

Izrada mikrosfera s natrijevim deksametazon fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine pri sušenju raspršivanjem

Dolanjski, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:687013>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



Patricia Dolanjski

**Izrada mikrosfera s natrijevim deksametazon
fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine
pri sušenju raspršivanjem**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, pomoći, trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i asistentici Lauri Nižić, mag. pharm. na prijateljskom pristupu i pruženoj pomoći te usmjeravanju i vođenju prilikom pripreme i odrade eksperimentalnog dijela rada kao i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Zahvaljujem djelatnicima Jadran-galenskog laboratorija d.d. na pomoći pri određivanju raspodjele veličina čestica.

Neizmjereno hvala cijeloj mojoj obitelji na pruženoj ljubavi i potpori tijekom života i cjelokupnog studiranja, a posebno mojim roditeljima, baki, djedu i sestri.

Puno hvala i mojim prijateljima, onima koje poznajem godinama, ali i kolegama s fakulteta kao i mojem Borni. Hvala za svaku toplu riječ, za svako ohrabrenje i za svaki osmijeh.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu.....	1
1.2. Veličina čestica praškastog sustava	4
1.2.1. Važnost veličine čestica za oblikovanje i učinak lijekova	4
1.2.2. Mikročestice za nazalnu primjenu	6
1.2.3. Sušenje raspršivanjem kao metoda pripreme mikročestica kontrolirane veličine	9
1.3. Bubrenje mikrosfera za nazalnu primjenu.....	10
1.3.1. Bubrenje i mukoadhezivnost	10
1.3.2. Bubrenje i profil oslobađanja lijeka	15
1.3.3. Metode ispitivanja bubrenja mikročestica <i>in vitro</i>	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Izrada otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem	20
3.2.2. Izrada mikrosfera sušenjem raspršivanjem.....	21
3.2.3. Određivanje sadržaja lijeka HPLC metodom	22
3.2.4. Određivanje raspodjele veličina čestica	23
3.2.5. Bubrenje mikrosfera	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama	25
4.3. Veličina mikrosfera.....	28
4.4. Bubrenje mikrosfera.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	34
6. LITERATURA.....	35
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	46
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu

Nazalna primjena lijekova je brojnih suvremenih istraživanja. Takav način primjene prvi je izbor za liječenje lokalnih poremećaja nazalne sluznice. Osim toga, nazalnom primjenom moguće je postići sistemsku raspoloživost kao i izravnu dostavu lijeka do središnjeg živčanog sustava, a nazalno se mogu primijeniti i cjepiva (Gieszinger i sur., 2017, Aulton, 2013, Nižić i sur., 2019). Mogućnost postizanja sistemske raspoloživosti i brzog početka djelovanja lijeka nakon nazalne primjene proizlazi iz velike površine sluznice nosa, dobre prokrvljenosti i niske enzimske aktivnosti (Tepper i Johnstone, 2018). Posebno je pogodna za lijekove male oralne bioraspoloživosti uslijed razgradnje u probavnom sustavu ili metabolizma prvim prolaskom kroz jetru. S obzirom da je primjena jednostavna i neinvazivna, posebno je prikladna za djecu, starije pacijente i pacijente koji imaju problema s gutanjem (Tanaka i sur., 2017).

Formulacije za nazalnu primjenu mogu biti tekućine, gelovi ili prašci. U upotrebi su najčešće tekuće formulacije, no danas se sve više pažnje pridaje prašcima kao mogućem boljem izboru (Tanaka i sur., 2017).

Nazalni prašci su praškasti sustavi namijenjeni primjeni u nosnu šupljinu pomoću prikladnog uređaja (Ph.Eur., 8.0). Maksimalna količina praška koja se može primijeniti u nos je 50 mg, ovisno o nasipnoj gustoći samog materijala (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Smjernice za suhe praške izrađuju Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency*, EMA) i Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (*US Food and Drug Administration*, FDA). Prema njima, potrebno je obratiti posebnu pažnju na svojstva djelatne tvari, kao što su veličina čestica, raspodjela veličina čestica, kristalna forma, oblik i kristaliničnost, zatim na svojstva pomoćnih tvari te testove ispitivanja osjetljivosti na temperaturu i vlagu (Gieszinger i sur., 2017).

Praškasti sustavi imaju brojne prednosti u odnosu na tekuće sustave. Dokazano je da produljuju kontakt lijeka s nosnom sluznicom, odgađajući mukocilijarno čišćenje te osiguravaju visoke koncentracije lijeka na mjestu depozicije (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

Za određene lijekove, produljeni kontakt na mjestu apsorpcije može rezultirati povećanom sistemskom raspoloživošću, dok visoke koncentracije lijeka uzrokuju brzu transmukoznu difuziju i brži početak djelovanja (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Također, praškasti sustavi pokazuju povoljnu kemijsku, fizičku i mikrobiološku stabilnost. Iz tog razloga nema posebnih zahtjeva za skladištenje pri sniženoj temperaturi te je manja potreba za pomoćnim tvarima (Gieszinger i sur., 2017, Aulton, 2013). Osim toga, izbjegava se gutanje značajnog dijela doze, koje mijenja apsorpciju i daje gorak okus, a često je povezano s tekućim formulacijama (Tepper i Johnstone, 2018). Nedostatak vezan uz nazalnu primjenu prašaka odnosi se na moguću iritaciju nazalne sluznice (Aulton, 2013).

Svojstva prašaka određuju mjesto depozicije u nosnoj šupljini te uvjetuju potencijalnu iritaciju sluznice nosa. Iz tog razloga, važno je odrediti svojstva čestica, kao što su oblik, veličina, topljivost, gustoća i svojstva tečenja praška (Filipović-Grčić i Hafner, 2008, Djupesland 2012). Većina formulacija nazalnih prašaka temeljena je na mukoadhezivnim polimerima koji bubre na vlažnoj sluznici (Alpar i sur., 2004). Takvi polimeri omogućuju produljeno zadržavanje lijeka na mjestu depozicije i usporeno mukocilijarno čišćenje (Illum, 2003, Soane i sur., 1999). Polimerni sustavi mogu biti formulirani u obliku mikročestica i nanočestica te na taj način dodatno poboljšati karakteristike praška (Aulton, 2013). Za poboljšanje nazalne apsorpcije, istražuje se i dodatak pospješivača apsorpcije u formulacije, primjerice ciklodekstrina i surfaktanata. To su tvari koje modificiraju strukturu nazalnog epitela i tako poboljšavaju permeaciju djelatne tvari kroz sluznicu nosa (Gänger i Schindowski, 2018).

Lijekovi kandidati za nazalnu primjenu moraju posjedovati određena svojstva, kao što su odgovarajući stupanj nazalne apsorpcije s obzirom na ciljanu lokalnu ili sistemsku raspoloživost, prikladna topljivost u vodi, minimalna nazalna iritacija, niska doza, zadovoljavajuća stabilnost i odsutnost neugodna mirisa. U slučaju praškastih sustava, neodgovarajuća svojstva mogu se zamaskirati ili poboljšati koristeći odgovarajuće polimere kao nosače lijekova (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Medicinske proizvode koji omogućuju nazalnu primjenu prašaka dijelimo u tri kategorije na temelju načina aktivacije. To su inhalatori aktivirani udahom, mehanički raspršivači prašaka i nazalni insuflatori. Inhalatori aktivirani udahom su medicinski proizvodi koji koriste

snagu vlastitog udaha pacijenta kako bi se lijek primijenio u nosnu šupljinu (Slika 1.). To su pasivni sustavi koji omogućuju inhaliranje prašaka iz blistera ili kapsule (Djupesland, 2012).



Slika 1. *Rhinocort® turbuhaler* primjer je inhalatora aktiviranog udahom (preuzeto i prilagođeno sa stranice www.kingstonallergyandasthma.com/resources/Nasal%20Sprays.pdf)

Mehanički raspršivači prašaka su aktivni sustavi koji se temelje na pogonskom mehanizmu tlaka zraka (Slika 2.). U kompresibilnoj komorici stvara se tlak zraka kojim se krute čestice raspršuju u nosnu šupljinu (Djupesland, 2012).



Slika 2. Primjer jednodoznog mehaničkog raspršivača razvijenog od strane *Aptar pharma* (preuzeto i prilagođeno sa stranice www.drug-dev.com/aptar-pharmas-nasal-unidose-device-approved-by-us-fda/)

Nazalni insuflatori su sustavi koji se sastoje od dva međusobno povezana dijela (Slika 3.). Jedan dio se stavlja u usta i na njega se izdahne, dok se drugi dio stavlja u nos i omogućuje da izdahnuti zrak iz usta nosi čestice praška u nosnu šupljinu (Djupešland, 2012).



Slika 3. Prikaz nazalnog insuflatora *TriVair™ nasal* (preuzeto i prilagođeno sa stranice <http://trivair.ipmedinc.com/method.html>)

1.2. Veličina čestica praškastog sustava

1.2.1. Važnost veličine čestica za oblikovanje i učinak lijekova

Praškaste sustave možemo klasificirati prema srednjoj veličini čestica kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija praška prema srednjoj veličini čestica (Aulton, 2013)

Opis praška	Srednja veličina čestica (x_{50} , μm)
Grubi prašci	> 350
Srednje fini prašci	100-350
Fini prašci	50-100
Vrlo fini prašci	10-50
Mikronizirani prašci	< 10

Veličina čestica važno je svojstvo koje osigurava postizanje optimalnog formuliranja djelatne tvari i proizvodnju učinkovitog ljekovitog oblika (Aulton, 2013). Značajan je utjecaj veličine čestica na procesibilnost, odnosno oblikovanje lijeka. Brojni procesi kao što su tečenje praška, pakiranje i poroznost praška, miješanje i segregacija, sušenje, filtriranje i otapanje ovise o veličini čestica praška (Shekunov i sur., 2006). Tablete i kapsule se proizvode tako da se masa oblika kontrolira volumetrijskim punjenjem zbog čega je važno tečenje praška. Prašci s različitom veličinom čestica pokazuju različito tečenje i pakiranje stoga mijenjaju volumen punjenja. Kako bi se izbjegli problemi prilikom proizvodnje, važno je definirati veličinu čestica praška (Aulton, 2013). Osim toga, učinkovitost i sigurnost primjene lijeka vezana je uz veličinu čestica (Shekunov i sur., 2006). Veličina čestica utječe na jednoličnost doziranja. Smanjenjem veličine čestica praška dolazi do povećanja broja čestica po jediničnoj masi, a time i do manje varijabilnosti među jediničnim dozama što je izuzetno važno kod niskodozirnih ljekovitih oblika. Utjecaj veličine čestica na brzinu otapanja, a time i na bioraspoloživost lijeka opisuje Noyes-Whitney jednadžba:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{A \cdot D}{h} (C_s - C)$$

A označava površinu izloženu otapalu, C_s topljivost lijeka, C koncentraciju u otopini, t vrijeme, D koeficijent difuzije dok je h debljina difuzijskog sloja (stacionarnog sloja otapala oko krutine). Što je manja veličina čestica, veća je površina izložena otapalu te je veća brzina otapanja, što ima izravan utjecaj na brzinu i obim apsorpcije (Slika 4., Aulton, 2013).



Slika 4. Utjecaj veličine čestica na brzinu otapanja (preuzeto i prilagođeno prema Atkinson i sur., 2013)

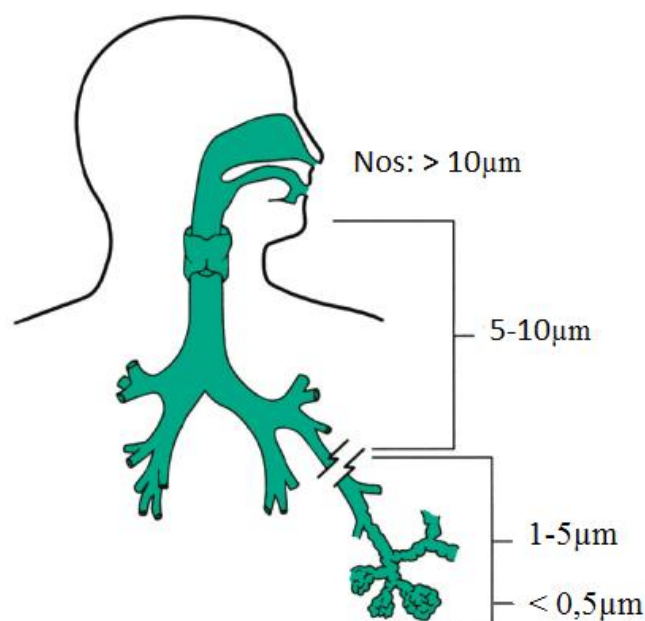
Smanjenje veličine čestica kako bi se povećala bioraspoloživost lijeka nije uvijek prednost. Primjer je lijek nitrofurantoin gdje povećanjem brzine otapanja dolazi do brže apsorpcije i veće opasnosti od nuspojava. Također, veličina čestica disperzne faze suspenzija određuje njihovu stabilnost i bioraspoloživost. Prema Stokesovom zakonu koji glasi:

$$v = \frac{2r^2(d_1-d_2)}{9\eta} \cdot g,$$

gdje v označava brzinu taloženja, r polumjer suspendirane čestice, d_1 gustoću disperzne faze, d_2 gustoću disperzijskog sredstva, η viskoznost disperzijskog sredstva i g konstantu gravitacije, brzina sedimentacije proporcionalna je kvadratu veličine čestica. Stoga, što su čestice disperzne faze manje, suspenzija je stabilnija. Osim toga, smanjenje veličine čestica kod suspenzija slabo topljivih tvari povećava brzinu otapanja i značajno povećava bioraspoloživost (Aulton, 2013).

1.2.2. Mikročestice za nazalnu primjenu

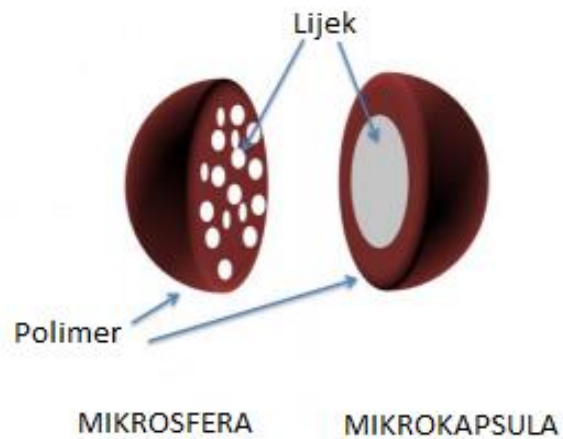
Veličina čestica važno je svojstvo nazalno primijenjenih prašaka s obzirom da o tome ovisi nazalna depozicija, stoga je bitno okarakterizirati to svojstvo (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Čestice veće od 10 μm odlažu se na nazalnu sluznicu, one raspona veličine 5-10 μm dolaze do dušnika i bronhija, čestice veličine 1-5 μm odlaze u niže dišne puteve, a tek one manje od 0,5 μm dolaze do alveola (Slika 5.; Moffa i sur., 2019). Prema zahtjevima EMA-e većina čestica nazalnih prašaka mora biti veličine veće od 10 μm te je važno odrediti limit čestica koje su manje od 10 μm (Europska agencija za lijekove, 2006). Čestice trebaju biti veće od 10 μm kako bi se izbjegla mogućnost pulmonalne depozicije (Fransen, 2008). U nazalnim pripravcima prevladava raspon veličine čestica od 30 do 120 μm (Sangolkar i sur., 2012).



Slika 5. Prikaz odlaganja udahnutih čestica (preuzeto i prilagođeno Gardenhire i sur., 2017)

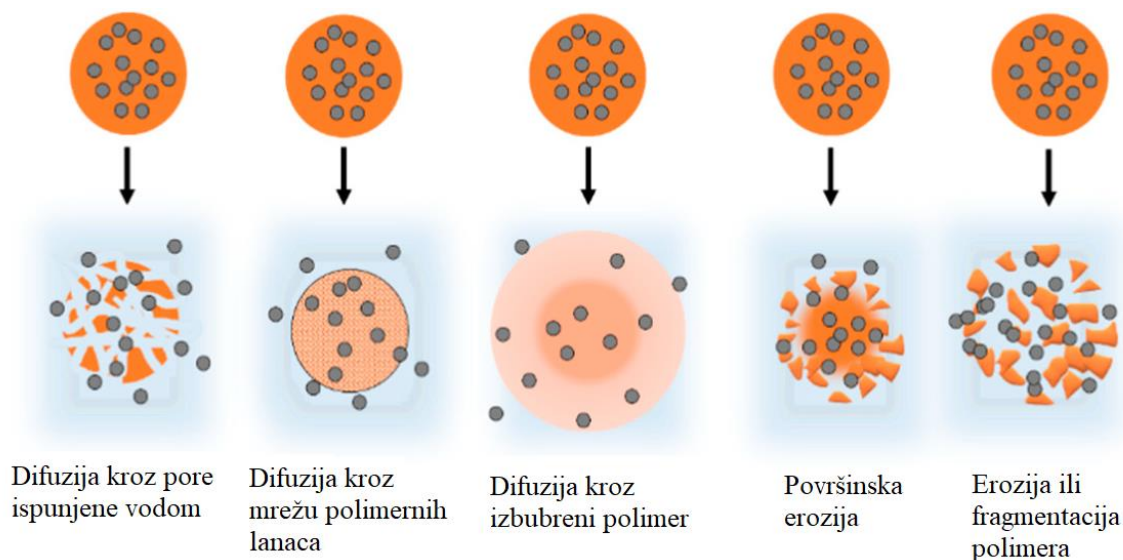
Polimerne mikročestice kao praškasti sustavi obećavajući su sustavi dopreme lijeka do nazalne sluznice (Nižić i sur., 2020). To su višestručni sustavi koji pružaju kako terapijske, tako i tehnološke prednosti (Lengyel i sur., 2019). Mikročestice su čvrste čestice raspona veličina 1-1000 μm . To su sustavi velikog omjera površine prema volumenu koji mogu uklopiti djelatnu tvar u svoju strukturu i tako djelovati kao učinkoviti nosači lijekova (Kreuter, 1996., Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Načinjene su uglavnom od biorazgradljivih polimera koji se razgrađuju *in vivo*, enzimatski ili neenzimatski, i time stvaraju biokompatibilne, netoksične produkte koji se metaboliziraju ili fiziološki izlučuju (Mitragotri i sur., 2014). Raspon tehnika za izradu mikročestica pruža brojne mogućnosti kontroliranja svojstava mikročestica te povećanja terapijskog učinka lijeka (Kadam i Suvarna, 2015). Neke od metoda izrade mikročestica su sušenje raspršivanjem, koacervacija, odjeljivanje faza dvostruke emulzije i isparavanje ili ekstrakcija otapala (Bansal i sur., 2011, Kadam i Suvarna, 2015). Takvi terapijski sustavi mogu zaštititi lijek od enzimske razgradnje, smanjiti toksičnost djelatne tvari, poboljšati stabilnost i kontakt sa sluznicom, prilagoditi profil oslobađanja lijeka i omogućiti ciljanu dostavu lijeka (Aulton, 2013, Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Osim toga, mikročestice mogu poboljšati adherenciju pacijenata i tako doprinijeti boljem terapijskom ishodu (Kadam i Suvarna, 2015). Razlikujemo mikrokapsule i mikrosfere. Mikrokapsule su spremišni sustavi u kojima je lijek smješten unutar polimerne membrane, dok su mikrosfere matriksni sustavi gdje je lijek otopljen ili dispergirani u polimernom matriksu (Slika 6.; Al-Hashimi i suradnici, 2018). Značajno se istražuju

mukoadhezivne mikrosfere za nazalnu primjenu. Netopljive su u vodi, ali u dodiru sa sluznicom nosa mukoadhezivni polimer bubri i stvara strukturu gela osiguravajući dulje zadržavanje na mjestu primjene. Taj proces dovodi do dehidracije sluznice i reverzibilnog proširenja čvrstih međustaničnih spojeva, što može rezultirati povećanom permeabilnošću hidrofилnih djelatnih tvari (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).



Slika 6. Prikaz mikročestica kao matriksnog i spremišnog sustava (preuzeto i prilagođeno prema Al-Hashimi i sur., 2018)

Mehanizam oslobađanja lijeka iz mikročestica ovisi o svojstvima nosača, svojstvima lijeka, načinu uklapanja lijeka i o mediju u kojem se lijek oslobađa (Hafner i sur., 2013, Lengyel i sur., 2019). Može se odvijati procesom difuzije lijeka, erozijom ili fragmentacijom polimera, desorpcijom s površine ili otapanjem (Slika 7.). Uglavnom se više mehanizama odvija istovremeno, premda jedan od njih ima važniju ulogu tijekom oslobađanja lijeka (Lengyel i sur., 2019).



Slika 7. Mehanizmi oslobađanja lijeka iz mikročestica (preuzeto i prilagođeno prema Lengyel i sur., 2019)

1.2.3. Sušenje raspršivanjem kao metoda pripreme mikročestica kontrolirane veličine

Sušenje raspršivanjem prikladna je i jednostavna tehnika za pripremu mikročestica za nazalnu primjenu (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). To je proces koji pruža jedinstvene mogućnosti dizajniranja čestica željenih karakteristika (Al-Khattawi i sur., 2017). Temelji se na atomizaciji tekućeg uzorka kroz sapnicu koja proizvodi kapljice. Miješanjem kapljica sa strujom vrućeg medija za sušenje (najčešće zraka), dolazi do brzog sušenja i formiranja čvrstih čestica koje se zatim odvajaju iz struje medija za sušenje (Lechanteur i Evrard, 2020). Dobivene čestice su uglavnom amorfne strukture i uskog raspona veličina (Al-Khattawi i sur., 2017). Brojni procesni i formulacijski parametri mogu se mijenjati tijekom procesa pripreme s ciljem optimiranja veličine, morfologije i sadržaja vlage mikročestica (Lechanteur i Evrard, 2020). Procesni parametri su kapacitet aspiratora, vlažnost medija za sušenje, protok medija za sušenje, ulazna temperatura i brzina dotoka uzorka, dok su koncentracija uzorka, vrsta otapala, sastav uzorka, viskoznost tekućeg uzorka i površinska napetost tekućeg uzorka formulacijski parametri (Focaroli, 2018, Muralidharan i sur., 2014, Al-Khattawi i sur., 2017). Utjecaj procesnih i formulacijskih parametara na veličinu čestica prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Utjecaj procesnih i formulacijskih parametara na veličinu čestica

Parametar	Utjecaj na veličinu čestica
Kapacitet aspiratora ↑	Bolja separacija manjih čestica
Vlažnost medija za sušenje ↑	Nema utjecaj
Protok komprimiranog zraka ↑	Manje čestice
Ulazna temperatura ↑	Nema utjecaj
Brzina dotoka uzorka ↑	Veće čestice
Koncentracija tekućeg uzorka ↑	Veće čestice
Organsko otapalo	Manje čestice

Pri većem aspiriranju, brži je protok medija za sušenje te se razvijaju veće centrifugalne sile koje omogućuju bolju separaciju manjih čestica iz struje zraka (Patel i sur., 2015). Što je veći protok komprimiranog zraka, odnosno tlak na sapnici, bolja je atomizacija tekućeg uzorka pa se na mlaznici proizvode manje kapljice te samim time nastaju manje čestice (Lechanteur i Evrard, 2019, Cal i Sollohub, 2008). Osim toga, korištenjem organskog otapala umjesto vode nastaju manje čestice zbog manje površinske napetosti kapljica (Patel i sur., 2015). Većom brzinom dotoka uzorka veća količina se treba dispergirati tako da će nastati veće čestice (Cal i Sollohub, 2008). Veće čestice dobit će se i povećanjem koncentracije tekućeg uzorka. Osim što je manja količina otapala u odnosu na frakciju čvrste tvari u formiranim kapljicama, moguća je i povećana viskoznost otopine zbog veće koncentracije polimera u raspršivanim sustavima koja se zbog toga raspršuje u veće kapljice (Patel i sur., 2015, Ziaee i sur., 2018).

1.3. Bubrenje mikrosfera za nazalnu primjenu

1.3.1. Bubrenje i mukoadhezivnost

Značajan interes u razvoju mikrosfera kao terapijskih sustava privukli su mukoadhezivni polimeri sa sposobnošću bubrenja. Cilj razvoja takvih sustava bio je nadvladati nedostatke koji su često vezani uz konvencionalnu primjenu lijeka, poput nedostatnog zadržavanja na mjestu primjene ili neadekvatne bioraspoloživosti lijeka (Zahir-Jouzani, 2018). Izbubreni polimerni sustavi su hidrogelovi, odnosno trodimenzionalne strukture koje apsorbiraju i zadržavaju velike količine vode i bioloških fluida (Sarada i sur.,

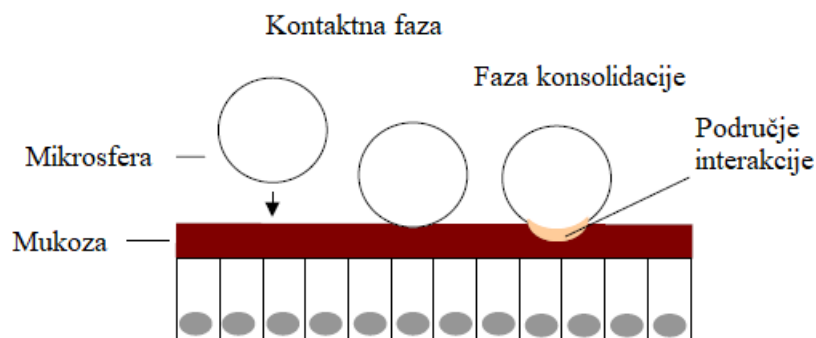
2014). Na molekularnoj razini, voda u hidrogelu može biti vezana ili slobodna. Vezana voda je kemijski vezana preko polarnih hidrofilnih skupina, dok slobodna voda popunjava slobodan prostor, pore ili pukotine unutar mreže lanaca polimera (Yang, 2012). Voda u hidrogelu omogućuje slobodnu difuziju otopljenih molekula dok polimer djeluje kao matriks koji zadržava vodu u svojoj strukturi (Okay, 2009).

Razlikujemo dvije generacije mukoadhezivnih materijala s obzirom na njihovo otkriće. U prvu generaciju ubrajamo prirodne ili sintetske hidrofilne polimere koji sadrže brojne funkcionalne skupine kojima stvaraju vodikove veze, poput karboksilne, hidroksilne i amino skupine (Komati i sur., 2018). Primjeri polimera prve generacije su derivati celuloze poput hidroksipropilmetilceluloze, hidroksipropilceluloze, metilceluloze i karboksimetilceluloze, zatim pektin, poliakrilati, škrob, alginati i kitozan (Chaturvedi i sur., 2011, Fransen 2008). Nazivaju se još i mokri adhezivi jer su aktivirani vlagom i kao takvi nespecifično adheriraju na različite površine (Smart, 2015). Druga, novija generacija mukoadheziva temelji se na specifičnom vezanju kemijskih struktura na površini sluznice poput lektina (Komati i sur., 2018).

Mukoadhezivni polimeri iskazuju visoku biokompatibilnost (Gazzaniga i sur., 2008). Biorazgradljivi su, jeftini i sigurni za upotrebu (Wu i sur., 2019). Takvi polimeri se ne apsorbiraju pa nema rizika od sistemske toksičnosti (Abd El-Hameed i Kellaway, 1997). Pri nazalnoj primjeni, osim što produljuju kontakt između lijeka i mjesta apsorpcije te odgađaju mukocilijarno čišćenje, neki mogu djelovati i kao pospješivači apsorpcije i tako dodatno povećati sistemske raspoloživost djelatne tvari (Illum, 2002).

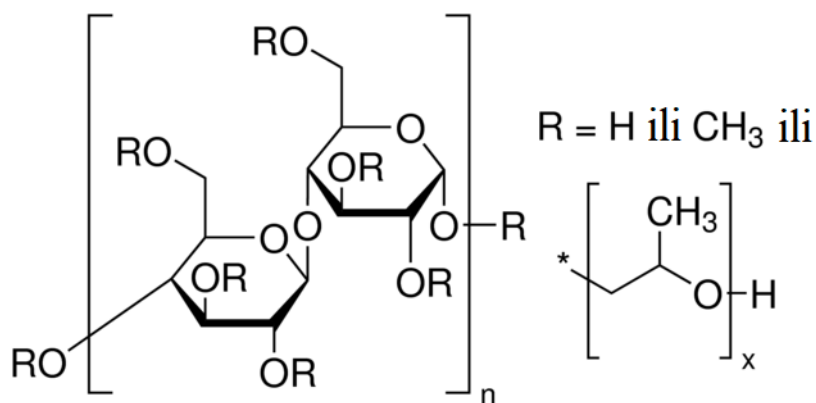
Prednosti nazalne primjene polimernih mikrosfera temelje se na procesu mukoadhezije koji se odnosi na prianjanje praškastog materijala na nazalnu sluznicu (Kirange i Chaudhari, 2016). Proces mukoadhezije možemo opisati u dvije faze: kontaktna faza i faza konsolidacije (Slika 8.). Kontaktna faza odnosi se na močenje i posljedično bubrenje polimera koje rezultira bliskim kontaktom sa sluznicom nosa (Komati i sur., 2018). Dolazi do interakcije s molekulama vode i disocijacije vodikovih veza u polimeru pri čemu se lanci polimera oslobađaju i formiraju strukturu gela. Pri tome je važno dobro rasprostiranje formulacije po sluznici, što ovisi o svojstvima tečenja i močenja mikrosfera, kako bi nabubreni polimer dobro obložio nazalnu sluznicu i omogućio adekvatno zadržavanje/raspoloživost lijeka (Chaturvedi i sur., 2011). Tijekom faze konsolidacije dolazi do stvaranja veza između

oslobođenih polimernih lanaca i lanaca mucina iz mukoznog sloja te penetracije lanaca polimera u pukotine tkiva. Stvorene veze mogu biti rezultat vodikovih veza, Van der Waalsovih, hidrofobnih ili elektrostatskih interakcija (Komati i sur., 2018). U postizanju optimalne mukoadhezije, važnu ulogu ima stupanj hidracije sluznice. Ako je hidracija nedovoljna, polimerni lanci nisu dovoljno oslobođeni te je slabija interakcija sa sluznicom. Nasuprot tome, kod prekomjerne količine vode stvara se previše vodikovih veza tako da su adhezivne veze sa sluznicom slabije (Ugwoke i sur., 2005).



Slika 8. Kontaktna faza i faza konsolidacije tijekom procesa mukoadhezije (preuzeto i prilagođeno prema Smart, 2015)

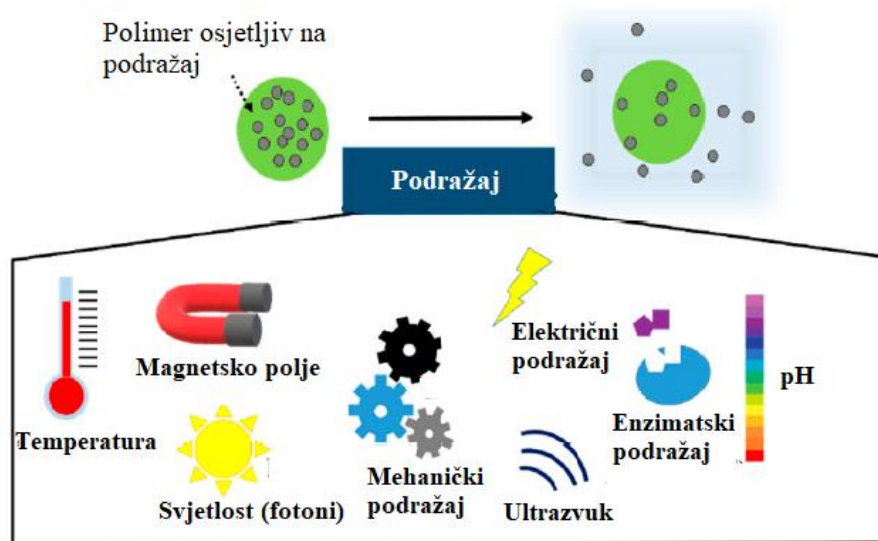
Hipromeloza (hidroksipropilmetilceluloza, HPMC) je najčešće korišten derivat celuloze u proizvodnji sustava koji bubre zbog svoje sigurnosti, mogućnosti raznolike namjene i dostupnosti (Li i sur., 2004, Gazzaniga i sur., 2006). To je mukoadhezivni polimer prve generacije koji je biokompatibilan i biorazgradljiv te se nalazi na GRAS (engl. *Generally recognized as safe*, Općenito prihvaćene kao sigurne) listi pomoćnih tvari (Smart, 2005, Li i sur., 2004, da Silva Junior i sur., 2017). Hipromeloza je neionski eter celuloze koji je hidrofilan, u prisutstvu vode gelira, stabilan je u pH području 3-11 i rezistentan na enzime (Slika 9.; Li i sur., 2004).



Slika 9. Strukturna formula hipromeloze (preuzeto i prilagođeno sa stranice <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/hypromellose12345900465311?lang=en®ion=HR>)

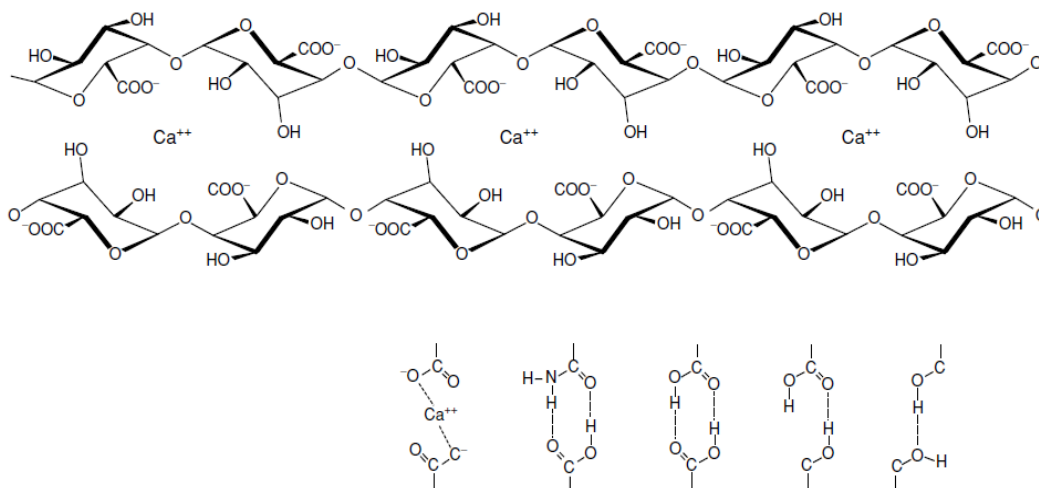
Pektin je vodotopljivi polisaharid koji je prirodno prisutan u staničnoj stijenci većine biljaka (Russo i sur., 2016). Posjeduje izvrsna svojstva bubrenja, siguran je, biokompatibilan i biorazgradljiv te se iz tog razloga često koristi u sustavima ciljanog i kontroliranog oslobađanja djelatnih tvari (Kaur, 2018, Kowalski i sur., 2018). To je polielektrolitni polimer koji se sastoji od djelomično esterificiranih molekula galakturonske kiseline povezanih α -1,4 glikozidnim vezama. Razlikujemo niskoesterificirani i viskoesterificirani pektin, pri čemu se kao gelirajuća tvar uglavnom koristi niskoesterificirani pektin zbog jednostavnijih uvjeta geliranja. Niskoesterificirani pektin se često amidira radi postizanja bolje kontrole geliranja i stvaranja čvršćeg gela (Flutto, 2003).

Proces bubrenja polimernog sustava na nazalnoj sluznici može biti kontroliran različitim faktorima, poput temperature, pH, ionske jakosti, prisutnosti određenih iona, svjetlosti, magnetskog polja, enzima i ostalog (Slika 10., Kouchak, 2014, Lengyel i sur., 2019). Konformacija polimernih lanaca mijenja se uslijed nekog od navedenih podražaja, a ovisno o njegovoj jakosti (Devasai i sur., 2016). Različiti izvori navode temperaturu nosne sluznice od 30 do 34°C (Chonkar i sur., 2014, Lindemann i sur., 2002, Keck i sur., 2000). pH vrijednost sluznice nosa iznosi od 5,5 do 6,5, a sluz je bogata ionima kalcija, natrija i kalija. U odgovoru na te uvjete, može doći do bubrenja polimera u kontaktu s nosnom sluznicom (Chonkar i sur., 2014).



Slika 10. Utjecaj različitih podražaja na proces bubrenja polimera (preuzeto i prilagođeno prema Lengyel i sur., 2019)

Umrežavanje lanaca polimera u prisutnosti određenih iona može ograničavati bubrenje pektinskih sustava. Umrežavanje pektina je uvjetovano prisutnošću kationa, osobito kalcija (Donald, 2001). Umrežavanje polimernih lanaca nastupa stvaranjem ionskih veza između slobodnih karboksilnih skupina na dva pektinska lanca i kalcija kao poveznice između njih te stvaranjem vodikovih veza između hidrofilnih skupina (Slika 11.). Iako i drugi kationi mogu sudjelovati u umrežavanju pektina, poput magnezija i kalija, kalcij je u tome najučinkovitiji. Razlog tome je veći ionski radijus i stvaranje fleksibilnih koordinativnih veza (Flutto, 2003). Osim pektinskih sustava, mikrosfere građene od alginata i gelan gume također pokazuju svojstva umrežavanja u prisustvu kalcija (Gómez-Mascaraque i sur., 2019, Das i Giri, 2020).



Slika 11. Mehanizam umrežavanja niskoesterificiranog pektina (preuzeto i prilagođeno prema Flutto, 2003)

Polimeri osjetljivi na pH su polielektroliti koji u svojoj strukturi sadrže kiselu (karboksilna ili sulfonska) ili bazičnu funkcionalnu skupinu (amonijeve soli) koje mogu primiti ili otpustiti protone ovisno o promjeni pH vrijednosti okoline (Sarada i sur., 2014, Almeida i sur., 2014). Primjeri takvih polimera su kitozan, poliakrilati, polimetakrilna kiselina, celuloza acetat ftalat, polietilenglikol i polikarbofili (Almeida i sur., 2014, Devasani i sur., 2016). Poliakrilati (npr. Carbopol[®], Carbomer) su polianioni koji u svojoj strukturi imaju kisele skupine koje mogu ionizirati, karboksilnu i sulfonsku skupinu. Kisele skupine su pri niskom pH deionizirane, dok pri visokom pH otpuštaju proton i prelaze u ionizirano stanje. Povećanjem pH polimer bubri zbog elektrostatskog odbijanja negativno nabijenih skupina (Almeida i sur., 2014).

1.3.2. Bubrenje i profil oslobađanja lijeka

Kontrola nad kinetikom oslobađanja lijeka uklopljenog u polimerne mikrosfere važna je za njihovu terapijsku primjenu iz razloga što omogućuje održavanje ciljne koncentracije lijeka na mjestu djelovanja kroz dulje vrijeme te primjenu manje doze lijeka, odnosno manju učestalost primjene lijeka (Veiga i sur., 2018). Sposobnost bubrenja mikrosfera osnovno je svojstvo koje utječe na profil oslobađanja lijeka, kontrolirajući brzinu difuzije fluida u mikrosfere te otapanje i difuziju lijeka u okolinu (Carbinatto i sur., 2014).

Oslobađanje lijeka iz polimernog sustava sastoji se od nekoliko koraka. Kontaktom medija, vode ili biološkog fluida, s mikrosferom, voda penetrira kroz polimerni matriks mikrosfere. Dolazi do relaksacije polimernih lanaca i bubrenja pri čemu se formiraju pore ispunjene tekućinom i raste osmotski tlak te dolazi do otapanja lijeka. Kako se bubrenjem povećava volumen mikrosfera, više molekula lijeka ulazi u vodeni odjeljak (Lengyel i sur., 2019). Otopljene molekule lijeka difundiraju kroz matriks u okolinu zbog koncentracijskog gradijenta (Jug i sur., 2017). Difuziju tekućine te otopljenih molekula kroz matriks mikrosfera omogućuju slobodni prostori odnosno pore između umreženih polimernih lanaca. Veličina pora ovisi o koncentraciji polimera i tvari za umrežavanje, kao i o vanjskim podražajima poput temperature ili pH. Kontrolirajući steričke interakcije lijeka i polimerne mreže, veličina pora određuje brzinu difuzije lijeka. Povećanjem veličine pora, omogućena je slobodna migracija molekula lijeka kroz polimernu mrežu te brže oslobađanje lijeka. Kod manje veličine pora, javlja se trenje između polimernih lanaca i lijeka, uzrokujući sporiju difuziju te sporo i produljeno oslobađanje lijeka (Li i Mooney, 2016).

1.3.3. Metode ispitivanja bubrenja mikročestica *in vitro*

Stupanj bubrenja mikročestica/hidrogelova ovisi o gustoći umreženja i gustoći naboja mreže polimera, kao i o koncentraciji polimera (Okay, 2009). Metode za ispitivanje bubrenja mogu biti gravimetrijske, volumetrijske, mikroskopske, spektrofotometrijske, te se mogu temeljiti na mjerenju fizikalnih veličina prije i nakon izlaganja polimernog sustava odgovarajućem vodenom mediju (Stevens, 2005).

Gravimetrijska metoda ispitivanja bubrenja temelji se na mjerenju mase uzorka prije i nakon izlaganja vodenom mediju. Suhi prašak polimera se izvaže te se suspendira u vodenom mediju. U različitim vremenskim intervalima gel se uklanja iz medija npr. filtracijom, uklanja se površinski sloj medija na uzorku i važe. Uzorak se ponovno vraća u medij za bubrenje te se postupak ponavlja. Iz omjera razlike mase izbubrenog i suhog uzorka te mase suhog uzorka dobiva se stupanj bubrenja (Begam i sur., 2002, Kowalski i sur., 2018).

Volumetrijskim mjerenjem stupnja bubrenja određuje se volumen medija kojeg je polimer vezao u procesu bubrenja. Stupanj bubrenja iskazuje se kao omjer volumena izbubrenog polimernog sustava i volumena suhog polimernog sustava (Chen i sur., 2003).

Primjer volumetrijske metode je korištenje Franzove difuzijske ćelije koja se sastoji od donorskog i receptorskog odjeljka odijeljenih polupropusnom membranom. U postraničnoj cjevčici receptorskog odjeljka snižava se razina receptorskog medija zbog bubrenja te se u različitim vremenskim intervalima dodaje određeni volumen medija. Nadomještanjem razine receptorskog medija određuje se volumen koji je polimerni sustav apsorbirao. Stupanj bubrenja izražava se kao dodani volumen medija po masi polimera/mikrosfera (Nižić i sur., 2020).

Ispitivanje bubrenja spektrofotometrijski temelji se na izlaganju uzorka obojenom otapalu (npr. otapalo uz dodatak joda) i mjerenju apsorbancije. Uzorak se suspendira u obojenom otapalu, u različitim intervalima se uzorkuje, kratko ispere u neobojenom otapalu te se spektrofotometrijski snima spektar. Izmjerena apsorbancija se koristi kao pokazatelj količine otapala u izbubrenom uzorku u različitim vremenima (Stevens, 2005).

Mikroskopskom metodom za određivanje bubrenja može se mjeriti promjer mikrosfera u različitim vremenima. Omjer razlike promjera izbubrenih i neizbubrenih mikrosfera te promjera neizbubrenih mikrosfera određuje stupanj bubrenja (Dhaliwal i sur., 2008).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena lijekova široko je zastupljena u liječenju sluznice nosa, a predstavlja i alternativni put sistemske dostave nekih lijekova. Faktor koji ograničava vrijeme kontakta lijeka i nosne sluznice je mukocilijarno čišćenje koje se može umanjiti korištenjem mukoadhezivnih sustava (Jain i sur., 2009). Razvijeni su brojni terapijski sustavi bazirani na mukoadhezivnim polimerima koji omogućavaju produljenje vremena zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini. Prednost praškastih oblika nad tekućima očituje se u boljoj stabilnosti formulacije te duljem zadržavanju i većoj koncentraciji lijeka na mjestu primjene (Mahajan i sur., 2012).

Većina nazalnih prašaka temeljena je na mukoadhezivnim polimerima sa sposobnošću bubrenja kao što su kitozan, pektin, škrob i hipromeloza. Od posebnog interesa su praškasti sustavi oblikovani u polimerne mikročestice koje djeluju kao učinkoviti nosači lijeka.

Kod nazalnih prašaka važna je kontrola veličine i morfologije čestica te svojstava tečenja, s obzirom da sve navedeno značajno utječe na reproducibilnost dostavljene doze, profil depozicije u nosnoj šupljini te potencijalnu iritaciju nosne sluznice (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Kao prikladna metoda izrade polimernih mikročestica za nazalnu primjenu istaknula se metoda sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem je kontinuirani proces kojim se kontroliranjem procesnih i formulacijskih parametara tekući uzorak prevodi u kruti uzorak odnosno prašak. Vrlo je zastupljen u području farmaceutske, biokemijske i prehrambene industrije. Sušenje raspršivanjem atraktivna je metoda zbog svoje energetske učinkovitosti kao i jednostavnog dizajna strategije sušenja i formuliranja za farmaceutsku proizvodnju u odnosu na druge proizvodne procese (Shi i sur., 2020). U farmaceutici, pronašla je svoju primjenu za razne svrhe. Neke od njih su priprema suhih prašaka za aerosole, poboljšanje svojstava tečenja farmaceutskih prašaka, promjena veličine i oblika čestica, kapsuliranje radi maskiranja okusa ili zaštite od oksidacije te sušenje biljnih ekstrakata i termolabilnih materijala (Arpagasus i sur., 2018). Sušenje raspršivanjem osigurava brojne prednosti pred drugim metodama pripreme mikročestica, kao što su kratko vrijeme pripreme, niska cijena te mogućnost optimiranja fizičko-kemijskih svojstava čestica, uključujući veličinu i raspodjelu veličina, morfologiju, sadržaj vlage i polimorfizam (Jiang i sur., 2017).

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti mikrosfere s natrijevim deksametazon fosfatom za nazalnu primjenu temeljene na pektinu i hipromelozi te ispitati utjecaj koncentracije

sastavnica raspršivanog sustava i brzine dotoka uzorka tijekom sušenja raspršivanjem na fizičko-kemijska svojstva pripremljenih mikrosfera.

Specifični ciljevi:

- Priprava mikrosfera od pektina i hipromeloze s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom metodom sušenja raspršivanjem
- Ispitivanje utjecaja koncentracije lijeka i hipromeloze u raspršivanom sustavu te brzine dotoka uzorka tijekom sušenja raspršivanjem na:
 - uspješnost uklapanja i sadržaj natrijeva deksametazon fosfata u mikrosferama
 - veličinu mikrosfera
 - svojstva bubrenja mikrosfera

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu mikrosfera u ovom radu korišteni su:

- natrijev deksametazon fosfat (Carbosynth Ltd., UK)
- hipromeloza (hidroksipropilmetilceluloza; Metolose 90SH 4000 SR, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japan)
- pektin (Pectin Amid CF 005, Herbstreith & Fox KG, Njemačka)

Prilikom ispitivanja bubrenja mikrosfera korišten je umjetni nazalni fluid (engl. *simulated nasal fluid*, SNF). Dobiven je otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 40 mM i $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u koncentraciji od 5,3 mM, u pročišćenoj vodi.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem

Hipromeloza je dispergirana u pročišćenoj vodi zagrijanoj pri 83°C uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nastankom homogene suspenzije, nastavljeno je miješanje 24 h pri sobnoj temperaturi te je pripravljena koncentrirana otopina hipromeloze (1,2%, *m/V*). Koncentrirana otopina pektina (1,4%, *m/V*) pripravljena je otapanjem pektina u pročišćenoj vodi uz 24-satno miješanje. Nakon otapanja, otopina je profiltrirana. Otopine natrijeva deksametazon fosfata koncentracija 1% i 10% (*m/V*) priređene su otapanjem krutine u pročišćenoj vodi. Koncentrirane otopine polimera pomiješane su u odgovarajućim omjerima te im je primiješana otopina lijeka. Koncentracija pektina u uzorcima za sušenje iznosila je 0,2%, *m/V*, a maseni omjer hipromeloze i pektina iznosio je 1:1 i 5:1. Sastav pripremljenih otopina polimera i lijeka prikazan je u Tablici 3. Ukupna masa uzorka za sušenje iznosila je 250 g.

Tablica 3. Sastav pripremljenih otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem

Uzorak	Koncentracija hipromeloze (%<i>, m/V</i>)	Koncentracija pektina (%<i>, m/V</i>)	Koncentracija lijeka (%<i>, m/V</i>)	Maseni omjer hipromeloze i pektina	Maseni omjer lijeka i pektina
1 i 5	1	0,2	0,2	5:1	1:1
2 i 6	0,2	0,2	0,2	1:1	1:1
3 i 7	0,2	0,2	0,02	1:1	0,1:1
4 i 8	1	0,2	0,02	5:1	0,1:1

3.2.2. Izrada mikrosfera sušenjem raspršivanjem

Mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom pripravljene su metodom sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem pripremljenih otopina polimera i lijeka provedeno je na uređaju Büchi 190 Mini SprayDryer (Flawil, Švicarska). Korištena je sapnica promjera 0,7 mm. Tijekom sušenja, varirana je brzina dotoka uzorka tako da je iznosila 2,5 ili 4,5 g/min. Ostali uvjeti bili su konstantni; protok komprimiranog zraka kroz sapnicu iznosio je 700 NL/h, aspirator je radio na 50% kapaciteta, temperatura sušenja je bila 160°C, dok je izlazna temperatura iznosila 85-87°C. U Tablici 4. prikazani su parametri sušenja.

Tablica 4. Parametri u procesu sušenja raspršivanjem

Parametar	Vrijednost
Brzina dotoka uzorka	2,5 ili 4,5 g/min
Protok komprimiranog zraka	700 NL/h
Kapacitet aspiratora	50%
Temperatura sušenja	160°C
Izlazna temperatura	85-87°C

3.2.3. Određivanje sadržaja lijeka HPLC metodom

Za kvantitativno određivanje natrijeva deksametazon fosfata korištena je prikladna metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Kromatografski parametri navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5. Kromatografski parametri korišteni za kvantitativno određivanje sadržaja lijeka

Kromatografski parametar	
Detektor	UV-Vis
Kolona	Kinetex C18 kolona, promjera pora 2,6 μm , 100 \times 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD)
Protok	0,7 ml/min
Temperatura kolone	55°C
Volumen injektiranja	20 μl
Eluiranje	Izokratno
Mobilna faza	68% 5 mM acetatni pufer pH 4,5 + 32% acetonitril
Valna duljina detekcije natrijeva deksametazon fosfata	241 nm

Mobilna faza izrađena je miješanjem 5 mM acetatnog pufera pH 4,5 i acetonitrila. Pufer je pripremljen otapanjem 0,185 g natrijeva acetata ($M = 82 \text{ g/mol}$) i 0,165 g octene kiseline ($M = 60,05 \text{ g/mol}$) u 800 ml deionizirane vode. Korištenjem 0,1 M HCl-a ili 0,1 M NaOH podešen je pH na $4,50 \pm 0,05$ te je pufer nadopunjen deioniziranom vodom do 1000 ml. Pufer je profiltriran kroz filter od celulozanitrata veličine pora 0,2 μm i pomiješan s acetonitrilom. Prije upotrebe, mobilna faza je profiltrirana kroz Nylon filter 0,45 mm i degazirana.

Standardna otopina natrijeva deksametazon fosfata koncentracije 1000 $\mu\text{g/ml}$ pripremljena je otapanjem 50 mg lijeka u deioniziranoj vodi korištenjem odmjerne tikvice klase A od 50 ml. Radne standardne otopine za izradu baždarnog pravca pripravljene su iz navedene osnovne otopine u koncentracijama 1, 2, 5 i 10 g/ml u duplikatu. Izrađene su pipetiranjem odgovarajućih volumena osnovne standardne otopine i razrjeđivanjem do željene koncentracije radne otopine deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici klase A od 25 ml.

Radne standardne otopine analizirane su na kromatografskom sustavu koji se sastojao od kontrolera SCL-10Avp, pumpe 10Advp, degazera DGU-14A, pećnice CTO-10Avp UV-VIS detektora SDP-10Avp (Shimadzu, Japan) i kolone Kinetex C18, promjera pora 2,6 μm , 100 \times 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD), pri kromatografskim parametrima definiranim u Tablici 4. Dobiveni rezultati korišteni su za izradu baždarnog pravca za kvantitativno određivanje natrijeva deksametazon fosfata.

Otopljeno je 20 mg uzorka u pročišćenoj vodi u odmjerne tikvici od 50 mL i stavljeno na magnetsku miješalicu. Nakon 24-satnog miješanja, uzorci su profiltrirani i injektirani na Kinetex C18 kolonu, promjera pora 2,6 μm , 100 \times 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD).

Sadržaj lijeka u mikrosferama (engl. *drug loading*, DL (%)), izražen kao postotni udio lijeka u mikrosferama (*m/m*), određen je prema jednadžbi:

$$\text{DL (\%)} = [\text{masa uklopljenog lijeka (mg)}] / [\text{ispitivana masa mikrosfera (mg)}] \times 100.$$

Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka provedeno je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{UU (\%)} = [\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}] / [\text{teorijski sadržaj lijeka (mg)}] \times 100.$$

3.2.4. Određivanje raspodjele veličina čestica

Raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije. Mjerenje je provedeno u tvrtki Jadran-galenski laboratorij d.d. na uređaju Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija), žarišne duljine leće 300 mm. Homogena suspenzija pripravljena je dispergiranjem 5 mg uzorka u 10 ml etanola (96%) uz soniciranje. Napravljeno je pozadinsko očitavanje i suspenzija mikrosfera je dodavana u Hydro MV ćeliju s magnetskim mješačem sve do zatamnjenja od 10-30%. Prije samog mjerenja, uzorci su ekvilibrirani 10 s. Analiza je provedena u triplikatu za svaki uzorak. Rezultati su izraženi volumnim promjerima Dv10, Dv50 i Dv90.

3.2.5. Bubrenje mikrosfera

Za ispitivanje bubrenja mikrosfera korištena je volumetrijska metoda. Ispitivanje je provedeno koristeći Franzovu difuzijsku ćeliju koja se sastoji od donorskog i receptorskog odjeljka odijeljenih polupropusnom membranom (Slika 12.). Sustav je termostatiran pri temperaturi od 34°C. Na polupropusnu membranu (Sartolon polimid, 0,45 µm, Sartorius stedim biotech, Njemačka) naneseo je 10 mg uzorka. Receptorski odjeljak napunjen je pročišćenom vodom ili SNF-om. Kako je uzorak u donorskom odjeljku bubrio, tako se razina receptorskog medija snižavala u postraničnoj cjevčici. Bubrenje je ispitivano tijekom 15 minuta, tako da je svake 3 minute dodan volumen pročišćene vode ili SNF-a koji je nadomještao receptorski medij do početne razine. Ispitivanje je provedeno u triplikatu. Bubrenje mikrosfera izraženo je dodanim volumenom pročišćene vode ili SNF-a po miligramu mikrosfera.

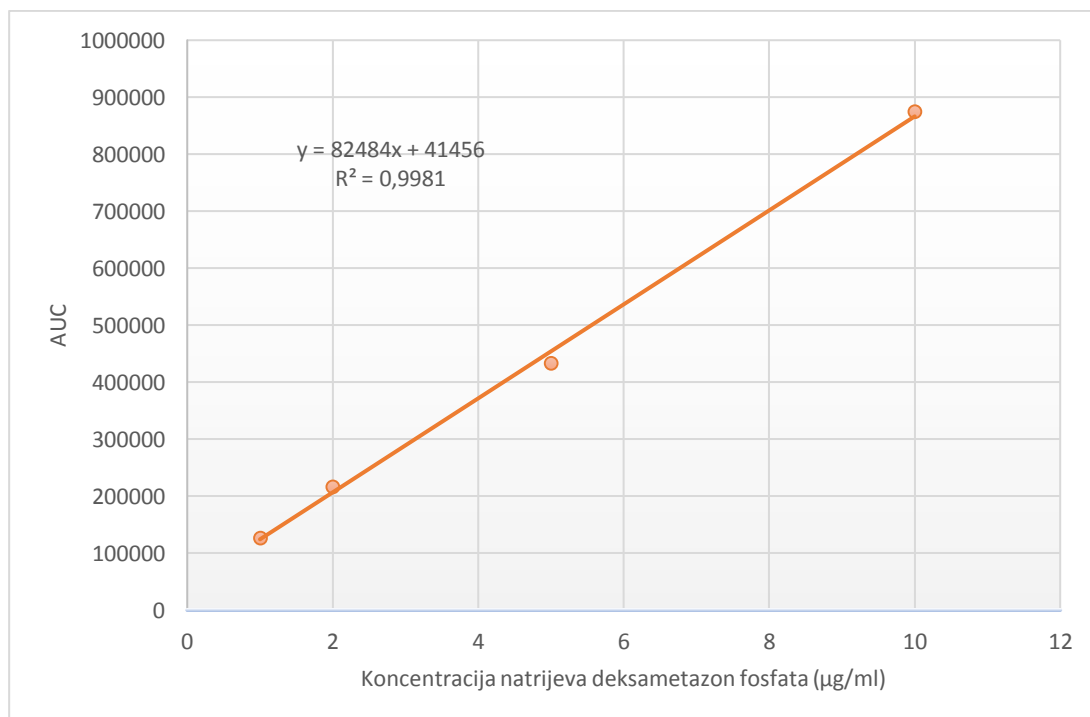


Slika 12. Ispitivanje bubrenja mikrosfera

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama

Prethodno navedena HPLC metoda verificirana je za kvantitativno određivanje natrijeva deksametazon fosfata. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) tehnika je odjeljivanja sastojaka u smjesi pri čemu mobilna faza (tekućina) nosi sastojke uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje sastojaka temelji se na različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu. Visoki tlak potreban je za osiguravanje protjecanja mobilne faze kroz kolonu. Primjenjuje se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju analita (Moreno-Arribas i Polo, 2003). Za određivanje sadržaja lijeka korištena je Kinetex C18 kolona (Phenomenex, SAD). Detekcija natrijeva deksametazon fosfata je provedena uz UV-VIS detektor pri valnoj duljini od 241 nm. Sadržaj lijeka određen je korištenjem kalibracijske krivulje pripravljene mjerenjem niza radnih standardnih otopina različitih koncentracija. Koncentracije radnih standardnih otopina su iznosile 1, 2, 5 i 10 µg/ml. Iz odnosa izmjerene površine pika i pripadajuće koncentracije radne otopine izračunata je kalibracijska funkcija $y = 82484x + 41456$ i koeficijent korelacije $r = 0,999071$ (koeficijent determinacije $R^2 = 0,9981$) prikazana na Slici 13.



Slika 13. Kalibracijski pravac natrijeva deksametazon fosfata

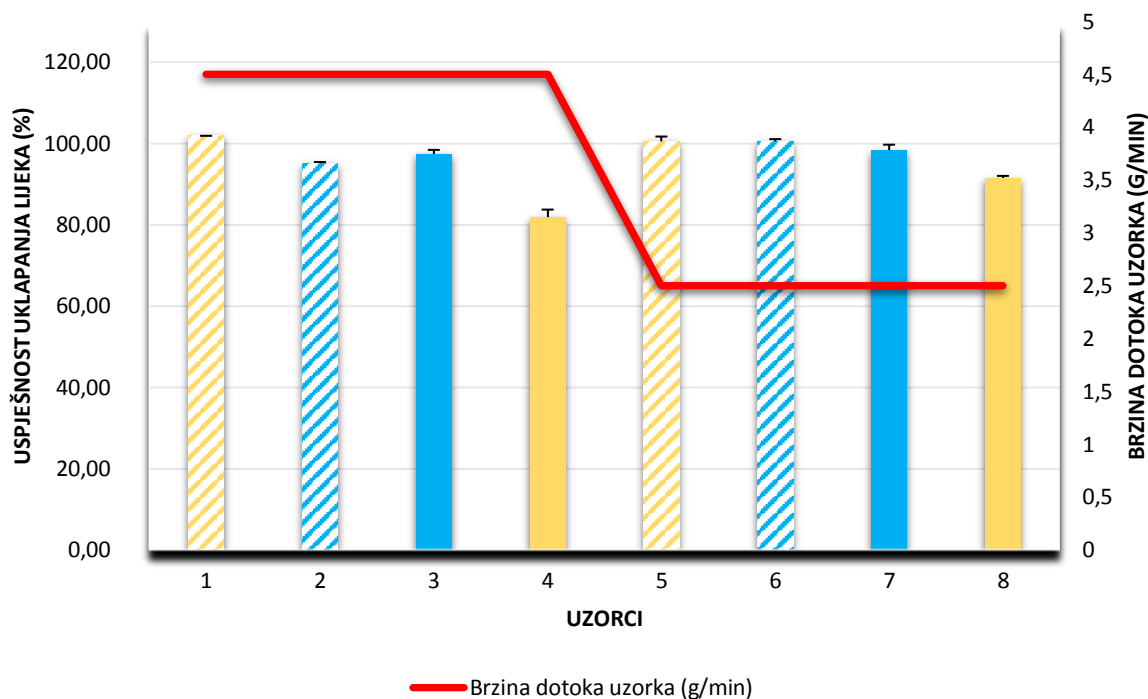
Sadržaj natrijeva deksametazon fosfata u mikrosferama određen je HPLC metodom. Izračunata je uspješnost uklapanja i sadržaj uklopljenog lijeka u odnosu na količinu mikrosfera prema formulama iz odjeljka 3.2.6. Sadržaj uklopljenog lijeka (engl. *drug loading*, DL (%)) prikazan je u Tablici 6. Sadržaj lijeka u mikrosferama iznosio je 1,3-33,5%, ovisno o omjeru lijeka i polimera. Najveći sadržaj uklopljenog lijeka prisutan je kod uzoraka 2 i 6. To su uzorci pripremljeni pri većoj koncentraciji lijeka i manjoj koncentraciji hipromeloze u raspršivanoj otopini, pri čemu obje iznose 0,2% (*m/V*). Jurišić Dukovski i suradnici (2019) pripravili su pektinske mikrosfere sa sadržajem deksametazona od $3,8 \pm 0,9$ % (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Prosječna dnevna doza nazalno primijenjenog deksametazona iznosi 400 - 800 μg stoga je uklopljeni sadržaj prikladan za primjenu deksametazona u terapijskoj dozi s obzirom da količina praška koja se može primijeniti pri jednom potisku iznosi 10-25 mg (Martino i sur, 2015). U ovom radu, masa mikrosfera s najvećim sadržajem lijeka koja bi osigurala dnevnu dozu deksametazona bila bi mala za reproducibilnu primjenu. No, široki raspon omogućuje miješanje mikrosfera s inertnim nosačem s ciljem optimiranja svojstava praška i depozicije, te također omogućuje ispitivanje utjecaja sadržaja lijeka na promatrana svojstva (Sacchetti i sur., 2002).

Tablica 6. Sadržaj natrijeva deksametazon fosfata u mikrosferama pripremljenim sušenjem raspršivanjem otopina različitih koncentracija hipromeloze i natrijeva deksametazon fosfata te pri različitim brzinama dotoka uzorka

	Konc. hipromeloze (%, <i>m/V</i>)	Konc. natrijeva deksametazon fosfata (%, <i>m/V</i>)	Brzina dotoka uzorka (g/min)	Sadržaj lijeka (DL) (%)
Uzorak 1	1,0	0,20	4,5	$14,6 \pm 0,05$
Uzorak 2	0,2	0,20	4,5	$31,7 \pm 0,33$
Uzorak 3	0,2	0,02	4,5	$4,6 \pm 0,09$
Uzorak 4	1,0	0,02	4,5	$1,3 \pm 0,02$
Uzorak 5	1,0	0,20	2,5	$14,4 \pm 0,07$
Uzorak 6	0,2	0,20	2,5	$33,5 \pm 0,44$
Uzorak 7	0,2	0,02	2,5	$4,7 \pm 0,03$
Uzorak 8	1,0	0,02	2,5	$1,5 \pm 0,01$

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3).

Uklapanje lijeka metodom sušenja raspršivanjem pokazalo se uspješnom i prikladnom metodom. Postignute su visoke uspješnosti uklapanja lijeka ($81,9 \pm 1,2 - 101,9 \pm 0,3\%$, Slika 14.) pri svim ispitivanim procesnim i formulacijskim parametrima. Najveća vrijednost uklapanja od 101,9 % postignuta je kod uzorka 1. Nižić i suradnici razvili su mikrosfere od pektina i/ili hipromeloze s uklopljenim melatoninom također metodom sušenja raspršivanjem s visokim uklapanjem lijeka bez obzira na polimerni sastav mikrosfera ($96,7 - 103,2\%$; Nižić i sur., 2020). Giunchedi i suradnici (1999) metodom sušenja raspršivanjem pripravili su pektinske mikrosfere s piroksikamom. Sadržaj uklopljenog lijeka bio je blizu teorijske vrijednosti (uspješnost uklapanja iznosila je 97-100 %). Analizom sadržaja lijeka i uspješnosti uklapanja zaključili su da je sušenje raspršivanjem metoda prikladna za uklapanje lijeka uz odličnu reproducibilnost (Giunchedi i sur., 1999). Shendge i Sayyad (2013) sušenjem raspršivanjem pripravili su kitozanske mikrosfere s uklopljenim budezonidom za ciljanu dostavu u kolon. Sadržaj uklopljenog lijeka iznosio je $42,12 - 46,15\%$, dok je uspješnost uklapanja za isti proces iznosila $84,24 - 92,28\%$ (Shendge i Sayyad, 2013). Mahajan i suradnici (2012) sušenjem raspršivanjem pripremili su pektinske mikrosfere ondansetrona sadržaja lijeka između 23 i 29%, dok je uspješnost uklapanja lijeka iznosila iznad 80%. Sukladno očekivanjima, sadržaj uklopljenog lijeka bio je obrnuto proporcionalan koncentraciji polimera u raspršivanoj otopini. Osim toga, uspješnost uklapanja povećala se s povećanjem koncentracije polimera zbog veće dostupnosti polimera za uklapanje lijeka (Mahajan i sur., 2012). Sander i suradnici (2013) pripravili su mikrosfere od hipromeloze s uklopljenim nikotinom metodom sušenja raspršivanjem uz visoke uspješnosti uklapanja, od 99 do 127%. Mikrosfere s najvećim omjerom hipromeloze u odnosu na nikotin imale su i najveći postotak uklapanja (Sander i sur., 2013). Jain i sur. (2009) priredili su mikrosfere hipromeloze s uklopljenim sumatriptanom uz uspješnost uklapanja preko 90%, dok je sadržaj uklopljenog lijeka iznosio od 16,31 do 46,04%. Uklapanje je bilo najveće kod najveće koncentracije hipromeloze u odnosu na lijek, dok je sadržaj uklopljenog lijeka u tom slučaju bio najmanji (Jain i sur., 2009).



Slika 14. Uspješnost uklapanja natrijeva deksametazon fosfata u mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina koncentracije hipromeloze od 1,0% (●) i 0,2% (●), koncentracije lijeka od 0,20% (iscrtkano) i 0,02% (ispunjeno), pri brzini dotoka uzorka od 2,5 i 4,5 g/min. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n = 3).

4.3. Veličina mikrosfera

Veličina čestica važan je faktor koji utječe na učinkovitu dopremu lijeka iz uređaja na nazalnu sluznicu (Ivey i sur., 2014). Čestice praškastih sustava odstupaju od idealnog sferičnog oblika, pa se za opisivanje njihove veličine koristi ekvivalentni sferični promjer. To je promjer sfere koja odgovara mjerenoj čestici po jednom od svojstava kao što su primjerice masa, površina ili volumen (Thomas i Charvet, 2017). Volumna raspodjela uzima u obzir volumen pojedine čestice i ukupni volumen svih čestica u uzorku. Dakle, doprinos svake čestice u volumnoj raspodjeli mjeri se volumenom te čestice, odnosno relativni doprinos proporcionalan je kubu promjera čestice. Volumni promjeri koji se najčešće koriste za opisivanje raspodjele veličina čestica u mjenom uzorku su Dv10, Dv50, i Dv90. Volumni promjer Dv10 odgovara onom promjeru od kojeg manje čestice čine 10% ukupnog volumena svih čestica u uzorku. Volumni promjer Dv50 odgovara onom promjeru od kojeg manje čestice čine 50% ukupnog volumena svih čestica u uzorku. Jednako tako, volumni promjer

Dv90 odgovara onom promjeru od kojeg manje čestice čine 90% ukupnog volumena svih čestica u uzorku (Innopharma Technology Limited).

Veličina mikrosfera u ovom radu određena je metodom laserske difrakcije te su rezultati izraženi volumnim promjerima Dv10, Dv50 i Dv90 (Tablica 7.). Čestice su veće što je veća koncentracija otopljenih tvari u otopini koja je sušena raspršivanjem. Prethodno je poznato kako sušenje raspršivanjem otopina veće koncentracije rezultira većim česticama zbog manje količine otapala u svakoj kapljici koje isparava tijekom procesa sušenja te povećane viskoznosti polimernih otopina (Ziaee i sur., 2018). Vrijednosti Dv10 vrlo su slične za sve uzorke, neovisno o koncentraciji sastavnica i uvjetima sušenja te iznose od $1,41 \pm 0,00$ do $2,19 \pm 0,06 \mu\text{m}$. Koncentracija uzorka imala je najveći utjecaj na vrijednosti Dv90, tako je najveća vrijednost Dv90 izmjerena kod uzorka 5. Campos i suradnici (2019) pripremili su mikročestice od kitozana i Eudragita® s uklopljenim budezonidom za oralnu primjenu metodom sušenja raspršivanjem. Uspoređivali su utjecaj koncentracije smjese polimera na veličinu čestica mjereći Dv10, Dv50 i Dv90. Izmjerene vrijednosti Dv10 su $3,42 - 9,7 \mu\text{m}$, Dv50 $8,17 - 22,07 \mu\text{m}$ i Dv90 $17,73 - 43,64 \mu\text{m}$. Zaključili su da s povećanjem koncentracije polimera raste i veličina čestica. Utjecaj je najmanje vidljiv na vrijednosti Dv10, dok je najizraženiji na vrijednosti Dv90 (Campos i sur., 2019).

Razuc i suradnici (2018) razvili su mikročestice s ciprofloksacinkloridom za pulmonalnu primjenu. Izmjerene vrijednosti Dv50 za mikročestice pripravljene pri različitim brzinama dotoka uzorka iznosile su $4,4 - 7,9 \mu\text{m}$. Povećanjem brzine dotoka uzorka, dobivene su čestice većeg promjera (Razuc i sur., 2018). Poznato je kako brzina dotoka uzorka, kao jedan od procesnih parametara metode sušenja raspršivanjem, ima utjecaj na veličinu dobivenih čestica (Uyen i sur., 2020). Povećanjem brzine dotoka uzorka nastaju veće kapljice i posljedično veće čestice zbog utroška energije atomizacije na veći volumen tekućeg uzorka (Ziaee i sur., 2018). U našem slučaju, brzina dotoka uzorka nije značajno utjecala na veličinu čestica. Baek i suradnici (2014) pripremili su mikročestice Eudragita® s uklopljenim ginsenzidom metodom sušenja raspršivanjem te također nisu uočili značajni utjecaj brzine dotoka uzorka na veličinu čestica. Veličina čestica iznosila je od $698,0 \pm 50,8 \text{ nm}$ do $1801,8 \pm 85,4 \text{ nm}$, a kod najveće brzine dotoka uzorka veličina čestica iznosila je $786,1 \pm 63,7 \text{ nm}$ (Baek i sur., 2014).

Prema zahtjevima EMA-e većina čestica nazalnih prašaka mora biti veličine veće od $10 \mu\text{m}$ što osigurava da je depozicija lokalizirana u nosnoj šupljini. Osim toga, zahtijeva i

određivanje raspona za dozvoljene granice promjera medijana raspodjele veličine čestica, kao i postavljanje limita za one čestice koje su manje od 10 μm (Europska agencija za lijekove, 2006). U pripravcima prevladava raspon veličine čestica od 30 do 120 μm (Sangolkar i sur., 2012). Primjer registriranog suhog praška za nazalnu primjenu je Teijin Rhinocort® (Teijin, Tokyo, Japan) koji sadrži beklometazonpropionat (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Mjerena je raspodjela veličina čestica tog pripravka te su određeni volumni promjeri koji iznose: Dv10 $51,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$, Dv50 $98 \pm 1,3 \mu\text{m}$ i Dv90 $162,3 \pm 4,0 \mu\text{m}$. Većina čestica je oko 100 μm što odgovara zahtjevima.

Mikrosfere pripravljene u ovom radu relativno su male veličine s obzirom na zahtjeve za nazalnu primjenu. Takva veličina čestica često se prijavljuje u literaturi za nazalne praškaste sustave pripravljene metodom sušenja raspršivanjem (Rathananand i sur., 2007). Naime, male čestice mogu biti kandidati za nazalnu primjenu, s obzirom da mogu biti izrazito kohezivne te davati aglomerate prikladne veličine čestica (Balakrishnan i sur., 2010). Također, mogu se miješati s ekscipijensima veće veličine čestica koja odgovara nazalnoj primjeni (Pozzoli i sur., 2016).

Tablica 7. Veličina mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem izražena volumnim promjerima Dv10, Dv50 i Dv90.

Uzorak	Konc. hipromeloze (%<i>, m/V</i>)	Konc. natrijevog deksametazon fosfata (%<i>, m/V</i>)	Brzina dotoka uzorka (g/min)	Dv10 (μm)	Dv50 (μm)	Dv90 (μm)
1	1,0	0,20	4,5	$1,85 \pm 0,00$	$4,97 \pm 0,01$	$17,70 \pm 0,37$
2	0,2	0,20	4,5	$1,56 \pm 0,00$	$2,60 \pm 0,01$	$5,13 \pm 0,06$
3	0,2	0,02	4,5	$1,42 \pm 0,00$	$2,15 \pm 0,01$	$4,37 \pm 0,02$
4	1,0	0,02	4,5	$1,73 \pm 0,00$	$3,60 \pm 0,01$	$15,27 \pm 0,25$
5	1,0	0,20	2,5	$2,19 \pm 0,06$	$13,65 \pm 0,45$	$21,35 \pm 0,85$
6	0,2	0,20	2,5	$1,53 \pm 0,00$	$2,88 \pm 0,01$	$8,20 \pm 0,16$
7	0,2	0,02	2,5	$1,41 \pm 0,00$	$2,24 \pm 0,00$	$6,29 \pm 0,00$
8	1,0	0,02	2,5	$1,61 \pm 0,00$	$3,11 \pm 0,01$	$12,90 \pm 0,00$

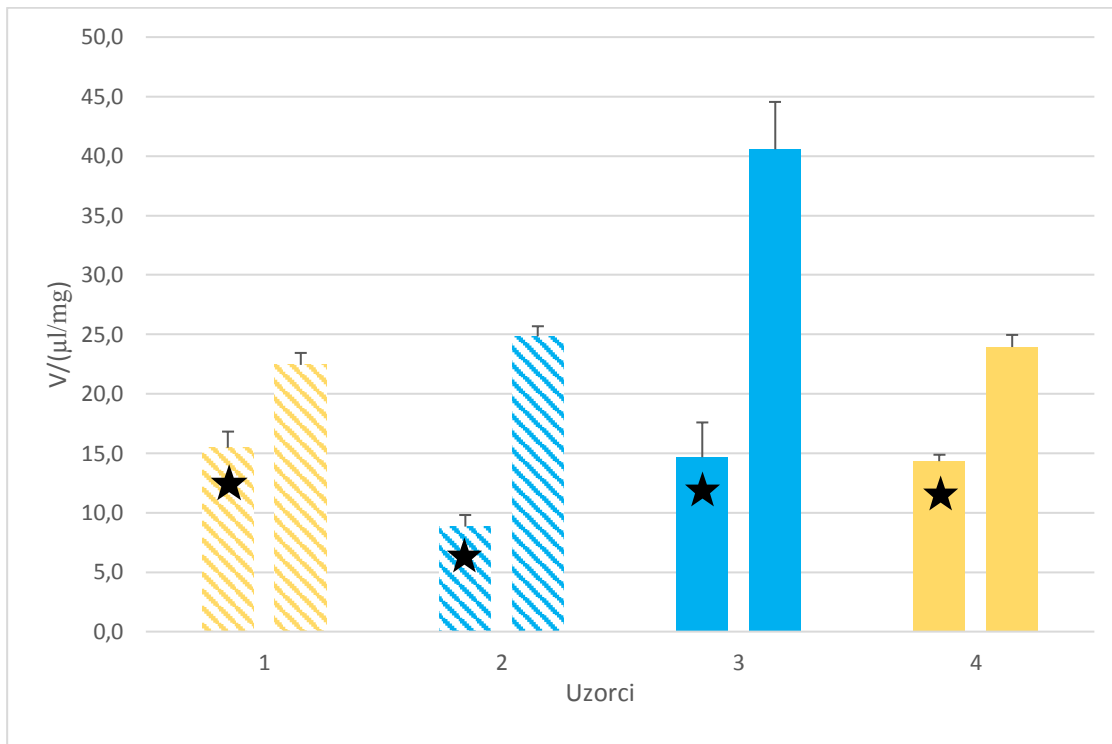
Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3).

4.4. Bubrenje mikrosfera

Kontrolirano bubrenje i formiranje hidrogela ključna je karakteristika nazalne primjene suhih prašaka (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Bubrenjem mikrosfera može doći do osmotskog stresa epitelnih stanica zbog dehidracije. Posljedično dolazi do otvaranja međustaničnih čvrstih spojeva i povećane paracelularne apsorpcije lijeka te je stoga važno optimirati svojstva bubrenja mikrosfera tijekom razvoja formulacije (Nižić i sur., 2020). Osim toga, ispitivanje bubrenja važno je kako bismo mogli predvidjeti mukoadhezivno ponašanje *in vivo* (Duggan i sur., 2017). U ovom radu bubrenje je ispitano pomoću Franzove difuzijske ćelije uz pročišćenu vodu i SNF kao medij za bubrenje te je izraženo kao volumen apsorbiranog fluida po miligramu mikrosfera. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 15. i 16. Iz rezultata je vidljivo da su mikrosfere apsorbirale značajno manji volumen SNF-a nego pročišćene vode. Jurišić Dukovski i suradnici (2018) ispitivali su kapacitet bubrenja pektinskih mikrosfera u koje su inkorporirane lipidno alginatne nanočestice deksametazona za nazalnu primjenu te također primijetili slabije bubrenje pektina kada je kao vodeni medij korišten SNF u odnosu na pročišćenu vodu (Jurišić Dukovski i sur., 2018). U SNF-u su prisutni dvovalentni kationi kalcija koji prolaze kroz membranu između donorskog i receptorskog odjeljka u procesu bubrenja. Prisutnost kalcija dovodi do umrežavanja lanaca pektina što je razlog slabijem bubrenju mikrosfera. Obrnuta proporcionalnost gustoće umreženja polimera i stupnja bubrenja već je poznata prethodno iz literature (Günter i sur., 2018).

Rezultati bubrenja u pročišćenoj vodi ukazuju da mikrosfere pripravljene pri manjem masenom omjeru hipromeloze prema pektinu (1:1) od dva ispitivana omjera (1:1 i 5:1) i manjem masenom omjeru lijeka prema pektinu (0,1:1) od dva ispitivana omjera (0,1:1 i 1:1) imaju najbolja svojstva bubrenja, neovisno o brzini dotoka uzorka ($40,6 \pm 4,0 \mu\text{l}/\text{mg}$, Slika 15. i 16.). Ranija ispitivanja pokazala su da dodatak hipromeloze smanjuje bubrenje pektinskog matriksa u vodi (Nižić i sur., 2020). U skladu s time, u ovom radu primijećeno je slabije bubrenje mikrosfera pripremljenih iz pektina i hipromeloze s većim udjelom hipromeloze. Isto tako, uzorak koji najbolje bubri karakteriziran je značajno manjim sadržajem uklopljenog lijeka, a samim time značajno većim udjelom polimernih sastavnica u matriksu mikrosfera. To doprinosi bubrenju mikrosfera, jer jedino polimerne sastavnice imaju sposobnost bubrenja. Jain i sur (2009) pripremili su mikrosfere hipromeloze sa sumatriptanom te ispitivali svojstva

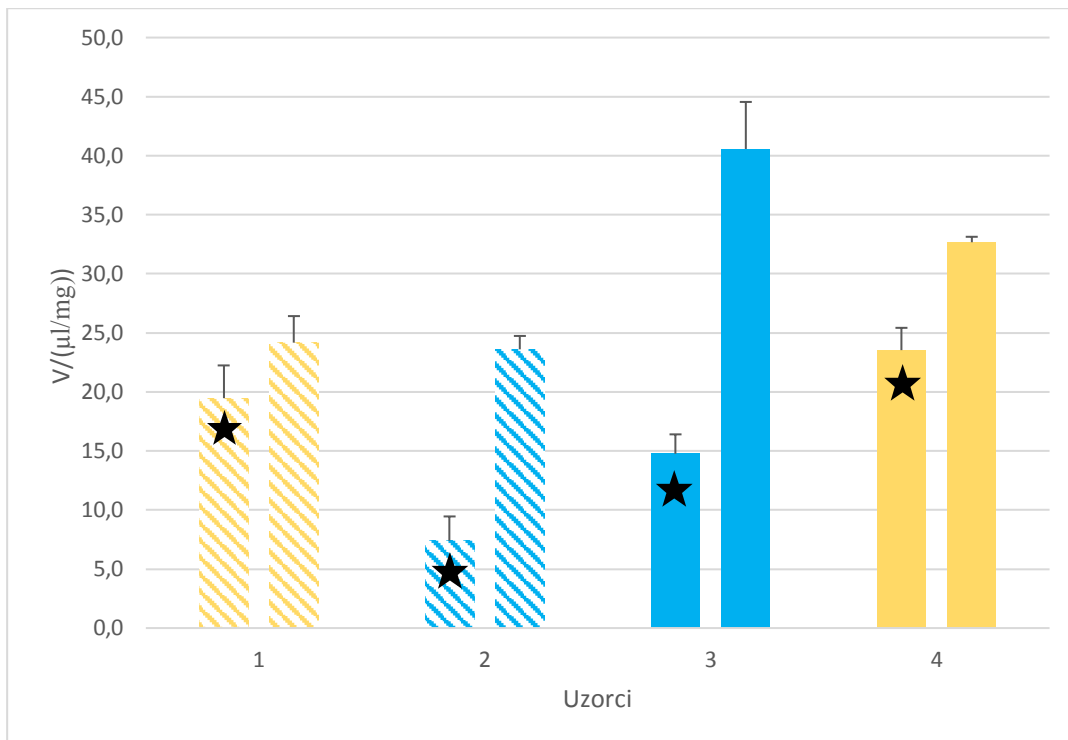
bubrenja u fosfatnom puferu (pH = 6,6). Zaključili su da povećanje koncentracije hipromeloze u odnosu na lijek rezultira povećanjem bubrenja mikrosfera (Jain i sur., 2009).



Slika 15. Svojstva bubrenja mikrosfera u pročišćenju u vodi i SNF-u (★) pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopina polimera i lijeka pri brzini dotoka uzorka od 4,5 g/min. Raspršivane su otopine koncentracije hipromeloze od 1% (●) ili 0,2% (●) i koncentracije lijeka od 0,2% (iscrtkano) ili 0,02% (ispunjeno). Bubrenje je izraženo volumenom fluida (µl) apsorbiranom po miligramu mikrosfera u 15-minutnom bubrenju. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Kod bubrenja uzoraka u SNF-u, mikrosfere koje su pripravljene pri većem masenom omjeru hipromeloze prema pektinu (5:1) uglavnom su pokazale bolja svojstva bubrenja od mikrosfera pripravljenih pri manjem masenom omjeru hipromeloze prema pektinu (1:1). Nižić i suradnici (2020) uočili su da mikrosfere pripravljene iz pektina i hipromeloze bolje bubre u SNF-u od pektinskih mikrosfera. Razlog tome je što ioni kalcija umrežavaju pektin, a ne i hipromelozu, pa je dodatak hipromeloze osigurao umjereno bubrenje što omogućuje optimiranje mukoadhezije i oslobađanja lijeka. Najslabije svojstvo bubrenja u SNF-u u ovom radu imale su mikrosfere pripravljene pri manjem omjeru hipromeloze i pektina (1:1) i većem omjeru lijeka i pektina (1:1) neovisno o brzini dotoka uzorka ($8,8 \pm 1,0$ i $7,4 \pm 2,1$ µl/mg,

Slika 15. i 16.). Takav rezultat u skladu je s očekivanjima, s obzirom da veći sadržaj uklopljenog lijeka znači i manji udio polimera u matriksu mikrosfera koji bubre u doticaju s vodenim medijem.



Slika 16. Svojstva bubrenja mikrosfera u pročišćenoj vodi i SNF-u (★) pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopina polimera i lijeka pri brzini dotoka uzorka od 2,5 g/min. Raspršivane su otopine koncentracije hipromeloze od 1% (●) ili 0,2% (●) i koncentracije lijeka od 0,2% (iscrtkano) ili 0,02% (ispunjeno). Bubrenje je izraženo volumenom fluida (μl) apsorbiranom po miligramu mikrosfera u 15-minutnom bubrenju. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

5. ZAKLJUČCI

- Mikrosfere masenog omjera natrijevog deksametazon fosfata i pektina 0,1:1 i 1:1 te hipromeloze i pektina 1:1 i 5:1 uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem pri različitim brzinama dotoka uzorka (2,5 i 4,5 g/min) te pri konstantnim postavkama kapaciteta aspiratora (50%), ulazne temperature (160°C) i protoka komprimiranog zraka (700 NI/h) kroz sapnicu promjera 0,7 mm.
- Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka (od 81,9 do 101,9%) pri svim ispitivanim formulacijskim i procesnim parametrima.
- Sadržaj uklopljenog lijeka iznosio je 1,3-33,5% ovisno o omjeru lijeka i polimera.
- Veličina mikrosfera rasla je s koncentracijom sastavnica u otopini koja je sušena raspršivanjem, a najveći utjecaj je vidljiv na vrijednosti Dv90 čiji je raspon od $4,37 \pm 0,02$ do $21,35 \pm 0,85$ μm . Vrijednosti Dv10 vrlo su slične za sve uzorke, neovisno o koncentraciji sastavnica i uvjetima sušenja te one iznose od $1,41 \pm 0,00$ do $2,19 \pm 0,06$ μm . Raspon vrijednosti Dv50 iznosi od $2,15 \pm 0,01$ do $13,65 \pm 0,45$ μm .
- Mikrosfere su u procesu bubrenja apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom, a uslijed umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} iz SNF-a.
- Sposobnost bubrenja mikrosfera u SNF-u rasla je s porastom udjela hipromeloze u polimernom matriksu i sa smanjenjem sadržaja uklopljenog lijeka.
- Nije uočen utjecaj brzine dotoka uzorka u procesu sušenja raspršivanjem na promatrana svojstva mikrosfera.

6. LITERATURA

Abd El-Hameed MD, Kellaway IW. Preparation and in vitro characterisation of mucoadhesive polymeric microspheres as intra-nasal delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 44, 53-60.

Al-Hashimi N, Begg N, Alany RG, Hassanin H, Elshaer A. Oral modified release multiple-unit particulate systems: compressed pellets, microparticles and nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 176.

Al-Khattawi A, Bayly A, Phillips A. The design and scale-up of spray dried particle delivery systems. *Expert Opin Drug Del*, 2018, 15, 47-63.

Almeida H, Amaral MH, Lobaõ P, Sousa Lobo JM. In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discov. Today*, 2013, 00, 1-13.

Alpar HO, Somavarapua S, Atuahb KN, Bramwella VW. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 411-430.

Aptar Pharma's Nasal Unidose Device Approved by US FDA, 2018., www.drug-dev.com/aptar-pharmas-nasal-unidose-device-approved-by-us-fda/, pristupljeno 5. 2. 2020.

Arpagaus C, Collenberg A, Rütli D, Assadpour E, Mahdi Jafari S. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 2018, 546, 194-214.

Atkinson TJ, Fudin J, Jahn HL, Kubotera N, Leigh Rennick A, Rhorer M. What's new in NSAID pharmacotherapy: oral agents to injectables. *Pain Med*, 2013, 14, 11-17.

Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines, 4th Ed. Elsevier, Ltd, 2013, str. 23-25, 138-139, 424, 646-649, 657-674.

Baek JS, Yeon WG, Lee CA, Hwang SJ, Park JS, Kim DC, Cho CW. Preparation and characterization of mucoadhesive enteric-coating ginsenoside-loaded microparticles. *Arch Pharm Res*, 2014, 38, 761-768.

Balakrishnan A, Pizette P, Martin CL, Joshi SV, Saha BP. Effect of particle size in aggregated and agglomerated ceramic powders. *Acta Mater*, 2010, 58, 802-812.

Bansal H, Preet Kaur S, Gupta AK. Microsphere: Methods of preparation and applications; A comparative study. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2011, 012, 69-78.

Begam T, Nagpal AK, Singhal R. A comparative study of swelling properties of hydrogels based on poly (acrylamide-co-methyl methacrylate) containing physical and chemical crosslinks. *J Appl Polym Sci*, 2003, 89, 779 -786.

Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: hardware and process parameters. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 575-586.

Campos JC, Ferreira DC, Lima S, Reis S, Costa PJ. Swellable polymeric particles for the local delivery of budesonide in oral mucositis. *Int J Pharm*, 2019, 566, 126-140.

Carbinatto FM, de Castro AD, Evangelista RC, Cury BSF. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 9, 27-34.

Chaturvedi M, Kumar M, Pathak K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2(4), 215-222.

Chen X, Chen Z, Lu G, Bu W, Yang B. Measuring the swelling behavior of polymer microspheres with different cross-linking densities and the medium-dependent color changes of the resulting latex crystal films. *J Colloid Interface Sci*, 2003, 264, 266-270.

Chonkar A, Nayak U, Udupa N. Smart polymers in nasal drug delivery. *Indian J Pharm Sci*, 2015, 77, 367-375.

Chowdary KPR, Srinivasa Rao Y. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27, 1717-1724.

Da Silva Júnior WF, de Oliveira Pinheiro JG, Moreira CDLFA, de Souza FJJ, de Lima AAN. Alternative technologies to improve solubility and stability of poorly water-soluble drugs. U: Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics, UK, Elsevier BV, 2017, str. 281-299.

Das M, Giri TK. Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2020, 56.

Devasani SR, Dev A, Rathod S, Deshmukh G. An overview of in situ gelling systems. *Pharm Biol Eval*, 2016, 3, 60-69.

Dhaliwal S, Jain S, Singh HP, Tiwary AK. Mucoadhesive microspheres for gastroretentive delivery of acyclovir: In vitro and in vivo evaluation. *AAPS J*, 2008, 10, 322-330.

Djupesland PG. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective - a review. *Drug Deliv and Transl Res*, 2013, 3, 42-62.

Donald AM. Food gels. Encyclopedia of Materials: Science and Technology (Second Edition), urednici, Jürgen Buschow KH, Cahn RW, Flemings CM, Ilscher B, Kramer EJ, Mahajan S, Veyssiere P, Elsevier Ltd, 2001, 3231-3233.

Duggan S, Cummins W, O'Donovan O, Hughes H, Owens E. Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 100, 64-78.

European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). European Pharmacopeia 8.0. Dosage Forms, 793. Strasbourg, Council of Europe, 2013.

European Medicines Agency. Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. European Medicines Agency: London, UK, 2006, 1-27.

Filipović- Grčić J, Hafner A. Nasal powder drug delivery. U: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Gad, SH, New Jersey, John Wiley and Sons, 2008, str. 651-681.

Flutto, L. Pectin: properties and determination. *Encycl Food Sci Nutr (Second Ed.)*, 2003, 4440–4449.

Focaroli S, Mah PT, Hastedt JE, Gitlin I, Oscarson S, Fahy JV, Healy AM. A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *Int J Pharm*, 2019, 562, 228–240.

Fransen N. Studies on a novel powder formulation for nasal drug delivery. Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations, Uppsala University, 2008, 70.str. URL: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:172562/FULLTEXT01.pdf>, pristupljeno 13.2.2020.

Gänger S, Schindowski K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: A review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 116.

Gardenhire DS, Burnett D, Strickland S, Myers TR. A guide to aerosol delivery devices for respiratory therapists. American Association for Respiratory Care, 2017, 55 str. URL: https://www.aarc.org/wp-content/uploads/2015/04/aerosol_guide_rt.pdf, pristupljeno 3.3.2020.

Gazzaniga A, Palugan L, Foppoli A, Sangalli ME. Oral pulsatile delivery systems based on swellable hydrophilic polymers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 11–18.

Gieszinger P, Csóka I, Pallagi E, Katona G, Jójárt-Laczkovich O, Szabó-Révész P, Ambrus R. Preliminary study of nanonized lamotrigine containing products for nasal powder formulation. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11, 2453-2466.

Giunchedi P, Conte U, Chetoni P, Saettone MF. Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9, 1-7.

Gómez-Mascaraque LG, Martínez-Sanz M, Hogan SA, López-Rubio A, Brodkorb A. Nano- and microstructural evolution of alginate beads in simulated gastrointestinal fluids. Impact of M/G ratio, molecular weight and pH. *Carbohydr Polym*, 2019, 223, 115-121.

Günter EA, Khramova DS, Markov PA, Popeyko OV, Melekhin AK, Beloserov VS, Martinson EA, Litvinets SG, Popov SV. Swelling behavior and satiating effect of the gel microparticles obtained from callus cultures pectins. *Int J Biol Macromol*, 2018, 123, 300-307.

Hypromellose, 2020.,

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/hypromellose12345900465311?lang=en®ion=HR>, pristupljeno: 20.2.2020.

Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *DDT*, 2002, 7(23), 1184-1189.

Illum L. Nasal drug delivery - possibilities, problems and solutions. *J Control Release*, 2003, 87, 187–198.

Innopharma Technology Limited. A guide to D-values in pharmaceutical particle characterisation [elektronička građa]. 5. str. URL: <https://www.innopharmatechnology.com/docs/default-source/eyecon2-whitepapers/a-guide-to-d-values-in-pharmaceutical-particle-characterisation.pdf>, pristupljeno: 4.5.2020.

Ivey JW, Lewis D, Church T, Finlay WH, Vehring R. A correlation equation for the mass median aerodynamic diameter of the aerosol emitted by solution metered dose inhalers. *Int J Pharm*, 2014, 465, 18–24.

Jain SA, Chauk DS, Mahajan HS, Tekade AR, Gattani SG. Formulation and evaluation of nasal mucoadhesive microspheres of Sumatriptan succinate. *J Microencapsul*, 2009, 26, 711–721.

Jiang WZ, Cai Y, Li HY. Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technol*, 2017, 312, 124-132.

Jug M, Hafner A, Lovrić J, Lusina Kregar M, Pepić I, Vanić Ž, Cetina-Cižmek B, Filipović-Grčić J. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J Pharm Biomed*, 2017, 147, 350-366.

Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Dry Technol*, 2019, 37, 1915-1925.

Kadam NR, Suvarna V. Microspheres: A brief review. *Asian J Biomed Pharm Sci*, 2015, 5, 13-19.

Kaur G, Grewal J, Jyoti K, Jain UK, Chandra R, Madan J. Drug targeting and stimuli sensitive drug delivery systems. Oral controlled and sustained drug delivery systems: Concepts, advances, preclinical, and clinical status. Elsevier, Inc, 2018, str. 567-626.

Keck T, Leiacker R, Riechelmann H, Rettinger G. Temperature profile in the nasal cavity. *Laryngoscope*, 2000, 110, 651–654.

Kirange RH, Chaudhari RB. Utilizing mucoadhesive polymers for nasal drug delivery system. *Int J Pharm Sci Res*, 2017, 8, 1012-22.

Komati S, Swain S, Bhanoji Rao ME, Jena BR, Dasi V. Mucoadhesive multiparticulate drug delivery systems: An extensive review of patents. *Adv Pharm Bull*, 2019, 9, 521-538.

Kouchak M. In situ gelling systems for drug delivery. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2014, 9, 1-2.

Kowalski G, Kijowska K, Witczak M, Kuteranski L, Łukasiewicz M. Synthesis and effect of structure on swelling properties of hydrogels based on high methylated pectin and aryllic polymers. *Polymers*, 2019, 11, 114.

Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *J Anat*, 1996, 189, 503-505.

Lechanteur A, Evrard B. Influence of composition and spray-drying process parameters on carrier-free DPI properties and behaviors in the lung: A review. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 55.

Lengyel M, Kállai-Szabó N, Antal V, Laki AJ, Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci Pharm*, 2019, 87, 20.

Li CL, Martini LG, Ford JL, Roberts M. The use of hypromellose in oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57, 533–546.

Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater*, 2016, 1, 1-38.

Lindemann J, Leiacker R, Rettinger G, Keck T. Nasal mucosal temperature during respiration. *Clin Otolaryngol*, 2002, 27, 135–139.

Mahajan HS, Tatiya BV, Nerkar PP. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. *Powder Technol*, 2012, 221, 168–176.

Martino BJ, Church CA, Seiberling KA. Effect of intranasal dexamethasone on endogenous cortisol level and intraocular pressure. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2015, 5, 605–609.

Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13, 655–672.

Moffa A, Costantino A, Rinaldi V, Sabatino L, Trecca EMC, Baptista P, Campisi P, Cassano M, Casale M. Nasal delivery devices: A comparative study on cadaver model. *BioMed Res Int*, 2019, 1-6.

Moreno-Arribas MV, Polo MC. Chromatography: High-performance liquid chromatography. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2003, 1274–1280.

Nasal sprays, www.kingstonallergyandasthma.com/resources/Nasal%20Sprays.pdf, pristupljeno 5. 2. 2020.

Nižić L, Potaś J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105-115.

Okay O. General Properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, 2009, 6, 1-14.

Patel BB, Patel JK, Chakraborty S, Shukla D. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharm J*, 2015, 23, 352-365.

Pozzoli M, Rogueda P, Zhu B, Smith T, Young PM, Traini D, Sonvico F. Dry powder nasal drug delivery: challenges, opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort device and formulation. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42, 1660–1668.

Rathananand M, Kumar DS, Shirwaikar A, Kumar R, Sampath Kumar D, Prasad RS. Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying. *Indian J Pharm Sci*, 2007, 69, 651-657.

Razuc M, Piña J, Ramírez-Rigo MV. Optimization of ciprofloxacin hydrochloride spray-dried microparticles for pulmonary delivery using design of experiments. *Pharm Sci Tech*, 2018, 19, 3085-3096.

Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F, Minghetti P, Parodi B. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2016, 32, 113-125.

Sacchetti C, Artusi M, Santi P, Colombo P. Caffeine microparticles for nasal administration obtained by spray drying. *Int J Pharm*, 2002, 242, 335–339.

Sander C, Nielsen HS, Søgaard SR, Støving C, Yang M, Jacobsen J, Rantanen J. Process development for spray drying of sticky pharmaceuticals; case study of bioadhesive nicotine microparticles for compressed medicated chewing gum. *Int J Pharm*, 2013, 452, 434-437.

Sangolkar S, Adhao V, Mundhe D, Sawarkar H. Particle size determination of nasal drug delivery system: A review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2012, 17, 66–73.

Sarada K, Firoz S, Padmini K. In-Situ Gelling System: A Review. *Int J Curr Pharm Rev Res*, 2014-15, 5, 76-90.

Shekunov BY, Chattopadhyay P, Tong HHY, Chow AHL. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharm Res*, 2007, 24, 203-227.

Shendge RS, Sayyad FJ. Formulation development and evaluation of colonic drug delivery system of budesonide microspheres by using spray drying technique. *J Pharm Res*, 2013, 6, 456-461.

Shi NQ, Zhou J, Walker J, Li L, Hong KY, Olsen KF, Tang J, Ackermann R, Wang Y, Qin B, Schwendeman A, Schwendeman SP. Microencapsulation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist in poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres by spray drying. *J Control Release*, 2019, 321, 756-772.

Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1556 – 1568.

Soane RJ, Frier M, Perkins AC, Jones NS, Davis SS, Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int J Pharm*, 1999, 178, 55–65.

Stevens F. Spectrophotometric measurement of swelling of polymer films by very poor solvents. *J Appl Polym Sci*, 2005, 97, 1082–1089.

Tanaka A, Furubayashi T, Enomura Y, Hori T, Shimomura R, Maeda C, Kimura S, Inoue D, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. Nasal drug absorption from powder formulations: Effect of fluid volume changes on the mucosal surface. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 212–219.

Tepper SJ, Johnstone MR. Breath-powered sumatriptan dry nasal powder: an intranasal medication delivery system for acute treatment of migraine. *Med Devices*, 2018, 11, 147–156.

Thomas D, Charvet A. An Introduction to Aerosols. *Aerosol Filtration*, 2017, 15-17.

Tiozzo Fasiolo L, Manniello MD, Tratta E, Buttini F, Rossi A, Sonvico F, Bortolotti F, Russo P, Colombo G. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 113, 2–17.

Trivair method of Operation, 2014., <http://trivair.ipmedinc.com/method.html> , pristupljeno: 5. 2. 2020.

Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1640 – 1665.

Umerska A, Mugheirbi NA, Kasprzak A, Saulnier P, Tajber L. Carbohydratebased Trojan microparticles as carriers for pulmonary delivery of lipid nanocapsules using dry powder inhalation. *Powder Technol*, 2019, 364, 507-521.

Uyen NTT, Hamid ZAA, Tram NXT, Ahmad NB. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153, 1035-1046.

Veiga MD, Ruiz-Caro R, Notario-Perez F, Martín-Illana A, Cazorla-Luna R. Hydrogels: Biomedical uses. U : Design and development of new nanocarriers. Grumezescu A, urednik, 2018, 509-538.

Wu Y, Zhang W, Huang J, Luo Z, Li J, Wang L, Di L. Mucoadhesive improvement of alginate microspheres as potential gastroretentive delivery carrier by blending with *Bletilla striata* polysaccharide, *Int J Biol Macromol*, 2019.

Yang T. Mechanical and swelling properties of hydrogels. 2011-2012, 67.str. URL: <http://kth.diva-portal.org/smash/get/diva2:571374/FULLTEXT01.pdf>, pristupljeno 16.3.2020.

Zahir-Jouzani F, Wolf JD, Atyabi F, Bernkop-Schnürch A. In situ gelling and mucoadhesive polymers: why do they need each other? *Expert Opin Drug Del*, 2018, 15, 1007-1019.

Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 127, 300-318.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena lijekova široko je zastupljena u liječenju lokalnih poremećaja sluznice nosa. Prednost nad tekućim oblicima imaju praškasti zbog bolje stabilnosti formulacije te duljeg zadržavanja i veće koncentracije lijeka na mjestu primjene. Većina nazalnih prašaka temeljena je na mukoadhezivnim polimerima sa sposobnošću bubrenja, a od posebnog interesa su polimerne mikrosfere koje djeluju kao učinkoviti nosači lijeka. Kao prikladna metoda izrade polimernih mikrosfera za nazalnu primjenu istaknula se metoda sušenja raspršivanjem.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti mikrosfere s natrijevim deksametazon fosfatom za nazalnu primjenu temeljene na pektinu i hipromelozi metodom sušenja raspršivanjem te ispitati utjecaj koncentracije sastavnica raspršivanog sustava i brzine dotoka uzorka na fizičko-kemijska svojstva pripremljenih mikrosfera.

Mikrosfere masenog omjera natrijevog deksametazon fosfata i pektina 0,1:1 i 1:1 te hipromeloze i pektina 1:1 i 5:1 uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem pri različitim brzinama dotoka uzorka (2,5 i 4,5 g/min) te pri konstantnim postavkama kapaciteta aspiratora (50%), ulazne temperature (160°C) i protoka komprimiranog zraka (700 NI/h) kroz sapnicu promjera 0,7 mm. Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka (od 81,9 do 101,9%) pri svim ispitivanim formulacijskim i procesnim parametrima, dok je sadržaj uklopljenog lijeka iznosio 1,3-33,5% ovisno o omjeru lijeka i polimera. Veličina mikrosfera rasla je s koncentracijom sastavnica u otopini koja je sušena raspršivanjem, a najveći utjecaj je vidljiv na vrijednosti Dv_{90} čiji je raspon od $4,37 \pm 0,02$ do $21,35 \pm 0,85 \mu\text{m}$. Vrijednosti Dv_{10} vrlo su slične za sve uzorke, neovisno o koncentraciji sastavnica i uvjetima sušenja te one iznose od $1,41 \pm 0,00$ do $2,19 \pm 0,06 \mu\text{m}$. Raspon vrijednosti Dv_{50} iznosi od $2,15 \pm 0,01$ do $13,65 \pm 0,45 \mu\text{m}$. U procesu bubrenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen umjetnog nazalnog fluida (SNF) po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom, a uslijed umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} iz SNF-a. Sposobnost bubrenja mikrosfera u SNF-u rasla je s porastom udjela hipromeloze u polimernom matriksu i sa smanjenjem sadržaja uklopljenog lijeka. Nije uočen utjecaj brzine dotoka uzorka u procesu sušenja raspršivanjem na promatrana svojstva mikrosfera.

Nasal drug administration is widely used in the treatment of local disorders of the nasal mucosa. Powders have an advantage over liquid forms due to better formulation stability, longer retention and higher drug concentration at the site of application. Most nasal powders are based on mucoadhesive polymers with the ability to swell. Polymeric microspheres as efficient drug carriers are of special interest. The spray drying method was highlighted as a suitable method of producing polymeric microspheres for nasal application.

The aim of this thesis was to prepare spray dried microspheres with sodium dexamethasone phosphate for nasal application based on pectin and hypromellose and to examine the influence of spray drying conditions such as feed composition and feed flow rate on physicochemical properties of prepared microspheres.

Microspheres with sodium dexamethasone phosphate to pectin weight ratio of 0.1:1 and 1:1 and hypromellose to pectin weight ratio of 1:1 and 5:1 were successfully prepared by spray drying at different sample feed rates (2.5 and 4.5 g/min) and at constant settings of the aspirator capacity (50%), inlet temperature (160 °C) and compressed air flow (700 Nl/h) through a nozzle with a diameter of 0,7 mm. High drug entrapment efficiency was achieved (from 81.9 to 101.9%) for all formulation and process parameters employed, while the drug loading ranged between 1.3 and 33.5%, depending on the drug to polymer ratio. The size of the microspheres increased with the concentration of the components in the spray dried feed, and the greatest influence was seen on the Dv_{90} values ranging from 4.37 ± 0.02 to 21.35 ± 0.85 μm . Dv_{10} values were very similar for all samples, regardless of the feed concentration and flow rate, and they ranged between 1.41 ± 0.00 and 2.19 ± 0.06 μm . Values of Dv_{50} ranged from 2.15 ± 0.01 to 13.65 ± 0.45 μm . In the swelling process, the microspheres absorbed significantly smaller volume of simulated nasal fluid (SNF) per unit mass compared to distilled water, due to the crosslinking of pectin with Ca^{2+} ions from SNF. The swelling capacity of microspheres in SNF increased with an increase in the proportion of hypromellose in the polymer matrix and with a decrease in the content of the incorporated drug. Influence of the feed flow rate on the studied properties of the spray dried microspheres was not observed.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Izrada mikrosfera s natrijevim deksametazon fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine pri sušenju raspršivanjem

Patricia Dolanjski

SAŽETAK

Nazalna primjena lijekova široko je zastupljena u liječenju lokalnih poremećaja sluznice nosa. Prednost nad tekućim oblicima imaju praškasti zbog bolje stabilnosti formulacije te duljeg zadržavanja i veće koncentracije lijeka na mjestu primjene. Većina nazalnih prašaka temeljena je na mukoadhezivnim polimerima sa sposobnošću bubrenja, a od posebnog interesa su polimerne mikrosfere koje djeluju kao učinkoviti nosači lijeka. Kao prikladna metoda izrade polimernih mikrosfera za nazalnu primjenu istaknula se metoda sušenja raspršivanjem.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti mikrosfere s natrijevim deksametazon fosfatom za nazalnu primjenu temeljene na pektinu i hipromelozi metodom sušenja raspršivanjem te ispitati utjecaj koncentracije sastavnica raspršivanog sustava i brzine dotoka uzorka na fizičko-kemijska svojstva pripremljenih mikrosfera.

Mikrosfere masenog omjera natrijevog deksametazon fosfata i pektina 0,1:1 i 1:1 te hipromeloze i pektina 1:1 i 5:1 uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem pri različitim brzinama dotoka uzorka (2,5 i 4,5 g/min) te pri konstantnim postavkama kapaciteta aspiratora (50%), ulazne temperature (160°C) i protoka komprimiranog zraka (700 Nl/h) kroz sapnicu promjera 0,7 mm. Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka (od 81,9 do 101,9%) pri svim ispitivanim formulacijskim i procesnim parametrima, dok je sadržaj uklopljenog lijeka iznosio 1,3-33,5% ovisno o omjeru lijeka i polimera. Veličina mikrosfera rasla je s koncentracijom sastavnica u otopini koja je sušena raspršivanjem, a najveći utjecaj je vidljiv na vrijednosti Dv90 čiji je raspon od $4,37 \pm 0,02$ do $21,35 \pm 0,85$ μm . Vrijednosti Dv10 vrlo su slične za sve uzorke, neovisno o koncentraciji sastavnica i uvjetima sušenja te one iznose od $1,41 \pm 0,00$ do $2,19 \pm 0,06$ μm . Raspon vrijednosti Dv50 iznosi od $2,15 \pm 0,01$ do $13,65 \pm 0,45$ μm . U procesu bubrenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen umjetnog nazalnog fluida (SNF) po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom, a uslijed umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} iz SNF-a. Sposobnost bubrenja mikrosfera u SNF-u rasla je s porastom udjela hipromeloze u polimernom matriksu i sa smanjenjem sadržaja uklopljenog lijeka. Nije uočen utjecaj brzine dotoka uzorka u procesu sušenja raspršivanjem na promatrana svojstva mikrosfera.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 16 grafičkih prikaza, 7 tablica i 98 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pektin; Hipromeloza; Mikrosfere; Deksametazon fosfat; Sušenje raspršivanjem; Nazalna primjena

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

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

Dr.sc. Jasmina Lovrić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr.sc. Maja Ortner Hadžiabdić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of pharmaceutical technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PREPARATION OF SPRAY DRIED MICROSPHERES WITH SODIUM DEXAMETHASONE PHOSPHATE: IMPACT OF THE FEED COMPOSITION AND FLOW RATE

Patricia Dolanjski

SUMMARY

Nasal drug administration is widely used in the treatment of local disorders of the nasal mucosa. Powders have an advantage over liquid forms due to better formulation stability, longer retention and higher drug concentration at the site of application. Most nasal powders are based on mucoadhesive polymers with the ability to swell. Polymeric microspheres as efficient drug carriers are of special interest. The spray drying method was highlighted as a suitable method of producing polymeric microspheres for nasal application.

The aim of this thesis was to prepare spray dried microspheres with sodium dexamethasone phosphate for nasal application based on pectin and hypromellose and to examine the influence of spray drying conditions such as feed composition and feed flow rate on physicochemical properties of prepared microspheres.

Microspheres with sodium dexamethasone phosphate to pectin weight ratio of 0.1:1 and 1:1 and hypromellose to pectin weight ratio of 1:1 and 5:1 were successfully prepared by spray drying at different sample feed rates (2.5 and 4.5 g/min) and at constant settings of the aspirator capacity (50%), inlet temperature (160 °C) and compressed air flow (700 NI/h) through a nozzle with a diameter of 0.7 mm. High drug entrapment efficiency was achieved (from 81.9 to 101.9%) for all formulation and process parameters employed, while the drug loading ranged between 1.3 and 33.5%, depending on the drug to polymer ratio. The size of the microspheres increased with the concentration of the components in the spray dried feed, and the greatest influence was seen on the Dv90 values ranging from 4.37 ± 0.02 to 21.35 ± 0.85 μm . Dv10 values were very similar for all samples, regardless of the feed concentration and flow rate, and they ranged between 1.41 ± 0.00 and 2.19 ± 0.06 μm . Values of Dv50 ranged from 2.15 ± 0.01 to 13.65 ± 0.45 μm . In the swelling process, the microspheres absorbed significantly smaller volume of simulated nasal fluid (SNF) per unit mass compared to distilled water, due to the crosslinking of pectin with Ca^{2+} ions from SNF. The swelling capacity of microspheres in SNF increased with an increase in the proportion of hypromellose in the polymer matrix and with a decrease in the content of the incorporated drug. Influence of the feed flow rate on the studied properties of the spray dried microspheres was not observed.

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

Thesis includes: 47 pages, 16 figures, 7 tables and 98 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pectin; Hypromellose; Microspheres; Dexamethasone phosphate; Spray drying; Nasal delivery

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

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

Jasmina Lovrić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: May 2020.