

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA ŠKODA

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOSUSPENZIJS
TEŽKO TOPNO UČINKOVINO**

**PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF
NANOSUSPENSIONS WITH SLIGHTLY SOLUBLE DRUG
SUBSTANCE**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Leku farmacevtski družbi d.d. v Razvojnem centru Slovenija na področju Novih dostavnih sistemov pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in pod somentorstvom asist. dr. Miha Homarja, mag. farm.

Zahvaljujem se osebju Razvojnega centra v Leku, ki me je sprejelo medse in mi omogočilo izdelavo diplomske naloge, predvsem izr. prof. dr. Janezu Kerču, mag. farm. Posebna zahvala gre mojemu somentorju asist. dr. Mihi Homarju, mag. farm. za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Največja zahvala pa gre mojim staršem, bratu, Simonu in vsem mojim prijateljem, za njihovo razumevanje in spodbudo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorja asist. dr. Miha Homarja, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
1 UVOD	1
1.1 Suspenzije.....	2
1.1.1 Fizikalna stabilnost suspenzij.....	3
1.2 Nanosuspenzije.....	6
1.2.1 Povečana topnost.....	7
1.2.2 Povečana hitrost raztapljanja	9
1.2.3 Adhezivne lastnosti nanodelcev.....	9
1.2.4 Načini izdelave nanosuspenzij.....	10
1.2.4.1 Obarjanje učinkovine iz raztopine v netopilo.....	10
1.2.4.2 Homogeniziranje pod visokim tlakom	11
1.2.4.3 Mokro mletje v krogličnem mlinu.....	13
1.2.5 Vrednotenje nanosuspenzij.....	15
1.2.5.1 Velikost in porazdelitev velikosti delcev.....	15
1.2.5.2 Naboj na površini delcev.....	17
1.2.5.3 Kristaliničnost	18
1.2.5.4 Topnost in hitrost raztapljanja	19
1.2.5.5 Hidrofobnost.....	19
1.2.5.6 Interakcije delcev s proteini v telesu	19
1.2.6 Stabilnost nanosuspenzij	20
1.2.7 Obnašanje nanosuspenzij in vivo	21
1.2.8 Farmacevtske oblike z nanosuspenzijami.....	22
2 NAMEN DELA	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 Uporabljena učinkovina.....	25
3.2 Uporabljene pomožne snovi	25
3.3 Uporabljena kemikalija, surovina.....	29
3.4 Naprave za izdelavo in vrednotenje nanosuspenzij.....	29
3.5 Izdelava nanosuspenzij.....	30
3.6 Določanje velikosti delcev v nanosuspenziji.....	32

3.7	Določanje zeta potenciala delcev v nanosuspenziji.....	32
3.8	Spremljanje stabilnosti nanosuspenzij.....	33
3.9	Izdelava granulata in tablet.....	33
3.10	Razpadnost/raztapljanje tablet.....	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
4.1	Ovrednotenje nanosuspenzij.....	36
4.1.1	<i>Določitev velikosti delcev.....</i>	<i>36</i>
4.1.2	<i>Določitev zeta potenciala.....</i>	<i>45</i>
4.2	Stabilnost nanosuspenzij.....	46
4.2.1	<i>Stabilnost nanosuspenzij v hladilniku.....</i>	<i>46</i>
4.2.2	<i>Stabilnost nanosuspenzij pri različnih temperaturah.....</i>	<i>49</i>
4.2.3	<i>Stabilnost nanosuspenzij ovrednoteno s HPLC analizo.....</i>	<i>56</i>
4.3	Izdelava tablet.....	57
4.3.1	<i>Izdelava placebo tablet.....</i>	<i>57</i>
4.3.2	<i>Izdelava tablet z nanosuspenzijo.....</i>	<i>59</i>
4.4	Razpadnost/raztapljanje tablet.....	60
5	SKLEP.....	74
6	LITERATURA.....	75

POVZETEK

Številne novo sintetizirane učinkovine so v vodi težko topne, zato je biološka uporabnost takšnih učinkovin običajno zelo majhna. Povečanje topnosti je eden izmed najpogostejših pristopov za povečanje biološke uporabnosti učinkovin, katerih absorpcija je omejena s hitrostjo raztapljanja.

Sodobno možnost za povečanje biološke uporabnosti težko topnih učinkovin predstavlja oblikovanje nanosuspenzij. Nanosuspenzije so koloidno disperzni sistemi delcev učinkovine nanometrskih velikosti v vodnem mediju. Izdelamo jih lahko z obarjanjem učinkovine iz raztopine v netopilo, s homogeniziranjem pod visokim tlakom ali z mokrim mletjem v krogličnem mlinu. Bistvene prednosti nanosuspenzij so povečana topnost, povečana hitrost raztapljanja in adhezivne lastnosti delcev nanometrskih velikosti.

Nanosuspenzije smo izdelali z metodo homogenizacije v visokotlačnem homogenizatorju. Težko topno učinkovino v obliki prahu smo dispergirali v vodni raztopini stabilizatorjev z magnetnim mešalom. Tako pripravljeno suspenzijo smo homogenizirali s homogenizatorjem pod visokim tlakom in dobili nanokristale učinkovine. Preskusili smo vpliv različnih stabilizatorjev (od površinsko aktivnih snovi do steričnih stabilizatorjev) v različnih koncentracijah na velikost nanokristalov in fizikalno stabilnost nanosuspenzije. Ugotovili smo, da na nastanek in lastnosti nanosuspenzij poleg lastnosti uporabljene učinkovine vplivajo številni dejavniki: tlak in število homogenizacijskih ciklov, vrsta in koncentracija stabilizatorja. Kot najprimernejša stabilizatorja sta se izkazala Polisorbat 80V in Texapon K12, oba v koncentraciji 2,1 %.

Nanosuspenzije z najustreznejšimi stabilizatorji in izdelane pod najustreznejšimi procesnimi pogoji smo uporabili za izdelavo modelnih tablet. Tablete smo izdelali iz različnih pomožnih snovi in spremljali redisperzibilnost nanosuspenzij iz tablet, kjer so se kot najustreznejše izkazale tablete izdelane iz PEG 4000.

ABSTRACT

Many of the newly synthesized drugs are slightly soluble in water, therefore the bioavailability of such drugs is in general very small. The increase in solubility is one of the most common approaches to increase the bioavailability of drugs, whose absorption is limited by the dissolution rate.

Formulation of nanosuspensions represents an advanced approach to increase the bioavailability of poorly soluble drugs. Nanosuspensions are colloidal dispersion systems of nanosized drug particles in water media. They can be produced by precipitation, high pressure homogenisation or ball milling. Main advantages of nanosuspensions are increased solubility, higher dissolution rate and adhesive properties of nanosized particles.

Nanosuspensions were produced by high-pressure homogenization. The drug powder was dispersed in an aqueous surfactant solution by magnetic stirrer. The obtained suspension was passed through a high pressure homogenizer to break the drug into nanoparticles. Various stabilizers were tested at various concentrations and their influence on the size of nanoparticles and physical stability of nanosuspension was measured. The formation and properties of nanosuspensions is affected by several factors as well as characteristics of the drug, the pressure and number of homogenisation cycles and the type and concentration of stabilizer. The most appropriate stabilizers have proved to be Polysorbate 80V and Texapon K12, both at a concentration of 2.1 %.

Nanosuspensions with the most suitable stabilizers and manufactured under the most appropriate process conditions were used to produce tablets. Tablets were made from various excipients and redispersibility of nanosuspensions from tablets was monitored. Tablets made of PEG 4000 were proved to be most suitable.

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	mikroskopija na atomsko silo (Atomic Force Microscopy)
AUC	površina pod krivuljo (Area Under Curve)
AWPS	Amplitude-Weighted Phase Structure Determination
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)
2D-PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza
EPAS	obarjanje učinkovine v vodni raztopini z odparevanjem topila (Evaporative Precipitation into Aqueous Solutions)
GIT	gastrointestinalni trakt, prebavni trakt
HIC	modificirana kromatografija za merjenje hidrofobnih interakcij (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
i.m.	v mišico (intra muskulum)
IPS	izguba po sušenju
i.v.	v veno (intra venam)
keps	sipanje vzorca (kilo count per second)
LD	laserska difraktometrija (Laser Diffractometry)
MPS	mononuklearno fagocitni sistem
n.p.	ni podatka
o/v	olje v vodi
PAS	površinsko aktivna snov
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (Photon Correlation Spectroscopy)
PEG	polietilenglikol
PI	polidisperzni indeks
s.c.	pod kožo (sub cutem)
SDS	natrijev dodecil sulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (Scanning Electronic Microscopy)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija (Transmission Electronic Microscopy)
ut./vol. %	utežno/volumski odstotek

1 UVOD

Farmacevtska industrija se v zadnjih letih sooča z vedno večjim številom novo sintetiziranih učinkovin, ki so v vodi težko topne. Topnost je, ne glede na način uporabe, bistven faktor za učinkovitost, hkrati pa predstavlja izziv mnogim farmacevtskim podjetjem za razvoj novih učinkovitih farmacevtskih oblik. (1) Razvoj učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik je ključen za tržen uspeh novih zdravnih učinkovin, saj je predvsem pri kroničnih obolenjih peroralno zdravljenje še vedno najbolj priljubljeno in pri pacientih zagotavlja najboljše sodelovanje. (2)

Posledica slabe topnosti učinkovin je nepopolna in nepredvidljiva absorpcija, kar vpliva na biološko uporabnost takšnih učinkovin. V številnih primerih, kadar prenizka biološka uporabnost po peroralnem dajanju predstavlja glavno oviro za uporabo učinkovine, niti alternativni parenteralni način ne more rešiti te težave. Dajanje v obliki intravenske injekcije pogosto ni možno zaradi majhne topnosti učinkovine in prisotnosti delcev učinkovine velikostnega razreda nad 5 μm . Parenteralno dajanje v obliki mikroniziranih delcev učinkovine (npr. i.m.) ne zagotavlja vedno dovolj visokih plazemskih koncentracij zaradi premajhnega volumna topila, ki je na voljo za raztapljanje učinkovine na mestu injiciranja. Majhna topnost, ki jo običajno spremlja tudi nizka hitrost raztapljanja, preprečuje dovolj velike koncentracije učinkovine v krvi. Izjema med učinkovinami, ki kljub slabi topnosti dosežejo dovolj velike plazemske koncentracije, predstavljajo visoko učinkovite spojine. To so spojine, pri katerih za terapevtski učinek zadostujejo že majhne plazemske koncentracije učinkovine. (3)

Povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja je eden izmed najpogostejših pristopov za povečanje biološke uporabnosti učinkovin, katerih absorpcija je omejena s hitrostjo raztapljanja. Za zagotovitev ustrezne koncentracije raztopljenih učinkovin že v farmacevtski obliki se uporabljajo različni pristopi:

- solubilizacija z dodatkom površinsko aktivnih snovi,
- postopki specifičnega ali nespecifičnega kompleksiranja (npr. dodatek PEG ali vključevanje manjših molekul v ciklodekstrine),
- solubilizacija z dodatkom sotopil (etanol, sorbitol, glicerol, propilenglikol).

Na le delno uspešnost vseh teh pristopov kaže dejstvo, da je na tržišču prisotnih le majhno število takšnih zdravil. Težave pri razvoju ustrezne farmacevtske oblike pa so še večje, kadar je učinkovina težko topna tako v vodnem kot v organskem mediju. V takšnem primeru je že v naprej izključena možnost uporabe zmesi topil. (3)

Splošni pristop za povečanje hitrosti raztapljanja je mikronizacija težko topne učinkovine. Mikronizacija poveča hitrost raztapljanja, vendar to ne zagotovi dovolj velike biološke uporabnosti zaradi nizke nasičene topnosti. Naslednji korak je pretvorba mikroniziranega praška (mikrodelci učinkovine) v delce učinkovine nanometerskih velikosti. Nanodelce lahko izdelamo z metodo obarjanja učinkovine iz raztopine v netopilo, z mokrim mletjem učinkovine v krogličnem mlinu ali s postopkom homogenizacije pod visokim tlakom. (3) V zadnjih 10 letih je razvoj nanotehnologije napredoval in nekaj primerov je mogoče že zaslediti v farmacevtski uporabi.

1.1 Suspenzije

Mnoge novejšje učinkovine so po naravi hidrofobne in zato težko topne v vodi. Za pripravo raztopin takšnih učinkovin z ustreznim odmerkom bi potrebovali zelo velik volumen topila, dajanje takšnega volumna raztopine pa ne bi bilo sprejemljivo. Prav suspenzije omogočajo oblikovanje tekoče farmacevtske oblike s težko topno učinkovino z ustreznim odmerkom in sprejemljivim volumnom raztopine. (4) Suspenzije vsebujejo fino zdrobljene trdne delce zdravilne učinkovine, ki so suspendirani s pomočjo pomožnih sredstev v predpisanem topilu. Fizikalno gledano so suspenzije grobo disperzni sistemi, sestavljeni iz dveh faz: dispergirano notranjo fazo predstavljajo trdni delci, disperzno sredstvo pa tekočina. Notranja faza je v disperznem sredstvu netopna ali slabo topna. (5) Suspenzije so primerne za peroralno dajanje, za dajanje na kožo ali v oko. Lahko jih uporabljamo v obliki intramuskularnih injekcij in tako dosežemo podaljšano delovanje. Za uporabo v obliki intravenskih injekcij mora biti velikost delcev učinkovine dovolj majhna.

Glavna pomanjkljivost suspenzij je nezanesljivo pravilno odmerjanje zdravilne učinkovine, zato suspenzije v neodmernih farmacevtskih oblikah niso primerne za dajanje učinkovin z močnim učinkom. S tega vidika imajo prednost druge farmacevtske oblike kot so npr.:

tablete, kapsule, injekcije. Problem predstavlja zlasti sedimentacija in tvorba pogače. Če med shranjevanjem pride do nastanka sedimenta, se mora le-ta z rahlim stresanjem redispergirati, tako da je med odmerjanjem zagotovljena homogena porazdelitev suspendiranih delcev učinkovine. Suspenzije imajo tudi prednosti, ki v določenih primerih odtehtajo njihove pomanjkljivosti. Poleg možnosti dajanja težko topne učinkovine v tekoči farmacevtski obliki z ustreznim volumnom, je učinkovina v suspenziji manj izpostavljena hidrolizi in oksidaciji kot pa v raztopini. V suspenzijah lahko prekrijemo neprijeten vonj in okus praškaste učinkovine z disperznim medijem. So tudi primerna oblika za široko populacijo otrok in starejših bolnikov, ki težko pogoltnejo trdne farmacevtske oblike (kapsule, tablete). (4, 5)

1.1.1 Fizikalna stabilnost suspenzij

Na fizikalno stabilnost odločilno vpliva tako velikost delcev in njihova porazdelitev v disperznem mediju kot tudi oblika in kristalna struktura delcev. Z zmanjšanjem velikosti trdnih delcev se njihova površina močno poveča, zato se poveča tudi površinska energija. Termodinamsko gledano je takšno stanje nestabilno. Delci zato težijo k spontanemu združevanju, saj se s tem zmanjša presežek proste energije v sistemu. Prehod sistema v energijsko ugodnejše stanje je možen z zmanjšanjem medfazne napetosti ali z zmanjšanjem površine delcev. Medfazno napetost lahko zmanjšamo z dodatkom površinsko aktivnih snovi.

Suspenzije so pogosto termodinamsko nestabilni sistemi, ki s časom prehajajo v energijsko stabilnejši sistem, kar se kaže s pojavi flokulacije, flotacije, sedimentacije, rastjo kristalov ali nastankom pogače. Agregacija je omejena, če imajo delci na površini električni naboj (izkazujejo zeta potencial).

Anizometrični delci (v obliki ploščic ali iglic) lahko tvorijo velike flokule, ki vodijo do zelo velike sedimentacijske prostornine. Prostor med rahlim ogrodjem zapolni disperzni medij in prepreči nastanek pogače. (4)

Sedimentacija je premosorazmerna s kvadratom polmera delcev, z razliko med gostotama dispergirane faze in disperznega medija ter obratno sorazmerna z viskoznostjo disperznega medija. Hitrost sedimentacije opisuje Stokesova enačba:

$$v = \frac{2 \cdot r^2 \cdot (\rho - \rho_0)}{9 \cdot \eta_0} \quad \text{Enačba 1}$$

v – hitrost sedimentacije [$cm \cdot s^{-1}$]

r – polmer suspendiranih delcev [cm]

ρ – gostota dispergirane faze [$g \cdot cm^{-3}$]

ρ_0 – gostota disperznega medija [$g \cdot cm^{-3}$]

η_0 – viskoznost disperznega medija [$Pa \cdot s$]

Sedimentacijo torej lahko upočasnimo, če:

- so delci čim manjši,
- je razlika v gostoti med fazama čim manjša oziroma
- povečamo viskoznost disperznega medija.

Idealno stanje, v katerem so delci enakomerno porazdeljeni in ne tvorijo agregatov, je težko dosegljivo, zato je pomembno, da se v primeru sedimentacije suspenzija z zmernim stresanjem homogeno resuspendira. (5, 6)

Povečanje velikih delcev na račun majhnih je tudi ena od oblik nestabilnosti, ki izhaja iz temperaturne fluktuacije ali Ostwaldove rasti. Zaradi omenjenega procesa lahko pride do sprememb v distribuciji velikosti delcev in do sprememb v polimorfni obliki učinkovine. Rast delcev je še posebno pomembna, kadar je topnost učinkovine odvisna od temperature. Vzrok za Ostwaldovo rast so razlike v nasičeni topnosti v okolici delcev različnih velikosti, zato med njimi obstaja koncentracijski gradient. V takšnih sistemih je topnost manjših delcev večja in že majhno nihanje temperature povzroči rast kristalov. Pri povišani temperaturi se majhni delci učinkovine raztapljajo bolje in tvorijo prenasočeno raztopino. Pri padcu temperature raztopljena učinkovina iz prenasočene raztopine kristalizira na površini obstoječih delcev. Tako večji delci rastejo na račun manjših. Gonilna sila procesa je razlika v topnosti med malimi in velikimi delci, kot jo podaja naslednja zveza, poznana kot Ostwald-Freundlichova enačba:

$$\ln \frac{S_r}{S_\infty} = \frac{2 \cdot \gamma \cdot V}{2,303 \cdot R \cdot T \cdot \rho \cdot r} \quad \text{Enačba 2}$$

S_r – topnost majhnih delcev s polmerom r [$g \cdot ml^{-1}$]

S_∞ – topnost zelo velikih kristaliničnih delcev ($r \rightarrow \infty$) [$g \cdot ml^{-1}$]

γ – medfazna napetost delcev v topilu [$N \cdot m^{-1}$]

V – molarni volumen trdnih delcev [$l \cdot mol^{-1}$]

R – splošna plinska konstanta [$N \cdot m \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$]

T – absolutna temperatura [K]

r – polmer delcev [cm]

ρ – gostota trdne snovi [$g \cdot cm^{-3}$]

Rast kristalov (t.j. Ostwaldovo rast) lahko preprečimo z dodatkom polimerov, ki se adsorbirajo na površino delcev.

Odvisnost topnosti od velikosti delcev pride do izraza šele, kadar so delci nanometrskih velikosti, t.j. manjši od $1 \mu m$. Pri večini prahov v farmaciji, ki jih pridobivamo s klasičnimi postopki, so delci znatno večji od $1 \mu m$, zato velikost delcev nima vpliva na topnost.

Delci izdelani z mletjem, ki imajo praviloma široko porazdelitev velikosti, so manj primerni za pripravo suspenzij kot pa delci izdelani z obarjanjem, kjer je običajno porazdelitev velikost delcev ožja.

Fizikalna stabilnost disperzij je v veliki meri odvisna od uporabljenega stabilizatorja, ki pomeni pregrado za prenos molekul dispergirane faze v kontinuirano fazo, kakor tudi onemogoči agregiranje pri približevanju delcev. (4, 6, 7)

1.2 Nanosuspenzije

Alternativa pri oblikovanju težko topnih zdravilnih učinkovin, katerih topnost je manjša od 200 µg/ml, je izdelava nanosuspenzij. V literaturi opisujejo takšne sisteme pod različnimi imeni: hidrosoli (Hydrosols), nanokristali in nanosuspenzije. Nanosuspenzije so koloidno disperzni sistemi delcev učinkovine nanometrskih velikosti (1-1000 nm) v tekočem mediju. Poznamo več načinov izdelave nanosuspenzij. Med najpogosteje uporabljenimi so:

- obarjanje učinkovine iz raztopine v netopilo. Med procesom obarjanja moramo natančno nadzorovati rast delcev in jo omejiti z dodatkom površinsko aktivnih snovi, s čimer preprečimo nastanek delcev mikrometerskih velikosti. Metoda je primerna za učinkovine, ki so topne vsaj v enem topilu in da se to topilo meša z netopilom. Ni primerna za učinkovine, ki so hkrati težko topne v vodi in v organskih topilih.
- izdelava suspenzije z dispergiranjem praškaste zdravilne učinkovine v raztopino površinsko aktivnih snovi. Nastalo suspenzijo običajno meljejo s krogljčnim mlinom.
- izdelava suspenzije z dispergiranjem praškaste zdravilne učinkovine v raztopino površinsko aktivnih snovi ter homogeniziranjem s homogenizatorjem pod visokim tlakom. (3, 4)

Bistvene prednosti nanosuspenzij pred klasičnimi farmacevtskimi oblikami so:

- povečana topnost,
- povečana hitrost raztapljanja in
- adhezivne lastnosti delcev nanometrskih velikosti.

Optimalno velikost delcev v nanosuspenziji določimo glede na vrsto učinkovine (terapevtsko področje) in glede na želene biofarmacevtske lastnosti. Kadar je zaželena velika hitrost raztapljanja, so primerni delci v območju od 100 do 200 nm. Kadar pa je zaželen podaljšan čas raztapljanja (npr. mukoadhezivne nanosuspenzije), so primerni delci iz zgornjega dela nanometrskega območja npr. od 800 do 1000 nm.

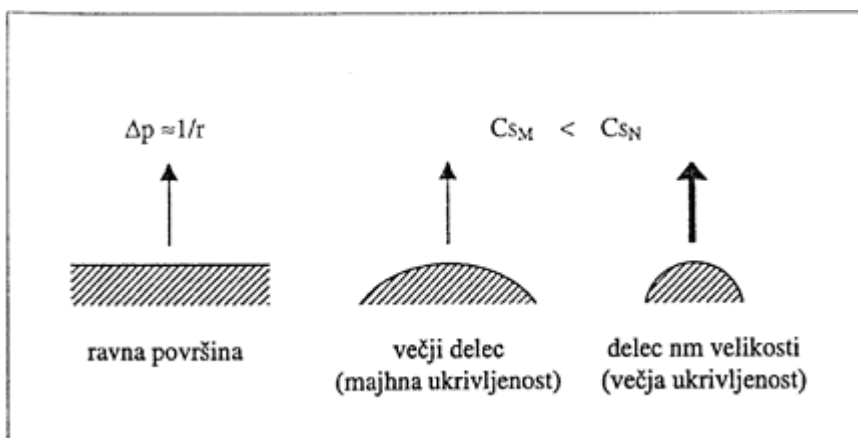
Želena velikost delcev in porazdelitev velikosti oz. PI pa je odvisna tudi od predvidenega načina aplikacije (peroralno, i.m., i.v., s.c.). Za intravensko dajanje in ciljno dostavo učinkovine v celice mononuklearnega fagocitnega sistema (MPS) so primernejši večji delci, saj le tako preprečimo, da bi se delci učinkovine že popolnoma raztopili, preden bi sploh dosegli makrofage. Poudariti je potrebno, da pravilo "manjša velikost delcev, boljši izdelek" ne drži vedno. Najprimernejšo velikost delcev je potrebno določiti glede na terapevtski namen uporabe. Za intravensko dajanje so primerni izdelki, ki vsebujejo 10 % ali manj učinkovine, medtem ko so za nadaljnjo proizvodnjo (npr. granuliranje in izdelava tablet) primernejše nanosuspenzije z večjo vsebnostjo učinkovine. (3)

1.2.1 Povečana topnost

Topnost je definirana kot koncentracija raztopljenih snovi v nasičeni raztopini pri določeni temperaturi. Poleg temperature je topnost odvisna tudi od velikosti delcev učinkovine. Odvisnost topnosti od velikosti delcev pride do izraza šele, kadar so delci manjši od 1 μm . (4) Pri kristaliničnih učinkovinah je v farmaciji pomemben pojav polimorfizma. Gre za različno razporeditev atomov in molekul v osnovni kristalni rešetki. Polimorfizem je izrednega pomena, saj se polimorfi razlikujejo v topnosti, hitrosti raztapljanja in drugih pomembnih lastnosti. Topnost je praviloma najvišja za polimorfno modifikacijo z najvišjo energijo in najnižjim tališčem. Splošno je znano, da imajo učinkovine v amorfnem stanju večjo hitrost raztapljanja. (5)

Zmanjšanje velikosti delcev do mikrometrskih velikosti ne vpliva bistveno na topnost. Če pa zmanjšamo delce na tako majhno velikost, da je razmerje med površino delcev in prostornino veliko, pa se lahko ravnotežna topnost spremeni. Molekule topljenca v površinski plasti so v posebno visokem energijskem stanju, ki se razlikuje od energije molekul v notranjosti delca oz. kristala, ker molekule čutijo privlak sosednjih molekul, s katerimi so obdane z vseh strani. Podobno kot molekule na površini tekočin imajo tudi molekule na površini trdnih snovi višjo prosto energijo kot v notranjosti. Če je velikost delcev topljenca zmanjšana na območje velikosti nekaj molekulskih premerov, postane očitno, da je signifikanten delež molekul v različnem energijskem stanju. Do povečanja topnosti ne pride samo zaradi povečanja površine, temveč tudi zaradi povečanja medfazne

napetosti trdno/tekoče, ki je posledica povečane ukrivljenosti površine majhnih delcev (Slika 1). (4)



Slika 1: Povečanje t.i. tlaka raztapljanja kot posledice povečane ukrivljenosti majhnih delcev; Δp – tlak raztapljanja, r – polmer delcev, C_{SM} – koncentracija nasičene raztopine mikrodelcev, C_{SN} – koncentracija nasičene raztopine nanodelcev. (prirejeno po referenci 4)

Povečanje topnosti nanodelcev lahko razložimo s Kelvinovo in Ostwald-Freundlichovo enačbo. Kelvinova enačba opisuje parni tlak na meji med ukrivljeno površino kapljice in plinom. Enačba, ki opisuje prehod molekul iz tekoče faze (kapljica) v plinasto fazo, velja tudi za prehod molekul iz trdne faze (delec učinkovine) v tekočo fazo (raztopina). Parni tlak v enačbi tako nadomestimo s tlakom raztapljanja. Parni tlak oz. tlak raztapljanja narašča z naraščanjem ukrivljenosti površine, oz. z zmanjševanjem velikosti delcev. Kelvinova enačba, ki velja za delce suspendirane v nasičeni raztopini: (8)

$$\ln \frac{S_1}{S_2} = \frac{2 \cdot \gamma \cdot M}{N \cdot k \cdot T \cdot \rho} \cdot \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{Enačba 3}$$

S_1, S_2 – topnost delcev s polmerom r_1 oz. r_2 v vodnem mediju [$g \cdot ml^{-1}$]

γ – medfazna napetost kristalov [$N \cdot m^{-1}$]

M – molekulska masa topljenca [$g \cdot mol^{-1}$]

k – Boltzmannova konstanta [$1,38 \cdot 10^{-23} J \cdot K^{-1}$]

N – Avogadrovo število [$6,02 \cdot 10^{23} \cdot mol^{-1}$]

T – absolutna temperatura [K]

ρ – gostota topljenca [$g \cdot cm^{-3}$]

1.2.2 Povečana hitrost raztapljanja

Povečanje topnosti ima za posledico tudi povečanje hitrosti raztapljanja. Hitrost raztapljanja sferičnih delcev učinkovine opisuje Noyes-Whitneyeva enačba:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D}{h} \cdot \frac{A}{V} \cdot (c_s - c) \quad \text{Enačba 4}$$

dc/dt – hitrost raztapljanja delcev učinkovine [$mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$]

D – difuzijski koeficient učinkovine [$cm^2 \cdot s^{-1}$]

A – površina delcev [cm^2]

h – debelina difuznega sloja [cm]

V – prostornina [l]

c_s – topnost učinkovine [$mol \cdot l^{-1}$]

c – koncentracija učinkovine v okolnem mediju [$mol \cdot l^{-1}$]

Zmanjšanje velikosti delcev ima za posledico večjo površino in tanjši difuzijski sloj okoli delcev in s tem povečano površinsko specifično hitrost raztapljanja. Sočasno povečanje nasičene topnosti c_s in zmanjšanje difuzijske razdalje vodi v povečanje koncentracijskega gradienta ($c_s - c$), kar poleg večje specifične površine manjših delcev še dodatno prispeva k večji hitrosti raztapljanja. (4, 9)

1.2.3 Adhezivne lastnosti nanodelcev

Tretja prednost nanosuspenzij so boljše adhezivne lastnosti delcev učinkovine nanometrskih velikosti. Povečanje adhezivnih lastnosti majhnih delcev v primerjavi z grobimi delci lahko poenostavljeno razložimo, če upoštevamo, da se zaradi večje stične površine izboljšajo medsebojne interakcije med delci. Primer iz vsakdanjega življenja je razlika med kristalnim sladkorjem in sladkorjem v prahu. Če pecivo potresemo s kristalnim sladkorjem bo le-ta spolzel s peciva, medtem ko bo sladkor v prahu ostal na njem.

Boljše adhezivne lastnosti delcev učinkovine nanometrskih velikosti lahko izkoriščamo za izboljšano peroralno dostavo težko topnih učinkovin in s tem povečano biološko uporabnost. Delci zaradi svojih lastnosti ostanejo dalj časa v stiku s steno GIT. Čas stika pa lahko še dodatno podaljšamo s kombinacijo z mukoadhezivnimi polimeri (npr. hitosan, carbopol). Povečana adhezivnost pa ima lahko tudi neugodne stranske učinke, saj lahko povzroči npr. nastanek razjede na sluznici. (4, 10)

1.2.4 Načini izdelave nanosuspenzij

1.2.4.1 Obarjanje učinkovine iz raztopine v netopilo

Nanosuspenzije lahko pripravljamo z asociacijo molekul v koloidne delce pri mešanju raztopine z netopilom. Pri tem mora biti učinkovina topna v določenem topilu, ki pa se meša z netopilom (voda), v katerem učinkovina ni topna. Na ta način ne moremo oblikovati učinkovin, ki niso topne niti v organskih topilih, niti v vodi. Proces obarjanja mora biti dobro nadzorovan, nastale nanodelce pa je potrebno stabilizirati, da preprečimo tvorbo mikrodelcev. Velikost nastalih delcev učinkovine pri obarjanju je obratno sorazmerna s topnostjo učinkovine v mediju za obarjanje. V raziskavah so dokazali, da so za ta način priprave primerne le tiste učinkovine, katerih topnost v vodi je manjša kot 10^{-3} - 10^{-4} mol/l. Če se pri tem obarjanju posreči v trenutku tako porazdeliti raztopino učinkovine v organskem topilu v mediju za obarjanje, da se vsi delci skoraj istočasno oborijo, lahko pričakujemo relativno enako velikost delcev. (4)

V literaturi zasledimo različne metode, ki temeljijo na izhodnem dvofaznem sistemu. Pri uporabi organskega topila z nizkim vreliščem in neznatno topnostjo v vodi kot dispergirane faze o/v emulzijskega sistema lahko obarjanje učinkovine in nastanek nanosuspenzije dosežemo enostavno z odparevanjem topila (npr. EPAS – Evaporative Precipitation into Aqueous Solutions). Kadar pa uporabimo organsko topilo, ki se delno meša z vodo, lahko dosežemo obarjanje učinkovine iz emulzije tipa o/v z metodo razredčevanja. (11)

Obarjanje učinkovine v vodni raztopini z odparevanjem topila (EPAS) je tehnologija izdelave delcev težko topne učinkovine nano- in mikrometrskih velikosti prekritih s hidrofilnim stabilizatorjem s čimer pospešimo hitrost raztapljanja učinkovine. Učinkovino

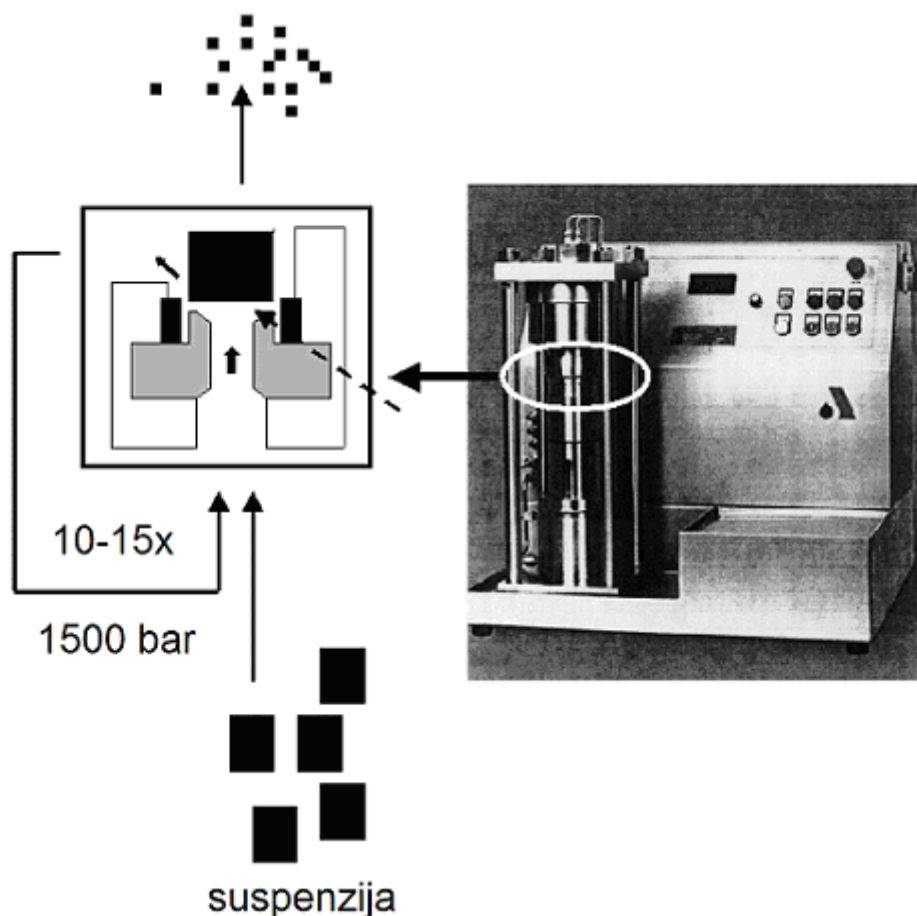
najprej raztopimo v organskem topilu z nizkim vreliščem (npr. diklorometan). To raztopino nato črpamo skozi cev, kjer se pri povečanem tlaku segreje nad temperaturo vrelišča organskega topila, in jo skozi fino šobo razpršujemo v segreto vodno fazo. Hitro odparevanje organskega topila povzroči prenasičenje in obarjanje učinkovine. Stabilizator, ki optimizira nastanek delcev in jih stabilizira, lahko dodamo v organsko fazo, vodno fazo ali v obe fazi. Šoba je potopljena v vodno raztopino, da je zagotovljen hiter stik nastajajočih delcev s hidrofilnim stabilizatorjem in da je preprečena kristalizacija in rast delcev učinkovine. (12)

V laboratorijskem merilu lahko nanosuspenzije pripravimo enostavno s hitrim mešanjem (npr. injiciranjem) raztopine učinkovine v organskem topilu z vodo. Stabilizatorje raztopimo v ustrezni fazi glede na njihovo topnost. Za proizvodnjo večjih količin je primerno mešanje v statičnem mešalu. To je ozka cev z dvema vstopoma in enim izstopom, v katero so vgrajene ovire, ki povzročijo nastanek turbulentnega toka. S pomočjo zobate črpalke uvajamo v mešalno komoro raztopino učinkovine in vode z ustreznim stabilizatorjem v želenem masnem razmerju. Obe raztopini ponavadi filtriramo pred vstopom v statično mešalo skozi membranski filter. Metoda ima tudi številne slabe strani. Da dobimo delce z ozko porazdelitvijo velikosti, je potrebno natančno nadzorovati nastanek in rast kristalov, kar pa ni tako enostavno. Velikokrat med procesom nastanejo metastabilni, amorfni trdni delci, ki pa se pretvorijo v bolj stabilno kristalinično obliko. Še bolj problematičen je proces rasti delcev, saj je spontan in težko kontroliran. Nenazadnje moramo uporabljena organska topila ustrezno odstraniti, da ne presegajo toksikološko dopustnih mej v končnem produktu. (4, 13)

1.2.4.2 Homogeniziranje pod visokim tlakom

Učinkovino v obliki prahu dispergiramo v vodni raztopini stabilizatorja. Priporočljivo je, da je začetna velikost delcev izhodne učinkovine čim manjša. Najbolje je, da je učinkovina predhodno mikronizirana. Tako pripravljeno suspenzijo homogeniziramo s homogenizatorjem pod visokim tlakom. Običajno izvajamo homogenizacijo pri tlakih 1000 do 1500 barov. Določene naprave lahko dosežejo tlake do 3000 barov. Pri prehodu suspenzije iz cilindra v režo se premer zmanjša iz 3,0 cm na samo 25 μm , zato se hitrost toka suspenzije izjemno poveča. Za nastanek nanosuspenzij v visokotlačnem

homogenizatorju so pomembne kavitacijske sile. V skladu z Bernoullijevo enačbo se dinamični tlak poveča, istočasno pa se zmanjša statični tlak. V reži se statični tlak zniža pod tlak vrelišča vode pri sobni temperaturi, zaradi česar prične voda vreti. Nastanejo mehurčki vodne pare, ki implodirajo, ko suspenzija zapusti režo in preide v območje normalnega zračnega tlaka. Pojav imenujemo kavitacija. Sila kavitacije je dovolj velika, da zdrobi delce učinkovine. Dodaten drobilni učinek nastopi zaradi visoke strižne napetosti v reži in zaradi trkov delcev (podobno kot pri mikronizaciji z zračnim tokom). V večini primerov ne zadostuje, da suspenzijo homogeniziramo samo enkrat, temveč moramo homogeniziranje ponoviti v več ciklih. Običajno zadostuje 3 do 10 do maksimalno 20 homogenizacijskih ciklov (Slika 2). (4)



Slika 2: Izdelava nanosuspenzij s homogenizacijo pod visokim tlakom

Velikost delcev, ki jih dobimo s homogeniziranjem pod visokim tlakom, je odvisna od tlaka in števila homogenizacijskih ciklov, od vrste in koncentracije PAS, od količine učinkovine v suspenziji, ki jo homogeniziramo in od trdote kristalov same učinkovine.

Splošno velja, da se z naraščanjem tlaka in števila homogenizacijskih ciklov velikost delcev zmanjšuje. Nastanek delcev točno določene velikosti lahko dosežemo z ustrezno izbiro tehnoloških parametrov, kot so npr. tlak in število ciklov. Za vsako učinkovino obstaja določena minimalna velikost delcev, ki jo lahko dosežemo pri določenem tlaku. Običajno je delež učinkovine v nanosuspenziji med 10 % in 20 %, lahko pa celo do 40 %.

Homogenizacijo učinkovine s homogenizatorjem pod visokim tlakom lahko izvedemo v vodni raztopini ali v nevodnih topilih oz. topilih z zmanjšano vsebnostjo vode. Obstaja pa tudi proces, kjer gre za kombinacijo obarjanja učinkovine, ki mu sledi visoko energijski korak, največkrat homogenizacija. (14)

Prednost tovrstnega homogeniziranja je v zelo majhnem deležu mikrodelcev in možnost kontinuirane proizvodnje v industrijskem merilu. V postopku priprave nanosuspenzij lahko pride do spremembe kristalne oblike učinkovine tako, da se poveča delež učinkovine v amorfno stanje ali se vsa učinkovina pretvori v amorfno stanje. Delež učinkovine, ki preide v amorfno stanje med procesom homogenizacije pod visokim tlakom je odvisen od tehnoloških parametrov, nanj pa vpliva tudi trdota same učinkovine. (4)

1.2.4.3 Mokro mletje v krogličnem mlinu

Konvencionalne tehnike izdelave drobnih delcev so suho mletje – mletje v zračnem toku (mikronizacija) ali mokro mletje v krogličnem mlinu. Z mletjem v zračnem toku dobimo populacijo delcev s široko porazdelitvijo velikosti med 0,5 μm in 30 μm , pri čemer je le majhen delež delcev pod 1 μm . Nanodelce lahko dobimo le s frakcioniranjem (npr. Field Flow Fractionation). Proces mletja je v osnovi mnogo lažje nadzorovati kot proces obarjanja učinkovine, kar je prednost tega postopka. Slabe strani te tehnologije so nizek izkoristek in tehnične težave v proizvodnem merilu.

Z mokrim mletjem uprašene učinkovine v krogličnem mlinu dobimo relativno visoke izkoristke. Slabost tega postopka mletja je, da je postopek nekontinuiran in lahko traja več dni, pride pa lahko tudi do obrabe kroglic. Najpogosteje se uporabljajo steklene kroglice ali kroglice iz cirkonijevega oksida. V nasprotju z i.v. farmacevtskimi oblikami material

kroglic za mletje pri peroralnih farmacevtskih oblikah ne povzroča problemov, ker je relativno netoksičen in se mikrodelci kroglic ne absorbirajo iz prebavnega trakta.

Postopek mletja poteka tako, da pripravimo suspenzijo učinkovine v vodni raztopini stabilizatorja in jo nato meljemo v krogličnem mlinu s kroglicami. Posodo mlina napolnimo s kroglicami (običajno od 15 do 35 % prostornine bobna) in s suspenzijo (približno 10 % prostornine posode). Za drobno mletje uporabljamo nizkoenergijske mline z manjšim številom obratov, kjer se delci drobijo zaradi sile trenja. Grobo mletje dosežemo v glavnem z udarjanjem pri višjih hitrostih mlina. Paziti moramo, da meljemo pri hitrosti, ki je bistveno nižja od kritične hitrosti (npr. 50 % kritične hitrosti). Kritična hitrost je definirana kot hitrost rotacije posode, pri kateri pride do učinka centrifugalne sile. Kroglice oz. medij, ki ga meljemo, se zaradi centrifugalne sile prilepijo na steno in drobilni učinek izgine. Učinek mletja je odvisen od številnih faktorjev: od materiala in velikosti kroglic, deleža kroglic in suspenzije v posodi, hitrosti in časa mletja, odvisen pa je tudi od učinkovine in izbranega stabilizatorja. V poskusih je trajalo mletje v krogličnem mlinu približno 4 dni, da so dobili delce manjše od 400 nm. Na splošno je prišlo do znatnega zmanjšanja velikosti delcev v prvih 24 urah. Nadaljnji učinek mletja je bil odvisen od vrste učinkovine in uporabljenega stabilizatorja. (4)

Nastale nanosuspenzije lahko pretvorimo v dolgotrajno stabilno obliko s sušenjem z razprševanjem. Pri tem raztopimo 10 % laktoze ali 5 % manitola, ki loči delce nanosuspenzije med procesom sušenja. Tako posušen vzorec je ob primernem shranjevanju obstojen več let. Pri ponovnem dispergiranju v vodi nastane izotonična raztopina. Uporaba postopka sušenja z razprševanjem se izplača le v velikem merilu, v majhnem merilu pa je za odstranitev disperznega medija bolj primeren postopek liofilizacije. Pred liofilizacijo v nanosuspenziji raztopimo 5 % manitol, ki med procesom liofilizacije deluje kot krioprotektant.

1.2.5 Vrednotenje nanosuspenzij

Za vrednotenje nanosuspenzij so pomembni naslednji parametri:

- velikost in porazdelitev velikosti delcev,
- zeta potencial delcev,
- kristaliničnost,
- topnost in hitrost raztapljanja.

Za nanosuspenzije z modificirano površino delcev so pomembni tudi naslednji parametri, ki nam dajo jasno sliko glede obnašanja delcev in vivo:

- adhezivne lastnosti delcev (v primeru mukoadhezivnih delcev),
- hidrofilne/lipofilne lastnosti površine delcev,
- interakcije delcev s proteini v telesu. (3)

1.2.5.1 Velikost in porazdelitev velikosti delcev

Z merjenjem velikosti delcev vrednotimo njihovo velikost, agregacijo in rast kristalov. Za ugotavljanje velikosti delcev obstajajo številne metode, ki se med seboj razlikujejo po principu merjenja, merilnem območju, potrebni količini vzorca in načinu njegove priprave. Osnova metod so različne lastnosti delcev, ki jih izkoriščamo za merjenje njihove velikosti (npr. mehanske, optične, elektronske). (15)

Merilo za širino distribucije velikosti delcev je polidisperzni indeks (PI), ki ima vrednosti od 0 do 1. Bolj kot je PI blizu 0, bolj je monodisperzna porazdelitev. Porazdelitev velikosti delcev v disperziji je osnovni standard kontrole kakovosti farmacevtskih suspenzij. (4)

Fotonska korelacijska spektroskopija

Povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev nanometrskih velikosti običajno določamo z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Photon Correlation Spectroscopy – PCS). Metoda omogoča merjenje velikosti delcev v območju od 3 nm do 3 μm . V tem območju izkazujejo delci znatno Brownovo gibanje zaradi trkov z molekulami topila, kar povzroči nihanje v jakosti sipanja svetlobe. Zaradi naključnosti gibanja je zgornja meja

velikosti delcev, ki jih s to metodo še lahko merimo, omejena s sedimentacijo delcev, ta pa je odvisna od velikosti delcev, kot tudi od razlike v gostoti delcev in medija. Pri merjenju s PCS je zelo pomembno, da vzdržujemo določeno temperaturo, saj so od nje odvisni hitrost gibanja delcev, gostota in viskoznost medija. Prednosti PCS metode so enostavna priprava vzorca, hitra meritev in učinkovitost. Problem te metode je v tem, da je za meritev potreben razredčen sistem in je velikokrat potrebno razredčevanje, kar ima za posledico spremembo sistema, ter da so delci sferični.

Laserska difraktometrija

Laserska difraktometrija (Laser Diffraction – LD) se uporablja za merjenje velikosti delcev v mikrometrskem območju ali agregatov nanodelcev učinkovine. Temelji na merjenju sipanja laserske svetlobe, ko ta zadene delec. Merilno območje je odvisno od uporabljene opreme in se giblje od 0,05 – 80 μm do največ 2000 μm . Rezultati LD metode so volumski podatki, značilni parametri so premeri 50, 90, 95 in 99 % (t.j. premer 99 % pomeni, da je v 99 % volumna velikost delcev pod dano velikostjo v mikrometrih). (3, 4) Tudi pri tej metodi predpostavimo, da so delci sferični.

Coulter counter metoda

Za nanosuspenzije, ki so namenjene intravenski uporabi, je pomembna analiza velikosti delcev s Coulterjevim števcem (Coulter counter). V nasprotju z lasersko difraktometrijo, pri kateri nam rezultati podajo le relativno porazdelitev velikosti delcev, nam analiza s Coulterjevim števcem daje absolutne rezultate (t.j. absolutno število delcev v določenem volumnu za določen velikostni razred). Za intravenske injekcije je vsebnost delcev večjih od 5 μm nevarna, zato ne smejo biti prisotni. Zavedati se moramo, da je premer najmanjših kapilar v organizmu 5-6 μm , zato lahko delci večji od 5 μm povzročijo zamašitev kapilar in embolijo. (3) Metoda temelji na spremembi prevodnosti, ko delec potuje med elektrodama. Takrat se namreč prevodnost zmanjša. Na volumen oz. velikost delca je možno sklepati iz površine spremembe signala. (16)

Elektronska mikroskopija

Velikost delcev lahko določimo tudi z elektronsko mikroskopijo. Uporabljamo predvsem tri vrste elektronske mikroskopije: vrstična elektronska mikroskopija (Scanning Electronic Microscopy – SEM), transmisijska elektronska mikroskopija (Transmission Electronic

Microscopy – TEM) in mikroskopija na atomsko silo (Atomic Force Microscopy – AFM). Vsaka od metod ima svoje specifičnosti. TEM presvetli vzorec in omogoča proučevanje notranjosti sistema, SEM in AFM pa omogočata predvsem opazovanje površine. Prednost elektronske mikroskopije je, da nam poda poleg velikosti tudi obliko delcev, pomanjkljivost pa je v zahtevni pripravi vzorca. Vzorec nanodelcev moramo najprej posušiti v vakuumu, nanj naporiti plast ogljika ali zlata s pomočjo katodne evaporacije v enakomernem sloju približno 20 nm, nakar dobimo sliko po obsevanju z elektroni. (4, 17)

1.2.5.2 Naboj na površini delcev

Na fizikalno stabilnost dispergiranih delcev ima velik vpliv naboj na površini. Ta je lahko posledica selektivne adsorpcije ionov iz disperznega medija ali ionizacije skupin na površini (npr. – COOH, naboj je odvisen od pKa in pH). Gostoto naboja na površini delcev ugotavljamo z merjenjem zeta potenciala. Večji naboj na površini daje večji absolutni zeta potencial, ki v fizikalnem smislu bolje stabilizira posamezni sistem. Zeta potencial je definiran kot razlika med potencialom na površini delca močno vezane plasti ionov in elektroneutralnim območjem v raztopini. Običajno ga določamo z elektroforezo, obstajajo pa še druge tehnike kot so: ultramikroskopsko opazovanje sipanja laserske svetlobe pri premikanju nanodelcev, laserska Dopplerjeva anemometrija in uporaba AWPS (Amplitude-Weighted Phase Structure Determination) metode. Pri elektroforezi merimo hitrost gibanja nabitih delcev v električnem polju skozi tekočino. S to metodo lahko ocenimo vrsto naboja na delcih ter elektroforezno gibljivost delcev [$(\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$], ki je povezana z nabojem na površini oz. zeta potencialom (mV).

$$\mu_E = \frac{v}{E} \quad \text{Enačba 5}$$

$$\xi = \mu_E \cdot \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta}{\varepsilon} \quad \text{Enačba 6}$$

μ_E – elektroforezna gibljivost delcev [$(\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$]

v – hitrost gibanja delcev [$\mu\text{m/s}$]

E – jakost električnega polja [V/cm]

ζ – zeta potencial delcev [V]

η – viskoznost disperznega medija pri temperaturi merjenja [kg/m³]

ε – dielektrična konstanta disperznega medija pri temperaturi merjenja [As/Vm]

Za fizikalno stabilnost nanosuspenzij, ki so stabilizirane samo z elektrostatskimi odbojnimi silami, mora biti zeta potencial absolutno večji od ± 30 mV. Sistemi z vrednostmi zeta potenciala med -5 mV in +5 mV veljajo za nestabilne. Pri sistemih, ki so stabilizirani tako z elektrostatskimi kot s steričnimi stabilizatorji, pa je za stabilen sistem zadostna vrednost zeta potenciala ± 20 mV. (3, 6, 16)

1.2.5.3 Kristaliničnost

Ugotavljanje kristaliničnosti je pomembno zlasti pri učinkovinah, ki imajo več polimorfnih modifikacij. Številne učinkovine so lahko tako v kristalnem kot tudi v amorfnem stanju. Polimorfizem je za farmacijo izrednega pomena, saj se polimorfi med seboj razlikujejo v fizikalnih lastnostih, med katerimi sta najpomembnejša topnost in hitrost raztapljanja. Večjo hitrost raztapljanja imajo modifikacije z višjo notranjo energijo, to so metastabilne in nestabilne oblike. Amorfnе oblike so sestavljene iz neurejeno razporejenih molekul, ki ne sestavljajo značilno urejene kristalne rešetke. Notranja energija in entalpija amorfnе oblike sta višji kot pri kristalnih oblikah, prav tako pa sta višji tudi Gibbsova prosta energija in entropija. Amorfnе oblike so po reoloških lastnostih podobne trdni obliki, po strukturnih pa tekočinam. Zaradi termodinamske nestabilnosti (visoka notranja energija, velika specifična površina) lahko amorfnе oblike spontano prehajajo v kristalne med tehnološkim procesom ali v času shranjevanja. (5)

Za določevanje kristaliničnosti nanodelcev se uporabljajo termoanalizne tehnike (npr. diferenčna termična analiza, diferenčna dinamična kalorimetrija) in rentgenska difrakcija. Predvsem diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je zelo primerna zaradi svoje enostavnosti in cene izvedbe. Metoda temelji na primerjalnem načinu merjenja. Vzorce primerjamo z inertno substanco, ki v danem temperaturnem območju ne doživi nobenih sprememb. Referenca in vzorec imata ves čas segrevanja enako temperaturo. Merimo toplotno energijo, ki je potrebna, da med vzorcem in referenco ne pride do temperaturnih

razlik, in je enaka toploti, ki se porablja ali sprošča pri faznih prehodih v vzorcu. V postopku priprave nanosuspenzij lahko pride do spremembe kristalne strukture učinkovine tako, da se spremeni polimorfna oblika, se poveča delež učinkovine v amorfem stanju ali se učinkovina popolnoma pretvori v amorfno stanje. Obseg prehoda lahko spremljamo z DSC analizo ali rentgensko difrakcijo. (18)

1.2.5.4 Topnost in hitrost raztapljanja

Bistvene prednosti nanosuspenzij pred tradicionalnimi oblikami so povečana hitrost raztapljanja, povečana topnost in adhezivne lastnosti nanosuspenzij. Zaradi teh prednosti pride do spremembe lastnosti takšnih pripravkov in vivo (profili krvnih koncentracij, maksimalne koncentracije v plazmi, biološka uporabnost). Določevanje hitrosti raztapljanja je pomembno za vrednotenje nanosuspenzij v primerjavi s tradicionalnimi oblikami učinkovine (npr. grob prašek, mikroniziran produkt). Za ugotavljanje hitrosti raztapljanja uporabimo preskus raztapljanja za trdne farmacevtske oblike. (3)

1.2.5.5 Hidrofobnost

Hidrofilne/hidrofobne lastnosti površine delcev vplivajo na in vivo porazdelitev učinkovine v posamezne organe. Hidrofobnost površin nanodelcev ugotavljamo v vodnem disperznem mediju. Največkrat uporabljene metode so merjenje stičnega kota, uporaba posebne modificirane kromatografije za merjenje hidrofobnih interakcij (Hydrophobic Interaction Chromatography – HIC), v zadnjem času pa uporabljamo tudi metodo inverzne plinske kromatografije. Hidrofobnost površine nanodelcev nam kaže na stopnjo vezave plazemskih proteinov na delce. (3, 16)

1.2.5.6 Interakcije delcev s proteini v telesu

Vrsta in količina plazemskih proteinov, ki se adsorbirajo na nanodelce po i.v. dajanju nanosuspenzije, je ključni dejavnik, ki določa porazdelitev učinkovine v organe. Za ugotavljanje adsorpcije proteinov na nanodelce učinkovine uporabljamo modificirano

dvodimenzionalno poliakrilamidno gelsko elektroforezo (2D-PAGE). Vrsto in količino proteinov, ki se v določenem času adsorbirajo na nanodelce učinkovine ugotavljamo tako, da nanodelce učinkovine inkubiramo s plazmo ali serumom. Lahko pa uporabimo plazmo ali serum živali, katerim smo predhodno i.v. injicirali nanosuspenzijo.

Obstajajo določene povezave med adsorpcijo proteinov na nanodelce učinkovine in porazdelitvijo le-teh v organe (npr. privzem v celice mononuklearnega fagocitnega sistema, cirkulacija delcev v krvi, privzem delcev v kostni mozeg, dostavljanje učinkovine v možgane). Na osnovi poznanih povezav med adsorpcijo proteinov in porazdelitvijo v organe lahko pripravimo nanosuspenzije za ciljno dostavo učinkovine. (3)

1.2.6 Stabilnost nanosuspenzij

Nanosuspenzije morajo imeti ustrezno kemijsko, fizikalno in mikrobiološko stabilnost, da so primerne za farmacevtsko uporabo. Kriterij za fizikalno stabilnost je odsotnost aglomeracije in zanemarljiva rast kristalov. Najbolj kritična je velikost delcev. Maksimalno fizikalno stabilnost nanosuspenzij lahko dosežemo, če kar se da poenotimo velikost delcev. Povprečna velikost delcev in delež delcev mikrometrskih velikosti v nanosuspenziji sta odvisna od proizvodnih parametrov. V primeru homogeniziranja pri visokem tlaku sta taka dva proizvodna parametra, ki vplivata na kakovost izdelka, tlak in število homogenizacijskih ciklov. Velikost in oblika delcev pa sta odvisni tudi od lastnosti same učinkovine in stabilizatorja. Kadar nanosuspenzije po izdelavi niso stabilne, jih lahko pretvorimo v stabilno stanje s postopkom sušenja z razprševanjem ali z liofilizacijo. Za takšen postopek so zaželene nanosuspenzije z vsaj 10 % vsebnostjo učinkovine, da se izognemo odstranjevanju velikih količin vode. Za izdelavo i.v. nanosuspenzij moramo izbrati postopek, ki omogoča izdelavo nanosuspenzij v aseptičnih pogojih, ali pa mora nanosuspenzija prenesti končno sterilizacijo.

Vsaki nanosuspenziji moramo zagotoviti stabilnost glede fizikalnih lastnosti (agregacija, velikost delcev) in mikrobiološke kakovosti v času roka uporabnosti pri določenih pogojih shranjevanja. (4, 19)

1.2.7 Obnašanje nanosuspenzij in vivo

Glavni kriteriji za oceno nanosuspenzij in vivo so:

- obseg in hitrost absorpcije (AUC), biološka uporabnost,
- maksimalen dosežen nivo v krvi (t_{\max} in c_{\max}),
- ponovljivost krivulje koncentracije v krvi,
- terapevtska učinkovitost,
- obseg stranskih učinkov.

Poudariti je potrebno, da kratek t_{\max} ali visok c_{\max} , nista vedno zaželena. Biološka uporabnost zdravilnih učinkovin po peroralnem dajanju nanosuspenzij se poveča zaradi povečanja koncentracijskega gradienta med svetlino prebavnega trakta in krvjo ter zaradi adhezije delcev na črevesno steno. (4) Adhezivnost delcev učinkovine nanometrskih velikosti je posebno pomembna, saj izboljša biološko uporabnost in zmanjša variabilnost absorpcije učinkovine. Če modificiramo površino delcev učinkovine z mukoadhezivnimi polimeri, lahko še dodatno povečamo biološko uporabnost. (3)

Za izdelavo nanodelcev z ustreznimi površinskimi lastnostmi lahko uporabimo v procesu proizvodnje določene površinsko aktivne snovi ali polimere kot stabilizatorje. Kadar tak postopek ni mogoč (npr. premajhen stabilizacijski učinek), lahko dodamo površinske modifikatorje k že izdelani nanosuspenziji. Glede na njihovo afiniteto do površine delcev se bodo adsorbirali in spremenili površinske lastnosti delcev. Spremembo lastnosti površine delcev lahko spremljamo z merjenjem fizikalnih parametrov npr. merjenje naboja na površini delcev (zeta potencial) ali analiza hidrofobnosti površine delcev (HIC). (3)

Poskusi na miših, ki so jim intravensko injicirali nanosuspenzije citostatikov, so pokazali večjo učinkovitost določenih protitumornih učinkovin v obliki nanosuspenzij. Ugotovili so tudi, da lahko v primeru nanosuspenzij povečamo odmerek dispergirane zdravilne učinkovine, ne da bi se pri tem bistveno povečala akutna toksičnost, zmanjšala telesna teža in ne da bi prišlo do patoloških sprememb na organih. (4)

1.2.8 Farmacevtske oblike z nanosuspensijami

Nanosuspenzije lahko vgradimo v različne farmacevtske oblike. Nanosuspenzije v dermatikih izboljšajo prodiranje učinkovine v kožo, saj se poveča nasičena topnost. V primeru očesnih kapljic se podaljša zadrževanje učinkovine na očesu zaradi adhezivnih lastnosti. Vodne nanosuspenzije, ki jim dodamo sredstvo za povečanje viskoznosti ali pripravimo gel, lahko uporabimo oralno (nanos v usta s čopičem). Zelo široko uporabo pa nudijo peroralne farmacevtske oblike, kjer lahko nanosuspenzijo vgradimo v tablete, pelete ali kapsule. Nanosuspenzijo posušimo z razprševanjem ali z liofilizacijo ali pa jih neposredno vgradimo v postopku granuliranja ali peletiranja. Kapsule lahko napolnimo z nanosuspenzijo v nevodnem mediju. Nanosuspenzije nudijo tudi možnost parenteralne uporabe, zlasti v obliki intravenskih injekcij. Pomembno področje razvoja pa predstavljajo nanosuspenzije za dostavo učinkovin v pljuča. (4)

Najbolj naraven in pacientu najprijaznejši način jemanja zdravila je peroralna aplikacija. Biološka uporabnost in učinkovitost zdravila po peroralni aplikaciji sta odvisni od topnosti in absorpcije v gastrointestinalnem traktu. In vitro visoko učinkovite, a težko topne učinkovine, se in vivo niso obnesle, saj je njihova majhna topnost omejevala proces absorpcije, zato v organizmu niso dosegle terapevtskih koncentracij. Enostaven primer, ki odraža problem težke topnosti v kombinaciji z nizko absorpcijo je zdravilna učinkovina atovakon. Atovakon se kot antibiotik uporablja peroralno v treh odmerkih po 750 mg. Razlog uporabe tako visokih odmerkov je v nizki absorpciji – samo 10-15 % odmerka. Možen način izboljšanja biološke uporabnosti atovakona je povečanje hitrosti absorpcije z oblikovanjem nanosuspenzije. Peroralna uporaba učinkovine v obliki nanosuspenzije je učinkovita tudi zaradi visoke adhezivnosti delcev učinkovine.

Peroralna aplikacija težko topnih učinkovin v obliki nanosuspensij ne predstavlja samo pristopa za povečanje biološke uporabnosti, pač pa tudi možnost ciljne dostave učinkovine na mesto gastrointestinalne bakterijske ali parazitske infekcije. Tehnologija izdelave nanosuspensij je tudi obetajoč pristop za dostavo učinkovin v kolon ter tako za terapijo raka kolona, infekcij s helminti, vnetij v prebavnem traktu in drugih obolenj GIT. (3, 4)

2 NAMEN DELA

Slaba topnost zdravilnih učinkovin ostaja predmet raziskav številnih farmacevtskih tehnologov, saj nezadostna vodotopnost učinkovin omejuje zadostno biološko uporabnost. Razvoj novih farmacevtskih oblik za povečanje topnosti in biološke uporabnosti v vodi težko topnih učinkovin predstavlja velik izziv in omogoča domišljiji prosto pot pri iskanju rešitev.

Namen diplomske naloge je izdelava in vrednotenje nanosuspenzij s težko topno učinkovino z metodo homogenizacije v visokotlačnem homogenizatorju. Učinkovino v obliki prahu bomo najprej dispergirali v vodni raztopini stabilizatorjev z mešalom visoke hitrosti. Tako pripravljeno suspenzijo bomo homogenizirali s homogenizatorjem pod visokim tlakom. Posledica potiskanja suspenzije skozi ozko režo je nastanek nanodelcev. Proučevali bomo vpliv različnih stabilizatorjev (od površinsko aktivnih snovi do steričnih stabilizatorjev) v različnih koncentracijah. V nalogi bomo ugotavljali vpliv tehnoloških parametrov (tlak in število homogenizacijskih ciklov) na nastanek in lastnosti nanosuspenzij. Izdelane nanosuspenzije bomo vrednotili med posameznimi homogenizacijskimi cikli in ob koncu procesa glede na velikost in porazdelitev velikosti delcev in glede na naboj na površini delcev. Velikost in porazdelitev velikosti delcev nanosuspenzije bomo spremljali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). Velikost delcev bomo poleg PCS ovrednotili še z metodo laserske difraktometrije (LD) in vrstične elektronske spektroskopije (SEM). Naboj na površini delcev, ki bistveno vpliva na stabilnost nanosuspenzij, bomo ugotavljali na principu laserske Dopplerjeve elektroforeze.

Izdelane nanosuspenzije bomo ovrednotili z vidika stabilnosti, kjer bomo v odvisnosti od časa in temperature shranjevanja spremljali velikost in porazdelitev velikosti delcev, naboj na površini in razpadne produkte. Velikost delcev bomo poleg PCS ovrednotili še z metodo laserske difraktometrije (LD) in vrstične elektronske spektroskopije (SEM).

Nanosuspenzije z najustrežnejšimi stabilizatorji in izdelane pod najustrežnejšimi procesnimi pogoji bomo uporabili za izdelavo tablet. Ugotavljali bomo redisperzibilnost nanosuspenzij iz tablet, kjer bomo spremljali velikost in porazdelitev velikosti delcev.

3 MATERIALI IN METODE

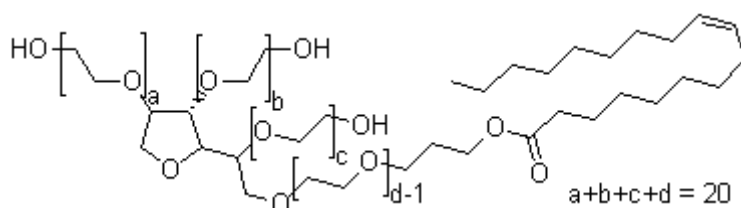
3.1 Uporabljena učinkovina

NDS

Modelna učinkovina spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo za preprečevanje zavrnitve presajenih organov. S stališča farmacevtske tehnologije je njena najpomembnejša lastnost zelo slaba topnost v vodi.

3.2 Uporabljene pomožne snovi

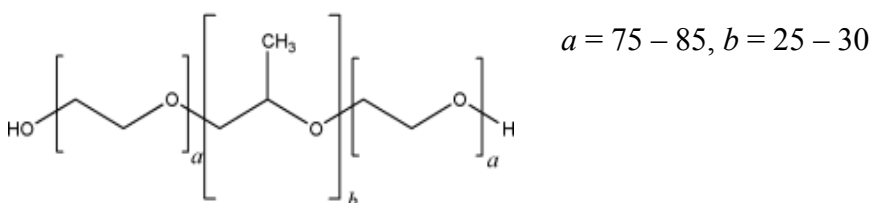
Polisorbat 80 (Tween 80, polioksietilen-20-sorbitanmonooleat), Croda, USA



Polisorbat 80 je neionogena površinsko aktivna snov. Je zmes parcialnih estrov sorbitola in njegovega anhidrida z maščobnimi kislinami (v glavnem z oleinsko kislino), ki nastanejo s kopolimerizacijo z 20 moli etilenoksida na mol sorbitola in njegovega anhidrida.

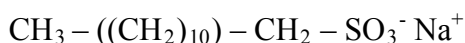
Je oljnata rumena viskozna tekočina, viskoznost ≈ 425 mPas (25°C), HLB 15,0; topna v vodi in etanolu; netopna v rastlinskih oljih in mineralnem olju. Solubilizator, močljivec in emulgator tipa o/v. V farmaciji se uporablja tako v izdelkih za peroralno, parenteralno in topikalno dajanje. Je netoksična in nedražeča snov. (20, 21)

Poloksamer 188 (Lutrol F-68), BASF, Nemčija



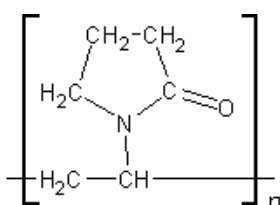
Poloksamer je polioksietilen-polioksipropilen-ski kopolimer, ki spada med neionogene površinsko aktivne snovi. Je v obliki belih, voskastih granul, brez vonja in okusa, je dobro topen v vodi in etanolu. Tališče: 52-57°C, HLB 12-18. V farmaciji se največ uporablja kot solubilizator in emulgator v intravenskih pripravkih. Poloksameri so varne, nedražeče snovi, ki se uporabljajo v številnih parenteralnih, peroralnih in topikalnih pripravkih. V telesu se ne metabolizirajo. (20)

Natrijev lavril sulfat, Natrijev dodecil sulfat (Texapon K12), Cognis GMBH, Nemčija

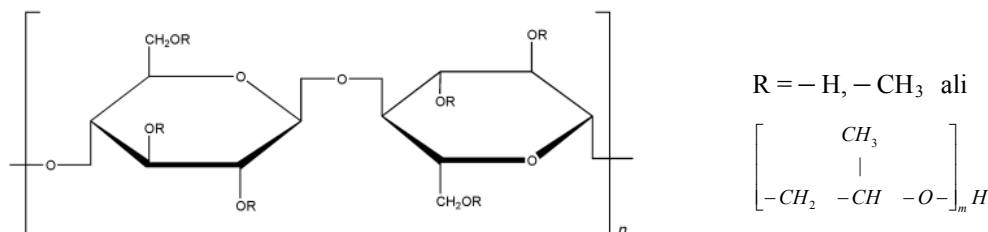


Natrijev lavril sulfat je anionska površinsko aktivna snov, ki se široko uporablja v neparenteralnih farmacevtskih oblikah in kozmetiki. Je bel ali kremast do rahlo rumen prašek, rahlega vonja maščobnih snovi in grenkega okusa. Tališče: 204-207°C, HLB \approx 40. Uporablja se kot detergent in močljivec, v zadnjem času pa tudi v elektroforezi: SDS (natrijev dodecil sulfat) poliakrilamidna gelska elektrofotreza, ki se veliko uporablja za analizo proteinov. (20)

Polivinilpirolidon (PVP, Kollidon, poli[1-(2-okso-1-pirolidinil)etilen]), ISP, Švica



Sintetični polimer, ki nastane s polimerizacijo 1-vinil-2-pirolidinon-skih enot, kar ima za posledico različno molekularno maso. Okarakteriziran je z viskoznostjo v vodni raztopini, ki jo izrazimo z K-vrednostjo. Je bel do kremasto-bel prašek, dobro topen v vodi, etanolu, metanolu, praktično netopen v mineralnem olju. V farmaciji se uporablja kot vezivo, solubilizator za povečanje topnosti težko topnih učinkovin v parenteralnih oblikah, stabilizator in povečevalec viskoznosti v topikalnih in oralnih suspenzijah in raztopinah. Je netoksičen, dokler se ne absorbira; na koži ne povzroča iritacije. (20)

Hidroksipropilmetilceluloza (Pharmacoat), Shin-Etsu, Japonska

Polsintetični polimer O-metil in O-(2-hidroksipropil) celuloze, ki se razlikuje glede na viskoznost in stopnjo substitucije. Je bel do kremasto bel prašek, brez vonja in okusa, topen v hladni vodi, netopen v etanolu, toda topen v mešanici vode in alkohola. V farmaciji se uporablja v peroralnih, očesnih in topikalnih pripravkih, kjer ima vlogo veziva, stabilizatorja, je tudi sredstvo za oblaganje in povečanje viskoznosti. (22, 23)

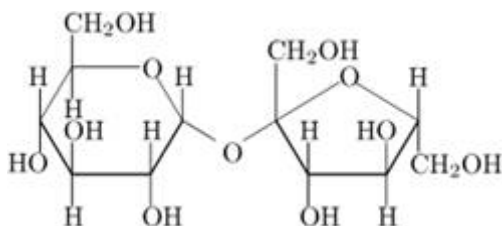
Polietilenglikol (PEG, Carbowax), Clariant, Nemčija

$\text{HO} - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2)_m - \text{CH}_2 - \text{OH}$, kjer je m število oksietilenskih skupin.

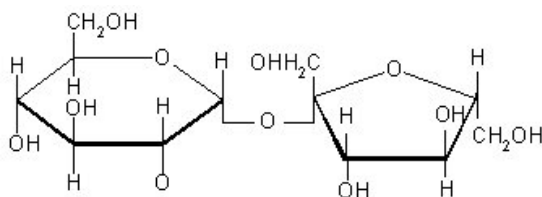
Je polimer etilen oksida in vode. Bela ali brezbarvna trdna snov z voskastim videzom, z rahlim, prijetnim vonjem. Topen v vodi, etanolu, diklormetanu, netopen v maščobnem in mineralnem olju. Tališče: 55-63°C. V farmaciji se uporablja v številnih peroralnih, parenteralnih, topikalnih, očesnih in rektalnih pripravkih. Vodne raztopine polietilenglikolov se uporabljajo kot sredstvo za suspendiranje. Polietilenglikol 6000 pa lahko uporabimo tudi kot mazivo pri tabletah. (20)

Polivinilalkohol (PVA), Fluka, Švica

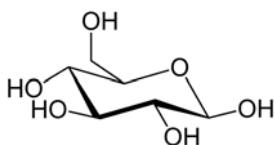
Polivinilalkohol je sintetični vodotopni polimer s formulo $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$, kjer je število n enot različno, s tem pa tudi viskoznost. Je prašek bele do kremaste barve, brez vonja, topen v vodi, rahlo topen v etanolu, netopen v organskih topilih. Uporablja se v topikalnih in očesnih farmacevtskih pripravkih kot stabilizator, povečevalec viskoznosti in mazivo. (20)

Laktoza, DMV international B.V., Nizozemska

Laktoza je disaharid iz glukoze in galaktoze, ki se nahaja v mleku. Je bel do brezbarvni prašek, brez vonja in rahlo sladkega okusa. Uporabljamo jo v kristalinični ali nekristalinični obliki (»spray dried« laktoza). Slednjo uporabljamo predvsem za direktno tabletiranje. V farmaciji se laktozo uporablja kot polnilo v tabletah in kapsulah ter kot vezivo. (23)

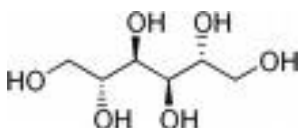
Saharoza (sladkor), Žito Šumi d.o.o., Slovenija

Saharoza je disaharid iz D-glukopiranoze in D-fruktofuranoze, ki jo dobimo iz sladkorne pese ali sladkornega trsa. Je bel kristaliničen prašek ali brezbarvni kristali, brez vonja in sladkega okusa. Tališče: 160-186°C. V farmaciji je široko uporabna predvsem v oralnih in peroralnih farmacevtskih oblikah. Sirup, ki vsebuje 50-67 w/w % saharoze, se uporablja kot vezivo pri vlažnem granuliranju. Uporabljamo jo tudi kot sladilo in suho vezivo v peroralnih farmacevtskih oblikah. (20)

Glukoza (dekstroza), DMV international B.V., Nizozemska

D-glukoza je monosaharid, ki jo pridobivamo s kislno hidrolizo škroba. Brez vonja in sladkega okusa, v obliki brezbarvnih kristalov ali belega kristaliničnega prahu. Evropska farmakopeja navaja glukozo v brezvodni (tališče: 146°C) in monohidratni (tališče: 83°C) obliki. V farmaciji jo uporabljamo kot sladilo in kot vezivo ter polnilo pri vlažnem granuliranju. Tablete, izdelane z glukozo, po določenem času otrdijo. (23)

Manitol (Pearlitol), Roquette freres, Francija



Manitol pridobivamo s katalitsko ali elektrolitsko redukcijo monosaharidov manoze ali glukoze. Je bel kristaliničen prašek, brez vonja in sladkega okusa. Tališče: 166-168°C. V farmacevtskih pripravkih ga uporabljamo kot polnilo. Je nehigroskopičen, zato je zlasti primeren za učinkovine, ki so občutljive na vlago. V obliki granulata ga uporabljamo kot sredstvo za direktno tabletiranje. (5, 23)

3.3 Uporabljena kemikalija, surovina

Metanol, Mallinckrodt Baker B.V., Nizozemska

Metanol ali metil alkohol (CH₃OH) je brezbarvna, vnetljiva tekočina, ki gori z nesvetlečim modrikastim plamenom. Meša se z vodo in alkoholom. Vrelišče: 64-65°C. (21)

Destilirana voda, Lek, Slovenija

3.4 Naprave za izdelavo in vrednotenje nanosuspenzij

Analitska tehtnica, XP 205, Mettler Toledo, Švica

Tehtnica, L 2200 P, Sartorius laboratory, Nemčija

Visokotlačni homogenizator APV Lab 40, APV, Nemčija

Visokotlačni Homogenizator Emulsiflex C3, Avestin, Kanada

Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

Aparatura za LD, Malvern Mastersizer S, Malvern, Velika Britanija

Vrstični elektronski mikroskop JEOL JSM-7001F, Jeol, Japonska

Tabletirka EK-O, Korsch, Nemčija

Aparatura za merjenje trdnosti tablet HC 97, Kraemer, Nemčija

Vakuumski sušilnik, Kambič, Slovenija

Vlagomer, Halogen Moisture Analyzer, HR73, Mettler Toledo, Nemčija

Magnetno mešalo, IKA, Nemčija

Ultrazvočna kadička, 10R, Iskra, Slovenija

3.5 Izdelava nanosuspenzij

Nanosuspenzije smo izdelali z metodo homogenizacije v visokotlačnem homogenizatorju. Težko topno učinkovino v obliki prahu smo dispergirali v vodni raztopini pomožnih snovi z magnetnim mešalom.

Najprej smo pripravili 100 g vodne raztopine pomožnih snovi v različnih koncentracijah (Preglednica I). Natehtali smo ustrezne količine pomožne snovi in vode ter mešali z magnetnim mešalom, dokler se pomožna snov ni v celoti raztopila.

Preglednica I: Sestava vodnih raztopin pomožnih snovi

Vodna raztopina pomožne snovi	Koncentracija	Pomožna snov (g)	Destilirana voda (g)
Polisorbat 80V	2,10 %	2,10	97,90
PVP K-25	10,52 %	10,52	89,48
Poloksamer 188	10,52 %	10,52	89,48
Pharmacoat 603	5,26 %	5,26	94,74
PEG 6000	10,52 %	10,52	89,48
PVA 10-98	5,26 %	5,26	94,74
Laktoza 200 mesh	10,52 %	10,52	89,48
Texapon K12	2,10 %	2,10	97,90

V 38 g vsake raztopine smo suspendirali 2 g NDS in postavili na magnetno mešalo, da je nastala homogena disperzija. Tako pripravljene suspenzije smo homogenizirali v visokotlačnem homogenizatorju pri različnih tlakih in številu homogenizacijskih ciklov. Glede na različne pomožne snovi in glede na različne procesne parametre smo dobili 12 vzorcev (Preglednica II).

Preglednica II: Sestava in postopek homogenizacije posameznih vzorcev

Vzorec	Sestava	Postopek homogenizacije
Vzorec 1	38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 1 x 1500 barov, 5 x 1500 barov, 10 x 1500 barov
Vzorec 2	38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 1 x 1500 barov, 5 x 1500 barov, 10 x 1500 barov, 10 x 1600 barov, 10 x 1600 barov
Vzorec 3	38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 1 x 1000 barov, 5 x 1000 barov, 10 x 1000 barov
Vzorec 4	38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS	1 x 150 barov, 3 x 1500 barov, 6 x 1500 barov, 5 x 1800 barov, 10 x 1800 barov, 13 x 1800 barov, 17 x 1800 barov, 25 x 1800 barov
Vzorec 5	38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 6	38 g 10,52 % PVP K-25 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 7	38 g 10,52 % Poloksamer 188 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 8	38 g 5,26 % Pharmacoat 603 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 9	38 g 10,52 % PEG 6000 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 10	38 g 5,26 % PVA 10-98 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 11	38 g 10,52 % Laktoza 200 mesh in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov
Vzorec 12	38 g 2,10 % Texapon K12 in 2 g NDS	2 x 150 barov, 2 x 500 barov, 2 x 1000 barov, 5 x 1500 barov, 5 x 1500 barov

3.6 Določanje velikosti delcev v nanosuspenziji

Priprava vzorca za meritev je dokaj enostavna: z ustrezno redčenim vzorcem (v našem primeru smo 0,1 ml nanosuspenzije redčili z 1 ml vodne raztopine ustrezne pomožne snovi) napolnimo kiveto. Kiveto vstavimo v aparaturo, ta pa nam preko računalniške obdelave poda povprečno velikost delcev in polidisperzni indeks (PI). Polidisperzni indeks je merilo za širino distribucije velikosti delcev. Pred meritvijo smo aparaturo nastavili na zelene pogoje merjenja. Nastavili smo temperaturo pri kateri smo izvajali meritve, izbrali ustrezni disperzni medij in ustrezno kiveto, v kateri smo izvajali meritve ter izbrali oz. vnesli ustrezni refrakcijski indeks. V našem primeru smo izvajali meritve pri temperaturi 25°C in v polistirenski kiveti za enkratno uporabo, kot disperzni medij smo izbrali vodo, ker podatka za viskoznost vodnih raztopin stabilizatorjev nismo poznali. Vrednost za viskoznost čiste vode pri 25°C je že vnesena v aparaturo.

Velikost delcev smo poleg PCS metode določili še z metodo laserske difraktometrije (LD) in vrstične elektronske spektroskopije (SEM). LD meritev smo izvajali v mali celici MS1 z volumnom 120 ml v vodnem mediju pri 2000 obratov na minuto in z zatemnitvijo več kot 10 %. Uporabljena leča je bila 300RF 0,05 – 900 µm. SEM meritev pa smo izvedli tako, da smo vzorec nanесли na grafitni trak in pomerili pri 2 kV.

3.7 Določanje zeta potenciala delcev v nanosuspenziji

Za merjenje zeta potenciala morajo biti vzorci čim bolj bistri, zato smo nanosuspenzijo redčili z vodno raztopino ustrezne pomožne snovi. V našem primeru smo 0,05 ml nanosuspenzije redčili z 2 ml vodne raztopine ustrezne pomožne snovi. Tako pripravljene vzorce smo napolnili v polistirenske zvite kapilarne celice za enkratno uporabo.

Pred meritvijo smo aparaturo nastavili na zelene pogoje merjenja, ki so enaki kot za PCS meritve, razlikujejo se le v vrsti celice. S celicami, ki smo jih uporabili za določanje zeta potenciala delcev, smo določali tudi velikost in porazdelitev velikosti delcev.

3.8 Spremljanje stabilnosti nanosuspenzij

Izdelane nanosuspenzije smo ovrednotili tudi z vidika stabilnosti. Velikost in porazdelitev velikosti delcev ter zeta potencial delcev smo spremljali v naslednjih časovnih intervalih: 1 dan po izdelavi, 3 dan, 5 dan, 1 teden, 2 teden, 3 teden, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 in 14 teden. Vzorce smo ves čas shranjevali v hladilniku, pred pričetkom meritve pa smo jih postavili na magnetno mešalo, da so se nanodelci ponovno redispersirali, ter jih za 2 minuti inkubirali v ultrazvočni kadički. Vzorce smo tudi shranjevali na temperaturi 25°C ter na temperaturi 40°C. Vzorcem smo izmerili velikost in porazdelitev velikosti delcev ter zeta potencial po 14 dneh, 1 mesecu in po 3 mesecih izpostavljanja omenjenim pogojem. Pred meritvijo smo vzorce inkubirali 2 minuti v ultrazvočni kadički, da se delci redispersirajo ter razbijejo morebitni agregati. Izvedli smo tudi HPLC analizo vzorcev shranjenih v hladilniku ter na 25°C in 40°C in ugotavljali, koliko učinkovine je razpadlo. Analizo smo izvedli z uporabo izokratske UPLC metode, kjer smo kot topilo uporabili metanol, uporabljena kolona pa je bila Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 × 100 mm.

3.9 Izdelava granulata in tablet

Z izbranimi nanosuspenzijami smo izdelali tablete. Tablete smo izdelali s stiskanjem granulata, ki smo ga pripravili s postopkom vlažne granulacije. Granuliranje smo izvedli v pateni, kjer smo 1 g izbrane nanosuspenzije enakomerno nakapljali na 8,5 g vodotopne pomožne snovi in mešali s pestilom. Preskusili smo naslednje pomožne snovi:

- Laktoza sušena z razprševanjem,
- Laktoza 200 mesh,
- Saharoza,
- Glukoza,
- Pearlitol 400 DC,
- Manitol,
- PEG 4000,
- Ludipress.

Izdelan granulata smo nato presejali skozi sito z velikostjo por 0,5 mm in sušili v vakuumskem sušilniku pri 60°C 15 min. Po končanem sušenju smo izmerili vlago v vzorcu pri 85°C v 15 minutah (IPS). Kadar je bila izguba vlage pri sušenju višja kot 2 %, smo proces sušenja ponovili. Ustrezno posušen granulata smo stisnili v tableto. Za izdelavo tablet smo uporabili tabletirko na udarec (ekscentrično tabletirko) in okrogle, bombirane (R = 19 mm) pečate s premerom 10 mm. Izdelali smo tablete z maso 380 mg ± 20 mg in dveh različnih trdnosti (najnižja trdnost okrog 20 N in najvišja trdnost okrog 250 N).

Ker je bil naš granulata za tabletiranje brez pomožnih snovi, ki izboljšajo stisljivost in pretočnost tabletne mase, smo tabletiranje izvedli ročno. Ročno tabletiranje pomeni, da smo ročno vsuli tabletno maso v matrično vdolbino in nato stisnili z ročno stiskalnico. Pri stiskanju tablet se velikokrat srečamo s problemom lepljenja mase oz. tablet na pečate in steno matrice. Da se izognemo omenjeni težavi dodajamo zmesi za tabletiranje antiadhezive (npr. magnezijev stearat), ki preprečujejo lepljenje tablete na pečate in lajšajo ločevanje tablete od zgornjih in spodnjih pečatov. Antiadhezivi so praviloma tudi maziva, ki zmanjšajo trenje med tableto in matrico. V našem primeru granulatom nismo dodajali antiahezivov, pač pa smo pred pričetkom tabletiranja pečate namazali z magnezijevim stearatom. Razlog, zakaj nismo granulatu dodali magnezijevega stearata je v njegovi netopnosti v vodi, kar bi vplivalo na kasnejšo določitev delcev v raztopini po raztapljanju tablet.

Pred izdelavo tablet z učinkovino NDS smo postopek izdelave preskusili z izdelavo placebo tablet. Izvedli smo vlažno granuliranje v pateni, kjer smo 1 g prečiščene vode nakapljali na 8,5 g vodotopne pomožne snovi in mešali s pestilom. Nadalje smo postopali tako, kot je opisano pri izdelavi tablet. Placebo tablete smo izdelali z namenom spoznavanja samega postopka izdelave in ugotavljanja obnašanja snovi za tabletiranje.

3.10 Razpadnost/raztapljanje tablet

Izdelane placebo tablete in tablete z učinkovino NDS smo raztapljali v destilirani vodi. Najprej smo raztapljali placebo tablete izdelane iz različnih vodotopnih pomožnih snovi, kjer smo ugotavljali, kako in v kolikšnem času tablete razpadejo – se pomožna snov

raztopi. Nato smo pomerili velikost delcev pomožne snovi v nastali raztopini. Podatek je pomemben s stališča, da ugotovimo, koliko k številu in velikosti izmerjenih delcev prispeva pomožna snov.

S pomočjo podatkov pridobljenih iz raztapljanja placebo tablet smo se odločili, da tablete z nanospenzijo učinkovine raztapljamo po naslednjem postopku: tablete smo raztapljali v 50 ml čašah s 25 ml destilirane vode in z magnetnim mešalom dolžine 2 cm. Velikost delcev smo merili po 5 in 20 minutah mešanja na magnetnem mešalu pri hitrosti mešanja med 3 in 4. Nato smo nastalo nanospenzijo inkubirali še 2 minuti v ultrazvočni kadički in ponovno pomerili velikost delcev.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Ovrednotenje nanosuspenzij

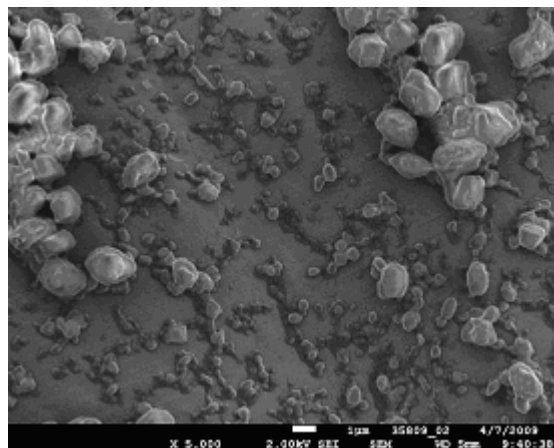
4.1.1 Določitev velikosti delcev

Nanosuspenzije smo izdelali z metodo homogenizacije v visokotlačnem homogenizatorju. Pripravljene suspenzije učinkovine v raztopini stabilizatorja smo homogenizirali pod določenimi tlaki in pri različnem številu homogenizacijskih ciklov ter nato pomerili velikost delcev.

Povprečna velikost delcev in njihova porazdelitev pri homogenizaciji vzorcev 1 – 5 ter zeta potencial so podane v Preglednicah III, IV, V, VI in VII, SEM slike vzorcev pa na Slika 3, Slika 4, Slika 5, Slika 6 in Slika 7.

Preglednica III: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 1 (38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS)

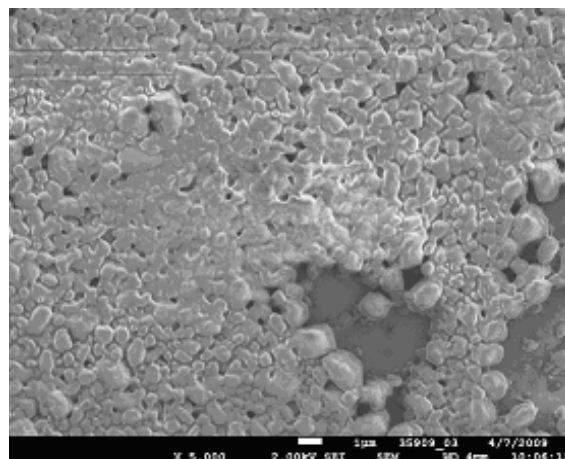
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	1854	0,532	
2x500	1390	0,559	
2x1000	910,7	0,570	
1x1500	834,8	0,450	
5x1500	638,8	0,463	
10x1500	468,4	0,379	-11,7



Slika 3: SEM slika vzorca 1

Preglednica IV: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 2 (38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS)

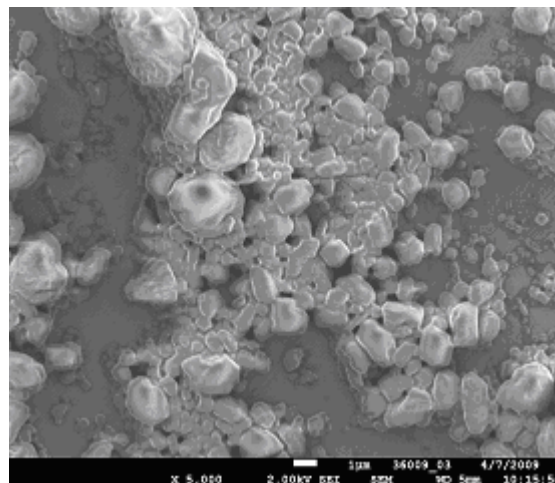
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	1870	0,528	
2x500	1275	0,612	
2x1000	843,8	0,515	
1x1500	872,9	0,462	
5x1500	565,8	0,370	
10x1500	468,5	0,375	
10x1600	481,3	0,443	
10x1600	455,8	0,412	-12,9



Slika 4: SEM slika vzorca 2

Preglednica V: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 3 (38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS)

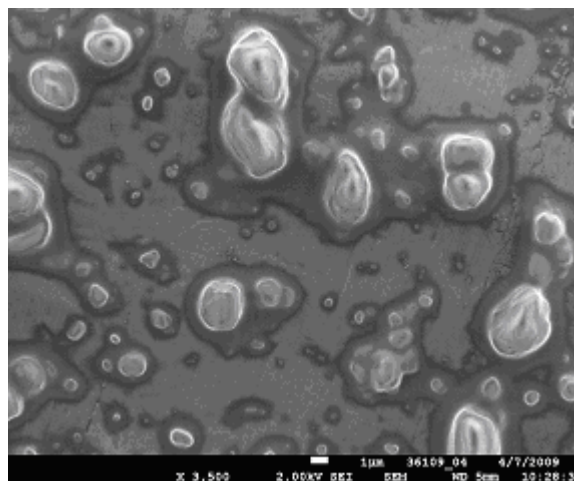
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	1876	0,814	
2x500	1238	0,596	
1x1000	935,1	0,478	
5x1000	600,2	0,378	
10x1000	499,5	0,263	-13,2



Slika 5: SEM slika vzorca 3

Preglednica VI: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 4 (38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS)

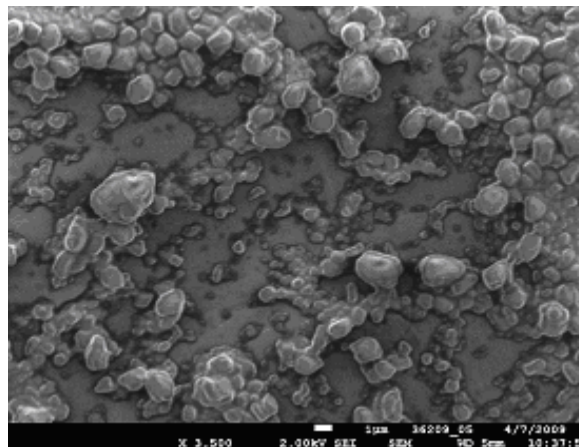
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
1x150	1987	0,446	
3x1500	1452	0,508	
6x1500	1107	0,306	
5x1800	986,7	0,478	
10x1800	1095	0,547	
13x1800	907,9	0,634	
17x1800	947,9	0,534	
25x1800	888,0	0,640	-14,3



Slika 6: SEM slika vzorca 4

Preglednica VII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 5 (38 g 2,10 % Polisorbat 80V in 2 g NDS)

TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	1367	0,492	
2x500	1262	0,596	
2x1000	924,0	0,455	
5x1500	585,5	0,446	
5x1500	783,1	0,636	-13,2



Slika 7: SEM slika vzorca 5

Vzorci 1 – 5 so izdelani z vodno raztopino Polisorbata 80V. Vzorce 1 – 3 smo izdelali z APV Lab 40. Vzorec 1 smo izdelali z uporabo srednjih tlakov in dosegli velikost delcev 468,4 nm. Vzorec 2 smo izpostavili višjim tlakom homogenizacije in dosegli velikost 455,8 nm. Pri vzorcu 3 smo se odločili za nižje vrednosti tlakov in dobili delce velike 499,5 nm. Trend kaže, da se velikost delcev ni bistveno znižala pri uporabi visokih tlakov, prav tako se velikost delcev pri uporabi nizkih tlakov ni močno povečala. Zaključimo lahko, da sprememba tlaka znotraj testiranega območja in število ponovitev ciklov ne vplivajo močno na velikost končnih delcev. Najmanjša velikost, ki jo lahko dosežemo, pa

je odvisna tudi od lastnosti učinkovine, predvsem od njene trdnosti, kar je verjetno tudi glavni dejavnik, ki določa minimalno velikost delcev v našem primeru. (3)

Vzorec 4 smo homogenizirali s homogenizatorjem Emulsiflex C3, ki lahko doseže višje tlake kot APV Lab 40. Pri homogenizaciji vzorca smo imeli nekaj težav predvsem z mašenjem reže, zato smo vzorec redčili. Izdelali smo delce z velikostjo 888,0 nm, kar ni bilo pričakovano. Glede na to, da smo uporabili višje tlake kot pri prejšnjih vzorcih, smo pričakovali velikost delcev vsaj v razredu prejšnjih meritev. Ker smo vzorec redčili je verjetno prišlo do manjšega števila trkov med samimi delci in manjše gostote delcev na območju kavitacije, kar je pripeljalo do zmanjšane učinkovitosti mletja.

Z zviševanjem tlakov in povečevanjem števila homogenizacijskih ciklov se velikost delcev bistveno ni spremenila, zato smo se odločili za srednje vrednosti tlakov in pri takih pogojih izvedli homogenizacijo vseh nadaljnjih vzorcev. Tudi Müller in drugi (3) navajajo, da se homogenizacija običajno izvede pri tlakih 1000 do 1500 barov, v 3 do 10 homogenizacijskih ciklih, maksimalno do 20 ciklov.

Vzorec 5 smo izdelali na podlagi dognanih ugotovitev in dobili delce velike 783,1 nm.

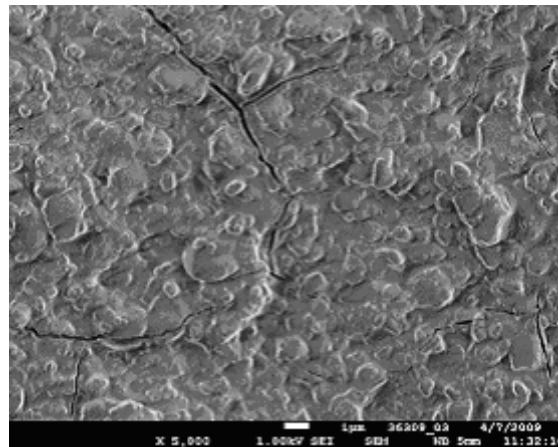
Vzorec 6 vsebuje kot stabilizator Polivinilpirolidona K-25 (PVP), ki deluje kot sterični stabilizator. Tudi vzorec 8 vsebuje sterični stabilizator in sicer Pharmacoat 603 (HPMC). Obe vodni raztopini sta viskozni in stabilizatorja nista dovolj stabilizirala delcev, saj so se delci začeli zlepljati med seboj (Slika 8, Slika 10) in nastali so delci mikrometrskih velikosti. Meritve z Zetasizerjem (Preglednica VIII, Preglednica X) niso ustrezne, ker je Zetasizer primeren le za merjenje delcev pod 6000 nm. Bolj ustrezni so rezultati dobljeni z LD. Velikost delcev z LD je bila: $d(0,9)$ 4,41 μm za vzorec 6 in za vzorec 8 2,69 μm . Omenjena stabilizatorja nista primerna za izdelavo delcev nanometrskih velikosti.

Za izdelavo vzorca 7 smo uporabili Poloksamer 188, ki je neionogena površinsko aktivna snov in tudi stabilizira delce po principu sterične stabilizacije. Povprečna velikost delcev pomejena z Zetasizerjem je bila 2600 nm (Preglednica IX), velikost pa smo pomerili še z lasersko difrakcijo in z elektronsko mikroskopijo (Slika 9). Velikost delcev z LD je bila

$d(0,9)$ 2,73 μm . Zaključimo lahko, da Poloksamer stabilizira delce, ne omogoča pa izdelavo delcev nanometrskih velikosti.

Preglednica VIII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 6 (38 g 10,52 % PVP K-25 in 2 g NDS)

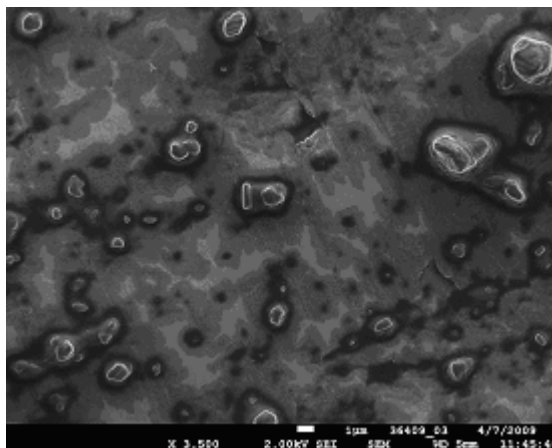
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	7556	0,482	
2x500	6355	0,007	
2x1000	7698	0,389	
5x1500	9566	0,250	
5x1500	15780	0,444	-0,0137



Slika 8: SEM slika vzorca 6

Preglednica IX: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 7 (38 g 10,52 % Poloksamer 188 in 2 g NDS)

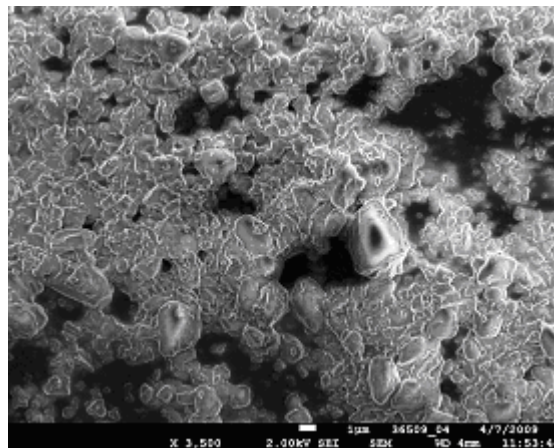
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	3941	0,350	
2x500	3909	0,582	
2x1000	3202	0,483	
5x1500	2377	0,334	
5x1500	2600	0,689	-2,47



Slika 9: SEM slika vzorca 7

Preglednica X: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 8 (38 g 5,26 % Pharmacoat 603 in 2 g NDS)

TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	7650	0,280	
2x500	7245	0,358	
2x1000	5689	0,512	
5x1500	10230	0,357	
5x1500	12330	0,190	-3,13



Slika 10: SEM slika vzorca 8

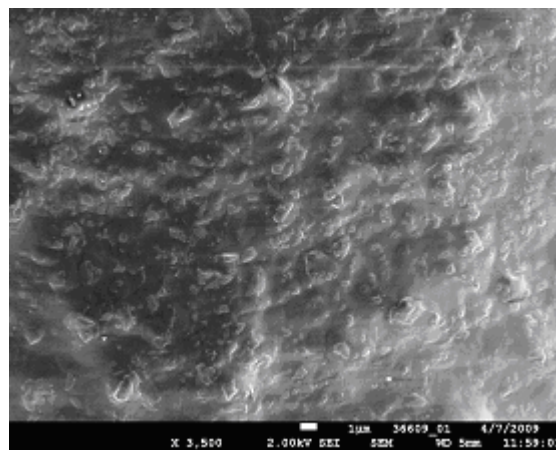
PVP, HPMC in Poloxamer so sterični stabilizatorji in ne omogočajo izdelavo delcev nanometrskih velikosti, zato so bolj ustrezne meritve dobljene z LD metodo. Z lasersko difrakcijo smo vsak vzorec pomerili dvakrat in sicer takoj in po 2 minutah mešanja. Pri vzorcih stabiliziranih s Poloksamerom in s HPMC mešanje ni vplivalo na velikost delcev, pri vzorcu stabiliziranem s PVP pa se velikost delcev po mešanju skoraj za polovico zmanjša, kar pomeni, da je prišlo do nastanka aglomeratov, ki smo jih z mešanjem razbili. Med vsemi uporabljenimi je torej PVP najslabši, saj se delci zlepljajo med seboj (Preglednica XIV).

V nadaljevanju smo izdelali nanosuspenzije s steričnima stabilizatorjema PEG 6000 (vzorec 9), PVA 10-98 (vzorec 10) ter z laktozo (vzorec 11). V nobenem primeru niso nastali delci nanometrskih velikosti. Pri vzorcu 10 je povprečna velikost delcev 32950 nm (Preglednica XII), čeprav z elektronsko mikroskopijo opazimo manjše delce (Slika 12). LD meritve za vzorec 10 je bila $d(0,9)$ 5,5 μm , zato lahko z upoštevanjem elektronske mikroskopije in LD zaključimo, da je dejanska velikost delcev okrog 5 μm . Povprečna velikost delcev pri vzorcu 9 je 20010 nm (Preglednica XI) in pri vzorcu 11 8641 nm (Preglednica XIII). V obeh primerih smo z elektronsko mikroskopijo (Slika 11, Slika 13) opazili, da so nastali veliki zlepljeni delci, torej uporabljena stabilizatorja nista zadostno stabilizirala delcev. LD meritve so bile $d(0,9)$ 12 μm (vzorec 9) in 10 μm (vzorec 11), ki pa jih z mešanjem razbijemo.

Pri vseh zgoraj omenjenih stabilizatorjih dobimo delce mikrometrskih velikosti, zato so relevantni samo podatki pridobljeni z LD metodo. Velike aglomerate dobimo pri vzorcih stabiliziranih s PEG in laktozo, ki jih z mešanjem razbijemo. Velike aglomerate smo pričakovali, saj snovi nimata nekakšnih stabilizatorskih lastnosti. Pri PVA pa ne pride do nastanka aglomeratov, torej so delci bolj stabilizirani, vendar ne dovolj, da bi nastali delci nanometrskih velikosti (Preglednica XIV).

Preglednica XI: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 9 (38 g 10,52 % PEG 6000 in 2 g NDS)

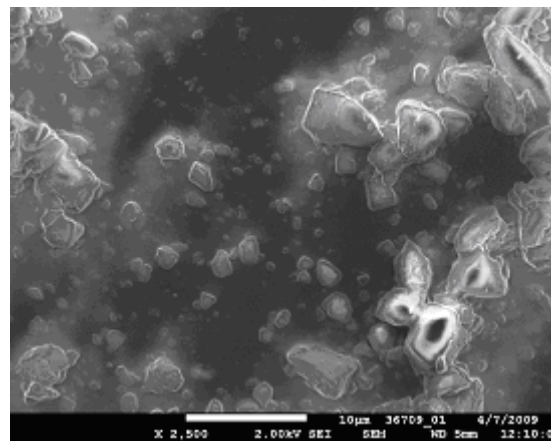
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	7223	0,790	
2x500	12530	0,584	
2x1000	10930	0,099	
5x1500	12010	0,093	
5x1500	20010	0,213	-4,95



Slika 11: SEM slika vzorca 9

Preglednica XII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 10 (38 g 5,26 % PVA 10-98 in 2 g NDS)

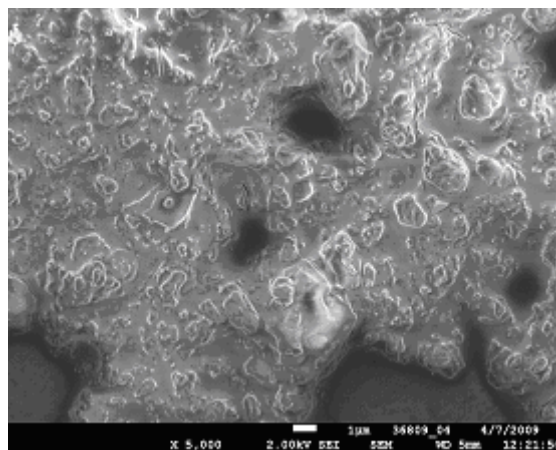
TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	18390	0,511	
2x500	18230	0,621	
2x1000	20060	0,354	
5x1500	16340	0,389	
5x1500	32950	0,064	0,113



Slika 12: SEM slika vzorca 10

Preglednica XIII: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 11 (38 g 10,52 % Laktoza 200 mesh in 2 g NDS)

TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	4866	1,000	
2x500	5563	0,449	
2x1000	7051	0,547	
5x1500	7324	0,042	
5x1500	8641	0,070	4,63



Slika 13: SEM slika vzorca 11

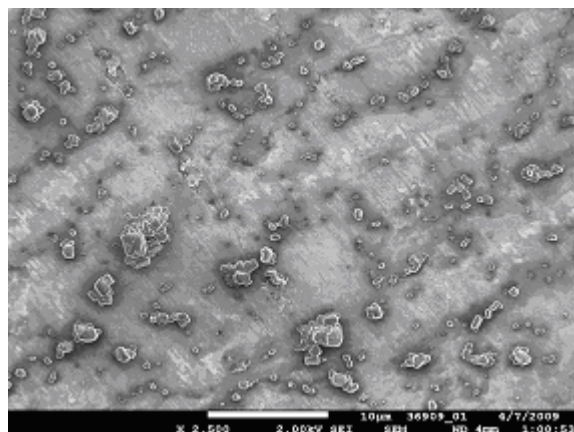
Preglednica XIV: Velikost delcev (LD meritev) takoj in po 2 minutah mešanja (npr. d(0,1) pomeni, da je v 10 % volumna vzorca velikost delcev pod določeno mejo)

Vzorec	d(0,1) (µm)	d(0,5) (µm)	d(0,9) (µm)	
Vzorec 1 (Polisorbat 80V)	0,31	0,89	2,26	takoj
	0,31	0,85	1,9	po mešanju
Vzorec 2 (Polisorbat 80V)	0,29	0,59	1,19	takoj
	0,29	0,58	1,19	po mešanju
Vzorec 3 (Polisorbat 80V)	0,36	1,22	2,61	takoj
	0,36	1,22	2,6	po mešanju
Vzorec 4 (Polisorbat 80V)	0,75	2,2	4,54	takoj
	0,76	2,2	4,49	po mešanju
Vzorec 5 (Polisorbat 80V)	0,36	1,0	2,15	takoj
	0,39	1,03	2,11	po mešanju
Vzorec 6 (PVP K-25)	0,97	3,93	7,37	takoj
	0,61	2,17	4,41	po mešanju
Vzorec 7 (Poloksamer 188)	0,42	1,32	2,79	takoj
	0,44	1,31	2,73	po mešanju
Vzorec 8 (Pharmacoat 603)	0,38	1,23	2,73	takoj
	0,41	1,24	2,69	po mešanju
Vzorec 9 (PEG 6000)	0,82	6,63	12,66	takoj
	0,56	3,62	7,27	po mešanju
Vzorec 10 (PVA 10-98)	0,68	2,3	5,53	takoj
	0,69	2,31	5,49	po mešanju
Vzorec 11 (Laktoza)	0,87	4,43	10,8	takoj
	0,43	1,47	3,37	po mešanju
Vzorec 12 (Texapon K12)	0,43	1,04	2,11	takoj
	0,41	1,02	2,08	po mešanju

Pri vzorcu 12 smo kot stabilizator uporabili anionsko površinsko aktivno snov Texapon K12 in izdelali delce s povprečno velikostjo 554,6 nm (Preglednica XV). Z elektronsko mikroskopijo vidimo, da so v vzorcu prisotni zelo majhni delci (tudi pod 500 nm) in tudi malo večji okrog 2000 nm (Slika 14), kar kaže, da je razpon velikosti delcev zelo širok, kar potrjuje tudi relativno visok PI.

Preglednica XV: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev pri homogenizaciji vzorca 12 (38 g 2,10 % Texapon K12 in 2 g NDS)

TLAK (bar)	POVPREČNA VELIKOST (nm)	PI	z.p. (mV)
2x150	4894	0,520	
2x500	3661	0,484	
2x1000	2453	1,000	
5x1500	987,1	0,740	
5x1500	554,6	0,662	-6,66



Slika 14: SEM slika vzorca 12

Najboljše rezultate (najmanjše delce) smo dobili pri uporabi stabilizatorjev Polisorbat in Texapon, kjer je bila povprečna velikost delcev okrog 500 nm, pri uporabi Poloksamera pa je bila 2600 nm. Vsi ostali sterični stabilizatorji – polimeri in laktoza so se izkazali kot neustrezni za izdelavo nanosuspenzij s preskušeno zdravilno učinkovino.

Največkrat uporabljena stabilizatorja za izdelavo nanosuspenzij sta neionogena površinsko aktivna snov Polisorbat ter ionogena površinsko aktivna snov natrijev lavril sulfat (Texapon), ki sta se tudi v našem primeru izkazala kot najbolj primerna. Uporaba polimerov pa ima nekaj omejitev. Pri polimerih kot so PVP, Pharmacoat, Poloksamer, PEG je zelo pomembno, da je hidrofobna površina učinkovine čim večja, saj se nanjo absorbirajo ti polimeri. Van Eerdenbrugh in drugi pa navajajo še druge omejitve. Pomembna je tudi koncentracija polimera. Pri PVA in Poloksameru dobimo boljše rezultate, če uporabimo polimer s koncentracijo nad 50 %, kar pa vedno ni mogoče, saj s povečanjem koncentracije naraste tudi viskoznost. Omenja pa tudi, da dobimo bolj stabilne nanosuspenzije, če uporabimo stabilizator, ki ima podobno površinsko energijo kot učinkovina. (26)

4.1.2 Določitev zeta potenciala

Vsem vzorcem smo po končani homogenizaciji poleg določitve velikosti in porazdelitve velikosti delcev določili tudi vrednost zeta potenciala. Dobljene vrednosti so zbrane v Preglednici XVI.

Preglednica XVI: Vrednosti zeta potenciala po homogenizaciji vzorcev

Vzorec	Stabilizator	Koncentracija	Zeta potencial (mV)
Vzorec 1	Polisorbat 80V	2,10 %	- 11,7
Vzorec 2	Polisorbat 80V	2,10 %	- 12,9
Vzorec 3	Polisorbat 80V	2,10 %	- 13,2
Vzorec 4	Polisorbat 80V	2,10 %	- 14,3
Vzorec 5	Polisorbat 80V	2,10 %	- 13,2
Vzorec 6	PVP K-25	10,52 %	- 0,0137
Vzorec 7	Poloxamer 188	10,52 %	- 2,47
Vzorec 8	Pharmacoat 603	5,26 %	- 3,13
Vzorec 9	PEG 6000	10,52 %	- 4,95
Vzorec 10	PVA 10-98	5,26 %	0,113
Vzorec 11	Laktoza	10,52 %	4,63
Vzorec 12	Texapon K12	2,10 %	- 6,66

Absolutno večji zeta potencial v fizikalnem smislu bolj stabilizira posamezni sistem. Za fizikalno stabilnost nanosuspenzij mora biti zeta potencial absolutno večji od ± 30 mV. Sistemi z vrednostmi zeta potenciala med -5 mV in $+5$ mV veljajo za nestabilne. Pri sistemih, ki so stabilizirani tako z elektrostatičnimi kot s steričnimi stabilizatorji, pa je za stabilen sistem zadostna vrednost zeta potenciala ± 20 mV. (3) V našem primeru so najstabilnejši sistemi, kjer smo kot stabilizator uporabili neionogeno površinsko aktivno snov Polisorbat 80V in anionsko površinsko aktivno snov Texapon K12, kjer uporabljena stabilizatorja stabilizirata tako z elektrostatičnim nabojem kot tudi sterično. Vsi ostali sistemi pa niso izkazovali ustrezne dolgoročne stabilnosti. Pri sistemih, kjer je pričakovati največjo stabilnost smo dobili delce velikosti pod 1000 nm, pri ostalih pa ne, kar lepo kaže na velik pomen stabilizacije delcev pri pripravi nanosuspenzij.

4.2 Stabilnost nanosuspenzij

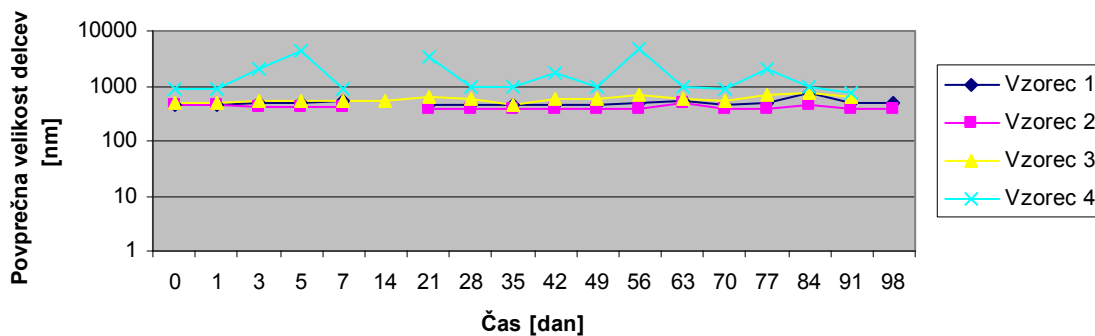
Vse izdelane vzorce smo ovrednotili tudi z vidika stabilnosti. Spremljali smo, kako se velikost delcev in zeta potencial spreminjata s časom. Ves čas opazovanja smo vzorce hranili v hladilniku. Poleg omenjenega testiranja pa smo manjše količine vseh vzorcev postavili za 14 dni, 1 mesec in 3 mesece na sobno temperaturo in na 40°C. Po vsakem času smo vzorcem prav tako pomerili velikost delcev in zeta potencial. Izbrane vzorce smo ovrednotili tudi s HPLC analizo.

4.2.1 Stabilnost nanosuspenzij v hladilniku

Izdelanim nanosuspenzijam smo v določenih časovnih intervalih, od dneva izdelave nanosuspenzije do konca praktičnega dela, merili velikost delcev in zeta potencial. Tako smo ugotovili, ali čas vpliva na spremembo omenjenih parametrov (Preglednice XVII, XVIII in IXX, Slika 15, Slika 16, Slika 17).

Preglednica XVII: Povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial vzorcev 1 do 4, shranjenih v hladilniku (T = teden)

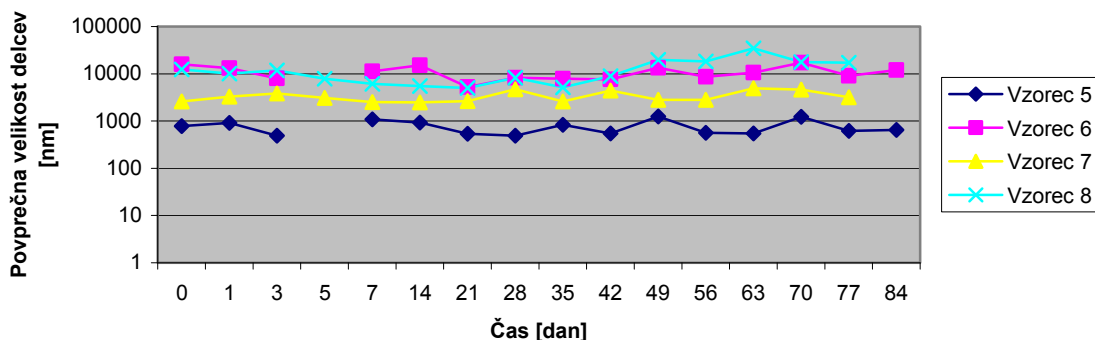
	VZOREC 1 (Polisorbat)			VZOREC 2 (Polisorbat)			VZOREC 3 (Polisorbat)			VZOREC 4 (Polisorbat)		
	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)
0 DAN	468,4	0,379		455,8	0,412		499,5	0,263		888	0,640	
1 DAN	468,5	0,358		435,3	0,286		497,2	0,353		871,8	0,488	
3 DAN	470,7	0,344		401,7	0,232		521	0,293		2100	1,000	-14,3
5 DAN	490,1	0,286		400,8	0,268		536	0,294	-13,2	4505	1,000	-15,5
7 DAN	515,1	0,355	-11,70	405,4	0,220	-12,9	554	0,265	-12,3	887,6	0,486	
2T	n.p.	n.p.		n.p.	n.p.		514,5	0,268	-10,4	5518	1,000	-17,6
3T	469,3	0,259	-13,90	394,8	0,235	-13,4	610,8	0,426	-15,6	3474	1,000	-17,6
4T	461	0,286		387,4	0,213		601,9	0,361		955,9	0,496	
5T	457,3	0,282		390,8	0,226		469,7	0,254		954,8	0,770	
6T	457,4	0,244	-11,10	375	0,183	-12,1	592,8	0,318	-10,4	1769	1,000	-19,8
7T	469,6	0,342		392,9	0,226		579,1	0,372		941	0,499	
8T	470,8	0,316		380	0,226		697,8	0,433	-16,6	4630	1,000	-23,9
9T	521	0,355	-18,00	477,8	0,498	-19,5	591,6	0,382		936,2	0,498	
10T	452,7	0,280		376,6	0,228		556,4	0,382		886,5	0,725	
11T	473	0,298		384,3	0,223		682,6	0,449	-16,1	1970	1,000	-26,8
12T	722,6	0,571	-16,80	456,2	0,474	-16,9	731,9	0,510		951,7	0,693	
13T	487,8	0,446		379,4	0,236		622,5	0,411		745,1	0,852	
14T	488,2	0,386		394,1	0,271							



Slika 15: Porazdelitev povprečne velikosti delcev vzorcev 1 do 4, shranjenih v hladilniku

Preglednica XVIII: Povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial vzorcev 5 do 8, shranjenih v hladilniku (T = teden)

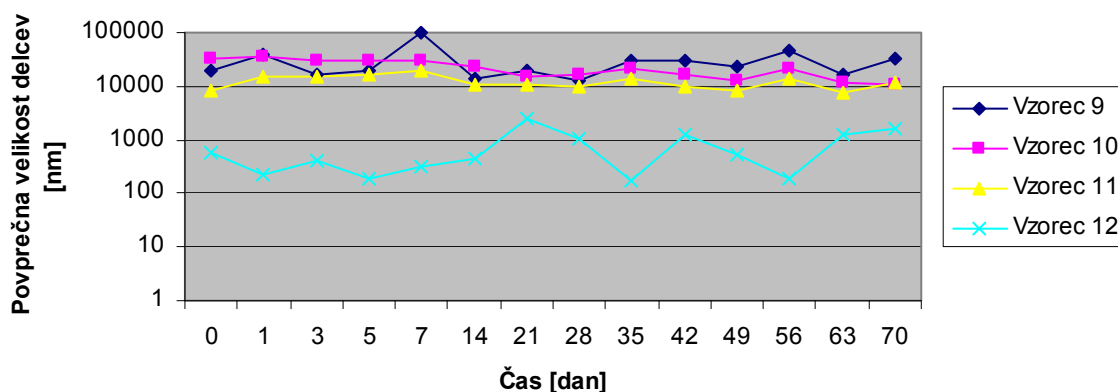
	VZOREC 5 (Polisorbat)			VZOREC 6 (PVP K-25)			VZOREC 7 (Poloksamer)			VZOREC 8 (Pharmacoat)		
	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)
0 DAN	783,1	0,636	-13,2	15780	0,444	-0,0137	2600	0,689	-2,47	12330	0,190	-3,13
1 DAN	916	0,625	-12,3	13150	0,344	0,321	3263	0,477	-2,18	10150	0,027	-2,75
3 DAN	489,3	0,276		7986	0,350		3825	0,821	-2,01	11850	0,336	-1,11
5 DAN	n.p.	n.p.		n.p.	n.p.		3064	0,456	-2,96	7875	0,359	-0,523
7 DAN	1077	0,681	-16	11270	0,159	0,254	2514	0,370		6131	0,351	
2T	928	0,658	-14,4	15130	0,368	0,44	2467	0,277		5514	0,326	
3T	537,2	0,288		5254	0,255		2639	0,399		5001	0,298	
4T	485,9	0,259		8217	0,438		4683	1,000	-1,92	8206	0,530	-3,87
5T	830,9	0,602	-14,1	7910	0,021	0,142	2602	0,269		5138	0,236	
6T	545,6	0,380		7589	0,540		4424	0,861	-2,68	8865	0,588	-2,97
7T	1245	0,723	-17,5	13390	0,362	0,00169	2804	0,392		19850	0,132	
8T	562,1	0,320		8693	0,429		2794	0,299		18360	0,155	
9T	542	0,311		10590	0,364		4911	0,527	-1,81	34570	0,306	-0,263
10T	1231	0,786	-15,6	17110	0,119	0,505	4650	0,308		17580	0,026	
11T	613,7	0,474		9033	0,310		3204	0,287		17130	0,059	
12T	648,6	0,467		11920	0,359							



Slika 16: Porazdelitev povprečne velikosti delcev vzorcev 5 do 8, shranjenih v hladilniku

Preglednica IXX: Povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial vzorcev 9 do 12, shranjenih v hladilniku (T = teden)

	VZOREC 9 (PEG 6000)			VZOREC 10 (PVA 10-98)			VZOREC 11 (Laktoza)			VZOREC 12 (Texapon)		
	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)	p. vel. del. (nm)	PI	zeta pot.(mV)
0 DAN	20010	0,213	-4,95	32950	0,064	0,113	8641	0,070	4,63	554,6	0,662	-6,66
1 DAN	39000	1,000	-4,55	34710	0,555	-0,0984	14850	0,369	6,34	230,7	0,674	-25,5
3 DAN	15870	0,300	-3,91	30290	0,738	-0,157	15470	0,324	-4,34	394,7	0,420	-29,2
5 DAN	19560	1,000	-2,78	30750	0,347	-0,0925	15870	0,003	4,96	182,8	0,578	-57,1
7 DAN	97930	1,000	-5,36	29750	0,013	-0,144	19840	1,000	2,83	314,9	0,609	-42,5
2T	14120	0,964		22470	0,293		11030	0,440		463,2	0,609	-69,4
3T	19520	0,306		14480	0,241		10790	0,457		2463	1,000	
4T	12440	0,286		16670	0,271		9763	0,467		1089	0,838	
5T	31330	0,409	-4,73	21010	0,144	-0,421	13680	1,000	3,44	173,1	0,278	-55,4
6T	29590	0,926		16420	0,379		9476	0,501		1268	1,000	
7T	23350	0,264		12550	0,350		8110	0,334		507,4	0,727	
8T	47350	1,000	-7,8	21370	0,356	-0,237	13770	1,000	-2,53	183,2	0,352	-1,25
9T	15890	0,045		11910	0,578		7513	0,360		1280	1,000	
10T	33690	0,012		10800	0,833		11190	0,012		1688	1,000	



Slika 17: Porazdelitev povprečne velikosti delcev vzorcev 9 do 12, shranjenih v hladilniku

Pri vseh vzorcih, ki so izdelani s Polisorbatom 80V (vzorec 1 – vzorec 5, Preglednici XVII in XVIII) opazimo, da ni povečanja velikosti delcev in polidisperznega indeksa v času shranjevanja, zeta potencial pa kaže rahel trend povečevanja. Z naraščanjem zeta potenciala smo tako dobili bolj stabilne delce. (27) Uporabljeni stabilizator torej zelo dobro stabilizira nanosuspenzijo, saj dobimo že pri izdelavi majhne velikosti delcev, ki se ohranijo ves čas shranjevanja. Tudi pri vzorcih 6, 7, 8, 9, 11 (Preglednici XVIII in IXX) opazimo le majhno povečanje velikosti delcev, ki pa so že v začetku bili mikrometrskih velikosti, ki so fizikalno gledano dosti bolj stabilni kot delci nanometrskih velikosti. Poudariti je treba, da PCS metoda za določanje velikosti delcev tukaj ni primerna zaradi velikosti merjenih delcev, lahko pa nam služi za grobo oceno sprememb. Zeta potencial se je pri teh vzorcih zelo malo spremenil, kar spet nakazuje na majhne fizikalne spremembe

vzorca. Pri vzorcu 10 opazimo trend zmanjševanja velikosti delcev, kar kaže na to, da je verjetno prišlo do disociacije aglomeratov. Zeta potencial se ne spremeni. Pri vzorcu 12 (Preglednica IXX) opazimo naraščanje zeta potenciala skozi določen čas in nato njegov nenaden padec.

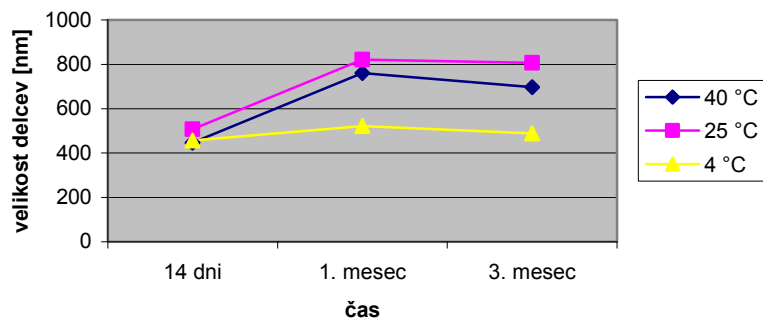
Najmanj stabilna sta vzorca 10 in 12, kjer opazimo, da se s časom velikost delcev spreminja, vsi ostali vzorci pa so fizikalno gledano stabilni v opazovanem obdobju. Za izdelavo nanosuspenzij pa je najbolj primeren stabilizator Polisorbat, ki omogoča izdelavo delcev nanometrskih velikosti in tudi zelo dobro stabilizira vzorce izdelane z njim.

Vse meritve smo izvedli z uporabo dveh celic. Medtem ko smo lahko z eno pomerili samo velikost, smo z uporabo druge celice poleg velikosti dobili tudi zeta potencial. Kjer je poleg velikosti delcev naveden tudi zeta potencial, smo uporabili drugo celico. Opazimo da imamo znotraj vzorca odstopanja v velikosti delcev, zaradi uporabe dveh različnih celic.

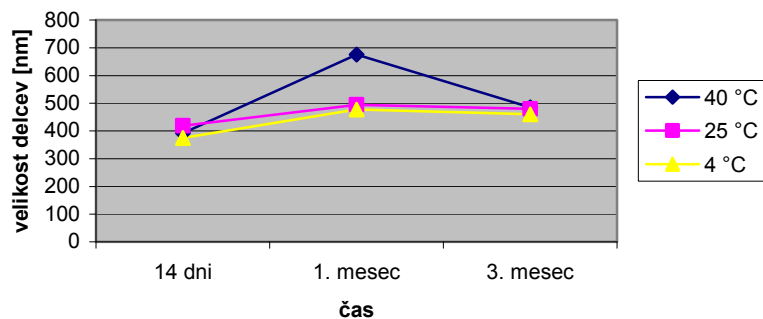
4.2.2 Stabilnost nanosuspenzij pri različnih temperaturah

Nanosuspenzije smo za 14 dni, 1 mesec in 3 mesece postavili na različne temperature in sicer na 4°C (hladilnik), 25°C in 40°C. Po pretečenem času smo ovrednotili vpliv temperature na velikost delcev in zeta potencial nanosuspenzij.

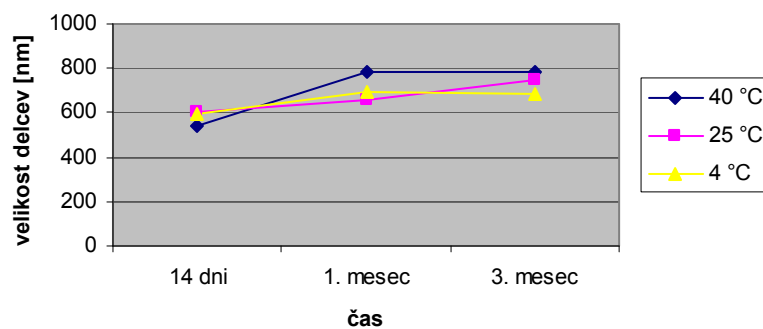
Pri vseh vzorcih s Polisorbatom 80V (vzorci 1 – 5) (Slika 18, Slika 19, Slika 20, Slika 21, Slika 22) opazimo splošni trend naraščanja velikosti delcev s povečevanjem temperature, razen v vzorcih 4 in 5, kjer je opaziti trend zmanjševanja velikosti delcev pri 25°C. S povečanjem temperature postane sistem bolj nestabilen, kar se kaže v naraščanju velikosti delcev. Isti trend opazimo tudi pri vzorcih 7 (Poloxamer) in 8 (HPMC) (Slika 24, Slika 25). Pri vzorcu 6 (PVP) (Slika 23) opazimo, da se delci skozi 3 mesečno obdobje povečujejo, vendar temperatura na rast delcev nima vpliva.



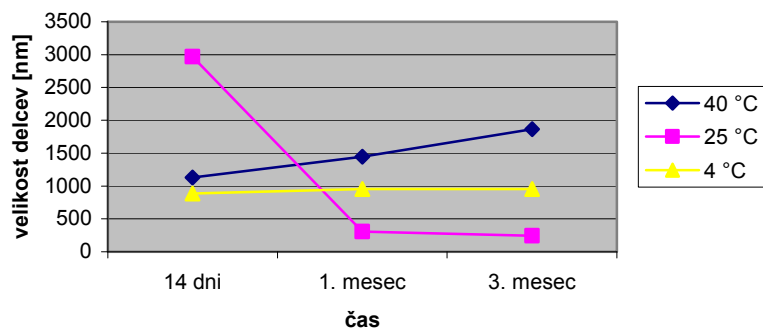
Slika 18: Povprečna velikost delcev v vzorcu 1 pri različnih temperaturah



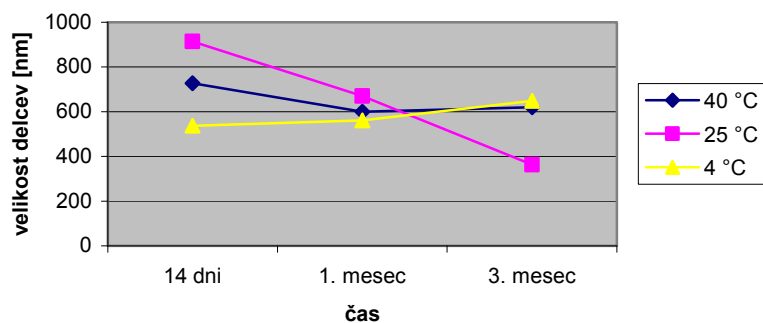
Slika 19: Povprečna velikost delcev v vzorcu 2 pri različnih temperaturah



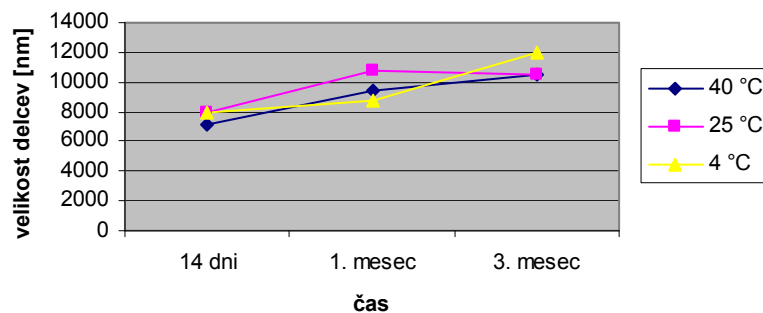
Slika 20: Povprečna velikost delcev v vzorcu 3 pri različnih temperaturah



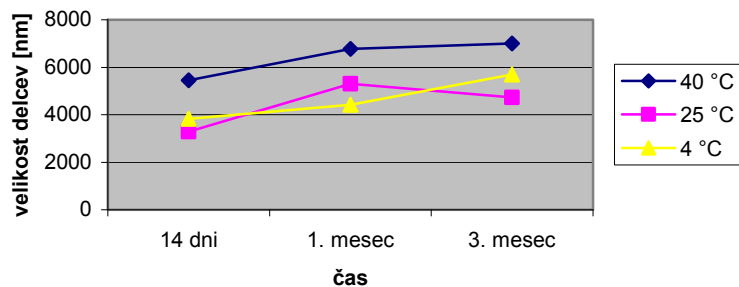
Slika 21: Povprečna velikost delcev v vzorcu 4 pri različnih temperaturah



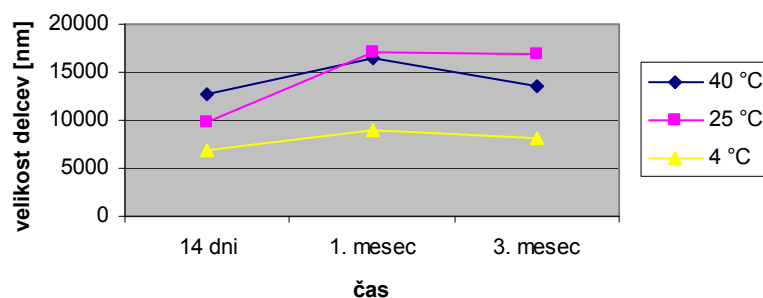
Slika 22: Povprečna velikost delcev v vzorcu 5 pri različnih temperaturah



Slika 23: Povprečna velikost delcev v vzorcu 6 pri različnih temperaturah

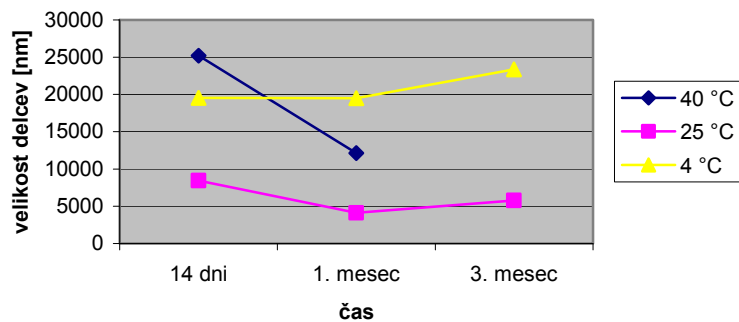


Slika 24: Povprečna velikost delcev v vzorcu 7 pri različnih temperaturah

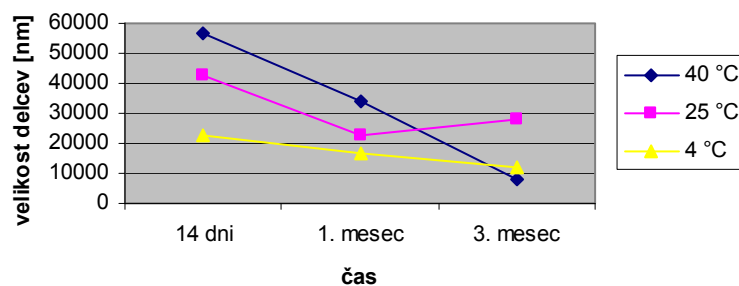


Slika 25: Povprečna velikost delcev v vzorcu 8 pri različnih temperaturah

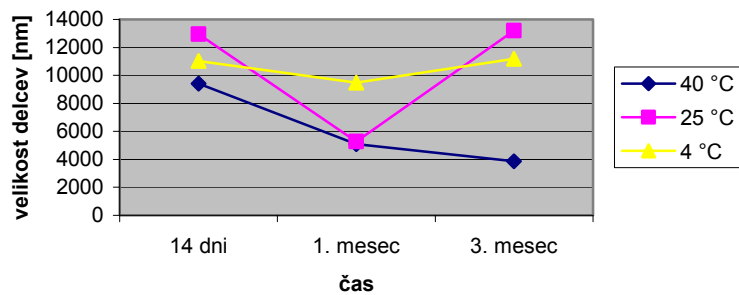
Pri vzorcih 9 (PEG 6000) in 11 (Laktoza) (Slika 26, Slika 28) opazimo veliko nihanje velikosti delcev in rezultati kažejo, da pri shranjevanju v hladilniku dobimo največje velikosti delcev, torej je sistem pri teh pogojih najmanj stabilen. Zavedati pa se moramo, da smo za meritev delcev mikrometrskih velikosti uporabili Zetasizer, ki temu ni namenjen. Realnejše rezultate bi dobili z uporabo LD metode. Na splošno pa se ni velikost delcev pri vseh temperaturah skozi tri mesečno obdobje bistveno spremenila od začetne velikosti. Pri vzorcu 10 (PVA) (Slika 27) opazimo pri vseh temperaturah trend zmanjševanja delcev. Tudi tukaj bi bolj relevantne rezultate dobili z uporabo LD metode. Pri vzorcu 12 (Texapon) (Slika 29) pa opazimo povečanje velikosti delcev, ki je največje prav pri meritvah vzorcev iz hladilnika.



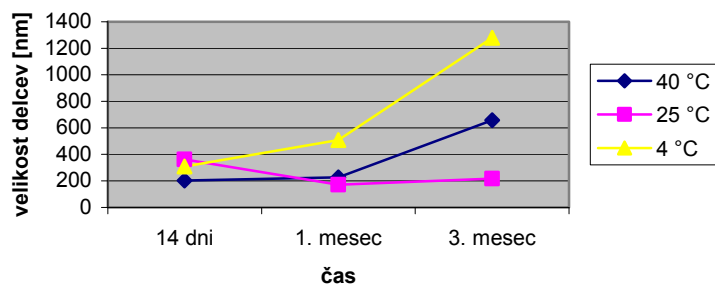
Slika 26: Povprečna velikost delcev v vzorcu 9 pri različnih temperaturah



Slika 27: Povprečna velikost delcev v vzorcu 10 pri različnih temperaturah



Slika 28: Povprečna velikost delcev v vzorcu 11 pri različnih temperaturah



Slika 29: Povprečna velikost delcev v vzorcu 12 pri različnih temperaturah

Zeta potencial se je pri vzorcih izdelanih s Polisorbatom (vzorci 1 – 5) na 25°C (Preglednica XXI) in 40°C (Preglednica XX) močno povečal in presegel mejo ± 30 mV, pri 4°C (Preglednica XXII) opazimo manjše naraščanje zeta potenciala, ki pa se še vedno giblje v ustreznih mejah. Sklepamo lahko, da zeta potencial narašča s temperaturo in časom. Stabilnost sistema najboljše ohranimo pri shranjevanju v hladilniku na 4°C. Pri shranjevanju na sobni temperaturi (25°C) pa je nanosuspenzija fizikalno stabilna približno mesec dni. Pri vzorcih 6 – 10 ni opaziti sprememb, ker gre za suspenzije mikrometrskih delcev, ki so fizikalno dosti bolj stabilne kot nanosuspenzije in ni pričakovati večjih nihanj v naboju delcev. Vzorec 11 kaže velika nihanja v zeta potencialu, kljub temu da gre za suspenzijo mikrometrskih delcev. Pri vzorcu 11 smo namesto stabilizatorja uporabili laktozo in tako želeli preskusiti njen vpliv pri stabilizaciji nanodelcev. Ugotovili smo, da laktoza ni primerna snov za nastanek in stabilizacijo nanodelcev. Ker nima nobenega naboja, imajo zato delci naboj kot ga ima sama učinkovina, ki pa med shranjevanjem zelo niha. Vzorec 12 pa že po pričakovanjih kaže hitro in močno naraščanje zeta potenciala, kar se odraža tudi na fizikalni stabilnosti.

Preglednica XX: Zeta potencial pri vzorcih shranjenih 3 mesece pri 40°C

VZOREC	STABILIZATOR	ZETA POTENCIAL po 14 dneh	ZETA POTENCIAL po 1 mesecu	ZETA POTENCIAL po 3 mesecu
Vzorec 1	Polisorbat 80V	- 20,1mV	- 31,5mV	- 37,0mV
Vzorec 2	Polisorbat 80V	- 14,6mV	- 29,4mV	- 31,3mV
Vzorec 3	Polisorbat 80V	- 20,3mV	- 34,6mV	- 35,5mV
Vzorec 4	Polisorbat 80V	- 34,4mV	- 42,5mV	- 40,0mV
Vzorec 5	Polisorbat 80V	- 25,6mV	- 37,0mV	- 40,8mV
Vzorec 6	PVP K-25	- 0,0202mV	0,527mV	0,537mV
Vzorec 7	Poloxamer 188	- 1,93mV	- 2,89mV	- 2,65mV
Vzorec 8	Pharmacoat 603	- 0,482mV	- 0,531mV	- 0,438mV
Vzorec 9	PEG 6000	- 7,19mV	- 6,32mV	n.p.
Vzorec 10	PVA 10-98	- 0,156mV	- 0,165mV	- 0,425mV
Vzorec 11	Laktoza	4,46mV	3,86mV	- 6,93mV
Vzorec 12	Texapon K12	- 34,2mV	- 6,75mV	- 86,6mV

Preglednica XXI: Zeta potencial pri vzorcih shranjenih 3 mesece pri 25°C

VZOREC	STABILIZATOR	ZETA POTENCIAL po 14 dneh	ZETA POTENCIAL po 1 mesecu	ZETA POTENCIAL po 3 mesecu
Vzorec 1	Polisorbat 80V	- 18,6mV	- 24,0mV	- 33,3mV
Vzorec 2	Polisorbat 80V	- 15,8mV	- 25,5mV	- 29,5mV
Vzorec 3	Polisorbat 80V	- 18,7mV	- 26,9mV	- 31,4mV
Vzorec 4	Polisorbat 80V	- 26,9mV	- 36,6mV	- 36,3mV
Vzorec 5	Polisorbat 80V	- 17,8mV	- 25,8mV	- 35,7mV
Vzorec 6	PVP K-25	0,111mV	0,813mV	0,478mV
Vzorec 7	Poloxamer 188	- 1,96mV	- 2,39mV	- 1,31mV
Vzorec 8	Pharmacoat 603	- 2,33mV	- 0,688mV	- 0,606mV
Vzorec 9	PEG 6000	- 4,98mV	- 4,65mV	- 5,13mV
Vzorec 10	PVA 10-98	0,102mV	- 0,353mV	- 0,142mV
Vzorec 11	Laktoza	1,57mV	11,2mV	- 4,31mV
Vzorec 12	Texapon K12	- 48,2mV	- 37,5mV	- 54,0mV

Preglednica XXII: Zeta potencial pri vzorcih shranjenih 3 mesece pri 4°C (hladilnik)

VZOREC	STABILIZATOR	ZETA POTENCIAL po 14 dneh	ZETA POTENCIAL po 1 mesecu	ZETA POTENCIAL po 3 mesecu
Vzorec 1	Polisorbat 80V	- 11,1mV	- 18,0mV	- 15,9mV
Vzorec 2	Polisorbat 80V	- 12,1mV	- 19,5mV	- 15,6mV
Vzorec 3	Polisorbat 80V	- 10,4mV	- 16,6mV	- 16,3mV
Vzorec 4	Polisorbat 80V	- 19,2mV	- 23,9mV	- 30,7mV
Vzorec 5	Polisorbat 80V	- 14,1mV	- 17,5mV	- 14,8mV
Vzorec 6	PVP K-25	0,142mV	0,00169mV	0,273mV
Vzorec 7	Poloxamer 188	- 3,44mV	- 2,68mV	- 1,79mV
Vzorec 8	Pharmacoat 603	- 2,45mV	- 2,97mV	- 0,608mV
Vzorec 9	PEG 6000	- 4,43mV	- 4,73mV	- 5,37mV
Vzorec 10	PVA 10-98	0,386mV	- 0,421mV	- 0,241mV
Vzorec 11	Laktoza	- 20,1mV	3,44mV	- 3,62mV
Vzorec 12	Texapon K12	- 44,2mV	- 55,4mV	- 74,6mV

4.2.3 Stabilnost nanosuspenzij ovrednoteno s HPLC analizo

HPLC analizo razgradnih produktov učinkovine smo naredili pri vzorcih, ki so bili na 40°C 14 dni in 1 mesec (Preglednica XXIII). Na osnovi primerjave rezultatov testiranja učinkovine in nanosuspenzij smo ugotovili, da prihaja do delne razgradnje učinkovine pri nanosuspenziji s stabilizatorjem Pharmacoat 603 (vzorec 8). Znatnejša razgradnja pa je nakazana v nanosuspenziji s Texaponom K12 (vzorec 12). Ker je delež razgradnih produktov zelo majhen, smo sklepali, da tudi pri milejših pogojih shranjevanja ne pride do bistvene razgradnje učinkovine pri vseh ostalih vzorcih, zato HPLC analiz drugih vzorcev nismo izvajali.

Razlog za znatnejšo razgradnjo učinkovine v nanosuspenzijah, stabiliziranih s Texaponom, je lahko tudi v tem, da Texapon (natrijev dodecil sulfat) pri svoji vezavi na učinkovino povzroči uničenje kristalinične strukture učinkovine. (28) Tako kot poročajo Ford in ostali, SDS v stiku s propranolol kloridom povzroči nastanek propranolol dodecil sulfata, ki zavira sproščanje učinkovine iz tablet. (29) O vplivu SDS na strukturo učinkovine poročajo tudi Alden in ostali. Proučevali so vpliv SDS na trdno disperzijo PEG 3000 in grizeofulvina. Pri vzorcih brez dodane površinsko aktivne snovi se trdna disperzija ohrani, pri vzorcih z dodanim SDS pa se disperzija pretvori v trdno raztopino. Poročajo o interakciji med določenimi atomi ogljika v molekuli grizeofulvina in SDS. (30)

Preglednica XXIII: Rezultati HPLC analize razgradnih produktov učinkovine

Vzorec	Vsota razgradnih produktov na 40°C (%)	
	14 dni	1 mesec
1 (Polisorbat 80V)	0.34	0.32
2 (Polisorbat 80V)	0.37	0.39
3 (Polisorbat 80V)	0.26	0.29
4 (Polisorbat 80V)	0.21	0.27
5 (Polisorbat 80V)	0.31	0.20
6 (PVP K-25)	0.29	0.31
7 (Poloxamer 188)	0.30	0.24
8 (Pharmacoat 603)	0.78	0.72
9 (PEG 6000)	0.18	0.15
10 (PVA 10-98)	0.40	0.49
11 (Laktoza)	0.12	0.35
12 (Texapon K12)	1.43	1.14

4.3 Izdelava tablet

Ker smo pri vzorcih izdelanih s stabilizatorjema Polisorbat 80V in Texapon K12 dobili najmanjšo velikost delcev, smo se odločili, da izbrane nanosuspenzije vgradimo v tablete. Tablete smo izdelali z dodatkom vodotopnih pomožnih snovi.

4.3.1 Izdelava placebo tablet

Pred izdelavo tablet z učinkovino smo se odločili za izdelavo placebo tablet, t.j. tablet izdelanih samo iz pomožnih snovi in vode, brez zdravilne učinkovine. Na ta način smo spoznali obnašanje zmesi za tabletiranje. Preskusili smo naslednje pomožne snovi: Laktoza sušena z razprševanjem, Laktoza 200 mesh, Saharoza, Glukoza, Manitol, PEG 4000, Pearlitol 400 DC in Ludipress. Trdnost placebo tablet so v Preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Trdnost placebo tablet

Vodotopna pomožna snov	nizka trdnost	visoka trdnost
Laktoza	5N	260N
Saharoza	5N	100N
Glukoza	15N	n.p.
Pearlitol 400 DC	10N	190N
Manitol	15N	50N
PEG 4000	5N	100N
Ludipress	5N	260N

Laktoza sušena z razprševanjem in Laktoza 200 mesh

Obe snovi se pri tabletiranju enako obnašata, zato sem jih opisala skupaj. Pred tabletiranjem smo izdelani granulat iz laktoze in vode presejali skozi sito z velikostjo por 0,5 mm in ga posušili v vakuumskem sušilniku. Pred tabletiranjem smo granulatu določili izgubo vode pri sušenju (IPS) 0,80 %. Pri tabletiranju granulata smo ugotovili, da se zmes za tabletiranje lepi na pečate. Za zmanjšanje lepljenja smo pečate predhodno namazali z magnezijevim stearatom. Poleg lepljenja je bila laktoza tudi slabo pretočna, zato smo tabletiranje izvedli ročno. Laktoza je tudi slabo stisljiva, zato smo pri nastavitvah tabletirke na nizko trdnost dobili krhke tablete, pri visoki trdnosti pa je tableta zaradi velikega trenja

pri izmetu počila. Izdelali smo tablete s povprečno maso 360 – 380 mg nizke trdnosti ~ 10 N in visoke trdnosti ~ 260 N.

Saharoza

Pri granuliranju saharoze s prečiščeno vodo smo dobili zelo mokro zmes, ki smo jo najprej posušili v vakuumskem sušilniku v 3 ciklih po 15 min in šele nato presejali skozi sito 0,5 mm. Granulat smo ponovno postavili v sušilnik za 15 min. Po sušenju je vrednost IPS znašala 0,35 %. Tako posušen granulat smo tabletirali, pečate smo predhodno namazali z magnezijevim stearatom. Prav tako kot laktoza je bila tudi saharoza slabo pretočna, zato smo tabletiranje izvedla ročno. Poleg omenjenih slabosti pa je saharoza tudi slabo stisljiva, kar dokazuje dejstvo da nam ni uspelo izdelati tablet trših od 100 N. Pri povečanju sile stiskanja se tableta zaradi trenja pri izmetu razplasti, razplastena tableta pa nima večje trdnosti.

Glukoza

Pred tabletiranjem smo izdelali granulat iz glukoze in vode ter ga presejali skozi sito 0,5 mm. Granulat smo nato sušili v vakuumskem sušilniku v dveh ciklih po 15 minut, ter pomerili IPS indeks 0,30 %. Granulat smo nato tabletirali, zmes za tabletiranje pa se je enako obnašala kot tista izdelana iz saharoze in vode.

Manitol

Granulat iz manitola in vode smo presejali skozi sito z velikostjo por 0,5 mm in ga posušili v vakuumskem sušilniku. Pred tabletiranjem smo pomerili še IPS 0,15 %. Granulat se je, prav tako kot ostali, lepil na pečate in je bil slabo pretočen, zato smo uporabili enake ukrepe kot pri ostalih vzorcih. Najvišja trdnost, ki smo jo dosegli pri izdelavi tablet je bila 50 N. Pri povečevanju sile stiskanja bolj trdnih tablet nismo uspeli izdelati.

Pearlitol 400 DC

Pred tabletiranjem smo izdelali granulat iz Pearlitola 400 DC in vode ter ga presejali skozi sito 0,5 mm. Tako pripravljen granulat smo posušili v vakuumskem sušilniku in pomerili IPS 0,10 %. Granulat smo nato tabletirali, zmes se je prav tako kot ostale zmesi lepila na pečate, zato smo jih predhodno namazali z magnezijevim stearatom. Za razliko od ostalih pa je bila zmes lepo pretočna in stisljiva. Izdelali smo tablete z nizko trdnostjo ~ 10 N in z

visoko trdnostjo ~ 190 N. Pri povečanju sile stiskanja se je tableta zaradi trenja razplastila in tako imela spet nizko trdnost.

PEG 4000

Tudi pri pomožni snovi PEG 4000 smo postopali enako kot pri ostalih vzorcih. Vrednost IPS je bila 0,30 %. Granulat izdelan iz PEG 4000 je bil zelo dobro stisljiv in nastane tableta z nizko trdnostjo ~ 10 N že pri nizkih silah stiskanja. Najvišja trdnost, ki smo jo dosegli, je bila 100 N, pri povečevanju sile stiskanja tablet z višjo trdnostjo nismo mogli izdelati. Prav tako kot ostali granulati se tudi ta granulat lepi na pečate.

Ludipress

Tudi pri tej pomožni snovi smo uporabili enak postopek kot pri ostalih, vrednost IPS je znašala 1,85 %. Granulat iz Ludipressa se je lepil na pečate in bil dobro stisljiv in pretočen. Izdelali smo tablete z nizko trdnostjo ~ 5 N in tablete z visoko trdnostjo ~ 300 N, ki je tudi najvišja trdnost, ki smo jo dosegli.

4.3.2 Izdelava tablet z nanosuspenzijo

Izdelan granulat smo posušili v vakuumskem sušilniku v istem številu ciklov kot smo placebo granulat in pomerili tudi IPS (Preglednica XXV). Z izdelavo placebo tablet smo spoznali obnašanje in lastnosti zmesi za tabletiranje. Ugotovili smo, da se vse zmesi lepijo na pečate, zato smo jih pred tabletiranjem namazali z magnezijevim stearatom. Veliko granulotov je bilo slabo pretočnih, zato smo tabletiranje izvedli ročno. Odločili smo se, da bomo pri vsaki pomožni snovi izdelali tablete dveh trdnosti. Tablete z nizko trdnostjo ~20 N in tablete z visoko trdnostjo ~260 N. Pri nekaterih granulatih nismo uspeli izdelati tablete s tako visoko trdnostjo, ampak je bila pri teh najvišja trdnost 100 N.

Preglednica XXV: Vrednosti IPS po sušenju granulata z nanosuspenzijo (zapisane številčne vrednosti poleg pomožne snovi (npr. 1x), pomenijo število ciklov sušenja, ki smo jih uporabili za ustrezno posušenje granulata)

Granulat (Polisorbat 80V)	IPS
Laktoza mesh 200 NF 1x	-0,87 %
Laktoza sušena z rozp. 1x	-0,84 %
PEG 4000 1x	-0,70 %
Glukoza 2x	-1,34 %
Pearlitol 400DC 1x	0,05 %
Ludipress 1x	-1,05 %
Saharoza 4x	-0,19 %
Manitol 1x	-0,20 %

Granulat (Texapon K12)	IPS
Laktoza mesh 200 NF 1x	-0,25 %
Laktoza sušena z rozp. 1x	-0,25 %
PEG 4000 1x	-0,80 %
Glukoza 2x	-1,26 %
Pearlitol 400DC 1x	-0,35 %
Ludipress 1x	-1,14 %
Saharoza 4x	-0,25 %
Manitol 1x	-0,15 %

4.4 Razpadnost/raztapljanje tablet

Placebo tablete smo uporabili za ugotavljanje obnašanja tablet pri raztapljanju. Vodnim raztopinam, v katerih so se raztopile tablete, smo pomerili tudi velikost delcev in ugotovili, da aparatura sicer zazna delce netopnih nečistoč, prisotnih v pomožni snovi, vendar jih je številčno tako malo, da ne vplivajo na našo meritev. Pri veliki večini tablet z nanosuspenzijo smo se srečali s slabo ponovljivostjo določitve velikosti nanodelcev, kar lahko pripišemo tudi temu, da smo tablete izdelali ročno in je vsebnost nanosuspenzije precej nihala.

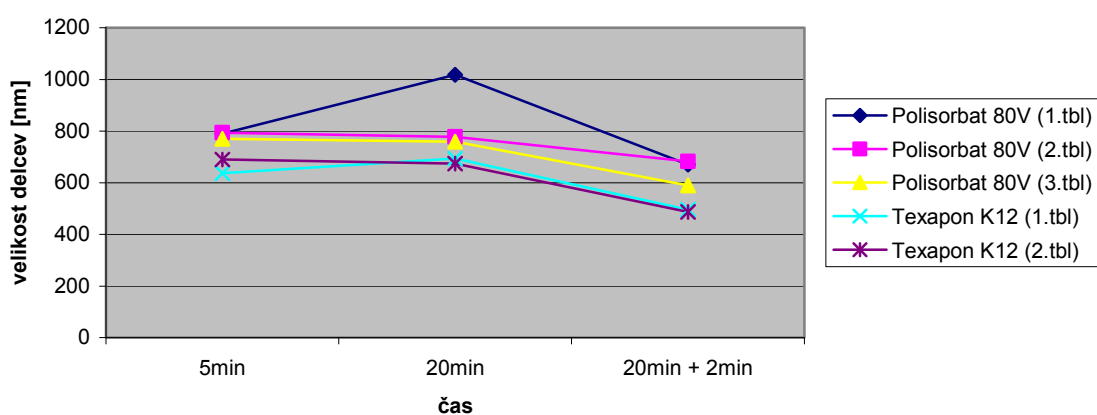
Pri raztapljanju placebo tablet smo se odločili, da bomo velikost delcev določali po 5 min, 20 min mešanja in po dodatnih 2 min izpostavitvi ultrazvoku. Najdaljši čas, 20 minut, smo postavili glede na čas, v katerem so se vse tablete raztopile. Pri raztapljanju nekaterih tablet z nanosuspenzijo pa se je zgodilo, da se tableta ni raztopila v določenem času, zato smo ga podaljšali za 5 minut.

Povprečna velikost delcev v nanosuspenziji pred tabletiranjem, je bila pri Polisorbatu 504,2 nm in pri Texaponu 198,1 nm.

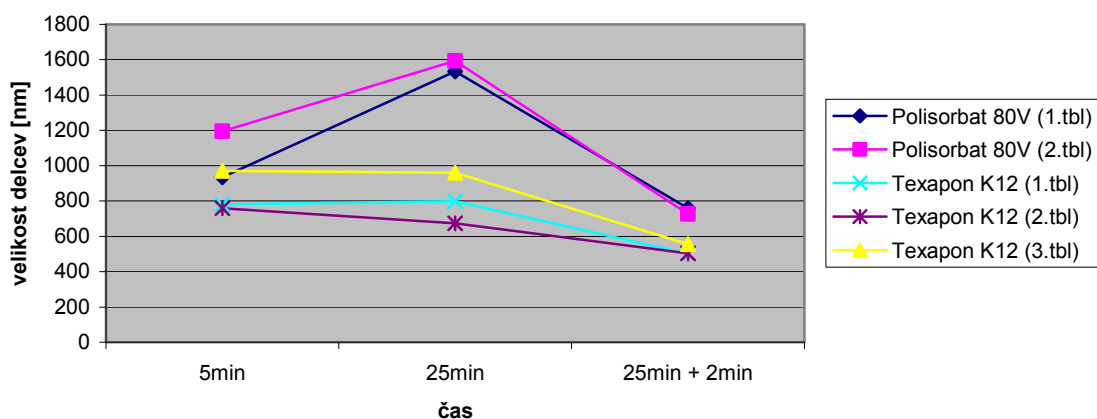
Raztapljanje tablet z Laktozo, sušeno z razprševanjem

Iz tablet z Laktozo, sušeno z razprševanjem je v 10 sekundah nastala kepa, ki je erodirala. Tablete niso razpadle v manjše delce, ki bi se potem raztopili.

Pri raztapljanju tablet z nizko trdnostjo (Slika 30) smo opazili zelo majhno odstopanje v velikosti delcev tako pri Polisorbatu 80V kot pri Texaponu K12. Pri prvi tableti s Polisorbatom 80V imamo pri 20 min vrednost, ki precej odstopa. Sklepamo lahko, da je prišlo do nastanka agregatov, ki pa smo jih z ultrazvokom razbili. Nizka sila stiskanja v tem primeru ne povzroči nastanka agregatov nanodelcev.



Slika 30: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Laktozo, sušeno z razprševanjem



Slika 31: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Laktozo, sušeno z razprševanjem

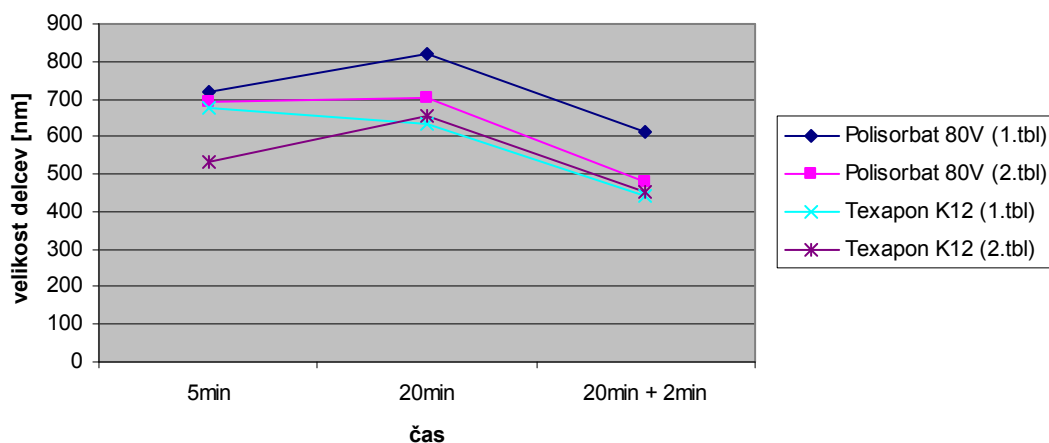
Pri raztapljanju tablet z visoko trdnostjo (Slika 31) smo opazili nekoliko večje razlike v velikosti delcev med obema vzorcema, kljub temu pa je bilo znotraj vzorca opaziti manj odstopanj. Pri uporabi stabilizatorja Texapon K12 smo dobili delce povprečne velikosti okrog 500 nm, pri Polisorbatu 80V pa okrog 700 nm. Opazno je bilo povečano nastajanje agregatov nanodelcev v primeru stabilizatorja Polisorbat 80V v primerjavi s stabilizatorjem Texapon K12. V obeh primerih pa lahko rečemo, da povišana sila stiskanja poveča nastajanje aglomeratov nanokristalov.

Ne glede na uporabljen stabilizator smo pri Laktozi, sušeni z razprševanjem dobili delce večjih velikosti, kot smo jih vgradili. Razlog je tudi v nastajanju aglomeratov.

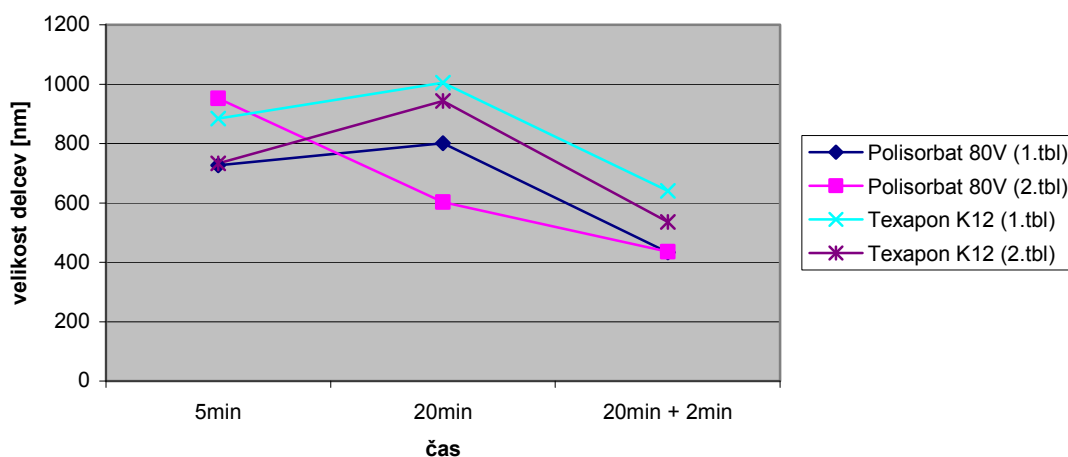
Raztapljanje tablet z Laktozo 200 mesh

Raztapljanje tablet z Laktozo 200 mesh je bilo podobno kot pri raztapljanju tablet z Laktozo, sušeno z razprševanjem. Gre za laktozo, ki se nahaja v dveh različnih oblikah.

Pri raztapljanju tablet z Laktozo 200 mesh je bila ponovljivost meritev slabša (Slika 32, Slika 33). Za razliko od Laktoze, sušene z razprševanjem je sila stiskanja manj vplivala na nastanek aglomeratov. Na splošno gledano je bilo nastajanje aglomeratov manjše in neodvisno od uporabljenega stabilizatorja. Pri tabletah s Polisorbatom smo dobili delce podobnih velikosti, kot smo jih vgradili. Razlog za boljše dispergiranje je verjetno v manjših delcih laktoze, ki se umestijo med nanokristale in tako preprečijo njihovo agregacijo.



Slika 32: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Laktozo 200 mesh

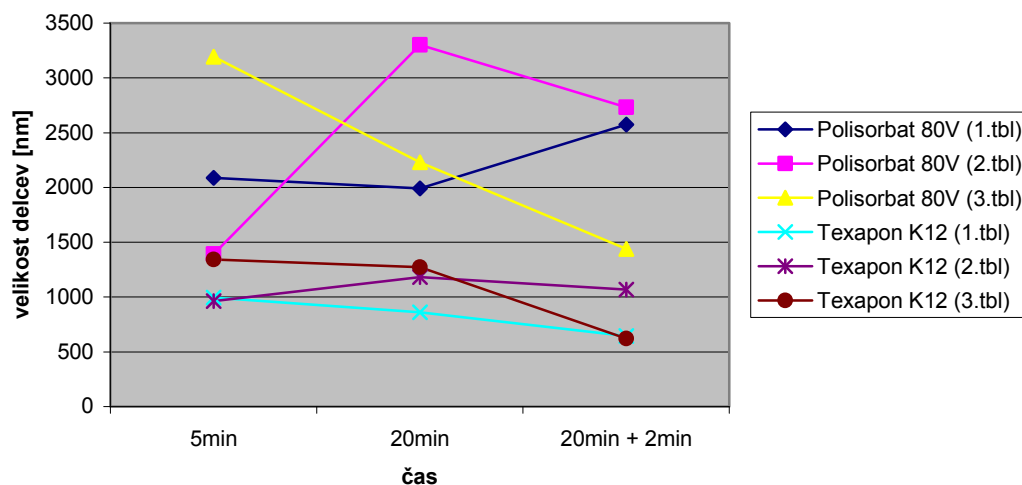


Slika 33: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Laktozo 200 mesh

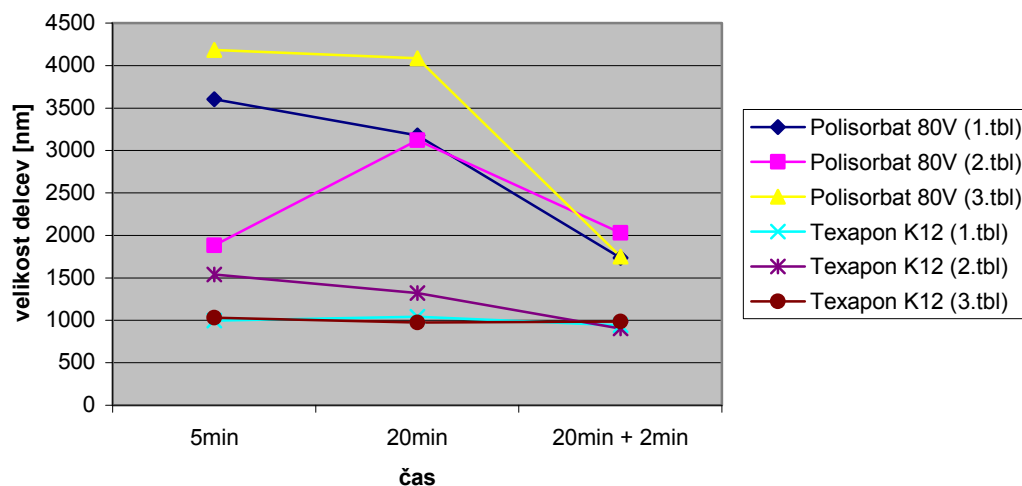
Raztapljanje tablet s Saharozo

Tablete s Saharozo z nizko trdnostjo pri raztapljanju so razpadli v manjše delce, ki so se raztopili. Tablete z visoko trdnostjo pa niso razpadle, ampak so erodirale in se dokončno raztopile v 7 minutah.

Pri raztapljanju tablet z nanosuspencijo Polisorbat 80V in Saharoze smo pri obeh trdnostih (Slika 34, Slika 35) dobili večje velikosti delcev, kot smo jih vgradili v tablete. Tudi ponovljivost določitve ni bila dobra. Tudi pri Texaponu K12 smo zasledili prisotnost večjih delcev, kot pa smo jih prvotno vgradili v tablete. Ponovljivost določitve velikosti delcev tudi pri Texaponu K12 ni bila zadovoljiva, predvsem pri tabletah z nizko trdnostjo, medtem ko pri tabletah z visoko trdnostjo ni bilo tako velikih odstopanj. Sklepamo lahko, da je saharoza manj primerno polnilo za izdelavo tablet iz nanosuspencij. Vzrok za nastanek aglomeratov je najverjetneje v preveliki omočenosti saharoze in posledično njeni nesposobnosti preprečitve aglomeracije nanokristalov.



Slika 34: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspencijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Saharozo

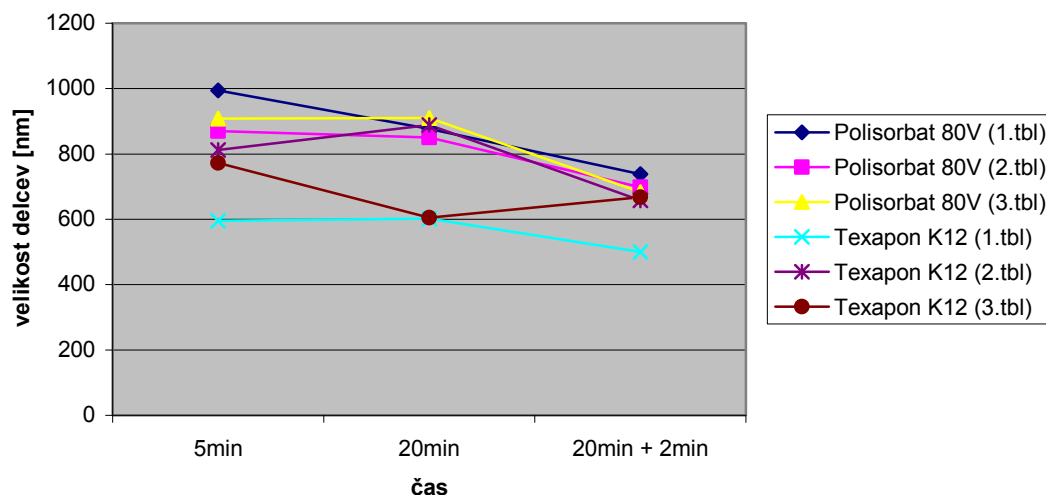


Slika 35: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspencijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Saharozo

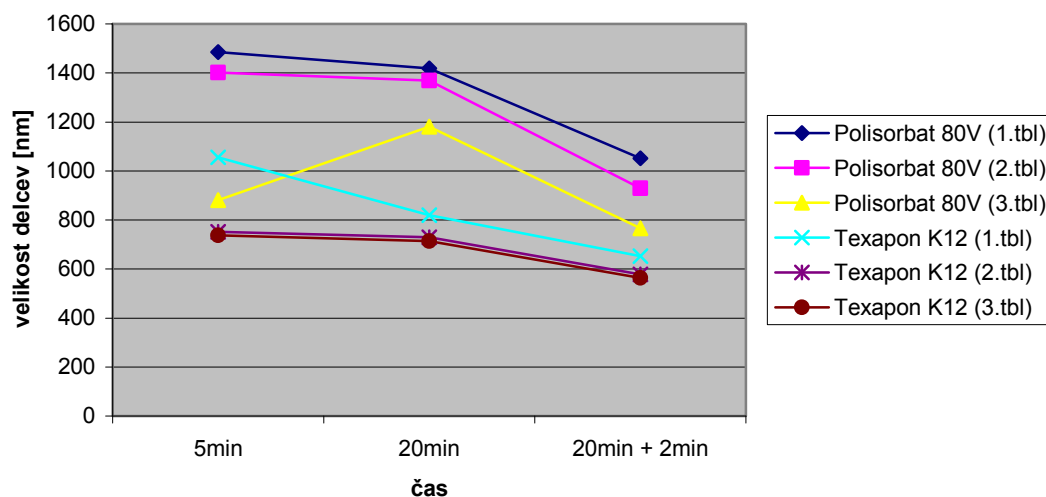
Raztapljanje tablet izdelanih iz Glukoze

Tablete z Glukozo so zelo hitro razpadle. Nastali so manjši delci, ki so se po 3 minutah raztopili.

Pri raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z Glukozo smo dobili pri obeh nanosuspencijah precej podobno velikost delcev in sicer okrog 700 nm. Izstopala je le ena meritev, ki je imela precej nižjo velikost delcev (Slika 36). Pri tabletah z visoko trdnostjo pa smo imeli več odstopanja v velikosti delcev vsaj pri Polisorbatu 80V, pri Texaponu K12 pa smo opazili lepo ponovljivost določitve velikosti delcev pri drugi in tretji tableti (Slika 37). Večja sila stiskanja je povzročila večji nastanek aglomeratov, ker je Polisorbat bolj občutljiv kot Texapon, in smo tako dobili pri njem večje velikosti delcev. Izmerjena velikost delcev je bila večja od vgrajene velikosti.



Slika 36: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspencijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Glukozo



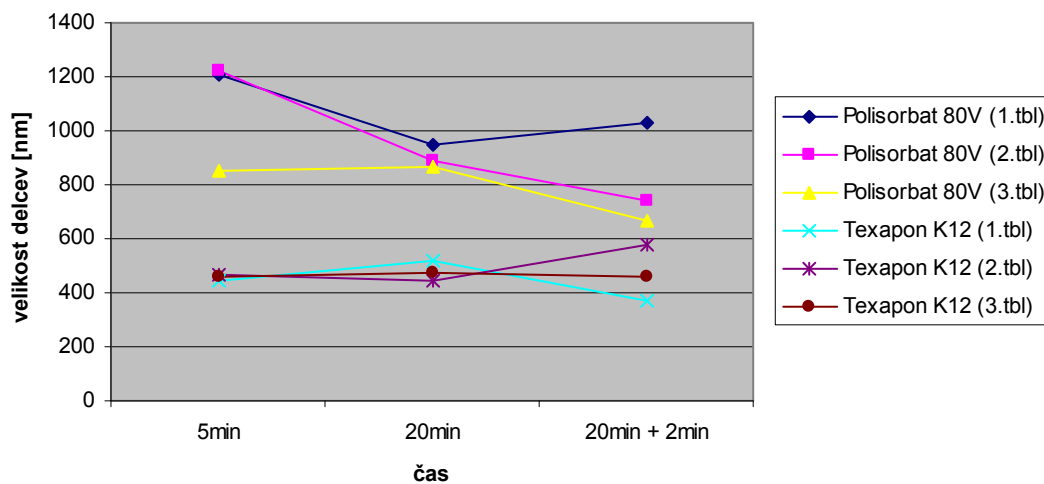
Slika 37: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspencijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Glukozo

Raztapljanje tablet z Manitolom

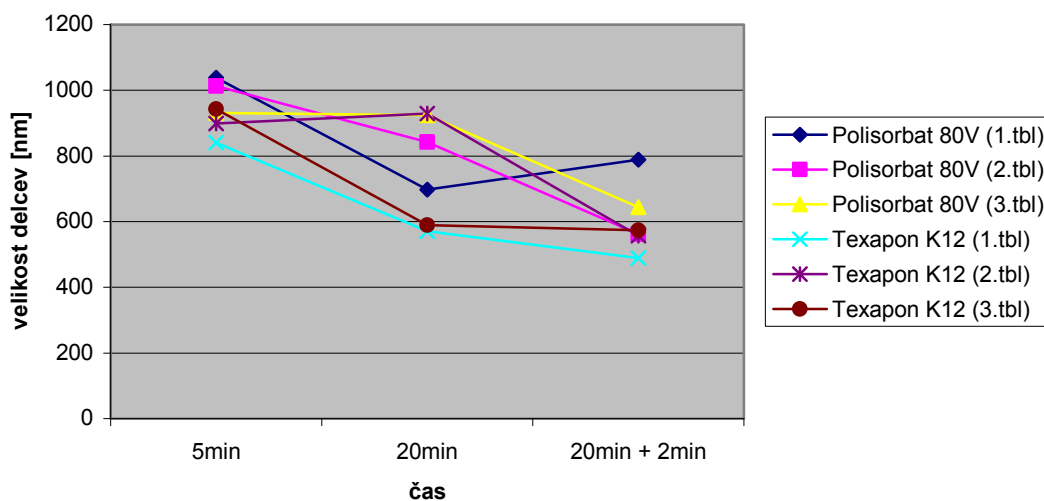
Tablete z Manitolom so v vodi erodirale, dokler se niso dokončno raztopile. Tablete z nizko trdnostjo so se raztopile v 30 sekundah, tablete z visoko trdnostjo pa v 7 minutah.

Povprečna velikost delcev, ki smo jo dobili pri raztapljanju tablet iz Polisorbata 80V je bila okrog 800 nm in pri Texaponu K12 okrog 450 nm (Slika 38, Slika 39). V obeh primerih je

bila večja od vgrajene velikosti delcev. Na velikost delcev je vplivala sila stiskanja, saj so pri večjih silah nastali večji aglomerati. Pri tabletah z nizko trdnostjo iz Texapona pa smo opazili, da ne prihaja do nastanka aglomeratov. Boljšo ponovljivost meritev pa smo dobili pri raztapljanju tablet iz Texapona K12.



Slika 38: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Manitolom

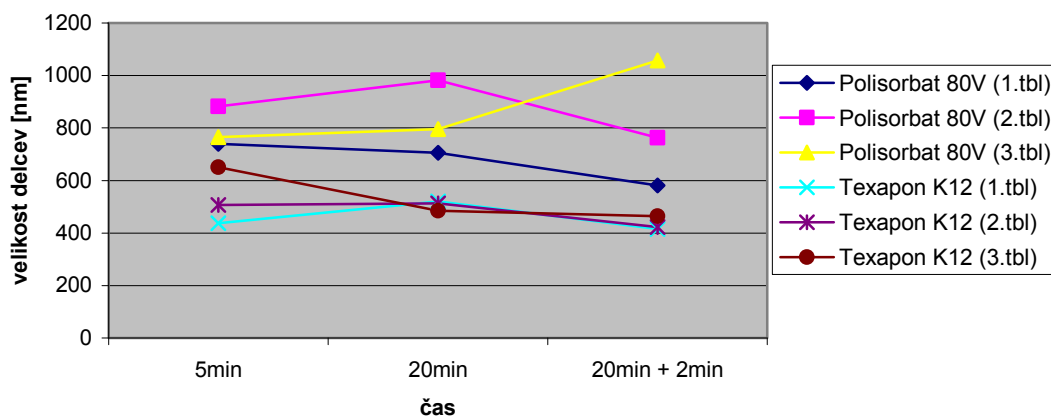


Slika 39: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Manitolom

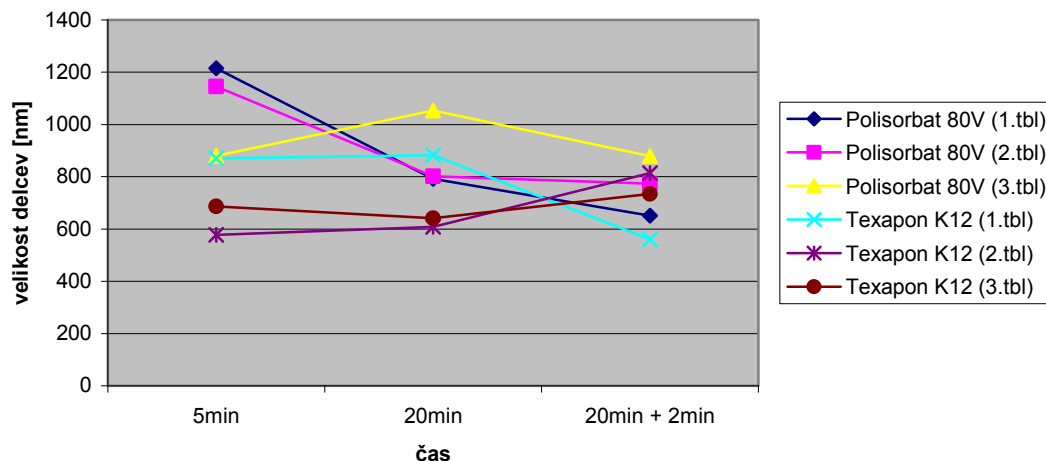
Raztapljanje tablet s Pearlitom 400DC

Tablete z nizko trdnostjo s Pearlitom 400DC so zelo hitro razpadle, dokončno pa so se raztopile v 1 minuti. Tablete z visoko trdnostjo pa so se raztopile približno v 10 minutah.

Pri raztapljanju tablet z nizko trdnostjo smo opazili večja odstopanja v velikosti delcev pri tabletah izdelanih iz Polisorbata 80V kot pa iz Texapona K12 (Slika 40). Enako lahko rečemo tudi za tablete z visoko trdnostjo, kjer pa so končne vrednosti pri Texaponu K12 bile večje, kot v primerjavi s tabletami z nizko trdnostjo (Slika 41). Tako lahko sklepamo, da je višja sila stiskanja povečala nastanek aglomeratov. Pri vseh tabletah s Pearlitom 400DC pa so bili delci večji od vgrajene velikosti zaradi nastajanja aglomeratov.



Slika 40: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo izdelanih iz nanosuspenzije Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Pearlitom 400DC

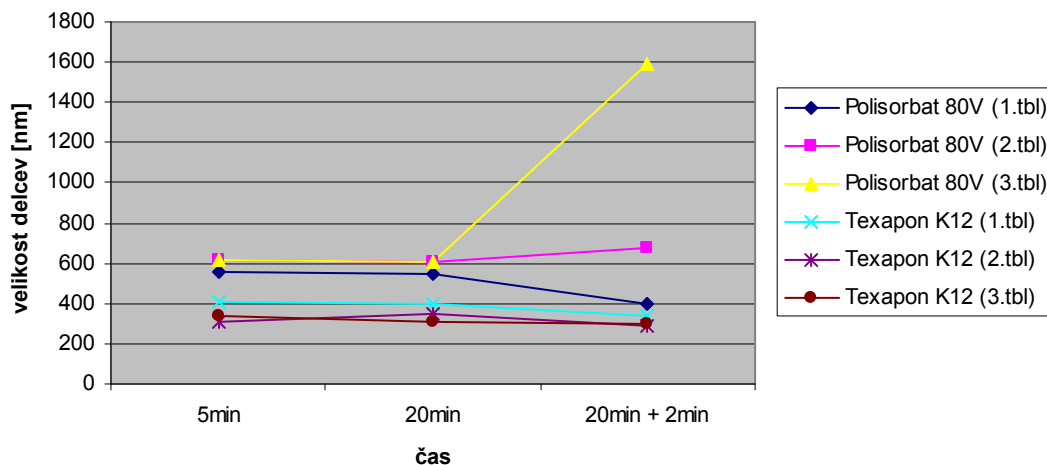


Slika 41: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo izdelanih iz nanosuspenzije Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Pearlitolom 400DC

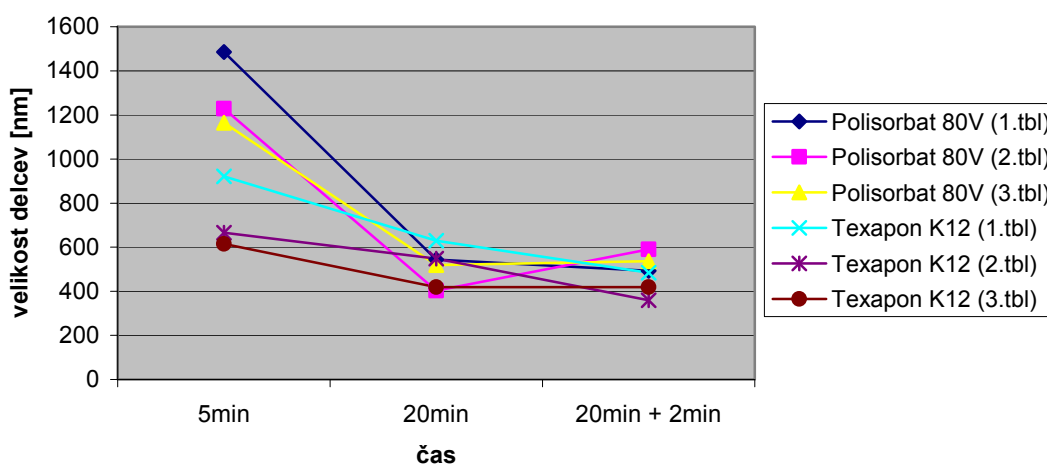
Raztapljanje tablet s PEG 4000

Od vseh tablet so se ravno tablete z visoko trdnostjo s PEG 4000 najpočasneje raztapljale in sicer 17 minut, zato smo tudi najdaljši čas za vse tablete vzeli 20 minut. V tem času so se omenjene tablete dokončno raztopile. Tablete z nizko trdnostjo pa so se raztopile v 3 minutah.

Pri nizkih silah stiskanja ni prišlo do aglomeracije, pri velikih pa je bil opazen močan vpliv sile stiskanja na nastanek aglomeratov. Pri raztapljanju tablet s Texaponom K12 in PEG 4000 smo dobili najmanjše velikosti delcev, okrog 300 nm. Tudi povprečne velikosti delcev pri vzorcih izdelanih iz Polisorbata 80V so se gibale v nižjih območjih, okrog 600 nm. S stališča ponovljivosti meritev pa so bile te bolj ponovljive pri vzorcih iz Texapona K12 (Slika 42, Slika 43). Prav pri tabletah izdelanih iz PEG 4000 smo dobili najmanjše velikosti delcev, ki pa so bile zelo blizu velikosti vgrajenih delcev.



Slika 42: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in PEG 4000



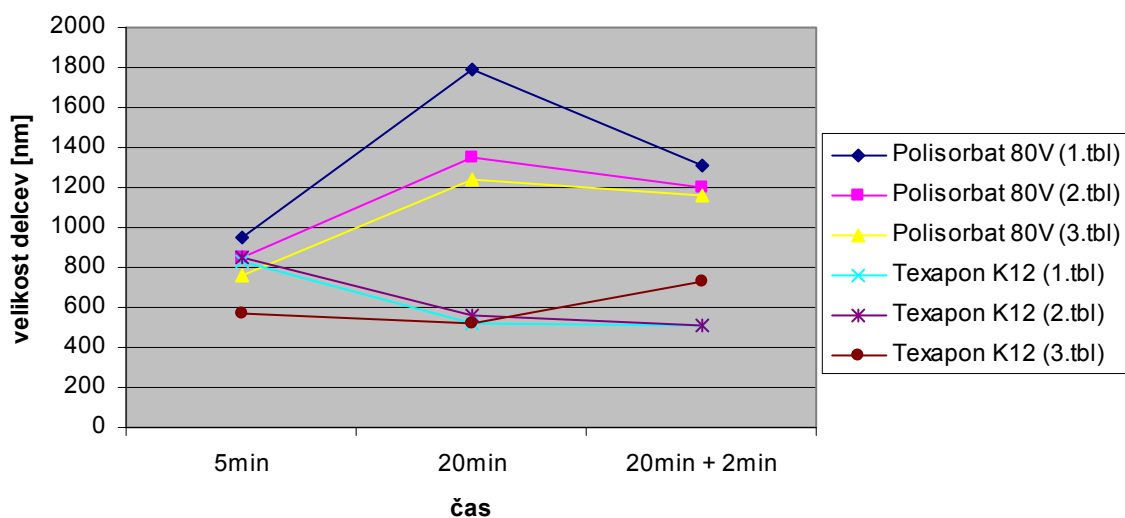
Slika 43: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in PEG 4000

Raztapljanje tablet z Ludipressom

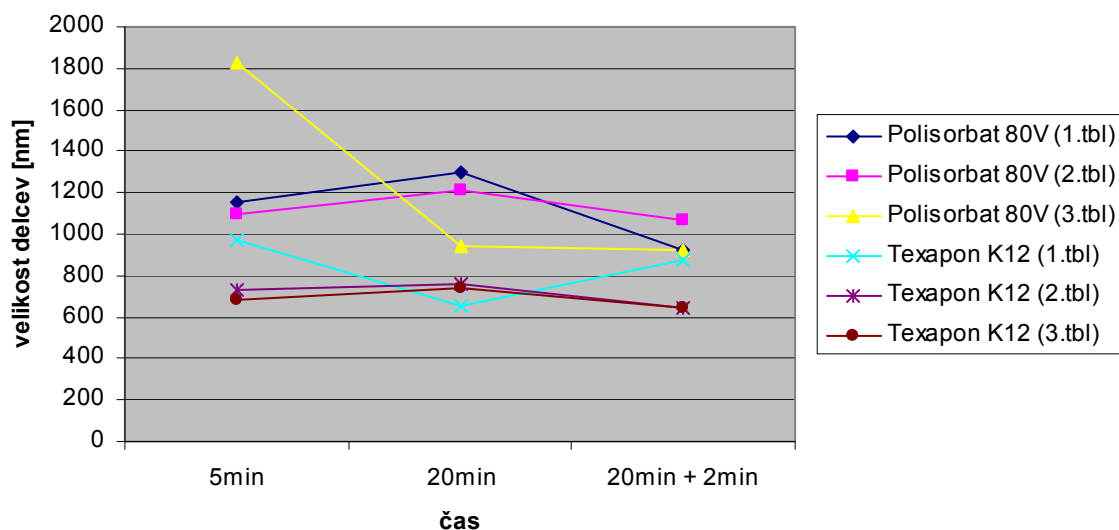
Pri raztapljanju tablet z Ludipressom je nastala nabrekla kepa, ki je erodirala. Tablete z nizko trdnostjo so se raztopile v 8 minutah, tablete z visoko trdnostjo pa v 10 minutah. Kemijsko gledano je Ludipress laktoza z dodanim vezivom (PVP) in razgrajevalom (cPVP), ki olajšajo tabletiranje. Premrežen PVP (cPVP) v vodi ni topen, zato smo ga videli

kot plavajoče delce v vodni raztopini. Po končanem mešanju so se delci posedli. Raztopino nad njimi smo uporabili za določitev velikosti delcev učinkovine.

Nizka sila stiskanja ni povzročila nastanek aglomeratov (Slika 44). Pri tabletah z visoko trdnostjo so nastali aglomerati, ki niso razpadli niti po obdelavi z ultrazvokom (Slika 45). Večji vpliv sile stiskanja na velikost delcev je bil bolj opazen pri tabletah izdelanih iz Polisorbata.



Slika 44: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z nizko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Ludipressom



Slika 45: Povprečna velikost delcev po raztapljanju tablet z visoko trdnostjo z nanosuspenzijo Polisorbat 80V ali Texapon K12 in Ludipressom

Preglednica XXVI: Povprečna velikost delcev pri raztapljanju tablet po 20 minutah

Pomožne snovi	Polisorbat ↓ trdnost	Polisorbat ↑ trdnost	Texapon ↓ trdnost	Texapon ↑ trdnost
	povprečna velikost delcev (nm)	povprečna velikost delcev (nm)	povprečna velikost delcev (nm)	povprečna velikost delcev (nm)
Vgrajena velikost	504,2	504,2	198,1	198,1
Laktoza s. z rozp.	851,6	1564	683,7	810,9
Laktoza mesh 200	763,6	701,8	642,9	974,2
Saharoza	2111	3149	1105,3	1113,3
Glukoza	879,1	1323	698,6	754,4
Manitol	900,2	821,5	475,9	696,6
Pearlitol 400DC	827,5	882,3	505,6	710,8
PEG 4000	587,6	488,8	351,2	532,5
Ludipress	1461,7	1149,2	531,8	718,7

Pri vseh tabletah smo opazili vpliv povečane sile stiskanja na nastanek aglomeratov, kar je posebej očitno, kadar smo kot stabilizator uporabili Texapon, pri uporabi Polisorbata kot stabilizatorja vpliv povečanja sile stiskanja ni bil tako izrazit. Večji aglomerati so nastajali pri tabletah s stabilizatorjem Polisorbat, upoštevati pa je potrebno, da je bila večja tudi izhodiščna velikost nanokristalov. Pri tabletah s PEG 4000 smo dobili velikosti delcev, ki so se najmanj razlikovale od začetne velikosti. Sklepamo lahko, da je izmed testiranih

pomožnih snovi PEG 4000 najbolj preprečil nastanek aglomeratov (Preglednica XXVI). Glede na začetne vrednosti velikosti nanokristalov lahko trdimo, da uporaba PEG 4000 kot pomožne snovi skoraj v celoti omogoči redispergiranje nanokristalov.

5 SKLEP

Slaba topnost zdravilnih učinkovin postaja in ostaja predmet raziskav številnih farmacevtskih tehnologov, saj nezadostna vodotopnost učinkovin omejuje zadostno biološko uporabnost. Razvoj novih farmacevtskih oblik za povečanje topnosti in biološke uporabnosti v vodi težko topnih učinkovin predstavlja velik izziv in omogoča domišljiji prosto pot pri iskanju rešitev.

Ugotovili smo, da je ustrezna izbira tlaka in števila homogenizacijskih ciklov, vrsta in koncentracija stabilizatorja ter tudi lastnosti uporabljene učinkovine ključnega pomena za izdelavo nanosuspenzij s težko topno učinkovino. Izdelane nanosuspenzije smo ovrednotili s fizikalnega in kemijskega stališča in dobili najustreznejše rezultate pri nanosuspenzijah izdelanih iz stabilizatorjev Polisorbat 80V in Texapon K12. Z vidika stabilnosti je najprimernejši stabilizator Polisorbat 80V, ki poleg tega, da omogoča izdelavo delcev nanometrskih velikosti, te tudi stabilizira skozi obdobje 3 mesecev pri hranjenju nanosuspenzij v hladilniku.

Nanosuspenzije iz stabilizatorjev Polisorbat 80V in Texapon K12 smo uporabili za izdelavo tablet. Tablete smo izdelali iz različnih pomožnih snovi. Pri raztapljanju tablet smo opazili vpliv povečane sile stiskanja na nastanek aglomeratov, zlasti pri Texaponu K12. Spremljali smo redisperzibilnost nanosuspenzij iz tablet, kjer so se kot najustreznejše izkazale tablete s PEG 4000, kjer smo dobili velikosti delcev, ki so se malo razlikovale od začetne velikosti nanokristalov.

6 LITERATURA

1. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J: Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2006; 312: 179-186
2. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm. Vestn.* 2008; 59: 263-268
3. Müller RH, Jacobs C, Kayser O: Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Del. Rev.* 2001; 47: 3-19
4. Saje V, Kristl J: Nanosuspenzije kot obetaven pristop za oblikovanje težko topnih zdravilnih učinkovin. *Farm. Vest.* 2001;52:145-152
5. Srčič S: Farmacevtska tehnologija za srednjo stopnjo, Didakta, Radovljica, 1997: 122-128
6. Martin A: *Physical pharmacy*, Williams & Wilkins, USA, Fourth Edition, 1993: 477-486
7. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Odon P: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *Int. J. Pharm.* 2009; 376: 204-212
8. Myers D: *Surfaces, interfaces and colloids*, Wiley-vch, New York, 1999: 221-250
9. Planinšek O: Nekatere metode za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin – 1.del. *Farm. Vest.* 2001; 52: 221-230
10. Jacobs C, Kayser O, Müller RH: Production and characterisation of mucoadhesive nanosuspension for the formulations of bupravaquone. *Int. J. Pharm.* 2001; 214: 3-7
11. Trotta M, Gallarate M, Pattarino F, Morel S: Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *J. of Controlled Rel.* 2001; 76: 119-128

12. Sarkari M, Brown J, Chen X, Swinnea S, Williams RO, Johnston KP: Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 2002; 243: 17-31
13. Kipp JE: The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2004; 284: 109-122
14. Keck CM, Müller RH: Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *European J. Pharm. and Biopharm.* 2006; 62: 3-16
15. Aulton ME: *Pharmaceutics The science of dosage form design*. Churchill Livingstone, London, 1988: 564-580
16. Podlogar F, Gašperlin M: Izbor metod za določevanje fizikalnih lastnosti koloidnih sistemov v farmaciji. *Farm. Vest.* 2003; 54: 47-56
17. Hosaka S, Morimoto T, Kuroda K, Kunitomo H, Hiroki T, Kitsukawa T, Miwa S, Yanagimoto H, Murayama K: Proposal for new atomic force microscopy (AFM) imaging for a high aspect structure (digital probing mode AFM). *Microelectronic Engineering* 2001; 57-58: 651-657
18. Vaje iz Instrumentalne farmacevtske analize. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 77-81
19. Krause KP, Müller RH: Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization. *Int. J. Pharm.* 2001; 214: 21-24
20. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2006; 535-747
21. *European Pharmacopoeia*, 6th Edition, Council of Europe, Strasburg, 2007
22. Williams RO, Sykora MA, Mahaguna V: Method to Recover a Lipophilic Drug From Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix Tablets, *AAPS, PharmaSciTech.* 2001; 2(2): article 8
23. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2006; 231-453

24. The Merk Index, 13th Edition, MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, NJ, USA, 2001
25. Malvern Instruments Ltd: Zetasizer Nano Series User Manual MANO317 Issue 4.0, United Kingdom, May 2008; 2-4
26. Van Eerdenbrugh B, Van den Mooterand G, Augustijns P: Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products Int. J. Pharm. 2008; 364: 64.75
27. Wilson B, Kumar Samanta M, Santhi K, Sampath Kumar KP, Paramakrishnan K, Suresh K: Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles European J. Pharm and Biopharm. 2008; 70: 75-84
28. Lee J. et al.: Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion European J. of Pharm. Sciences 2005; 24: 441-449
29. Ford JL, Mitchell K, Sawh D, Ramdour S, J. Armstrong DJ, Elliott PNC, Rostron C, Hogan JE: Hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing propranolol hydrochloride and sodium dodecyl sulphate Int. J. Pharm. 1991; 71: 213-221
30. Aldén M, Tegenfeldt J, Sjökvist E: Structure of solid dispersions in the system polyethylene glycol-griseofulvin with additions of sodium dodecyl sulphate Int. J. Pharm. 1982; 83: 47-52