

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA FONDA

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA FONDA

**PROUČEVANJE REDISPERZIBILNOSTI NANOSUSPENZIJE TEŽKO TOPNE
UČINKOVINE
STUDY OF REDISPERSIBILITY OF NANOSUSPENSION WITH POORLY
SOLUBLE DRUG**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala v Leku farmacevtski družbi d.d. v Razvojnem centru Slovenija, na področju Farmacevtska tehnologija, skupina Novi dostavni sistemi, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Mihe Homarja, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Kerču, mag. farm. za strokovno pomoč in somentorju dr. Mihi Homarju, mag. farm. za vse nasvete in usmeritve pri eksperimentalnem delu ter za potrpežljivost pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi Ani Miklavžin ter Aleksandri Komperšak za vso pomoč in dobro voljo pri delu v laboratoriju.

Zahvala gre tudi mojim staršem za spodbudo in hkrati tudi za finančno pomoč tekom mojega študija. Še posebej se zahvaljujem mami za izjemno podporo.

Hvala tudi Roku in vsem, ki so mi stali ob strani.

Izjava

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

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Lastnosti nanosuspenzij	1
1.1.1	Povečanje nasičene topnosti, hitrosti raztapljanja in bioadhezije.....	2
1.2	Izdelava nanosuspenzij	3
1.2.1	Precipitacijska metoda.....	4
1.2.2	Homogeniziranje pod visokim tlakom	4
1.2.3	Mletje v krogličnem mlinu	5
1.3	Določanje velikosti delcev v nanosuspenzijah	8
1.3.1	Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)	8
1.3.2	Laserska difrakcija (LD).....	9
1.4	Sušenje nanosuspenzij	9
1.4.1	Liofilizacija.....	10
1.4.2	Sušenje z razprševanjem.....	11
1.5	Vgradnja nanosuspenzij v trdne farmacevtske oblike	12
1.5.1	Izdelava tablet z nanosuspenzijo	12
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	Uporabljena učinkovina.....	15
3.2	Uporabljene pomožne snovi	15
3.3	Naprave za izdelavo in vrednotenje nanosuspenzij	17
3.4	Izdelava nanosuspenzij	18
3.5	Določanje velikosti delcev v nanosuspenziji	18
3.6	Sušenje nanosuspenzij	19
3.6.1	Sušenje nanosuspenzij s kopovidonom	19
3.6.2	Sušenje nanosuspenzij s HPC.....	19

3.7	Izdelava tablet	20
3.8	Redispergiranje posušenih nanosuspenzij in tablet.....	21
3.9	Obdelava podatkov	21
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1	Pregled literature	22
4.2	Priprava nanosuspenzij	26
4.3	Sušenje in redispergiranje nanosuspenzij s kopovidonom.....	29
4.4	Sušenje in redispergiranje nanosuspenzij s hidroksipropilcelulozo.....	31
4.4.1	Sušenje v sušilniku	31
4.4.2	Sušenje z liofilizacijo	35
4.4.3	Sušenje z razprševanjem.....	42
4.5	Izdelava in redispergiranje tablet.....	48
4.5.1	Izdelava in redispergiranje tablet z nanosuspenzijami, sušenimi v sušilniku	48
4.5.2	Izdelava in redispergiranje tablet z liofiliziranimi nanosuspenzijami	53
4.5.3	Izdelava in redispergiranje tablet z nanosuspenzijami, sušenimi z razprševanjem	61
4.6	Primerjava metod sušenja nanosuspenzij.....	68
4.6.1	Primerjava metod sušenja nanosuspenzij	68
4.6.2	Primerjava metod sušenja s tabletiranimi nanosupenzijami.....	70
4.7	Vpliv izdelave tablet na velikost delcev	73
4.7.1	Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec s saharozo	73
4.7.2	Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec z manitolom.....	74
4.7.3	Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec s saharozo (z dodano citronsko kislino in NaHCO_3)	75
5	SKLEP.....	77
6	LITERATURA.....	78

POVZETEK

Vse več na novo sintetiziranih učinkovin je slabo topnih v vodi. Učinkovit pristop za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja učinkovin je tvorba nanosuspenzij. To so koloidno disperzni sistemi delcev učinkovine nanometrskih velikosti (manj kot 1 μm) v tekočem mediju. Prednosti nanokristalov sta povečani hitrost raztapljanja in nasičena topnost, poleg tega pa imajo nanokristali tudi adhezivne lastnosti. Nanosuspenzije lahko izdelamo s precipitacijsko metodo, s homogenizacijo z visokim tlakom ali z mokrim mletjem v krogličnem mlinu. Zaradi boljše fizikalne stabilnosti je pogosto potrebno sušenje nanosuspenzij. Nanosuspenzije lahko liofiliziramo ali sušimo z razprševanjem, lahko pa jih tudi granuliramo ali izdelamo pelete. Posušene nanosuspenzije lahko vgradimo v trdne farmacevtske oblike, kot so kapsule in tablete, saj so v primerjavi s prahovi bolj prijazne bolniku.

Nanosuspenzijo s fenofibratom smo izdelali z mletjem v planetarnem krogličnem mlinu. Za pripravo nanosuspenzij smo uporabili tri različne stabilizatorje: hidroksipropilcelulozo, hidroksipropilmetilcelulozo in kopovidon. Nanosuspenzije smo posušili s sušenjem v sušilniku s pladnji, z liofilizacijo in s sušenjem z razprševanjem. Dodali smo jim različne pomožne snovi ter iz njih izdelali tablete. Ugotovili smo, da izbira stabilizatorja in dodatek pomožnih snovi pred sušenjem vplivata na velikost delcev v nanosuspenziji po redispergiranju. Najmanjše delce smo določili v nanosuspenzijah s hidroksipropilcelulozo ter z dodatkom saharoze in manitola. Dodatek pomožnih snovi po sušenju v večini primerov ni vplival na redisperzibilnost nanosuspenzije. Proučevali smo vpliv metode sušenja na velikost delcev v izbranih vzorcih, pri čemer smo najboljše rezultate dosegli z metodo sušenja z razprševanjem. Dobre rezultate smo dosegli tudi z liofilizacijo. Preverili smo tudi vpliv izdelave tablet na redisperzibilnost nanosuspenzije. Ugotovili smo, da se je velikost delcev statistično značilno povečala pri liofiliziranih vzorcih, pri vzorcih sušenih z razprševanjem ter v večini primerov v sušilniku sušenih vzorcev pa vpliv tabletiranja ni bil statistično značilen. Za izdelavo tablet sta najprimernejši nanosuspenziji z dodatkom saharoze in manitola, ki smo jih posušili z razprševanjem, saj smo po redispergiranju dobili delce, ki so statistično enako veliki kot delci v izhodni tekoči nanosuspenziji.

ABSTRACT

A growing number of newly synthesized drugs are poorly soluble in water. Effective approach for increasing the solubility and dissolution rate is the formation of nanosuspensions. These are colloidal dispersal systems of nanosized drug particles (less than 1 μm) in a liquid media. Main advantages of nanocrystals are increased dissolution rate and saturated solubility, as well as their adhesive properties. Nanosuspensions can be produced by precipitation method, high pressure homogenization or ball milling. Because of better physical stability it is often necessary to dry nanosuspensions. Nanosuspensions can be freeze-dried or spray dried, but may be also granulated or formulated into pellets. Dried nanosuspensions can be integrated into solid dosage forms such as capsules and tablets, as these formulations are more patient-friendly compared to the powders.

Nanosuspension with fenofibrate was prepared by grinding in a planetary ball mill. Three different stabilizers were used for the preparation of nanosuspensions: hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose and copovidone. Nanosuspensions were dried by drying in a tray-dryer, by freeze-drying and spray drying. Different excipients were added and compressed into tablets. We tested influence of various excipients on compression and redispersibility of dry nanosuspension. The choice of stabilizer and excipient added prior to drying affect the particle size in nanosuspension after redispersion. The smallest particles were determined in nanosuspensions with hydroxypropylcellulose and the addition of sucrose and mannitol. In most cases addition of excipients after drying did not affect the nanosuspension redispersibility. The effect of drying method on particle size in selected samples was studied. The best results were achieved by spray drying method. Good results were also obtained by freeze-drying method. The influence of compression on nanosuspension redispersibility was also analyzed. The particle size significantly increased in the freeze-dried samples after compression. In the spray-dried samples and in most cases in the tray-dryer dried samples the impact of compression was not statistically significant. The most appropriate method for the production of tablets is spray drying of nanosuspensions with the addition of sucrose and mannitol.

SEZNAM OKRAJŠAV

BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutical Classification System)
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe (Dynamic Light Scattering)
HDL	lipoprotein z visoko gostoto (High Density Lipoprotein)
HPC	hidroksipropilceluloza
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
LD	laserska difrakcija (Laser Diffraction)
MCC	mikrokristalna celuloza
NaCMC	natrijeva karboksimetilceluloza
NS	nanosuspenzija
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (Photon Correlation Spectroscopy)
PDI	polidisperzni indeks
PEG	polietilenglikol
PPAR α	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)
PVP	polivinilpirolidon
rpm	obrati na minuto (Revolution Per Minute)
SLS	natrijev lavrilsulfat
TPGS	D- α -tokoferol polietilenglikol 1000 sukcinat
VLDL	lipoprotein z zelo nizko gostoto (Very-Low-Density Lipoprotein)

1 UVOD

Vedno več na novo sintetiziranih učinkovin je slabo topnih v vodi. Za slabo topne učinkovine je veljalo, da je njihova vgradnja v farmacevtske oblike otežena, problem pa se pojavlja pri zagotavljanju učinkovitosti zaradi majhne biološke uporabnosti.

Da bi povečali topnost in hitrost raztapljanja učinkovin, ki po BCS klasifikaciji spadajo v razred II (slabo topne in dobro permeabilne učinkovine) in razred IV (slabo topne in slabo permeabilne učinkovine), so raziskovalci razvili kar nekaj metod. Najpogosteje dodajajo učinkovinam razna sotopila ali pa sintetizirajo učinkovino v obliki soli ali estrov (predzdravila). Ostale metode, ki se uporabljajo, pa so: tvorba trdnih disperzij, emulzij in mikroemulzij, kompleksiranje s ciklodekstrini ter tvorba liposomov (1). Uporaba velikih količin pomožnih snovi ali organskih topil je v farmacevtskih oblikah zaradi njihove potencialne toksičnosti omejena, zato so potrebni drugi pristopi, ki bi povečali hitrost raztapljanja učinkovine (2).

Z mikronizacijo učinkovine lahko povečamo hitrost raztapljanja, saj z zmanjšanjem velikosti delcev povečamo površino in zmanjšamo difuzijsko razdaljo. Mikronizacija pomeni pretvorbo grobe praškaste zmesi v zmes prahov z velikostjo delcev 2-5 mikrometrov, čeprav po navadi porazdelitev velikosti delcev obsega vrednosti od 0,1 do 25 mikrometrov, delež delcev, manjših od 0,1 mikrometra, pa je zelo majhen. Kljub povečanju hitrosti raztapljanja pa z mikronizacijo pogosto ne moremo doseči večje biološke uporabnosti, saj nasičena topnost učinkovine ostaja enaka (3). V zadnjih desetih letih se je izjemno povečalo število znanstvenih člankov na področju izdelave nanokristalov. Za razliko od mikronizacije lahko z nanokristali učinkovine dosežemo tudi povečanje nasičene topnosti (1).

1.1 Lastnosti nanosuspenzij

Nanosuspenzije so koloidno disperzni sistemi delcev učinkovine nanometrskih velikosti (manj kot 1 μm) v tekočem mediju. Navadno so stabilizirane s površinsko aktivnimi snovmi, polimeri ali mešanico obeh. V nanosuspenzijah je dispergirana velika količina učinkovine (do 40 %) v relativno majhnem volumnu tekočine. Uporabljajo se lahko kot

končna farmacevtska oblika ali pa kot vmesna stopnja pri izdelavi trdnih farmacevtskih oblik, kot so kapsule ali tablete (2).

Poleg visoke vsebnosti učinkovine, majhne količine pomožnih snovi in nizkih stroškov izdelave imajo nanosuspenzije tudi naslednje prednosti:

- Povečajo hitrost raztapljanja
- Povečajo nasičeno topnost
- Nanokristali imajo adhezivne lastnosti

Zaradi teh lastnosti lahko povečamo biološko uporabnost in zmanjšamo vpliv hrane pri peroralni uporabi ter lažje prilagodimo režim uporabe in odmere (5).

1.1.1 Povečanje nasičene topnosti, hitrosti raztapljanja in bioadhezije

Topnost je po definiciji maksimalna koncentracija topljenca, ki v nekem volumnu topila daje nasičeno homogeno molekularno disperzijo. Odvisna je od fizikalno-kemijskih lastnosti topljenca in topila ter od temperature (6). Velikost delcev ne vpliva na povečanje topnosti, če so delci večji od 1 mikrometra. Pod to vrednostjo, še posebno pod 0,1 mikrometrom pa pride do povečanja tlaka raztapljanja zaradi zelo velike ukrivljenosti površine, posledično pa tudi do povečane topnosti. Ta pojav opisujeta Ostwald-Freundlichova in Kelvinova enačba (7). Kelvinova enačba (enačba 1) opisuje parni tlak na meji med ukrivljeno površino tekočine (kapljice) in plinom. Isto enačbo lahko uporabimo tudi za opis prehoda molekul iz nanokristala (trda faza) v raztopino (tekoča faza). V tem primeru parni tlak zamenjamo s tlakom raztapljanja.

Kelvinova enačba:

$$\ln \frac{c_1}{c_2} = \frac{\gamma_{sl} \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{enačba 1}$$

c_1 in c_2	topnost delcev s polmerom r_1 in r_2 v vodnem mediju [g/ml]
γ_{sl}	medfazna napetost [N/m]
V_m	molarni volumen [L/mol]
R	splošna plinska konstanta [J/(mol·K)]
T	absolutna temperatura [K]

Posledica povečane topnosti je povečanje hitrosti raztapljanja. Opišemo jo lahko z Noyes-Whitneyevo enačbo (enačba 2). Poleg povečane topnosti vplivata na večjo hitrost

raztapljanja tudi manjša difuzijska razdalja in večja površina delcev. Z zmanjšanjem velikosti delcev lahko torej povečamo površino, ki je v stiku s topilom in tako povečamo hitrost raztapljanja.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D}{h} \cdot \frac{A}{V} (c_s - c) \quad \text{enačba 2}$$

c_s	topnost učinkovine [mol/l]
c	raztopljena učinkovina v času t [mol/l]
h	debelina difuzijske plasti [cm]
V	prostornina [l]
A	površina delcev [cm ²]
D	difuzijski koeficient učinkovine [cm ² /s]

Osnova za Noyes-Whitneyevo enačbo je 1. Fickov zakon, ki pravi, da je hitrost raztapljanja trdnega delca odvisna od difuzijskega koeficienta, od površine raztapljajoče se snovi in od koncentracijskega gradienta, ki se vzpostavi na določeni razdalji (6).

Prednost nanonizirane učinkovine v primerjavi z večjimi delci je tudi sposobnost bioadhezije. Adhezivne lastnosti lahko v vsakdanjem življenju opazimo pri mletem sladkorju, ki se zadrži na pecivu, ko ga potresemo po njem. V nasprotju z mletim sladkorjem bo kristalni sladkor s peciva zdrsel. Zaradi večje stične površine se lahko nanokristali prilepijo na steno prebavnega trakta, kar poveča čas zadrževanja v tankem črevesu in želodcu. Učinkovina je več časa na voljo za absorpcijo, posledično pride do zvečanja biološke uporabnosti. Sposobnost bioadhezije pa ni vedno dobrodošla, saj lahko agresivne učinkovine na mestu adhezije povzročijo razjede (5).

1.2 Izdelava nanosuspenzij

Metode izdelave nanosuspenzij lahko razdelimo v dve skupini. Prve so tako imenovane »bottom up« oziroma precipitacijske metode, pri katerih učinkovino raztopimo v nekem organskem topilu, nato pa raztopino učinkovine dodajamo netopilu. Delci se zaradi prisotnosti netopila oborijo v obliki nanokristalov. Druge metode so »top down« metode,

kjer večje trdne delce razbijemo do nanometrskih velikosti. Najpogostejši metodi sta visokotlačna homogenizacija in mokro mletje v krogličnem mlinu (8).

1.2.1 Precipitacijska metoda

Pri precipitacijski metodi učinkovino raztopimo v organskem topilu, kot sta aceton in tetrahidrofuran, da nastane nasičena raztopina. To raztopino dodajamo netopilu, ki se meša s topilom. Učinkovina v netopilu ni topna, zato se obori. Kot netopilo se največkrat uporablja voda, ki vsebuje stabilizatorje, kot so hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), polivinilpirolidon, Tween 80, Poloxamer 188 ali lecitin. Pogosto se uporablja tudi več stabilizatorjev hkrati, ki zavirajo prekomerno rast kristalov in njihovo agregacijo. Zelo pomemben je tudi način mešanja, s katerim zagotavljamo enakomerno velikost kristalov in ustrezno velike delce. S to metodo lahko dobimo tudi amorfne delce (9).

Prednost te metode je, da v primerjavi s »top down« metodami ne potrebujemo drage opreme, vendar pa precipitacije ne moremo uporabiti za vse učinkovine. Ta metoda ni primerna za učinkovine, ki so netopne tako v vodi kot v organskem topilu, saj mora biti učinkovina topna vsaj v enem topilu, ki se meša z netopilom. Slabosti te metode so tudi ostanek organskih topil, lahko pa pride tudi do Ostwaldove rasti (10).

V zadnjem času so številne izboljšave precipitacijske metode omogočile izdelavo visokokakovostnih nanodelcev. V industriji se uporabljajo metode, pri katerih se med mešanjem ustvarja turbulenten tok in velike strižne sile, kar povzroči obarjanje nanokristalov z ozko porazdelitvijo velikosti delcev. Raziskujejo tudi uporabo neorganskih topil. Učinkovino raztopimo v bazičnem topilu, ki ga nato dodajamo topilu s kislim pH. Sprememba pH povzroči obarjanje učinkovine. Ta metoda je primerna le za učinkovine, katerih topnost je odvisna od pH medija (9). Obstajajo tudi kombinirane metode, in sicer precipitacija s sledečo homogenizacijo. S homogenizacijo preprečimo rast nanokristalov ter zagotovimo dolgoročno stabilnost nanosuspenzij (11).

1.2.2 Homogeniziranje pod visokim tlakom

Visokotlačna homogenizacija se pogosto uporablja za izdelavo nanosuspenzij v industrijskem merilu. Poznamo dva načina homogenizacije: mikrofluidizacijo in homogenizacijo z batnimi homogenizatorji (piston-gap homogenization).

Pri mikrofluidizaciji dosežemo zmanjšanje delcev s čelnim trčenjem dveh curkov suspenzij pod tlakom do 1700 barov v homogenizacijski komori »Z tipa« ali »Y tipa«. Delci se

zmanjšajo zaradi trkov med delci ter strižnih in kavitacijskih sil. Da dosežemo primerno velikost delcev, moramo pogosto ponoviti homogeniziranje v več ciklih (50-100) (8).

Pri homogenizaciji z batnimi homogenizatorji potiskamo suspenzijo iz cilindra s premerom 3 cm skozi režo s premerom 25 mikrometrov pod visokim tlakom (1500-2000 barov). Zaradi majhnega premera homogenizacijske reže se poveča hitrost toka suspenzije. V skladu z Bernoullijevo enačbo se dinamični tlak poveča, zmanjša pa se statični tlak. Statični tlak se v reži zniža pod parni tlak vode, kar povzroči zavretje vode. Ko suspenzija pride iz reže na območje normalnega zračnega tlaka, nastali mehurčki pare implodirajo, kar imenujemo kavitacija. Sila kavitacije, strižna napetost v reži in trki med delci povzročijo drobljenje mikrodcelcev v nanodelce. Tudi pri tej metodi moramo izvesti več ciklov homogenizacije. Število ciklov je odvisno od trdote učinkovine, od zelene povprečne velikosti delcev in od zelene homogenosti nanosuspenzije. Prednosti te metode sta majhen delež mikrodcelcev ter možnost uporabe v proizvodnji (12). Raziskovalci so razvili dva načina izvedbe homogenizacije z batnimi homogenizatorji. Pri tehnologiji Dissocubes® učinkovino dispergirajo v raztopini stabilizatorja. Tehnologija Nanopure® kot disperzni medij za učinkovino uporablja nevodne disperzne medije (olja, tekoče PEG) ali disperzne medije z zmanjšano vsebnostjo vode (mešanice glicerola in vode oziroma etanola in vode). Pri tej izvedbi homogenizacije zaradi nizke vsebnosti vode v disperznem mediju med procesom ne pride do kavitacije, vendar se velikost delcev vseeno zadovoljivo zmanjša zaradi strižnih sil, trkov med delci in turbulentnega toka (8).

1.2.3 Mletje v krogličnem mlinu

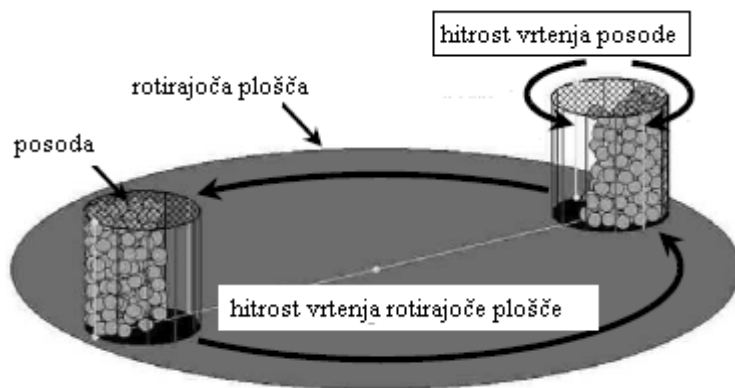
Učinkovine lahko meljemo na dva načina: suho mletje v zračnem toku in mokro mletje v krogličnem mlinu. Z mletjem v zračnem toku dobimo delce mikrometrskih velikosti (0,5 do 30 μm). Zelo majhen delež delcev je manjših od 1 μm , posledično imamo nizek izkoristek, pojavijo pa se tudi tehnične težave v proizvodnem merilu (12).

Z mokrim mletjem v krogličnem mlinu izdelujemo nanosuspenzije. Poznamo več vrst krogličnih mlinov, kot na primer planetarni kroglični mlin ali mešajoči kroglični mlin. Suspenzijo pripravimo iz vode oziroma pufra, stabilizatorja in učinkovine. Posodo za mletje napolnimo s pripravljeno suspenzijo in kroglicami. Če je potrebno, lahko suspenziji dodamo tudi razne soli ali sladkorje. Kroglice so lahko iz cirkonijskega oksida, stekla, nerjavečega jekla ali iz premrežene polistirenske smole, velike pa so lahko od 0,5-1 mm (13). Med mletjem pride do trkov in trenja med kroglicami, pri tem pa nastanejo dovolj

velike sile, da se delci zdrobijo do nanometrskih velikosti (14). Učinek mletja je odvisen od naslednjih dejavnikov: od materiala in velikosti kroglic, deleža kroglic in suspenzije v posodi za mletje, hitrosti in časa mletja, pa tudi od učinkovine in izbranega stabilizatorja (12). Manjše kroglice bolj učinkovito zmanjšajo velikost delcev kot večje zaradi večjega števila trkov med kroglicami. Če imamo večje delce učinkovine, z majhnimi kroglicami ne moremo bistveno zmanjšati velikosti delcev, ampak moramo najprej uporabiti večje kroglice. Čas mletja je zelo različen, odvisen je od trdnosti učinkovine, količine suspenzije in kroglic, želene velikosti delcev ter od tipa mlina. Večinoma se mletje izvaja od nekaj ur pa do nekaj dni, pri mletju z novejšimi mlini pa je čas mletja zmanjšan na nekaj minut. Želena velikost nanokristalov lahko dobimo pri nizkih hitrostih vrtenja (80-90 rpm) in dolgi časi mletja (1-5 dni), lahko pa hitrost vrtenja povišamo na 1800-4800 rpm ter s tem čas mletja skrajšamo na 30-60 min. Daljši časi mletja niso priporočljivi, saj lahko pride do erozije materialov in kontaminacije vzorca, pojavijo se problemi s stabilnostjo vzorca, povečajo pa se tudi stroški izdelave nanosuspenzije (13).

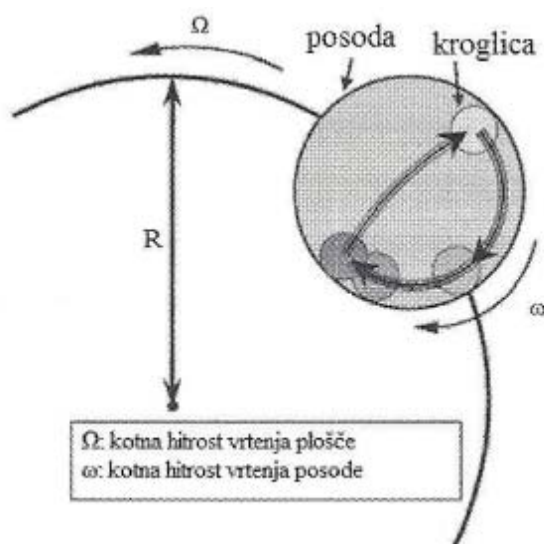
Med mletjem pride v posodi za mletje do dveh nasprotnih procesov: drobljenje materiala na manjše delce in rast delcev zaradi medsebojnih trkov. Pojavnost teh dveh nasprotnih procesov je odvisna od procesnih parametrov. Po določenem času delci dosežejo določeno velikost, z nadaljnjim mletjem se velikost delcev ne manjša več. V nekaterih primerih lahko z daljšim časom mletja dosežemo celo povečanje velikosti delcev in večjo heterogenost vzorca. Med mletjem lahko zaradi velikih sil pride do nastanka amorfnih predelov v kristalu ali popolna pretvorba delca v amorfn obliko. Amorfn predeli povečajo površinsko energijo sistema, kar se lahko kaže kot fizikalna in kemijska nestabilnost izdelane nanosuspenzije (13).

Planetarni kroglični mlin je sestavljen iz rotirajoče plošče, ki se vrti okoli svoje osi, na katero je nameščena posoda za mletje s kroglicami in suspenzijo. Posoda za mletje se prav tako vrti okoli svoje osi (15). Na sliki 1 je prikazana shema planetarnega krogličnega mlina.



Slika 1: Shematski prikaz vrtenja rotirajoče plošče in posode v planetarnem krogličnem mlinu

Pri mletju moramo paziti na hitrost vrtenja posode. Pomembno je, da meljemo pri hitrosti, ki je precej nižja od kritične hitrosti (približno 50 % kritične hitrosti). Kritična hitrost je definirana kot hitrost rotacijske posode za mletje, pri kateri pride do efekta centrifugalne sile. Kroglice in vzorec se zaradi centrifugalne sile prilepijo na steno posode, kar povzroči prenehanje drobilnega učinka (12). Na sliki 2 je prikazano gibanje kroglic v posodi za mletje.



Slika 2: Prikaz gibanja kroglic v posodi za mletje

Z zmanjševanjem velikosti delcev se poveča njihova površina. To povzroči termodinamsko nestabilnost nanokristalov, ki se začno združevati in na tak način manjšajo površinsko energijo (4). Da bi preprečili rast kristalov v nanosuspenziji, dodajamo stabilizatorje.

Učinkovit stabilizator mora biti sposoben močenja površine delcev ter tvoriti sterično ali elektrostatično oviro, ki preprečuje združevanje delcev (14). Stabilizator se adsorbira na površino delca z ionskimi interakcijami, vodikovimi vezmi, van der Waalsovimi vezmi, s hidrofobnimi interakcijami ali z ion-dipol interakcijami (4). Fizikalno stabilne nanosuspenzije dobimo, če je razmerje med učinkovino in stabilizatorjem med 20:1 in 2:1. Če je stabilizatorja premalo, pride do aglomeracije ali agregacije delcev, če ga je preveč, pa pride do Ostwaldove rasti delcev. Pogosto lahko kombiniramo ionski in neionski stabilizator ter na tak način zagotovimo ustrezno stabilizacijo nanosuspenzije (14). V literaturi lahko zasledimo naslednje najbolj uporabljenje neionske stabilizatorje: blok kopolimeri (Poloksameri), polisorbati (Tween 80®), derivati celuloze (hidroksipropilceluloza (HPC) in hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)) ter polivinil pirolidoni. Med ionskimi stabilizatorji se največ uporablja natrijev lavrilsulfat (4).

Prednost mletja v planetarnem krogličnem mlinu je možnost izdelave nanosuspenzij z učinkovinami, ki so slabo topne tako v vodnem kot v nevodnem mediju. Dodatne prednosti so tudi možnost prenosa tehnologije iz laboratorija v proizvodnjo ter majhne razlike v velikosti delcev med serijami. Slabost te metode je možna obraba kroglic in s tem kontaminacija vzorca. Da preprečimo kontaminacijo, morajo biti kroglice izdelane iz zelo vzdržljivih materialov (13). Med slabosti lahko prištevamo tudi dolge čase mletja (tudi več dni), kar predstavlja težavo predvsem v proizvodnji (14).

1.3 Določanje velikosti delcev v nanosuspenzijah

Velikost in porazdelitev velikosti delcev sta ključna parametra za določanje fizikalne stabilnosti nanosuspenzij. Poznamo številne metode za določanje velikosti delcev in njihove porazdelitve, med drugimi tudi fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS), znano tudi kot dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS) in lasersko difrakcijo (LD). Metodi se med seboj razlikujeta po principu merjenja, po načinu priprave vzorca ter po potrebni količini vzorca (16).

1.3.1 Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)

Za določanje velikosti in porazdelitve velikosti delcev v tekočem mediju se pogosto uporablja fotonska korelacijska spektroskopija ali dinamično sipanje laserske svetlobe

(DLS) (16). Metoda se uporablja za določanje povprečnega premera in porazdelitve delcev nanometrskih velikosti. Metoda je primerna za merjenje delcev med 3 nm in 3 μm . Delci, katerih velikost spada v ta interval, izkazujejo v disperznem mediju Brownovo gibanje zaradi trkov z molekulami topila. To povzroča nihanja v jakosti sipanja svetlobe. Ker je to gibanje naključno, je zgornja meja velikosti delcev, ki jih še lahko merimo s to metodo, omejena s sedimentacijo delcev. Sedimentacija delcev je odvisna od velikosti delcev in od razlike v gostoti delcev in disperznega medija. Pri merjenju je pomembna tudi konstantna temperatura, saj se s spremembo temperature spreminjajo tudi hitrost gibanja delcev, gostota in viskoznost medija. Rezultati metode so podani kot povprečna velikost delcev in kot širina porazdelitve. Merilo za določanje širine porazdelitve je polidisperzni indeks (PDI). PDI lahko zavzema vrednosti med 0 in 1 (12). Če je PDI med 0,1 in 0,25, ima vzorec ozko porazdelitev velikosti delcev. PDI večji od 0,5 kaže na široko porazdelitev velikosti delcev v vzorcu (16). Prednosti te metode so: enostavna priprava vzorca, natančno, zanesljivo, ponovljivo in hitro merjenje, majhen volumen vzorca, učinkovitost in avtomatiziranost (17). Med slabosti PCS metode pa lahko štejemo ozko območje merjenja (3 nm do 3 μm) ter da z njo ne moremo meriti velikosti delcev v suhih prahovih, potrebno pa je tudi redčenje vzorca (16).

1.3.2 Laserska difrakcija (LD)

Pogosto se skupaj s PCS uporablja tudi laserska difrakcija. Njeno območje detekcije sega od 20 nm do 2000 μm , z njo pa lahko določamo velikost delcev tako v nanosuspenzijah kot tudi v suhih prahovih. Metoda temelji na sipanju laserske svetlobe, ko le-ta zadene delce. Pomen te metode je pri določanju delcev večjih od 5 μm , ki ne smejo biti prisotni v farmacevtskih oblikah za parenteralno aplikacijo (16).

1.4 Sušenje nanosuspenzij

Zaradi fizikalne stabilnosti nanosuspenzij, pa tudi zaradi večje sprejemljivosti za paciente, je potrebno sušenje nanosuspenzij ter vgradnja v trdne farmacevtske oblike. Nanosuspenzije lahko liofiliziramo ali sušimo z razprševanjem, lahko pa jih tudi granuliramo ali formuliramo pelete (16).

1.4.1 Liofilizacija

Liofilizacija je proces sušenja, pri katerem vzorec v tekočem stanju najprej zamrznemo, nato sledi odstranitev vode iz vzorca najprej s sublimacijo, potem pa še z desorpcijo vode, do ustrezne količine, ki ne bo več omogočala rasti mikroorganizmov ali kemičnih reakcij.

Proces liofilizacije je sestavljen iz treh posameznih stopenj:

- Zamrzovanje raztopine: v tej stopnji imobiliziramo učinkovino in pomožne snovi. Struktura ostane po zamrznitvi fiksna. Na začetku pride do podhladitve raztopine do temperature, pri kateri nastopita nukleacija in kristalizacija ledu. V idealni strukturi zamrznjene pogače tvorijo ledeni kristali kanale, po katerih bo med primarnim sušenjem voda sublimirala iz pogače. Struktura zamrznjene pogače je odvisna od hitrosti ohlajanja raztopine, stopnje podhladitve raztopine in koncentracije topljencev v raztopini.
- Proces primarnega sušenja: cilj procesa je odstranitev vode iz zamrznjene raztopine s sublimacijo kristalov ledu. Pri sublimaciji snov prehaja iz trdnega v plinasto stanje pri temperaturi in tlaku, ki sta nižja kot temperatura in tlak v trojni točki v faznem diagramu. Hitrost sublimacije je odvisna od sestave in strukture zamrznjene pogače.
- Proces sekundarnega sušenja: ob koncu primarnega sušenja ostane v vzorcu približno 5-10 % vode (rezidualna prosta voda in vezana voda). Problem predstavlja rezidualna prosta voda, saj lahko zmanjša stabilnost vzorca. Pri sekundarnem sušenju gre torej za desorpcijo vode iz liofilizata, s katero se vsebnost rezidualne vode bistveno zmanjša.

V vzorec lahko pred liofilizacijo dodamo razne pomožne snovi (npr. manitol, PEG 6000), ki pomagajo tvoriti primerno strukturo pogače ter omogočajo hitro rekonstitucijo po dodatku vode.

Liofilizacijo izvajamo v liofilizatorju. Liofilizator je sestavljen iz: liofilizacijske komore, kondenzatorske komore in vakuumskega sistema. Metoda liofilizacije ima številne prednosti, kot so: ohranitev oblike vzorca, enostavna rekonstitucija vzorca, daljši rok uporabnosti in možnost natančnega odmerjanja. Med slabosti pa lahko štejemo dolgotrajnost samega procesa (24 ur in več), visoki stroški opreme in obratovanja ter nezmožnost kontinuirane proizvodnje (18).

1.4.2 Sušenje z razprševanjem

Princip te metode je razprševanje vzorca na majhne kapljice, ki se v toku toplega zraka posušijo in tvorijo majhne trdne delce. Vzorec razpršujemo v sušilno komoro, kapljice pa se posušijo, še preden trčijo ob steno komore (19). Proces sušenja z razprševanjem lahko razdelimo na 5 korakov:

- Priprava raztopine, suspenzije ali emulzije za razprševanje
- Atomizacija pripravljene raztopine ali suspenzije
- Stik kapljice s toplim zrakom v komori
- Odparevanje topila in sušenje delcev
- Separacija posušenega vzorca (20)

Končni rezultat sušenja z razprševanjem je odvisen od lastnosti snovi in od procesnih parametrov aparature za sušenje z razprševanjem. Pri procesu lahko spreminjamo naslednje parametre: velikost šobe, tlak v šobi, pretok tekočine, temperaturo vstopnega zraka in pretok vstopnega zraka. Velikost kapljic lahko nadziramo z velikostjo šobe, pretokom tekočine in tlakom v šobi. Z ožjo šobo, manjšim pretokom tekočine in večjim tlakom v šobi dobimo manjše delce. S temperaturo in pretokom vstopnega zraka lahko kontroliramo hitrost in učinkovitost sušenja. Večja ko sta temperatura in pretok, hitreje poteka sušenje (21).

Obstajajo različne izvedbe sušilnika z razprševanjem, vsi pa imajo šobo, ki razprši tekočino v drobne kapljice, ob stiku s toplim zrakom pa se le-te zelo hitro posušijo. Smer razprševanja je običajno od zgoraj navzdol. Posušeni delci se ločijo od toplega zraka v ciklonu. Ciklon je ozek stekleni del, ki se nadaljuje iz razprševalne komore, na koncu pa je zaključen s posodo za zbiranje vzorca (19).

Prednost te metode je, da omogoča kontinuirano sušenje in avtomatizacijo procesa, poleg tega pa je postopek sušenja zelo hiter in enostaven (20). Ena izmed slabosti metode je možna izguba vzorca v razprševalni komori. Če se delci ne posušijo pravilno, se prilepijo na steno razprševalne komore. Delce lahko tok zraka odnese tudi v filter, kar predstavlja dodatno izgubo vzorca (21).

1.5 Vgradnja nanosuspenzij v trdne farmacevtske oblike

Sušene nanosuspenzije lahko uporabimo v obliki prahu za rekonstitucijo ali kot orodisperzibilne tablete, ki smo jih izdelali z liofilizacijo. Lahko pa nanosuspenzije vgradimo v kapsule in tablete, saj so v primerjavi s prahovi bolj prijazne bolniku. Pomembno je, da se redisperzibilnost nanosuspenzij ohrani tudi po vgradnji v trdne farmacevtske oblike, saj bi se v nasprotnem primeru bistveno zmanjšala biološka uporabnost učinkovine. Da bi dosegli čim boljšo redisperzibilnost vgrajene nanosuspenzije, moramo zagotoviti dobro močenje in hitro razpadnost farmacevtske oblike ob stiku z disperznim medijem. V te namene se lahko že pred sušenjem dodajo razne snovi, kot so vodotopni sladkorji (1, 16).

1.5.1 Izdelava tablet z nanosuspenzijo

Po definiciji so tablete trdne farmacevtske oblike, ki vsebujejo enkratni odmerek ene ali več zdravilnih učinkovin. Običajno jih izdelamo tako, da enovito prostornino delcev stisnemo v tableto. Uporabljamo jih peroralno. Zmes prahov za tabletiranje je sestavljena iz ene ali več učinkovin s pomožnimi snovmi ali brez njih. Namen pomožnih snovi je na primer redčenje, razpadanje, drsenje in mazanje. Tablete so običajno pravilni, okrogli, trdni valji, katerih spodnja in zgornja površina je ravna ali izbočena, robova sta lahko prirezana. Lahko imajo razdelilne zareze ali druge oznake, lahko pa so tudi filmsko obložene (22). Tablete lahko izdelamo s tabletirko na udarec, ki je primernejša za manjše količine vzorca. V industriji se uporablja rotirka, s katero lahko izdelamo tudi do milijon tablet na uro. Proces stiskanja poteka v naslednjih korakih:

- Prerazporeditev delcev: ko zmes vsujemo v matrično vdolbino, se pri nizkem tlaku stiskanja delci prerazporedijo tako, da manjši delci zasedejo prazne prostore med večjimi, prisoten zrak se odstrani.
- Deformacija zaradi elastičnih sprememb: ko ob povečevanju tlaka nadaljnja prerazporeditev ni več mogoča, se delci elastično deformirajo, da se prilagodijo obremenitvi. To je reverzibilna sprememba. Če zmanjšamo tlak, se delci povrnejo v prvotno stanje.
- Plastična deformacija: delci se plastično deformirajo, ko s stiskanjem presežemo mejni tlak plastične deformacije. Pride do preurejanja molekul znotraj trdnih delcev snovi.

- Lom delcev oziroma fragmentacija: če sila stiskanja še naprej narašča, se začnejo delci lomiti (23).

Tablete so najbolj uporabljena farmacevtska oblika za peroralno uporabo zaradi številnih prednosti, kot so natančno odmerjanje, večja stabilnost, boljše sodelovanje bolnikov in možnost proizvodnje velikega števila tablet v kratkem času. Pri izdelavi tablet se lahko srečamo tudi z nekaterimi težavami, kot so variiranje mase in odmerka, premajhna trdnostjo tablet, razplastitvijo tablete in lepljenje vzorca na pečate. Da se izognem težavam pri tabletiranju, je potrebno izbrati ustrezne pomožne snovi ter procesne parametre (24).

Posušene nanosuspenzije imajo zaradi adhezivnih lastnosti nanokristalov slabše pretočne lastnosti, zato jih težko direktno tabletiramo, saj lahko pride do neenakomernosti mase in odmerka. Pomemben je dodatek polnil (npr. laktoza, mikrokristalna celuloza) in drsljivcev (magnezijev stearat, koloidni silicijev dioksid ali smukec), s katerimi izboljšamo pretočne lastnosti zmesi prahov. Boljše pretočne lastnosti lahko dosežemo z granuliranjem, saj so zrnca večja (25). V literaturi je opisan postopek suhega granuliranja nanosuspenzij, pri katerem delce združujemo z uporabo visokih tlakov brez uporabe tekočine za granuliranje (26).

2 NAMEN DELA

Z zmanjševanjem velikosti delcev težko topne učinkovine pod en mikrometer se povečata topnost in hitrost raztapljanja učinkovine. S tem se poveča tudi absorpcija učinkovine, kar omogoča doseganje terapevtskih plazemskih koncentracij. Poraja pa se vprašanje, če se nanokristali iz tekoče nanosuspenzije po sušenju in vgradnji v trdno farmacevtsko obliko ponovno redispergirajo na svojo prvotno velikost, ko se končna farmacevtska oblika prične raztapljati.

Namen diplomske naloge je ovrednotenje vpliva sestave in postopka izdelave končne farmacevtske oblike na redisperzibilnost nanokristalov težko topne učinkovine, vgrajenih v to farmacevtsko obliko. Najprej bomo pripravili suspenzije z modelno učinkovino fenofibratom in različnimi stabilizatorji (kopovidon, HPC, HPMC) in izdelali nanosuspenzije z mletjem v planetarnem krogličnem mlinu ter jim izmerili velikost in porazdelitev velikosti delcev z metodo fotonske korelacijske spektroskopije. Tekočim nanosuspenzijam z najmanjšo velikostjo nanokristalov bomo dodali različne pomožne snovi (saharozo, manitol, PEG 6000) ter jih posušili na pladnjih v sušilniku, z liofilizacijo in z metodo sušenja z razprševanjem. Suhe nanosuspenzije bomo redispergirali ter jim ponovno izmerili velikost in porazdelitev velikosti delcev. Suhim nanosuspenzijam bomo dodali tudi različne pomožne snovi (citronsko kislino, natrijev hidrogenkarbonat, laktozo), jih stisnili v tablete ter jih prav tako redispergirali in izmerili velikost delcev.

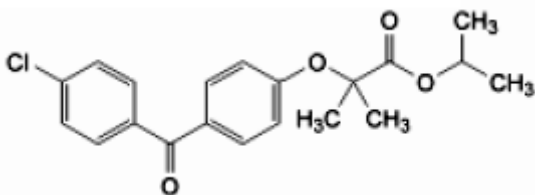
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Uporabljen učinkovina

Fenofibrat, Harman Finochem limited, India

Fenofibrat (slika 3) spada med fibrate, ki se uporabljajo za zdravljenje hiperlipidemij. Delovanje fenofibrata temelji na aktivaciji jedrnih receptorjev PPAR α , kar povzroči povečano sintezo lipoproteinske lipaze. Poveča se razgradnja s trigliceridi bogatih lipoproteinov, preko povečane oksidacije maščobnih kislin pa se zmanjša nastanek delcev VLDL. Zviša se tudi serumska koncentracija HDL (27).

Molekulska formula fenofibrata je $C_{20}H_{21}ClO_4$, molska masa pa 360,831 g/mol. Je bel prašek s slabimi pretočnimi lastnostmi in temperaturo tališča med 79°C in 82°C. Je slabo topen v vodi (0,29 mg/l pri 37°C) in zelo lipofilen (logP je 5,24) (28, 29, 30).



Slika 3: Fenofibrat (propan-2-il 2-{4-[(4-klorofenil)karbonil]fenoksi}-2-metilpropanoat)

3.2 Uporabljene pomožne snovi

Hidroksipropilceluloza (Klucel EF), Hercules, ZDA

Hidroksipropilceluloza (HPC) je polisaharid iz linearno povezanih D-glukoz z delno O-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami. Molska masa HPC je 60000-1200000 g/mol. Je bel, rumenkastobel ali sivkastobel zrnat ali vlaknat rahlo higroskopen prah brez vonja in okusa. Je dobro topen v vodi pri temperaturah pod 38°C. Uporablja se kot stabilizator, tvorilec gelov, zgoščevalo, za filmske obloge in vezivo v tabletah, za povečanje viskoznosti ter tvorilo ogrodja za podaljšano sproščanje iz tablet (31, 32).

Hidroksipropilmetilceluloza (Pharmacoat 603), Shin Etsu, Japonska

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) je polisaharid iz linearno povezanih D-glukoz z delno O-metiliranimi in O-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami. Je rumenkastobel ali sivkastobel zrnat ali vlaknat rahlo higroskopen prah brez vonja in okusa. Uporablja se kot stabilizator, suspendirajoče sredstvo, tvorilec gelov, za preprečevanje koalescence kapljic, agregacije delcev in nastanka sedimenta v emulzijah in suspenzijah (32).

Kopovidon (Kolidon VA 64), BASF, Nemčija

Kopovidon je kopolimer pirolidinpirolidona in vinilacetata v masnem razmerju 3:2 z molsko maso 45000-70000 g/mol. Je bel do rahlo rumenkast amorfen prah brez okusa in z rahlim vonjem. Uporablja se kot vezivo pri direktnem tabletiranju in pri vlažnem granuliranju ter v filmskih oblogah (31, 32).

Saharoza (beli mleti jedilni sladkor), Suedzucker AG, Nemčija

Saharoza je disaharid fruktoze in glukoze, ki sta povezani z 1,2- α,β glikozidno vezjo. Obstaja v obliki belega ali skoraj belega kristaliničnega prahu in v obliki brezbarvnih ali belih svetlečih monoklinskih kristalov. Je sladkega okusa in brez vonja. Saharoza se zelo pogosto uporablja v peroralnih farmacevtskih oblikah, in sicer kot korigens okusa, polnilo v tabletah in kapsulah, suspendirajoče sredstvo, zgoščevalo, za sladkorne obloge pelet in tablet ter suho vezivo (31, 32).

D-manitol, Sigma-Aldrich, ZDA

D-manitol je bel ali skoraj bel nehigroskopičen kristaliničen prah ali zrnca sladkega okusa in brez vonja. Uporablja se kot polnilo pri liofilizaciji, sladilo, polnilo za tablete in kapsule ter za direktno tabletiranje in granuliranje (31, 32).

Makrogol 6000, Clariant GMBH, Nemčija

Makrogol 6000 (PEG 6000) je polientilenglikol z molsko maso 7000-9000 g/mol. Je bela ali skoraj bela trdna snov z voskastim ali parafinskim videzom. Uporablja se v dražirnih prevlekah kot mehčalo, suspendirajoče sredstvo in za povečanje viskoznosti (31, 32).

Laktoza sušena z razprševanjem, DMV Fronterra excipients, Nizozemska

Laktoza sušena z razprševanjem je mešanica amorfne laktoze in laktoze monohidrata. Laktoza je disaharid iz glukoze in galaktoze, ki sta povezani z 1,4- β glikozidno vezjo. Je bel do umazano bel kristaliničen prah. Je brez vonja in rahlo sladkega okusa. Uporablja se kot polnilo in vezivo v tabletah ter za izboljšanje pretočnih lastnosti pri direktnem tabletiranju (31, 32).

Citronska kislina monohidrat, Merck, Nemčija

Citronska kislina monohidrat se nahaja v obliki brezbarvnih ortorombskih kristalov ali zrn ali kot bel kristaliničen prah brez vonja in z močno kislim okusom. Uporablja se kot sredstvo za uravnavanje kislosti, kelator, korigens okusa in za pripravo šumečih zrn in tablet (31, 32).

Natrijev hidrogenkarbonat, Merck, Nemčija

Natrijev hidrogenkarbonat obstaja v obliki belega kristaliničnega prahu brez vonja ter slanega in rahlo alkalnega okusa. Uporablja se kot sredstvo za povečanje bazičnosti ter za pripravo šumečih zrn in tablet (31).

Magnezijev stearat, Faci, Italija

Magnezijev stearat je droben, oborjen ali zmlet, bel ali svetlorumen prah, ki je masten na otip. Ima rahel vonj po stearinski kislini ter rahel, značilen okus. Hitro se prilepi na kožo. Uporablja se kot drsilo, mazivo in kot antiadheziv pri tabletah in kapsulah (32).

3.3 Naprave za izdelavo in vrednotenje nanosuspenzij

Zetasizer Nano ZS, Malvern, Nemčija

Analitska tehtnica XP 205, Mettler Toledo, Švica

Precizna tehtnica BP1200, Sartorius, Nemčija

Planetarni kroglični mlin PM100, Retsch, Nemčija

Sušilnik Mini Airpro, Procept, Belgija

Sušilnik SP-105-C, Kambič, Slovenija

Tabletirka EK-O, Korsch, Nemčija

Magnetno mešalo RT1S Power, Ika, Nemčija

Ultrazvočna kadička USC 600T, VWR, ZDA

Liofilizator Lio 5P LT, Kambič, Slovenija

Aparatura za merjenje trdnosti tablet HC97, Kraemer, Nemčija

3.4 Izdelava nanosuspenzij

Nanosuspenzije smo izdelali z mokrim mletjem v planetarnem krogljčnem mlinu. Uporabili smo naslednje stabilizatorje: HPC, HPMC in kopovidon.

Natehtali smo 2,46 g stabilizatorja (HPC, HPMC, kopovidon) in ga raztopili v 28,0 g vode. Med mešanjem z magnetnim mešalom smo dodali 12,80 g fenofibrata, homogeno premešali ter pustili stati 30 minut, da se je suspenzija odzračila. V enem primeru smo raztopili 4,0 g HPC v 36,0 g vode, nato pa smo med mešanjem dodali še 12,0 g fenofibrata. Pripravljeni suspenzijo smo natehtali v posodo za mletje. Sprva smo natehtali 25 g suspenzije, nato pa 12,5 g. Volumen posode za mletje je bil v obeh primerih 50 ml. V posodo za mletje smo natehtali tudi 100 g kroglic iz cirkonijevega oksida velikosti 0,6-0,8 mm. Posodo smo vstavili v mlin in mleli 3 ure (za suspenzije s HPC in HPMC kot stabilizatorjem) oziroma 30 min (za suspenzije s kopovidonom), vedno pri hitrosti vrtenja 500 rpm. Enega od vzorcev s HPC smo mleli 5 ur. Po mletju smo nanosuspenzijo ločili od kroglic s spiranjem z vodo (trikrat po 15 ml za 25 g nanosuspenzije in trikrat po 10 ml za 12,5 g suspenzije). Uporabili smo sito z velikostjo odprtnic 0,315 mm.

Mleli smo tudi v posodi z volumnom 250 ml. V tem primeru smo v posodo natehtali 25 g suspenzije in 200 g kroglic. Mleli smo 3 ure pri hitrosti vrtenja 500 rpm. Nanosuspenzijo smo ločili od kroglic s spiranjem s trikrat po 20 ml vode.

Nanosuspenzije z istim stabilizatorjem, ki so imele najmanjše velikosti delcev, smo združili.

3.5 Določanje velikosti delcev v nanosuspenziji

Velikost delcev v nanosuspenzijah smo določali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije z napravo Zetasizer Nano ZS. Eno kapljico nanosuspenzije smo kapnili v kiveto, v katero smo predhodno dali 1 ml vode, ter premešali. Uporabili smo polistirensko kiveto za enkratno uporabo. Kiveto smo vstavili v aparaturo ter v računalniškem programu nastavili parametre: izbrali smo ustrezno kiveto, kot topilo smo izbrali vodo ter nastavili

temperaturo meritev na 25°C. Aparatura je izmerila velikost delcev in polidisperzni indeks (PDI). Za vsak vzorec smo izvedli tri meritve ter izračunali povprečno velikost delcev ter povprečni PDI.

3.6 Sušenje nanosuspenzij

3.6.1 Sušenje nanosuspenzij s kopovidonom

Nanosuspenzije s kopovidonom smo sušili v sušilniku in z liofilizacijo. Pri metodi sušenja v sušilniku smo vlili 50 g nanosuspenzije na petrijevko ter jo dali v sušilnik. Sušili smo 24 ur pri temperaturi 40°C in 80% hitrosti ventilatorja. Suho nanosuspenzijo smo postrgali s petrijevk, jo zdrobili v pateni ter presegali skozi sito z velikostjo odprtín 0,355 mm. Za sušenje z liofilizacijo smo 50 g nanosuspenzije vlili v bučko ter jo potopili v tekoč dušik, da je nanosuspenzija zamrznila. Bučko smo nato pritrdili na liofilizator in sušili 24 ur pri temperaturi približno -100°C in tlaku približno 0 barov. Liofilizat smo postrgali iz bučke, ga strli v pateni in ga presegali skozi sito 0,355 mm.

3.6.2 Sušenje nanosuspenzij s HPC

Nanosuspenzije s HPC smo sušili na tri načine, in sicer v sušilniku, z liofilizacijo in z metodo sušenja z razprševanjem. Pri vseh treh metodah smo natehtali 18 g nanosuspenzije ter ji dodali 6 g pomožne snovi (saharozo, manitol ali PEG 6000) ter ročno premešali, da se je pomožna snov raztopila. Masno razmerje med nanosuspenzijo in pomožno snovjo je bilo 3:1. Sušili smo tudi samo nanosuspenzijo brez pomožnih snovi. Pri metodi liofilizacije in sušenja z razprševanjem smo poleg saharoze, manitola ali PEG 6000 dodali še natrijev hidrogenkarbonat, in sicer v razmerju nanosuspenzija z dodatkom oz. brez proti NaHCO_3 = 3:1. Dodali smo tudi ustrezno količino vode (približno 100 ml), da se je natrijev hidrogenkarbonat raztopil.

Pri metodi sušenja v sušilniku smo nanosuspenzijo (z dodatkom ali brez) vlili v petrijevko ter jo dali v sušilnik. Sušili smo pri temperaturi 40°C in 80% hitrosti ventilatorja. Po 24 urah so bile nanosuspenzije suhe, le nanosuspenzijo z dodatkom saharoze smo sušili 48 ur. Suhe nanosuspenzije smo postrgali s petrijevk, jih zdrobili v pateni ter presegali skozi sito z velikostjo odprtín 0,355 mm.

Pri metodi liofilizacije smo nanosuspenzije vlili v bučke ter jih potopili v tekoči dušik, da je nanosuspenzija popolnoma zamrznila. Nato smo jih pritrdili na liofilizator. Liofilizirali smo 24 ur pri temperaturi približno -100°C in tlaku približno 0 barov. Liofilizate smo postrgali iz bučk, jih strli v pateni in jih presejali skozi sito 0,355 mm.

Sušenje z razprševanjem smo izvajali na aparaturi AirPro (s ciklonom) pri naslednjih pogojih: pretok zraka = 0,8 m³/min, T vhodnega zraka = 55°C , hitrost razprševanja = 2,5 ml/min, tlak razprševanja = 2,5 bar, velikost šobe = 0,8 (oznaka šobe = 8), odprtost šobe = 3/6, globina šobe = 30 cm. Če smo opazili, da se je vzorec preveč lepil na steno sušilne komore, smo po potrebi hitrost razprševanja znižali na 2,0 ml/min. Posušene nanosuspenzije smo postrgali iz posode, v kateri so se delci med procesom zbirali.

3.7 Izdelava tablet

S posušenimi nanosuspenzijami smo izdelali tudi tablete. Uporabili smo tabletirko na udarec (ekscentrično tabletirko). Najprej smo izdelali tablete brez suhih dodatkov pomožnih snovi, nato pa smo suhim nanosuspenzijam dodali še citronsko kislino in natrijev hidrogenkarbonat (razmerje citronske kisline proti NaHCO₃ je 2:1, razmerje zmesi citronske kisline in NaHCO₃ proti suhi nanosuspenziji je 1:1) oziroma 200 mg laktoze sušene z razprševanjem. Citronsko kislino smo najprej strli v pateni ter jo presejali skozi sito 0,355, nato smo ji dodali NaHCO₃, premešali in ponovno presejali. Na koncu smo dodali še nanosuspenzijo, premešali ter spet presejali. Nanosuspenzijam, katerim smo že pred sušenjem dodali NaHCO₃, smo dodali samo zdrobljeno in presejano citronsko kislino v razmerju 2:1 ter zmes prav tako premešali in presejali.

Ker so bili vzorci brez pomožnih snovi, ki bi izboljšale pretočnost tabletne mase, pa tudi zaradi majhnega števila izdelanih tablet, smo tabletiranje izvedli ročno. Izbrali smo mase tablet, ki so ustrezale odmerku fenofibrata 160 mg. Uporabili smo okrogle ravne pečate. Za izdelavo tablet z maso 191 mg (vse nanosuspenzije brez dodatkov pred in po sušenju) smo uporabljali pečate s premerom 7 mm. Ko smo tabletirni masi dodali laktozo, smo uporabljali pečate premera 10 mm (mase tablet: 391 mg, 454 mg in 539 mg). Za izdelavo ostalih tablet smo uporabljali pečate premera 9 mm (mase tablet: 254 mg, 339 mg, 381 mg, 508 mg). Tabletirne mase, ki so vsebovale citronsko kislino in vse tiste, sušene z razprševanjem, so se lepile na pečate, zato smo pečate rahlo premazali z magnezijevim stearatom. Magnezijev stearat je antiadheziv, ki se ga pri izdelavi tablet dodaja v tabletirno maso.

Preprečuje lepljenje na pečate, pa tudi zmanjšuje trenje med tableto in matrico. V našem primeru smo z njim samo premazali pečate, saj bi v nasprotnem primeru zaradi svoje netopnosti motil določevanje velikosti delcev.

Tabletam smo izmerili tudi trdnost, ki se je z izjemami gibala med 50 N in 70 N.

3.8 Redispergiranje posušenih nanosuspenzij in tablet

Posušene nanosuspenzije in izdelane tablete smo poskusili redispergirati v vodi.

0,05 g suhe nanosuspenzije smo dispergirali v 20 ml vode. Pripravili smo dve paralelki. Po 5 min mešanja na magnetnem mešalu pri stopnji mešanja okoli 3 smo izmerili velikost delcev. Pri določanju velikosti delcev smo za vsako paralelko vedno izvedli dve meritvi. Nato smo vzorce za 15 min inkubirali v ultrazvočni kadički in ponovno izmerili velikosti delcev. Vzorce smo pustili, da so se na magnetnem mešalu mešali 24 ur, nato smo ponovno izmerili velikost delcev. Sledila je ponovna inkubacija vzorcev v ultrazvočni kadički za 15 min in še zadnja določitev velikosti delcev.

Tablete smo dispergirali po enakem postopku kot za posušene nanosuspenzije, le da smo tablete dispergirali v 100 ml vode in mešali pri stopnji med 3 in 4. Preden smo čašo s tableto v vodi postavili na mešalo, smo tudi optično preverili, kaj se s tableto dogaja (ali plava, razpada...).

3.9 Obdelava podatkov

Vse pridobljene podatke smo tudi statistično obdelali. Uporabili smo dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$. Enakost varianc smo predhodno preverili z F-testom. Kot ničelno hipotezo smo postavili, da se velikost delcev med vzorcema ne razlikuje. Za alternativno hipotezo pa velja, da se velikost delcev med dvema vzorcema razlikuje. Testirali smo vzorce, ki so pri isti metodi sušenja vsebovali različne, po sušenju dodane pomožne snovi. Primerjali smo tudi procese sušenja med seboj ter testirali netabletirane in tabletirane vzorce z enakimi pomožnimi snovmi.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Pregled literature

Najprej smo pregledali znanstveno literaturo, v kateri so opisali sušenje nanosuspenzij, pripravljenih z mokrim mletjem in visokotlačno homogenizacijo. Rezultate pregleda literature smo zbrali v preglednici I. Našli smo 12 relevantnih člankov. V 10 primerih so za izdelavo nanosuspenzij uporabili mokro mletje v krogličnem mlinu, v dveh primerih pa visokotlačno homogenizacijo. Sestava nanosuspenzij je bila zelo različna, največkrat so kot stabilizator uporabili PVP, SLS ter HPC. V enem primeru najdemo dodatek HPC v kombinaciji s fenofibratom kot učinkovino. Nanosuspenzijam so dodali razne pomožne snovi (saharozo, manitol, MCC, karagenan...) ter jih sušili z liofilizacijo oziroma s sušenjem z razprševanjem. V treh člankih so posušene nanosuspenzije tudi tabletirali. V večini primerov so izvajali teste raztapljanja, ki niso direktno primerljivi z našimi rezultati, en članek pa je opisoval ugotavljanje redisperzibilnosti na podoben način, kot smo ga izvajali v naših poskusih. V tem članku so kot učinkovine uporabili naproksen, itrakonazol, solfakon, cilostazol ter fenofibrat. Kot stabilizator so uporabili HPC. Suspencijo so pripravili tako, da so najprej HPC raztopili v vodi, nato pa so dodali še prahove učinkovin. Tako pripravljene suspencije so mleli v krogličnem mlinu 5 dni pri hitrosti vrtenja 125 rpm in sobni temperaturi. Povprečna velikost delcev v nanosuspenziji s fenofibratom je bila 160 nm, z naproksenom 100 nm, z itrakonazolom 110 nm, s solfakonom 320 nm ter s cilostazolom 200 nm. Nanosuspenzijam so dodali še raztopine karagenana (0,1-5 %), želatine (0,5-5 %) in alginske kisline (0,5-2 %) v razmerju 1:1. Nanosuspencije z dodatki so sušili v vakuumskem sušilniku pri sobni temperaturi 24 ur, v sušilniku pri temperaturi 40, 60 in 80°C 24 ur ter z liofilizacijo, ki je prav tako trajala 24 ur. 0,01 g posušene nanosuspencije so dispergirali v 10 ml vode ter takoj pomerili velikost delcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Karagenan se je izkazal kot najučinkovitejši stabilizator, saj je že v nizkih koncentracijah omogočal dobro redisperzibilnost nanosuspencij, delci so bili podobne velikosti kot pred sušenjem. Na splošno so potrebovali najmanjšo koncentracijo stabilizatorja za dobro redisperzibilnost nanosuspencij, ko so nanosuspencije sušili z liofilizacijo (37).

Preglednica I: Pregled primerov sušenja nanosuspenzij in pretvorba v tablete

Metoda sušenja	ZU	Metoda izdelave NS	Sestava NS	Sestava tablete	Rezultati	Literatura
Sušenje z razprševanjem, nato direktno tabletiranje	naproksen	Mokro mletje	Naproksen PVP	Naproksen (46,7 %) PVP (3,5 %) HPC (11,6 %) Laktoza (35,0 %) Mg-stearat (0,23 %) Filmska obloga z barvilom Opadry Light Orange (3,0 %)	Primerjava z zdravilom Aleve: Trdnost: med 10 in 13 kPa (Aleve 14,4 kPa) Razpadnost: 2 – 2,5 min (Aleve 26 min) <i>In vivo</i> študija pri psih s hrano in na tešče: čas do maks. Konc v plazmi je krajši, manjše so razlike v absorpciji, manjšr so razlike v absorpciji na tešče/ s hrano.	Liversidge et. al. (1998) (26)
Sušenje z razprševanjem, nato suho granuliranje in tabletiranje	naproksen	Mokro mletje	Naproksen HPC	Naproksen (65,8 %) HPC (6,6 %) Na CMC (14,8) – dodan pred granuliranjem Laktoza (12,3 %) Mg-stearat (0,49 %)	Primerjava z zdravilom Aleve: Trdnost: 6 kPa (Aleve 14,4 kPa) Razpadnost: 1,6 min (Aleve 26 min) Test raztapljanja, pH 6: 80 % v 7 min (Aleve 11 min)	Liversidge et. al. (1998) (26)
Sušenje z razprševanjem, nato direktno tabletiranje	celekoksib	Emulzijsko difuzijska metoda z visokotlačno homogenizacijo	Celekoksib PVP/SLS (etilacetat)	Celekoksib PVP/SLS MCC Mg-Stearat (2 %)	Trdnost: 70 kPa Test raztapljanja (metoda z veslom): pH 10, 1,0 % SDS v mediju: 78 % v 20 min pH 6,8, 0,5 % SDS v mediju: 60 % v 20 min	Dolenc et. al. (2009) (7)
Liofilizacija in sušenje z razprševanjem	9 učinkovin	Mokro mletje	9 različnih učinkovin D- α -tokoferol polietilenglikol 1000 sukcinat (TPGS)	/	Raztapljanje: mešanje v mikserju, nato določanje vsebnosti ZU v suspenziji Hitrost raztapljanja je bila podobna pri sušenju z razprševanjem in pri liofilizaciji.	Van Eerdenbrugh et. al. (2008) (33)
Liofilizacija	rutin	Visokotlačna homogenizacija	Rutin SLS	Nanokristali rutina (50 %) Avicel (42 %) AcDiSol (5 %) ALI	Test raztapljanja (metoda z veslom): V vodi in v pufru s pH 6,8 se je v 5 min raztopilo 80 % ZU (primerjava z zdravilom na tržišču: 30 % ZU v 5 min).	Mauludin et. al. (2008) (34)

				Explotab (5 %) Mg-Stearat (2 %) Smukec (1 %)	V pufru s pH 1,2 se je v 30 min raztopilo 67 % ZU (zdravilo na trgu 51 %).	
Sušenje z razprševanjem	fenofibrat	Mokro mletje	Fenofibrat Laktoza SDS	/	Test raztapljanja (metoda z veslom): V FaSSIF (fasted state simulated intestinal fluid) je prišlo do supersaturacije (60 % raztopljene ZU v 10 min), potem pa je prišlo do rekristalizacije in precipitacije (po treh urah je konc. padla na 20 %).	Vogt et. al. (2007) (35)
Liofilizacija	itrakonazol	Mokro mletje	Itrakonazol Saharoza (50, 100, 200 %) Itrakonazol MCC (50, 100, 200 %)	/	Test raztapljanja (metoda z veslom): Večje količine saharoze so zmanjšale hitrost raztapljanja ZU. Saharoza sproži aglomeracijo delcev pri koncu sušenja. Večje količine MCC povečajo hitrost raztapljanja ZU.	Van Eerdenbrugh et. al. (2008) (36)
Liofilizacija	naproksen itrakonazol solfakon fenofibrat	Mokro mletje	HPC z Naproksenom Itrakonazolom Solfakonom Fenofibratom Cilostazolom Pred sušenjem so NS dodali še: karagenan (0,1-5 %), želatino (0,5-5 %) ali alginsko kislino (0,5-2 %)	/	Redisperzibilnost: Merili so velikost delcev v vodi pred in po sušenju: Po redisperziji so najmanjše delce dobili pri konc. želatine 2-5 % in pri konc. karagenana 5 %.	Kim et. al. (2010) (37)
Liofilizacija	lovirid	Mokro mletje	Lovirid Tween 80 (50 %) Poloksamer 188 (50 %) Pred sušenjem so NS dodali še saharozo.	/	Test raztapljanja (metoda z veslom): Ob dodatku saharoze se je ZU raztopila v nekaj minutah. Če saharoze niso dodali, je prišlo do aglomeracije, po 15 min se je raztopilo 58 % ZU.	Van Eerdenbrugh et. al. (2007) (38)

Sušenje z razprševanjem	cinarizin itrakonazol fenilbutazon	Mokro mletje	TPGS s Cinarizinom Itrakonazolom Fenilbutazonom Pred sušenjem so NS dodali še MCC (100 %), brezvodni kalcijev fosfat (100 %), koloidni silicijev dioksid (100 %) ali hidrofobno spremenjen inulin (100 %).	/	Raztapljanje: mešanje v mikserju, nato določanje vsebnosti ZU v suspenziji. Vrstni red tvorilcev ogrodja glede na ohranila hitrosti raztapljanja po sušenju: brezvodni kalcijev fosfat < MCC < koloidni silicijev dioksid < hidrofobno spremenjen inulin.	Van Eerdenbrugh et. al. (2008) (39)
Liofilizacija	naproksen	Mokro mletje	Naproksen HPC (0, 1, 4 %) Argininijev klorid (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 %)	/	Test raztapljanja: dializa (v 0,1 M HCl). Konc. ZU v dializatu so merili z UV. Po redisperziji se je velikost delcev ohranila.	Ain-Ai et al. (2008) (40)
Sušenje z razprševanjem	ibuprofen	Mokro mletje	Ibuprofen (2 % in 15 %) HPMC (0,5 %) PVP (0,5 %) SLS (0,1 %) Pred sušenjem so NS dodali še manitol (15 %)	/	Test raztapljanja (metoda z veslom): V 2 min se je raztopilo skoraj 100 % ZU (enako kot pri nesušeni NS).	Plakkot et al. (2011) (41)

4.2 Priprava nanosuspenzij

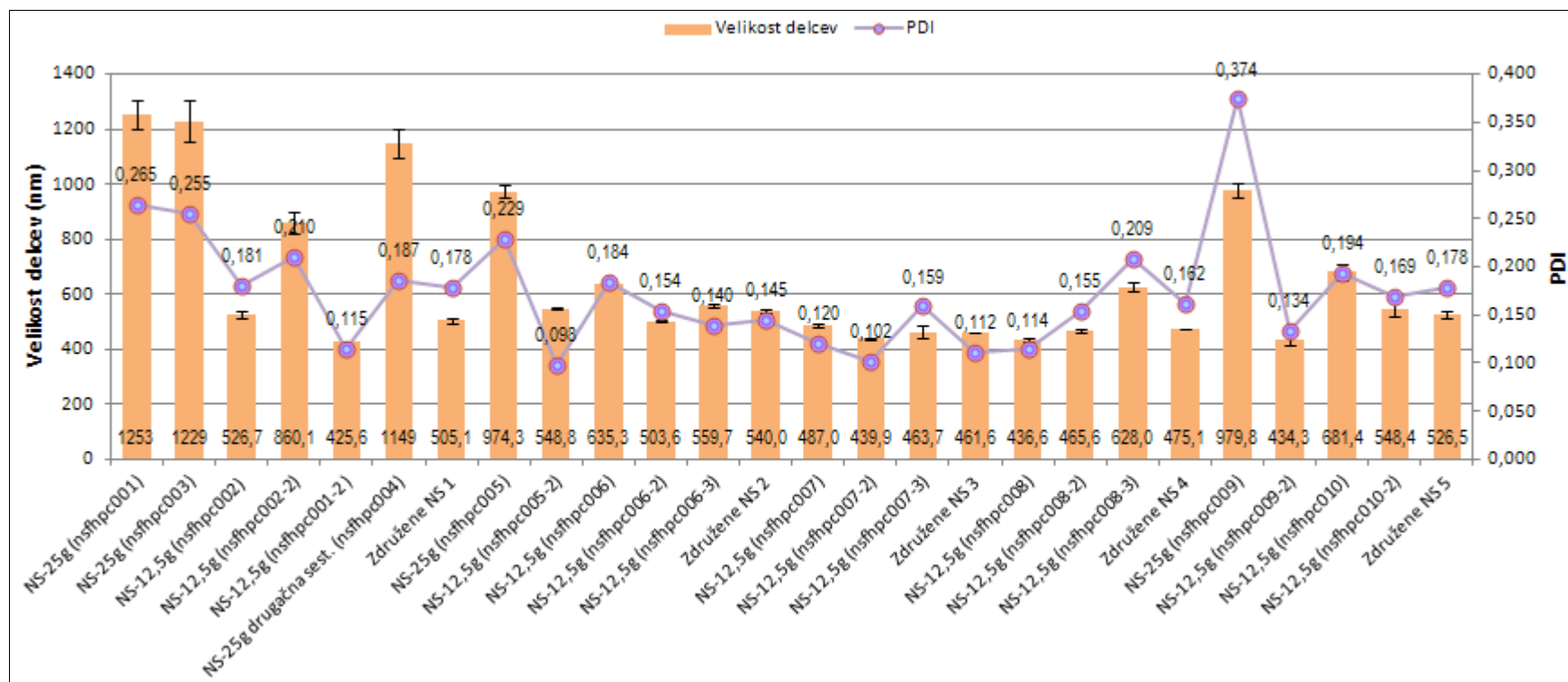
Pripravili smo suspenzijo s fenofibratom in tremi različnimi stabilizatorji (hidroksipropilcelulozo, hidroksipropilmetilcelulozo in kopovidonom). Suspenzije so vsebovale 12,8 g fenofibrata, 2,46 g stabilizatorja in 28,0 g vode. Sestavo suspenzij in način izdelave nanosuspenzij smo izbrali na podlagi rezultatov v diplomski nalogi Lucije Fašalek (42). Najprej smo poskusili izdelati nanosuspenzije s HPC kot stabilizatorjem. V preglednici II so predstavljeni poskusi izdelave nanosuspenzij pri različnih pogojih, na sliki 4 pa lahko vidimo povprečne velikosti delcev in PDI izdelanih nanosuspenzij. Vse nanosuspenzije smo mleli pri hitrosti vrtenja 500 rpm. Vse nanosuspenzije smo mleli v 50 ml posodi s 100g kroglic. Izjemoma smo enkrat mleli tudi v 250 ml posodi z 200 g kroglic (zadnja vrstica v preglednici II ter na sliki 4 označeno kot »NS-25g (nsfhpc009)«). Pripravili smo tudi suspenzijo, ki je vsebovala 12,0 g fenofibrata, 4,0 g HPC in 36,0 g vode (v preglednici II in na sliki 4 označena kot »NS-25g drugačna sest. (nsfhpc004)«). Najbolj ustrezne velikosti delcev smo dobili pri mletju 12,5 g nanosuspenzije s HPC. Nanosuspenzije z ustrezno velikostjo delcev med 400 in 600 nm smo združili ter določili velikost delcev združenim nanosuspenzijam. Združene nanosuspenzije smo uporabili v nadaljnjih poskusih. Nanosuspenzije s HPC smo pripravljali sproti (glede na potrebe), zato smo naredili tudi več združenih nanosuspenzij.

Preglednica II: poskusi mletja nanosuspenzij s HPC pri različnih pogojih

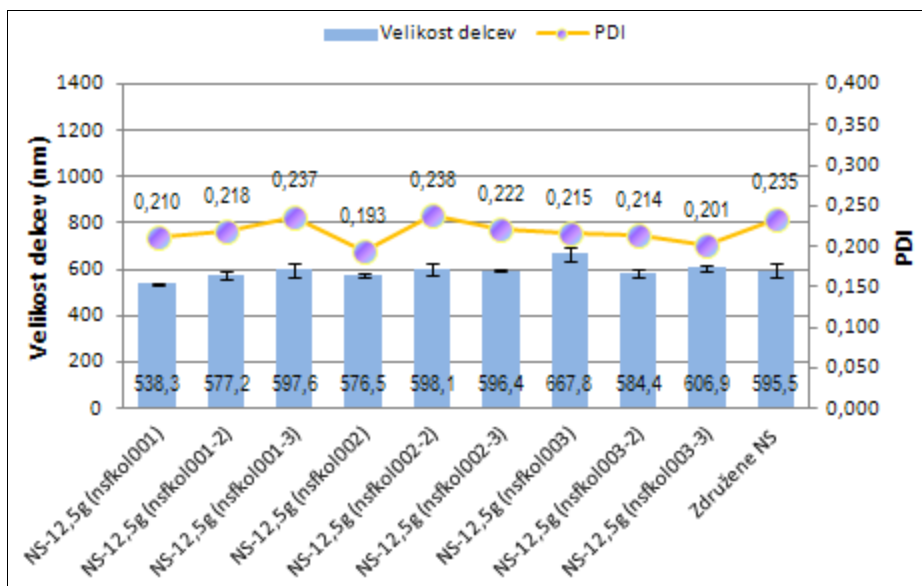
Oznaka vzorca	Zatehtana masa NS [g]	Masa kroglic [g]	Volumen posode [ml]	Čas mletja [h]	Velikost delcev [nm]
nsfhpc001, nsfhpc003	25	100	50	3	1241
nsfhpc005	25	100	50	5	974,3
nsfhpc004 - drugačna sest.	25	100	50	3	1149
nsfhpc002, nsfhpc001-2, nsfhpc006, nsfhpc006-3, nsfhpc007-2, nsfhpc008, nsfhpc008-3, nsfhpc010,	12,5	100	50	3	501,7
nsfhpc002-2, nsfhpc005-2, nsfhpc006-2, nsfhpc007, nsfhpc007-3, nsfhpc008-2, nsfhpc009-2, nsfhpc010-2					
nsfhpc009	25	200	250	3	979,8

Vse nanosuspenzije s kopovidonom smo izdelali pod enakimi pogoji: 12,5 g suspenzije smo natehtali v posodo za mletje, dodali 100 g kroglic ter mleli 30 min pri hitrosti vrtenja

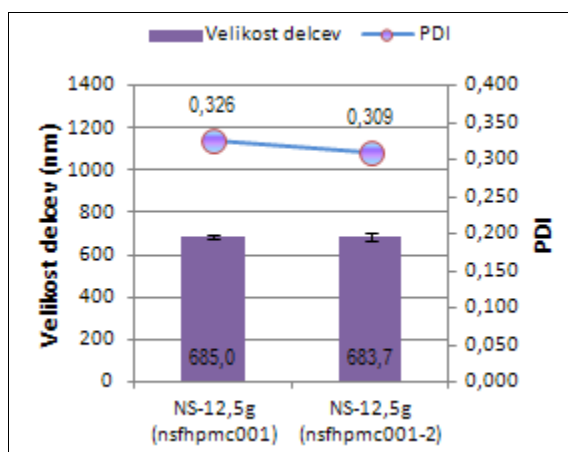
500 rpm. Velikost delcev v nanosuspenzijah s kopovidonom je bila med 530 in 670 nm (slika 5). Vse izdelane nanosuspenzije smo združili in uporabili v nadaljnjih eksperimentih. Pripravili smo tudi nanosuspenzije s HPMC, ki smo jih izdelali na sledeč način: 12,5 g suspenzije smo natehtali v posodo za mletje, dodali 100 g kroglic ter mleli 3 ure pri hitrostjo vrtenja 500 rpm. Velikost delcev nanosuspenzij s HPMC je bila večja kot pri ostalih dveh stabilizatorjih (slika 6), zato teh nanosuspenzij nismo uporabili za nadaljnje poskuse.



Slika 4: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v nanosuspenzijah (NS) s hidroksipropilcelulozo (HPC) kot stabilizatorjem. Nanosuspenzije z ustrešno velikostjo delcev med 400 in 600 nm smo združili v: Združene NS 1 (nsfhpc002, nsfhpc002-2 in nsfhpc001-2), Združene NS 2 (nsfhpc005-2, nsfhpc006, nsfhpc006-2 in nsfhpc006-3), Združene NS 3 (nsfhpc007, nsfhpc007-2 in nsfhpc007-3), Združene NS 4 (nsfhpc008, nsfhpc008-2 in nsfhpc008-3) ter Združene NS 5 (nsfhpc009-2, nsfhpc010 in nsfhpc010-2).



Slika 5: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v nanosuspenzijah (NS) s kopovidonom kot stabilizatorjem.

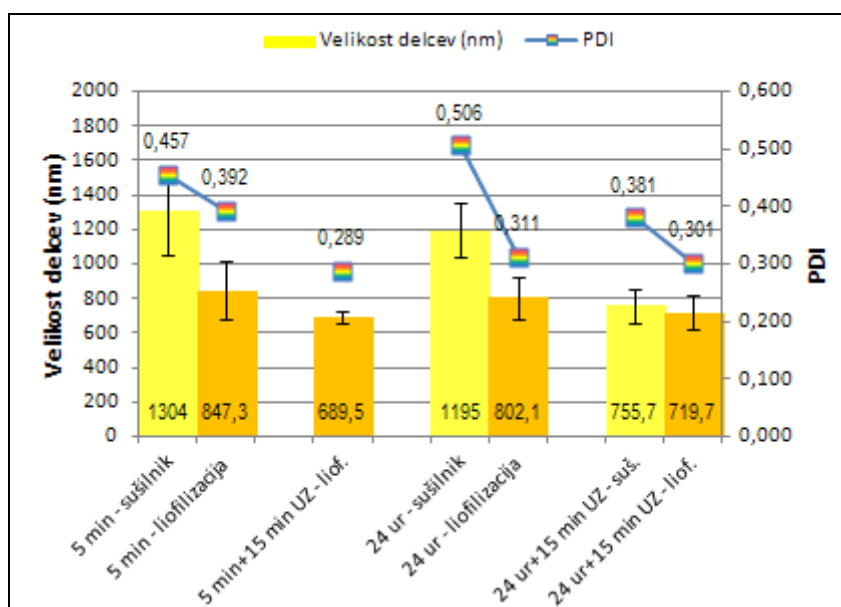


Slika 6: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v nanosuspenzijah (NS) s hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC) kot stabilizatorjem.

4.3 Sušenje in redispergiranje nanosuspenzij s kopovidonom

Najprej smo posušili nanosuspenzije s kopovidonom kot stabilizatorjem, brez dodatkov pomožnih snovi. Uporabili smo metodo sušenja v sušilniku in metodo liofilizacije. Suhe nanosuspenzije smo redispergirali v vodi (0,05 g nanosuspenzije v 20 ml vode). Delci, sušeni po obeh metodah, so se v vodi dobro dispergirali. Usedline nismo opazili. Podatke o

velikosti delcev smo statistično obdelali. Najprej smo z F-testom preverili enakost varianc, nato pa smo uporabili t-test. Po 5 min mešanja na magnetnem mešalu so bili delci statistično značilno večji kot v izhodni tekoči nanosuspenziji (slika 7). Razlika v velikosti delcev med liofilizirano in med v sušilniku sušeno nanosuspenzijo je bila statistično značilna. Manjše delce smo dobili z liofilizacijo. Meritve velikosti delcev smo ponovili po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički (le za liofilizirano nanosuspenzijo), po 24 urah mešanja in po ponovni 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički. Velikost delcev je bila po 24 urah statistično značilno manjša v liofilizirani nanosuspenziji (preglednica III), po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički pa razlika ni bila več statistično značilna. Delci so tudi po inkubaciji v ultrazvočni kadički ostali statistično značilno večji kot v tekoči nanosuspenziji. Omeniti je potrebno tudi polidisperzne indekse (PDI), ki so bili manjši pri liofilizirani nanosuspenziji.



Slika 7: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih in v sušilniku sušenih NS s kopovidonom v različnih časovnih intervalih. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 595,5 nm.

Preglednica III: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva metode sušenja na velikost delcev po redispergiranju

Nanosuspenzije	p vrednosti
5 min - sušilnik	0,0407
5 min - liofilizacija	

24 ur - sušilnik	0,0377
24 ur - liofilizacija	
24 ur+15 min UZ - suš.	0,0992
24 ur+15 min UZ - liof.	

Dodatna slabost nanosuspenzije s kopovidonom je bila izjemna elektrostatičnost liofilizata v primerjavi z liofilizatom nanosuspenzije s HPC. Med sejanjem liofilizata je zato prišlo do velikih izgub. Zaradi tega ter manjše velikosti delcev v začetni nanosuspenziji s HPC v primerjavi s kopovidonom smo za nadaljnje poskuse uporabili le nanosuspenzijo s HPC.

4.4 Sušenje in redispergiranje nanosuspenzij s hidroksipropilcelulozo

Nanosuspenzije smo sušili s tremi metodami: v sušilniku, z liofilizacijo in s sušenjem z razprševanjem.

4.4.1 Sušenje v sušilniku

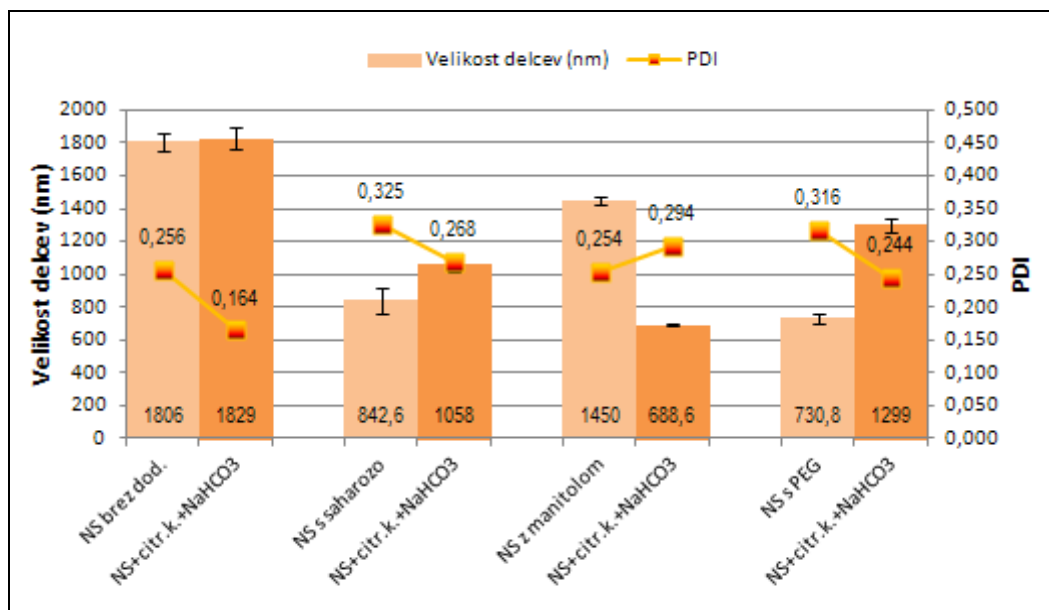
V sušilniku smo sušili nanosuspenzije brez dodatkov ter z dodatkom saharoze, manitola in PEG 6000. Masno razmerje med tekočo nanosuspenzijo in pomožno snovjo je bilo 3:1. Vse nanosuspenzije smo sušili 24 ur, le nanosuspenzijo z dodatkom saharoze je bilo potrebno sušiti 48 ur, ker se v 24 urah ni posušila.

0,05 g suhih nanosuspenzij smo redispergirali v 20 ml vode. Pri vseh nanosuspenzijah smo na dnu čaše opazili usedlino. V nanosuspenziji brez dodatkov je bilo usedilne precej, ob dodatku saharoze in PEG 6000 je bila usedlina zelo rahla, ob dodatku manitola pa so se delci dobro redispergirali, tako da je bila usedlina komaj opazna. Velikost delcev smo določevali po 5 min mešanja na magnetnem mešalu (slika 8), po 15 min inkubiranja v ultrazvočni kadički (slika 9), po 24 urah mešanja (slika 10) ter po ponovni 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički (slika 11). Po 5 min mešanja smo najmanjše delce dobili v nanosuspenzijah s saharozo in s PEG 6000. Velikost delcev v teh dveh vzorcih se je statistično signifikantno razlikovala od velikosti delcev v ostalih vzorcih, ki sta imela velikost delcev precej čez 1000 nm. Vsi vzorci so bili statistično signifikantno različni od delcev v začetni nanosuspenziji. Po inkubaciji v ultrazvočni kadički so se delci zmanjšali, pri NS s PEG 6000 je bila velikost delcev statistično enaka kot v začetni tekoči nanosuspenziji. Po 24 urah mešanja je bila velikost delcev spet nekoliko večja, po ponovni inkubaciji v ultrazvočni kadički pa se je spet zmanjšala.

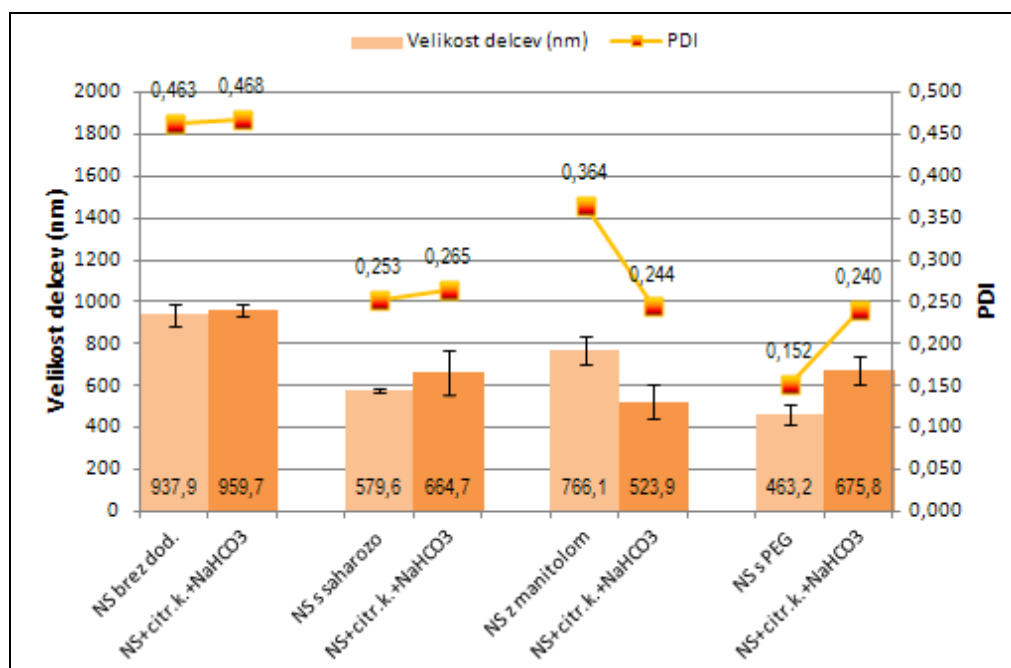
Vsem nanosuspencijam smo po sušenju dodali še citronsko kislino in natrijev hidrogenkarbonat (ki sta bila razmerju v 2:1). Razmerje med nanosuspencijo in dodano zmesjo citronske kisline in NaHCO_3 je bilo 1:1. Menili smo, da naj bi citronska kislina in NaHCO_3 v vodi reagirala, sprostil bi se CO_2 , ki bi pripomogel k večji dispergiranosti delcev. S t-testom (preglednica IV) smo preverili, ali dodatek citronske kisline in NaHCO_3 statistično značilno vpliva na velikost delcev po 5 min mešanja v primerjavi z nanosuspencijami brez dodatkov. Pred izvedbo t-testa smo z F-testom preverili enakost varianc. Statistično značilno razliko smo dobili v primeru nanosuspencij z dodatkom saharoze, manitola in PEG 6000, ne pa pri nanosuspenciji brez dodatkov. Opaziti pa je, da so bili delci ob dodatku citronske kisline in NaHCO_3 pri NS z manitolom manjši, pri NS s saharozo in s PEG 6000 pa večji. Za nanosuspenciji s saharozo in s PEG 6000 lahko torej zaključimo, da dodatek citronske kisline in NaHCO_3 ni pripomogel k zmanjšanju delcev. V primeru nanosuspencije z manitolom pa je dodatek citronske kisline in NaHCO_3 signifikantno zmanjšal velikost delcev, vendar je bila njihova velikost statistično značilno večja od velikosti delcev v tekoči nanosuspenciji.

Preglednica IV: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 na velikost delcev po redispergiranju v sušilniku sušenih nanosuspencij s HPC po 5 minut mešanja z magnetnim mešalom.

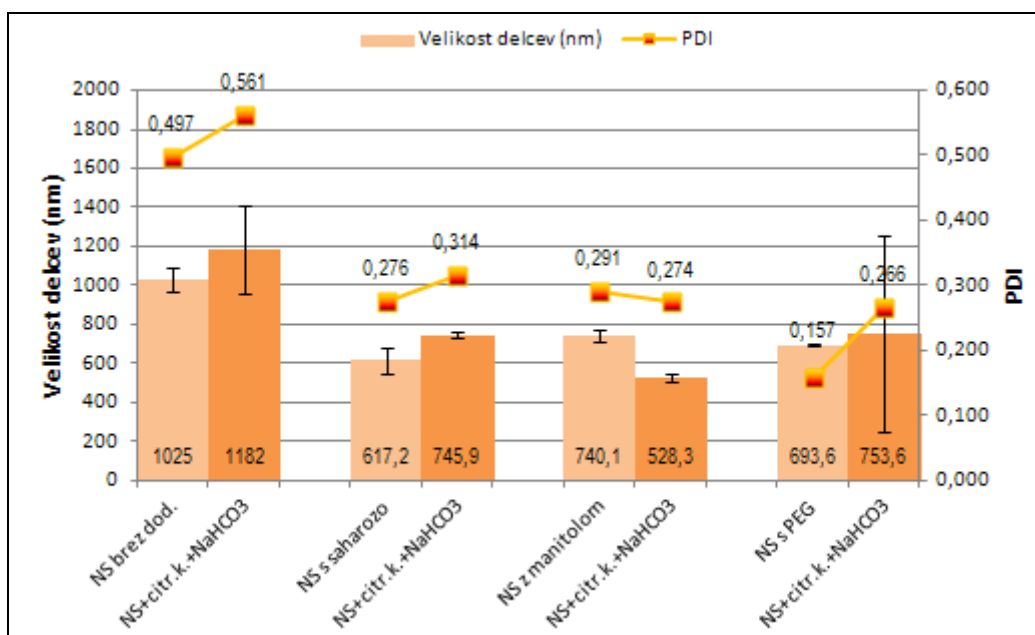
Nanosuspencije	p vrednosti
NS brez dod. NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,7967
NS s saharozo NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,0122
NS z manitolom NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,00000002
NS s PEG NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,0000025



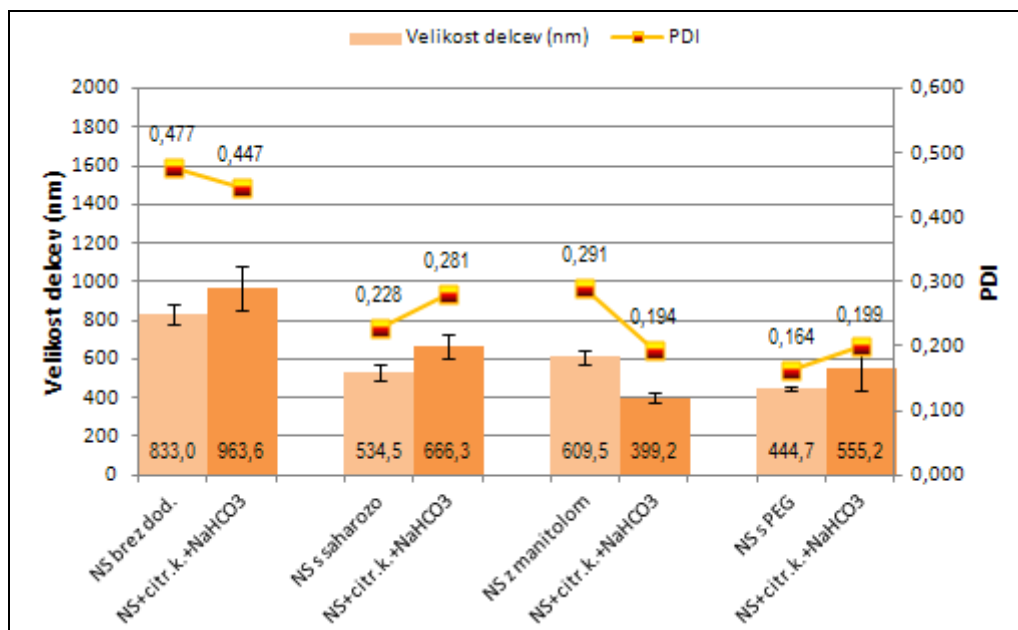
Slika 8: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 9: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 5 min mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 10: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 11: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 24 urah mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.

4.4.2 Sušenje z liofilizacijo

Liofilizirali smo nanosuspenzije brez dodatkov ter z dodatkom saharoze, manitola in PEG 6000. Tekočim nanosuspenzijam smo dodali še natrijev hidrogenkarbonat v razmerju 3:1 ter liofilizirali tudi tako pripravljene nanosuspenzije. Liofilizirali smo 24 ur pri temperaturi približno -100°C in tlaku približno 0 barov.

Liofilizirane nanosuspenzije smo dispergirali v vodi po enakem postopku kot tiste, sušene v sušilniku. Opazovali smo, kako so se nanosuspenzije obnašale v vodi. Delci nanosuspenzije brez dodatkov so plavali na površini, dispergirali so se šele, ko smo čašo postavili na magnetno mešalo. Nanosuspenzije z manitolom in s PEG 6000 (obe brez NaHCO_3) so se dobro redispergirale, usedline nismo opazili. Pri redispergiranju nanosuspenzij s saharozo (brez in z NaHCO_3), z manitolom (z NaHCO_3), s PEG 6000 (z NaHCO_3) ter nanosuspenzije le z NaHCO_3 smo opazili rahlo usedlino.

Po liofilizaciji smo nanosuspenzijam, ki še niso vsebovale NaHCO_3 , dodali citronsko kislino in NaHCO_3 (2:1) v razmerju 1:1. Nanosuspenzijam, ki smo jim dodali NaHCO_3 že pred liofilizacijo, pa smo dodali le citronsko kislino v razmerju 3:2. Tudi te nanosuspenzije

smo redispergirali. Ob stiku z vodo smo pri vse nanosuspensijah opazili mehurčke. Delci nanosuspensije brez dodatkov z naknadnim dodatkom citronske kisline in NaHCO_3 so plavali na površini, med mešanjem so se redispergirali. Nanosuspensije s saharozo, z manitolom in s PEG 6000 ter z naknadno dodanima citrnsko kislino in NaHCO_3 so se lepo dispergirale brez nastanka usedline. Pri ostalih nanosuspensijah smo opazili usedlino, iz katere so izhajali mehurčki. Posebnost je bila nanosuspenzija s saharozo (z NaHCO_3) in z dodano citrnsko kislino. Delci so se združili v skupek, ki je plaval na površini (kot šumeča tableta). Opazili smo izhajanje mehurčkov. Skupek je kmalu razpadel, delci so se dobro redispergirali.

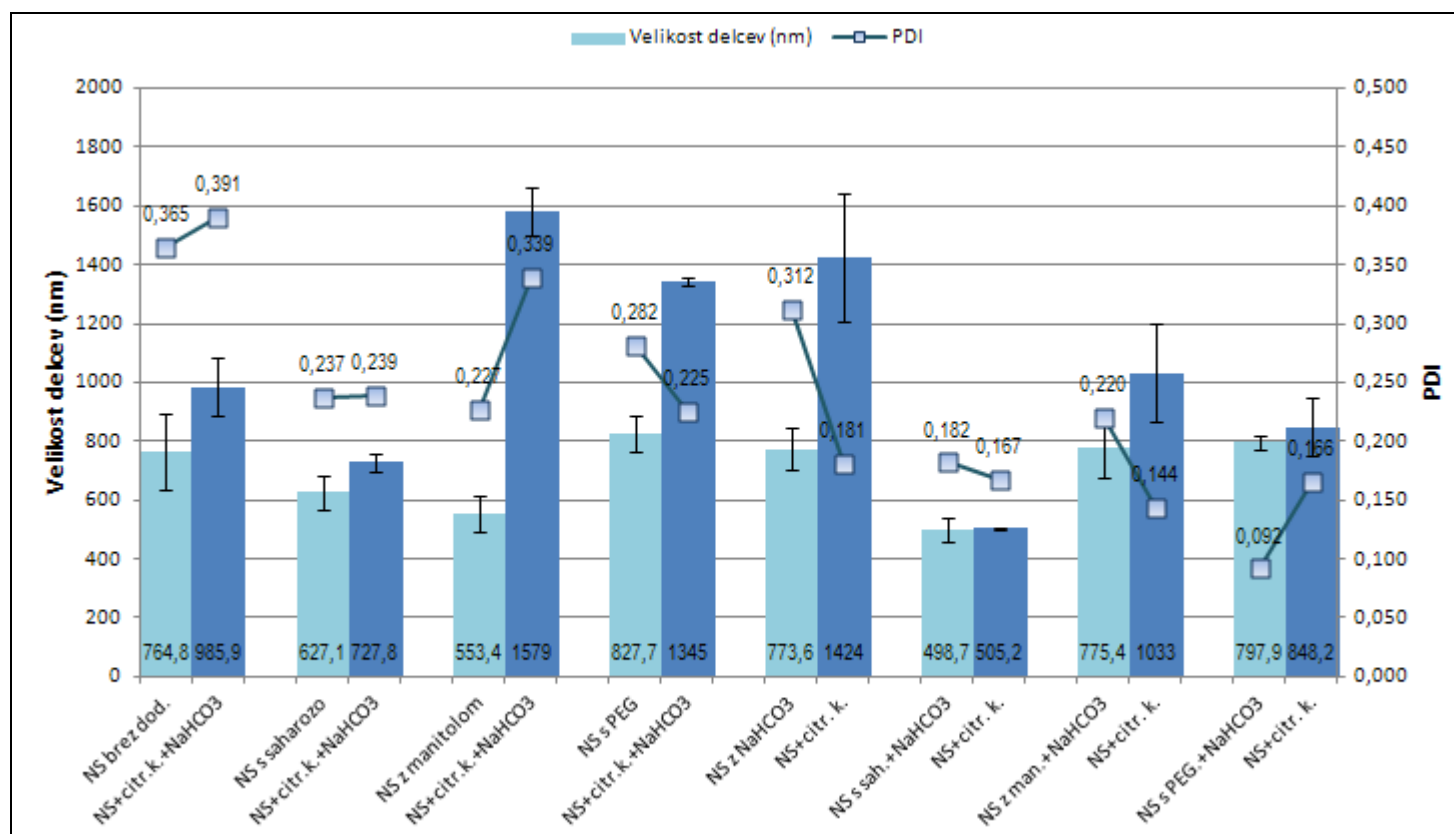
Redispergiranim nanosuspensijam smo določili tudi velikost delcev v enakih časovnih intervalih kot pri nanosuspensijah sušenih v sušilniku (slika 12). Povprečna velikost delcev po 5 min redispergiranja na magnetnem mešalu je bila večja od 1000 nm pri vzorcih z manitolom (z naknadnim dodatkom citronske k. in NaHCO_3), s PEG 6000 (z naknadnim dodatkom citronske k. in NaHCO_3), z manitolom in NaHCO_3 (z naknadnim dodatkom citronske k.) ter pri nanosuspensiji brez dodatkov z NaHCO_3 (z naknadnim dodatkom citronske k.). Najmanjše velikosti delcev, ki so statistično značilno primerljive z velikostjo delcev v tekoči nanosuspensiji, smo dobili pri redispergiranju nanosuspensij s saharozo, z manitolom in s saharozo z dodatkom NaHCO_3 . V preglednici V so podani rezultati t-testa, s katerim smo preverjali vpliv dodatka pomožnih snovi po liofilizaciji (NaHCO_3 in citronske kisline oziroma samo citronske kisline) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Pred izvedbo t-testa smo z F-testom preverili enakost varianc. Dodatek pomožnih snovi po liofilizaciji je statistično značilno vplival na velikost delcev pri nanosuspensiji brez dodatkov, nanosuspensijah s saharozo, z manitolom, s PEG 6000 ter pri nanosuspensiji, ki smo ji dodali le NaHCO_3 . Velikost delcev se je po dodatku pomožnih snovi povečala. Sklepamo lahko, da dodatek citronske kisline in NaHCO_3 (oz. samo citronske k.) po liofilizaciji ne doprinese k zmanjšanju velikosti delcev med redispergiranjem, kar je primerljivo z rezultati nanosuspensij, sušenih v sušilniku.

Preglednica V: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 na velikost delcev po redispergiranju liofiliziranih nanosuspensij s HPC po 5 minut mešanja z magnetnim mešalom.

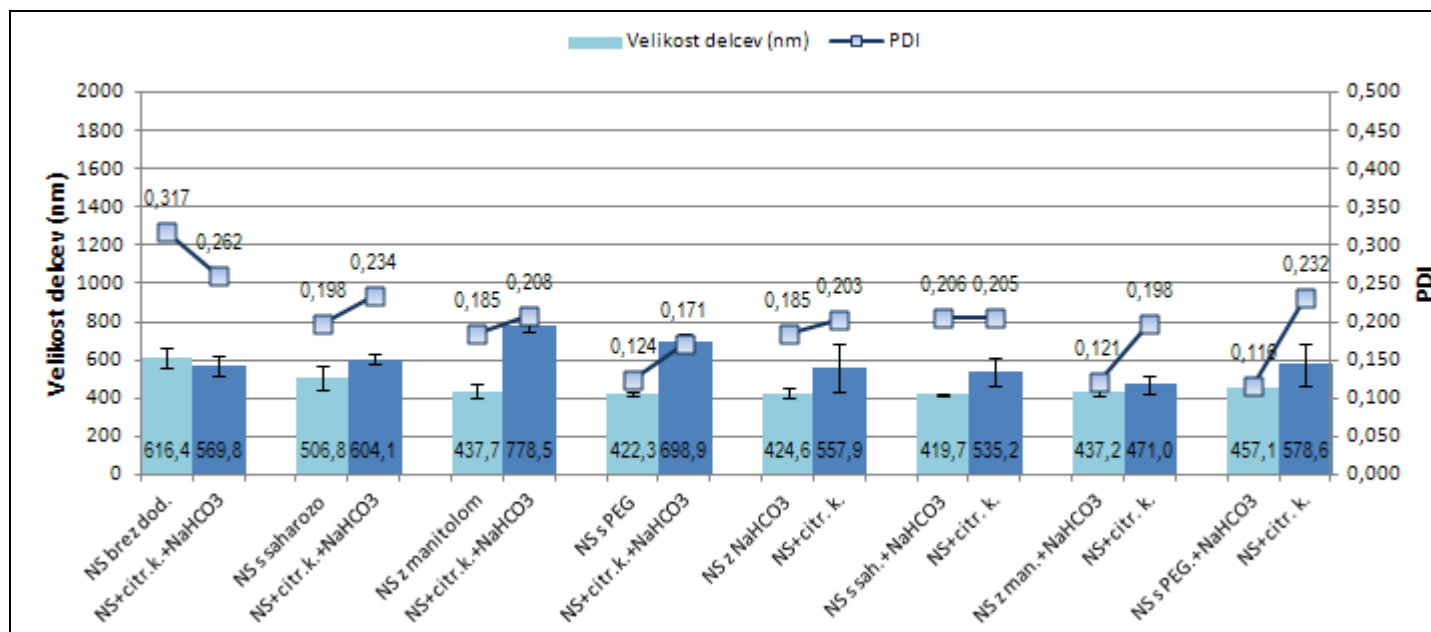
Nanosuspensije	p vrednosti
NS brez dod.	0,0202

NS+citr.k.+NaHCO ₃	
NS s saharozo NS+citr.k.+NaHCO ₃	0,0408
NS z manitolom NS+citr.k.+NaHCO ₃	0,0001
NS s PEG NS+citr.k.+NaHCO ₃	0,000039
NS z NaHCO ₃ NS+citr. k.	0,0017
NS s sah.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	0,8442
NS z man.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	0,1244
NS s PEG.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	0,5357

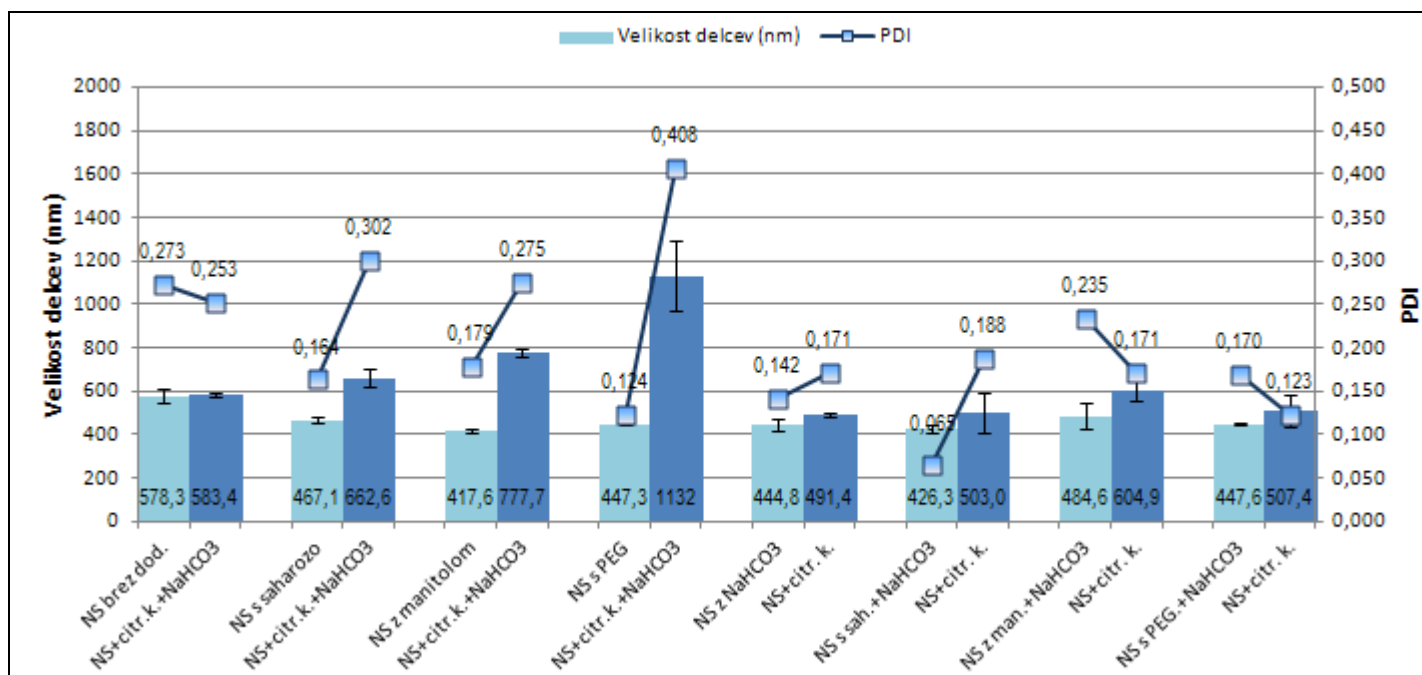
Na slikah 13, 14 in 15 vidimo povprečne velikosti delcev, ki smo jih določili v že omenjenih časovnih intervalih. Opazimo lahko, da se je velikost delcev po 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički zmanjšala vsem nanosuspenzijam. Povprečna velikost delcev nekaterih nanosuspenzij (predvsem tistih brez dodatkov po liofilizaciji) se je zmanjšala pod 450 nm. Po 24 urah mešanja je velikost delcev ostala enaka, pri vzorcu s PEG 6000, citronsko kislino in NaHCO₃ se je zvečala. Ko smo vzorce ponovno za 15 min inkubirali v ultrazvočni kadički, se je velikost delcev vzorca s PEG 6000, citronsko kislino in NaHCO₃ ponovno zmanjšala. Ostali vzorci so ohranili enako velikost delcev kot pred inkubacijo.



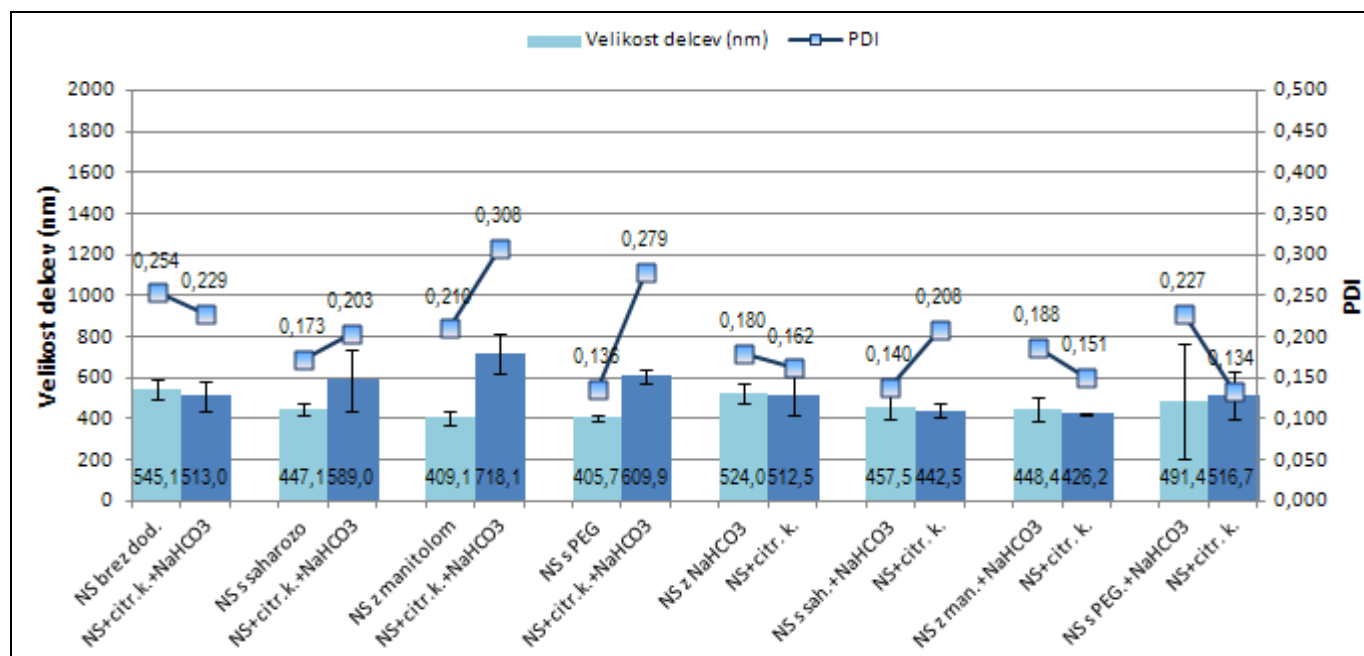
Slika 12: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citrsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citrsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 13: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citrsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citrsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 14: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 15: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.

4.4.3 Sušenje z razprševanjem

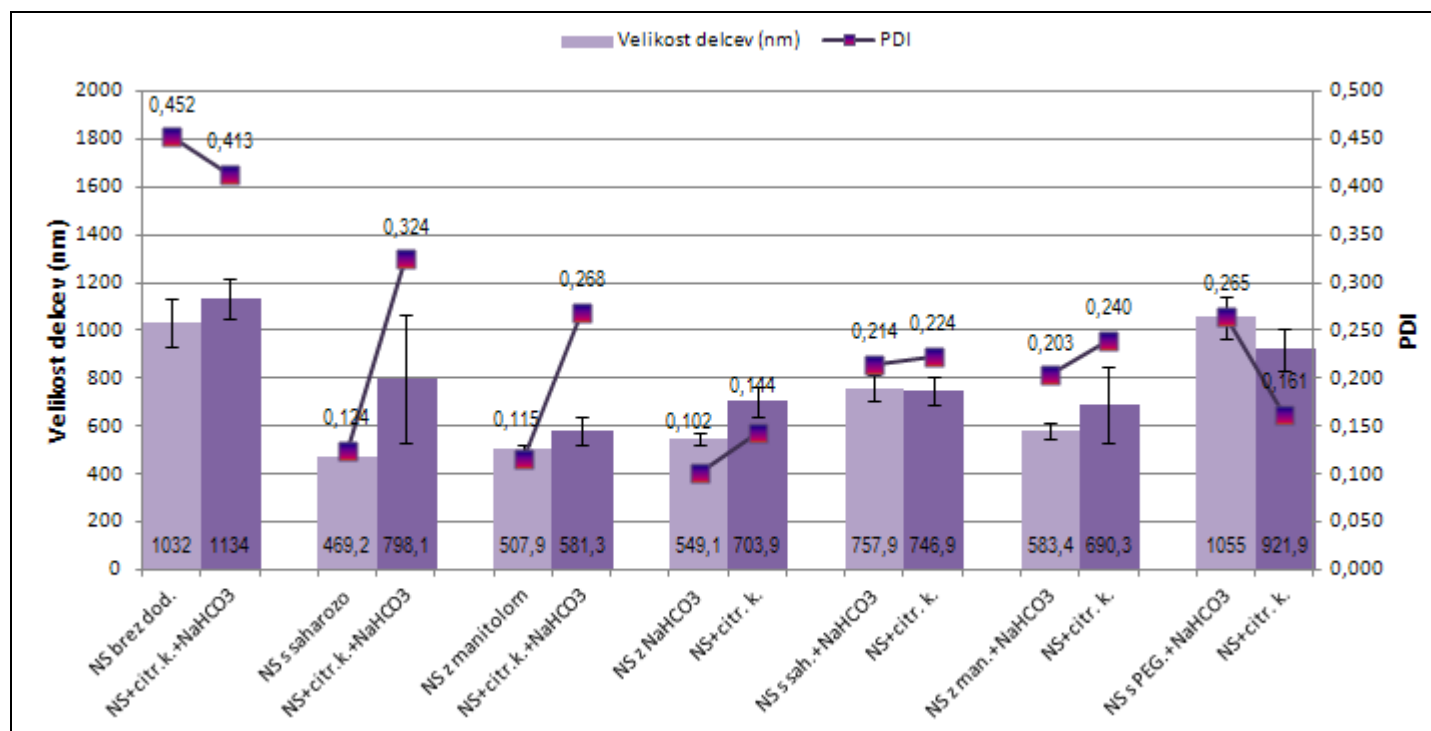
Z metodo sušenja z razprševanjem smo sušili nanosuspenzijo brez dodatkov ter z dodatkom saharoze, manitola in PEG 6000. Vsem nanosuspenzijam smo dodali tudi NaHCO_3 v razmerju 3:1. Sušili smo pod pogoji, ki so navedeni v poglavju Materiali in metode. Hitrost doziranja smo po potrebi zmanjšali, če se je vzorec lepil na steno komore. Vzorec s PEG 6000 se je med razprševanjem močno lepil na steno komore, pa tudi na cevi, ki so povezovale komoro in ciklon ter posodo za zbiranje suhega vzorca. PEG 6000 se pri 55°C začne taliti oz. mehčati (31), zato smo temperaturo vhodnega zraka med procesom znižali na 45°C . Kljub znižanju temperature vhodnega zraka pa se je v zbirni posodi nabralo zanemarljivo malo vzorca, zato nadaljnjih meritev ni bilo možno izvesti. Pri dodatku NaHCO_3 nanosuspenziji s PEG 6000 smo sušenje prav tako izvajali pri temperaturi vhodnega zraka 45°C . Sicer je prišlo do izgub, ker se je vzorec lepil na steno komore, vendar se je v zbirni posodi nabralo dovolj vzorca, da smo ga lahko uporabili v nadaljnjih poskusih.

Kot že pri ostalih dveh metodah smo tudi z razprševanjem posušene nanosuspenzije dispergirali v vodi. Pri vseh vzorcih smo opazili, da so delci nekaj časa plavali na vodni površini, nato pa so se dispergirali. Pri nanosuspenzijah s citronsko kislino smo opazili tudi rahlo izhajanje mehurčkov. Velikost delcev smo ponovno merili po 5 min mešanja (slika 16), po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički (slika 17), po 24 urah mešanja (slika 18) in po 15 min ponovne inkubacije v ultrazvočni kadički (slika 19). Delce, ki so imeli statistično značilno podobne velikosti kot v tekoči nanosuspenziji, smo izmerili v vzorcih z manitolom in NaHCO_3 , z manitolom in NaHCO_3 (z naknadnim dodatkom citronske kisline), s saharozo ter vzorcu s saharozo (z naknadno dodanima citronsko kislino in NaHCO_3). Delce nad 1000 nm sta imeli le nanosuspenziji brez dodatkov ter ista nanosuspenzija z dodatkom NaHCO_3 in citronske kisline (oboje dodano po sušenju) ter pri nanosuspenziji s PEG 6000 in NaHCO_3 . S t-testom smo preverili vpliv dodatkov pomožnih snovi po sušenju (preglednica VI). Najprej smo izvedli F-test, s katerim smo preverili enakost varianc. Do statistično značilne razlike v velikosti delcev ni prišlo pri nobenem od vzorcev. Dodatek pomožnih snovi torej statistično značilno ne vpliva na velikost redispergiranih delcev.

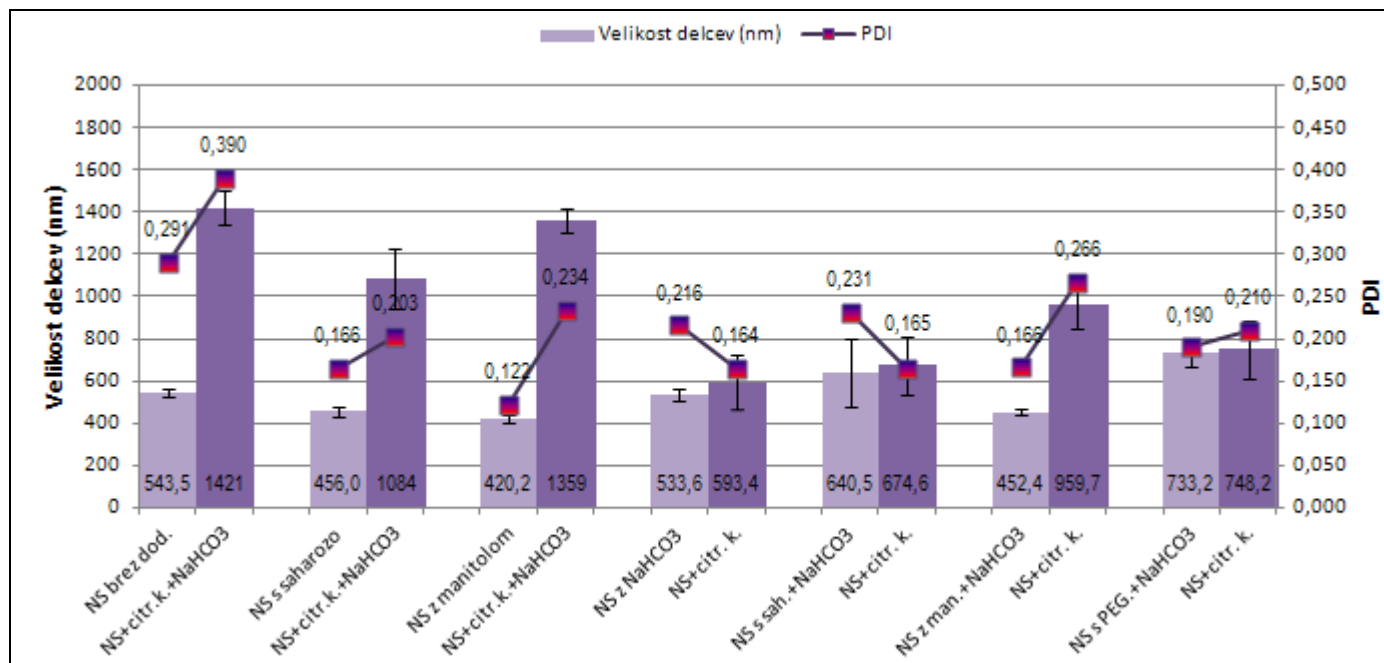
Preglednica VI: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 na velikost delcev po redispergiranju z razprševanjem sušenih nanosuspenzij s HPC po 5 min mešanja z magnetnim mešalom.

Nanosuspenzije	p vrednosti
NS brez dod. NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,2103
NS s saharozo NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,2680
NS z manitolom NS+citr.k.+ NaHCO_3	0,0628
NS z NaHCO_3 NS+citr. k.	0,0897
NS s sah.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	0,8623
NS z man.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	0,1740
NS s PEG.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	0,2891

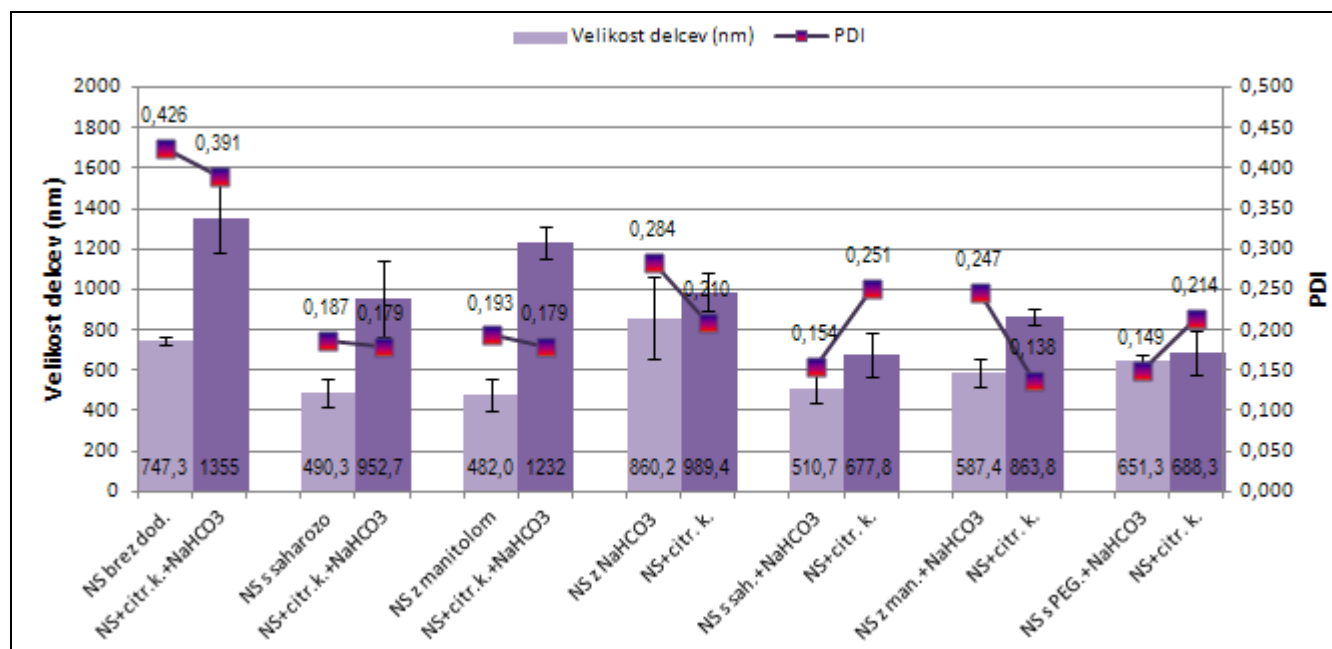
Po 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički se je velikost delcev pri večini vzorcev zmanjšala, pri nekaterih vzorcih pa se je velikost delcev celo povečala, še posebno pri nanosuspenziji z manitolom ter citronsko kislino in NaHCO_3 . Po 24-urnem mešanju so delci ostali približno enake velikosti, po ponovni inkubaciji v ultrazvočni kadički pa so se delci v vseh vzorcih spet nekoliko zmanjšali.



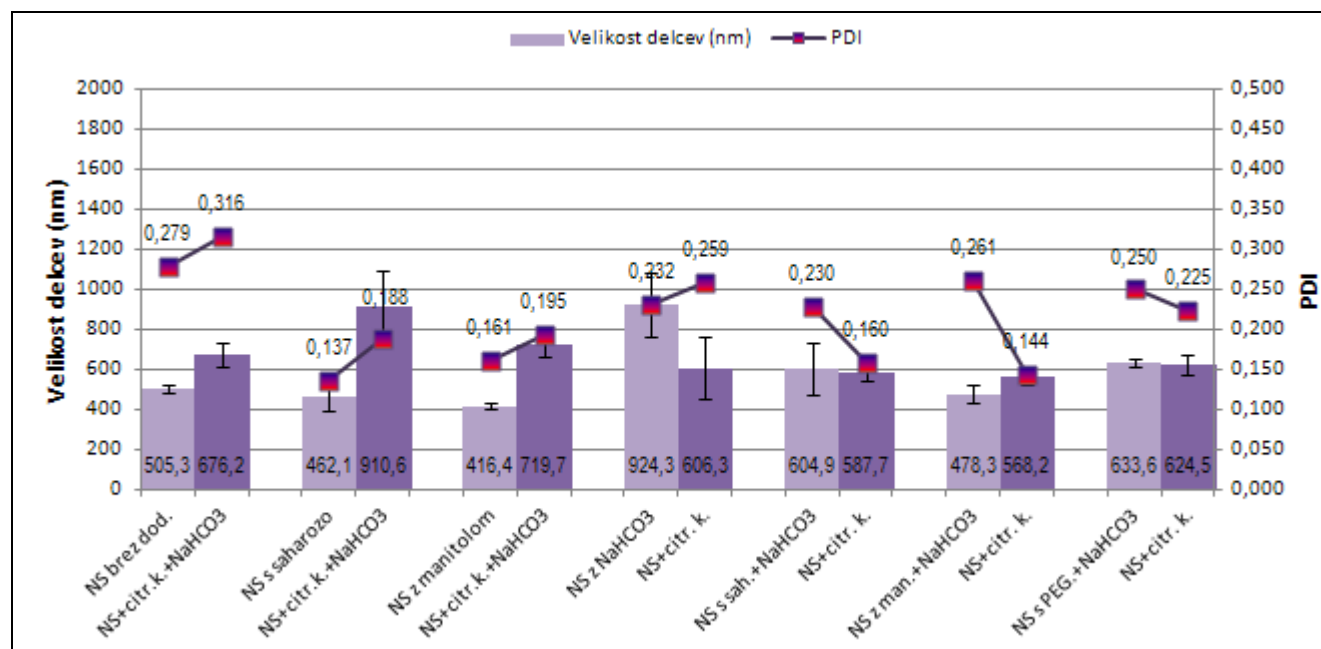
Slika 16: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju z razprševanjem dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.



Slika 17: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju z razprševanjem dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm..



Slika 18: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju z razprševanjem dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.



Slika 19: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja ter 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju z razprševanjem dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.

4.5 Izdelava in redispergiranje tablet

Tablete smo izdelali s tabletirko na udarec. Tabletiranje smo izvedli ročno, saj tabletirni masi nismo dodali snovi, ki bi izboljšale pretočne lastnosti, pa tudi zaradi majhnega števila izdelanih tablet. Maso tablet smo preračunali in tablete izdelali tako, da so vedno vsebovale 160 mg fenofibrata, ne glede na količino drugih pomožnih snovi. Najlažje smo stiskali tablete z dodatkom laktoze sušene z razprševanjem. Pri tabletiranju nanosuspenzij, ki so bile sušene z razprševanjem, ter pri nanosuspenzijah z dodano citronsko kislino se je tabletirna masa lepila na pečate. Če smo pečate premazali z magnezijevim stearatom, smo lepljenje preprečili. Pečate je bilo potrebno premazati pred vsakim stiskanjem tablete. Dodatne težave smo imeli tudi pri vzorcih s citronsko kislino. Čeprav smo citronsko kislino shranjevali v eksikatorju, je med pripravljanjem tabletirne mase (med mešanjem in sejanjem) vezala vlago iz zraka. Tabletirna masa se je skepila, oteženo je bilo stiskanje tablet. Posledično smo pri nekaterih vzorcih izdelali manj tablet, kot je bilo načrtovano, saj je tabletirne mase zmanjkalo.

Poskuse redispergiranja smo izvajali na sledeči način: 1 tableto smo dispergirali v 100 ml vode (dve tableti na vzorec) ter opazovali obnašanje tablete (razpadanje, plavanje...). Velikost delcev smo določevali po 5 min mešanja na magnetnem mešalu, po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički, po 24 urah mešanja ter po ponovni 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički.

4.5.1 Izdelava in redispergiranje tablet z nanosuspenzijami, sušenimi v sušilniku

Za posamezen vzorec smo izdelali 5 tablet, razen pri vzorcu s PEG 6000, citronsko kislino in NaHCO_3 , kjer smo izdelali samo 4 tablete. Razlog za manjše število izdelanih tablet je v že prej omenjenem oteženem stiskanju tablet s citronsko kislino in posledični veliki izgubi vzorca. Vsaki tableti smo pomerili trdnost. Za redispergiranje smo uporabili tablete, ki so imele podobno trdnost (za lažjo primerjavo rezultatov). V preglednici VII so zbrani podatki o masi tablet, trdnosti tablet, trdnosti tablet izbranih za redispergiranje ter obnašanje tablete v vodi. Za redispergiranje smo izbrali tablete, ki so imele trdnost med 50 in 70 N. Pri nekaterih vzorcih so imele vse izdelane tablete trdnost manj od 50 N oziroma več kot 70 N, zato smo izbrali tablete, ki so imele trdnost najbližje 50 oziroma 70 N. Tableta z nanosuspenzijo z manitolom, citronsko kislino in NaHCO_3 je razpadla takoj.

Tablete ostalih vzorcev so le rahlo razpadale, pri nekaterih pa razpadanja ob stiku z vodo nismo opazili.

Preglednica VII: Masa in trdnost izdelanih tablet, trdnost tablet izbranih za redispergiranje ter obnašanje tablet ob dodatku vode za posamezne vzorce tablet z nanosuspenzijami, sušenimi v sušilniku

Vzorci	Masa tablete [mg]	Trdnost tablet [N]	Trdnost tablet za redisp. [N]	Obnašanje tablet v vodi
NS brez dod.	191	72, 61, 63, 49, 72	61, 63	Ne razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	381	71, 75, 73, 57, 64	71, 73	Rahlo razpada
NS+laktoza	391	67, 60, 64, 59, 54	59, 60	Ne razpada
NS s saharozo	254	54, 49, 53, 52, 55	55, 54	Rahlo razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	45, 51, 46, 55, 76	55, 51	Rahlo razpada
NS+laktoza	454	67, 66, 58, 74, 55	67, 66	Ne razpada
NS z manitolom	254	66, 74, 53, 61, 59	59, 61	Rahlo razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	45, 44, 55, 51, 67	51, 55	Takoj razpadla
NS+laktoza	454	53, 70, 54, 76, 49	53, 54	Rahlo razpada
NS s PEG	254	72, 63, 64, 70, 67	63, 64	Ne razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	40, 30, 31, 30	31, 40	Rahlo razpada
NS+laktoza	454	75, 70, 61, 75, 67	61, 67	Ne razpada

Velikost delcev smo določali po 5 min mešanja, po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički, po 24 urah mešanja ponovno po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Po 5 min mešanja (slika 20) nismo v nobeni nanosuspenziji izmerili velikosti delcev, ki bi bila statistično značilno enaka kot velikost delcev v tekoči nanosuspenziji. Velikost delcev, ki je bila manjša od 1000 nm, smo izmerili pri v vzorcih s saharozo (brez drugih dodatkov ter z dodatkom laktoze) ter s PEG 6000 (brez drugih dodatkov ter z dodatkom laktoze). Ostalim vzorcem smo določili delce nad 1000 nm. Pri teh vzorcih je bil visok tudi PDI (nad 0,5), kar pomeni, da je bila velikost delcev precej neenakomerna. S t-testom smo preverili vpliv dodatka različnih pomožnih snovi po sušenju na velikost delcev (preglednica VIII). Pred uporabo t-testa smo enakost varianc preverili z F-testom. Med sabo smo primerjali vzorec nanosuspenzije brez dodatka po sušenju, vzorec z dodatkom citronske kisline in NaHCO₃ ter vzorec z dodatkom laktoze. Velikost delcev v vzorcu brez dodatkov pred sušenjem z naknadno dodanima citrinsko kislino in NaHCO₃ je bila statistično značilno manjša od vzorca brez dodatkov in vzorca z dodano laktozo. Vzorec s saharozo je imel statistično značilno manjše delce od vzorcev z dodatki po sušenju. Pri

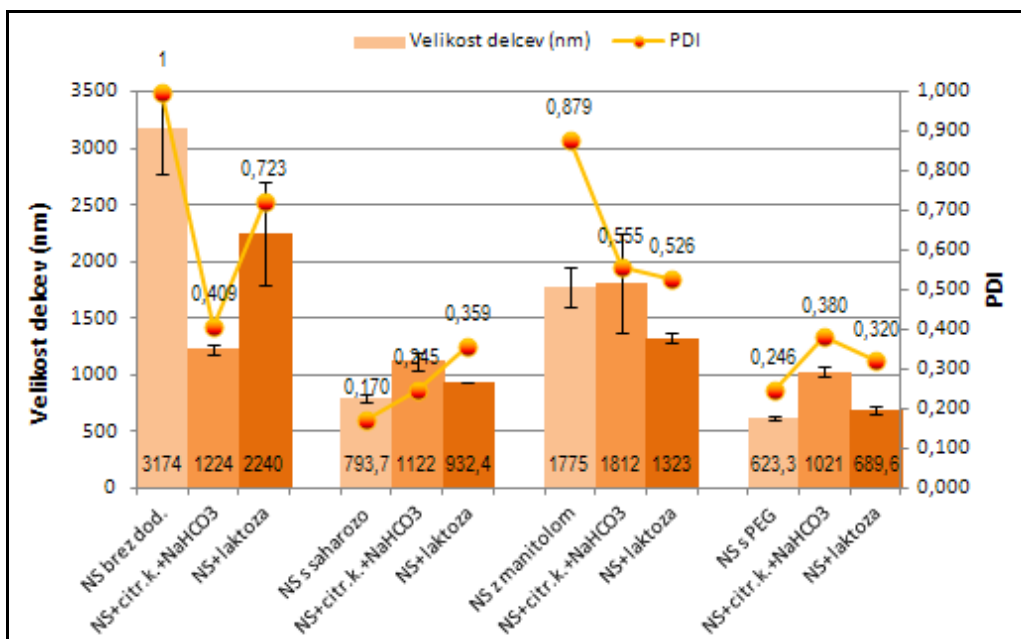
vzorcih z manitolom je imel vzorec z dodano laktozo statistično značilno manjše delce od vzorca brez dodatkov po sušenju. Vzorca s PEG 6000 (brez naknadnih dodatkov in z dodano laktozo) sta imela statistično značilno manjše delce kot vzorec s PEG 6000 in z dodano citronsko kislino in NaHCO_3 , med njima pa ni bilo statistično značilne razlike.

Preglednica VIII: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 ter dodatka laktoze na velikost delcev po redispergiranju v sušilniku sušenih in tabletiranih nanosuspenzij s HPC po 5 min mešanja z magnetnim mešalom.

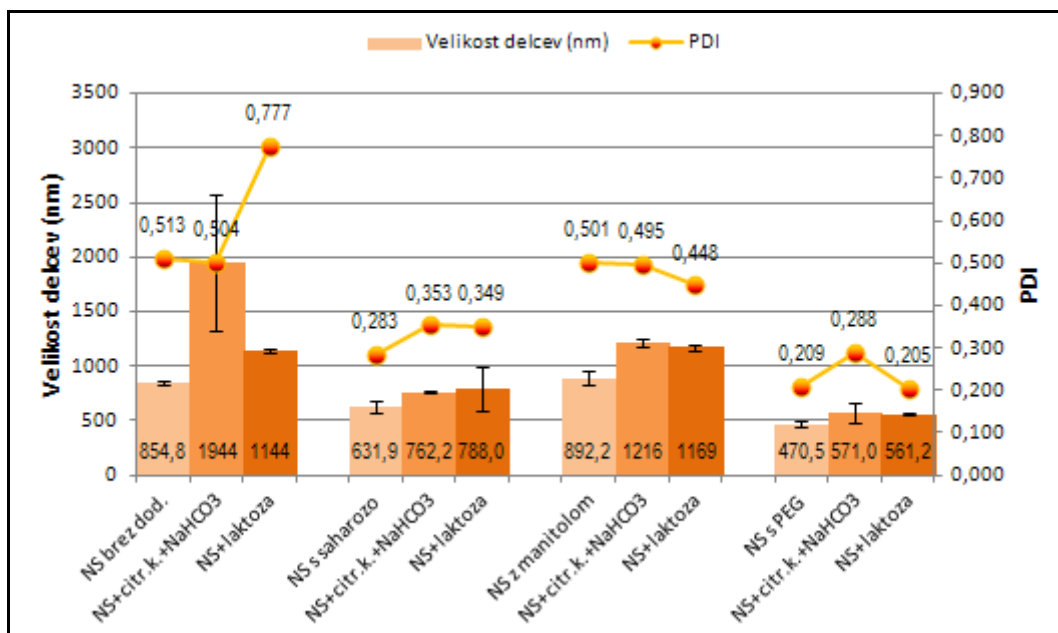
NS brez dod.	NS brez dod.	NS+citr.k.+ NaHCO_3
NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS+laktoza	NS+laktoza
0,0116	0,0658	0,0173
NS s saharozo	NS s saharozo	NS+citr.k.+ NaHCO_3
NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS+laktoza	NS+laktoza
0,0011	0,0002	0,0367
NS z manitolom	NS z manitolom	NS+citr.k.+ NaHCO_3
NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS+laktoza	NS+laktoza
0,9013	0,0121	0,1575
NS s PEG	NS s PEG	NS+citr.k.+ NaHCO_3
NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS+laktoza	NS+laktoza
0,0016	0,0520	0,0004

Po 15-minutni inkubaciji v ultrazvočni kadički so vse tablete razpadle. Velikost delcev se je zmanjšala pri vseh vzorcih, pri tistih s PEG 6000 (tudi z dodatki) se je zmanjšala na velikost, ki so jo imeli delci v tekoči nanosuspenziji. Po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu se velikost delcev ni spremenila, prav tako je ostala približno enaka po ponovni inkubaciji v ultrazvočni kadički. Le pri vzorcu z naknadno dodanima citronsko kislino in NaHCO_3 lahko opazimo zvečanje velikosti delcev.

Zaključimo lahko, da dodatek citronske kisline in NaHCO_3 ter dodatek laktoze po sušenju ne prispeva k bistveno boljši redisperzibilnosti. Ta je predvsem odvisna od pomožne snovi dodane pred sušenjem.

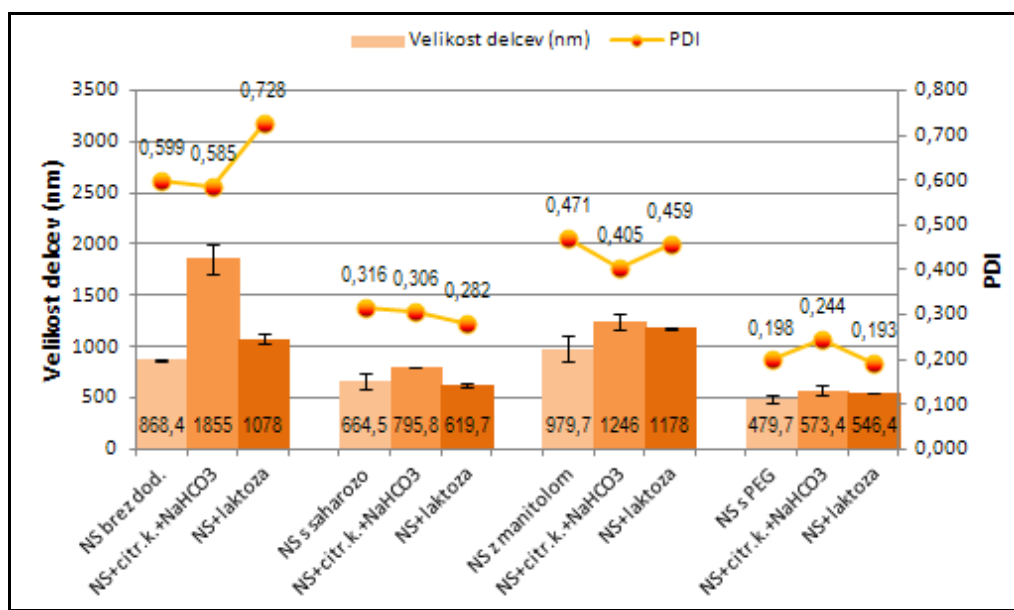


Slika 20: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih in tabletiranih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.

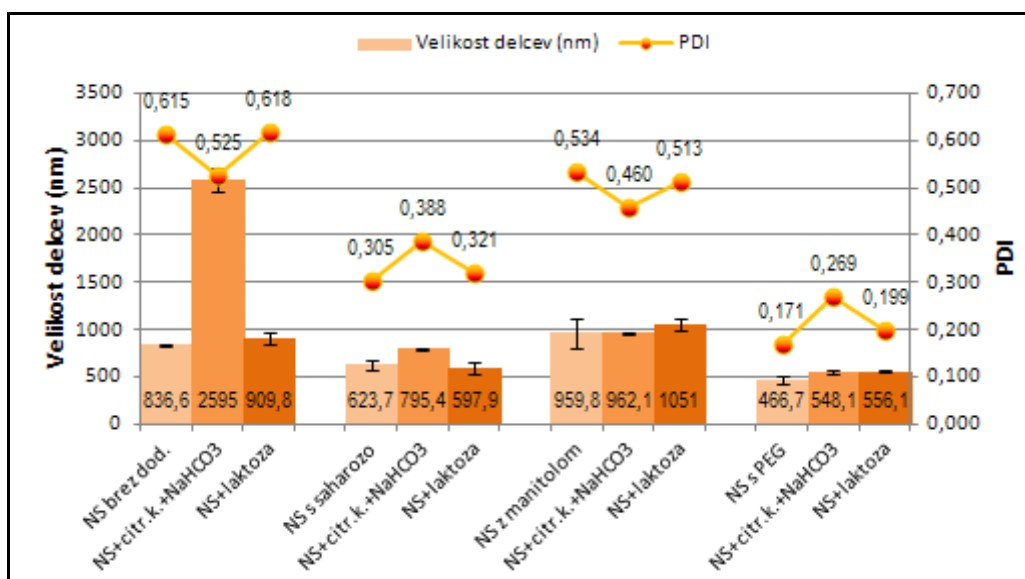


Slika 21: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih in tabletiranih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 5 min

mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 22: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih in tabletiranih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO_3 . Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 23: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi v sušilniku sušenih in tabletiranih NS s HPC (brez dodatkov, s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000) po 24 urah mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.

4.5.2 Izdelava in redispergiranje tablet z liofiliziranimi nanosuspenzijami

Tudi iz liofiliziranih nanosuspenzij smo izdelali tablete. Za vsak vzorec smo izdelali 5 tablet. Iz nanosuspenzij, ki so vsebovale NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo izdelali le po 3 tablete zaradi manjše količine vzorca. Izdelanim tabletam smo pomerili tudi trdnost (preglednica IX). Tudi pri liofilizirani tabletirni masi smo ob dodatku citronske kisline imeli težave s tabletiranjem, zato so tudi trdnosti tablet pri nekaterih vzorcih zelo nizke ali zelo visoke. Za redispergiranje smo izbrali tablete, ki so imele najbolj primerno trdnost (za lažjo primerjavo med vzorci). Izjeme so bile seveda nekatere tablete s citronsko kislino. Tablete smo dispergirali v 100 ml vode. Pri tabletah, ki so vsebovale citronsko kislino, smo ob stiku z vodo opazili mehurčke. Razen vzorca brez dodatkov z naknadnim dodatkom citronske kisline in NaHCO₃ ter vzorca s saharozo (s citronsko k. in NaHCO₃), so vse ostale tablete z dodatkom citronske kisline razpadle v 5 min. Tableti z vzorcem s PEG 6000 (z laktozo) in vzorcem brez dodatkov (z naknadno dodano laktozo) sta tudi razpadli v

5 min. Pri ostalih tabletah smo opazili le rahlo razpadanje ali pa razpadanja tablete ob stiku z vodo sploh nismo opazili.

Preglednica IX: Masa in trdnost izdelanih tablet, trdnost tablet izbranih za redispergiranje ter obnašanje tablet ob dodatku vode za posamezne vzorce tablet z liofiliziranimi nanosuspensijami

Vzorci	Masa tablete [mg]	Trdnost tablet [N]	Trdnost tablet za redisp. [N]	Obnašanje tablet v vodi
NS brez dod.	191	75, 75, 75, 69, 65	69, 65	Plava, ne razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	381	64, 63, 69, 75, 76	63, 64	Rahlo razpada
NS+laktoza	391	76, 55, 61, 58, 61	61, 61	Ne razpada
NS s saharozo	254	42, 42, 42, 64, 57	57, 64	Ne razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	45, 71, 60, 70, 51	51, 60	Rahlo razpada
NS+laktoza	454	76, 55, 61, 58, 61	66, 67	Ne razpada
NS z manitolom	254	67, 70, 60, 64, 70	60, 64	Rahlo razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	76, 79, 74, 66, 76	66, 74	Takoj razpadla
NS+laktoza	454	61, 66, 54, 67, 55	66, 67	Rahlo razpada
NS s PEG	254	62, 54, 46, 49, 52	54, 62	Plava, ne razpada
NS+citr.k.+NaHCO ₃	508	36, 49, 46, 41, 45	46, 49	Plava, takoj razpadla
NS+laktoza	454	76, 74, 71, 69, 55	69, 71	Takoj razpadla
NS z NaHCO ₃	254	69, 73, 71, 65, 59	65, 69	Rahlo razpada
NS+citr. k.	381	40, 41, 35	40, 41	Takoj razpadla
NS+laktoza	454	61, 76, 75	75, 76	Takoj razpadla
NS s sah.+NaHCO ₃	339	63, 67, 67	67, 67	Ne razpada
NS+citr. k.	508	80, 78, 45	78, 80	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	59, 72, 63	59, 63	Rahlo razpada
NS z man.+NaHCO ₃	339	75, 76, 69	69, 75	Rahlo razpada
NS+citr. k.	508	34, 31, 41	34, 41	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	55, 71, 55	55, 55	Rahlo razpada
NS s PEG.+NaHCO ₃	339	55, 61, 64	61, 64	Ne razpada
NS+citr. k.	508	27, 31, 29	29, 31	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	75, 74, 68	68, 74	Rahlo razpada

Velikost delcev smo določali v že omenjenih časovnih intervalih. Po 5 min mešanja na magnetnem mešalu (slika 24) je bila velikost delcev najmanjša pri vzorcu s saharozo in NaHCO₃. Velikost delcev v tem vzorcu se ni statistično značilno razlikovala od velikosti delcev v tekoči nanosuspensiji. Malo večje delce, ki pa so statistično začilno večji od delcev v vzorcu s saharozo z NaHCO₃, smo dobili pri dispergiranju vzorca brez dodatkov (z laktozo), vzorca z manitolom (z laktozo) ter vzorca s saharozo in NaHCO₃ (z laktozo).

Pri ostalih vzorcih smo dobili precej večje velikosti delcev, čeprav so tablete popolnoma razpadle v 5 min. Tudi PDI so bili večji pri vzorcih z večjo velikostjo delcev. S t-testom smo tudi preverili vpliv dodatka pomožnih snovi po liofilizaciji na velikost delcev (preglednica X). Izvedli smo tudi F-test, s katerim smo preverili enakost varianc. V nanosuspenziji brez dodatkov (z laktozo) je bila velikost delcev statistično značilno manjša od vzorcev brez naknadnih dodatkov ter z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3 . Pri vzorcih s saharozo in s PEG 6000 je do statistično značilne razlike v velikosti delcev prišlo le med vzorcema z dodano laktozo ter z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3 . Velikost delcev v vzorcu z manitolom (z laktozo) je bila statistično značilno manjša kot pri vzorcu z manitolom brez naknadnih dodatkov ter z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3 . Delci v vzorcu s saharozo z NaHCO_3 so bili značilno manjši od delcev v vzorcu z dodatkom laktoze ter od delcev v vzorcu s citrnsko kislino. Vzorec z manitolom (z NaHCO_3) brez dodatkov je imel statistično značilno manjše delce od vzorca z dodatkom laktoze, oba pa sta imela manjše delce kot vzorec s citrnsko kislino. Manjšo velikost delcev od ostalih dveh vzorcev s PEG 6000 (z NaHCO_3) je imel vzorec brez dodatkov, med vsemi tremi vzorci pa so bile statistično značilne razlike. V skoraj vseh primerih so se delci povečali ob dodatku citronske kisline. Dodatek laktoze razen pri vzorcu brez dodatkov in pri vzorcu z manitolom ni imel statistično značilnega vpliva. Delce, ki so statistično enako veliki kot delce v tekoči nanosuspenziji, smo po 5 min mešanja dobili le pri redispergiranju nanosuspenzije s saharozo in NaHCO_3 .

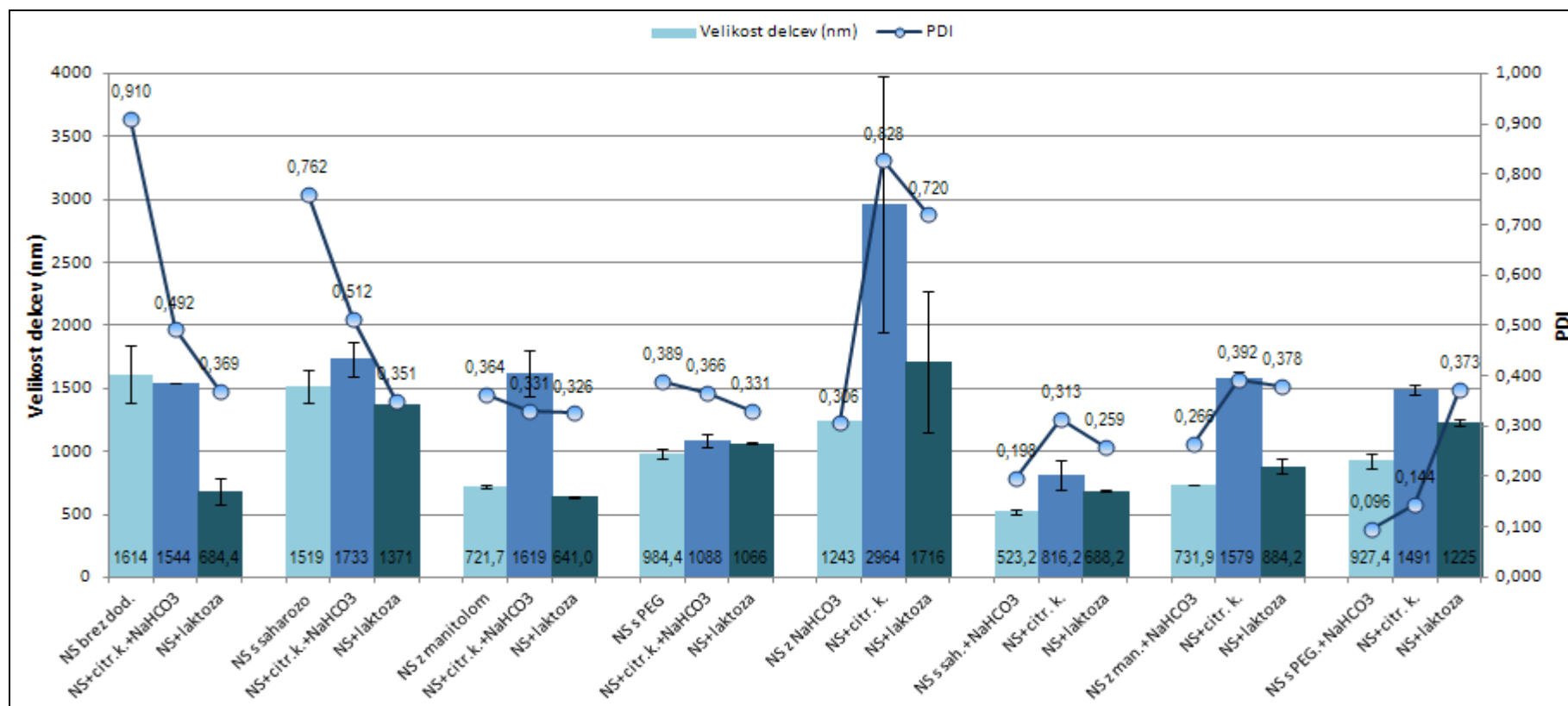
Preglednica X: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 ter dodatka laktoze na velikost delcev po redispergiranju liofiliziranih in tabletiranih nanosuspenzij s HPC po 5 min mešanja z magnetnim mešalom.

NS brez dod. NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS brez dod. NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,8284	0,0214	0,0001
NS s saharozo NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS s saharozo NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,2258	0,3759	0,0107
NS z manitolom NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS z manitolom NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,0024	0,0001	0,0019
NS s PEG NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS s PEG NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza

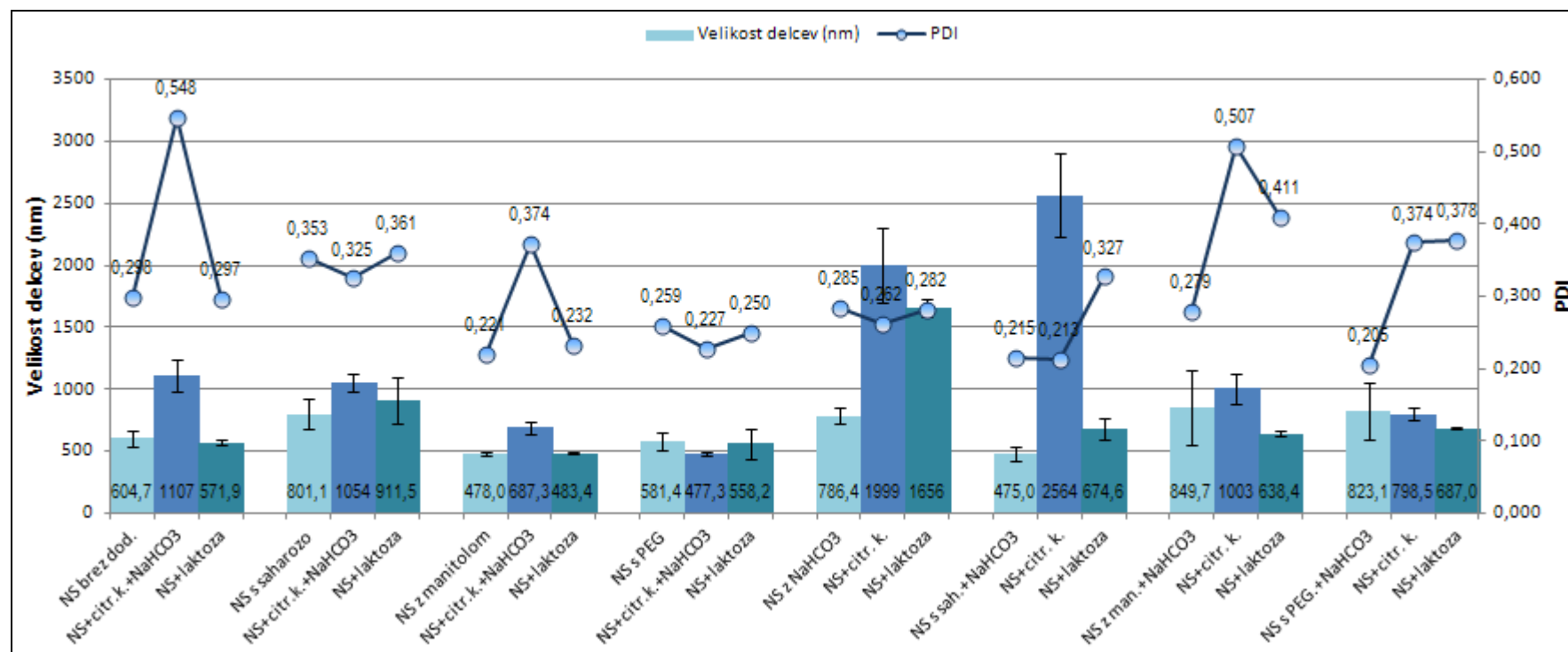
0,1624	0,0630	0,0000
NS z NaHCO ₃ NS+citr. k.	NS z NaHCO ₃ NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0324	0,1623	0,0541
NS s sah.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	NS s sah.+NaHCO ₃ NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0037	0,0038	0,0943
NS z man.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	NS z man.+NaHCO ₃ NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0016	0,0040	0,0003
NS s PEG.+NaHCO ₃ NS+citr. k.	NS s PEG.+NaHCO ₃ NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,000031	0,0001	0,0014

Po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički se je velikost delcev v vseh vzorcih zmanjšala, nekaterim celo na velikost delcev v tekoči nanosuspenziji. Zanimivo pa je, da se je velikost delcev vzorca s saharozo (z NaHCO₃) z dodatkom citronske kisline zelo povečala. Po 24 urah mešanja se velikost delcev v vzorcih ni spremenila, tudi velikost delcev v vzorcu s saharozo (z NaHCO₃) z dodatkom citronske kisline je ostala visoka. Po ponovni inkubaciji v ultrazvočni kadički so se delci še malo zmanjšali. Razen vzorca brez dodatkov (z naknadno dodano citronsko kislino in NaHCO₃), vzorca z dodanim le NaHCO₃ ter vzorca s saharozo (z NaHCO₃) z dodatkom citronske kisline je bila velikost delcev v vseh vzorcih precej pod 1000 nm.

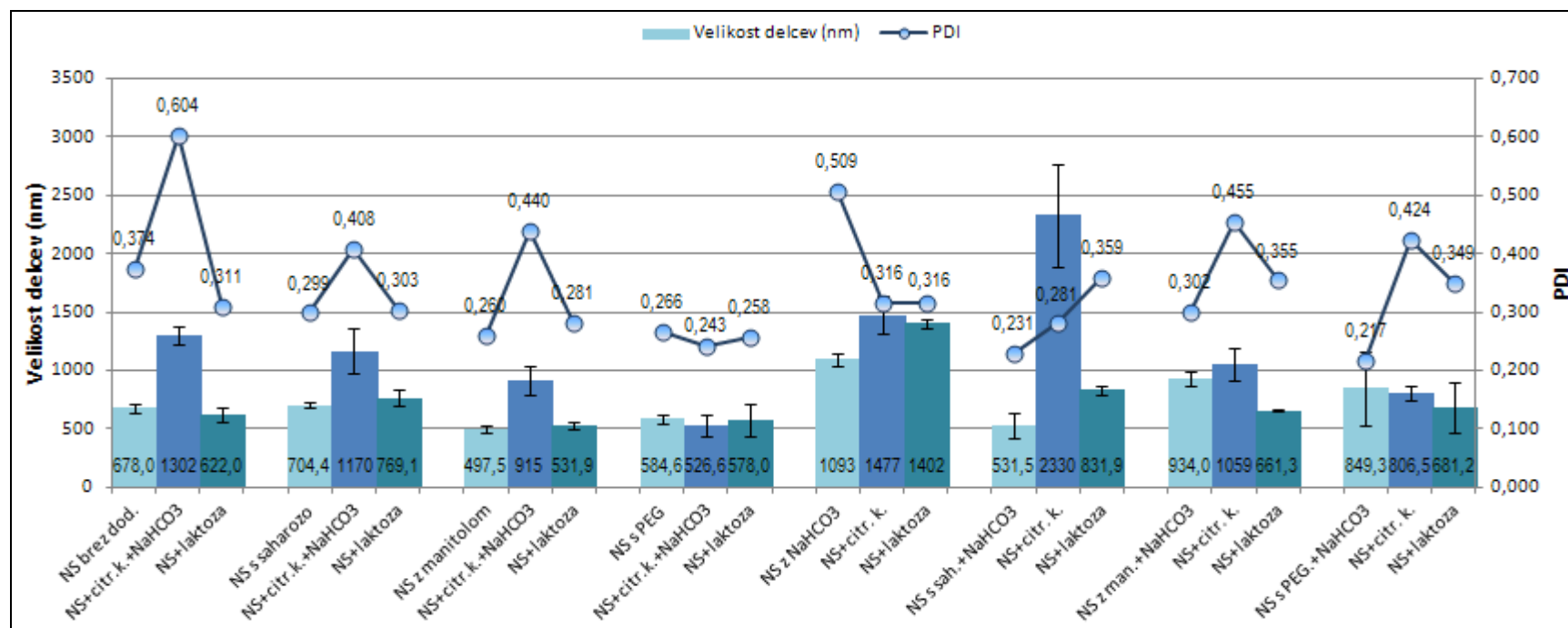
Iz rezultatov lahko povzamemo, da dodatek citronske kisline ne prispeva k zmanjšanju delcev po redispergiranju, temveč so delci ob dodatku citronske kisline večji. Enako lahko zaključimo za dodatek laktoze, saj so bili delci statistično značilno manjši od delcev v vzorcu brez dodatkov le v dveh primerih, v ostalih pa se niso razlikovali ali pa so bili celo večji. Redisperzibilnost je torej predvsem odvisna od pomožne snovi, dodane pred sušenjem.



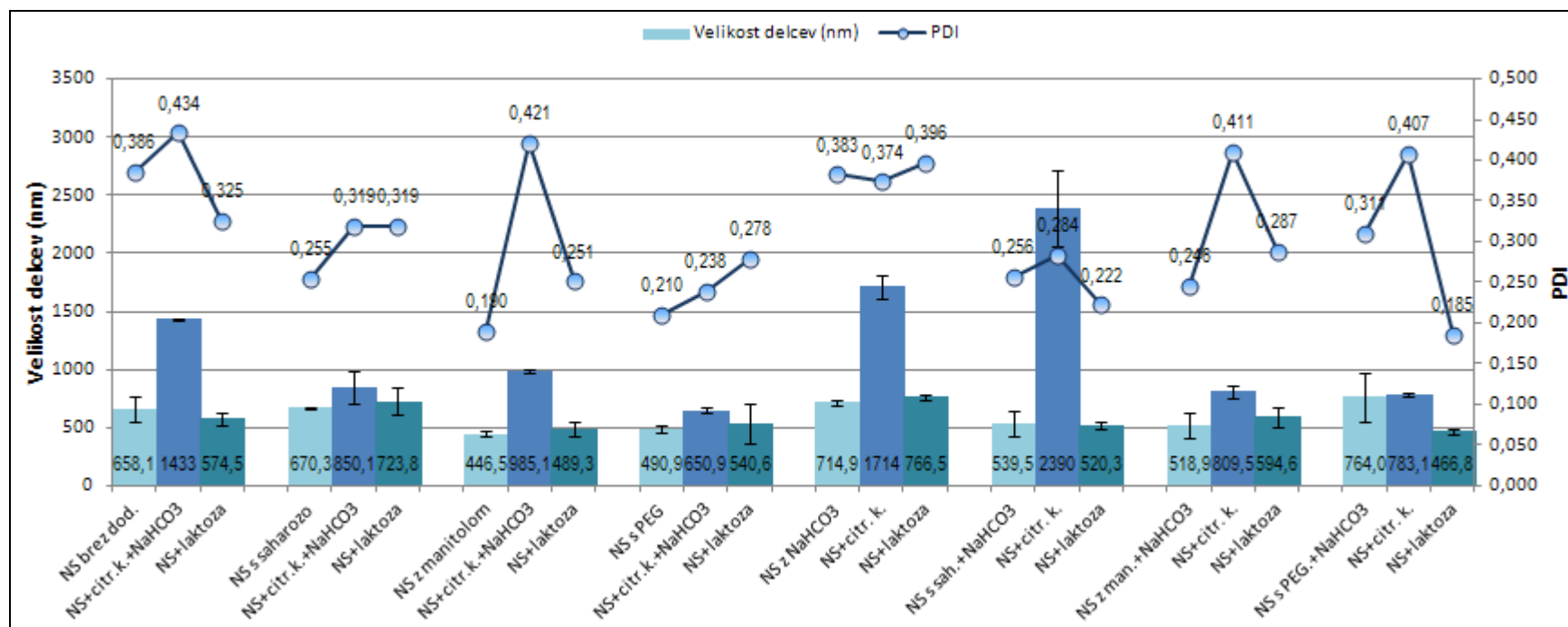
Slika 24: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm



Slika 25: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citrinsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citrinsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 26: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citrsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citrsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.



Slika 27: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi liofiliziranih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s PEG 6000, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred liofilizacijo, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po liofilizaciji dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 460-545 nm.

4.5.3 Izdelava in redispergiranje tablet z nanosuspenzijami, sušenimi z razprševanjem

Za večino vzorcev smo izdelali po 5 tablet. Pri nanosuspenziji brez dodatkov ter pri nanosuspenziji s PEG 6000 in NaHCO_3 smo pri sušenju z razprševanjem imeli zelo slabe izkoristke, zato smo izdelali manj tablet. Vsaki tableti smo pomerili trdnost (preglednica XI). Tablete, ki so vsebovale citronsko kislino, so ponovno imele zelo nizko oziroma zelo visoko trdnost. Tabletirna masa se je že pred tabletiranjem kepila, izdelane tablete pa se med merjenjem trdnosti niso prelomile, temveč so se obnašale kot plastična masa. Zaradi tega razloga smo tabletam s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3) izmerili izredno visoko trdnost. Za poskuse redispergiranja smo izbrali tablete z najprimernejšo trdnostjo (za lažjo primerjavo med vzorci). Poskuse redispergiranja smo izvajali tako, da smo eno tableto potopili v 100 ml vode ter najprej opazovali, ali je tableta ob stiku z vodo začela razpadati (preglednica XI). Vse tablete z dodatkom citronske kisline, razen tablete s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3), so razpadle v 5 min. V tem času so razpadle tudi tablete s saharozo (z NaHCO_3), z manitolom (z NaHCO_3), s saharozo (z dodatkom laktoze) in z manitolom (z dodatkom laktoze). Pri ostalih tabletah smo opazili rahlo razpadanje. Iz tablet s citronsko kislino so med razpadanjem izhajali mehurčki.

Preglednica XI: Masa in trdnost izdelanih tablet, trdnost tablet izbranih za redispergiranje ter obnašanje tablet ob dodatku vode za posamezne vzorce tablet z nanosuspenzijami, sušenimi z razprševanjem

Vzorci	Masa tablete [mg]	Trdnost tablet [N]	Trdnost tablet za redisp. [N]	Obnašanje tablet v vodi
NS brez dod.	191	49, 66, 66	66, 66	Rahlo razpada
NS+citr.k.+ NaHCO_3	381	55, 60, 64, 61	61, 64	Takoj razpadla
NS+laktoza	391	78, 75, 69, 79, 74	69, 74	Rahlo razpada
NS s saharozo	254	54, 64, 67, 46, 57	54, 57	Rahlo razpada
NS+citr.k.+ NaHCO_3	508	102, 145, 244, 407, 407	102, 145	Rahlo razpada
NS+laktoza	454	42, 43, 46, 76, 81	43, 46	Takoj razpadla
NS z manitolom	254	52, 71, 50, 58, 69	69, 71	Rahlo razpada
NS+citr.k.+ NaHCO_3	508	40, 66, 75, 72, 78	66, 72	Takoj razpadla
NS+laktoza	454	53, 79, 54, 44, 69	53, 54	Takoj razpadla
NS z NaHCO_3	254	76, 50, 51, 53, 70	52, 53	Rahlo razpada
NS+citr. k.	381	42, 53, 55, 35, 54	54, 55	Takoj razpadla
NS+laktoza	454	70, 61, 55, 64, 58	61, 64	Rahlo razpada
NS s sah.+ NaHCO_3	339	75, 69, 61, 55, 66	66, 69	Takoj razpadla

NS+citr. k.	508	71, 58, 49, 36, 81	58, 71	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	75, 58, 67, 53, 64	64, 67	Rahlo razpada
NS z man.+NaHCO ₃	339	67, 67, 58, 51, 53	67, 67	Takoj razpadla
NS+citr. k.	508	49, 56, 51, 48, 42	51, 56	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	65, 76, 53, 52, 52	53, 65	Rahlo razpada
NS s PEG.+NaHCO ₃	339	75, 67, 71	67, 71	Ne razpada
NS+citr. k.	508	61, 49, 37	49, 61	Takoj razpadla
NS+laktoza	539	73, 79, 83	73, 79	Rahlo razpada

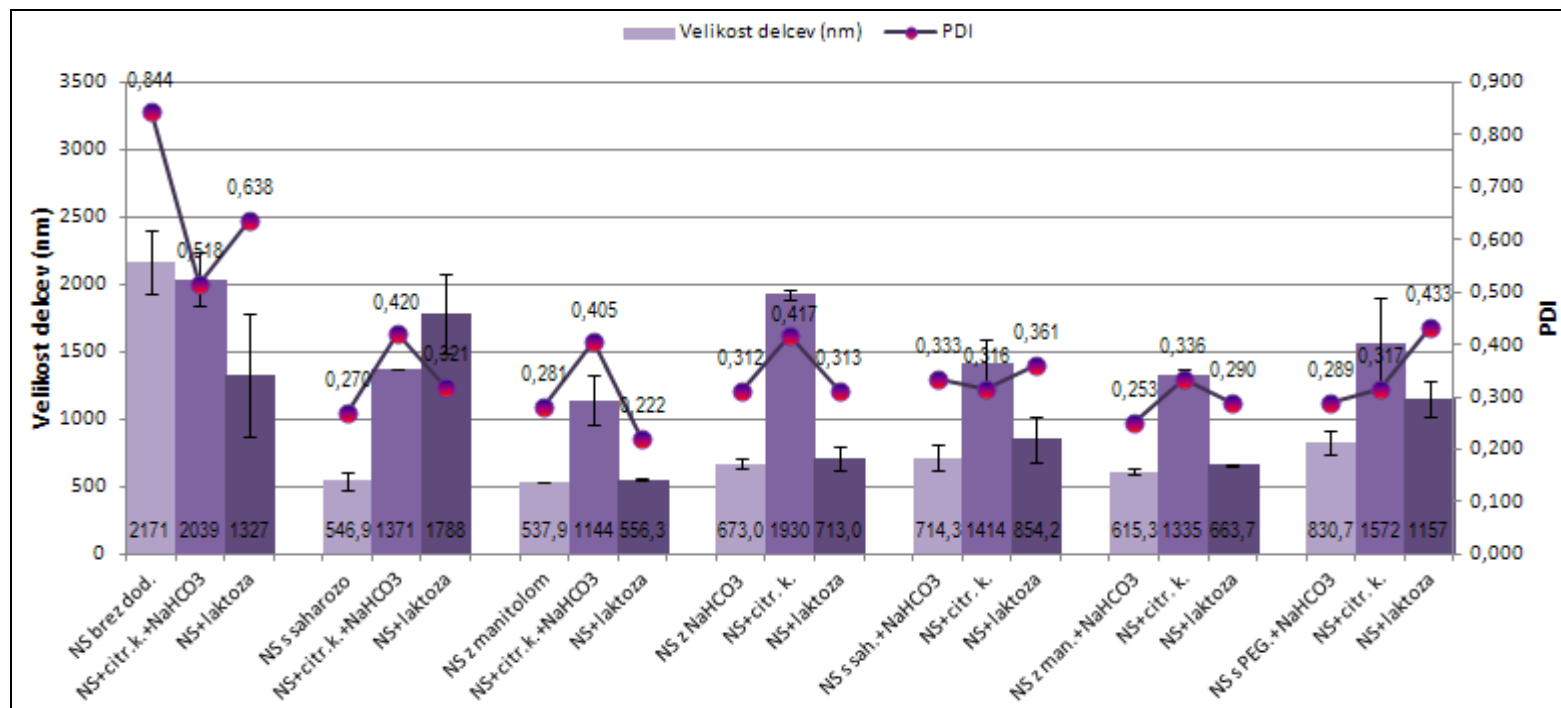
Vzorcem smo velikost delcev določali v že omenjenih časovnih intervalih. Po 5 min mešanja na magnetnem mešalu (slika 28) smo najmanjše velikosti delcev izmerili pri vzorcih s saharozo, z manitolom ter z manitolom in dodatkom NaHCO₃. Velikost delcev v teh vzorcih ni statistično značilno različna od velikosti delcev v tekoči nanosuspenziji, v vseh ostalih vzorcih pa je razlika statistično značilna. Velikost delcev pod 1000 nm smo izmerili v vzorcu z dodanim NaHCO₃ (brez naknadnih dodatkov ter z dodatkom laktoze), s saharozo in NaHCO₃ (brez naknadnih dodatkov ter z dodatkom laktoze), z manitolom (z dodatkom laktoze), z manitolom in NaHCO₃ (z dodatkom laktoze) ter s PEG 6000 z dodanim NaHCO₃. Velikost delcev v ostalih vzorcih je bila večja od 1000 nm. S t-testom smo testirali vpliv dodatka pomožnih snovi po sušenju na velikost delcev v vzorcih (preglednica XII). Opravili smo tudi F-test, s katerim smo preverili enakost varianc. Opazimo lahko, da je velikost delcev ob dodatku citronske kisline v primerjavi z velikostjo delcev brez dodatka oz. ob dodatku laktoze statistično značilno večja v vzorcih z manitolom, s saharozo (z NaHCO₃) in z manitolom (z NaHCO₃) ter v vzorcu z dodanim le NaHCO₃. V teh primerih se vzorca brez predhodnih dodatkov ter z dodano laktozo v velikosti delcev med seboj ne razlikujeta statistično značilno. V vzorcu s saharozo brez naknadnih dodatkov je velikost delcev statistično značilno manjša od velikosti delcev v vzorcih z dodatkom citronske kisline in NaHCO₃ ter z dodatkom laktoze. Dodatek pomožnih snovi v vzorcu brez predhodnih dodatkov ni statistično značilno vplival na velikost delcev. Pri vzorcu s PEG 6000 (z NaHCO₃) lahko opazimo, da je dodatek pomožnih snovi po sušenju statistično značilno povečal velikost delcev. Dodatek citronske kisline torej ne pripomore k zmanjševanju velikosti delcev v vzorcih, temveč se velikost delcev v naših primerih celo poveča. Z dodatkom laktoze se velikost delcev v primerjavi z vzorcem brez dodatkov v večini primerov statistično značilno ne spremeni.

Preglednica XII: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva dodatka citronske kisline in NaHCO_3 ter dodatka laktoze na velikost delcev po redispergiranju z razprševanjem sušenih in tabletiranih nanosuspenzij s HPC.

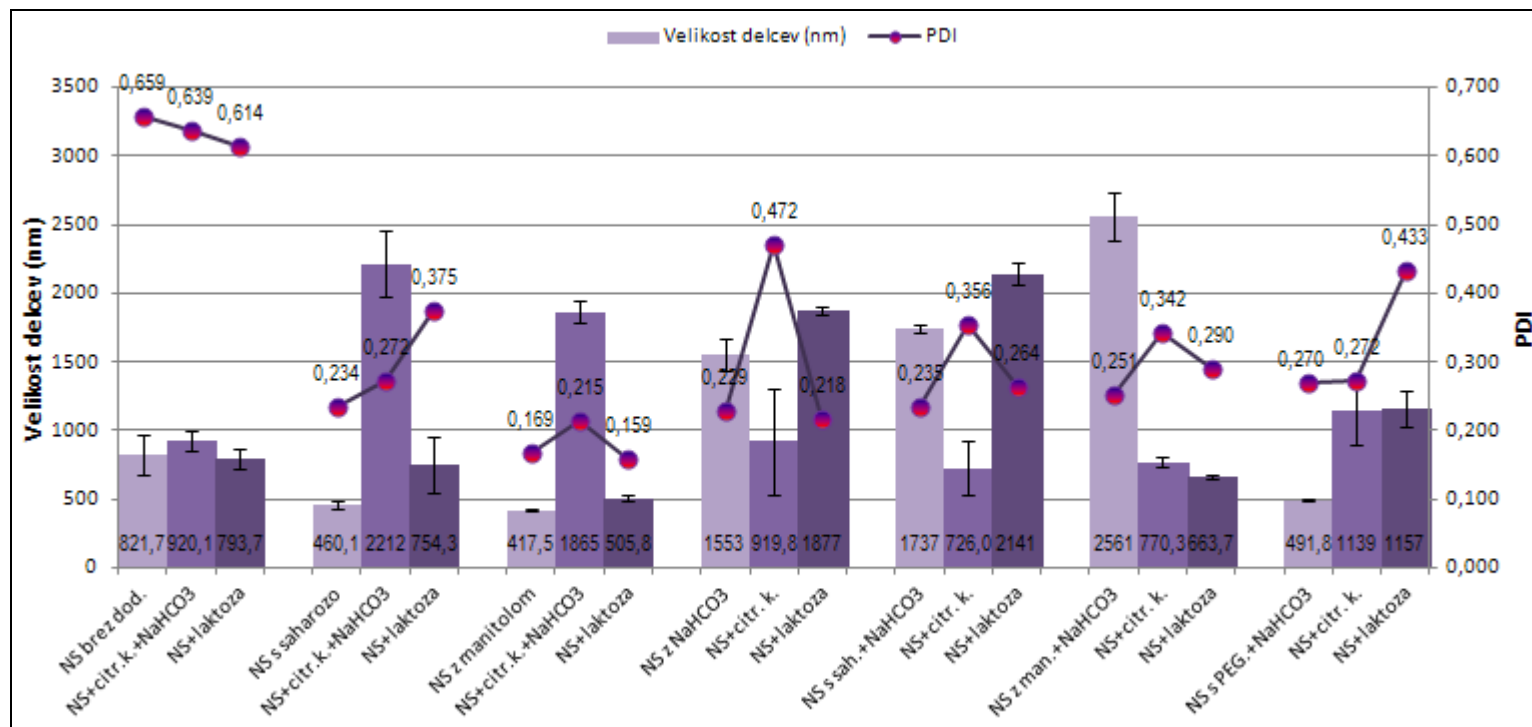
NS brez dod. NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS brez dod. NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,7824	0,1216	0,0154
NS s saharozo NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS s saharozo NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,0002	0,0001	0,0420
NS z manitolom NS+citr.k.+ NaHCO_3	NS z manitolom NS+laktoza	NS+citr.k.+ NaHCO_3 NS+laktoza
0,0105	0,5306	0,0134
NS z NaHCO_3 NS+citr. k.	NS z NaHCO_3 NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0000	0,4309	0,0000
NS s sah.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	NS s sah.+ NaHCO_3 NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0005	0,1414	0,0045
NS z man.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	NS z man.+ NaHCO_3 NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0001	0,4039	0,0000
NS s PEG.+ NaHCO_3 NS+citr. k.	NS s PEG.+ NaHCO_3 NS+laktoza	NS+citr. k. NS+laktoza
0,0052	0,0170	0,0650

Velikost delcev smo določali po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički (slika 29). V vzorcu brez predhodnih dodatkov se je velikost delcev zmanjšala, tako se je zgodilo še vzorcu s PEG 6000 (z NaHCO_3). Opazimo pa lahko izrazito povečanje velikosti delcev v nekaterih vzorcih. Velikost delcev v vzorcu s saharozo (z dodano citronsko kislino in NaHCO_3), vzorcu z NaHCO_3 (brez naknadnih dodatkov ter z dodano laktozo), vzorcu s saharozo in NaHCO_3 (brez naknadnih dodatkov ter z dodano laktozo) in vzorcu z manitolom in NaHCO_3 . Najmanjše velikosti delcev smo izmerili pri vzorcih s saharozo, z manitolom ter s PEG 6000 (z NaHCO_3). Po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu (slika 30) so velikosti delcev ostale približno enake. Po 15 min ponovne inkubacije v ultrazvočni kadički se je velikost delcev v vzorcih spet nekoliko zmanjšala (slika 31).

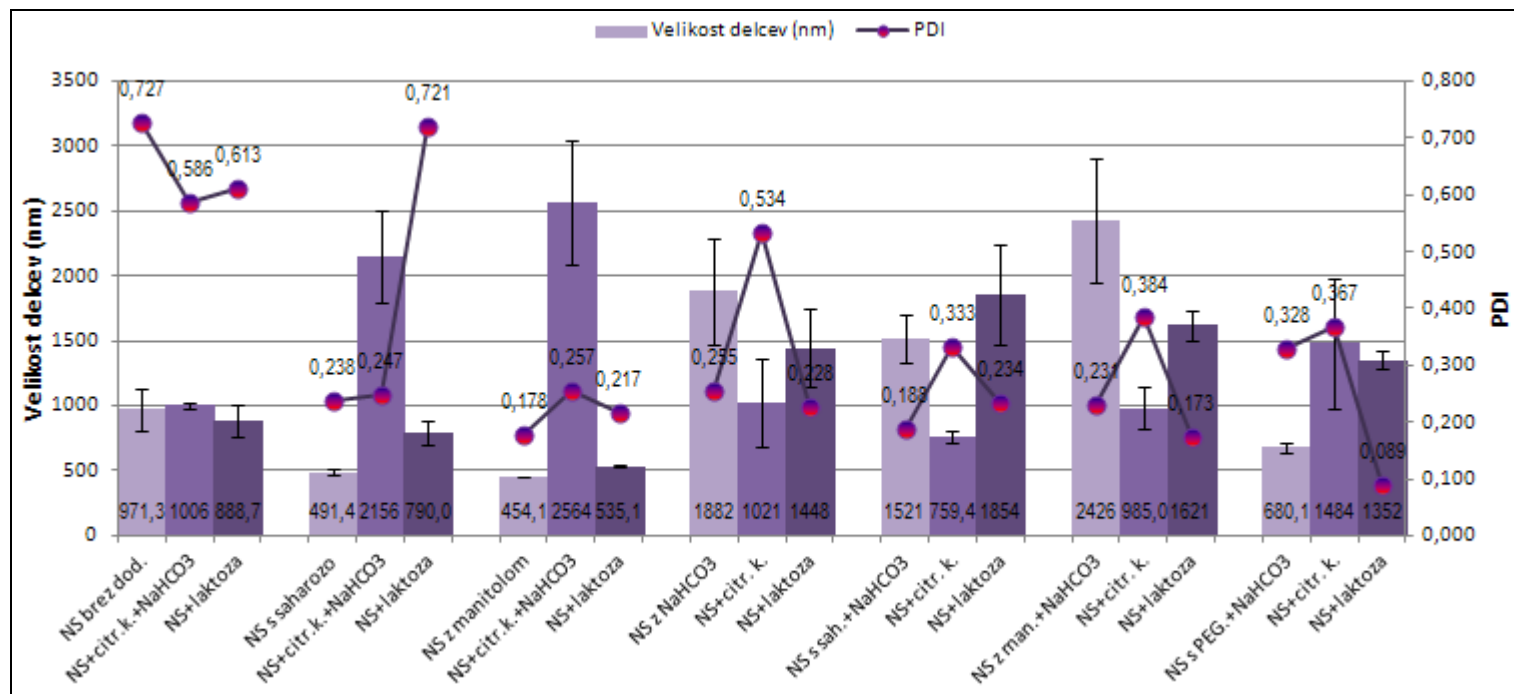
Zaključimo lahko, da dodatek citronske kisline in NaHCO_3 ter dodatek laktoze ne prispevata k boljši redisperzibilnosti, ampak je ta odvisna od pomožne snovi, ki smo jo dodali pred sušenjem.



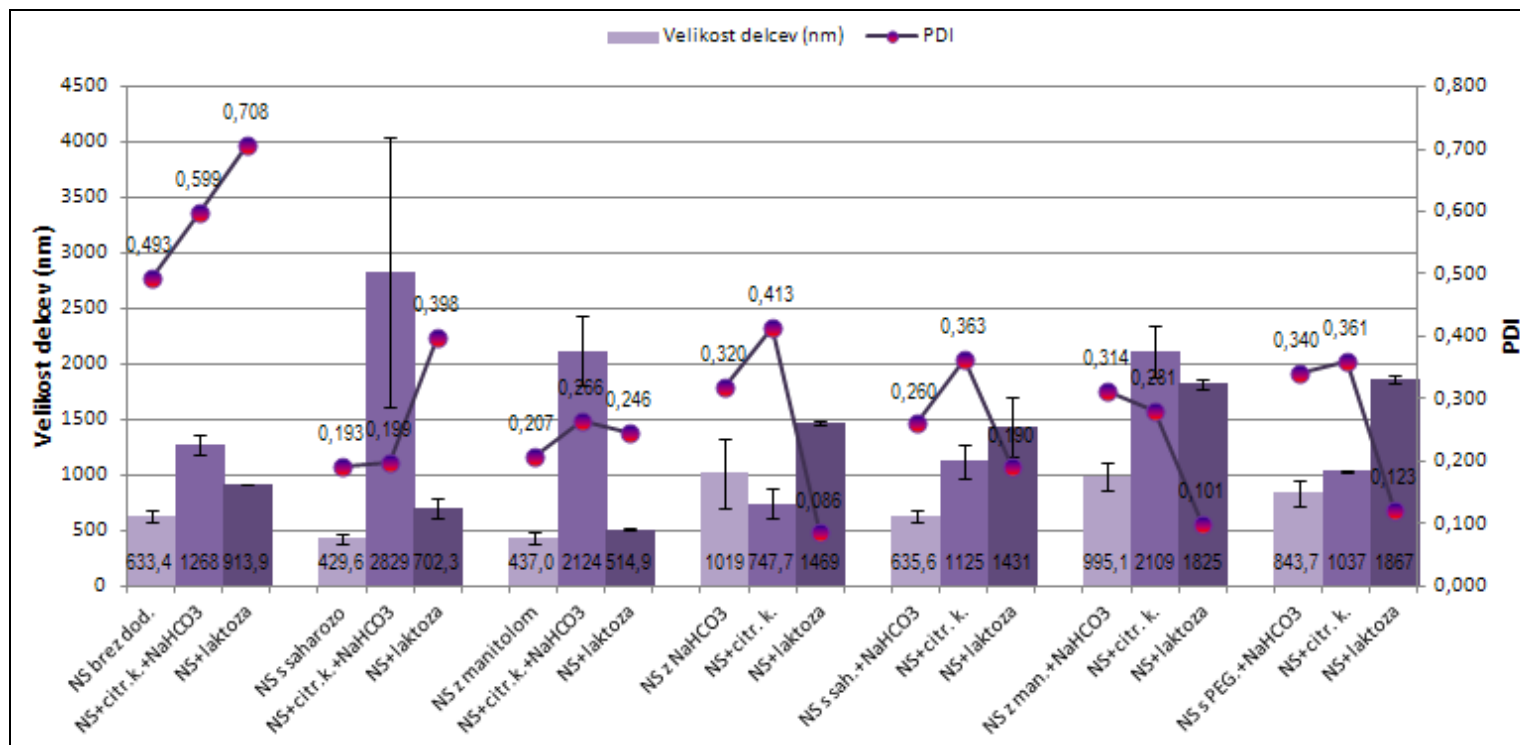
Slika 28: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.



Slika 29: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 5 min mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.



Slika 30: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja na magnetnem mešalu. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.



Slika 31: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi z razprševanjem sušenih in tabletiranih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, samo z NaHCO₃, s saharozo (z NaHCO₃), z manitolom (z NaHCO₃) ter s PEG 6000 (z NaHCO₃) po 24 urah mešanja in 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički. Temnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še citronsko kislino in NaHCO₃. Tistim, ki vsebujejo NaHCO₃ že pred sušenjem, smo dodali le citronsko kislino. Najtemnejši stolpci predstavljajo velikost delcev in PDI NS, ki smo jim po sušenju dodali še laktozo sušeno z razprševanjem. Povprečna velikost delcev v začetni suspenziji je bila 470-540 nm.

4.6 Primerjava metod sušenja nanosuspenzij

S statistično obdelavo podatkov smo tudi želeli ugotoviti, kako različne metode sušenja vplivajo na velikost delcev v vzorcih. Za testiranje vpliva smo izbrali t-test. Pred uporabo t-testa smo enakost varianc preverili z F-testom. Metode smo primerjali na različnih vzorcih. Vzorec smo izbrali na podlagi velikosti delcev tako, da smo v vzorcu pri vseh treh metodah sušenja izmerili čim manjšo velikost delcev po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Čeprav smo določili manjšo velikost delcev tudi v vzorcih, ki smo jim pred sušenjem dodali tudi NaHCO_3 , jih za to primerjavo nismo mogli uporabiti, saj teh vzorcev nismo sušili v sušilniku. Prav tako nismo mogli uporabiti vzorca s PEG 6000, saj je med sušenjem z razprševanjem prišlo do prevelikih izgub in ga zato nismo uporabili za nadaljnje poskuse. Metode sušenja smo med seboj primerjali tako z netabletiranimi nanosuspenzijami kot z izdelanimi tabletami.

4.6.1 Primerjava metod sušenja nanosuspenzij

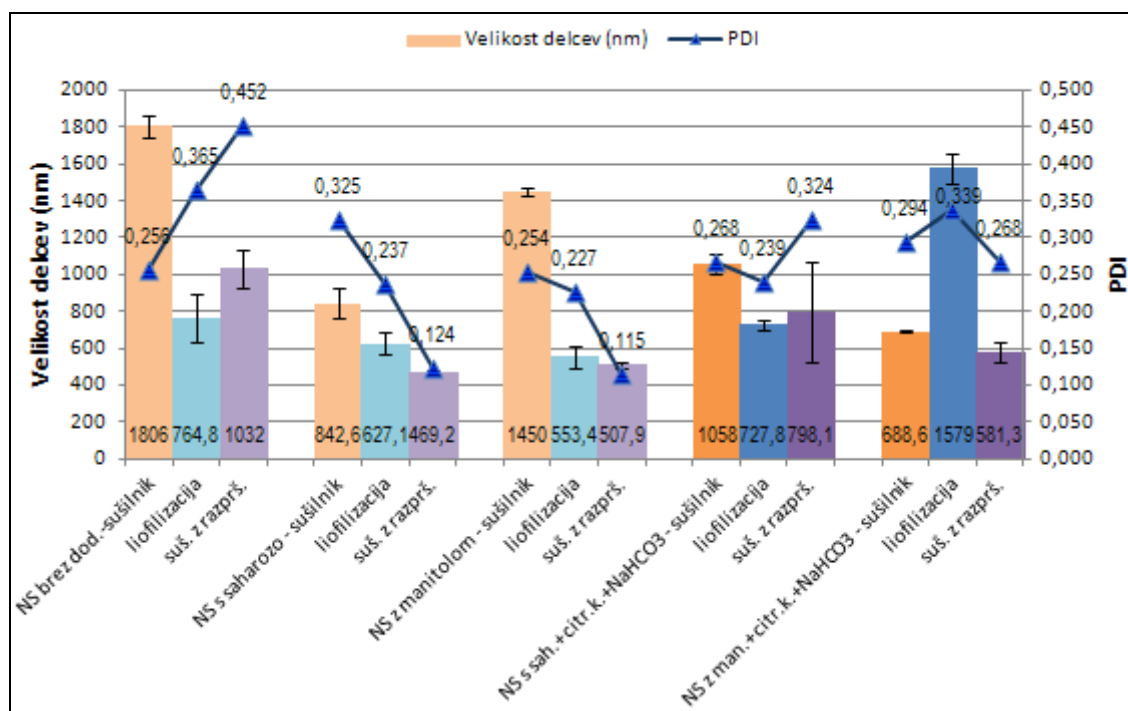
Metode sušenja smo primerjali z vzorci, ki smo jih redispergirali po sušenju nanosuspenzij (preglednica XIII). Uporabili smo nanosuspenzijo brez dodatkov ter nanosuspenzije s saharozo, z manitolom, s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3) in z manitolom (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3). Povprečne velikosti delcev so prikazane na sliki 32. Pri vzorcu brez dodatkov je do statistično značilne razlike v velikosti delcev prišlo med vsemi tremi metodami sušenja. Najmanjšo velikost delcev smo izmerili pri liofilizirani nanosuspenziji. Velikost delcev v vzorcu s saharozo je bila statistično značilno najmanjša, ko smo nanosuspenzijo sušili z razprševanjem. V vzorcu z manitolom smo najmanjše delce izmerili pri liofilizirani ter pri z razprševanjem sušeni nanosuspenziji. Z obema metodama smo dobili statistično značilno manjšo velikost delcev kot s sušenjem v sušilniku, med njima pa ni bilo statistično značilne razlike. Vpliv metode sušenja na velikost delcev smo preverjali tudi z vzorci, ki smo jim naknadno dodali citronsko kislino in NaHCO_3 . V vzorcu s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3) smo najmanjšo velikost izmerili pri liofilizirani nanosuspenziji. Velikost delcev v tem vzorcu je bila statistično značilno manjša od velikosti delcev v sušilniku sušene nanosuspenzije, ni se pa statistično značilno razlikovala od velikosti delcev z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Velikost delcev vzorca z manitolom (z dodatkom citronske kisline in

NaHCO₃) je bila statistično značilno največja pri liofiliziranem vzorcu, statistično značilno najmanjše delce pa smo dobili po sušenju z razprševanjem.

Na splošno lahko rečemo, da sušenje v sušilniku najslabše vpliva na redisperzibilnost nanosuspenzije. Pri sušenju z liofilizacijo smo v vzorcih s saharozo in z manitolom dobili delce, ki so statistično značilno enaki delcem v tekoči nanosuspenziji. V primeru sušenja z razprševanjem smo delce, ki so bili statistično značilno enaki delcem v tekoči nanosuspenziji, dobili v vzorcih s saharozo in s saharozo z dodatkom citronske kisline in NaHCO₃.

Preglednica XIII: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva metode sušenja na velikost delcev po redispergiranju netabletiranih nanosuspenzij s HPC

NS brez dod.-sušilnik lioofilizacija	NS brez dod.-sušilnik suš. z razprš.	lioofilizacija suš. z razprš.
0,00000000000006	0,0000064	0,0040
NS s saharozo - sušilnik lioofilizacija	NS s saharozo - sušilnik suš. z razprš.	lioofilizacija suš. z razprš.
0,0123	0,0001	0,0131
NS z manitolom - sušilnik lioofilizacija	NS z manitolom - sušilnik suš. z razprš.	lioofilizacija suš. z razprš.
0,0000005	0,000000001	0,3210
NS s sah.+citr.k.+NaHCO ₃ - sušilnik lioofilizacija	NS s sah.+citr.k.+NaHCO ₃ - sušilnik suš. z razprš.	lioofilizacija suš. z razprš.
0,0001	0,3638	0,7915
NS z man.+citr.k.+NaHCO ₃ - sušilnik lioofilizacija	NS z man.+citr.k.+NaHCO ₃ - sušilnik suš. z razprš.	lioofilizacija suš. z razprš.
0,0022	0,0224	0,0001



Slika 32: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi posušenih NS s HPC brez dodatkov, s saharozo, z manitolom, s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3) in z manitolom (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3). Oranžni stolpci predstavljajo v sušilniku sušene nanosuspenzije, modri liofilizirane nanosuspenzije, vijolični pa z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 460-545 nm.

4.6.2 Primerjava metod sušenja s tabletiranimi nanosupenzijami

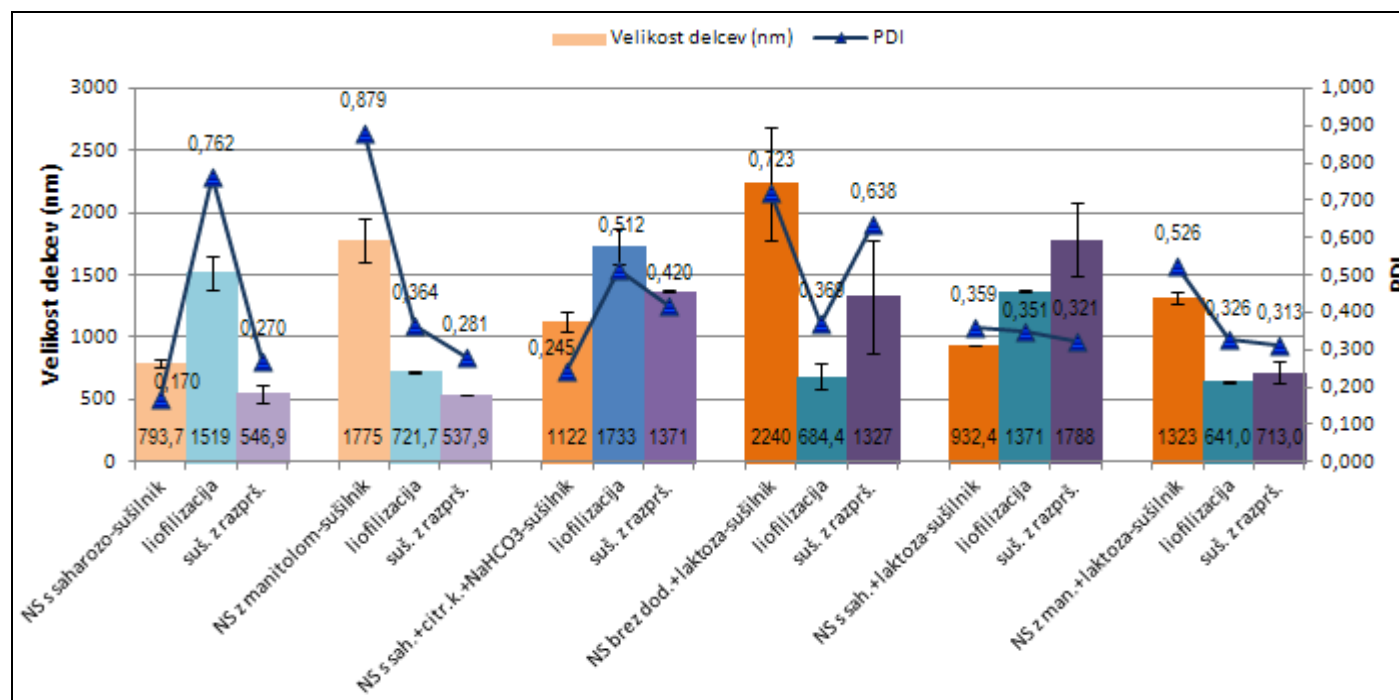
Metode sušenja smo primerjali tudi z vzorci, iz katerih smo izdelali tablete in jih nato redispergirali (preglednica XIV). Uporabili smo vzorce s saharozo (brez naknadnih dodatkov, z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3 ter z dodatkom laktoze), z manitolom (brez naknadnih dodatkov ter z dodatkom laktoze) ter vzorec brez predhodnih dodatkov z naknadno dodano laktozo. Povprečne velikosti delcev za posamezne vzorce so prikazani na sliki 33. Pri vseh vzorcih je obstajala statistično značilna razlika v velikosti delcev med vsemi tremi metodami sušenja. V vzorcu s saharozo in manitolom smo statistično značilno najmanjšo velikost delcev dobili s sušenjem z razprševanjem. Velikost delcev v vzorcu s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3) ter v vzorcu s saharozo z dodatkom laktoze je bila najmanjša z metodo sušenja v sušilniku. V vzorcu brez predhodnih dodatkov (z dodano laktozo) ter v vzorcu z manitolom (z dodano laktozo) smo najmanjšo velikost delcev dobili z liofilizacijo. Delce, ki so bili statistično značilno enaki delcem v tekoči

nanosuspenziji, smo dobili le z metodo sušenja z razprševanjem, in sicer v vzorcih s saharozo in z manitolom.

Preglednica XIV: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva metode sušenja na velikost delcev po redispergiranju tabletiranih nanosuspenzij s HPC

NS s saharozo - sušilnik liofilizacija	NS s saharozo - sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0141	0,0013	0,0006
NS z manitolom-sušilnik liofilizacija	NS z manitolom-sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0023	0,0010	0,0044
NS s sah.+citr.k.+NaHCO ₃ -sušilnik liofilizacija	NS s sah.+citr.k.+NaHCO ₃ -sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0004	0,0173	0,0123
NS brez dod.+laktoza-sušilnik liofilizacija	NS brez dod.+laktoza-sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0045	0,0189	0,0386
NS s sah.+laktoza-sušilnik liofilizacija	NS s sah.+laktoza-sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0000002	0,0059	0,0410
NS z man.+laktoza-sušilnik liofilizacija	NS z man.+laktoza-sušilnik suš. z razprš.	liofilizacija suš. z razprš.
0,0018	0,0011	0,0003

Če povzamemo rezultate netabletiranih in tabletiranih nanosuspenzij, smo najmanjšo velikost delcev, ki se je statistično značilno razlikovala od ostalih, največkrat izmerili v vzorcih, sušenih z razprševanjem (petkrat). Štirikrat je bila velikost delcev statistično značilno najmanjša v liofiliziranih vzorcih, s sušenjem v sušilniku pa smo najmanjšo velikost delcev izmerili dvakrat. Statistično značilno enake delce kot v tekoči nanosuspenziji smo največkrat izmerili v vzorcih, sušenih z razprševanjem. Zaključimo lahko, da se je metoda sušenja z razprševanjem v naših poskusih izkazala za najboljšo, vendar smo dobre rezultate dosegli tudi z liofilizacijo.



Slika 33: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi tabletiranih NS s HPC s saharozo, z manitolom, s saharozo (z dodatkom citronske kisline in NaHCO_3), brez predhodnih dodatkov (z laktozo), s saharozo (z laktozo) in z manitolom (z laktozo). Oranžni stolpci predstavljajo v sušilniku sušene nanosuspenzije, modri liofilizirane nanosuspenzije, vijolični pa z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 460-545 nm.

4.7 Vpliv izdelave tablet na velikost delcev

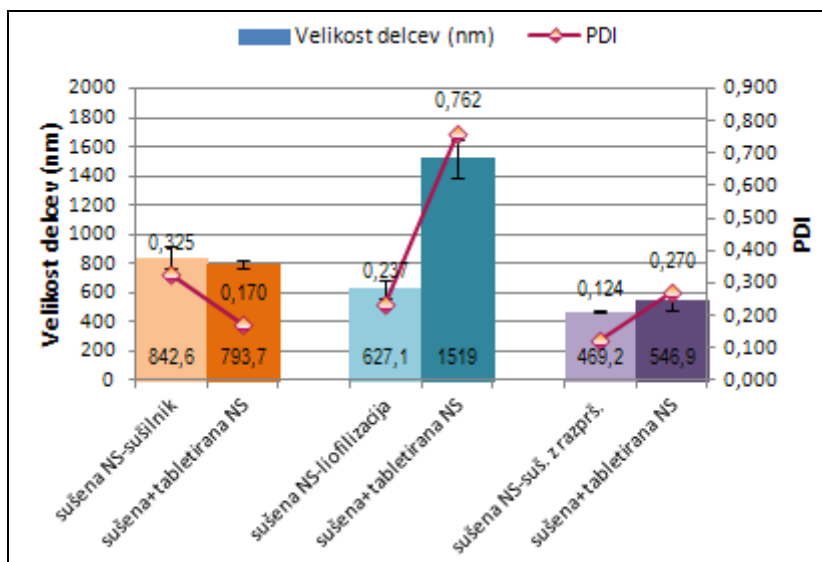
Preverili smo tudi ali izdelava tablet iz posušene nanosuspenzije vpliva na velikost delcev po redispergiranju. Primerjali smo velikost delcev v treh vzorcih (sušene z vsemi tremi metodami), ki smo jo izmerili po redispergiranju netabletirane in nato tabletirane nanosuspenzije. Za testiranje vpliva tabletiranja smo uporabili t-test. Še prej smo naredili F-test, da smo preverili enakost varianc. Uporabili smo tri vzorce, pri katerih smo pri vseh treh metodah sušenja določili čim manjšo velikost delcev po 5 min mešanja na magnetnem mešalu. Vzorcev, ki smo jim pred sušenjem dodali NaHCO_3 , za to primerjavo nismo mogli uporabiti, ker jih nismo sušili v sušilniku. Zaradi velikih izgub pri sušenju z razprševanjem prav tako nismo mogli primerjati vzorca s PEG 6000.

4.7.1 Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec s saharozo

Primerjali smo velikost delcev med sušeno (netabletirano) nanosuspenzijo in tabletirano nanosuspenzijo za vse tri metode sušenja (preglednica XV). Povprečne velikosti delcev so prikazane na sliki 34. Ko smo vzorec sušili v sušilniku, se velikost delcev med netabletirano in tabletirano nanosuspenzijo ni statistično značilno razlikovala. Prav tako ni prišlo do statistično značilne razlike v velikosti delcev, ko smo vzorec sušili z razprševanjem. Statistično značilno manjše delce smo izmerili pri liofiliziranem vzorcu, in sicer v netabletirani nanosuspenziji. Ta razlika je predvsem posledica zelo velikih delcev po tabletiranju liofiliziranega vzorca, ki je bila dosti večja kot v vseh drugih primerih sušenja.

Preglednica XV: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva izdelave tablet na velikost delcev po redispergiranju nanosuspenzij s HPC s saharozo

Nanosuspenzije	p vrednosti
sušena NS-sušilnik sušena+tabletirana NS	0,3491
sušena NS-liofilizacija sušena+tabletirana NS	0,0068
sušena NS-suš. z razprš. sušena+tabletirana NS	0,1499



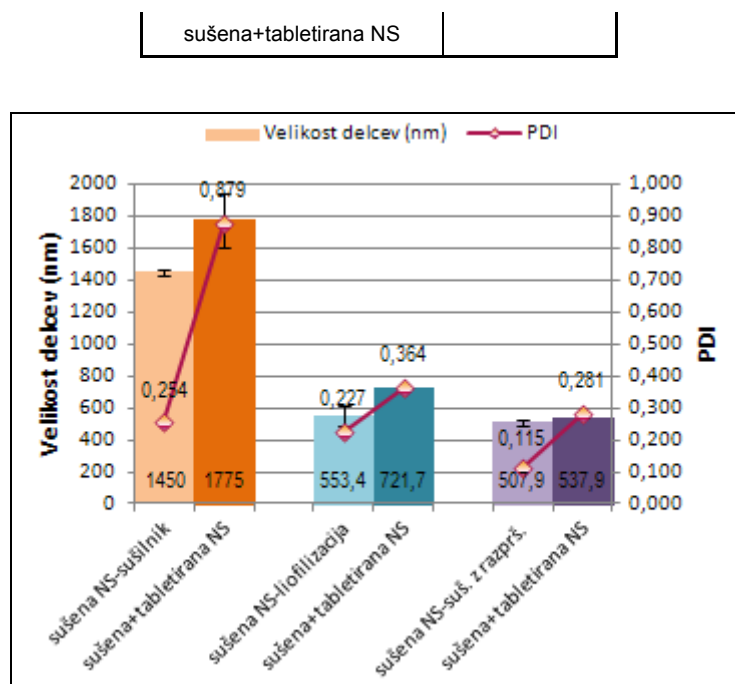
Slika 34: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi sušenih (netabletiranih) in tabletiranih NS s HPC s saharozo. Oranžni stolpci predstavljajo v sušilniku sušene nanosuspenzije, modri liofilizirane nanosuspenzije, vijolični pa z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 460-545 nm.

4.7.2 Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec z manitolom

Tudi za vzorec z manitolom smo primerjali velikost delcev med sušeno (netabletirano) nanosuspenzijo in tabletirano nanosuspenzijo za vse tri metode sušenja (preglednica XVI). Na sliki 35 so prikazane povprečne velikosti delcev. Pri vzorcu sušenem v sušilniku in liofiliziranem vzorcu lahko med tabletirano in netabletirano nanosuspenzijo opazimo statistično značilno razliko v velikosti delcev. V obeh primerih je po tabletiranju prišlo do povečanja velikosti delcev. Ko smo vzorec sušili z razprševanjem, pa se velikost delcev po tabletiranju ni statistično značilno spremenila.

Preglednica XVI: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva izdelave tablet na velikost delcev po redispergiranju nanosuspenzij s HPC z manitolom

Nanosuspenzije	p vrednosti
sušena NS-sušilnik sušena+tabletirana NS	0,0254
sušena NS-liofilizacija sušena+tabletirana NS	0,0200
sušena NS-suš. z razprš.	0,3152



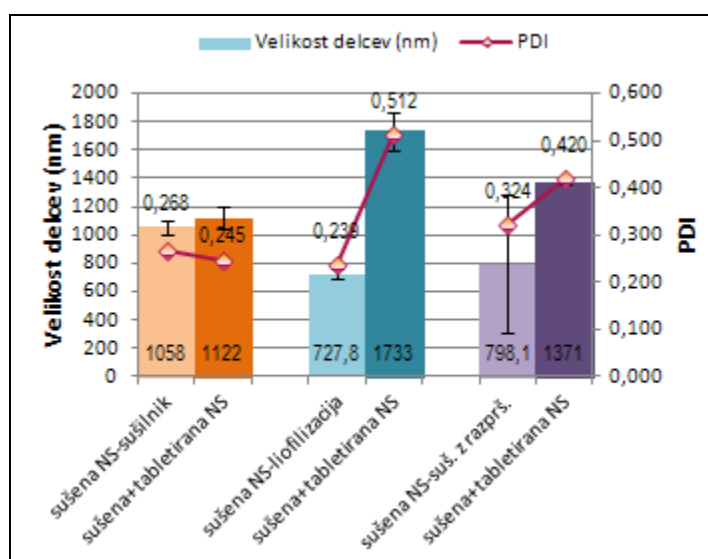
Slika 35: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi sušenih (netabletiranih) in tabletiranih NS s HPC z manitolom. Oranžni stolpci predstavljajo v sušilniku sušene nanosuspenzije, modri liofilizirane nanosuspenzije, vijolični pa z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 460-545 nm.

4.7.3 Vpliv izdelave tablet na velikost delcev za vzorec s saharozo (z dodano citronsko kislino in NaHCO_3)

Primerjali smo velikost delcev med sušeno (netabletirano) nanosuspenzijo in tabletirano nanosuspenzijo tudi za vzorec, ki smo mu po sušenju dodali citronsko kislino in NaHCO_3 . Kot pri prejšnjih primerih smo vpliv tabletiranja testirali za vse tri metode sušenja (preglednica XVII). Na sliki 36 so prikazane povprečne velikosti delcev. Pri vzorcih, sušenih v sušilniku ni prišlo do statistično značilne spremembe v velikosti delcev po tabletiranju. Statistično značilno večji delci so po tabletiranju nastali le v primeru liofilizacije vzorca. Pri vzorcu, sušenim z razprševanjem so po tabletiranju nastali večji delci. Razlike v velikosti delcev nismo mogli statistično dokazati zaradi velikega standardnega odklona pri netabletiranem vzorcu.

Preglednica XVII: p vrednosti za dvostranski t-test z enakima variancama pri $\alpha=0,05$ za testiranje vpliva izdelave tablet na velikost delcev po redispergiranju nanosuspenzij s HPC s saharozo (z dodano citrsko kislino in NaHCO_3)

Nanosuspenzije	p vrednosti
sušena NS-sušilnik sušena+tabletirana NS	0,3283
sušena NS-liofilizacija sušena+tabletirana NS	0,00001
sušena NS-suš. z razprš. sušena+tabletirana NS	0,0989



Slika 36: Povprečne velikosti delcev in polidisperzni indeksi sušenih (netabletiranih) in tabletiranih NS s HPC saharozo (z dodano citrsko kislino in NaHCO_3). Oranžni stolpci predstavljajo v sušilniku sušene nanosuspenzije, modri liofilizirane nanosuspenzije, vijolični pa z razprševanjem sušene nanosuspenzije. Povprečna velikost delcev v začetni nanosuspenziji je bila 460-545 nm.

V večini primerov torej ni prišlo do statistično značilnega povečanja velikosti delcev po tabletiranju. Pri vseh vzorcih so se delci po tabletiranju statistično značilno povečali pri liofilizaciji, pri vzorcu z manitolom pa tudi, ko smo nanosuspenzije sušili v sušilniku. Zaključimo lahko, da vpliv tabletiranja ni velik, še posebej v primeru sušenja v sušilniku. V določenih primerih pa lahko tabletiranje vodi v povečanje delcev.

5 SKLEP

Nanosuspenzije smo pripravili z mletjem v planetarnem krogličnem mlinu, jim dodajali različne pomožne snovi ter jih posušili s tremi različnimi metodami (v sušilniku, z liofilizacijo in s sušenjem z razprševanjem), jim ponovno dodali različne pomožne snovi ter iz njih izdelali tablete.

Ugotovili smo, da izbira stabilizatorja vpliva na velikost delcev v nanosuspenziji. Najmanjšo velikost delcev smo izmerili nanosuspenzijam, ki so kot stabilizator vsebovale HPC. Suhe nanosuspenzije smo redispergirali v vodi in izmerili velikost delcev po 5 min mešanja, po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički, po 24 urah mešanja in po ponovni inkubaciji v ultrazvočni kadički. Najpomembnejše so bile meritve po 5 min mešanja. Po 15 min inkubacije v ultrazvočni kadički se je velikost delcev nekoliko zmanjšala, pri ostalih merjenjih pa ni prišlo do izrazitih sprememb v velikosti delcev. Pred sušenjem smo nanosuspenzijam dodali pomožne snovi. Ugotovili smo, da dodatek pomožnih snovi vpliva na velikost delcev po redispergiranju. Velikost delcev med nanosuspenzijami z različnimi dodatki se je razlikovala. Najmanjše delce smo določili v nanosuspenzijah z dodatkom saharoze in manitola. Po sušenju smo nanosuspenzijam brez dodatkov in z dodatki pomožnih snovi dodali citronsko kislino in NaHCO_3 ter laktozo. Velikost delcev smo merili netabletiranim in tabletiranim nanosuspenzijam. Dodatek pomožnih snovi po sušenju v večini primerov ni vplival na redisperzibilnost nanosuspenzije. Velikost delcev je bila ob dodatku pomožnih snovi po sušenju celo večja kot v vzorcih brez dodatkov. Testirali smo vpliv metode sušenja na velikost delcev v izbranih vzorcih. Metoda sušenja z razprševanjem se je v naših poskusih izkazala za najboljšo, saj smo pri uporabi le-te dobili najmanjše delce. Dobre rezultate smo dosegli tudi z liofilizacijo.

Na izbranih vzorcih smo preverili tudi, ali je izdelava tablet vplivala na redisperzibilnost nanosuspenzije. Ugotovili smo, da se je velikost delcev statistično značilno povečala pri liofiliziranih vzorcih, pri vzorcih sušenih z razprševanjem ter v večini primerov v sušilniku sušenih vzorcev pa vpliv tabletiranja ni bil statistično značilen.

Zaključimo lahko, da sta za izdelavo tablet najprimernejši nanosuspenziji z dodatkom saharoze in manitola, ki smo jih posušili z razprševanjem. Pri teh dveh vzorcih smo po redispergiranju tablet dobili delce, ki se niso statistično značilno razlikovali od delcev v tekoči nanosuspenziji.

6 LITERATURA

1. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG: Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63: 427 – 440.
2. Peng L, Xinyu R, Laru J, Van VeenB, Kiesvaara J, Hirvonen J, Laaksonen T, Peltonen L: Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling, *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 411; 215 – 222.
3. Neeti R, Murugesan Senthil K, Nanjaian M: Solubility: Particle size reduction is a promising approach to improve the bioavailability of lipophilic drugs. *International Journal of recent Advances in Pharmaceutical Research* 2011; 1; 8 – 18.
4. Van Eerdenbrugh B, Van der Mooter G, Augustijns P: Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 364; 64 – 75.
5. Dolenc A: Prednosti nanooblog in nanodelcev v načrtovanju sodobnih sistemov za dostavo učinkovin. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
6. Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A: Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko. Skripta, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Univerza v Ljubljani, 2001.
7. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinšek O: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 376; 204 – 212.
8. Shegokar R, Müller RH: Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 399; 127 – 139.
9. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J: Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today* 2011; 16; 354 – 360.
10. Lakshmi P, Kumar GA: Nano-suspension technology: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2010; 2; 35 – 40.

11. Masareddy RS, Sutar RS, Yellanki SK: Nano drug delivery systems – a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2011; 2; 203 – 216.
12. Saje V, Kristl J: Nanosuspenzije kot obetavne pristop za oblikovanje težko topnih zdravilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2001; 52; 145 – 152.
13. Peltonen L, Hirvonen J: Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: crytical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 62; 1569 – 1579.
14. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER: Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 18; 113 – 120.
15. Mio H, Kano J, Saito F, Kaneko K: Effects of rotational direction and rotation-to-revolution speed ratio in planetary ball milling. *Materials Science and Engineering* 2002; 332; 75 – 80.
16. Wu L, Zhang J, Watanabe W: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63; 456 – 469.
17. Malvern instruments, Dynamic light scattering URL: http://www.malvern.com/LabEng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm, julij 2012.
18. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles. Press LLC, Florida, 2002.
19. Kileen MJ: The process of spray drying and spray congealing. *Pharmaceutical Engineering* 1993; 13; 56 – 64.
20. Patel RP, Patel MP, Suthar AM: Spraydrying technology: an overview. *Indian journal of science and technology* 2009; 10; 44 – 47.
21. Meenan P, Roberts KJ, Knight PC, Yuregir K: The influence of spray drying conditions on the particle properties of recrystallized burkeite ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot (\text{Na}_2\text{SO}_4)_2$). *Powder technology* 1997; 90; 125 – 130.
22. Vučko Mole S, Trobevšek P: Formularium Slovenicum 2.2: slovenski dodatek k evropski farmakopeji, dopolnilo k drugi izdaji 2007, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Ljubljana, 2007: 628 – 630.
23. Bunjevca M, Vrečer F, Ilić I, Baumgartner S: Pomen Heckelove analize za proučevanje kompresibilnosti zmesi za tabletiranje. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60; 326 – 337.

24. Swarbrick J, Boylan JC: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Second Edition, Marcel Dekker, New York, 2002: 2669 – 2688.
25. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition, Informa Healthcare USA, New York, 2007: 3673 – 3683.
26. Liversidge GG, Eickhoff WM, Ruddy SB, Mueller KR, Roberts ME, Engers DA: Formulations of nanoparticle naproxen tablets. Številka patenta: WO/1998/035666, 1998.
27. Groundy SM: Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome, Fifth Edition, Springer Science+Business Media, New York, 2011: 184.
28. Karmarkar AB, Gonjari ID, Hosmani A, Dhabale PN, Bhise SB: Use of melt solidification technique for preparation of fenofibrate beads: a technical note. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2009; 4 (2): 291-297.
29. Zhu W, Romanski FS, Meng X, Mitra S, Tomassone MS: Atomistic simulation study of surfactant and polymer interactions on the surface of a fenofibrate crystal. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011; 42: 452-561.
30. Drug Bank URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01039>, julij 2012.
31. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC: Handbook of pharmaceutical excipients, Fifth Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists association, Washington, 2006.
32. Bevc B: Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi. Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
33. Van Eerdenbrugh B, Froyen L, Van Humbeeck J, Martens JA, Augustijns P, Van den Mooter G: Drying of crystalline drug nanosuspensions – The importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2008; 35: 127 – 135.
34. Mauludin R, Müller RH, Keck CM: Development of an oral rutin nanocrystal formulation. International Journal of Pharmaceutics 2009; 370: 202 – 209.
35. Vogt M, Kunath K, Dressman JB: Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: Comparison with commercial preparations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 68: 283 – 288.
36. Van Eerdenbrugh B, Vercruysse S, Martens JA, Vermant J, Froyen L, Van Humbeeck J, Van Den Mooter G, Augustijns P: Microcrystalline cellulose, a useful

- alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions – A case study with itraconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 70; 590 – 596.
37. Kim S, Lee J: Effective polymeric dispersants for vacuum, convention and freeze-drying of drug nanosuspensions. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 397; 218 – 224.
38. Van Eerdenbrugh B, Froyen L, Martens JA, Bleton N, Augustijns P, Brewster M, Van Den Mooter G: Characterization of physico-chemical properties and pharmaceutical performance of sucrose co-freeze-dried solid nanoparticulate powders of the anti-HIV agent lopinavir prepared by media milling. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 338; 198 – 206.
39. Van Eerdenbrugh B, Froyen L, Van Humbeek J, Martens JA, Augustijns P, Van Den Mooter G: Alternative matrix formers for nanosuspension solidification: Dissolution performance and X-ray microanalysis as an evaluation tool for powder dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 35; 344 – 353.
40. Ain-Ai A, Gupta PK: Effect of arginine hydrochloride and hydroxypropyl cellulose as stabilizers on the physical stability of high drug loading nanosuspensions of a poorly soluble compound. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 351; 282 – 288.
41. Plakkot S, de Matas M, Saunders M, Sulaiman B: Communion of ibuprofen to produce nano-particles for rapid dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 415; 307 – 314.
42. Fašalek L: Vpliv temperature na velikost delcev pri mletju v krogličnem mlinu. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2012.