

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK LIPAR

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK LIPAR

**OPTIMIZACIJA IZDELAVE POLIMERNIH NANODELCEV S
CELEKOKSIBOM IN VREDNOTENJE ULTRACENTRIFUGIRANJA KOT
SEPARACIJSKE METODE**

**OPTIMIZATION OF MANUFACTURING POLYMER NANOPARTICLES WITH
CELECOXIB AND EVALUATION OF ULTRACENTRIFUGATION AS A
SEPARATING TECHNIQUE**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Zahvala

Za strokovne nasvete, razlage in pomoč pri izdelavi magistrske naloge se najlepše zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm., kot tudi vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko tehnologijo za pomoč pri delu v laboratoriju ter vratarju za potrpežljivost pri zaklepanju laboratorijev v večernih urah.

Posebna zahvala gre mojim najbližjim, staršem Marjeti in Jožetu, mami Tončki in dekletu Tini, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me spodbujali pri delu.

Hvala, nikoli ni prepozno!

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Rok Lipar

KAZALO

POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 NANOTEHNOLOGIJA V FARMACIJI	1
1.2 POLIMERNI ND KOT DOSTAVNI SISTEMI.....	2
1.2.1 Metode izdelave polimernih ND	3
1.2.2 Velikost in porazdelitev velikosti ND	5
1.2.3 Določevanje vsebnosti vgrajene ZU.....	8
1.3 ULTRACENTRIFUGIRANJE.....	10
1.4 IZHODNI MATERIALI ZA IZDELAVO POLIMERNIH ND	13
1.4.1 Polimeri	13
1.4.2 Stabilizatorji	14
1.4.3 Celekoksib	15
2 NAMEN DELA	16
3 EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR.....	18
3.3 METODE.....	19
3.3.1 Izdelava polimernih ND	19
3.3.2 Določanje povprečne velikosti ND v disperziji.....	21
3.3.3 Ultracentrifugiranje disperzije ND	23
3.3.4 HPLC analiza celekoksiba.....	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	29

4.1	OPTIMIZACIJA IZDELAVE POLIMERNIH ND.....	29
4.2	ULTRACENTRIFUGIRANJE.....	34
4.2.1	Velikost in porazdelitev velikosti ND v supernatantu po ultracentrifugiranju 34	
4.2.2	Določanje vsebnosti ZU v supernatantu po ultracentrifugiranju.....	39
4.2.3	Fizikalna stabilnost disperzije ND.....	48
4.2.4	Hidrofobna narava ND	48
5	SKLEP.....	50
6	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Prečni prerez polimernega ND z vgrajeno ZU: nanosfera (levo) in nanokapsula (desno).....	2
Slika 2: Shema instrumenta ZetaSizer Nano: 1 – laser, 2 – celica, 3 – detektor, 4 – atenuator, 5 – korelator, 6 – računalnik (8).....	5
Slika 3: Spreminjanje položaja delcev v vzorcu kot posledica Brownovega gibanja delcev (8).....	6
Slika 4: Grafični prikaz intenzitetne, volumnske in številčne porazdelitve velikosti delcev v vzorcu, ki vsebuje enako število delcev velikosti 5 nm in 50 nm (8).....	7
Slika 5: Shema HPLC sistema.....	9
Slika 6: Ultracentrifuga serije WX ULTRA 100 in rotor T- 1250.....	11
Slika 7: Shema sedimentacije delcev v odvisnosti od časa centrifugiranja.....	12
Slika 8: Hidroliza polimera PLGA (15).....	13
Slika 9: Struktura Resomera RGP d50155 ; m –število enot PLGA (x – število enot mlečne kisline, y – število enot glikolne kisline), n- število enot etilenoksida.....	14
Slika 10: Kemijska zgradba molekule celekoksiba (16).....	15
Slika 11: Vodna raztopina stabilizatorja med mešanjem, pred injiciranjem raztopine polimera z učinkovino.....	20
Slika 12: Nastanek ND, kar je razvidno iz opalescence vzorca.....	20
Slika 13: Primerjava vodne raztopine stabilizatorja (leva čaša) in vzorca polimernih ND (desna čaša).....	21
Slika 14: Primer rezultata treh ponovitev meritev povprečne velikosti in PI vzorca ND na Zetasizerju Nano ZS.....	22
Slika 15: Centrifugirki za uporabo v ultracentrifugi.....	24
Slika 16: Posamezni deli ultracentrifuge Sorvall WX Ultra 100.....	25
Slika 17: Kromatogram "topila"(mobilne faze).....	28
Slika 18: Kromatogram standardne raztopine celekoksiba.....	28
Slika 19: Povprečna velikost ND v supernatantu za vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.....	35
Slika 20: Povprečna velikost ND v supernatantu vzorca št. 26* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.....	37

Slika 21: Primerjava povprečne velikosti ND v supernatantu za vzorec št. 22 in vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja pri času centrifugiranja 5 min.	38
Slika 22: Primerjava povprečne velikosti ND v supernatantu za vzorec št. 24 in vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja pri času centrifugiranja 15 min.	39
Slika 23: Umeritvena krivulja za celekoksib.	40
Slika 24: Koncentracija ZU v supernatantih vzorca št. 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.	42
Slika 25: Koncentracija ZU v supernatantih vzorca št. 26* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.	45
Slika 26: Koncentracija ZU v supernatantih vzorcev št. 22, 24 in 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Hitrost centrifugiranja in centrifugalna sila pri ultracentrifugiranju z uporabo rotorja T-1250.	23
Preglednica II: Sestava disperzij ND brez vgrajene ZU, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.	29
Preglednica III: Sestava disperzij ND z vgrajeno ZU, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.	30
Preglednica IV: Sestava disperzij ND z vgrajeno ZU in različnimi koncentracijami ND v vzorcu, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.	31
Preglednica V: Sestava disperzij ND z različnimi polimeri z vgrajeno ZU in različnimi koncentracijami ND v vzorcu, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.	33
Preglednica VI: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND vzorca št. 25* in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantu po ultracentrifugiranju.	34
Preglednica VII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND vzorca št. 26* in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantu po ultracentrifugiranju.	36

Preglednica VIII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND za vzorca št. 22 in 24 in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantih po ultracentrifugiranju.....	37
Preglednica IX: Odzivi raztopin standardna (RS) ZU.....	39
Preglednica X: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 5 min.	40
Preglednica XI: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 10 min.	41
Preglednica XII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 15 min.	41
Preglednica XIII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 5 min.	43
Preglednica XIV: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 10 min.	43
Preglednica XV: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 15 min.	44
Preglednica XVI: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 22 z različno hitrostjo in časom 5 min.	46
Preglednica XVII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 24 z različno hitrostjo in časom 15 min.	46
Preglednica XVIII: Povprečna velikost ND in PI takoj po izdelavi in po 40 dneh.	48
Preglednica XIX: Vpliv načina priprave vzorca za HPLC analizo na določeno vsebnost ZU v vzorcu.....	49

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Beer-Lambertov zakon	9
Enačba 2: Stokes-ova enačba za sedimentacijo sferičnih delcev v gravitacijskem polju.	

POVZETEK

Ultracentrifugiranje je separacijska metoda, ki se pogosto uporablja pri izdelavi polimernih nanodelcev. V procesu centrifugiranja prihaja do pospešenega posedanja nanodelcev v disperznem mediju, s pomočjo katerega posredno določamo učinkovitost vgrajevanja zdravilne učinkovine v izdelane nanodelce. Na podlagi izbrane hitrosti in časa centrifugiranja pa običajno ne moremo zagotovo trditi, da so se posedli vsi nanodelci, kar je lahko vzrok znatnih analitskih napak.

S postopkom nanoprecipitacije smo izdelali ter optimizirali izdelavo polimernih nanodelcev iz biorazgradljivih in biokompatibilnih polimerov PLGA in PEG-PLGA z zdravilno učinkovino celekoksibom. Disperzije nanodelcev so vsebovale različne koncentracije zdravilne učinkovine in nanodelce dveh različnih velikosti ~ 90 nm ter ~ 140 nm, ki smo jih ultracentrifugirali pri različnih hitrostih (od 5.000 do 45.000 obr/min) in različno dolgo (5, 10 in 15 min). Po vsakem ciklu ultracentrifugiranja smo v supernatantu s fotonsko korelacijsko spektroskopijo ovrednotili povprečno velikost in porazdelitev velikosti nanodelcev ter s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti določili vsebnost celekoksiba. Iz povprečne velikosti nanodelcev in vsebnosti celekoksiba v supernatantu po ultracentrifugiranju smo ocenili, pri kateri hitrosti in času centrifugiranja se posedajo »vsi« nanodelci.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da večji kot so nanodelci, oziroma večja kot je njihova koncentracija v vzorcu, hitreje se le-ti pri danih pogojih centrifugiranja posedajo. Spoznali smo, da velikost nanodelcev ni imela vpliva na učinkovitost vgrajevanja zdravilne učinkovine v nanodelce, saj je bila le-ta v primeru večjih in manjših nanodelcev ~ 90 %. Pri določevanju vsebnosti zdravilne učinkovine v supernatantu v odvisnosti od hitrosti in časa ultracentrifugiranja smo ugotovili, da se s povečevanjem hitrosti in časa centrifugiranja napaka, ki jo naredimo, če se vsi nanodelci ne posedajo, manjša, vendar je pri vzorcih z manjšo koncentracijo in manjšo velikostjo nanodelcev napaka bistveno večja. Iz podatkov o vsebnosti zdravilne učinkovine v supernatantih lahko trdimo, da se pri hitrosti centrifugiranja 35.000 obr/min ali več posedajo "vsi" nanodelci, ne glede na čas centrifugiranja.

Ključne besede: ultracentrifugiranje, polimerni nanodelci, nanoprecipitacija, celekoksib, PLGA.

ABSTRACT

Ultracentrifugation is a separation technique frequently used in preparation of polymeric nanoparticles. In the process of centrifugation accelerated settling of nanoparticles in the dispersion medium occurs, thus drug entrapment efficiency in produced nanoparticles can be indirectly determined. Based solely on the speed and time of centrifugation, we cannot claim with certainty whether all nanoparticles have sedimented, which can cause significant analytical error.

Nanoprecipitation method have been used and optimized for the preparation of polymeric nanoparticles from biocompatible and biodegradable polymers PLGA and PEG-PLGA with incorporated active substance celecoxib. Nanoparticle dispersions contained different concentrations of celecoxib and nanoparticles of two different sizes, namely ~ 90 nm and ~ 140 nm, which were centrifuged at different speeds (5.000 to 45.000 rpm) and for different time period (5, 10 and 15 min). After each cycle of centrifugation the average size and size distribution of nanoparticles in supernatants was determined by photon correlation spectroscopy and the content of celecoxib by high performance liquid chromatography. Based on the average particle size and the content of celecoxib in supernatant the speed and time of centrifugation were determined, resulting in complete nanoparticle sedimentation.

Based on the results it was found out that the sedimentation of nanoparticles at the given conditions of centrifugation is faster, if nanoparticles are bigger and if their concentration is higher. Furthermore, it was shown that size of nanoparticles had no impact on the efficiency of drug entrapment, since in the case of smaller and bigger nanoparticles it was ~ 90 %. When determining the concentration of celecoxib in the supernatant, depending on the speed and time of centrifugation, we found that by increasing the speed and time of centrifugation, the experimental error, due to incomplete sedimentation of nanoparticles, was decreased. However, if the concentration of nanoparticles is low and their size is small, the experimental error is consequently significantly higher. Based on the data about the celecoxib concentration in supernatants it can be concluded that the centrifugation speed of 35.000 rpm or higher causes complete sedimentation of nanoparticles, regardless of the centrifugation time.

Key words: ultracentrifugation, polymer nanoparticles, nanoprecipitation, celecoxib, PLGA.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN – acetonitril

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

MeOH – metanol

ND – nanodelci

PEG – polietilenglikol

PI – polidisperzni indeks

PLA – polimlečna kislina

PLGA – kopolimer mlečne in glikolne kisline

PSC – fotonska korelacijska spektroskopija

PVA – polivinilalkohol

RPM – obrati na minuto

RSD – relativni standardni odmik

VZ – vzorec

ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 NANOTEHNOLOGIJA V FARMACIJI

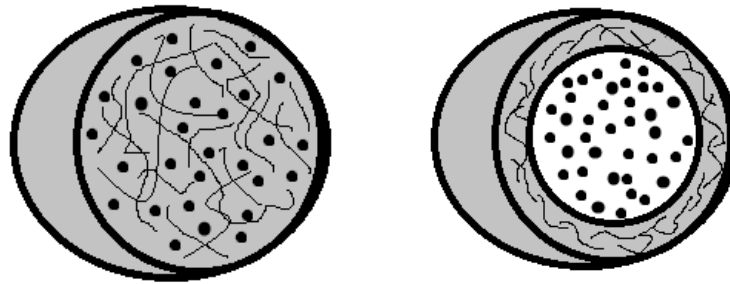
Nanotehnologija je interdisciplinarno področje, ki proučuje molekule in strukture, katerih vsaj ena dimenzija je nanometrijske velikosti (med 10^{-7} in 10^{-9} m). Materiali se med seboj razlikujejo po svoji naravi ter v fizikalno kemijskih lastnostih, vendar pa so tudi lastnosti istega materiala lahko zelo različne, če je velikost delcev različna. Nanomateriali oziroma nanodelci so od nekdaj prisotni na različnih področjih v vsakodnevnem življenju, vendar jih šele zadnjih nekaj desetletij, ko je tehnologija napredovala v zadostni meri, odkrivamo in bolje spoznavamo njihove lastnosti. Nanotehnologija ima velik potencial zaradi inovacij na številnih področjih uporabe, tako v industriji kot tudi v družbi nasploh (1).

V farmaciji že dalj časa potekajo številne raziskave na področju iskanja novih zdravilnih učinkovin (ZU), ki bi bile učinkovite in bi čim bolj selektivno delovale na obolele celice, saj ima večina zdravil poleg želenih tudi neželene učinke. Tehnološki napredek, tako v biotehnologiji kot tudi v molekularni biologiji, je omogočil odkritje oziroma izdelavo novih kemijskih spojin, kandidatk za ZU za specifične bolezni in obolenja. Vendar pa veliko novih učinkovin izkazuje slabo vodotopnost, ki vodi do slabe biološke uporabnosti po peroralnem vnosu in nezmožnosti za oblikovanje intravenskih formulacij. Zato je za doseganje boljših rezultatov zdravljenja z že odkritimi ZU oziroma tudi s tistimi, ki so bile izločene že kot kandidatke za ZU v predkliničnih ali kliničnih raziskavah, razvoj usmerjen v odkrivanje novih učinkovitejših dostavnih sistemov (2, 3).

Nanodelci (ND) predstavljajo dostavni sistem, ki omogoča dostavo ZU na mesto njihovega delovanja. Z izdelavo nanodostavnih sistemov lahko povečamo topnost ZU, dosežemo ciljano dostavo različnih skupin učinkovin (antibiotikov, citostatikov, peptidov in proteinov, nukleinskih kislin itd.), zaščitimo učinkovine pred encimskimi in kemijskimi spremembami ter zmanjšamo neželene stranske učinke nekaterih ZU ter njihovo nadzorovano sproščanje. Z vgrajevanjem ZU v ND lahko izboljšamo biološko uporabnost slabo vodotopnih učinkovin, kot tudi izdelamo formulacije za parenteralno, peroralno, pulmonalno, okularno ali dermalno uporabo (3, 4).

1.2 POLIMERNI ND KOT DOSTAVNI SISTEMI

Polimerni ND, kot sistemi za dostavo zdravilnih učinkovin, so koloidni delci, katerih velikost je od nekaj 10 nm pa vse do 1 μm in so zgrajeni iz polimerov. Poznamo dva osnovna tipa ND (slika 1), ki se ločita po zgradbi: nanosfere, ki so ogrodni tip dostavnega sistema, in nanokapsule, ki imajo v jedru rezervoar z učinkovino, ki je obdan s polimerno membrano (4).



Slika 1: Prečni prerez polimernega ND z vgrajeno ZU: nanosfera (levo) in nanokapsula (desno).

Ta dva osnovna tipa ND so odkrili že v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Zaradi sorazmerno enostavnih metod priprave in možnosti prenosa proizvodnje do industrijskega merila ter zaradi stabilnosti in možnosti liofilizacije so raziskave polimernih ND še danes zelo aktualne. Za izdelavo nanosfer in nanokapsul z vgrajeno učinkovino imamo na voljo več metod, ki omogočajo enostavno, varno in ponovljivo izdelavo. Glede na fizikalno-kemijske lastnosti ZU izberemo najbolj primerno metodo izdelave in najbolj ustrezen polimer, da dosežemo čim boljše učinkovitost vgrajevanja ZU in želen profil sproščanja. Z izbiro metode izdelave ND moramo ohraniti biološko aktivnost ZU, kar je še zlasti pomembno pri vgrajevanju biomolekul (5).

V naravi najdemo hidrofilne polimere, kot so želatina, hitosan, albumin, ki so primerni za izdelavo polimernih ND, čeprav se za njihovo izdelavo največkrat uporabljajo sintezni hidrofobni polimeri, kot sta polimlečna kislina (PLA) in kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA). Njihove največje prednosti so biorazgradljivost (se razgradijo v biološkem okolju oziroma v stiku s tkivom) in biokompatibilnost (v telesu ne povzročajo nikakršnih vplivov in sprememb) ter možnost nadzorovanega sproščanja ZU. Slabost njihove uporabe pa je uporaba organskih topil pri izdelavi ND. Razvoj metod za pripravo ND teži k

uporabi čim manj toksičnih reagentov, k enostavnim postopkom izdelave, ki omogočajo ekonomičen prenos proizvodnje iz laboratorijskega v industrijsko merilo (ang. *scale-up*) in k optimizaciji izkoristka izdelave ter učinkovitosti vgrajevanja ZU (5).

1.2.1 Metode izdelave polimernih ND

Postopek izdelave polimernih nanodelcev je odvisen od narave polimera in od lastnosti ZU. Do izdelave polimernih ND vodita dve poti: "od **spodaj-navzgor**", kar pomeni, da ND izdelamo z uporabo polimerizacijskih metod, vendar po izdelavi lahko ostanejo toksični zaostanki reagentov ali pa nastali ND niso biorazgradljivi. Druga pot, po kateri lahko izdelamo ND, pa je "od **zgoraj-navzdol**", kar pomeni, da ND izdelamo iz predhodno narejenih polimerov; bodisi s **postopkom emulgiranja** ali s **postopkom spontane tvorbe ND** (4).

1. Pri emulzijskih metodah je polimer lahko topen v vodi ali v organskem topilu. Če je polimer topen v vodi, potem emulgiramo vodno raztopno polimera (npr. albumin) v oljno fazo, da nastane emulzija V/O, sledi toplotna denaturacija polimera ali dodajanje snovi za premreženje (metoda primerna predvsem za vgrajevanje hidrofilnih ZU) (4).

Pri polimerih, ki so topni v organskem topilu, s postopkom visokotlačne homogenizacije ali soniciranjem pripravimo emulzije tipa O/V ali V/O/V. Če se organsko topilo z vodo ne meša, dobimo emulzijo O/V, čemur sledi odparevanje organskega topila. Za vgrajevanje hidrofilnih ZU pripravimo emulzijo V/O/V, tako da najprej vodno raztopino ZU s soniciranjem emulgiramo v raztopino polimera v organskem topilu in tako pripravimo preemulzijo V/O, ki jo nato emulgiramo v vodno fazo tako, da nastane dvojna emulzija V/O/V. Nato sledi odstranitev organskega topila. Organsko topilo, ki se delno meša z vodo (npr. etilacetat, benzilni alkohol), odstranimo z difuzijo topila, tako da emulzijo O/V razredčimo z večjo količino vodne faze. Pri tem pride do difuzije organskega topila in obarjanja ND. Če pa se organsko topilo z vodo ne meša, organsko topilo odparimo (4).

2. Pri postopku izdelave ND, kjer pride do spontanega nastanka ND, izkoriščamo razlike v topnosti ali sposobnosti geliranja raztopljenih polimerov. Npr. pri naravnih polimerih (alginat, hitosan), ki jih lahko uporabimo za dostavo peptidov in nukleinskih kislin, ND izdelamo z ionotropnim geliranjem (4).

Pri postopku izdelave ND, ki temelji na razlikah v topnosti polimerov v različnih medijih, pride do fazne separacije na dva načina. Prvi način je koacervacija ali nadzorovana desolvatacija, kjer s počasnim dodajanjem snovi za izsoljevanje vodni raztopini polimera izzovemo nastanek ND. Drug način izdelave ND, ki temelji na razlikah v topnosti polimera, pa je postopek **nanoprecipitacije**, kjer raztopini polimera, ki je topen v organskem topilu, dodamo netopilo, v katerem polimer ni topen, organsko topilo pa se popolnoma meša z vodo. Tako pride do fazne separacije ter nastanka ND (4).

Z **nanoprecipitacijo** lahko izdelamo ND iz številnih sinteznih polimerov. Običajno polimer raztopimo v acetonu, nato pa raztopino polimera injiciramo v čašo z vodno fazo, ki se meša na magnetnem mešalu. V trenutku, ko pride raztopina polimera v stik z vodno fazo, topilo, v katerem je bil raztopljen polimer, difundira v disperzni medij in pri tem pride do nukleacije in precipitacije raztopljenega polimera z ZU. V vodno fazo običajno dodamo površinsko aktivne snovi, ki zagotavljajo stabilizacijo polimernih ND. Adsorpcija stabilizatorjev na površino ND onemogoča nadaljnjo rast delcev. Izbira topila, temperatura vodne faze, vrsta stabilizatorja kot tudi njegova prisotnost v vodni fazi oziroma v raztopini polimera, so pomembni dejavniki pri izdelavi ND (4, 6).

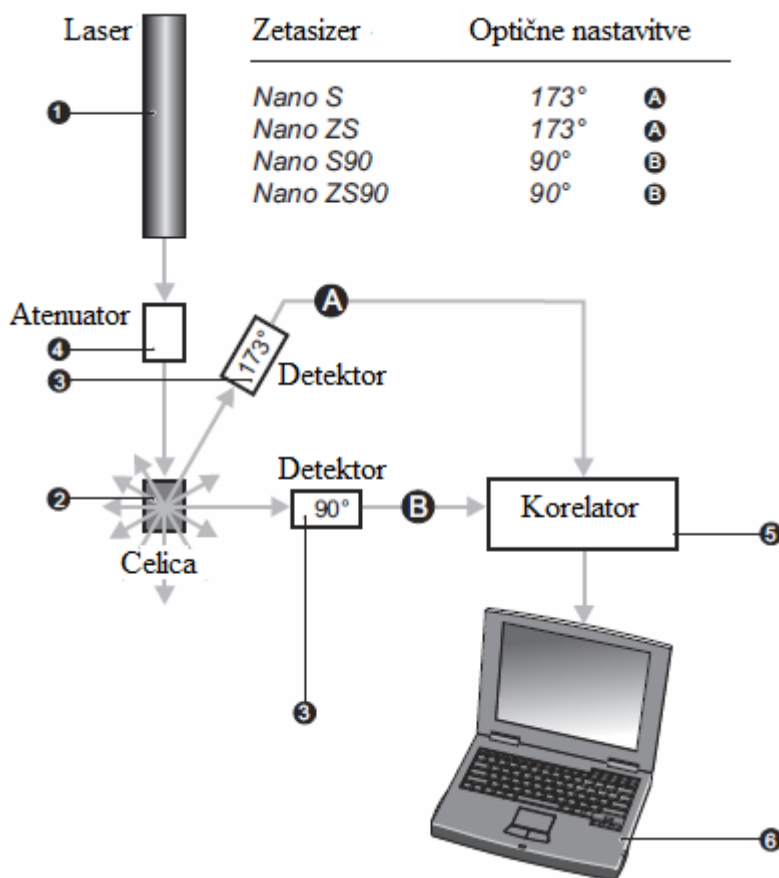
Ta enostavna metoda izdelave omogoča izdelavo ND v industrijskem merilu. V procesu izdelave nastanejo ND, natančneje nanosfere, prav tako pa lahko s podobnim postopkom izdelave naredimo tudi nanokapsule, če pri izdelavi v raztopino polimera emulgiramo majhno količino organske faze (1, 4). Metoda izdelave ND z nanoprecipitacijo je predvsem uporabna za učinkovine, ki so hidrofobne narave in imajo relativno majhno topnost v vodi. Posledično lahko dosežemo skoraj 100 % učinkovitost vgrajevanja učinkovine v ND. Na prehajanje učinkovine iz ND v zunanji medij, kadar imamo opravka z vodotopnimi učinkovinami, lahko v nekaterih primerih vplivamo tudi s spremembo pH medija, ki zmanjša ionizacijo učinkovine ter zmanjša njeno vodotopnost (6).

S tehnološkega vidika je po fazi izdelave disperzij ND potrebna faza čiščenja in vrednotenja nastalih ND (**meritev povprečne velikosti in porazdelitve velikosti ND ter določevanje učinkovitosti vgrajevanja in vsebnosti ZU v ND**) (7).

1.2.2 Velikost in porazdelitev velikosti ND

ND lahko ovrednotimo na osnovi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so oblika, velikost, površinske lastnosti, gostota in koncentracija delcev. Velikost in porazdelitev velikosti ND sta pomembna parametra, ki ju moramo ovrednotiti, da lahko zagotovimo varno uporabo ND. Površinske lastnosti so prav tako pomembne, saj površina ND vstopa v interakcije z medijem, ki jih obdaja, in po vnosu v telo z biološkim okoljem.

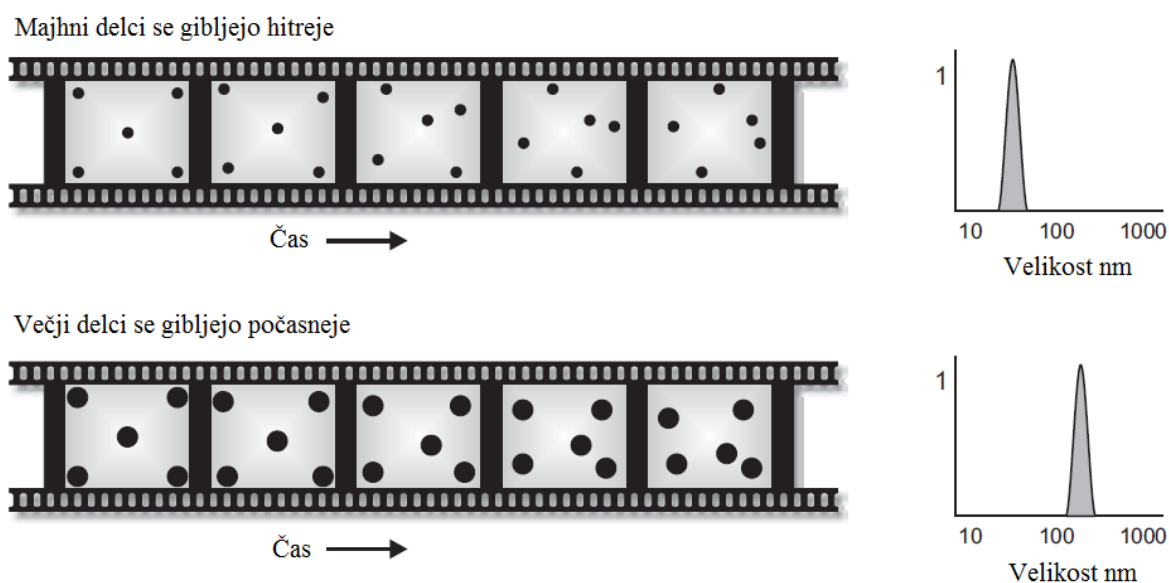
Instrument ZetaSizer Nano omogoča merjenje treh lastnosti delcev oziroma molekul v tekočem mediju: velikosti delcev, zeta potenciala in molekulske mase. Unikatna tehnologija znotraj instrumenta (slika 2) omogoča merjenje teh parametrov znotraj širokega koncentracijskega območja (8).



Slika 2: Shema instrumenta ZetaSizer Nano: 1 – laser, 2 – celica, 3 – detektor, 4 – atenuator, 5 – korelator, 6 – računalnik (8).

Povprečna hidrodinamska velikost delca je ekvivalenten premer sferičnega delca, ki difundira oziroma se giblje v vzorcu po Brownovem načelu. Pri Brownovem gibanju gre za naključno premikanje delcev v tekočini pod vplivom trkov z molekulami, ki jih obdajajo. ZetaSizer določi velikost delcev posredno preko merjenja dinamičnega sipanja laserske svetlobe na delcih, ki se Brownovo gibljejo, ter nato izračuna velikost delcev (8).

Znano je, da se manjši delci v tekočini premikajo hitreje od večjih. Če posnamemo slike porazdelitve delcev v vzorcu v časovnem razmiku 200 μ s, lahko opazimo, da so se delci premaknili, in na podlagi tega izračunamo njihovo velikost. Če je prišlo do minimalnega premika delcev in je njihov položaj približno enak kot na prvi sliki, lahko sklepamo, da je velikost delcev velika. Nasprotno, če je prišlo do večjih premikov delcev in je njihov položaj v vzorcu znatno spremenjen, gre za manjše delce (slika 3) (8).



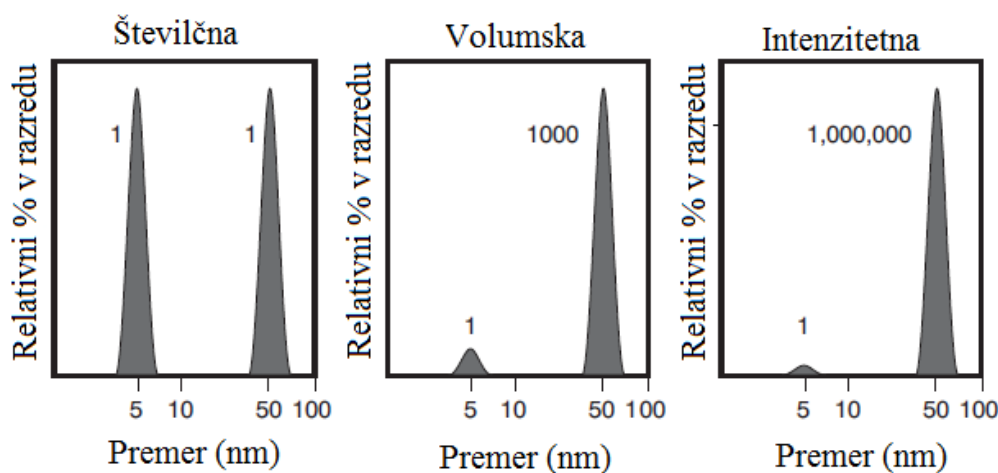
Slika 3: Spreminjanje položaja delcev v vzorcu kot posledica Brownovega gibanja delcev (8).

Metoda določanja velikosti delcev, ki temelji na dinamičnem sipanju svetlobe na dispergiranih delcih, se imenuje fotonska korelacijska spektroskopija. Na vzorec posvetimo z lasersko svetlobo, ki se na dispergiranih delcih v vzorcu sipa. Delci zaradi Brownovega gibanja povzročajo fluktuacije sipane svetlobe različnih intenzitet, kar zazna detektor, računalniški program pa pretvori oziroma preračuna v velikost delcev. Digitalni korelator znotraj instrumenta meri stopnjo primerljivosti med dvema signaloma v časovnem intervalu (1 do 10 ms). Korelacija je zelo dobra (1), če sta intenziteti signala

med seboj primerljivi, kar pomeni, da sta signala med seboj skoraj identična. Ker se delci v vzorcu gibljejo, pa korelacija s časom limitira proti 0 (8).

Ker se veliki delci gibljejo počasneje, posledično tudi intenziteta signala fluktuirata počasneje in nasprotno, pri majhnih delcih je fluktuacija intenzitete signala hitrejša zaradi hitrejšega gibanja delcev. Ko so podatki zajeti, računalniški program s pomočjo algoritmov izračuna povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev. Merilo za porazdelitev velikosti delcev v vzorcu je polidisperzni indeks (PI), ki ima vrednosti med 0 in 1. Bolj se vrednost PI približuje k 0, bolj je sistem glede na velikost dispergiranih delcev homogen, oziroma so delci monodisperzni, tj. enake velikosti. Kadar PI preseže vrednost 0,5, govorimo o polidisperznih sistemih, kjer so dispergirani delci različnih velikosti, zato je s ftonsno korelacijsko spektroskopijo izmerjena povprečna velikost delcev manj zanesljiva (8).

Kot rezultat meritve lahko aparatura poda porazdelitev velikosti delcev v vzorcu na podlagi intenzitete sipane svetlobe, na podlagi volumna populacij delcev v vzorcu ali na podlagi njihovega števila v vzorcu. Na sliki 4 je predstavljena razlika med intenzitetno, volumsko in številčno porazdelitvijo velikosti delcev v vzorcu, ki vsebuje enako število delcev dveh različnih velikosti (5 nm in 50 nm) (8).



Slika 4: Grafični prikaz intenzitetne, volumske in številčne porazdelitve velikosti delcev v vzorcu, ki vsebuje enako število delcev velikosti 5 nm in 50 nm (8).

Na prvem grafu (slika 4), ki prikazuje številčno porazdelitev, sta vrhova enake velikosti, ker je v vzorcu enako število delcev obeh velikosti.

Na drugem grafu (slika 4), ki prikazuje volumsko porazdelitev, je površina vrha delcev velikosti 50 nm 1000-krat večja v primerjavi z vrhom, ki predstavlja delce velikosti 5 nm.

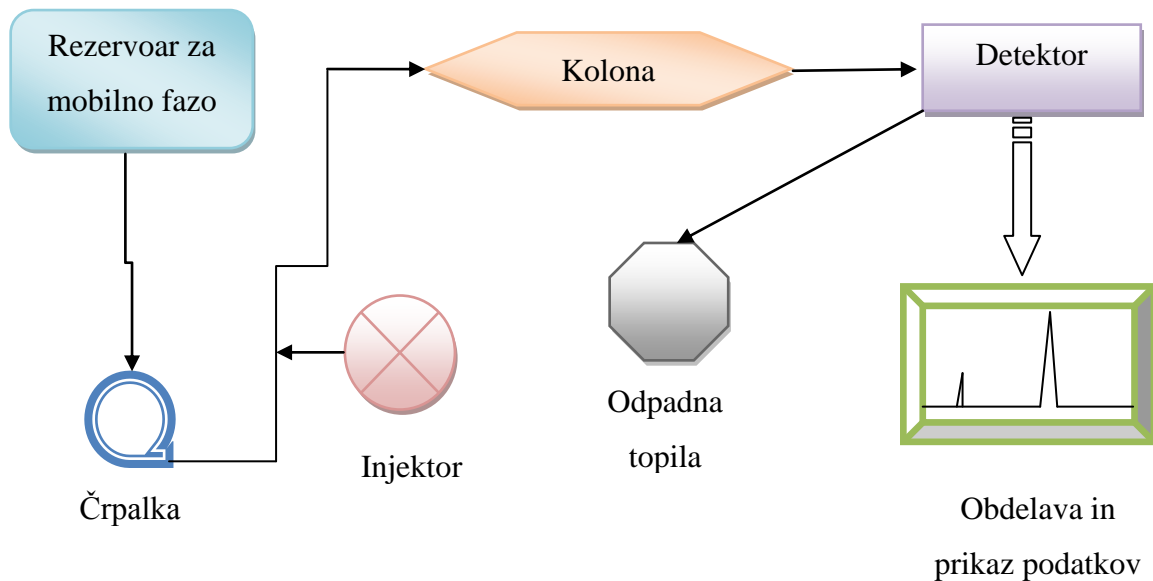
Razlika izhaja iz razlik v volumnu posameznih delcev, saj je volumen delca velikosti 50 nm 1000-krat večji v primerjavi z volumnom delca z velikostjo 5 nm, kar sledi iz enačbe za volumen okroglega delca ($V = \frac{3}{4}\pi(r)^3$).

Na tretjem grafu (slika 4), ki prikazuje intenzitetno porazdelitev velikosti delcev, je površina vrha, ki predstavlja delce z velikostjo 50 nm, 1.000.000-krat večja od vrha, ki predstavlja delce z velikostjo 5 nm. Razlika nastane zaradi razlik v sipanju svetlobe na večjih in manjših delcih. Večji delci sipajo mnogo več svetlobe kot manjši, saj je po Raylijevi aproksimaciji intenziteta sipanja svetlobe delcev sorazmerna šesti potenci premera delcev. Poudariti je potrebno, da je osnovni rezultat meritev intenzitetna porazdelitev velikosti delcev v vzorcu (poznati moramo viskoznost in lomni količnik disperznega medija), ostali porazdelitvi pa sta preračun le-te, ob poznavanju parametrov vzorca: lomnega količnika dispergiranih delcev in njihovih absorpcijskih lastnosti (8).

1.2.3 Določevanje vsebnosti vgrajene ZU

Učinkovitost vgrajevanja in vsebnost ZU v ND običajno vrednotimo posredno tako, da v supernatantu disperzije ND po ultracentrifugiranju določimo vsebnosti nevgrajene ZU z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ki je v analitiki najbolj pogosto uporabljena metoda za določevanje najrazličnejših substanc v vzorcih (7).

HPLC kromatograf je sestavljen iz štirih glavnih med seboj povezanih delov (slika 5): rezervoarjev za mobilno fazo, injektorja, kromatografske kolone in detektorja. Vsak izmed osnovnih delov ima še dodatne komponente, ki zagotavljajo optimalno delovanje aparature. Črpalka zagotavlja enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono in s tem ponovljive kromatografske parametre. Injektor je instrumentalni sklop, ki omogoča vnos vzorca v tok mobilne faze pred vstopom v kromatografsko kolono. Kromatografska kolona je pglavni del sistema, saj na njej poteka ločevanje komponent vzorca. Sestavljena je iz kovinskega ogrodja različnih dolžin (5-30 cm) in različnih notranjih premerov (3-5 mm). Kolona je napolnjena z različnimi polnili oziroma stacionarnimi fazami (9).



Slika 5: Shema HPLC sistema.

Detektor je instrumentalni sklop, ki zazna prisotnost spojin na izhodu iz kolone, tako da meri spremembo v fizikalni lastnosti mobilne faze (npr. lomni količnik, dielektrično konstanto), ki jo povzroči prehod spojine skozi pretočno merilno celico detektorja, ali zazna spojine na podlagi spremembe absorbance. Odziv vzorca nato detektor prevede v električni signal. Najpogosteje se uporabljajo UV-VIS detektorji, ki merijo absorbanco vzorca v ultravijoličnem ter v vidnem spektru svetlobe. Imajo široko uporabnost, veliko občutljivost, selektivnost in točnost. Korelacijo med absorbanco vzorca in koncentracijo analita v vzorcu podaja Beer-Lambertov zakon (enačba 1), ki ga s pridom uporabljamo za kvantitativno določanje koncentracij spojin v vzorcu (10).

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Enačba 1: Beer-Lambertov zakon

A = absorbanca vzorca

ε = molarni absorpcijski koeficient

b = dolžina poti svetlobe

c = koncentracija analita

Vsebnost spojin v vzorcu običajno določamo po metodi zunanjega standarda. Metoda temelji na pripravi umeritvene krivulje. Tako standarde kot vzorce analiziramo pod enakimi pogoji. Odziv raztopine vzorca primerjamo z odzivom standardne raztopine in ob upoštevanju redčitev in koncentracij izračunamo vsebnost analita v preiskovanem vzorcu.

1.3 ULTRACENTRIFUGIRANJE

Analitsko ultracentrifugiranje je fizikalna metoda ločevanja dispergiranih (koloidnih) delcev od disperznega medija. Pod besedo "delec" ponavadi razumemo več pojmov, kot so npr. celice, celični organeli, velike molekule ali pa preprosto delci oziroma ND. Odvisno od sistema, lahko iz rezultatov ultracentrifugiranja dobimo podatke o gostoti, sestavi in obliki delcev ter porazdelitvi velikosti delcev. Lahko ga uporabljamo za vrednotenje interakcij topil, ugotavljanju stehiometrije povezovanja makromolekul ter tvorbe različnih proteinskih kompleksov. Zaradi velikega potenciala pri vrednotenju makromolekul ima analitsko ultracentrifugiranje pomembno vlogo v biokemiji, biotehnologiji ter na področju proučevanja polimerov in ND (11).

Ultracentrifugiranje je metoda, ki se zelo pogosto uporablja pri čiščenju ND in ločevanju vgrajene in nevgrajene ZU v disperziji ND. Je separacijska metoda, ki temelji na uporabi centrifugalne sile, ki povzroči pospešeno posedanje delcev. Z vrtenjem rotorja se ustvari močno gravitacijsko polje in na vsak posamezen delec v disperziji deluje centrifugalna sila, zaradi katere se delci pospešeno posedajo na dno centrifugirke kot oborina, preostanek vzorca nad oborino po centrifugiranju pa imenujemo supernatant.

Ultracentrifuga (slika 6) je sestavljena iz rotorja, motorja, vakuumske črpalke, hladilnega sistema in sistema senzorjev v povezavi z integriranim računalnikom. Rotor je snemljivi del v katerega vstavimo centrifugirke napolnjene z vzorcem. Poznamo 3 osnovne tipe rotorjev: rotorji z nihajočo košarico, vertikalne rotorje in rotorje s stalnim naklonom. Rotorji so narejeni iz različnih materialov, najpogosteje iz titana, aluminija in ogljikovih vlaken (13). Motor skupaj s senzorji v povezavi z računalniškim sistemom skrbi za enakomerno pospeševanje oz. pojemanje vrtenja rotorja. Senzorji skrbijo za natančno uravnavanje hitrosti, kot tudi za varnost ultracentrifugiranja, tako da v začetku cikla centrifugiranja pri cca. 4000 obr/min sistem preverja, ali je v napravi pravilno nameščen rotor in ali je tudi ustrezno uravnovešen (12).

Ker se pri ultracentrifugi rotorji vrtijo s hitrostjo več kot 15.000 obr/min, je centrifuga opremljena z vakuumsko črpalko, ki v prostoru z rotorjem ustvari podtlak, tako da je upor pri vrtenju rotorja čim manjši. Pri velikih hitrostih in daljših časih centrifugiranja se rotor z vzorci segreva, zato ima ultracentrifuga integriran tudi sistem hlajenja, s katerim zagotavljamo enakomerno temperaturo skozi celoten cikel centrifugiranja, kar omogoča ultracentrifugiranje tudi termo labilnih vzorcev (12).



Slika 6: Ultracentrifuga serije WX ULTRA 100 in rotor T- 1250 .

Hitrost sedimentacije delcev (slika 7) opisuje Stokes-ov zakon (enačba 2), ki predpostavlja, da so v vzorcu dispergirani sferični delci. Hitrost posedanja delcev je odvisna od velikosti, gostote in oblike dispergiranih delcev ter od gostote in viskoznosti disperznega medija, kakor tudi od hitrosti centrifugiranja (14).

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_1)}{18\mu} \times g$$

Enačba 2: Stokes-ova enačba za sedimentacijo sferičnih delcev v gravitacijskem polju.

v = hitrost sedimentacije oz. hitrost delca

d = premer delca

ρ_p = gostota delca

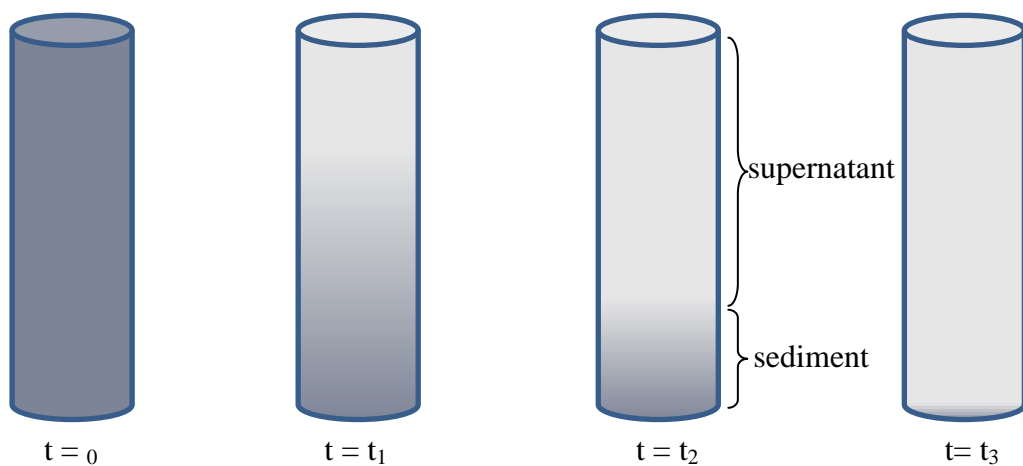
ρ_1 = gostota disperznega medija

μ = viskoznost disperznega medija

g = sila gravitacije

Na podlagi Stokes-ovega zakona lahko zaključimo naslednje:

1. Hitrost sedimentacije delca je sorazmerna z njegovo velikostjo.
2. Hitrost sedimentacije delca je sorazmerna razliki med gostotama delca in disperznega medija.
3. Hitrost sedimentacije je enaka nič, kadar sta gostoti delca in tekočega medija enaki.
4. Hitrost sedimentacije pada, kadar narašča viskoznost disperznega medija.
5. Hitrost sedimentacije narašča, kadar narašča tudi gravitacijska sila.

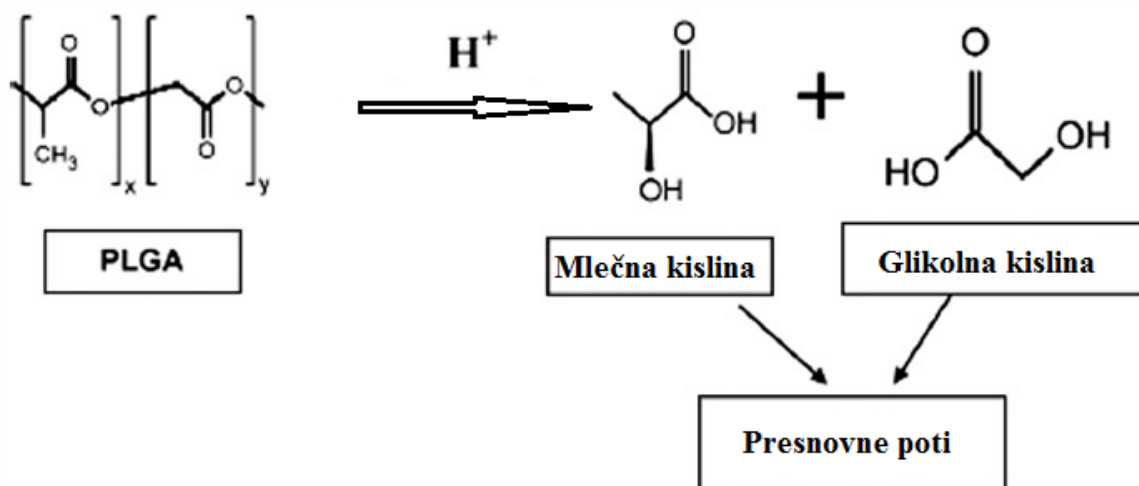


Slika 7: Shema sedimentacije delcev v odvisnosti od časa centrifugiranja.

1.4 IZHODNI MATERIALI ZA IZDELAVO POLIMERNIH ND

1.4.1 Polimeri

Med najbolj pogosto uporabljanimi polimeri za izdelavo biorazgradljivih nanodelcev so polimlečna kislina (PLA), poliglikolna kislina (PGA) in njuni kopolimeri (PLGA). Ti polimeri so sprejemljivi zaradi njihove biokompatibilnosti, prav tako je mogoče s spreminjanjem razmerja med PLA in PGA v kopolimeru nadzorovati hitrost njegove razgradnje in s tem vplivati na hitrost sproščanja ZU. Zaradi biorazgradljivosti polimerov se le-ti v biološkem okolju v določenem časovnem obdobju razgradijo in ne predstavljajo nevarnosti za človeka. PLGA se v telesu razgradi na netoksično mlečno in glikolno kislino (slika 8), ki se lahko metabolizirata skozi Krebsov cikel. Prav zaradi omenjenih lastnosti so ti polimeri primerni za izdelavo dostavnih sistemov z nadzorovanim sproščanjem ZU (15).

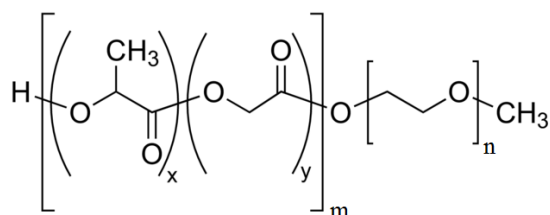


Slika 8: Hidroliza polimera PLGA (15).

Sestava polimera je običajno definirana z razmerjem monomerov v kopolimeru, npr. PLGA 50:50 je sestavljen iz 50 % PLA in 50 % PGA. Tako ločimo različne vrste PLGA:

- Resomer RG 502H; PLGA 50:50, molekulska masa 7.000 - 17.000 g/mol, polimerna veriga se zaključuje s karboksilno skupino.
- Resomer RG 502S; PLGA 50:50, molekulska masa 7.000 - 17.000 g/mol, polimerna veriga se zaključuje z estersko skupino.
- Resomer RG 503H; PLGA 50:50, molekulska masa 24.000 - 38.000 g/mol, polimerna veriga se zaključuje s karboksilno skupino.

- Resomer RGP d50155; PEG:PLGA (50:50), PEG molekulska masa ~ 5.000 g/mol, PLGA molekulska masa ~ 55.000 g/mol (slika 9).



Slika 9: Struktura Resomera RGP d50155 ; m –število enot PLGA (x – število enot mlečne kisline, y – število enot glikolne kisline), n - število enot etilenoksida.

1.4.2 Stabilizatorji

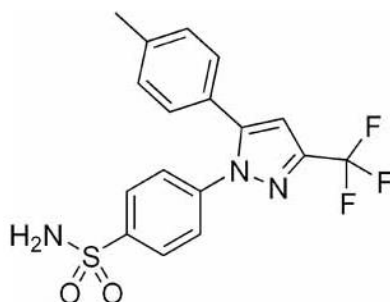
Na stabilnost izdelanih ND vplivamo s površinsko aktivnimi snovmi, ki omogočajo fizikalno stabilizacijo disperzije ND. Pomanjkljiva fizikalna stabilizacija vodi do sedimentacije, aglomeracije ter rasti delcev. Mehanizma, s katerima zagotavljamo stabilnost koloidnih vodnih in nevodnih disperzij ND, sta sterična in elektrostatska stabilizacija, ki ju dosežemo z dodatkom ionogenih in neionogenih stabilizatorjev v disperzni medij. Z dodatkom ionogenih stabilizatorjev dosežemo elektrostatsko stabilizacijo ND. Za sterično stabilizacijo pa običajno uporabljamo amfifilne neionogene stabilizatorje. Sterični stabilizator se z enim delom absorbira na površino ND, z drugim dobro solvatiranim delom pa se usmeri v disperzni medij (7).

Primeri steričnih stabilizatorjev sta

- Poloksamer 188, ki je sintezni blok kopolimer etilenoksida in propilenoksida. Je amfifilna molekula v kateri osrednji lipofilni del obdaja na vsaki strani po ena hidrofilna veriga.
- Polivinilalkohol (PVA), Mowiol 4-98, je vodotopen polimer, ki se uporablja kot sterični stabilizator koloidnih disperzij.

1.4.3 Celekoksib

Celekoksib (slika 10) je zdravilna učinkovina, nesteroidni antirevmatik, selektivni COX-2 zaviralec, ki zavira encim ciklooksigenazo COX-2. Le-ta je odgovorna za nastajanje prostaglandinov, ki imajo pomembno vlogo pri povzročanju bolečin in vnetij, zato se celekoksib uporablja kot protivnetna in protirevmatična učinkovina za lajšanje bolečin ter za zdravljenje artritisa.



Slika 10: Kemijska zgradba molekule celekoksiba (16).

Topnost celekoksiba v vodi je 5,6 µg/ml pri pH 6,8 in temperaturi 25 °C (16). Učinkovina je lipofilna in sodi v II. razred biofarmacevtske klasifikacije (BCS) (učinkovina je težko topna in dobro permeabilna).

2 NAMEN DELA

Pri izdelavi formulacij ND pogosto uporabljamo ultracentrifugiranje pri čiščenju disperzij ND ali pri določanju vsebnosti in učinkovitosti vgrajevanja ZU. Pri postopku ultracentrifugiranja kot osnovna parametra spreminjamo hitrost in čas centrifugiranja. Pri izbrani hitrosti in času centrifugiranja pa ne moremo z gotovostjo trditi, da so se v vzorcu posedli vsi ND, kar je lahko vzrok za signifikantno napako. V okviru magistrske naloge bomo na izdelanih disperzijah polimernih nanodelcev ovrednotili, kakšen je vpliv izbranih pogojev ultracentrifugiranja na rezultat določanja nevgrajene učinkovine v supernatantu.

V magistrski nalogi bomo najprej optimizirali izdelavo polimernih ND z metodo nanoprecipitacije. Uporabili bomo biorazgradljiv in biokompatibilen polimer PLGA ali PEG-PLGA, zdravilno učinkovino celekoksib ter različne stabilizatorje. Poskušali bomo izdelati ND dveh različnih velikosti in oceniti, kakšen vpliv ima velikost ND na vgrajevanje ZU in kakšen je vpliv velikosti ND na proces ultracentrifugiranja oziroma posedanja delcev. Izdelanim ND bomo s PCS ovrednotili povprečno velikost in PI. Pripravljeno disperzijo ND bomo centrifugirali pri različnih hitrostih centrifugiranja (od 5.000 do 45.000 obr/min) različno dolgo (5, 10 in 15 min). Po vsakem ciklu centrifugiranja bomo odvzeli alikvot supernatanta za analizo povprečne velikosti in PI ND ter za HPLC analizo vsebnosti ZU v supernatantu.

S povečevanjem hitrosti centrifugiranja in podaljševanjem časa centrifugiranja bomo ugotavljali, pri katerih parametri centrifugiranja lahko trdimo, da so se posedli "vsi" ND in tako lahko v supernatantu pravilno določimo le nevgrajeno učinkovino ter kakšno napako naredimo, če vzorec centrifugiramo pri premajhni hitrosti. S HPLC analizo bomo v supernatantu določili nevgrajeno ZU in tako posredno določili učinkovitost vgrajevanja ZU v ND.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

Izdelava nanodelcev

Polimeri

- PLGA:
 - Resomer RG 502H (Boehringer Ingelheim, Nemčija)
 - Resomer RG 502S (Boehringer Ingelheim, Nemčija)
 - Resomer RG 503H (Boehringer Ingelheim, Nemčija)
- PEG –PLGA: Resomer RGP d50155 (Boehringer Ingelheim, Nemčija)

Zdravilna učinkovina

- Celekoksib 2010 (Lek d.d., Slovenija)

Stabilizatorja

- Poloksamer 188 (Lutrol F68) (BASF, Nemčija)
- PVA (Mowiol 4-98) (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Topila

- Aceton, CH_3COCH_3 , ACS reag. Ph. Eur (Merck, Nemčija)
- Prečiščena voda (pripravljena na FFA)

Mobilna faza za HPLC

- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MM=138 g/mol (Merck, Nemčija)
- Fosforna kislina, H_3PO_4 , 85%, MM=98 g/mol (Merck, Nemčija)
- Acetonitril, CH_3CN , ACS reag. Ph. Eur (Merck, Nemčija)
- Metanol CH_3OH , ACS reag. Ph. Eur (Merck, Nemčija)

3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR

- Analitska tehtnica Mettler Tolledo XS205; Dual range
- Aparat za pripravo ultra čiste vode Advantage A10 TOC (Millipore, ZDA)
- Brizge Discardit 2 ml, 5 ml, 10 ml (BD Discardit, Indija)
- Elektronske pipete e 5000 (100-5000 μ l), e 1000 (50-1000 μ l) (Biohit, Nemčija)
- Filtri z velikostjo por 0,2 μ m (Phenomenex, ZDA)
- HPLC-instrument (Agilent, 1100 Series, ZDA), kolona Hypersil ODS C₁₈, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Thermo Scientific)
- Injekcijske igle 1,2 x 50 mm 418 (Tik, Slovenija)
- Magnetno mešalo (IKA-WERKE, Nemčija)
- Magnetno mešalo z grelnikom; Rotamix 560 MMH (Tehtnica, Slovenija)
- Naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- pH meter S220 Seven CompactTM pH/Ion (Mettler Toledo, ZDA)
- Precizna tehtnica Vibra AJ 1200 CE (Tehtnica, Slovenija)
- Pipetni nastavki in kapalke (Biohit, Nemčija)
- Ultracentrifuga Sorvall WX ultra 100 (Thermo Scientific)
- Ultrazvočna kopel Sonis 2GT (Iskra-PIO, Slovenija)
- Staklovina: steklene merilne bučke (10,0 ml, 20,0 ml, 100,0 ml), čaše (50 ml, 100 ml, 250 ml) (Brand, Nemčija)
- Termometer do 250 °C (Brand, Nemčija)

3.3 METODE

3.3.1 Izdelava polimernih ND

Ker je med nastajanjem ND potrebno le-te stabilizirati, da ne pride do kosmičenja oziroma združevanja nastalih ND, smo za stabilizacijo uporabili 5 % (m/m) raztopino PVA in 5 % (m/m) raztopino poloksamera 188 v različnih razmerjih ter v različnih koncentracijah glede na volumen vodne faze, v katero smo injicirali raztopino polimera z zdravilno učinkovino.

Priprava raztopin stabilizatorjev

- 5 % (m/m) raztopina PVA
100 ml čašo z magnetkom smo stehali in si zapisali maso. Dolili smo ~25 ml prečiščene vode in čašo postavili na magnetno mešalo z integriranim grelnikom ter pokrili z urnim steklom. Vodo smo segrevali do ~ 80-90 °C in nato med mešanjem dodali 2,50 g PVA. Ko se je le-ta v celoti raztopil, smo dodali še ~ 22,5 ml prečiščene vode. Ko se je raztopina ohladila, smo čašo z raztopino stehali in dodali prečiščeno vodo do skupne mase raztopine 50 g.
- 5 % (m/m) raztopina poloksamera 188
50 ml čašo z magnetkom smo stehali in zapisali maso. Natehtali smo 2,50 g poloksamera 188 in dodali ~ 40 ml prečiščene vode ter mešali na magnetnem mešalu. Ko se je ves poloksamer 188 raztopil, smo čašo z raztopino stehali in dodali prečiščeno vodo do skupne mase 50 g in raztopino dobro premešali.

Priprava raztopine polimera in ZU

- V plastično centrifugirko smo natehtali polimer in zdravilno učinkovino v različnih razmerjih (preglednice II-V). Uporabili smo različne polimere: Resomer RG 502H, Resomer RG 503H, Resomer RG 502S in Resomer RGP d50155. Nato smo dodali ustrezen volumen acetona (preglednice II-V), v katerem sta se tako učinkovina kot polimer raztopila. Vsebino centrifugirke smo dobro premešali ter jo za 30 s delno potopili v ultrazvočno kopel.

Izdelava ND z metodo nanoprecipitacije

V 250 ml čašo smo natehtali 186 g prečiščene vode ter dodali 14 g raztopine stabilizatorja: 5 g PVA (5 %, m/m) in 9 g poloksamera 188 (5 %, m/m). Nato smo v čašo dodali magnet in jo postavili na magnetno mešalo. Med mešanjem vodne raztopine s stabilizatorjem smo vanjo počasi z brizgo injicirali raztopino polimera z učinkovino v acetonu (slika 11). Čas injiciranja je znašal ~ 5 do 10 s. Ker se aceton in voda dobro mešata, so ob injiciranju raztopine acetona začeli izpadati ND (slika 12), saj polimer v vodi ni topen, prav tako pa je v vodi težko topna tudi uporabljena ZU.



Slika 11: Vodna raztopina stabilizatorja med mešanjem, pred injiciranjem raztopine polimera z učinkovino.



Slika 12: Nastanek ND, kar je razvidno iz opalescence vzorca.

Razlika med vodno raztopino stabilizatorja in vodno disperzijo ND je bila zelo očitna zaradi opalascence vzorca, kjer so bili prisotni ND (slika 13). Aceton, ki smo ga injicirali v vodno raztopino, je izhlapel, saj se je čaša z disperzijo ND mešala še ~ 24 h po izdelavi. Po 24 h smo čašo z disperzijo ND stekali in dopolnili do skupne mase disperzije ND 200 g.



Slika 13: Primerjava vodne raztopine stabilizatorja (leva čaša) in vzorca polimernih ND (desna čaša).

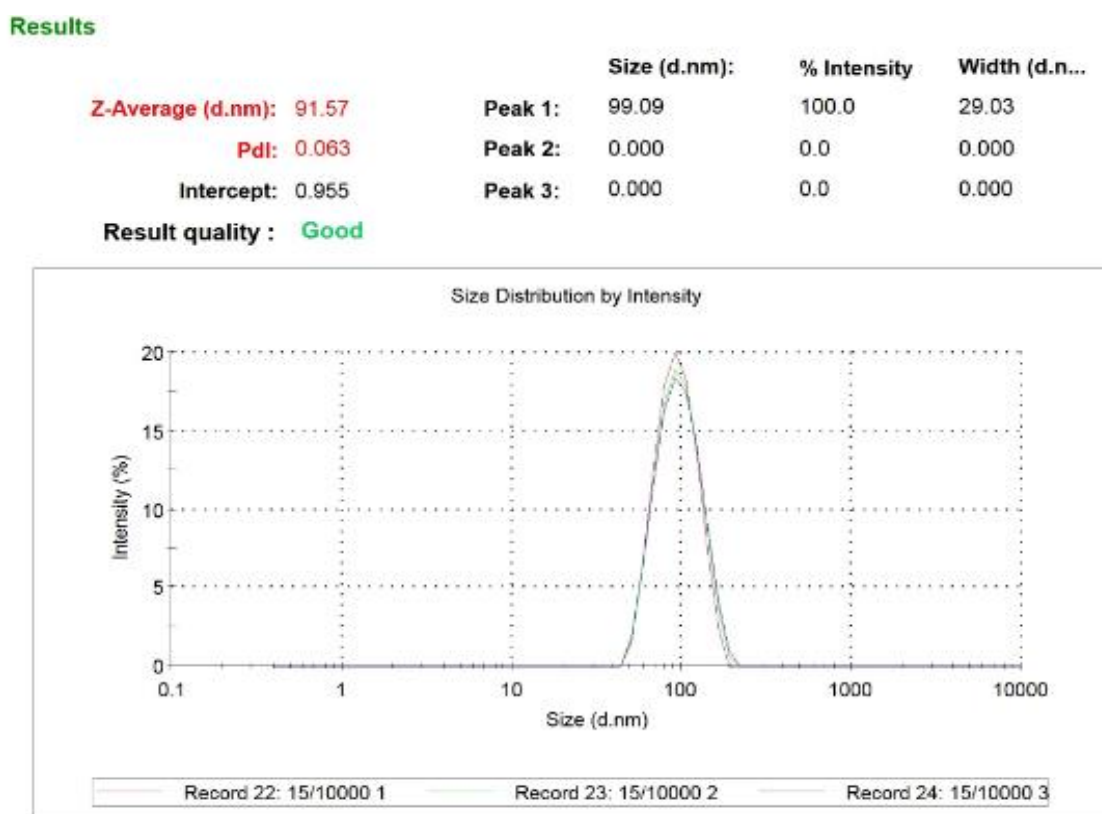
3.3.2 Določanje povprečne velikosti ND v disperziji

Velikost nastalih ND smo merili z metodo PCS z aparaturo Zetasizer Nano ZS. Meritve smo izvajali na vzorcih takoj po pripravi ND in v različnih časovnih presledkih. V namensko plastično kiveto dimenzij 1 cm x 1 cm s pokrovčkom smo odpipetirali ~ 1 ml disperzije ND. V kiveti ni smelo biti prisotnih mehurčkov zraka, saj bi le-ti motili pot laserskega žarka in posledično bi bile meritve napačne. Kiveta je imela na stranici markacijo, tako da smo jo v celico aparature vstavili vedno v enaki poziciji, zunanje stene kivete z vzorcem so morale biti suhe in brez prstnih odtisov.

V računalniški program, ki je nadzoroval delovanje aparature, smo vnesli parametre za meritve:

- Disperzni medij: voda
- Temperatura meritve: sobna, 25 °C
- Število meritev: 3

Velikost delcev smo izmerili takoj po izdelavi in nato po 24 h oziroma pred začetkom ultracentrifugiranja. Med posameznimi cikli centrifugiranja smo iz centrifugirke s pipeto pazljivo odvzeli alikvot vzorca za meritve velikosti ND ter alikvot vzorca za HPLC meritev vsebnosti celekoksiba. Posebna pazljivost je bila potrebna z razlogom, saj je že najmanjša vibracija oz. motnja povzročila redispergiranje ND iz usedline po centrifugiranju. Primer meritve povprečne velikosti in polidisperznosti disperzije ND prikazuje slika 14.



Slika 14: Primer rezultata treh ponovitev meritev povprečne velikosti in PI vzorca ND na Zetasizerju Nano ZS.

3.3.3 Ultracentrifugiranje disperzije ND

Ultracentrifugiranje je potekalo na Ultracentrifugi WX Ultra 100, Thermo Scientific. V meniju aparature smo nastavili oziroma spreminjali parametre:

- tip rotorja: T-1250,
- temperatura komore z rotorjem: 20 °C
- čas centrifugiranja: 5 min, 10 min ali 15 min,
- hitrost centrifugiranja v razponu 5.000 - 45.000 obr/min v korakih po 5.000 obr/min.

Na ND v disperznem mediju je delovala centrifugalna sila, ki je odvisna od dveh parametrov: hitrosti centrifugiranja in tipa uporabljenega rotorja za centrifugiranje (preglednica I) .

Preglednica I: Hitrost centrifugiranja in centrifugalna sila pri ultracentrifugiranju z uporabo rotorja T-1250.

Hitrost centrifugiranja (obr/min) x 1000	Centrifugalna sila
5	3.000 x g
10	12.000 x g
15	27.100 x g
20	48.200 x g
25	75.300 x g
30	108.400 x g
35	147.500 x g
40	192.700 x g
45	243.800 x g

Disperzijo ND smo iz čaše prelili v 300 ml erlenmajerico in mešali na magnetnem mešalu, da smo zagotovili homogenost vzorca. Iz erlenmajerice smo odpipetirali 15 ml alikvota vzorca za centrifugiranje, jih napolnili v centrifugirke, ki smo jih pokrili s pokrovčkom s tesnilom ter jih zatesnili s kovinsko matico (slika 15). Vzorce smo centrifugirali 5 min s hitrostjo 5.000 obr/min ter nato po korakih povečevali hitrost centrifugiranja vse do 45.000 obr/min. Nato smo v drugem sklopu eksperimenta nastavili čas centrifugiranja na 10 min in ponovno povečevali hitrost centrifugiranja od 5.000 do 45.000 obr/min. Eksperiment smo ponovili še s časom centrifugiranja 15 min.

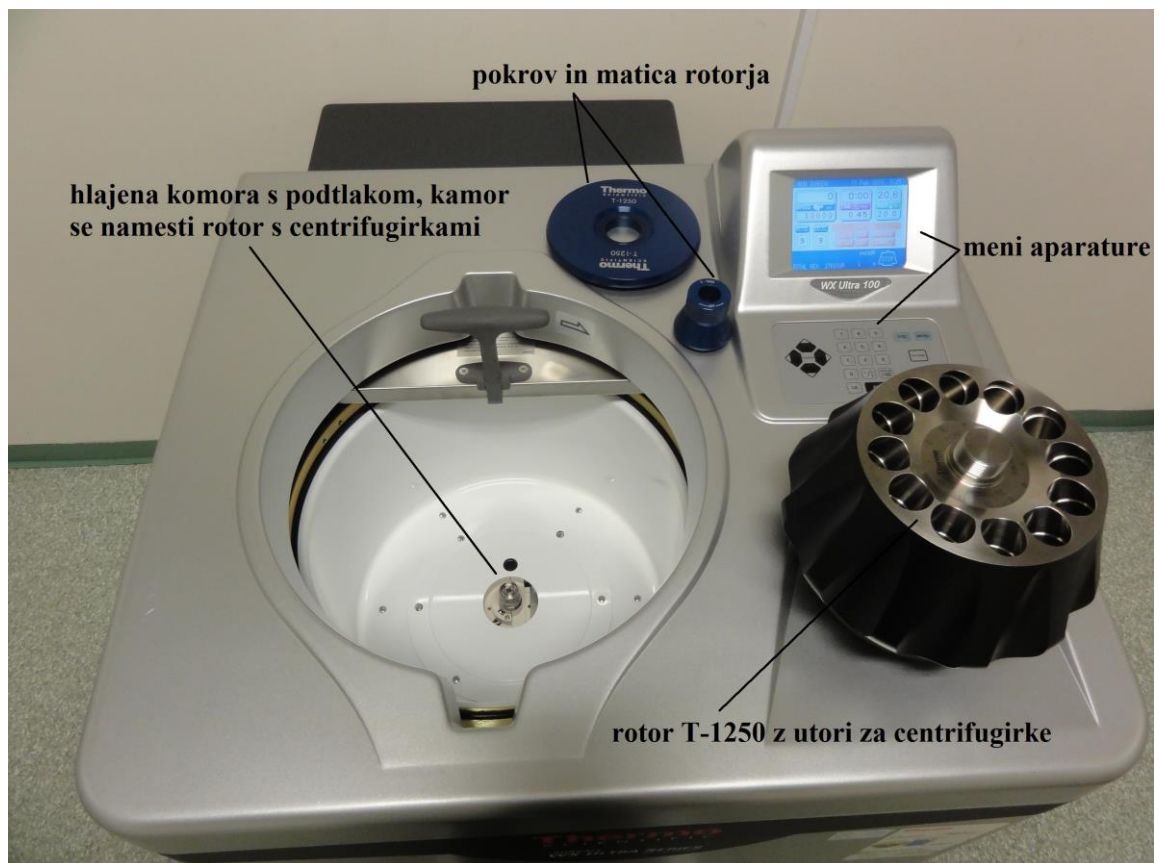


Slika 15: Centrifugirki za uporabo v ultracentrifugi.

Tesnjenje centrifugirk med ultracentrifugiranjem je zelo pomembno, saj je v komori med delovanjem aparature podtlak. V rotor smo zaradi uravnovešenosti med vrtenjem namestili centrifugirki tako, da sta si stali nasproti. V eni centrifugirki smo imeli vodo (utež), v drugi centrifugirki se je nahajala disperzija ND. Rotor smo pokrili s pokrovom rotorja, ki je imel utor s tesnilom in matico, s katero smo vanj zaprli centrifugirki. Rotor smo s pazljivostjo namestili v komoro centrifuge, zaprli pokrov in pričeli postopek centrifugiranja (slika 16).

Najprej je potekalo vakuumiranje komore z rotorjem. Med to fazo se je rotor vrtel s hitrostjo do 4.000 obr/min. Pri tej hitrosti rotorja je aparatura preverila, ali se v komori

nahaja rotor, ki smo ga predhodno izbrali v meniju aparature. Ko je bil dosežen ustrezen podtlak, je hitrost centrifugiranja začela naraščati do nastavljene vrednosti. Istočasno je potekalo hlajenje rotorske komore. Ko je rotor dosegel želeno hitrost, se je pričel odštevati čas, ki smo ga nastavili kot čas centrifugiranja. Po zaključenem ciklu centrifugiranja je začela hitrost rotorja počasi pojemati, dokler se le-ta ni ustavil, na kar nas je aparatura opozorila z zvočnim signalom. Nato smo v komori centrifuge izenačili tlak z zunanjim in previdno odprli komoro ter zelo previdno odstranili rotor s centrifugirkama. Pazljivo smo odprli rotor ter centrifugirko in iz nje odvzeli alikvot supernatanta vzorca za meritve. Vsak tresljaj pri odstranitvi rotorja oziroma odvzemu vzorca, ki je povzročil delno redispergiranje sedimenta, se je kasneje izrazil pri meritvi povprečne velikosti ND.



Slika 16: Posamezni deli ultracentrifuge Sorvall WX Ultra 100.

3.3.4 HPLC analiza celekoksiba

S HPLC metodo smo v vzorcih določevali vsebnost učinkovine celekoksiba. Za vrednotenje rezultatov smo najprej pripravili umeritveno krivuljo celekoksiba, na podlagi katere smo nato določali vsebnosti celekoksiba v vzorcih.

Delo je potekalo na HPLC instrumentu Agilent 1100. Za kromatografsko ločitev smo uporabljali kolono Hypersil ODS C₁₈ z dimenzijami 250 x 4,0 mm, 5 µm proizvajalca Thermo Scientific. Za delo smo si predhodno pripravili mobilno fazo in standardne raztopine celekoksiba. Pri delu smo uporabljali lahko hlapna topila, zato je delo potekalo v digestoriju.

Priprava pufrne raztopine (NaH₂PO₄ x 2H₂O, pH 4,00)

- V tehtič smo natehtali 1,56 g NaH₂PO₄ x 2H₂O, ki smo ga s pomočjo prečiščene vode kvantitativno prenesli v 1000 ml merilno bučo z magnetom ter bučo postavili na magnetno mešalo ter mešali, da se je v celoti raztopil. Nato smo s fosforno kislino umerili pH na 4,00 in odstranili mešalo ter s prečiščeno vodo dopolnili do merilne oznake na buči.

Priprava mobilne faze

- V 1000 ml čašo smo nalili 450 ml pufrne raztopine (NaH₂PO₄ x 2H₂O, pH 4,00), 450 ml acetonitrila in 100 ml metanola. Mobilno fazo smo dobro premešali in na ultrazvočni kopeli razplinili (~5 min).

Priprava standardne raztopine celekoksiba

- V 200 ml bučko smo natančno natehtali približno 20,0 mg celekoksiba in z mobilno fazo dopolnili do oznake volumna ter raztopino dobro premešali. Nato smo dobljeno raztopino ustrezno naprej redčili in iz osnovne raztopine pripravili 6 raztopin standarda celekoksiba v koncentracijskem območju 0,2 µg/ml - 18 µg/ml.

Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo pokrili območje pričakovanih koncentracij ZU v preiskovanih vzorcih, tj. od 1 % do 100 % teoretične koncentracije učinkovine, ki smo jo uporabili pri izdelavi ND.

Priprava vzorcev supernatanta po ultracentrifugiranju za HPLC analizo

Najprej smo supernatant po ultracentrifugiranju liofilizirali, a liofilizata v različnih topilih (acetone, etilacetat, metanol, acetonitril) nismo uspeli v celoti raztopiti, zato smo vzorce za HPLC analizo pripravljali neposredno po ultracentrifugiranju, tako kot je opisano v nadaljevanju.

- V 1,5 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali 0,5 ml supernatanta in nato dodali še 0,5 ml raztopine acetonitrila in metanola v volumskem razmerju 9:1. Mikrocentrifugirke smo dobro pretresli in za nekaj sekund potopili v ultrazvočno kopel. Nato smo vzorec iz mikrocentrifugirke prefiltrirali skozi 0,2 μm filter neposredno v 2 ml vialo.
- Pri vzorcih, ki smo jih za analizo shranili in so tako v mikrocentrifugirkah čakali na analizo 10 dni, smo pripravili 2 vzorca za HPLC analizo. Iz osnovne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 0,5 ml vzorca v novo mikrocentrifugirko in dodali 0,5 ml raztopine acetonitrila in metanola v volumskem razmerju 9:1, dobro premešali in vzorec za nekaj sekund potopili v ultrazvočno kopel. V osnovno mikrocentrifugirko smo dodali 0,5 ml raztopine acetonitrila in metanola v volumskem razmerju 9:1, zaprli in dobro premešali ter vzorec potopili v ultrazvočno kopel za nekaj sekund. Nato smo vzorca iz mikrocentrifugirk prefiltrirali skozi 0,2 μm filter neposredno v 2 ml viali. Tako smo pripravili dva vzorca za HPLC analizo.

Priprava HPLC sistema

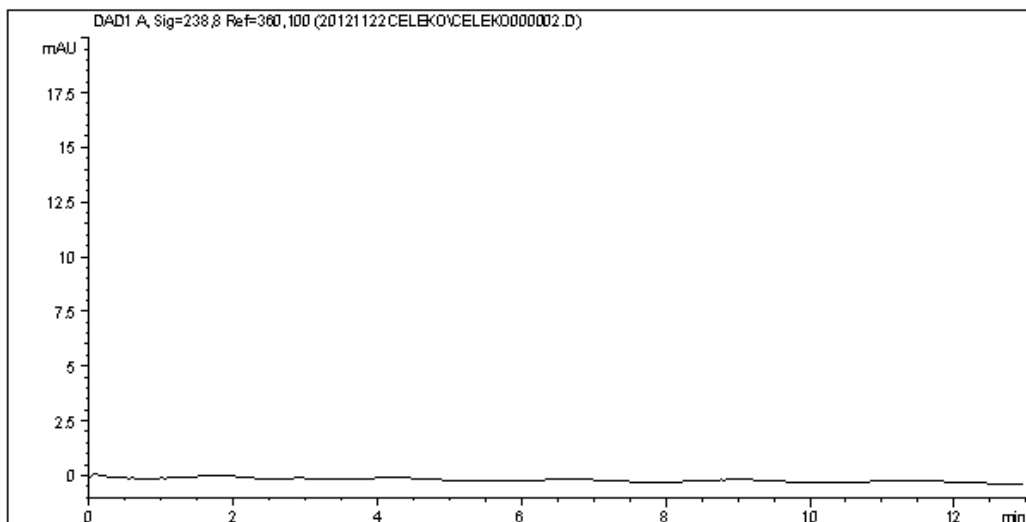
Na HPLC sistemu smo nastavili spodnje parametre in kondicionirali sistem.

Parametri HPLC metode:

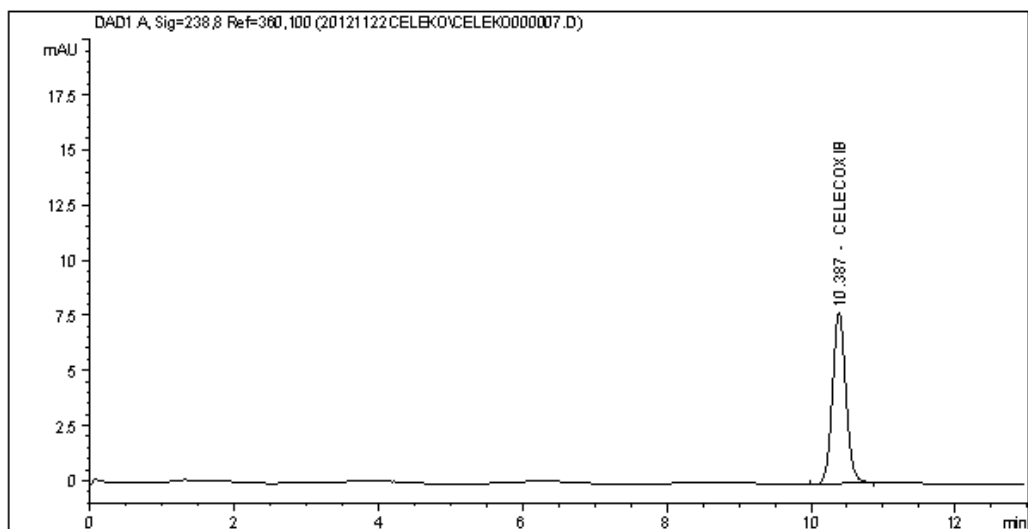
- temperatura kolone: 30 °C,
- pretok mobilne faze skozi kolono: 1,4 ml/min,
- čas analize: 13 min,
- detektor DAD1 Sig=238,8 Ref=360,1 in
- volumen injiciranja: 20 μl .

Za spiranje HPLC sistema po končanih analizah smo pripravili raztopino acetonitrila in vode v volumskem razmerju 1:1.

V programu Chemstation, ki je nadzoroval delovanje HPLC sistema, smo kreirali sekvenco oziroma zaporedje injiciranj iz vial z vzorci in standardi. Najprej smo injicirali topilo (slika 17), ki je bilo v našem primeru mobilna faza, in nato raztopine standarda celekoksiba različnih koncentracij (slika 18) ter raztopine vzorcev.



Slika 17: Kromatogram "topila"(mobilne faze).



Slika 18: Kromatogram standardne raztopine celekoksiba.

Na podlagi površin oziroma odzivov detektorja glede na koncentracijo celekoksiba v standardnih raztopinah smo pripravili umeritveno krivuljo, ki smo jo kasneje uporabili za ugotavljanje vsebnosti ZU v vzorcih.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA IZDELAVE POLIMERNIH ND

Nanodelce smo izdelovali z različnimi polimeri in stabilizatorji v različnih koncentracijah. Rezultati so podani v preglednicah II-V.

Preglednica II: Sestava disperzij ND brez vgrajene ZU, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.

VZ št.	m (ZU) [mg]	m (POLIMER) [mg]		V (ACETON) [ml]	m (razt. STABILIZATORJA) [g]		m (H ₂ O) [g]	m (VZORCA) [g]	masni delež STABILIZATORJA [%]	VELIKOST ND [nm]	PI	IZGLED VZORCA
1	0,0	Resomer RG 502S	50,7	1	PVA (5%)		95,0	100,0	5,0	234,6 ± 1,6	0,24 ± 0,02	Opalescenca + NITKE
2		Resomer RG 503H	50,2	1	PVA (5%)					/	/	Opalescenca + NITKE
3			50,2	1	Poloksamer 188 (5%)					/	/	Opalescenca + NITKE
4			50,0	1,5	PVA (5%)					199,1 ± 3,2	0,13 ± 0,02	Opalescenca + NITKE
5			49,9	1,5	Poloksamer 188 (5%)					209,8 ± 3,2	0,16 ± 0,04	Opalescenca + NITKE
6			50,1	2	PVA (5%)					176,7 ± 3,0	0,1 ± 0,01	Opalescenca
7		50,1	2	Poloksamer 188 (5%)		184,4 ± 2,2				0,08 ± 0,03	Opalescenca	

V prvem sklopu eksperimentov smo za izdelavo ND uporabili polimera Resomer RG 502S in Resomer RG 503H ter raztopini stabilizatorjev PVA (5 %, m/m) in poloksamera 188 (5 %, m/m). Neposredno po izdelavi je bil izgled vzorcev opalescenten, vendar so se na površini vzorcev pojavile nitke izoborjenega polimera. V vzorcu št. 6 oziroma 7, kjer smo povečali volumen injiciranega acetona z raztopljenim polimerom, ostali parametri pa so ostali enaki, so nastali ND. Povprečne velikosti ND vzorcev št. 6 in 7 se med seboj niso bistveno razlikovale, PI je bil ~ 0,1, kar je kazalo na monodisperznost disperzije ND. Iz tega smo sklepali, da je za nastanek stabilne disperzije ND pomemben parameter volumen injiciranega acetona z raztopljenim polimerom, ne glede na uporabljen stabilizator.

V drugem sklopu eksperimentov smo v ND poskušali vgraditi ZU (preglednica III). Izgled vzorcev št. 8-12 je bil takoj po izdelavi opalescenten, vendar so ND po ~ 5 min začeli aglomerirati in nastajali so kosmiči. Ne glede na vrsto uporabljenega polimera, stabilizatorja in volumna raztopine polimera z učinkovino v acetonu nismo uspeli izdelati stabilne disperzije ND.

Preglednica III: Sestava disperzij ND z vgrajeno ZU, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.

VZ št.	m (ZU) [mg]	m (POLIMER) [mg]	m (ZU+POLIMER) [mg]	masni delež ZU v ND [%]	V (ACETON) [ml]	m (razt. STABILIZATORJA) [g]		m (H ₂ O) [g]	m (VZORCA) [g]	masni delež STABILIZATORJA [%]	VELIKOST ND [nm]	PI	IZGLED VZORCA	
8	19,8	Resomer RG 502H	183,6	203,4	9,7	5	PVA (5%)	1,4	65,6	67,0	2,0	154,9 ± 1,0	0,08 ± 0,01	Opalescenca + KOSMIČI
9	61,1		550	611,1	10,0	15	PVA (5%)	4,2	195,9	200,0	2,1	147,5 ± 1,9	0,11 ± 0,02	Opalescenca + KOSMIČI
10	5,2	Resomer RG 503H	45,4	50,6	10,4	2	PVA (5%)	5,0	95,0	100,0	5,0	161,1 ± 4,2	0,11 ± 0,03	Opalescenca + KOSMIČI
11	5,2		45,4	50,6	10,4	2	Poloksamer 188 (5%)	5,0	95,0	100,0	5,0	169,7 ± 5,1	0,19 ± 0,04	Opalescenca + KOSMIČI
12	5,1	Resomer RG 502S	45,2	50,3	10,2	1	PVA (5%)	5,0	95,0	100,0	5,0	225,1 ± 0,7	0,17 ± 0,01	Opalescenca + KOSMIČI
13	5,0	Resomer RG 503H	45,1	50,1	10,0	2	Poloksamer 188 (5%)	5,0	95,0	100,0	5,0	/	/	Opalescenca + KOSMIČI
14	2,3		47,8	50,0	4,5	2	Poloksamer 188 (5%)	5,0	95,0		5,0	170,7 ± 2,7	0,07 ± 0,03	Opalescenca + KOSMIČI
15	1,9		48,1	50,0	3,8	3	Poloksamer 188 (5%)	5,0	95,0		5,0	152,8 ± 1,5	0,09 ± 0,04	Opalescenca + KOSMIČI
16	1,8		48,2	50,0	3,6	5	Poloksamer 188 (5%)	5,0	95,0		5,0	117,0 ± 2,1	0,10 ± 0,01	Opalescenca + KOSMIČI
17	2,5		47,6	50,0	4,9	3	Poloksamer 188 (5%) + PVA (5%) [m/m; 4,5:2,5]	7,0	93,0		7,0	127,1 ± 1,4	0,07 ± 0,01	Opalescenca + KOSMIČI
18	2,8	Resomer RG 502H	97,3	100,0	2,8	3	Poloksamer 188 (5%)+ PVA (5%) [m/m; 4,5:2,5]	7,0	93,0	7,0	171,7 ± 1,6	0,07 ± 0,04	Opalescenca	

Za nestabilnost disperzij ND z vgrajeno ZU smo iskali vzrok v masnem deležu ZU, zato smo postopoma zmanjševali masni delež ZU (vzorci št. 13-18), prav tako smo za stabilizacijo disperzije ND uporabili zmes stabilizatorjev PVA (5 %, m/m) in poloksamera 188 (5 %, m/m) v masnem razmerju 4,5:2,5. V vzorcih št. 17 in 18 smo poleg zmanjšanja deleža ZU povečali masni delež stabilizatorja in polimera ter uspeli izdelati stabilno disperzijo ND z vgrajeno ZU. Ugotovili smo, da so masni delež ZU in masni delež ter vrsta uporabljenega stabilizatorja odločilnega pomena za nastanek stabilne disperzije polimernih ND.

Ponovljivost izdelave stabilne disperzije ND smo preverili tako, da smo le-to izdelali v 3 paralelkah (preglednica IV, vzorci št. 19-21). Izdelava ND je bila ponovljiva, saj so nastali ND med seboj primerljive povprečne velikosti in disperzije ND so bile monodisperzne (PI ~ 0,1). Da bi preverili, ali lahko v obstoječi disperziji ND povečamo koncentracijo le-teh, smo ~ 12 h po pripravi vzorcev št. 19-20 v vsak vzorec (*) injicirali dodatni alikvot, tj. 3 ml raztopine polimera z učinkovino v acetonu. Povprečna velikost delcev in porazdelitev velikosti delcev se nista bistveno spremenili, teoretična koncentracija ZU v vzorcih št. (19-21)* pa je bila 25,00 µg/ml. Tako smo potrdili, da lahko povečamo koncentracijo ND v vzorcu, ne da bi se bistveno spremenila njihova povprečna velikost in polidisperznost.

Preglednica IV: Sestava disperzij ND z vgrajeno ZU in različnimi koncentracijami ND v vzorcu, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.

VZ št.	m (ZU) [mg]	m (POLIMER) [mg]		m (ZU+POLIMER) [mg]	masni delež ZU v ND [%]	V (ACETON) [ml]	m (razt. STABILIZATORJA) [g]		m (H ₂ O) [g]	m (VZORCA) [g]	masni delež STABILIZATORJA [%]	VELIKOST ND [nm]	PI	IZGLED VZORCA
19	2,5	Resomer RG 502H	97,5	100,0	2,5	3	Poloksamer 188 (5%) + PVA (5%) [m/m; 9:5]	14,0	186,0	200,0	7,0	158,6 ± 1,9	0,09 ± 0,01	Opalescenca
20												158,4 ± 1,2	0,08 ± 0,02	
21												162,0 ± 3,3	0,07 ± 0,01	
19*	5,0	Resomer RG 502H	195,0	200,0	2,5	3	Poloksamer 188 (5%) + PVA (5%) [m/m; 9:5]	14,0	186,0	200,0	7,0	159,1 ± 1,1	0,09 ± 0,03	Opalescenca
20*												161,2 ± 1,9	0,08 ± 0,01	
21*												164,8 ± 1,2	0,08 ± 0,01	

VZ št.	m (ZU) [mg]	m (POLIMER) [mg]		m (ZU+POLIMER) [mg]	masni delež ZU v ND [%]	V (ACETON) [ml]	m (razt. STABILIZATORJA) [g]		m (H ₂ O) [g]	m (VZORCA) [g]	masni delež STABILIZATORJA [%]	VELIKOST ND [nm]	PI	IZGLED VZORCA
22	5,1	Resomer RG 502H	195,0	200,1	2,5	6	Poloksamer 188 (5%) + PVA (5%) [m/m; 9:5]	14,0	186,0	200,0	7,0	146,7 ± 3,0	0,08 ± 0,01	Opalescenca
23												152,5 ± 3,0	0,07 ± 0,01	Opalescenca
24	7,6	Resomer RG 502H	292,6	300,1	2,5	9	Poloksamer 188 (5%) + PVA (5%) [m/m; 9:5]	14,0	186,0	200,0	7,0	149,5 ± 2,4	0,10 ± 0,02	Opalescenca
24*	13,9		536,4	550,2								16,5	160,0 ± 1,4	0,11 ± 0,01

Ponovljivost priprave disperzije ND in vpliv povečanja koncentracije ND v vzorcu oziroma volumna raztopine polimera z učinkovino v acetonu smo ponovili pri vzorcih št. 22-24 (preglednica IV). Ugotovili smo, da med disperzijami z različnimi koncentracijami ND ni bistvenih razlik v povprečni velikosti ND, prav tako ne v PI (~ 0,1) ter da volumen injicirane raztopine polimera z učinkovino v acetonu ne vpliva na stabilnost disperzije ND. Teoretična koncentracija ZU v vzorcih št. 22 in 23 je bila 25,23 µg/ml, v vzorcu št. 24 pa 37,85 µg/ml. Ponovno smo preverili, kaj se zgodi, če povečamo volumen injicirane raztopine polimera z ZU in v 40 ml vzorca št. 24 dodatno injicirali 1,5 ml alikvot raztopine polimera z učinkovino v acetonu (vzorec št. 24*). Po 60 dneh sta bila povprečna velikost ND in PI primerljiva z osnovnim vzorcem št. 24, disperzija ND pa je bila stabilna.

V tretjem sklopu eksperimentov izdelave ND smo uvedli tri spremembe: povečali smo hitrost mešanja disperzije, zmanjšali koncentracijo ZU in pri izdelavi ND uporabili zmes dveh polimerov Resomera RG 502H in Resomera RGP d50155 v masnem razmerju 1:1 (preglednica V). Posamezni vzorec št. 25 in 26 smo pripravili v treh paralelah, ki smo jih naslednji dan, ko so se vzorci v čašah mešali ~ 12 h in je aceton izhlapel, združili v končni vzorec 25* oz. 26*. Tako smo imeli dovolj vzorca (~ 600 ml), da smo lahko izvedli vse stopnje ultracentrifugiranja z istim začetnim vzorcem ND.

Preglednica V: Sestava disperzij ND z različnimi polimeri z vgrajeno ZU in različnimi koncentracijami ND v vzorcu, povprečna velikost in PI delcev ter izgled vzorcev.

VZ št.	m (ZU) [mg]	m (POLIMER) [mg]		m (ZU+POLIMER) [mg]	masni delež ZU v ND [%]	V (ACETON) [ml]	m (razt. STABILIZATORJA) [g]		m (H ₂ O) [g]	m (VZORCA) [g]	masni delež STABILIZATORJA [%]	VELIKOST ND [nm]	PI	IZGLED VZORCA
25/1	2,7	Resomer RG 502H	97,5	100,1	2,7	6	Poloksamer 188 (5%)+ PVA (5%) [m/m; 9:5]	14,0	186,0	200,0	7,0	104,2 ± 1,6	0,11 ± 0,01	Opalescenca
25/2												95,5 ± 1,3	0,10 ± 0,01	Opalescenca
25/3												94,1 ± 1,1	0,09 ± 0,01	Opalescenca
26/1	5,1	Resomer RG 502H + Resomer RGP d50155	195,0	200,1	2,5	6		14,0	186,0	200,0	7,0	100,2 ± 0,7	0,14 ± 0,01	Opalescenca
26/2												89,7 ± 0,5	0,11 ± 0,01	Opalescenca
26/3												87,5 ± 0,9	0,10 ± 0,01	Opalescenca
25*	2,7	Resomer RG 502H	97,5	100,1	2,7	6		14,0	186,0	200,0	7,0	94,5 ± 0,4	0,10 ± 0,01	Opalescenca
26*	5,1	Resomer RG 502H + Resomer RGP d50155	195,0	200,1	2,5	6		14,0	186,0	200,0	7,0	89,1 ± 0,6	0,13 ± 0,01	Opalescenca

Povprečne velikosti ND v paralelkah vzorca št. 25 oziroma 26 so bile med seboj primerljive. Prav tako ni bilo bistvene razlike v povprečni velikosti ND med vzorcema št. 25 in 26. Vsi pripravljene vzorci so bili monodisperzni, saj je bil PI ~ 0,1. Iz rezultatov lahko sklepamo, da vrsta polimera oziroma zmes polimerov ni imela bistvenega vpliva na povprečno velikost nastalih ND. V vzorcu št. 26* je bila koncentracija ND ~ 2-krat večja kot v vzorcu 25*, kar ni imelo vpliva na stabilnost disperzije ND. Glede na povprečno velikost ND vzorca št. 22 (preglednica IV) in vzorca št. 25 (preglednica V) je imela hitrost mešanja oziroma hitrost injiciranja raztopine polimera z učinkovino v acetonu zelo velik vpliv, saj je razlika v povprečni velikosti ~ 30 %. Teoretična koncentracija ZU v vzorcu št. 25* je bila 13,58 µg/ml, v vzorcu št. 26* pa 25,43 µg/ml. Ultracentrifugiranje kot separacijsko metodo smo vrednotili na vzorcih št. 22 in 24 ter vzorcih št. 25* in 26*.

4.2 ULTRACENTRIFUGIRANJE

4.2.1 Velikost in porazdelitev velikosti ND v supernatantu po ultracentrifugiranju

Vzorci PLGA ND št. 22, 24, 25* in 26* smo ultracentrifugirali z različno hitrostjo in različno dolgo. Takoj po ultracentrifugiranju so sledile meritve povprečne velikosti delcev in porazdelitve velikosti delcev v supernatantu. Rezultati so prikazani v preglednicah VI, VII in VIII.

Iz preglednice VI razberemo, da je bila povprečna velikost ND vzorca 25* pred ultracentrifugiranjem ~ 95 nm in da je bil vzorec monodisperzen (PI ~0,1). S povečevanjem hitrosti centrifugiranja je velikost ND v supernatantu padala, kar je bilo pričakovano, saj so se najprej posedli večji ND. Vrednost PI delcev v supernatantu se je s povečevanjem hitrosti centrifugiranja večala, saj je bilo v supernatantu prisotnih vedno manj ND, katerih velikost se je lahko precej razlikovala. Vsak večji delec, prisoten v supernatantu, močno vpliva na PI vzorca z nizko koncentracijo delcev.

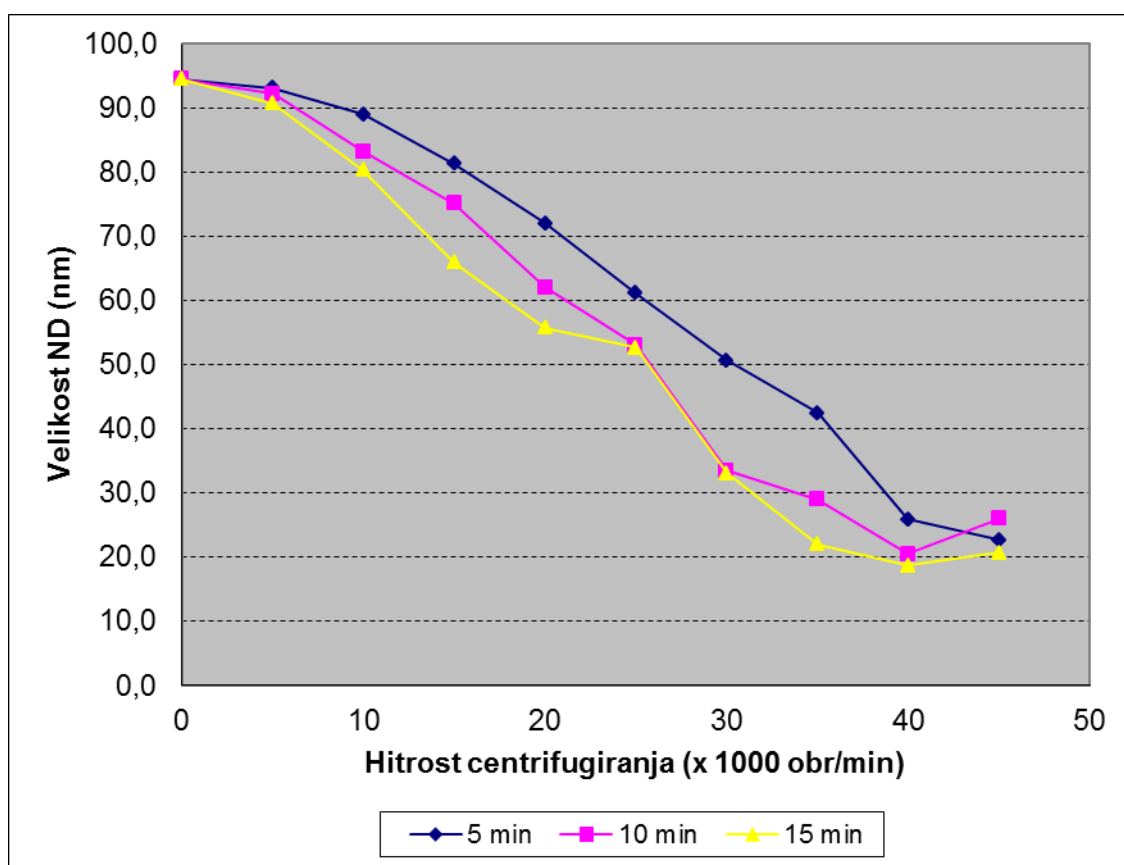
Preglednica VI: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND vzorca št. 25* in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantu po ultracentrifugiranju.

Čas / VZ	5 min / VZ 25*		10 min / VZ 25*		15 min / VZ 25*	
	d (nm)	PI	d (nm)	PI	d (nm)	PI
0	94,5 ± 0,4	0,10 ± 0,01	94,5 ± 0,4	0,10 ± 0,01	94,5 ± 0,4	0,10 ± 0,01
5	93,1 ± 0,7	0,08 ± 0,01	92,2 ± 0,6	0,10 ± 0,02	90,7 ± 0,4	0,10 ± 0,02
10	89,0 ± 1,1	0,07 ± 0,02	83,2 ± 0,4	0,09 ± 0,01	80,3 ± 0,8	0,09 ± 0,01
15	81,3 ± 0,9	0,09 ± 0,01	75,1 ± 0,9	0,11 ± 0,01	66,0 ± 0,6	0,10 ± 0,01
20	72,1 ± 0,7	0,10 ± 0,01	62,1 ± 1,2	0,13 ± 0,00	55,8 ± 0,6	0,16 ± 0,01
25	61,2 ± 0,4	0,13 ± 0,02	53,1 ± 1,1	0,23 ± 0,01	52,6 ± 0,9	0,30 ± 0,01
30	50,6 ± 1,0	0,23 ± 0,01	33,5 ± 1,4	0,40 ± 0,07	33,1 ± 2,7	0,40 ± 0,06
35	42,5 ± 0,4	0,26 ± 0,00	29,0 ± 0,8	0,36 ± 0,05	22,0 ± 1,9	0,51 ± 0,04
40	25,9 ± 0,6	0,51 ± 0,01	20,5 ± 1,8	0,52 ± 0,02	18,8 ± 2,6	0,54 ± 0,05
45	22,7 ± 2,0	0,54 ± 0,02	26,0 ± 2,2	0,64 ± 0,11	20,7 ± 0,3	0,57 ± 0,00

Supernatant je bil po centrifugiranju pri hitrosti 15.000 obr/min in času 5 min še opalescenten, medtem ko pri enaki hitrosti centrifugiranja in času 10 min oziroma 15 min opalescence ni bilo moč zaznati.

Na sliki 19 je prikazan potek zmanjševanja velikosti ND v supernatantu s povečevanjem časa in hitrosti ultracentrifugiranja. Pri hitrosti centrifugiranja 25.000 obr/min in času centrifugiranja 15 min je viden odklon glede na pričakovan potek krivulje. Vzrok za odklon je verjetno napaka pri odvzemu vzorca iz centrifugirke, to je delno redispregiranje posedenih ND, kar je povzročilo prisotnost večjih ND v supernatantu.

Na podlagi slike 19 lahko predpostavimo, da so se posedli vsi ND po 15 min centrifugiranja pri hitrosti 35.000 obr/min, oziroma po 10 min centrifugiranja pri hitrosti 40.000 obr/min, oziroma po 5 min centrifugiranja pri hitrosti 45.000 obr/min. Pri hitrostih nad 40.000 obr/min je velikost ND v supernatantu znašala med 20 in 30 nm, PI > 0,5 pa je kazal, da so bili delci v supernatantu polidisperzni, kar pomeni, da so bile velikosti preostalih ND v supernatantu različne, oziroma je bilo le-teh v vzorcu zelo malo, saj so se skoraj vsi ND posedli.



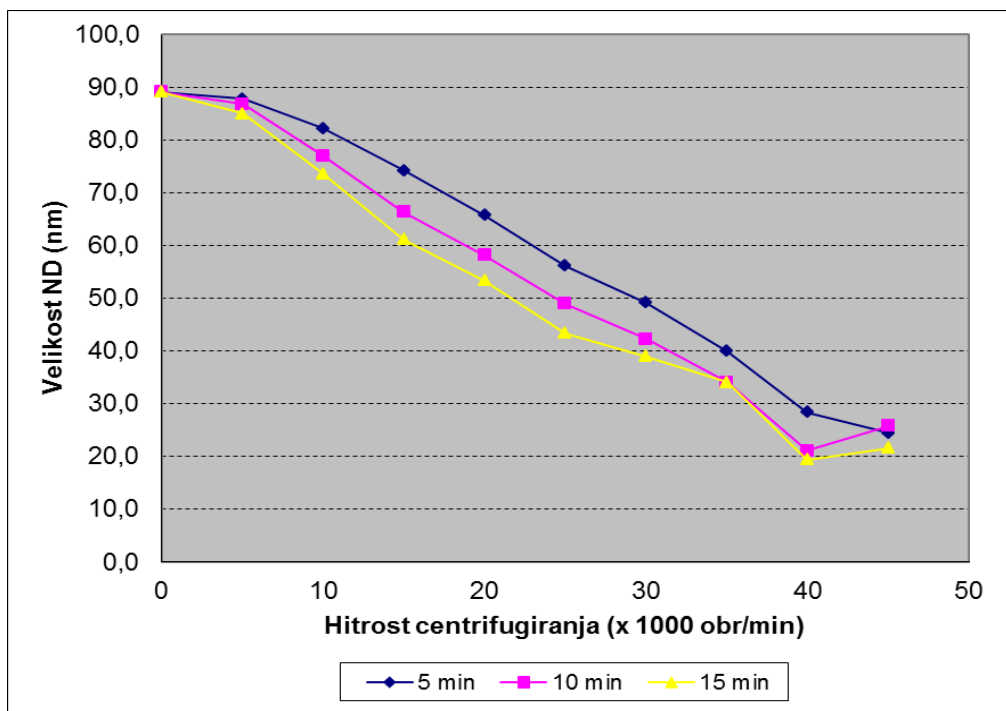
Slika 19: Povprečna velikost ND v supernatantu za vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.

V vzorcu št. 26* je bila povprečna velikost ND pred ultracentrifugiranjem ~ 89 nm (preglednica VII), kar se bistveno ne razlikuje od povprečne velikosti ND v vzorcu št. 25*, kljub temu da smo uporabili kombinacijo polimerov PLGA in PEG-PLGA pri izdelavi ND. Čeprav je koncentracija ND v vzorcu št. 26* ~ dvakrat večja od koncentracije ND v vzorcu št. 25*, prav tako med vzorcema ni opaziti razlike v profilu posedanja ND (sliki 19 in 20).

Preglednica VII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND vzorca št. 26* in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantu po ultracentrifugiranju.

Čas / VZ	5 min / VZ 26*		10 min / VZ 26*		15 min / VZ 26*	
	d (nm)	PI	d (nm)	PI	d (nm)	PI
0	89,1 ± 0,6	0,13 ± 0,01	89,1 ± 0,6	0,13 ± 0,01	89,1 ± 0,6	0,13 ± 0,01
5	87,8 ± 0,3	0,11 ± 0,01	86,8 ± 1,4	0,12 ± 0,01	85,0 ± 0,6	0,10 ± 0,00
10	82,2 ± 0,7	0,11 ± 0,02	77,0 ± 0,3	0,09 ± 0,01	73,7 ± 0,2	0,10 ± 0,01
15	74,2 ± 0,0	0,09 ± 0,01	66,3 ± 0,7	0,10 ± 0,01	61,2 ± 0,3	0,10 ± 0,01
20	65,7 ± 0,1	0,09 ± 0,01	58,2 ± 0,4	0,12 ± 0,01	53,4 ± 0,3	0,15 ± 0,01
25	56,2 ± 0,4	0,11 ± 0,01	49,0 ± 0,0	0,17 ± 0,01	43,4 ± 0,2	0,20 ± 0,02
30	49,2 ± 0,2	0,15 ± 0,01	42,2 ± 0,2	0,27 ± 0,00	39,0 ± 1,8	0,35 ± 0,05
35	40,0 ± 0,1	0,21 ± 0,01	34,1 ± 0,6	0,34 ± 0,05	34,1 ± 1,4	0,51 ± 0,02
40	28,4 ± 0,5	0,34 ± 0,05	21,1 ± 0,6	0,43 ± 0,02	19,4 ± 0,3	0,47 ± 0,03
45	24,6 ± 1,1	0,44 ± 0,03	25,8 ± 4,7	0,46 ± 0,04	21,6 ± 1,2	0,51 ± 0,03

Na sliki 20 je prikazan trend padanja povprečne velikosti ND v supernatantu skozi celoten postopek ultracentrifugiranja. V predzadnji oziroma zadnji stopnji ultracentrifugiranja pri hitrostih centrifugiranja 40.000 oziroma 45.000 obr/min se povprečna velikost dispergiranih delcev nekoliko poveča, a sprememba je zanemarljiva, saj gre za majhne razlike, pa tudi PI vzorcev je ~ 0,5, kar kaže na prisotnost različno velikih delcev.

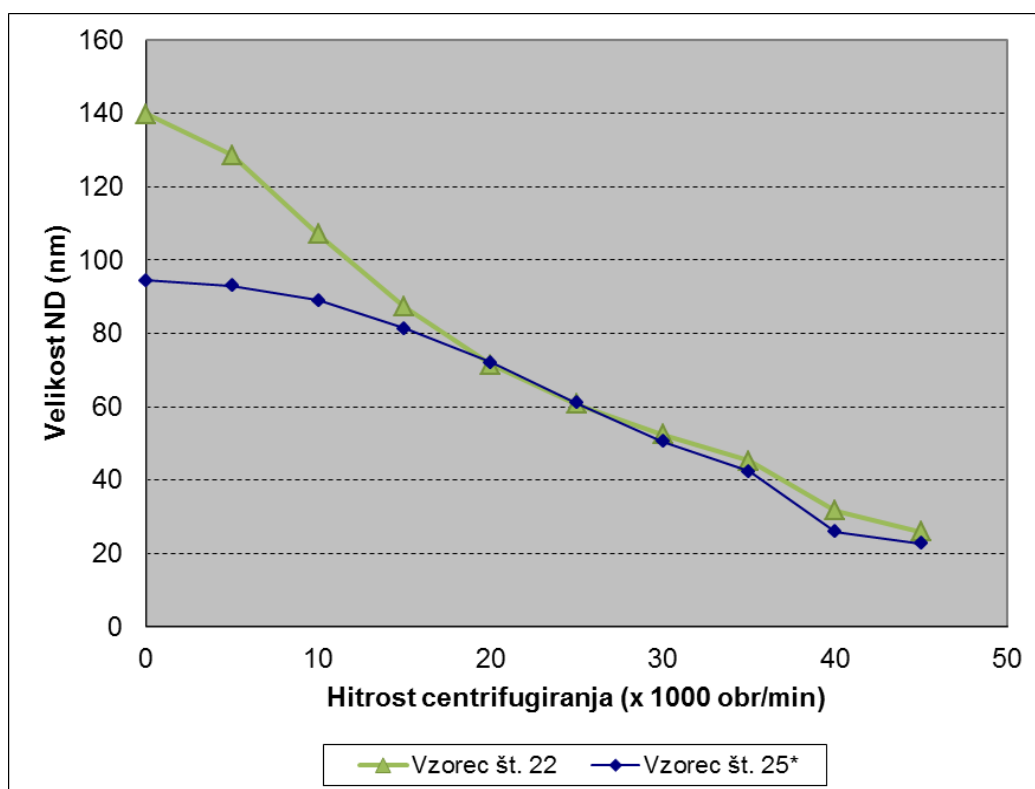


Slika 20: Povprečna velikost ND v supernatantu vzorca št. 26* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.

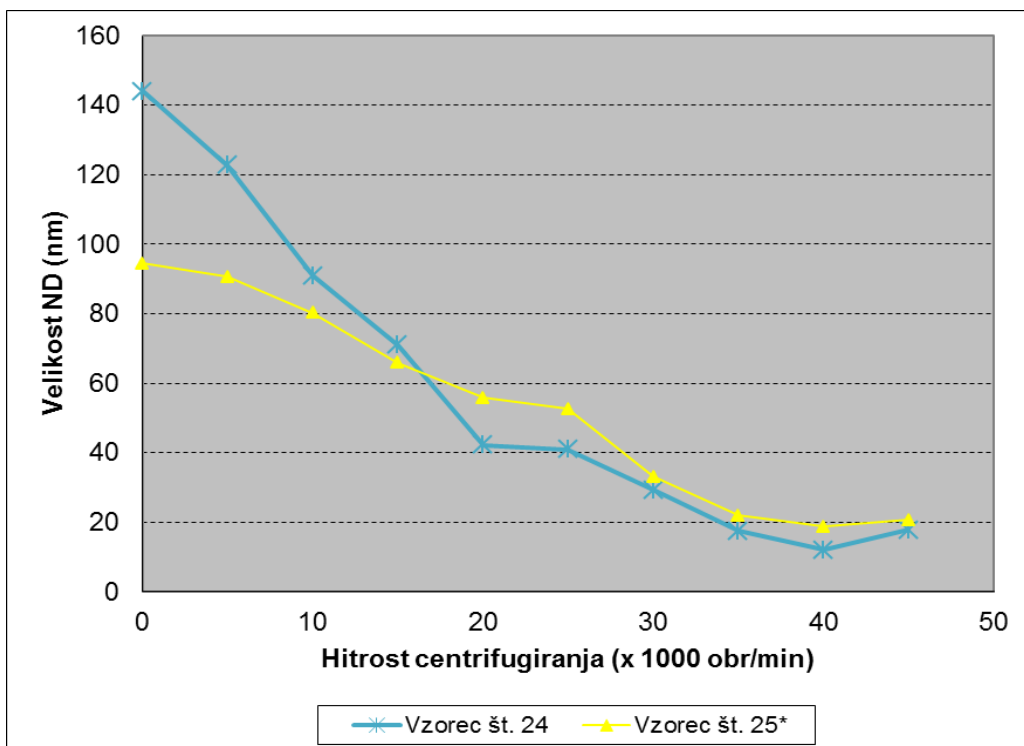
Preglednica VIII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti ND za vzorca št. 22 in 24 in povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev v supernatantih po ultracentrifugiranju.

Čas / VZ	5 min / VZ 22		15 min / VZ 24	
	d (nm)	PI	d (nm)	PI
0	139,9 ± 1,9	0,11 ± 0,01	144,0 ± 1,3	0,07 ± 0,03
5	128,6 ± 3,6	0,07 ± 0,02	122,8 ± 1,2	0,07 ± 0,02
10	107,1 ± 2,4	0,07 ± 0,01	90,9 ± 0,9	0,05 ± 0,01
15	87,3 ± 2,1	0,07 ± 0,01	71,1 ± 0,9	0,11 ± 0,01
20	71,5 ± 1,3	0,11 ± 0,02	42,2 ± 0,4	0,30 ± 0,01
25	60,8 ± 0,4	0,19 ± 0,01	41,0 ± 1,2	0,47 ± 0,02
30	52,4 ± 0,0	0,25 ± 0,01	29,3 ± 0,3	0,50 ± 0,01
35	45,3 ± 3,2	0,44 ± 0,00	17,5 ± 0,8	0,47 ± 0,03
40	31,7 ± 1,7	0,53 ± 0,01	12,0 ± 0,1	0,37 ± 0,03
45	25,9 ± 3,7	0,64 ± 0,10	17,8 ± 0,6	0,54 ± 0,04

Primerjavo rezultatov ultracentrifugiranja vzorcev ND dveh različnih povprečnih velikosti prikazujeta sliki 21 in 22 (vzorec št. 25*: ~ 90 nm, vzorca št. 22 in 24: ~ 140 nm). Glede na koncentracijo ND v vzorcu št. 25* je bila koncentracija ND v vzorcu št. 22 ~ dvakrat večja in v vzorcu št. 24 ~ trikrat večja. Pri hitrostih centrifugiranja 20.000 obr/min in več razlike med vzorcema št. 22 in 25* na sliki 21 ni opaziti, krivulji sta skoraj enaki. Med vzorcema št. 24 in 25* (slika 22) so pri hitrostih centrifugiranja nad 15.000 obr/min razlike minimalne. Iz bolj strmega naklona krivulj padanja povprečne velikosti delcev v supernatantih vzorcev št. 22 in 24 lahko sklepamo, da se večji ND pri danih pogojih centrifugiranja hitreje posedajo.



Slika 21: Primerjava povprečne velikosti ND v supernatantu za vzorec št. 22 in vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja pri času centrifugiranja 5 min.



Slika 22: Primerjava povprečne velikosti ND v supernatantu za vzorec št. 24 in vzorec št. 25* v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja pri času centrifugiranja 15 min.

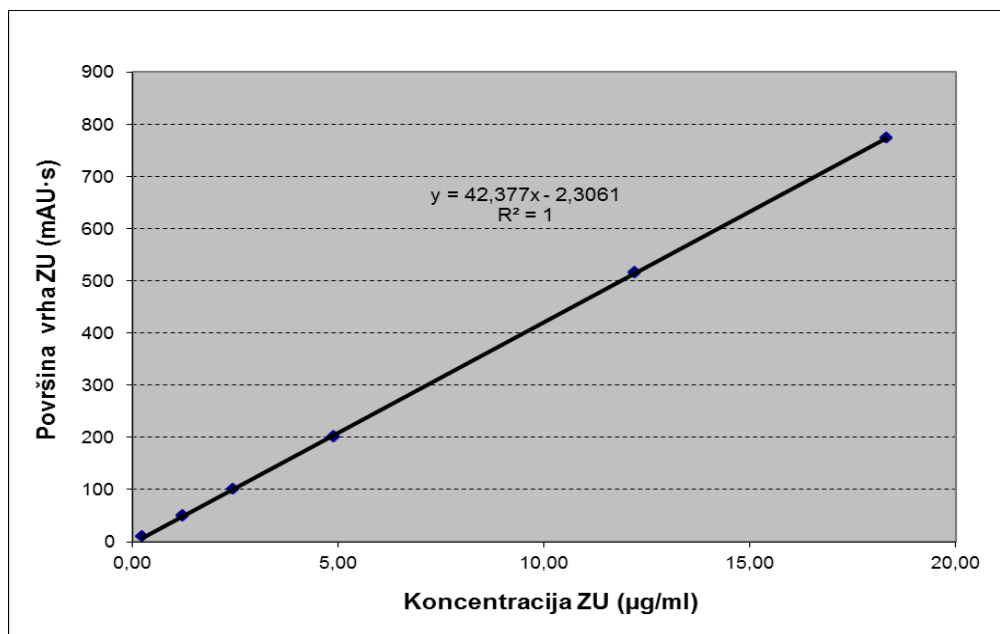
4.2.2 Določanje vsebnosti ZU v supernatantu po ultracentrifugiranju

Vsako raztopino standardna ZU smo dvakrat injicirali v kromatografski sistem, ki je dajal ponovljive rezultate (preglednica IX).

Preglednica IX: Odzivi raztopin standardna (RS) ZU.

RS	Osnovna raztopina (μl)	V (ml)	Koncentracija (μg/ml)	Površina vrha ZU 1. injiciranje	Površina vrha ZU 2. injiciranje
1	50	20	0,24	9,9	9,7
2	125	10	1,22	50,4	49,9
3	250	10	2,44	100,3	100,4
4	500	10	4,88	200,3	203,1
5	1250	10	12,21	516,8	515,5
6	1875	10	18,31	774,2	773,0

Na sliki 23 je umeritvena krivulja za celekoksib, ki je bila linearna v koncentracijskem območju med 0,24 μg/ml in 18,31 μg/ml.



Slika 23: Umeritvena krivulja za celekoksib.

Za določitev vsebnosti ZU v supernatantu oziroma v disperziji ND je bilo potrebno ND razgraditi/raztopiti, tako da se je sprostila tudi vgrajena ZU. Alikvote supernatanta oziroma disperzije ND, ki smo jih odvzeli med posameznimi stopnjami ultracentrifugiranja in jih shranili v 1,5 ml plastičnih mikrocentrifugirkah, smo redčili v volumskem razmerju 1:1 z raztopino acetonitrila in metanola (volumsko razmerje ACN/MeOH = 9:1).

Iz HPLC meritev (preglednice X - XII) je razvidno, da je medij (raztopina ACN/MeOH), s katerim smo redčili disperzijo ND, ustrezen, saj je bila določena koncentracija ZU v začetni disperziji ND (13,83 µg/ml) primerljiva s teoretično izračunano koncentracijo ZU v vzorcu (13,58 µg/ml), kar pomeni, da so se vsi ND po redčenju z medijem ACN/MeOH raztopili in ZU se je sprostila.

Preglednica X: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 5 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	291,8	2	13,83	100,0
5	265,4	2	12,58	91,0
10	236,7	2	11,23	81,2
15	189,9	2	9,02	65,2
20	143,6	2	6,83	49,4

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
25	111,5	2	5,32	38,5
30	89,7	2	4,29	31,0
35	68,4	2	3,28	23,7
40	57,1	2	2,75	19,9
45	53	2	2,56	18,5

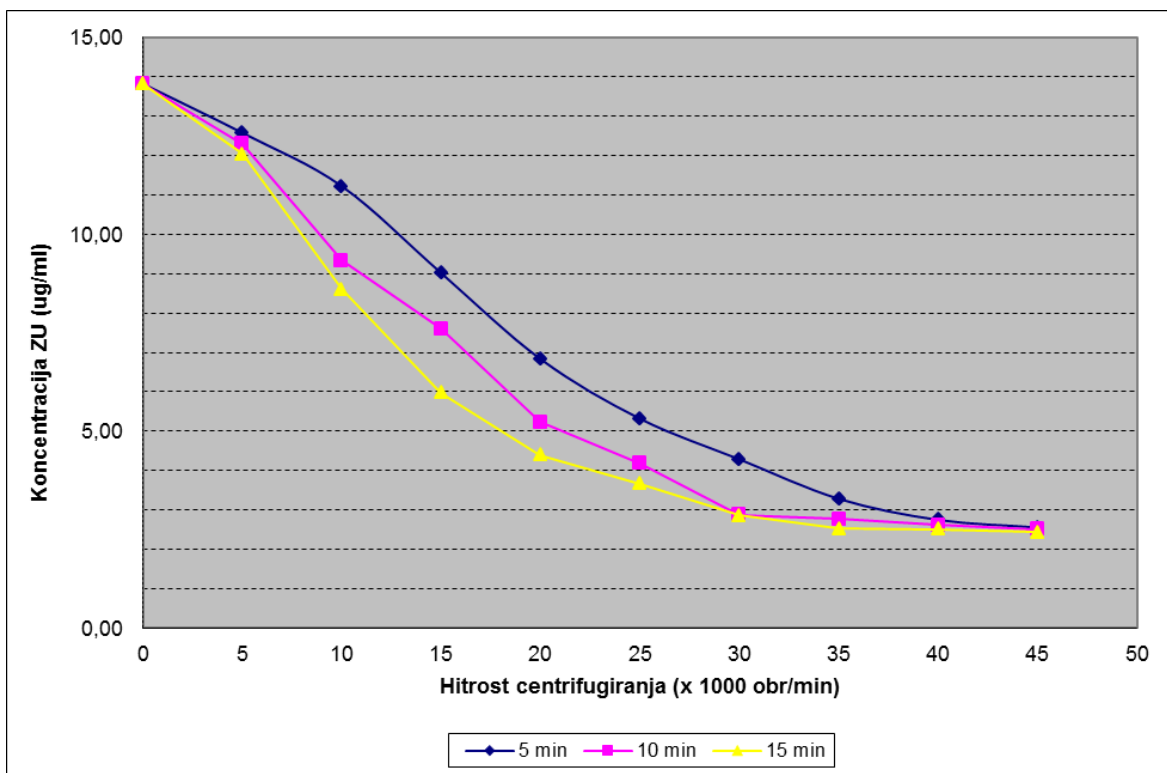
Preglednica XI: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 10 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	291,8	2	13,83	100,0
5	259,4	2	12,30	88,9
10	196,8	2	9,34	67,6
15	159,9	2	7,60	55,0
20	109,7	2	5,23	37,8
25	87,5	2	4,18	30,3
30	59,9	2	2,88	20,8
35	57,5	2	2,77	20,0
40	54,4	2	2,62	19,0
45	52	2	2,51	18,1

Preglednica XII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 25* z različno hitrostjo in časom 15 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	291,8	2	13,83	100,0
5	254	2	12,04	87,1
10	181,2	2	8,61	62,2
15	125,6	2	5,98	43,3
20	92,1	2	4,40	31,8
25	76,5	2	3,66	26,5
30	59,4	2	2,86	20,7
35	52,5	2	2,53	18,3
40	52,1	2	2,51	18,2
45	50,4	2	2,43	17,6

Če primerjamo povprečno velikost ND v supernatantih vzorca št. 25* (slika 19) in koncentracijo ZU v supernatih vzorca št. 25* (slika 24), opazimo korelacijo, ki kaže, da manjša kot je povprečna velikost ND v supernatantu, manjša je vsebnost ZU. Pri hitrosti centrifugiranja 30.000 obr/min in času centrifugiranja 10 min oziroma 15 min je manjši odklon na obeh grafih, tako pri povprečni velikosti ND kot pri vsebnosti ZU. Pri hitrosti centrifugiranja 40.000 oziroma 45.000 obr/min pa skoraj ni razlike v vsebnosti ZU pri vseh treh časih centrifugiranja.



Slika 24: Koncentracija ZU v supernatantih vzorca št. 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.

Meritve vsebnosti ZU v supernatantih po ultracentrifugiranju kažejo, da se vsebnost ZU z večanjem hitrosti centrifugiranja zmanjšuje. Prav tako kot velikost delcev v supernatantih se je tudi vsebnost učinkovine v supernatantih s hitrostjo in časom centrifugiranja zmanjševala, vendar tukaj ni bilo nobenih odklonov krivulje, saj priprava vzorca ni imela tolikšnega vpliva na meritev, kot je bilo to v primeru meritev povprečne velikosti ND. Najnižja koncentracija ZU, ki smo jo določili v supernatantu, je bila ~ 2,5 µg/ml, medtem ko je bila učinkovitost vgrajevanja ZU v ND 82,4 %.

V vzorcu št. 25* (učinkovitost vgrajevanja ZU 82,4%) je bila začetna koncentracija ZU ~ dvakrat manjša kot pri vzorcu št. 26* (preglednice XIII - XV; učinkovitost vgrajevanja ZU 88,2%), zato je posledično učinkovitost vgrajevanja ZU manjša.

Preglednica XIII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 5 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	546,4	2	25,84	100,0
5	509,4	2	24,10	93,2
10	444,8	2	21,05	81,4
15	339,1	2	16,06	62,1
20	239,8	2	11,37	44,0
25	182,6	2	8,67	33,6
30	142	2	6,76	26,1
35	93,2	2	4,45	17,2
40	81,6	2	3,91	15,1
45	73,7	2	3,53	13,7

Preglednica XIV: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 10 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	546,4	2	25,84	100,0
5	498,8	2	23,60	91,3
10	352,2	2	16,68	64,5
15	264,5	2	12,54	48,5
20	186,9	2	8,88	34,3
25	135,9	2	6,47	25,0
30	92	2	4,40	17,0
35	80,5	2	3,85	14,9
40	72,2	2	3,46	13,4
45	68	2	3,26	12,6

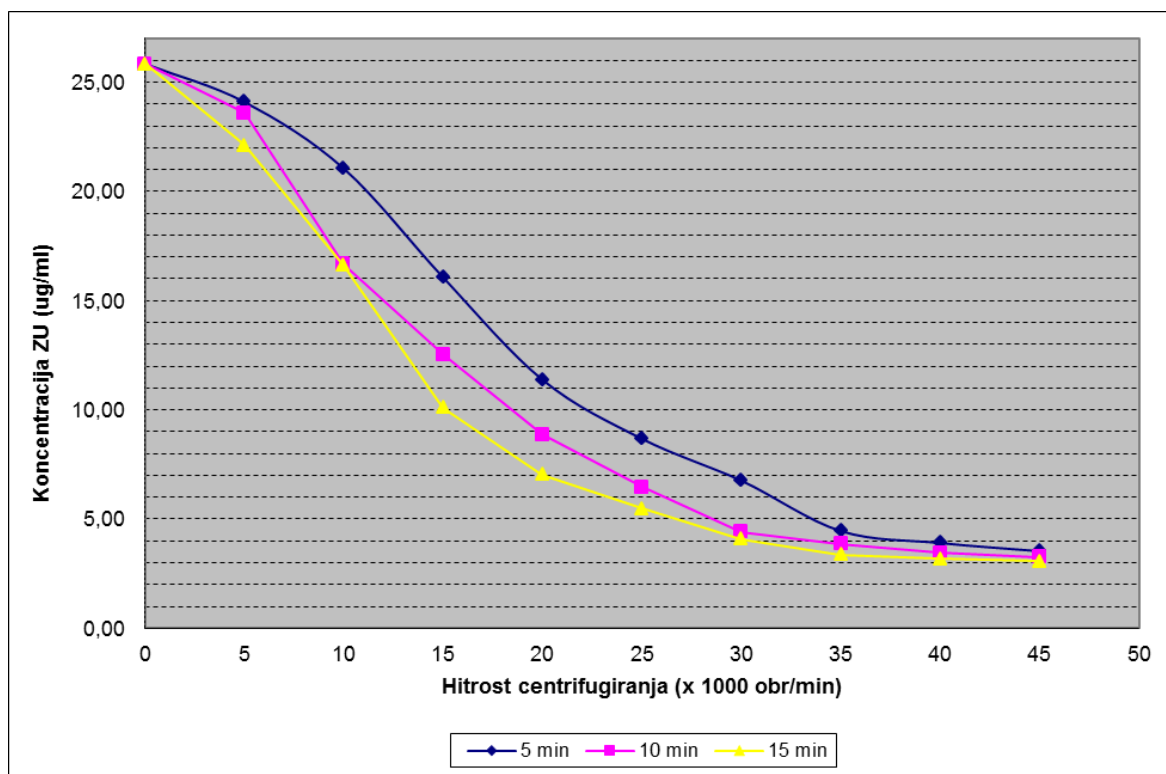
Preglednica XV: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 26* z različno hitrostjo in časom 15 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU ($\mu\text{g/ml}$)	Delež ZU (%)
0	546,4	2	25,84	100,0
5	467,2	2	22,10	85,5
10	350,6	2	16,60	64,2
15	212,6	2	10,09	39,0
20	147,7	2	7,03	27,2
25	115	2	5,48	21,2
30	85,3	2	4,08	15,8
35	70	2	3,36	13,0
40	66,4	2	3,19	12,3
45	63,6	2	3,06	11,8

Koncentracija ZU (slika 25) je najbolj strmo padala v supernatantih vzorcev, ki smo jih centrifugirali s hitrostjo od 5.000 do 30.000 obr/min, kar je pričakovano, saj je v tem območju hitrosti centrifugiranja potekalo zelo intenzivno posedanje ND. Pri hitrosti centrifugiranja večji od 40.000 obr/min ni bistvenih razlik v koncentraciji ZU v supernatantih ne glede na čas centrifugiranja, tako da lahko predpostavimo, da se pri tej hitrosti centrifugiranja posede večina ND in da naredimo zelo majhno napako, ne glede na to, ali centrifugiramo 5, 10 ali 15 min. Najmanjša koncentracija ZU, ki smo jo določili v supernatantu po centrifugiranju, je bila med 3,0 $\mu\text{g/ml}$ in 3,5 $\mu\text{g/ml}$ (slika 25), kar je primerljivo s topnostjo celekoksiba; v vodi je le-ta 5,6 $\mu\text{g/ml}$ pri pH 6,8 ter pri temperaturi 25 °C (16). Iz tega lahko tudi sklepamo, da je bilo v supernatantu prisotnih le malo ali nič ND, kar pomeni, da so se "vsi" ND posedli pri hitrosti centrifugiranja enaki ali večji od 35.000 obr/min, ne glede na čas centrifugiranja.

V vzorcu št. 26* je bila izmerjena koncentracija ZU pred ultracentrifugiranjem 25,84 $\mu\text{g/ml}$, kar je prav tako primerljivo s teoretično koncentracijo ZU v vzorcu (25,43 $\mu\text{g/ml}$). Končna koncentracija ZU v supernatantu po ultracentrifugiranju je bila nekoliko višja v primerjavi z vzorcem št. 25*, in sicer med 3,06 $\mu\text{g/ml}$ in 3,53 $\mu\text{g/ml}$. Glede na končno izmerjeno koncentracijo ZU 3,06 $\mu\text{g/ml}$, ki je ostala v supernatantu, in začetno koncentracijo 25,84 $\mu\text{g/ml}$, smo izračunali, da je bila učinkovitost vgrajevanja ZU v ND 88,2 %. Pri izdelavi polimernih ND z metodo nanoprecipitacije obstaja možnost, da se

oborijo tudi delci same ZU (nanosuspenzija), ki se pri ultracentrifugiranju prav tako posedejo kot polimerni nanodelci. Pri določanju učinkovitosti vgrajevanja ZU zato naredimo napako, saj teh delcev, ki predstavljajo nevgrajeno ZU, ne moremo ločiti od polimernih ND. Tako posledično določimo lažno večjo učinkovitost vgrajevanja ZU.



Slika 25: Koncentracija ZU v supernatantih vzorca št. 26* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.

Na podlagi slike 25 lahko ugotovimo da, če vzorec centrifugiramo 5 min pri hitrosti 10.000 obr/min, v supernatantu ostane še ~ 80 % ND, če pa vzorec centrifugiramo 15 min namesto 5 min, v supenatantu ostane "le" še ~ 60 % ND. Pri hitrosti centrifugiranja 30.000 obr/min in času centrifugiranja 5 min je v supernatantu ~ 15 % ND, medtem ko je pri času centrifugiranja 15 min v supernatantu prisotnih le še ~ 5 % ND. Z večanjem hitrosti centrifugiranja centrifugalna sila eksponentno narašča (preglednica I), zato se tudi napaka, ki jo naredimo, zmanjšuje tako glede na čas kot na hitrost centrifugiranja, saj je v disperziji prisotnih vedno manj ND, ki so glede na velikost vse manjši.

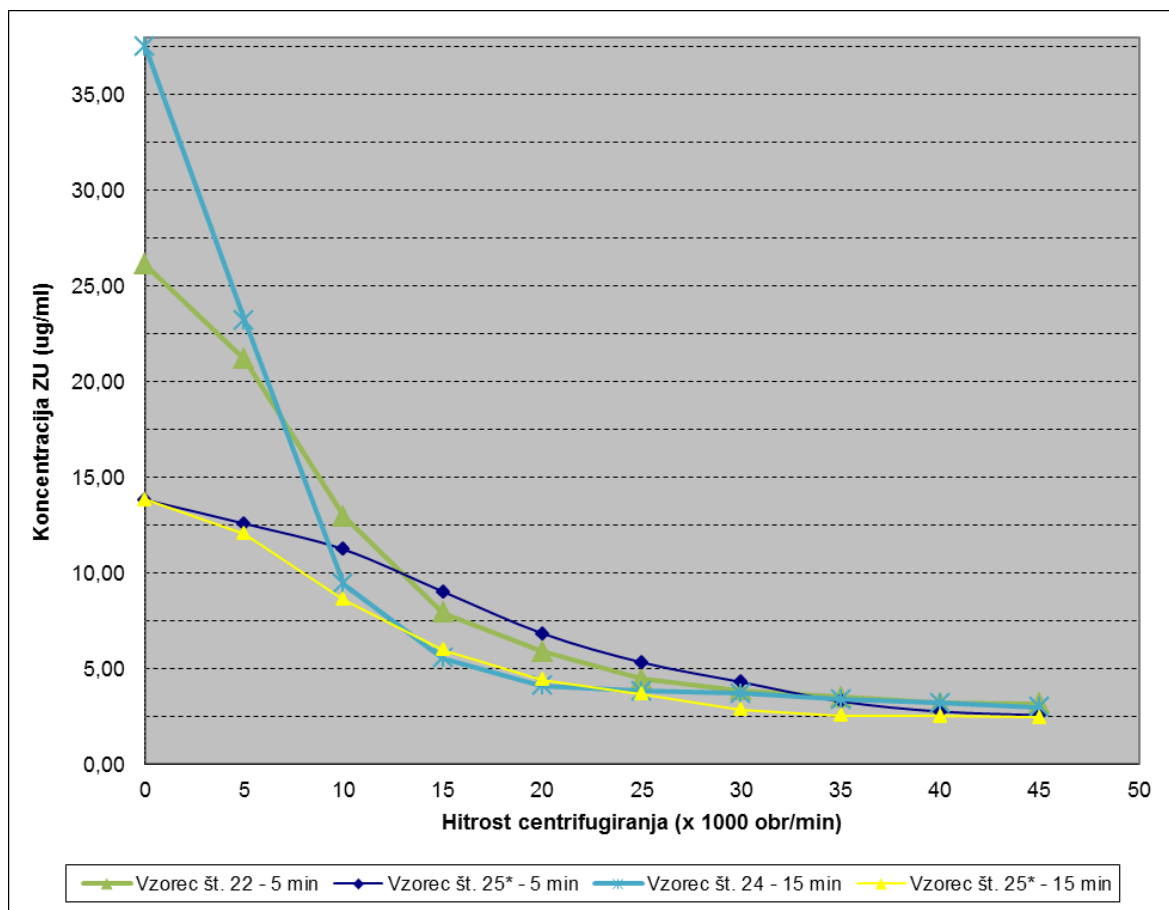
Na sliki 26 je primerjava med vsebnostmi ZU v supernatantih za posamezne stopnje ultracentrifugiranja za vzorce treh različnih začetnih koncentracij ND ter dveh različnih povprečnih velikosti ND (vzorec št. 25* ~ 90 nm, vzorca št. 22 in 24 ~ 140 nm). Iz vsebnosti ZU v supernatantih (preglednici XVI, XVII) oziroma poteka krivulj vzorca št. 22 in 24, kjer sta večji koncentracij in večji velikosti ND glede na vzorec št. 25*, ugotovimo, da se pri hitrosti centrifugiranja 15.000 obr/min posede že večji del ND. Pri hitrosti centrifugiranja 35.000 obr/min in več, pa so razlike v koncentraciji ZU v supernatantu zanemarljive ne glede na čas centrifugiranja.

Preglednica XVI: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 22 z različno hitrostjo in časom 5 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	537,6	2	26,12	100,0
5	435,8	2	21,18	81,1
10	266,6	2	12,97	49,6
15	162,8	2	7,93	30,3
20	120,4	2	5,87	22,5
25	91,1	2	4,45	17,0
30	79	2	3,86	14,8
35	71,8	2	3,51	13,4
40	65,4	2	3,20	12,2
45	64,7	2	3,16	12,1

Preglednica XVII: Vsebnost ZU v supernatantih po centrifugiranju vzorca št. 24 z različno hitrostjo in časom 15 min.

Hitrost centrifug. X 1000 (obr/min)	Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)
0	514,9	3	37,51	100,0
5	318,3	3	23,20	61,8
10	129,1	3	9,42	25,1
15	75,9	3	5,55	14,8
20	84,1	2	4,11	10,9
25	78	2	3,81	10,2
30	50,38	3	3,69	9,8
35	45,9	3	3,37	9,0
40	43,6	3	3,20	8,5
45	40,3	3	2,96	7,9



Slika 26: Koncentracija ZU v supernatantih vzorcev št. 22, 24 in 25* v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja.

Iz podatkov na sliki 26 sklepamo, da večji kot so nanodelci, oziroma večja kot je njihova koncentracija v vzorcu, hitreje se le-ti pri danih pogojih centrifugiranja posedajo. Pri ND velikosti ~ 90 nm (vzorec št. 25*) in hitrosti centrifugiranja 20.000 obr/min ter času centrifugiranja 15 min ostane v supernatantu ~ 17 % ND. Pri enakih pogojih centrifugiranja disperzije s povprečno velikostjo ND ~ 140 nm (vzorec št. 24) in ~ 3 -krat večjo koncentracijo ND pa ostane v supernatantu le ~ 3 % ND. Glede na literaturne podatke (18) se pri večkratnem spiranju disperzij PLGA ND običajno vzorce ultracentrifugira 10 min pri hitrosti 21.000 obr/min. Pri tem lahko predpostavimo, da se pri vsakem ciklu spiranja (ultracentrifugiranja) zavrže nekaj % neposedenih ND, odvisno od koncentracije in velikosti ND, kar pa ni zanemarljiva količina, še posebej zato, ker se postopek ultracentrifugiranja večkrat ponovi, napaka pa se sešteva.

4.2.3 Fizikalna stabilnost disperzije ND

Vzorcem št. 19*, 20* in 21* smo po 40 dneh ponovno izmerili povprečno velikost ND in porazdelitev velikosti delcev (preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Povprečna velikost ND in PI takoj po izdelavi in po 40 dneh.

VZ	PO IZDELAVI		PO 40 DNEH	
	VELIKOST ND (nm)	PI	VELIKOST ND (nm)	PI
19*	159,1	0,09	152,9	0,07
20*	161,2	0,08	156,3	0,08
21*	164,8	0,08	160,2	0,07

Rezultati kažejo na fizikalno stabilnost disperzij ND, saj se velikost ND ni bistveno spremenila. Majhno zmanjšanje povprečne velikosti nanodelcev je morda posledica sedimentacije večjih delcev, ki se po 40 dneh niso redispergirali.

4.2.4 Hidrofobna narava ND

Pri meritvah vsebnosti ZU v osnovnem vzorcu in vzorcu, ki smo ga pripravili v drugi mikrocentrifugirki (poglavje 3.3.4), smo opazili znatne razlike. Vsebnost ZU v osnovni mikrocentrifugirki je bila vedno večja od vsebnosti ZU v drugi pripravljene mikrocentrifugirki. Do takšnih razlik je verjetno prišlo predvsem zaradi hidrofobne narave ND, ki so se adsorbirali na površino plastične mikrocentrifugirke in jih pred redčenjem nismo mogli redispergirati.

Rezultati v preglednici XIX potrjujejo, da pri pripravi vzorcev supernatantov za HPLC analizo, ki stojijo v mikrocentrifugirki vsaj 24 h, naredimo napako, ki pri vzorcih z majhno koncentracijo ND ni zanemarljiva (vzorec št. 22).

Preglednica XIX: Vpliv načina priprave vzorca za HPLC analizo na določeno vsebnost ZU v vzorcu.

VZ	Hitrost centrifugiranja (x 1000 obr/min)	Površina vrha ZU		Povprečna površina vrha ZU	Faktor redčenja	Koncentracija ZU (µg/ml)	Delež ZU (%)	Razlika med osnovnim in drugim vzorcem (%)
		Osnovni VZ	Drugi VZ					
22	0	365,0	337,8	351,4	3	25,61	100,0	3,9
22	10	148,2	137,4	142,8	3	10,42	35,3	3,8
22	30	55,6	34,4	45,0	3	3,30	13,2	23,6
23	0	366,0	337,4	351,7	3	25,63	100,0	4,1
24	0	543,8	495,4	519,6	3	37,86	100,0	4,7

Ker nobena izmed določenih koncentracij ZU ni "pravilna" (pravilna je povprečna vrednost vsebnosti ZU v obeh vzorcih), smo HPLC analizo vsebnosti ZU izvajali takoj po končanem ultracentrifugiranju z redčenjem vzorca v osnovni mikrocentrifugirki.

5 SKLEP

Z optimizacijo sestave formulacije (polimer, kombinacija stabilizatorjev) in pogojev izdelave smo z metodo nanoprecipitacije uspeli izdelati stabilno disperzijo polimernih ND z vgrajeno ZU celekoksibom, ki smo jo nato uporabili v procesu ultracentrifugiranja. Pri nanoprecipitaciji je imela hitrost mešanja disperznega medija oziroma hitrost injiciranja raztopine polimera z učinkovino v acetonu odločilen vpliv na velikost nastalih ND. Izdelane disperzije ND so bile monodisperzne s povprečno velikostjo ND ~ 140 nm; pri hitrejšem mešanju oziroma počasnejšem injiciranju raztopine polimera z učinkovino v acetonu so nastali manjši ND s povprečno velikostjo ~ 90 nm.

Pri postopku ultracentrifugiranja, ki je ena izmed najbolj pogostih separacijskih metod pri izdelavi polimernih ND, je bila potrebna posebna pazljivost pri jemanju rotorja iz centrifuge in centrifugirk z vzorci iz rotorja. Natančnost dela v tej fazi se je odražala pri nadaljnjih meritvah povprečne velikosti ND v vzorcu, saj so tudi najmanjši tresljaji povzročili delno redispergiranje posedenih delcev. S HPLC analizo supernatantov po končanem ultracentrifugiranju smo potrdili, da se v disperznem mediju raztopi med 2,4 µg/ml in 3,0 µg/ml ZU, kar se ujema s podatki iz literature o topnosti celekoksiba v vodi. Ugotovili smo, da različna povprečna velikost ND nima vpliva na učinkovitost vgrajevanja ZU v ND, saj je bila le-ta v primeru manjših (~ 90 nm) in večjih (~ 140 nm) ND ~ 90 %. Ker smo izdelali ND z majhnim masnim deležem ZU glede na polimer (~ 2,5 %), nismo zaznali razlike v učinkovitosti vgrajevanja ZU v ND, pri večjem masnem deležu ZU pa bi pričakovali drugačen rezultat. Za postopek ultracentrifugiranja lahko rečemo, da za ND manjših velikosti potrebujemo daljši čas centrifugiranja, da se le-ti posedejo, oziroma se posedejo šele pri večjih hitrostih centrifugiranja.

Na podlagi podatkov o vsebnosti ZU v supernatantih lahko zaključimo, da se pri hitrosti centrifugiranja 35.000 obr/min in več posedejo "vsi" ND, ne glede na čas centrifugiranja. Pri določanju vsebnosti ZU v supernatantu v odvisnosti od hitrosti in časa centrifugiranja smo ugotovili, da se s povečevanjem hitrosti in časa centrifugiranja napaka, ki jo naredimo, če se vsi ND še ne posedejo, manjša. Vendar je pri manjših koncentracijah ND in manjših velikostih ND ta napaka večja.

Zaključimo lahko, da je že sama izdelava polimernih ND z metodo nanoprecipitacije zelo zahtevna, saj je pomembnih več dejavnikov vključno z izbiro stabilizatorjev, polimera,

koncentracije ZU, volumna topila, v katerem sta raztopljena ZU in polimer, hitrosti mešanja in injiciranja. Sam postopek ultracentrifugiranja ni problematičen, vendar zahteva natančnost in skrbnost pri delu ter zadostno hitrost in čas centrifugiranja, saj v nasprotnem primeru naredimo znatno napako pri določanju vsebnosti ZU v supernatantu oz. posredno v ND.

6 LITERATURA

1. Schulenburg M.: Nanotehnologija - inovacije za jutrišnji svet. Evropska komisija, Generalni direktorat za raziskave, Bruselj, 2006.
2. Richard A. Graves, Grace A. Ledet, Elena Y. Glotser, Demaurian M. Mitchner, Levon A. Bostanian, Tarun K. Mandal: Formulation and evaluation of biodegradable nanoparticles for the oral delivery of fenretinide. *European Journal of Pharmaceutical Science* 76 (2015) 1-9.
3. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd Edition, Informa Healthcare. New York, 2007: VOLUME 1, Nanoparticle Engineering: 2384-2398.
4. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd Edition, Informa Healthcare. New York, 2007: VOLUME 1, Drug delivery: Nanoparticles: 1183-1200.
5. Pinto Reis C., Neufeld R. J., Riberio J. A., Veiga F.: Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2 (2006) 8-21.
6. U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker: Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European journal of Pharmaceutical Sciences* 24 (2005) 67-75.
7. L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 456-469.
8. Zetasizer Nano Series User Manual, Man 0317 Issue 1.1 feb. 2004
9. European Pharmacopoeia 7th Edition, 2011; Volume 1, Methods of analysis - 2.2.46 Chromatographic separation techniques.
10. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd Edition, Informa Healthcare. New York, 2007: VOLUME 1, Biologic Fluids: Analysis: 194-207
11. Schuck P., Zhao H.: Editorial for the special issue of methods "Modern Analytical Ultracentrifugation". *Modern Analytical Ultracentrifugation Methods* 54 (2011) 1-3.
12. Maechtle W. Börger L.: *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006, XIII, 237 p.
13. <https://static.thermoscientific.com/images/D20940~.pdf> (22.06.15)
14. [https://medschool.vanderbilt.edu/cdb-core-lab/files/cdb-core-lab/public_files/Thermo_Scientific_Rotor_Guide%20\(Exhaustive\).pdf](https://medschool.vanderbilt.edu/cdb-core-lab/files/cdb-core-lab/public_files/Thermo_Scientific_Rotor_Guide%20(Exhaustive).pdf) (22.06.15)

15. Danhier F., Ansorena E., Silva M. J., Coco R., La Breton A., Pr at V.: PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 505-522.
16. Margulis-Goshen K., Kesselman K., Danino D., Madagassi S.: Formation of celecoxib nanoparticles from volatile microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 393 (2010) 230-237.
17. Dolenc A., Kristl J., Baumgartner S., Planin sek O.: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation into tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 376 (2009) 204-212.
18. Holzer M., Vogle V., M antele W., Schwartz D., Haase W., Langer K.: Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European journal of Pharmaceutical Sciences* 72 (2009) 428-437.