciali nanodelcev po vsakem koraku našega dela za formulacije, pri katerih sta se obe tableti popolnoma redispergirali.

Na sliki 21 so za formulacije, pri katerih sta se obe tableti popolnoma redispergirali, prikazane izmerjene velikosti nanodelcev po vsakem koraku našega dela. Pri vseh tabletah, ki so se popolnoma redispergirale, je bila velikost nanodelcev manjša kot pred tabletiranjem. Lahko, da so se spremenile lastnosti nanodelcev med procesom tabletiranja ali je prišlo do delne disociacije kompleksov med procesom redispergiranja tablete. Pri tabletah, stisnjenih iz liofilizatov 4 % dekstran in 4 % (manitol + saharoza), smo izmerili celo občutno manjšo velikost nanodelcev kot v začetni disperziji pred liofilizacijo (velikost nanodelcev, izmerjena v prvotni disperziji po dodatku pomožnih snovi). Velikost nanodelcev po redispergiranju tablet formulacij 2 % dekstran in 4 % (manitol + dekstran) se je glede na velikost pred liofilizacijo veliko manj zmanjšala (najmanj pri formulaciji 2 % dekstran), zato so se lastnosti nanodelcev pri teh dveh formulacijah verjetno dobro ohranile.



Slika 21: Velikost nanodelcev po vsakem koraku našega dela za formulacije, pri katerih sta se obe tableti popolnoma redispergirali.

4.7 Izbira najboljše formulacije

Nujen pogoj za ustreznost naše formulacije je bilo popolno redispergiranje tablete. To se je zgodilo samo pri tabletah formulacij 2 % dekstran, 4 % dekstran, 4 % (manitol + dekstran), 4 % (manitol + saharoza) ter delno 4 % (manitol + dekstran + PVP), kjer se je redispergirala ena tableta od dveh. Pri izbiri najboljše formulacije smo izbirali med temi formulacijami.

Želeli smo izdelati liofilizat s čim boljšimi pretočnimi lastnostmi, ustreznim obnašanjem ob rokovanju in sposobnostjo stiskanja v tablete, hkrati pa čim bolj ohranjeno velikost nanodelcev po redispergiranju liofilizatorov in tablet. Veliko oviro pri rokovanju z liofilizati je predstavljalo vezanje vlage in posledično raztapljanje liofilizatorov na zraku. Med formulacijami, med katerimi smo izbirali, je bilo to najbolj opazno pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran + PVP), ki je imel posledično slabe pretočne lastnosti. Poleg tega je bila hitra vezava vlage razlog za vidne plasti na tabletah, ki so nastale zaradi stopenjskega stiskanja. Skupaj z dejstvom, da se je popolnoma redispergirala samo ena tableta, je bilo tako močno vezanje vlage zadosten razlog, da smo formulacijo 4 % (manitol + dekstran + PVP) izločili iz nabora ustreznih formulacij.

Tudi liofilizat 4 % (manitol + saharoza) je močno vezal vlago in se raztapljal. Poleg tega je imel liofilizat slabo stisljivost, saj so imele stisnjene tablete krušljive robove ter neravne površine, ker se liofilizat ni enakomerno razporedil po matrici. Velikost nanodelcev med liofilizacijo je bila dobro ohranjena, po redispergiranju tablet pa je bila velikost nanodelcev manjša kot v začetni disperziji. Zaradi raztapljanja liofilizata na zraku, slabe sposobnosti za tabletiranje in zmanjšanje velikosti nanodelcev pod začetno velikost smo tudi to formulacijo izločili iz izbora.

Med preostalimi formulacijami je imela pomembno prednost formulacija 2 % dekstran, ki je vsebovala najmanj pomožnih snovi, kar omogoča vgradnjo večje količine nanodelcev v določeno količino liofilizata. Tudi pri ostalih lastnostih je bila formulacija 2 % dekstran najmanj enakovredna ali celo boljša kot formulacija 4 % dekstran. Pretočne lastnosti so bile pri liofilizatu 2 % dekstran boljše, saj smo pri določanju nasipnega kota morali liofilizat 4 % dekstran pomešati s spatulo, da je stekel, medtem ko pri liofilizatu 2 % dekstran to ni bilo potrebno. Carrov indeks je imel liofilizat 2 % dekstran sicer nekoliko večji. Pri rokovanju in tabletiranju sta se oba liofilizata obnašala podobno, nista bila zelo elektrostatična, tabletiranje je potekalo brez posebnosti, stisnjene tablete so bile trdne in brez krušljivih robov. Velikost nanodelcev po redispergiranju tablet je bila pri

formulaciji 4 % dekstran manjša, vendar je bila pri formulaciji 2 % dekstran bližje velikosti nanodelcev v začetni disperziji. Formulacija 4 % dekstran tako pred formulacijo 2 % dekstran ni imela nobene prednosti, da bi jo lahko označili kot bolj primerno.

Glavna pomanjkljivost formulacije 2 % dekstran v primerjavi s formulacijo 4 % (manitol + dekstran) so bile slabše pretočne lastnosti. Liofilizat 4 % (manitol + dekstran) je imel med liofilizati, ki so se po tabletiranju popolnoma redispergirali, najboljše pretočne lastnosti. Poleg tega ni bil elektrostatičen in ni intenzivno vezal vlage na zraku. Tudi pri tabletiranju nismo imeli težav, stisnjene tablete so bile trdne in brez krušljivih robov. Velikost nanodelcev po redispergiranju tablet je ohranil podobno dobro kot 2 % dekstran, ki je najbolje ohranil velikost nanodelcev glede na velikost, izmerjeno v začetni disperziji po dodatku pomožnih snovi. Pri ostalih formulacijah, pri katerih sta se popolnoma redispergirali obe tableti, je bila velikost nanodelcev veliko manjša kot v začetni disperziji, zato lahko predvidevamo, da so se njihove lastnosti delno spremenile, lahko je prišlo do disociacije polimernih verig iz nanodelcev. Pri formulacijah 2 % dekstran in 4 % (manitol + dekstran) pa je bila velikost nanodelcev le nekoliko manjša kot v začetni disperziji po dodatku pomožnih snovi. Formulacija 4 % (manitol + dekstran) je imela najboljšo pretočnost, po redispergiranju tablet je dobro ohranila velikost nanodelcev, ostale lastnosti pa so bile enakovredne ali boljše kot pri formulaciji 2 % dekstran, zato smo formulacijo 4 % (manitol + dekstran) izbrali kot formulacijo, ki se je pri našem delu izkazala za najprimernejšo.

5 SKLEP

Cilj magistrske naloge je bil poiskati in ovrednotiti tiste pomožne snovi ali njihovo kombinacijo, pri kateri nastane liofilizat, ki najbolj zadovoljuje naše zahteve. Od liofilizata smo želeli čim boljše pretočne lastnosti, ustrezno obnašanje ob rokovanju (predvsem odsotnost raztapljanja na zraku), sposobnost stiskanja v tablete, pri čemer nastanejo trdne tablete brez krušljivih robov ter čim bolj ohranjena velikost nanodelcev po redispergiranju tablet glede na velikost nanodelcev v začetni disperziji. Kot nujen pogoj smo postavili popolno redispergiranje liofilizatorov in tablet, stisnjenih iz liofilizatorov. Da bi poiskali formulacijo, ki najbolj ustreza postavljenim zahtevam, smo izdelali liofilizate, ki so poleg nanodelcev vsebovali različne pomožne snovi, jim določili pretočne lastnosti in jih redispergirali v vodi, da smo preverili sposobnost ohranjanja velikosti nanodelcev med liofilizacijo. Liofilizate z najboljšimi lastnostmi smo nato stisnili v tablete ter tudi te redispergirali. Da bi preverili, kakšni delci so nastali s postopkom SFD, smo nekatere liofilizate slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Pri našem delu smo ugotovili naslednje:

- Najboljše pretočne lastnosti med narejenimi liofilizati so imeli liofilizati z manitolom. Med liofilizati s posameznimi sladkorji so sledili liofilizati z dekstranom in maltodekstrinom, najslabšo pretočnost so imeli liofilizati s trehalozo in saharozo. Med liofilizati s kombinacijami manitola z ostalimi sladkorji so imeli najboljše pretočne lastnosti liofilizati s kombinacijo manitola in dekstrana, liofilizat 4 % (manitol + dekstran) je imel pretočnost le malo slabšo kot liofilizat 4 % manitol. Dodatek polimerov h kombinaciji manitola in dekstrana je v vseh primerih poslabšal pretočne lastnosti liofilizatorov, najmanj pri liofilizatu 4 % (manitol + dekstran + PEG), kateremu smo izmerili le malenkost slabšo pretočnost kot liofilizatu 4 % (manitol + dekstran).
- Slabe pretočne lastnosti liofilizatorov so bile v veliko primerih posledica intenzivne vezave vlage, ki je povzročila raztapljanje liofilizatorov. Raztapljanje na zraku smo opazili predvsem pri liofilizatih, ki so vsebovali amorfni pomožni snovi trehalozo in saharozo, tudi pri liofilizatih s kombinacijami teh dveh pomožnih snovi z manitolom. Manj intenzivno vezanje vlage je bilo prisotno pri liofilizatih, ki so vsebovali ostali preizkušeni amorfni pomožni snovi dekstran in maltodekstrin. Ti so se samo združevali v granule in se niso raztapljali. Pri liofilizatih z manitolom znakov vezanja vlage nismo opazili, so pa bili ti liofilizati zelo elektrostatični. Med liofilizati s kombinacijami

manitola, dekstrana in polimerov so se na zraku raztapljali liofilizati s PVP ter liofilizat 4 % (manitol + dekstran + polisorbato).

- Med liofilizacijo je pri veliko liofilizatih prišlo do agregacije nanodelcev, zato se pri redispergiranju niso popolnoma redispergirali, v disperziji so bili prisotni s prostim očesom vidni delci. Noben liofilizat, narejen iz disperzije z 1 % ali 2 % pomožnih snovi, razen liofilizata 2 % dekstran, se ni popolnoma redispergiral, ker je bila pri teh liofilizatih premajhna količina pomožnih snovi, da bi učinkovito zaščitila nanodelce pred agregacijo. Velikost nanodelcev so, glede na njihovo velikost pred liofilizacijo, najbolje ohranile amorfne pomožne snovi trehaloza, saharoza in dekstran. Zelo malo se je med liofilizacijo velikost nanodelcev povečala tudi pri formulaciji 4 % (manitol + dekstran), kjer smo izmerili tudi zelo majhno polidisperznost nanodelcev. Dodatek polimerov h kombinaciji manitola in dekstrana ni izboljšal ohranjanja velikosti nanodelcev med liofilizacijo, pri vseh redispergiranih liofilizatih s polimeri je bila velikost večja kot pri liofilizatu brez polimera.
- Liofilizate, ki so se popolnoma redispergirali, smo stisnili v tablete. Najustreznejše tablete, ki so bile trdne in brez krušljivih robov, smo stisnili iz liofilizata z dekstranom ter kombinacije manitola in dekstrana. Med tabletiranjem ostalih liofilizata so se tablete razplastile, ker se je liofilizat prijel na enega ali oba pečata, ali pa so bile neustrezne zaradi intenzivne vezave vlage in raztapljanja liofilizata.
- Po redispergiranju tablet smo pri vseh formulacijah izmerili manjšo velikost nanodelcev kot pred tabletiranjem oz. po redispergiranju liofilizata, kar lahko kaže na določene spremembe nanodelcev pri tabletiranju ali delno disociacijo polimerov iz kompleksov. Pri vseh formulacijah, pri katerih sta se popolnoma redispergirali obe tableti, je bila velikost nanodelcev po redispergiranju tablet manjša kot v začetni disperziji po dodatku pomožnih snovi, najbolj se je velikost zmanjšala pri formulacijah 4 % dekstran in 4 % (manitol + saharoza). Najmanj se je med temi formulacijami velikost zmanjšala pri formulaciji 2 % dekstran, le nekoliko bolj pa pri formulaciji 4 % (manitol + dekstran).
- S slikanjem z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo ugotovili, da so s postopkom SFD nastali sferični delci. Površina delcev je bila različna, odvisno od pomožnih snovi, ki smo jih uporabili. Delci liofilizata z dekstranom so bili najbolj porozni, delci liofilizata, ki so vsebovali manitol so bili porozni in imeli bolj zapolnjeno površino, liofilizati, ki so vsebovali polimere pa so imeli bolj gladko ali zalito površino.

- Pri izbiri najboljše formulacije smo morali narediti kompromis, saj nobena formulacija ni bila brez pomanjkljivosti. Zaradi zelo dobrih pretočnih lastnosti in ugodnega obnašanja ob rokovanju liofilizata, nastanka trdnih tablet brez krušljivih robov in dobro ohranjene velikosti nanodelcev po redispergiranju tablet smo kot najboljšo formulacijo izbrali formulacijo 4 % (manitol + dekstran).

6 LITERATURA

1. Cegnar M, Miklavžin A, Kerč J: Freeze-Drying and Release Characteristics of Polyelectrolyte Nanocarriers for the Mucosal Delivery of Ovalbumin. *Acta Chimica Slovenica* 2011; 58: 241-250.
2. Hartig SM, Greene RR, Dikov MM, Prokop A, Davidson JM: Multifunctional Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes. *Pharmaceutical Research* 2007; 24: 2353-2369.
3. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V: Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* 2006; 116: 1-27.
4. Cegnar M, Kerč J: Self-assembled Polyelectrolyte Nanocomplexes of Alginate, Chitosan and Ovalbumin. *Acta Chimica Slovenica* 2010; 57: 431-441.
5. Hamman JH: Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs* 2010; 8: 1305-1322.
6. Hejazi R, Amiji M: Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2003; 89: 151-165.
7. Erman A: Hitosan in možna uporaba v medicini. *Zdravniški Vestnik* 2011; 80: 489-498.
8. Yeh M, Cheng K, Hu C, Huang Y, Young J: Novel protein-loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 3804-3812.
9. Malvern technical note: Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes.
10. Nekkanti V, Vabalaboina V, Pillai R: Drug Nanoparticles – An Overview. *The Delivery of Nanoparticles* 2012: 111-132.
11. Malvern technical note: Zeta potential: An introduction in 30 minutes.
12. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H: Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process nad storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 1688-1713.
13. Aulton ME: *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, Second Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002: 390 – 393, 197 – 210, 397 -404.
14. Poje T: Razvoj in vrednotenje liofiliziranega izdelka z modelno peptidno učinkovino. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2008.

15. Kasper JC, Friess W: The freezing step in lyophilization. Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011; 78: 248-263.
16. Schiffter H, Condliffe J, Vonhoff S: Spray-freeze-drying of nanosuspensions: the manufacture of insulin particles for needle-free ballistic powder delivery. *Journal of the Royal Society Interface – Interface Focus* 2010; 7: 483-500.
17. Cheow WS, Ling ML, Kho K, Hadinoto K: Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: Effect of freeze-drying adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 404: 289-300.
18. <http://www.sono-tek.com/ultrasonic-nozzle-technology/> (dostop januar 2014)
19. Rabzelj J: Preučevanje pretočnih lastnosti zmesi praškov z različnimi velikostnimi razredi, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011.
20. *European Pharmacopoeia 7th Edition, Methods of analysis: 2.9.36 Powder Flow*, 308-311.
21. Dreu R et al.: Vaje iz industrijske farmacije. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2009.
22. Jeol: SEM Scanning Electron Microscope A To Z; dostopno na internetu: <http://www.jeolusa.com/RESOURCES/ElectronOptics/DocumentsDownloads/tabid/320/Default.aspx?EntryId=598> (dostop februar 2014)
23. Allison SD, Molina M, Anchordoquy TJ: Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000; 1468: 127-138.
24. Passot S, Fonseca F, Alarcon-Lorca M, Rolland D, Marin M: Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005; 60: 335-348.