

Priprava i karakterizacija nanokristala flutikazonpropionata

Bano, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:842697>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Bano

**Priprava i karakterizacija nanokristala
flutikazonpropionata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Pepića. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivanu Pepiću i izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom i savjesnom vođenju kroz proces izrade diplomskog rada te Lauri Nižić, mag. pharm. na pruženoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Također, želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i bezuvjetnoj podršci tijekom studentskih dana.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanokristali.....	1
1.2. Izrada nanokristala djelatne tvari	3
1.2.1. Metoda vlažnog mljevenja	5
1.2.2. Visokotlačna homogenizacija	6
1.2.3. Precipitacija iz otopine	6
1.3. Nazalna primjena lijekova	16
1.3.1. Nanokristali za nazalnu primjenu lijekova	16
1.3.2. Mukocilijarni klirens	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Priprava i karakterizacija slijepih uzoraka	20
3.2.2. Izrada suspenzije flutikazonpropionata	20
3.2.3. Priprema uzoraka za mljevenje	21
3.2.4. Određivanje srednjeg promjera čestica	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Rezultati mjerenja	23
4.1.1. Utjecaj omjera djelatne tvari/PAT-a i mase kuglica za mljevenje	24
4.1.2. Utjecaj variranja mase pojedinih veličina kuglica za mljevenje	27
5. ZAKLJUČCI	30
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK/SUMMARY	35

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. UVOD

Prema podacima navedenim u dostupnoj literaturi, oko 60% novosintetiziranih djelatnih tvari teško je topljivo (Merisko-Liversidge, 2002). Stoga se pokušavaju naći metode kojima se postigne bolja solubilizacija, odnosno povećava topljivost takvih tvari. Jedna od njih upravo je i priprava nanočestica, odnosno smanjenje veličine čestica djelatnih tvari na nanometarsku veličinu. Veličina nanočestica je različita i u rasponu je od od 1 do 1000 nm.

Danas je nanotehnologija zastupljena u različitim aspektima znanosti. Najčešći primjeri njezine primjene odnose se na proizvodnju kompjutorskih čipova (Kanellos, 2005) primjenu u biotehnologiji te u razvoju dermokožmetičkih proizvoda (nanonizirane čestice pokazuju različite korisne učinke) (Müller i sur., 2006). Također, nanotehnologija je zastupljena u prehrambenoj industriji (nanokapsulirani vitamini u funkcionalnoj hrani) (Velikov, 2006), u medicinskim djelatnostima (mali roboti kao čistači arterija) (Kazimierski, 2005), odnosno u farmaceutskoj industriji u proizvodnji i primjeni različitih lijekova (Junghanns i Müller, 2008).

U farmaceutskoj industriji proizvodnjom nanoniziranih lijekova poboljšana su određena svojstva djelatne tvari koja se odnose na fizičko-kemijsku stabilnost i topljivost. Slaba topljivost povezana je sa slabom bioraspoloživošću lijeka. Prva formulacija lijeka u obliku nanokristala (antimikotik, amfotericin B) odobrena je 1990. godine zaštićenog imena Ambisome®. Od tada, na tržištu lijekova cirkulira 40-ak različitih nanoniziranih lijekova.

1.1. NANOKRISTALI

Nanokristali su nanonizirane čestice djelatne tvari. Iako pojam 'nanokristali' implicira da djelatna tvar mora biti u kristalnom obliku, što vrijedi za većinu djelatnih tvari, proširen je kako bi se lakše opisale i druge nanosuspenzije. Pojedine djelatne tvari u kristalnom obliku, prilikom pripreme i obrade nanosustava postaju amorfne. Međutim, strogo govoreći, tako dobivene amorfne djelatne tvari se ne bi trebale zvati nanokristalima.

Nanosuspenzije su termodinamički nestabilni sustavi koji imaju veliku specifičnu površinu i time visoku Gibbsovu slobodnu energiju. Svi sustavi u prirodi teže stanju niže slobodne energije. Kako bi sustav postao stabilan, čestice u nanosuspenzijama agregiraju čime se povećavaju te

moгу izaći iz raspona nanometarske veličine. Zbog toga se, osim djelatne tvari i tekuće faze, u sustavu mora nalaziti i treća komponenta (Malamatari i sur., 2018).

Formulacija nanokristala sastoji se od nanočestica djelatne tvari i jednog ili više stabilizatora dispergiranih u vodenom ili nevodnom mediju. Stabilizatori moraju biti zdravstveno ispravni i ne smiju smanjivati učinkovitost lijeka. Oni mogu biti surfaktanti, puferi, šećeri ili soli (Raghava i Mishra, 2014). Mehanizmi kojima stabilizatori osiguravaju stabilnost formulacije su sterička stabilizacija i elektrostatsko odbijanje. Stabilnost se postiže uvođenjem ionskih i neionskih stabilizatora u sustav (Malamatari i sur., 2018).

Nanokristali se mogu koristiti za oralnu (Hanafy i sur., 2007; Kayser i sur., 2003; Mauludin i sur., 2009), parenteralnu (Ganta i sur., 2009; Rabinow i sur., 2007; Gao i sur., 2008), okularnu (Kassem i sur., 2007; Ali i sur., 2011), dermalnu (Shaal i sur., 2011; Mitri i sur., 2011; Mishra i sur., 2009), pulmonalnu (El-Gendy i sur., 2011; Jacobs i Muller, 2002; Yang i sur., 2010) i nazalnu primjenu za postizanje selektivne i kontrolirane dostave lijeka na određeno mjesto (Kayser i sur., 2001; Muller i Jacobs, 2002, Malamatari i sur., 2018).

Problem dobivanja nanosustava je relativno nisko uklapanje djelatne tvari, složeni postupci izrade i nedovoljno ispitana sigurnost sirovina koje se koriste kao nosači (Lovrić i sur., 2015).

Laboratorijske metode dobivanja nanokristala teško je prenijeti na industrijsku proizvodnju. Također, u industriji se *de novo* sintetiziraju pomoćne tvari tako da odgovaraju fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari. Budući da takvi materijali nisu toksikološki ispitani, mogu predstavljati problem vezano uz zdravstvenu ispravnost.

Nanočesticama se smatraju one tvari koje imaju veličinu od 1 do 1000 nm. Međutim, neka istraživanja pokazuju da se čestice veće od 200 nm slabije otapaju te ih onda fagocitiraju makrofagi jetre, dok se, s druge strane, čestice koje su manje od 100 nm, vrlo brzo otapaju (Eknath Ahire i sur., 2018). Takvi podaci moraju se uzeti u obzir kada se ispituje što se događa s lijekovima *in vivo*, posebice u slučaju lijekova za parenteralnu primjenu.

Danas na tržištu postoji nekoliko odobrenih nanosustava za različite indikacije poput karcinoma, boli ili infektivnih bolesti. Neki od njih su oralni pripravci, primjerice Rapamune® (sirolimus), Tricor®/Lipanthyl®/Lipidil® (fenofibrat), Emend® (aprepitant), Neoral® (ciklosporin), Norvir® (ritonavir). Za parenteralnu primjenu su odobreni primjerice Zypadhera® (olanzapin), Xeplion® (paliperidon), Abraxane® (paklitaksel), Monofer® (željezov (III) izomaltozid) (Hafner i sur., 2014).

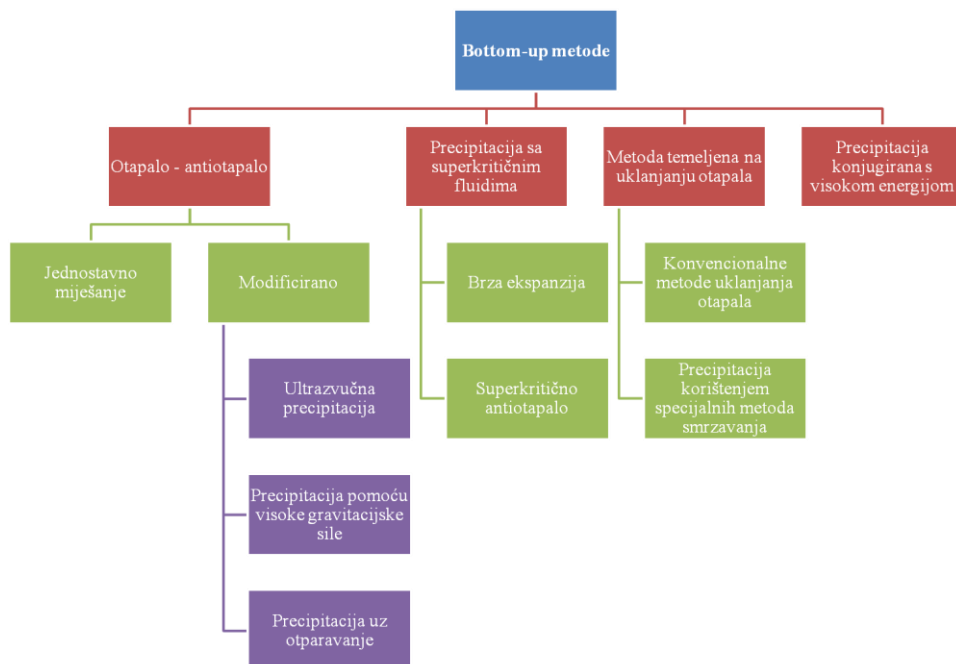
Neke formulacije nanosustava kao što su primjerice Semapimod® (gvanilhidrazon), Paxceed® (paklitaksel), Theralux® (thymectacin) i Nucryst® (srebro) su još uvijek u kliničkim fazama istraživanja. Osim njih, postoje i mnogi drugi u pretkliničkim fazama (Raghava Srivalli i Mishra, 2014.)

1.2. IZRADA NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Danas su poznate dvije skupine metoda dobivanja nanočestica (Slika 2.), a odnose se na:

- metode smanjenja veličine čestica (engl. top-down methods) pripadaju fizičko-mehaničkim metodama, odnosno temelje se na principu smanjivanja većih čestica na nanometarsku veličinu; smatraju se univerzalnim metodama za pripremu kristalinih nanočestica, osiguravaju dobivanje finijih čestica i mogu se lako prenijeti na industrijsko mjerilo (metoda vlažnog mljevenja, metoda visokotlačne homogenizacije - engl. high-pressure homogenization - HPH, mikrofluidizacija i dr.),
- metode povećanja veličine čestica (engl. bottom-up methods), pripadaju fizičko-kemijskim metodama u kojima je djelatna tvar otopljena u određenom otapalu, nakon čega se nanokristali dobivaju precipitacijom iz otopine; sve metode iz ove skupine obuhvaćaju dva osnovna principa: taloženje nanokristala i otparavanje otapala (metode precipitacije s otapalom i antiotapalom, kriogeno otparavanje otapala, precipitacija sa superkričnim fluidima, precipitacija s centrifugiranjem i dr.) (Raghava Srivalli i Mishra, 2014);

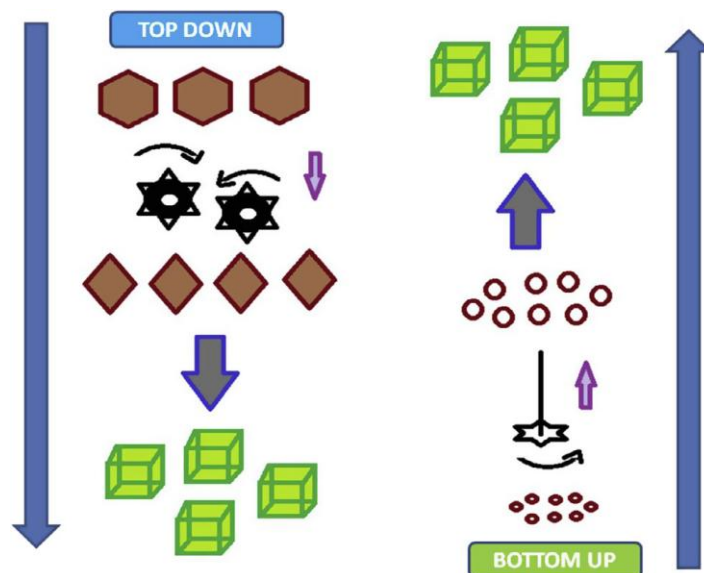
Slika 1. daje uvid u konvencionalne i nove *bottom-up* metode za učinkovitu proizvodnju nanokristala (Eknath Ahire i sur., 2018).



Slika 1. Napredak u *bottom-up* tehnikama za proizvodnju nanokristala (prilagođeno prema Eknath Ahire i sur., 2018)

Posljednih godina, najčešće korištene metode pripreme nanokristala su vlažno mljevenje, precipitacija i visokotlačna homogenizacija (HPH), odnosno kombinacija već spomenutih metoda.

Kombinacijom metoda, koja uključuje i jednu i drugu skupinu metoda, postupak najčešće započinje nanoprecipitacijom, nakon čega slijedi neka druga metoda npr. poput HPH. Sve kombinacije metoda se jednim imenom zovu *smartCrystals*® (Keck i sur., 2008; Shegokar i Müller, 2010).



Slika 2. Shema *top-down* i *bottom-up* metoda (prilagođeno prema Raghava Srivalli i Mishra, 2014.)

1.2.1. Metoda vlažnog mljevenja (engl. Wet-milling method)

Vlažno mljevenje je fizička metoda smanjivanja veličine čestica mljevenjem krutine suspendirane u tekućini. Za provođenje navedene metode potrebni su: tvar koja ulazi u postupak mljevenja, stabilizator i sredstvo za mljevenje, dok se postupak mljevenja odvija u komori. Sredstva za mljevenje mogu biti male kuglice ili keramički biseri (npr., itrijev stabilizirani cirkonijev dioksid), visoko umreženi polistiren, nehrđajući čelik ili staklo različite veličine (0,3 mm ili više). Kuglice, odnosno keramički biseri i polistiren osiguravaju minimalnu kontaminaciju tvari u sustavu za mljevenje (Raghava Srivalli i Mishra, 2014). Prilikom provođenja procesa mljevenja, mehanička energija stvara puknuća u česticama, koja se potom šire duž čestice i uzrokuju lomove. Eksperimentalni podaci ukazuju na to da se duljim mljevenjem dobivaju manje, finije čestice. Razumijevanje kinetike loma za pojedine čestice djelatnih tvari, važno je zbog određivanja duljine trajanja mljevenja. Isto tako, uočeno je, da različiti parametri, kao što su vrijeme trajanja mljevenja, brzina mljevenja, udio djelatne tvari, stabilizatora i drugih parametara mogu utjecati na dobivenu veličinu čestica (Romero i sur., 2016).

1.2.2. Visokotlačna homogenizacija (engl. high-pressure homogenization - HPH)

Tijekom HPH procesa suspenzija djelatne tvari se pod visokim tlakom uvodi u homogenizator, prolazi uskim prolazom, također pod vrlo visokim tlakom (približno 1500-2000 bara), uslijed čega čestice pucaju. Čestice se lome djelovanjem kavitacije, visokih sila smicanja i sudaranja te prolaze kroz uski prolaz oko 50-100 puta kako bi dobile optimalnu veličinu. Dakle, HPH metoda uključuje tri procesna dijela. Prvi dio je priprava disperzije praškastog oblika djelatne tvari u čistom otapalu ili otapalu sa stabilizatorom, drugi je smanjivanje čestica djelovanjem sila smicanja ili homogenizacijom pod niskim tlakom, a treći dio je sama visokotlačna homogenizacija. Spomenutim postupcima dobiva se željena veličina, odnosno raspon veličina čestica.

1.2.3. Precipitacija iz otopine

Precipitacija iz otopine, kao jedna od *bottom-up* metoda, uključuje proces nukleacije, ali i rast kristala. Nukleacija je posebno važna za dobivanje što manjih čestica. Metoda precipitacije s otapalom i antiotapalom predstavlja najjednostavniji postupak dobivanja nanočestica. Uključuje jedan korak, jednostavnije instrumente i ekonomski je isplativija od vlažnog mljevenja i HPH (Raghava Srivalli, 2014). Uobičajena mješalica je magnetska ploča koja se može kombinirati s ultrazvukom kako bi se potaknula nukleacija. Najčešće su korištena polarna organska otapala koja trebaju dobro otapati lipofilne djelatne tvari i različite stabilizatore, a odnose se na etanol, metanol, aceton, dimetilsulfoksid, diklorometan, acetonitril, tetrahidrofuran. Iako su poznate metode s puferima kao antiotapalima, kao antiotapalo najčešće se koristi voda. Otapalo u kojem se nalaze djelatna i pomoćne tvari miješa se s antiotapalom, pri čemu, u trenutku nastajanja prezasićene otopine dolazi do stvaranja malih kristalnih jezgri i rasta kristala. Primjenom navedene metode dobivanja nanočestica, veoma je teško odrediti stopu precipitacije, pri čemu mogu zaostati organska otapala (Eknath Ahire i sur., 2018), što može imati za posljedicu neželjeni rast kristala. Navedeno je i osnovni nedostatak ove metode dobivanja nanočestica.

Suspenziju nanokristala djelatne tvari moguće je prevesti u čvrste nanokristale sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem (Tomić i sur., 2019).

U Tablici 1. prikazani su primjeri nanoniziranih lijekova i korištenih metoda nanonizacije.

Tablica 1. Primjeri nanoniziranih lijekova i metoda kojima su dobiveni

Djelatna tvar	Stabilizator/ površinski aktivna tvar	Specifičnost metode	Veličina dobivenih čestica nakon određenog vremena mljevenja	Komentar	Literatura
ciklosporin A	Vitamin E polietilenglikol sukcinat (TPGS)	Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5% djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05, 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)	97 nm, 48 h	Prethodnim istraživanjima, pomoću metoda mljevenja kuglicama i HPH, dobivene su veličine čestica od 200 nm (Nakarani i sur., 2010) i 950 nm (Müller i sur., 2006). Ovim istraživanjem dobivene su još sitnije čestice. Smanjenje čestica ovisilo je o vremenu mljevenja. Nakon 24 h čestice su bile premale, čak ispod limita, a nakon 72h suspenzija je postala plavkasta zbog Tyndallovog fenomena.	Romero i sur., 2016
resveratrol	alkil- poliglukozid	Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5%	202 nm, 48 h	U prethodnim istraživanjima, nanokristali resveratrola veličine od	Romero i sur., 2016

	C8-C10	djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05, 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)		oko 200 nm dobiveni su visokotlačnom homogenizacijom (Kobierski i sur., 2011). Mljevenjem zrcima na magnetskoj miješalici postignuta je odgovarajuća veličina nanokristala resveratrola.	
hesperitin	alkil-poliglukozid C8-C10	Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5% djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05, 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)	49 nm, 24 h	Metoda se pokazala najprikladnijom za nanoniziranje hesperitina. Iako su čestice jako male, i dalje zadržavaju fizički integritet.	Romero i sur., 2016.

<p>askorbil palmitat</p>	<p>alkil- poliglukozid C8-C10</p>	<p>Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5% djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05, 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)</p>	<p>171 nm, 72 h</p>	<p>U prethodnim istraživanjima, uz pomoć visoktlačne homogenizacije je postignuta veličina od 365 nm. Uporabom ove metode, nakon 120 h postignuta je veličina od 159 nm, a već nakon 6 h veličina od 279 nm.</p>	<p>Romero i sur., 2016</p>
<p>apigenin</p>	<p>alkil- poliglukozid C8-C10</p>	<p>Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5% djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05,</p>	<p>85 nm, 24 h</p>	<p>Miješanje je trajalo 24 h jer se nakon toga suspenzija gelirala i magnetski mješači se više nisu mogli pomicati.</p>	<p>Romero i sur., 2016</p>

		0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)			
hesperidin	poloksamer 188	Mljevenje kuglicama na magnetskoj miješalici; 5% djelatne tvari, 1% stabilizatora. 1,9 g kuglica za mljevenje, 0,5 mL suspenzije, brzina miješanja 1200 okr/min pri 5 °C. 3 magnetska mješača (9,5 × 6,0 mm). Različiti promjeri kuglica za mljevenje (0,05, 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm)	294 nm, 1 h	Dobiveni rezultati su slični onima iz prethodnih istraživanja. Daljnje mljevenje dovelo je do povećanja čestica na oko 863 nm zbog agregacije.	Romero i sur., 2016
furosemid	poloksamer	Metoda precipitacije s otapalom i antiotapalom. Furosemid je prvo otopljen u acetonu (otapalo) i takva je otopina injektirana u vodu (antiotapalo). Priređeni su različiti omjeri lijeka i poloksamera, otapala i	119,1 nm, 30 min raspon 120 - 160 nm, 15 ili 30 min	Čestice su bile okrugle i dobro suspendirane. Kristalni oblici su bili stabilniji od amorfnih. Furosemid se slabo otapa u želucu djelovanjem želučane kiseline. Pripravljajem nanosuspenzije povećana mu je topljivost: > 80 % se otopilo u roku od 5 min, a potpuno otapanje postignuto	Shariare i sur., 2019

		antiotapala. Vremena miješanja na magnetskoj mješalici su 15 i 30 min.		je nakon 30 min. Povećanje topljivosti rezultiralo je povećanjem bioraspoloživosti furosemida.	
loratadin	polisorbat 80 polimeri: Kollicoat MAE 100P, Eudragit L 100 55, PEG 4000	Metoda otparavanja otapala. Polimer je otopljen u etanolu uz miješanje na magnetskoj mješalici. Određena količina loratadina otopljena je u apsolutnom etanolu. Organska faza pripremljena je miješanjem otopine polimera i otopine loratadina, a vodena otapanjem polisorbata 80 u vodi za injekcije. Organska faza dodana je vodenoj, a konačni volumen iznosi 50 mL.	40,41 nm, 24 h raspon 40 - 270 nm	Nakon 15 dana nanosuspenzije s Eudragitom pokazale su nestabilnost koja se očitovala povećanjem dobivenih nanočestica. Veličina čestica loratadina s Kollicoat-om kao stabilizatorom, nije se mijenjala niti nakon 15 dana. Međutim, u tom periodu došlo je do smanjenja zeta-potencijala što ipak pokazuje znakove nestabilnosti suspenzije. Nanočestice loratadina s Kollicoat-om pokazale su stabilnost u prisutnosti jake želučane kiseline (pH = 1-3). Sloj stabilizatora se počeo razgrađivati tek oko pH 5,5, a potpuno otpuštanje lijeka dogodilo se oko pH 6,5 i 7,4. Pripravom nanočestica poboljšala se bioraspoloživost loratadina u odnosu	Rodriguez Amado i sur., 2017

				na prethodne formulacije.	
olmesartan medoksomil	polivinil- alkohol (PVA), poloksamer 407	Kombinirana tehnologija: kuglično mljevenje s ultrazvučnom sondom, nakon čega slijedi visokobrzinska homogenizacija (engl. high speed homogenization - HSH) s ultrazvučnom sondom. 30 mg olmesartana je dispergirano u 15 mL otopine stabilizatora i homogenizirano.	raspon 469- 797 nm, 10-30 min	Uspoređivana je veličina čestica dobivenih kugličnim mljevenjem i visokobrzinskom homogenizacijom te onih dobivenih istim metodama, ali uz ultrazvučnu sondu. Manja veličina čestica zabilježena je za kuglično mljevenje uz UZV sondu. Isto je pokazano i za HSH uz UZV sondu, ali samo sa poloksamerom kao stabilizatorom, ne i s PVA. Proučavanjem apsorpcije olmesartana u probavnom sustavu, koji se apsorbira u proksimalnom dijelu duodenuma (Kang et al., 2012), uočeno je da se puno bolje apsorpira u obliku nanočestica nego konvencionalnog farmaceutskog oblika.	Attari i sur., 2016
probukol	hidroksipropil metilceluloza	Metoda vlažnog mljevenja. 25 mL vodene otopine s 5 g	raspon 192,4 - 464,4 nm, 3 h	Tri različita stabilizatora u sustavu su pridonijela boljem otapanju probukola.	Fang Li i sur., 2018

	<p>(HPMC), poloksamer 188 (Pluronic®, F68), natrij- dodecilsulfat (SDS)</p>	<p>probukola i stabilizatorima miješano je sa 150 g zrnaca cirkonijskog oksida pri brzini od 1000 okr/min, kroz 3 h.</p>		<p>Hidroksipropilna skupina u molekuli derivata celuloze najviše pridonosi boljem otapanju probukola jer ima veći afinitet za molekule vode. Povećanjem viskoznosti HPMC (povećanjem molekularne mase), smanjila se kinetička energija tijekom mljevenja, što je dovelo do neznačajnog smanjenja čestica tijekom procesa. Uočeno je smanjenje veličine čestica povećanjem masenog udjela F68 do 1 %. Daljnje povećavanje sadržaja F68 (do 2 %) nije utjecalo na veličinu. Također je i dodavanje 0,1 % i 1,0 % SDS-a u sustav s dva stabilizatora smanjilo veličinu čestica. Ternarni sustav stabilizatora je pridonio smanjenju veličine čestica probukola. Međutim, uočena je važnost odabira metoda sušenja i optimiziranja određenih parametara</p>	
--	---	--	--	---	--

				kako ne bi došlo do agregacije čestica, što posljedično dovodi do lošijeg otapanja i oralne bioraspoloživosti lijeka.	
--	--	--	--	--	--

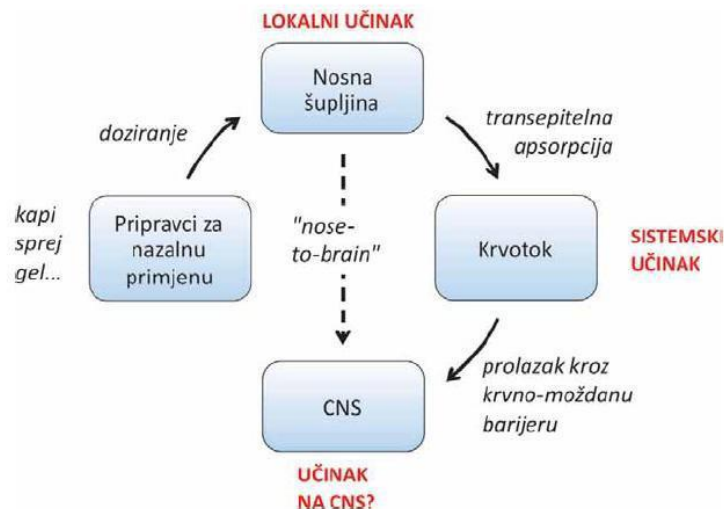
1.3. NAZALNA PRIMJENA LIJEKOVA

1.3.1. Nanokristali za nazalnu primjenu lijekova

Nazalna primjena lijekova omogućuje lokalni učinak, no predstavlja i alternativni put sistemske dostave lipofilnih lijekova i lijekova velikih molekulskih masa kao što su peptidne molekule. To je posljedica specifičnih obilježja nosne sluznice. Sistemska bioraspodivnost nazalno primijenjenog lijeka omogućena je dobrom prokrvljenosti i permeabilnosti nosne sluznice, velikom apsorpcijskom površinom, malim brojem proteolitičkih enzima te izbjegavanja prvog prolaza kroz jetru.

Najčešće se nazalna primjena koristi u liječenju bolesti sluznice i sinusa kao što su lokalne infekcije, alergijski rinitis ili nazalna kongestija. Međutim, moguć je i učinak na središnji živčani sustav jer lijekovi izravno prelaze iz nosne šupljine u mozak zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Slika 3.) (Hafner i sur., 2014).

Kako je nosna sluznica povezana i s limfnim sustavom, moguća je i nazalna primjena cjepiva. Time se izaziva lokalni i sistemski imunski odgovor. Prednost takvog cijepljenja je neinvazivnost primjene, čime se povećava i adherencija pacijenta (Kammona i Kiparissides, 2012).



Slika 3. Mogućnosti i ciljevi nazalne primjene lijekova (preuzeto iz Hafner i sur., 2014)

1.3.2. Mukocilijarni klirens (MC)

Farmaceutski oblici koji se mogu koristiti za nazalnu primjenu su otopine, suspenzije, gelovi i prašci. Nakon depozicije u nosnoj šupljini, lijek se pokretanjem cilija na stanicama epitela prenosi u nazofarinks, a zatim gutanjem u probavni sustav. Taj se proces naziva mukocilijarni klirens (MC) (Merkus i sur., 1998; Schipper i sur., 1991; Ugwoke i sur., 2005) i izvorno osigurava pasivnu barijeru za mikroorganizme koji inhalacijom mogu inficirati dišne putove.

Mukocilijarni klirens je ograničavajući faktor kod nazalne primjene lijekova. Unutar 15 min od primjene, MC uklanja konvencionalne farmaceutske oblike iz nosne šupljine, što smanjuje bioraspoloživost. Stoga je jedan od načina poboljšanja učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka usporavanje mukocilijarnog klirensa (Shelke i sur., 2016) razvojem mukoadhezivnih viskoznijih formulacija. Također, volumen doziranja treba biti manji od 0,2 mL. U suprotnom, dolazi do curenja pripravka iz nosa i izostanka terapijskog učinka lijeka.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

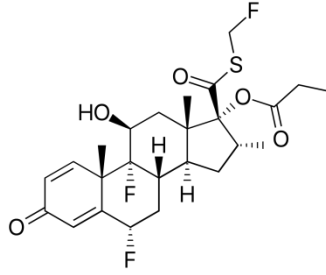
Nanokristali kao terapijski sustavi pokazuju brojna svojstva koja im daju na važnosti u proizvodnji lijekova. Najistaknutije svojstvo je povećanje topljivosti i stabilnosti teško topljivih djelatnih tvari, što im onda može povećati i bioraspoloživost. Veoma važno u procesu proizvodnje je i stabilnost takvih nanosuspenzija.

Kao stabilizatori koriste se različite površinski aktivne tvari i puferi koji moraju zadovoljavati određene standarde. Kao što sama riječ kaže, stabiliziraju djelatnu tvar u suspenziji, pri čemu ne smiju utjecati na njezina farmakološka svojstva, moraju biti zdravstveno ispravni i netoksični te ne smiju izazivati iritacije.

Kada govorimo o nanokristalima za lokalnu primjenu na nosnoj sluznici, važno je izraditi formulaciju lijeka koja će se dovoljno dugo zadržati na samoj nosnoj sluznici. Time će se povećati i apsorpcija djelatne tvari, a izbjeći proces mukocilirajnog čišćenja i curenja pripravka iz nosa prilikom primjene. Takvom primjenom može se dobiti adekvatna doza lijeka.

U ovom eksperimentalnom radu je korišten lijek flutikazon. Kao stabilizator, odnosno površinski aktivna tvar, korišten je Tween 80.

Flutikazon pripada skupini kortikosteroidnih lijekova. Indiciran je kod profilakse astmatičnih napadaja kod odraslih i adolescenata starijih od 16 god. Također, indiciran je kod kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) te profilakse i liječenja alergijskog rinitisa i peludne hunjavice. Primjenjuje se inhalacijom u pluća, odnosno kao sprej ili kapi za nos. Ima snažno protuupalno djelovanje kao i ostali kortikosteroidi. Mehanizam djelovanja isti je kod svih: inhibicijom enzima fosfolipaze A2 inhibiraju sintezu proupalnih medijatora kao što su prostaglandini, prostaciklini, tromboksani. Smanjuju broj i djelovanje upalnih stanica poput makrofaga, mastocita, eozinofila, T-limfocita i dendritičkih stanica. Djeluju i na endotelne, epitelne i žljezdane stanice i sprječavaju simptome upale poput ektravazacije, sekrecije sluzi, kontrakcije glatke muskulature bronha. Prema podacima iz SmPC-a, flutikazon se > 90% veže za proteine plazme. Kada govorimo o inhalacijskom obliku, apsolutna bioraspoloživost je oko 10%, a kod intranazalnog flutikazona je oko 0,5%. Prolazi ekstenzivan metabolizam u jetri pri čemu se inaktivira, što govori u prilog tome da je oralni oblik slabo bioraspoloživ.



Slika 4. Struktura flutikazon-propionata

Tween 80 (polioksietilen-20-sorbitanmonooleat, polisorbitat 80) dio je skupine neionskih emulgatora. Po kemijskom sastavu on je parcijalni ester masnih kiselina i polioksietilen sorbitana. HLB¹ mu je 15.

Cilj navedenog eksperimentalnog rada je dobiti nanočestice flutikazona suspendiranog pomoću polisorbata 80 (Tween-a 80). Time bi mu se poboljšala fizičko-kemijska svojstva te u konačnici ostvario bolji farmakoterapijski učinak.

Specifični ciljevi rada:

- Ispitati veličinu prije i nakon mljevenja i usporediti dobivene rezultate
- Ispitati koja je namanja veličina čestica koja se može dobiti
- Ispitat indekse polidisperznosti
- Ispitati utjecaj masenog omjera flutikazona i Tween-a 80 na veličinu dobivenih čestica
- Ispitati utjecaj variranja mase različitih veličina kuglica za mljevenje

¹ HLB = stupanj hidrofilnosti, odnosno lipofilnosti surfaktanta; emulgator tipa V/U ima HLB-vrijednost 3-8, a emulgator tipa U/V ima HLB-vrijednost 10-18

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U izradi praktičnog dijela ovog diplomskog rada korištene su slijedeće kemikalije:

- flutikazonpropionat (Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, SAD)
- natrijev klorid (Kemig, Hrvatska)
- pročišćena voda

3.2. METODE

3.2.1. Priprava i karakterizacija slijepih uzoraka

Kako bi se odredilo utječe li Tween 80 u uzorcima na mjerenje veličine čestica, kao slijepi uzorci pripravljene su otopine Tween-a 80 u 10 mM otopini NaCl pri koncentracijama od 0,001%, 0,3%, 0,05%, 0,1%, 0,5% i 1%. Takvim otopinama mjeren je srednji promjer čestica fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. photon correlation spectroscopy - PCS) na uređaju Litesizer 500 (Anton Paar, Austrija). Oko 1 ml uzorka stavljeno je u polistirensku kivetu dimenzija $10 \times 10 \times 45$ mm. Mjerenje je rađeno pri temperaturi od 25°C. Iz funkcije intenziteta raspršene svjetlosti ovisno o vremenu doznaje se veličina i stupanj disperznosti čestica. Za svaki uzorak napravljena su 3 mjerenja.

3.2.2. Izrada suspenzije flutikazonpropionata

Mikronizirani flutikazonpropionat rastavljen je s Tween-om 80 kao sredstvom za suspendiranje u masenom omjeru u rasponu od 10:1 do 1:1. Smjesi flutikazona i Tween-a 80 postupno je dodana pročišćena voda uz stalno miješanje, čime je pripravljena fina suspenzija flutikazonpropionata pri koncentraciji od 0,06%. Koncentracija Tween-a 80 bila je u rasponu od 0,006 do 0,06%. Svaka je suspenzija izrađena u duplikatu.

3.2.3. Priprema uzoraka za mljevenje

Prvo su u vijale promjera 12 cm i visine 35 mm izvagane kuglice za mljevenje izrađene od itrijevog stabiliziranog cirkonijskog oksida promjera 0,1 mm, 0,2 mm i 0,4-0,6 mm. Masa kuglica svake od veličina je varirana tijekom eksperimenta (Tablica 2.). Zatim je u svaku vijalu dodano 2,5 grama suspenzije flutikazonpropionata, a nakon toga po 5 cilindričnih magnetskih mješača duljine 10 mm i promjera 6 mm. Svaki uzorak izrađen je u duplikatu. Uzorci su miješani pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici 24, 48 ili 72 sata pri 350 okretaja po minuti, nakon čega je mjerena veličina (srednji promjer) čestica.

3.2.4. Određivanje srednjeg promjera čestica

Srednji promjer čestica flutikazonpropionata prije i nakon usitnjavanja mjeren je fotonskom korelacijskom spektroskopijom na uređaju Litesizer 500 (Anton Paar, Austrija) na način koji je opisan u poglavlju 3.2.1.

Tablica 2. Priprema i sadržaj analiziranih uzoraka

Naziv uzorka	m_{lijek} (mg)	m_{Tween80} (mg)	m_{kuglice0,1} (g)	m_{kuglice0,2} (g)	m_{kuglice0,4-0,6} (g)
FT 10:1; 0,5 g	12,0	1,2	0,5	0,5	0,5
FT 8:1; 0,5 g	12,0	1,5	0,5	0,5	0,5
FT 5:1; 0,5 g	12,0	2,4	0,5	0,5	0,5
FT 2:1; 0,5 g	12,0	6,0	0,5	0,5	0,5
FT 1:1; 0,5 g	12,0	12,0	0,5	0,5	0,5
FT 10:1; 0,75 g	12,0	1,2	0,75	0,75	0,75
FT 8:1; 0,75 g	12,0	1,5	0,75	0,75	0,75
FT 5:1; 0,75 g	12,0	2,4	0,75	0,75	0,75
FT 2:1; 0,75 g	12,0	6,0	0,75	0,75	0,75
FT 1:1; 0,75 g	12,0	12,0	0,75	0,75	0,75
FT 10:1; 0,2 g	12,0	1,2	0,2	0,2	0,2
FT 8:1; 0,2 g	12,0	1,5	0,2	0,2	0,2
FT 5:1; 0,2 g	12,0	2,4	0,2	0,2	0,2
FT 2:1; 0,2 g	12,0	6,0	0,2	0,2	0,2
FT 1:1; 0,2 g	12,0	12,0	0,2	0,2	0,2
FT 4:1; 0,75 g	12,0	3,0	0,75	0,75	0,75
FT 3:1; 0,75 g	12,0	4,0	0,75	0,75	0,75
FT 4:1; 0,5 g	12,0	3,0	0,5	0,5	0,5
FT 3:1; 0,5 g	12,0	4,0	0,5	0,5	0,5
FT 4:1; 0,2 g	12,0	3,0	0,2	0,2	0,2
FT 3:1; 0,2 g	12,0	4,0	0,2	0,2	0,2
FT 2:1; K1	12,0	6,0	0,75	0,5	0,25
FT 2:1; K2	12,0	6,0	0,6	0,5	0,4
FT 2:1; K3	12,0	6,0	0,75	0,6	0,15
FT 2:1; K4	12,0	6,0	0,6	0,6	0,3

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati mjerenja

Kako bi se rezultati mogli uspoređivati i utvrditi stupanj usitnjenja flutikazonpropionata, izmjerene su veličine čestica djelatne tvari prije mljevenja (Tablica 3.). Opažena bimodalna raspodjela veličina čestica flutikazonpropionata prije mjerenja moguće upućuje na postojanje nanočestica flutikazonpropionata i/ili agregata površinski aktivne tvari (Tween 80) koji se koristi kao stabilizator u nanosuspenzijskom sustavu.

Tablica 3. Veličine čestica flutikazonpropionata prije mljevenja

Naziv uzorka	PDI (%)	Peak 1 (nm)	Peak 2 (nm)
susp 10:1	24,19 ± 1,82	1256,8 ± 255,0	206,2 ± 3,5
susp 8:1	25,98 ± 0,61	1060,4 ± 189,0	157,2 ± 0,0
susp 5:1	24,57 ± 5,69	889,5 ± 175,1	128,6 ± 37,2
susp 4:1	24,44 ± 4,4	842,8 ± 127,2	0,0
susp 3:1	20,3 ± 9,38	887,0 ± 216,0	115,4 ± 52,8
susp 2:1	24,78 ± 4,2	1149,4 ± 47,5	149,6 ± 0,0
susp 1:1	20,98 ± 8,43	1221,8 ± 63,1	0,0

Nakon pripreme slijepih uzoraka i suspenzije flutikazona te izmjerenih veličina čestica i indeksa polidisperznosti, izrađene su nove suspenzije s različitim masenim omjerima flutikazonpropionata i Tween 80 (Tablica 3.).

Postupkom fotonske korelacijske spektroskopije izmjerene su veličine čestica flutikazonpropionata prije mljevenja. Rezultati mjerenja označavaju ishodnu veličinu čestica flutikazonpropionata na osnovu koje se procjenjuje stupanj usitnjenja nakon mljevenja.

Postupkom vlažnog mljevenja suspenzija flutikazonpropionata s različitim omjerima djelatne tvari i Tween 80 provedeno je usitnjavanje čestica djelatne tvari. U Tablici 2. prikazan je pregled koncentracija flutikazonpropionata i Tween-a 80.

Za postupak vlažnog mljevenja prvo su korištene kuglice za mljevenje mase 0,5 g u svim veličinama (dakle, $0,5 \text{ g} \times 3 = 1,5 \text{ g}$), a zatim 0,75 ($0,75 \text{ g} \times 3 = 2,25 \text{ g}$) i 0,2 ($0,2 \text{ g} \times 3 = 0,6 \text{ g}$). Posljednje varijacije su bile varijacije mase različitih veličina kuglica (K1, K2, K3, K4).

Tablicom 2. prikazane su mase kuglica korištene u pojedinim suspenzijama.

4.1.1. Utjecaj omjera djelatne tvari/PAT-a i mase kuglica za mljevenje

S obzirom na inicijalnu veličinu čestica u rasponu od 842,8 nm i 1256,8 nm, postupkom vlažnog mljevenja dobivene su čestice veličine od 209,74 nm do 394,42 nm. Rezultati upućuju na znatno smanjenje veličine čestica flutikazonpropionata. Također se uočava kako koncentracija Tween 80, odnosno omjer djelatna tvar/ Tween, utječe na veličinu čestica. Jednako tako, na veličinu čestica flutikazonpropionata utječe i masa kuglica za mljevenje.

Tablica 4. Veličine čestica flutikazonpropionata nakon mljevenja u različitim suspenzijama i s različitim masama kuglica za mljevenje

omjer	masa kuglica za mljevenje (g)					
	0,5		0,75		0,2	
	<i>veličina (nm)</i>	<i>PDI (%)</i>	<i>veličina (nm)</i>	<i>PDI (%)</i>	<i>veličina (nm)</i>	<i>PDI (%)</i>
10:1	296,83 ± 42,83	23,81 ± 1,21	234,98 ± 8,28	17,80 ± 2,93	366,55 ± 19,12	24,81 ± 1,21
8:1	380,82 ± 126,24	19,67 ± 2,61	280,20 ± 13,30	18,01 ± 4,35	373,20 ± 37,66	23,65 ± 3,29
5:1	227,78 ± 14,68	17,18 ± 3,53	236,93 ± 18,83	17,88 ± 1,94	374,33 ± 37,46	23,75 ± 2,70
4:1	231,67 ± 4,47	15,46 ± 4,93	239,47 ± 9,09	21,90 ± 1,87	394,42 ± 25,98	25,93 ± 3,46
3:1	229,08 ± 6,63	18,38 ± 2,86	224,17 ± 7,30	22,41 ± 1,47	368,12 ± 36,13	28,44 ± 1,94
2:1	209,74 ± 18,22	17,94 ± 2,75	211,91 ± 15,63	16,56 ± 3,61	360,12 ± 12,01	25,11 ± 1,81
1:1	293,47 ± 61,59	20,23 ± 3,72	256,40 ± 36,26	17,57 ± 3,17	370,83 ± 29,37	22,65 ± 2,78

Utjecaj mase kuglica za mljevenje

Ako se promatra masa kuglica, može se lako uočiti da su najveće čestice bile one gdje je korištena masa svake veličine kuglica od 0,2 g. To je ukupno 0,6 g, što odgovara pretpostavci o specifičnoj površini. Što je specifična površina veća, to će više dolaziti u dodir s česticama djelatne tvari koje usitnjava i čestice djelatne tvari će biti sitnije. Vrijedi i suprotno; što je specifična površina manja, to će manje dolaziti u kontakt s djelatnom tvari, čime će se ona manje učinkovito usitniti (Malamatari i sur., 2018). U ovom slučaju površina je najmanja zbog najmanje mase kuglica pa je za očekivati da će se dobiti najkrupnije čestice u odnosu na veću masu kuglica.

S druge strane, to bi onda značilo da će najveća masa kuglica od 0,75 g (odnosno $0,75 \text{ g} \times 3 = 2,25 \text{ g}$), najviše usitniti djelatnu tvar. Prema rezultatima mjerenja, nema velike razlike u veličini u slučaju mase 0,75 g i mase 0,5 g (odnosno $0,5 \text{ g} \times 3 = 1,5 \text{ g}$). Ta pojava bi se mogla objasniti na način da postupkom vlažnog mljevenja povećavanje mase kuglica za mljevenje nema značajnog učinka na smanjenje veličine nanočestica.

U slučaju mase kuglica od 0,5 g najmanja veličina je bila 209 nm, a najveća 380 nm. Veličina od 380 nm bila je jedina veća od 300 nm, ali i s najvećom standardnom devijacijom od 126 nm.

U slučaju mase kuglica od 0,75 g najmanja veličina je bila 211 nm, a najveća 280 nm.

S obzirom na sva ostala mjerenja, razlika u veličini nije značajna u slučaju korištenja takve dvije mase kuglica.

Utjecaj omjera djelatne i površinski aktivne tvari

Utjecaj omjera djelatne tvari i površinski aktivne tvari u ovom slučaju se pokazao značajnim.

10:1. U suspenziji s najmanjom koncentracijom površinski aktivne tvari, postignuti su zadovoljavajući rezultati. Najmanja veličina čestica bila je u slučaju mase kuglica od 0,75 g, pri čemu je i indeks polidisperznosti bio manji. S masom kuglica od 0,5 g izrađene su prevelike čestice kada se uzmu u obzir i druga mjerenja, kao i PDI koji je višeg postotka. Najveće su čestice opažene u slučaju mase kuglica od 0,2 g, ali s druge strane je to jedna od manjih veličina koja je dobivena korištenjem te mase kuglica.

8:1. Manjim povećanjem koncentracije PAT-a, dobivene su značajno veće čestice djelatne tvari. Niti jedna masa kuglica nije pridonijela smanjenju veličine ispod 280 nm. Očekivano, najkrupnije čestice su bile u slučaju mase kuglica od 0,2 g. Međutim, iznenađujući rezultati su bili u slučaju mase kuglica od 0,5 g. Ti rezultati su znatno iznad prosjeka veličina dobivenih mljevenjem s tom masom kuglica. PDI kod 0,5 g i 0,75 g su zadovoljavajućeg postotka koji je ispod 20%.
Mogu se uočiti dva procesa koja su pridonijela veličini čestica. To su lom čestica, odnosno smanjenje veličine i agregacija čestica. U prethodnoj studiji, vlažnim mljevenjem itakonazola, uočeno je da vrsta i koncentracija stabilizatora utječu na veličinu čestica (Bilgili i sur., 2018). U slučaju mljevenja flutikazonpropionata s Tween-om kao stabilizatorom, pri omjeru djelatna tvar/PAT-a od 8:1, nastupila je agregacija čestica, umjesto smanjenja veličine čestica.

5:1. Veća koncentracija Tween-a pridonijela je boljoj stabilizaciji suspenzije zbog čega su i čestice bile manje, unutar prosjeka kod svake mase kuglica. Usporedbom s drugim rezultatima dostupnima u literaturi, mogu se uočiti sličnosti. Primjerice, za docetaksel je korištena metoda precipitacije iz otapala te je uočeno da se korištenjem manje koncentracije stabilizatora (hidroksipropilmetil celuloze i natrijevog deoksikolata) od 1% postiže veličina čestica od 714,0 nm do 295,8 nm. Porastom koncentracije stabilizatora na 5% veličina čestica je bila u rasponu 375,0 nm do 83,97 nm (Ibrahim i sur., 2018).

Indeks polidisperznosti nije bio veći od 18% u slučaju mase kuglica od 0,5 g ili 0,75 g. Veličina čestica i PDI za masu kuglica od 0,2 g nisu se smanjili povećanjem koncentracije PAT.

4:1. Manjim povećanjem koncentracije Tween-a, postiže se veća veličina čestica u odnosu na prethodne manje koncentracije Tween-a. Dobar rezultat PDI zapažen je u slučaju mase kuglica od 0,5 g gdje iznosi 15,5%, što je najniži rezultat od svih dobivenih. Međutim, u slučaju mase kuglica od 0,2 g dobivene su i najveće nanočestice od gotovo 400 nm.

3:1. U ovoj suspenziji, veličine čestica su ponovno u padu. Veličina čestica u slučaju mase kuglica od 0,2 g je manja u odnosu na prosjek. Kod ostalih masa kuglica od 0,5 g i 0,75 g veličine su prosječne. PDI u slučaju mase kuglica od 0,5 g je zadovoljavajući i iznosi 18%.

2:1. Masa PAT koja iznosi polovicu mase djelatne tvari pokazala se najučinkovitijom u procesu vlažnog mljevenja jer su dobivene čestice flutikazonpropionata najmanje veličine. Veličine čestica iznosile su 210 nm za masu kuglica od 0,5 g, odnosno 212 nm za masu kuglica od 0,75 g. Za masu kuglica od 0,2 g, veličina je u odnosu na sve druge rezultate bila najmanja i iznosila je 360 nm. PDI za masu kuglica od 0,5 g ili od 0,75 g nisu porasli iznad 18%.

1:1. Jednaka masa djelatne tvari i PAT nije pridonijela smanjenju veličine čestica flutikazonpropionata. Naprotiv, čestice su izrazito velike u odnosu na ostala mjerenja. Niti indeksi polidisperznosti nisu niski. Za masu kuglica od 0,5 g čak je malo iznad 20%.

Zbog prevelike koncentracije stabilizatora Tween-a, vjerojatno je došlo do agregacije čestica zbog Ostwaldovog zrenja suspenzije, pri čemu veće čestice rastu na račun manjih zbog razlika u topljivosti, čime se smanjuje količina najmanjih čestica (Malamatari i sur., 2018).

Najmanja veličina čestica dobivena je u suspenziji u slučaju omjera djelatna tvar : Tween 2:1, bez obzira na masu korištenih kuglica. Također, prihvatljivi su rezultati u slučaju omjera djelatna tvar: Tween 3:1. Najveće čestice su dobivene u slučaju omjera djelatna tvar : Tween 8:1.

Vjerojatno najbolje suspendiranje flutikazona pomoću Tween 80 postignuto je u njihovim omjerima 2:1, što pokazuju rezultati mjerenja veličine čestica.

Zbog toga je u posljednjem dijelu eksperimenta korišten upravo omjer djelatna tvar : Tween 2:1. Međutim, variranjem mase pojedinih veličina kuglica nije dobivena najmanja masa nanočestica.

4.1.2. Utjecaj variranja mase pojedinih veličina kuglica za mljevenje

Ukupna masa svih triju veličina kuglica u navedena četiri uzorka bila je 1,5 g. Ta masa određena je opažanjem pojedinih obrazaca koji su se pojavljivali u prethodnim eksperimentima. Najprihvatljivije veličine nanočestica dobivene su upravo korištenjem kuglica čija je ukupna masa 1,5 g, odnosno gdje je masa pojedinih veličina bila 0,5 g.

U uzorcima navedenim u Tablici 5. prikazane su mase određenih veličina kuglica, tako da je ukupna masa konstantna 1,5 g.

Tablica 5. Veličina čestica flutikazonpropionata variranjem mase pojedinih veličina kuglica za mljevenje u suspenziji omjera flutikazonpropionat : Tween 80 2:1.

Naziv uzorka	veličina (nm)	PDI (%)
K1, 2:1	234,60 ± 7,68	18,21 ± 3,56
K2, 2:1	231,53 ± 10,34	20,52 ± 3,50
K3, 2:1	238,72 ± 8,04	19,70 ± 4,32
K4, 2:1	232,32 ± 12,37	19,52 ± 2,17

Najmanje veličine kuglica od 0,1 mm su imale najveću masu u svim uzorcima u odnosu na veličine 0,2 mm i 0,4-0,6 mm.

K1: Korištena je najveća masa najmanjih kuglica u odnosu na uzorke K2 i K4. Najveće kuglice su također korištene u najvećoj masi u odnosu na masu istih kuglica u drugim uzorcima. Time je dobivena prosječna veličina čestica s obzirom na sva četiri uzorka. PDI je bio najmanji i iznosio je 18%.

K2: U uzorku su omjeri masa kuglica bili najmanji u odnosu na ostale uzorke. Masa najmanjih kuglica je smanjena na račun povećanja mase najvećih kuglica. Neočekivano, time je dobivena najmanja veličina čestica od 231,5 nm, ali i najveći PDI od 20,5%.

K3: Masa najvećih kuglica je smanjena na čak 0,15 g, ali je povećana masa najmanjih i onih srednje veličine. Ponovno neočekivano, veličina nanočestica je bila najveća u odnosu na ostala tri uzorka, iako je masa najmanjih čestica bila 0,75 g kao i u uzorku K1.

K4: Masa najmanjih i srednjih kuglica je bila jednaka, ali je udvostručena masa najvećih kuglica u odnosu na prethodni uzorak. PDI je bio malo ispod 20%. Dobivena je veličina čestica 232,3 nm, što je neznatno veće od najmanje dobivene veličine čestica.

Može se uočiti kako variranje mase kuglica različitih veličina nema značajnijeg utjecaja na veličinu nanočestica. Pretpostavka je bila da najmanja veličina kuglica treba biti najveće mase u odnosu na ostale. Naime, one imaju veću specifičnu površinu i veće su mase od ostalih veličina kuglica. Tako se ostvaruje više dodirnih točaka s česticama flutikazonpropionata i time se postiže bolje usitnjenje (Malamatari i sur., 2018). Štoviše, najmanja srednja veličina dobivena je u slučaju kombinacija kuglica K2 i K4 gdje je masa najmanjih kuglica 0,6 g, dok je u uzorcima K1 i K3 bila 0,75 g. Prema tome, može se zaključiti da je masa najmanjih kuglica od 0,75 g vjerojatno prevelika, one ne mogu generirati dovoljno energije što onemogućava učinkovito usitnjavanje svih čestica (Malamatari i sur., 2018).

Stabilnost

Suspenzije flutikazonpropionata i Tween 80 pokazale su stabilnost i nakon nekoliko dana od pripreve. Promotrene su vizualno, a i rezultati mjerenja pokazali su da nema velikih odstupanja. U Tablici 6. prikazani su rezultati mjerenja veličina čestica usitnjenog flutikazonpropionata nakon kratkoročnog starenja.

Tablica 6. Rezultati mjerenja uzoraka flutikazonpropionata za ispitivanje stabilnosti suspenzije pri 25°C

flutikazon nakon određenog broja dana mljevenja	masa kuglica za mljevenje (g)	PDI (%)	Peak 1 (nm)	Peak 2 (nm)
0	0,5	29,74 ± 1,40	1042,2 ± 268,3	149,3 ± 108,2
1	0,5	15,27 ± 4,92	219,3 ± 6,7	-
2	0,5	17,87 ± 2,71	203,9 ± 7,8	-
3	0,5	19,00 ± 1,48	207,0 ± 5,6	-

5. ZAKLJUČCI

- Izrađene su nanočestice flutikazon-propionata u suspenziji s Tween-om 80 kao površinski aktivnom tvari metodom vlažnog mljevenja.
- Suspenzije flutikazon-propionata i Tween-a 80 su makroskopskim pregledom i na osnovu rezultata ispitivanja pokazale stabilnost 3 dana nakon priprave.
- Uočen je značajan utjecaj omjera flutikazon-propionata i Tween-a na veličinu nanočestica.
- Pokazano je da se s jednakom masom djelatne i površinski aktivne tvari nužno ne dobiva najmanja veličina čestica.
- Suspenzije 10:1, 5:1, 4:1 i 1:1 pokazale su zadovoljavajuće rezultate.
- Najveća masa od 0,75 g nije imala utjecaj na smanjenje veličine čestica u odnosu na rezultate dobivene mljevenjem s kuglicama mase 0,5 g.
- Variranje mase kuglica svih triju veličina nije pridonijelo smanjenju veličine nanočestica u odnosu na korištenje istih masa svih veličina kuglica.
- Najveća masa najmanjih kuglica nije rezultirala smanjenjem veličine nanočestica u odnosu na sve korištene varijacije veličina kuglica.

6. LITERATURA

Ahire E, Thakkar S, Darshanwad M, Misra M. Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8, 733-755.

Attari Z, Bhandari A, Jagadish PC, Lewis S. Enhanced ex vivo intestinal absorption of olmesartan medoxomil nanosuspension: Preparation by combinative technology. *Saudi Pharm J*, 2015, 24, 57-63.

Baza lijekova, <http://new.halmed.hr>, pristupljeno 20. 3. 2019.

Bilgili E, Rahman M, Palacios D, Arevalo F. Impact of polymers on the aggregation of wet-milled itraconazole particles and their dissolution from spray-dried nanocomposites. *Adv Powder Technology*, 2018, 29, 2941-2956.

Gomboc I. Razvoj lipidno-alginatnih nanočestica za nazalnu primjenu lipofilnih lijekova. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017, 1-46.

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physico chemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharmaceutics*, 2009, 381, 205-213.

Hafner A, Lovrić J, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9, 1005-1023.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farm Glas*, 2014, 70, 303-321.

<https://mediately.co/hr/drugs>, pristupljeno 21. 3. 2019.

Ibrahim MA, Shazly GA, Aleanizy FS, Alqahtani FY, Elosaily GM. Formulation and evaluation of docetaxel nanosuspensions: In-vitro evaluation and cytotoxicity. *Saudi Pharm J*, 2018, 27, 49-55.

Inouea D, Tanakab A, Kimurac S, Kiriyaamac A, Katsumib H, Yamamotob A, Ogawarad K, Kimurad T, Higakid K, Yutanie R, Sakanee T, Furubayashia T. The relationship between in vivo nasal drug clearance and in vitro nasal mucociliary clearance: Application to the prediction of nasal drug absorption. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 117, 21-26.

Junghanns Jens-Uwe AH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3, 295-309.

Jurišić Dukovski B, Plantić I, Čunčić I, Krtalić I, Juretić M, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *Int J Pharm*, 2017, 533, 480-487.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 11. izdanje, 2011, 347-348.

Li F, Li L, Wang S, Yang Y, Li J, Liu D, Zhang S, Wang S, Xu H. Improved dissolution and oral absorption by co-grinding active drug probucol and ternary stabilizers mixtures with planetary beads-milling method. *Asian J Pharm Sci*, 2018, 12, 1-9.

Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Durrigl M, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farm Glas*, 2015, 71, 355-384.

Lua Y, Lib Y, Wua W. Injected nanocrystals for targeted drug delivery. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6, 106-113.

Malamatari M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*, 2018, 23, 534-547.

Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Safundžić Kučuk M, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable *in situ* gelling fluticasone suspension: development and optimization of nasal deposition. *Int J Pharm*, 2019, 563, 445-456.

Raghava Srivalli KM, Mishra B. Drug nanocrystals: A way toward scale-up. *Saudi Pharm J*, 2014, 24, 388-404.

Rodriguez Amado JR, Lafourcade Prada A, Lobato Duarte J, Keita H, Rivero da Silva H, Ferreira AM, Hernandez Sosa E, Tavares Carvalho JC. Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi Pharm J*, 2017, 25, 1158-1168.

Romero Gregori B, Keck Cornelia M, Muller RH. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm*, 2016, 501, 236-244.

Santos AM, Carvalho FC, Teixeira DA, Azevedo DL, de Barros WM, Daflon Gremião MP. Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. *Int J Pharm*, 2017, 524, 330-338.

Shariare MH, Altamimi MA, Marzan AL, Tabassum R, Jahan B, Reza HM, Rahman M, Ahsan GU, Kazi M. In vitro dissolution and bioavailability study of furosemide nanosuspension prepared using design of experiment (DoE), *Saudi Pharm J*, 2018, 27, 96-105.

Tanaka A, Furubayashi T, Tomisaki M, Kawakami M, Kimura S, Inoue D, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. Nasal drug absorption from powder formulations: The effect of three types of hydroxypropyl cellulose (HPC). *Eur J Pharm Sci*, 2016, 96, 284-289

Tao J, Chow SF, Zheng J. Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 9, 4-18.

Tomić I, Juretić M, Jug M, Pepić I, Cetina Čižmek B, Filipović-Grčić J. Preparation of *in situ* hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study. *Int J Pharm*, 2019, 563, 249-258.

7. SAŽETAK

Veliki broj novosintetiziranih djelatnih tvari teško je topljivo. Jedna od metoda postizanja bolje solubilizacije je priprava nanokristala, odnosno smanjenje veličine čestica djelatnih tvari na nanometarsku veličinu. Veličina nanokristala je u rasponu od od 1 do 1000 nm. Povećanjem topljivosti djelatne tvari, povećava se i njezina bioraspoloživost. Nanosuspencije su termodinamički nestabilni sustavi. Zbog toga, osim djelatne tvari i tekuće faze, sustav mora sadržavati stabilizator. Za pripravu nanokristala koriste se dvije skupine metoda; metode smanjenja veličine čestica (engl. top-down methods) i metode povećanja veličine čestica (engl. bottom-up methods). Metoda vlažnog mljevenja pripada skupini *top-down* metoda. Nanokristali djelatne tvari mogu se koristiti za nazalnu primjenu lijekova. Time je moguće postići lokalni, ali i sistemski učinak. Najčešće se nazalna primjena koristi u liječenju lokalnih infekcija, alergijskog rinitisa ili nazalne kongestije, ali moguće je i učinak na središnji živčani sustav.

Cilj ovog rada bio je pripremiti nanokristale flutikazonpropionata u suspenziji s Tween 80 kao površinski aktivnom tvari.

Postupkom vlažnog mljevenja izrađeni su nanokristali flutikazonpropionata raspona veličina od 209,74 do 394,42 nm. Udio Tween 80, odnosno omjer djelatna tvar/Tween 80 te masa kuglica za mljevenje utjecala je na veličinu čestica. Suspenzije 10:1, 5:1, 4:1 i 1:1 pokazale su zadovoljavajuće rezultate. Najmanja veličina čestica dobivena je u suspenziji u slučaju omjera djelatna tvar : Tween 80 2:1. Najveća masa od 0,75 g nije imala utjecaj na smanjenje veličine čestica u odnosu na rezultate dobivene mljevenjem s kuglicama mase 0,5 g. Variranje mase kuglica različitih veličina također nije imala značajnijeg utjecaja na veličinu nanočestica.

SUMMARY

A large number of newly synthesized active substances are severely soluble. One of the methods for achieving better solubilization is the preparation of nanocrystals and the reduction of active substance particles on a nanometric scale. The size of nanocrystals ranges from 1 to 1000 nm. By increasing the solubility of active substances, their bioavailability increases. Nanosuspensions are thermodynamically unstable systems. Therefore, in addition to the active substance and the liquid phase, there also must be a stabilizer in the system. There are two groups of methods used for preparation of nanocrystals. Those are methods based on particle size reduction (top-down methods) and methods based on increasing the particle size (bottom-up methods). The method of wet milling is one of top-down methods. Nanocrystals can be used for nasal administration of drugs. Nasal administration can achieve local but also a systemic effects. The most common nasal use is for the treatment of local infections, allergic rhinitis and nasal congestion, or possible effects on the central nervous system.

The aim of this study was to prepare nanocrystals of fluticasone propionate in suspension with Tween 80 as a surfactant.

By the wet milling method, nanocrystals were obtained from 209.74 nm to 394.42 nm. Concentration of Tween 80, respectively, the ratio of the active substance/Tween 80 and the mass of milling beads affected the particle size. Suspensions 10:1, 5:1, 4:1 and 1:1 showed satisfactory results. The minimum particle size was obtained by suspending the active ingredient : Tween 80 2:1. The maximum weight of 0.75 g milling beads had no impact on the particle size reduction compared to results given for milling by 0.5 g milling beads. There was no significant influence on the size of nanocrystals by varying weights of milling beads different sizes.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA NANOKRISTALA FLUTIKAZONPROPIONATA

Ana Bano

SAŽETAK

Veliki broj nosintetiziranih djelatnih tvari teško je topljivo. Jedna od metoda postizanja bolje solubilizacije je priprava nanokristala, odnosno smanjenje veličine čestica djelatnih tvari na nanometarsku veličinu. Veličina nanokristala je u rasponu od 1 do 1000 nm. Povećanjem topljivosti djelatne tvari, povećava se i njezina bioraspoloživost. Nanosuspencije su termodinamički nestabilni sustavi. Zbog toga, osim djelatne tvari i tekuće faze, sustav mora sadržavati stabilizator. Za pripravu nanokristala koriste se dvije skupine metoda; metode smanjenja veličine čestica (engl. top-down methods) i metode povećanja veličine čestica (engl. bottom-up methods). Metoda vlažnog mljevenja pripada skupini *top-down* metoda. Nanokristali djelatne tvari mogu se koristiti za nazalnu primjenu lijekova. Time je moguće postići lokalni, ali i sistemski učinak. Najčešće se nazalna primjena koristi u liječenju lokalnih infekcija, alergijskog rinitisa ili nazalne kongestije, ali moguć je i učinak na središnji živčani sustav.

Cilj ovog rada bio je pripremiti nanokristale flutikazonpropionata u suspenziji s Tween 80 kao površinski aktivnom tvari.

Postupkom vlažnog mljevenja izrađeni su nanokristali flutikazonpropionata raspona veličina od 209,74 do 394,42 nm. Udio Tween 80, odnosno omjer djelatna tvar/Tween 80 te masa kuglica za mljevenje utjecala je na veličinu čestica. Suspenzije 10:1, 5:1, 4:1 i 1:1 pokazale su zadovoljavajuće rezultate. Najmanja veličina čestica dobivena je u suspenziji u slučaju omjera djelatna tvar : Tween 80 2:1. Najveća masa od 0,75 g nije imala utjecaj na smanjenje veličine čestica u odnosu na rezultate dobivene mljevenjem s kuglicama mase 0,5 g. Variranje mase kuglica različitih veličina također nije imala značajnijeg utjecaja na veličinu nanočestica.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 4 grafička prikaza, 6 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanočestice; Flutikazonpropionat; Tween 80; Vlažno mljevenje; Nazalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FLUTICASONE PROPIONATE NANOCRYSTALS

Ana Bano

SUMMARY

A large number of newly synthesized active substances are severely soluble. One of the methods for achieving better solubilization is the preparation of nanocrystals and the reduction of active substance particles on a nanometric scale. The size of nanocrystals ranges from 1 to 1000 nm. By increasing the solubility of active substances, their bioavailability increases. Nanosuspensions are thermodynamically unstable systems. Therefore, in addition to the active substance and the liquid phase, there also must be a stabilizer in the system. There are two groups of methods used for preparation of nanocrystals. Those are methods based on particle size reduction (top-down methods) and methods based on increasing the particle size (bottom-up methods). The method of wet milling is one of top-down methods. Nanocrystals can be used for nasal administration of drugs. Nasal administration can achieve local but also a systemic effects. The most common nasal use is for the treatment of local infections, allergic rhinitis and nasal congestion, or possible effects on the central nervous system.

The aim of this study was to prepare nanocrystals of fluticasone propionate in suspension with Tween 80 as a surfactant.

By the wet milling method, nanocrystals were obtained from 209.74 nm to 394.42 nm. Concentration of Tween 80, respectively, the ratio of the active substance/Tween 80 and the mass of milling beads affected the particle size. Suspensions 10:1, 5:1, 4:1 and 1:1 showed satisfactory results. The minimum particle size was obtained by suspending the active ingredient : Tween 80 2:1. The maximum weight of 0.75 g milling beads had no impact on the particle size reduction compared to results given for milling by 0.5 g milling beads. There was no significant influence on the size of nanocrystals by varying weights of milling beads different sizes.

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

Thesis includes: 37 pages, 4 figures, 6 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoparticles; Fluticasone propionate; Tween 80; Wet milling; Nasal administration

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2019