

# Ispitivanje utjecaja laktoze i manitola na svojstva praškastog sustava s natrijevim deksamatazon fosfatom za nazalnu primjenu

---

Blažon, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:208315>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sara Blažon**

**Ispitivanje utjecaja laktoze i manitola na  
svojstva praškastog sustava s natrijevim  
deksametazon fosfatom za nazalnu primjenu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na uloženom trudu, stručnom vodstvu te ukazanom strpljenu prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem asistenticama Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. te Mirni Perkušić, mag. pharm., na savjetima, uloženom vremenu i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i Alojziju na neizmjernoj podršci prilikom studiranja, vjeri u mene te riječima potpore u trenucima posustajanja.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama uz koje je studentski život bio mnogo lakši.*

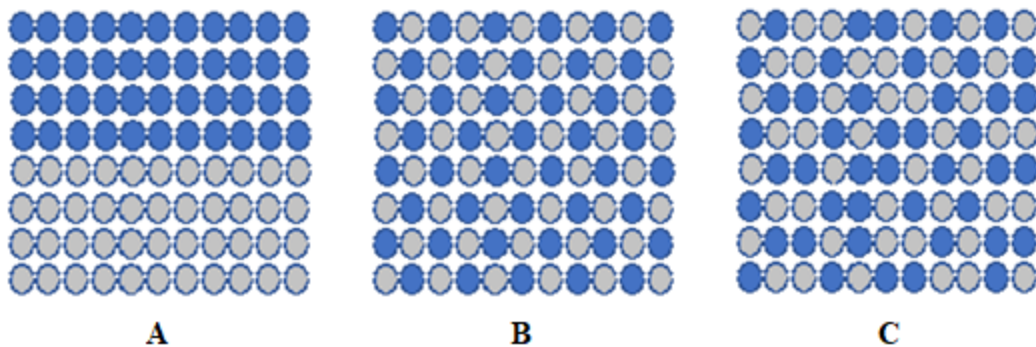
# Sadržaj

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1. Miješanje prašaka .....	1
1.2. Homogenost.....	3
1.3. Reologija prašaka .....	4
1.4. Inertni nosači .....	7
1.4.1. Laktoza .....	7
1.4.2. Manitol .....	11
1.5. Nazalna primjena praškastih sustava .....	12
1.6. Deksametazon.....	14
<b>2. Obrazloženje teme.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materijali i metode.....</b>	<b>18</b>
3.1. Materijali .....	18
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Priprava mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom.....	18
3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere .....	20
3.2.3. Priprava praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača.....	20
3.2.4. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava .....	21
3.2.5. Ispitivanje svojstava tečenja praškastih sustava .....	21
3.2.6. Ispitivanje bubrenja praškastih sustava .....	22
<b>4. Rezultati i rasprava.....</b>	<b>23</b>
4.1. Priprava mikrosfera i uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata .....	23
4.2. Homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnih nosača .....	24
4.3. Svojstva tečenja praškastih sustava .....	27
4.4. Bubrenje praškastih sustava.....	29
<b>5. Zaključci .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>33</b>
<b>7. Sažetak/Summary .....</b>	<b>39</b>
<b>Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card</b>	

# 1. Uvod

## 1.1. Miješanje prašaka

Miješanje prašaka neizostavan je korak proizvodnje u slučaju kad čvrsti farmaceutski oblik čini više sastavnica. Miješanje osigurava jednaku raspodjelu djelatne tvari, ujednačen izgled te pravilno oslobađanje djelatne tvari iz oblika. Iz tog je razloga kontrola procesa miješanja od velike važnosti u osiguravanju kakvoće farmaceutskog oblika. Miješanje se definira kao proces kojem se podvrgavaju višekomponentni sustavi kako bi se postiglo da je svaka jedinica u što većoj mjeri okružena drugom komponentom. Savršena bi mješavina u tom slučaju bila proizvedena kad je jedna komponenta u potpunosti okružena drugom komponentom. Takav je sustav nemoguće postići u praksi pa se teži nasumičnoj mješavini u kojoj bi vjerojatnost pronalaska pojedine komponente sustava bila jednaka u svim dijelovima mješavine te bi njezina vrijednost odgovarala udjelu pojedine komponente (Venables i Wells, 2001). Navedeni tipovi mješavina prikazani su na Slici 1.



**Slika 1.** Različite faze miješanja praška. A) Potpuna razdvojenost. B) Savršena mješavina. C) Nasumična mješavina.

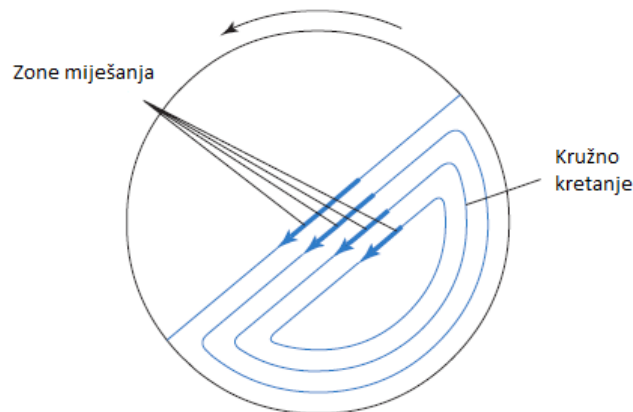
Ovisno o energiji koju je potrebno uložiti prilikom miješanja, mješavine se dijele na pozitivne, negativne i neutralne. Neutralne su mješavine prilično stabilne. Nemaju tendenciju spontanog miješanja kakvu posjeduju pozitivne mješavine te je za razliku od negativnih mješavina potreban određen utrošak energije da bi došlo do segregacije. Navedena svojstva posjeduju praškasti sustavi (Twitchell, 2013).

Miješanje prašaka postiže se pomoću mehanizama koji uključuju konvekciju, smicanje i difuziju. Kako bi se postigla prava nasumična mješavina, potrebno je miješanje pojedinačnih čestica praška koje se postiže difuzijom. Prilikom miješanja, djelovanjem sile, čestice se razdvajaju što pridonosi nastajanju zrakom ispunjenih šupljina koje omogućavaju ulazak pojedinačnih čestica. Vrsta mješača, uvjeti miješanja i svojstva komponenata praškastog sustava određuju prevladavajući mehanizam miješanja (Twitchell, 2013).

Nepoželjan proces suprotan miješanju je segregacija, odnosno odvajanje komponenata mješavine. To dovodi do smanjenja kvalitete pripravka, povećava varijabilnost sastava mješavine te narušava izgled. Segregaciji su podložne mješavine prašaka koji se međusobno razlikuju prema veličini, obliku, gustoći i površinskim svojstvima čestica te su zastupljeni različitim udjelom u smjesi. Čestice različitih svojstava gibaju se odvojeno te su kasnije sklone razdvajanju. Razlika u veličini čestica najčešći je uzrok segregacije. Manje čestice zbog djelovanja sile prilikom miješanja, lijevanja ili protresivanja prolaze kroz šupljine između većih čestica te se nakupljaju na dnu (Desai i sur., 2020). Kako bi faktori segregacije došli do izražaja potrebno je dulje vrijeme. Iz tog razloga postoji optimalno vrijeme miješanja za svaki pripravak koje će omogućiti prihvatljivu standardnu devijaciju sadržaja, a neće dovesti do razdvajanja komponenti. Jedan od načina smanjenja mogućnosti segregacije je proizvodnja tzv. uređenih mješavina (engl. *ordered mixtures*) (Twitchell, 2013). Naime, ukoliko su čestice praška dovoljno male, mogu se adsorbirati na čestice nosača što pridonosi stabilnosti mješavine uz zadržavanje dobrih svojstava tečenja. To je prvi put zamijećeno prilikom miješanja mikronizirane sode bikarbone s kristalima saharoze (Travers i White, 1971). Uređene mješavine koriste se u tehnologiji izrade praška inhalata. Adsorbiranjem lijeka na nosač (najčešće laktozu) postiže se dostava lijeka do pluća te ujednačeno doziranje prilikom svake inhalacije (Sarkar i sur., 2017).

Prilikom izrade mješavine praška s niskim udjelom djelatne tvari potrebno je postupno dodavati pomoćnu tvar metodom geometrijske trituracije kako bi se osigurao prikladan volumen. Vrsta mješača u postupku izrade mješavine praška određuje se na temelju prikladnog mehanizma miješanja za svaku formulaciju. Mješači se mogu podijeliti u dvije skupine: segregirajući koji se temelje na smičnom i difuznom miješanju te neselegirajući temeljeni na konvekciji (Venables i Wells, 2001). Miješanje prašaka najčešće se provodi u različitim izvedenicama rotirajućeg mješača koje se temelje na principu rotacije oko određene osi.

Miješanjem prikladnom brzinom postiže se kretanje slojeva praška prikazano na Slici 2. Nastanak gradijenta brzine između slojeva pridonosi smičnom miješanju. Slojevi praška pod djelovanjem gravitacijske sile propadaju uzrokujući stvaranje šupljina što omogućava difuzno miješanje. Miješanje će se u najvećoj mjeri odvijati u vanjskim slojevima koji se gibaju najvećom brzinom. Rotirajući mješač prikladan je za praške dobrih svojstava tečenja, a slabe je efikasnosti za kohezivne praške s lošim svojstvima tečenja.



**Slika 2.** Prikaz kretanja slojeva praška unutar rotirajućeg mješača (Preuzeto i prilagođeno prema Twitchell, 2013)

Sofisticiranije izvedenice rotirajućeg mješača koriste rotacijsko, translacijsko i inverzno gibanje u sve tri dimenzije. Efikasnije miješanje smanjuje mogućnost segregacije komponenti koje se razlikuju prema veličini i gustoći čestica (Twitchell, 2013).

## 1.2. Homogenost

Određivanje homogenosti ključan je korak nakon miješanja prašaka zbog izravne povezanosti sa sigurnošću i učinkovitošću lijeka (Sacre i sur., 2014). Homogenost praškastog sustava osigurava ujednačenost doziranja i održavanje koncentracije lijeka unutar terapijske širine. Homogenost konačnog produkta miješanja ovisi o brojnim parametrima procesa, ali i fizičkim svojstvima čestica praška. Tako na uniformnost produkta utječu uvjeti, vrijeme i brzina miješanja, vrsta mješača, udio djelatne tvari, kohezivnost, veličina, oblik i gustoća čestica te njihova površinska svojstva (Wang i sur., 2017). Usporedbom miješanja prašaka pri različitom udjelu djelatne tvari utvrđena je manja homogenost za manje udjele te različiti utjecaj brzine miješanja ovisno o udjelu djelatne tvari (Florian-Algarin i Mendez, 2015).

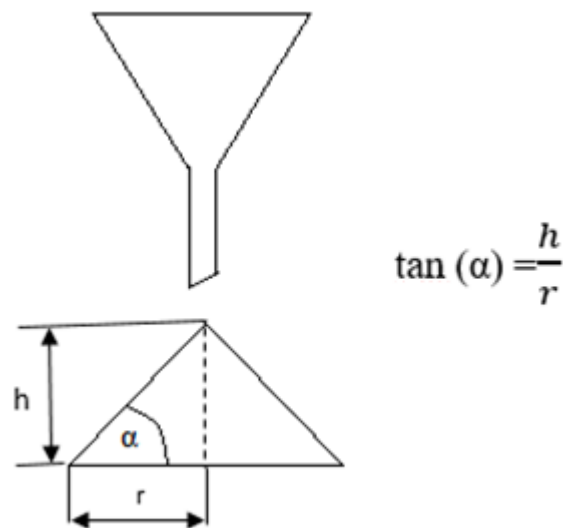
Homogenost odnosno uspješnost miješanja određuje se izračunavanjem standardne devijacije od teorijskog udjela komponente smjese tijekom određenog vremena miješanja ili broja okretaja mješača. Europska farmakopeja definira najveću dopuštenu devijaciju koja je za većinu tvari u rasponu od 2 do 6 %. Završna točka miješanja odnosno prikladna homogenost postiže se kad prosječan sadržaj i standardna devijacija odgovaraju kriteriju definiranom u farmakopeji. Za procjenu uniformnosti koriste se mnoge *off-line*, *in-line* i *on-line* metode. Najčešće *off-line* metode za analizu homogenosti su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (Kaialy i sur., 2012a) i UV-Vis spektrofotometrija (Florian-Algarin i Mendez, 2015). Neinvazivne metode kao što su NIR (engl. *near-infrared*) spektroskopija (Scheibelhofer i sur., 2013), Ramanova spektroskopija (Wang i sur., 2017) i laserom inducirana fluorescencija (LIF) (Karumanchi i sur., 2011) korištene su za *on-line* te *in-line* mjerenje uniformnosti. Prednost *on-line* metode je provođenje analize u realnom vremenu *in situ* bez uzorkovanja.

### **1.3. Reologija prašaka**

Preduvjet uspješne proizvodnje praškastih i čvrstih farmaceutskih oblika su dobra svojstva tečenja prašaka. Reologija prašaka je složena te ovisi o mnogobrojnim čimbenicima kao što su veličina i oblik čestica, vlažnost, međumolekulske sile, površinska svojstva te dodatak sredstava za kliženje (Goh i sur., 2018). Van der Waalove i elektrostatske sile utječu na adhezivnost te kohezivnost prašaka što dovodi do smanjenja svojstava tečenja. Budući da se proces adhezije i kohezije odvija na površini, veličina čestica utjecat će na svojstva tečenja. Stoga su sitne čestice zbog većeg omjera površine i mase kohezivnije od većih čestica koje su pod izraženijim utjecajem gravitacijske sile. Svojstva tečenja razlikuju se za čestice jednake veličine, a različitog oblika. Sferične čestice imaju minimalnu dodirnu površinu što rezultira boljom reologijom u odnosu na nepravilne čestice s većim omjerom površine i mase (Aulton, 2013). Budući da povećana vlažnost pridonosi smanjenju svojstava tečenja praška, važno je obratiti pozornost na uvjete skladištenja gotovog farmaceutskog oblika (Hirschberg i sur., 2019).



Europska farmakopeja propisuje četiri različite metode određivanja reologije prašaka. Svaka metoda kvantificira svojstva tečenja na drugačiji način, stoga ne postoji jedinstvena metoda određivanja reologije prašaka. Određivanje nasipnog kuta (engl. *angle of repose*) primjenjuje se u brojnim granama znanosti, a temelji se na otporu čestica praška prema tečenju. Nasipni kut definira se kao najstrmiji nagib, mjereno u odnosu na vodoravnu podlogu pri kojem se materijal može gomilati bez da se uruši (Slika 3.). Čestice praška će teći kad je kut dovoljno velik da gravitacijska sila prevlada silu trenja, a čestice će prestati kliziti kad je kut nedovoljan za prevladavanje adhezije odnosno kohezije. Prema tome vrijednost kuta će biti velika ako je prašak kohezivan i obrnuto (Al-Hashemi, 2018). Metoda se klasificira prema visini lijevka i promjeru baze koji mogu biti konstantni ili se mijenjati s formiranjem stošca. Nasipni kut nije intrinzično svojstvo svakog praška, što znači da je ovisan o metodi mjerenja (European Pharmacopoeia 8.0., 2013).



**Slika 3.** Shematski prikaz metode određivanja nasipnog kuta

Najznačajniji parametri koji se koriste za opisivanje reoloških svojstava prašaka su Hausnerov omjer i Carrov indeks (indeks kompresibilnosti). Njihove se vrijednosti teorijski izračunavaju temeljem eksperimentalno određenih vrijednosti nasipne gustoće praška prije ( $\rho_{bulk}$ ) i nakon ( $\rho_{tapped}$ ) protresivanja. Promjene nasipnog volumena nakon protresivanja nastaju zbog reorganizacije čestica te strukturni raspored postaje zbijeniji (Kaleem i sur., 2020). Carrov indeks i Hausnerov omjer nisu apsolutne vrijednosti te uvelike ovise o sljedećim parametrima metode: promjeru upotrijebljenog cilindra, broju protresivanja, masi praška te eventualnoj primjeni rotacije tijekom protresivanja (European Pharmacopoeia 8.0., 2013).

Direktna metoda koja se koristi za određivanje tečenja prašaka je brzina tečenja kroz otvor. Brzina tečenja definira se kao masa praška koja proteče kroz otvor u jedinici vremena, a osim brzine potrebno je odrediti i jednolikost tečenja. Mjerenje se provodi korištenjem elektronske vage te neke vrste uređaja za snimanje na dva moguća načina: određivanjem vremena potrebnog da 100 g ili 200 ml uzorka prođe kroz otvor s točnošću desetinke sekunde te određivanjem količine praška koji prođe kroz otvor u 10 sekundi s točnošću desetinke grama. Metoda se razlikuje ovisno o vrsti spremnika, veličini i obliku otvora te načinu određivanja brzine protoka. Usporedba rezultata dobivenih ovom metodom izuzetno je teška, budući da je rezultat ovisan o metodi te ne postoji opće prihvaćena gradacija rezultata (European Pharmacopoeia 8.0., 2013).

Posljednja metoda koju propisuje Europska farmakopeja je korištenje reometra za praške. Pomoću njega se određuje smično naprezanje definirano kao sila po jedinici površine koja je potrebna za pomicanje praškastog sloja pod uvjetima normalnog opterećenja. Mjerenje je nešto složenije u odnosu na prethodno opisane metode, no veća je mogućnost kontrole eksperimenta (European Pharmacopoeia 8.0., 2013).

Dobra svojstva tečenja izrazito su bitan parametar razvoja novih farmaceutskih oblika. Osobito je izazovno postići optimalno tečenje kohezivnih prašaka koji sadrže fine čestice manje od 10  $\mu\text{m}$ . Mnoga su istraživanja bila usmjerena na ispitivanje problematike kohezivnih prašaka finih čestica namijenjenih nazalnoj primjeni (Zhou i sur., 2010). Optimiranje svojstava tečenja prašaka može se postići prilagođavanjem raspodjele veličina čestica, odnosno uklanjanjem najsitnijih čestica. Poznato je da sferične čestice posjeduju bolja svojstva tečenja od onih nepravilnog oblika. U svrhu prilagođavanja oblika koristi se proces sušenja raspršivanjem koji može poboljšati sferičnost čestica. Optimiranjem uvjeta proizvodnje mogu se postići bolja površinska svojstva čestica i izbjeći međusobno mehaničko blokiranje zbog grublje površine. Vlaga utječe na svojstva tečenja povećanjem adhezivnosti čestica praška što dovodi do povećanja nasipne gustoće i smanjene poroznosti. Stoga se prašci velike vlažnosti podvrgavaju procesu sušenja, dok se higroskopni prašci čuvaju i proizvode u uvjetima niske vlažnosti. Granulacija je česta metoda koja pomaže u poboljšanju svojstava tečenja jer povećava uniformnost veličine čestica, smanjuje količinu vrlo sitnih čestica i prašine te smanjuje vjerojatnost segregacije (Aulton, 2013).

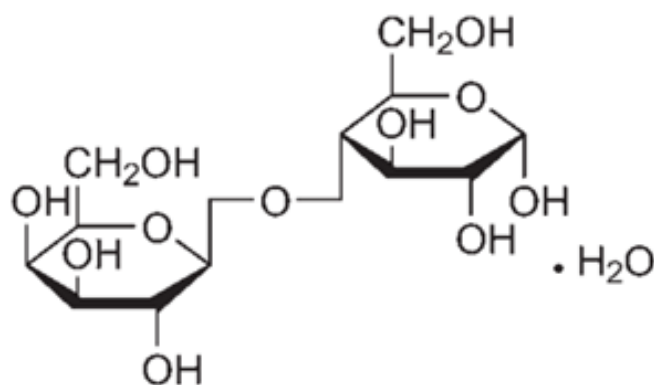
Najčešća metoda za poboljšanje svojstava tečenja je dodatak sredstva za kliženje koje smanjuje adheziju i koheziju. Sredstva za kliženje s velikom specifičnom površinom smanjuju van der Waalsove interakcije povećanjem udaljenosti između čestica praška, odnosno smanjenjem nasipne gustoće. Za praške s adsorbiranom velikom količinom vlage koriste se hidrofobne tvari koje prekidaju vodeni film na površini. Najčešća sredstva koja se koriste za poboljšanje reologije prašaka su magnezijev stearat, magnezijev oksid, silicijev dioksid, škrob i talk (Tomas i Kleinschmidt, 2009).

## **1.4. Inertni nosači**

Broj djelatnih tvari u praškastom obliku za nazalnu primjenu je ograničen zbog neprikladne veličine čestica, niske topljivosti, loše apsorcije i iritabilnosti. Navedena ograničenja mogu se prevladati korištenjem inertnih nosača koji moraju biti biokompatibilni, hidrofilni i topljivi te veličine koja odgovara nazalnoj primjeni (De Ascentiis i sur., 1996). Na taj način inertni nosači poboljšavaju kvalitetu i učinkovitost praškastog sustava za nazalnu primjenu. Da bi se pomoćna tvar mogla razmotriti kao nosač u praškastom farmaceutskom obliku moraju biti zadovoljena sljedeća dva kriterija: pomoćna tvar mora biti svrstana na GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) listu te moraju biti dostupni literaturni podaci o sigurnosti njene primjene putem dišnog sustava ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### **1.4.1. Laktoza**

Laktoza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) je disaharid sastavljen od molekule glukoze i galaktoze međusobno povezanih  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom. Prirodni je ugljikohidrat koji se sintetizira u mliječnim žlijezdama sisavaca, a industrijski se dobiva iz sirutke kravljeg mlijeka. Laktoza je bijeli kristalični prašak, topljiv u vodi, blago slatkog okusa. U krutom agregatnom stanju postoje različite izomerne forme ovisno o uvjetima kristalizacije i sušenja kao što su:  $\alpha$ -laktoza monohidrat,  $\alpha$ -anhidrična laktoza te  $\beta$ -anhidrična laktoza. Poseban oblik laktoze kojeg čini smjesa mikrokristalične  $\alpha$ -monohidrat laktoze i amorfnih sferičnih agregata dobiven je procesom sušenja raspršivanjem. Kristalizacijom iz prezasićene otopine pri temperaturi manjoj od 93,5 °C priprema se  $\alpha$ -laktoza monohidrat (Slika 4.) koju karakteriziraju dobra svojstva tečenja, ali slaba kompresibilnost. U svrhu poboljšanja kompresibilnosti laktoza monohidrat se miješa s malim količinama anhidrične laktoze (Rowe RC i sur., ured., 2009).



**Slika 4.** Struktura  $\alpha$ -laktoze monohidrata (preuzeto s Rowe RC i sur., ured., 2009)

Laktoza je česta pomoćna tvar u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Različiti oblici laktoze razlikuju se prema raspodjeli veličine čestica, svojstvima tečenja i kompresibilnosti. To omogućuje odabir najprikladnijeg oblika za pojedinu namjenu (Rowe RC i sur., ured., 2009). Koristi se kao konstituens u proizvodnji tableta i kapsula te ima ulogu inertnog nosača u prašku inhalata. Za nazalnu se primjenu najčešće koristi  $\alpha$ -laktoza monohidrat proizvedena mljevenjem, sušenjem-raspršivanjem ili prosijavanjem. Fine čestice mljevene laktoze pridonose lakšoj aerosolizaciji pripravka (Pilcer i sur., 2012). Mnoga su se istraživanja bavila tematikom  $\alpha$ -laktoze monohidrata kao inertnog nosača u inhalacijskim pripravcima, a neka od njih prikazana su u Tablici 1. Anhidrična laktoza, zbog niskog sadržaja vlage, prikladna je za lijekove koji podliježu hidrolizi te se može koristiti u pripravi intravenskih oblika.

Obzirom da je laktoza česta pomoćna tvar u farmaceutskim pripravcima, preispituje se mogućnost pojave nepoželjnih reakcija zbog intolerancije na laktozu. To je poremećaj najzastupljeniji u odrasloj populaciji iz razloga što se količina i aktivnost laktaze smanjuju s dobi. Nemogućnost razgradnje laktoze na sastavne dijelove te njihove apsorpcije dovodi do povećanog osmotskog učinka u tankom crijevu što uzrokuje tipične simptome kao što su grčevi, proljev, nadutost, flatulencija i nelagoda u području abdomena. Dnevna doza laktoze koja je progutana za vrijeme primjene nazalnih pripravaka prilično je niska te nedostatna za izazivanje simptoma kod većine ljudi. Bez obzira na to, postoje slučajevi dijareje uzrokovani lijekom zbog intolerancije na laktozu, stoga je prilikom korištenja potrebna doza opreza (Zdrojewicz i sur., 2018).

Erizas<sup>®</sup> je praškasti sustav odobren u Japanu i Južnoj Koreji namijenjen nazalnoj primjeni čija je pomoćna tvar laktoza. Erizas<sup>®</sup> sadrži ester kortikosteroida naziva deksametazon cipeclat u dozi od 400 ili 200 µg koji je odobren za liječenje alergijskog rinitisa. Prvi je kortikosteroidni praškasti sustav koji se primjenjuje jedanput dnevno uz učinkovito poboljšanje simptoma bolesti kao što su kihanje, curenje iz nosa te začepljenje nosa ([www.nippon-shinyaku.co.jp](http://www.nippon-shinyaku.co.jp)).

**Tablica 1.** Primjeri istraživanih terapijskih sustava u obliku suhog praška koji sadrže α-laktozu monohidrat kao inertni nosač

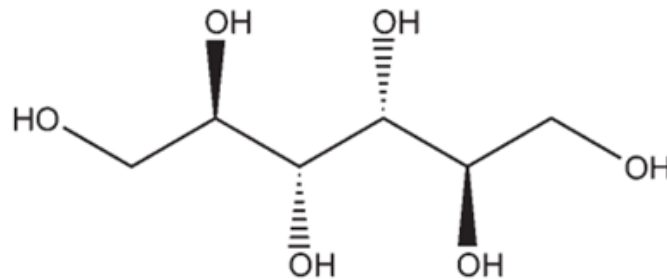
DJELATNA TVAR	CILJ ISTRAŽIVANJA	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	LITERATURA
bosentan	Ispitati fizičko-kemijska svojstva nosača pripremljenih različitim proizvodnim postupkom (sušenje raspršivanjem, mljevenje, sijanje) te aerodinamička svojstva formulacije.	Laktoza pripravljena sušenjem raspršivanjem pokazala je najbolja svojstva tečenja, ali najgoru sposobnost oslobađanja lijeka.	Lee i sur., 2018
enoksaparin	Ispitati mogućnost primjene enoksaparina u obliku praška inhalata koristeći laktozu kao inertni nosač.	Enoksaparin u obliku praška ima bolja svojstva apsorpcije od otopine, laktoza je prikladan nosač.	Bai i sur., 2010
goveđi serumski albumin	Ispitati mogućnost primjene laktoze obložene goveđim serumskim albuminom u procesu elektrodinamičke atomizacije.	Formulacija je uspješno pripremljena, ne dolazi do značajnih konformacijskih promjena i degradacije proteina – postoji potencijal pulmonalne primjene.	Tavares Cardoso i sur., 2011
griseofulvin	Ispitati utjecaj različitih ulaznih temperatura sušenja raspršivanjem na nastanak cvjetaste (engl. <i>flower-like</i> ) laktoze za uklapanje griseofulvina.	Laktoza s najvećom poroznošću i kapacitetom uklapanja dobivena je pri temperaturi od 150 °C. Cvjetasta laktoza može povećati topljivost lijeka.	Tan i sur., 2018

flutikazonpro- pionat i terbutalin sulfat	Ispitati karakteristike laktoze (mljevena, prosijana) koje utječu na interakciju lijeka i nosača te izvedbu formulacije.	Mljevena laktoza zbog finijih čestica ima bolja svojstva adsorpcije i veći potencijal stvaranja aglomerata s lijekom, no otežano je oslobađanje djelatne tvari.	Le i sur., 2012
morfin hidroklorid	Ispitati svojstva praškastih sustava za nazalnu primjenu pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine morfin hidroklorida i različitih šećera (manitol, trehaloza, laktoza, $\beta$ -ciklodekstrin, HPMC).	Laktoza se pokazala najučinkovitijom pomoćnom tvari kod proizvodnje mikrosfera te dostave lijeka na mjesto primjene.	Russo i sur., 2006

HPMC – hipromeloza

### 1.4.2. Manitol

Manitol ( $C_6H_{14}O_6$ , Slika 5.) je prirodni šećerni alkohol D konfiguracije prisutan kod biljaka i životinja koji nastaje redukcijom manoze i glukoze. Izomer je sorbitola te se od njega razlikuje prema položaju hidroksilne skupine na drugom ugljikovom atomu. Manitol nije higroskopan za razliku od sorbitola, stoga je prikladna pomoćna tvar kod lijekova sklonih hidrolizi. Pojavljuje se u obliku kristaličnog praška ili granula bijele boje te je slatkog okusa.



**Slika 5.** Struktura D-manitola (preuzeto s Rowe RC i sur., ured., 2009)

Najčešća primjena manitola u farmaceutskoj industriji je kao punilo u čvrstim farmaceutskim oblicima. Koristi se u postupku vlažne granulacije i direktnog komprimiranja tableta u obliku granulata ili praška dobivenog sušenjem raspršivanjem. Česta je komponenta formulacija tableta s produljenim oslobađanjem te prikladan nosač u prašcima inhalata (Rowe RC i sur., ured., 2009). Primijenjen parenteralno manitol djeluje kao osmotski diuretik u liječenju akutne insuficijencije bubrega, povišenog intrakranijalnog tlaka i cerebralnog edema te rezistentnog povišenog intraokularnog tlaka ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Prednost primjene manitola u odnosu na laktozu su nereducirajuća svojstva koja pridonose fizičkoj stabilnosti. Iz tog razloga postoje brojne studije koje ispituju primjenu manitola kao alternativu  $\alpha$ -laktozi monohidratu u ulozi inertnog nosača. Usporedbom fizičkih i aerodinamičkih svojstava sustava dobivenih miješanjem granuliranog manitola ili laktoze za inhalaciju s djelatnom tvari (salbutamol sulfat, budesonid), manitol se pokazao prikladnim nosačem (Hertel i sur., 2020a). Ispostavilo se da prekrystalizacija manitola iz mješavine vode i etanola rezultira značajnim promjenama fizičkih i morfoloških svojstava manitola. Promjenom udjela vode u odnosu na etanol može se optimirati količina finih čestica praška čime se postižu bolja svojstva u odnosu na netretirani manitol (Kaialy i sur., 2010).

Površina manitola nešto je grublja u usporedbi s laktozom što rezultira smanjenjem svojstava tečenja i posljedično manjom inhaliranom dozom. Dodatkom malih količina finih čestica manitola ili magnezijevog stearata postiže se sferičniji izgled nosača zbog adhezije na površinu te poboljšanje svojstava tečenja (Hertel i sur., 2020b).

## **1.5. Nazalna primjena praškastih sustava**

Nazalna primjena lijeka prvi je izbor za liječenje bolesti poput nazalnih polipa, rinitisa, rinosinitisa, nazalne kongestije i infekcija zbog manje doze koja je potrebna za postizanje lokalnog učinka te smanjene mogućnosti razvoja sistemskih nuspojava. S druge strane, nazalno se primjenjuju i lijekovi čiji je cilj postići sistemski učinak. To omogućuju relativno velika apsorpcijska površina, dobra prokrvljenost i permeabilnost te niska enzimska aktivnost sluznice nosa. Učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka ovisi o fiziologiji sluznice nosa te fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari i farmaceutskog oblika (Hafner i sur., 2014). Pacijentima nazalna primjena predstavlja jednostavan, bezbolan i neinvazivan način primjene. Bez obzira na prednosti u usporedbi s oralnom i parenteralnom primjenom, postoje ograničavajući čimbenici za nazalnu primjenu. Kompleksna struktura nosne šupljine smanjuje dostavu lijeka do ciljnog mjesta djelovanja, a mukocilijarno čišćenje skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici (Nižić i sur., 2020).

Praškastih sustavi pokazali su brojne prednosti u odnosu na otopine i suspenzije koje čine većinski dio pripravaka za nazalnu primjenu. Suhi oblik karakteriziran je većom kemijskom, fizičkom i mikrobiološkom stabilnošću zbog čega za njihovu formulaciju nisu potrebni konzervansi što smanjuje mogućnost iritacije sluznice (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Doza primijenjenog pripravka mora biti prilagođena kapacitetu nosne šupljine. Maksimalni volumen tekućeg oblika kojeg je moguće primijeniti u jednu nosnicu iznosi 200  $\mu$ l što omogućuje primjenu samo niskih doza ili izrazito topljivih lijekova (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Primjena praškastih sustava omogućava dostavu većih doza lijeka s produljenim vremenom zadržavanja te bolju bioraspoloživost. Dulje zadržavanje praškastog sustava na nazalnoj sluznici omogućava dulje djelovanje i rjeđu primjenu što pridonosi većoj adherenciji pacijenata. Maksimalna količina nazalno primijenjenog praškastog sustava ovisi o nasipnoj gustoći, a iznosi 10-25 mg (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).



Bez obzira na navedene prednosti praškastih sustava, u Europskoj uniji odobren je samo jedan praškasti sustav za nazalnu primjenu koji se koristi kod liječenja hipoglikemije. Diljem svijeta u primjeni je tek nekoliko praškastih sustava koji postižu lokalne ili sistemske učinke nakon nazalne primjene (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Odobreni praškasti sustavi za nazalnu primjenu s lokalnim ili sistemskim djelovanjem

ZAŠTIĆENO IME	DJELATNA TVAR (DOZA)	POMOĆNE TVARI	INDIKACIJA	LITERATURA
Rhinocort <sup>®</sup> Turbuhaler <sup>®</sup> * (Kanada)	budezonid (100 µg)	nema	liječenje alergijskog i vazomotornog rinitisa te nazalnih polipa	Product monograph, 2018
Teijin Rhinocort <sup>®</sup> (Japan)	beklometazon dipropionat (50 µg)	hidroksipropilceluloza, magnezijev stearat, stearinska kiselina	liječenje alergijskog i vazomotornog rinitisa	Pozzoli i sur., 2016
Erizas <sup>®</sup> (Japan)	deksametazon cipeclat (400 ili 200 µg ovisno o uređaju)	laktoza	liječenje alergijskog rinitisa	www.nippon-shinyaku.co.jp
Onzetra Xsail <sup>®</sup> (SAD)	sumatriptan sukcinat (11 mg)	nema	akutno liječenje migrene sa ili bez aure	www.onzentra.com
Baqsimi <sup>®</sup> (SAD, EU)	glukagon (3 mg)	betadeks (β-ciklodekstrin), dodecilsfosfokolin	liječenje hipoglikemije u odraslih i djece starije od 4 godine	www.ema.europa.eu

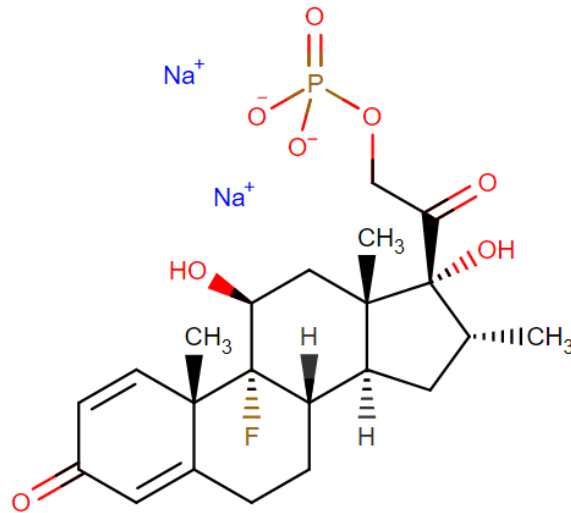
\*lijek je povučen s tržišta od strane nositelja odobrenja AstraZeneca Canada zbog ekonomskih razloga u veljači 2020. godine (www.drugstoragescanada.ca)

## 1.6. Deksametazon

Kortikosteroidi su skupina lijekova širokog spektra djelovanja koji se koriste u brojnim indikacijama, oblikovani u različitim farmaceutskim oblicima. Klinička učinkovitost kortikosteroida temelji se na trojakom protuupalnom djelovanju, od kojih je najvažnija smanjena transkripcija gena za proupalne medijatore (prostaglandini, leukotrieni, faktor aktivacije trombocita) posredovanjem glukokortikoidnih receptora. Protuupalnom učinku također pridonose smanjena migracija proupalnih stanica te pojačana transkripcija gena za protuupalne medijatore (Karatzanis i sur., 2017).

Dugotrajnija sistemska primjena kortikosteroida može dovesti do ozbiljnih nuspojava, stoga se teži korištenju lokalnih pripravaka koji djeluju na mjestu primjene. Nazalna je primjena kortikosteroida prva linija liječenja bolesti kao što su rinitis, rinosinuitis i nazalni polipi budući da je njihov temelj upala nosne sluznice. Mogućnost pojave sistemskih nuspojava lokalnom primjenom znatno je smanjena, no zabilježene česte nuspojave su faringitis, infekcija gornjih dišnih puteva, peckanje, iritacija ili ulceracija nosa te iritacija grla ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Epistaksa odnosno krvarenje iz nosa najčešće je prijavljivana nuspojava koja može biti uzrokovana mehaničkim oštećenjem septuma nastavkom spreja, atrofijom sluznice i perforacijom septuma (Wu i sur., 2019). Kortikosteroidi odobreni za nazalnu primjenu u Republici Hrvatskoj su flutikazonpropionat, flutikazonfuroat, budezonid, mometazonfuroat i triamcisonolon u obliku spreja ili kapi.

Deksametazon je sintetski kortikosteroid s jakom glukokortikoidnom te blagom mineralokortikoidnom aktivnošću. Djeluje protuupalno i imunosupresivno, stoga ima brojne terapijske indikacije kao što su: endokrini poremećaji, bolesti vezane uz alergijske reakcije, reumatske, kožne, maligne, očne bolesti, bolesti probavnog i dišnog sustava te infektivna stanja ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Kliničko ispitivanje *Recovery* provedeno na hospitaliziranim pacijentima s dijagnosticiranim COVID-19 pokazalo je smanjenje smrtnosti te kraće trajanje hospitalizacije pacijenata koji su u uznapređovalom stadiju bolesti primali deksametazon u usporedbi s pacijentima liječenim standardnim metodama ([www.nejm.org](http://www.nejm.org)). Natrijev deksametazon fosfat (Slika 6.) vodotopljivi je esterski prolijek deksametazona šta ga čini prikladnim oblikom za izradu otopina uz poboljšanu bioraspodivnost. Prolijek djelovanjem fosfataza brzo prelazi u aktivni oblik ([www.drugbank.com](http://www.drugbank.com)).



**Slika 6.** Struktura natrijevog deksametazon fosfata (preuzeto s [www.drugbank.com](http://www.drugbank.com))

U Republici Hrvatskoj odobreno je šest pripravaka s natrijevim deksametazon fosfatom kao djelatnom tvari u obliku otopine za injekciju/infuziju, kapi za oko i gela za oko. Trenutno nema odobrenih nazalnih pripravaka, no na području EU registrirani su pripravci u obliku otopine (Solupen® sine, Dexamethasone® N sine).

## 2. Obrazloženje teme

Upalne bolesti sluznice nosa kao što su rinitis, rinosinitis i nazalni polipi primarno se liječe nazalnom primjenom kortikosteroida zbog prednosti u odnosu na sistemska primjenu. Osnovne značajke koje čine nazalnu primjenu poželjnim modelom dostave lijeka su: direktna dostava lijeka do mjesta djelovanja, brz početak djelovanja, smanjenje potrebne doze i mogućih nuspojava te poboljšanje adherencije bolesnika. Većina odobrenih pripravaka nazalnih kortikosteroida je u konvencionalnom tekućem obliku. Iako rijetko zastupljeni na tržištu, praškasti sustavi omogućuju veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu primjene, bolju stabilnost formulacije te produljeno vrijeme zadržavanja na sluznici zbog odgođenog mukocilijarnog klirensa (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

Većina praškastih sustava temelji se na mikrosferama koje predstavljaju sferične terapijske sustave veličine od 1 do 1000  $\mu\text{m}$ , načinjene od polimernog matriksa s uklopljenim lijekom (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Polimerni matriks osigurava kontrolirano oslobađanje lijeka, izraženiju interakciju s nosnom sluznicom i zaštitu uklopljenog lijeka od enzimske razgradnje (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Pektin i hipromeloza su biokompatibilni i mukoadhezivni polimeri bez iritirajućeg djelovanja. Omogućavaju kontrolirano bubrenje u kontaktu s nosnim fluidom, a formirani se gel dulje zadržava na sluznici nosa u odnosu na konvencionalne tekuće oblike. Bubrenje uzrokuje dehidraciju mukoznih stanica i posljedično slabljenje čvrstih veza što može utjecati na permeabilnost djelatne tvari (Nižić i sur., 2020). Mikrosfere manje veličine zbog veće ukupne površine lakše stupaju u kontakt s nosnom sluznicom. S druge strane, čestice manje od 10  $\mu\text{m}$  nisu prikladne za djelovanje u nosnoj šupljini zbog depozicije u nižim dišnim putovima te jačih kohezivnih sila koje narušavaju svojstva tečenja.

Poboljšanje reoloških svojstava i profila depozicije mikrosfera u nosnoj šupljini može se postići adsorpcijom mikrosfera na inertne nosače odgovarajuće veličine. Takav praškasti sustav zadržava pozitivna svojstva mikrosfera, osigurava veličinu čestica prikladnu za nazalnu depoziciju te pruža mogućnost poboljšane učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka. Dodatna prednost uvođenja inertnog nosača u sustav je bolja reproducibilnost doziranja te ujednačenost proizvodnje praškastih formulacija (Lee i sur., 2018).

U ovom su radu pripremljene mikrosfere temeljene na hipromelozi i pektinu s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom procesom sušenja raspršivanjem. Cilj je bio pripremiti praškaste sustave miješanjem mikrosfera i inertnih nosača (laktoza, manitol) u različitim masenim omjerima te ispitati utjecaj količine i vrste nosača na homogenost, svojstva tečenja te bubrenje sustava.

## **3. Materijali i metode**

### **3.1. Materijali**

Uzorak mikrosfera s uklopljenom djelatnom tvari pripremljen je korištenjem niskometoksiliranog amidiranog pektina (Pectin Amid CF 005, Herbstreith & Fox KG, Njemačka), hipromeloze (Metolose SH 4000, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd, Japan) te natrijevog deksametazon fosfata (Carbosynth Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo). Laktoza GranuLac® 200 (Meggle, Njemačka) i manitol (VWR Chemicals BDH®, Ujedinjeno Kraljevstvo) korišteni su kao inertni nosači.

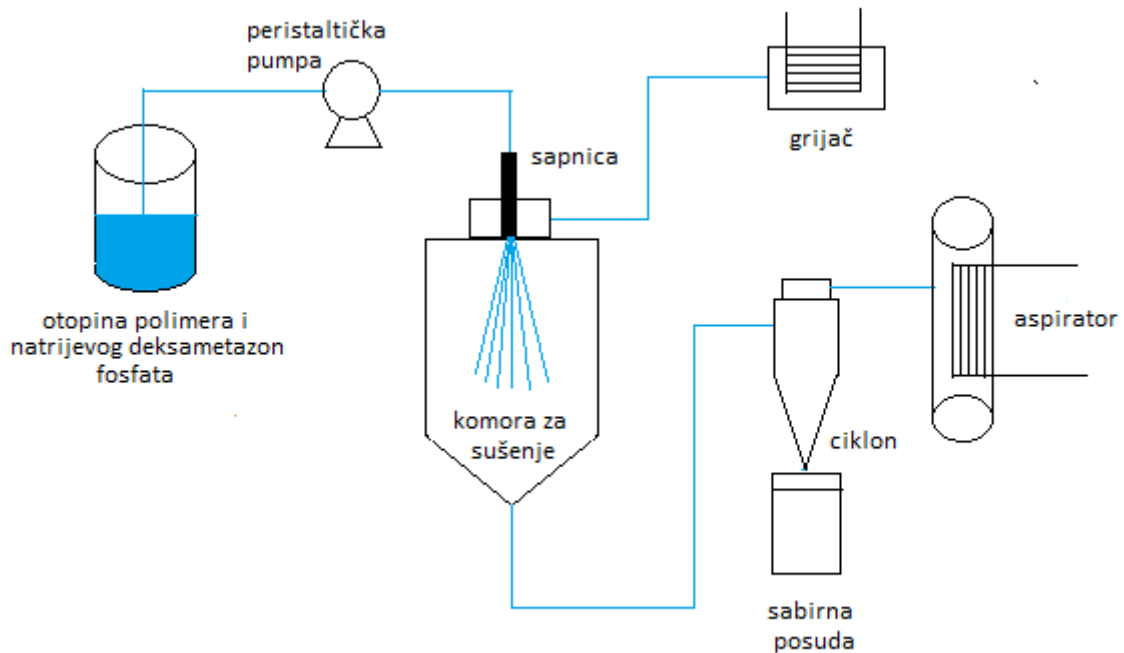
Umjetni nazalni fluid (engl. *Simulated nasal fluid*-SNF) pripremljen je otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska), KCl (Kemig, Hrvatska) i  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka) u pročišćenoj vodi. Koncentracije krutina u pripremljenoj otopini iznosile su redom 150 mM, 40 mM te 5,3 mM.

### **3.2. Metode**

#### **3.2.1. Priprava mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom**

Prvi korak pripreve mikrosfera bio je izraditi koncentrirane vodene otopine polimera i djelatne tvari. Otopina pektina pripravljena je otapanjem u pročišćenoj vodi pri masenom udjelu od 1,4 % uz stalno miješanje magnetskom miješalicom kroz 24 sata. Otopina hipromeloze pripravljena je dispergiranjem polimera u pročišćenoj vodi zagrijanoj na 80 – 90 °C te je nakon toga nastavljeno miješanje na magnetskoj miješalici 24 sata pri sobnoj temperaturi. Maseni udio hipromeloze u pripravljenoj otopini iznosio je 1,2 % te je otopina pohranjena u hladnjak 24 sata prije upotrebe. Otopina natrijevog deksametazon fosfata masenog udjela 0,135 % pripravljena je u pročišćenoj vodi. Navedene su otopine pomiješane dajući smjesu u kojoj je maseni udio svih navedenih sastavnica iznosio 0,2 % iz čega proizlazi da je maseni omjer natrijevog deksametazon fosfata u odnosu na polimere iznosio 1:2.

Mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom pripravljene su iz navedene smjese otopina procesom sušenja raspršivanjem (Slika 7.). Uređaj korišten za tu svrhu je Büchi Mini Spray Dryer B-190 (Flawil, Švicarska) s promjerom sapnice 0,7 mm. Parametri procesa sušenja raspršivanjem bili su sljedeći: protok komprimiranog zraka 650 NI/h, ulazna temperatura zraka 160 °C, izlazna temperatura 102 °C, brzina dotoka otopine na sapnicu 2,5 g/min te kapacitet aspiratora 50 %.



**Slika 7.** Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem

Za određivanje iskorištenja procesa korištena je sljedeća formula:

$$I (\%) = \frac{\text{masa pripremljenih mikrosfera (mg)}}{\text{masa suhe tvari u otopini za sušenje (mg)}} \times 100$$

Masa suhe tvari izračunata je iz masenog udjela pojedinih sastavnica (natrijev deksametazon fosfat, pektin, hipromeloza) te ukupne mase vodene otopine koja se koristila u procesu sušenja.

### 3.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere

Izvagano je 10 mg mikrosfera i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 ml koja je nadopunjena pročišćenom vodom do oznake. Disperzija je miješana 24 sata na magnetskoj miješalici te je profiltrirana kroz polietersulfonsku membranu veličine pora 0,20 µm (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Dobiveni je filtrat razrijeđen pročišćenom vodom u omjeru 1:4 (V/V). Sadržaj natrijevog deksametazon fosfata određen je pomoću spektrofotometra (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) pri valnoj duljini od 241 nm. Preliminarnim je ispitivanjima utvrđeno da pri navedenoj valnoj duljini otopljeni polimeri ne interferiraju s natrijevim deksametazon fosfatom. Mjerenje je za svaki uzorak provedeno u triplikatu.

Koncentracija natrijevog deksametazon fosfata u uzorku dobivena je iz prethodno određenog baždarnog dijagrama. Iz dobivenih je rezultata izračunata uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere prema formuli:

$$UU (\%) = \frac{\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}}{\text{teorijski sadržaj lijeka (mg)}} \times 100$$

### 3.2.3. Priprava praškastih sustava mikrosfera i inertnog nosača

Za pripravu praškastih sustava mikrosfera i nosača korišteni su laktoza monohidrat GranuLac® 200 (GL) i manitol (M). Nosače je prije miješanja s mikrosferama bilo potrebno prosijati pomoću laboratorijskog vibracijskog sita (Vibratory Sieve Shaker AS 200, Retsch®, Njemačka). Prosijavanje je trajalo 10 minuta pri amplitudi od 50 %. U daljnjim je eksperimentima korištena prosijana frakcija čestica veličine 45-63 µm. Praškasti sustavi mikrosfera i prosijanih nosača pripremljeni su miješanjem u različitim masenim omjerima: 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 i 1:9. Prašci su izvagani u kivetu volumena 50 ml (Falcon®, Corning Inc, SAD) te miješani na MX-S vortex mixer miješalici (DLAB Scientific Co. Ltd., Kina) 5 minuta pri 1250 okretaja/min. Nakon toga je smjesa prebačena u kivete volumena 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka) te dodatno homogenizirana u 3D mješaču prašaka Turbula® T2F (Willy A. Bachofen AG, Švicarska) 10 minuta pri 70 okretaja/min.



### 3.2.4. Ispitivanje homogenosti praškastih sustava

Neposredno nakon pripreve praškastih sustava ispitana je njihova homogenost prema metodi Bobičanec i Kobaš (2020) uzorkovanjem prašaka s vrha, sredine i dna kivete u triplikatu. U vijale je izvagano 5 mg praškastog sustava te dodano 10 ml pročišćene vode. Disperzije su miješane na magnetskoj miješalici tijekom 24 sata te filtrirane kroz membrane veličine pora 0,20 µm (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Filtrat je prema potrebi razrijeđen pročišćenom vodom profiltriranom na isti način. Sadržaj natrijevog deksametazon fosfata određen je spektrofotometrijski na način opisan u poglavlju 3.2.2. Homogenost praškastih sustava izražena je kao srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalno određene i teorijske mase natrijevog deksametazon fosfata u uzorku te je za svaki sustav prikazana i relativna standardna devijacija (RSD).

### 3.2.5. Ispitivanje svojstava tečenja praškastih sustava

Određivanje svojstava tečenja praškastih sustava provedeno je indirektnom metodom na način da su za svaki praškasti sustav određene gustoće prije i nakon protresivanja ( $\rho_{\text{bulk}}$  i  $\rho_{\text{tapped}}$ ) iz kojih su izračunati Carrov indeks i Hausnerov omjer. Mjerenje je provedeno prema metodi Bobičanec i Kobaš (2020). Izvagana je količina praška od 50 mg koja je prenesena u začepljenu plastičnu brizgalicu volumena 1 ml (Medispo®, HBM Group, SAD) te je markerom označen volumen. Brizgalica je zatvorena parafilmom i protresivana sve dok volumen između dva uzastopna protresivanja nije bio konstantan. Mjerenje je provedeno za sustave mikrosfera i nosača masenog omjera 1:1 i 1:9 te same mikrosfere u duplikatu. Masa praška koja se nalazila u štrcaljci te određeni volumeni prije i nakon protresivanja korišteni su za izračun nasipne gustoće prije i nakon protresivanja. Iz dobivenih su se vrijednosti izračunali Carrov indeks i Hausnerov omjer prema jednadžbama kako slijedi (European pharmacopoeia 8.0., 2013):

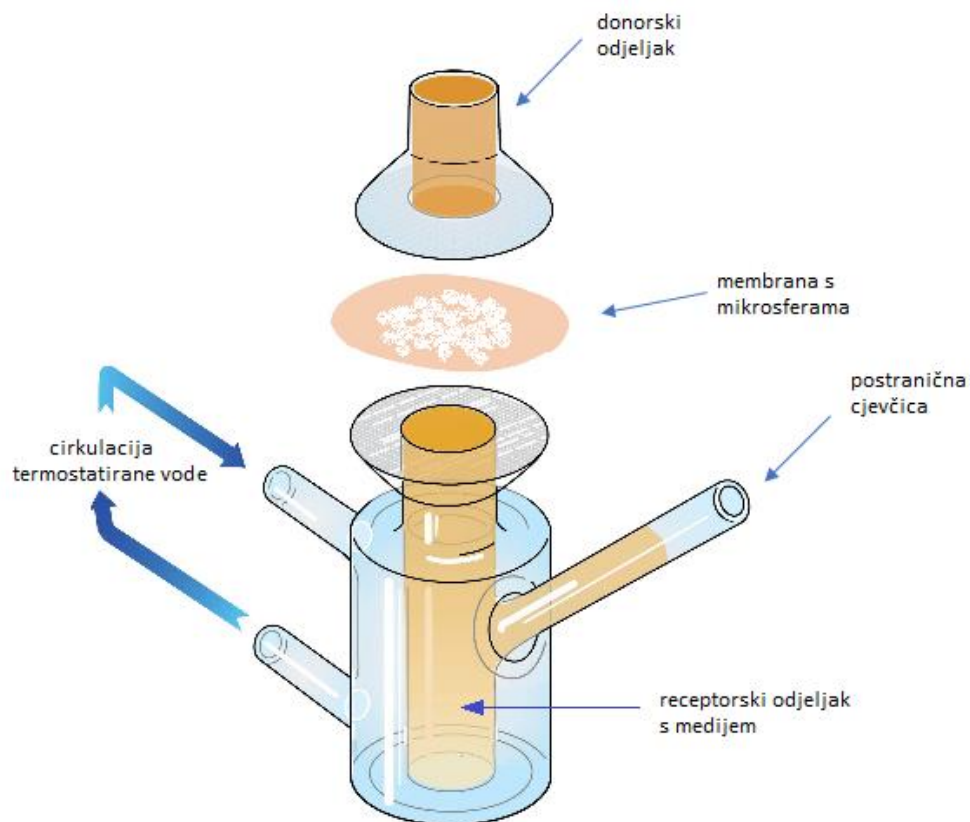
$$\text{Carrov indeks (\%)} = \frac{\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}}}{\rho_{\text{tapped}}} \times 100$$

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}}$$

$\rho_{\text{bulk}}$  – nasipna gustoća prije protresivanja;  $\rho_{\text{tapped}}$  – nasipna gustoća nakon protresivanja

### 3.2.6. Ispitivanje bubrenja praškastih sustava

Bubrenje prašaka ispitano je volumetrijskom metodom pomoću Franzove difuzijske ćelije (PermeGear, SAD; Slika 8.) prema metodi Bobičanec i Kobaš (2020) . Količina praška od 10 mg ravnomjerno je raspoređena na poliamidnu membranu veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka). Kao medij za bubrenje korišteni su pročišćena voda i SNF termostatirani pri 34 °C. Receptorski odjeljak ćelije napunjen je medijem, a membrana s praškom postavljena je između donorskog i receptorskog odjeljka te je namočena medijem za bubrenje. Ispitivanje bubrenja provedeno je u trajanju od 15 minuta u oba medija za svaki prašak u duplikatu. Bubrenje mikrosfera rezultiralo je smanjenjem razine medija u postraničnoj cjevčici koji se prema potrebi svake 3 minute nadopunjavao do početne razine pomoću građuirane štrcaljke volumena 500  $\mu\text{l}$  (Hamilton, Švicarska). Svojstvo bubrenja iskazano je kao volumen medija apsorbiran po miligramu mikrosfera u praškastom sustavu.



**Slika 8.** Prikaz Franzove difuzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema [www.permegear.com](http://www.permegear.com))

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Priprava mikrosfera i uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata

Mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem je često korištena metoda u pripravi mikrosfera namijenjenih nazalnoj primjeni zbog svoje brzine, jednostavnosti i reproducibilnosti (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Proces se temelji na raspršivanju otopine, suspenzije ili emulzije u sitne kapljice te njihovom sušenju u struji vrućeg zraka. Nastale čestice praška potom se u ciklonu odvajaju od struje vrućeg zraka te se sakupljaju u sabirnoj posudi. Dobiveni praškasti produkt fizički je i kemijski stabilniji od tekućih farmaceutskih oblika. Mogućnost prilagodbe različitih procesnih parametara čini sušenje raspršivanjem poželjnom metodom pripreme čestica različite veličine i oblika (Lechanteur i Evrard, 2020). Utjecaj na svojstva produkta imaju i karakteristike samog uređaja te svojstva tekućine koja se podvrgava procesu. Povećana brzina dotoka otopine na sapnicu, veći promjer sapnice te veća koncentracija otopine rezultirat će česticama većeg promjera. S druge strane veći tlak komprimiranog zraka, manja površinska napetost raspršenih kapljica i promjer sapnica pridonose nastanku čestica manjeg promjera. Brzina isparavanja otapala koja ovisi o ulaznoj temperaturi i vrsti otapala utječe na poroznost produkta (Sosnik i Seremeta, 2015).

U ovom su radu pripravljene mikrosfere sušenjem raspršivanjem otopine natrijevog deksametazon fosfata, pektina i hipromeloze u masenom omjeru 1:1:1 (koncentracija svake od tvari u otopini iznosila je 0,2%, *m/m*) što ih razlikuje od mikrosfera pripremljenih u radu Bobičanec i Kobaš, 2020. Pektin i hipromeloza su mukoadhezivni polimeri dobrih gelirajućih svojstava prisutni u nekoliko odobrenih pripravaka. Pektin je gelirajuća tvar nazalnog pripravka fentanila zaštićenog naziva PecFent® ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Primjer nazalnog pripravka s hipromelozom kao pomoćnom tvari je sprej azelastina naziva Vivispray® te se navedeni polimer često koristi u kapima za oči zbog stvaranja zaštitnog filma ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Iskorištenje procesa definira se kao postotak nastalog praškastog produkta u odnosu na suhu tvar koju sadrži ishodišna otopina te je iznosilo  $65,7 \pm 8,7$  %. Uspoređujući s literaturnim podacima dobivena vrijednost predstavlja relativno visok stupanj iskorištenja. Do gubitka produkta dolazi zbog zaostajanja čestica praška na unutarnjim stijenkama komore za sušenje i drugim dijelovima uređaja te smanjene mogućnosti ciklona za odvajanje čestica manjih od 2  $\mu\text{m}$  koje se gube kroz ispušni ventil. Nadalje, proces proizvodnje mikrosfera u industrijskom mjerilu bio bi bolje iskoristivosti jer je udio izgubljenog produkta niži u odnosu na ukupnu masu (Salama, 2020).

Uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u pripremljene mikrosfere iznosila je  $94,4 \pm 0,4$  % što ukazuje na prikladnost odabrane metode. Dobivena vrijednost odgovara literaturnim podacima (Nižić i sur., 2020; Bobičanec i Kobaš, 2020; Pačarić, 2020). Uzimajući u obzir ciljane dnevne doze deksametazona (400-800  $\mu\text{g}$ ) (Jurišić Dukovski i sur, 2019), dobivenu uspješnost uklapanja te omjer djelatne tvari u odnosu na polimere, zaključuje se da doza mikrosfera koja osigurava maksimalnu dnevnu dozu natrijevog deksametazon fosfata iznosi 2,5 mg. Količina praška koja se može primijeniti u nosnicu jednim potiskom iznosi 10-25 mg (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018) što omogućava miješanje mikrosfera i inertih nosača s ciljem poboljšanja reoloških svojstava i nazalne depozicije uz postignutu terapijsku dozu.

## **4.2. Homogenost praškastih sustava mikrosfera i inertnih nosača**

Veličina mikrosfera dobivenih procesom sušenja raspršivanjem neprikladna je za nazalnu primjenu zbog odlaganja u niže dijelove dišnog sustava. Miješanje mikrosfera s inertnim nosačem utječe na kvalitativni i kvantitativni aspekt nazalne primjene. Ukoliko se inertni nosač primjenjuje u pripravcima za oralnu inhalaciju, potrebno je odvajanje finih čestica od nosača tijekom inhalacije kako bi lijek dospio u pluća. S druge strane, inertni nosači korišteni u formuliranju nazalnog pripravka odlažu se u nosnu šupljinu zajedno s adheriranim mikrosferama (Tavers Cardoso i sur., 2011).

Inertni nosači korišteni u ovom radu su  $\alpha$ -laktoza monohidrat (GL) i manitol (M) jer su u prethodnom istraživanju pokazali najveći potencijal za nazalnu primjenu (Bobičanec i Kobaš, 2020). Obje su pomoćne tvari svrstane na GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) listu te postoje podaci o njihovoj primjeni putem dišnog sustava. Korištena je frakcija veličine čestica u rasponu od 45 do 63  $\mu\text{m}$  koja se prema literaturnim podacima pokazala optimalnom za nazalnu primjenu (Trows i Scherließ, 2016).

Praškasti sustavi pripremljeni su miješanjem mikrosfera i prosijane frakcije nosača u različitim masenim omjerima (1:1, 1:2, 1:4, 1:7, 1:9) kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj količine nosača na svojstva formulacije. Nižić i sur. (2020) pripremili su praškaste sustave koji sadrže mikrosfere s uklopljenim melatoninom i  $\alpha$ -laktozu mohohidrat u ulozi inertnog nosača. Pokazalo se da smjesa omjera 1:1 (*m/m*) nema značajnijeg utjecaja na poboljšanje depozicije melatonina, dok je kod smjese omjera 1:9 (*m/m*) uočeno značajno povećanje efikasnosti depozicije u ciljanoj nosnoj regiji. Priprava praškastih sustava temelji se na miješanju mikrosfera i inertnih nosača pri čemu nastaju adhezijske i kohezijske sile između čestica praška. Mikrosfere su male čestice velike specifične površine čija je sila vezanja na površinu nosača veća od gravitacijske sile koja teži odvajanju komponenti. To omogućava pripravu homogene smjese praška odgovarajuće veličine (Twitchell, 2013). Osim postizanja boljih svojstava depozicije, odabir prikladnog omjera u korist nosača bitan je kako ne bi došlo do zasićenja veznih mjesta za mikrosfere na površini nosača. U tom bi se slučaju mikrosfere slabije vezale što bi uzrokovalo njihovo odvajanje od površine nosača prilikom raspršivanja ili udaha te bi se povećao udio mikrosfera koje se odlažu u donjim dišnim putovima (Trows i Scherließ, 2016).

Učinkovitost miješanja mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (MS) i inertnih nosača (GL/M) ispitana je određivanjem homogenosti pripremljenih praškastih sustava. Za svaki je sustav uzet uzorak s vrha, sredine i dna kivete u kojima je određen sadržaj djelatne tvari. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 3. Praškasti sustav zadovoljavajuće homogenosti karakteriziran je srednjom vrijednošću postotnog omjera eksperimentalne i teorijske mase natrijevog deksametazon fosfata (% NDF) u pojedinom uzorku unutar raspona  $100 \pm 5,5\%$  te relativnom standardnom devijacijom (RSD) u iznosu  $\leq 5,5\%$  (Kaialy i sur., 2012b).

**Tablica 3.** Homogenost praškastih sustava pripravljenih miješanjem mikrosfera (MS) i inertnog nosača u različitim omjerima izraženi kao srednja vrijednost postotnog omjera eksperimentalne i teorijske mase natrijevog deksametazon fosfata u pojedinim uzorcima (% NDF) uz prikaz relativne standardne devijacije RSD (n=9).

<b>MS-GL</b>					
	1:1	1:2	1:4	1:7	1:9
% NDF	98,4	101,0	99,3	98,7	97,3
RSD %	4,1	2,5	3,2	1,8	3,1
<b>MS-M</b>					
	1:1	1:2	1:4	1:7	1:9
% NDF	102,9	102,4	97,1	94,8	97,7
RSD %	1,4	2,9	2,6	1,8	1,7

MS – mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom, GL – laktoza monohidrat GranuLac® 200, M- manitol

Iz navedenih je rezultata vidljivo da su svi pripremljeni praškasti sustavi zadovoljili oba kriterija homogenosti sa srednjom vrijednošću postotnog omjera eksperimentalne i teorijske mase natrijevog deksametazon fosfata  $100 \pm 5,5$  % te relativnom standardnom devijacijom manjom od 5,5 %. Sadržaj djelatne tvari iznosio je 94,8 – 102,9 % uz RSD vrijednosti 1,4 – 4,1 %. Homogenost sustava pokazatelj je efikasnosti miješanja te osnovni preduvjet za postizanje ujednačene isporuke terapijske doze. Kriterij homogenosti izrazito je bitan prilikom izrade formulacija niskog udjela djelatne tvari što je slučaj kod praškastih sustava pripravljenih u ovom radu. Za razliku od literaturnih podataka, navedeni rezultati ne upućuju na smanjenje homogenosti praškastih sustava koji sadrže manji udio djelatne tvari (Florian-Algarin i Mendez, 2015).

### 4.3. Svojstva tečenja praškastih sustava

Određivanje reoloških svojstava nazalnih prašaka neizostavan je korak u njihovom razvoju zbog direktne povezanosti s količinom djelatne tvari koja se tijekom raspršivanja dostavi u nosnu šupljinu te geometrijom oblaka generiranog aerosola koja utječe na raspodjelu djelatne tvari unutar nosne šupljine (Kaialy i sur., 2012). Reološka svojstva prašaka posljedica su adhezijskih i kohezijskih sila među česticama praška. Budući da se te interakcije događaju na površini čestica, ovisne su o veličini, obliku, gustoći, hrapavosti te drugim površinskim svojstvima čestica (Aulton, 2013). Dodatak različitih vrsta inertnih nosača u različitim omjerima mijenja prethodno navedena svojstva te može povoljno utjecati na reološka svojstva pripravka.

Svojstva tečenja praškastih sustava određena su indirektnom metodom na temelju izračunatog Hausnerovog omjera i Carrovog indeksa. Navedene su veličine povezane s trenjem između čestica te kompresibilnošću praška, stoga su prikladne za reološku karakterizaciju (Aulton, 2013; European Pharmacopoeia 8.0., 2013). U ovom su radu određena svojstva tečenja MS mikrosfera te sustava koji sadrže inertni nosač s najmanjim i najvećim masenim omjerom nosača u odnosu na mikrosfere (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Nasipna gustoća prije ( $\rho_{bulk}$ ) i nakon ( $\rho_{tapped}$ ) protresivanja te izračunate vrijednosti Carrovog indeksa i Hausnerovog omjera za mikrosfere (MS) te praškaste sustave mikrosfera i inertnog nosača u masenom omjeru 1:1 te 1:9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2).

Prašak		$\rho_{bulk}$ (mg/ml)	$\rho_{tapped}$ (mg/ml)	Carrov indeks (%)	Hausnerov omjer
MS		170,89 $\pm$ 3,62	373,82 $\pm$ 18,53	54,25 $\pm$ 1,30	2,19 $\pm$ 0,06
MS-GL	1:1	304,50 $\pm$ 12,19	502,00 $\pm$ 1,41	39,34 $\pm$ 2,60	1,65 $\pm$ 0,07
	1:9	589,03 $\pm$ 47,34	914,67 $\pm$ 115,02	35,42 $\pm$ 2,95	1,55 $\pm$ 0,07
MS-M	1:1	285,65 $\pm$ 11,14	499,50 $\pm$ 0,71	42,81 $\pm$ 2,31	1,75 $\pm$ 0,07
	1:9	527,28 $\pm$ 39,99	832,50 $\pm$ 1,18	36,67 $\pm$ 4,71	1,58 $\pm$ 0,12

MS – mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom, GL – laktoza monohidrat GranuLac® 200, M - manitol

Praškasti sustavi mikrosfera i inertnih nosača karakterizirani su značajno boljim svojstvima tečenja u odnosu na same mikrosfere. Mikrosfere kao praškasti produkt sušenja raspršivanjem male su veličine čestica te manje nasipne gustoće. Velika specifična površina mikrosfera dovodi do jače kohezivnosti te nekontrolirane aglomeracije čestica. Mehanička nestabilnost čestica negativno utječe na raspršivanje prašaka uzrokujući neadekvatnu depoziciju u nosnoj šupljini (Jüptner i Scherließ, 2019). Adsorpcijom mikrosfera na površinu čestica inertnog nosača postignuto je poboljšanje reoloških svojstava sustava nastankom uređene mješavine (engl. *ordered mixture*) u kojoj veće čestice inertnog nosača kontroliraju gibanje praška kao cjeline. Prema tome, praškasti sustavi većeg masenog omjera inertnog nosača u odnosu na mikrosfere karakterizirani su boljim svojstvima tečenja u odnosu na sustave kod kojih je navedeni omjer manji. Tečenje prašaka odvija se pod utjecajem gravitacijske sile, stoga su čestice veće gustoće manje kohezivne i boljih svojstava tečenja u odnosu na čestice manje gustoće, a iste veličine i oblika (Aulton, 2013). Gustoća manitola nešto je niža u odnosu na  $\alpha$ -laktozu monohidrat, a površina čestica grublja (Rowe RC i sur., ured., 2009; Hertel, 2020b). To može biti razlog nešto manje izraženih svojstava tečenja MS-M praškastih sustava u odnosu na MS-GL praškaste sustave. No, uzimajući u obzir standardnu devijaciju mjerenja, može se reći da su praškasti sustavi s oba nosača usporedivih reoloških svojstava. Bobičanec i Kobaš (2020) također su uočile poboljšanje svojstava tečenja sustava nakon adsorpcije mikrosfera na inertne nosače, no razlika reoloških svojstava sustava s laktozom i manitolom bila je značajnija. Razlog različitih vrijednosti je sama izvedba metode koja se razlikuje ovisno o osobi koja provodi mjerenje. Metoda punjenja cilindra utječe na vrijednost početnog volumena, a varijacijama su podložne i vrijednosti volumena očitane golim okom (Boschini i sur., 2015).



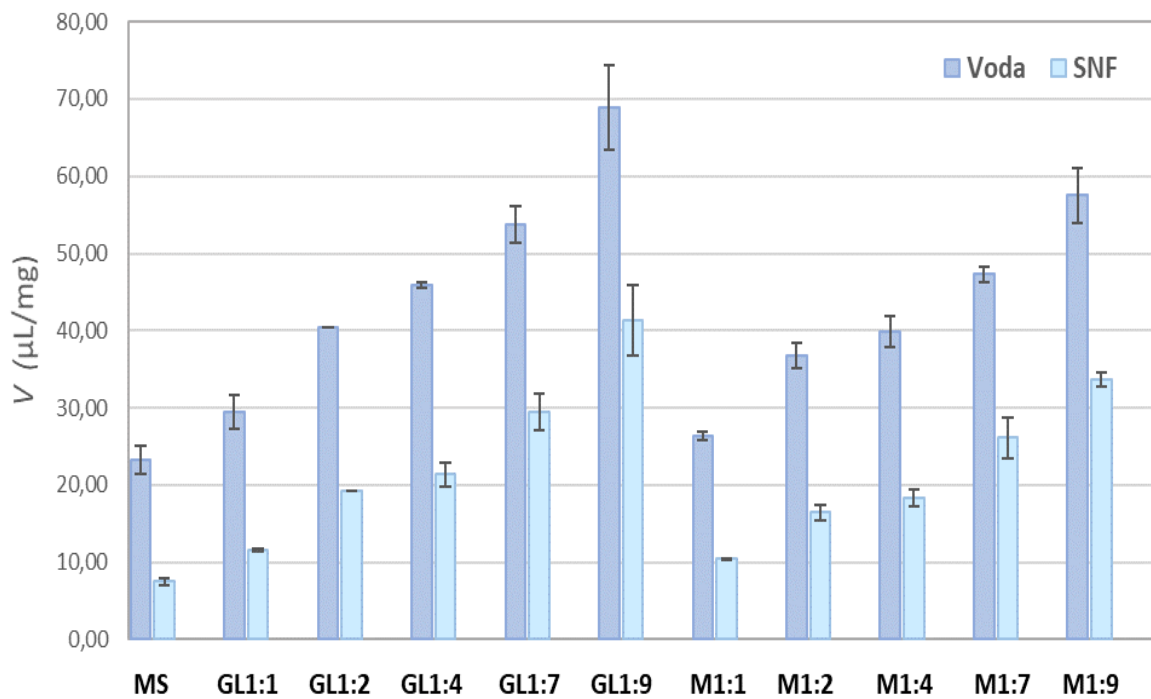
#### 4.4. Bubrenje praškastih sustava

Kontrolirano bubrenje i nastanak hidrogela kritični je parametar kvalitete praškastog sustava za nazalnu primjenu zbog izravne povezanosti s vremenom zadržavanja na nazalnoj sluznici, profilom oslobađanja lijeka uklopljenog u polimerni matriks te poboljšanjem adsorpcije lijeka kroz čvrste spojeve (engl. *tight junction*) epitelnih stanica. Svojstvo bubrenja ovisno je o vrsti polimera te okolišnim čimbenicima (Jurišić-Dukovski i sur., 2019). Bubrenje rezultira produljenjem polimernih lanaca što omogućava veću dostupnost veznih mjesta polimera za adsorpciju na sluznicu nosa uzrokujući produljeno vrijeme zadržavanja (Nižić i sur., 2020). Bubrenje uzrokuje dehidraciju mukoznih stanica i posljedično slabljenje čvrstih međustaničnih spojeva što poboljšava permeabilnost hidrofilnih djelatnih tvari putem paracelularne adsorpcije (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). S druge strane, prekomjerno bubrenje može uzrokovati oštećenje sluznice zbog gubitka vode, smanjiti adhezivnost formulacije te izazvati osjećaj nelagode prilikom primjene (Jurišić-Dukovski i sur., 2019).

U ovom je radu provedeno ispitivanje svojstava bubrenja samih mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom te praškastih sustava nastalih miješanjem mikrosfera i inertnih nosača u različitim omjerima. Bubrenje je ispitano indirektnom volumetrijskom metodom pomoću Franzove difuzijske ćelije. Ispitivanje je za svaki prašak provedeno u dva medija, pročišćenoj vodi te umjetnom nazalnom fluidu (SNF). Svojstvo bubrenja iskazano je kao volumen medija apsorbiran po miligramu mikrosfera u praškastom sustavu. Rezultati mjerenja prikazani su na Slici 9.

Same mikrosfere s uklopljenom djelatnom tvari su u procesu bubrenja apsorbirale  $23,3 \pm 1,8$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  pročišćene vode i  $7,5 \pm 0,5$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  SNF-a. Bubrenje prašaka posljedica je hidratacije polimernih lanaca pektina i hipromeloze te je ovisno o vrsti medija za bubrenje. Uočena su bolja svojstva bubrenja mikrosfera koristeći pročišćenu vodu kao medij u odnosu na SNF koji predstavlja biorelevantan medij. Razlog tome je prisutnost kalcijevih iona u SNF-u koji uzrokuju preslagivanje pektinskih lanaca u trodimenzionalnu mrežu zbog interakcija s negativno nabijenim funkcionalnim skupinama. Prema literaturnim podacima, dodatak hipromeloze smanjuje bubrenje mikrosfera načinjenih od nabijenih polimernih lanaca u vodi. S druge strane, hipromeloza u kombinaciji s pektinom poboljšava bubrenje mikrosfera u SNF-u, budući da kalcijevi ioni nemaju utjecaj na njezino bubrenje (Pačarić, 2020; Nižić i sur., 2020).

Jurišić Dukovski i sur. (2019) pripremili su mikrosfere s uklopljenim deksametazonom temeljene na pektinu koje su pokazale izraženija svojstva bubrenja u odnosu na mikrosfere (MS) pripremljene u ovom radu. Razlog tome je manji sadržaj pektina u MS mikrosferama, ali i dodatak hipromeloze za koju je poznato da smanjuje bubrenje u vodi. Mikrosfere pripremljene u radu Bobičanec i Kobaš (2020) sadržavale su manji udio pektina, a veći hipromeloze u odnosu na MS mikrosfere što je rezultiralo slabijim bubrenjem u vodi te poboljšanim bubrenjem u SNF-u.



**Slika 9.** Bubrenje mikrosfera s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (MS) te praškastih sustava mikrosfera i inertnih nosača (GL – laktoza monohidrat GranuLac® 200, M – manitol) različitih masenih omjera u pročišćenoj vodi i umjetnom nazalnom fluidu (SNF-u). Svojstvo bubrenja izraženo je volumenom ( $V$ ) medija apsorbiranog po miligramu mikrosfera u praškastom sustavu tijekom 15 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n=2$ ).

Dodatak topljivih i osmotski aktivnih tvari u praškasti sustav za nazalnu primjenu pospješuje moćenje mikrosfera. To pridonosi otapanju i poboljšanoj raspoloživosti djelatne tvari na mjestu djelovanja. Učinak inertnih nosača na mukoadhezivnost mikrosfera koje sadrže pektin trebao bi biti umjeren obzirom na umrežavanje pektinskih lanaca kalcijevim ionima iz SNF-a (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Za praškaste sustave pripravljene miješanjem mikrosfera s laktozom monohidratom ili manitolom u različitim omjerima zabilježeni su veći apsorbirani volumeni SNF-a i pročišćene vode u odnosu na same mikrosfere. Bobičanec i Kobaš (2020) došle su do sličnih zapažanja ispitujući utjecaj različitih nosača. Količina apsorbiranog medija u receptorskom odjeljku po miligramu mikrosfera rasla je s porastom masenog udjela inertnog nosača u praškastom sustavu. Povećanje volumena apsorbiranog medija može se objasniti pojavom osmotskog tlaka zbog otapanja nosača koji uzrokuje difuziju medija kroz polupropusnu membranu iz receptorskog u donorski odjeljak. Nazalnom primjenom formulacija koje sadrže laktozu uočeno je povećanje volumena sluzi uzrokovano difuzijom vode iz epitelnih stanica nosa (Tanaka i sur., 2017). Količina apsorbiranog medija (pročišćene vode i SNF-a) pri ispitivanju praškastih sustava s laktozom bila je veća u usporedbi s onom pri ispitivanju odgovarajućih praškastih sustava s manitolom. Kako bi se procijenio značaj dobivenih vrijednosti, potrebno je provesti *in vivo* ispitivanja na animalnim modelima koji omogućuju mjerenje mukocilijarnog klirensa formulacija s mjesta primjene u ovisnosti o njihovom sastavu.

## 5. Zaključci

- Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom uspješno su pripravljene procesom sušenja raspršivanjem.
- Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem iznosilo je  $65,7 \pm 8,7$  %, a uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere  $94,4 \pm 0,4$  %.
- Praškasti sustavi mikrosfera i inertnog nosača (laktoze monohidrata i manitola) pripremljeni su miješanjem u omjerima 1:1, 1:2, 1:4, 1:7, 1:9 (*m/m*) pritom zadovoljavajući kriterije homogenosti.
- Praškasti sustavi mikrosfera i inertnog nosača u masenom omjeru 1:1 i 1:9 boljih su reoloških svojstava u odnosu na same mikrosfere.
- Svojstvo bubrenja mikrosfera u umjetnom nosnom fluidu (SNF) bilo je umjerenije u odnosu na bubrenje u pročišćenoj vodi. Dodatak inertnih nosača u sustav povećao je volumen apsorbiranog medija u donorskom odjeljku po miligramu mikrosfera, proporcionalno udjelu nosača.
- Provedenom karakterizacijom praškastih sustava utvrđena je prikladnost laktoze monohidrata i manitola kao nosača mikrosfera za nazalnu primjenu. Sustavi masenog omjera mikrosfera i inertnog nosača od 1:9 pokazali su se najprikladnijima za dodatna *in vitro* te *in vivo* ispitivanja.

## 6. Literatura

Al-Hashemi HMB, Al-Amoudi OSB. A review on the angle of repose of granular materials. *Powder Technology*, 2018, 330, 397 – 417

Aulton ME. Powder flow. U: Aulton's *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, Fourth edition, Aulton ME, Taylor KMG (ur.), Edinburgh, Elsevier, 2013, 187 – 200

Bai S, Gupta V, Ahsan F. Inhalable Lactose-Based Dry Powder Formulations of Low Molecular Weight Heparin. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 2010, 23, 97 – 104

Bobičanec S, Kobaš M. Mikrosfere s deksametazonom u praškastom inertnom nosaču: karakterizacija farmaceutskog oblika i depozicija u silikonskom modelu nosne šupljine, rad za dodjelu rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu, 2020

Boschini F, Delaval V, Traina K, Vandewalle N, Lumay G. Linking flowability and granulometry of lactose powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 494, 312-320

Council of Europe. Powder flow. In *European Pharmacopoeia 8.0.*, Strasbourg: Council of Europe, 2013, 346 – 349

De Ascentiis A, Bettini R, Caponetti G, Catellani PL, Peracchia MT, Santi P, Colombo P. Delivery of nasal powders of beta-cyclodextrin by insufflation. *Pharmaceutical Research*, 1996, 13, 734 – 738

Desai PM, Acharya S, Armstrong C, Wu EL, Zaidi SAM. Underpinning mechanistic understanding of the segregation phenomena of pharmaceutical blends using a near-infrared (NIR) spectrometer embedded segregation tester. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 154

Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19, 2021, <https://www.nejm.org>, pristupljeno: 27.3.2021.

Dexamethasone sodium phosphate, <https://go.drugbank.com/>, pristupljeno: 27.3.2021.

Discontinuation report RHINOCORT TURBUHALER 100 MCG/DOSE, 2020, <https://www.drugshortagescanada.ca/discontinuance/95737>, pristupljeno: 25.3.2021.

Filipović-Grčić J, Hafner A. Nasal powder drug delivery. U: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Gad SC (ur.), New Jersey, John Wiley & Sons, 2008, 651 – 681

Florian-Algarin M, Mendez R. Effect of material properties and design parameters on the final blend uniformity using experimental and simulation results. *Powder Technology*, 2015, 276, 156 – 165

Franz Cell – The Original, <https://permeagear.com/franz-cells/>, pristupljeno: 10.2.2021.

Goh HP, Heng PWS, Liew CV. Comparative evaluation of powder flow parameters with reference to particle size and shape. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 547, 133 – 141

Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products, 2006, <https://www.ema.europa.eu/en/pharmaceutical-quality-inhalation-nasal-products>, pristupljeno: 20. 3.2021.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović-Grčić J. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2014, 70, 303 – 321

Hertel N, Birk G, Scherließ R. Particle engineered mannitol for carrier-based inhalation - A serious alternative? *International Journal of Pharmaceutics*, 2020a, 577

Hertel N, Birk G, Scherließ R. Performance tuning of particle engineered mannitol in dry powder inhalation formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020b, 586

Hirschberg C, Sun CC, Risbo J, Rantanen J. Effects of Water on Powder Flowability of Diverse Powders Assessed by Complimentary Techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 108, 2613 – 2620

Jüptner A, Scherließ R. Spray Dried Formulations for Inhalation – Meaningful Characterisation of Powder Properties. *Pharmaceutics*, 2019, 12

Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying technology*, 2019, 37

Kaialy W, Momin MN, Ticehurst MD, Murphy J, Nokhodchi A. Engineered mannitol as an alternative carrier to enhance deep lung penetration of salbutamol sulphate from dry powder inhaler. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 79, 345 – 356

Kaialy W, Ticehurst M, Nokhodchi A. Dry powder inhalers: Mechanistic evaluation of lactose formulations containing salbutamol sulphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012a, 423, 184 – 194

Kaialy W, Alhalaweh A, Velaga SP, Nokhodchi A. Influence of lactose carrier particle size on the aerosol performance of budesonide from a dry powder inhaler. *Powder Technology*, 2012b, 227, 74-85

Kaleem MA, Alam MZ, Khan M, Jaffery SHI, Rashid B. An experimental investigation on accuracy of Hausner Ratio and Carr Index of powders in additive manufacturing processes. *Metal Powder Report*, 2020

Karatzanis A, Chatzidakis, Milioni A, Vlaminck S, Kawauchi H, Velegrakis S, Prokopakis E. Contemporary Use of Corticosteroids in Rhinology. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2017, 17

Karumanchi V, Taylor MK, Ely KJ, Stagner WC. Monitoring Powder Blend Homogeneity Using Light-Induced Fluorescence. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12, 1031 – 1037

Launch of "Erizas® Capsule for Nasal spray 400µg" for the treatment of allergic rhinitis, a first once daily dry powder type steroid nasal spray in Japan, 2009, [https://www.nippon-shinyaku.co.jp/english/company\\_profile](https://www.nippon-shinyaku.co.jp/english/company_profile), pristupljeno: 25.3.2021.

Le VNP, Bierend H, Robins E, Steckel H, Flament MP. Influence of the lactose grade within dry powder formulations of fluticasone propionate and terbutaline sulphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 422, 75 – 82

Lee HJ, Lee HG, Kwon YB, Kim JY, Rhee YS, Chon J, Park ES, Kim DW, Park CW. The role of lactose carrier on the powder behavior and aerodynamic performance of bosentan microparticles for dry powder inhalation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 117, 279 – 289

Lechanteur A, Evrard B. Influence of Composition and Spray-Drying Process Parameters on Carrier-Free DPI Properties and Behaviors in the Lung: A review. *Pharmaceutics*, 2020, 12

Nižić L, Potas J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 141

Onzentra Xsail® sumatriptan nasal powder, 2019, <https://www.onzetra.com/>, pristupljeno: 25.3.2021.

Pačarić M. Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi za nazalnu primjenu natrijevog deksametazon fosfata, diplomski rad predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, 2020

Pilcer G, Wauthoz N, Amighi K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 233 – 256

Pozzoli M, Rogueda P, Zhu B, Smith T, Young PM, Traini D, Sonvico F. Dry Powder Nasal Drug Delivery: Challenges, Opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort® device and formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2016, 42, 1660 – 1668

Product monograph, Rhinocort Turbuhaler®, 2018, [https://pdf.hres.ca/dpd\\_pm/00045951.PDF](https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00045951.PDF), pristupljeno: 25.3.2021.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009

Russo P, Sacchetti C, Pasquali I, Bettini R, Massimo G, Colombo P, Rossi A. Primary Microparticles and Agglomerates of Morphine for Nasal Insufflation. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2006, 95, 2553-2561

Sacre PY, Lebrun P, Chavez PF, De Bleye C, Netchacovitch L, Rozet E, Klinkenberg R, Streel B, Hubert P, Ziemons E. A new criterion to assess distributional homogeneity in hyperspectral images of solid pharmaceutical dosage forms. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 818, 7 – 14.

Salama AH. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Delivery and Translational Research*, 2020, 10, 1-12

Sarkar S, Minatovicz B, Thalberg K, Chaudhuri B. Mechanistic investigation of mixing and segregation of ordered mixtures: experiments and numerical simulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, 43, 1677 - 1685



Sažetak opisa svojstava lijeka, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/baqsimi-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/baqsimi-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno: 25.3.2021.

Sažetak opisa svojstava lijeka, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pecfent-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pecfent-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno: 15.4.2021.

Sažetak opisa svojstava lijeka, <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Deksametazon-Krka-4-mg-ml-otopina-za-injekciju-infuziju>, pristupljeno: 27.3.2021.

Sažetak opisa svojstava lijeka, <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Manitol-HZTM-20-otopina-za-infuziju>, pristupljeno: 22.3.2021.

Sažetak opisa svojstava lijeka, <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Vivispray-1-mg-ml-sprej-za-nos-otopina>, pristupljeno: 15.4.2021.

Scheibelhofer O, Balak N, Wahl PR, Koller DM, Glasser BJ, Khinast JG. Monitoring Blending of Pharmaceutical Powders with Multipoint NIR Spectroscopy. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, 234 – 244

Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carrier. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2015, 223, 40-54

Tan S, Jiang T, Ebrahimi A, Langrish T. Effect of spray-drying temperature on the formation of flower-like lactose for griseofulvin loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 111, 534 – 539

Tanaka A, Furubayashi T, Enomura Y, Hori T, Shimomura R, Maeda C, Kimura S, Inoue D, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. Nasal Drug Absorption from Powder Formulations: Effect of Fluid Volume Changes on the Mucosal Surface. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2017, 40, 212-219

Tavers Cardoso MA, Talebi M, Soares PAMH, Yurteri CU, van Ommen JR. Functionalization of lactose as a biological carrier for bovine serum albumin by electrospraying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 414, 1 – 5

Tiozzo Fasiolo L, Manniello MD, Tratta e, Buttini F, Rossi A, Sonvico F, Bortolotti F, Russo P, Colombo G. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 113, 2 – 17

Tomas J, Kleinschmidt S. Improvement of Flowability of Fine Cohesive Powders by Flow Additives. *Chemical Engineering & Technology*, 2009, 32, 1470 – 1483

Travers DN, White RC. The mixing of micronized sodium bicarbonate with sucrose crystals. British Pharmaceutical Conference, 1971, 260 – 261

Trows S, Scherließ R. Carrier based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug. *Powder Technology*, 2016, 292, 223-231

Twitchell AM. Mixing. U: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, Fourth edition, Aulton ME, Taylor KMG (ur.), Edinburgh, Elsevier, 2013, 170 – 186

Venables HJ, Wells JI. Powder Mixing. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001, 27, 599 – 612

Wang H, Barona D, Oladepo S, Williams L, Hoe S, Lechuga-Ballesteros D, Vehring R. Macro-Raman spectroscopy for bulk composition and homogeneity analysis of multi-component pharmaceutical powders. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 141, 180 – 191

Wu EL, Harris WC, Babcock CM, Alexander BH, Riley CA, McCoul ED. Epistaxis Risk Associated with Intranasal Corticosteroid Sprays: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, 2019, 161, 18 – 27

Zdrojewicz Z, Zyskowska K, Wasiuk S. Lactose in drugs and lactose intolerance. *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*, 2018, 14, 261 – 266

Zhou Q, Armstrong B, Larson I, Stewart PJ, Morton DAV. Improving powder flow properties of a cohesive lactose monohydrate powder by intensive mechanical dry coating. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99, 969 – 981

## 7. Sažetak/Summary

Nazalna primjena kortikosteroida primaran je način dostave lijeka kod bolesti nosa i sinusa jer omogućava brži početak djelovanja te smanjenu sistemsku apsorpciju. Nedostaci konvencionalnih tekućih oblika doveli su do razvoja praškastih sustava za nazalnu primjenu koji omogućuju veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu primjene, bolju stabilnost formulacije te produljeno zadržavanje na mjestu primjene. Jedan od takvih sustava su polimerne mikrosfere s uklopljenom djelatnom tvari.

U ovom su radu mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine natrijevog deksametazon fosfata, pektina i hipromeloze u masenom omjeru 1:1:1. Iskorištenje procesa iznosilo je  $65,7 \pm 8,7 \%$ , a uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere  $94,4 \pm 0,4 \%$ . Praškasti sustavi mikrosfera i inertnog nosača ( $\alpha$ -laktoza monohidrat ili manitol) pripremljeni su miješanjem u omjerima 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 te 1:9 (*m/m*) uz zadovoljene kriterije homogenosti. Uočeno je poboljšanje reoloških svojstava praškastih sustava s inertnim nosačem u odnosu na same mikrosfere. Praškasti sustavi s ispitivanim inertnim nosačima usporedivih su reoloških svojstava. Svojstva bubrenja mikrosfera u umjetnom nazalnom fluidu bila su umjerenija u odnosu na pročišćenu vodu. Dodatak inertnog nosača povećao je volumen apsorbiranog medija u donorskom odjeljku po miligramu mikrosfera, proporcionalno udjelu nosača. Provedenom karakterizacijom praškastih sustava utvrđena je prikladnost laktoze monohidrata i manitola kao nosača mikrosfera za nazalnu primjenu. Sustavi masenog omjera mikrosfera i inertnog nosača od 1:9 pokazali su se najprikladnijima za dodatna *in vitro* te *in vivo* ispitivanja.

Nasal administration of corticosteroids is the primary method of drug delivery for sinonasal disease treatment since it enables a rapid onset of action and reduced systematic absorption. Disadvantages of conventional liquid formulations led to the development of powder formulations that assure higher local drug concentration, increased stability of the formulation, as well as prolonged drug retention at the nasal mucosa. One type of those systems encompasses polymer-based, drug-loaded microspheres.

In this study microspheres were prepared by spray-drying of solution containing sodium dexamethasone phosphate, pectin and hypromellose in 1:1:1 (w/w/w) ratio. Process yield was  $65.7 \pm 8.7$  %, whilst sodium dexamethasone phosphate entrapment efficiency was  $94.4 \pm 0.4$  %. Powder systems containing microspheres and inert carrier ( $\alpha$ -lactose monohydrate or mannitol) were prepared by mixing components in 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 and 1:9 (w/w) ratios, assuring the homogeneity of the mixtures. Powders containing inert carrier demonstrated improvement of rheological properties in comparison with microspheres alone. Powder systems with  $\alpha$ -lactose monohydrate had comparable rheological properties to powder systems with mannitol. Swelling properties of the microspheres in simulated nasal fluid were moderate compared to purified water. Addition of an inert carrier increased volume of absorbed medium per milligram of microspheres in the donor compartment, proportionally to the mass fraction of inert carrier. Characterisation of powder systems demonstrated suitability of lactose monohydrate and mannitol as carriers of microspheres for nasal delivery. Systems containing microspheres and inert carrier in weight ratio of 1:9 have proven to be the most suitable for additional *in vitro* and *in vivo* tests.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## ISPITIVANJE UTJECAJA LAKTOZE I MANITOLA NA SVOJSTVA PRAŠKASTOG SUSTAVA S NATRIJEVIM DEKSAMETAZON FOSFATOM ZA NAZALNU PRIMJENU

Sara Blažon

### SAŽETAK

Nazalna primjena kortikosteroida primaran je način dostave lijeka kod bolesti nosa i sinusa jer omogućava brži početak djelovanja te smanjenu sistemsku apsorpciju. Nedostaci konvencionalnih tekućih oblika doveli su do razvoja praškastih sustava za nazalnu primjenu koji omogućuju veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu primjene, bolju stabilnost formulacije te produljeno zadržavanje na mjestu primjene. Jedan od takvih sustava su polimerne mikrosfere s uklopljenom djelatnom tvari.

U ovom su radu mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine natrijevog deksametazon fosfata, pektina i hipromeloze u masenom omjeru 1:1:1. Iskorištenje procesa iznosilo je  $65,7 \pm 8,7$  %, a uspješnost uklapanja natrijevog deksametazon fosfata u mikrosfere  $94,4 \pm 0,4$  %. Praškasti sustavi mikrosfera i inertnog nosača ( $\alpha$ -laktoza monohidrat ili manitol) pripremljeni su miješanjem u omjerima 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 te 1:9 (m/m) uz zadovoljene kriterije homogenosti. Uočeno je poboljšanje reoloških svojstava praškastih sustava s inertnim nosačem u odnosu na same mikrosfere. Praškasti sustavi s ispitivanim inertnim nosačima usporedivih su reoloških svojstava. Svojstva bubrenja mikrosfera u umjetnom nazalnom fluidu bila su umjerenija u odnosu na pročišćenu vodu. Dodatak inertnog nosača povećao je volumen apsorbitanog medija u donorskom odjeljku po miligramu mikrosfera, proporcionalno udjelu nosača. Provedenom karakterizacijom praškastih sustava utvrđena je prikladnost laktoze monohidrata i manitola kao nosača mikrosfera za nazalnu primjenu. Sustavi masenog omjera mikrosfera i inertnog nosača od 1:9 pokazali su se najprikladnijima za dodatna *in vitro* te *in vivo* ispitivanja.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 9 grafičkih prikaza, 4 tablice i 63 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nazalna primjena, natrijev deksametazon fosfat, mikrosfere, pektin, hipromeloza, inertni nosači

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LACTOSE AND MANNITOL ON NASAL POWDER DELIVERY SYSTEM OF SODIUM DEXAMETHASONE PHOSPHATE

Sara Blažon

#### SUMMARY

Nasal administration of corticosteroids is the primary method of drug delivery for sinonasal disease treatment since it enables a rapid onset of action and reduced systematic absorption. Disadvantages of conventional liquid formulations led to the development of powder formulations that assure higher local drug concentration, increased stability of the formulation, as well as prolonged drug retention at the nasal mucosa. One type of those systems encompasses polymer-based, drug-loaded microspheres.

In this study microspheres were prepared by spray-drying of solution containing sodium dexamethasone phosphate, pectin and hypromellose in 1:1:1 (w/w/w) ratio. Process yield was  $65.7 \pm 8.7$  %, whilst sodium dexamethasone phosphate entrapment efficiency was  $94.4 \pm 0.4$  %. Powder systems containing microspheres and inert carrier ( $\alpha$ -lactose monohydrate or mannitol) were prepared by mixing components in 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 and 1:9 (w/w) ratios, assuring the homogeneity of the mixtures. Powders containing inert carrier demonstrated improvement of rheological properties in comparison with microspheres alone. Powder systems with  $\alpha$ -lactose monohydrate had comparable rheological properties to powder systems with mannitol. Swelling properties of the microspheres in simulated nasal fluid were moderate compared to purified water. Addition of an inert carrier increased volume of absorbed medium per milligram of microspheres in the donor compartment, proportionally to the mass fraction of inert carrier. Characterisation of powder systems demonstrated suitability of lactose monohydrate and mannitol as carriers of microspheres for nasal delivery. Systems containing microspheres and inert carrier in weight ratio of 1:9 have proven to be the most suitable for additional *in vitro* and *in vivo* tests.

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

Thesis includes: 40 pages, 9 figures, 4 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nasal delivery, sodium dexamethasone phosphate, microspheres, pectin, hypromellose, inert carrier

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.