

Utjecaj površinski aktivnih tvari na veličinu čestica deksametazona u nanosuspenziji

Tkalec, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:722541>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Jelena Tkalec

**Utjecaj površinski aktivnih tvari na veličinu
čestica deksametazona u nanosuspenziji**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Industrijska farmacija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u PLIVA HRVATSKA d.o.o. pod stručnim vodstvom dr. sc. Biserke Cetina-Čižmek, znanstvene savjetnice, uz suvoditeljstvo Sandre Miočić, voditeljice Razvoja formulacija, Pliva-istraživanje i razvoj.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Biserki Cetina-Čižmek na trudu i strpljenju, a posebno komentorici Sandri Miočić na savjesnom i stručnom vođenju kroz cijeli proces izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala i djelatnicima Razvoja formulacija na pomoći pri rješavanju praktičnih problema.

Hvala prijateljima za najljepše studentske trenutke, smijeh i bezbrižnost. Katarini, za maratonske razgovore. Ivanu, jer vjeruje u mene čak i kad je moje vlastito uvjerenje pokolebano.

Najveće hvala mojoj obitelji, na bezrezervnoj podršci koju mi pružaju. Mami, na svakoj nesebičnoj žrtvi i riječi ohrabrenja. Sestri, jer me poznaje najbolje. I baki, koja je držala fige za vrijeme svakog mog ispita.

1.Uvod.....	1
1.1. Nanosuspenzije	1
1.2. Dobivanje nanosuspenzija	2
1.2.1. „ <i>Bottom-up</i> “ metode	3
1.2.2. „ <i>Top-down</i> “ metode	3
1.3. Stabilnost nanosuspenzija.....	6
1.4. Svojstva deksametazona	7
1.5. Svojstva pomoćnih tvari	9
1.5.1. Tyloxapol	9
1.5.2. Polisorbat 20.....	10
1.5.3. Poloksamer 188	11
1.5.4. Karboksimetilceluloza.....	12
1.5.5. NaCl	12
1.5.6. HCl i NaOH.....	13
1.6. Ispitivanja nanosuspenzija	13
1.6.1 Ispitivanje veličine čestica	13
1.6.2. <i>In Vitro</i> ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije	15
1.6.2.1. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije Enhancer ćelijom	16
2. Obrazloženje teme	17
3. Materijali i metode	18
3.1. Materijali.....	18
3.2. Metode	18
3.2.1. Priprema koncentrata deksametazona ((m) 1% , 5% koncentrat)	18
3.2.2. Visokotlačna homogenizacija.....	18
3.2.3. Priprema formulacije (0.1% (m) suspenzija)	19
3.2.4. Mjerenje veličina čestica deksametazona u 0.1% suspenziji	20
3.2.5. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije Enhancer ćelijom	21
4. Rezultati i rasprava	23
4.1. LALLS analiza veličine čestica	23
4.1.1. Veličina čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji	23

4.1.2. Utjecaj vrste surfaktanta na veličinu čestica u formulaciji.....	24
4.1.3. Utjecaj broja propuštanja/duljine homogenizacije koncentrata na veličinu čestica u formulaciji	25
4.1.4. Utjecaj koncentracije tyloxapola na veličinu čestica u formulaciji.....	26
4.1.5. Utjecaj koncentracije deksametazona na veličinu čestica u formulaciji	27
4.2. Mikroskopske slike uzoraka.....	28
4.2.1. Slike uzoraka nepodvrgnutih homogenizaciji	28
4.2.2. Slike uzoraka homogeniziranih mikrofluidizatorom.....	29
4.3. Utjecaj veličine čestica djelatne tvari u formulaciji na brzinu oslobađanja djelatne tvari u <i>In vitro</i> uvjetima	30
5. Zaključci.....	34
6. Literatura	35
7. Sažetak/Summary.....	39
8. Prilozi.....	41
Temeljna dokumentacijska kartica	44
Basic documentation card	45

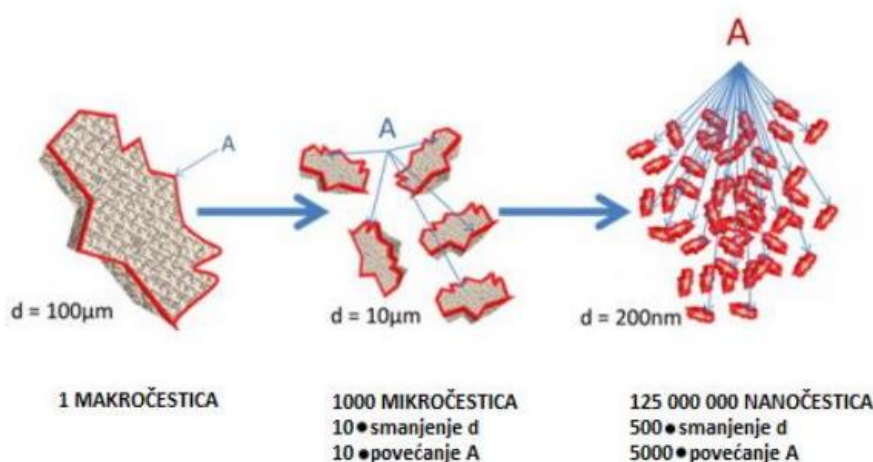
1.UVOD

1.1. Nanosuspenzije

Znatnim porastom udjela teško topljivih ljekovitih tvari u istraživanju i razvoju novih lijekova, javlja se potreba za razvojem novih formulacija koje bi povećale bioraspoloživost takvih lijekova. Jedan od obećavajućih pristupa su i nanosuspenzije zbog njihovih raznovrsnih svojstava i brojnih prednosti pred ostalim farmaceutskim dozirnim oblicima. Nanosuspenzije definiramo kao koloidne disperzije nanokristala lijeka proizvedenih prikladnom metodom i stabiliziranih prikladnim stabilizatorom. Veličine kristala u nanosuspenzijama kreću se od 10 do 1000 nm, ovisno o željenoj brzini djelovanja. (R.H. Müller, 2001). Kemijski su vrlo jednostavan sustav, bez mnogo pomoćnih tvari. Jedna od prednosti nanosuspenzija je povećanje brzine otapanja te, u nekim slučajevima, i same topljivosti tako oblikovane ljekovite supstancije što se događa zbog dramatičnog povećanja ukupne površine čestica pri prijelazu iz mikronskih u nano-dimenzije. Dokaz te tvrdnje dobivamo iz Nernst-Brunnerove modifikacije Noyes Whitneyevog modela disolucije:

$$dX/dt = ((D \times A)/h) (C_s - X/V),$$

gdje je dX/dt brzina otapanja, A površina, h je debljina difuzijskog sloja, C_s topljivost, X koncentracija u okolnom mediju, a V volumen medija. (A. A. Noyes, 1897)



Slika 1, Odnos površina čestica različite veličine za jednaku količinu materijala (Mauludin, 2009)

Takvo poboljšanje u topljivosti dovodi do povećane bioraspoloživosti, a time i do većeg učinka iste doze lijeka bez obzira na put primjene. Jednostavnost proizvodnje i uvećanja mjerila u usporedbi s ostalim novim terapijskim sustavima kao što su liposomi još je jedna važna prednost nanosuspenzija. Također, zbog ujednačenosti veličine dobivenih čestica, izostaje pojava Ostwaldovog zrenja zbog čega nanosuspenzije pokazuju dugotrajnu fizikalnu stabilnost. U idealnom bi slučaju čestice nanosuspenzija trebale biti u kristalnom obliku, međutim i amorfne čestice mogu biti stabilne kroz dovoljno dug period. (Sudhir Vermaa, 2011)

Nanosuspenzije su pogodne za primjenu u različitim dozirnim oblicima i za različite putove primjene lijeka zbog mogućnosti dobivanja različitih veličina čestica i lakoće modificiranja svojstava njihove površine u svrhu ne samo pasivne, već i aktivne ciljane terapije. (Feng Liu*, 2010)

Na tržištu postoje farmaceutski oblici s nanokristalima lijeka za oralnu i parenteralnu primjenu: intramuskularne injekcije za ex-tempore primjenu, Xeplion® (European Medicines Agency, 2012.), Zypadhera® (European Medicines Agency, 2013.), suhi oralni oblici: obložene tablete i oralne suspenzije: Rapamune® (EMA, 2015).

Da bismo mogli lijek primijeniti parenteralno, on mora biti ili otopljen ili veličine čestica manje od pet mikrometara. Stariji pristupi oblikovanju parenteralnih pripravaka (korištenje su-otapala, kompleksacija s ciklodekstrinima) pa i noviji pristup uklapanja u liposome ograničeni su kapacitetom uklapanja/otapanja i (ne)prihvatljivošću za parenteralnu primjenu. Dok su liposomi najpodnošljiviji za parenteralnu primjenu, primjena im je ograničena skupom proizvodnjom, kompliciranim uvećanjem mjerila proizvodnje i nestabilnošću formulacije u usporedbi s nanosuspenzijama. (V. B. Patravale, 2004)

1.2. Dobivanje nanosuspenzija

Dva su osnovna pristupa u izradi nanokristala, tzv. „*bottom-up*“ i „*top-down*“ pristupi. „*Bottom-up*“ pristup temelji se na generiranju nanokristala iz molekula lijeka u otopini što se postiže kontroliranim taloženjem sa su-otapalom ili evaporacijom otapala. Drugi pristup „*top-down*“ kreće iz suprotnog smjera. Nanokristali se dobivaju usitnjavanjem većih čestica mljevenjem ili visokotlačnom homogenizacijom. Prednost „*top-down*“ pristupa je u tome što smo sigurni da ćemo proizvesti upravo nanokristale, dok kod „*bottom-up*“ pristupa postoji mogućnost stvaranja amorfnih nanočestica, ovisno o uvjetima proizvodnje. Međutim,

visokotlačna homogenizacija jest energetski vrlo zahtjevan proces, a mljevenje može biti vrlo dugotrajno te uvijek postoji opasnost od kontaminacije česticama kuglica za mljevenje. (Jens, 2008).

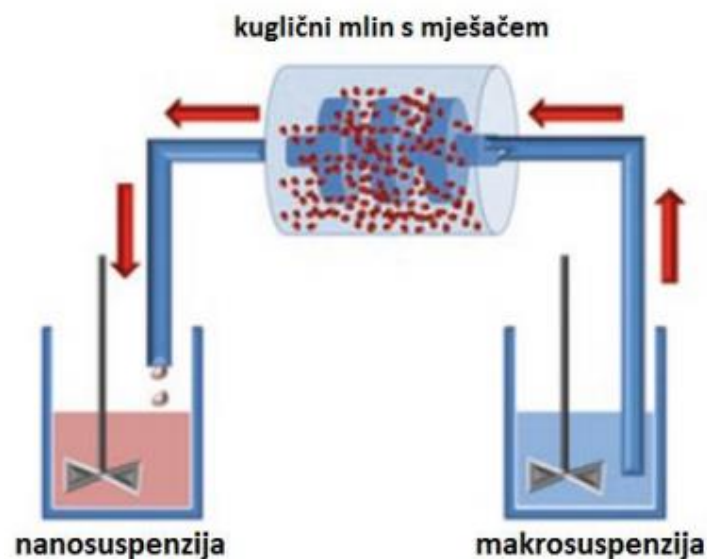
1.2.1. „*Bottom-up*“ metode

„*Bottom-up*“ pristup taloženjem iz otopine sastoji se od tri glavna koraka: stvaranje prezasićene otopine, nukleacije i rasta čestica. Prezasićena otopina nastaje primješavanjem anti-otapala za ljekovitu tvar u otopinu iste. Važno je da se otapalo i antiotapalo međusobno lako miješaju. Da bi se dobile čestice ujednačenih veličina u nanopodručju, važno je uravnotežiti procese nukleacije i rasta čestica. Neke od tehnika kojima se to postiže su vrtožno miješanje, ultrazvuk, korištenje superkritičnih fluida kao otapalo ili antiotapalo, centrifugiranje, tehnika sudarajućih mlazova u ograničenom prostoru. Drugi pristup koristi evaporaciju otapala kako bi nastala prezasićena otopina lijeka. Jedna od mogućnosti je korištenje uređaja za sušenje raspršivanjem. Otopina se raspršuje u sitne kapljice te zatim isparava pod utjecajem zagrijanog zraka. Kako bi se prikupile nastale nanočestice, potrebno je koristiti elektrostatički kolektor jer se one zbog svoje male mase ne skupljaju pri dnu uređaja. Pristup koji bolje kontrolira uvjete temperature i vremena sušenja je korištenje atomizirajućeg mlaza s plinom nosačem čestica i zagrijanom komorom. Najnovija metoda je elektrosprej koji omogućuje stvaranje najmanjih i najujednačenijih čestica, međutim, nije pogodan za korištenje kod mnogih lijekova. Kod svih „*Bottom-up*“ metoda javljaju se znatne teškoće pri proizvodnji u uvećanom mjerilu, tzv. „*scale up*“ stoga na tržištu nema gotovog lijeka proizvedenog ovim tehnologijama. (Hak-Kim Chan, 2011).

1.2.2. „*Top-down*“ metode

Osnovno načelo „*top-down*“ tehnologija sastoji se u usitnjavanju kristala do nanometarskih veličina. Postiže se pomoću dviju osnovnih metoda, kugličnog mljevenja i visokotlačne homogenizacije.

Prilikom mljevenja pomoću mješača i kuglica sile smičnog naprezanja djeluju na velike čestice suspendiranog lijeka usitnjavajući ih.

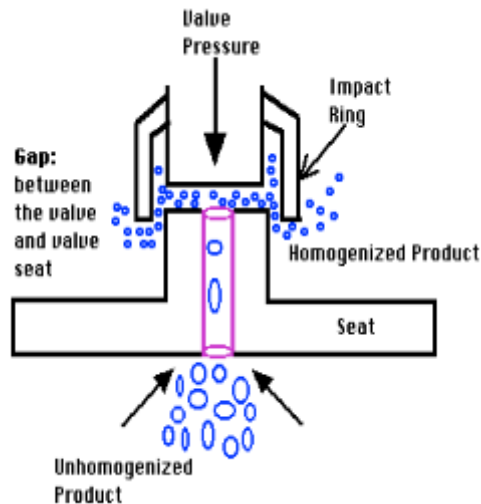


Slika 2, Priprava nanosuspenzija mljevenjem u kugličnom mlinu (Pepić, 2015)

Kuglice mogu biti različitih veličina i materijala: keramike, čelika, stakla ili polimera. Erozijska kuglica najčešći je problem ove vrste pristupa. Tome se doskočilo korištenjem zirkonij-itriranih ili polistirenskih kuglica koje imaju vrlo nizak stupanj trošenja. Drugi problem koji se javlja jest vrijeme odvijanja procesa koje s obzirom na svojstva ljekovite supstancije, upotrijebljenih površinski aktivnih tvari (surfaktanata) i količinu suspenzije može trajati od 30 minuta do čak nekoliko dana. Unatoč tome, ova je metoda često izbor u industrijskoj proizvodnji te postoji više od nekoliko proizvoda na tržištu proizvedenih upravo na ovaj način, i za različite putove primjene. (Shegokar, 2010)

1.2.3. Visokotlačna homogenizacija

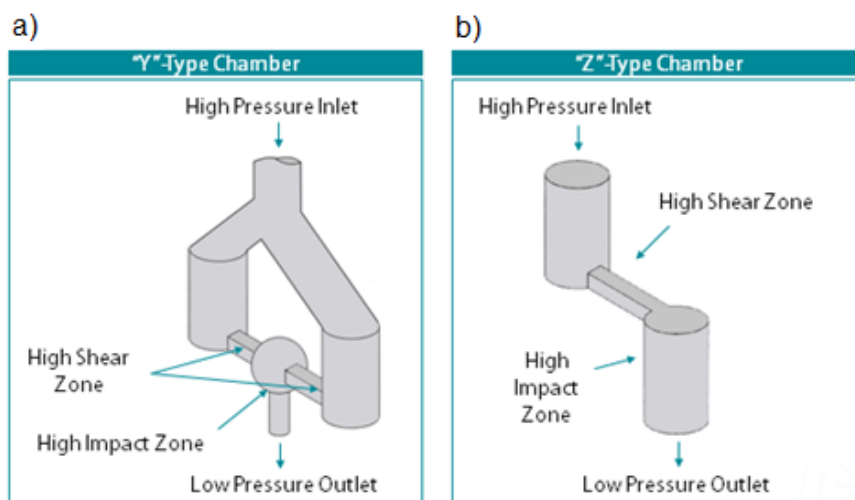
Visokotlačna homogenizacija je proces protiskivanja tekućine kroz vrlo uski kanal ili pukotinu pod vrlo visokim tlakovima, najčešće do 2000 bara. Ova tehnologija se koristi u svrhu emulgiranja, mikronizacije, nanonizacije, stvaranja liposoma i raspadanja stanica. Dvije se vrste uređaja koriste u svrhu postizanja navedenog: homogenizatori tipa klip-pukotina tzv. *piston-gap* uređaji i mikrofluidizatori. *Piston gap* uređaji pomoću pumpe protiskuju suspenziju kroz uski prolaz postižući relativno male brzine ali i visoki tlak. Prolazeći kroz tjesnac, suspenzija znatno ubrza rezultirajući padom tlaka te se izbacuje homogenizirana suspenzija.



Slika 3, Princip rada piston-gap uređaja za homogenizaciju (Dhankhar, 2014)

U tom procesu dolazi do velikog prijenosa energije u mali volumen suspenzije. Nekoliko je teorija zbog čega pri tome dolazi do usitnjenja čestica među kojima su turbulentni tok i teorija kavitacije prema kojoj zbog naglog pada tlaka dolazi do isparavanja tekućine i nastanka mjehurića plina koji kad implodiraju trgaju okolne čestice. Premda postoje neslaganja, većina literature navodi kombinaciju više mehanizama koji rezultiraju homogenizacijom.

Proces koji se odvija u mikrofluidizatorima drugačijeg je mehanizma od *piston gap* uređaja. Komorica s mikrokanalima uskim i do 50 mikrometara mjesto je odvijanja procesa homogenizacije. Kanalići mogu biti Z-tipa gdje suspenzija mijenja smjer pod ostrim kutovima ili Y-tipa gdje se suspenzija odvoji da bi se zatim mlazovi sudarili. Smanjenje promjera kanalića rezultira povećanjem brzine suspenzije i do 500 m/s. I ovdje dolazi do trenja, vrtloženja, kavitacije i ostalih procesa koji usitnjavaju čestice.



Slika 4, Dvije izvedbe mikokanalića mikrofluidizatora (Microfluidics, 2013)

Od velikog utroška energije, svega se 2% iskoristi za usitnjavanje čestica, dok je veći dio izgubljen u procesima trenja, vibracija, stvaranja topline, deformacija dijelova uređaja i čestica.

Mikrofluidizacija ima nekoliko važnih prednosti pred procesom kugličnog mljevenja: moguće je dobiti manje i ujednačenije kristale, nema bojazni od kontaminacije erozijom dijelova uređaja i lakše se prevodi u veće mjerilo. Glavni nedostatak ove metode su mikrokanali osjetljivi na čepljenje većim česticama, stoga suspenzije ponekad moraju biti predobrađene drugom metodom.

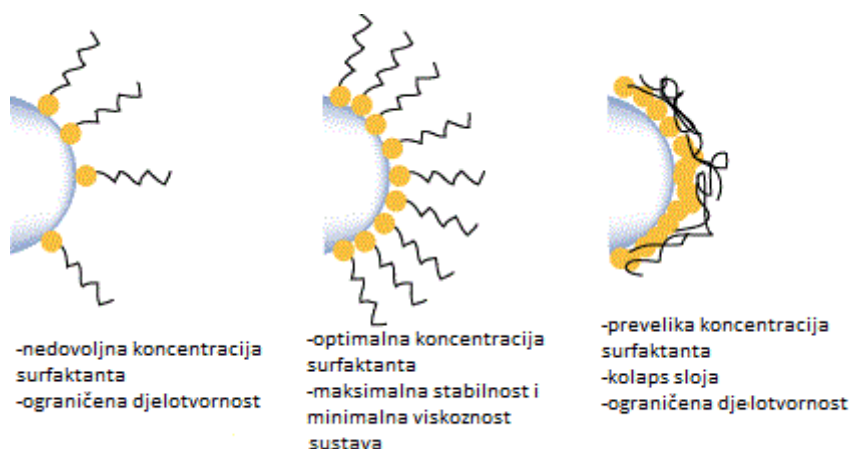
Važno je napomenuti da za uspješnu mikrofluidizaciju treba optimirati brojne procesne parametre, ali i odabrati primarni proizvod pravih karakteristika.

Tlak, vrijeme homogenizacije /broj propuštanja, procesna temperatura, vrsta/promjer komore, brzina protoka, polazna veličina čestica, koncentracija lijeka, vrsta i koncentracija surfaktanta ključni su za dobivanje konačnog proizvoda – nanosuspenzije željenih karakteristika. (R.H Müller, 2001)

1.3. Stabilnost nanosuspenzija

Stabilnost je vrlo važno svojstvo nanosuspenzija iz jednostavnog razloga što njihova svojstva bioraspoloživosti ovise o veličini čestica u suspenziji. Prilikom usitnjavanja dolazi do stvaranja „novih površina“ čestica koje teže aglomeriranju/agregiranju kako bi smanjile energiju sustava. Osim termodinamičke, može doći i do kinetičke destabilizacije zbog van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija čestica. Stoga se u suspenzije dodaje stabilizator prije procesa usitnjavanja u svrhu osiguravanja dugotrajne stabilnosti ali i unaprjeđenja efikasnosti procesa. Stabilizatori (polimeri /surfaktanti) adsorbiraju se na novonastale površine čestica i na više načina stabiliziraju nastalu nanosuspenziju. Surfaktanti su, po definiciji, površinski aktivne tvari koje, već u niskim koncentracijama mijenjaju površinska svojstva sustava u kojim se nalaze adsorbirajući se na međufazne površine u tim sustavima. Da bi to bilo moguće, surfaktant mora imati dijelom hidrofilna, a dijelom lipofilna svojstva. (Rosen MJ, 2012) DLVO teorija opisuje stabilnost koloidnih disperzija kao rezultat ravnoteže privlačnih van der Waalsovih silama među molekulama (nanočesticama) i odbojnih elektrostatskim i/ili sila dvosloja. Jedan od načina uravnoteženja sila je upravo dodatak polimernih surfaktanta koji, oblažući površinu nanočestica pojačavaju odbojne sile među česticama kao i stabilnost nanosuspenzije. Za optimalan učinak, polimerni surfaktant mora biti dobro topljiv u vanjskoj fazi. (Milton J. Rosen,

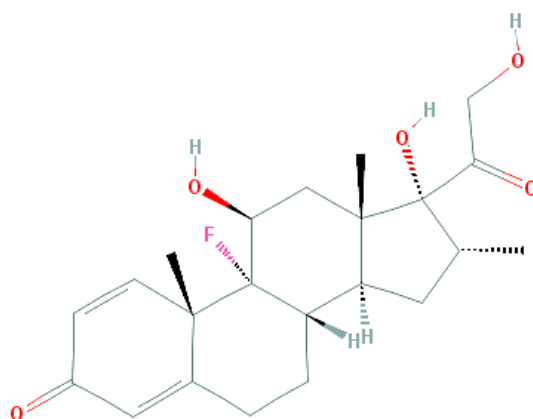
2012) Neki od stabilizatora odobrenih za parenteralnu primjenu su lecitini, polisorbati (Tween 20, Tween 80), poloksameri (Pluronic F68), niskomolekulski PVP.



Slika 5, Uspješnost steričke stabilizacije nanosuspenzije ovisi o koncentraciji surfaktanta (Andrić, 2012)

1.4. Svojstva deksametazona

Deksametazon ($C_{22}H_{29}FO_5$) kao sirovina dolazi u obliku bijelog kristaliničnog praha bez mirisa i gorkastog okusa. Kristalna struktura mu je heksagonalna, a molekulska masa 392.461063 g/mol. Štetna je kemikalija (Xn) stoga je propisan zatvoren proces rada i zbrinjavanje nastalog otpada kao opasnog. (PubChem, 2016)



Slika 6, Struktura deksametazona (PubChem, 2016)

Deksametazon je sintetski hormon kore nadbubrežne žlijezde (kortikosteroid) s glukokortikoidnim djelovanjem i blagim mineralokortikoidnim djelovanjem. Djeluje protuupalno i imunosupresivno, a djeluje i na energetske metabolizam i homeostazu glukoze, te (preko negativne povratne sprege) na izlučivanje hipotalamičkog inducirajućeg činitelja i tropnog hormona iz adenohipofize. Mineralokortikoidni učinak očituje se u regulaciji metabolizma natrija i kalija te ravnoteže elektrolita i vode. Protuupalno i imunosupresivno djelovanje glukokortikoida temelji se na molekularnim i biokemijskim učincima. Molekularni protuupalni učinci posljedica su vezanja glukokortikoida na glukokortikoidne receptore i promjene brojnih gena koji reguliraju tvorbu različitih informacijskih molekula u upalnoj reakciji. Biokemijski protuupalni učinci glukokortikoida posljedica su inhibicije humoralnih upalnih medijatora: prostaglandina, tromboksana, citokina i leukotriena. Deksametazon smanjuje tvorbu leukotriena smanjivanjem oslobađanja arahidonske kiseline iz staničnih fosfolipida, što je posljedica inhibiranja učinka fosfolipaze A2. Na fosfolipazu ne djeluje neposredno nego povećanjem koncentracije lipokortina (makrokortina) koji inhibira fosfolipazu A2. Tvorbu prostaglandina i tromboksana inhibira smanjenjem tvorbe specifične mDNK, a time i opsega tvorbe ciklooksigenaze. Pored toga, povećanjem koncentracije lipokortina smanjuje i nastanak PAF (Platelet-activating factor). Drugi biokemijski protuupalni učinci jesu smanjenje tvorbe TNF (Tumor necrosis factor) i IL-1 (Interleukin-1). Glukokortikoidi su liposolubilni i bez teškoća prolaze kroz staničnu membranu. Budući da se glukokortikoidni receptori nalaze u svim tkivima, može se očekivati da će djelovati na većinu tjelesnih stanica.

Deksametazon se može primjeniti oralno, putem tableta, ili parenteralno, u obliku injekcija (intramuskularno) ili infuzija (intravenski) te oftalmički u obliku masti ili kapi.

U plazmi se oko 77% deksametazona veže na bjelancevine, osobito na albumin, a samo se mala količina deksametazona veže na ne albuminske bjelancevine. Deksametazon je liposolubilna, zato može prelaziti u međustanični i unutarstanični prostor. U središnjem živčevlju (hipotalamus, hipofiza) veže se i djeluje preko membranskih receptora, a u perifernim se tkivima veže na citoplazmatske receptore i djeluje preko njih.

Razgrađuje se na mjestu djelovanja, u stanicama. Metabolizira se uglavnom u jetri, zatim u bubrezima i drugim tkivima. Izlučuje se uglavnom urinom.

U Republici Hrvatskoj registrirani su sljedeći parenteralni pripravci deksametazona: Deksametazon 4 mg/ml otopina za injekciju (Sandoz), Dexafluid 1,315 mg/ml kapi za oko,

otopina u jednodoznom spremniku(Mibe pharmaceuticals), Dexamethason 4 mg/ml otopina za injekciju ili infuziju(Krka), Maxidex 1 mg/g mast za oko (Alcon Farmaceutika), Maxidex 1 mg/ml kapi za oko, suspenzija (Alcon Farmaceutika), Maxitrol kapi za oko, suspenzija (Alcon Farmaceutika), Maxitrol mast za oko (Alcon Farmaceutika), Tobradex 3 mg + 1 mg/g mast za oko (Alcon Farmaceutika), Tobradex 3 mg + 1 mg/ml kapi za oko, suspenzija (Alcon Farmaceutika) . (Halmed, 2013.)

Sa topljivošću u vodi od svega 89 mg/L (na 25 °C) (YALKOWSKY SH., 1992) spada u praktički netopljive tvari, stoga se najčešće primjenjuje u obliku suspenzija.

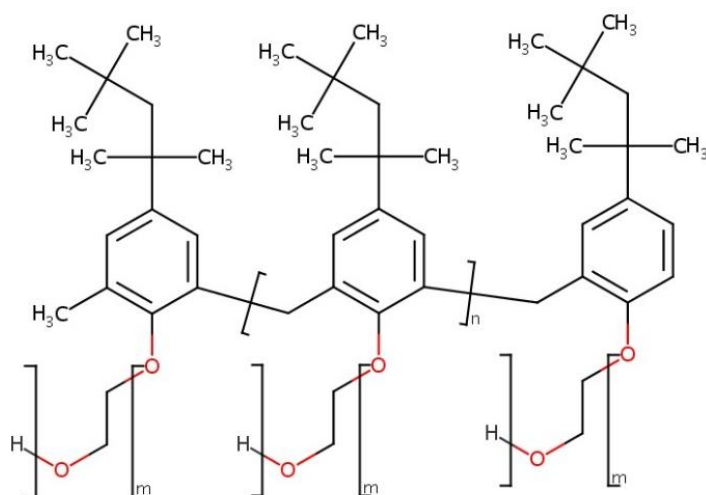
U ovom je radu kao polazna sirovina korišten mikronizirani deksametazon, veličine čestica u krutini $d_{90} = 10\mu\text{m}$.

1.5. Svojstva pomoćnih tvari

1.5.1. Tyloxapol

Tyloxapol je pri sobnoj temperaturi viskozna blijedo žuta tekućina koja je u vodi topljiva, ali s vodom teško mješljiva. Topljiv je u kloroformu, toluenu i ledenoj octenoj kiselini. Molekulske mase M_r 4500 g/mol, HLB vrijednosti 12,5 i CMC vrijednosti 18 μM , pripada grupi polioksietiliranih neionskih polimera. (Jiao, 2008)

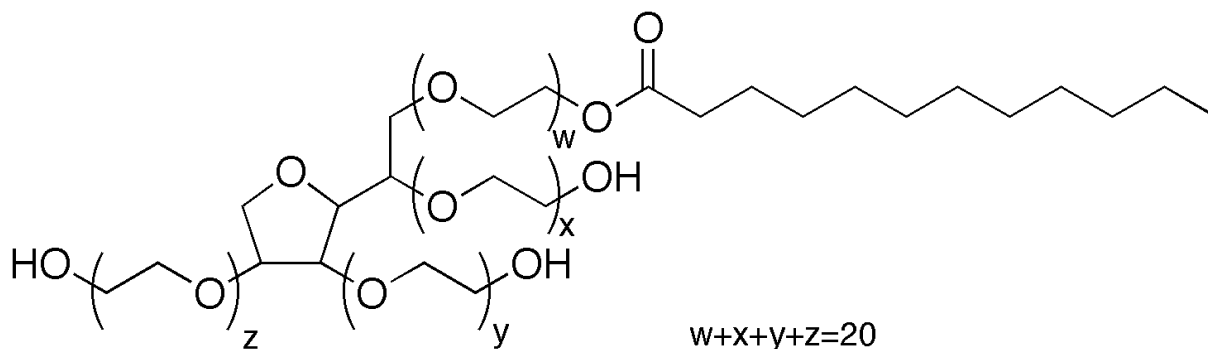
Koristi se uglavnom kao surfaktant u oftalmičkim pripravcima u koncentraciji do 0,05% (FDA, 2016) no istražuje se njegova uloga u terapiji cistične fibroze i razlaganju lipoproteinskih čestica bogatih trigliceridima. (Ghio AJ1, 1996)



Slika 7, Osnovna struktura Tyloxapola (Biotechnology, 2016)

1.5.2. Polisorbat 20

Polisorbat 20 niz je parcijalnih estera laurinske i drugih masnih kiselina i sorbitana te njegovih anhidrida povezanih oksietilenskim mostovima. Kemijske formule $C_{58}H_{114}O_{26}$ i molekulske mase Mr 1128, hidrofilni je neionski surfaktant koji se koristi kao emulgator, solubilizator, surfaktant, sredstvo za moćenje u ovisnosti o upotrijebljenoj koncentraciji.



Slika 8, Osnovna struktura polisorbata 20 (Johnson, 2014)

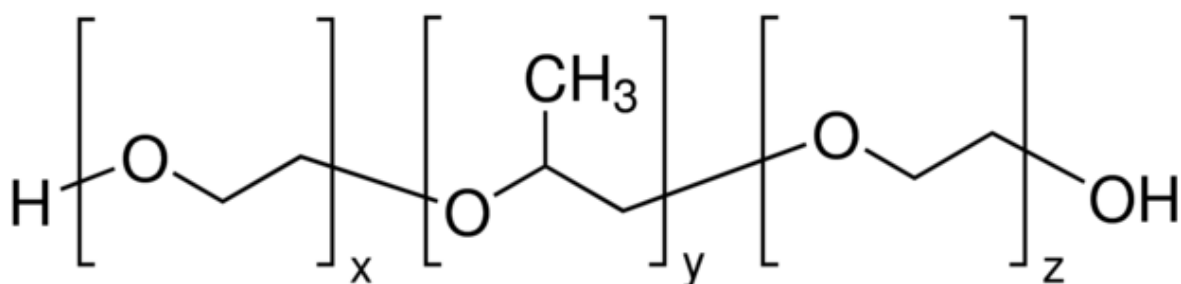
Na sobnoj je temperaturi viskozna žuta tekućina topljiva u vodi i etanolu, a netopljiva u uljima. HLB vrijednost polisorbata 20 je 16.7. Priprema se iz sorbitola u tri koraka. U prvom se koraku ekstrahira voda pri čemu nastaje sorbitan- ciklički anhidrid sorbitola koji se u idućem koraku parcijalno esterificira laurinskom kiselinom te se u zadnjem koraku dodaje etilenoksid u prisutnosti katalizatora, rezultirajući stvaranjem polisorbata.

Polisorbati se široko primjenjuju u kozmetici, hrani, oralnim, parenteralnim i topikalnim farmaceutskim formulacijama te se smatraju netoksičnim i neiritirajućim kemikalijama. (Zhang, 2009)

Odobren je za parenteralnu primjenu u koncentracijama do 2,4% te za oftalmičku do 0,05%. (FDA, 2016)

1.5.3. Poloksamer 188

Poloksamer 188 neionski je blok-kopolimer etilen i propilen oksida, u omjeru 80:20 (X,Z:Y). Prosječne molekularne mase M_r 8400 g/mol, krutina je bijele boje pri sobnoj temperaturi. Temperatura taljenja mu je 52-57⁰ C, a HLB vrijednost 29 zbog dominacije hidrofilne komponente polioksietilena naspram hidrofobnog polioksipropilena. Topljiv je u vodi i etanolu, a netopljiv u propanolu i masnim uljima. (BASF Aktiengesellschaft, 1997)



Slika 9, Osnovna struktura poloksamera 188 (Sigma-Aldrich, 2016)

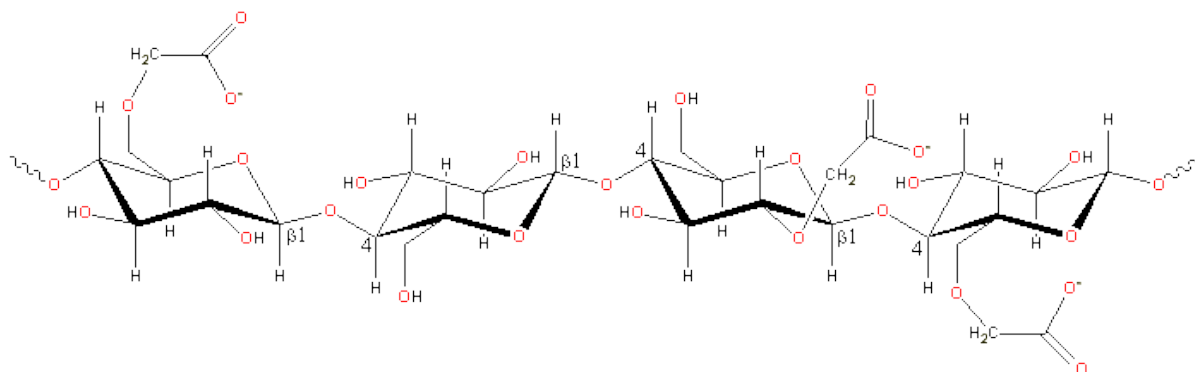
Upotrebljava se kao emulgator u umjetnim krvnim pripravcima i kao surfaktant u suspenzijama. Terapeutska primjena mu je omekšavanje stolice pri konstipaciji, za čišćenje rana, terapija kod bubrežnih kamenaca te kao sredstvo za močenje u kapima za oči. Za parenteralnu primjenu odobren je u koncentracijama do 0,6% , a za oftalmičku primjenu do 0,1%. (FDA, 2016)

Kao i polisorbati, i poloksameri se primjenjuju u oralnim, parenteralnim i topikalnim farmaceutskim formulacijama te se smatraju netoksičnim i neiritirajućim kemikalijama. Ne metaboliziraju se u organizmu.

Proizvodnja poloksamera kreće reakcijom propilen oksida s propilen glikolom pri čemu nastaje polioksipropilen glikol. Zatim se dodaje etilen oksid da bi nastao blok-kopolimer. (Collett, 2009)

1.5.4. Karboksimetilceluloza

Karboksimetilceluloza natrij natrijeva je sol polikarboksimetil etera celuloze. Na sobnoj je temperaturi gotovo bijeli prah bez mirisa i okusa. Netopljiva u acetonu, etanolu i toluenu, a u vodi lako tvori bezbojnu koloidnu otopinu.



Slika 10, Struktura karboksimetilceluloze (Water Structure and Science, 2015)

U oralnim, parenteralnim i topikalnim tekućim formulacijama koristi se kao sredstvo za povećanje viskoznosti, povećanje stabilnosti suspenzija, stabilizator emulzija. Također je primjenjiva kao vezivno i sredstvo za raspadanje u pripremi krutih formulacija. Osim toga, njezina mukoadhezivna svojstva koriste u tretiranju rana, dermatološkim flasterima kao i za sakupljanje eksudata, zarastanje kostiju, modificiranje apsorpcije...

Smatra se netoksičnom i neiritirajućom sirovinom te je na listi GRAS pomoćnih tvari. (Hooton, 2009)

1.5.5. NaCl

Natrijev klorid ionski je spoj, sol dobro topljiva u vodi (360g/L pri 25⁰C). Molekulska mu je masa 58.44 g/mol, a dolazi u obliku bezbojnih kristala ili bijelog kristaliničnog praha. Fiziološka funkcija iona natrija je održavanje stanične osmolarnosti, provodljivosti živčanih vlakana i kontraktibilnosti mišića te bubrežne funkcije. Izlučuje se urinom, znojem i fecesom. (NCBI, accessed Apr. 10, 2016)

Natrijev klorid primjenjuje se u brojnim parenteralnim i neparenteralnim farmaceutskim formulacijama, s primarnom svrhom izotonizacije otopine. (Rowe, 2009)

1.5.6. HCl i NaOH

Klorovodična je kiselina jaka korozivna kiselina koja se često koristi kao laboratorijski reagens. Dobiva se otapanjem klorovodika u vodi. U organizmu je prisutna kao komponenta želučanog soka. U širokoj je uporabi u industriji, a u farmaceutskim formulacijama upotrebljava se kao sredstvo za podešavanje pH. (NCBI, accessed Apr. 10, 2016)

Natrijev hidroksid je jaka baza nerijetko u uporabi u farmaceutskoj i industriji hrane. Koristi se za podešavanje pH formulacija ili tvorbu soli reakcijom sa slabim kiselinama. U niskim koncentracijama smatra se ne toksičnom supstancijom, dok u visokim djeluje korozivno na kožu, oči i sluznice. (NCBI, accessed Apr. 10, 2016)

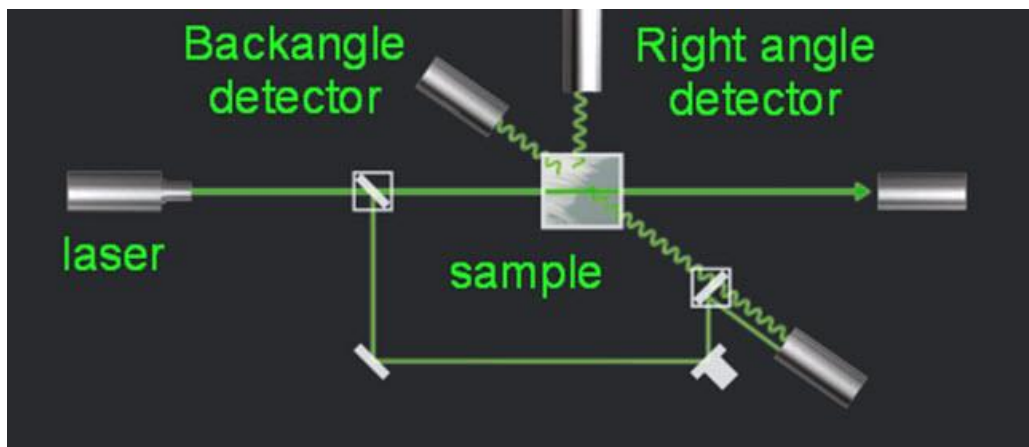
1.6. Ispitivanja nanosuspenzija

Najčešća svojstva nanosuspenzija koja se ispituju prilikom formuliranja ljekovitog oblika su identifikacija i čistoća, distribucija veličine čestica, površinska svojstva (Zeta potencijal), brzina oslobađanja lijeka iz formulacije te stabilnost nanosuspenzija.

1.6.1 Ispitivanje veličine čestica

Razvijene su brojne metode ispitivanja veličine čestica i distribucije iste. Zbog načina mjerenja i u ovisnosti o senzoru i ispitivanom uzorku, svaka nudi različit raspon veličina čestica koje može pouzdano izmjeriti: *Taylor Dispersion Analysis: 0.2nm - 20nm*, *Dynamic Light Scattering: 1nm - 1μm*, *Nanoparticle Tracking Analysis : 30nm - 1μm*, *Resonant Mass Measurement: 50nm - 5μm*, *Laser Diffraction :100nm - 2mm*.

Osim izabrane metode laserske difrakcije, prikladnija bi metoda bila *Dynamic Light Scattering*, koja pouzdano mjeri nanočestice (1nm - 1μm). Svojstvo koje koristi DLS metoda je činjenica da se vrlo male čestice u suspenziji kreću nasumično, tzv. Brownovo gibanje. Mjerenjem nastalih promjena u intenzitetu raspršene svjetlosti (zbog gibanja čestica) u kratkim vremenskim intervalima, korelacijom se dolazi do izračuna veličine čestica. (Boris Y. Shekunov, 2007) Mjerenjem raspršenja s više detektora pod različitim kutovima postiže se veća točnost i reproducibilnost dobivenih rezultata. (Naiim M, 2015)



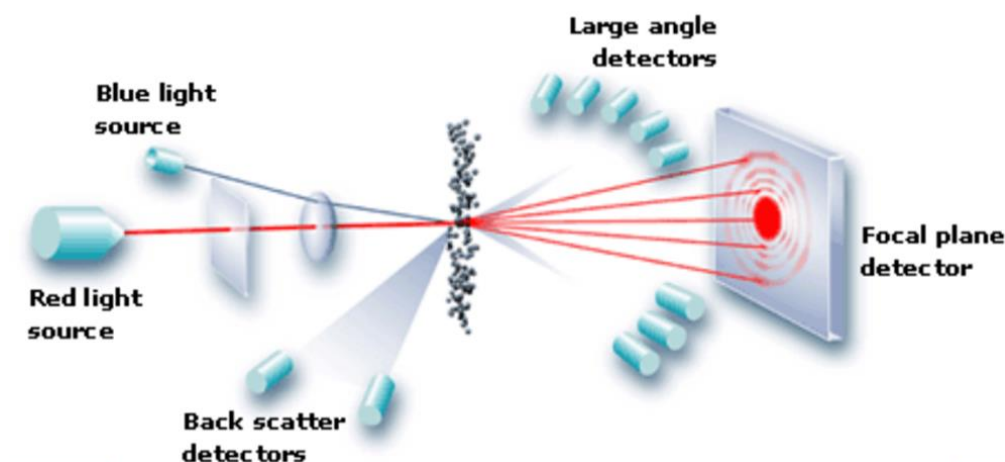
Slika 11, Optički dijelovi DLS anaizatora veličina čestica (Horiba-Scientific, 2016)

1.6.1.1. Low Angle Laser Light Scattering (LALLS) - Laserska difrakcija pri niskom kutu

Laserska difrakcija temelji se na činjenici da će čestice koje obasjava laserska zraka raspršiti svjetlost pod kutom koji je izravno proporcionalan njihovoj veličini. Što je veličina neke čestice manja, promatrani kut raspršenja je veći. Intenzitet raspršenja također ovisi o veličini čestica, smanjujući se zajedno s volumenom čestice. Dakle, velike čestice raspršuju svjetlost pod malim kutom s visokim intenzitetom dok male čestice raspršuju svjetlost pod većim kutom, ali raspršena svjetlost ima niski intenzitet.

Instrument se sastoji od lasera (izvor koherentnog, intenzivnog zračenja određene valne duljine), niza detektora raspoređenih na način da detektiraju raspršenje u širokom rasponu kutova te put prolaska uzorka kroz lasersku zraku (sustav cjevčica).

Reprezentativni uzorak, raspršen u odgovarajućoj koncentraciji u odgovarajućem mediju, prolazi kroz lasersku zraku. Naišavši na česticu, zraka se raspršuje pod određenim kutom ovisno o veličini čestice, te se ukupno raspršenje pod različitim kutovima mjeri detektorom, a brojčane vrijednosti koje se odnose na raspršivanje u uzorku tada se bilježe za daljnju analizu. Te numeričke vrijednosti raspršivanja se zatim transformiraju, upotrebom odgovarajućeg optičkog modela i matematičke formule, kako bi se dobio rezultat u obliku postotka od ukupnog volumena koji u uzorku zauzimaju čestice u određenoj kategoriji veličine tvoreći volumetrijsku raspodjelu čestica. (npr. d_{50} opisuje česticu čiji je promjer veći od 50% čestica u uzorku). (Boris Y. Shekunov, 2007)



Slika 12, Princip mjerenja LALLS analizatora (Dublin, 2012)

1.6.1.2. Mikroskopska analiza uzoraka

Morfologija nanokristala ili eventualna aglomeracija ispituje se promatranjem uzorka mikroskopski, svjetlosnim ili elektronskim mikroskopom. Osim što elektronskim mikroskopom vidimo sitnije čestice, on je pogodan i za snimanje trodimenzionalne slike nanočestica uzorka.

Vrlo važan podatak je i rezolucijsko ograničenje svjetlosnog mikroskopa od $\sim 0.2 \mu\text{m}$, tj nemogućnost opažanja čestica manjih od oko 200 nm, čak ni na najvećem povećanju. Rezolucija skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) je $\sim 1 \mu\text{m}$ (Bacic, 2012)

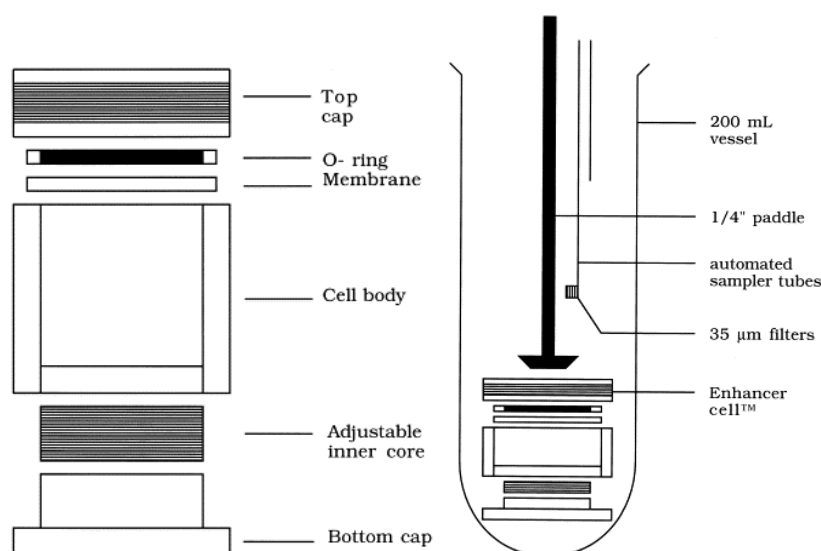
1.6.2. *In Vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije

Test oslobađanja lijeka iz formulacije ključan je korak u razvoju lijekovitog oblika. Sve metode imaju sličan osnovni koncept i glavne dijelove uređaja-donorski i akceptorski odjeljak odvojen membranom koja predstavlja aproksimaciju barijere lijeku *In vivo*. Koriste se različite membrane, od sintetskih membrane, preko uzgojenih tkiva do bioloških uzoraka, kao što je životinjska ili ljudska koža. Oba su odjeljka ispunjena prikladnim puferiranim medijem. Na početku eksperimenta uzorak se unosi u donorski odjeljak iz kojeg otopljeni lijek difundira preko odabrane membrane u akceptorski odjeljak. U zadanim vremenskim razmacima uzorkuje se medij akceptorskog odjeljka te se mjeri količina oslobođenog lijeka u tom vremenskom intervalu. Nakon svakog uzorkovanja medij se nadomješta da bi volumen bio konstantan. Eksperiment se provodi u uvjetima kontrolirane temperature i pH te osigurane topljivosti. Jedna od najčešćih *IVRT* metoda (*In Vitro Release Testing*) je korištenje Franz difuzijske ćelije koja se sastoji od donorskog i akceptorskog odjeljka razdvojenih membranom u termostatiranom staklenom kućištu. (Particle Sciences, 2009).

Za ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacija s nanočesticama, popularna je metoda dijalize zbog svoje izuzetne prilagodljivosti. Temelji se na činjenici da će otopljeni lijek velikom brzinom difundirati u akceptorski odjeljak u kojem se ispituje njegova koncentracija. Odjeljci su razdvojeni dijalizacijskom membranom/stjenkama vrećice, a uzorkovanje je znatno olakšano. Metoda dijalize jedna je od manje složenih tehnika a ujedno je prikladna za testiranje različitih dozirnih oblika kao što su nanosfere, liposomi, emulzije, nanosuspenzije... Problemi nastaju radi potencijalnog curenja medija otvaranjem vrećica, te ispitivanjem lijekova koji se vežu na iste, zbog čega se preporuča prethodna provjera adsorpcije. (D'Souza, 2014)

1.6.2.1. *In vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije Enhancer ćelijom

Enhancer ćelija slično je koncipirana kao i Franz difuzijska ćelija. Glavna je razlika u tome što je Enhancer ćelija sama „donorski odjeljak“ otvoren membranom prema mediju u koji je uronjena, a koji predstavlja akceptorski odjeljak. Tijelo ćelije ima volumen prilagodljiv eksperimentu. Prikladan je za ispitivanje oslobađanja lijeka iz polučvrstih formulacija, kao i iz otopina, suspenzija i emulzija. (Aglient Technologies inc., 2013) Ovdje se, za razliku od prethodne metode, gdje se miješa donorski odjeljak, miješa akceptorski odjeljak iznad membrane Enhancera. Eksperiment se također provodi u uvjetima kontrolirane temperature i pH te osigurane topljivosti. (Rege, 1998)



Slika 13, Osnovni dijelovi Enhancer ćelije (Rege, 1998)

2. Obrazloženje teme

Oblikovanje prikladnog dozirnog oblika za teško topljive lijekove je oduvijek predstavljalo izazov za farmaceutsku industriju. Kako bi molekula postigla svoje farmakološko djelovanje, ona na mjestu apsorpcije mora biti otopljena u mediju. U novije vrijeme, kada je preko 40% novih ljekovitih molekula slabo ili gotovo ne topljivo u vodenim otopinama problem postaje ozbiljnijim (Elaine M. Merisko-Liversidge, 2008). Iz tog su razloga razvijene brojne metode poboljšanja topljivosti lijekova, među ostalima i nanonizacija čestica lijekova BCS skupine II ili čak IV. Svojom izrazito niskom topljivošću deksametazon je idealan za ispitivanje uklapanja u nove dozirne oblike. Nanokristali su pred ostalim submikronskim sustavima u prednosti time što sadrže vrlo malo pomoćnih tvari te imaju visoki udio sadržaja lijeka u formulaciji. Nanokristali se također smatraju svestranim oblikom za različite putove primjene, kao što je oralna, parenteralna, oftalmička, transdermalna te pulmonarna primjena. Istraživanja u *in vivo* uvjetima potvrđuju brojne prednosti nanokristala, točnije da poboljšavaju bioraspoloživost, potencijalni su nosači za ciljanu dostavu lijekova, njihova bioraspoloživost je neovisna o uzimanju hrane i prikladni su za lijekove s uskim periodom apsorpcije. Iako priprema nanokristala mikrofluidizacijom ima značajne prednosti pred ostalim metodama poput kugličnog mljevenja, većina odobrenih lijekova na tržištu ipak je pripremljena kugličnim mljevenjem.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti nanosuspenciju deksametazona veličine čestica d_{50} manjih od 1000 nm te optimirati proces usitnjavanja procesom mikrofluidizacije. Odabrani su surfaktanti odobreni za parenteralnu/oftalmičku temeljem njihove dobre podnošljivosti te su korišteni u niskim koncentracijama. Obzirom da je poznato da na učinkovitost usitnjavanja čestica utječu vrsta i koncentracija surfaktanta, kao i koncentracija deksametazona, te vrijeme homogenizacije, upravo su ti parametri odabrani za ispitivanje. Oslobođanje deksametazona iz odabranih formuliranih nanosuspencija sa različitim veličinama čestica je nadalje evaluirano prikladnom metodom.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Tijekom eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći materijali: voda za injekcije, mikronizirani deksametazon (Pfizer), polisorbit 20 (Montanox Seppic), tyloxapol (AMRI), poloksamer 188 (MERCK), karboksimetilceluloza - Blanose CMC 7MF PM (Ashland), natrij klorid (MERCK), kloridna kiselina (MERCK), natrij hidroksid (MERCK).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema koncentrata deksametazona (1% , 5% koncentrat)

U dijelu vode za injekcije prvo se otopi surfaktant te se u toj otopini pomoću miješalice Ultraturrax T25 (IKA JANKE-KUNKEL) homogeno suspendira prethodno odvagani deksametazon. Suspenzija se nadopuni vodom za injekcije do željene mase i promiješa miješalicom RW20 (IKA). Tako dobiveni koncentrat homogenizira se pomoću mikrofluidizatora M-110EH-30 (Microfluidics, USA) pri tlaku od 1800 bara. Pomoću izmjerene brzine protoka (ml/min) odredi se vrijeme potrebno da koncentrat prođe željeni broj propuštanja kroz mikrofluidizator.

3.2.2. Visokotlačna homogenizacija

Ispitivanje je provedeno u dva dijela. U preliminarnom ispitivanju provedena je evaluacija tri različite vrste surfaktanta u koncentracijama od 0.5%: **polisorbata 20, poloksamera 188 te tyloxapola** u koncentratu deksametazona (1%). S obzirom da je preliminarno ispitivanje pokazalo kako je tyloxapol najučinkovitiji u usitnjavanju veličine čestica i sprečavanju aglomeracije istih, idući je korak ispitivanja proveden s tyloxapolom pri različitim varijablama: **broj ciklusa homogenizacije (30, 40, 50), koncentracija deksametazona (1%, 5%), koncentracija tyloxapola-surfaktanta (0.5%, 2.5%).**

Nakon homogenizacije, koncentrati su korišteni za pripremu finalne 0.1% suspenzije deksametazona.

Tablica 1, Pripremljeni uzorci koncentrata deksametazona za preliminarno ispitivanje

<i>oznaka</i> <i>koncentrata</i>	<i>konc.</i> <i>deksametazona</i>	<i>surfaktant</i>	<i>konc.</i> <i>surfaktanta</i>	<i>broj</i> <i>propuštanja</i>	<i>za</i> <i>suspenziju</i>
DEX-C-1	1%	Polisorbat 20	0,50%	0	DEX-S-1
DEX-C-4C	1%	Polisorbat 20	0,50%	50	DEX-S-8
DEX-C-2	1%	Poloxamer 188	0,50%	0	DEX-S-2
DEX-C-2C	1%	Poloxamer 188	0,50%	40	DEX-S-5
DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	DEX-S-3
DEX-C-3A	1%	Tyloxapol	0,50%	30	DEX-S-6

Tablica 2, Pripremljeni uzorci koncentrata deksametazona za ispitivanja s tyloxapolom

<i>oznaka</i> <i>koncentrata</i>	<i>konc.</i> <i>deksametazona</i>	<i>surfaktant</i>	<i>konc.</i> <i>surfaktanta</i>	<i>broj</i> <i>propuštanja</i>	<i>za</i> <i>suspenziju</i>
DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	DEX-S-3
DEX-C-3A	1%	Tyloxapol	0,50%	30	DEX-S-6
DEX-C-5B	1%	Tyloxapol	0,50%	40	DEX-S-9
DEX-C-5C	1%	Tyloxapol	0,50%	50	DEX-S-10
DEX-C-6A	5%	Tyloxapol	2,50%	30	DEX-S-16
DEX-C-6B	5%	Tyloxapol	2,50%	40	DEX-S-17
DEX-C-6C	5%	Tyloxapol	2,50%	50	DEX-S-18
DEX-C-7A	5%	Tyloxapol	0,50%	30	DEX-S-13
DEX-C-7B	5%	Tyloxapol	0,50%	40	DEX-S-14
DEX-C-7C	5%	Tyloxapol	0,50%	50	DEX-S-15

3.2.3. Priprema formulacije (0.1% suspenzija)

U dijelu vode za injekcije otopi se natrijev klorid, te se toj otopini, uz miješanje na električnoj miješalici Ultra-turrax T25 (IKA JANKE-KUNKEL), postupno dodaje karboksimetil celuloza natrij. Ostavi se bubriti uz miješanje najmanje 30 minuta, do nastanka homogene otopine bez grudica.

Idući je korak razrjeđivanje koncentrata deksametazona. Pripremljenoj otopini karboksimetil celuloze doda se određena količina koncentrata te promiješa (miješalica - RW20, IKA). Izmjeri se pH vrijednost suspenzije (pH metar - PHM240 , RADIOMETER) i po potrebi korigira

otopinama NaOH ili HCl do željenih vrijednosti. (7,2-7,6). Takva se suspenzija nadopuni vodom za injekcije da se dobije 0.1% suspenzija deksametazona. Sva su mjerenja provedena na finalnim 0.1% suspenzijama.

Tablica 3, Sastav suspenzija deksametazona

NAZIV SUPSTANCIJE	MASENI UDIO (%) (m/m)
deksametazon	0,1
surfaktant	0,05
karboksimetilceluloza	0,5
NaCl	0,9
voda za injekcije	do 100%
NaOH/ HCl	q.s.

3.2.4. Mjerenje veličina čestica deksametazona u 0.1% suspenziji

LALLS analiza veličine čestica

Raspodjela veličine čestica deksametazona je mjerena sa LALLS metodom (*Low Angle Laser Light Scattering*) na instrumentu Malvern Mastersizer 3000 koristeći Hydro MV disperzijsku jedinicu.

Kao **disperzijski medij** korištena je zasićena otopina deksametazona pripremljena u otopini 0.02% w/w Tween 80/voda. Zasićena otopina je pripremljena dodavanjem oko 250 mg deksametazona u 1L 0.02% w/w Tween 80/voda otopine. Takva suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici oko 30 minuta, i tretirana na ultrazvučnoj kupelji oko 15 minuta. Suspenzija je na kraju profiltrirana kroz 0.45 µm filter.

Eksperimentalni parametri:

Refraktivni indeks deksametazona: 1.591

Absorpcijski indeks deksametazona: 1.000

Refraktivni indeks disperzanta: 1.33

Trajanje pozadinskog mjerenja (background): 5.00 s

Trajanje mjerenja uzorka: 10.00 s

Broj mjerenja: 3

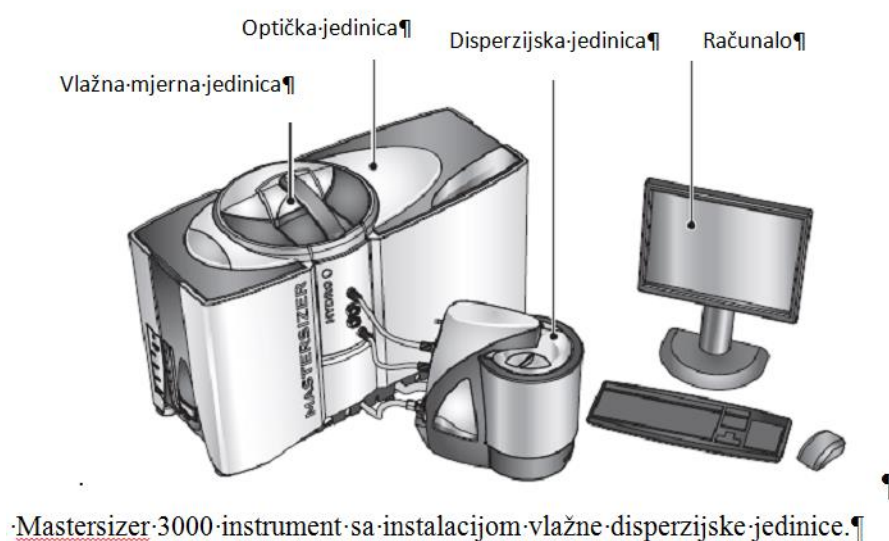
Opskuracija – donja granica: 8%

Opskuracija – gornja granica: 15%

Brzina pumpe: 1800 okretaja/min

Donja i gornja granica veličine: 0.0200- 2000 μm

Rezultat je izražen kao volumna raspodjela, srednja vrijednost triju mjerenja.



Slika 14, Mastersizer 3000, dijelovi

OPTIČKI MIKROSKOP

Mikroskopska analiza provedena je na optičkom mikroskopu Olympus BX51 opremljenom sa kamerom Linkam 600, na povećanju **x50**.

3.2.5. In vitro ispitivanje oslobađanja lijeka iz formulacije Enhancer ćelijom

Korišten je uređaj za ispitivanje oslobađanja Varian VK 7010 s posudama malog volumena i modificiranim lopaticama te Enhancer® ćelija površine za oslobađanje od 4 cm^2 , također proizvođača Varian, INC.

Kao receptorski medij korištena je smjesa McIlvaine pufera pH 7,4 i etanola (omjer: 90:10) u volumenu od 75 mL po posudi. Pufer je svježe pripremljen otapanjem limunske kiseline (Kemika, Hrvatska) i natrij hidrogen fosfata (Kemika, Hrvatska) u deioniziranoj vodi. Analiza je provedena pri konstantnoj temperaturi od 32°C.

Kao nosač uzorka korištene su polietilsulfonske membrane Pall veličine pora 0,1 µm, prethodno namočene u receptorskom mediju (najmanje 30 min). Uzorci nanosuspenzije deksametazona u volumenima od 1 ml nanieseni su u donorski odjeljak ćelije. Na ćelije je zatim postavljena membrana, te je membrana pričvršćena brtvenim prstenom i prstenom za učvršćivanje.

Ćelije s uzorcima oprezno su spuštene u posude uređaja za ispitivanje oslobađanja s termostatiranim medijem. Brzina okretaja lopatica bila je 100 rpm. Uzorkovanje je vršeno ručno nakon 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 i 180 minuta, u volumenu od 1 mL.

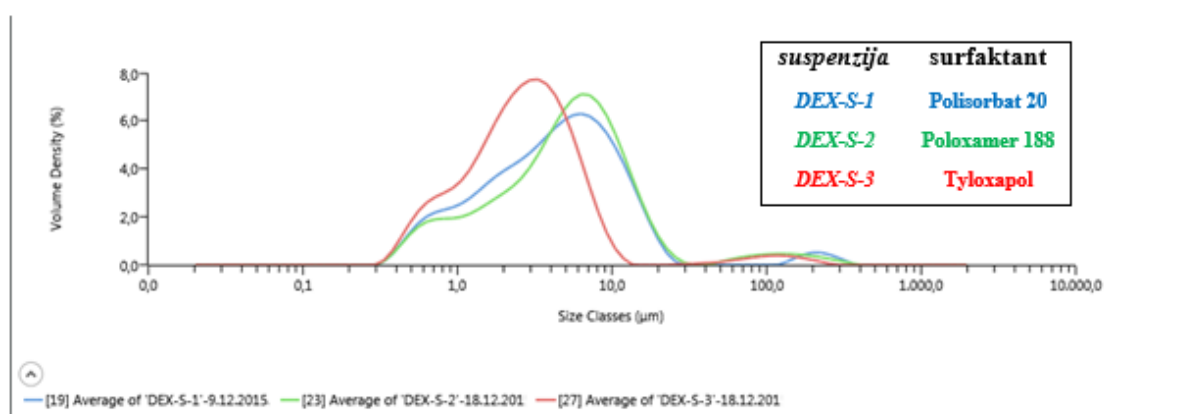
Analiza svakog uzorka provedena je šest puta. Mobilna faza za HPLC analizu bio je acetonitril (Merck, Njemačka) u odgovarajućem omjeru sa svježe priređenim fosfatnim puferom pH=2,0. Fosfatni pufer pripremljen je iz kalijevog dihidrogen fosfata (Kemika, Hrvatska) i MiliQ vode.

4. Rezultati i rasprava

4.1. LALLS analiza veličine čestica

4.1.1. Veličina čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji

Kako bi mogli odrediti utjecaj visokotlačne homogenizacije na veličinu čestica, potrebno je izmjeriti veličine čestica deksametazona u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji. Na **slici 15** vidljivo je kako je 90% čestica u nehomogeniziranoj suspenziji s poloksamerom 188 i polisorbatom 20 manjih od 14,6 μm odnosno 12,9 μm dok se u suspenziji s tyloxapolom ta vrijednost kreće oko 7 μm .

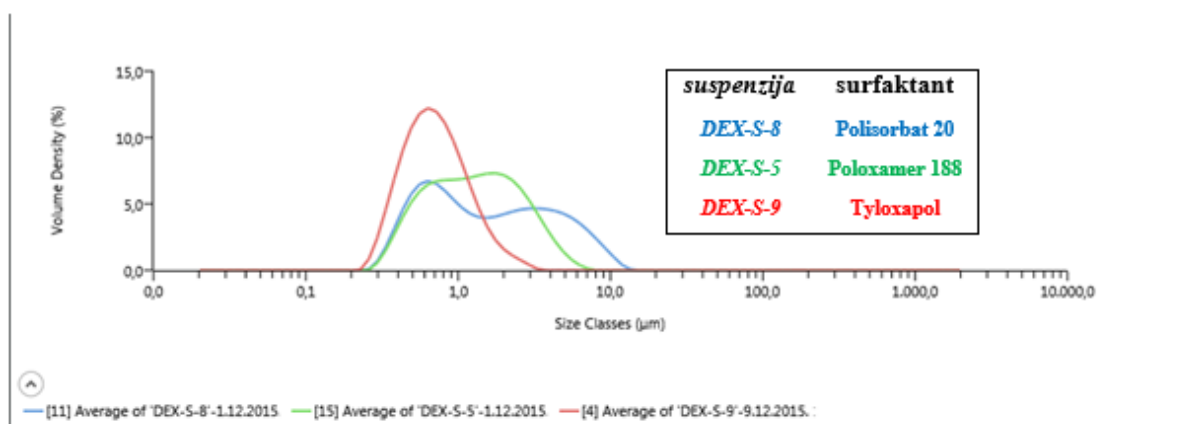


Slika 15, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji

Tablica 4, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji

suspenzija	iz koncentrata	konc. deksametazona	surfaktant	konc. surfaktanta	broj propuštanja	Dx 10 (μm)	Dx 50 (μm)	Dx 90 (μm)
DEX-S-1	DEX-C-1	1%	Polisorbat 20	0,50%	0	0,913	4,36	12,9
DEX-S-2	DEX-C-2	1%	poloxamer 188	0,50%	0	0,993	5,22	14,6
DEX-S-3	DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	0,787	2,66	6,65

4.1.2. Utjecaj vrste surfaktanta na veličinu čestica u formulaciji



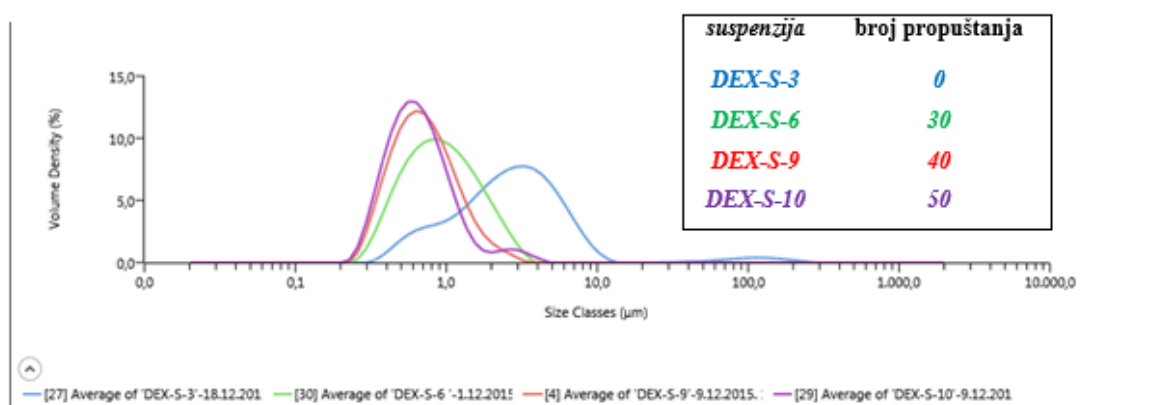
Slika 16, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim surfaktantima nakon homogenizacije

Tablica 5, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim surfaktantima

suspenzija	iz	konc.	surfaktant	konc.	broj	Dx 10	Dx 50	Dx 90
	koncentrata	deksametazona		surfaktanta	propuštanja	(µm)	(µm)	(µm)
DEX-S-8	DEX-C-4C	1%	Polisorbat 20	0,50%	50	0,479	1,45	5,92
DEX-S-5	DEX-C-2C	1%	Poloxamer 188	0,50%	40	0,499	1,27	3,16
DEX-S-9	DEX-C-5B	1%	Tyloxapol	0,50%	40	0,386	0,686	1,36

Na **slici 16** prikazane su veličine čestica u suspenzijama S-8, S-5, S-9, redom s polisorbatom 20, poloksamerom 188 I tyloxapolom nakon 50/40/40 prolazaka kroz mikrofluidizator. U svim je formulacijama došlo do značajnog pada veličine čestica, međutim, najmanje čestice dobivene su u formulaciji S-9 s tyloxapolom. Štoviše, ostale suspenzije ne pokazuju pravilnu raspodjelu veličina prisutnu u suspenziji s tyloxapolom, stoga su daljnja ispitivanja usmjerena upravo prema tim formulacijama.

4.1.3. Utjecaj broja propuštanja/duljine homogenizacije koncentrata na veličinu čestica u formulaciji



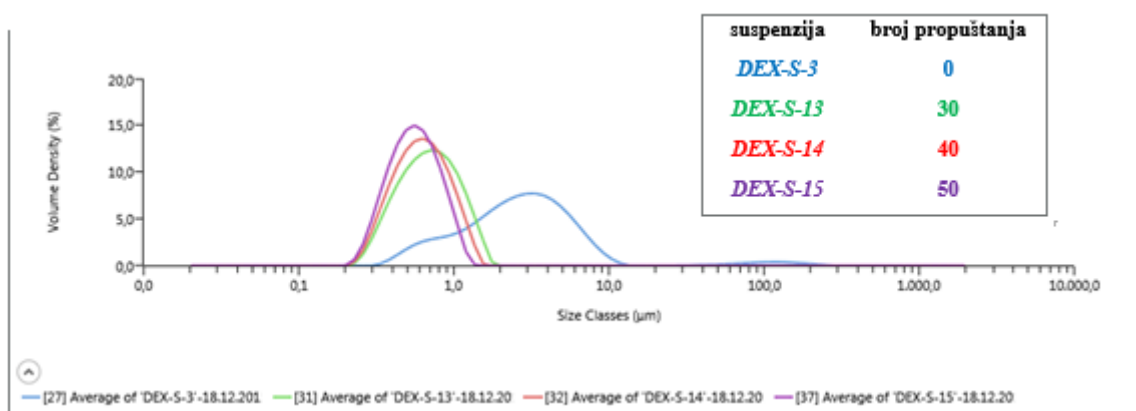
Slika 17, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s tyloxapolom različitih broja ciklusa homogenizacije

Tablica 6, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s tyloxapolom različitih broja ciklusa homogenizacije

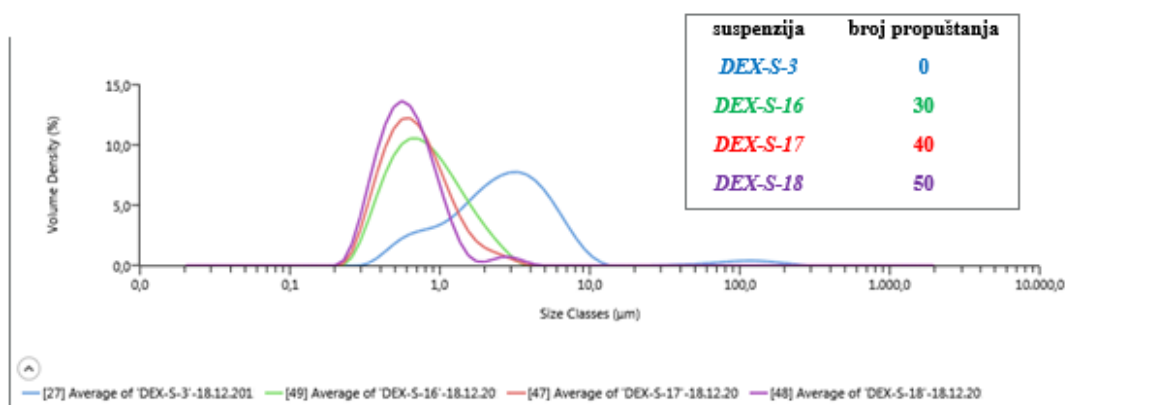
suspenzija	iz koncentrata	konc. deksametazona	surfaktant	konc. surfaktanta	broj propuštanja	Dx 10 (μm)	Dx 50 (μm)	Dx 90 (μm)
DEX-S-3	DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	0,787	2,66	6,65
DEX-S-6	DEX-C-3A	1%	Tyloxapol	0,50%	30	0,447	0,9	1,94
DEX-S-9	DEX-C-5B	1%	Tyloxapol	0,50%	40	0,386	0,686	1,36
DEX-S-10	DEX-C-5C	1%	Tyloxapol	0,50%	50	0,367	0,629	1,23

Slika 17 pokazuje krivulje raspodjele veličine čestica u suspenzijama s tyloxapolom koje su prošle kroz mikrofluidizator redom 0, 30, 40 i 50 puta. Jasno je vidljivo da se povećanjem broja propuštanja veličina čestica smanjuje, no i da je najveća razlika na početku, dok se daljnjom mikrofluidizacijom vide manji pomaci u veličini čestica. Ono što je važnije, jest da s većim brojem propuštanja, čestice postaju ujednačenije, to jest, da se krivulja raspodjele veličina sužava.

4.1.4. Utjecaj koncentracije tyloxapola na veličinu čestica u formulaciji



Slika 18, Raspodjela veličina čestica u suspenzijama izrađenim iz koncentrata s 5% deksametazona i 0,5% tyloxapola



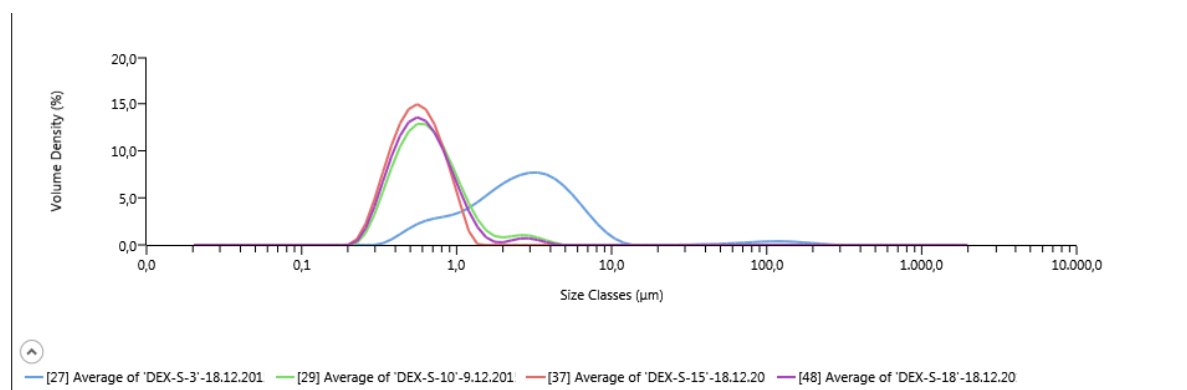
Slika 19, Raspodjela veličina čestica u suspenzijama izrađenim iz koncentrata s 5% deksametazona i 2,5% tyloxapola

Tablica 7, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim udjelom tyloxapola

suspenzija	iz	konc.	surfaktant	konc.	broj	Dx 10	Dx 50	Dx 90
	koncentrata	deksametazona		surfaktanta	propuštanja	(μ m)	(μ m)	(μ m)
DEX-S-3	DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	0,787	2,66	6,65
DEX-S-13	DEX-C-7A	5%	Tyloxapol	0,50%	30	0,378	0,688	1,2
DEX-S-14	DEX-C-7B	5%	Tyloxapol	0,50%	40	0,359	0,613	1,03
DEX-S-15	DEX-C-7C	5%	Tyloxapol	0,50%	50	0,338	0,552	0,891
DEX-S-16	DEX-C-6A	5%	Tyloxapol	2,50%	30	0,404	0,766	1,68
DEX-S-17	DEX-C-6B	5%	Tyloxapol	2,50%	40	0,373	0,657	1,33
DEX-S-18	DEX-C-6C	5%	Tyloxapol	2,50%	50	0,351	0,589	1,07

Povećanjem koncentracije tyloxapola u koncentratima iz kojih su izrađene navedene suspenzije (S16-18), dobivene su nešto veće čestice u odnosu na suspenzije izrađene iz koncentrata s pet puta manjom koncentracijom surfaktanta (S13-15). Razlog može biti taj što kod prevelike koncentracije surfaktanta dolazi do kolapsa monosloja na granici faza te se smanjuje djelotvornost surfaktanta. Također, pojačano pjenjenje uzorka uslijed viška surfaktanta može imati negativan učinak na usitnjavanje uzorka.

4.1.5. Utjecaj koncentracije deksametazona na veličinu čestica u formulaciji



Slika 20, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama izrađenih iz koncentrata s različitim udjelom deksametazona i tyloxapola

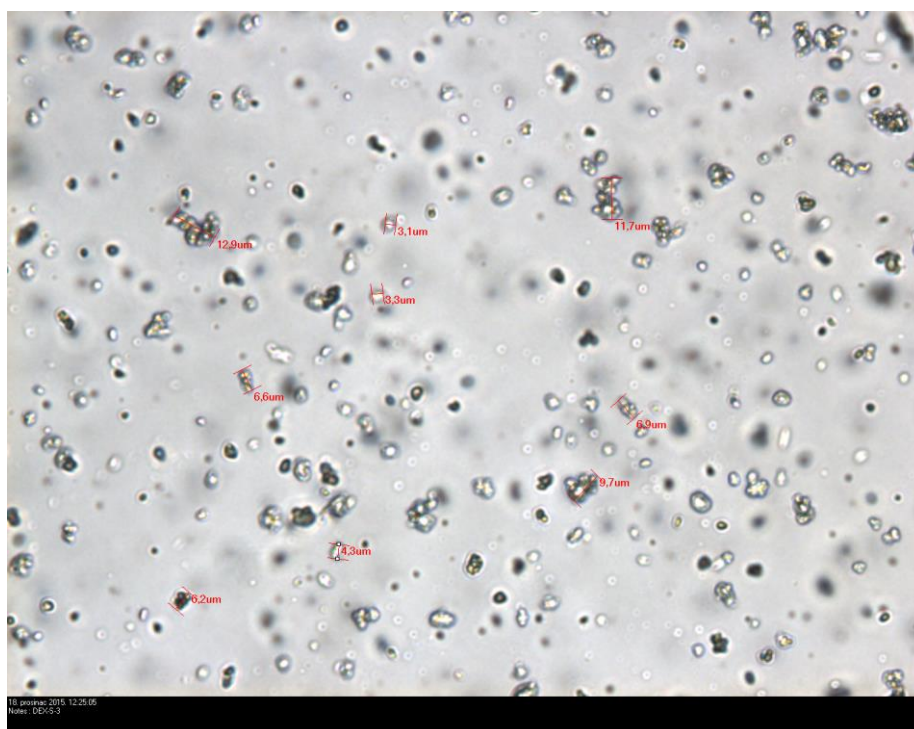
Tablica 8, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim udjelom deksametazona

suspenzija	iz koncentrata	konc. deksametazona	surfaktant	konc. surfaktanta	broj propuštanja	Dx 10 (μm)	Dx 50 (μm)	Dx 90 (μm)
DEX-S-3	DEX-C-3	1%	Tyloxapol	0,50%	0	0,787	2,66	6,65
DEX-S-10	DEX-C-5C	1%	Tyloxapol	0,50%	50	0,367	0,629	1,23
DEX-S-15	DEX-C-7C	5%	Tyloxapol	0,50%	50	0,338	0,552	0,891
DEX-S-18	DEX-C-6C	5%	Tyloxapol	2,50%	50	0,351	0,589	1,07

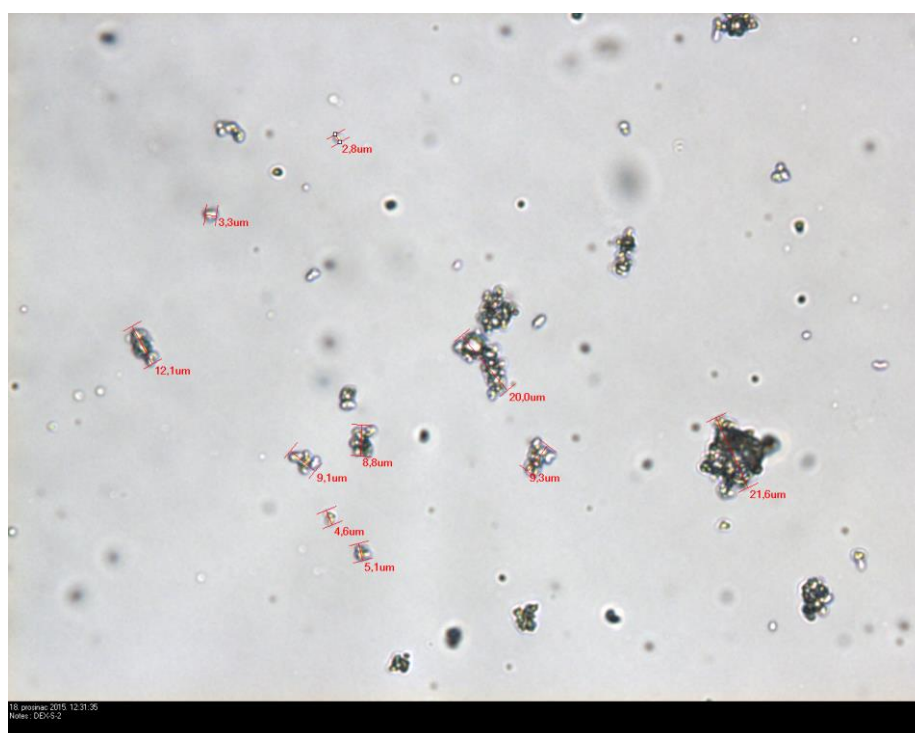
Povećanjem koncentracije deksametazona (pet puta u S-15 i S-18 u odnosu na S-10) u koncentratima iz kojih su izrađene navedene suspenzije, dobivene su manje čestice i užeg raspona veličina. Najmanja postignuta veličina čestica izmjerena je u S-15 suspenziji izrađenoj iz koncentrata s 5% deksametazona i 0.5% tyloxapola. D90 u toj suspenziji iznosi 0,891 μm što znači da je 90% čestica u suspenziji manje od te veličine. Ovaj rezultat je očekivan obzirom da je kod veće koncentracije krutine povećana vjerojatnost međusobnih sudara čestica kao i sudara sa homogenizacijskom komorom čime se povećava efikasnost homogenizacije.

4.2. Mikroskopske slike uzoraka

4.2.1. Slike uzoraka nepodvrgnutih homogenizaciji

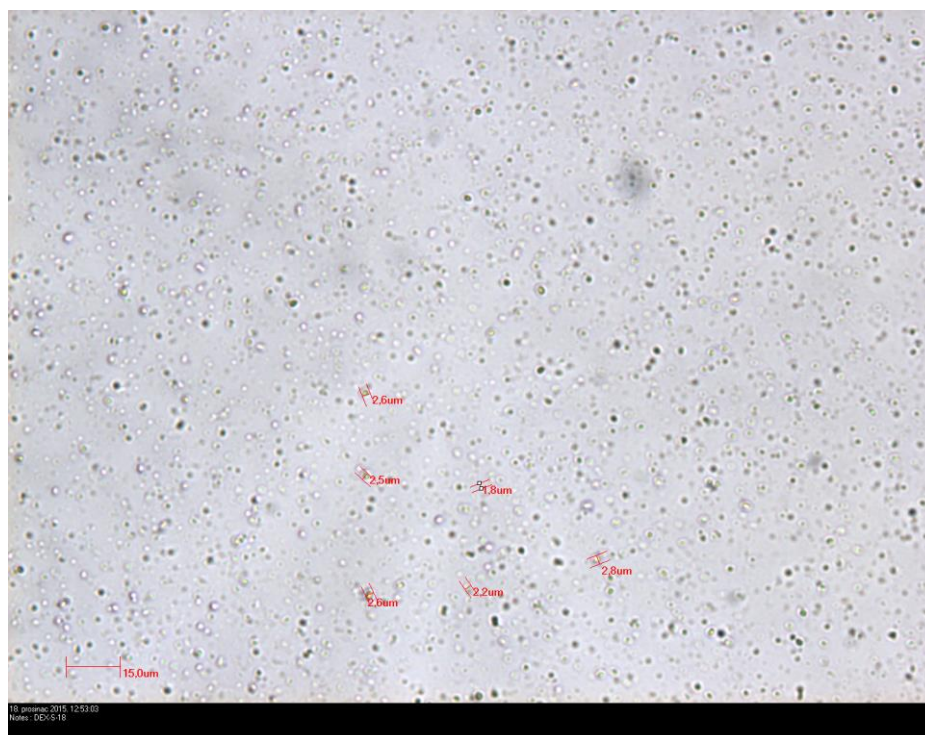


Slika 21, Čestice suspenzije S3 (tyloxapol) nepodvrgnute homogenizaciji pri povećanju 50x

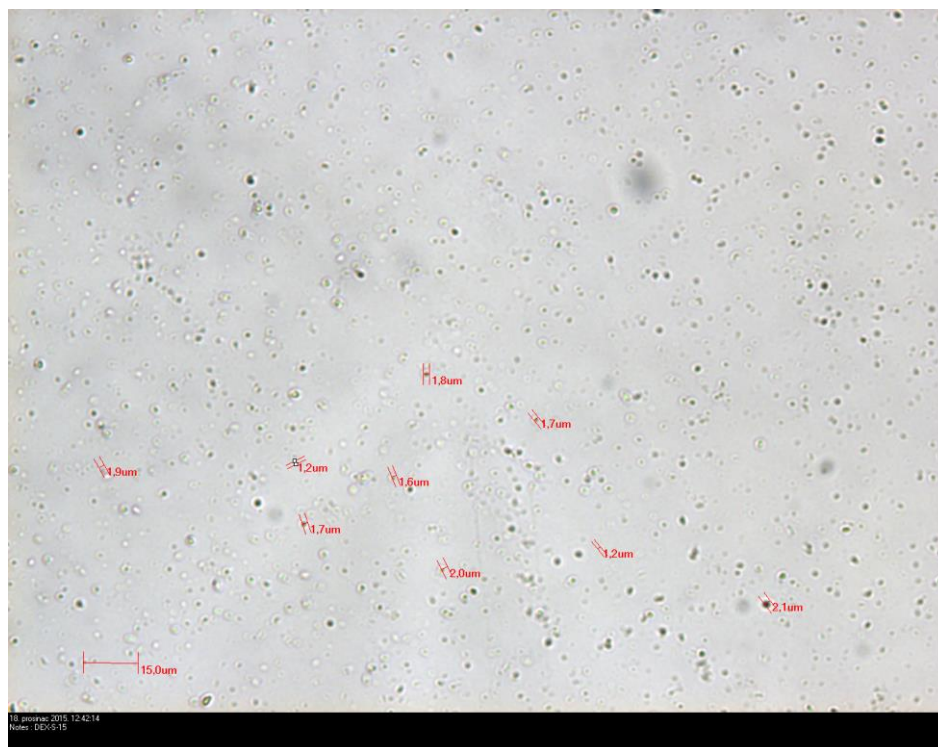


Slika 22, Čestice suspenzije S2 (poloksamer 188) nepodvrgnute homogenizaciji pri povećanju 50x

4.2.2. Slike uzoraka homogeniziranih mikrofluidizatorom



Slika 23, Čestice suspenzije S18, (tyloxapol) nakon 50 ciklusa homogenizacije pri povećanju 50x



Slika 24, Čestice suspenzije S15, (tyloxapol) najmanje od svih mjerenih suspenzija, 50x povećanje

Iz mikroskopskih prikaza vidljivo je kako su čestice u uzorcima nepodvrgnutim homogenizaciji (**slika 21 i 22**) aglomerirane u nakupine veličine i preko 20 μm , dok se veličine pojedinačnih čestica kreću između 3 i 4 μm . Usporedbom sa prikazima uzoraka nakon homogenizacije (**slika 23 i 24**) vidimo značajnu razliku: aglomerata nema, velike pojedinačne čestice su malobrojne, veličina tek nešto većim od 1 μm . Zbog ograničenja razlučivosti svjetlosnog mikroskopa manje čestice nisu vidljive.

4.3. Utjecaj veličine čestica djelatne tvari u formulaciji na brzinu oslobađanja djelatne tvari u *In vitro* uvjetima

Prema prethodno definiranim uvjetima, proveden je *in vitro* release test (IVRT) za dvije formulacije s različitom veličinom djelatne tvari – mljeveni S14 ($d_{90}=1.03\mu\text{m}$) i nemljeveni S3 ($d_{90}=6.65\mu\text{m}$) uzorak. Dobiveni su podatci o količini oslobođenog lijeka u predefiniranim vremenskim intervalima. Linearan dio vremena uzorkovanja je otprilike u rasponu 12-37% oslobođenog deksametazona iz formulacije. Rezultati oslobađanja deksametazona iz suspenzija S3 i S14 djelatne tvari su prikazani u tablicama 9 i 10.

Tablica 9, Brzina oslobađanja deksametazona iz nehomogenizirane suspenzije (S3) ($d_{90}=6.65\mu\text{m}$)

S3 Količina oslobođenog deksametazona ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

$\sqrt{t}/\text{min}$	1	3	5	2	4	6	Srednja vrijednost	s.d.	RSD(%)	SEM
4,5	12	16	15	13	15	16	14	1,4	9,5	0,8
6,3	21	26	24	22	24	26	24	1,8	7,6	1,0
7,7	29	35	33	30	32	35	32	2,1	6,5	1,2
8,9	36	44	41	38	40	43	41	2,9	7,1	1,7
10,0	43	52	48	44	47	51	47	3,1	6,6	1,8
11,0	49	59	55	50	53	57	54	3,6	6,6	2,1
11,8	55	66	61	56	59	64	60	3,8	6,3	2,2
12,6	60	72	67	62	64	70	66	4,1	6,1	2,3
13,4	66	78	73	68	70	75	72	3,9	5,4	2,2
nagib pravca	6,3476	7,4499	6,8558	6,4087	6,4932	7,0382				

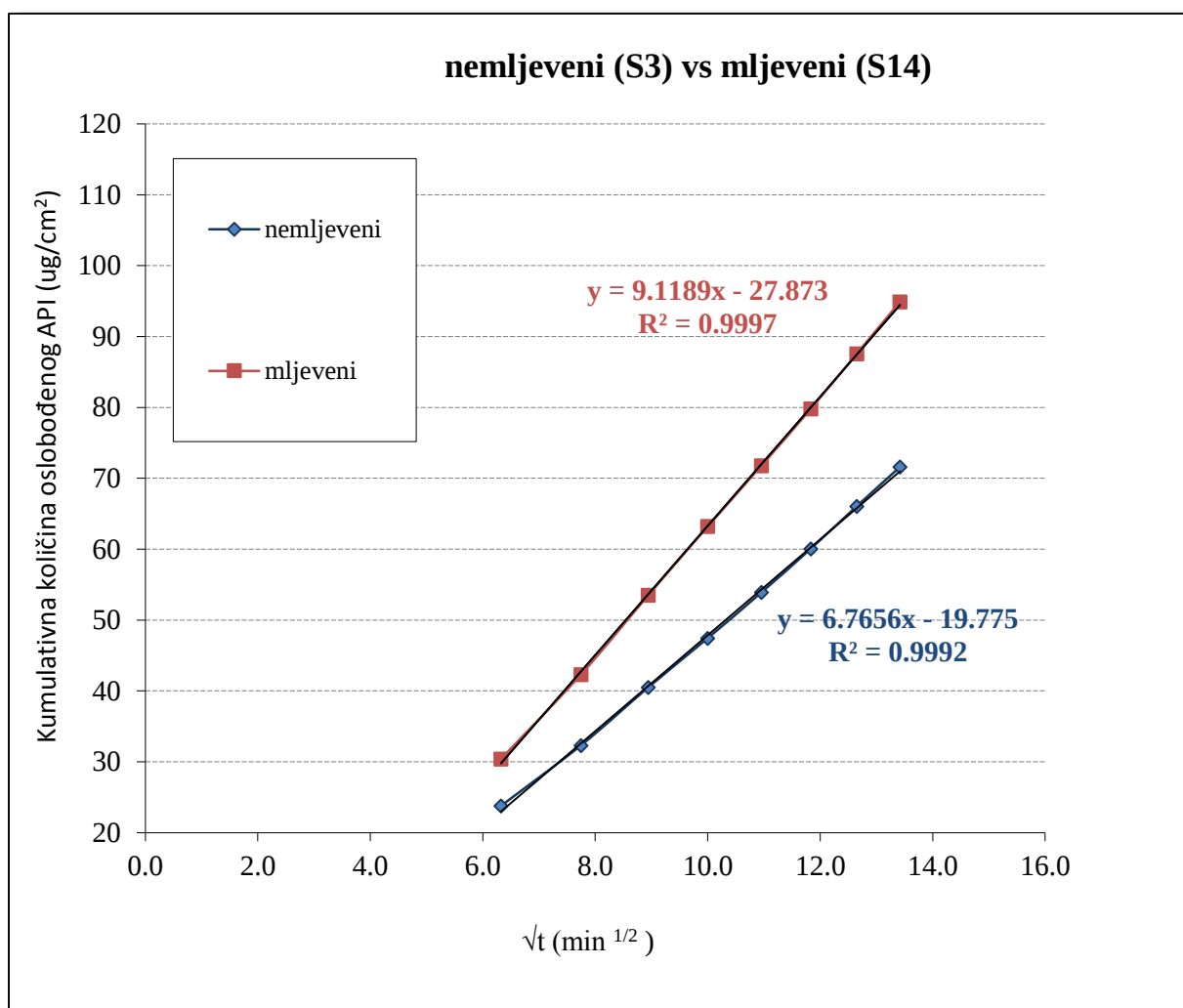
Tablica 10, Brzina oslobađanja deksametazona iz homogenizirane suspenzije (S14) ($d_{90}=1.03\mu\text{m}$)

S14 Količina oslobođenog deksametazona ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

$\sqrt{t}/\text{min}$	2	4	6	1	3	5	Srednja vrijednost	s.d.	RSD(%)	SEM
4,5	18	20	19	19	19	18	19	0,4	2,3	0,2
6,3	30	32	30	29	31	31	30	1,2	3,8	0,7
7,7	41	43	40	43	43	43	42	0,5	1,1	0,3
8,9	52	55	51	55	53	55	54	0,8	1,5	0,5
10,0	61	65	60	65	63	65	63	1,2	1,9	0,7
11,0	69	75	69	73	71	74	72	1,4	1,9	0,8
11,8	77	82	77	81	80	83	80	1,5	1,9	0,9
12,6	84	89	84	89	88	91	88	1,4	1,6	0,8
13,4	91	96	92	97	95	99	95	1,6	1,7	0,9
nagib pravca	8,6923	9,1227	8,7656	9,4697	9,0678	9,5952				

Na **slici 25** je prikazan grafički prikaz oslobađanja deksametazona iz nehomogenizirane i homogenizirane suspenzije. Iz linearne ovisnosti parametara vidljivo je da se oslobađanje deksametazona iz nanosuspenzija dobro može opisati Higuchijevim modelom.

Iz nagiba pravaca na **slici 25**, gdje je prikazan samo linearni dio oslobađanja deksametazona, vidljiva je razlika u brzinama oslobađanja s obzirom na različitu veličinu čestica djelatne tvari. Brzina oslobađanja deksametazona raste sa smanjenjem veličine čestica. To je i očekivano jer je u formulaciji s manjim česticama deksametazona površina čestica veća te se brže otapaju i mogu difundirati kroz membranu u receptorski medij.



Slika 25, Prosječni nagibi regresijskih pravaca oslobađanja deksametazona iz formulacija s većom i manjom veličinom čestica djelatne tvari u linearnom dijelu vremena (Enhancer ćelija, 75 mL pH 7.4/EtOH=90/10, 100 rpm).

Ukupno šest pojedinačnih nagiba pravaca dobivenih ispitivanjem formulacije s većom veličinom čestica djelatne tvari uspoređeno je sa šest pojedinačnih nagiba uzorka s manjom veličinom čestica (tablica 11).

Međusobni omjeri formulacija s različitom veličinom čestica djelatne tvari su poredani od najmanjeg prema najvećem. 90%-tni interval pouzdanosti za usporedbu navedenih formulacija koncentracijom iznosio je od 70,25% do 78,87%. Dobivene vrijednosti ne upadaju u interval koji je propisan za potvrđivanje sličnosti ispitivanih uzoraka. Odabrana metoda je osjetljiva na promjene u veličini čestica djelatne tvari.

Tablica 11, Usporedba šest pojedinačnih nagiba pravaca: nemljeveni vs mljeveni uzorak

		nemljeveni (d90=6.65 µm)					
		6,3476	7,4499	6,8558	6,4087	6,4932	7,0382
mljeveni (d90=1.03µm)	8,6923	73,03	85,71	78,87	73,73	74,70	80,97
	9,1227	69,58	81,66	75,15	70,25	71,18	77,15
	8,7656	72,41	84,99	78,21	73,11	74,08	80,29
	9,4697	67,03	78,67	72,40	67,68	68,57	74,32
	9,0678	70,00	82,16	75,61	70,68	71,61	77,62
	9,5952	70,00	82,16	75,61	70,68	67,67	77,62

90% CI: 70,25% do 78,87%

5. Zaključci

Prilikom izrade ovog diplomskog rada uspješno su pripremljene nanosuspenzije deksametazona metodom visokotlačne homogenizacije mikrofluidizatorom koristeći surfaktant tyloxapol. Koristeći ostala dva ispitivana surfaktanta (poloksamer 188, polisorbat 20) efikasnost usitnjavanja deksametazona je bila smanjena, te niti pri najvećem broju propuštanja kroz homogenizator nije došlo do formiranja nanosuspenzija. Stoga je daljnja optimizacija procesa homogenizacije i sastava koncentrata deksametazona provedena koristeći samo tyloxapol.

Povećanjem broja ciklusa homogenizacije koncentrata, smanjuje se veličina čestica u pripadajućim finalnim suspenzijama.

Povećanjem koncentracije deksametazona u koncentratima, smanjuje se veličina čestica u pripadajućim finalnim suspenzijama što se pripisuje povećanoj vjerojatnosti međusobnih sudara čestica kao i sudara sa homogenizacijskom komorom čime se povećava efikasnost homogenizacije.

Povećanje koncentracije surfaktanta-tyloxapola nije imalo povoljan utjecaj na smanjenje veličine čestica.

Rezultati dobiveni ispitivanjem brzine oslobađanja iz suspenzija u skladu su s veličinom čestica, korištena metoda *IVRC-a (Enhancer difuzijska ćelija)* pokazala je brže oslobađanje lijeka iz nanosuspenzije u odnosu na nehomogenizirani uzorak.

6. Literatura

- Aglient Technologies inc. Enhancer Cell operating manual, 2013.
- Andrić, Ivana. Priprava stabilne suspenzije za lijevanje kompozitne keramike. Zagreb, 2012.
- Bacic, Sarah M, Wilson Antony. Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nature Protocols*, br. 7, str. 1716–1727, 2012
- BASF Aktiengesellschaft. Poloxamer 188 for the pharmaceutical industry, 1997
- Biotechnology, Santa Cruz. <http://www.scbt.com/datasheet-255711-tyloxapol.html>, pristupljeno lipanj 2016.
- Collett JH, Poloxamer. U: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, autori Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Walter G Cook i Marian E. Fenton, str. 506-509, 2009.
- D'Souza, Susan A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014
- Dhankhar, P. Homogenisation Fundamentals. *Journal of Engeneering* 4, br. 5, str. 1-8, 2014
- European Medicines Agency, EMA. *Rapamune, sirolimus*. European Medicines Agency, 2015
- European Medicines Agency, EMA. *Xeplion, paliperidon*. European Medicines Agency, EMA, 2012
- European Medicines Agency, EMA. *Zypadhera (olanzapine)*. European Medicines Agency, 2013
- FDA. *Inactive Ingredients Database* . FDA, 2016
- Feng Liu, Ji-Young Park, Yong Zhang, Christine Conwell, Yang Liu, Surendar Reddy Bathula and Leaf Huang. Targeted cancer therapy with novel high drug-loading nanocrystals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, br. 8, str. 3542–3551, 2010
- Ghio AJ, Marshall BC, Diaz JL, Hasegawa T, Samuelson W, Povia D, Kennedy TP, Piantodosi CA. Tyloxapol inhibits NF-kappa B and cytokine release, scavenges HOCl, and reduces viscosity of cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996

- Hak-Kim Chan, Philip Chi Lip Kwok. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*, str. 406-416, 2011
- Halmed, *SAŽETAK OPISA SVOJSTAVA LIJEKA: Dexamethason Krka 4 mg/ml otopina za injekciju ili infuziju* . Halmed, 2013
- Hooton, JC. Carboxymethylcellulose Sodium, U: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, autori Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Walter G Cook i Marian E. Fenton, str. 118-121, 2009
- Horiba-Scientific. *Dynamic Light Scattering Technology*.
<http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>, pristupljeno lipanj 2016.
- Jens, Uwe. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine*, str. 295-309, 2008
- Jiao, J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, br. 15 str. 1663–1673, 2008
- Johnson, Mary. *A comprehensive review of laboratory detergents, and their applications in biomedical experiments, including Labome survey results*. Labome, Synatom Research, 2014.
- Mauludin. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, str. 202-209, 2009
- Merisko-Liversidge Elaine M., Liversidge Gary G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicologic Pathology* 36, br. 1, str. 43-48, 2008
- Microfluidics. *Microfluidizer High Shear Processor*. <http://www.microfluidicscorp.com/our-technology>, 2013, pristupljeno travanj 2016.
- Milton J. Rosen, Joy T. Kunjappu. Dispersion and aggregation of solids in liquid media by surfactants. U *Surfactants and Interfacial Phenomena*, str. 368-381. Wiley and sons, 2012.

- Müller R. H., C Jacobs, O Kayser. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, br. 1, str. 3–19, 2001
- Naiim M, Boualem A, Ferre C, Jabloun M, Jalocha A, Ravier P. Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*, br. 1, str. 28-32, 2015
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*; CID=14798. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14798>, pristupljeno travanj 2016.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*; CID=313. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/313>, pristupljeno travanj 2016.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*; CID=5234. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5234>, pristupljeno travanj 2016.
- Noyes A.A., Whitney W. R. The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions. *Journal of the American Chemical Society* 19, br. 12, str. 930-934, 1897
- Particle Sciences. In Vitro Release Testing Methods for Semisolid Formulations. *Technical Brief - Particle Sciences* 10, 2009
- Patravale V. B., Abhijit A. Date, R. M. Kulkarni. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, str. 827–840, 2004
- Pepić, Ivan. Terapijska primjena nanokristala lijeka. Zagreb, 2015.
- PubChem. *Compound summary for dexamethasone*. PubChem: open chemistry database, pristupljeno svibanj 2016.
- R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayser. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, br. 1, str. 3-19, 2001

- Rege, Vilivalam, Collins. Development in release testing of topical dosage forms: use of the Enhancer Cell™ with automated sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17, br. 8, str. 1225-1233, 1998
- Rosen MJ, Kunjappu JT. Characteristics and features of surfactants . U *Surfactants and Interfacial Phenomena*, str. 1-25. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2012
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. *Sodium Chloride U: Handbook of Pharmaceutical Excipients*, London: Pharmaceutical Press, 2009
- Shegokar, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *International Journal of Pharmaceutics* 399, br. 1-2, str. 129-139, 2010
- Shekunov Boris Y., Pratibhash Chattopadhyay, Henry H. Y. Tong, Albert H. L. Chow. Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Research* 24, br. 2, str. 203-227, 2007
- Sigma-Aldrich. Osnovna struktura poloksamera 188- P2164009 SIGMA-ALDRICH, pristupljeno lipanj 2016.
- Sudhir Vermaa, Sumit Kumara, Rajeev Gokhaleb, Diane J. Burgessa. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *International Journal of Pharmaceutics* 406, br. 1-2, str. 145-152, 2011
- Trinity college Dublin. *Particle Size Analysis*. Center for microscopy and analysis, 2012
- Wang, Hong. Excipient monographs - Tyloxapol. U *US Pharmacopoeia*, str. 2228, 2007
- Water Structure and Science. *Carboxymethylcellulose*. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/>, 2015, pristupljeno travanj 2016.
- Yalkowsky S.H., Dannenfelser R.M. Prediction of drug solubility by the general solubility equation (GSE), 1992
- Zhang, D. Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters. U *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, autori Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Walter G Cook i Marian E. Fenton, str. 549-553, 2009

7. Sažetak/Summary

Tijekom ovog istraživanja pripremljeni su koncentracije deksametazona s različitim vrstom surfaktanta (tyloxapola, poloksamera 188 te polisorbata 20), te dodatno evaluirane različite koncentracije deksametazona i surfaktanta tyloxapola. Isti koncentracije podvrgnuti su visokotlačnoj homogenizaciji - mikrofluidizaciji u različitim brojem ciklusa. Vrijednosti temperature i tlaka bile su konstantne.

Temeljem rezultata pripremljene su i uspoređene finalne suspenzije deksametazona (0.1%), te surfaktanta (0.05%). Usporedba se temelji na njihovim veličinama čestica i brzini oslobađanja deksametazona.

Ispitivanjem veličine čestica provedenim LALLS metodom (*Low Angle Laser Light Scattering*) na instrumentu Malvern Mastersizer 3000, dobiveni su profili volumne raspodjele veličine čestica. Brzina oslobađanja mjerena je pomoću Enhancer difuzijskih ćelija i kvantitativno određivanje oslobođenog lijeka uz pomoć HPLC uređaja.

Rezultati su pokazali da se povećanjem broja ciklusa homogenizacije koncentrata i koncentracije deksametazona smanjuje veličina čestica u pripadajućim finalnim suspenzijama. Povećanje koncentracije surfaktanta nije imalo povoljan utjecaj na smanjenje veličine čestica.

Metoda *IVRT* s Enhancer difuzijskom ćelijom pokazala je brže oslobađanje deksametazona iz nanosuspenzija u odnosu na nehomogeniziranu suspenziju.

In this study dexamethasone concentrates were prepared with different types of surfactants (tyloxapol, poloxamer 188 and polysorbate 20). Concentrates with variable amounts of dexamethasone and tyloxapol were further evaluated. The same concentrates were subjected to high pressure microfluidization with variable cycles. The values of temperature and pressure were kept constant.

Using results of these concentrates, final dexamethasone suspensions (dexamethasone 0.1%), and surfactant 0.05% were prepared and compared. The comparison is based on their particle sizes and the release rate of dexamethasone.

Particle size was examined using LALLS method (Low Angle Laser Light Scattering), Malvern Mastersizer 3000 instrument. Results were obtained in the form of particle size volume distribution profiles. The release rate was measured using the Enhancer diffusion cells and quantified using HPLC equipment.

Results showed that by increasing the number of homogenization cycles and dexamethasone concentration in the concentrates, smaller particles are found in corresponding final suspensions. Increasing the concentration of the surfactant did not have a favorable effect on the particle size reduction.

IVRT method with Enhancer diffusion cells has shown faster release of dexamethasone from nanosuspensions in comparison with non-homogenised suspensions.

8. Prilozi

Tablica 1, Pripremljeni uzorci koncentrata deksametazona za preliminarno ispitivanje	19
Tablica 2, Pripremljeni uzorci koncentrata deksametazona za ispitivanja s tyloxapolom	19
Tablica 3, Sastav suspenzija deksametazona	20
Tablica 4, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji	23
Tablica 5, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim surfaktantima	24
Tablica 6, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s tyloxapolom različitih broja ciklusa homogenizacije.....	25
Tablica 7, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim udjelom tyloxapola	26
Tablica 8, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim udjelom deksametazona..	27
Tablica 9, Brzina oslobađanja deksametazona iz nehomogenizirane suspenzije (S3) (d90=6.65 μm).....	30
Tablica 10, Brzina oslobađanja deksametazona iz homogenizirane suspenzije (S14) (d90=1.03μm).....	31
Tablica 11, Usporedba šest pojedinačnih nagiba pravaca: nemljeveni vs mljeveni uzorak....	33
Slika 1, Odnos površina čestica različite veličine za jednaku količinu materijala (Mauludin, 2009).....	1
Slika 2, Priprava nanosuspenzija mljevenjem u kugličnom mlinu (Pepić, 2015).....	4
Slika 3, Princip rada piston-gap uređaja za homogenizaciju (Dhankhar, 2014)	5
Slika 4, Dvije izvedbe mikokanalića mikrofluidizatora (Microfluidics, 2013)	5

Slika 5, Uspješnost steričke stabilizacije nanosuspenzije ovisi o koncentraciji surfaktanta (Andrić, 2012)	7
Slika 6, Struktura deksametazona (PubChem, 2016)	7
Slika 7, Osnovna struktura Tyloxapola (Biotechnology, 2016)	10
Slika 8, Osnovna struktura polisorbata 20 (Johnson, 2014)	10
Slika 9, Osnovna struktura poloksamera 188 (Sigma-Aldrich, 2016)	11
Slika 10, Struktura karboksimetilceluloze (Water Structure and Science, 2015)	12
Slika 11, Optički dijelovi DLS analizatora veličina čestica (Horiba-Scientific, 2016)	14
Slika 12, Princip mjerenja LALLS analizatora (Dublin, 2012)	15
Slika 13, Osnovni dijelovi Enhancer ćelije (Rege, 1998)	16
Slika 14, Mastersizer 3000, dijelovi	21
Slika 15, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama nepodvrgnutim homogenizaciji	23
Slika 16, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s različitim surfaktantima nakon homogenizacije	24
Slika 17, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama s tyloxapolom različitih broja ciklusa homogenizacije	25
Slika 18, Raspodjela veličina čestica u suspenzijama izrađenim iz koncentrata s 5% deksametazona i 0,5% tyloxapola	26
Slika 19, Raspodjela veličina čestica u suspenzijama izrađenim iz koncentrata s 5% deksametazona i 2,5% tyloxapola	26
Slika 20, Raspodjela veličine čestica u suspenzijama izrađenih iz koncentrata s različitim udjelom deksametazona i tyloxapola	27
Slika 21, Čestice suspenzije S3 (tyloxapol) nepodvrgnute homogenizaciji pri povećanju 50x28	

Slika 22, Čestice suspenzije S2 (poloksamer 188) nepodvrgnute homogenizaciji pri povećanju 50x.....	28
Slika 23, Čestice suspenzije S18, (tyloxapol) nakon 50 ciklusa homogenizacije pri povećanju 50x.....	29
Slika 24, Čestice suspenzije S15, (tyloxapol) najmanje od svih mjerenih suspenzija, 50x povećanje.....	29
Slika 25, Prosječni nagibi regresijskih pravaca oslobađanja deksametazona iz formulacija s većom i manjom veličinom čestica djelatne tvari u linearnom dijelu vremena	32

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Industrijska farmacija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj površinski aktivnih tvari na veličinu čestica deksametazona u nanosuspenziji

Jelena Tkalec

Tijekom ovog istraživanja pripremljeni su koncentрати deksametazona s različitom vrstom surfaktanta (tyloxapola, poloksamera 188 te polisorbata 20), te dodatno evaluirane različite koncentracije deksametazona i surfaktanta tyloxapola. Isti koncentрати podvrgnuti su visokotlačnoj homogenizaciji - mikrofluidizaciji u različitom broju ciklusa. Vrijednosti temperature i tlaka bile su konstantne.

Temeljem rezultata pripremljene su i uspoređene finalne suspenzije deksametazona (0.1%), te surfaktanta (0.05%). Usporedba se temelji na njihovim veličinama čestica i brzini oslobađanja deksametazona.

Ispitivanjem veličine čestica provedenim LALLS metodom (Low Angle Laser Light Scattering) na instrumentu Malvern Mastersizer 3000, dobiveni su profili volumne raspodjele veličine čestica. Brzina oslobađanja mjerena je pomoću Enhancer difuzijskih ćelija i kvantitativo određivanje oslobođenog lijeka uz pomoć HPLC uređaja.

Rezultati su pokazali da se povećanjem broja ciklusa homogenizacije koncentrata i koncentracije deksametazona smanjuje veličina čestica u pripadajućim finalnim suspenzijama. Povećanje koncentracije surfaktanta nije imalo povoljan utjecaj na smanjenje veličine čestica.

Metoda IVRT s Enhancer difuzijskom ćelijom pokazala je brže oslobađanje deksametazona iz nanosuspenzija u odnosu na nehomogeniziranu suspenziju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 25 grafičkih prikaza, 11 tablica i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: deksametazon, tyloxapol, nanosuspenzija, visokotlačna homogenizacija

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, redovita profesorica *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Jasmina Lovrić, izvanredna profesorica *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Industrial pharmacy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE IMPACT OF SURFACTANTS ON THE PARTICLE SIZE OF DEXAMETHASONE IN NANOSUSPENSIONS

Jelena Tkalec

In this study dexamethasone concentrates were prepared with different types of surfactants (tyloxapol, poloxamer 188 and polysorbate 20). Concentrates with variable amounts of dexamethasone and tyloxapol were further evaluated. The same concentrates were subjected to high pressure microfluidization with variable cycles. The values of temperature and pressure were kept constant.

Using results of these concentrates, final dexamethasone suspensions (dexamethasone 0.1%), and surfactant 0.05% were prepared and compared. The comparison is based on their particle sizes and the release rate of dexamethasone.

Particle size was examined using LALLS method (Low Angle Laser Light Scattering), Malvern Mastersizer 3000 instrument. Results were obtained in the form of particle size volume distribution profiles. The release rate was measured using the Enhancer diffusion cells and quantified using HPLC equipment.

Results showed that by increasing the number of homogenization cycles and dexamethasone concentration in the concentrates, smaller particles are found in corresponding final suspensions. Increasing the concentration of the surfactant did not have a favorable effect on the particle size reduction.

IVRT method with Enhancer diffusion cells has shown faster release of dexamethasone from nanosuspensions in comparison with non-homogenised suspensions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 25 figures, 11 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: dexamethasone, tyloxapol, nanosuspension, high pressure homogenisation

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.**, Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.**, Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jelena Filipović-Grčić, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasmina Lovrić, Ph.D., Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2016.

