

# Priprava i profil oslobađanja timolola uklopljenog u micle neionskih površinski aktivnih tvari

---

Ivančić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:516439>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



*Ivona Ivančić*

**Priprava i profil oslobađanja timolola  
uklopljenog u micelle neionskih površinski  
aktivnih tvari**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom  
fakultetu

Zagreb, 2016 .

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Ivana Pepića.

*Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc.Ivanu Pepiću na uloženom vremenu i trudu te nesebičnoj pomoći pri izradi diplomskog rada. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su mi olakšali izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i potpori tijekom cijelog studiranja.*

*I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima i bratu, koji su uvijek bili uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.*

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1.BIOFARMACEUTIKA .....	1
1.2.GLAVNE BIOFARMACEUTSKE ZNAČAJKE PROBLEMA TOPLJIVOSTI DJELATNIH TVARI.....	1
1.3.OTAPANJE I TOPLJIVOST .....	2
1.3.1. Noyes-Whitneyjeva jednadžba otapanja krutine djelatne tvari.....	2
1.3.2. Ispitivanje brzine otapanja ili oslobađanja djelatne tvari .....	3
1.4.ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA OTAPANJE.....	4
1.4.1.Veličina čestica .....	4
1.4.2.Temperatura .....	5
1.4.3.Tlak.....	5
1.4.4.Veličina molekule .....	5
1.4.5.Polimorfni oblici .....	5
1.5.KLASIFIKACIJA DJELATNIH TVARI PREMA TOPLJIVOSTI I PERMEABILNOSTI.....	6
1.5.1Biofarmaceutska klasifikacija djelatnih tvari .....	6
1.5.2.Razvojno-formulacijska klasifikacija djelatnih tvari .....	7
1.6.TEHNIKE POBOLJŠANJA TOPLJIVOSTI TEŠKO TOPLJIVIH DJELATNIH TVARI .....	8
1.6.1.Prilagodba pH.....	8
1.6.2.Izrada samoemulgirajućih terapijskih sustava.....	9
1.6.3.Smanjenje veličine čestica .....	10
1.6.4.Uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse .....	10
1.6.5.Primjena suotapala .....	11
1.7. HIDROTROPNI UČINAK .....	12
1.8.MICELARNA SOLUBILIZACIJA .....	13
1.8.1.Miješane micelle.....	14
1.8.2.Polimerne micelle.....	14
1.9.METODE FIZIČKOG UKAPANJA DJELATNE TVARI.....	16
1.9.1.Solubilizacijski kapacitet.....	18
1.10.STABILNOST I OSLOBAĐANJE DJELATNE TVARI.....	20
1.10.1.Termodinamička stabilnost .....	21
1.10.2.Kinetička stabilnost .....	21
1.10.3 Oslobađanje lijeka iz kopolimernih micela .....	22
<b>2.OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>25</b>
<b>3.MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1.MATERIJALI .....	26

3.2.METODE .....	27
3.2.1.Priprava Krebs-Ringerovog pufera .....	27
3.2.2.Priprava ishodnih otopina solubilizatora283.2.3.Ispitivanje oslobađanja timolola in vitro .....	28
3.2.4.Određivanje sadržaja oslobođenog timolola .....	28
3.2.4.Određivanje veličine i disperznosti micela .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1. OSLOBAĐANJE TIMOLOLA U KREBS-RINGEROVOM PUFERU .....	31
4.2.VELIČINA MICELA PLURONICA F68 S UKLOPLJENIM TIMOLOLOM.....	31
4.3.VELIČINA MICELA TILOKSAPOLA S UKLOPLJENIM TIMOLOLOM .....	33
4.4.OSLOBAĐANJE TIMOLOLA U KREBS-RINGER PUFERU UZ DODATAK PLURONICA F68.....	34
4.5.OSLOBAĐANJE TIMOLOLA U KREBS-RINGER PUFERU UZ DODATAK TILOKSAPOLA .....	35
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>42</b>

# 1.UVOD

## 1.1. BIOFARMACEUTIKA

Biofarmaceutika je znanstvena disciplina koja se bavi utjecajem *in vitro* fizičko-kemijskih svojstava djelatne tvari i farmaceutskog oblika na njihovu primjenu u organizam pri normalnim ili patološkim uvjetima. Glavni je interes biofarmaceutskih razmatranja bioraspoloživost djelatnih tvari. Bioraspoloživost se odnosi na brzinu i obim raspoloživosti onog dijela primijenjene doze djelatne tvari koja će biti na raspolaganju organizmu na određenom mjestu biološkog učinka. Cilj je biofarmaceutike prilagoditi primjenu djelatne tvari u obliku farmaceutskog pripravka u smislu optimalne terapijske učinkovitosti i sigurnosti za bolesnika. Biofarmaceutska ispitivanja omogućuju racionalno oblikovanje i razvoj farmaceutskih oblika na osnovu: (i) fizičkih i kemijskih svojstava djelatne tvari, (ii) načina primjene, uključujući anatomske i fiziološke značajke mjesta primjene (npr. oralni, lokalni, transdermalni), (iii) zahtijevanog farmakodinamičkog učinka (npr. trenutni ili produljeni), (iv) toksikoloških svojstava djelatne tvari, (v) sigurnosnog profila korištenih pomoćnih tvari, (vi) učinka pomoćnih tvari i farmaceutskog oblika (tehnoloških parametara) na primjenu djelatne tvari (Jalšenjak i sur., 1998).

## 1.2. GLAVNE BIOFARMACEUTSKE ZNAČAJKE TOPLJIVOSTI DJELATNIH TVARI

Otapanje teško topljivih djelatnih tvari predstavlja relativno veliki izazov u nekliničkim fazama ispitivanja novih djelatnih tvari i pri razvoju njihovih farmaceutskih oblika. Pretpostavlja se da je oko 40% novih djelatnih tvari koje su razvijene u istraživačkim laboratorijima farmaceutske industrije teško topljive. Iako su farmaceutske tvrtke za određene djelatne tvari uspjele prevladati probleme povezane s topljivošću, djelatne tvari s topljivošću manjom od 0,1 mg/ml i dalje predstavljaju jedinstvene izazove pri razvoju formulacije. Takve djelatne tvari najčešće se sporo apsorbiraju, imaju neprimjerenu i promjenjivu bioraspoloživost, a opaženi su i različiti toksični učinci na barijerama preko kojih se odvija njihova apsorpcija. Samo se otopljena djelatna tvar može apsorbirati preko apsorpcijskih barijera i doći do mjesta svog farmakološkog učinka. Oralno primijenjene djelatne tvari

apsorbiraju se samo nakon potpunog otapanja u tekućinama gastrointestinalnog sustava, a što je jedan od preduvjeta njihove dobre bioraspoloživosti. Bioraspoloživost djelatnih tvari ovisi o brojnim čimbenicima, primjerice topljivosti djelatne tvari u vodenoj sredini i njezinoj permeabilnosti preko apsorpcijskih barijera. Brzinu ukupnog procesa apsorpcije kontrolira najsporiji proces u nizu (ograničavajući proces): (i) brzina otapanja/oslobađanja slabo topljivih djelatnih tvari najsporiji je proces u nizu koji kontrolira brzinu ukupnog procesa, odnosno njihovu bioraspoloživost ili (ii) brzina permeacije dobro topljive djelatne tvari kroz apsorpcijsku barijeru proces je koji kontrolira ukupnu brzinu apsorpcije, odnosno njezinu bioraspoloživost. (Chen i sur., 2011).

### 1.3. OTAPANJE I TOPLJIVOST

Pojam topljivosti je definiran kvantitativnim i kvalitativnim značajkama djelatne tvari. Kvantitativne značajke djelatne tvari odnose se na maksimalnu količinu djelatne tvari koju je moguće otopiti u određenom volumenu otapala pri konstantnim uvjetima temperature. Kvalitativne značajke topljivosti djelatne tvari definirane su međudjelovanjima dvije ili više tvari koje oblikuju homogenu molekulska disperziju određenog farmaceutskog oblika. Zasićena otopina definirana je ravnotežnom topljivošću djelatne tvari u određenom otapalu, a najčešće se izražava postotnim udjelima, masenom ili množinskom koncentracijom djelatne tvari. Proces otapanja uključuje narušavanje intermolekulskih ili interionskih veza tvari koja se otapa, narušavanje strukture otapala s ciljem osiguravanja prostora za tvar koja se otapa, međudjelovanja molekula otapala s ionima ili molekulama tvari koja se otapa.

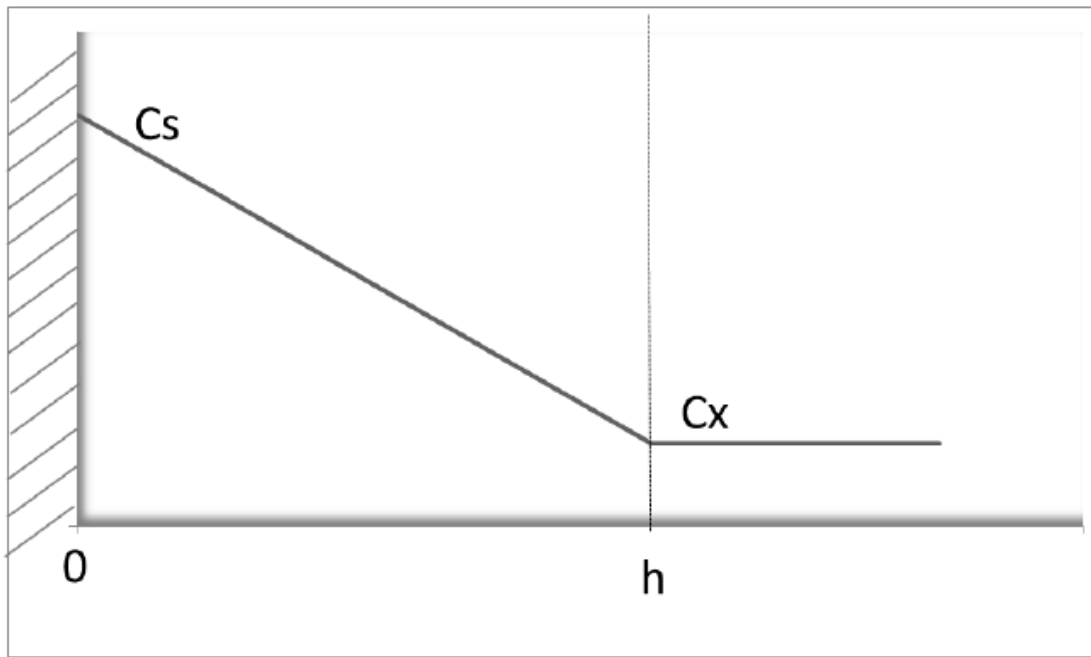
#### 1.3.1. Noyes-Whitneyjeva jednadžba otapanja krutine djelatne tvari

Brzina otapanja krutina u otapalu  $dc_x/dt$  može se opisati Noyes-Whitneyjevom jednadžbom:

$$\frac{dc_x}{dt} = k \times A \times (c_s - c_x)$$

gdje je  $k$  konstanta brzine otapanja (tzv. intrinzička konstanta koja uključuje viskoznost otopine; što je veća viskoznost manja je brzina otapanja),  $A$  specifična površina krutine koja se otapa,  $c_s$  topljivost krutine, a  $c_x$  koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu  $t$ . Iz Noyes-Whitneyjeve jednadžbe moguće je opaziti da se na otapanje može utjecati fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari, tehnološkim parametrima i otapalom. Djelatna tvar se na

mjestu apsorpcije (primjerice lumenu gastrointestinalnog sustava, površini oka) otapa u vodenoj sredini. Na brzinu otapanja djelatne tvari utječe temperatura sredstva za otapanje i brzina njegovog miješanja. Uvjeti *in vivo* osiguravaju stalnu temperaturu (najčešće 37°C, iako je u posebnim slučajevima temperatura mjesta apsorpcije nešto smanjena; npr. temperatura površine oka je 34°C) uz osigurano miješanje (primjerice peristaltika gastrointestinalnog sustava). Ispitivanja kinetike otapanja *in vitro* zahtijevaju održavanje stalne temperature i miješanja. Takva se ispitivanja najčešće provode pri 37°C, a brzina miješanja održava se pri određenom broju okretaja po jedinici vremena (npr. okretaji/minuti); s povećanjem temperature povećava se kinetička energija molekula u sustavu, što rezultira povećanjem koeficijenta brzine difuzije djelatne tvari; povećanjem miješanja sredstva za otapanje, smanjuje se debljina stacionarnog sloja, a brzina se otapanja djelatne tvari povećava (Jalšenjak i sur., 1998).



**Slika 1.** Model difuzijskog sloja pri otapanju krutina (prilagođeno prema Jalšenjak i sur., 1998)

### 1.3.2. Ispitivanje brzine otapanja ili oslobađanja djelatne tvari

Brzina otapanja je mjera koja govori koliko se tvar brzo otapa u otapalu, a na nju utječu različiti čimbenici: veličina čestica (raspadanjem tvari na manje dijelove povećava se njezina površina; tvar se brže otapa jer se proces otapanja odvija na površini čestica), temperatura (za čestice čvrste tvari povećanje temperature sustava uzrokuje povećanje količine otopljene tvari,



ali i povećanje brzine otapanja), količina prethodno otopljene tvari u otopini (pri niskim koncentracijama prethodno otopljene tvari u otopini brzina otapanja je relativno velika, dok se s povećanjem koncentracije prethodno otopljene tvari u otopini brzina otapanja smanjuje kako se koncentracija tvari približava ravnotežnoj topljivosti), miješanje u sustavu (miješanjem se osigurava novi udjel otapala koji će biti u kontaktu s tvari koja se otapa pa se na taj način povećava brzina otapanja).

Metode ispitivanja otapanja i oslobađanja djelatne tvari *in vitro* važne su u razvoju i kontroli kakvoće pripravka. U smislu kontrole kakvoće najčešće se primjenjuju za: (i) ispitivanje ujednačenosti oslobađanja djelatne tvari između pojedinih proizvodnih šarži, (ii) ispitivanje stabilnosti pripravka, (iii) prilagođavanje laboratorijskog postupka izrade industrijskom mjerilu (eng. scale-up), (iv) predviđanje učinka *in vivo* lijeka.

Ispitivanja otapanja/oslobađanja djelatne tvari *in vitro* često su vrijedan alat pri razvoju farmaceutsko-tehnološkog oblika lijeka. Korištenjem primjerene metode ispitivanja oslobađanja *in vitro* moguće je prepoznati nedostatke pri oblikovanju farmaceutskog oblika lijeka koji će rezultirati problemima bioraspodjelivosti. Dobro postavljena metoda treba odražavati promjene u farmaceutskom obliku, postupku proizvodnje, fizičkim i kemijskim svojstvima djelatne tvari (npr. veličina čestica, specifična površina, polimorfni oblici) (Jalšenjak i sur., 1998).

## 1.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA OTAPANJE

### 1.4.1. Veličina čestica

Veličina čestica tvari koja se otapa utječe značajno na njezinu topljivost jer što su čestice manje to je veći omjer površine prema volumenu čestica. Povećanjem površine čestica osiguravaju se bolja međudjelovanja s otapalom. Ostwald-Freundlichova jednačba opisuje odnos između topljivosti krute tvari i njezine veličine čestica:

$$\log \frac{c_s}{c_x} = \frac{2 \times \sigma \times V}{2,303 \times R \times T \times \rho \times r}$$

gdje je  $c_s$  topljivost krutine,  $c_x$  koncentracija otopine u vremenu  $t$ ,  $\sigma$  površinska napetost na graničnoj površini čvrsto/tekuće,  $V$  molarni volumen čestica krutine,  $R$  opća plinska konstanta,  $T$  termodinamička temperatura,  $\rho$  gustoća krutine,  $r$  polumjer čestica krutine. Iz Ostwald-Freundlichove jednačbe je jasno da se smanjenjem veličine čestica krutine ( $r$ )

povećava njezina topljivost ( $c_s$ ). Pored ovisnosti o veličini čestica krutine, topljivost tvari također se mijenja ovisno o strukturi kristalne rešetke tvari, odnosno energiji kristalne rešetke. Topljevost se kristalnih polimorfa povećava s povećanjem energije kristalne rešetke i smanjenjem njihovog tališta. Istodobno, tvari u amorfnom stanju karakterizirane su boljom topljivošću u odnosu na tvari u kristaliničnom stanju jer je slobodna energija kristalnog oblika uvijek manja od slobodne energije amornog oblika (Gao i sur., 2008).

#### *1.4.2. Temperatura*

S povećanjem temperature povećava se topljivost tvari jer se povećava količina energije koja je apsorbirana u sustav, a u slučaju endoternog procesa otapanja. Međutim, u slučaju kada otapanje tvari rezultira oslobađanjem energije u sustavu (egzotermni proces) topljivost se smanjuje s povećanjem temperature. Primjerice topljivost plinova se smanjuje s povećanjem temperature u otopini (Jalšenjak i sur., 1998).

#### *1.4.3. Tlak*

Za čvrste tvari promjene tlaka u sustavu u pravilu ne utječu na topljivost. Za tvari u plinovitom agregatnom stanju povećanje tlaka uzrokuje povećanje topljivosti (Jalšenjak i sur., 1998).

#### *1.4.4. Veličina molekule*

Topljevost tvari smanjuje se s povećanjem molekulske mase i veličine molekule tvari koja se otapa jer se velike molekule teže okružuju molekulama otapala pri otapanju. U slučajevima organskih tvari s povećanim udjelom razgranatih ugljikovodičnih lanaca smanjuje se veličina (ili volumen) molekule što osigurava učinkovitije oblaganje molekula otapalom (Jalšenjak i sur., 1998).

#### *1.4.5. Polimorfni oblici*

Polimorfi imaju istu kemijsku strukturu, ali različita fizička svojstva (npr. topljivost, gustoću, čvrstoću, svojstva kompresibilnosti). Određeni polimorfni oblici djelatne tvari manje su topljivosti od njihovog amornog oblika, što rezultira njihovom nepotpunom apsorpcijom. Kristalni oblik najniže slobodne energije je najstabilniji polimorfni oblik. Neki su polimorfi metastabilni i s vremenom prelaze u stabilnije oblike.

Amorfni oblik je nekristalinični oblik djelatne tvari. Amorfni oblik (nekristalinični) djelatne tvari općenito se brže otapa u usporedbi s istom djelatnom tvari uređenom u bolje strukturirani rigidni kristalni oblik.

Solvati su oblici djelatne tvari koji sadrže otapalo (solvati) ili vodu (hidrati). Desolvatirani solvati oblici su djelatne tvari pripremljeni uklanjanjem otapala iz solvata. Pri izradi neke djelatne tvari međudjeluju s otapalom pri čemu se stvaraju kristali, solvati ili hidrati. (Jalšenjak i sur., 1998).

## 1.5. KLASIFIKACIJA DJELATNIH TVARI PREMA TOPLJIVOSTI I PERMEABILNOSTI

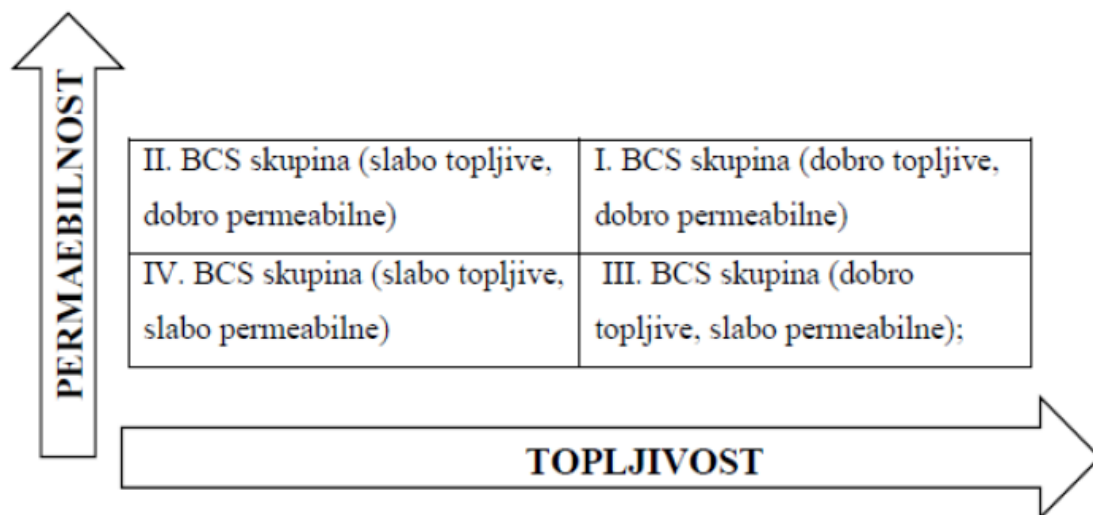
### 1.5.1. Biofarmaceutska klasifikacija djelatnih tvari

Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari (eng. Biopharmaceutics Classification System; BCS) je znanstveni okvir klasifikacije djelatnih tvari na osnovu njihove topljivosti i intestinalne permeabilnosti. BCS uzima u obzir tri glavne značajke djelatne tvari: topljivost, intestinalnu permeabilnost i brzinu otapanja. Djelatne tvari I. BCS skupine su dobro topljive i dobro permeabilne. Takve djelatne tvari brzo se i kvantitativno otapaju i apsorbiraju preko barijera gastrointestinalnog sustava. Djelatne tvari II. BCS skupine dobro permeiraju preko relevantnih fizioloških barijera gastrointestinalnog sustava, ali imaju slabu topljivost u tekućinama gastrointestinalnog sustava. Djelatne tvari III. BCS skupine su dobro topljive ali loše permeabilne preko barijera gastrointestinalnog trakta pa za njih postoji opasnost od izlučivanja iz organizma a bez apsorpcije i farmakološkog učinka. Djelatne tvari IV. BCS skupine predstavljaju najveći problem pri razvoju formulacija jer su slabo topljive i slabo permeabilne.

Od 1995. kada je BCS objavljen učinjena su značajna poboljšanja u ranim fazama razvoja farmaceutskog oblika lijeka. BCS je prihvaćen od strane regulatornih tijela (Europske agencije za lijekove - EMA; Američke agencije za hranu i lijekove - FDA; Svjetske zdravstvene organizacije - WHO) u postavljanju bioekvivalencijskih standarda za odobravanje oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari. Bioekvivalenciju većine odobrenih oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari moguće je pouzdano procijeniti relativno jednostavnim *in vitro* ispitivanjima, naspram dugotrajnih i skupih kliničkih ispitivanja. WHO je proširila navedenu primjenu na određene djelatne tvari II. BCS

skupine, dok WHO i EMA odobravaju BCS primjenu za neke djelatne tvari III. BCS skupine (Lobenberg i Amidon, 2000).

BCS je moguće u gruboj procjeni koristiti i pri razvoju farmaceutskih oblika za različite ne-parenteralne putove primjene djelatne tvari, a pri tome uvažavajući specifičnosti svakog pojedinačnog puta primjene (Loch i sur., 2012).



**Slika 2.** BCS klasifikacija djelatnih tvari (prilagođeno prema Dahan i sur., 2009)

### 1.5.2. Razvojno-formulacijska klasifikacija djelatnih tvari

Korištenje BCS klasifikacije u razvoju farmaceutskog oblika djelatne tvari ponekad previše pojednostavljuje složenu prirodu biofarmaceutskih svojstava djelatne tvari i nedovoljno uzima u obzir specifične biorelevantne uvjete na mjestu apsorpcije. Slabo topljive djelatne tvari ponekad imaju toliko nisku topljivost da je brzina njihovog otapanja, čak i s površine vrlo malih nanokristala (< 100 nm), izrazito spora. U tom slučaju nije moguće postići dovoljno visoku koncentraciju djelatne tvari na mjestu apsorpcije niti zadovoljavajuću apsorpciju, a dodatni čimbenici (npr. efluksni transporteri i/ili metabolički enzimi na mjestu apsorpcije) dodatno smanjuju apsorpciju. Zbog toga je razvijen novi sustav koji djelatne tvari klasificira u nešto drugačije kategorije, ovisno o tome je li bioraspoloživost djelatne tvari ograničena brzinom otapanja, topljivošću ili permeabilnošću. Takva se klasifikacija naziva razvojno-formulacijska klasifikacija (eng. Developability Classification System; DCS). Takvom klasifikacijom su djelatne tvari unutar II. BCS skupine razvrstane na one čija je bioraspoloživost ograničena brzinom otapanja (DCS IIa) i one čija je bioraspoloživost ograničena topljivošću (DCS IIb). Bioraspoloživost djelatnih tvari IIb. DCS skupine moguće

je povećati tehnikama povećanja topljivosti, najčešće solubilizacijom, ciklodekstrinskom kompleksacijom ili prilagodbom kristalnog oblika djelatne tvari. Za djelatne tvari IIa. DCS skupine bioraspoloživost je u izravnoj korelaciji s brzinom otapanja *in vivo*. Frakcija primijenjene doze koja se otopi na mjestu apsorpcije vrlo se brzo apsorbira pa je bioraspoloživost takvih djelatnih tvari moguće poboljšati farmaceutsko-tehnološkim tehnikama povećanja brzine otapanja, odnosno prilagodbom kristalnog oblika djelatne tvari (primjerice, korištenjem tehnike sušenja raspršivanjem ili ekstruzije taljenjem) i/ili obradom djelatne tvari korištenjem tehnologije nanokristala (Butler i Dressman, 2010).

## 1.6. TEHNIKE POBOLJŠANJA TOPLJIVOSTI TEŠKO TOPLJIVIH DJELATNIH TVARI

Brojne se tehnike mogu primijeniti s ciljem poboljšanja topljivosti teško topljivih tvari: prilagodba kristalnog oblika djelatne tvari (priprava topljivijih kristalnih polimorfa, kristalnih soli ili kokristala), prilagodba pH oblika, izrada farmaceutskih oblika trenutnog oslobađanja djelatne tvari uz dodatak solubilizatora, izrada farmaceutskih oblika koji se osnivaju na lipidima (npr. samoemulgirajući sustavi, meke kapsule s uljnom otopinom ili suspenzijom djelatne tvari), prevođenje djelatne tvari u amorfno stanje, uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse, uklapanje djelatne tvari u micelarne agregate (micelarna solubilizacija), smanjenje veličine čestica djelatne tvari postupcima mikronizacije ili nanonizacije (Chen i sur., 2011).

### 1.6.1. Prilagodba pH

Ovisnost topljivosti djelatne tvari o različitim fiziološkim pH vrijednostima predstavlja pH profil topljivosti djelatne tvari. Primjerice, pri oblikovanju oralnih doznih oblika, u obzir je potrebno uzeti promjene pH duž gastrointestinalnog trakta, od kiselih pH vrijednosti u želucu do blago alkalnih u tankom crijevu. Djelatne tvari baznih svojstava topljivije su u kiseloj sredini jer stvaraju topljive soli. Djelatne tvari kiselih svojstava topljivije su u crijevima jer stvaraju topljive soli u alkalnoj sredini. Profil topljivosti ovisan o pH daje grubu procjenu o obimu otapanja djelatne tvari na mjestu apsorpcije.

Topljivost djelatnih tvari se može poboljšati dodatkom kiselih ili bazičnih pomoćnih tvari. Pomoćne tvari koje povećavaju pH doznog oblika do raspona pH vrijednosti većih od  $pK_a$  vrijednosti djelatnih tvari koje su slabe kiseline povećavaju njihovu topljivost. Acidificirajuće pomoćne tvari povećavaju topljivost djelatnih tvari koje su slabe baze. Opisani pristup moguće je primijeniti i na kristalinične i lipofilne teško topljive tvari. Bioraspoloživost otopljenih djelatnih tvari ovisi o značajkama njihovog taloženja nakon primjene. Bioraspoloživost je moguće povećati u slučajevima kada se djelatna tvar taloži pri razrjeđenju u obliku finih ili amorfnih čestica, a što povećava površinu s koje se odvija otapanje i koncentracijski gradijent preko apsorpcijske barijere. U slučajevima kada se djelatna tvar taloži u obliku čestica koje se sporo otapaju nije moguće u zadovoljavajućem obimu povećati njihovu bioraspoloživost.

Prilagodba pH farmaceutskog oblika često se kombinira s korištenjem suotapala a s ciljem daljeg povećanja topljivosti teško topljive djelatne tvari. Glavni nedostatak opisanog pristupa je ponovno taloženje djelatne tvari u uvjetima razrjeđenja s vodenim sustavima pH vrijednosti pri kojima je tvar teško topljiva (Jalšenjak i sur., 1998).

### *1.6.2. Izrada samoemulgirajućih terapijskih sustava*

Mikroemulzije su optički bistri, izotropni i termodinamski stabilni providni ili poluprovodni sustavi koji sadrže smjesu ulja, površinski aktivnih tvari i otapala u kojoj je djelatna tvar otopljena. U kontaktu s vodom takvi se oblici spontano dispergiraju ili samoemulgiraju pri čemu se stvara bistra mikroemulzija malog raspona veličina disperzne hidrofobne faze koja sadrži otopljenu teško topljivu djelatnu tvar. Tehnologija mikroemulzija korištena je za povećanje topljivosti brojnih djelatnih tvari uključujući i uklapanje proteinskih djelatnih tvari za oralnu, parenteralnu i transdermalnu primjenu. Takvi su homogeni disperzni sustavi tekućine relativno niske viskoznosti koje je moguće izraditi u širokom rasponu koncentracija i udjela površinski aktivnih tvari te sastava uljne faze. Površinski aktivne tvari i njihove smjese te kosurfaktanti u mikroemulzijskim sustavima imaju važnu ulogu u poboljšanju topljivosti teško topljivih djelatnih tvari. Sustavi izrađeni bez dodatka vode (tzv koncentрати) na mjestu primjene (*in situ*) pri kontaktu s vodom oblikuju mikroemulzijski sustav, a nazivaju se samoemulgirajući nano-, mikro- ili (makro-)emulzijski terapijski sustavi. Miješanje potrebno za oblikovanje takvih sustava na mjestu primjene osigurano je peristaltikom gastrointestinalnog sustava. U izradi samoemulgirajućih terapijskih sustava najčešće se koriste sljedeće površinski aktivne tvari: Brij 35, Span 80, alkiltrimetilamonijev bromid,

natrijev laurilsulfat, fosfatidilkolin. S obzirom da se većina samoemulgirajućih terapijskih sustava u današnje vrijeme izrađuje u tekućem obliku najčešće se oblikuju u meke ili tvrde želatinske kapsule. Primjereno otapanje teško topljivih djelatnih tvari korištenjem ovakvih sustava moguće je postići samo u slučaju kada je tvar primjereno topljiva u smjesi ulja i površinski aktivne tvari (Cherniakov i sur., 2015; Singh i sur., 2014).

### *1.6.3.Smanjenje veličine čestica*

Bioraspoloživost teško topljivih djelatnih tvari najčešće je povezana s njihovom intrinzičnom topljivošću i veličinom čestica. Smanjenjem veličine čestica povećava se površina s koje se odvija otapanje, a što poboljšava i ubrzava otapanje teško topljive djelatne tvari. Povećanje površine s koje se odvija otapanje rezultira boljim međudjelovanjima djelatne tvari s otapalom, a što u konačnici poboljšava svojstva otapanja takve djelatne tvari (Chen i sur., 2011).

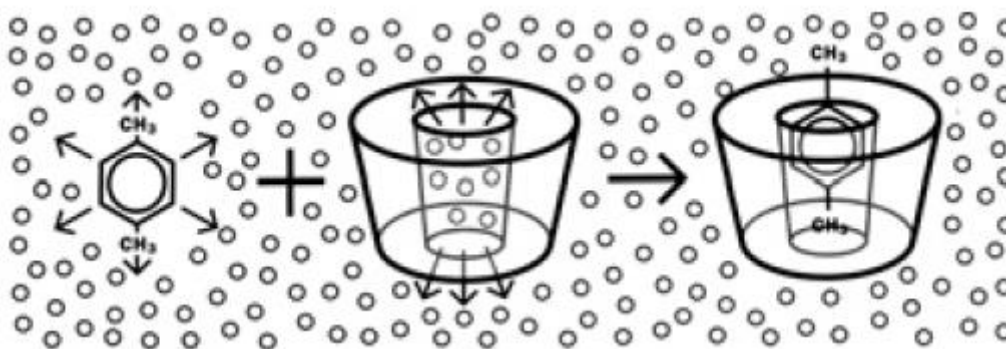
Mikronizacija je postupak koji se rutinski primjenjuje u farmaceutskoj industriji i kojim se veličina čestica djelatne tvari smanjuje do raspona veličina 1-50  $\mu\text{m}$ , korištenjem mlinova s čekićima te kugličnih ili mlaznih mlinova. Postupkom mikronizacije u određenoj se mjeri povećava brzina otapanja teško topljive djelatne tvari, ali je učinak na njezinu bioraspoloživost često ograničen.

Suvremena tehnika smanjenja veličine čestica djelatne tvari do nanometarskog raspona dimenzija je nanonizacija. Postupkom nanonizacije je moguće veličinu čestica teško topljive djelatne tvari smanjiti do nanometarskog raspona dimenzija ( $< 1000 \text{ nm}$ ), a tako obrađene djelatne tvari nazivamo nanokristalima djelatne tvari ili amorfnim nanočesticama djelatne tvari (Junghann i Muller, 2008; Muller i sur., 2011; Shegokar i Muller, 2010; Sinha i sur., 2013).

### *1.6.4.Uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse*

Kompleksi s ciklodekstrinima nastaju u vodenim sustavima i u čvrstom stanju. U vodenoj otopini, ciklodekstrini formiraju inkluzijske komplekse s mnogim djelatnim tvarima, pri čemu molekule vode smještene u centralnoj šupljini molekula ciklodekstrina bivaju zamijenjene molekulom djelatne tvari ili čestice samo nekim njezinim dijelom. Proces stvaranja kompleksa je reverzibilan, naročito u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena molekule gosta između vezanog i nevezanog oblika. Topljivost teško topljivih djelatnih tvari može se značajno povećati stvaranjem njihovog inkluzijskog kompleksa s hidrofилnim derivatima

ciklodekstrina (primjerice, hidroksipropil-, maltozil-, dimetil- i sulfobutileter- $\beta$ -ciklodekstrin). Pri tome ciklodekstrini djeluju kao nosači djelatne tvari kroz hidrofilan medij bioloških tekućina do mjesta koje ima veći afinitet prema uklopljenoj molekuli djelatne tvari, nego sam ciklodekstrin. Na apsorpcijskoj membrani dolazi do brzog prijelaza uklopljene molekule djelatne tvari kroz stanični dvosloj, dok nosač ostaje u hidrofilnoj okolini. Pri tome valja upotrebljavati najmanju koncentraciju ciklodekstrina koja omogućuje otapanje djelatne tvari, kako uslijed suviška ciklodekstrina ne bi došlo do pomaka ravnoteže prema nastajanju kompleksa, jer samo slobodna djelatna tvar može biti apsorbirana u sistemsku cirkulaciju. Kompleksi relativno niske konstante stabilnosti brzo se apsorbiraju dajući brzo vršne koncentracije u plazmi, dok je kod kompleksa visoke konstante stabilnosti taj proces nešto dulji, no ipak brži nego za neuklopljene molekule djelatne tvari. Disocijacija kompleksa često se može pospješiti dodatkom nekih pomoćnih tvari koje će kompetirati s djelatnom tvari za uklapanje u hidrofobnu centralnu šupljinu molekule ciklodekstrina. Utvrđeno je da se kompleksiranjem djelatnih tvari, kao što su steroidi, kardiotonični glikozidi, nesteroidni analgetici-antipiretici, benzodiazepini, oralni hipoglikemici i koronarni vazodilatatori s hidrofilnim derivatima ciklodekstrina značajno povećava bioraspoloživost djelatnih tvari (Jug i Bećirević-Laćan, 2002).



**Slika 3.** Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa (Jug i Bećirević-Laćan, 2002)

### *1.6.5. Primjena suotapala*

Topljivost teško topljivih djelatnih tvari često se povećava dodatkom suotapala koje se miješa s vodom i u kojem je teško topljiva djelatna tvar dobro topljiva. Sustavi suotapala su smjese vode i jednog ili više otapala koji se miješaju s vodom, a koji se izrađuju s ciljem poboljšanja topljivosti teško topljivih djelatnih tvari. Povijesno gledajući, takav postupak je vrlo često korišten zbog njegove jednostavnosti. Primjena suotapala često je prisutna u izradi različitih čvrstih i tekućih farmaceutskih oblika. Sustavi u kojima se koriste suotapala mogu povećati



topljivost teško topljivih djelatnih tvari i do nekoliko tisuća puta u usporedbi s topljivošću takvih tvari u vodi. U takvim smjesama moguće je otopiti relativno visoki udjel djelatne tvari, a u odnosu na druge pristupe poboljšanja topljivosti. Najčešće se kao suotapala koriste PEG 300, propilenglikol i etanol. Dimetil sulfoksid i dimetil acetoamid također se često koriste kao suotapala zbog njihovog velikog solubilizacijskog kapaciteta i relativno niske toksičnosti. Različiti udjeli (5-40%) PEG 6000 korišteni su u čvrstim binarnim smjesama s ciljem povećanja topljivosti i brzine oslobađanja meloksikama.

Oblici koji su izrađeni korištenjem suotapala primjenjuju se oralno i parenteralno. Poboljšanje topljivosti korištenjem suotapala često se koristi pri izradi parenteralnih oblika zbog relativno niskog iritacijskog potencijala površinski aktivnih tvari i relativno niske toksičnosti korištenih suotapala. Parenteralni oblici mogu zahtijevati dodatak vode ili razrjeđenje s vodenim sustavima s ciljem smanjenja udjela suotapala u sustavu prije primjene. U smislu parenteralne primjene najčešće se koriste sljedeća suotapala: propilenglikol, etanol, glicerol i PEG.

Korištenje suotapala u određenim slučajevima ne rezultira poboljšanjem bioraspodivnosti djelatne tvari, a najčešće zbog taloženja djelatne tvari u obliku kristaliničnog ili amorfne taloga pri razrjeđenju. Nastali talog se mora otopiti, a kako bi se djelatna tvar mogla apsorbirati. U slučaju parenteralne primjene taloženje djelatne tvari nosi rizik od embolije ili lokalnih nuspojava na mjestu primjene. Tehnologija suotapala može se kombinirati s drugim pristupima poboljšanja topljivosti djelatne tvari (Li i sur., 1999; Miyako i sur., 2010).

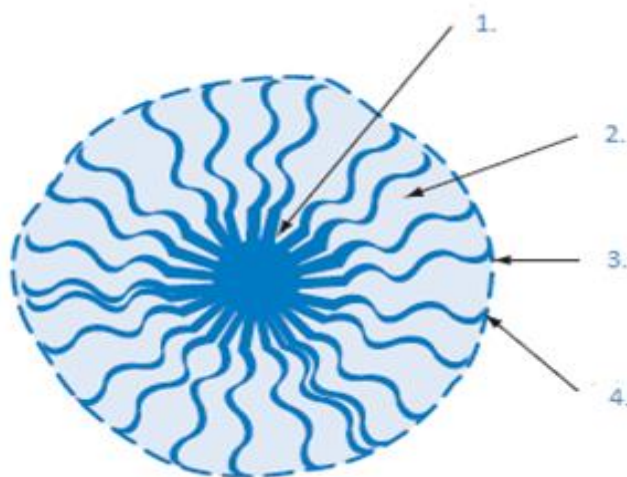
## 1.7. HIDROTROPNI UČINAK

Hidrotropni učinak je postupak otapanja koji uključuje dodatak velike količine druge tvari u sustav, a što rezultira povećanjem topljivosti tvari koju je ishodno potrebno otopiti. Hidrotropni učinak u određenim slučajevima osigurava povećanje topljivosti teško topljive djelatne tvari. Mehanizam koji je uključen u takvo povećanje topljivosti povezan je sa stvaranjem kompleksa između hidrotropnog sredstva (natrijev benzoat, natrijev acetat, natrijev alginat, urea) i teško topljive djelatne tvari. Hidrotropna sredstva najčešće su ionske organske soli. Hidrotropna sredstva mogu povećati topljivost ("salting in" učinkom) ili smanjiti topljivost ("salting out" učinkom) teško topljive djelatne tvari. Određene soli velikih molekularnih dimenzija aniona ili kationa koje su vrlo dobro topljive u vodenoj sredini uzrokuju "salting in" učinak i nazivaju se hidrotropne soli. Korištenje hidrotropnog učinka za

poboljšavanje topljivosti teško topljivih djelatni tvari ne zahtijeva njihove kemijske modifikacije niti korištenje organskih otapala ili izradu termodinamski nestabilnih emulzijskih sustava. Klasifikaciju hidrotropnih sredstava na osnovu njihove molekulske strukture teško je provesti s obzirom da tvari vrlo različite molekulske strukture imaju hidrotropni učinak. Pojedinačni primjeri uključuju etanol, aromatske alkohole (primjerice rezorcinol, pirogalol, katehol), salicilate, alkaloide (kafein, nikotin), ionske površinski aktivne tvari (primjerice natrij laurilsulfat). U ispitivanjima poboljšanja topljivosti teško topljivih djelatnih tvari najčešće se koriste aromatska hidrotropna sredstva. Pored učinka povećanja topljivosti teško topljivih djelatnih tvari u vodi, hidrotropna sredstva utječu i na stvaranje micela u sustavu, promjenu faznog ponašanja višefaznih sustava te smanjenje topljivosti otopina površinski aktivnih tvari (Booth i sur., 2015; El-Houssieny i sur., 2014; Kim i sur., 2011; Maheshwari i Jagwani, 2011).

## 1.8. MICELARNA SOLUBILIZACIJA

Površinski aktivne tvari smanjuju površinsku napetost u vodenim sustavima i poboljšavaju otapanje teško topljivih djelatnih tvari. Često se koriste i pri izradi suspenzijskih oblika kao sredstva za močenje čestica teško topljive djelatne tvari. Pri povećanju koncentracije površinski aktivnih tvari u sustavu iznad njihove kritične micelizacijske koncentracije (koja je za većinu površinski aktivnih tvari u rasponu od 0,05 do 0,1%) u sustavu se stvaraju micelle koje uklapaju teško topljivu djelatnu tvar. Takav proces naziva se micelarna solubilizacija i najčešće rezultira povećanjem topljivosti teško topljive djelatne tvari. Od neionskih površinski aktivnih tvari najčešće se koriste polisorbati, polioksietilirano ricinusovo ulje, polioksietilirani gliceridi, lauroil-makrogliceridi te mono- i di-esteri masnih kiselina s nisko molekulskim polietilenglikolima. Micelarni sustavi koji se koriste za poboljšanje topljivosti teško topljive djelatne tvari najčešće su miješane micelle ili polimerne micelle.



**Slika 4.** Dijagramski prikaz presjeka neionske micelle; 1. jezgra micelle, 2. palisadni sloj, 3. smična površina, 4. oksietilenski lanac (Florence i Attwood, 2006)

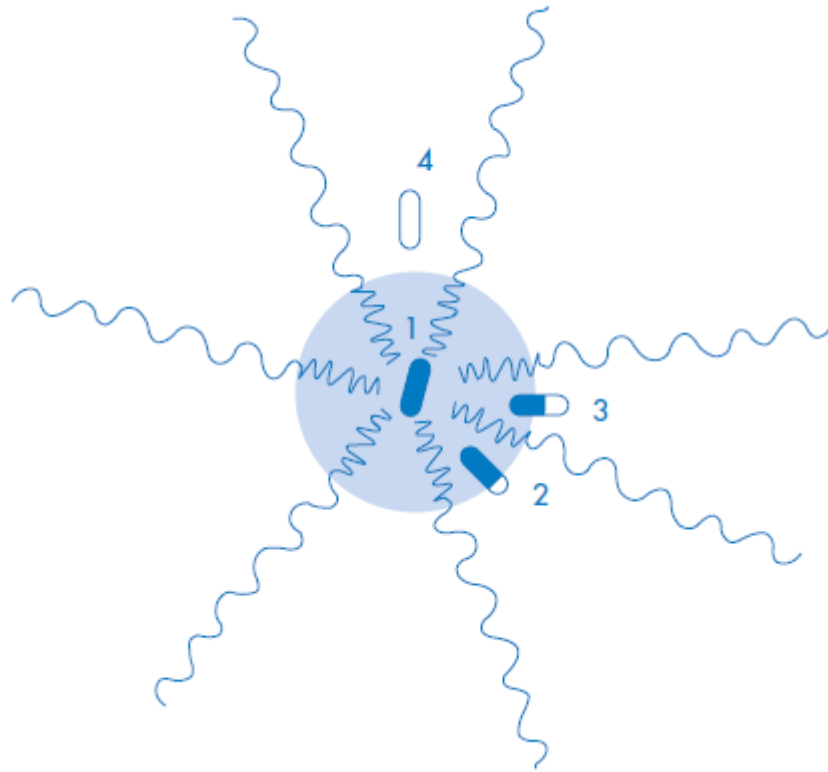
### 1.8.1. Miješane micelle

Miješane micelle sadrže dvije ili više površinski aktivnih tvari koje oblikuju hidrofobnu jezgru i hidrofilni omotač miješanog micelnog sustava. Teško topljiva djelatna tvar najčešće se uklapa u hidrofobnu jezgru micelle. Međutim, s obzirom na njezine fizičko-kemijske karakteristike moguće se smješta na međupovršinu jezgre i omotača micelle. Micelarni sustavi su termodinamski stabilni sustavi koji se spontano stvaraju postupkom samoorganiziranja u vodenoj sredini. Micelle su u dinamičkoj ravnoteži sa slobodno otopljenim molekulama površinski aktivnih tvari. Veličina i oblik micela ovisi o fizičko-kemijskim i strukturnim značajkama površinski aktivnih tvari (Mu i sur., 2005).

### 1.8.2. Polimerne micelle

Nedostaci niskomolekulskih površinski aktivnih tvari (većinom milimolarne cmc vrijednosti, termodinamička i kinetička nestabilnost, niski solubilizacijski kapacitet) pridonijeli su razvoju novih micelnih sustava građenih od amfifilnih kopolimera. Blok kopolimeri lakše stvaraju micelle zbog znatno veće duljine hidrofobnog dijela molekule. Nastale micelle termodinamički su stabilnije s obzirom na niže cmc vrijednosti (pretežno mikromolarno područje). Disocijacija sustava nakon razrjeđenja je sporija, čime je poboljšana i kinetička stabilnost sustava, što omogućuje dulje zadržavanje lijeka unutar micelnog sustava i moguće nakupljanje u ciljnom tkivu. Kopolimerni micelarni sustavi imaju veći solubilizacijski kapacitet zbog većeg broja micela koje nastaju pri samoorganiziranju (niže cmc vrijednosti)

i/ili veće hidrofobne micelarne jezgre. Nadalje, veličina micela je nekoliko desetina nanometara, što također pridonosi postojanosti sustava nakon npr. parenteralne primjene.



**Slika 5.** Mogući smještaj lijeka unutar micelarnih odjeljaka (Florence i Attwood, 2006)

Smještaj lijeka u micelarnim odjeljcima prvenstveno ovisi o hidrofilno-lipofilnim svojstvima lijeka. S obzirom da se u miceli udio vode smanjuje od visoko hidratiziranog micelnog omotača do nehidratizirane ili vrlo slabo hidratizirane jezgre micela, uspostavlja se gradijent polarnosti duž kojega se lijek smješta ovisno o njegovim svojstvima (slika 5). Izrazito lipofilni lijek bit će uklopljen u hidrofobnu jezgru micela (položaj 1), dok se izrazito hidrofilni lijek smješta u vanjski micelarni omotač (položaj 4). Molekule lijeka svojstava između izrazito hidrofilnih i izrazito lipofilnih imaju neke od prijelaznih položaja unutar micela prikazanih slikom 5 (položaj 2 i 3) (Pepić, 2004).

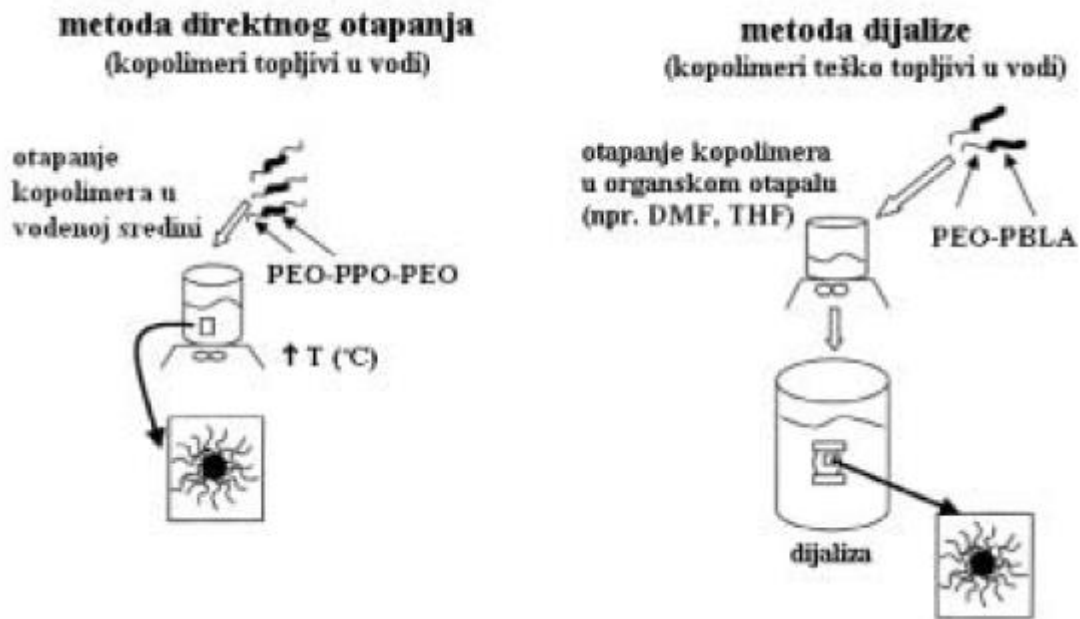
Idealan micelarni sustav za primjenu teško topljive djelatne tvari trebao bi: (i) spontano nastati samoorganiziranjem lijeka, amfifilnog polimera i drugih specifičnih vrsta, (ii) biti veličine ~ 10 nm radi sposobnosti prodiranja u različita tkiva, (iii) biti kontrolirano stabilan u uvjetima *in vivo* radi isporuke lijeka u željena tkiva/stanice i oslobađanja slobodnog oblika lijeka pri dodiru s ciljnim tkivom/stanicom, (iv) biti biokompatibilan i biorazgradiv. Moglo bi

se reći da idealan micelarni sustav treba, u što većoj mjeri, oponašati prirodne supramolekulske nosače (viruse i/ili lipoproteine). U organizacijskom i funkcionalnom smislu virusi, kao sustavi za prijenos genetskog materijala, udovoljavaju većini prethodno navedenih zahtijeva (nastaju samoorganiziranjem biopolimera, sferične su građe s hidrofobnom jezgrom i hidrofilnim omotačem, veličine 20-100 nm, kronološki programirane stabilnosti). Lipoproteini su lipidno-proteinski kompleksi s hidrofobnom jezgrom za prijenos kolesterola i lipida u krvi. Razdioba veličina različitih skupina lipoproteina je 10-100 nm, tj. u području veličina koje osigurava zadovoljavajuće zadržavanje u krvnom optoku. Dakle, lipoproteini i virusi čine vrlo sofisticirane prirodne nanosustave čije razumijevanje može pomoći razvoju novih terapijskih sustava, napose micelarnih, za primjenu lijeka (Pepić, 2004).

## 1.9. METODE FIZIČKOG UKAPANJA DJELATNE TVARI

Za fizičko uklapanje djelatne tvari u micide upotrebljavaju se različite metode koje ovise o samoj metodi pripreme micelarnih sustava.

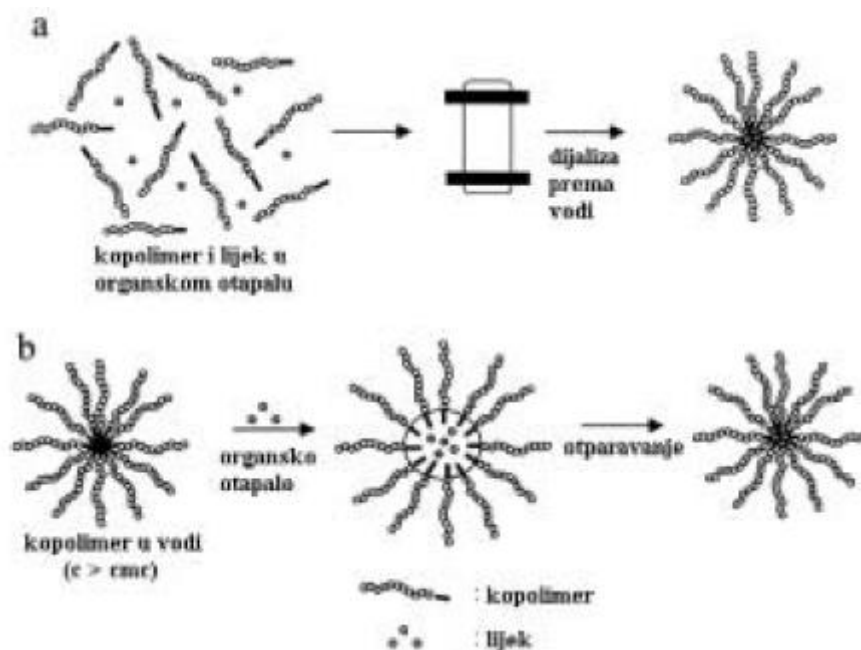
Ako se micide pripravljaju direktnim otapanjem u vodi, onda se već miješanjem micelarne otopine s djelatnom tvari može postići određeno uklapanje, iako takav jednostavan ravnotežni proces djelatne tvari i micela ne mora rezultirati visokim obimom uklapanja. Postoje različiti pristupi metodi direktnog otapanja kojima se nastoji povećati uklapanje djelatne tvari. Tako se djelatna tvar može otopiti u organskom otapalu, koje se miješa s vodom (npr. etanol), te dodati micelarnoj otopini nakon čega se organsko otapalo otpari. Djelatna tvar se može otopiti u organskom otapalu (npr. aceton, etanol) koje se otpari, a micelarna se otopina dodaje na tanki film djelatne tvari zaostale na stjenkama tikvice. Vrlo slično, djelatna tvar i kopolimer mogu se otopiti u zajedničkom organskom otapalu koje se otpari pri čemu na stjenkama tikvice ostaje matriksni film djelatne tvari i kopolimera, a micide s uklopljenom djelatnom tvari nastaju dodatkom određenog volumena vode uz miješanje (Lukyanov i sur., 2002; Torchilin, 2002; Wang i sur., 2005).



**Slika 6.** Metode pripreve kopolimernih micela (Pepić, 2004)

Metoda dijalize sastoji se u prijenosu djelatne tvari i kopolimera iz otapala u kojem su obje tvari dobro topljive (zajedničko organsko otapalo koje se miješa s vodom) u otapalo u kojemu je selektivno topljiv samo hidrofilni dio kopolimerne molekule (voda). Kako se dobro otapalo zamjenjuje selektivnim, tako hidrofobni dijelovi kopolimera samoorganiziranjem stvaraju micelle uklapajući pritom slabo topljivu djelatnu tvar (Lukyanov i sur., 2002; Torchilin, 2002; Wang i sur., 2005).

Djelatna tvar se u micelle može uklopiti i U/V emulzijskom metodom. Takva metoda sastoji se u pripravi micelarne vodene otopine, kojoj se dodaje djelatna tvar otopljena u organskom otapalu koje se ne miješa s vodom (npr. kloroform), pri čemu nastaje emulzija tipa ulje u vodi (U/V). Otparavanjem organskog otapala nastaju micelle. Djelatna tvar se u njih uklapa, kako se otapalo otparava (Allen i sur., 1999; Jones i Leroux, 1999).



**Slika 7.** Uklapanje lijeka u kopolimerne micelle metodom dijalize (a) i U/V emulzijskom metodom (b) (Pepić, 2004)

### 1.9.1. Solubilizacijski kapacitet

Odlučujući čimbenik u solubilizaciji je kompatibilnost teško topljive djelatne tvari i hidrofobne micelarne jezgre, iako međudjelovanje djelatne tvari s hidrofilnim micelarnim omotačem i međudjelovanje s otapalom u manjoj mjeri mogu utjecati na proces solubilizacije. S jedne strane, kompatibilnost ovisi o svojstvima same djelatne tvari, kao što su molekularni volumen, površinska aktivnost, polarnost, hidrofilnost/lipofilnost, naboj i stupanj ionizacije (Allen i sur., 1999; Pepić, 2004). Ipak, izborom strukture hidrofobnog dijela kopolimera može se postići maksimalna kompatibilnost sa željenom djelatnom tvari. Najviši stupanj solubilizacije postiže se visokom kompatibilnošću micelarne jezgre i djelatne tvari. Za procjenu kompatibilnosti koristi se Flory-Huggins-ov parametar međudjelovanja ( $\chi_{sp}$ ) opisan jednadžbom:

$$\chi_{sp} = \frac{(\delta_s - \delta_p)^2 \times V_s}{R \times T}$$

gdje je  $\chi_{sp}$  parametar međudjelovanja solubilizata (s) i hidrofobnog dijela kopolimera (p),  $\delta_s$  Scatchard-Hildebrandov parametar topljivosti solubilizata (djelatne tvari),  $\delta_p$  Scatchard-Hildebrandov parametar topljivosti hidrofobnog dijela kopolimera,  $V_s$  molarni volumen solubilizata,  $R$  opća plinska konstanta,  $T$  termodinamička temperatura (Allen i sur., 1999; (Lavanifanar i sur., 2002). Što je manja pozitivna vrijednost parametra međudjelovanja, to je

veća kompatibilnost solubilizata i hidrofobnog dijela kopolimera. Najveći je stupanj kompatibilnosti moguć u slučaju  $\delta_s = \delta_p$ . Za specifična međudjelovanja (npr. ionska) vrijednost parametra međudjelovanja može biti negativna. Zbog složenosti međudjelovanja kopolimera i djelatne tvari, malo je vjerojatno da će neki micelarni sustav biti univerzalni nosač za sve djelatne tvari, a jednako je vjerojatno da će neka djelatna tvar biti učinkovito isporučen bilo kojim micelarnim sustavom (Allen i sur., 1999).

Pored kompatibilnosti kopolimera i djelatne tvari te međudjelovanja, postoje i drugi parametri koji utječu na solubilizacijski kapacitet kopolimernih micela:

- Duljina hidrofobnog dijela kopolimerne molekule. Povećanjem hidrofobnog dijela kopolimera smanjuje se vrijednost kritične micelizacijske koncentracije, a povećava se agregacijski broj. Povećanjem agregacijskog broja smanjuje se koncentracija micela, ali se povećava volumen micelarne jezgre i jačaju hidrofobna međudjelovanja većinom odgovorna za micelarnu solubilizaciju teško topljivih djelatnih tvari (Allen i sur., 1999, Pepić, 2004).
- Duljina hidrofilnog dijela kopolimerne molekule. Značajnim povećanjem duljine hidrofilnog dijela kopolimera povećava se cmc vrijednost te smanjuje agregacijski broj, što povećava koncentraciju micela. Međutim, kako manji broj kopolimera čini micelu, tako se smanjuje volumen micelarne jezgre i slabe hidrofobna međudjelovanja, pa se smanjuje stupanj solubilizacije hidrofobnih djelatnih tvari (Allen i sur., 1999; Pepić, 2004).
- Priroda hidrofilnog dijela kopolimera. Učinak prirode hidrofilnog dijela kopolimera na uklapanje djelatne tvari može se razmatrati Flory-Huggins-ovim parametrom međudjelovanja. U slučaju povoljnih međudjelovanja lijeka i hidrofilnog dijela kopolimera, određena količina lijeka može biti uklopljena u vanjski micelarni omotač. Tako npr., PEO-PPO-PEO micelle imaju veći afinitet prema klorbenzenu, nego prema benzenu; što nije za očekivati, jer je parametar međudjelovanja benzena ( $\chi_{sp} = 0,0014$ ) niži od parametra međudjelovanja klorbenzena ( $\chi_{sp} = 0,0068$ ). To se može objasniti solubilizacijom određene količine klorbenzena u vanjskom micelarnom omotaču, s obzirom da je parametar međudjelovanja klorbenzena i polietilenoksida ( $\chi_{sp} = 0,1711$ ) niži od parametra međudjelovanja benzena i polietilenoksida ( $\chi_{sp} = 0,2483$ ). Vjerojatno će se amfilni lijekovi s niskim parametrom međudjelovanja, kako za hidrofobni tako i za hidrofilni dio kopolimerne molekule, solubilizirati na međupovršini unutrašnjeg i vanjskog micelnog odjeljka (Allen i sur., 1999).
- Koncentracija kopolimera. O HLB svojstvima kopolimera ovisi utjecaj koncentracije na solubilizaciju; kod nekih se obim solubilizacije povećava s kopolimernom koncentracijom, dok je kod drugih obim solubilizacije neovisan o kopolimernoj koncentraciji. Solubilizacija naftalena u različitim tipovima PEO-PPO-PEO kopolimernih micela neovisna je o

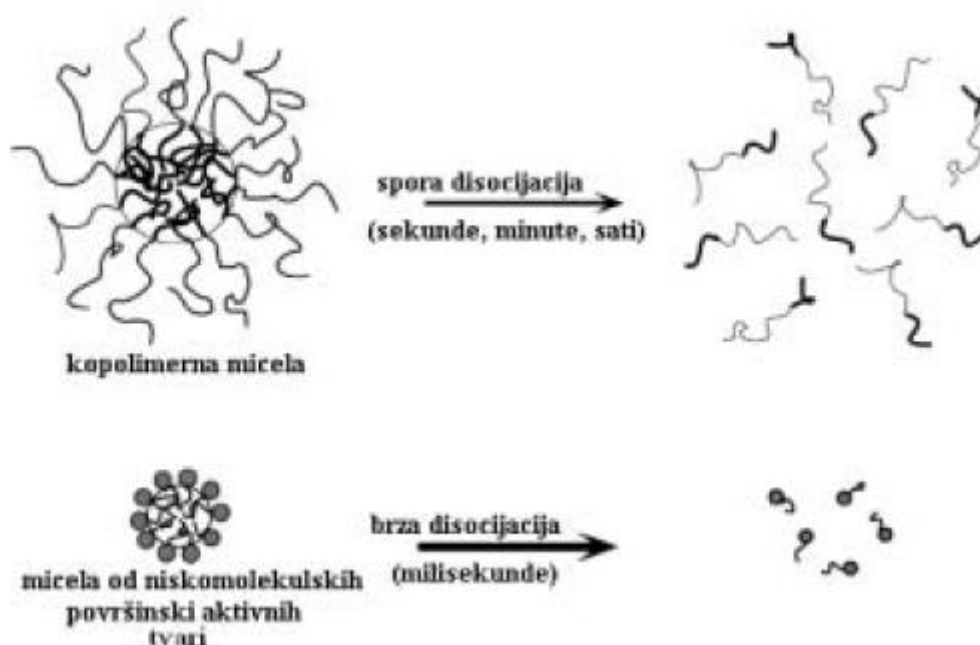


koncentraciji za kopolimere s visokim udjelom hidrofobnog dijela, dok se obim solubilizacije povećava s koncentracijom za kopolimere s visokim udjelom hidrofilnog dijela (Allen i sur., 1999).

- Koncentracija solubilizata (djelatne tvari). Prisutnost hidrofobnog solubilizata može pridonijeti micelizaciji amfifilnih kopolimera, što se očituje smanjenjem cmc vrijednosti te povećanjem broja micela prisutnih u sustavu. Povećanjem koncentracije solubilizata povećava se agregacijski broj kopolimera, čime nastaju veće micide koje imaju veći solubilizacijski kapacitet (Allen i sur., 1999, Pepić, 2004).

## 1.10. STABILNOST I OSLOBAĐANJE DJELATNE TVARI

Stabilnost kopolimernih micela može se promatrati s dva različita stajališta: termodinamičke stabilnosti (ravnotežnog ponašanja sustava) i kinetičke stabilnosti (dinamičkog ponašanja sustava).



**Slika 8.** Usporedba kinetičke stabilnosti kopolimernih micela prema micelama s niskomolekulskim površinski aktivnim tvarima (Pepić, 2004)

### *1.10.1. Termodinamička stabilnost*

Povezana je s cmc vrijednostima ispod kojih se ravnoteža unimera i micela pomiče prema disocijaciji sustava, dok kinetička stabilnost daje informacije o stvarnom vremenu potrebnom za takvu disocijaciju. Dakle, sustav u uvjetima razrjeđenja, kada je koncentracija niža od cmc vrijednosti, može još određeni vremenski period ostati u micelarnom obliku prije disocijacije, što ovisi o stvarnoj brzini disocijacije, tj. kinetičkoj stabilnosti sustava (Pepić, 2004).

Blok kopolimerne micelle, naspram niskomolekulskih, pokazuju visoki stupanj kinetičke stabilnosti nakon razrjeđenja zbog dugotrajnog relaksacijskog procesa koji rezultira sporom disocijacijom micela.

### *1.10.2. Kinetička stabilnost*

Ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući agregatno stanje micelarne jezgre i udio otapala u njemu, duljinu hidrofobnog dijela kopolimera, PEO/PPO omjer te uklopljene hidrofobne tvari. S obzirom na strukturu kopolimernog dijela koji stvara micelarnu jezgru javljaju se hidrofobna ili elektrostatska međudjelovanja iz kojih proizlaze kohezivne sile koje kinetički stabiliziraju micelarni sustav. Jačina kohezivnih sila može se karakterizirati temperaturom staklastog prijelaza ( $T_g$ ), stupnjem kristaliničnosti i umrežavanja micelarne jezgre. Micelle građene od hidrofobnih dijelova s visokim temperaturama staklastog prijelaza ( $T_g > 37^\circ\text{C}$ ) imaju smrznutu micelarnu jezgru s fizički udruženim kopolimernim lancima bez mogućnosti molekuskog gibanja. Takve micelle sporije disociraju u odnosu na kopolimere s nižim vrijednostima  $T_g$ .

Oslobađanje djelatne tvari iz takvih sustava je sporo i ograničeno difuzijom djelatne tvari iz micelarne jezgre. Blok kopolimeri takvog tipa pružaju produljeno vrijeme cirkulacije sustava u krvi i postupno oslobađanje lijeka. Uklapanje hidrofobnih djelatnih tvari u micelarnu jezgru može povećati micelarnu stabilnost. Npr., fizičkim uklapanjem i kemijskom konjugacijom doksorubicina u PEO-P(Asp) micelle povećava se kinetička stabilnost sustava. Stabilnost sustava povećava se s povećanjem udjela konjugirane djelatne tvari, ali i povećanjem fizički uklopljenog doksorubicina. To je objašnjeno povećanjem hidrofobnih međudjelovanja u micelarnoj jezgri i stvaranjem bolje pakiranih micela (Kabanov i Alakhov, 2002; Kabanov i sur., 2002a; Kabanov i sur., 2002b).

Čimbenik		Micelarna stabilnost
cmc	niska	↑
	visoka	↓
T <sub>g</sub>	niska	↓
	visoka	↑
HLB-vrijednost	niska	↓
	visoka	↑
udio konjugiranog lijeka	nizak	↓
	visok	↑

**Slika 9.** Čimbenici koji utječu na termodinamičku i kinetičku stabilnost kopolimernih micela (Pepić, 2004)

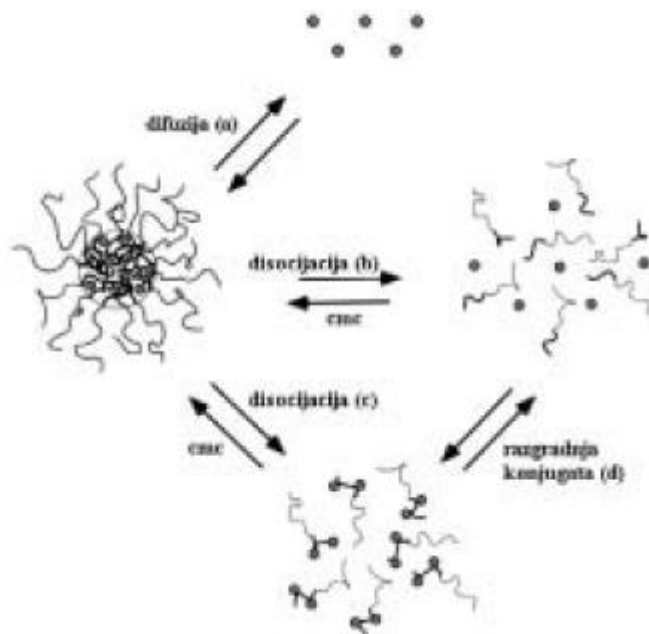
### 1.10.3 Oslobađanje lijeka iz kopolimernih micela

Stabilnost micelnog sustava je preduvjet za kontrolu brzine oslobađanja djelatne tvari. Za fizički uklopljene djelatne tvari u stabilne micide sa sporom biodegradacijom, oslobađanje je kontrolirano brzinom difuzije djelatne tvari ili brzinom disocijacije sustava. Čimbenici koji kontroliraju oslobađanje lijeka iz micela usko su povezani s čimbenicima koji određuju stabilnost micela (Pepić, 2004).

Ako je djelatna tvar smještena u micelarnu jezgru, onda se jačanjem međudjelovanja s hidrofobnim dijelom kopolimerne molekule usporava oslobađanje djelatne tvari. Jaka međudjelovanja povećavaju stupanj uklapanja djelatne tvari i stabilnost micela, ali smanjuju brzinu oslobađanja. Stoga je potrebno naći kompromis kako bi se optimizirala svojstva micela. Na ta međudjelovanja mogu utjecati pH vrijednost (pH-senzitivne micide) i temperatura (termo-senzitivne micide). Tako se povećanjem pH vrijednosti sredine od kiselog prema neutralnom povećava brzina oslobađanja indometacina iz PEO-PBLA micela zbog sve veće ionizacije karboksilnih skupina djelatne tvari te slabljenja hidrofobnih međudjelovanja. Fizičko stanje micelarne jezgre utjecati će i na brzinu oslobađanja djelatne tvari preko veće ili manje pokretljivosti hidrofobnih lanaca, odnosno jačim ili slabijim međudjelovanjima s djelatnom tvari. Difuzija otapala u jezgru micide može prilično smanjiti vrijednosti temperature staklastog prijelaza. Jezgre micide građene od nešto hidrofilnijih kopolimera mogu zadržavati određenu količinu vode, što ubrzava oslobađanje djelatne tvari. Oslobađanje se može usporiti povećanjem količine uklopljene djelatne tvari zbog jačanja hidrofobnih

međudjelovanja. Povećanjem duljine hidrofobnog dijela kopolimerne molekule povećava se micelarna jezgra što usporava oslobađanje djelatne tvari. Molekulski volumen djelatne tvari utječe na brzinu difuzije djelatne tvari iz micela i što je on veći brzina difuzije je manja, a oslobađanje je sporije. Agregatno stanje djelatne tvari također utječe na brzinu oslobađanja. Molekulski otopljeni djelatna tvar u jezgri micela može imati ulogu plastifikatora i smanjivati temperaturu staklastog prijelaza, te tako ubrzavati oslobađanje. U slučajevima da djelatna tvar nije dobro otopljen ili solubiliziran, već oblikuje odvojenu fazu unutar jezgre micela, oslobađanje djelatne tvari iz sustava može biti onemogućeno (Kabanov i Alakhov, 2002; Kabanov i sur., 2002a; Kabanov i sur., 2002b).

Hidrofilnije djelatne tvari uklopljene u micelarni omotač ili na međupovršinu micelarnih odjeljaka biti će drugačije oslobađane, naspram djelatnih tvari iz jezgre micela. Vanjski micelarni omotač je prilično pokretan, stoga će se djelatna tvar prilično brzo oslobađati (eng. burst release). Djelatne tvari smještene u ovim dijelovima micela ne moraju difundirati kroz micelarno središte tako da njegova veličina nema utjecaja na oslobađanje. Molekulski volumen djelatne tvari jednako je zanemariv (Kabanov i Alakhov, 2002; Kabanov i sur., 2002a; Kabanov i sur., 2002b).



**Slika 10.** Mehanizmi oslobađanja lijeka iz kopolimernih micela (Pepić, 2004)

Pri kovalentnom vezanju djelatne tvari i kopolimera, brzina oslobađanja ovisi o kemijskom ili enzimatskom cijepanju kovalentne veze. S jedne strane postoji mogućnost prodiranja vode u micelarnu jezgru i hidrolize kemijske veze nakon čega slijedi difuzija djelatne tvari. Kada je prodiranje vode u hidrofobnu jezgru ograničeno, oslobađanje djelatne tvari kontrolirano je disocijacijom micelnog sustava. Sporom disocijacijom micela u kopolimerne konjugate te oslobađanje slobodne djelatne tvari hidrolizom kovalentnih veza ograničene stabilnosti u konačnici se postiže produljeni učinak (Lavasanifar i sur., 2002).

## 2.OBRAZLOŽENJE TEME

Poboljšanje topljivosti teško topljivih djelatnih tvari u svrhu izrade gotovih farmaceutskih oblika vrlo je važno i aktualno pitanje suvremene farmacije. Brojni su načini kojima je moguće povećati topljivost teško topljivih djelatnih tvari bilo pri izradi pojedinog farmaceutskog oblika lijeka ili na mjestu njegove apsorpcije (*in situ*). Primjerice, suvremeni načini poboljšanja topljivosti djelatne tvari pri izradi obuhvaćaju: prilagodbu kristalnog oblika djelatne tvari (priprava topljivijih kristalnih polimorfa, kristalnih soli ili kokristala), prilagodbu pH oblika, izradu farmaceutskih oblika trenutnog oslobađanja djelatne tvari uz dodatak solubilizatora, prevođenje djelatne tvari u amorfnu stanje, uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse, smanjivanje veličine čestica krutine djelatne tvari postupcima mikro- i/ili nanonizacije.

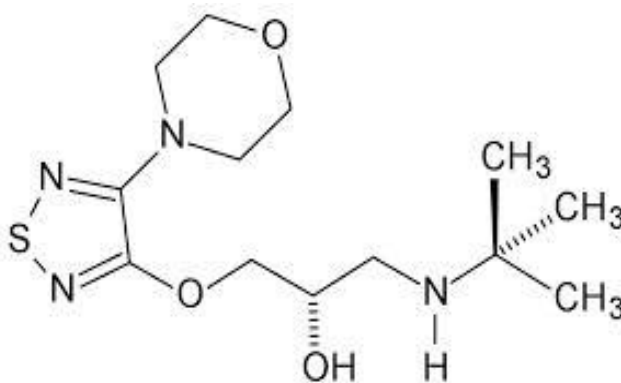
Često korišten način poboljšanja topljivosti teško topljivih djelatnih tvari je micelarna solubilizacija. Komparativne prednosti micelarnih disperzija s otopljenim/solubiliziranim lijekom su jednostavna tehnologija izrade koja *a priori* osigurava relativno jednostavno uvećanje mjerila (eng. *scale up*) s ciljem industrijske proizvodnje. U slučaju zahtijeva za sterilnošću gotovih lijekova, postupci sterilne izrade (primjerice, bakteriološka filtracija, toplinski postupci sterilizacije, aseptička izrada) micelarnih disperzija s otopljenim/solubiliziranim lijekom vrlo su lako prilagodljivi i/ili kompatibilni s klasičnim industrijskim linijama izrade sterilnih pripravaka.

S farmaceutsko-tehnološkog stajališta, neionski solubilizatori u određenim područjima koncentracija i/ili temperatura samoorganiziranjem stvaraju micelle. Relativno je dobro poznato da različiti dodaci (elektroliti, PAT, teško topljive djelatne tvari) ometaju ili poboljšavaju samoorganiziranje i stvaranje takvih micela. Stoga je cilj ovog diplomskog rada ispitati mogućnosti solubilizacije timolola kao modelne teško topljive djelatne tvari u ternarnim sustavima timolola, različitih neionskih solubilizatora i Krebs-Ringerovog pufera kao složene otopine elektrolita, a sve pri temperaturi koja je specifična za određeno mjesto apsorpcije djelatne tvari. Uz solubilizacijski kapacitet pojedinih neionskih micela s obzirom na timolol, bit će određena veličina micela s uklopljenim timololom i njihova disperznost, a kao osnovne značajke fizičke stabilnosti micelarnih sustava pri čuvanju i primjeni.

### 3.MATERIJALI I METODE

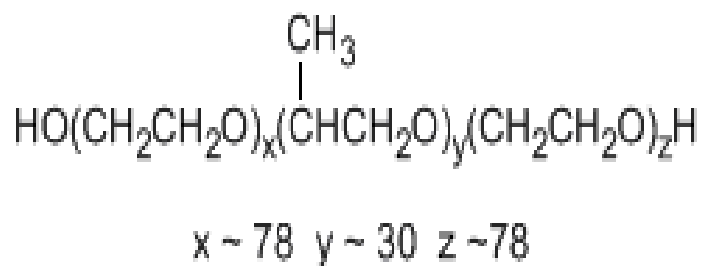
#### 3.1. MATERIJALI

Djelatna tvar ispitivana u ovome radu je timolol maleat koji pripada skupini neselektivnih blokatora  $\beta$ -adrenergičkih receptora.

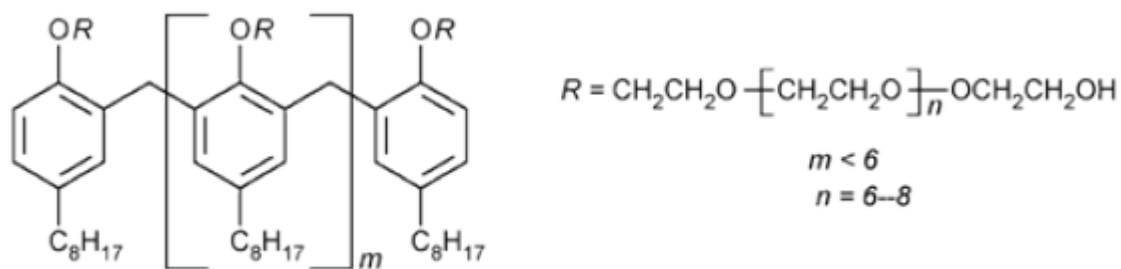


**Slika 11.** Strukturna formula timolola ([www.wikipedia.hr](http://www.wikipedia.hr))

Kao solubilizator u svim pokusima bez dodatnog pročišćavanja, s obzirom da su takve sirovine komercijalno dostupne za izradu farmaceutskih oblika lijekova u farmaceutskoj industriji, upotrebljavani su: poloksamer 188 triblok kopolimer (zaštićeni naziv: Pluronic<sup>®</sup> F68, Sigma-Aldrich, Njemačka) i tiloksapol (zaštićeni naziv: Tyloxapol, Sigma-Aldrich).



**Slika 12.** Strukturna formula Pluronica F68 ([www.wikipedia.hr](http://www.wikipedia.hr))



**Slika 13.** Strukturna formula tiloksapola (www.wikipedia.hr)

Za pripremu Krebs-Ringerovog pufera (pH=7,4) upotrbljeni su:

natrijev klorid, kalijev klorid, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev dihidrogenkarbonat dihidrat, magnezijev sulfat heptahidrat, glukoza monohidrat (Kemig, Hrvatska), kalcijev klorid (Sigma-Aldrich), HEPES (AppliChem, Njemačka) analitičkog stupnja čistoće upotrebljeni su za pripremu Krebs-Ringerovog pufera (pH = 7,4). Za sve pokuse upotrebljena je redestilirana voda specifične provodnosti  $< 1 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

Ostale upotrebljene kemikalije analitičkog su stupnja čistoće, proizvođača Kemika, Hrvatska.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprava Krebs-Ringerovog pufera

Krebs-Ringerov pufer (pH = 7,4) pripremljen je odvagom 6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,158 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,26 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,575 g HEPES te 1,1 g D-glukoza monohidrata u odmjerne tikvici od 1 l; koja je zatim nadopunjena potrebnim volumenom redestilirane vode. pH vrijednost pufera podešana je na 7,4 10 M NaOH. Prije upotrebe pufer je filtriran kroz membranski filter veličine pora  $0,20 \mu\text{m}$  kako bi se uklonili mogući tragovi nečistoća.



### 3.2.2. Priprava ishodnih otopina solubilizatora

Ishodne otopine F68 (5 %, *m/V*) pripravljene su otapanjem F68 u dijelu potrebnog volumena Krebs-Ringerovog pufera (pH = 7,4); najmanje 24 sata pri 4°C. Nakon potpunog otapanja sirovina, odmjerne tikvice su nadopunjene do oznake Krebs-Ringerovim puferom (pH = 7,4). Ishodne otopine su homogenizirane mućkanjem tek nakon potpunog nadopunjavanja kako bi se izbjeglo pjenjenje u prethodnim fazama priprave.

Ishodne otopine tiloksapola (2 %, *m/V*) pripravljene su otapanjem navedenih sirovina u dijelu potrebnog volumena Krebs-Ringerovog pufera (pH = 7,4) 1 sat pri sobnoj temperaturi. Nakon potpunog otapanja sirovina, odmjerne tikvice su nadopunjene do oznake Krebs-Ringerovim puferom (pH = 7,4). Ishodne otopine su homogenizirane mućkanjem tek nakon potpunog nadopunjavanja kako bi se izbjeglo pjenjenje u prethodnim fazama priprave.

### 3.2.3. Ispitivanje oslobađanja timolola *in vitro*

U svrhu ispitivanja potencijalne interakcije timolola s micelama solubilizatora upotrijebljen je postupak dijalize. Uzorci timolola, odnosno timolola i pojedinog solubilizatora, u Krebs-Ringerovom puferu (3 mL) dijalizirani su kroz polupropusnu membranu za dijalizu (Mw cut off = 3500 Da, Dialysis Tubing Visking) prema Krebs-Ringerovom puferu (30 mL). Dijaliza je provedena tijekom 200 minuta pri sobnoj temperaturi uz umjereno miješanje na magnetskom nosaču (300 okr/min). Tijekom 200 minuta u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci (1 mL), a uzeti volumen nadomješten je Krebs-Ringerovim puferom kako bi se osigurao stalni volumen sredstva za dijalizu. Uzorcima je dodano 2 mL Krebs-Ringerovog pufera te je slobodeni timolol određen spektrofotometrijski (UV – Visible Spectrophotometer, Varian) pri valnoj duljini 295 nm. Ispitivanja su provedena dva puta sa svježim pripremljenim uzorcima. Rezultati su prikazani kao ovisnost srednjih vrijednosti kumulativnog udjela oslobođenog timolola  $Q$  (%)  $\pm$  SD o vremenu  $t$  (min).

### 3.2.4. Određivanje sadržaja oslobođenog timolola

Sadržaj oslobođenog timolola u uzorcima određen je spektrofotometrijskom metodom pri  $\lambda = 295$  nm. Za izradu baždarnog dijagrama iz ishodne otopine timolola u Krebs-Ringer puferu (1 mg ml<sup>-1</sup>) pripremljen je koncentracijski niz otopina timolola u Krebs-Ringerovom puferu (pH = 7,4). Značajke baždarnog pravca su sljedeće:  $y = 0,0256x - 0,008$ ;  $r^2 = 0,9998$ . Sadržaj oslobođenog timolola određen je u uzorcima razrijeđenim Krebs-Ringerovom puferom (1:3).

### 3.2.4. Određivanje veličine i disperznosti micela

Veličina i disperznost micela u filtratima određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments).



**Slika 14.** Zetasizer 3000HS (<http://magneticmicrosphere.com/>)

PCS metodom određuje se veličina dispergiranih čestica u području od 2 nm do 3  $\mu\text{m}$ . Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom. Fotomultiplikatorom se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom i prevodi u električni signal koji se prenosi do digitalnog korelatora, što generira autokorelacijske funkcije. Veličina čestica izračunava se iz korelacijskih funkcija uporabom različitih algoritama PCS komercijalnih programa. Dispergirane se čestice stalno gibaju (Brownovo gibanje) što rezultira stalnim fluktuiranjem promatranog intenziteta raspršene svjetlosti tijekom vremena. Brzina Brownovog gibanja definirana je translacijskim difuzijskim koeficijentom ( $D$ ). Veličina čestica dobivena PCS mjerenjima izračunata je uporabom Stokes-Einsteinove jednadžbe:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D},$$

gdje je  $d_h$  hidrodinamički promjer,  $D$  translacijski difuzijski koeficijent,  $k$  Boltzmannova konstanta,  $T$  termodinamička temperatura,  $\eta$  viskoznost.

Promjer čestice dobiven PCS metodom vrijednost je koja govori o difuziji čestice unutar otopine i naziva se hidrodinamičkim promjerom ( $d_h$ ). To je promjer okrugle čestice (sfere) koja bi imala jednaki translacijski difuzijski koeficijent kao čestica koja se promatra.

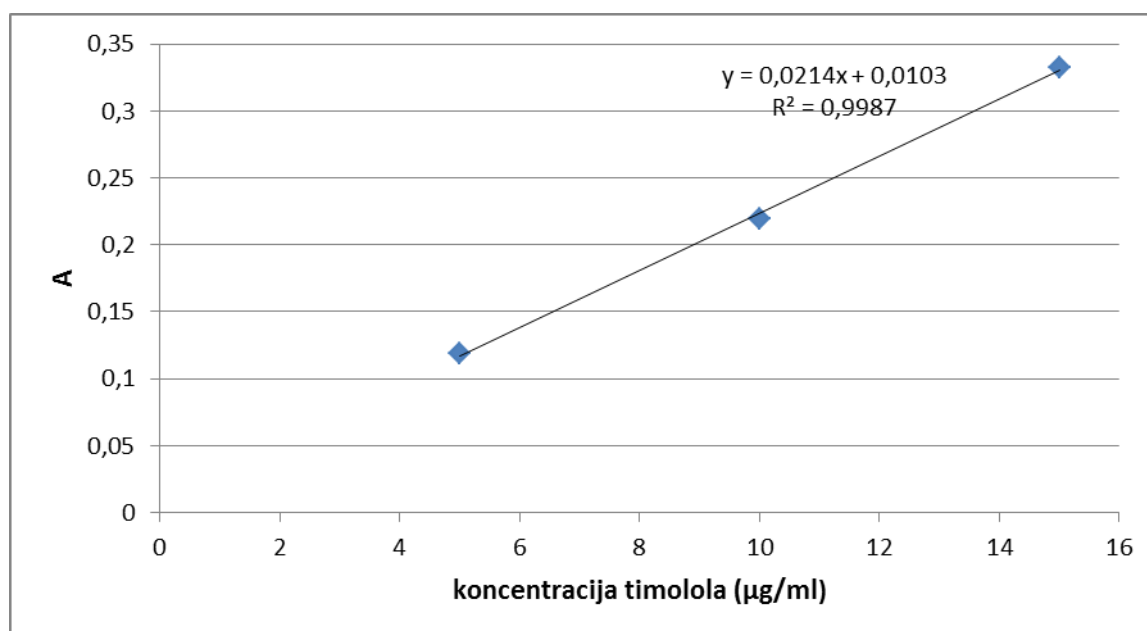
U mjernim sustavima uporabljen je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ( $\lambda = 633$  nm), a kut detekcije raspršene svjetlosti bio je  $90^\circ$ . Mjerenja filtrata provođena su pri  $34^\circ\text{C}$  u području koncentracija solubilizatora većem od njegovih cmc ( $c > \text{cmc}$ ) pri odgovarajućoj temperaturi. Za obradu podataka uporabljen je *CONTIN* algoritam. Rezultati mjerenja prikazani su kao srednje vrijednost tri mjerenja  $d_h \pm \text{SD}$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PROFIL OSLOBAĐANJA TIMOLOLA IZ MICELA U KREBS-RINGEROVOM PUFERU

Kako bi se odredio profil oslobađanja timolola iz micela u Krebs-Ringerovom puferu priređena je suspenzija timolola u Krebs-Ringerovom puferu bez dodatka solubilizatora.

Spektrofotometrijski je određen sadržaj otopljenog/solubiliziranog timolola nakon 24 sata disperzije i filtracije kroz membranske filtre kako bi se odjelio otopljeni/solubilizirani od neotopljenog timolola.



**Slika 15.** Ovinost koncentracije otopljenog timolola u Krebs- Ringerovom puferu o apsorbanciji  $\lambda = 295$  nm pri 25°C

Porastom koncentracije otopljenog/solubiliziranog timolola raste i apsorbancija na  $\lambda = 295$  nm.

### 4.2. VELIČINA MICELA PLURONICA F68 S UKLOPLJENIM TIMOLOLOM

Određena je veličina i raspodjela veličina micela Pluronic F68 (0,1%, 0,5% i 1%, *m/V*) u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 kako bi se mogao procijeniti utjecaj uklapanja timolola na

veličinu i raspodjelu veličine micela Pluronica F68. Zatim je određena veličina i raspodjela veličina micela Pluronica F68 različitih koncentracija u Krebs-Ringerovom puferu s uklopljenim timololom.

**Tablica 1.** Veličina i raspodjela veličina micela Pluronica F68 s uklopljenim timololom u Krebs-Ringerovom puferu pri 25°C

		TIMOLOL/PLURONIC F68			
		$d_h$ (nm)		PDI	
		mean	SD	mean	SD
0,1% PLURONIC F68	0,1% F68	51,1	15,2	0,559	0,156
	timolol 100 µg/mL+0,1% F68	53,1	17,8	0,56	0,157
0,5% PLURONIC F68	0,5% F68	79,0	2,1	0,769	0,011
	timolol 1000 µg/mL+0,5% F68	44,2	15,2	0,531	0,107
1% PLURONIC F68	1% F68	31,9	1,3	0,379	0,009
	timolol 100 µg/mL+1% F68	46,4	2,5	0,512	0,028
	timolol 1000 µg/mL+1% F68	44,2	13	0,471	0,119

Izmjerena je veličina micela i PDI filtrata nakon filtriranja kroz PES filtar veličine pora 0,45 µm. Timolol pri koncentraciji Pluronic F68 0,5% uzrokuje dehidraciju omotača micela, dok istodobno relativno malo uklapanje timolola ne može znatno utjecati na veličinu micela, a što u konačnici rezultira smanjenjem veličine micela. S povećavanjem koncentracije Pluronic F68 u sustavu (1%), omotač micela je sve gušće pakiran jer sve veći broj unimera gradi jednu micelu, odnosno sve manje hidratiziran (prazne micide znatno manje nego pri koncentraciji Pluronic F68 0,5%). Pri takvoj koncentraciji Pluronic F68 dehidracijski učinak timolola je manje izražen, dok se istodobno više timolola uklapa u omotač micela, a što u konačnici rezultira povećanjem ukupne veličine micela s uklopljenim timololom u odnosu na prazne micide pri toj koncentraciji Pluronic F68 u sustavu.

### 4.3. VELIČINA MICELA TILOKSAPOLA S UKLOPLJENIM TIMOLOLOM

Određena je veličina i raspodjela veličina micela tiloksapola različitih koncentracija (0,1%, 0,5% i 1%, *m/V*) u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 kako bi se mogao procijeniti utjecaj uklapanja timolola na veličinu i raspodjelu veličina micela tilokapola. Mjerena je veličina micela filtrirane otopine tiloksapola preko filtra veličine pora od 0,45  $\mu\text{m}$ .

Zatim je određena veličina i raspodjela veličina micela tilokaspola u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 s uklopljenim timololom.

**Tablica 2.** Veličina i raspodjela veličina micela tiloksapola s uklopljenim timololom u Krebs-Ringerovom puferu pri 25°C

		TIMOLOL/TILOKSAPOL			
		$d_h$ (nm)		PDI	
		mean	SD	mean	SD
0,1% TILOKSAPOL	0,1% TILOKSAPOL	14,3	0,4	0,197	0,014
	timolol 100 $\mu\text{g/mL}$ +0,1% TIL	13,6	0,6	0,195	0,018
	timolol 1000 $\mu\text{g/mL}$ +0,1% TIL	29,5	6,2	0,358	0,061
0,5% TILOKSAPOL	0,5% TILOKSAPOL	14,6	0,9	0,175	0,037
	timolol 1000 $\mu\text{g/mL}$ +0,5% TIL	14,5	1,0	0,199	0,007
1% TILOKSAPOL	1% TIL	8,3	0,4	0,262	0,087
	timolol 100 $\mu\text{g/mL}$ +1% TIL	9,1	0,4	0,242	0,042
	timolol 1000 $\mu\text{g/mL}$ +1% TIL	10,5	0,5	0,222	0,026

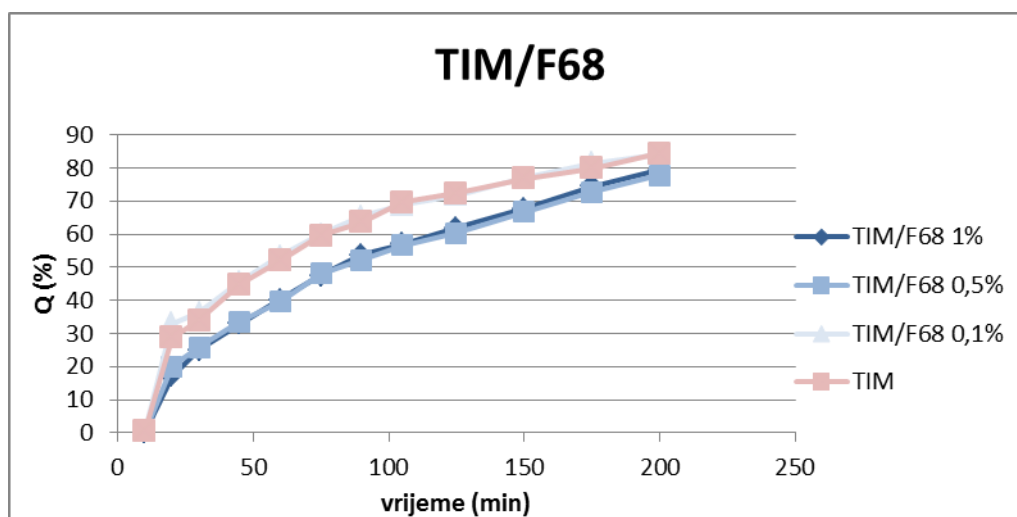
Kod tiloksapola, uslijed drugačijeg promatranog koncentracijskog područja prema cmc tiloksapola u odnosu na promatrano koncentracijsko područje prema cmc Pluronic F68, dehidratacijski učinak timolola nije izražen, odnosno opažene su relativno slične vrijednosti veličine praznih micela tiloksapola u odnosu na micide tiloksapola s uklopljenim timololom.

Ako se usporede veličine micela tiloksapola u KRB-u i veličine micela timolola u KRB-u s uklopljenim timololom opaža se da uklapanje hidrofilnog timolola u micelle tilokapola također ne utječe znatno na njihovu veličinu. Iz toga se može zaključiti da uklapanje timolola u micelle tiloksapola ne utječe na fizičku stabilnost i stvaranje micela tiloksapola procesom samoorganiziranja.

#### 4.4. OSLOBAĐANJE TIMOLOLA U KREBS-RINGER PUFERU UZ DODATAK PLURONICA F68

Pri uvjetima osigurane topljivosti ispitan je profili oslobađanja timolola (TIM) iz micela Pluronic F68 (F68) pri različitim koncentracijama (0,1%, 0,5% i 1%, *m/V*) u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 pri 25°C.

U postupku ispitivanja korištena su crijeva za dijalizu kojih veličina pora ne dozvoljava prolaz Pluronic F68 u dijalizacijski medij, odnosno osigurano je zadržavanje sirovine koja gradi micelle u dijalizacijskoj vrećici. U protivnom bi na početku ispitivanja oslobađanja u dijalizacijskoj vrećici imali micelle, a na kraju postupka razrijeđenu otopinu pojedinačnih molekula (unimera) solubilizatora.



**Slika 16.** *In vitro* profil oslobađanja timolola iz micela Pluronic F68 u Krebs-Ringerovom puferu (pH=7,4) u uvjetima osigurane topljivosti pri 25°C

Promjene u oslobađanju timolola uz dodatak Pluronic F68 opažaju se pri koncentraciji Pluronic F68 od 0,1%, dok se pri koncentracijama Pluronic F68 0,5% i 1% usporava oslobađanje u odnosu na otopinu timolola bez dodatka Pluronic F68.

**Tablica 3.** Vrijeme potrebno da se iz pripravka oslobodi 50 % sadržaja timolola iz otopine i timolola uz dodatak Pluronic F68 micela ( $t_{50\%}$ )

	$t_{50\%}$ (min)
<b>TIM/F68 1%</b>	79,52
<b>TIM/F68 0,5%</b>	82,61
<b>TIM/F68 0,1%</b>	<b>53,86</b>
<b>TIM</b>	56,33

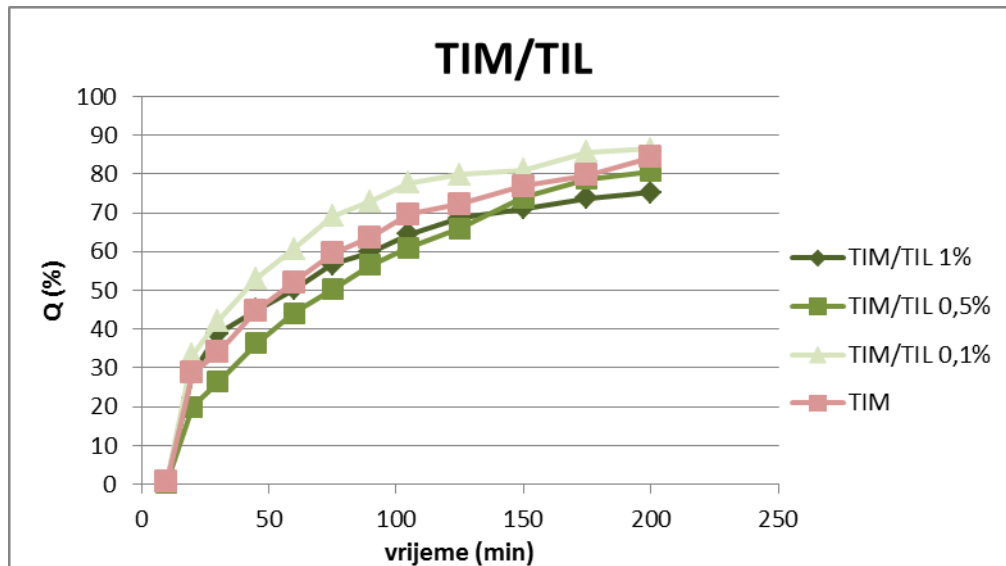
Uspoređivanjem vremena u kojima se oslobodilo 50% timolola iz micela u odnosu na otopinu timolola opaženo je ubrzanje oslobađanja timolola iz Pluronic F68 pri koncentracijama od 0,1%. Pri koncentracijama 0,5% i 1% Pluronic F68 oslobađanja timolola iz micela se usporava.

#### 4.5. OSLOBAĐANJE TIMOLOLA U KREBS-RINGER PUFERU UZ DODATAK TILOKSAPOLA

Pri uvjetima osigurane topljivosti ispitan je profil oslobađanja timolola (TIM) iz micela tiloksapola (TIL) (0,1%, 0,5% i 1%  $m/V$ ) u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 pri 25°C kako bi se mogao procijeniti utjecaj različitih koncentracija tiloksapola na oslobađanje timolola.



U postupku ispitivanja korištena su crijeva za dijalizu kojih veličina pora ne dozvoljava prolaz tiloksapola u dijalizacijski medij, odnosno osigurano je zadržavanje sirovine koja gradi micela u dijalizacijskoj vrećici.



**Slika 17.** *In vitro* profil oslobađanja timolola iz micela tilokaspola u Krebs-Ringerovom puferu (pH=7,4) u uvjetima osigurane topljivosti pri 25°C

Značajne promjene u profilu oslobađanja timolola opažaju se pri koncentraciji tiloksapola 0,1%, dok se pri koncentracijama tiloksapola 0,5% i 1% usporava oslobađanje timolola u odnosu na otopinu timolola. Opaža se značajni porast oslobađanja timolola iz micela tiloksapola pri koncentraciji tilokaspola 0,1% (slika 17).

**Tablica 4.** Vrijeme potrebno da se iz pripravka oslobodi 50 % sadržaja timolola iz otopine i timolola uz dodatak tiloksapol micela ( $t_{50\%}$ )

	<b><math>t_{50\%}</math> (min)</b>
<b>TIM/TIL 1%</b>	59,47
<b>TIM/TIL 0,5%</b>	70,33
<b>TIM/TIL 0,1%</b>	<b>42,42</b>
<b>TIM</b>	56,33

Opaženo je značajno ubrzanje oslobađanja timolola s uklopljenim tiloksapolom pri koncentracijama od 0,1% u odnosu na otopinu timolola. Pri koncentracijama 0,5% i 1% tiloksapola došlo je do usporenog oslobađanja timolola iz micela.

Uklapanje timolola u tiloksapol više utječe na ubrzanje oslobađanja timolola u odnosu na brzinu oslobađanja Pluronic F68 s uklopljenim timololom. Dobiveni rezultati ukazuju na djelomično uklapanje timolola u omotač micela Pluronic F68 ili tiloksapola s vrlo vjerojatnom brzom raspodjelom timolola između micelarne i vodene faze.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitano je oslobađanje timolola uz dodatak pluronica F68 i tiloksapola (neionski solubilizatori) u Krebs-Ringerovom puferu pH = 7,4 (složena otopina elektrolita) postupkom dijalize u uvjetima osigurane topljivosti. Sva ispitivanja provedena su pri temperaturi 25°C.

Količina oslobođenog timolola određena je spektrofotometrijskom metodom pri  $\lambda = 295$  nm.

Obje ispitivane površinski aktivne tvari (Pluronic F68 ili tiloksapol) stvaraju micelarne agregate u složenoj otopini elektrolita Krebs-Ringerovog pufera pri odabranoj temperaturi ispitivanja.

Dodatak djelatne tvari (timolola) u tako složeni sustav ne ometa stvaranje micela, iako su pri pojedinim koncentracijama površinski aktivne tvari (primjerice, Pluronic F68 0,5%) opažene određene razlike u raspodjeli veličina micela (primjerice, PDI vrijednosti nešto veće od gornje granične vrijednosti), a što može ukazivati na relativno velike nepovoljne promjene fizičke stabilnosti takvog složenog sustava.

Veličina i disperznost micela u filtratima određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom. Veličina i raspodjela veličina micela ne mijenja se znatno pri uklapanju timolola. Moguće je zaključiti da uklapanje timolola u micelle Pluronic F68 ili tiloksapola ne utječe na fizičku stabilnost i stvaranje micela procesom samoorganiziranja.

U odnosu na otopinu timolola, vrijeme koje je potrebno za oslobađanje 50% timolola iz sustava ubrzava se kod koncentracije Pluronic F68 i tiloksapola od 0,1% u sustavu. Dok pri koncentracijama 0,5% i 1% Pluronica F68 i tiloksapola nije došlo do ubrzanja oslobađanja timolola. Takvi rezultati ukazuju na djelomično uklapanje timolola u omotač micela Pluronica F68 ili tiloksapola s vrlo vjerojatnom brzom raspodjelom timolola između micelarne i vodene faze.

## 6. LITERATURA

1. Allen, C., Yu, Y., Eisenberg, A., Maysinger, D., 1999. Cellular internalization of PCL(20)-b-PEO(44) block copolymer micelles. *Biochim Biophys Acta* 1421, 32-38.
2. Booth, J.J., Omar, M., Abbott, S., Shimizu, S., 2015. Hydrotrope accumulation around the drug: the driving force for solubilization and minimum hydrotrope concentration for nicotinamide and urea. *Phys Chem Chem Phys* 17, 8028-8037.
3. Butler, J.M., Dressman, J.B., 2010. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci* 99, 4940-4954.
4. Chen, H., Khemtong, C., Yang, X., Chang, X., Gao, J., 2011. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today* 16, 354-360.
5. Cherniakov, I., Domb, A.J., Hoffman, A., 2015. Self-nano-emulsifying drug delivery systems: an update of the biopharmaceutical aspects. *Expert Opin Drug Deliv*, 1-13.
6. El-Houssieny, B.M., El-Dein, E.Z., El-Messiry, H.M., 2014. Enhancement of solubility of dexibuprofen applying mixed hydrotropic solubilization technique. *Drug Discov Ther* 8, 178-184.
7. Gao, L., Zhang, D.R., Chen, M.H., 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res* 10, 845-862.
8. Jalšenjak, I., Jalšenjak, V., Filipović-Grčić, J., 1998. *Farmaceutika. Školska knjiga, Zagreb.*
9. Jones, M., Leroux, J., 1999. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 48, 101-111.
10. Jug M., Bećirević-Laćan, M. (2002) Ciklodekstrini – nosači lijekova *Farm. Glas.* 58, 189-2014.
11. Junghanns, J.U.A.H., Muller, R.H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed* 3, 295-309.
12. Kabanov, A.V., Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19, 1-72.

13. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., 2002a. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 82, 189-212.
14. Kabanov, A.V., Lemieux, P., Vinogradov, S., Alakhov, V., 2002b. Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 223-233.
15. Kim, J.Y., Kim, S., Pinal, R., Park, K., 2011. Hydrotropic polymer micelles as versatile vehicles for delivery of poorly water-soluble drugs. *J Control Release* 152, 13-20.
16. Lavasanifar, A., Samuel, J., Sattari, S., Kwon, G.S., 2002. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharm Res* 19, 418-422.
17. Li, P., Zhao, L., Yalkowsky, S.H., 1999. Combined effect of cosolvent and cyclodextrin on solubilization of nonpolar drugs. *J Pharm Sci* 88, 1107-1111.
18. Lobenberg, R., Amidon, G.L., 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 3-12.
19. Loch, C., Zakej, S., Kristl, A., Nagel, S., Guthoff, R., Weitschies, W., Seidlitz, A., 2012. Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. *Eur J Pharm Sci* 47, 131-138.
20. Lukyanov, A.N., Gao, Z., Mazzola, L., Torchilin, V.P., 2002. Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. *Pharm Res* 19, 1424-1429.
21. Maheshwari, R.K., Jagwani, Y., 2011. Mixed hydrotrophy: novel science of solubility enhancement. *Indian J Pharm Sci* 73, 179-183.
22. Miyako, Y., Khalef, N., Matsuzaki, K., Pinal, R., 2010. Solubility enhancement of hydrophobic compounds by cosolvents: role of solute hydrophobicity on the solubilization effect. *Int J Pharm* 393, 48-54.
23. Mu, L., Elbayoumi, T.A., Torchilin, V.P., 2005. Mixed micelles made of poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine conjugate and d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as pharmaceutical nanocarriers for camptothecin. *Int J Pharm* 306, 142-149.
24. Muller, R.H., Gohla, S., Keck, C.M., 2011. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 78, 1-9.

25. Pepić, I. 2004, Magistarski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
26. Shegokar, R., Muller, R.H., 2010. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm* 399, 129-139.
27. Singh, B., Beg, S., Khurana, R.K., Sandhu, P.S., Kaur, R., Katare, O.P., 2014. Recent advances in self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 31, 121-185.
28. Sinha, B., Muller, R.H., Moschwitzter, J.P., 2013. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm* 453, 126-141.
29. Torchilin, V.P., 2002. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 235-252.
30. Wang, J., Mongayt, D., Torchilin, V.P., 2005. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *J Drug Target* 13, 73-80.

## 7. SAŽETAK

U ovom radu ispitano je uklapanje i oslobađanje timolola iz micela Pluronic F68 i tiloksapola u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 kao složenoj otopini elektrolita pri 25°C postupkom dijalize u uvjetima osigurane topljivosti.

Količina oslobođenog timolola određena je spektrofotometrijski pri  $\lambda = 295$  nm.

Veličina i raspodjela veličina micela ne mijenja se znatno pri uklapanju timolola. Moguće je zaključiti da uklapanje timolola u micelle Pluronic F68 ili tiloksapola ne utječe na fizičku stabilnost i stvaranje micela procesom samoorganiziranja.

Opaženo je ubrzanje oslobađanja timolola iz Pluronic F68 i tiloksapol micela pri koncentracijama od 0,1%. Dok pri koncentracija 0,5% i 1% Pluronica F68 ili tiloksapola nije došlo do ubrzanja oslobađanja timolola.

Takvi rezultati ukazuju na djelomično uklapanje timolola u omotač micela Pluronica F68 ili tiloksapola s vrlo vjerojatnom brzom raspodjelom timolola između micelarne i vodene faze.

## SUMMARY

In this study examined the incorporation and release of timolol from the micelles tyloxapol and Pluronic F68 in a Krebs-Ringer buffer pH 7,4 as a complex solution of electrolyte at 25 ° C in a dialysis process under conditions provided solubility.

The amount of released timolol was determined spectrophotometrically at  $\lambda = 295$  nm.

The size and size distribution of micelles does not change significantly in adapting timolol. It is possible to conclude that the integration of timolol in micelles Pluronic F68 or tyloxapol does not affect the physical stability and a micelle-forming process of self-organization.

It was observed acceleration of release of timolol from Pluronic F68 and tyloxapol micelles at concentrations of 0.1%. While the concentration are 0.5% and 1% Pluronic F68 tyloxapol or not an acceleration of release of timolol.

These results indicate a partial integration of timolol in the micelle shell Pluronic F68 or tyloxapol with a probable rapid distribution of timolol between micellar and aqueous phases.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Priprava i profil oslobađanja timolola uklopljenog u micela neionskih površinski aktivnih tvari

Ivona Ivančić

#### SAŽETAK

U ovom radu ispitano je uklapanje i oslobađanje timolola iz micela Pluronic F68 i tiloksapola u Krebs-Ringerovom puferu pH=7,4 kao složenoj otopini elektrolita pri 25°C postupkom dijalize u uvjetima osigurane topljivosti. Količina oslobođenog timolola određena je spektrofotometrijski pri  $\lambda = 295$  nm.

Veličina i raspodjela veličina micela ne mijenja se znatno pri uklapanju timolola. Moguće je zaključiti da uklapanje timolola u micela Pluronic F68 ili tiloksapola ne utječe na fizičku stabilnost i stvaranje micela procesom samoorganiziranja. Opaženo je ubrzanje oslobađanja timolola iz Pluronic F68 i tiloksapol micela pri koncentracijama od 0,1%. Dok pri koncentracija 0,5% i 1% Pluronica F68 ili tiloksapola nije došlo do ubrzanja oslobađanja timolola. Takvi rezultati ukazuju na djelomično uklapanje timolola u omotač micela Pluronica F68 ili tiloksapola s vrlo vjerojatnom brзом raspodjelom timolola između micelarne i vodene faze.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 17 grafičkih prikaza, 4 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Timolol, tiloksapol, Pluronic F68, oslobađanje, topljivost

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

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

**Dr. sc. Iva Mucalo**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Travanj 2016.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Preparation and profile release of timolol integrated into micelles of nonionic surfactants

Ivona Ivančić

#### SUMMARY

In this study examined the incorporation and release of timolol from the micelles tyloxapol and Pluronic F68 in a Krebs-Ringer buffer pH 7,4 as a complex solution of electrolyte at 25 ° C in a dialysis process under conditions provided solubility. The amount of released timolol was determined spectrophotometrically at  $\lambda = 295$  nm. The size and size distribution of micelles does not change significantly in adapting timolol. It is possible to conclude that the integration of timolol in micelles Pluronic F68 or tyloxapol does not affect the physical stability and a micelle-forming process of self-organization. It was observed acceleration of release of timolol from Pluronic F68 and tyloxapol micelles at concentrations of 0.1%. While the concentration are 0.5% and 1% Pluronic F68 tyloxapol or not an acceleration of release of timolol. These results indicate a partial integration of timolol in the micelle shell Pluronic F68 or tyloxapol with a probable rapid distribution of timolol between micellar and aqueous phases.

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

Thesis includes: 43 pages, 17 figures, 4 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Timolol, tyloxapol, Pluronic F68, release, solubility

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

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Iva Mucalo, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2016.