

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KUMAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KUMAR

**FIZIKALNA STABILNOST KARVEDILOLA V TRDNIH
DISPERZIJAH Z MEZOPOROZNIM
SILICIJEVIM DIOKSIDOM**

**PHYSICAL STABILITY OF CARVEDIOL
IN SOLID DISPERSIONS WITH
MESOPOROUS SILICA**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku za vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi moje magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre moji mami Greti, bratu Janu, partnerju Urošu in vsem ostalim sorodnikom in prijateljem za vso pomoč, podporo in spodbudo tekom študija. Hvala vam, ker ste mi pomagali uresničiti zastavljene cilje.

Izjava

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

Klara Kumar

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 AMORFNA IN KRISTALNA OBLIKA TRDNE SNOVI.....	2
1.2 METODE IZDELAVE AMORFNE OBLIKE SPOJIN.....	4
1.3 FIZIKALNA STABILNOST AMORFNE OBLIKE	5
1.4 STABILIZACIJA AMORFNE OBLIKE	9
1.4.1 Shranjevanje pri temperaturi $T_g - 50\text{ }^\circ\text{C}$	9
1.4.2 Izdelava trdne disperzije	9
1.4.2.1 Metoda taljenja (angl. »simple fusion« in »melt quenching«).....	11
1.4.2.2 Metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku (angl. »solvent evaporation method«).....	12
1.4.2.3 Metoda somletja (angl. »co-milling«)	13
1.5 POROZNI NOSILNI MATERIALI ZA IZDELAVO TRDNIH DISPERZIJ	15
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 APARATURE	22
3.3 METODE.....	23
3.3.1 Določanje maksimalne topnosti učinkovine v mediju za sproščanje.....	23
3.3.2 Izdelava trdnih disperzij z metodo somletja.....	23
3.3.3 Izdelava trdnih disperzij z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku.....	24
3.3.4 Priprava fizikalnih zmesi.....	26
3.3.5 Priprava amorfne oblike karvedilola	26
3.3.6 Določanje vsebnosti učinkovine v pripravljenih trdnih disperzijah.....	27
3.3.7 Pospešen test fizikalne stabilnosti	27
3.3.8 Preizkus raztapljanja	29
3.3.9 Izdelava umeritvene premice za preizkus raztapljanja učinkovine.....	29
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1 Izbira medija za preizkus raztapljanja učinkovine.....	30

4.2	Maksimalna topnost učinkovine v fosfatnem pufri	31
4.3	Analiza izhodne kristalne in amorfne oblike učinkovine	32
4.4	Analiza fizikalne stabilnosti amorfne oblike učinkovine pripravljene z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline.....	33
4.5	Analiza trdnih disperzij pripravljenih z metodo somletja učinkovine in pomožne snovi.....	37
4.6	Analiza vzorcev trdnih disperzij pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku	46
4.7	Analiza fizikalne zmesi karvedilola in Syloida 244 FP	52
5.	SKLEP	55
6.	LITERATURA	57

POVZETEK

Danes je veliko novih spojin, ki imajo visok terapevtski potencial, vendar je njihova uporaba v farmaciji omejena zaradi slabe topnosti. Velik potencial za izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja predstavlja metoda izdelave amorfnе oblike učinkovine, ki pa je za razliko od kristalne oblike fizikalno nestabilna. Zato je potrebno amorfnо obliko z vidika uporabe v farmacevtski industriji stabilizirati. Obetaven način za povečanje fizikalne stabilnosti učinkovin predstavlja metoda izdelave trdnih disperzij z mezoporoznimi nosilnimi materiali. Namen magistrskega dela je bil preučiti vpliv metode izdelave in deleža karvedilola v trdnih disperzijah z mezoporoznim SiO₂ na fizikalne lastnosti učinkovine in stabilnost. Za izdelavo trdnih disperzij smo uporabili metodo somletja in metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Amorfnо obliko karvedilola smo dodatno izdelali tudi z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline. Trdne disperzije smo pripravili z različnim masnimi deleži karvedilola v pomožni snovi Syloid 244 FP (33 %, 50 % in 67 %). Pri mletju zmesi smo uporabili različne čase mletja (30 min, 120 min in 24 ur) in preverili vpliv prisotnosti topila na izdelavo in fizikalno stabilnost amorfnе učinkovine. Pri metodi odparevanja topila smo dodatno raziskali vpliv temperature na nastanek in nadaljnjo stabilizacijo amorfnе učinkovine.

Vzorci smo ob času 0 in po 6 tednih shranjevanja pri 40 °C in 75-odstotni relativni vlažnosti zraka ovrednotili s preskusom sproščanja po Eur. Ph. 7th Ed. in s termično analizo. Medtem ko nam je z metodo odparevanja topila v vseh primerih izdelanih trdnih disperzij uspelo pripraviti amorfnо učinkovino, smo z metodo somletja dobili amorfnо učinkovino le v primeru nižjega uporabljenega masnega deleža učinkovine in pri času mletja, ki je bilo daljše od 30 min. Boljšo fizikalno stabilnost je imela amorfnа učinkovina v trdnih disperzijah izdelanih z metodo odparevanja topila, saj je bila učinkovina stabilna tako v trdni disperziji z masnima razmerjema 1 : 1 kot tudi 1 : 2, medtem ko je bila pri metodi somletja stabilna le disperzija z najnižjim deležem učinkovine. Dodatek topila fizikalni zmesi pred začetkom mletja ni imel nobenega pomembnega vpliva na izdelavo in nadaljnjo fizikalno stabilnost učinkovine. Učinkovina se je najhitreje in najboljšeje raztapljala iz trdnih disperzij pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, vendar le pri nižjih deležih učinkovine, saj je prišlo s povečanjem njenega deleža do večje napolnjenosti por in povečanja hidrofobnih lastnosti.

ABSTRACT

Nowadays there are lots of new drugs with high therapeutic potential but their use in pharmacy is limited due to their poor solubility. A promising approach to enhance their solubility and dissolution rate is the method of making an amorphous form of drug. In contrast to a crystalline form, an amorphous form of drug is physically unstable and has to be stabilized for the use in pharmaceutical industry. An effective way to improve physical stability of drug is to formulate solid dispersion by using porous materials. The aim of our study was to examine how methods of preparing solid dispersions and mass fraction of carvedilol in solid dispersions with mesoporous SiO₂ influence physical properties and stability of drug. We prepared different solid dispersions of carvedilol using co-milling and solvent evaporation method. Additionally, an amorphous form of carvedilol was prepared by melt quenching method. Solid dispersions were formulated using different mass fractions of carvedilol and Syloid 244 FP (33 %, 50 % and 67 %). When preparing solid dispersions by co-milling method, we used different time of milling and also examine the influence of solvent presence on formulation and physical stability of the amorphous form of drug. In solid dispersions prepared by solid evaporation method we examine the influence of temperature. All samples of solid dispersions were characterized by thermal analysis and dissolution test according to the Eur. Ph. 7th Ed at time zero and after 6 weeks of storage at 40 °C and 75 % relative humidity. The results showed that all solid dispersions prepared by solvent evaporation method contained an amorphous form of carvedilol. An amorphous form of drug was also discovered in solid dispersions prepared by co-milling method but only in those with the lowest mass fraction of carvedilol and prepared by milling time longer than 30 minutes. Physical stability of an amorphous form of carvedilol was higher in solid dispersions prepared by solvent evaporation than in those prepared by co-milling. To illustrate, an amorphous form of carvedilol prepared by solvent evaporation was physically stable in solid dispersions with mass ratio 1 : 1 and 1 : 2, but in case of co-milling there only dispersion with the lowest mass fraction of carvedilol was stable. It turned out that addition of solvent to physical mixture before milling had no significant effect on formulation and physical stability of carvedilol. The drug release was fastest and most extensive from solid dispersions prepared by solvent evaporation method, but only from those dispersions with the lowest mass fraction of drug. Increasing mass fraction of drug resulted in higher fraction of filled pores and increased hydrophobicity.

SEZNAM OKRAJŠAV

BU	biološka uporabnost
DSC	Differential Scanning Calorimetry (diferenčna dinamična kalorimetrija)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo)
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja
PS	pomožna snov
PVP	polivinilpirolidon
RV	relativna vlažnost zraka
SDS	sodium dodecyl sulfate (natrijev dodecil sulfat)
T	temperatura
T_g	temperatura steklastega prehoda snovi
T_m	temperatura tališča snovi
TD	trdna disperzija
ZU	zdravilna učinkovina

1. UVOD

V današnjem času je peroralni način jemanja zdravila med najbolj razširjenimi načini vnosa zdravila v telo. Za bolnika predstavlja najbolj varen, enostaven, neinvaziven ter dobro poznan način uporabe zdravila. Za farmacevtsko industrijo imajo trdne farmacevtske oblike številne prednosti pred ostalimi, kot so večja stabilnost, nižji stroški proizvodnje, enostaven proces izdelave (1). Vendar pa velik delež na novo odkritih zdravilnih učinkovin (ZU) izkazuje nizko topnost v vodi ter s tem nizko biološko uporabnost (BU) po peroralni aplikaciji zdravila. To predstavlja veliko oviro v tehnološkem razvoju peroralnih farmacevtskih oblik, saj je slaba topnost učinkovine tista lastnost, ki vpliva na zmanjšan delež absorpcije zdravilne učinkovine, s tem pa na zmanjšano terapevtsko učinkovitost. Izboljšanje raztapljanja novih ZU predstavlja farmacevtski industriji velik izziv (2). Obstaja veliko različnih pristopov za izboljšanje topnosti učinkovin. Nekateri izmed njih so predstavljeni v preglednici I (1, 3).

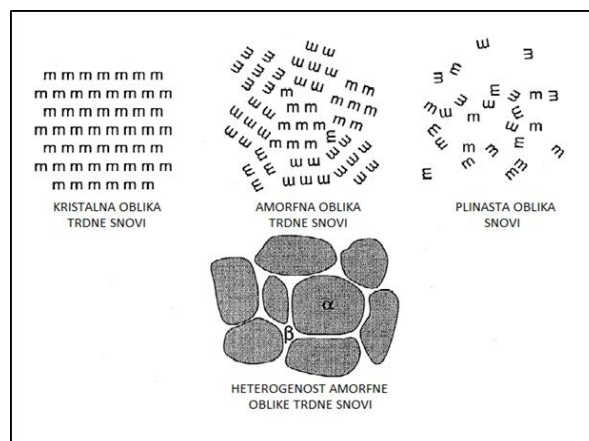
Preglednica I: Možni pristopi za izboljšanje topnosti zdravilnih učinkovin.

Kemijski pristopi	Fizikalni pristopi	Ostali pristopi
<ul style="list-style-type: none"> • tvorba soli • izdelava predzdravil 	<ul style="list-style-type: none"> • zmanjšanje velikosti delcev (mletje, nanosuspenzije) • psevdopolimorfi, kokristali • kompleksacija/solubilizacija (z uporabo ciklodekstrinov/površinsko aktivnih snovi) • amorfizacija (trdne disperzije) 	<ul style="list-style-type: none"> • uporaba sotopil • uporaba poroznih mikrodelcev

Pretvorba kristalne oblike učinkovine v amorfno predstavlja enega izmed najbolj obetajočih pristopov za izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja ZU ter s tem biološke uporabnosti. Mullins in Macek sta že leta 1960 dokazala izboljššan profil raztapljanja amorfne oblike antibiotika novobiocina v primerjavi s pripadajočo kristalno obliko (4). Amorfna oblika ZU ima v primerjavi s kristalno obliko višjo notranjo energijo in je termodinamično nestabilna. Tako lahko tekom proizvodnje, med shranjevanjem ali raztapljanjem počasi prehaja v bolj stabilno kristalno obliko (5). Od hitrosti pretvorbe nestabilne oblike v stabilno je odvisno, ali je potrebno amorfno stanje stabilizirati. Zato je zelo pomembno poznavanje lastnosti amorfne oblike spojine, tako z vidika njenih uporabnih lastnosti kot tudi fizikalne in kemijske nestabilnosti v primerjavi s kristali (6).

1.1 AMORFNA IN KRISTALNA OBLIKA TRDNE SNOVI

Trdne snovi so lahko prisotne v amorfni (steklasti) obliki ali v termodinamično stabilnejši kristalni obliki. V amorfni obliki izkazujejo molekule red kratkega dosega, ki je omejen samo na najbližje sosednje molekule, medtem ko reda dolgega dosega, značilnega za kristalno obliko, ne izkazujejo. Pravimo, da imajo nično kristaliničnost (angl. »zero-crystallinity«). Iz slike 1 je razvidno, da se neposredna okolica molekul (m) amorfne oblike trdne snovi ne razlikuje bistveno od okolice v kristalni snovi (podobno število in oddaljenost od najbližje sosede), vendar pa to velja samo na kratki razdalji molekul. Zgradba amorfne trdne snovi je v osnovi zelo podobna zgradbi tekočin, zato jo lahko obravnavamo kot podhlajeno tekočino. V primerjavi s plini pa je stanje bistveno bolj urejeno. Posamezna področja amorfne snovi (regiji α in β) se med seboj razlikujejo po stopnji urejenosti in gostoti, zato pravimo, da je amorfna oblika heterogena.



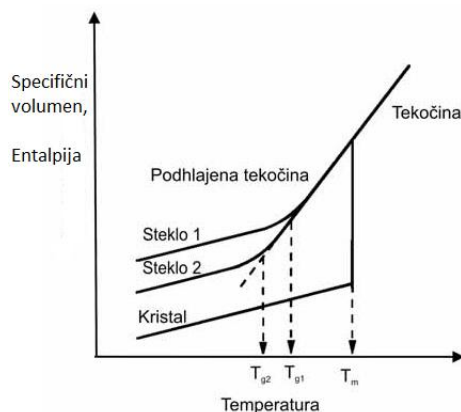
Slika 1: Shematičen prikaz strukture amorfne oblike trdne snovi v primerjavi s kristalno obliko in plinom (7).

Zaradi notranje neurejenosti ima amorfna oblika trdne snovi v primerjavi s kristalnim stanjem višjo entropijo, entalpijo, Gibbsovo prosto energijo in večji specifični volumen (7). Zato je termodinamično manj stabilna in lahko tekom procesa izdelave, shranjevanja ali med procesom raztapljanja prehaja v stabilnejšo kristalno obliko (5, 7, 8). Proces imenujemo tudi devitrifikacija (9). Po drugi strani pa je lahko amorfna oblika kinetično stabilna toliko časa, da njeno uporabo izkoriščamo v farmaciji.

Za razliko od amorfne oblike tvorijo kristale strukturne enote, imenovane osnovne celice, ki se ponavljajo periodično v vseh treh prostorskih dimenzijah in tvorijo kristalno mrežo. Osnovna celica ima določeno orientacijo in obliko, ki ju definirajo trije translacijski

vektorji (a, b, c). Glede na dimenzijo vektorjev v osnovni celici ter velikost kotov med njimi (α , β in γ) ločimo sedem kristalnih sistemov (razredov). To so kubični, heksagonalni, tetragonalni, romboedrični, ortorombski, monoklinski in triklinški sistem. Ista trdna snov se lahko nahaja v različnih kristalnih strukturah. Pojav imenujemo polimorfizem. Polimorfi imajo enako kemijsko sestavo, medtem ko so notranja struktura in fizikalno kemijske lastnosti (temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost, gostota, trdnost) različne. Značilnost kristalne oblike trdne snovi je temperatura tališča (T_m), ki predstavlja ravnotežje med tekočo in trdno fazo (10).

Karakteristika amorfne oblike je temperatura steklastega prehoda (T_g). Gre za temperaturni interval, v katerem med segrevanjem snov prehaja iz trdnega steklastega stanja v razmehčano stanje. Lahko ga imenujemo tudi tališče amorfne snovi, kljub temu da gre za fazno spremembo drugega reda, tališče kristalne oblike pa je fazna sprememba prvega reda. Prehod prvega reda je nezvezni prehod, saj se različne fizikalne količine (toplotna kapaciteta, entalpija) pri temperaturi faznega prehoda T_m spremenijo nezvezno. To pomeni, da ostaja temperatura sistema kljub dovajanju toplote konstantna vse dokler ni fazna pretvorba popolna. Po drugi strani pa predstavlja T_g zvezni prehod, saj se fizikalne količine tekom prehoda spreminjajo zvezno s temperaturo. V območju temperature steklastega prehoda se poveča toplotna kapaciteta in mobilnost molekul. S tem se poveča kemijska reaktivnost in sposobnost rekristalizacije amorfne snovi (11). Za razliko od temperature tališča je temperatura steklastega prehoda kinetični parameter. Njegova vrednost je odvisna od hitrosti segrevanja amorfne snovi ter od metode izdelave amorfne oblike snovi. Eihei Fukuoka je s sodelavci že leta 1986 pri preiskovanju amorfni vzorcev indometacina ugotovil, da je vrednost T_g učinkovine odvisna od hitrosti segrevanja vzorca pri vrednotenju amorfne oblike z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Ugotovil je, da večja hitrost segrevanja vzorca poviša vrednost T_g amorfne snovi. V primeru izdelave amorfne indometacina z metodo ohlajanja taline je zmanjšana hitrost ohlajanja taline vodila v nižjo vrednost T_g amorfne učinkovine in obratno (12). Na sliki 2 lahko vidimo, da obstaja več steklastih stanj z različnimi lastnostmi, na katere vpliva metoda izdelave amorfne snovi. Če tekočino ohlajamo z višjo hitrostjo, ostane vzorec v podhlajenem stanju do višje temperature in obratno. Steklo 1 je bilo pridobljeno pri višji hitrosti ohlajanja od stekla 2 (13).



Slika 2: Prikaz spreminjanja vrednosti specifičnega volumna in entalpije v odvisnosti od temperature za tekočine, ki lahko kristalizirajo in tvorijo stekla (13).

Amorfno obliko spojine na laboratorijski ravni najpogosteje pripravimo z metodo hitrega ohlajanja taline. Pripravljena talina spojine, ki lahko kristalizira ali tvori steklo, se lahko pri ohlajanju obnaša na dva načina (slika 2). Pri ohlajanju tekočine lahko le ta pri nizki hitrosti ohlajanja kristalizira pri temperaturi tališča (T_m). Nastali kristal ima nižji specifičen volumen in nižje energijsko stanje v primerjavi s tekočino. Pri višji hitrosti ohlajanja taline pa se lahko izognemo nastanku kristala. Nastane ravnotežno stanje imenovano podhlajena tekočina. Zanj je značilno, da pri T_m ne pride do odmika od premice v diagramu specifičnega volumna in entalpije v odvisnosti od temperature. Pri nadaljnjem ohlajanju ravnotežje sistema izgine. Nastane steklo ali amorfna oblika spojine. Točka prekinitev ravnotežnega stanja predstavlja temperaturo steklastega prehoda (T_g). Pri ohlajanju podhlajene tekočine viskoznost vse bolj narašča, gibljivost molekul pa postaja vse bolj omejena, do točke, ko preurejanje molekul ni več možno. Pravimo, da je struktura amorfne snovi »zamrznjena« v času, ko izvajamo eksperiment (13, 14).

1.2 METODE IZDELAVE AMORFNE OBLIKE SPOJIN

Poznamo veliko različnih načinov priprave amorfne oblike spojin, kot so mletje, tvorba trdnih disperzij, liofilizacija (za amorfizacijo proteinov in peptidov), sušenje z razprševanjem, predhodno omenjena metoda hitre ohladitve taline, desolvatacija solvatov, dehidratacija hidratov ter obarjanje kislinskih in bazičnih snovi s spremembo pH (7). Najpogostejše metode izdelave amorfne oblike spojine lahko razdelimo glede na dva glavna mehanizma pretvorbe. V večini primerov pripravimo amorfno obliko spojine preko vmesne pretvorbe kristalne oblike v termodinamsko stabilno nekristalno obliko (talino ali

raztopino), kateri sledi hitro ohlajanje taline (angl. »quench-cooling«) ali obarjanje iz raztopine (npr. sušenje z razprševanjem). Drugi mehanizem pretvorbe pa vključuje direktno pretvorbo kristalne oblike v manj stabilno amorfno obliko z mehansko aktivacijo. Najboljši primer predstavlja metoda mletja (5, 15). Turnbull je proces izdelave amorfne snovi opisal kot zaporedje treh dogodkov: 1. energijska obdelava kristalne snovi (npr. mletje), 2. odvzem energije snovi z ohlajanjem ter 3. kinetično ujetje amorfne oblike snovi v past (16). Potrebno je opozoriti na to, da amorfne spojine, pripravljene z različnimi metodami, izkazujejo različne lastnosti. V procesih, pri katerih prihaja do mehanske aktivacije, lahko pride do delne bodisi do popolne amorfizacije vzorca, medtem ko pretvorba kristalne oblike preko vmesne faze vodi do popolne amorfizacije in s tem do popolne izgube kristalnih lastnosti snovi (14, 15). Do amorfizacije učinkovine lahko pride tudi spontano, o čemer je poročalo več raziskovalcev. Konno in sodelavci so zaznali spontano amorfizacijo aspirina in fenacetina v fizikalnih zmesih z Neusilinom ali aktivnim ogljem, shranjenih pri sobni T za obdobje od 7 do 14 dni. Ugotovili so, da se hitrost amorfizacije poveča v primeru znižanega tlaka. Spontani prehod učinkovine iz kristalne oblike v amorfno naj bi potekal preko parne faze in naj bi bil odvisen od njenega parnega tlaka. Pri učinkovinah, ki so imele višji parni tlak, so zabeležili bistveno hitrejšo amorfizacijo, kot v primeru učinkovin z nižjim parnim tlakom (17).

1.3 FIZIKALNA STABILNOST AMORFNE OBLIKE

Topnost amorfne oblike učinkovine mora ostati tekom roka uporabe zdravila pri shranjevanju pri določenih pogojih nespremenjena. Zato mora ostati amorfna oblika ZU tekom shranjevanja fizikalno stabilna. Za doseg optimalne stabilnosti mora biti mobilnost molekul kar se da nizka oziroma enaka nič, saj je za potek kristalizacije potrebna zadostna mobilnost molekul, kar omenjajo številne publikacije (7, 18, 19). Ločnico med območjem nizke oziroma ničelne gibljivosti molekul in območjem višje gibljivosti predstavlja temperatura steklastega prehoda (20). Pripravki, v katerih ZU ni popolnoma amorfna (takšne delce daje somletje), vsebujejo delce kristalne učinkovine, ki predstavljajo jedra za nadaljnjo kristalizacijo amorfne učinkovine. Dokazali so, da so trdne disperzije (TD), ki ne vsebujejo popolnoma amorfne učinkovine, tekom shranjevanja bistveno manj stabilne ter izkazujejo bistveno slabši profil raztapljanja. Nasprotno je pri TD, ki vsebujejo popolnoma amorfno obliko delcev. V tem primeru mora najprej poteči proces nukleacije, kateremu lahko sledi nadaljnja kristalizacija učinkovine (21). Kristalizacija amorfne oblike snovi je v

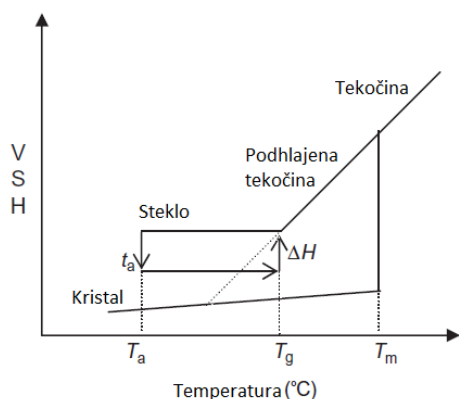
osnovi kompleksen proces, odvisen od več različnih dejavnikov, ki so predstavljeni v preglednici II in jih lahko razdelimo na kinetične, termodinamične in molekulske dejavnike. Pomemben vpliv na proces kristalizacije predstavljajo tudi ostali procesni parametri, kot so vsebnost vlage, metoda in pogoji izdelave amorfne oblike snovi (22).

Preglednica II: Dejavniki, ki vplivajo na fizikalno stabilnost amorfne oblike trdne snovi.

Dejavnik	Indikator	Vpliv na stabilnost	Vir
Mobilnost molekul	Temperatura steklastega prehoda (T_g)	Stabilnost narašča z višanjem T_g amorfne snovi. Izdelava TD učinkovine z dodatkom polimera z visoko vrednostjo T_g (npr. PVP) izboljša kinetično stabilnost amorfne oblike.	24, 27, 28, 29
Entropijska bariera kristalizacije	Konfiguracijska entropija	Snovi, ki imajo nižjo konfiguracijsko entropijo, zahtevajo manjšo gibljivost molekul za rekristalizacijo amorfne snovi.	22
Tvorba vodikovih vezi		Amorfni materiali, ki imajo podobne vrednosti T_g , lahko zaradi različnega števila prisotnih vodikovih vezi med molekulami učinkovine in pomožne snovi izkazujejo različne profile stabilnosti.	24, 29
Zunanji dejavniki	Relativna vlaga, mehanični stres, temperatura	Prisotnost vlage poveča gibljivost molekul ter zaradi učinka mehčala zniža vrednost T_g . Tako povišana RV, T kot prisoten mehanični stres povečajo hitrost kristalizacije amorfne snovi.	22, 25
Metoda izdelave	Taljenje, odparevanje topila, metode mehanične aktivacije	Izbira metode izdelave amorfne oblike, zaradi razlik v stopnji relaksacije (mobilnosti) molekul in razlik v termodinamičnih lastnostih amorfne snovi, vpliva na njeno stabilnost.	22, 26
Pogoji izdelave amorfne oblike	Hitrost ohlajanja, temperatura izdelave, čas izdelave, izbira in vsebnost pomožne snovi	Pogoji izdelave imajo različen vpliv na stabilnost (odvisno od lastnosti učinkovine in pomožne snovi).	22,25, 26,30

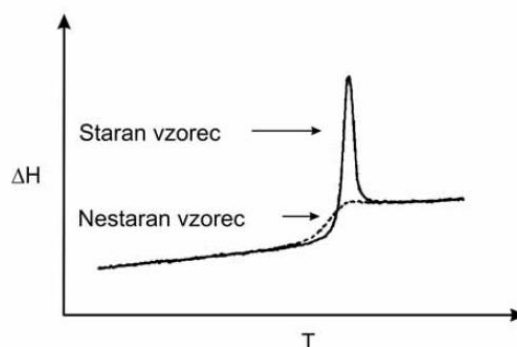
Izmed opisanih dejavnikov, ki vplivajo na fizikalno stabilnost amorfne snovi, pripisujejo največji vpliv mobilnosti molekul. Mobilnost molekul lahko kvantificiramo z računanjem konstante molekulske relaksacije (τ), ki je uporaben parameter za napoved temperature shranjevanja vzorca. Definirana je kot povprečen čas, ki je potreben za premik molekul v vzorcu. Odvisna je od temperature, pri T_g znaša 100-200 sekund. Velja pravilo, da je tveganje za kristalizacijo minimizirano, kadar je konstanta relaksacije podobna oziroma večja kot eksperimentalni čas (npr. čas sušenja produkta, čas ohlajanja) (21). Konstanto molekulske relaksacije lahko izračunamo z merjenjem entalpije relaksacije vzorca (ΔH) (slika 3). Tekom shranjevanja amorfne snovi pod T_g , pri temperaturi T_a , prihaja do

strukturnih sprememb (težnja po prehodu amorfne oblike v ravnotežno podhlajeno stanje). Pride do znižanja vrednosti specifičnega volumna in entalpije. Med procesom segrevanja staranega vzorca z diferenčno dinamično kalorimetrijo se izgubljen entalpijski deficit regenerira, kar vidimo kot endotermni vrh na DSC krivulji (slika 4) (23). Položaj in velikost endotermnega vrha sta odvisna od temperature in časa staranja vzorca. Daljše časovno obdobje staranja omogoča večjo relaksacijo vzorca.



Slika 3: Sprememba termodinamičnih parametrov tekom shranjevanja vzorca pri temperaturi (T_a) za čas (t_a) (23).

(V - specifični volumen, S - entropija, H - entalpija, ΔH - entalpija relaksacije vzorca)



Slika 4: DSC krivulji staranega ter nestaranega amorfne vzorca (6).

Za vsako temperaturo, pri kateri shranjujemo vzorec, obstaja maksimalna vrednost entalpije relaksacije (ΔH_∞). Njena vrednost pada z nižanjem temperature. Za izračun njene vrednosti se uporablja predvsem naslednja enačba (6, 13, 24):

$$\Delta H_\infty = (T_g - T) \Delta C_p, \quad \text{Enačba 1}$$

(T = eksperimentalna temperatura, ΔC_p = sprememba toplotne kapacitete pri T_g)

Nadalje lahko s poznano vrednostjo ΔH_∞ izračunamo obseg deleža relaksacije v vzorcu (Φ_t):

$$\Phi_t = 1 - (\Delta H_t / \Delta H_\infty) \quad \text{Enačba 2}$$

(ΔH_t = izmerjena entalpija relaksacije vzorca po določenem času hranjenja (t) pri določenih pogojih)

Vrednost Φ_t nato uporabimo za izračun τ , ki ga izrazimo iz Kohlrausch-William-Watts (KWW) enačbe :

$$\Phi_t = \exp [-(t/\tau)^\beta], \quad 0 < \beta \leq 1 \quad \text{Enačba 3}$$

(β = porazdelitveni parameter relaksacijskega časa)

Vpliv na stabilnost učinkovine ima tudi sposobnost tvorbe vodikovih vezi med molekulami učinkovine in pomožne snovi. Amorfne učinkovine, ki imajo približno enake vrednosti T_g ,

pogosto izkazujejo različen profil stabilnosti. Pri raziskovanju razlik v stabilnosti so raziskovalci dokazali, da je vzrok za razlike različna sposobnost molekul ZU za tvorbo vodikovih vezi z uporabljenimi materiali. Primer sta učinkovini valdekoksib ($T_g = 56,4 \text{ }^\circ\text{C}$) in etorikoksib ($T_g = 58,7 \text{ }^\circ\text{C}$). Obe učinkovini imata podobno strukturo in podobni vrednosti T_g , medtem ko je njuna stabilnost v trdnih disperzijah, pripravljenih s pomožno snovjo PVP (polivinilpirolidon), različna. Po opravljeni FTIR (infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo) analizi, obeh učinkovin in njunih trdnih disperzij, so Bansal in njegovi sodelavci ugotovili, da lahko razliko v stabilnostnem profilu pripišejo različni tvorbi H-vezi. Valdekoksib ima za razliko od etorikoksiba sulfonamidno skupino in s tem dva donorja H-vezi, ki lahko tvorita H-vezi s $-\text{C}=\text{O}$ skupino polivinilpirolidona. Zaradi močnejših interakcij med molekulami valdekoksiba in molekulami PVP-ja se je zmanjšala mobilnost učinkovine, kar so zaznali s padcem entalpije relaksacije (24).

Na stabilnost disperzije, ki vsebuje amorfnu spojino, vplivajo tudi pogoji shranjevanja (predvsem temperatura in relativna vlažnost zraka (RV)), metoda in pogoji izdelave. Pomemben je izbor ustrezne pomožne snovi in njenega deleža v disperziji. Yang in sodelavci so preučevali vpliv zunanjih dejavnikov na hitrost kristalizacije amorfne učinkovine efavirenz v trdnih disperzijah s pomožno snovjo PVP, izdelanih z metodo sušenja z razprševanjem. Ugotovili so, da se hitrost kristalizacije učinkovine bistveno poveša s povišanjem temperature in relativne vlažnosti zraka shranjevanja TD. Preučevali so tudi vpliv deleža PVP na fizikalno stabilnost. Ugotovili so, da ima delež polivinilpirolidona v trdni disperziji bistveno večji vpliv na zmanjšano hitrost kristalizacije in s tem na izboljšanje stabilnosti, kot pa vrednosti T in RV shranjevanja. Določili so tudi delež PVP, ki bi bil potreben za stabilizacijo amorfne učinkovine. Pripravili so trdne disperzije s 25 % deležem PVP in ugotovili, da je bila učinkovina v TD, shranjeni pri $T = 72 \text{ }^\circ\text{C}$ in $RV = 53 \%$ 24 mesecev, še vedno popolnoma amorfna. Stabilnosti za daljši čas hranjenja trdnih disperzij pri izbranih pogojih niso preverjali (25). Takeuchi je skupaj s sodelavci ugotovil, da ima izbor pomožne snovi pri izdelavi TD skupaj z metodo izdelave in pogoji hranjenja velik vpliv na stabilnost amorfne učinkovine. Medtem, ko je bil tolbutamid v trdni disperziji (masno razmerje ZU : PS = 1 : 1), izdelani z metodo razprševanja, stabilen po 28 dneh hranjenja pri $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ in $RV = 0 \%$ tako v primeru uporabe porozne (Sylysia 350) kot neporozne (Aerosil 200) silike, je bila učinkovina v primeru izdelave TD z metodo odparevanja topila stabilna samo v primeru uporabe

poroznega nosilca. Ko so vzorce shranili pri $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$ je bila učinkovina v disperziji stabilna največ 14 dni (26).

1.4 STABILIZACIJA AMORFNE OBLIKE

Amorfne snovi so zaradi povišane notranje energije in povečane gibljivosti molekul termodinamsko nestabilne ter lahko s časom preidejo v stabilnejšo kristalno obliko, še posebno če jih izpostavimo povišani vrednosti temperature in relativne vlage. Zato je potrebno amorfno obliko stabilizirati z namenom, da le ta ostane stabilna tekom izdelave končne farmacevtske oblike, shranjevanja in uporabe (5, 7, 14). Iste metode kot za izdelavo amorfne oblike ZU uporabljamo tudi za njihovo stabilizacijo s tem, da učinkovini dodamo pomožne snovi in izdelamo trdne disperzije. Vodilo za izbiro metode stabilizacije predstavlja T_g amorfne snovi (7).

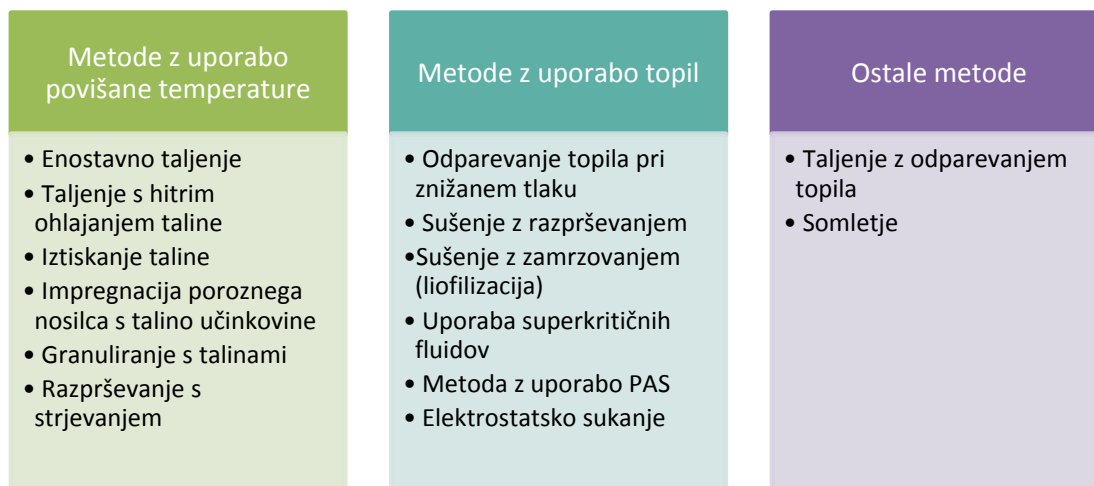
1.4.1 Shranjevanje pri temperaturi $T_g - 50\text{ }^{\circ}\text{C}$

Amorfne snovi so pod temperaturo steklastega prehoda relativno stabilne. Pri vrednostih višjih od T_g snovi pa se poveča mobilnost molekul ter njihova občutljivost na mehanske in termične obremenitve, kar ima vpliv na njihove fizikalne in mehanske lastnosti (6, 7). Shranjevanje amorfne snovi pod temperaturo steklastega prehoda naj bi zmanjšalo verjetnost za njeno pretvorbo v kristalno stanje (7). Molekule so pod T_g še vedno gibljive, vendar je za premik potrebno daljše časovno obdobje kot pri temperaturi višji od T_g (31). Večina amorfne snovi ima vrednost T_g nad vrednostjo sobne temperature. Vendar pa prisotnost zaostalih topil med procesom izdelave, relativna vlaga in prisotnost ostalih nečistot povzročata, da so amorfne snovi nestabilne tudi pri temperaturi, ki je nižja od sobne. Tako topila kot relativna vlaga delujejo mehčalno ter povečajo gibljivost molekul. Zaradi tega T_g ni dovolj dober pokazatelj meje, pod katero molekule naj ne bi bile gibljive, poleg tega je ta način stabilizacije uporaben le za spojine, ki imajo vrednost T_g nad $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6).

1.4.2 Izdelava trdne disperzije

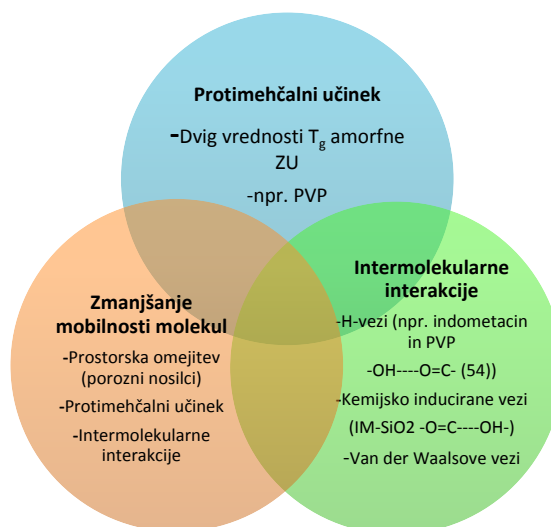
Trdna disperzija (TD) je disperzija najmanj dveh različnih komponent v trdnem agregatnem stanju; običajno hidrofilnega ogrodja, ki je inertno, ter hidrofobne učinkovine. Ogrodje TD je lahko kristalno ali amorfno, učinkovina pa je dispergirana molekularno v obliki amorfne ali kristalne delce. Za izdelavo TD uporabljamo različne pomožne snovi:

polivinilpirolidon, polietilen glikol, celulozne derivate, sodobne površinsko aktivne snovi (Poloksamer, Tween, Gelucire), porozne materiale. Glede na urejenost molekul v ogrodju delimo trdne disperzije v več razredov: evtektična zmes, amorfni precipitati v/na kristalnem nosilcu, trdna raztopina, amorfna suspenzija, amorfna raztopina, kompleksna spojina in kombinacija naštetega. Obstaja več različnih metod za pripravo TD. V grobem jih delimo na metode z uporabo povišane temperature, metode z uporabo topil ter na ostale metode. Delitev metod je shematsko prikazana na sliki 5.



Slika 5: Delitev metod izdelave trdnih disperzij.

Z izdelavo trdne disperzije se poveča stabilnost amorfne učinkovine, poleg tega pa pride do izboljšanja topnosti in biološke uporabnosti učinkovine, glede na kristalno obliko (32, 33). Obstaja več različnih mehanizmov stabilizacije amorfne učinkovine v TD. Posamezni stabilizacijski mehanizmi so predstavljeni na sliki 6 (34).



Slika 6: Predlagani mehanizmi stabilizacije amorfne učinkovine v trdni disperziji.

Pri izdelavi TD z izbrano pomožno snovjo lahko pride do prevlade enega samega ali pa do kombinacije več različnih stabilizacijskih mehanizmov. Kateri mehanizem bo prevladal, pa je odvisno od lastnosti učinkovine in pomožne snovi (34). Na tržišču so že dostopna zdravila, ki so izdelana v obliki TD. Nekatera izmed njih so: Sporanox® (itakonazol), Prograf® (takrolimus), Crestor® (rosuvastatin), Cesamet® (nabilon), Solufen® (ibuprofen), Norvir® (ritonavir), Zithromax® (azitromicin) in Implanon® (etonogestrel) (30, 35).

1.4.2.1 Metoda taljenja (angl. »simple fusion« in »melt quenching«)

Pri metodi taljenja najprej pripravimo fizikalno zmes učinkovine in nosilca, ki jo nato segrevamo nad temperaturo tališča, da se zmes popolnoma stali. Procesu taljenja sledi proces ohlajanja taline, ki ga lahko izvedemo na različne načine: ohlajanje v ledeni kopeli z močnim mešanjem, hlajenje plošče iz nerjavečega jekla, na kateri je talina z mrzlim zrakom ali hladno vodo, ohlajanje taline po nanosu na petrijevko pri sobni temperaturi v eksikatorju, hlajenje taline na aluminijastih čolničkih nad suhim ledom (30, 36). Vsi omenjeni postopki zahtevajo daljši čas hlajenja, kar lahko vodi do ločitev faz in v kristalizacijo amorfne učinkovine. Bistveno boljši je postopek hitrega ohlajanja taline (angl. »melt quenching«), kjer se kot hladilno sredstvo najpogosteje uporablja tekoči dušik. Ohlajeni produkt zmeljemo in presejemo skozi sita, da dobimo ustrezno velike frakcije delcev. Kljub prednostim, kot so enostavnost, ekonomičnost ter odsotnost topil, je uporaba metode taljenja v industriji omejena. Enega od razlogov omejitve predstavlja uporaba visokih temperatur pri taljenju, ki lahko povzroči razpad učinkovine ali nosilca. Pri lahko hlapnih učinkovinah in nosilcih lahko pride do odparevanja in izgub posamezne komponente. Učinkovina in nosilec morata biti kompatibilna in se morata dobro mešati pri temperaturi taljenja. Necompatibilnost komponent lahko pripelje v ločitev faz in nastanek nehomogene disperzije (33). Zaradi omenjenih slabosti so uvedli modificirane postopke priprave TD, kot so iztiskanje taline (angl. »hot melt extrusion«), MeltrexTM, granuliranje s talino (angl. »melt agglomeration process«) in razprševanje s strjevanjem (angl. »spray-congealing«) (36).

1.4.2.2 Metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku (angl. »solvent evaporation method«)

Pri metodi z odparevanjem topila učinkovino in nosilni material najprej raztopimo v zadostni količini hlapnega organskega topila. Nato odstranimo topilo iz sistema, npr. s pomočjo vrtečega evaporatorja (rotavaporja) ali vakumskega sušilnika, produkt pa posušimo do konstantne mase (30, 32). Temperatura, ki se uporablja za odstranitev topila, je bistveno nižja kot pri metodi taljenja, zato se metoda uporablja za učinkovine, ki pri višji temperaturi razpadejo. Slabost metode z uporabo topil predstavlja možen zaostanek topil, ki so lahko toksična in imajo učinek mehčala. Težavo predstavlja tudi možna ločitev komponent pri odstranjevanju topila iz sistema. Verjetnost ločitve komponent lahko zmanjšamo z uporabo višje temperature, ki pospeši proces odstranitve topila. S tem se skrajša čas, v katerem lahko pride do ločitve komponent. Po drugi strani pa uporaba povišane temperature poveča mobilnost molekul učinkovine ter nosilca, kar poveča verjetnost kristalizacije učinkovine (33). Poleg tega je metoda z uporabo topil zahtevnejša, stroški izdelave pa višji (36). Težavo predstavlja tudi ustrezna izbira topila, v kateri bi bila topna tako hidrofobna učinkovina kot hidrofilni nosilni material. Za povečanje topnosti učinkovine v izbranem topilu uporabljamo površinsko aktivne snovi, kot npr. Tween, Poloksamer in Gelucire. Tachibani in Nakamura sta bila prva raziskovalca, ki sta učinkovino in nosilec raztopila v istem topilu, ki sta ga nato odstranila z odparevanjem pri znižanem tlaku (37). TD z odparevanjem topila lahko pripravimo tudi tako, da ostane nosilec v organskem topilu neraztopljen, učinkovina pa se po odparevanju topila obori v porah nosilnega materiala ali pa se adsorbira na njegovo površino (38). Vgradnja učinkovine v pore/na površino nosilnega materiala zmanjša gibljivost molekul in s tem izboljša fizikalno stabilnost amorfnе učinkovine. Pri metodi odparevanja topila so za stabilnost učinkovine v pripravljenih TD pomembni naslednji dejavniki: izbira pomožne snovi, razmerje učinkovina - pomožna snov, narava topila, razmerje učinkovina - topilo, pomožna snov - topilo, način in hitrost odparevanja topila (39).

Kovačič in sodelavci so preiskovali vpliv različnih materialov in načina izdelave na fizikalno stabilnost karvedilola v TD, izdelanih z metodo odparevanja topila z uporabo rotavaporja. Uporabili so dve različni pomožni snovi - porozno Sylysio 350 in neporozni Aerosil® in dva različna načina polnjenja ZU v pore oz. na površino pomožne snovi - enostopenjsko (niz A) in večstopenjsko polnjenje (niz B). Z analizo pripravljenih vzorcev so ugotovili, da je z naraščajočim masnim deležem učinkovine, ki so ga uporabili za

izdelavo TD s Sylysio 350, naraščal tudi delež učinkovine v kristalni obliki. Razlog za to je bil prevelik delež uporabljene ZU glede na volumen por pomožne snovi. Posledično je z višanjem masnega deleža ZU ostalo vedno več učinkovine zunaj por. Očitna razlika v deležu kristalne oblike je bila med nizom A in nizom B pripravljenih TD. Medtem ko se je pri nizu A z višanjem masnega deleža ZU višal delež učinkovine, ki se je nahajala v kristalni obliki, so z metodo večkratnega polnjenja v vseh primerih (maksimalna vsebnost ZU v TD je bila 60 %) dobili TD, ki so vsebovale popolnoma amorfno učinkovino. Ugotovili so tudi, da se učinkovina bistveno bolj nalaga v pore v nizu B, medtem ko so v nizu A opazili nalaganje na zunanje stene porozne snovi. Posledično so zabeležili bistveno boljšo stabilnost učinkovine v nizu B trdnih disperzij, kjer je karvedilol ostal v amorfni obliki tudi po 12 mesecih hranjenja pri sobnih pogojih. S tem so dokazali, da predstavlja metoda vgradnje karvedilola v pore nosilnega sistema pomemben vpliv na stabilizacijski učinek karvedilola v TD (2). Tudi Ambrogi in sodelavci so z vgradnjo furosemda v porozni material SBA-15 (angl. »Santa Barbara Amorphous material«) z metodo topila pripravili disperzijo, ki je bila stabilna tudi po 6 mesecih hranjenja pri pogoju 40 °C/75 % RV (40).

Kot smo že omenili, se poleg metode odparevanja topila pri znižanem tlaku za odstranitev topila iz sistema uporabljajo tudi druge metode. Van Den Mooter in sodelavci so izboljšali stabilnost ketokonazola z izdelavo TD z metodo sušenja z razprševanjem. Stabilizacijski učinek so pripisali izdelavi TD in protimehčalnemu učinku nosilca PVP ($T_g = 155$ °C). Medtem ko je bila amorfna učinkovina v trdni disperziji stabilna, je v primeru izdelave fizikalne zmesi hitro rekristalizirala. Stabilnost disperzije se je ohranila tudi v primeru, ko so k TD dodali kristale učinkovine (27). Z izdelavo trdnih disperzij z metodo odparevanja topila so izboljšali fizikalno stabilnost amorfne oblike še številnim drugim učinkovinam, kot so meloksikam, naproksen, rofekoksib, felodipin, atenolol in nimesulid (41).

1.4.2.3 Metoda somletja (angl. »co-milling«)

Amorfizacijo in nadaljnjo stabilizacijo izdelane amorfne učinkovine lahko dosežemo tudi z mletjem fizikalne zmesi učinkovine in primerne pomožne snovi. Kot primerni pomožni snovi sta se izkazala predvsem PVP in SiO₂ (6). Največkrat se za mletje zmesi uporabljajo: mlin na zračni tok, mlin kladivar in kroglični mlin, ki se uporablja najpogosteje (11). Metoda somletja predstavlja alternativno metodo za amorfizacijo učinkovin, ki so občutljive na povišano T ali prisotnost topil (6). Med mletjem se ustvarja mehanska

energija, ki omogoča, da pride do lomljenja delcev in nadaljnega porušenja kristalne strukture. Najprej prihaja do amorfizacije površine vzorca, medtem ko lahko sredica ostane kristalna (42). Zaradi močno izraženih interakcij, do katerih prihaja tekom mletja med komponentama v zmesi, predstavlja metoda somletja učinkovitejšo metodo stabilizacije kot pa metoda hitre ohladitve taline (43).

Vpliv na izdelavo amorfne oblike snovi in na njeno stabilizacijo ima dodatek pomožnih snovi ter čas mletja, kar so dokazali Mura in sodelavci. Pri preučevanju mletja glizentida so ugotovili, da je za amorfizacijo učinkovine potreben krajši čas mletja v primeru dodatka PVP-ja kot v primeru mletja same izhodne učinkovine. Poleg tega je bila učinkovina v trdni disperziji s PVP stabilna vsaj 4 mesece (44). Preučevali so tudi disperzije, pripravljene s somletjem indometacina in SiO_2 . Kot v primeru glizentida je potekala amorfizacija hitreje v primeru uporabe pomožne snovi kot brez nje. Stabilnost pripravljenih TD so spremljali z izotermično kalorimetrijo. TD so shranili pri 30 °C in 11 % RV ter merili čas potreben za rekristalizacijo amorfne učinkovine. Ugotovili so, da je bila amorfna oblika indometacina bistveno bolj stabilna v TD, mletih s SiO_2 , kot pa v primeru same amorfne učinkovine. Poleg tega je bila amorfna učinkovina v disperzijah, pripravljenih z daljšim časom mletja, bolj stabilna. V primeru krajšega časa mletja zmesi so zaostali mikrokristali učinkovine predstavljali jedra za nadaljnjo kristalizacijo indometacina. Predlagani mehanizem stabilizacije indometacina z mletjem zmesi so bile prisotne tako imenovane mehansko inducirane kemijske interakcije med površino indometacina in silanolnimi skupinami, kar so pozneje tudi potrdili z jedrsko magnetno resonanco. Na ta način je bila omejena mobilnost in s tem izboljšana stabilnost amorfne učinkovine. Poleg tega so s podaljšanim časom mletja zmesi zaznali porast T_g na DSC krivulji, kar dodatno prispeva k stabilizaciji amorfne učinkovine (43). Bahl in Bogner sta pri somletju fizikalne zmesi indometacina in Neusilina® poleg prisotnosti pomožne snovi kot možni mehanizem amorfizacije in stabilizacije navedla tudi proces sublimacije kristalov indometacina, ki ji sledi adsorpcija plinaste faze na površino porozne silike, ki naj bi se zgodila med procesom somletja. Ugotovila sta, da ima poleg časa mletja na olajšan potek amorfizacije vpliv tudi prisotna procesna vlaga. Le ta ima učinek mehčala, zato poveča mobilnost molekul in vodi v nastanek nižje energijskega kristalnega stanja. V tem primeru pa je prisotna vlaga na račun povišane mobilnosti olajšala interakcije med učinkovino in Neusilinom®. Efekt je bil bolj izražen v prisotnosti višjega deleža PS. Z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo so nakazali na možno prisotnost

H-vezi med silanolnimi skupinami Neusilina® in karboksilno skupino indometacina ter ion-dipol interakcij med Mg^{2+} in/ali Al^{3+} ioni, ki se nahajajo na površini silike in karboksilno skupino učinkovine. Izdelane vzorce trdnih disperzij so shranili pri povišani T in RV. Vzorci, v katerih je bila učinkovina popolnoma amorfna, so ostali stabilni ne glede na prisotni delež Neusilina® tudi po 3 mesecih hranjenja pri 40 °C in 75 % RV (45).

1.5 POROZNI NOSILNI MATERIALI ZA IZDELAVO TRDNIH DISPERZIJ

Za izdelavo trdnih disperzij uporabljamo različne nevodotopne porozne nosilne materiale, kot so porozni silicijev dioksid (Syloid®, Sylysia®), magnezijev aluminometasilikat (Neusilin®), polipropilenska pena v prahu (Accurel®), porozni kalcijev silikat (Florite®), porozna keramika in kalcijev karbonat ($CaCO_3$). Med novejša porozna materiala spadata MCM-41 (angl. »Mobil Composition of Matter«) in SBA-15 (angl. »Santa Barbara Amorphous material«). Kljub njihovi nevodotopnosti jih glede na vrsto in obseg interakcij z vodo delimo na hidrofilne in hidrofobne nosilce (46). Po IUPAC nomenklaturi jih glede na velikost por delimo v tri razrede, in sicer: mikroporozni (od 0,3 do 2 nm), mezoporozni (od 2 do 50 nm) in makroporozni (nad 50 nm) (47, 48). Glavne lastnosti poroznih nosilnih materialov so velika specifična površina (večja kot $500 \text{ m}^2/\text{g}$), velik volumen (približno $1 \text{ cm}^3/\text{g}$) in ozka porazdelitev velikosti por. Uporaba poroznih materialov omogoča vgradnjo večje množine molekul učinkovin, nudi zaščito pred zunanjimi vplivi ter omogoča kontrolirano in hitrejše sproščanje učinkovine v medij (49). Ugotovili so, da uporaba poroznega materiala pri izdelavi TD vpliva na zmanjšanje kristaliničnosti učinkovine. Z vgradnjo amorfne učinkovine na površino ali v pore nosilnega materiala se poveča fizikalna stabilnost, saj je zaradi prostorske omejitve ovirana tvorba kristalnih jeder in s tem nadaljnja kristalizacija učinkovine (5, 46). Poleg tega pride zaradi zapolnitve por do zmanjšanja Gibbsove proste energije (48). Dodaten mehanizem stabilizacije predstavljajo tudi že predhodno omenjene interakcije, ki jih lahko ZU tvori s poroznimi materiali. Takeuchi in sodelavci so pri preučevanju stabilnosti amorfne indometacina v TD, pripravljenih z metodo sušenja z razprševanjem, dokazali pomen prisotnosti poroznega nosilnega materiala za stabilizacijo učinkovine. Amorfen indometacin je bil v TD, izdelani s porozno siliko (Sylysia 350), stabilen, saj po dveh mesecih hranjenja TD pri pogoju $T = 40 \text{ °C}/RV = 75 \%$ ni prišlo do rekristalizacije učinkovine, medtem ko se je v odsotnosti silike amorfen indometacin zlahka pretvoril nazaj v kristalno obliko (50).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je preučiti vpliv metode izdelave in deleža karvedilola v trdnih disperzijah z mezoporoznim SiO₂ (Syloid 244 FP) na fizikalne lastnosti učinkovine in stabilnost.

1. Najprej bomo izdelali trdne disperzije karvedilola in Syloida 244 FP z dvema različnima metodama; metodo somletja in metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Z metodo somletja bomo pripravili TD z različnimi deleži učinkovine, ki jih bomo mleli različno dolgo časa. Najprej bomo mleli fizikalne zmesi brez dodatka topila, nato pa bomo zmesi pred začetkom mletja dodali še majhno količino acetona. TD bomo pripravili tudi z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, kjer bomo ravno tako kot pri metodi somletja uporabili različna razmerja učinkovine in pomožne snovi. Raziskali bomo tudi vpliv temperature pri odparevanju topila na izdelavo amorfnih oblik učinkovine in njeno stabilizacijo. Amorfnih karvedilol bomo pripravili tudi z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline.
2. Izdelane vzorce bomo analizirali takoj po izdelavi z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC). Za potrditev izdelave amorfnih učinkovine bomo opravili tudi test raztapljanja karvedilola iz izdelanih TD.
3. Pripravljene vzorce bomo za 6 tednov shranili v komori pri povišani temperaturi in relativni vlagi ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$). Po 6 tednih staranja bomo vzorce ponovno analizirali z metodo DSC in testom raztapljanja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri izvajanju eksperimentalnega dela smo uporabljali:

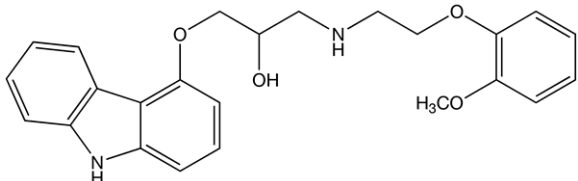
Učinkovina:

- Karvedilol, tovarna zdravil Krka d.d., Novo mesto.

Osnovni podatki:

Karvedilol je belkast do siv prah kristalne oblike, ki je dobro topen v dimetilsulfoksidu in acetonu, topen v metilenkloridu in metanolu, rahlo topen v etanolu (2) in praktično netopen v vodi ter želodčnem in črevesnem soku (51). Njegova topnost je odvisna od pH vrednosti, in sicer s padanjem vrednosti pH le ta narašča (pri pH = 9,0 znaša topnost v vodi manj kot 1 µg/ml, pri pH = 7,0 približno 23 µg/ml, pri pH = 5,0 pa se njegova topnost v vodi bistveno izboljša in doseže vrednost 100 µg/ml pri sobni temperaturi). V vodnih raztopinah s pH med 1 in 4 je njegova topnost omejena z nastankom protonirane oblike učinkovine oziroma tvorbe soli (v želodčnem mediju je to klorovodikova kislina) (52). Kemijske lastnosti karvedilola so prikazane v preglednici III (52, 53).

Preglednica III: Kemijske lastnosti karvedilola.

Mednarodno nelastniško ime (INN)	Karvedilol
IUPAC poimenovanje	(±)-[3-(9 <i>H</i> -karbazol-4-iloksi)-2-hidroksipropil] [2-(2-metoksifenoksi)etil]amin
Molekulska formula	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄
Molekulska masa	406,5 g/mol
Strukturna formula	

Učinkovina se nahaja v različnih polimorfnih oblikah, ki so predstavljene v preglednici IV. Poleg polimorfov lahko karvedilol tvori tudi solvate (npr. karvedilol etil acetat solvat) in hidrate (karvedilol dihidrogenfosfat dihidrat) (54).

Preglednica IV: Pregled polimorfnih oblik karvedilola.

Polimorfna oblika karvedilola	DSC odziv
oblika I	<ul style="list-style-type: none"> • temperatura tališča 123 - 126 °C
oblika II	<ul style="list-style-type: none"> • temperatura tališča 114 - 115 °C
oblika III	<ul style="list-style-type: none"> • temperatura tališča 92 - 95 °C, nato rekristalizacija pri 105 °C, 114 °C (temperatura tališča oblike II)
oblika IV	<ul style="list-style-type: none"> • temperatura tališča 104 °C
oblika V	<ul style="list-style-type: none"> • 67 °C (rekristalizacija), 115 °C (tališče)
oblika VI karvedilol solvat	<ul style="list-style-type: none"> • 74 °C (glavni vrh) in 112 °C (manjši vrh)
oblika VII	<ul style="list-style-type: none"> • 73 °C (polimorfna modifikacija v obliko II), 114 °C (temperatura tališča oblike II)
oblika IX	<ul style="list-style-type: none"> • 94,5 - 96,2 °C • 80 °C (manjši vrh) in 99 °C (večji vrh)
karvedilol hemihidrat	<ul style="list-style-type: none"> • temperatura tališča 94 - 96 °C

Farmakodinamične lastnosti:

Uporabljena modelna učinkovina je antagonist adrenergičnih receptorjev α in β . Neselektivno zavira adrenergične receptorje β , selektivno pa adrenergične receptorje α_1 . Njegov najpomembnejši učinek je vazodilatacija, poleg tega pa izkazuje tudi antioksidativne in antiproliferativne lastnosti. Uporablja se za zdravljenje esencialne hipertenzije, kronične stabilne angine pectoris, kroničnega srčnega popuščanja ter za zdravljenje bolnikov z dokazano sistolično disfunkcijo po miokardnem infarktu (55). Odmerke zdravilne učinkovine se prilagodi posameznemu bolniku. Največji priporočeni dnevni odmerek učinkovine je 2 x 25 mg na dan. Učinkovina je racemat dveh stereoizomerov, ki se razlikujeta po učinkih in po presnovi. Oba enantiomera S (-) in R (+) zavirata adrenergične receptorje α_1 , enantiomer S (-) pa dodatno neselektivno deluje tudi na receptorje β in z zaviralnim delovanjem znižuje arterijski krvni tlak, zmanjšuje srčno

frekvenco ter minutni volumen srca. Presnova enantiomera S (-) poteka hitreje, zato so vrednosti plazemskih koncentracij karvedilola R (+) dva- do trikrat večje od koncentracije karvedilola S (-) (56).

Biološka uporabnost ZU znaša zgolj 30 % zaužitega karvedilola, kar je posledica obsežnega metabolizma učinkovine pri prehodu skozi jetra. Presnova poteka predvsem z jetrnima encimoma CYP2D6 ter CYP2C9. Pri tem nastanejo trije aktivni metaboliti, ki izkazujejo aktivnost za receptorje beta. Aktivni presnovki imajo v primerjavi s karvedilolom le šibki vazodilatacijski učinek (56).

Pomožna snov:

- mezoporozni Syloid 244 FP EU Grace Davison ZDA.

Syloid 244 FP je sintetičen amorfen silicijev dioksid, zelo visoke stopnje čistosti (min 99,0 % SiO₂). Na videz je bel sipek prašek, brez vonja in okusa. Povprečna velikost delcev Syloida 244 FP znaša med 2,5 μm in 3,7 μm, povprečna površina 311 ± 14 m²/g, povprečen volumen por pa znaša 1,42 ± 0,04 cm³/g (57). Te edinstvene morfološke lastnosti prispevajo k njegovi multifunkcionalnosti (nosilec ZU, drsilo, razgrajevalo, adsorbent). Velika zunanja površina delcev in velik volumen por omogočata vgradnjo trdnih snovi in tekočin. Na ta način lahko povečamo topnost in hitrost raztapljanja slabo topnih ZU, saj se poveča površina delcev, ki je na voljo za raztapljanje, izboljšano pa je tudi močenje. Vgradnja amorfne učinkovine v pore nosilnega sistema omogoča zaščito ZU pred zunanjimi vplivi med proizvodnim procesom in shranjevanjem, kar vpliva na izboljšano fizikalno stabilnost amorfne učinkovine. Povzetek lastnosti in prednosti Syloida 244 FP so predstavljene v preglednici V. Strukturo delca Syloida 244 FP lahko vidimo na prečnem prerezu delca na sliki 7 (58).

Preglednica V: Prikaz povzetka lastnosti in prednosti Syloida 244 FP.

Lastnosti	Prednosti
<ul style="list-style-type: none"> • visoka notranja poroznost (nm) in velika zunanja površina delcev 	<ul style="list-style-type: none"> • višja stroškovna učinkovitost • kontrolirano in hitrejše sproščanje ZU • izboljšana topnost ZU

<ul style="list-style-type: none">• velika adsorptivna kapaciteta	<ul style="list-style-type: none">• vezava vlage in povečanje stabilnosti na vlago občutljivih ZU• vgradnja večjega deleža ZU
<ul style="list-style-type: none">• enakomernejša porazdelitev velikosti delcev	<ul style="list-style-type: none">• enakomerna vsebnost ZU



Slika 7: Prečni prerez delca Syloida 244 FP (58).

Topila:

- aceton, CH_3COCH_3 (Merck, Nemčija),
- metanol, MeOH (Merck, Nemčija),
- prečiščena voda.

Reagenti:

- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija),
- natrijev hidroksid, NaOH (Merck, Nemčija),
- 37% klorovodikova kislina, HCl (Merck, Nemčija),
- SDS (angl. sodium dodecyl sulfate).

Laboratorijski pribor:

- steklovina (čase, bučke, merilni valji, erlenmajerice, epruvete),
- čolnički za tehtanje,
- spatule, žličke,

- pipete,
- steklene in plastične kapalke,
- nuča,
- patena, pestilo,
- silikonsko olje,
- tekoči dušik,
- magneti za magnetno mešalo,
- eksikator napolnjen s silikagelom,
- brizge 10 ml, igle 8 mm,
- filtri Minisart[®] RC25 0.45 μm , (Sartorius, Nemčija),
- filtri Minisart[®] SRP, PTFE 0.20 μm , (Sartorius, Nemčija),
- membranski filter PALL 0.20 μm (Pall Corporation, Michigan),
- termometer,
- parafilm (Pechiney Chichago, USA),
- plastični lončki za shranjevanje vzorcev,
- stoparica,
- škarje.

Priprava medijev za test raztapljanja:

Raztopina klorovodikove kisline s pH = 1,2:

V 5000 ml bučko smo nalili približno 4500 ml prečiščene vode in v digestoriju dodali 42,5 ml 37 % HCl. Bučko smo nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in izmerili pH.

Fosfatni pufer s pH = 6,8 z dodatkom SDS:

V 5000 ml bučko smo natehtali 30,0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in dodali približno 4500 ml prečiščene vode. V bučko smo dodali predhodno natehtan SDS (0,5 g/100 ml) ter bučko pustili mešati na magnetnem mešalu, dokler se ni vse raztopilo. Nato smo s predhodno pripravljeno raztopino NaOH uravnali pH raztopine na vrednost 6,8 ter bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Fosfatni pufer s pH = 6,8:

V 5000 ml bučko smo natehtali 30,0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, dodali približno 4500 ml prečiščene vode in bučko pustili mešati na magnetnem mešalu, dokler se ni vse raztopilo. Nato smo s predhodno pripravljeno raztopino NaOH uravnali pH raztopine na vrednost 6,8 ter bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Priprava raztopine NaOH za uravnavanje pH medija:

V 500 ml bučko smo natehtali 50 g NaOH ter bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro premešali.

3.2 APARATURE

- tehnica A&D Instruments LTD, GH-300-EC, Italija,
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG 245, Švica,
- analizna tehtnica Mettler Toledo XS DualRange, Švica,
- vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija,
- rotavapor BÜCHI R-114, Švica,
- vodna kopel BÜCHI B-480, Švica,
- vakuumška črpalka BÜCHI VAC V-500, Švica,
- upravljalnik tlaka BÜCHI B-721, Švica,
- diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, Švica,
- naprava za merjenje pH vrednosti raztopin: pH METER, Mettler Toledo MA235, Švica,
- magnetno mešalo IKA-RO 15 power, Nemčija,
- magnetno mešalo z grelcem, IKA RCT basic, Nemčija,
- ultrazvočna kadička Sonis4, Iskra Pio, Slovenija,
- naprava za test raztapljanja Erweka DT6, Nemčija,
- spektrofotometer Hewlett Packard, HP 8453, UV-Visible spectroscopy system, Nemčija,
- osebni računalnik Hewlett Packard Vectra XA, povezan z UV spektrofotometrom, Nemčija.

3.3 METODE

3.3.1 Določanje maksimalne topnosti učinkovine v mediju za sproščanje

Maksimalno topnost učinkovine smo določili v fosfatnem pufru s pH = 6,8. Pripravili smo nasičene raztopine učinkovine. V 50 ml erlenmajerico z obrusom smo natehtali približno 40 mg učinkovine ter s polnilno pipeto dodali 25 ml medija za sproščanje. Raztopine smo pustili na stresalniku VIBROMIX 313 EVT pri sobni temperaturi 24 ur. Koncentracijo raztopljenе učinkovine smo določili z UV-VIS spektrofotometrom, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 332 nm, na podlagi predhodno pripravljene umeritvene premice. Uporabili smo kiveto iz kvarčnega stekla in potjo žarka 1 cm. Pred merjenjem absorbance smo nasičene raztopine filtrirali skozi filter Minisart® RC25 0,45 µm. Pripravili smo tri paralele nasičenih raztopin.

3.3.2 Izdelava trdnih disperzij z metodo somletja

Vzorci smo mleli z vibracijskim mlinom Pulverisette 0 (slika 8). Učinkovino in pomožno snov smo natehtali v določenem razmerju s pomočjo analizne tehtnice Mettler Toledo ter vzorec prenesli v možnar mlina. Zmes snovi smo premešali s spatulo, mlin zaprli ter nastavili ustrezen čas mletja. Mletje je potekalo pri sobni temperaturi. Vsi mleti vzorci so imeli skupno maso 400 mg. Najprej smo mleli izhodno kristalno obliko karvedilola z dodatkom Syloida 244 FP v masnem razmerju 1 : 1 in 1 : 2. Čas mletja smo nastavili na 30 min in 120 min. Nato smo mleli vzorce karvedilola in Syloida 244 FP še z dodatkom topila. Kot topilo smo uporabili aceton. Ustrezno količino topila (100 µL/200 mg suhe snovi) smo s pomočjo avtomatske pipete nakapljali na zmes suhe snovi v možnarju mlina in zmes s pomočjo spatule ponovno premešali, mlin zaprli ter nastavili čas mletja. Čas mletja vzorcev, pripravljenih na opisan način, smo nastavili na 120 min. Kot zadnja smo pripravili vzorca s 24 urnim mletjem. Slednji mletji vzorcev sta potekali brez dodatka topila. Sestava vzorcev in pogoji mletja so predstavljeni v preglednici VI.

Preglednica VI: Pregled sestave trdnih disperzij pripravljenih z metodo somletja.

Pripravljeni vzorci	Masa ZU (mg)	Masa Syloida 244 FP (mg)	Topilo aceton (µl)	Čas mletja
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	200,0	200,0	/	30 min
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	133,3	266,7	/	30 min

karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	200,0	200,0	/	120 min
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	133,3	266,7	/	120 min
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	200,0	200,0	200	120 min
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	133,3	266,7	200	120 min
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	200,0	200,0	/	24 ur
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	133,3	266,7	/	24 ur



Slika 8: Vibracijski mlin Pulverisette 0 s posodo in kroglo za mletje.

Vibracijski mlin melje material s trenjem, drgnjenjem in zadevanjem krogle ob vzorec in steno možnarja. Možnar vibrira elektromagnetno, s pomočjo elektromotorja. Vibracije se prenesejo iz krogle na mleti material in obratno. Na začetku mletja je zmanjševanje velikosti delcev posledica udarcev krogle ob delce, kasneje pa drgnjenja zmesi med kroglo in steno možnarja. Zaradi vibracij se material v možnarju nenehno poseda na dno, kar omogoča, da se material dobro premeša. Mlin nam omogoča poljubno nastavitve časa mletja in intenzitete vibriranja krogle (59).

3.3.3 Izdelava trdih disperzij z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku

S pomočjo tehtnice Mettler Toledo smo natehtali ustrezno količino učinkovine in pomožne snovi v masnem razmerju 2 : 1, 1 : 1 ter 1 : 2. Natehtano količino učinkovine smo prenesli v 100 ml bučko ter dodali 50 ml acetona, v katerem se raztopi vsa učinkovina (topnost karvedilola v acetonu znaša 10,4 g/100 ml pri temperaturi 25 °C) (55). Raztopini smo dodali Syloid 244 FP, vse skupaj premešali ter bučko dali na rotavapor (slika 9). S

pomočjo zniževanja vrednosti tlaka smo topilo počasi odstranili. Temperaturo vodne kopeli smo nastavili na 40 °C/60 °C, hitrost vrtenja bučke pa na 50 obratov/min. Začetno vrednost tlaka v bučki smo nastavili na 650 mBar. Vrednosti tlaka smo zniževali počasi, vsake pol ure za 50 mBar do vrednosti tlaka 400 mBar, ko smo topilo že skoraj popolnoma odstranili. V nadaljevanju smo vrednosti tlaka zniževali hitreje, da smo produkt posušili. Končna vrednost tlaka je znašala 10 mBar. Po končanem postopku odparevanja topila, smo vzorec prenesli v možnar, kjer smo ga s pomočjo pestila zdrobili na manjše delce. Sestava vzorcev in pogoji priprave trdnih disperzij z odparevanjem topila so predstavljeni v preglednici VII.

Preglednica VII: Pregled sestave trdnih disperzij karvedilola in Syloida 244 FP, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku z uporabo rotavaporja.

Pripravljeni vzorci	Masa ZU (mg)	Masa Syloida 244 FP (mg)	Topilo aceton (ml)	T vodne kopeli (°C)	Hitrost vrtenja (obrti/min)
karvedilol:Syloid 244 FP (2:1)	1000	500	50	40	50
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	1000	1000	50	40	50
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	1000	2000	50	40	50
karvedilol:Syloid 244 FP (2:1)	1000	500	50	60	50
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	1000	1000	50	60	50
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	1000	2000	50	60	50



Slika 9: Rotavapor za pripravo TD z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku.

3.3.4 Priprava fizikalnih zmesi

Za pripravo fizikalnih zmesi karvedilola in Syloida 244 FP smo natehtali ustrezne količine učinkovine in pomožne snovi v razmerju 1 : 1 in 1 : 2. Skupna masa zmesi je znašala 400 mg. Natehtane snovi smo prenesli v pateno in s pomočjo spatule mešali 10 min. Sestavo fizikalnih zmesi prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Pregled sestave fizikalnih zmesi.

Pripravljeni vzorci	Masa ZU (mg)	Masa Syloida 244 FP (mg)	Čas mešanja (min)
karvedilol:Syloid 244 FP (1:1)	200,0	200,0	10
karvedilol:Syloid 244 FP (1:2)	133,3	266,7	10

3.3.5 Priprava amorfne oblike karvedilola

Karvedilol smo segrevali v kovinski pateni na kopeli iz silikonskega olja, ki smo jo predhodno segreli na 125 °C ($T_m + 10$ °C) (5). Ko se je ves karvedilol stalil, smo pateno postavili v posodo s tekočim dušikom. Karvedilol smo nato zdrobili s pestilom in vzorec shranili v eksikator.

3.3.6 Določanje vsebnosti učinkovine v pripravljenih trdnih disperzijah

Vsebnost učinkovine v vzorcih smo določali z UV-VIS spektrofotometrom z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 332 nm. V 250 ml bučko smo natehtali med 10 in 15 mg vzorca in dodali 100 ml metanola za analize. Bučko smo postavili v ultrazvočno kadičko. Po 15 min mešanja v kadički smo vsebino dopolnili z metanolom do oznake. Rastopino smo filtrirali skozi filter Minisart® SRP25 0.20 µm ter na osnovi predhodno izdelane umeritvene krivulje učinkovine v metanolu izmerili njeno koncentracijo. Absorbanco vzorcev smo merili v kiveti iz kvarčnega stekla in potjo žarka 1,0 cm. Določene vrednosti vsebnosti ZU za posamezne vzorce TD smo upoštevali pri proučevanju raztapljanja.

3.3.7 Pospešen test fizikalne stabilnosti

Fizikalno stabilnost (prehod amorfno → kristalno) karvedilola v trdnih disperzijah smo preverjali s shranjevanjem vzorcev v komori pri povišani temperaturi $T = 40\text{ °C}$ in relativni vlažnosti zraka $RV = 75\%$. Vzorce smo v komori shranjevali 6 tednov. Pogoje s povišanima vrednostma temperature in relativne vlage smo zagotovili s shranjevanjem vzorcev v električnem sušilniku s prisotnostjo nasičene raztopine NaCl. Vzorce smo analizirali z DSC analizatorjem preden smo jih shranili pri povišani temperaturi in relativni vlagi ter po 6 tednih hranjenja pri omenjenih pogojih.

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Termično analizo učinkovine, fizikalnih zmesi in vzorcev trdnih disperzij smo opravili s pomočjo diferenčnega dinamičnega kalorimetra Mettler Toledo DSC1, opremljenega s programsko opremo STARe Software v9.30. Z analitsko tehtnico smo v aluminijasti lonček natančno natehtali med 5 in 10 mg vzorca ter lonček zaprli. Meritve so bile izvedene v inertni dušikovi atmosferi, s pretokom dušika 40 ml/min. Vzorce smo segrevali od 0 °C do 130 °C s hitrostjo 10 K/min. Aparatura je bila kalibrirana z indijem.

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC, angl. »differential scanning calorimetry«) predstavlja sodobno termoanalitično metodo, ki omogoča kvantitativno merjenje toplotnih procesov, kateri nastopijo pri faznih spremembah ali kemijskih reakcijah, v odvisnosti od temperature. Metoda temelji na primerjalnem načinu merjenja. Vzorce primerjamo z referenčno substanco, ki v danem temperaturnem območju ne doživi nobenih sprememb. Referenca in vzorec imata ves čas segrevanja enako temperaturo. Merimo toplotno

energijo, ki je potrebna, da med vzorcem in referenco ne pride do temperaturnih razlik. Slednja je enaka toploti, ki se porablja ali sprošča pri kemijskih reakcijah ali faznih prehodih v vzorcu. Napravo sestavljajo (slika 10): peč, nosilec vzorca in reference s termočleni, tehtnica v termostatisirani komori, regulacijski sistem za uravnavanje segrevanja/ohlajanja ter pretoka plina in računalnik za vodenje in obdelavo meritev. Za kalibracijo naprave se uporabljajo različni standardi, ki imajo različne vrednosti temperature tališča: Indij ($T_m = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$), cink ($T_m = 419,5 \text{ }^\circ\text{C}$), aluminij ($T_m = 660,3 \text{ }^\circ\text{C}$), zlato ($T_m = 1064,2 \text{ }^\circ\text{C}$) in paladij ($T_m = 1554 \text{ }^\circ\text{C}$). Z metodo DSC določamo temperaturo steklastega prehoda, temperaturo kristalizacije, temperaturo tališča, specifično toplotno kapaciteto, talilno entalpijo in reakcijsko toploto, kristalizacijski čas, % kristalizacije, termično stabilnost, oksidacijsko stabilnost, čistost materiala, izvajamo pa lahko tudi proces staranja.



Slika 10: Naprava DSC (60).

V peči je poleg vzorčnega lončka prisoten tudi referenčni lonček. Pri analiziranju vzorca oba lončka segrevamo po enakem in vnaprej določenem temperaturnem programu. Odvisno od vzorca lahko pri določeni vrednosti temperature pride do spremembe sestave ali strukture vzorca. To na termogramu zaznamo kot fazni prehod, ki se lahko kaže kot endotermni ali eksotermni odmik od bazne linije zapisa toplotnega toka v odvisnosti od temperature. Če je fazna sprememba endotermna (steklast prehod, taljenje kristala), je za pretvorbo vzorca potrebna toplota, zato je tok toplote v vzorec večji kot v referenco, medtem ko sta temperaturi vzorca in reference enaki. V območju temperature steklastega

prehoda je sprememba nivoja krivulje proporcionalna spremembi specifične toplote (C_p), ploščina endotermnega pika taljenja snovi pa je enaka talilni entalpiji (ΔH_t). Nasprotno se dogaja v primeru eksotermnega faznega prehoda (kristalizacija), kjer se toplota vzorca sprošča, zato je tok toplote v vzorec manjši kot tok toplote v referenco.

Metoda DSC spada med bolj občutljive metode, saj zazna prisotnost 2 % kristalne snovi v vzorcu. Poleg tega lahko z odsotnostjo pika taljenja kristalne snovi na DSC termogramu potrdimo, da je struktura snovi amorfna (61, 62).

3.3.8 Preizkus raztapljanja

Preizkuse raztapljanja učinkovine smo izvedli po Ph. Eur. 7th Ed., in sicer takoj po pripravi trdnih disperzij ter po 6 tednih shranjevanja pri povišani temperaturi $T = 40\text{ °C}$ in relativni vlagi zraka $RV = 75\%$. Uporabili smo napravo z vesli Erweka DT 6. Za preizkus sproščanja smo kot medij uporabili fosfatni pufer s $pH = 6,8$. Pogoji, pri katerih je potekalo raztapljanje: volumen medija 900 ml, temperatura medija $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ in hitrost vrtenja vesel 50 obratov/min. Test sproščanja smo izvedli za čisto učinkovino, pripravljene trdne disperzije ter za fizikalne zmesi. Natehtali smo maso vzorca, ki je vsebovala enkratni odmerek karvedilola (25 mg). Vzorčili smo ročno z brizgo (10 ml) in iglo. Ob določenih časovnih intervalih (1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) smo odvzeli 10 ml vzorca iz raztopine ter ga filtrirali skozi filter Minisart[®] RC 0,45 μm . Volumna odvzetega medija nismo nadomeščali, zato smo izgubo volumna upoštevali pri izračunu deleža raztopljene učinkovine. Koncentracijo učinkovine v odvzetih vzorcih smo določili z UV-VIS spektrofotometrom, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 332 nm, na osnovi predhodno izdelane umeritvene premice. Absorbanco smo pomerili v kiveti iz kvarčnega stekla in potjo žarka 1,0 cm. Preizkus raztapljanja smo izvedli v dveh paralelah.

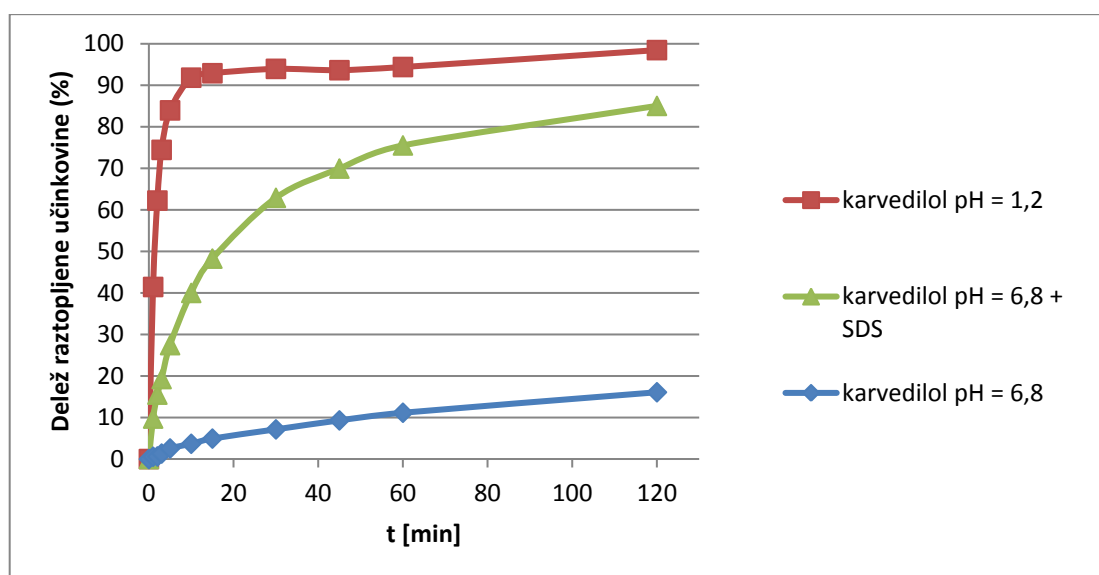
3.3.9 Izdelava umeritvene premice za preizkus raztapljanja učinkovine

Natehtali smo približno 10 mg karvedilola (natančno maso smo si zapisali za nadaljnje računanje) in ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko. V bučko smo z merilnim valjem dodali 10 ml MeOH, da se je natehtana vrednost učinkovine raztopila. Bučko smo za 15 min postavili v ultrazvočno kadičko in nato vsebino dopolnili do oznake s fosfatnim pufrom s $pH = 6,8$. Iz osnovne raztopine smo z uporabo avtomatske pipete pripravili ustrezne redčitve (0,5/10, 2/25, 1/10, 2/10, 3/10, 4/10 in 5/10) ter jih umerili z UV-VIS spektrofotometrom. Naredili smo dve paraleli meritev.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izbira medija za preizkus raztapljanja učinkovine

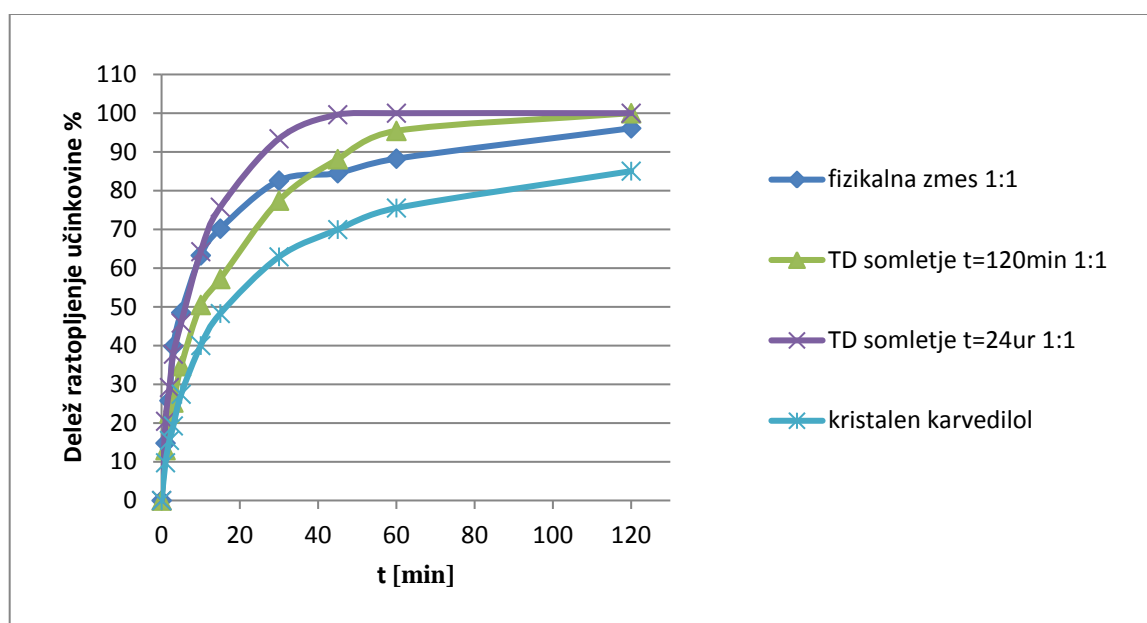
Izhodno obliko učinkovine smo raztapljali v treh različnih medijih (slika 11): v mediju HCl s pH = 1,2, v fosfatnem pufru s pH = 6,8, najprej z dodatkom SDS-a in nato še brez. V vseh primerih smo raztapljali enkratni odmerek učinkovine ($m = 25$ mg) v 900 ml izbranega medija. Volumna odvzetega medija nismo nadomeščali, kar smo upoštevali pri izračunu deleža raztopljenе učinkovine.



Slika 11: Raztapljanje karvedilola v treh različnih medijih ($m = 25$ mg, $V = 900$ ml).

Raztapljanje je bilo najhitrejše v kislem mediju. Nekoliko počasneje se je učinkovina raztapljala v fosfatnem pufru s pH = 6,8 z dodatkom površinsko aktivne snovi SDS (0,5 g/100 ml) najslabše pa v samem fosfatnem pufru s pH = 6,8. Ta ugotovitev je skladna s pH odvisno topnostjo karvedilola, ki jo navaja literatura, saj je karvedilol bistveno bolj topen v kislem kot pa v nevtralnem mediju (52). Glede na dobljene rezultate smo se odločili, da bomo za nadaljnje raztapljanje karvedilola iz pripravljenih TD in fizikalnih zmesi kot medij uporabili fosfatni pufer s pH = 6,8. V mediju z nevtralnim pH-jem je bil karvedilol zelo slabo topen, zato nam ta medij omogoča bistveno boljšo primerjavo raztapljanja učinkovine iz pripravljenih TD in fizikalnih zmesi takoj po izdelavi vzorcev, kot tudi po 6 tednih hranjenja le teh pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti zraka. Kot medija nismo izbrali fosfatnega pufra z dodatkom površinsko aktivne snovi SDS, ker ravno tako kot kisli medij ne omogoča diskriminatorne primerjave raztapljanja karvedilola

iz TD in fizikalnih zmesi. Dodatek površinsko aktivne snovi v medij zelo izboljša topnost kristalnega karvedilola, saj je to ena od metod za izboljšanje topnosti slabo topnih učinkovin. Na sliki 12 lahko vidimo, kako je dodatek SDS-a v fosfatni medij izboljšal raztapljanje izhodnega karvedilola in karvedilola iz fizikalne zmesi. Profila raztapljanja karvedilola iz slednjih dveh vzorcev sta primerljiva profiloma raztapljanja ZU iz izbranih dveh trdnih disperzij. Po 120 min raztapljanju se je v fosfatnem pufru z dodatkom SDS-a raztopilo 85,0 % kristalnega karvedilola. V primeru raztapljanja učinkovine samo v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$ je delež znašal zgolj 16,1 %. Z izdelavo fizikalne zmesi v masnem razmerju 1 : 1 se je končni delež raztopljene učinkovine po 120 min raztapljanju v fosfatnem pufru z dodatkom SDS-a dvignil na 96,1 %.



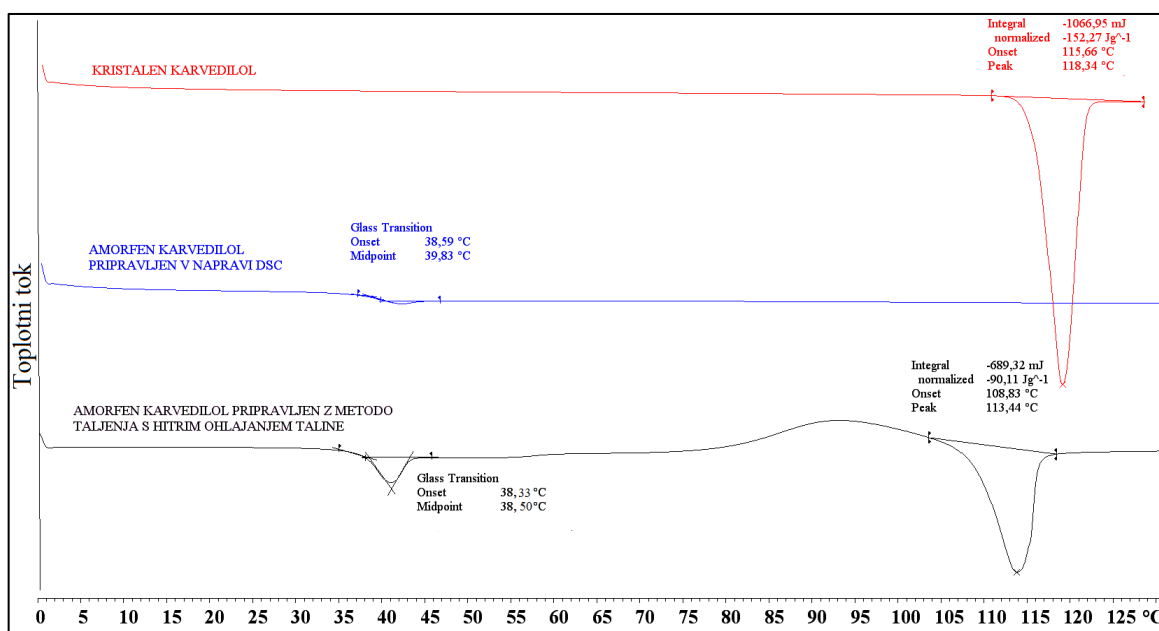
Slika 12: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola, karvedilola iz pripravljene fizikalne zmesi in izbranih dveh TD, pripravljenih z metodo somletja, v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$ z dodatkom SDS-a.

4.2 Maksimalna topnost učinkovine v fosfatnem pufru

Ker nas je zanimala vrednost ravnotežne topnosti učinkovine v pufru s $\text{pH} = 6,8$, smo pripravili nasičene raztopine učinkovine v fosfatnem pufru. Pripravljene raztopine smo pustili na stresalniku pri sobni temperaturi 24 ur ter po tem času izmerili koncentracije raztopljene učinkovine v izbranem mediju. Ugotovili smo, da znaša vrednost ravnotežne topnosti učinkovine v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$ 28,6 mg/l, kar je v skladu s podatki iz literature (52).

4.3 Analiza izhodne kristalne in amorfne oblike učinkovine

Izvedli smo DSC analizo izhodne kristalne oblike karvedilola, ki smo jo uporabili za izdelavo trdnih disperzij in amorfne oblike učinkovine. Amorfno obliko karvedilola smo pripravili z ohlavitvijo taline izhodnega karvedilola v napravi DSC ter z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline v tekočem dušiku. Rezultata DSC analize sta prikazana na sliki 13. Izvedli smo tudi preizkus raztapljanja za izhodno kristalno učinkovino in amorfno obliko karvedilola pripravljeno z metodo hitrega ohlajanja v tekočem dušiku. Amorfno učinkovino smo raztapljali v fosfatnem pufru s pH = 6,8 iz fizikalnih zmesi s Syloidom 244 FP, saj je profil raztapljanja same amorfne učinkovine enak ali pa celo slabši kot profil raztapljanja izhodne kristalne učinkovine. Razlog za to je temperatura medija, v katerem poteka raztapljanje, saj je le ta zelo blizu temperaturi steklastega prehoda amorfne karvedilola. Pri temperaturi 37 °C pride namreč do pretvorbe amorfne učinkovine v podhlajeno talino, s tem pa se zmanjša površina, ki je na voljo za raztapljanje (55, 29). Varsha in sodelavci so omenjeno teorijo obrazložili s študijo entalpije relaksacije amorfne karvedilola, ki so ga izpostavili staranju pri naslednjih pogojih: T = 30 °C in RV = 65 %. V različnih časovnih točkah (na začetku, po 2, 4, 8 in 16 urah) so zabeležili porast endotermnega vrha na DSC diagramu s časom staranja, na račun migriranja molekul proti stabilnejši kristalni obliki preko podhlajene taline (29).

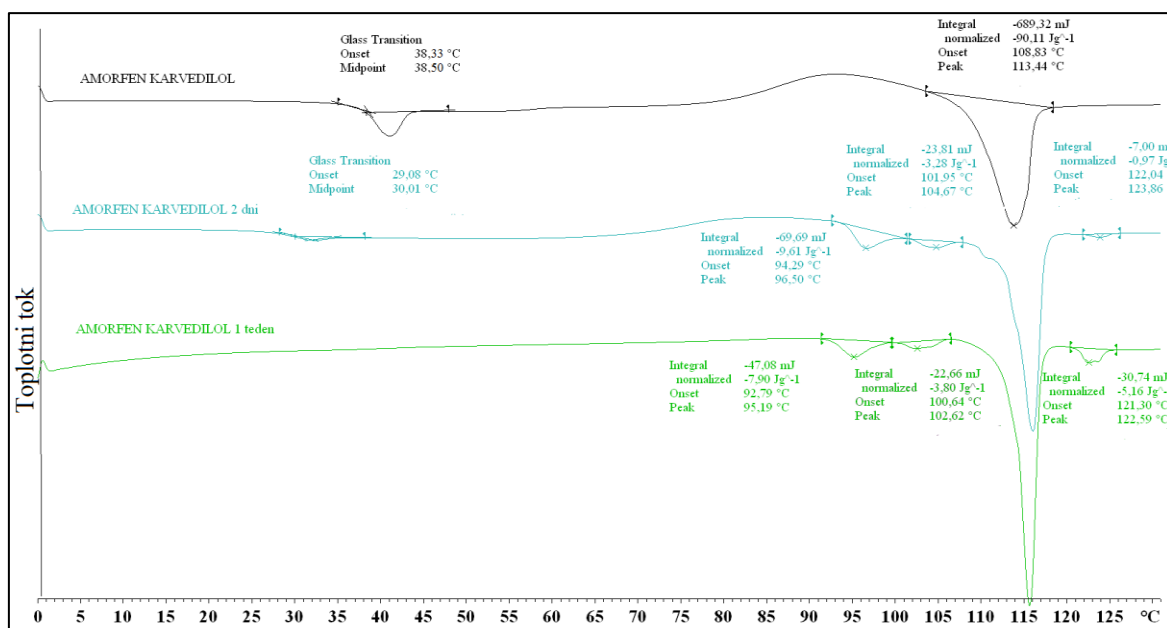


Slika 13: DSC krivulja izhodnega kristalnega karvedilola, amorfnega karvedilola pripravljenege v napravi DSC in amorfnega karvedilola pripravljenege z metodo taljenja s sledečim hitrim ohlajanjem taline v tekočem dušiku.

DSC krivulja na sliki 13, ki smo jo posneli za izhodno obliko kristalnega karvedilola izkazuje oster endotermni vrh pri temperaturi 115,7 °C, ki predstavlja temperaturo tališča (T_m) kristalne oblike II. Za amorfno učinkovino je značilna temperatura steklastega prehoda (T_g). Izhodno kristalno obliko učinkovine smo najprej segreli na temperaturo, višjo od T_m učinkovine. Po segrevanju smo učinkovino hitro ohladili na temperaturo nižjo od vrednosti temperature steklastega prehoda. Pri tej temperaturi smo učinkovino pustili hladiti približno 5 min. Po procesu ohlajanja smo učinkovino ponovno segreli (63). Dobili smo DSC krivuljo (krivulja amorfen karvedilol pripravljen v napravi DSC), iz katere smo določili vrednost $T_g = 39,8$ °C. Dobljeni vrednosti temperature tališča in temperature steklastega prehoda karvedilola sta skladni s podatki iz literature (55). Z metodo taljenja kristalne učinkovine s sledečim hitrim ohlajanjem taline v tekočem dušiku smo uspeli pripraviti amorfen karvedilol, kar vidimo po prisotni temperaturi steklastega prehoda ($T_g = 38,5$ °C) na DSC krivulji. Vzorec ohlajen v tekočem dušiku izkazuje poleg steklastega prehoda rekristalizacijski vrh pri približno 85 °C. Glede na vrednost temperature tališča ($T_m = 108,8$ °C) nastale kristalne oblike, je lahko nastala polimorfna oblika IV. Obstaja tudi verjetnost, da je nastala polimorfna oblika II, z nižjo vrednostjo T_m , zaradi zmanjšanja velikosti delcev tekom procesa rekristalizacije amorfnega karvedilola.

4.4 Analiza fizikalne stabilnosti amorfnе oblike učinkovine pripravljene z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline

Preverili smo fizikalno stabilnost amorfnega karvedilola, pripravljenega z metodo taljenja s sledečim hitrim ohlajanjem taline v tekočem dušiku. V komori s povišanima vrednostima temperature in relativne vlažnosti zraka smo shranili amorfno učinkovino ter amorfni fizikalni zmesi z masnima razmerjema 1 : 1 in 1 : 2. Fizikalni zmesi smo pripravili z mešanjem amorfnе učinkovine, izdelane z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline in pomožne snovi Syloida 244 FP. Vzorce smo analizirali takoj po izdelavi (čas 0), po 2 dneh in po 1 tednu hranjenja v komori pri $T = 40$ °C in $RV = 75$ %.

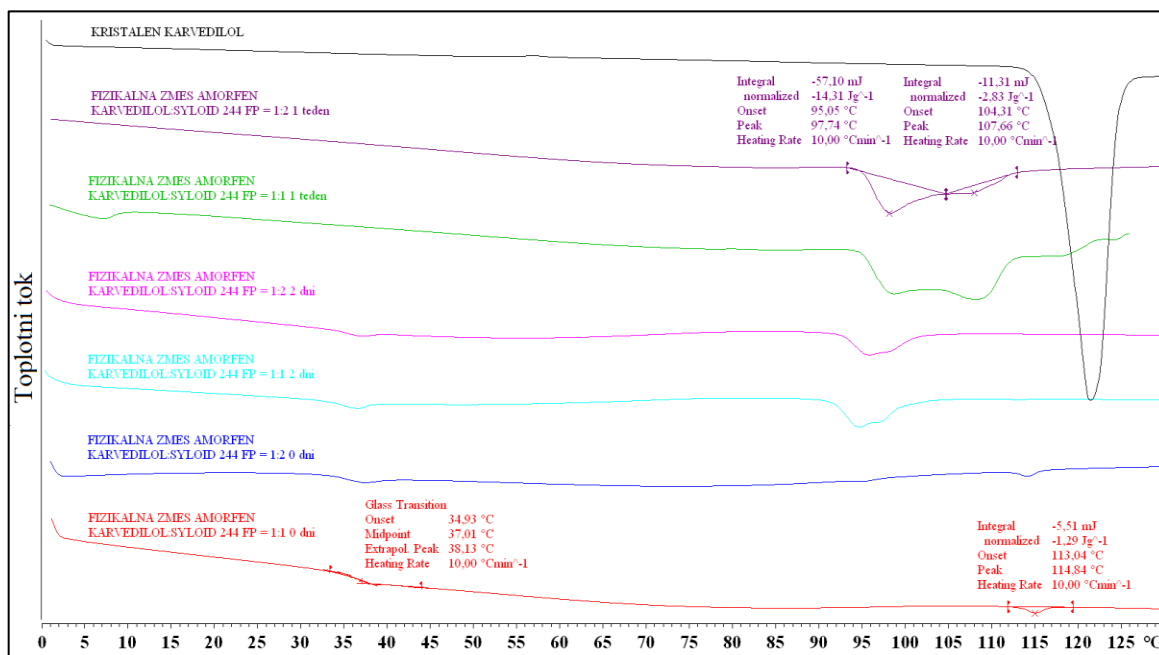


Slika 14: DSC krivulje amorfnega karvedilola v času 0, po 2 dneh in po 1 tednu hranjenja pri $T = 40\text{ °C}$ in $RV = 75\%$.

Sama amorfna oblika karvedilola, pripravljena z metodo hitrega ohlajanja taline, je bila zelo nestabilna, saj je le ta zelo hitro prešla v kristalno obliko (deloma že po 2 dneh, popolnoma po 1 tednu). Iz krivulj na sliki 14 lahko vidimo, da se je s časom staranja povečal delež kristalne oblike II na račun zmanjšanja deleža amorfne oblike. Na krivulji amorfnega karvedilola shranjenega 2 dni v komori vidimo eksotermno relaksacijo med 70 °C in 90 °C , ki ji sledi endotermni vrh taljenja z vrednostjo $94,3\text{ °C}$. Ta dva odziva se skladata s podatki iz literature za DSC krivuljo polimorfne oblike karvedilola III, ki jo lahko pripravimo tudi s kristalizacijo iz vode (64, 65). Poleg omenjenih polimorfnih oblik karvedilola sta glede na vrednosti temperature tališča nastali tudi oblika I (temperatura tališča $123\text{--}126\text{ °C}$) in oblika IV (temperatura tališča 104 °C) (54). Po 1 tednu izpostavitve amorfnega karvedilola pogojem pospešenega staranja so bili odzivi nastalih polimorfnih oblik podobni, z razliko v odsotni eksotermni relaksaciji med 70 °C in 90 °C .

Po dveh dneh shranjevanja vzorca pri pogojih staranja je prišlo do padca temperature steklastega prehoda amorfne učinkovine na vrednost $30,0\text{ °C}$. Znižanje vrednosti T_g je najverjetneje povzročila adsorbirana vlaga, ki je zaradi učinka mehčala povečala mobilnost molekul (43).

Želeli smo preveriti, kakšen vpliv ima prisotnost Syloida 244 FP na fizikalno stabilnost nestabilne amorfne učinkovine. Amorfni karvedilol, pripravljen z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline s tekočim dušikom, smo uporabili za izdelavo fizikalnih zmesi v dveh različnih masnih razmerjih (1 : 1 in 1 : 2). Le te smo pripravili z mešanjem komponent v pateni. Pripravljene fizikalne zmesi smo ravno tako kot samo amorfno učinkovino izpostavili pogojem pospešenega staranja. Opravili smo DSC analizo takoj po izdelavi (čas 0), po 2 dneh in po 1 tednu hranjenja vzorcev v komori.

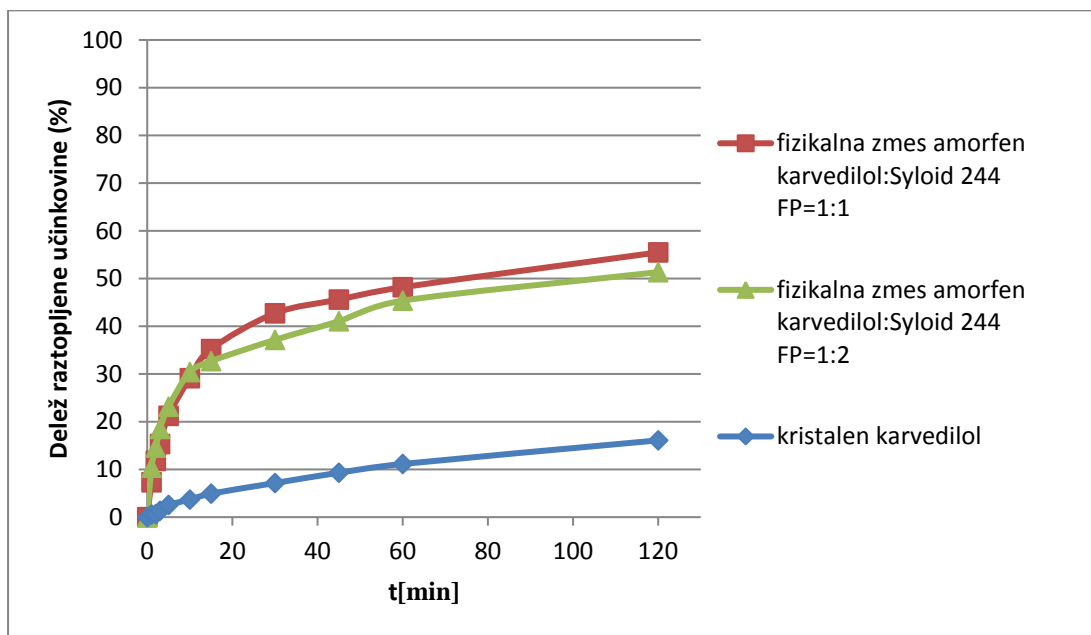


Slika 15: DSC krivulja izhodne kristalne učinkovine in krivulje fizikalnih zmesi amorfnega karvedilola in Syloida 244 FP v razmerju 1 : 1 in 1 : 2 v času 0, po 2 dneh in po 1 tednu hranjenja pri T = 40 °C in RV = 75 %.

Iz krivulj na sliki 15 vidimo, da je bil karvedilol v fizikalnih zmesih 1 : 1 in 1 : 2 takoj po izdelavi delno v amorfni obliki ter delno v kristalni obliki II. Po hranjenju obeh fizikalnih zmesi 2 dni v komori pri povišani T in RV, je bila v obeh primerih zmesi še vedno delno prisotna amorfna oblika učinkovine, poleg nje pa smo zaznali tudi polimorfno obliko III (temperatura tališča 92-95 °C). Do popolne pretvorbe amorfne oblike v kristalno je prišlo po 1 tednu hranjenja zmesi v komori. Glede na vrednosti T_m smo sklepali, da sta nastali kristalna oblika III (temperatura tališča 92-95 °C) in oblika IV (temperatura tališča 104 °C) (54). Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da prisotnost Syloida 244 FP ne upočasni kristalizacije učinkovine. Za razliko od staranja same amorfne ZU (slika 14), v primeru staranja fizikalnih zmesi ni prišlo do nastanka polimorfne oblike I in polimorfne oblike II.

Iz tega lahko sklepamo, da ima prisotnost Syloida 244 FP vpliv na pretvorbo amorfne oblike v kristalno.

Opravili smo tudi preskus raztapljanja amorfne učinkovine iz obeh fizikalnih zmesi. Oba vzorca smo raztapljali takoj po izdelavi zmesi, medtem ko raztapljanja nismo ponovili po 2 dneh in 1 tednu hranjena vzorcev v komori, saj smo na podlagi DSC analize sklepali, da se je zaradi pretvorbe amorfne učinkovine nazaj v kristalno obliko raztapljanje zgolj še poslabšalo.

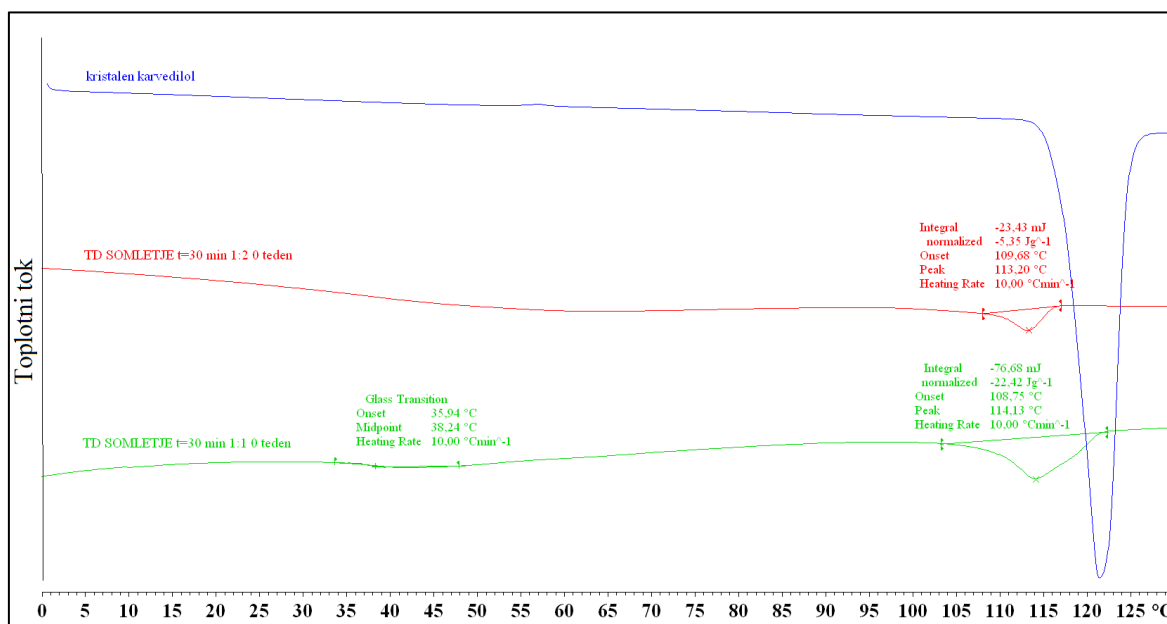


Slika 16: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in fizikalnih zmesi amorfnega karvedilola s Syloidom 244 FP, v času 0, v fosfatnem pufru s pH = 6,8.

Na sliki 16 lahko vidimo primerjavo raztapljanja kristalne oblike karvedilola in amorfne učinkovine iz izdelanih dveh fizikalnih zmesi. Po izdelavi fizikalne zmesi z amorfim karvedilolom se je delež raztopljene učinkovine v primerjavi z izhodno kristalno obliko povečal. Povečala se je tudi hitrost raztapljanja. Izboljšanje raztapljanja ni bilo zelo veliko, saj je bil v amorfni obliki le del učinkovine, del pa se je še vedno nahajal v kristalni obliki, kar je razvidno iz DSC krivulj na sliki 15. Opazimo lahko tudi, da uporabljen delež pomožne snovi ni imel vpliva na izboljšanje raztapljanja, saj sta krivulji v obeh primerih zelo podobni. Razlika v deležu raztopljene učinkovine med fizikalno zmesjo 1 : 1 in 1 : 2 je lahko posledica eksperimentalne napake.

4.5 Analiza trdnih disperzij pripravljenih z metodo somletja učinkovine in pomožne snovi

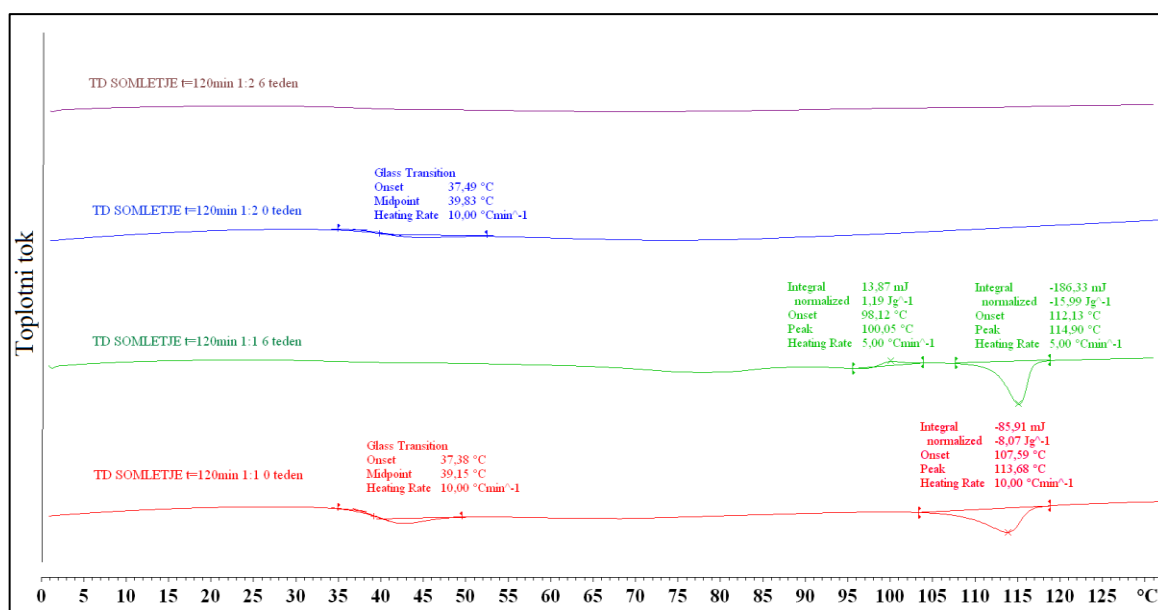
Pripravljene fizikalne zmesi karvedilola in Syloida 244 FP smo v dveh različnih masnih razmerjih (1 : 1 in 1 : 2) mleli različno dolgo časa (30 min, 120 min, 24 ur), saj nas je zanimalo, ali lahko na ta način izdelamo popolno amorfno karvedilol. Poleg tega nas je zanimala tudi stabilnost amorfne učinkovine glede na delež pomožne snovi v vzorcu. V ta namen smo za vse vzorce, razen za 30 min mletje, izvedli DSC analizo vzorcev takoj po izdelavi ter po 6 tednih hranjenja pri povišani temperaturi (40 °C) in relativni vlagi (75 %). Takoj po izdelavi TD in po 6 tednih hranjenja, pri pogojih pospešenega staranja, smo opravili tudi preizkus raztapljanja.



Slika 17: DSC krivulje TD pripravljenih z metodo somletja (t = 30 min) v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, v času 0.

Iz DSC termograma na sliki 17 lahko vidimo, da s 30 min mletjem fizikalne zmesi karvedilola in Syloida 244 FP, tako v masnem razmerju 1 : 1 kot 1 : 2, nismo uspeli pridobiti popolnoma amorfne oblike učinkovine. Na DSC krivuljah sta bila v obeh primerih trdnih disperzij prisotna endotermna vrhova taljenja kristalne oblike II, z vrednostma $T_m = 108,8$ °C za TD 1 : 1 in $T_m = 109,7$ °C za TD 1 : 2. Vrednosti obeh izmerjenih temperatur tališča sta bili nekoliko nižji, kot velja za kristalno obliko II (temperatura tališča 114-115 °C). Najverjetneje so za to vzrok delci manjših velikosti, ki nastanejo pri mletju. V primeru trdne disperzije z masnim razmerjem 1 : 1 je amorfiziral

manjši delež učinkovine, kot v primeru trdne disperzije z razmerjem 1 : 2. Če primerjamo DSC krivulji na sliki 17, vidimo, da je endotermni vrh taljenja kristalne oblike večji v primeru TD 1 : 1, višja pa je tudi talilna entalpija (5,4 J/g za TD 1 : 2 in 22,4 J/g za TD 1 : 1). Trdni disperziji, pripravljene s 30 min mletjem učinkovine s pomožno snovjo, nismo uporabili za nadaljnjo analizo fizikalne stabilnosti, zaradi prisotnosti še vedno velikega deleža kristalne oblike karvedilola v vzorcu.

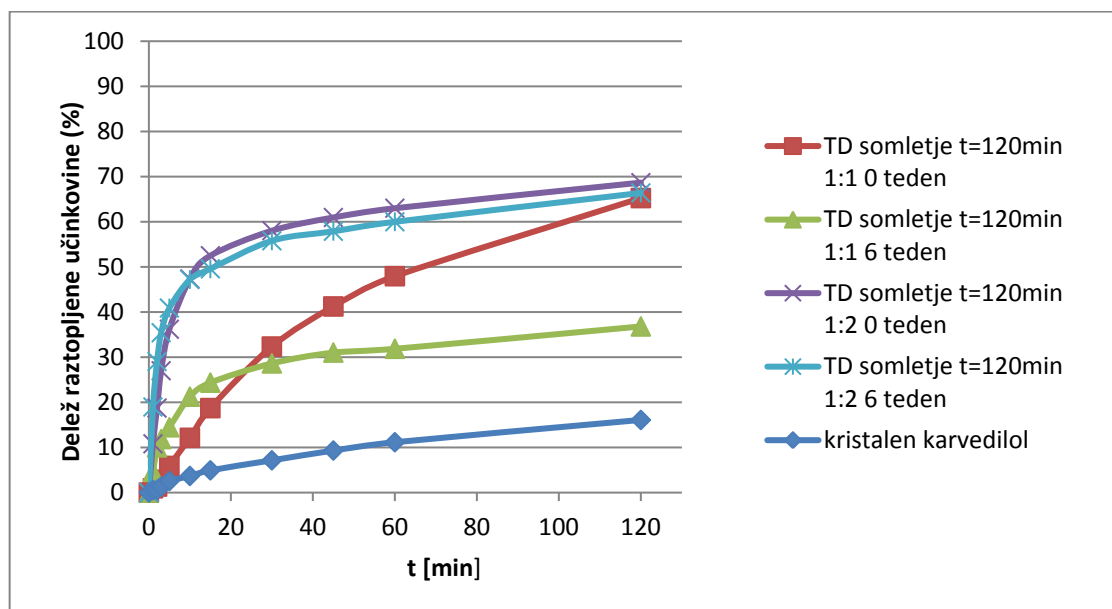


Slika 18: DSC krivulje TD, pripravljenih z metodo somletja (t = 120 min) v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, v času 0 ter po 6 tednih hranjenja vzorcev pri T = 40 °C in RV = 75 %.

Slika 18 predstavlja DSC krivulje trdnih disperzij, ki smo jih pripravili s 120 min mletjem zmesi karvedilola in Syloida 244 FP v dveh različnih masnih razmerjih (1 : 1 in 1 : 2), pred izpostavitvijo vzorcev povišani temperaturi in vlagi ter po 6 tednih hranjenja pri pogoju T = 40 °C in RV = 75 %. Iz DSC analize lahko vidimo, da nam je s 120 min mletjem učinkovine s pomožno snovjo v razmerju 1 : 1 uspelo pripraviti amorfno obliko karvedilola, kar potrjuje prisotnost temperature steklastega prehoda (T_g = 39,2 °C). Amorfizacija ni bila popolna, saj je na DSC krivulji vzorca v času 0 viden endotermni vrh taljenja kristalne oblike II karvedilola. Ta vrh se je po 6 tednih shranjevanja vzorca pri povišani temperaturi in vlagi še dodatno povečal, na račun povišanja deleža kristalne oblike učinkovine. Prišlo je do porasta vrednosti talilne entalpije. Ta pretvorba dokazuje, da TD, pripravljena z metodo somletja zmesi učinkovine in pomožne snovi z masnim razmerjem 1 : 1, ni bila fizikalno stabilna. Vzrok nestabilnosti je bila nepopolna amorfizacija in s tem povezana zaostala kristalna jedra učinkovine v zmesi. Z metodo

somletja učinkovine in pomožne snovi v razmerju 1 : 2 pa nam je uspelo pripraviti popolnoma amorfno učinkovino, kar lahko vidimo iz DSC krivulje, na kateri endotermni vrh taljenja kristalne oblike ni prisoten. Poleg tega je bila amorfna oblika učinkovine, pripravljena z mletjem zmesi v masnem razmerju 1 : 2 stabilna, saj po 6 tednih shranjevanja pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $\text{RV} = 75\%$ ni prišlo do rekristalizacije karvedilola. Vzrok temu je bil večji delež pomožne snovi v zmesi in s tem večje število por na površini Syloida 244 FP v kombinaciji z ustreznim intervalom mletja. Učinkovina se je zato bolj učinkovito adsorbirala na površino oz. v pore, stabilnost izdelane TD pa je bila večja. Na DSC krivulji vzorca mletega v razmerju 1 : 2 in shranjenega 6 tednov pri povišanih pogojih, bi pričakovali prisotnost T_g , saj signala, značilnega za kristalno obliko učinkovine, ni opaziti. Odsotnost T_g je najverjetneje posledica prisotnosti velike količine pomožne snovi, ki prikrije termodinamski prehod, kar so predpostavili že Varsha B. in sodelavci, ki so raziskovali stabilnost terciarnega sistema (karvedilol, PVP ter Aerosil^R 200) trdnih disperzij, pripravljenih z metodo sušenja z razprševanjem. Kot v našem primeru temperature steklastega prehoda, značilnega za amorfno obliko, na DSC krivulji vzorcev niso zaslediti (29).

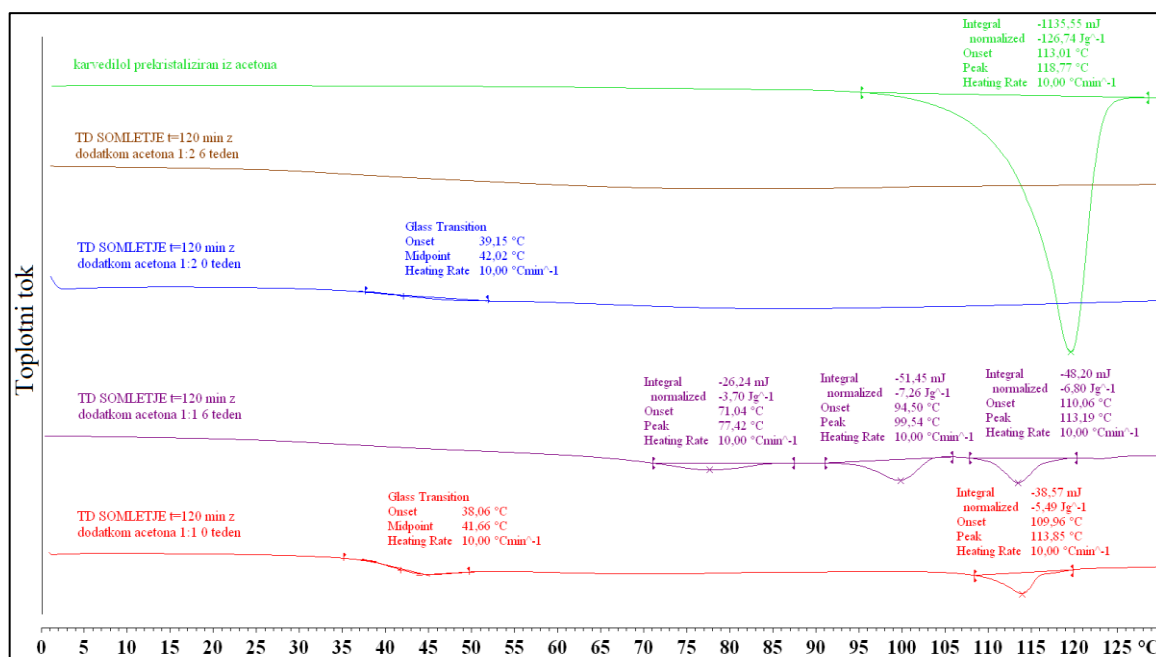
Pripravljene mlete vzorce trdnih disperzij smo raztapljali v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$.



Slika 19: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in TD, pripravljenih z metodo somletja ($t = 120\text{ min}$) v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$, ob času 0 in po 6 tednih hranjenja pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $\text{RV} = 75\%$.

Slika 19 prikazuje primerjavo raztapljanja kristalne oblike karvedilola z raztapljanjem učinkovine iz trdnih disperzij, pripravljenih z metodo somletja v dveh različnih masnih razmerjih, v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$, ob času 0 ter po 6 tednih hranjenja vzorcev pri pogoju $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $\text{RV} = 75\%$. Iz diagrama sproščanja lahko vidimo, da smo s pripravo TD s 120 min mletjem učinkovine skupaj s pomožno snovjo izboljšali hitrost in obseg raztapljanja učinkovine v primerjavi s kristalno obliko učinkovine (v 120 min se je raztopilo zgolj 16,1 % izhodnega karvedilola). Izboljšanje hitrosti raztapljanja učinkovine je bilo bistveno večje v primeru, ko smo uporabili večji masni delež pomožne snovi. Že iz DSC krivulje na sliki 18 smo videli, da je bila amorfna oblika učinkovine v TD z višjim masnim deležem pomožne snovi fizikalno stabilna, kar se odraža tudi na profilu raztapljanja. Vidimo lahko, da sta bili hitrost raztapljanja ter delež raztopljene ZU iz vzorca po 6 tednih shranjevanja pri povišani temperaturi in relativni vlagi skoraj identični kot v tednu 0. Razlika v končnem obsegu sproščene učinkovine je znašala le dobra 2 %. Pri mletju ZU z nižjim masnim deležem pomožne snovi nismo uspeli pripraviti popolnoma amorfne učinkovine, zato je bilo tudi raztapljanje karvedilola iz te disperzije slabše in počasnejše, zlasti po 6 tednih, ko se je zaradi fizikalne nestabilnosti povečal delež kristalne oblike učinkovine. Končni delež raztopljenega karvedilola se je znižal iz 65,2 %, za raztapljanje TD 1 : 1 v tednu 0, na vrednost 36,8 %.

Kot smo omenili že v uvodu, ima velik vpliv na stabilnost amorfne oblike mobilnost molekul v vzorcu. Ker smo želeli preučiti vpliv dodatka topila fizikalni zmesi karvedilola in Syloida 244 FP na nastanek amorfne učinkovine in nadaljnjo stabilnost, smo pred začetkom mletja zmesi dodali aceton ($100\text{ }\mu\text{L}/200\text{ mg}$ suhe snovi) in mleli 120 min.

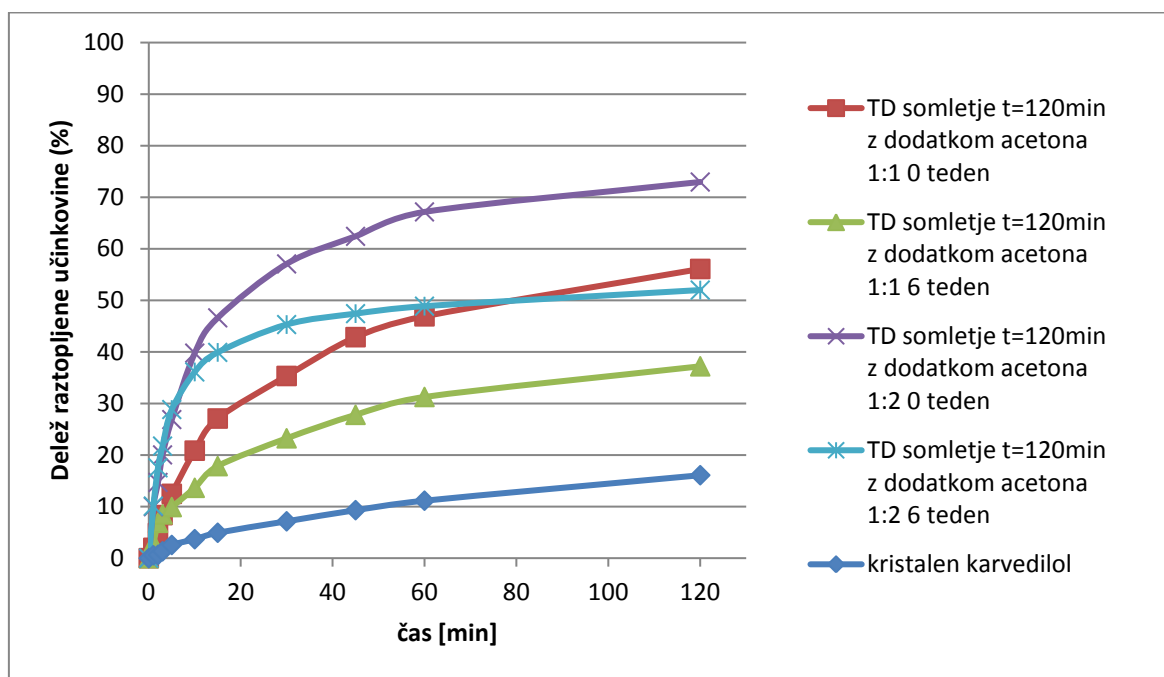


Slika 20: DSC krivulje TD, pripravljenih z metodo somletja ($t = 120$ min) v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, z dodatkom acetona, v času 0 ter po 6 tednih hranjenja vzorcev pri $T = 40$ °C in $RV = 75$ %.

Iz DSC krivulj na sliki 20 lahko vidimo, da podobno kot v primeru mletja brez dodatka topila, z mletjem fizikalne zmesi z manjšim deležem pomožne snovi nismo uspeli pridobiti popolnoma amorfne učinkovine. Na DSC krivulji TD 1 : 1 0 teden je poleg temperature steklastega prehoda prisoten endotermni vrh taljenja kristalne oblike karvedilola II, z vrednostjo $T_m = 110$ °C. V primeru mletja fizikalne zmesi z večjim masnim deležem pomožne snovi pa je nastala popolnoma amorfna oblika karvedilola. Po 6 tednih izpostavitve vzorcev stresnim pogojem je bila kot v primeru mletja brez dodatka topila učinkovina v trdni disperziji, z višjim masnim deležem pomožne snovi (TD 1 : 2) še vedno popolnoma amorfna. To je dokaz, da je bila amorfna oblika učinkovine v TD, pripravljene z višjim masnim deležem pomožne snovi, fizikalno stabilna. V TD z razmerjem 1 : 1 pa je bila učinkovina nestabilna, kar smo ugotovili že pri mletju brez dodatka topila. Po 6 tednih izpostavitve vzorcev stresnim pogojem, je amorfna oblika učinkovine rekristalizirala. Nastala je zmes treh kristalnih oblik karvedilola. Na podlagi vrednosti T_m smo sklepali, da so nastale kristalna oblika II ($T_m = 110,1$ °C), oblika III ($T_m = 94,5$ °C) in oblika VII ($T_m = 71,0$ °C) (54). Glede na rezultate DSC analize lahko zaključimo, da kljub dodatku topila, ki naj bi izboljšal mobilnost molekul (kot je to pri tvorbi kokristalov (66)) ter s tem omogočal lažjo pretvorbo kristalne oblike v amorfno in hkrati povečal možnost difuzije molekul v pore pomožne snovi, v primeru TD 1 : 1 ni prišlo do nastanka popolnoma

amorfne učinkovine. Po drugi strani pa lahko zaostalo topilo deluje kot mehčalo in vpliva na hitrejšo rekristalizacijo ZU. V primeru TD, izdelane z večjim masnim deležem PS, je bila učinkovina po 6 tednih še vedno popolnoma amorfna, kljub možnemu zaostanku topila.

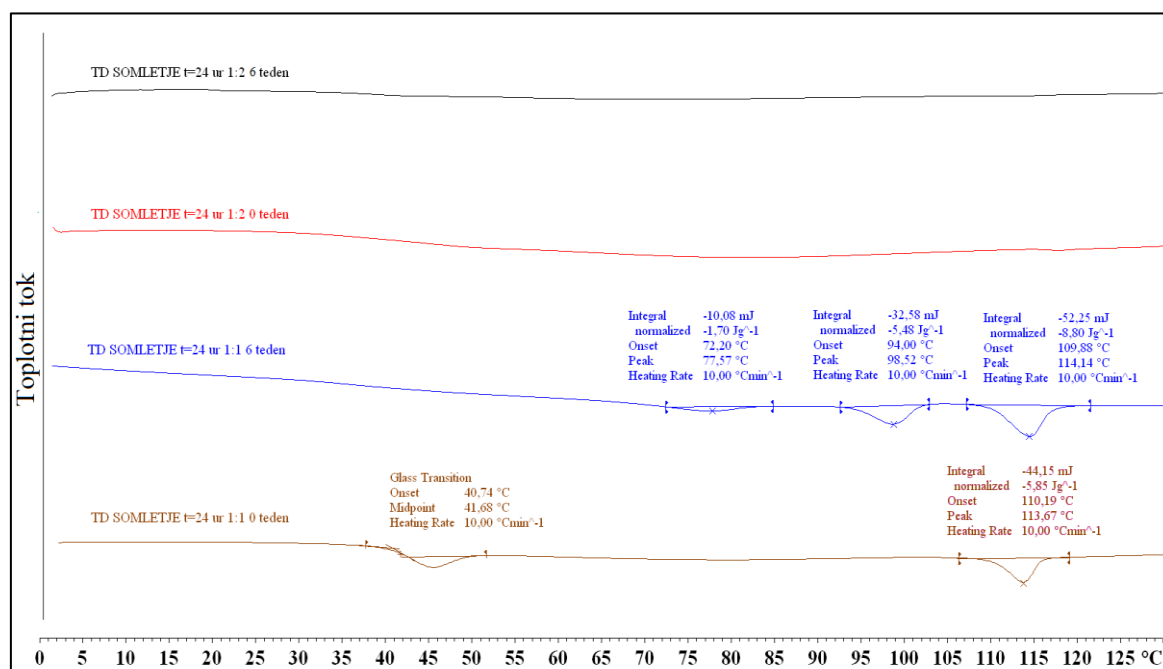
Ker smo želeli preveriti vpliv acetona na kristalne pretvorbe karvedilola, smo izvedli prekristalizacijo učinkovine iz acetona. Učinkovini smo dodali količino acetona, v kateri se je vsa raztopila in pustili čez noč, da je topilo izhlapelo. Nastale kristale smo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (slika 20, krivulja karvedilol prekristaliziran iz acetona). Glede na vrednost T_m , iz rezultatov te analize, smo ugotovili, da nastane s prekristalizacijo učinkovine iz acetona zgolj oblika II, kar je navedeno tudi v literaturi (52). Za potrditev izdelave amorfne oblike karvedilola in njegove stabilnosti, smo tudi v primeru somletja z dodatkom topila pripravljene TD raztapljali v fosfatnem pufri s pH = 6,8.



Slika 21: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in TD, pripravljenih z metodo somletja ($t = 120 \text{ min}$) v razmerju 1 : 1 ter 1 : 2, z dodatkom acetona, v fosfatnem pufri s pH = 6,8, ob času 0 in po 6 tednih hranjenja pri $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ in $RV = 75 \%$.

Če primerjamo raztapljanje učinkovine iz trdnih disperzij z raztapljanjem izhodne kristalne oblike učinkovine v tednu 0 (slika 21), lahko rečemo, da nam je s pripravo trdne disperzije uspelo izboljšati hitrost raztapljanja in končni delež raztopljenega karvedilola. Izboljšanje je bilo bistveno boljše v primeru disperzije, ki je vsebovala višji masni delež Syloida 244

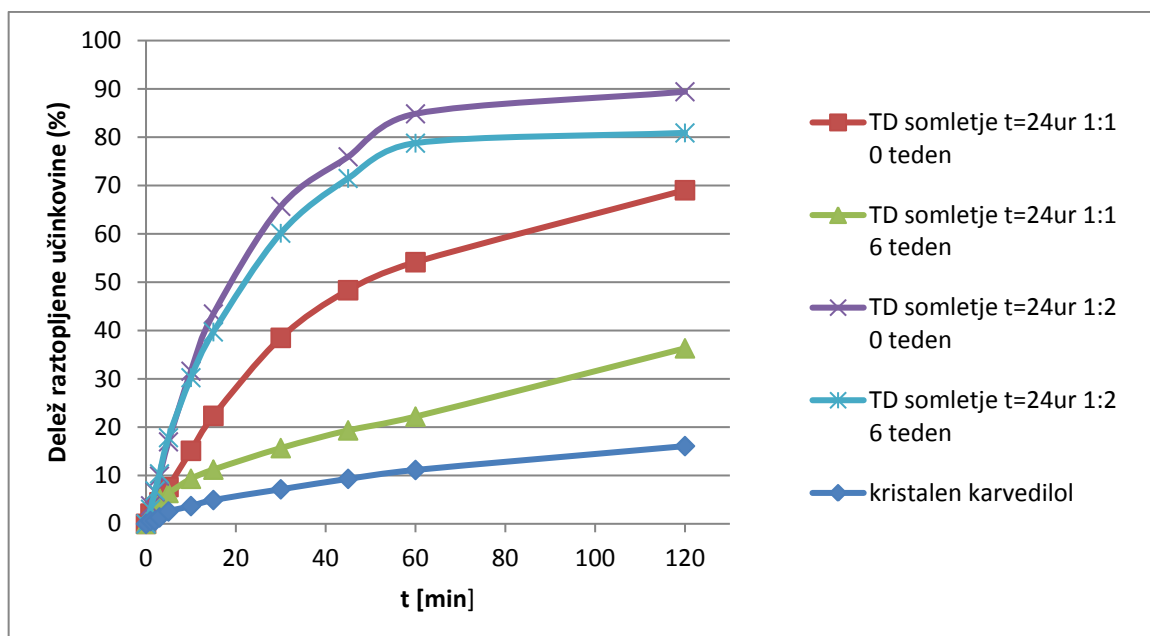
FP, kar smo ugotovili že pri mletju učinkovine s pomožno snovjo brez dodatka topila, saj je v tem primeru nastala popolnoma amorfna učinkovina. Po 6 tednih hranjenja vzorcev pri pogoju $T = 40\text{ °C}$ in $RV = 75\%$ sta se tako končni obseg kot sama hitrost raztapljanja učinkovine iz trdnih disperzij z nižjim in višjim masnim deležem Syloida 244 FP poslabšala. Končni delež raztopljene učinkovine se je po 120 min raztapljanju trdnih disperzij (1 : 1 in 1 : 2) zmanjšal za dobrih 20 % glede na končni delež raztopljene učinkovine v tednu 0. V primeru TD 1 : 1 je že iz DSC krivulje na sliki 20 vidno, da se je po 6 tednih hranjenja vzorcev pri povišanih pogojih povečal delež kristalne oblike II, poleg tega pa sta dodatno nastali še dve polimorfni obliki karvedilola (oblika III in VII). Slabšega sproščanja karvedilola iz TD z višjim masnim deležem pomožne snovi ne moremo pripisati nastanku kristalne oblike učinkovine, saj na DSC krivulji vzorca po 6 tednih hranjenja pri povišanih pogojih ni videti endotermnega vrha taljenja kristalne oblike.



Slika 22: DSC krivulje TD pripravljenih z metodo somletja ($t = 24$ ur) v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, v času 0 ter po 6 tednih hranjenja vzorcev pri $T = 40\text{ °C}$ in $RV = 75\%$.

Z DSC analizo TD, pripravljenih z metodo somletja ($t = 24$ h) karvedilola in Syloida 244 FP, smo dobili podobne rezultate kot v primeru somletja, ki je trajalo 120 min. Kljub podaljšanemu času mletja nam v primeru TD z nižjim masnim deležem PS ni uspelo pripraviti popolnoma amorfne učinkovine, na kar nakazuje prisotnost endotermnega vrha taljenja kristalne oblike II karvedilola ($T_m = 110,2\text{ °C}$) (slika 22). Z mletjem fizikalne zmesi v razmerju 1 : 2 pa smo dobili TD, ki je vsebovala popolnoma amorfni karvedilol, ki

je ostal stabilen tudi po 6 tednih hranjenja pri pogojih staranja. Kot v primeru somletja, ki je potekalo krajši čas, je bila tudi tu TD z razmerjem 1 : 1 fizikalno nestabilna, saj je prišlo do rekristalizacije karvedilola. Nastala je zmes treh kristalnih oblik učinkovine. Glede na vrednosti T_m smo sklepali, da so nastale naslednje polimorfne oblike karvedilola: oblika II ($T_m = 109,9\text{ }^\circ\text{C}$), oblika III ($T_m = 94,0\text{ }^\circ\text{C}$) in oblika VII ($T_m = 72,2\text{ }^\circ\text{C}$) (54).



Slika 23: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in TD, pripravljenih z metodo somletja ($t = 24$ ur) v razmerju 1 : 1 ter 1 : 2, v fosfatnem pufru s $\text{pH} = 6,8$, ob času 0 in po 6 tednih hranjenja vzorcev pri $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$ in $\text{RV} = 75\text{ }%$.

Slika 23 prikazuje primerjavo profilov raztapljanja karvedilola iz trdnih disperzij, pripravljenih z metodo somletja ($t = 24$ ur) v dveh različnih masnih deležih PS, takoj po izdelavi TD in po 6 tednih hranjenja vzorcev v komori pri pogojih pospešenega staranja. Obseg in hitrost raztapljanja karvedilola iz TD z nižjim deležem Syloida 244 FP (TD 1 : 1) v času 0 sta bila skoraj identična rezultatom raztapljanja karvedilola iz TD 1 : 1, ki smo jo pripravili z 120 min mletjem. To še dodatno potrjuje, da podaljšani čas mletja fizikalne zmesi z nižjim deležem pomožne snovi ni imel vpliva na nastanek amorfne učinkovine ter da je imel večji vpliv na amorfizacijo ZU in fizikalno stabilnost TD delež uporabljene pomožne snovi. V primerjavi s TD 1 : 2, pripravljeno s 120 min mletjem (končni delež raztopljene učinkovine je znašal 68,7 %), se je s podaljšanjem časa mletja na 24 ur raztopil bistveno višji končni delež karvedilola (89,4 %), hitrost raztapljanja pa je bila nižja. Medtem ko se je v primeru TD 1 : 2 mlete 120 min v 5 min raztopilo 36,2 % učinkovine, je v primeru TD

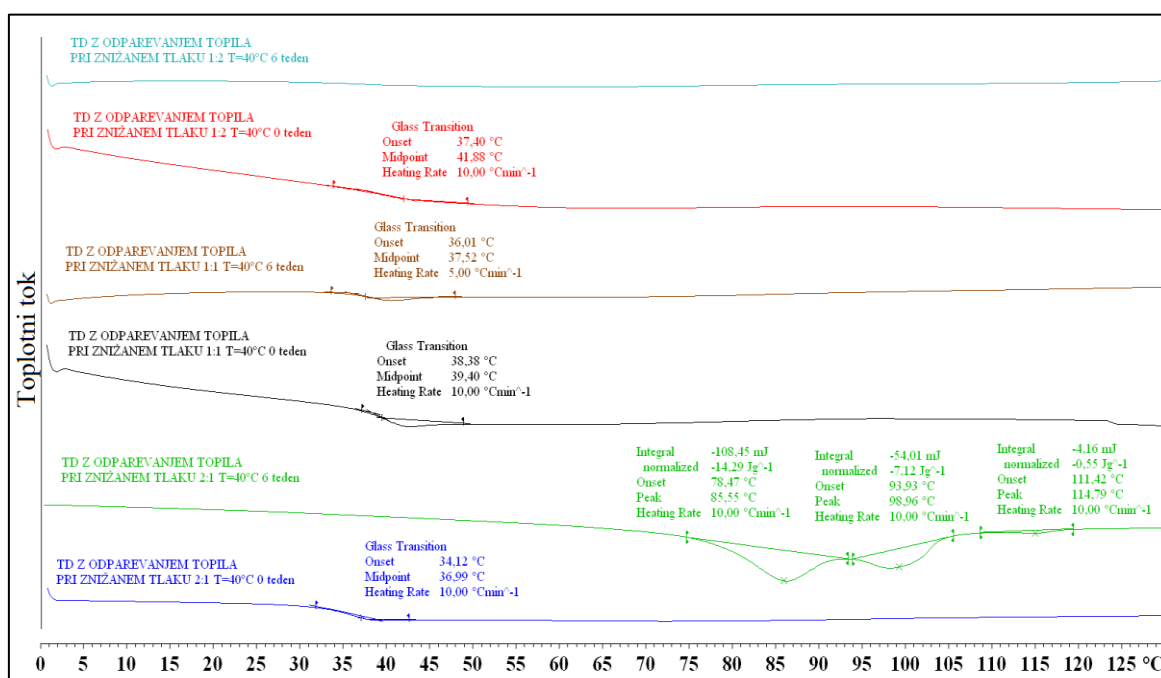
1 : 2 mlete 24 ur delež znašal zgolj 17,0 %. Razlog povišanega končnega obsega raztopljenе učinkovine so lahko bili manjši delci, ki so nastali zaradi daljšega časa mletja. Zmanjšanje hitrosti raztapljanja karvedilola iz TD 1 : 2, s podaljšanjem časa mletja, pa je bila najverjetneje posledica intenzivnejšega polnjenja učinkovine v pore Syloida 244 FP. V primeru podaljšane časa mletja se je učinkovina intenzivneje nalagala v pore, zato je bil za njeno difuzijo iz por potreben daljši čas. Po 6 tednih hranjenja TD 1 : 2 pri pogojih pospešenega staranja se hitrost raztapljanja karvedilola iz TD ni spremenila, končni delež sproščene učinkovine pa se je nekoliko zmanjšal (za 8,5 %).

Iz rezultatov DSC analize vseh mletih vzorcev lahko povzamemo, da je za amorfizacijo in stabilizacijo karvedilola bolj kot podaljšan čas mletja pomemben delež pomožne snovi v TD. To so dokazali tudi Mura in sodelavci pri preiskovanju TD, pripravljenih z mletjem učinkovine glizentida in pomožne snovi polivinilpirolidona. S 30 min mletjem fizikalne zmesi učinkovine in PS z vibracijskim mlinom so izdelali skoraj popolnoma amorfno učinkovino v disperziji, ki je vsebovala višji delež pomožne snovi (44).

4.6 Analiza vzorcev trdnih disperzij pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku

Z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku smo pripravili vzorce TD v treh različnih masnih razmerjih učinkovine in pomožne snovi: 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2. Poleg vpliva masnega deleža na fizikalno stabilnost TD smo želeli preučiti tudi vpliv uporabljene temperature vodne kopeli. Za izdelavo TD smo uporabili temperaturi, 40 °C in 60 °C. Pripravljene vzorce smo enako kot v primeru somletja ovrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo in preizkusom raztapljanja učinkovine takoj po izdelavi (0 teden) ter po 6 tednih hranjenja pri pogoju $T = 40\text{ °C}$ in $RV = 75\%$.

Izdelava trdnih disperzij pri 40 °C:



Slika 24: DSC krivulje TD, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku in $T = 40\text{ °C}$, v razmerju 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2, v času 0 ter po 6 tednih shranjevanja vzorcev pri $T = 40\text{ °C}$ in $RV = 75\%$.

Slika 24 prikazuje DSC krivulje trdnih disperzij, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, v treh različnih masnih razmerjih učinkovine in PS, v času 0 ter po 6 tednih shranjevanja vzorcev pri povišani temperaturi in relativni vlagi. Z izbrano metodo izdelave trdnih disperzij nam je pri izbranih pogojih uspelo pripraviti amorfno obliko karvedilola v vseh treh primerih, kar vidimo po prisotni T_g na DSC krivuljah posameznih disperzij v času 0. Medtem ko je bila amorfna učinkovina v trdni disperziji 1 : 1 in 1 : 2

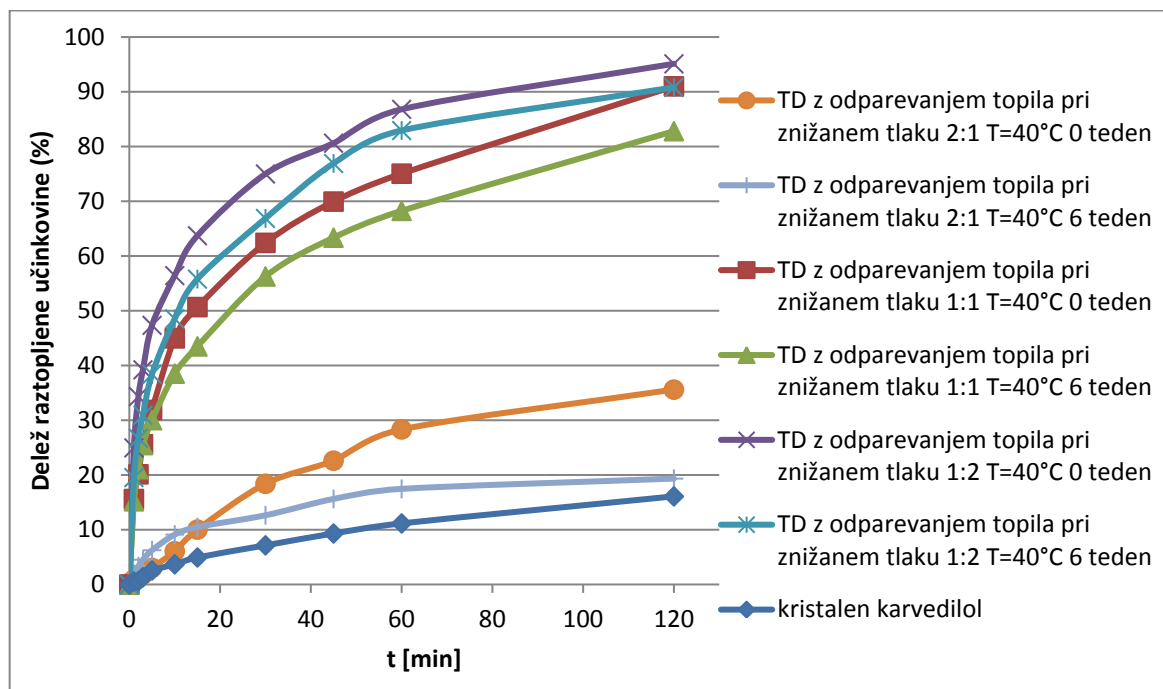
fizikalno stabilna, je v TD z najmanjšim deležem PS prišlo do njene pretvorbe v kristalno obliko. Na DSC krivulji TD 2 : 1 6 teden, smo opazili nastanek treh endotermnih vrhov. Glede na vrednosti T_m smo predpostavili, da sta nastali polimorfna oblika II karvedilola ($T_m = 111,4 \text{ }^\circ\text{C}$) in oblika III ($T_m = 93,9 \text{ }^\circ\text{C}$). Za prisoten tretji endotermni vrh z vrednostjo $T_m = 78,5 \text{ }^\circ\text{C}$ nismo mogli potrditi, ali gre za prisotnost zaostalega topila ali je nastala dodatna kristalna oblika karvedilola. Da bi se prepričali o možnosti prisotnega zaostalega topila, smo opravili termogravimetrično analizo vzorca. Rezultati, ki smo jih dobili z termogravimetrično analizo, niso kazali na prisotnost zaostalega topila. Tako smo pojav endotermnega vrha z vrednostjo $T_m = 78,5 \text{ }^\circ\text{C}$ pripisali nastanku kristalne oblike karvedilola.

Ker so pore različnih velikosti, lahko v manjših porah nastanejo kristalni delci manjših velikosti in obratno. Poleg tega učinkovina, ki se nahaja zunaj por, ni prostorsko omejena. Ker imajo manjši kristalni delci nižjo vrednost T_m od kristalov večjih velikosti, obstaja verjetnost, da oba endotermna vrhova (tako $T_m = 78,5 \text{ }^\circ\text{C}$ kot $T_m = 93,9 \text{ }^\circ\text{C}$) pripadata kristalni obliki III karvedilola, ki je prisotna v različni velikosti delcev. Obstaja tudi možnost, da je prišlo do nastanka polimorfne oblike VII. Glede na vrednosti temperature tališča prvega in tretjega talilnega vrha TD 2 : 1 ($T_{m1} = 78,5 \text{ }^\circ\text{C}$ in $T_{m2} = 111,4 \text{ }^\circ\text{C}$) je lahko nastal tudi karvedilol solvat VI. Za natančnejšo določitev nastalih polimorfni oblik karvedilola bi bilo potrebno izvesti dodatne analize.

Razlog nestabilnosti TD z najnižjim deležem pomožne snovi (TD 2 : 1) je bila prisotnost premajhne količine por za vgradnjo učinkovine. Pri izdelavi TD z metodo odparevanja topila se pore nosilca napolnijo z raztopino učinkovine, zaradi delovanja kapilarnih sil. Med odparevanjem topila karvedilol amorfizira in se nalaga v pore pomožne snovi. V primeru prisotnosti manjše količine PS se najprej napolnijo pore majhne velikosti, šele nato pa tudi pore večje velikosti. Medtem ko naj bi pore majhne velikosti omejevale rekristalizacijo, v porah večje velikosti do tega procesa prihaja lažje. Poleg tega se v primeru manjšega uporabljenega deleža PS več amorfni delcev karvedilola nahaja zunaj por. Mobilnost molekul učinkovine, ki se nahaja zunaj por, ni omejena, zato ta bistveno lažje rekristalizira, kot učinkovina, ki je vgrajena v porah. Zato je za stabilizacijo amorfnih oblike učinkovine pomembno masno razmerje med ZU in PS, kar pa smo ugotovili tudi pri metodi somletja (49).

Če primerjamo vrednosti T_g izdelanih TD (0 teden), lahko vidimo, da z višanjem deleža Syloida 244 FP vrednost T_g narašča (TD 2 : 1 $T_g = 37,0 \text{ }^\circ\text{C}$, TD 1 : 1 $T_g = 39,4 \text{ }^\circ\text{C}$, TD 1 : 2

$T_g = 41,9\text{ }^\circ\text{C}$). Dvig T_g je najverjetneje posledica interakcij med učinkovino in PS, saj se s povečanjem masnega deleža Syloida 244 FP poveča možnost tvorbe interakcij površine PS s karvedilolom.



Slika 25: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in TD, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku pri $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, v razmerju 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2, 0 teden in po 6 tednih hranjenja pri $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$ in $RV = 75\%$, v fosfatnem pufru s $pH = 6,8$.

Z rezultati DSC analize sovпада tudi diagram raztapljanja učinkovine iz pripravljenih trdnih disperzij na sliki 25. Hitrost raztapljanja ZU in končni delež raztopljenе učinkovine sta se z izdelavo trdnih disperzij z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku bistveno izboljšala, glede na profil raztapljanja izhodne kristalne oblike karvedilola. Bistveno slabše se je učinkovina raztapljala iz trdnih disperzij z najnižjim deležem Syloida 244 FP, medtem ko je bila razlika med ostalima dvema TD majhna.

Raztapljanje učinkovine iz trdnih disperzij korelira z razmerjem masnega deleža učinkovine in pomožne snovi v pripravljenih TD. ZU se je najhitreje in najboljšeje raztapljala iz TD z največjim deležem pomožne snovi. Iz slike 25 lahko vidimo deleže raztopljenе učinkovine po 120 min raztapljanju TD v fosfatnem pufru s $pH = 6,8$. Po 120 min raztapljanju trdnih disperzij, takoj po izdelavi, se je iz TD 1 : 2 raztopilo skoraj 100 % karvedilola (95 %), TD 1 : 1 91 % karvedilola ter iz TD 2 : 1 zgolj 36 % učinkovine. Po 6 tednih hranjenja TD pod stresnimi pogoji se je delež raztopljenega karvedilola najbolj

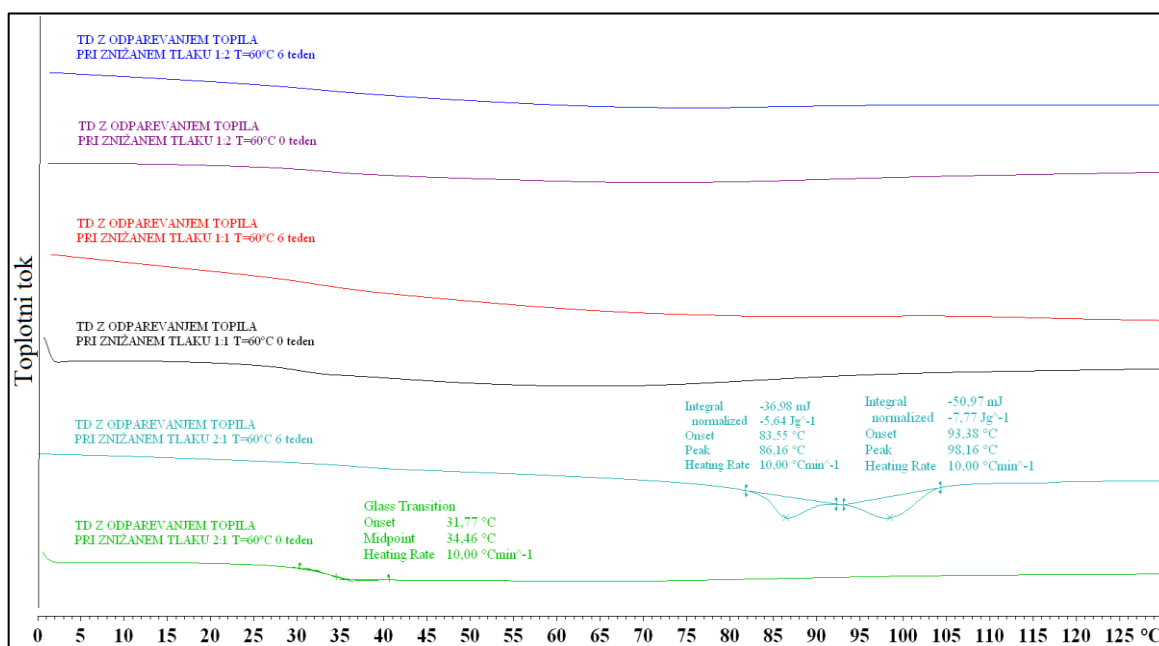
zmanjšal ravno pri TD z najvišjo vsebnostjo karvedilola, saj je bila slednja glede na rezultate DSC analize nestabilna. Prišlo je do pretvorbe amorfnе oblike karvedilola v slabše topno zmes kristalnih oblik. Pri TD 1 : 1 in 1 : 2 do rekristalizacije učinkovine ni prišlo. Odraz tega je profil raztapljanja ZU iz slednjih TD, ki je le nekoliko slabši od profila raztapljanja v času 0.

Že iz literature je znano, da ima nastanek amorfnе oblike učinkovine pomemben vpliv na izboljšanje tako hitrosti kot tudi obsega raztapljanja ZU. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da na profil raztapljanja poleg amorfnе oblike učinkovine vplivajo še drugi dejavniki, saj je bilo raztapljanje karvedilola iz TD z masnim razmerjem 2 : 1 v času 0 kljub vsebnosti popolnoma amorfnе učinkovine zelo slabo. Ti dejavniki so: poroznost, hidrofilne lastnosti delcev, močljivost in velika specifična površina učinkovine. Z večanjem vsebnosti karvedilola v TD pride zaradi napolnjenosti por in nalaganja učinkovine na stene pomožne snovi do zmanjšanja poroznosti TD ter do povečanja hidrofobnih lastnosti delcev. Zaradi manjšega deleža pomožne snovi je učinkovina v porah naložena v več slojih, zato je za njeno sprostitvev potreben daljši čas, saj mora medij učinkovino iz por izpodriniti. Teoretično je lahko v primeru izdelave TD 2 : 1 prišlo do velike napolnjenosti por z učinkovino. S podatki iz literature za gostoto karvedilola (kristalen karvedilol $1,26 \text{ g/cm}^3$, amorfen karvedilol $1,24 \text{ g/cm}^3$) (55) in povprečni volumen por Syloida 244 FP ($1,42 \text{ cm}^3/\text{g}$) (57) smo izračunali, da lahko 1 g Syloida 244 FP sprejme 1,76 g amorfnega karvedilola, kar pa je manjša količina učinkovine kot smo jo mi želeli vgraditi v pore PS v primeru TD 2 : 1. Poleg učinkovine, ki se je adsorbirala na površino por, so najverjetneje nastali tudi amorfni delci, ki so nastali zunaj por oziroma v večjih porah. Zaradi napolnjenosti por PS z učinkovino je prišlo do zmanjšanja površine delcev, posledično je bila slabša močljivost in slabše raztapljanje (2, 55). V primeru uporabe večjega deleža pomožne snovi, pa je imela učinkovin več možnosti, da se na stene por naloži v obliki monosloja, posledično je bilo tudi raztapljanje karvedilola iz teh TD boljše.

Izdelava trdnih disperzij pri 60 °C:

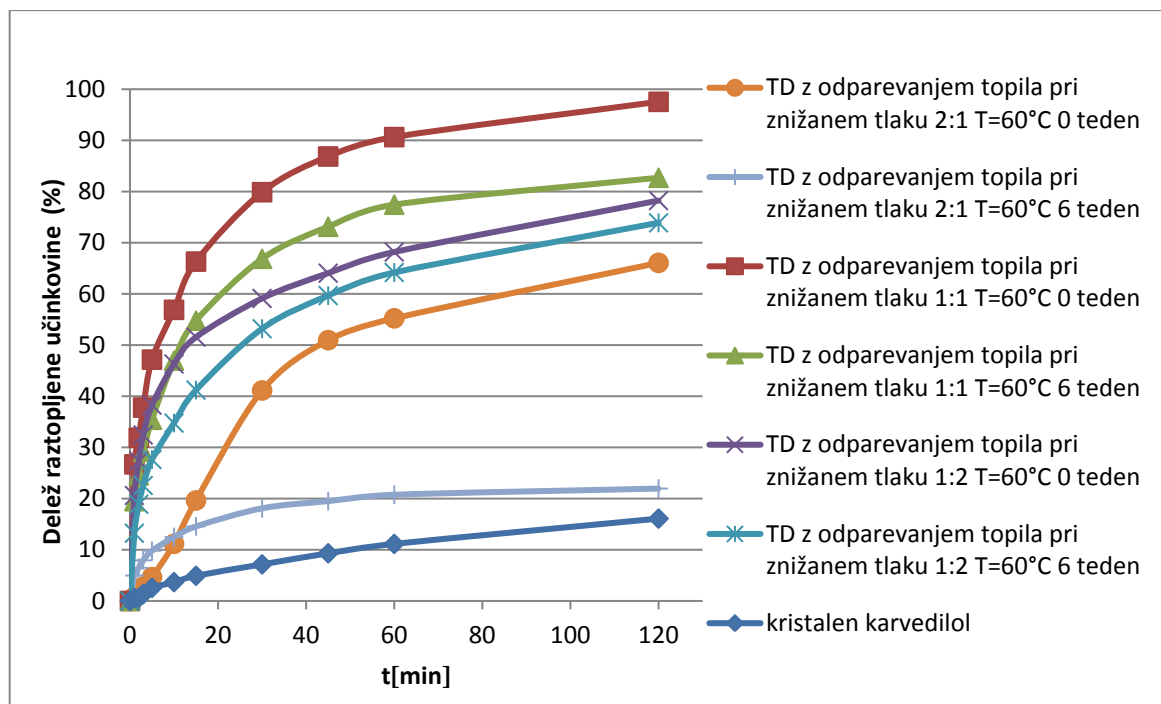
Višja temperatura vodne kopeli omogoča večjo topnost karvedilola v acetonu med odparevanjem topila. Tako obstaja večja možnost, da bo učinkovina naložena globlje v porah, kjer bo zaščitena pred vplivi vlage, s tem pa bo zmanjšana tudi njena gibljivost in možnost rekristalizacije.

Želeli smo preveriti verjetnost omenjene hipoteze, zato smo pripravili TD z različnimi masnimi razmerji učinkovine in PS (2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2) z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, s temperaturo vodne kopeli 60 °C.



Slika 26: DSC krivulje TD, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku pri T = 60 °C, v razmerju 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2, v času 0 ter po 6 tednih shranjevanja vzorcev pri T = 40 °C in RV = 75 %.

Iz DSC grafa analiziranih TD na sliki 26 lahko vidimo, da so bili dobljeni rezultati skoraj enaki kot v primeru uporabljene nižje T vodne kopeli. Učinkovina je bila popolnoma amorfna v vseh treh izdelanih TD. Po 6 tednih hranjena vzorcev pri pogoju T = 40 °C in RV = 75 % sta bili TD z višjima deležema Syloida 244 FP stabilni, saj je bila učinkovina še vedno popolnoma amorfna. Učinkovina v TD 2 : 1 pa ni bila stabilna, saj je prišlo po 6 tednih do njene rekristalizacije. Za razliko od TD 2 : 1, izdelane pri nižji temperaturi vodne kopeli, sta na DSC termogramu krivulje TD 2 : 1 6 teden prisotna samo 2 endotermna vrha taljenja kristalnega karvedilola ($T_m = 83,6$ °C in $T_m = 93,4$ °C). Kot v primeru TD 2 : 1, izdelane pri temperaturi vodne kopeli 40 °C, lahko pojav dveh talilnih vrhov pripišemo nastanku iste kristalne oblike (polimorfna oblika III) z različnima velikostima delcev. Obstaja pa tudi možnost, da je prišlo do nastanka dodatne kristalne oblike. Za potrditev nastanka določene polimorfne oblike karvedilola bi morali izvesti dodatne analize.



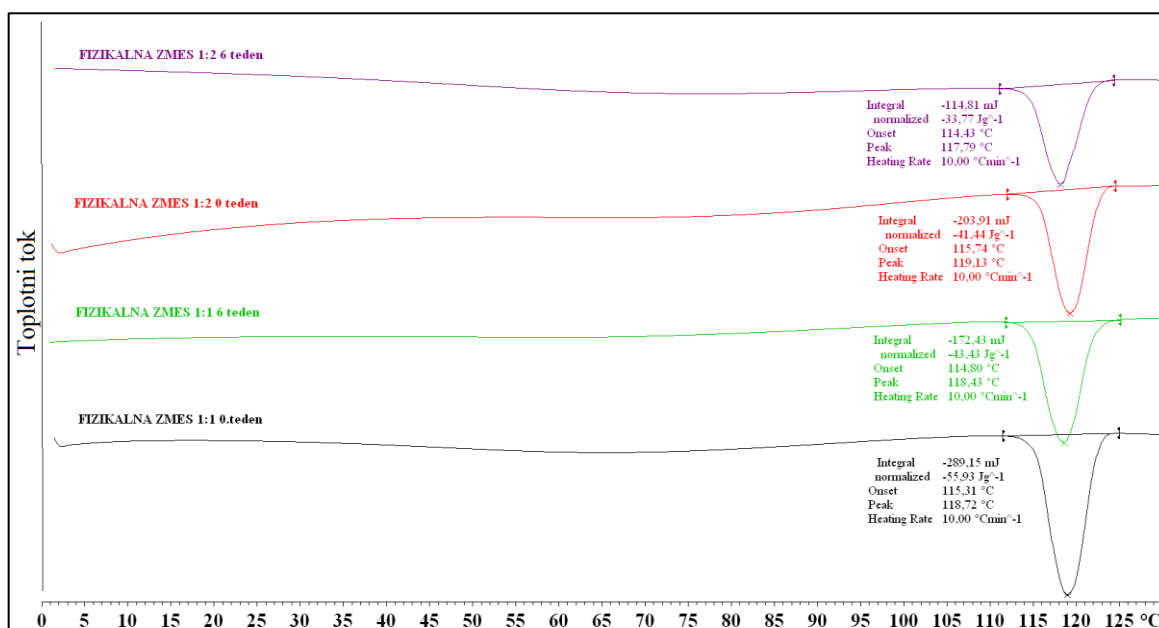
Slika 27: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in TD, pripravljenih z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku pri $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, v razmerju 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2, 0 teden in po 6 tednih hranjenja pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$, v fosfatnem pufru s $pH = 6,8$.

Iz diagrama na sliki 27 lahko vidimo, da smo z izdelavo TD izboljšali profil raztapljanja karvedilola glede na izhodno kristalno obliko, kar dodatno potrjuje nastanek amorfne učinkovine, ki smo jo zaznali na DSC termogramu na sliki 26. Tudi v primeru višje uporabljene T vodne kopeli je bil profil raztapljanja najslabši v primeru TD z najnižjim masnim deležem PS. Vendar je bil končni delež raztopljene učinkovine takoj po izdelavi disperzije bistveno višji kot v primeru uporabe nižje T vodne kopeli (v primeru uporabljene nižje temperature vodne kopeli je končni delež raztopljene učinkovine znašal 35,6 %, v primeru višje temperature vodne kopeli pa 66,1 %). Zaradi fizikalne nestabilnosti amorfnega karvedilola v TD 2 : 1 in nastanka polimorfni oblik je prišlo po 6 tednih do poslabšanja profila raztapljanja učinkovine. Slabši profil raztapljanja smo zabeležili tudi v primeru TD 1 : 1 in 1 : 2, po izpostavitvi pogojem pospešenega staranja. Prišlo je do znižanja končnega deleža raztopljene ZU, ki je bilo višje v primeru TD 1 : 1. Za razliko od profila raztapljanja trdne disperzije 1 : 1 in 1 : 2 izdelane pri nižji temperaturi vodne kopeli (slika 25), kjer je bil profil raztapljanja učinkovine boljši v primeru TD izdelane z višjim masnim deležem pomožne snovi (TD 1 : 2), je bil v primeru povišanja temperature vodne kopeli boljši profil raztapljanja karvedilola iz TD z nižjim deležem

pomožne snovi (TD 1 : 1). Rezultat je nepričakovan. V primeru uporabe višjega masnega deleža pomožne snovi obstaja večja verjetnost, da bo učinkovina naložena v porah v obliki monosloja, s katerega se tudi najhitreje sprošča. Posledično bo tudi večja verjetnost, da bo prisotnih manj amorfnih delcev, ki upočasnijo raztapljanje. Praktično pa je v našem primeru najboljše raztapljanje iz TD 1 : 1, kjer se po 120 min sprosti skoraj 100 % učinkovine. Zakaj se učinkovina najhitreje sprošča iz slednje TD ne znamo razložiti. Obstaja možnost, da je v primeru TD 1 : 2 prišlo do tvorbe močnejših interakcij med učinkovino in površino pomožne snovi, ki so otežile sprostitev učinkovine iz por.

4.7 Analiza fizikalne zmesi karvedilola in Syloida 244 FP

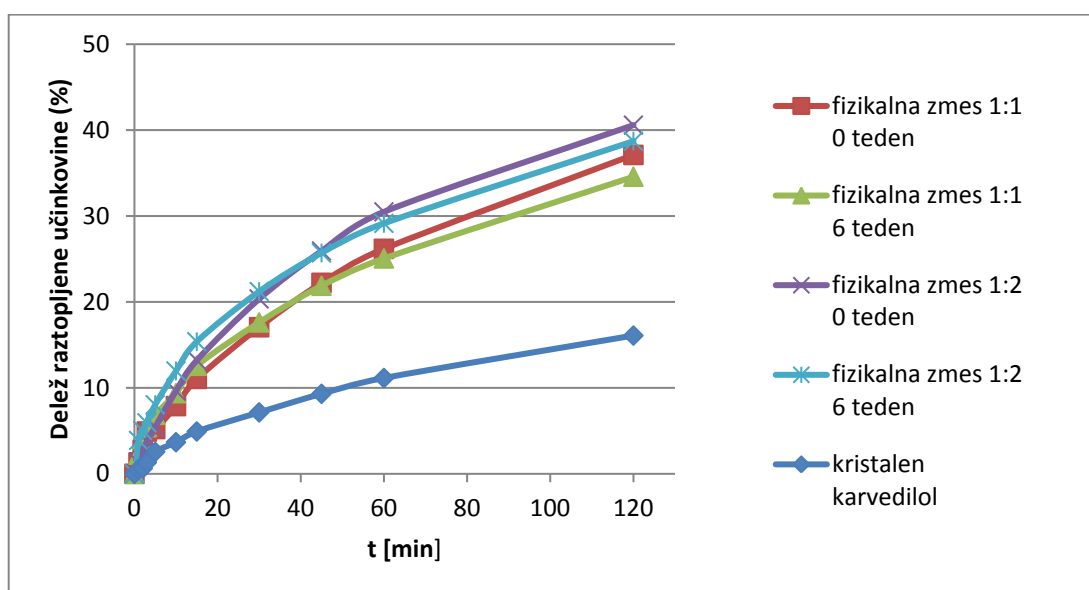
Z namenom preveriti smiselnost izbranih metod na izdelavo amorfnе oblike karvedilola ter na njeno fizikalno stabilnost, smo pripravili fizikalni zmesi izhodne kristalne učinkovine in pomožne snovi v razmerju 1 : 1 in 1 : 2 z mešanjem obeh komponent s spatulo v pateni. Obe zmesi smo ovrednotili z DSC analizo in z raztapljanjem učinkovine takoj po izdelavi ter po 6 tednih hranjenja pri pogoju $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$.



Slika 28: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in Syloida 244 FP, pripravljene v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, 0 teden ter po 6 tednih hranjenja pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$.

V obeh primerih fizikalnih zmesi (1 : 1 in 1 : 2) z mešanjem ZU in pomožne snovi s spatulo v pateni ni prišlo do nastanka amorfnе oblike karvedilola, kar smo videli po odsotnosti T_g učinkovine na DSC termogramu ter po prisotnem endotermnem vrhu taljenja

kristalne oblike II na sliki 28. Tudi po 6 tednih hranjenja obeh vzorcev pri pogojih pospešenega staranja ni prišlo do spremembe kristalne oblike karvedilola. S tem poskusom smo dokazali, da imata ključno vlogo za nastanek amorfne oblike in njeno stabilizacijo uporabljeni metodi izdelave trdnih disperzij, t.i. metoda somletja in metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku. Iz DSC grafa lahko opazimo, da ima kristalna oblika karvedilola v pripravljeneh fizikalnih zmesih nekoliko višjo temperaturo tališča glede na temperaturo tališča kristalne oblike ZU v trdnih disperzij, pripravljeneh z metodo somletja. Vzrok za to so večji delci kristalne oblike karvedilola v fizikalni zmesi v primerjavi z mletimi vzorci.



Slika 29: Raztapljanje izhodne kristalne oblike karvedilola in fizikalnih zmesi karvedilola in Syloida 244 FP pripravljeneh v razmerju 1 : 1 in 1 : 2, 0 teden ter po 6 tednih hranjenja pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $RV = 75\%$, v fosfatnem pufru s $pH = 6,8$.

Iz slike 29, ki prikazuje graf raztapljanja karvedilola iz pripravljeneh fizikalnih zmesi, lahko vidimo, da se je raztapljanje karvedilola iz fizikalne zmesi nekoliko izboljšalo v primerjavi z raztapljanjem izhodne kristalne učinkovine. To lahko pripišemo izboljšani močljivosti fizikalne zmesi v primerjavi z izhodno učinkovino, zaradi prisotne hidrofilne pomožne snovi. Vendar to izboljšanje ni bilo tako obsežno kot v primeru TD, pripravljeneh z metodo somletja ter metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. S hranjenjem fizikalnih zmesi pri pogojih pospešenega staranja se je hitrost sproščanja karvedilola v začetnem času nekoliko povečala. Vzrok je bila verjetno vezana voda, saj smo vzorce shranjevali pri povišani relativni vlagi. Končni delež raztopljene ZU pa se je nekoliko

zmanjšal, tako v primeru fizikalne zmesi z nižjim kot tudi višjim masnim deležem Syloida 244 FP.

S preskusom raztapljanja karvedilola iz pripravljenih fizikalnih zmesi smo dokazali, da že samo dodatek Syloida 244 FP k izhodni kristalni obliki učinkovine izboljša hitrost in končni delež raztopljene ZU. Razlog za izboljšanje so hidrofilne lastnosti pomožne snovi, ki pripomorejo k izboljšanju močenja hidrofobne zdravilne učinkovine. Vendar je to izboljšanje raztapljanja bistveno slabše kot pri trdnih disperzijah, izdelanih z metodo somletja in metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo skušali s tremi različnimi metodami izdelati amorfen karvedilol, ki bi bil fizikalno stabilen. Uporabili smo metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline v tekočem dušiku, metodo somletja in metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Za izdelavo trdnih disperzij smo kot nosilec uporabili mezoporozni SiO₂, Syloid 244 FP.

Z metodo taljenja s hitrim ohlajanjem taline smo uspeli pretvoriti kristalno obliko karvedilola v manj stabilno amorfno obliko. Nastala amorfna oblika je bila zelo nestabilna, saj je tekom pospešenega staranja zelo hitro prešla nazaj v kristalno obliko. Delno v dveh dneh in popolno v 1 tednu. S časom staranja se je povečal delež kristalne oblike II. Poleg polimorfne oblike II sta glede na vrednosti T_m nastali še polimorfna oblika I, polimorfna oblika III in polimorfna oblika IV. Pri staranju amorfne učinkovine smo zaznali padec temperature steklastega prehoda, ki smo ga pripisali adsorbirani vlagi, ki zaradi mehčalnega učinka poveča mobilnost molekul. Dodatek pomožne snovi Syloida 244 FP k nastali amorfni učinkovini ni upočasnil kristalizacije amorfne učinkovine, saj se je tekom staranja fizikalne zmesi amorfna oblika učinkovine po 1 tednu pretvorila v zmes dveh kristalnih oblik. Nastali sta polimorfna oblika III in polimorfna oblika IV.

Z mletjem karvedilola skupaj s pomožno snovjo, smo v vseh primerih na DSC krivulji zaznali prisotno temperaturo steklastega prehoda, ki potrjuje nastanek amorfne učinkovine. Pri mletju zmesi z manjšim deležem pomožne snovi, je pri vseh časih mletja (30 min, 120 min in 24 ur) amorfiziral samo del učinkovine, del pa se je še vedno nahajal v kristalni obliki. Iz takšnih disperzij se je učinkovina raztapljala počasneje in v manjšem obsegu. S povišanjem deleža uporabljene pomožne snovi pa je prišlo do popolne pretvorbe kristalne oblike v amorfno, kadar smo zmes mleli dlje kot 30 min. Na nastanek in nadaljnjo stabilnost amorfne oblike, tekom procesa pospešenega staranja, je imel večji vpliv kot čas mletja delež učinkovine v zmesi. Medtem ko je bila amorfna oblika učinkovine v TD izdelani z višjim deležem pomožne snovi stabilna tako v primeru 120 min kot 24 urnega mletja, je v primeru nižjega deleža uporabljene pomožne snovi prišlo do njene rekristalizacije. Za razliko od 120 min mletja, kjer je nastala le oblika II, sta v primeru podaljšanega časa mletja poleg oblike II nastali še oblika III in oblika VII. Dodatek acetona zmesi pred začetkom mletja ni imel nobenega pomembnega vpliva na nastanek in nadaljnjo stabilnost amorfne oblike učinkovine. Glede na vzorec mletja brez topila, sta v primeru dodatka acetona po izpostavitvi vzorca pogojem pospešenega staranja nastali dve

dodatni polimorfni obliki; oblika III in oblika VII. Nastanek amorfne oblike učinkovine in njeno stabilnost tekom izpostavitve vzorcev pogojem pospešenega staranja smo potrdili tudi s testom raztapljanja. Pri vseh mletih vzorcih je bilo raztapljanje učinkovine iz trdnih disperzij boljše v primeru manjše vsebnosti učinkovine. Tako se je učinkovina najbolje raztapljala iz mletih TD, ki so vsebovale višji masni delež pomožne snovi, saj je bila učinkovina v teh TD amorfna. Poleg amorfne učinkovine je k boljšemu raztapljanju prispeval tudi večji delež pomožne snovi, ki je zaradi hidrofilnih lastnosti izboljšal močenje.

Boljša od metode mletja se je za izdelavo amorfne oblike karvedilola in izboljšano fizikalno stabilnost izkazala metoda odparevanja topila pri znižanem tlaku. Z izdelavo TD smo v vseh treh primerih uporabljenih masnih deležev učinkovine in pomožne snovi; 2 : 1, 1 : 1 in 1 : 2 uspeli pripraviti amorfno obliko karvedilola, kar smo potrdili z raztapljanjem učinkovine iz izdelanih TD. Delež raztopljene učinkovine in hitrost sta se z izdelavo TD bistveno izboljšala, glede na profil raztapljanja izhodnega karvedilola. Medtem ko je bila amorfna učinkovina v TD 1 : 1 in 1 : 2 fizikalno stabilna najmanj 6 tednov pri izpostavljenosti pogojem pospešenega staranja, je v primeru TD 2 : 1 prišlo do njene rekristalizacije v zmes treh kristalnih oblik. Zaradi ujemanja T_m nastalih polimorfni oblik z teoretičnimi vrednostmi DSC odzivov nismo mogli zagotovo potrditi prisotnost določene polimorfne oblike karvedilola v vzorcu. Temperatura izdelave trdnih disperzij ni imela pomembnejšega vpliva na izboljšanje fizikalne stabilnosti učinkovine. Opazili pa smo nekoliko spremenjen profil raztapljanja učinkovine, ki je bil boljši v primeru nižjega uporabljenega deleža pomožne snovi.

6. LITERATURA

1. Neha et al: Approaches to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs and different parameter to screen them. *Int J Pharm Sci* 2012; 1 (4): 171-182.
2. Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O: Solid Disperion of Carvedilol with Porous Silica. *Chem Pharm Bull* 2011; 59 (4): 427-433.
3. Leuner C, Dressman J: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000; 50: 47-60.
4. Mullins J, Macek T: Some pharmaceutical properties of novobiocin. *J Am Pharm Assoc Sci* 1960; 49: 245-248.
5. Laitinen R, Löbmann K, Strachan CJ, Grohganz H, Rades T: Emerginig trends in the stabilization of amorphous drugs. *Int J Pharm* 2012; 453 (1): 65-79.
6. Planinšek O: Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin. *Farm Vestn* 2007; 58: 8-14.
7. Yu L: Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 48: 27-42.
8. Jondhale S, Bhise S, Pore Y: Physicochemical Investigations and Stability Studies of Amorphous Gliclazide. *Pharm Sci Tech* 2012; 13 (2): 448-459.
9. Craig DQM, Royall PG, Kett VL, Hopton ML: The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *Int J Pharm* 1998; 179: 179-207.
10. Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJW: Crystalline solids. *Adv Drug Del Rev* 2001; 48: 3-26.
11. Ferlan A, Vrečer F: Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2004; 55: 11-21.
12. Fukuoka E, Makita M, Yamamura S: Some physicochemical properties of glassy indomethacin. *Chem Pharm Bull* 1986; 34: 4314-4321.
13. Ediger MD, Angell CA, Nagel SR: Suprecooled liquids and glasses. *J Phys Chem* 1996; 100: 13200-13212.
14. Hancock BC, Zografi G: Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci* 1997; 86 (1): 1-12.
15. Hilden LR, Morris KR: Physics of amorphous solids. *J Pharm Sci* 2003; 93: 3-12.

16. Turnbull D: Undercooled alloy phases. 1986; Warrendale PA: Metallurgical Soc, pp 3-22.
17. Konno T, Kinuno K, Kataoka K: Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. I. Effect of vapor pressure of the medicinals on changes in crystalline properties. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(1): 301–307.
18. Bhugra C, Rambhatla S, Bakri A, Duddu SP, Miller DP, Pikal MJ, et al: Prediction of the onset of crystallization of amorphous sucrose below T_g from correlations with mobility. *J Pharm Sci* 2007; 96 (5):1258-69.
19. Alie J, Menegotto J, Cardon P, Duplaa H, Caron A, Lacabanne C, et al: Dielectric study of the molecular mobility and the isothermal crystallization kinetics of an amorphous pharmaceutical drug substance. *J Pharm Sci* 2004; 93(1): 218-33.
20. Jolley JE: Microstructure of photographic gelatin binders. *Photogr Sci Eng* 1970; 14:169-177.
21. Kumavat SD, Chaudhari YS, Badhe M, Borole P, Shenghani K: Physical stability of amorphous solid dispersion: A review. *Int J Pharm Arch* 2013; 5: 129-136.
22. Bhugra C, Pikal MJ: Role of thermodynamic, molecular, and kinetic factors in crystallization from the amorphous state. *J Pharm Sci* 2008; 97: 1329-1349.
23. Surana R, Pyne A, Rani M, Suryanarayanan R: Measurement of enthalpic relaxation by differential scanning calorimetry-effect of experimental conditions. *Thermochim Acta* 2005; 433:173-182.
24. Bansal SS, Kaushal AM, Bansal AK: Enthalpy relaxation studies of two structurally related amorphous drugs and their binary dispersions. *Drug Dev Ind Pharm* 2010; 36: 1271-1280.
25. Yang J, Grey K, Doney J: An improved kinetics approach to describe the physical stability of amorphous solid dispersions. *Int J Pharm* 2010; 384: 24-31.
26. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y: Solid dispersion particles of tolbutamide prepared with fine silica particles by the spray-drying method. *Powder Tech* 2004; 141: 187– 195.
27. Van den Mooter G, Wuyts M, Blaton N, Busson R, Grobet P, Augustijns P, Kinget R: Physical stabilisation of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 261-269.

28. Kothari K, Ragoonanan V, Suryanarayanan R: Influence of Molecular Mobility on the Physical Stability of Amorphous Pharmaceuticals in the Supercooled and Glassy States. *Mol Pharm* 2014; 11: 3048-3055.
29. Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN, Ambike AA, Mahadik KR, Paradkar A: Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. *Powder Tech* 2006; 167: 20-25.
30. Tiwari R, Tiwari G, Srivastava B, Rai AK: Solid Dispersions: An Overview To Modify Bioavailability Of Poorly Water Soluble Drugs. *Int J Pharm Tech Res* 2009; 1 (4): 1338-1349.
31. Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G: Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm Res* 1995; 12: 799-806.
32. Dhirenda K, Lewis S, Udupa N, Atin K: Solid dispersions: A review. *Pak J. Pharm Sci.* 2009; 22(2): 234-246.
33. Dixit ND, Niranjana SK: A review: Solid dispersion. *World J Pharm and Pharm Sci* 2014; 3(9): 238-257.
34. Teja SB, Patil SP, Shete G, Patel S, Bansal AK: Drug-excipient behavior in polymeric amorphous solid dispersions. *J Excipients and Food Chem* 2013; 4(3): 70-94.
35. Brough C, Williams III RO: Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *Int J Pharm* 2013; 453: 157– 166.
36. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P: Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today* 2007; 12: 1068-1075.
37. Saffoon N. et. Al: Enhancement of Oral Bioavailability and Solid Dispersion: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011; 1(7): 13-20.
38. Planinšek O: Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo zdravil. *Farm Vestn* 2009; 60: 169-176.
39. Janssens S, Van den Mooter G: Review: physical chemistry of solid dispersions. *J Pharma Pharmaco* 2009; 61: 1571-1586.
40. Ambrogi V, Perioli L, Pagano C, Marmottini F, Ricci M, Sagnella A, Rossi C: Use of SBA-15 for furosemide oral delivery enhancement. *Europ J Pharm Sci* 2012; 46: 43-48.

41. Kamalakkannan V, Puratchikody A, Masilamani K, Senthilnathan B: Solubility enhancement of poorly soluble drugs by solid dispersion technique – A review. *J Pharm Res* 2010; 3(9): 2314-2321.
42. Elamin AA, Ahlneck C, Alderborn G, Nystrom C: Increased metastable solubility of milled griseofulvin, depending on the formulation of a disordered surface structure. *Int J Pharm* 1994; 111: 159-170.
43. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F et al: Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm* 2001; 226: 81-91.
44. Mura P, Cirri M, Faucci MT et. Al: Investigation of the effects of grinding and co-grinding on physicochemical properties of glisentide. *J Pharm Biom Anal.* 2002; 30: 227-237.
45. Bahl D, Bogner RH: Amorphization of Indomethacin by Co-Grinding with Neusilin US2: Amorphization Kinetics, Physical Stability and Mechanism. *Pharm Res* 2006; 23(10): 2317-2325.
46. Sher P, Ingavle G, Ponrathnam S, Pawar AP: Low density porous carrier based conceptual drug delivery system. *Microporous and Mesoporous Materials* 2007; 102: 290–298.
47. Ukmar T, Mali G, Planinšek O: Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij. *Farm vestn.* 2009; 60: 313-318.
48. Qian KK, Bogner RH: Application of Mesoporous Silicon Dioxide and Silicate in Oral Amorphous Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci* 2012; 101(2): 444-463.
49. Xu W, Riikonen J, Lehto VP: Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2013; 453: 181–197.
50. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y: Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles prepared by using spray-drying method. *Int J Pharm* 2005; 293: 155–64.
51. Company literature on COREG® (Carvedilol) Tablets. GlaxoSmithKline, NC, USA, pp. 1–2. Dostopno na:
<https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/COREG-PI-PIL.PDF>
(maj 2014)
52. Brook S. C. et al.. Carvedilol phosphate salts and/or solvates thereof, corresponding compositions, and/or methods of treatment. Unites States Patent, 7,893,100 B2, patent vložen 2007.

53. Carvedilol. European Pharmacopoeia, 7th Ed.
54. Čurič M: Poskus izdelave kokristalov karvedilola z aminokislinami, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011.
55. Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F: Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersion with porous silica. *International Journal of Pharm* 2011; 406: 41-48.
56. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Coryol, Centralna baza zdravil. Dostopno na: <http://www.cbz.si/>. (maj 2014)
57. Kinnari P, Makila E, Heikkila T, Salonen J, Hirvonen J, Santos HA: Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica material as drug carriers for itraconazole. *Int J Pharm* 2011; 414: 148-156.
58. Syloid® 244 FP, Grace Davison Discovery Science. Product description. Dostopno na: http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M318_Syloid244FP_EU.pdf. (junij 2014)
59. <http://www.fritsch-milling.com/products/milling/ball-mills/pulverisette-0/>. (julij 2014)
60. <http://www.prweb.com/releases/2009/04/prweb2347284.htm>. (januar 2015)
61. Leuner C, Dressman J: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 47-60.
62. Kamalakkannan V, Puratchikody A, Masilamani K, Senthilnathan B: Solubility enhancement of poorly soluble drugs by solid dispersion technique – A review. *J Pharm Res* 2010; 3(9): 2314-2321.
63. Kerč J, Srčič S: Thermal analysis of glassy pharmaceuticals. *Thermochim Acta* 1995; 248: 81-95.
64. Hildesheim J, Finogueev S, Aronhime J, Dolitzky B, Ben-Valid S, Kor I: Carvedilol. WIPO Patent Application, Patent number WO 02/00216 A1, 2002.
65. Chen W, Gallop M, Oh C, PCT Publication, Patent number WO 03/005970, 2003.
66. Shan N, Todab F, Jones W: Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chem Commun* 2002; 20: 2372–2373.