

Određivanje utjecaja procesnih parametara na veličinu i zeta potencijal čestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem

Lepur, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:363976>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Antonio Lepur

**Određivanje utjecaja procesnih parametara na
veličinu i zeta potencijal čestica pripremljenih
tehnikom sušenja raspršivanjem**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju *Industrijska farmacija* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u PLIVI Hrvatska d.o.o. pod stručnim vodstvom nasl.doc. dr. sc. Biserke Cetine-Čižmek, Istraživanje i razvoj PLIVA Hrvatska d.o.o.

ZAHVALA

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Biserki Cetini-Čižmek te suvoditeljici Marieti Duvnjak-Romić koje su svojim strpljenjem, prijateljskim pristupom i stručnim vodstvom omogućile realizaciju ovoga rada. Hvala i svim drugim djelatnicima Plive koji su me nesebično savjetovali i pomogli u provođenju praktičnog dijela rada.

Hvala svim mojim učiteljima i profesorima koji su mi pomagali, izlazili u susret i podupirali me u mojem školovanju.

Osobito zahvaljujem svojim dugogodišnjim prijateljima Dominiku i Filipu što su uvijek bili uz mene kada sam imao problema i što su zajedno sa mnom prošli kroz sve radosne i tužne trenutke.

Iz svega srca zahvaljujem svojoj Mateji na velikoj pomoći tijekom studija koja se ne može opisati riječima. Uz njezinu pomoć svaki problem je bio lako rješiv i sve je postalo moguće. Puno joj hvala na neizmjernoj podršci i ljubavi koja mi je omogućila da budem ono što jesam.

Ponajviše se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri koji su mi uvijek davali podršku te me usmjeravali na pravi životni put tokom prošle 23 godine. Hvala što su vjerovali u moj uspjeh i konstantno me poticali da učim te da budem vrijedan ukoliko želim biti uspješan. Zahvalan sam im na njihovoj upornosti i financiranju dugih 17 godina mog školovanja.

Sve moje zahvale idu i tebi Isuse bez čije pomoći i vjere ne bih nikada došao do cilja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Topikalni pripravci.....	1
1.1.1. Mikročestice u topikalnoj primjeni	1
1.1.2. Struktura kože i penetracija lijeka kroz kožu	2
1.2. Melatonin.....	4
1.2.1. Melatonin u koži.....	5
1.3. Sušenje raspršivanjem	5
1.3.1. Stvaranje mikročestica sušenjem raspršivanjem	8
1.4. Dizajn eksperimenta.....	9
1.5. Veličina čestica	10
1.5.1. Morphologi G3-ID	13
1.6. Zeta potencijal.....	17
1.6.1. Naboj u polarnim medijima.....	17
1.6.2. Električna svojstva tvari u nevodenom mediju	18
1.6.3. Dvostruki električni dvosloj	18
1.6.4. Aglomeracija dispergiranih čestica.....	20
1.6.5. Mjerenje naboja čestica.....	21
1.6.6. Zetasizer Nano ZS	22
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	24
3. MATERIJALI I METODE.....	25
3.1. Materijali.....	25
3.2. Metode	25
3.2.1. Statistički plan i obrada	25
3.2.2. Priprema mikročestica tehnikom sušenja raspršivanjem	25
3.2.3. Određivanje zeta-potencijala.....	26
3.2.4. Određivanje veličine čestica.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Utjecaj procesnih parametara na vrijednost Z-potencijala	29
4.2. Utjecaj procesnih parametara na veličinu čestica	32
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA.....	35
7. SAŽETAK	38

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Topikalni pripravci

Topikalni pripravci su lijekoviti oblici koji se primjenjuju lokalno na kožu, a mogu se podijeliti u dvije skupine – pripravci s lokalnim djelovanjem na kožu, te pripravci sa sistemskim učinkom. Lokalna primjena uključuje djelovanje na površini kože, u stratumu corneumu, epidermisu i/ili dermisu, a sistemska primjena se postiže korištenjem transdermalnih flastera, odnosno transdermalnih terapijskih sustava (Ueda i sur., 2009).

Pod topikalnim dozirnim oblicima podrazumijevamo: otopine, emulzije (losione), suspenzije, čvrste oblike (aerosoli i puderi), polučvrste oblike (gelovi, pjene, masti, paste, kreme) i sprejeve. Fizikalne osobine gore navedenih oblika se međusobno razlikuju pa stoga postoje različiti testovi za ispitivanje učinkovitosti lijekovitih oblika koji se temelje na profilu oslobađanja lijekovite tvari iz formulacije. Navedeni polučvrsti pripravci se često koriste u dermatološkoj terapiji upravo zato jer je produljen transport i zadržavanje djelatne tvari na mjestu djelovanja (Gibson, 2009). Topikalni pripravci se koriste također i u svrhu njege kože. Koža je najveći ljudski organ koji je izložen brojnim fizikalnim stresovima i štetnim učincima iz okoline. Postoje i drugi čimbenici koji su uzročnici oštećenja i bolesti kože kao što su: poremećaji regeneracije površine kože, lijekovima uzrokovana preosjetljivost, autoimuni poremećaji i drugi razlozi.

1.1.1. Mikročestice u topikalnoj primjeni

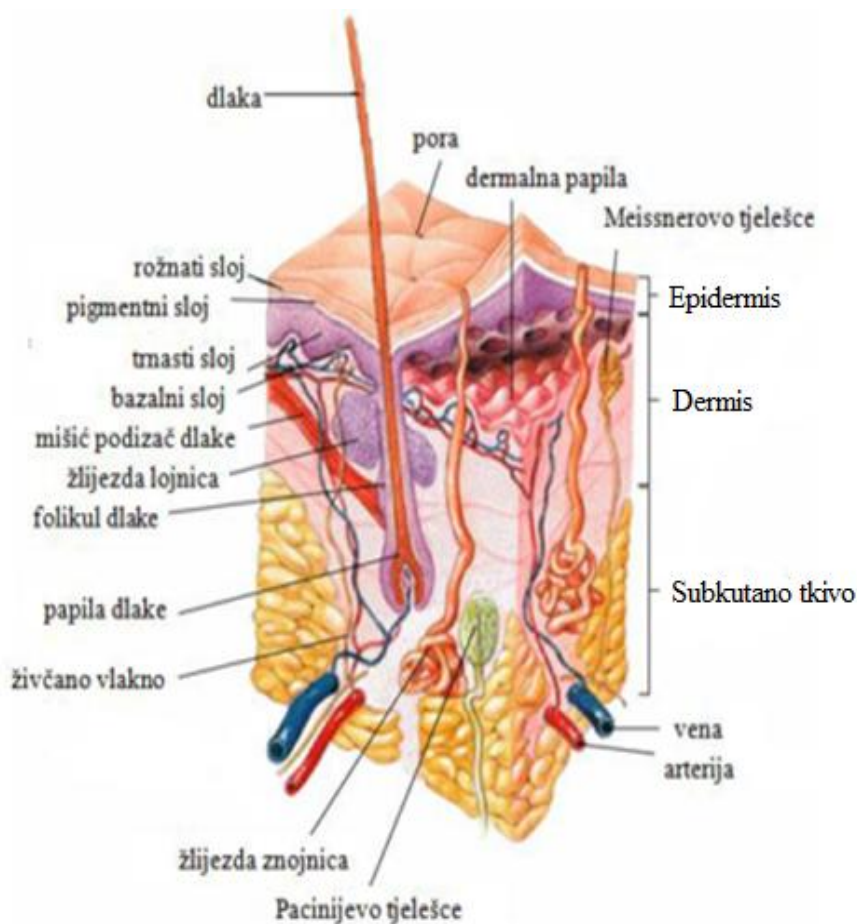
Svojstva transdermalnih terapijskih sustava ovise o molekulskoj masi, lipofilnosti i naboju molekula (Chang i sur., 2006). Pozitivno nabijene mikročestice imaju pozitivan učinak na transdermalnu apsorpciju zbog prisustva negativnih molekula na površini kože kao što su fosfatidil kolin i ugljikohidrati. Transdermalna apsorpcija lijeka će biti veća kod neutralnog pH kože gdje su molekule na površini kože negativno nabijene (Hoeller i sur., 2009).

Jedan od popularnih transdermalnih terapijskih sustava s produljenim djelovanjem su polimerne mikročestice. Korištenje mikročestica za topikalnu primjenu kao što je retinol omogućuje dostavljanje djelatne tvari u kožu na duži period te se smanjuje sistemska

apsorpcija (Rossler i sur. 1994). Penetracija lijeka koji je uklopljen u mikročestice ovisit će prvenstveno o promjeru čestica. Dokazano je na svinjskoj koži kako PLGA mikrosfere (1-10 μ m) mogu efikasno prodrijeti kroz stratum corneum i dospjeti do epidermisa, ali veće čestice su ostajale na površini kože (Rolland i sur., 1993).

1.1.2. Struktura kože i penetracija lijeka kroz kožu

Koža je najveći organ pokrovnog tkiva sastavljen od višestrukih slojeva ektodermalnog tkiva. Funkcije kože mogu se podjeli na: zaštitnu, homeostatsku i osjetilnu. Građena je od četiri sloja: *stratum corneum*, ostali slojevi *epidermisa* (vijabilni epidermis), *dermis* i subkutano tkivo. Od kožnih privjesaka postoje: nokti, žlijezde znojnice, žlijezde lojnice te folikuli dlaka (Slika 1.).



Slika 1. Građa kože (preuzeto i prilagođeno s www.cancer.gov)

Epidermis je građen od ukupno pet slojeva različitog stupnja diferencijacije: bazalni sloj (*stratum basale*), trnasti sloj (*stratum spinosum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), rožnati sloj (*stratum corneum*).

Stratum corneum je rožnati sloj nevjabilnog epidermisa debljine 10-20 μm sastavljen od 15-25 slojeva oroženih, spljoštenih te gusto zbijenih stanica. Rožnati sloj je uglavnom građen od netopljivog keratina (~70%) i lipida (~20%) koji su integrirani u staničnu ovojnica. Kohezija terminalno diferenciranih keratinocita omogućena je intercelularnim regijama koje su sastavljene od dezmosoma i lipida. U ostale funkcije ubrajaju se sinteza melanina iz melanocita koji daje pigment koži i štiti kožu od štetnog UV zračenja. *Stratum corneum* je važan za regulaciju vode te služi kao barijera za mikroorganizme i štetne tvari.

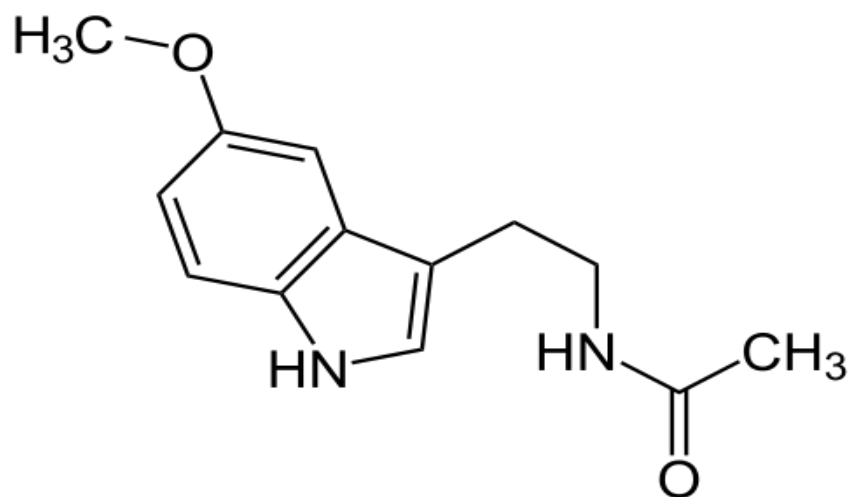
Dermis je dio kože sastavljen od vlakana kolagena uklopljenih u mukopolisaharidni matriks koji služi kao potpora te od elastičnog vezivnog tkiva koje daje elastičnost koži. Glavne funkcije *dermisa* su održavanje temperature, regulacija tlaka i boli. *Dermis* je ujedno i bitan za regulaciju krvnog protoka i topline zbog mnogih krvnih žila koje čine arteriovenske anastomoze.

Subkutis, odnosno hipodermis je građen od masnoga tkiva.

Bioraspoloživost djelatne tvari u koži ovisit će o brojnim faktorima kao što su koeficijent razdiobe lijeka između rožnatog sloja i podloge gdje je lijek suspendiran ili otopljen i stupanj difuzije lijeka unutar rožnatog sloja. Tvari s koeficijentima razdiobe koji pokazuju da se tvar može otopiti i u lipidnom i u vodenom mediju će najbrže prodrijeti kroz kožu (Gibson, 2009). Djelatna tvar kroz kožu prolazi intercelularno (kroz međustanične prostore) ili intracelularno (kroz rožnate stanice). Kada je prolaz djelatne tvari intracelularan, tada su proteinski filamenti put za prolaz polarnih tvari, a lipidni medij gdje su uloženi filamenti put transporta lipidnih tvari (Čajkovac, 2005). Bioraspoloživost djelatne tvari ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima tvari, ali i o koeficijentu raspodjele i topljivosti molekule. Veličina djelatne tvari i svojstva vezanja utjecat će na difuziju kroz rožnati sloj, a izlazak molekule iz epidermisa odnosno dermisa ovisit će o protoku krvi. Ostali načini ulaska i prolaska tvari kroz kožu su transsudoriferalni, odnosno putem žlijezda lojnica te pilosebacealni, odnosno kroz folikule dlake i lojnice.

1.2. Melatonin

Melatonin, također poznat kao N-acetil-5-metoksitriptamin, prikazan je na slici 2., hormon kojeg luči pinealna žlijezda. Melatonin ritmično prenosi informaciju o duljini dana cirkadijalnom i cirkventnom sustavu (Reiter, 1993). Navedena informacija je bitna za proces spavanja, regulaciju temperature i sezonske reproduktivne promjene (Arendt, 1998). On posjeduje pleiotropnu aktivnost kao: hormon, neurotransmiter, citokin i modifikator biološkog odgovora (Reiter i sur., 2010). Mnoge od njegovih aktivnosti koje nisu povezane s primarnom neurohormalnom funkcijom povezane su s protuupalnim djelovanjem, uklanjanjem slobodnih radikala i aktiviranjem antioksidansa (Gomez-Florit i sur., 2013).



Slika 2. Struktura melatonina (preuzeto s www.swolept.com)

Pokazalo se da melatonin posjeduje antibakterijski učinak protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kao i sposobnost poboljšavanja procesa cijeljenja rana, što se pripisalo sposobnosti da mogu pristupiti slobodnom obliku željeza i masnim kiselinama (Tekbas i sur., 2008; Srinivasan i sur., 2012). Melatonin također sadrži imunomodulirajuća svojstva tako što aktivira imunološki sustav regulacijom produkcije citokina i imunokompetentnih stanica. Kliničke studije su pokazale kako melatonin reducira adheziju proupalnih citokina. Eksperimentalno je dokazano da melatonin ima neuroprotektivnu ulogu kod

neurodegenerativnih bolesti u kojima je živčani sustav oštećen zbog oksidativnog stresa (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Melatonin pokazuje antitumorsko djelovanje tako što sprječava stanična oštećenja putem neurohormalne regulacije te ima antiproliferativni učinak. Utvrđeno je da modificira omjer cGMP i cAMP te tako regulira stanične metaboličke procese i proizvodnju antioksidansa (Fontenot i sur., 1990). Također, pokazao je antigonadotropno i antiestrogeno djelovanje u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima hormon ovisnih tumora (Cos i sur., 2003). Također, modulacijom enzima uključenih u lokalnu sintezu estrogena regulira ekspresiju estrogenskih receptora (Mediavilla i sur., 2010).

1.2.1. Melatonin u koži

Melatonin utječe na funkcije i strukture kože putem procesa na površinskim stanicama i nuklearnim receptorima na koži. Učinci se dijele na ovisne i neovisne o receptoru koji štite od oksidativnog stresa i mogu ublažiti oštećenja uzrokovana ultraljubičastim zračenjem. Rasprostranjena ekspresija i pleiotropna aktivnost kožnog melatoninergičkog sustava osigurava visoku razinu selektivnosti stanica. Svojstva endogenog melatonina upućuju da je ova molekula važan efektor stresnih odgovora u koži te da može neutralizirati ili ublažiti okolišne i endogene molekule koje uzrokuju stres (Slominski i sur., 2008). Na temelju navedenih svojstava melatonin se koristi i za topikalnu primjenu.

1.3. Sušenje raspršivanjem

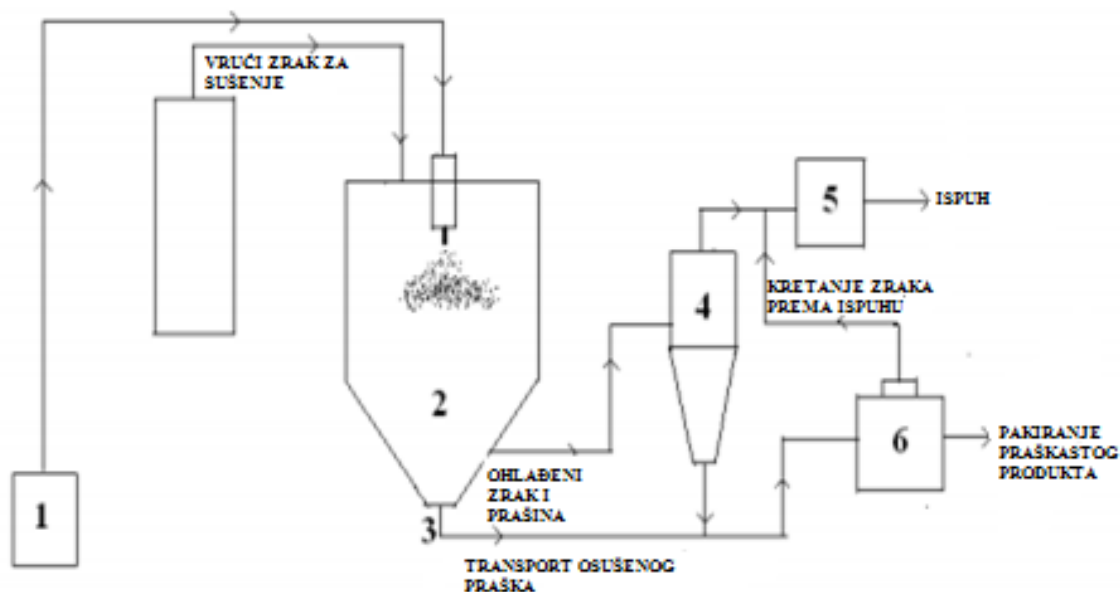
Za vrijeme drugog svjetskog rata postojala je potreba za smanjenjem transportne mase hrane i drugih materijala. Tehnikom sušenja raspršivanjem omogućeno je da hrana tekućeg oblika prijeđe u formu praška, granula ili aglomerata, što ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima hrane te tehnici sušenja. Danas se navedenom tehnikom stabiliziraju tvari i amorfni oblici, koristi se za granuliranje, oblaganje i mikrokapsuliranje lijekova, te za pripravu mikročestičnih terapijskih sustava (www.indjst.org).

Tehnika sušenja raspršivanjem omogućuje dobivanje sferičnih i nesferičnih čestica koje mogu biti kompaktne ili udubljene s različitim svojstvima površine i brzinom otapanja. Dobivene

čestice mogu biti u rasponu od 1 do 1000 mikrometara. Proces sušenja je brz i omogućuje sušenje jako osjetljivih supstancija (enzimi, vitamini i hormoni) na visokim temperaturama. Lijekovi koji se proizvode raspršivanjem sadrže djelatnu tvar u amorfnom obliku jer se naglim uklanjanjem vode onemogućava kristalizacija. Ova tehnologija primjenjuje se kod lijekova slabo topljivih u vodi jer njihov topljiviji amorfni oblik omogućuje veću bioraspoloživost i bolji terapijski učinak. Primjerice antibiotik novobiocin kao amorfni oblik ima deset puta veću topljivost i bioraspoloživost u odnosu na kristalni oblik. Općenito granulati koji nastaju navedenom tehnikom imaju poboljšana svojstva tečenja, bolju distribuciju čestica i zahtijevaju manje sredstva za močenje. Dobiveni granulati mogu sadržavati koprecipitiranu djelatnu tvar (eng. API¹) u obliku stabilne amorfne čvrste disperzije čime se povećava bioraspoloživost brojnih lijekova kao što su tolbutamin i indometacin. (www.indjst.org).

Proces sušenja raspršivanjem sastoji se od nekoliko važnijih koraka prikazanih na Slici 3. (www.indjst.org). Za početak je bitno da je sirovina odgovarajuće koncentracije. Sirovina premale koncentracije neće biti u potpunosti osušena na kraju procesa, dok sirovina prevelike koncentracije može začepiti sapnicu. Prvi korak je raspršivanje pod tlakom zraka čime nastaje atomizirana tekućina u obliku kapljica koja dolazi u kontakt s vrućim plinom što čini optimalne uvjete za isparavanje. Slijedeća faza započinje kada nema dovoljno vlage čime je onemogućeno održavanje zasićenih uvjeta na površini kapljica uzrokujući stvaranje forme suhih ljuski na površini kapljica. Evaporacija tada ovisi o difuziji vlage kroz navedenu formu zbog čega se povećava debljina kapljica. Posljednja faza je odjeljivanje osušenog produkta koje se provodi ciklonima i elektrostatskim precipitatorima.

¹ eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*



Slika 3. Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (1-sirovina, 2-ćelija za sušenje, 3-osušeni produkt, 4-ciklon, 5-mokri postupak, 6-vrećica filtera) (preuzeto i prilagođeno s <http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/30719>)

Elementarni dio svakog raspršivača sušenjem o kojem ovisi uspješnost cijelog procesa je sapnica. Ona mora raspršivati sirovinu u male kapljice koje su dobro distribuirane i temeljito izmiješane s vrućim plinom. Kapljice koje su prethodno nastale ne smiju biti prevelike jer tada nisu dovoljno osušene, a ne smiju biti premale kako ne bi došlo do njihovog pregrijavanja i začepljenja sapnice. Atomizacija se može vršiti kao: zračna atomizacija, atomizacija bez zraka uz pomoć mlaznica, tlačna atomizacija, atomizacija rotirajućim ili disk mlaznicama te ultrazvučna atomizacija (www.indjst.org).

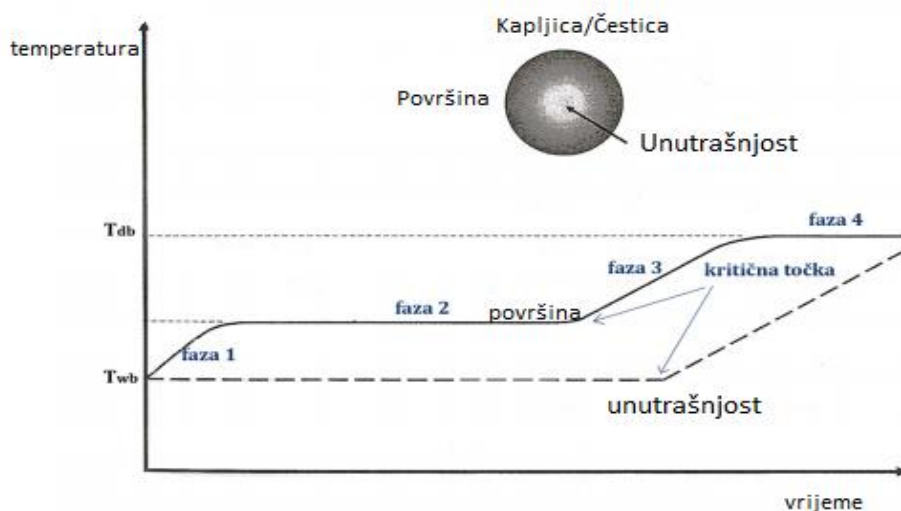
Važna komponenta sušenja raspršivanjem je i protok zraka. Kod istostrujnog zračenja sprej, odnosno mlaznica je usmjerena u smjeru gibanja vrućeg zraka pa oni zajedno prolaze kroz komoru u istom smjeru. Kod protustrujnog zračenja vrući zrak i mlaznica nalaze se sa suprotnih strana, a također postoji i kombinacija navedenih strujanja zraka. Unutar zračne komore potrebno je održati određeni protok zraka i spriječiti taloženje parcijalno osušenih kapljica na stjenke komore ili na atomizator (www.indjst.org).

Kritični parametri u uređaju za sušenje raspršivanjem su: ulazna i izlazna temperatura zraka, viskoznost, sadržaj krute tvari, površinska napetost, temperatura sirovine te vrsta otapala.

Potrebno je regulirati ulaznu temperaturu zraka jer kod povišenih temperatura evaporacija se brže odvija što za posljedicu može imati promjenu fizikalno-kemijskih svojstava kod termolabilnih tvari. Izlazna temperatura zraka je važna za regulaciju konačnog sadržaja vlage i veličinu čestica u suhoj tvari. Za viskoznost je poželjno da je niže vrijednosti jer je tada potrebna niža energija i tlak da nastanu pravilne kapljice. Vrlo visoka viskoznost sprječava pravilno formiranje kapljica. Dodatkom površinski aktivnih tvari može se značajno smanjiti površinska napetost čime se mogu dobiti manje kapljice. Brzina evaporacije, odnosno cjelokupnog procesa sušenja će biti veća što je temperatura početne sirovine viša. Dobro isparavanje otapala uvijek je poželjno u procesima sušenja, a u većini slučajeva kao otapalo služi voda. Za odabir materijala mlaznica važno je da ne dođe do abrazije i da je otporno na koroziju te se stoga najčešće koristi nehrđajući čelik i volframov karbid (www.indjst.org).

1.3.1. Stvaranje mikročestica sušenjem raspršivanjem

Tehnika sušenja raspršivanjem omogućuje stvaranje mikročestica koje nisu samo pasivni nosači lijeka već predstavljaju terapijski sustav koji omogućuje kontrolirano oslobađanje lijeka (Vehring, 2008). Dodirna površina između otapala i medija za sušenje se povećava raspršenjem kapljica u mikročestice, a time se ubrzava prijenos topline i ubrzava isparavanje otapala. Na slici 4. je prikazan proces sušenja mikrokaplje i njezine izloženost toplini medija za sušenje.



Slika 4. Promjena temperature u ovisnosti o vremenu tijekom sušenja raspršivanjem

Tijekom isparavanja otapala događa se prijenos topline između zagrijanog zraka i kapljica te prijenos mase isparenog otapala kroz granični sloj oko kapljice u medij za sušenje. Proces prijenosa topline i mase ovisit će o vlažnosti i temperaturi medija za sušenje, relativnoj brzini gibanja kapljica te promjeru kapljica (Masters, 1985). Sušenje raspršivanjem započinje isparavanjem (faza 1, sl.4). Tijekom faze 2 (sl. 4) otapalo isparava konstantnom brzinom sve dok je vanjski sloj zasićen otapalom koje difundira iz unutrašnjosti prema površini mikrokapljice. Površina mikrokapljice tada ima konstantnu temperaturu, koja je zbog trošenja topline na proces isparavanja, niža od izlazne temperature medija za sušenje. Brzina isparavanja se održava do kritične točke gdje započinje čvrsta faza (Masters, 1985). Nakon toga dolazi do smanjenja brzine isparavanja otapala zbog povećanog otpora prijenosu mase unutar mikročestice (faza 3, sl. 4). Slijedi porast temperature površine unutrašnjosti mikročestice. Temperatura mikročestice u završnoj fazi 4 (sl. 4) označena je kao T_{db} , temperatura suhe mikročestice. Produkt sušenja neće postići ulaznu temperaturu medija za sušenje, stoga se tehnologija može koristiti za termolabilne materijale. Na temelju prikazanog proizlazi da je temperatura bitan procesni parametar tijekom sušenja raspršivanjem jer utječe na dinamiku isparavanja otapala o kojoj ovisi morfologija nastalih mikročestica (Vehring i sur., 2007).

1.4. Dizajn eksperimenta

Primjena statističkih metoda u planiranju, provedbi i analizi rezultata dobivenih tijekom istraživanja postala je standard u razvoju farmaceutskih oblika. Glavni cilj primjene statistički planiranih pokusa u industriji je reducirati broj potrebnih pokusa te istovremeno dobiti kvalitetnu informaciju o istraživanom procesu (Ukrainczyk, 2010).

Dostupni statistički programski paketi generiraju plan pokusa prema klasičnim matematičkim modelima ili prema posebnim iterativnim algoritmima uz zadane uvjete.

Definitivni pretražni dizajn je algoritmom producirani dizajn posebno koristan u situacijama kada se očekuje prisutnost i interaktivni utjecaj između ispitivanih faktora te postoji mogućnost pojave nelinearnih utjecaja faktora na mjereni parametar. Pretražni planovi se najčešće koriste kako bi se unutar malog broja pokusa utvrdili faktori s najvećim utjecajem na ispitivani parametar (Jones i Nachtsheim, 2011).

U definitivnom pretražnom dizajnu faktori se ispituju unutar određenog područja. Granične razine (niska i visoka) ispitivanih faktora predstavljaju krajnje razine unutar kojih se može dobiti produkt zadovoljavajućih svojstava. Tijekom definiranja dizajna često se dodaju centralne točke sa srednjim vrijednostima faktora kako bi se mogla utvrditi priroda ovisnosti (linearna, kvadratna...).

1.5. Veličina čestica

Poznavanje veličine čestica ishodnih sirovina te gotovih pripravaka važno je za terapijski učinak lijeka, stabilnost, oblikovanje i skladištenje. Za različite materijale i različite veličine čestica postoje drukčije metode određivanja, a dobiveni rezultati se ne mogu uvijek uspoređivati. Postupci određivanja veličina čestica se dijele na tzv. direktne i indirektne. Direktno određivanje veličine čestica temelji se na određivanju neke stvarne veličine, primjerice mikroskopom, dok se kod indirektnih metoda mjeri svojstvo koje ovisi o veličini (npr. specifična površina) te se onda preračunava kolika je veličina čestica. Stoga, kada se navodi parametar veličine vrlo bitno je dati i metodu kojom je on određen.

Najjednostavnija i u praksi najčešće provedena metoda određivanja veličina čestica je sijanje. Ono se izvodi uz pomoć niza standardnih sita složenih jedno ispod drugoga sa sve manjim otvorima. Sita su u obliku mrežice koja je napravljena od tankih metalnih niti određene debljine. Promjer čestica se definira veličinom pravokutnog otvora sita kroz koji je prošla čestica i veličinom otvora gdje se zaustavila. Kod prosijavanja prašaka koji nisu pravilnih dimenzija orijentacija čestica može također utjecati hoće li čestica proći kroz sito. Ako je razdvajanje uvjetovano volumenom, odnosno masom čestica tada je riječ o masenoj razdiobi u kojoj je granica prosijanja od 50 do 60 mikrometara (Jalšenjak i sur., 1998).

Veličina čestica može se određivati i mikroskopom kojim se mjeri duljina karakteristične dimenzije baždarnim okularnim mikromjerom. U analizi se koristi nekoliko dogovorenih pristupa određivanja promjera. Promjer prema Martinu, d_M , koji je definiran kao dimenzija koja je paralelna sa zamišljenim pravcem koji dijeli česticu na dvije jednake površine. Ferretov promjer, d_F , najveća je dimenzija paralelna sa zamišljenim pravcem. Određivanjem veličine čestica mikroskopom dobivamo numeričku razdiobu, a potrebno je izmjeriti oko 3000 čestica kako bi bili sigurni u reproducibilnost rezultata. (Jalšenjak i sur., 1998).

Sedimentacijska analiza temelji se na Stokesovom zakonu sedimentacije i provodi se u Andreasenovu aparatu. Dobiveni promjer naziva se Stokesov promjer, d_{St} , te on predstavlja promjer zamišljene okrugle čestice koja ima istu brzinu sedimentacije kao nepravilna čestica koja se promatra. Rezultati dobiveni ovom metodom također predstavljaju masenu razdiobu veličine čestica (Jalšenjak i sur., 1998).

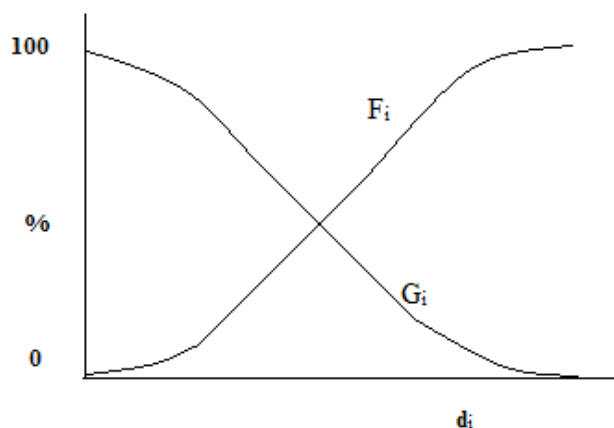
Laserska difrakcija je trenutno jedna od najčešće korištenih tehnika za analizu veličine čestica. Instrumenti laserske difrakcije mjere kutne ovisnosti intenziteta raspršene svjetlosti laserske zrake na česticama. Korištenjem optičkog modela za interpretaciju podataka o raspršenju može se izračunati raspodjela veličine čestica (www.malvern.com).

Dinamičko raspršenje svjetlosti je tehnika za mjerenje veličine čestica u submikronskoj regiji. Temelji se na Brownovom gibanju koje se mjeri i preračunava na veličinu čestica. Brownovo gibanje je nasumično kretanje čestica zbog bombardiranja od strane molekula otapala koje ih okružuju. Za veće čestice bit će sporije Brownovo gibanje, dok se manje čestice kreću brže (www.malvern.com).

Primjer indirektne metode određivanja veličine čestica je BET metoda u kojoj se mjeri specifična površina praškastog materijala adsorpcijom dušika na površinu čestica. Iz razlike tlaka prije i poslije adsorpcije plina u monomolekularnom sloju oko čestica može se izračunati specifična površina uzorka. (Jalšenjak i sur., 1998).

U metodi gdje se koristi Coulterovo brojilo određuje se električna vodljivost. Krute čestice se dispergiraju u otopini elektrolita i prolaze kroz mali otvor te ispunjavaju prostor između dvije elektrode. Vodljivost elektrolita se smanjuje obrnuto proporcionalno veličini čestica i dobivena raspodjela je brojčana (Jalšenjak i sur., 1998).

Prilikom određivanja veličina čestica uvijek se govori o skupu čestica, stoga su dobiveni rezultati ustvari razdioba veličine čestica svrstanih u klase. Zbog toga se rezultati prikazuju funkcijama razdiobe, a to su diferencijalna i kumulativna (krivulja ostatka i prolaska) krivulja. Funkcijom ostatka, G_i , prikazuje se kumulativni udio materijala s česticama koje su veće od promatrane veličine (npr. kod sitene analize to je postotak ukupne mase materijala koji je zadržana na svim sitima u odnosu na promatrano). Funkcija prolaza, F_i , govori o kumulativnom udjelu materijala s česticama koje su manje od promatrane veličine kao što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Krivulja ostatka (G_i) i prolaza (F_i)

Diferencijalna krivulja je udio mase supstancije u svakoj klasi, a u slučaju normalne raspodjele riječ je o Gaussovoj krivulji. Kod granulometrijske analize za aproksimaciju rezultata koriste se logaritamska normalna funkcija (prema Hatchu i Choatu) i RRSB funkcija. Navedenim funkcijama prikazuju se kumulativni udjeli zbog linearizacije rezultata i dobivanja parametara koji omogućuju usporedbu različitih uzoraka. Kada se funkcija prolaza nanese na ordinatu koja predstavlja skalu vjerojatnosti, a apscisu logaritam veličine čestica, tada se dobiju dva pravca od kojih je jedan za brojčanu (a) i drugi (b) za masenu razdiobu kao što je prikazano na slici 6. (Jalšenjak i sur., 1998).

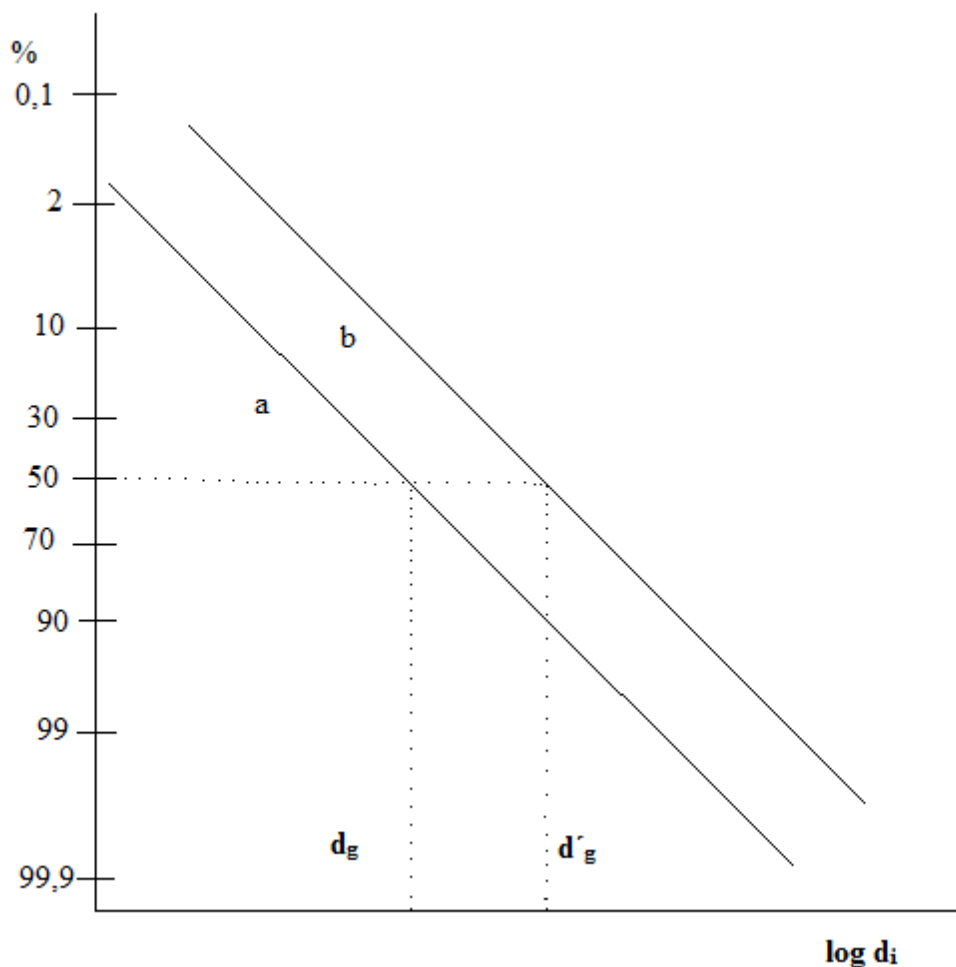
Medijan označava veličinu čestica koja odgovara vrijednosti kumulativnog udjela od 50%. Naziva se još i srednjim geometrijskim promjerom te se označuje s d'_g (masena razdioba) i d_g (brojčana razdioba). Na temelja vrijednosti iz grafa $d_{16\%}$ i $d_{84\%}$ može se izračunati geometrijska standardna devijacije, σ_g , prema formuli:

$$\sigma_g = d_{84\%} / d_g \text{ ili } d_g / d_{16\%}$$

Standardna devijacija govori o raspršenosti čestica oko medijana raspodjele. Na temelju vrijednosti d_g , d'_g i σ_g mogu se izračunati srednji promjeri iz sljedećih izraza (Jalšenjak i sur., 1998):

$$\log d_{vp} = \log d_g + 5,757 (\log \sigma_g)^2$$

$$\log d_{vp} = \log d'_g - 1,151 (\log \sigma_g)^2$$



Slika 6. Podaci dobiveni granulometrijskom analizom

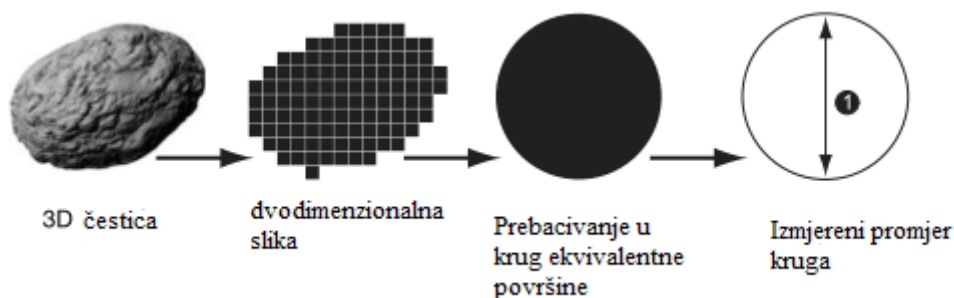
1.5.1. Morphologi G3-ID

Morphologi G3-ID je uređaj za statičku, automatiziranu analizu slike spregnutu Raman spektroskopijom koji omogućuje mjerenje morfoloških karakteristika (veličina i oblik) čestica. Korištenjem Raman spektroskopije moguće je kemijski identificirati čestice na temelju spektroskopskih algoritama ugrađenih u Morphologi program. Morphologi G3-ID karakterizira visoka osjetljivost te visoko rezolutni analitički alat za diferencijaciju i karakterizaciju uzorka čestica. Na slici 7. prikazani su sastavni dijelovi Morphologija G3-ID: digitalna kamera, optička jedinica, nosač uzorka, stražnja priključna ploča, integrirana disperzijska jedinica, pomična ploča, i upravljačka palica za ručno pomicanje pomične ploče.



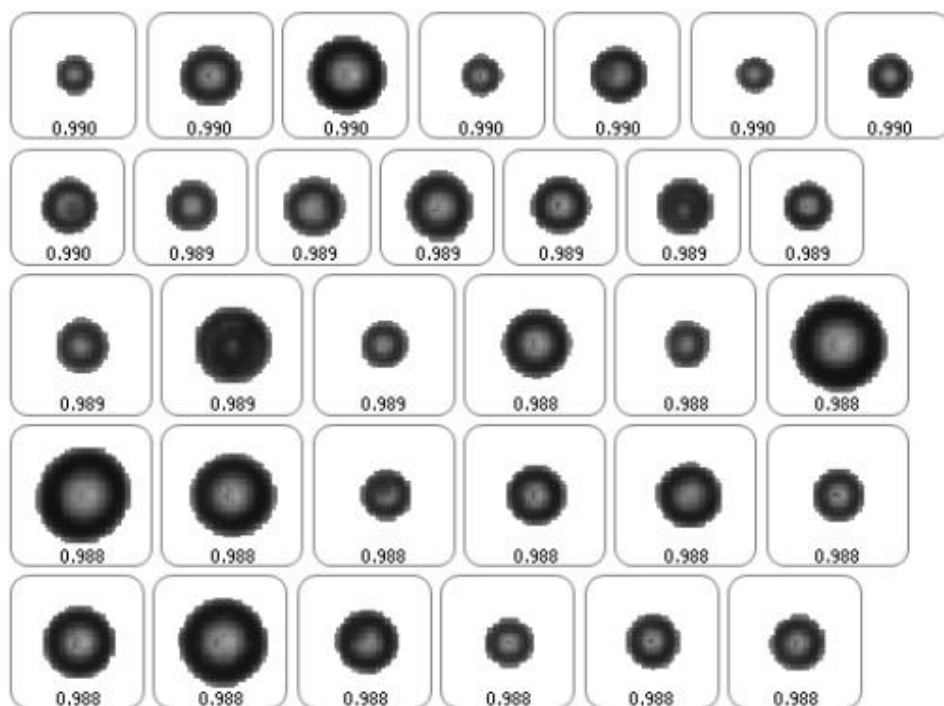
Slika 7. Morphologi G3-ID

Za provedbu točnog i pouzdanog mjerenja potrebno je adekvatno pripremiti optimalnu disperziju uzorka. Kod prašaka s dobrim svojstvima tečenja može se koristiti priprema suhe disperzije jednostavnim posipanjem uzorka po staklenoj ploči. Proces mjerenja koji je automatiziran započinje standardnim operacijskim postupkom. Za određivanje veličine trodimenzionalne čestice koristi se digitalna kamera za dobivanje dvodimenzionalnih slika raspršenih čestica uzorka. Dobivena 2D slika se prebacuje u krug koji je ekvivalentan površini 2D slike kako je prikazano na slici 8. Uređaj određuje veličine čestica od $0,5\mu\text{m}$ do $1000\mu\text{m}$. Dobiveni podaci temelje se na pojedinačnim česticama koje se identificiraju digitalnim određivanjem praga intenziteta te na uzorku kao cjelini nakon čega se analizom ispituju oblik, veličina te druga fizikalna svojstva (www.malvern.com).



Slika 8. Određivanje promjera veličine čestica (preuzeto i prilagođeno s www.malvern.com)

Analizom pojedinih čestica dobiva se identifikacijski broj unutar kojeg se nalaze morfološki podaci i XY koordinate na predmetnom stakalcu. Automatskom analizom od 10000 do 100000 čestica omogućena je statistički reprezentativna distribucija čestica. Za precizno određivanje veličine čestice potrebno je odrediti parametre koji karakteriziraju oblik čestice. Svaka pojedina čestica opisana je sljedećim parametrima oblika: promjerom, duljinom, širinom, opsegom, glavnom osi, površinom izraženom u pikselima, površinom izraženom u μm^2 , kružnošću, konveksnošću, elongacijom, čvrstoćom, standardnom devijacijom intenziteta slike te položajem u koordinativnom sustavu. Najčešće se određuju parametri kružnosti, konveksnosti i elongacije. Slikom 9. vizualno su prikazane pojedine čestice koje su filtrirane na temelju parametra kružnosti. Nakon automatskog snimanja cijelog uzorka, potrebno je ručnim pregledom i analizom čestica, na temelju karakterističnih parametara, odrediti koje su čestice izvorne, a aglomerate i nepravilne čestice izdvojiti iz razdiobe.



Slika 9. Dvodimenzionalni prikaz pojedinih čestica

Kružnost je parametar koji kvantificira koliko je blizu oblik čestice savršenom krugu. Konveksnošću se određuje hrapavost površine čestica tako što se podijeli konveksni opseg s pravim opsegom čestice. Tijekom analize veličine čestica pripremljenih tehnikom raspršivanja zadani parametar konveksnosti bio je iznad vrijednosti 0,9. Elongacija je definirana kao omjer širine i duljine. Ona će iznositi 0 ukoliko postoji simetrija u svim smjerovima kao što je u krugu ili kvadratu. Ukoliko je omjer širine i duljine veći, vrijednost elongacije je bliža vrijednosti 1. Statistika distribucije izračunava se iz rezultata pomoću izvedenih promjera $D[m, n]$. $D[n, 0.5]$ označava promjer čestica izražen u mikronima gdje je 50 % čestica manje i 50 % veće od određene vrijednosti. $D[n, 0.1]$ i $D[n, 0.9]$ prikazuju vrijednost promjera čestice ispod kojeg se nalazi 10 %, odnosno 90 % uzorka (www.malvern.com).

1.6. Zeta potencijal

Elektrostatski potencijal čestica ili molekula u određenom mediju naziva se zeta potencijal te on proizlazi iz površinskog naboja, koncentracije i vrste iona u otopini. Stabilnost uzorka koja se manifestira većom otpornošću na flokulaciju i agregaciju čestica, bit će tim veća što je veći naboj na površini čestica. Korištenjem surfaktanata i različitih elektrolita regulira se stabilnost tako što se mijenja: pH, ionska koncentracija te vrste iona. Poznavanje zeta potencijala čestica važno je kod odabira formulacije kako bi se odabrao prikladan materijal koji osigurava stabilnost i povećava rok trajanja. Također poznavanjem zeta potencijala može se predvidjeti interakcija čestica s površinom (www.malvern.com).

1.6.1. Naboj u polarnim medijima

Čestice u koloidnim suspenzijama ili emulzijama imaju naboj koji je češće negativan nego pozitivan. Ponekad površine čestica sadrže kemijske grupe koje ionizacijom stvaraju površinski naboj, ali moguće je da se na površine čestica adsorbiraju određeni ioni koji mijenjaju naboj jedne strane čestice u odnosu na drugu. Također je moguće dodati kemijske spojeve koji se dominantno adsorbiraju na površinu čestica i stvaraju naboj. Sve tvari koje dođu u kontakt s polarnim medijem će spontano poprimiti električni naboj. Najvažniji mehanizmi koji dovode do promjene naboja u polarnom mediju su: razlika u elektronskom afinitetu između dvije faze, ionizacija površinskih kemijskih grupa, diferencijalna ionska adsorpcija iz otopine elektrolita, diferencijalno ionsko otapanje iz kristalne rešetke, površinska anizotropija i izomorfna supstitucija. Razlike u elektronskom afinitetu su odgovorne za stvaranje potencijala između različitih metala te je dominantni proces u određivanju površinskog naboja u metalnim otopinama. Ionizacija površinskih kemijskih grupa je mehanizam uočen kod površina čestica s metalnim oksidima, karbonilnim i amino skupinama (proteini, ionski polimeri, polielektroliti). Ionizacija i disocijacija navedenih kemijskih skupina ovisit će o pH disperzijskog medija. U diferencijalnoj ionskoj adsorpciji iz otopine elektrolita neto površinski naboj proizlazi iz nejednolike adsorpcije suprotno nabijenih iona što rezultira pozitivnim ili negativnim neto nabojem na površini čestice. Ukoliko je prisutan površinski aktivna tvar, tada on određuje neto naboj.

1.6.2. Električna svojstva tvari u nevodenom mediju

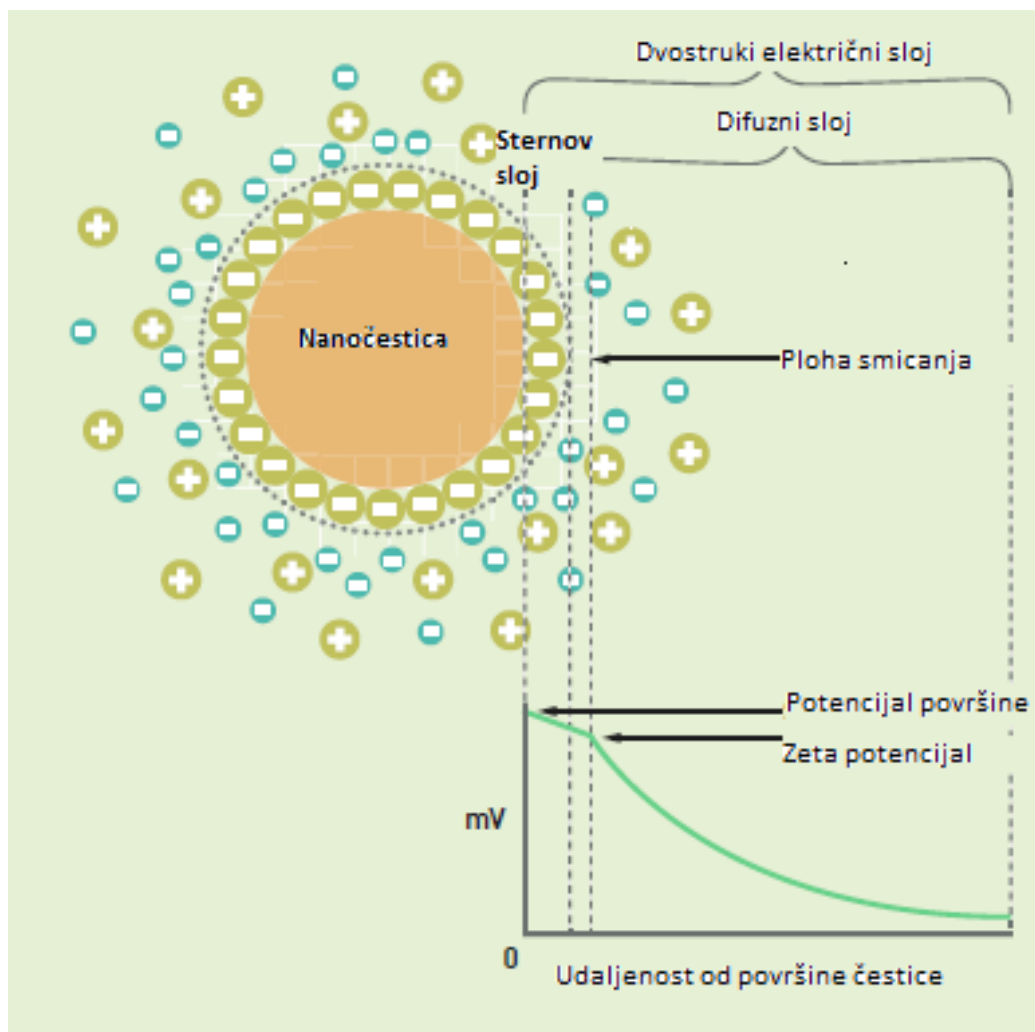
U otapalima s nižom vrijednošću dielektrične konstante određen stupanj ionizacije je moguć, a mehanizmi stvaranja naboja su slični kao u vodenom mediju. Primjeri tvari koje donekle disociraju u spomenutim otapalima su: aldehidi, ketoni, niskomolekularni alkoholi i amini. Iako se ne može odviti potpuna ionizacija elektrolita u nepolarnom mediju, čestice dispergirane unutar takvog medija mogu dobiti naboj i elektrostatske sile koje igraju presudnu ulogu u stabiliziranju nevodenih suspendiranih oblika. To se može objasniti kiselo-baznim interakcijama između površine čestica i dispergirane tvari, a to je ujedno i razlog zašto se bazični i kiseli polimeri koriste za izradu suspenzija u nevodenom mediju (www.particlesciences.com).

1.6.3. Dvostruki električni dvosloj

Površine čestica unutar dispergirane faze mogu biti električki nabijene zbog prisustva suviška iona ukoliko je došlo do disocijacije površinskih skupina ili adsorpcije iona iz otopine. Uz negativno nabijenu površinu čestica čvrste faze nalaze se pozitivno nabijeni ioni u otopini na način da ih je najviše u blizini površini čestice, a kako se povećava udaljenost od same površine time se izjednačava broj negativnih i pozitivnih iona kako je prikazano na slici 10. Navedena pojava se naziva dvostruki električni dvosloj koji se sastoji od tri dijela. Prvi sloj se sastoji od negativnih iona adsorbiranih na površini dok drugi sloj koji se zove Sternov sloj čine pozitivni ioni. Treći sloj je difuzijski dio dvostrukog električnog sloja i zove se Gouy-Chapmanov sloj. Na temelju recipročne vrijednosti Debye-Hückelovog parametra može se odrediti debljina difuzijskog sloja:

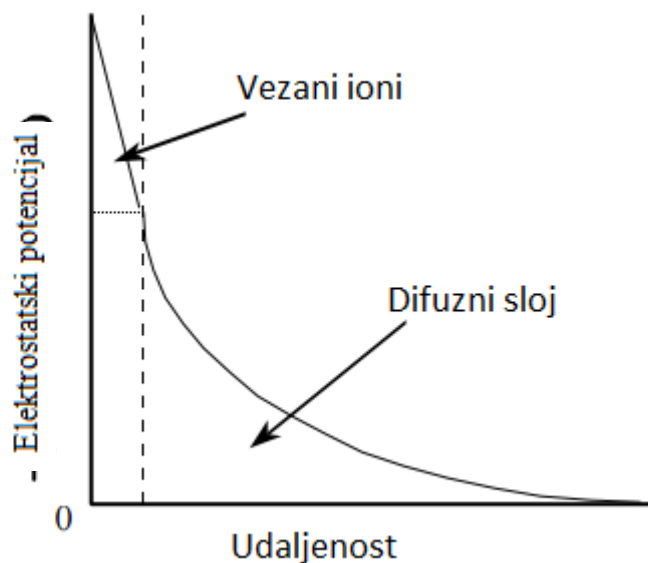
$$\delta = 1/\chi$$

Gornji izraz prikazuje kako se debljina difuzijskog sloja smanjuje s koncentracijom elektrolita u sustavu. Dvostruki električni sloj se može slikovito prikazati kao električni kondenzator sastavljen od dviju suprotno nabijenih površina.



Slika 10. Shematski prikaz zeta potencijala (preuzeto i prilagođeno s www.malvern.com)

Slika 11. prikazuje ovisnost promjene potencijala o udaljenosti od površine čestice. Potencijal ima najvišu vrijednost na površini čestice te potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim se eksponencijalno smanjuje (Gouy-Champmanov sloj). Pojava kod koje se nabijene dispergirane čestice se kreću unutar električnog polja prema elektrodi suprotnog predznaka naziva se elektroforetska gibljivost. Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala gibaju se zajedno s nabijenom česticom, pri čemu se kreću plohom smicanja u odnosu na ostale molekule otapala. Potencijal koji se nalazi na udaljenosti plohe smicanja naziva se elektrokinetički zeta potencijal. On se može jednostavno odrediti iz elektroforetske pokretljivosti čestica, a stabilnost pripremljenih disperzija ovisi o njemu i naboju na površini dispergirane faze (Jalšenjak i sur., 1998).

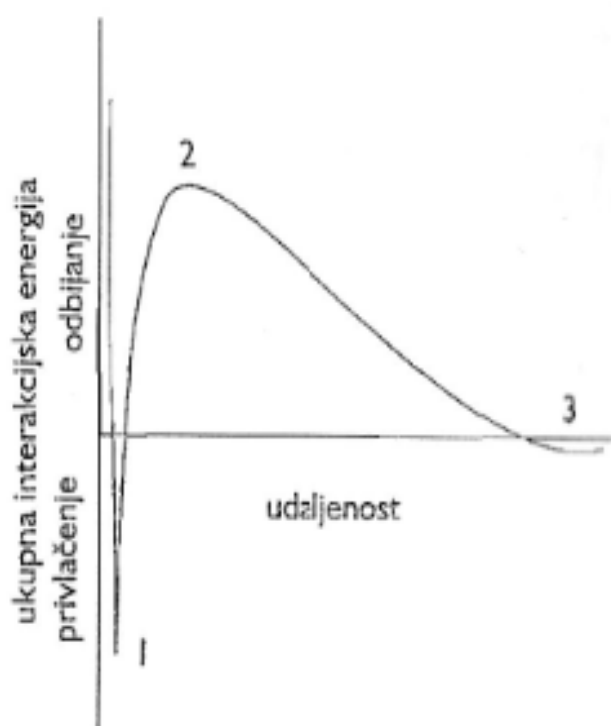


Slika 11. Zeta potencijal u blizini negativno nabijene sferične čestice (preuzeto i prilagođeno s <http://www.colloidal-dynamics.com/>)

1.6.4. Aglomeracija dispergiranih čestica

Nestabilnost suspenzija i emulzija proističe iz aglomeracije prvotno dispergiranih čestica. Veći aglomerati će brže sedimentirati, odnosno vrhnjeti u skladu sa Stokesovim zakonom. Upravo iz tog razloga potrebno je pripremiti disperzije koje su stabilne i koje je moguće redispergirati. Aglomeracija čestica se događa kada se one međusobno približe na dovoljno mali razmak te tada djeluju dvije vrste sila. To su privlačna London – van der Waalsova disperzijska sila i elektrostatske odbojne sile između nabijenih površina ukoliko su čestice istog naboja. Zbrajanjem energije privlačenja i energije odbijanja za svaku udaljenost između čestica dobije se interakcijska energija čestica. Kada privlačne sile nadmašuju odbijanja na svim udaljenostima, tada je disperzija nestabilna jer nema energetske barijere i ona će aglomerirati brzinom određenom brzinom difuzije čestica kako je prikazano na slici 12. Ukoliko je površinski potencijal reduciran ili je ionska jakost povećana, barijera se snizuje, a disperzija polagano aglomerira. Čestice će aglomerirati u tzv. primarnom minimumu u kojem su udaljene nekoliko nanometara, ako se približe na manju udaljenost od kritične te ako posjeduju dovoljno energije da prijeđu barijeru. Tada više ne može doći do redispergiranja i to se naziva koagulacija. Do aglomeracije može doći i u sekundarnom minimumu u kojemu privlačenje između čestica sporije opada s njihovom udaljenošću od odbijanja. U ovom

slučaju moguće je redispergiranje čestica već i djelovanjem slabije mehaničke sile, a razlog tome je postojanje tankog filma vanjske vodene faze između čestica. Pošto je aglomeriranje čestica unutar primarnog minimuma ireverzibilno, potrebno je to izbjeći pri izradi disperzija (Jalšenjak i sur., 1998).



Slika 12. Ovisnost potencijalne energije o udaljenosti pri približavanju dviju dispergiranih čestica (1-primarni minimum, 2-barijera, 3-sekundarni minimum) (preuzeto i prilagođeno s Jalšenjak i sur., 1998)

1.6.5. Mjerenje naboja čestica

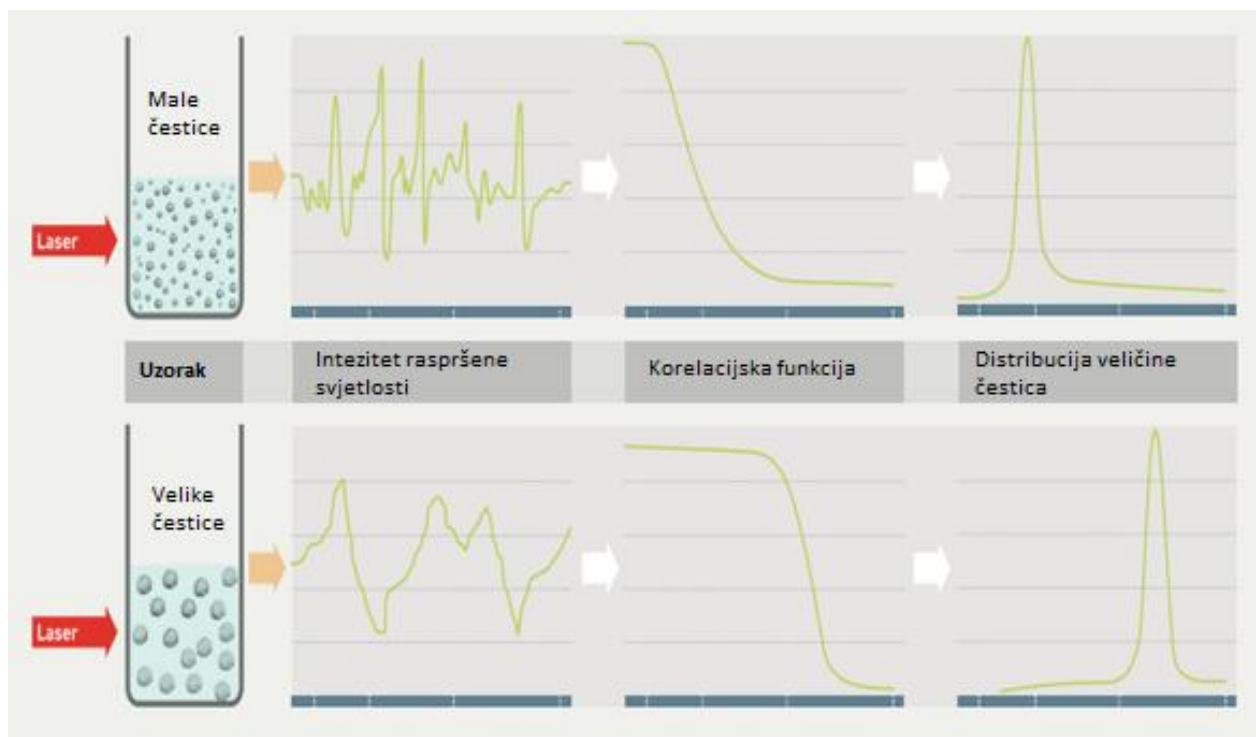
Postoji više različitih metoda kojima se može odrediti naboj čestica. Jedna od najefikasnijih metoda je elektroforeza koja se temelji na primjeni električnog polja u pripremljenoj suspenziji te se mjeri kako se čestice brzo gibaju. Čestice koje imaju veći naboj, odnosno zeta potencijal koji se razlikuje na različitim dijelovima čestice, brže će se kretati pod utjecajem električnog polja. Električno polje će istovremeno uzrokovati gibanje čestica u jednom

smjeru, ali i gibanje suprotno nabijenih čestica u drugom smjeru te ćemo kao rezultat dobiti neto naboj čestica. Porastom zeta potencijala stabilnost sustava će rasti, dok u slučaju potrebe razdvajanja čestica iz okolnog medija, poželjno je da je njegova vrijednost što manja (www.colloidal-dynamics.com).

1.6.6. Zetasizer Nano ZS

Instrument Zetasizer Nano ZS određuje zeta potencijal čestica i molekula mjerenjem njihove brzine kretanja između elektroda pod utjecajem električnog polja, a navedena pojava naziva se elektroforeza. Brzina kojom se čestice kreću proporcionalna je jačini električnog polja, odnosno vrijednosti zeta potencijala. Zetasizer Nano ZS također služi za mjerenje veličine koloida, nanočestica i molekula koji ne zahtjeva agitaciju kako bi uzorak bio prikladan za mjerenje. Instrument mjeri veličine čestica od 5 nm do 10 μ m. Na temelju veličine čestica može se odrediti molekulska masa te se mogu brže odrediti oligomerna stanja u odnosu na kromatografiju. Princip rada instrumenta bazira se na dinamičkom raspršenju svjetlosti prikazanom na slici 13. Veličina čestica se izražava kao promjer sfere koja difundira jednakom brzinom kao i mjerena čestica. Čestice i molekule koje su u konstantnom termičkom kretanju (Brownovom kretanju -nasumično gibanje čestica u otopini zbog interakcije s molekulama koje ih okružuju), difundiraju brzinom osnovanom na njihovoj veličini. Manje čestice će se u odnosu na veće gibati brže. Za dobivanje pouzdanih rezultata potrebno je kontrolirati temperaturu o kojoj ovisi Brownovo gibanje. Kod određivanja brzine difuzije koriste se mrlje koje nastaju nakon laserskog osvjetljivanja čestica. Raspršena svjetlost promatra se pod specifičnim kutem, a intenzitet se određuje putem fotodiodnog detektora.

.



Slika 13. Princip rada instrumenta Zetasizer Nano ZS

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sušenje raspršivanjem poznata je metoda pripreme mikročestica, koje nisu više samo pasivni nosači, nego su esencijalni dio terapijskog sustava koji omogućuje modulaciju oslobađanja lijeka. Svojstva takvog terapijskog sustava jednako su važna kao i svojstva samog lijeka. Tehnika sušenja raspršivanjem omogućuje dobivanje čestica s različitim svojstvima površine i brzinom otapanja. Cilj ovog rada je odrediti utjecaj procesnih parametara na veličinu i naboj mikročestica s melatoninom pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Mijenjanjem procesnih parametara brzine pumpe, temperature zraka te omjera lipida i kitozana dobit će se mikročestice koje se razlikuju u veličini i vrijednosti Z-potencijala. Poznavanje veličine čestica ishodnih sirovina te gotovih pripravaka važno je za terapijski učinak lijeka, stabilnost, oblikovanje i skladištenje. Elektrostatski potencijal čestica ili molekula u određenom mediju uvjetuje stabilnost uzorka. Naime, stabilnost koja se manifestira većom otpornošću na flokulaciju i agregaciju čestica, bit će tim veća što je veći naboj na površini čestica. Za dizajniranje plana pokusa kao i statističku obradu dobivenih podataka analize mikročestica s melatoninom koristit će se JMP program temeljen na posebnim iterativnim algoritmima uz zadane uvjete. Glavni cilj primjene statistički isplaniranih pokusa u industriji je reducirati broj potrebnih pokusa te istovremeno dobiti kvalitetnu informaciju o istraživanom procesu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripremu mikročestica korišteni su polimeri kitozan (Sigma, Japan) i Poloksamer 407 (BASF, Njemačka), lipid Compritol ATO 888 (Gattefosse, Njemačka) te melatonin (Sigma, USA).

Prilikom izrade diplomskog rada, za određivanje veličine čestica korištena je metalna špatula, 70% etilni alkohol, pročišćena voda, filter papir, predmetno stakalce i uređaj za mjerenje veličina čestica Morphologi G3 (Malvern, UK). Za određivanje zeta-potencijala korištena je analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska), lađica za vaganje, odmjerena tikvica od 200 ml, pročišćena voda, natrijev klorid (Kemika, Hrvatska), uređaj Zetasizer nano ZS (Malvern, UK), kiveta za mjerenje zeta-potencijala (Malvern, UK), šprica s filterom, metalna špatula, staklena čaša od 10 ml, filter-papir i stakleni štapić.

3.2. Metode

3.2.1. Statistički plan i obrada

Za dizajniranje plana pokusa kao i statističku obradu dobivenih podataka analize mikročestica s melatoninom korišten je JMP program. JMP je skup statističkih računalnih programa koji je namijenjen za istraživanje i vizualizaciju podataka. On matematički obrađuje unešene podatke te se postavljena hipoteza o testiranim faktorima može potvrditi ili negirati (www.jmp.com). Za analizu dobivenih podataka korišten je regresijski model, a statistička analiza je vršena metodom analize varijance.

3.2.2. Priprema mikročestica tehnikom sušenja raspršivanjem

U razrijeđenoj vodenoj otopini octene kiseline (0,5% (m/V)) otopljen je kitozan koncentracije 1% (m/V). U skladu s eksperimentalnim planom, u otopinu kitozana dodana je etanolna otopina Poloxamera 407 i melatonina, te suspenzija lipida u Poloksamernoj vodenoj otopini.

Iz miksture su pripravljene mikročestice metodom sušenja raspršivanjem u struji vrućeg zraka korištenjem laboratorijskog raspršivača (ProCept 4M8-TriX, Belgija). Uvjeti raspršivanja su podešeni u skladu s planom eksperimenta (Tablica 1).

Tablica 1. Eksperimentalni plan pokusa

Broj uzorka	Brzina pumpe (%)	Temp.zraka (° C)	Omjer lipida i kitozana (%)
1	40	125,0	62,500
2	30	117,5	46,875
3	20	110,0	31,250
4	30	125,0	62,500
5	40	110,0	46,875
6	20	125,0	46,875
7	30	110,0	31,250
8	40	125,0	31,250
9	40	110,0	62,500
10	40	117,5	31,250
11	20	125,0	31,250
12	20	110,0	62,500
13	20	117,5	62,500

3.2.3. Određivanje zeta-potencijala

Za određivanje zeta-potencijala pripremljena je 10 mM otopinu natrijevog klorida. Nakon toga je u staklenu čašu od 10 ml prenesen uzorak mikročestica s melatoninom uz pomoć metalne špatule. Navedenom sadržaju staklene čaše dodano je 5 ml 10 mM otopine natrijevog klorida i dobro je promiješan staklenim štapićem. Za mjerenje zeta-potencijala korišten je Zetasizer nano ZS, odnosno kiveta za mjerenje zeta-potencijala kako je prikazano na slici 14. Kiveta je prije početka mjerenja isprana s 10 mM NaCl-om. Nakon toga je kiveta isprana s pripremljenim uzorkom koji se dodatno mehanički dispergirao. U kivetu je prenesen odgovarajući volumen uzorka na isti način. Kiveta je zatvorena propisanim čepićima, njezine stjenke su obrisane filter-papirom i ona je unesena u Zetasizer nano ZS kojim je određen zeta-potencijal. Prikazani postupak je ponovljen na svim uzorcima mikročestica s melatoninom

koji su se razlikovali u parametrima pripreme. Za pojedine uzorke određivanje zeta-potencijala je ponovljeno i nekoliko puta.



Slika 14. Kivete za mjerenje zeta-potencijala (preuzeto i prilagođeno s www.malvern.com)

3.2.4. Određivanje veličine čestica

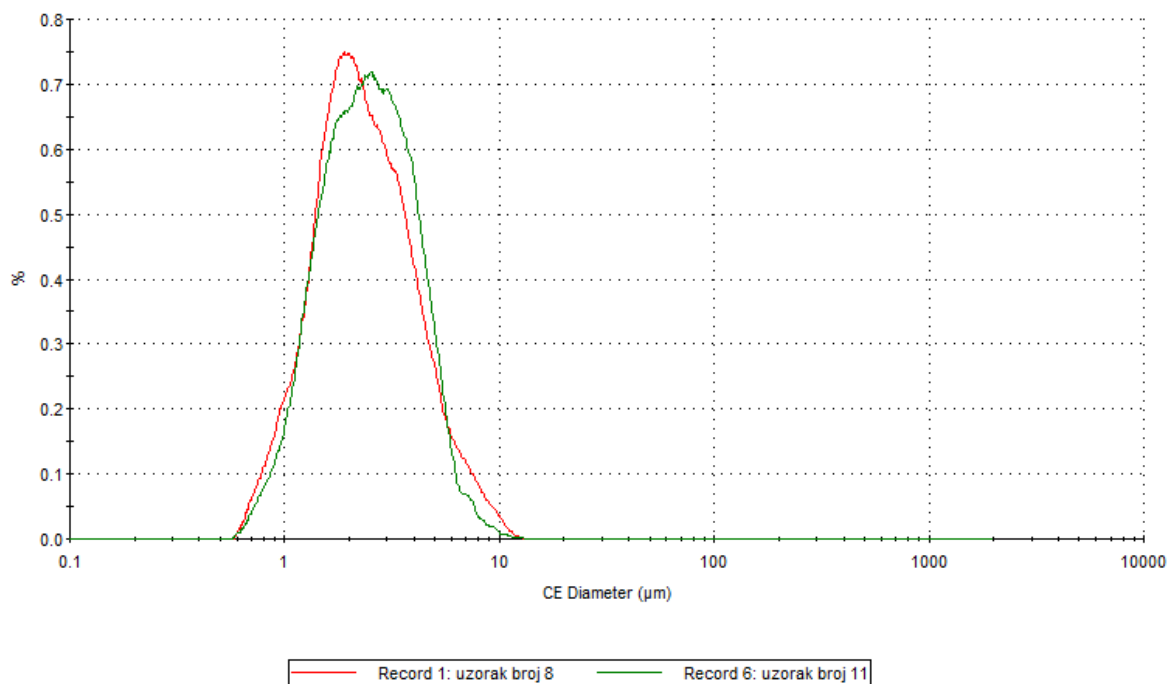
Na početku je metalnom špatulom preneseno 3 mm^3 pripremljenog praška mikročestica s melatoninom u posudu za uzorkovanje koja je sastavni dio Morphologia G3. Na stolić automatskog mikroskopa (Morphologi G3) stavljeno je predmetno stakalce. U programu navedenog uređaja su podešeni određeni parametri standardne operativne procedure. Podešen je parametar tlaka na 2,5 bara, vrijeme pritiska na 20ms i vrijeme mirovanja nakon pritiska na 90 sekundi. Također je namješteno povećanje na 20 puta, promjer površine pod kojim su promatrane čestice na 10mm, slika je kalibrirana i centrirana na način da bude dovoljno oštra. Kada je proces dispergiranja završio, započelo je snimanje veličine otprilike 8000 čestica. Na temelju parametra konveksnosti, cirkularnosti, elongacije, promjera čestica i razvedenosti površine čestica razlikovane su čestice od aglomerata. Aglomerirane čestice su uklonjene kako bi se na kraju dobila razdioba veličine čestica. Postupak određivanja veličine čestica je ponovljen sa 13 uzoraka koji su se razlikovali u parametrima načina pripreme.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za pripremu uzoraka mikročestica s melatoninom mijenjani su parametri brzine pumpe, temperature zraka te omjer lipida i kitozana kako je prikazano u tablici 1. Iz literaturnih podataka je ustanovljen raspon navedenih parametara unutar kojega se može mjerodavno odrediti zeta-potencijal i veličina čestica. U računalni program JMP uneseni su podaci za raspon brzine pumpe (20-40 %), za temperaturu zraka (110-125°C) te za omjer lipida i kitozana (31,25-62,5 %). Na temelju zadanih vrijednosti JMP program je odredio 13 različitih odnosa između parametara prema kojima su pripremljeni uzorci. U tablici 2. prikazano je da uzorci broj 8 i 11 imaju najmanje vrijednosti veličine čestica od 2,71 μm , odnosno 2,72 μm (slika 15.), a pripremljeni su pri najvišoj dozvoljenoj temperaturi i najmanjem omjeru lipida i kitozana. Takvi uzorci mikročestica su zbog svoje veličine pogodniji za transdermalnu primjenu u odnosu na druge uzorke zbog bolje penetracije kroz kožu te apsorpcije.

Tablica 2. Prikaz dobivenih vrijednosti veličine čestica i Z-potencijala

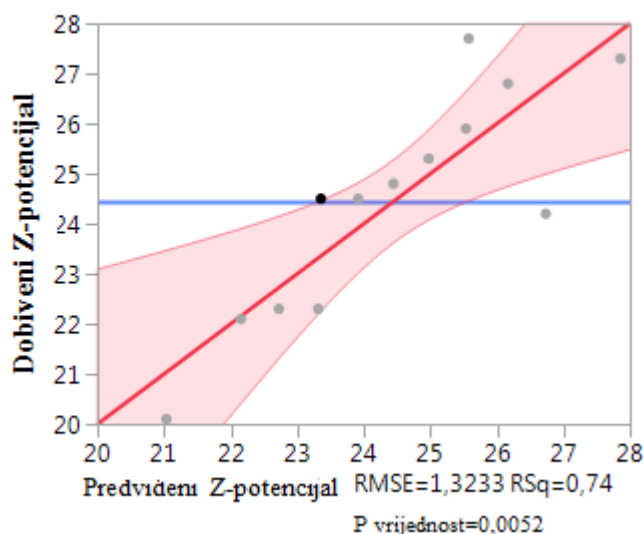
Broj uzorka	Veličina čestica (μm)	Zeta potencijal (mV)
1	3,94	24,5
2	2,73	24,8
3	3,15	25,9
4	3,94	24,5
5	3,07	22,3
6	3,11	26,8
7	3,44	25,3
8	2,71	24,2
9	3,00	20,1
10	3,72	27,7
11	2,72	27,3
12	3,61	22,1
13	3,07	22,3



Slika 15. Prikaz raspodjele veličina čestica za uzorke broj 11 (zeleno) i broj 8 (crveno)

4.1. Utjecaj procesnih parametara na vrijednost Z-potencijala

Uzorak broj 11 ima najveću izmjerenu vrijednost Z-potencijala koja iznosi 27,3 mV. Takav uzorak se najbolje apsorbira na kožu, koja sadrži negativno nabijene molekule fosfatidil kolina i ugljikohidrata, zbog najpozitivnije vrijednosti Z-potencijala.



Slika 16. Grafički prikaz odnosa predviđenog i dobivenog Z-potencijala

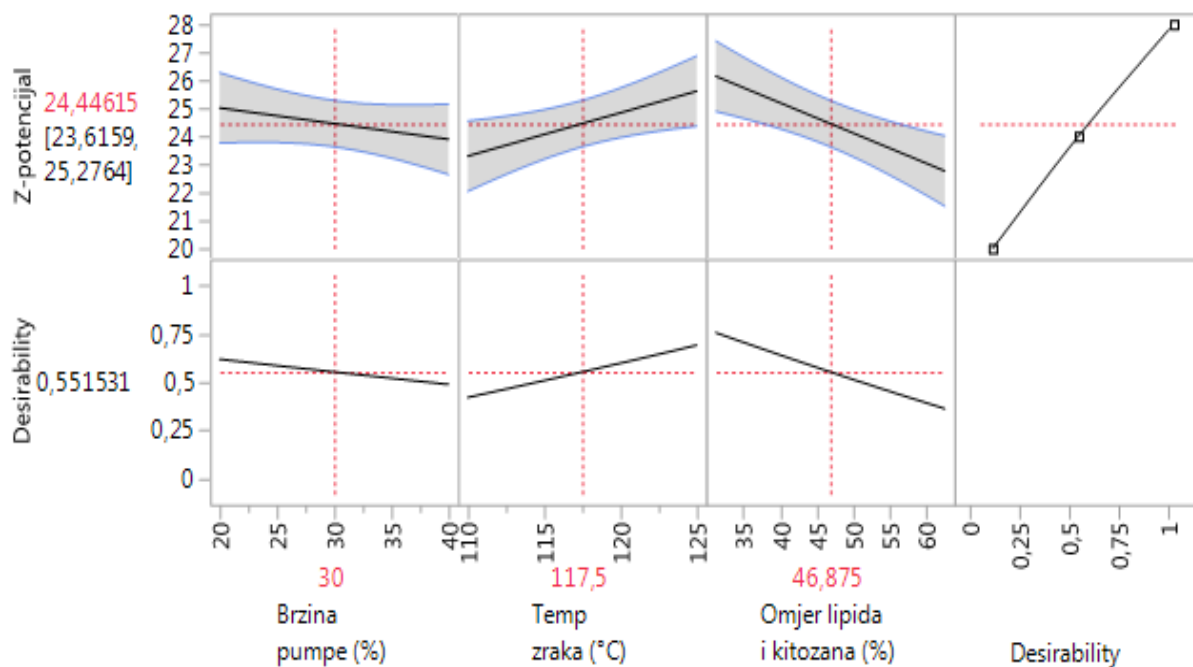
Graf prikazan slikom 16. dobiven je tako što je na apscisu nanesen Z-potencijal koji je modelom predvidio JMP program, a na ordinatu je nanesen Z-potencijal izmjerenih čestica. Metodom linearne regresije dobivena je krivulja koja pokazuje linearan odnos između predviđenog i dobivenog Z-potencijala. Linearnom krivuljom potvrđena je ispravnost predviđenog modela kojim su određeni uvjeti pripreme uzorka.

Tablica 3. Utjecaj ispitanih parametara na vrijednost Z-potencijala

Parametar	Log parametra	P vrijednost
Omjer lipida i kitozana (%) (31,25,62,5)	2,532	0,00293
Temp zraka (°C) (110,125)	1,664	0,02168
Brzina pumpe (%) (20,40)	0,670	0,21364

Tablica 3. dobivena je matematičkom analizom JMP programa i prikazuje vrijednost logaritma pojedinog parametra te P vrijednosti. Na temelju dobivenih rezultata najveći utjecaj na vrijednost Z-potencijala ima omjer lipida i kitozana. Takav efekt je očekivan budući da kitozan nosi pozitivan, a lipidna komponenta negativan naboj. Čestice koje sadrže veći udio lipida imaju niži Z-potencijal zbog moguće ionske interakcije dijela pozitivnog naboja

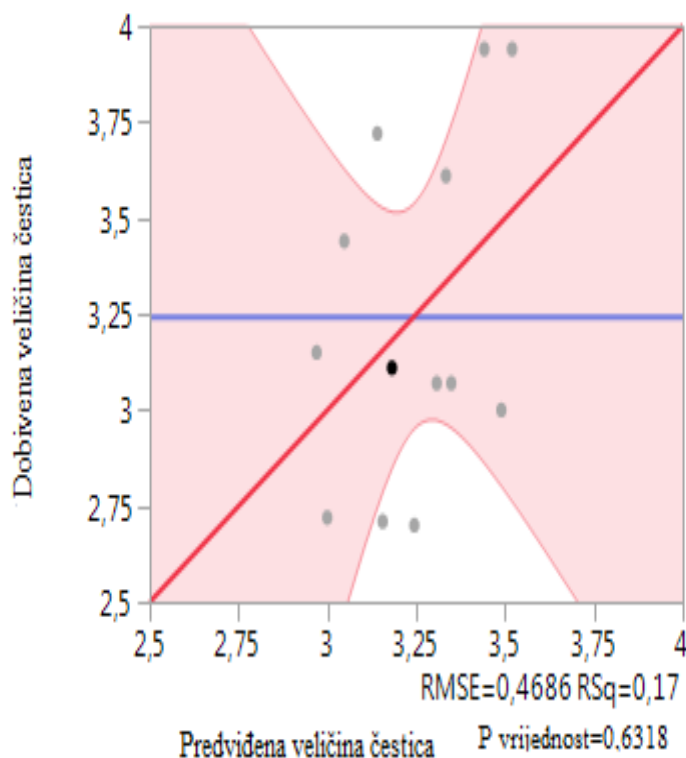
kitozana s lipidima. Temperatura zraka ima umjeren utjecaj na Z-potencijal, dok brzina pumpe ima slabi utjecaj.



Slika 17. Ovisnost Z-potencijala o promjeni vrijednosti pojedinog parametra

Na slici 17. slikovito je prikazana moguća promjena Z-potencijala u ovisnosti o promjeni vrijednosti pojedinog parametra. Krivulje ovisnosti omjera lipida i kitozana te temperature zraka u odnosu na krivulju brzine pumpe imaju veći nagib što ukazuje na veći utjecaj na vrijednost Z-potencijala.

4.2. Utjecaj procesnih parametara na veličinu čestica



Slika 18. Grafički prikaz odnosa predviđene i dobivene veličine čestica

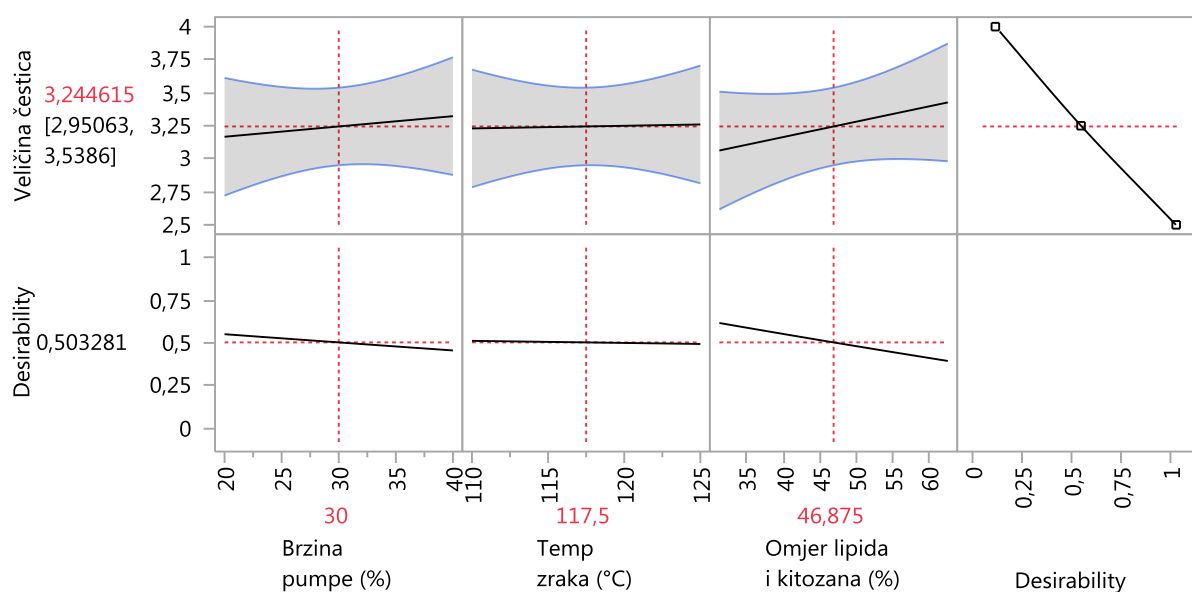
Graf prikazan slikom 18. dobiven je tako što su na apscisu nanese vrijednosti veličine čestica koje je predvidio JMP program, a na ordinatu su nanese izmjerene vrijednosti veličine čestica. Metodom linearne regresije nije dobivena krivulja koja pokazuje linearan odnos između predviđenih i dobivenih veličina čestica. Iz toga razloga nije moguće potvrditi ispravnost predviđenog matematičkog modela.

S obzirom da je razlika između najmanjih i najvećih izmjerenih čestica relativno mala (veličina čestica uzorka broj 1 je 3,94 μm , veličina čestica uzorka broj 8 je 2,71 μm), model ne može pouzdano odrediti utjecaj ispitivanih parametara. Može se zaključiti da u ispitanom području omjera lipida i kitozana, brzine pumpe te temperature sušenja ne dolazi do značajne promjene u veličini pripremljenih čestica.

Tablica 4. Utjecaj parametara na vrijednost veličine čestica

Parametri	Log vrijednosti	P vrijednost
Omjer lipida i kitozana (%) (31,25,62,5)	0,601	0,25049
Brzina pumpe (%) (20,40)	0,214	0,61133
Temp zraka (°C) (110,125)	0,035	0,92159

Tablica 4. dobivena je matematičkom analizom JMP programa i prikazuje vrijednost logaritma pojedinog parametra te P vrijednosti. U skladu s grafičkim prikazom na slici 15, vidljivo je da na temelju P vrijednosti nije moguće odrediti važnost utjecaja parametra na vrijednosti veličine čestica.



Slika 19. Ovisnost Z-potencijala o promjeni vrijednosti pojedinog parametra

Na slici 19. slikovito je prikazana moguća promjena veličine čestica u ovisnosti o promjeni vrijednosti pojedinog parametra. Krivulje za omjer lipida i kitozana je u odnosu na krivulju brzine pumpe i temperature zraka ima nešto veći nagib što ukazuje na pozitivan utjecaj na veličina čestica, no taj utjecaj nije statistički značajan.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada uspješno je proveden i evaluiran plan pokusa sa svrhom ispitivanja utjecaja procesnih parametara na veličinu i naboj mikročestica s melatoninom pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Za dizajniranje plana pokusa te statističku obradu dobivenih podataka analize mikročestica s melatoninom korišten je JMP program. Mjenjanjem procesnih parametara brzine pumpe (20-40 %), omjera lipida i kitozana (31,25-62,5) te temperature zraka (110-125 °C) dobivene su mikročestice koje se razlikuju u veličini i vrijednosti Z-potencijala. Mikroskopskim određivanjem veličine čestica analizirano je 13 uzoraka koji su se razlikovali u parametrima načina izrade. Uzorci broj 8 i 11 imaju najmanje vrijednosti veličine čestica od 2,71 μm , odnosno 2,72 μm , a pripremljeni su pri najvišoj dozvoljenoj temperaturi i najmanjem omjeru lipida i kitozana. Takvi uzorci mikročestica su zbog svoje veličine pogodniji za transdermalnu primjenu u odnosu na druge uzorke zbog bolje penetracije kroz kožu te apsorpcije. Međutim, metodom linearne regresije nije dobivena krivulja koja pokazuje linearan odnos između predviđenih i dobivenih veličina čestica. Razlika između najmanjih i najvećih izmjerenih čestica relativno je mala (veličina čestica uzorka 1 je 3,94 μm , veličina čestica uzorka 8 je 2,71 μm), zbog čega model ne može pouzdano odrediti utjecaj ispitivanih parametara na veličinu čestica. Stoga je utvrđeno da u ispitanom području omjera lipida i kitozana, brzine pumpe te temperature sušenja ne dolazi do značajne promjene u veličini pripremljenih čestica.

Određivanje vrijednosti Z-potencijala također je provedeno na 13 uzoraka. Uzorak broj 11 ima i najveću vrijednost Z-potencijala koja iznosi 27,3 mV. Takav uzorak se najbolje adsorbira na kožu zbog najpozitivnije vrijednosti Z-potencijala. Metodom linearne regresije dobivena je krivulja koja pokazuje linearan odnos između predviđenog i dobivenog Z-potencijala. Matematičkom analizom JMP programa utvrđeno je da najveći utjecaj na vrijednost Z-potencijala ima omjer lipida i kitozana što je i očekivano budući da kitozan nosi pozitivan, a lipidna komponenta negativan naboj. Temperatura zraka ima umjeren utjecaj na Z-potencijal, dok brzina pumpe ima slabi utjecaj. S obzirom na malu veličinu čestica i visok zeta potencijala, uzorak broj 11 odabran je kao uzorak s optimalnim svojstvima. Prema predstavljenom dizajnu eksperimenta, optimalni uvjeti za pripremu mikročestica s melatoninom su priprema formulacije s omjerom lipida i kitozana 31,25 %, sušena u temperaturi zraka od 125 °C pri brzini pumpe od 20 %.

6. LITERATURA

Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod*, 1998, 13-22.

Chang JH, Cho MA, Son HH, Lee CK, Yoon MS, Cho HH, Seo DS, Kim KJ. Characterization and formation of phospholipid nanoemulsion coatings on Mg-modified sericite surface. *J Ind Eng Chem*, 2006,12: 635-638.

Colloidal dynamics, 2009., <http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>, pristupljeno 18. 03. 2017.

Cos S, Fern R, Mediavilla M. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 153-159.

Čajkovac M. Kozmetologija. Naklada Slap, Jastrebarsko, 2005, str. 60-65.

Fontenot JM, Levine SA. Melatonin deficiency: Its role in oncogenesis and age-related pathology. *Orthomol Med*, 1990, vol. 22-24.

Gibson M. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Informa Healthcare USA, Inc, 2009, 491-499, str. 503-510.

Gómez-Florit M, Ramis JM, Monjo M. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86, 1784-1790.

Hoeller S, Sperge, A, Valenta C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *Int J Pharm*, 2009, 370: 181–186.

Indian Journal of Science and Technology, 2013., <http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/30719>, pristupljeno 17.3.2017.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Školska knjiga, Zagreb, 1998, str. 3-7, 29-31.

JMP Statistical Discovery From SAS, 2017., https://www.jmp.com/en_us/software.html, pristupljeno 4.5.2017.

Jones B, Nachtsheim CJ, “A Class of Three-Level Designs for Definitive Screening in the Presence of Second-Order Effects” *Journal of Quality Technology*, 2011,43:1-15.

Malvern Instruments, 2017., <http://www.malvern.com/es/Assets/MRK1839.pdf>, pristupljeno 18. 03. 2017.

Masters K. Spray drying handbook, New York, Halsted Press 1985

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem*, 2010, 4462-4481.

Particle Sciences, 2012., <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2012/overview-of-zeta-potential.html>, pristupljeno 18. 03. 2017.

Reiter RJ, The melatonin rhythm: both a clock and a calendar *Experientia*, 1993, 654-664.

Reiter R, Tan D, Fuentes-Broto L Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*, 181 2010, 127–151.

Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res*, 1993,10(12):1738-1744.

Rosler B, Kreuter J, Ross G Effect of collagen microparticles on the stability of retinol and its absorption into hairless skin mouse in vitro. *Pharmazie*, 1994, 49(2-3):175-179.

Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19:17-24.

Srinivasan V, Zakaria R, Jeet Singh H, Acuna-Castroviejo D Melatonin and its agonists in pain modulation and its clinical application. *Arch Ital Biol*, 2012, 150(4):274-289.

Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res*, 2008, 44, 222-226.

The National Center for Biotechnology Information, 1988., www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001216/, pristupljeno 17.3.2017.

Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, Maibach H, Marques M, Rytting H, Shaw S, Thakker K, Yacobi A. Topical and transdermal drug products. *PF*, 2009, 35, 750-764.

Ukrainczyk M. Planiranje pokusa u industriji. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam; 2010, 5(3-4):96-105.

Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, 2008, 25, 999-1022.

Vehring R, Foss WR, Lechuga-Ballesteros D Particle formation in spray drying. *Aer Sci*, 2007,38, 728-746.

7. SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada uspješno je proveden i evaluiran plan pokusa sa svrhom ispitivanja utjecaja procesnih parametara na veličinu i naboj mikročestica s melatoninom pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Poznavanje veličine čestica ishodnih sirovina te gotovih pripravaka važno je za terapijski učinak lijeka, stabilnost, oblikovanje i skladištenje. Naboj na površini čestica uvjetuje stabilnost uzorka, koja se manifestira većom otpornošću na flokulaciju i agregaciju čestica. Za dizajniranje plana pokusa te statističku obradu dobivenih podataka analize mikročestica s melatoninom korišten je JMP program. Temeljem statističke obrade utvrdili su se faktori s najvećim utjecajem na ispitivani parametar. Mijenjanjem procesnih parametara brzine pumpe (20-40 %), omjera lipida i kitozana (31,25-62,5) te temperature zraka (110-125 °C) dobiveno je 13 uzoraka mikročestica koje se razlikuju u veličini i vrijednosti Z-potencijala. Metodom linearne regresije nije dobivena krivulja koja pokazuje povezanost između predviđenih i dobivenih veličina čestica. Stoga je utvrđeno da u ispitanom području omjera lipida i kitozana, brzine pumpe te temperature sušenja ne dolazi do značajne promjene u veličini pripremljenih čestica. Matematičkom analizom JMP programa utvrđeno je da najveći utjecaj na vrijednost Z-potencijala ima omjer lipida i kitozana što je i očekivano budući da kitozan nosi pozitivan, a lipidna komponenta negativan naboj. Temperatura zraka ima umjeren utjecaj na Z-potencijal, dok brzina pumpe ima slabi utjecaj. Optimalni uvjeti za pripremu mikročestica male veličine i visoke vrijednosti zeta potencijala su: omjer lipida i kitozana 31,25 %, sušenje na temperaturi zraka od 125 °C pri brzini pumpe od 20 %.

Ključne riječi: veličina čestica, zeta potencijal, sušenje raspršivanjem, melatonin, JMP

SUMMARY

Within this graduate thesis, a plan of experiments whose purpose was to examine the influence of process parameters on the size and charge of micro particles containing melatonin prepared using the spray drying technique was successfully carried out and evaluated. Knowing the size of the raw materials as well as the size of particles in the drug product is important for the therapeutic effect, stability, shaping and storage of the medication. The particles' surface charge influences the stability of the sample, which is manifested in a greater resilience to flocculation and aggregation of the particles. In order to design the experimental plan, and for the statistical analysis of the data acquired from the analysis of the micro particles containing melatonin the JMP program was used. The factors having the highest influence on the target parameter were determined by the statistical analysis. By changing the process parameters of the pump speed (20-40 %), the lipid-chitosan ratio (31,25-62,5) and the air temperature (110-125 °C), 13 micro particle samples that differed in size and Z-potential values were obtained. Using the method of linear regression obtained curve did not show the linear relation between the predicted and obtained particle sizes. Therefore, it was demonstrated that in the tested lipid-chitosan ratio, pump speed and drying temperature had no significant impact on the change of the size of the prepared particles. The mathematical analysis of the JMP program determined that the lipid-chitosan ratio has the highest influence on the Z-potential value, which was expected seeing as chitosan carries a positive, whereas the lipid component carries a negative charge. The air temperature has a moderate influence on the Z-potential, while the speed pump has a weak influence. The optimal conditions for the preparation of small size microparticles and high value of the zeta potential are: lipid-chitosan ratio 31.25 %, air temperature drying at 125 °C at 20 % pump speed.

Keywords: Particle size, zeta potential, spraying drying, melatonin, JMP

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje utjecaja procesnih parametara na veličinu i zeta potencijal čestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem

Antonio Lepur

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada uspješno je proveden i evaluiran plan pokusa sa svrhom ispitivanja utjecaja procesnih parametara na veličinu i naboj mikročestica s melatoninom pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Poznavanje veličine čestica ishodnih sirovina te gotovih pripravaka važno je za terapijski učinak lijeka, stabilnost, oblikovanje i skladištenje. Naboj na površini čestica uvjetuje stabilnost uzorka, koja se manifestira većom otpornošću na flokulaciju i agregaciju čestica. Za dizajniranje plana pokusa te statističku obradu dobivenih podataka analize mikročestica s melatoninom korišten je JMP program. Temeljem statističke obrade utvrdili su se faktori s najvećim utjecajem na ispitivani parametar. Mijenjanjem procesnih parametara brzine pumpe (20-40 %), omjera lipida i kitozana (31,25-62,5) te temperature zraka (110-125 °C) dobiveno je 13 uzoraka mikročestica koje se razlikuju u veličini i vrijednosti Z-potencijala. Metodom linearne regresije nije dobivena krivulja koja pokazuje povezanost između predviđenih i dobivenih veličina čestica. Stoga je utvrđeno da u ispitanom području omjera lipida i kitozana, brzine pumpe te temperature sušenja ne dolazi do značajne promjene u veličini pripremljenih čestica. Matematičkom analizom JMP programa utvrđeno je da najveći utjecaj na vrijednost Z-potencijala ima omjer lipida i kitozana što je i očekivano budući da kitozan nosi pozitivan, a lipidna komponenta negativan naboj. Temperatura zraka ima umjeren utjecaj na Z-potencijal, dok brzina pumpe ima slabi utjecaj.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 19 grafičkih prikaza, 4 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: veličina čestica, zeta potencijal, sušenje raspršivanjem, melatonin, JMP

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *nasl. doc. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *nasl. doc. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Jelena Grčić-Filipović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of the influence of the process parameters on the size and zeta potential of the particles produced by spray drying

Antonio Lepur

SUMMARY

Within this graduate thesis, a plan of experiments whose purpose was to examine the influence of process parameters on the size and charge of micro particles containing melatonin prepared using the spray drying technique was successfully carried out and evaluated. Knowing the size of the raw materials as well as the size of particles in the drug product is important for the therapeutic effect, stability, shaping and storage of the medication. The particles' surface charge influences the stability of the sample, which is manifested in a greater resilience to flocculation and aggregation of the particles. In order to design the experiment plan, and for the statistical analysis of the data acquired from the analysis of the micro particles containing melatonin the JMP program was used. The factors with the biggest influence on the target parameter were determined by the statistical analysis. By changing the process parameters of the pump speed (20-40 %), the lipid-chitosan ratio (31,25-62,5) and the air temperature (110-125 °C), 13 micro particle samples which differed in size and Z-potential values were obtained. Using the method of linear regression did not result in a curve that showed the linear relation between the predicted and obtained particle sizes. Therefore, it was determined that in the tested lipid-chitosan ratio, pump speed and drying temperature there were no significant changes in the size of the prepared particles. The mathematical analysis of the JMP program determined that the lipid-chitosan ratio has the biggest influence on the Z-potential value, which was expected seeing as chitosan carries a positive, whereas the lipid component carries a negative charge. The air temperature has a moderate influence on the Z-potential, while the speed pump has a weak influence.

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

Thesis includes: 42 pages, 19 figures, 4 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Particle size, zeta potential, spraying drying, melatonin, JMP

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

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

The thesis was accepted: July 2017.

