

Kompozycja zawierająca kannabinoidy

Przedmiotem wynalazku jest samoemulgująca się, stabilna kompozycja zawierająca kannabinoidy, tworząca wodne dyspersje tych organicznych związków nierozpuszczalnych w roztworach wodnych. Proponowane kompozycje mogą być łatwo rozcieńczane w roztworach wodnych. Dzięki temu nadaje się do wytwarzania produktów doustnych na bazie roztworów wodnych, zwłaszcza kompozycji farmaceutycznych lub produktów spożywczych.

Kannabinoidy są naturalnymi substancjami chemicznymi występującymi w konopiach (*Cannabis sativa* L.) – zarówno dzikich (*Cannabis sativa ruderalis* J.) lub siewnych (*Cannabis sativa sativa* L.), jak i indyjskich (*Cannabis sativa indica*). Konopie zawierają około 480 różnych substancji, z czego 80 określa się jako kannabinoidy. Przeważająca większość nich jest pozbawiona właściwości psychoaktywnych, natomiast wiele z nich wykazuje właściwości prozdrowotne. Obecnie największe zainteresowanie wzbudzają związki takie jak tetrahydrokannabinol (THC), a szczególnie Δ^9 -THC oraz kannabidiol (CBD). Kannabinoidy jak i ekstrakty kannabinoidów są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie. Umieszczenie ich w wodzie lub produktach wodnych w niemodyfikowanej postaci powoduje, że wytrącają się w postaci opadających na dno produktu kryształów bądź tworzą heterogeniczną mieszaninę, przez co nie są równomiernie rozprowadzone w całej objętości roztworu wodnego. W takiej postaci ich biodostępność po podaniu doustnym jest niewielka (zazwyczaj poniżej 6%). Dodatkowo dostarczane dawki kannabinoidów nie są jednakowe, co ma znaczenie dla produktów spożywczych, gdzie bardzo ważne jest, aby efekt był odczuwalny jak najszybciej po spożyciu. Wpływa to negatywnie na jednolitość produktu, jego aspekty wizualne jak i nierównomierne dawkowanie kannabinoidów przy podaży doustnej. Oprócz napojów wiele produktów spożywczych opartych jest na wodzie lub ich wytwarzanie wymaga obecności wody. Dlatego, aby móc zastosować kannabinoidy w tego typu wyrobach i uzyskać równomierne dawkowanie wymagane jest ich rozpuszczenie. Zastosowanie kannabinoidów w produktach ciekłych – roztworach wodnych wymaga ich modyfikacji chemicznej, bądź opracowania odpowiedniej kompozycji, której zadaniem jest wytworzenie stabilnej zawiesiny po ich dodaniu do układów wodnych.

W stanie techniki znane są kompozycje kannabinoidów, które poprawiają rozpuszczalność kannabinoidów w roztworach wodnych. Znajdują one zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, jak również w przemyśle spożywczym jako dodatki do produktów spożywczych.

Z opisu patentowego US20200037638 znane są formułacje, które dotyczą samodyspergującej się emulsji z wykorzystaniem kannabinoidów jako związku hydrofobowego. W opisie ujawniono kompozycje, które zwiększają rozpuszczalność kannabinoidów w roztworach wodnych podawanych drogą doustną. Kompozycja przedstawiona w zgłoszeniu patentowym zawiera mieszaninę trójglicerydów o średniej długości łańcucha i/lub trójglicerydów zawierających długie łańcuchy, surfaktant oraz kannabinoidy. Znane

formulacje nie są pozbawione wad: ich czas dyspersji przekracza 60 s, a uzyskiwane dyspersje nie są dostatecznie klarowne (transmitancja poniżej 85%), często cechują się wysoką niejednorodnością lub zbyt wysoką polidispersyjnością.

Zasadniczym problemem technicznym jest słaba rozpuszczalność kannabinoidów w roztworach wodnych. Kolejnym problemem obecnie stosowanych systemów emulgujących mimo tworzenia jednorodnej zawiesiny jest zmiana właściwości wizualnych produktów, czyli tworzenie się tzw. „mlecznych” zawiesin nieakceptowanych w wielu produktach spożywczych takich jak wody mineralne, bezbarwne i klarowne napoje. Brak rozpuszczalności kannabinoidów prowadzi do rozwarstwiania się i tym samym niskiej stabilności emulsji w czasie. W celu wytworzenia układu zdyspergowanego niejednokrotnie niezbędne jest intensywne mieszanie i zastosowanie urządzeń typu sonifikatory lub homogenizatory. Jednym z głównym problemów jest również otrzymanie roztworu wodnego kannabinoidu, który charakteryzowałby się niewielkim rozmiarem cząsteczek oraz monodispersyjnością w układzie wodnym. Dodatkowym problemem jest zmniejszona szybkość działania kannabinoidów po przyjęciu doustnym, która jest związana bezpośrednio z rozwarstwianiem się emulsji.

Kolejnym problemem jest dostarczenie łatwej do uzyskania, stabilnej zawiesiny wodnej kannabinoidów, która mogłaby być stosowana jako koncentrat nadający się do wytwarzania napojów będących roztworami wodnymi zawierającymi ściśle określoną, docelowo znacznie rozcieńczoną, zawartość kannabinoidów. Znaną wadą obecnych rozwiązań są: brak odporności skoncentrowanego układu kannabinoidów na rozcieńczenia, brak stabilności produktów poddawanych konserwacji takich jak pasteryzacja, czy brak stabilności przy niskim pH (poniżej 3), co znacznie utrudnia proces wytwarzania i przetwarzania takich koncentratów.

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie ulepszonej kompozycji, dzięki której uzyskuje się stabilną nanoemulsję nierozpuszczalnych w wodzie kannabinoidów, która charakteryzuje się jednocześnie wysoką przejrzystością, krótkim czasem uzyskania jednorodnej dyspersji kannabinoidów, brakiem konieczności intensywnego mieszania w celu wytworzenia dyspersji, uzyskaniem nanocząsteczek o niewielkiej średnicy hydrodynamicznej, monodispersyjnością nanoukładu, wysoką odpornością na rozcieńczanie w roztworach wodnych, szeroki zakres pH od pH=8 do wartości pH<3 , oraz procesy konserwacji produktu końcowego (np. pasteryzacji, filtrowania na zimno, promieniowania UV).

Dla celów niniejszego zgłoszenia wysoka przejrzystość nanoemulsji po dodaniu do roztworu wodnego oznacza przejrzystość powyżej 85%, najlepiej powyżej 90%. W kontekście wynalazku przejrzystość należy utożsamiać z transmitancją optyczną. Transmitancja uzyskanej zgodnie z wynalazkiem nanoemulsji może być mierzona w procentach (%T) przy długości fali $\lambda=600\text{nm}$ za pomocą dowolnego spektrometru w tym zakresie. W opisanych badaniach pomiary dokonano za pomocą spektrometru firmy Merck® model Pharo 300.

Dla celów niniejszego zgłoszenia krótki czas uzyskania jednorodnej dyspersji kannabinoidów oznacza czas poniżej 60 s od momentu dodania ostatniej kropli mieszaniny składników kompozycji do wody, do całkowitego rozpuszczenia. Pomiar czasu dyspersji może być wykonany metodą spektrometryczną za pomocą dowolnego spektrometru w zakresie 550-650 nm, gdzie czas dyspersji oznacza osiągnięcie stałej wartości transmitancji bądź absorbancji, która nie zmienia się przy dłuższym mieszaniu dyspersji w stałych warunkach mieszania. Pomiaru czasu dyspersji można również dokonać za pomocą automatycznych analizatorów stabilności oraz starzenia się emulsji, dyspersji i zawiesin np. aparaty typu Turbiscan.

Dla celów niniejszego zgłoszenia brak konieczności intensywnego mieszania w celu wytworzenia dyspersji oznacza brak konieczności stosowania mieszania wysokoobrotowego powyżej 2500 RPM, homogenizatorów, homogenizacji wysokociśnieniowej i metod sonikacji. W zgłoszeniu wykazano, że mieszanie poniżej 150 RPM zapewnia odpowiednie parametry produktu dla zgłaszanych kompozycji. Szybsza wartość mieszania (testowano zakres do 2500 RPM), przyspiesza czas i zwiększa jakość dyspersji tworzonych dla zgłaszanych kompozycji zawierających kannabinoidy. Szybkość mieszania w tym wypadku jest pojęciem względnym bowiem na jakość mieszania ma wpływ m.in. rodzaj i konstrukcja mieszadła mechanicznego (np. łopatkowe, kielichowe, kotwicowe, ramowe, spiralne, śmigłowe, turbinowe, wstęgowe i inne specjalistyczne jak Visco-Jet, czy nawet mieszadła mechaniczne wysokoobrotowe), budowa mieszalnika, reaktora (np. zastosowanie skrobaków, przegród, łamaczy fal), czy mikserów zbiornikowych.

Dla celów niniejszego zgłoszenia nanocząsteczki o niewielkiej średnicy hydrodynamicznej oznacza nanocząsteczki o średnicy hydrodynamicznej poniżej 180 nm. Wartość średnicy hydrodynamicznej określa się w nanometrach (D_H , nm), a jej pomiar może być wykonany za pomocą analizatorów badających rozkład wielkości cząstek z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła np. Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern.

Dla celów niniejszego zgłoszenia monodispersyjność nanoukładu oznacza wartość polidispersyjności cząstek po dyspersji w wodzie wynoszącą poniżej 0,250. Pomiar polidispersyjności cząstek po dyspersji w wodzie (ang. Polydispersity Index) wyrażanej jako wartość PDI może być wykonany za pomocą urządzenia Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern.

Dla celów niniejszego zgłoszenia wysoką odpornością na rozcieńczanie w roztworach wodnych należy utożsamiać z wysoką stabilnością nanoemulsji przy bardzo dużych rozcieńczeniach tj. rozcieńczeniach do 10 000x. Pomiar stabilności nanoemulsji w rozcieńczeniu 10 000x może być wykonany metodą spektrometryczną za pomocą dowolnego spektrometru w zakresie 550-650 nm, gdzie stała wartość transmitancji i/lub absorbancji opisuje stabilność w trakcie przechowywania. Stabilność emulsji można również badać stosując analizatory stabilności oraz starzenia się emulsji, typu Turbiscan. Ponadto stała wartość średnicy hydrodynamicznej i polidispersyjności nanocząstek w układzie świadczy, że emulsja jest stabilna i nie zachodzą procesy agregacji, sedymentacji, czy flokulacji. Badanie średnicy hydrodynamicznej

i polidispersyjności nanocząstek może być wykonany za pomocą analizatorów badających rozkład wielkości cząstek z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła np. Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern.

Nieoczekiwanie, określony powyżej złożony cel techniczny został osiągnięty w prezentowanym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest samoemulgująca się, stabilna kompozycja zawierająca kannabinoid lub ekstrakt kannabinoidowy, surfaktant oraz dwie odmienne frakcje lipidowe. Korzystnie, kompozycja według wynalazku składa się z co najmniej jednego kannabinoidu lub ekstraktu kannabinoidowego, surfaktanta oraz dwóch odmiennych frakcji lipidowych.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że kannabinoid lub ekstrakt kannabinoidowy stanowi nie więcej niż 20% wagowych kompozycji, surfaktant stanowi 30-50% wagowych kompozycji, pierwsza frakcja lipofilowa stanowi 20-35% wagowych kompozycji, druga frakcja lipofilowa stanowi 15-30% wagowych kompozycji.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że co najmniej jeden kannabinoid lub ekstrakt kannabinoidowy zawiera tetrahydrokannabinol (Δ^9 -THC), kannabidiol (CBD), ekstrakt *Cannabis sativa*, *Cannabis indicam* *Cannabis hybrid* oraz innych gatunków z rodzaju *Cannabis*, kwas tetrahydrokannabinolowy (THC-A), kwas kannabidiolowy (CBDA), kannabinol (CBN), kannabigerol (CBG), kwas kannabigerolowy (CBG-A), kannabichromen (CBC), tetrahydrokannabinowien (THC-V), Δ^8 -tetrahydrokannabinol (Δ^8 -THC), kannabidiwaryn (CBDV), kannabicyklol (CBL).

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że surfaktant stanowi polisorbitat 80, pierwszą frakcję lipofilową stanowi triacylogliceryd o średniej długości łańcucha C8-C12, drugą frakcję lipofilową stanowi mono-diacylogliceryd o średniej długości łańcucha C8-C12.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że w roztworze wodnym tworzy samoemulgujący klarowny, monodispersyjny układ.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że monodispersyjny układ tworzy cząsteczki mniejsze niż 180 nm.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że monodispersyjny układ tworzy się w czasie krótszym niż 60 s i nie wymaga intensywnego mieszania.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że monodispersyjny układ tworzy stabilną nanoemulsję odporną na rozcieńczanie.

W korzystnym przykładzie wykonania kompozycja charakteryzuje się tym, że zawiera dodatki poprawiające smak i zapach oraz barwniki.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji według wynalazku określonej powyżej do wytwarzania produktów doustnych na bazie wody. Korzystnie produktem doustnym jest kompozycja farmaceutyczna lub produkt spożywczy.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania stabilnego układu monodispersyjnego charakteryzujący się tym, że wodę lub roztwór wodny miesza się z kompozycją według wynalazku określoną powyżej.

Korzystnie, mieszanie prowadzi się w czasie krótszym niż 120 sekund, korzystnie w czasie krótszym niż 60 sekund, przy intensywności mieszania nie przekraczającej 2500 RPM, korzystnie przy intensywności mieszania nie przekraczającej 150 RPM.

Kolejnym przedmiotem wynalazku układ monodispersyjny charakteryzujący się tym, że składa się z ośrodka dyspersyjnego będącego wodą lub roztworem wodnym oraz fazy rozproszonej tworzonej przez cząsteczki uzyskane z kompozycji według wynalazku określonej powyżej, przy czym cząsteczki według wynalazku posiadają warstwę zewnętrzną zawierającą surfaktant, oraz warstwę wewnętrzną, którą stanowi mieszanina lipidów, w której rozpuszczony jest kannabinoid lub ekstrakt kannabinoidowy.

Składniki kompozycji według wynalazku po wymieszaniu w środowisku wodnym tworzą spontanicznie zasadniczo kuliste nanocząsteczki, których warstwę zewnętrzną stanowi surfaktant, a środek (warstwę wewnętrzną) stanowi mieszanina lipidów, w której rozpuszczony jest kannabinoid lub ekstrakt kannabinoidowy. Surfaktant tworzący warstwę zewnętrzną zakotwiczony jest w wewnętrznej, rdzeniowej warstwie lipidowej swoją częścią lipofilową (fragment cząsteczki surfaktanta stanowiący resztę kwasu tłuszczowego). Jednocześnie lipid 2, pełniący kluczową rolę w strukturze nanocząsteczki według wynalazku, uczestniczy w oddziaływaniach pomiędzy jej hydrofilową warstwę zewnętrzną i wewnętrznym rdzeniem hydrofobowym, pozwalając na uzyskanie korzystnych właściwości nanocząsteczek opisanych w zgłoszeniu. Składniki kompozycji po zmieszaniu w środowisku wodnym tworzą spontanicznie nanocząsteczki według wynalazku, których przybliżony skład wraz ze zbliżaniem się do środka nanocząsteczki zmienia się następująco: otoczenie, które stanowi r-r wodny, dalej surfaktant, który dominuje w warstwie zewnętrznej nanocząsteczki, dalej mieszanina lipidów z substancją aktywną (Lipid 1 + Lipid 2 + Kannabinoidy), które stanowią rdzeń nanocząsteczki, gdzie składnik Lipid 2 z dużym prawdopodobieństwem dominuje w zewnętrznej warstwie rdzenia wspomagając surfaktant.

Korzystnie, fazę rozproszoną układu monodispersyjnego według wynalazku tworzą cząsteczki mniejsze niż 180 nm.

Korzystnie, układ monodispersyjny według wynalazku posiada: przejrzystość powyżej 90 %, monodispersyjność poniżej 0,250, zachowuje stabilność nanoemulsji przy rozcieńczaniu do 10 000x wodą lub roztworem wodnym i/lub zachowuje stabilność nanoemulsji przy pH sięgającym w zakresie od pH=8 do poniżej pH<3.

Głównym efektem technicznym opracowanej kompozycji umożliwiającej rozpuszczenie kannabinoidów w roztworze wodnym jest:

- wysoka przejrzystość nanoemulsji po dodaniu do roztworu wodnego, powyżej 85%
- bardzo krótki czas uzyskania jednorodnej dyspersji po dodaniu do roztworu wodnego, poniżej 60 s

- brak konieczności intensywnego mieszania, mieszanie poniżej 2500 RPM, a nawet poniżej 150 RPM
- uzyskanie nanocząsteczek o niewielkich rozmiarach, rozmiar poniżej 180 nm średnicy hydrodynamicznej
- uzyskanie monodispersyjnego nanoukładu, monodispersyjność poniżej 0,250
- wysoka stabilność nanoemulsji przy bardzo dużych rozcieńczeniach, rozcieńczanie do 10 000x.
- wysoka odporność na szeroki zakres pH od pH=8 do wartości pH<3 oraz procesy konserwacji produktu końcowego (np. pasteryzacji, filtrowania na zimno, promieniowania UV).

W niniejszym opisie wykorzystano następujące oznaczenia:

- T80 –mieszanina polioksyetylenowych pochodnych sorbitanu i kwasu oleinowego, polisorbitat 80, surfaktant Tween® 80,
- MCT – triacylogliceryd średniołańcuchowy (ang. *medium chain triglycerides*, C8÷C12)
- MCM – mono-diglicerydy średniołańcuchowe, głównie kwasu kaprylowego (C8) i kaprynowego (dekanowego, C10) (ang. *mono-diglyceride of medium chain fatty acids*),
- CBD – kannabidiol, izolat o czystości ≥95%.

Badanie kompozycji znanych ze stanu techniki

Badanie znanych kompozycji przeprowadzono w oparciu o opis patentowy US 20200037638i. Skład formułacji określono w opisie patentowym w skrócie jako mieszaninę MCT i/lub LCT (triacyloglicerydy długołańcuchowe) oraz surfaktant i ekstrakt kannabinoidowy. W dokumencie zostały wykonane nanoemulsje w czasie 2h, natomiast nie podano prędkości mieszania. Jest to istotne, gdyż wraz ze zwiększeniem intensywności mieszania zwiększa się jakość nanoemulsji, lecz powoduje to wydłużenie czasu procesu wytwarzania w skali przemysłowej. Dodatkowo rezultaty opisują jedynie wielkość cząstek bez odniesienia się do rozkładu wielkości cząstek. Nie zidentyfikowano informacji o jakości emulsji, a mianowicie czy uzyskano układ polidispersyjny czy monodispersyjny. Układy polidispersyjne mają tendencję do agregowania, flokulacji, sedymentacji. Z powyższych względów uznano, że należy wykonać eksperymenty w celach badawczych, bazując na opisie patentowym US 20200037638.

W badaniu formułacji znanych ze stanu techniki zastosowano następujące produkty:

- MCT – triacylogliceryd średniołańcuchowy, stosując komercyjnie dostępny produkt Crodamol™ GTCC firmy CRODA,
- T80 – polisorbitat 80, stosując komercyjnie dostępny produkt Tween 80 firmy CRODA,
- CBD – kannabidiol, izolat o czystości ≥95% zakupiony w firmie Kannastar.

Tabela 1. Badanie kompozycji konkurencyjnych.

Nr	MCT %	T80 %	CBD %	Układ jednorodny	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	D _H [nm]	PdI
1	0	90	10	TAK	198	16,6	157,2	0,383
2	10	80	10	TAK	382	0,55	n/a	n/a
3	20	70	10	TAK	840	0,35	n/a	n/a
4	30	60	10	TAK	573	33,8	120,3	0,165
5	40	50	10	TAK	600	1,32	156,5	0,195
6	50	40	10	TAK	620	0,11	191,5	0,268
7	60	30	10	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a
8	70	20	10	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a
9	80	10	10	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a
10	0	80	20	TAK	>1800	0,14	n/a	n/a
11	10	70	20	TAK	390	0,13	372,7	0,661
12	20	60	20	TAK	568	0,11	271,9	0,466
13	30	50	20	TAK	>1800	0,17	193,1	0,528
14	40	40	20	TAK	>1800	0,16	218,6	0,518
15	50	30	20	TAK	>1800	38,3	n/a	n/a
16	60	20	20	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a
17	70	10	20	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a
18	80	0	20	NIE	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabela przedstawia procentowe zawartości wagowe.

n/a – nie oznaczono (z uwagi na niejednorodność próbki i/lub próbka polidispersyjna nie nadająca się do badań).

Podsumowanie badania znanych formułacji przedstawionych w tabeli 1: badanie wskazuje, że we wszystkich przypadkach czas dyspersji był znacznie dłuższy niż 60 s, w żadnym z przypadków nie uzyskano transmitancji na poziomie 85% lub większym, duża część kompozycji charakteryzowała się niejednorodnością, co uniemożliwiło ich dalsze badanie, jednorodne nanoemulsje w przypadku kompozycji 2 i 3 oznaczono jako „n/a” dla D_H i PdI, bowiem posiadały bardzo dużą polidispersyjność (>0,500), dlatego też, w takich sytuacjach próbki nie spełniają minimum jakościowego do prawidłowego pomiaru, wartości PdI są większe od 0,500, a dla parametru D_H są większe od 250 nm.

W celu opracowania ulepszonej kompozycji zawierającej kannabinoidy, umożliwiające rozpuszczenie tych związków w roztworach wodnych, przeprowadzono szereg doświadczeń, które umożliwiły dobór optymalnych składników pod względem efektywności rozpuszczania i ich zastosowanych ilości, nieoczekiwanie doprowadzając do kompozycji według wynalazku stanowiącej stabilną nanoemulsję nierozpuszczalnych w wodzie kannabinoidów, która charakteryzuje się jednocześnie: wysoką przejrzystością, krótkim czasem uzyskania jednorodnej dyspersji kannabinoidów, brakiem konieczności intensywnego mieszania w celu wytworzenia dyspersji, uzyskaniem nanocząsteczek o niewielkiej średnicy hydrodynamicznej, monodispersyjnością nanoukładu oraz wysoką odpornością na rozcieńczanie w roztworach wodnych. Ponadto opracowywane formułacje testowane również były pod kątem stabilności w niskim pH (poniżej 3) oraz odporności na konserwację (pasteryzację).

Procedura ogólna przygotowania kompozycji według wynalazku

Wszystkie składniki kompozycji odważono do wspólnego naczynia. Zawartość naczynia mieszano przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Alternatywnie całą mieszaniną można ogrzać w celu przyspieszenia rozpuszczenia składników, a następnie wymieszać w celu ujednoczenia mieszaniny.

Przykładowa procedura otrzymywania kompozycji zawierającej 10% wagowych CBD:

Kompozycję przygotowano odważając do jednego naczynia 0,460 mg surfaktantu (T80), 220 mg triacyloglicerydu średniołańcuchowego (MCT), 220 mg mono-diacyloglicerydu średniołańcuchowego (MCM) i 100 mg ekstraktu kannabinoidów (CBD). Całość mieszano przez 30 min przy użyciu sztabki mieszającej i 300 RPM do ujednoczenia w temperaturze pokojowej, bądź krócej w wyższej temperaturze (np. 60 °C).

Procedura otrzymywania nanoemulsji

Podstawowe rozcieńczenie – stukrotne (100x) otrzymywano poprzez wprowadzenie 100 mikrolitrów (μL) gotowej kompozycji wkraplając, w krótkim czasie (<10 sekund) do fiolki szklanej ze sztabką mieszającą zawierającą 10 mililitrów (mL) wody. Zawartość szklanej fiolki mieszano przy obrotach do 150 RPM. Mierzono czas dyspersji do otrzymania jednorodnego układu.

Rozcieńczenie dwustukrotne (200x) otrzymano poprzez rozcieńczenie 1:1 (v/v) z wodą otrzymanej wcześniej nanoemulsji rozcieńczonej stukrotnie kompozycji.

Metodyka prowadzonych badań

- czas dyspersji (ang. *dispersion time*) mierzono w sekundach (t, sek) od momentu dodania ostatniej kropli mieszaniny do wody, do całkowitego rozpuszczenia,
- transmitancję nanoemulsji (ang. *transmittance*) mierzono w procentach (%T) przy długości fali $\lambda=600\text{nm}$ za pomocą spektrometru firmy Merck® model Pharo 300,
- średnicę hydrodynamiczną nanocząstek (ang. *hydrodynamics diameter*), podawano w nanometrach (DH, nm) i mierzono za pomocą urządzenia Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern,

- polidispersyjność cząstek po dyspersji w wodzie (ang. *polydispersity index*) wyrażano jako wartość Pdl i mierzono za pomocą urządzenia Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern.

Opracowanie samoemulgującej kompozycji kannabinoidu według wynalazku

Kompozycja będąca przedmiotem wynalazku zawiera 4 składniki:

1	:	2	:	3	:	4
Surfaktant	:	Lipid 1	:	Lipid 2	:	Kannabinoid

przy czym:

- **Surfaktant** (T80) oznacza polioksyetylenowa pochodna sorbitanu i kwasu oleinowego (ang. Polisorbat 80, Polysorbate 80, Monooleinian polioksyetylenosorbitolu, TweenTM 80), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy TweenTM 80.
- **Lipid 1** (MCT) oznacza triacylogliceryd średniołańcuchowy (ang. medium chain triglycerides, z mieszaniną kwasów o długości C8-C12), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy CrodamolTM GTCC,
- **Lipid 2** (MCM) oznacza mono-diglicerydy średniołańcuchowe, głównie kwasu kaprylowego (C8) i kaprynowego (dekanowego, C10), (ang. mono-diglyceride of medium chain fatty acids), komercyjnie dostępne i oferowany przez wielu producentów producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy IOI OLEOCHEMICAL – Imwitor[®] 988,
- **Kannabinoid** (CBD), ewentualnie jako składnik ekstraktu kannabinoidowego oznacza ekstrakty i izolaty to produktu komercyjnie dostępne i oferowane przez wielu producentów. W zgłoszeniu, większość testów przeprowadzono stosując kannabidiol, izolat o czystości $\geq 95\%$ zakupiony w firmie Kannastar.

Zawartość kompozycji i udział składników stanowią % wagowe (m/m/m/m). Przykłady realizacji kompozycji według wynalazku dotyczą następujących zakresów zawartości poszczególnych składników:

- T80: 30-50%,
- MCT: 20-35%,
- MCM: 15-30%,
- CBD: 0-20%.

Tabela 2. Przykłady realizacji kompozycji według wynalazku

Nr	T80 %	MCT %	MCM %	CBD %	Układ jednorodny	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x*	D _H [nm]	Pdl
19	37,0	35,0	20,1	7,9	TAK	20	36,1%	58,8%	113,3	0,219

20	30,0	20,0	30,0	20,0	TAK	29	0,13%	0,86%	154,1	0,136
21	36,1	24,6	19,3	20,0	TAK	67	0,12%	0,59%	200,0	0,278
22	36,1	24,6	19,3	20,0	TAK	70	0,12%	0,44%	190,9	0,254
23	30,0	30,0	25,0	15,0	TAK	10	0,82%	8,68%	188,6	0,256
24	36,3	20,0	28,9	14,8	TAK	15	20,4%	44,6%	135,6	0,246
25	30,0	30,0	25,0	15,0	TAK	30	0,43%	5,87%	150,3	0,147
26	30,0	35,0	15,0	20,0	TAK	86	0,11%	0,13%	262,0	0,472
27	42,1	27,7	22,7	7,5	TAK	20	76%	86,1%	71,3	0,209
28	44,1	20,0	30,0	5,9	TAK	30	96,3%	97,9%	32,5	0,205
29	42,7	20,0	24,7	12,5	TAK	15	74,3%	85,9%	66,3	0,177
30	30,9	35,0	30,0	4,1	TAK	15	35,2%	58,9%	115,7	0,188
31	37,2	24,8	30,0	8,0	TAK	15	59,6%	77,1%	104,0	0,274
32	43,1	30,0	15,0	11,9	TAK	50	31,3%	55,5%	106,2	0,143
33	42,2	31,1	26,7	0,0	TAK	22	91,9%	95,9%	50,9	0,238
34	48,3	20,0	15,0	16,7	TAK	80	15,4%	38,9%	124,2	0,214
35	42,2	31,1	26,7	0,0	TAK	30	86,3%	93%	62,6	0,255
36	50,0	35,0	15,0	0,0	TAK	250	4,91%	22%	266,5	0,293
37	50,0	25,2	20,2	4,6	TAK	30	95%	97,3%	35,8	0,194
38	36,4	34,3	15,0	14,3	TAK	70	0,2%	3,07%	265,3	0,266
39	50,0	20,0	30,0	0,0	TAK	25	98,7%	99,5%	23,8	0,198
40	37,0	35,0	20,1	7,9	TAK	25	11%	33%	139,5	0,217
41	37,2	24,8	30,0	8,0	TAK	20	57,3%	75,3%	90,5	0,186
42	50,0	24,4	15,0	10,6	TAK	50	77,9%	87,7%	69,6	0,193

*jako parametr kontrolny jakości nanoemulsji i działania samoemulgujących kompozycji wykonano rozcieńczenie 200 krotnie (200x) celem lepszej charakterystyki układów za pomocą transmitancji (%T).

Badanie wybranych przykładów kompozycji

Przetestowano także przykłady kompozycji o różnej zawartości ekstraktów kannabinoidów.

Jako szczególnie korzystne uznano następujące układy dla różnych zastosowań formulacji (T80 : MCT : MCM

: CBD, m/m/m/m) zestawiono poniżej:

- 0% CBD (44,6 : 25,4 : 30,0 : 0),
- 5% CBD (44,3 : 26,9 : 23,7 : 5),
- 10% CBD (46,0 : 22,0 : 22,0 : 10),
- 15% CBD (43,7 : 20,0 : 21,3 : 15),
- 20% CBD (37,3 : 20,0 : 22,7 : 20).

Tabela 3. Właściwości kompozycji o różnej zawartości ekstraktów kannabinoidów.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
1	0% CBD	15	98,1%	99,1%	23,9	0,162
2	0% CBD	28	97,2%	99,4%	24,0	0,146
3	0% CBD	25	97,9%	99,5%	22,8	0,103
4	5% CBD	29	94,5%	97,3%	37,7	0,177
5	5% CBD	29	94,3%	96,9%	38,0	0,192
6	5% CBD	27	95,3%	96,6%	39,2	0,205
7	10% CBD	27	93,2%	95,0%	46,6	0,175
8	10% CBD	23	92,2%	95,3%	44,6	0,168
9	10% CBD	27	91,3%	95,1%	45,6	0,179
10	15% CBD	39	50,6%	71,1%	86,5	0,181
11	15% CBD	44	51,6%	70,9%	95,5	0,229
12	15% CBD	63	52,8%	71,4%	87,3	0,172
13	20% CBD	62	0,4%	4,7%	148,9	0,198
14	20% CBD	52	0,2%	2,6%	154,1	0,166
15	20% CBD	72	0,2%	1,6%	153,2	0,147
Wyniki uśrednione (n=3)						
Nr	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
43	0% CBD	23±7	97,7±0,5%	99,3±0,2%	23,6±0,7	0,137±0,031
44	5% CBD	28±1	94,7±0,5%	96,9±0,4%	38,3±0,8	0,191±0,014
45	10% CBD	26±2	92,2±1,0%	95,1±0,2%	45,6±1,0	0,174±0,006
46	15% CBD	49±13	51,7±1,1%	71,1±0,3%	89,8±5,0	0,194±0,031
47	20% CBD	62±10	0,3±0,1%	3,0±1,6%	152,1±2,8	0,170±0,026

Wszystkie warianty samoemulgujących kompozycji i dyspersji wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach i otrzymano jednorodne próbki.

Badanie którego wyniki przedstawiono w Tabeli 3 (powyżej) wskazało, że czas dyspersji dla kompozycji (43-46) nie przekroczył 60 sekund, natomiast przy zawartości 20% kannabinoidów dla próbki (47) czas dyspersji wyniósł nieco ponad 60 sek. Transmitancję powyżej 90% osiągnięto dla kompozycji zawierającej do 10% CBD (45), lecz przy większych stężeniach CBD tj. powyżej 10 % (46-47) nie osiągnięto minimalnej wartości transmitancji tj. 85%, wszystkie kompozycje przedstawione w tabeli 1 są jednorodne i posiadają bardzo dobre wartości PdI<0,200 co świadczy o bardzo dobrej jakości nanoemulsji (wysoka stabilność emulsji),

uzyskana średnica hydrodynamiczna nanocząstek jest bardzo dobra dla wszystkich kompozycji i mieści się w zakresie $D_H < 180$ nm, co więcej do 15% zawartości CBD (włącznie) jest ona mniejsza niż 100 nm.

Badanie kompozycji z wykorzystaniem różnorodnych kannabinoidów

Istotną zaletą samoemulgujących kompozycji według wynalazku jest stwierdzenie, że kompozycje te są uniwersalne i sprawdzają się dla różnych związków hydrofobowych, dlatego też przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem różnorodnych kannabinoidów. Zbadano warianty kompozycji, gdzie jako kannabinoidy, stosowano czyste związki tj. kannabidiol (CBD), tetrahydrokannabinol (THC), mieszaninę różnych naturalnie występujących kannabinoidów konopnych (ang. *full spectrum*, zastosowano skrót „MIX”), różne ekstrakty o niższych zawartościach kannabinoidów (oznaczono jako „Ekstrakty typ...”), a także olej konopny o śladowej ilości kannabinoidów i charakteryzujący się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Wszystkie kompozycje oparto na jednej, uznanej za wzorcową samoemulsyfikującą się kompozycję zawierającą 10% zawartości surowca – kannabinoidu. (T80 : MCT : MCM : Kannabinoid, m/m/m/m).

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem:

- CBD – izolat o czystości $\geq 95\%$,
- THC – izolat o czystości $\geq 95\%$,
- MIX – mieszanina naturalnie występujących kannabinoidów konopnych oraz fitosteroli, terpenów, zawartość kannabinoidów ok. 95%,
- Ekstrakt typ 1 – mieszanina naturalnie występujących kannabinoidów o czystości 70,66% CBD, 4,36% THC, 2,18% CBG,
- Ekstrakt typ 2 – mieszanina naturalnie występujących kannabinoidów o czystości 29,79% CBDA, 24,31% CBD, , 1,26% THC, 0,60% THCA,
- Ekstrakt typ 3 – mieszanina naturalnie występujących kannabinoidów o czystości 25.17% CBD, 18,79% CBDA, 1,30% -THC, 0,14% THCA, 1,84% CBC, 0,89% CBG, 0,49% CBGA, 0,22% CBDV, 0,05% CBL, 0,04% CBN, 0,04% delta-8-THC,
- Olej konopny – olej otrzymywany z nasion konopi siewnych (*Cannabis sativa*) zawierający ok. 54% kwasu linolowego, 15% kwasu α -linolenowego, 4% kwasu γ -linolenowego, 13% kwasu oleinowego i 14% pozostałych kwasów tłuszczowych.

Tabela 4. Właściwości kompozycji z wykorzystaniem różnorodnych kannabinoidów.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D_H [nm]	Pdl
1	10% MIX	28	90,9%	93,6%	49,0	0,184
2	10% MIX	23	86,4%	92,2%	52,7	0,226
3	10% MIX	27	84,6%	92,0%	51,3	0,200

4	10% THC	32	95,5%	97,7%	31,0	0,183
5	10% THC	20	96,9%	98,5%	32,5	0,223
6	10% THC	38	96,6%	98,0%	32,9	0,235
7	10% Ekstrakt typ 1	19	96,1%	97,4%	33,4	0,234
8	10% Ekstrakt typ 1	19	95,9%	98,2%	34,3	0,224
9	10% Ekstrakt typ 1	30	95,3%	96,9%	34,8	0,231
10	10% Ekstrakt typ 2	19	94,4%	99,8%	23,2	0,207
11	10% Ekstrakt typ 2	20	94,3%	100,3%	22,9	0,238
12	10% Ekstrakt typ 2	23	93,1%	100,5%	22,1	0,202
13	10% Ekstrakt typ 3	22	89,9%	98,6%	37,9	0,174
14	10% Ekstrakt typ 3	23	93,1%	96,2%	37,2	0,179
15	10% Ekstrakt typ 3	13,5	93,2%	98,1%	37,2	0,183
16	10% Olej konopny	35	90,6%	94,4%	62,0	0,284
17	10% Olej konopny	33	92,7%	95,6%	54,5	0,283
18	10% Olej konopny	28	90,9%	95,0%	59,7	0,276
Wyniki uśrednione (n=3)						
Nr	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
45	CBD	26±2	92,2±1,0%	95,1±0,2%	45,6±1,0	0,174±0,006
48	MIX	26±3	87,3±3,2%	92,6±0,9%	51,0±1,9	0,203±0,021
49	THC	30±9	96,3±0,7%	98,1±0,4%	32,1±1,0	0,214±0,027
50	Ekstrakt typ 1	23±6	95,8±0,4%	97,5±0,7%	34,2±0,7	0,230±0,005
51	Ekstrakt typ 2	21±2	93,9±0,7%	100,2±0,4%	22,7±0,6	0,216±0,020
52	Ekstrakt typ 3	20±5	92,1±1,9%	97,6±1,3%	37,4±0,4	0,179±0,005
53	Olej konopny	32±4	91,1±1,1%	95,0±0,6%	58,7±3,8	0,281±0,004

Wykonane badanie dowodzi, że czas dyspersji dla wszystkich formułacji (45, 48÷53) nie przekroczył 60 s., samoemulgujące kompozycje posiadają podobną charakterystykę niezależnie od surowca z konopi i stopnia jego oczyszczenia, transmitancja dla rozcieńczenia 100x (100-krotnego) w wodzie w większości przypadków przekroczyła 90%, wyjątek stanowi surowiec zawierający pełne spektrum kannabinoidów oraz terpeny i fitosterole (48), których obecność obniżała nieznacznie transmitancję do wartości 87%, wszystkie kompozycje, niezależnie od zastosowanego surowca posiadały niewielką średnicę hydrodynamiczną nanocząstek $D_H < 60$ nm. Wszystkie kompozycje, niezależnie od zastosowanego surowca były monodispersyjne zachowując $PdI < 0,250$ z wyjątkiem próbki 53, której wartość PdI wynosiła poniżej 0,300.

Badanie dot. wyboru surfaktantu zawartego w kompozycji

Zbadano również właściwości wariantów kompozycji zawierających określone powyżej szczególnie korzystne proporcje pozostałych składników ustalonych dla 10% zawartości CBD, w których wykorzystano różne surfaktanty (surfaktant : MCT : MCM : CBD, m/m/m/m).

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem następujących surfaktantów z odpowiednich grup:

- monoacylowane polioxyetylenosorbitolu – istnieje wiele różnych pochodnych tej klasy surfaktantów, dla których powszechnie stosuje się skrót Tween™ i w zależności od reszty acylowej odpowiedniego kwasu tłuszczowego, wyróżnia się Tween 20, 40, 60, 80 i 85. W zgłoszeniu oprócz Tween™ 80 zastosowano dodatkowo dwa spośród nich:
 - monolaurynian polioxyetylenosorbitolu, jako „Tween 20” (ang. *Polysorbate 20, Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate*), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy CRODA – Tween™ 20,
 - monostearynian polioxyetylenosorbitolu, jako „Tween 60” (ang. *Polysorbate 20, Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate*), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy CRODA – Tween™ 60,
- etoksyłowane pochodne oleje jako „Etocas” – surfaktant oparty na oleju rycynowym z polioxyetylenem (35), (ang. *PEG-35 castor oil, Polyoxyl 35 Castor Oil*), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy CRODA – Etocas™ 35,
- uwodornione etoksyłowane pochodne oleje jako „Croduret” – surfaktant oparty na uwodornionym oleju rycynowym 35), (ang. *Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil, PEG-40 hydrogenated castor oil*), komercyjnie dostępny i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy CRODA – Croduret™ 50,
- acylowe pochodne poliglicerylu, jako „Plurol” – zastosowano dioleinian poliglicerylu-r (ang. *Polyglyceryl-3 dioleate*) komercyjnie dostępne surfaktanty i oferowany przez wielu producentów producentów. W doświadczeniu zastosowano z firmy GATTEFOSE – Plurol® Oleique.

Tabela 5. Badanie dot. wyboru surfaktantu dla samoemulgującej kompozycji.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
1	Tween 20	44	29,7%	65,3%	110,8	0,133
2	Tween 20	55	36,3%	58,3%	106,8	0,131
3	Tween 20	80	40,2%	61,3%	109,0	0,155
4	Tween 60	58	56,3%	76,5%	97,2	0,203
5	Tween 60	32	63,5%	81,0%	95,3	0,211
6	Tween 60	28	56,4%	76,0%	118,2	0,266

7	Etocas	515	95,8%	100,7%	98,7	0,188
8	Etocas	420	95,8%	101,1%	28,5	0,169
9	Etocas	305	96,5%	101,6%	37,4	0,237
10	Croduret	548	96,3%	100,8%	27,1	0,081
11	Croduret	607	97,1%	98,9%	28,0	0,101
12	Croduret	364	98,1%	101,8%	28,5	0,100
13	Plurol	układ niejednorodny	n/a	n/a	n/a	n/a
14	Plurol					
15	Plurol					
Wyniki uśrednione (n=3)						
No	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
45	Tween 80	26±2	92,2±1,0%	95,1±0,2%	45,6±1,0	0,174±0,006
54	Tween 20	60±18	35,4±5,3%	61,6±3,5%	108,9±2,0	0,140±0,013
55	Tween 60	39±16	58,7±4,1%	77,8±2,8%	103,6±12,7	0,227±0,034
56	Etocas 35	413±105	96,0±0,4%	101,1±0,5%	54,9±38,2	0,198±0,035
57	Croduret	506±127	97,2±0,9%	100,5±1,5%	27,9±0,7	0,094±0,011
58	Plurol	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a – nie oznaczono (z uwagi na niejednorodność próbki i/lub próbka polidispersyjna nie nadająca się do badań).

Wyniki wykonanego badania dowodzą, że kompozycje zawierające TweenTM 80 (45) posiadają najlepszy czas dyspersji, bardzo dobre parametry wielkości nanocząstek, charakteryzują się monodispersyjnością, natomiast alternatywny TweenTM 60 (55) charakteryzuje się znacznie gorszą transmitancją, a kompozycje zawierające Etocas (56) i Croduret (57) charakteryzują się bardzo dobrą transmitancją, natomiast dyspergują gorzej i dłużej niż kompozycja zawierająca TweenTM 80 (45).

Dlatego w korzystnej realizacji kompozycji według wynalazku jako surfaktant stosuje się TweenTM 80.

Badanie dot. wyboru składnika lipidowego (Lipid 1) zawartego w kompozycji

Przeprowadzono również analogiczne badanie dotyczące wyboru składnika lipidowego Lipid 1, który w korzystnej kompozycji wynalazku stanowi triacylogliceryd średniołańcuchowy (MCT) z mieszaniną kwasów o długości C8÷C12. Triacyloglicerydy średniołańcuchowe stanowią przede wszystkim estry z kwasami kaprylowym (oktanowym, C8:0) i kaprynowym (dekanowy, C10:0). MCT są komercyjnie dostępne i oferowany przez wielu producentów pod różnymi nazwami handlowymi, m.in.: Crodamol GTCC triacylogliceryd firmy CRODA, Labrafac lipophile firmy GATEFOSSE, Miglyol 808 firmy IOI OLEOCHEMICAL, Miglyol 812 N firmy IOI OLEOCHEMICAL, Imwitor[®] 928 firmy IOI OLEOCHEMICAL, Captex[®] 300 firmy ABITEC, czy Captex[®] 355 firmy ABITEC. W badaniach przetestowano dwa pierwsze, które tworzyły identyczną pod względem parametrów kompozycję.

Przetestowane zostały również formułacje zawierające korzystne proporcje składników określone powyżej dla 10% zawartości CBD z różnymi lipidami zamiast MCT (T80 : Lipid 1 : MCM : CBD, m/m/m/m).

W badaniu jako składnik lipidowy Lipid 1 wykorzystano związki z następujących grup:

- olej konopny – olej otrzymywany z nasion konopi siewnych (*Cannabis sativa*) zawierający ok. 54% kwasu linolowego, 15% kwasu α -linolenowego, 4% kwasu γ -linolenowego, 13% kwasu oleinowego i 14% pozostałych kwasów tłuszczowych. Zastosowany związek zalicza się do triacyloglicerydów długołańcuchowych z mieszaniną kwasów o długości C14÷C26 (ang. *long chain triglycerides*, LCT),
- kwas tłuszczowy jako „FA” (ang. *fatty acid*) – jako przykład tej grupy związków wybrano kwas oleinowy, stanowiący przykład długołańcuchowego wolnego kwasu tłuszczowego, który posiada 18 atomów węgla i jedno wiązanie podwójne (C18:1). Kwasy tłuszczowe są komercyjnie dostępne i oferowany przez wielu producentów. W doświadczeniu zastosowano kwas oleinowy z firmy Sigma-Aldrich o czystości >95%.
- triacylogliceryd, jako „TAG” (ang. *triacylglyceride*) – jako przykład tej grupy związków wybrano naturalny olej, który zawiera głównie różne triacyloglicerydy złożone przede wszystkim z pochodnych kwasu oleinowego ale również z kwasu palmitynowego, linolowego i innych kwasów tłuszczowych. W doświadczeniu zastosowano komercyjny spożywczy olej, sprzedawany jako oliwę z oliwek, który zawiera również niewielkie ilości (<1%) skwalenu, związków fenolowych i witaminy E.

Tabela 6. Badanie dot. wyboru lipidowego składnika (lipid 1) samoemulgującej kompozycji.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	Pdl
1	olej konopny	14	55,2%	74,1%	53,4	0,387
2	olej konopny	21	69,1%	80,1%	50,4	0,271
3	olej konopny	21	71,2%	83,5%	54,4	0,301
4	FA	układ niejednorodny	n/a	n/a	n/a	n/a
5	FA					
6	FA					
7	TAG	układ niejednorodny	n/a	n/a	n/a	n/a
8	TAG					
9	TAG					
Wyniki uśrednione (n=3)						
Nr	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	Pdl
45	MCT	26±2	92,2±1,0%	95,1±0,2%	45,6±1,0	0,174±0,006
59	olej konopny	19±4	65,2±8,7%	79,2±4,8%	52,75±2,1	0,320±0,060
60	FA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

61	TAG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

n/a – nie oznaczono (z uwagi na niejednorodność próbki i/lub próbka polidispersyjna nie nadająca się do badań).

Przeprowadzone badanie dowodzi, że kompozycje zawierające MCT (45) jako Lipid 1 stanowią najlepszy wariant, bowiem charakteryzują się bardzo dobrym czasem dyspersji i wysoką transparentnością mierzoną przez pomiar transmitancji. W przypadku wariantu z zastosowaniem oleju konopnego (59) układ posiada niższą transmitancję i ma niemalże dwukrotnie wyższy współczynnik polidispersyjności wobec optymalnej kompozycji (45). W korzystnej kompozycji według wynalazku Lipid 1 stanowi MCT.

Badanie dot. wyboru lipidowego składnika (Lipid 2) samoemulgującej kompozycji

Przeprowadzono również badanie dotyczące wyboru składnika lipidowego Lipid 2, który w korzystnej kompozycji wynalazku stanowi mono-diacylgliceryd średniołańcuchowy (MCM) z mieszaniną kwasów o długości C8÷C12. Mono-diacylglicerydy średniołańcuchowe są komercyjnie dostępne i oferowany przez wielu producentów pod różnymi nazwami handlowymi, m.in.: Imwitor® 988 (Type I) firmy IOI OLEOCHEMICAL, Imwitor® 308 (Type II) firmy IOI OLEOCHEMICAL, Imwitor® 742 (Type I) firmy IOI OLEOCHEMICAL, Imwitor® 928 firmy IOI OLEOCHEMICAL, Campul MCM EP/NF (Type I) firmy ABITEC, Campul 808G EP/NF (Type II) firmy ABITEC, Campul MCM-8 (Type I) firmy ABITEC, czy Campul MCM NF (Type I) firmy ABITEC.

Tabela 7. Badanie porównania MCM jako składnik lipidowy Lipid 2 różnych producentów i typów.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
1	Imwitor® 988	27	93,2%	95,0%	46,6	0,175
2	Imwitor® 988	23	92,2%	95,3%	44,6	0,168
3	Imwitor® 988	27	91,3%	95,1%	45,6	0,179
4	Campul 808G	17	95,7%	97,2%	27,6	0,205
5	Campul 808G	18	97,0%	98,5%	27,9	0,182
6	Campul 808G	19	97,2%	97,9%	27,9	0,183
7	Capmul MCM EP/NE	25	94,5%	96,8%	37,5	0,258
8	Capmul MCM EP/NE	20	95,8%	97,2%	30,5	0,155
9	Capmul MCM EP/NE	37	94,9%	96,9%	34,9	0,174
Wyniki uśrednione (n=3)						
Nr	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
45	Imwitor® 988	26±2	92,2±1,0%	95,10±0,20%	45,60±1,0	0,174±0,006
62	Capmul 808G	18±1	96,6±0,8%	97,87±0,65%	27,80±0,2	0,190±0,013
63	Capmul MCM EP/NE	27±9	95,1±0,7%	96,97±0,21%	34,29±3,5	0,196±0,055

Na podstawie tabeli 7 identyczne pod względem składu kompozycji, zawierające MCM jako Lipid 2 od różnych producentów, tworzą identyczne układy nanocząsteczek i charakteryzują się: zbliżonym czasem dyspersji, transmitancją, średnicą hydrodynamiczną oraz tworzą monodispersyjne układy, których parametr Pdl jest zbliżony i wynosi we wszystkich przypadkach niewiele poniżej 0,200.

Przetestowane zostały również formułacje zawierające korzystne proporcje składników określone powyżej dla 10% zawartości CBD z różnymi lipidami zamiast MCM (T80 : MCT : Lipid 2 : CBD, m/m/m/m). W badaniu jako składnik lipidowy Lipid 2 wykorzystano związki stanowiące pochodne MCM z następujących grup:

- monoestry kwasów średniołańcuchowych z glikolem propylenowym – istnieje kilka różnych pochodnych tej grupy związków, które w zgłoszeniu opisano jako „PGM” (ang. *propylene glycol monoester*). W zgłoszeniu testowano trzy spośród nich:
 - monoester kwasu kaprylowego (C8:0) z glikolem propylenowym, typ I klasyfikacji farmaceutycznej, w skrócie „PGMC-I” (ang. *propylene glycol monocaprylate*, PG monocaprylate C8, Type I, NF) o nazwie handlowej Capryol PGMC z firmy GATEFOSSE,
 - monoester kwasu kaprylowego (C8:0) z glikolem propylenowym, typ II klasyfikacji farmaceutycznej, w skrócie PGMC-II” (ang. *propylene glycol monocaprylate*, PG monocaprylate C8, Type II) o nazwie handlowej Capryol 90 z firmy GATEFOSSE,
 - monoester kwasu laurynowego (C12:0) z glikolem propylenowym, typ II klasyfikacji farmaceutycznej, w skrócie PGML” (ang. (ang. *propylene glycol monolaurate*, Type II) o nazwie handlowej Capmul PG-12 NEP/NF z firmy ABITEC,
- monoestry kwasów długołańcuchowych z glicerolem – istnieje kilka różnych pochodnych tej grupy związków, które w zgłoszeniu opisano jako „GM” (ang. *glycerol monoester*). W zgłoszeniu testowano trzy spośród nich:
 - monoester glicerolu z kwasem oleinowym (C18:1), w skrócie „GMO” (ang. *glyceryl monooleate*, Type 40) o nazwie handlowej Peceol z firmy GATEFOSSE,
 - monoester glicerolu z kwasem linolowym (C18:2), w skrócie „GML” (ang. *glyceryl monolinoleate*) o nazwie handlowej Maisine CC z firmy GATEFOSSE,
 - monoester glicerolu z kwasem rycynolowym (C18:1,-OH), w skrócie „GMR” (ang. *glyceryl monoricinoleate*) o nazwie handlowej Softigen 701 z firmy IOI OLEOCHEMICAL.

Tabela 8. Badanie dot. wyboru lipidowego składnika Lipid 2 samoemulgującej kompozycji.

#	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	Pdl
1	PGMC-I	520	0,27%	3,75%	179,0	0,221
2	PGMC-I	470	0,28%	4,05%	169,5	0,193
3	PGMC-I	580	0,20%	2,74%	183,6	0,220

4	PGMC-II	195	0,18%	2,16%	208,4	0,293
5	PGMC-II	209	0,34%	4,99%	198,5	0,270
6	PGMC-II	230	0,19%	2,27%	203,9	0,317
7	PGML	>1200				
8	PGML	układ	n/a	n/a	n/a	n/a
9	PGML	niejednorodny				
10	GMO	>1200				
11	GMO	układ	n/a	n/a	n/a	n/a
12	GMO	niejednorodny				
13	GML	>1200				
14	GML	układ	n/a	n/a	n/a	n/a
15	GML	niejednorodny				
16	GMR	140	0,15%	0,66%	233,9	0,426
17	GMR	160	0,13%	0,31%	254,0	0,447
18	GMR	165	0,13%	0,24%	285,7	0,498
Wyniki uśrednione (n=3)						
Nr	Nazwa	Czas dyspersji [sek]	Transmitancja [%] 100x	Transmitancja [%] 200x	D _H [nm]	PdI
45	MCM	26±2	92,2±1,0%	95,1±0,2%	45,6±1,0	0,174±0,006
64	PGMC-I	523±55	0,25±0,04%	3,51±0,69%	177,37±7,2	0,211±0,016
65	PGMC-II	211±17	0,24±0,09%	3,14±1,60%	203,62±5,0	0,293±0,023
66	PGML	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
67	GMO	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
68	GML	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
69	GMR	155±13	0,14±0,01%	0,40±0,23%	257,88±26,1	0,457±0,037

n/a – nie oznaczono (z uwagi na niejednorodność próbki i/lub próbka polidispersyjna nie nadająca się do badań).

Tabela nr 8 wskazuje, że kompozycje oparte na MCM jako lipid 2 charakteryzują się bardzo niskim czasem dyspersji <60 sekund, wysokim współczynnikiem transparentności mierzonej przez pomiar transmitancji (%T), bardzo dobrymi parametrami wielkości nanocząstek zachowując monodispersyjność układu.

W korzystnej realizacji kompozycji według wynalazku jako Lipid 2 stosuje się MCM.

Badanie dot. stabilności samoemulgującej kompozycji podczas rozcieńczania i różnych układów dyspersyjnych

Potwierdzono stabilność układu korzystnej kompozycji zawierającej 10% i 20% zawartości kannabinoidu w dyspersjach rozcieńczanych do 10000x. Testy wykonano w oparciu o dwie kompozycje, które proporcje były inne od optymalnych (wariant 1 i 2), aby wykazać uniwersalność technologii. Skład kompozycji

dostosowano do badanego zakresu w zgłoszeniu a dokładne wartości badanych kompozycji przedstawia Tabela 9.

Tabela 9. Samoemulgujące kompozycje testowane w różnych rozcieńczeniach dyspersji.

Opis	Skrót	Surfaktant T80	Lipid 1 MCT	Lipid 2 MCM	Kannabinoid CBD
Układ optymalny (Nr 45)	CBD 10%	46%	22%	22%	10%
Wariant 1	W-1	30%	30%	30%	10%
Układ optymalny (Nr 47)	CBD 20%	37,3%	20%	22,7%	20%
Wariant 2	W-2	30%	25%	25%	20%

W tej części badań nanoemulsje wykonywano według ogólnego opisu wprowadzając odpowiednią ilość naważki badanej kompozycji. Szybkość mieszania w tym wypadku wynosiła w każdym przypadku 500 RPM. W wynikach nie uwzględniono czasu dyspersji, z uwagi na bardzo szybką dyspersję <10 sekund w każdym przypadku a pomiar transmitancji (%T), średnicę hydrodynamiczną i polidispersyjność badano przy odpowiednim rozcieńczeniu układu.

Testowano trzy układy dyspersyjne, które stanowiły:

- woda (<0,21 uS) o pH=7,01
- roztwór wodny zawierający 0,8% wagowych kwasu cytrynowego i 0,08% benzoesu sodu o pH=2,61
- roztwór wodny zawierający 10% wagowych sacharozy, 0,8% wagowych kwasu cytrynowego i 0,08% benzoesu sodu o pH=2,74

We wszystkich przypadkach matrycy (woda, r-r wodny z dodatkiem kwasu cytrynowego i benzoesu sodu oraz r-r wodny z dodatkiem cukru, kwasu cytrynowego i benzoesu sodu) uzyskano dyspersje, które charakteryzowały się bardzo podobnymi parametrami tj.: współczynnikiem transparentności mierzonej przez pomiar transmitancji (%T), średnicy hydrodynamicznej nanocząstek i polidispersyjność układu. W Tabeli 10 przedstawiono tylko te które dotyczą zastosowania jako układu dyspersyjnego roztworu wodnego zawierającego 0,8% wagowych kwasu cytrynowego i 0,08% benzoesu sodu o pH=2,61.

Tabela 10. Badanie dot. stabilności nanoemulsji dla różnych rozcieńczeń w roztworze wodnym o pH=2,61.

#	Nazwa	Rozcieńczenie	Transmitancja [%]	D _H [nm]	PdI
1	W-1 1000x	1 000	95,5	69,8	0,115
2	W-1 1000x	1 000	95,4	72,4	0,122
3	W-1 1000x	1 000	95,1	70,2	0,105
4	W-1 2500x	2 500	97,7	76,4	0,142

5	W-1 2500x	2 500	97,6	73,6	0,117
6	W-1 2500x	2 500	97,3	75,6	0,121
7	W-1 5000x	5 000	99,1	75	0,126
8	W-1 5000x	5 000	98,9	73,9	0,124
9	W-1 5000x	5 000	99,2	69,6	0,126
10	W-1 10000x	10 000	99,2	75,8	0,142
11	W-1 10000x	10 000	99,2	73,6	0,135
12	W-1 10000x	10 000	99,1	122,1	0,315
13	W-2 1000x	1 000	88,3	97,0	0,108
14	W-2 1000x	1 000	85,1	105,2	0,128
15	W-2 1000x	1 000	87,9	99,9	0,115
16	W-2 2500x	2 500	92,1	104,5	0,137
17	W-2 2500x	2 500	89,6	112,3	0,141
18	W-2 2500x	2 500	90,6	108,5	0,147
19	W-2 5000x	5 000	95,5	102,3	0,137
20	W-2 5000x	5 000	93,4	105,9	0,151
21	W-2 5000x	5 000	91,8	153,1	0,319
22	W-2 10000x	10 000	96,8	125,4	0,263
23	W-2 10000x	10 000	96,1	109,6	0,152
24	W-2 10000x	10 000	95,1	119,7	0,184
Wyniki uśrednione (n=3)					
Nr	Nazwa	Rozcieńczenie	Transmitancja [%]	D_H [nm]	PdI
45	CBD 10%	100	92,2±1,0%	45,6±1,0	0,174±0,013
70	W-1 1000x	1 000	95,3±0,2%	70,8±1,4	0,114±0,009
71	W-1 2500x	2 500	97,5±0,2%	75,2±1,4	0,127±0,006
72	W-1 5000x	5 000	99,1±0,2%	72,8±2,9	0,125±0,001
73	W-1 10000x	10 000	99,2±0,1%	90,5±27,4	0,197±0,102
47	CBD 20%	100	0,3±0,1%	152,1±2,8	0,170±0,026
74	W-2 1000x	1 000	87,1±0,7%	100,7±4,2	0,117±0,010
75	W-2 2500x	2 500	90,8±1,3%	108,4±3,9	0,142±0,005
76	W-2 5000x	5 000	93,6±1,9%	120,4±28,3	0,202±0,101
77	W-2 10000x	10 000	96,0±0,9%	118,2±8,0	0,200±0,057

Kompozycje według wynalazku charakteryzują się stabilnością podczas rozcieńczeń do 10000x. Zestawione w Tabeli 10 wyniki wskazują, że testowane kompozycje charakteryzują się bardzo wysokim współczynnikiem przejrzystości mierzonej przez pomiar transmitancji (%T). Rozcieńczenia nie mają również

znaczącego wpływu na średnice hydrodynamiczne nanocząstek i polidispersyjność układów. W wynikach nie uwzględniono czasu dyspersji, z uwagi na bardzo szybką dyspersję <10 sekund.

Badanie stabilności substancji aktywnej w kompozycji oraz test stabilności substancji aktywnych w symulowanych warunkach konserwacji

Istotną zaletą samoemulgujących kompozycji według wynalazku jest fakt, że kompozycje służą do wytwarzania produktów doustnych na bazie roztworów wodnych, zwłaszcza kompozycji farmaceutycznych, medycznych lub produktów spożywczych. Wspomniane wyżej produkty muszą zapewnić dostarczenie jednakowych dawek substancji aktywnej. W tym celu wariant kompozycji dla rozcieńczenia 1000x zweryfikowano pod kątem zawartości substancji aktywnej – kannabidiolu (CBD) w świeżej emulsji i po symulowanym teście pasteryzacji, który przeprowadzono przetrzymując dyspersję w 72⁰C przez 15 min. Pomiaru zawartości substancji aktywnej dokonano z użyciem aparatu UHPLC model Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC⁺ focused, na kolumnie Thermo Scientific Acclaim RSLC PolarAdantage II (2,1 mm x 100 mm, 2,2 μm) stosując elucję gradientową z dwoma fazami: A: 0,1% HCOOH w wodzie i B: 0,1% HCOOH w acetonitrylu. Odczytu dokonano w oparciu o krzywą sporządzoną o wzorzec stanowiący roztwór kannabidiolu w metanolu, zakupiony z firmy Merck (CRM, 1,0 mg/mL Cerilliant[®]), gdzie współczynnik regresji krzywej kalibracyjnej wyniósł R²=0,9999 dla limitu detekcji (ang. *limit of detection*, LOD) 1,31 μg/mL i limitu oznaczalności (ang. *limit of quantitation*, LOQ) 3,98 μg/mL.

Tabela 11. Badanie zawartości substancji aktywnej w roztworze wodnym o pH=2,61 przed i po symulowanej pasteryzacji.

#	Nazwa	Rozcieńczenie	Zawartość CBD w dyspersji przed pasteryzacją [%]*	Zawartość CBD w dyspersji po pasteryzacji [%]*
1	W-1 1000x	1 000	98,46	96,22
2	W-1 1000x	1 000	96,28	95,61
3	W-1 1000x	1 000	95,75	95,87
4	W-2 1000x	1 000	97,60	98,74
5	W-2 1000x	1 000	89,77	93,79
6	W-2 1000x	1 000	96,43	98,85
Wyniki uśrednione (n=3)				
Nr	Nazwa	Rozcieńczenie	Zawartość CBD w dyspersji przed pasteryzacją [%]*	Zawartość CBD w dyspersji po pasteryzacji [%]*
70	W-1 1000x	1 000	96,83±1,44	95,90±0,31
74	W-2 1000x	1 000	94,60±4,22	97,13±2,89

* % zawartość CBD w przeliczeniu na zawartość teoretyczną wyliczoną na podstawie naważki

Zawartość CBD w dyspersji dla układów 70 i 74 przekracza >90% i wynosi w obu przypadkach ok. 95%, co potwierdza, że zgłaszane kompozycje tworzą stabilne nanoemulsje i spełniają wymóg dostarczenia jednakowych dawek substancji aktywnej. Próba konserwacji nanoemulsji, poprzez pasteryzację w warunkach symulowanych, układów 70 i 74 nie wpłynęła na zawartość CBD w tych układach, a różnice nie przekraczają 3% zawartości substancji aktywnej.

Procedura otrzymywania nanoemulsji w skali przemysłowej

Produkcję nanoemulsji w skali przemysłowej (półtechnicznej) przeprowadzono na termostatowanym mieszalniku firmy Kates o objętości 5 litrów, wyposażonego w pojedyncze mieszadło łopatkowe zasilane silnikiem o mocy 0,75 kW Basel S.A. Cantoni® Group regulowane falownikiem.

Nanoemulsje przygotowano poprzez wprowadzenie do mieszalnika 3500 mL wody do której dodawano 1400 mg kompozycji w składzie: T80:MCT:MCM:CBD, 50:20:20:10 % masowych. Całość mieszano przez 1 min przy 17% mocy silnika dla wariant 1 oraz przy 55% mocy dla wariantu 2. Po tym czasie próbki poddano badaniu. W obu przypadkach temperatura w trakcie procesu wynosiła $23,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ według wskazań czujnika temperaturowego mieszalnika.

Tabela 12. Badanie nanoemulsji otrzymanych w skali przemysłowej.

Nr	Nazwa	Moc mieszania	Transmitancja [%]	D_H [nm]	PdI
78	Wariant 1	17%	$99,8 \pm 0,1$	$34,1 \pm 0,2$	$0,175 \pm 0,007$
79	Wariant 2	55%	$99,9 \pm 0,1$	$32,4 \pm 0,2$	$0,156 \pm 0,024$

Korzystne przykłady opisanych kompozycji są skalowalne i tworzą nanoemulsje zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej. Wyniki zestawione w Tabeli 12 wskazują, że transparentność roztworów mierzona poprzez transmitancję (%T), średnicę hydrodynamiczną nanocząstek i polidispersyjność układów uzyskiwane w skali półtechnicznej spełniają określone powyżej wymogi. W obu przypadkach (78 i 79) transmitancja jest bliska 100%, a średnica hydrodynamiczna nie przekracza 35 nm. Oba układu są również monodispersyjne, a wartość PdI nie przekracza 0,180.

Rodzaj zastosowanego mieszania i szybkość mieszania mają znaczenie na jakość nanoemulsji niemniej zaletą zastrzeganych kompozycji jest fakt, że dobre parametry nanoemulsji można otrzymać stosując minimalne mieszanie.

Testowane kompozycje zawierające jako surfaktant Tween™ 80 w ilości 50% masowych potwierdziły również, że zawartość surfaktanta nie wpływa niekorzystnie na sam proces tworzenia nanoemulsji i nie powoduje pienienia. Pienie jest efektem niepożądanym i stanowi powszechny problem technologiczny, zwłaszcza w skali przemysłowej. Opisane kompozycje i sposób ich stosowania nie stwarzają tego problemu nawet przy najwyższych stężeniach surfaktantu.