

# Izrada i karakterizacija nanosuspenzija loteprednol etabonata

---

Špoljar, Andrija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:430774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



**Andrija Špoljar**

**Izrada i karakterizacija nanosuspenzija  
loteprednol etabonata**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu Pepiću na stručnom vođenju prilikom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na njihovoj pomoći i suradnji, a posebice asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i djevojci Ivani na pruženoj potpori tijekom cijelog akademskog obrazovanja te na podršci prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Nanokristali .....	2
1.1.1. Svojstva nanokristala.....	4
1.1.2. Stabilnost nanosuspenzija .....	7
1.1.3. Metode izrade nanokristala .....	9
1.2. Oftalmička primjena nanokristala .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	16
3. MATERIJALI I METODA.....	18
3.1. Materijali .....	18
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Izrada micela SoluPlusa® u vodi i fosfatnom puferu .....	18
3.2.2. Određivanje hidrodinamičkog promjera i indeksa polidisperznosti micela SoluPlusa® u vodi i fosfatnom puferu.....	18
3.2.3. Određivanje UV/VIS apsorpcijskih maksimuma disperzija SoluPlusa®. ....	20
3.2.4. Izrada nanosuspenzija loteprednol etabonata i SoluPlusa®.....	21
3.2.5. Određivanje hidrodinamičkog promjera i indeksa polidisperznosti nanosuspenzija loteprednol etabonata.....	21
3.2.6. Ispitivanje nanosuspenzija loteprednol etabonata HPLC metodom.....	22
3.2.7. TEM analiza nanosuspenzija loteprednol etabonata .....	23
3.2.8. Ispitivanje stabilnosti nanosuspenzija loteprednol etabonata.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Utjecaj pH na veličinu micela i indeks polidisperznosti SoluPlusa® .....	24
4.2. Utjecaj formulacijskih i procesnih parametara na izradu nanosuspenzija loteprednol etabonata .....	25
4.3. TEM analiza nanosuspenzija loteprednol etabonata .....	27
4.4. Ispitivanje stabilnosti nanosuspenzija loteprednol etabonata .....	30
5. ZAKLJUČAK .....	32
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	33
7. LITERATURA .....	35
8. SAŽETAK / SUMMARY .....	39
9. TEMELJNA IDENTIFIKACIJSKA KARTICA .....	41

## 1. UVOD

Svakodnevnim novim spoznajama i otkrićima u području medicine i farmacije, širi se znanje o fiziološkim i patofiziološkim procesima u ljudskom tijelu. Novim otkrićima mehanizama nastanka bolesti, raste i broj mogućih terapijskih meta (engl. *therapeutic target*) te je samim time sve više mogućih djelatnih tvari (engl. *active pharmaceutical ingredient, API*). Identifikacija i karakterizacija tih djelatnih tvari svoj oslonac pronalazi u razvitku tehnologije, a dostupno je sve više različitih uređaja i raznolikih metoda za identifikaciju i karakterizaciju molekula. Molekule koje se sintetiziraju za lijekove postaju sve kompleksnije i sve veće molekulske mase, ali su zato svojom strukturom prilagođenije terapijskim metama na koje djeluju. Sve je više novih djelatnih tvari svrstano u četvrtu skupinu prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System, BSC*), koji je prvi put objavljen 1995. godine (Amidon i sur., 1995). To je sustav za predviđanje bioraspoloživosti oralnih djelatnih tvari na temelju topljivosti i permeabilnosti. U takvom sustavu klasifikacije djelatnih tvari, prvu skupinu čine dobro topljivi i dobro permeabilne tvari, drugu skupinu čine slabo topljive i dobro permeabilne tvari, treću skupinu čine dobro topljive i loše permeabilne tvari, a četvrtu skupinu čine loše topljive i loše permeabilne tvari. Molekule četvrte skupine predstavljaju najveći izazov u izradi farmaceutskih oblika. Djelatna tvar sama po sebi tek je dio konačnog cilja, odnosno farmaceutskog oblika kojega čine djelatne tvari (lat. *remedium*), koja je nositelj terapijskog djelovanja, i pomoćnih tvari (lat. *excipientia*), koje su nositelji fizičkih osobina pripravka, a pomažu boljem djelovanju i podnošljivosti lijeka (Senjković, 2003). Jedan od takvih farmaceutskih oblika su i suspenzije, jedna od relativno zahtjevnih farmaceutskih oblika (Aulton i suradnici, 2021). Posebna skupina suspenzija su nanosuspenzije, a to su farmaceutski oblici čiji se red veličine mjeri i izražava u nanometrima ( $10^{-9}$  metara). Nanosuspenzije, kao i ostali nanotehnološki farmaceutski oblici, svoje polazište pronalaze u tradicionalnim farmaceutskim oblicima. Nanosuspenzije su temeljene na suspenzijama, a definirane su kao submikronske koloidne disperzije nanometarskih čestica djelatnih tvari koje su stabilizirane surfaktantima (Patel i sur., 2011). Nanosuspenzije predstavljaju učinkovit i pametan pristup pri izradi farmaceutskog oblika djelatnih tvari koje su netopljive u vodi jer se takvim usitnjavanjem povećava topljivost i površina djelatne tvari dostupna za otapanje (Wang i sur., 2013). Nanokristalni oblik djelatne tvari jedan je od najčešćih suspendiranih oblika djelatne tvari u nanosuspenzijama.

## 1.1. Nanokristali

Nanokristali su skupina krutih farmaceutskih oblika koji spajaju nanotehnologiju i kristalnu prirodu djelatne tvari u svrhu postizanja prednosti u vidu topljivosti, otapanja i fizikalno-kemijskih svojstava lijekova. Nanokristali, za razliku od ostalih krutih farmaceutskih oblika, imaju velike izazove u vidu fizikalne i kemijske stabilnosti prilikom izrade i skladištenja (Jahangir i sur., 2020). Nanokristali djelatne tvari češće dolaze u obliku nanosuspenzija, a rijede u suhom krutom farmaceutskom obliku. Prvi lijek u obliku nanokristala pojavio se 2000. godine od strane kompanije Wyeth, a to je bio imunosupresiv sirolimus zaštićenog naziva Rapamune®. Ubrzo se na tržištu pojavljuju i Emend® (2003. godine) i Tricor® (2004. godine) od strane nizozemske kompanije Merck i američke kompanije Abbott. U zadnjih nekoliko godina raste broj lijekova na tržištu u obliku nanokristala, te ih je trenutno više od 20 na tržištu (Tablica 1.).

**Tablica 1.:** Lista lijekova na tržištu i u kliničkim istraživanjima koji su bazirani na nanokristalima (prilagođeno prema Mohammad i sur., 2019.)

Generički naziv lijeka	Trgovački naziv lijeka	Proizvođač lijeka	Indikacija lijeka	Status
Sirolimus	Rapamune®	Wyeth	Imunosupresiv	Na tržištu.
Aprepitant	Emend®	Merck	Antiemetik	Na tržištu.
Fenofibrat	Tricor®	Abbott	Hiperkolesterolemia	Na tržištu.
Fenofibrat	Triglide®	Sciele Pharma Inc.	Hiperkolesterolemia	Na tržištu.
Megestrol	Megace ES®	Par Pharmaceutical Companies	Anoreksija	Na tržištu.
Griseofulvin	Gris-Peg®	Novartis	Antifungalni	Na tržištu.
Nabilone	Cesamet®	Lilly	Antiemetik	Na tržištu.
Verapamil	Verelan PM®	Schwarz Pharma	Antiaritmik	Na tržištu.
Dexmethylphenidat hidroklorid	Focalin XR®	Novartis	Antipsihotik	Na tržištu.
Morfin sulfat	Avinza®	King Pharm	Kronična bol	Na tržištu.
Metilfenidat hidroklorid	Ritalin LA®	Novartis	Antipsihotik	Na tržištu.
Diltiazem	Herbesser®	Mitsubishi Tanabe Pharma	Antiangina	Na tržištu.
Tizanidin hidroklorid	Zanaflex™	Acorda	Mišićni relaksans	Na tržištu.

<b>Natrijev naproksen</b>	Naprelan®	Wyeth	Antiinflamatorik	Na tržištu.
<b>Teofilin</b>	Theodur®	Mitsubishi Tanabe Pharma	Bronhodilatator	Na tržištu.
<b>Fenofibrat</b>	Triglide®	Skye Pharma	Hiperkolesterolemija	Na tržištu.
<b>Paliperidon palmitat</b>	Invega Sustenna®	Johnson & Johnson	Antidepresiv	Na tržištu.
<b>Srebro</b>	SILCRYST®	Nucryst Pharmaceuticals	Antimikrobni	Na tržištu.
<b>NPI 32101</b>	Acticoat®	Nucryst Pharmaceuticals	Antiinflamatorik	Na tržištu.
<b>Ensulozon i oktinoksat</b>	Renergie Microlift	Lancome	Kozmetik (protiv bora)	Na tržištu.
<b>2-metoksi estradiol</b>	Panzem NCD	EntreMed	Rak jajnika	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Temozolomid</b>	Panzem NCD	EntreMed	Citostatik	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Bevacizumab</b>	Panzem NCD and Avastin	EntreMed	Karcinoidni tumor	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Guanilhidrazon</b>	Semapimod®	Cytokine Pharmasciences	TNF- $\alpha$ inhibitor	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Paklitaksel</b>	Paxceed®	Angiotech	Antiinflamatorik	Kliničko istraživanje. (III faza)
<b>Timektacin</b>	Theralux®	Celmed	Citostatik	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Srebro</b>	Nucryst®	Nucryst Pharmaceuticals	Antibakterijski	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Srebro i srebrov sulfadiazin</b>	NCT02108535	University of Sorocaba	Opekline drugog stupnja	Kliničko istraživanje. (IV faza)
<b>Titanov dioksid</b>	NCT01552135	Oslo University Hospital	Opekline od sunca	Kliničko istraživanje. (IV faza)

<b>Srebro</b>	NCT00659204	Madigan Army Medical Center	Antibakterijski	Kliničko istraživanje. (III faza)
<b>Estradiol i progesteron</b>	NCT02467673	University Potiguar and InBios International, Inc	Sindrom menopauze	Kliničko istraživanje. (II faza)
<b>Inzulin</b>	/	Self-developed	Antidijabetik	Kliničko istraživanje. (I faza)
<b>Busulfan</b>	/	Supergen	Citostatik	Kliničko istraživanje. (I faza)
<b>Budezonid</b>	/	Sheffield Pharmaceuticals	Astma	Kliničko istraživanje. (I faza)
<b>Kalcij fosfat</b>	/	Self-developed	Adjuvant za mišićno cjepivo za herpes	Kliničko istraživanje. (I faza)
<b>Timektacin</b>	/	NewBiotics/IIex oncology	Citostatik	Kliničko istraživanje. (I/II faza)
<b>Paklitaksel</b>	/	American Pharmaceutical Partners	Citostatik	Kliničko istraživanje. (III faza)
<b>Fenofibrat</b>	/	Solvay Pharmaceuticals	Noćne apneje	Kliničko istraživanje. (II faza)

### 1.1.1. Svojstva nanokristala

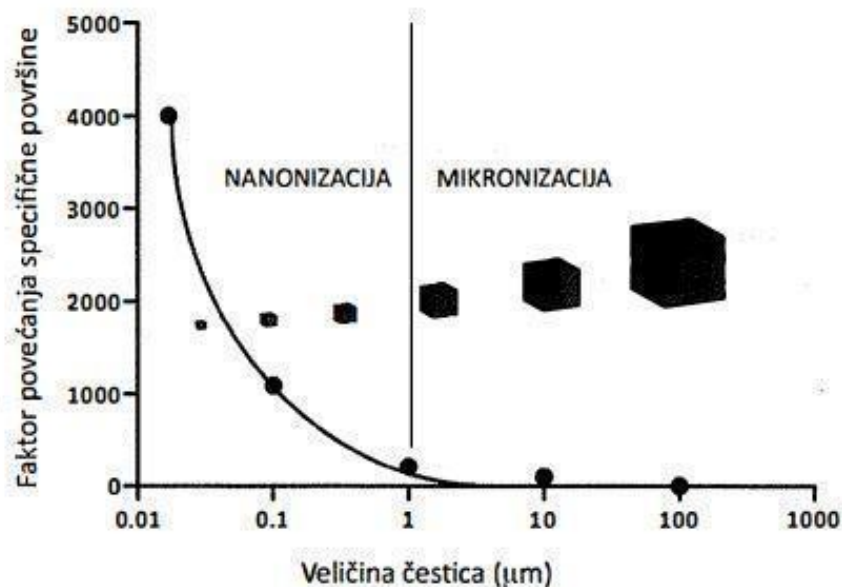
Nanokristali su čestice djelatne tvari čija je veličina u rasponu od 10 nm do 1000 nm te su stabilizirane surfaktantom ili polimernim stabilizatorom (Sharma i sur., 2016). Jedan od glavnih razloga smanjenja djelatnih tvari do nanometarskih veličina je povećanje specifične površine čestica djelatne tvari, a samim time i povećanje brzine otapanja krutine što pozitivno utječe na biofarmaceutska svojstva adhezivnosti i vremena zadržavanja na mjestu apsorpcije, ali negativni utjecaj se vidi kroz variranje bioraspodjelivosti (Lovrić i sur., 2015). Takav odnos



specifične površine čestica krutine i brzine otapanja krutine definiran je Noyes-Whitneyjevom jednadžbom:

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

u kojoj je  $k$  konstanta brzine otapanja (intrinzična konstanta na koju utječe viskoznost otopine; veća viskoznost otopine rezultira manjom brzinom otapanja),  $A$  označava specifičnu površinu krutine koja se otapa,  $c_s$  je topljivost krutine, a  $c_x$  označava koncentraciju djelatne tvari u otopini u vremenu  $t$ . Osim povećanja specifične površine krutine, smanjenjem veličina čestica povećava se i broj čestica, a smanjuje se promjer čestica krutine (Slika 1.).

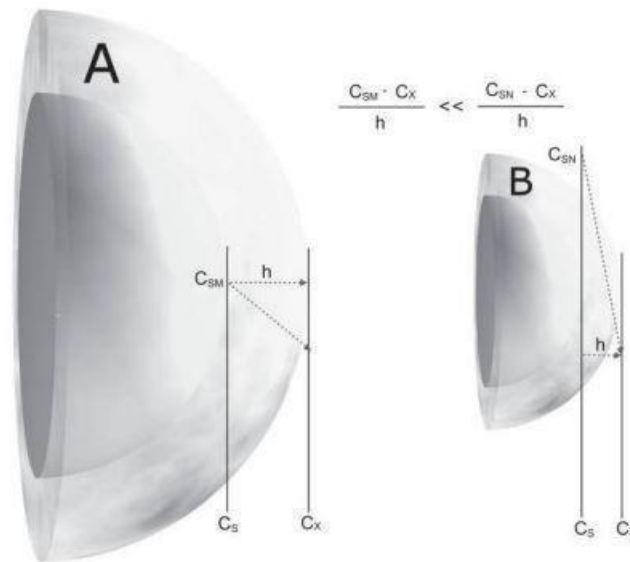


**Slika 1.** Povećanje specifične površine krutine pri smanjenju veličine čestica krutine djelatne tvari do nanometarskih dimenzija (Lovrić i sur., 2015.).

Uz povećanje specifične površine krutine, važno fizikalno-kemijsko svojstvo nanokristala je i smanjenje debljine difuzijskog sloja otapala  $h$  oko nanokristala u usporedbi s mikrokristalima, odnosno makrokristalima. Prema Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi, brzina otapanja krutina je proporcionalna sa konstantom  $k$ , a konstanta  $k$  se izvodi iz pretpostavke da se oko čestice nalazi tanki stacionarni difuzijski sloj otapala u kojem koncentracija otopljene djelatne tvari linearno opada od najveće na površini čestice  $c_s$  do najmanje  $c_x$  na udaljenosti  $h$  od čestice. Konstanta  $k$  definirana je omjerom prividnog koeficijenta difuzije tvari  $D$  i debljinom stacionarnog difuzijskog sloja  $h$ , te se Noyes-Whitneyjeva jednadžba može raspisati na sljedeći način:

$$\frac{dc_x}{dt} = A \times D \times \left(\frac{c_s - c_x}{h}\right)$$

U takvom raspisu Noyes-Whitneyjeve jednadžbe uočava se obrnuta proporcionalnost brzine otapanja krutine i debljine difuzijskog sloja otapala  $h$ , točnije nanokristali se u teoriji brže otapaju od mikrokristala, odnosno makrokristala zbog manje debljine difuzijskog sloja otapala  $h$  (Slika 2.)



**Slika 2.** Usporedba debljine stacionarnog sloja otapala  $h$  između čestice A mikrometerske veličine i čestice B nanometerske veličine (Junghanns, 2006).

Uz povećanje specifične površine krutine A i smanjenje difuzijskog sloja otapala  $h$ , kao važno svojstvo djelatne tvari u obliku nanokristala ističe se povećanje topljivosti  $c_s$ . Topljivost se definira kao koncentracija otopljene tvari u zasićenoj otopini pri određenoj temperaturi (Senjković, 2003). Objašnjenje povećanja topljivosti krutine smanjenjem veličina čestica do nanometerskih veličina proizlazi iz Ostwald-Freundlichove jednadžbe koja se može zapisati na sljedeći način:

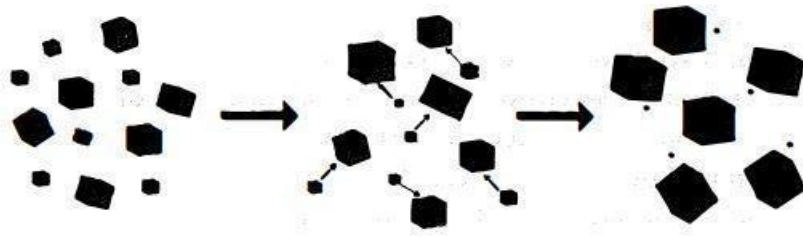
$$\log \frac{c_s}{c_x} = \frac{2\sigma V}{2,303RT\rho r}$$

U takvome zapisu Ostwald-Freundlichove jednadžbe  $c_s$  označava topljivost krutine,  $c_x$  označava koncentraciju otopine u vremenu  $t$ ,  $\sigma$  označava površinsku napetost na graničnoj površini krutina/tekućina,  $V$  označava molarni volumen čestica krutine,  $R$  predstavlja opću plinsku konstantu,  $T$  označava termodinamičku temperaturu,  $\rho$  je gustoća krutine, a  $r$  je polumjer čestica krutine. Iz takvog raspisa Ostwald-Freundlichove jednadžbe se uočava obrnuta proporcionalnost topljivosti krutine  $c_s$  i polumjera čestice krutine  $r$ , a samim time se zaključuje da se smanjenjem veličina čestica do razine nanokristala postiže i veća topljivost krutina.

Uz fizikalno-kemijska svojstva nanokristala, važno je pri izradi nanokristala obratiti pozornost i na biofarmaceutska svojstva poput adhezivnosti, apsorpcije, biorasploživosti i djelotvornosti. Poboljšana adhezivnost posljedica je nanoniziranja, točnije povećanja broj čestica i specifične površine. Postoje 4 teorije koje objašnjavaju bolju adhezivnost nanočestica, a to su: elektrostatska teorija (elektrostatske privlačne sile između nanočestica i površine), adsorpcijska teorija (vodikove i van der Waalsove privlačne sile između nanočestica i površine), difuzijska teorija (međudjelovanje nanočestica i površine posljedica je umrežavanja polimernih lanaca nanočestica i proteina s površine membrana) i teorija zarobljavanja (engl. *trapping theory*) (nanočestica se dulje zadržavaju na neravnoj površini membrane) (Lovrić i sur., 2015.). Poboljšana apsorpcija nanokristala posljedica je povećanja topljivosti  $c_s$ , brzine otapanja  $dc_x/dt$  i poboljšane adhezivnosti. Poboljšana biorasploživost posljedica je povećanja topljivosti  $c_s$ , brzine otapanja  $dc_x/dt$ , specifične površine  $A$ , poboljšane adhezivnosti i smanjenog utjecaja hrane na apsorpciju iz probavnog sustava. Poboljšana djelotvornost lijekova u obliku nanokristala objašnjava se mogućnošću otapanja (poboljšanja topljivost u odnosu na mikrokristale i makrokristale) teško topljivih lijekova u vodenom mediju te izbjegavanja organskih otapala u formulaciji lijekova. Procjenjuje se da s poboljšanom adhezivnošću, apsorpcijom i biorasploživosti, raste i djelotvornost lijekova u obliku nanokristala.

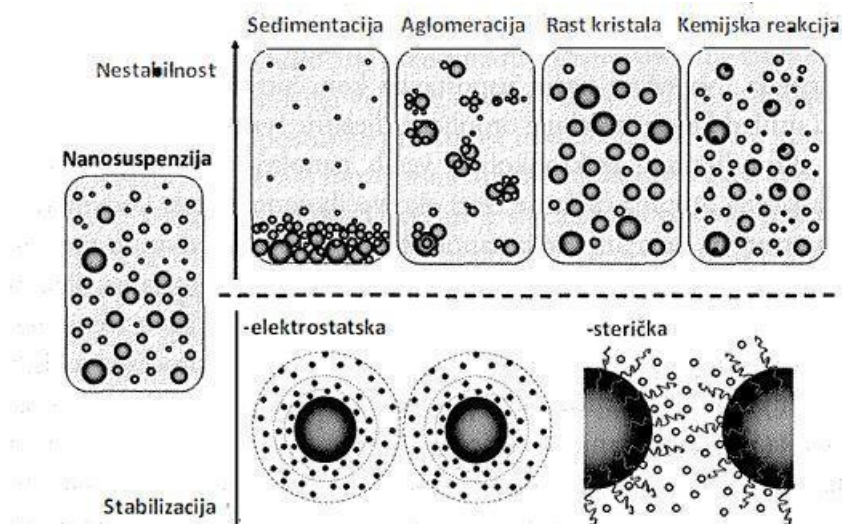
### 1.1.2. Stabilnost nanosuspenzija

Najveće iskušenje farmaceutske industrije pri izradi nanokristala u obliku nanosuspenzija predstavlja stabilnost nanosuspenzije kroz određeni vremenski period. Nestabilnost nanosuspenzija leži u činjenici da se nanonizacijom djelatne tvari povećava specifična površina djelatne tvari te se oslobađa slobodna Gibbsova energija čime raste i nestabilnost sustava. Iz toga proizlaze i glavni problemi stabilnosti, a to su agregacija, aglomeracija, taloženje i kemijska razgradnja čestica nanosuspenzije. Najčešći problem koji se javlja kod nanosuspenzija je agregacija nanočestica. Glavni uzrok agregacije je razlika u veličini čestica prilikom izrade nanosuspenzije, a kao posljedica toga se javlja Ostwaldovo zrenje (Slika 3.). Kod Ostwaldovog zrenja dolazi do stvaranja koncentracijskog gradijenta jer se manje čestice brže otapaju od većih čestica te posljedično nastupa povećanje veličine nanokristala u nanosuspenzijskom sustavu (Sun i Yeo, 2012).



**Slika 3.** Shematski prikaz Ostwaldovog zrenja suspenzije nanokristala. Manji nanokristali brže i bolje se otapaju pa otopljena djelatna tvar difundira prema većim nanokristalima te se taloži na njih i kristali postaju sve veći (Lovrić i sur., 2015).

Ostali problemi koji se javljaju kao posljedica nestabilnosti nanosuspenzija su aglomeracija, taloženje i kemijska razgradnja djelatne tvari (Slika 4.). Aglomeracija je posljedica privlačnih međudjelovanja čestica pri čemu se formiraju aglomerati nanokristala. Aglomeracija zavisi o svojstvima površine nanokristala, o prirodi korištenog stabilizatora i načinima međudjelovanja, a najčešće je posljedica nakupljanja čestica stabilizatora na površinu nanokristala te neutralizacije naboja na površini nanokristala (Lovrić i sur., 2015). Do taloženja dolazi kad gravitacijska sila nadvlada silu uzgona disperzijskog sredstva te dolazi do taloženja dispergirane faze, odnosno nanokristala. Najčešći uzrok kemijske razgradnje nanokristala predstavlja hidroliza i oksidacija djelatne tvari jer su nanosuspenzije nanokristala najčešće izrađene u vodenom mediju.

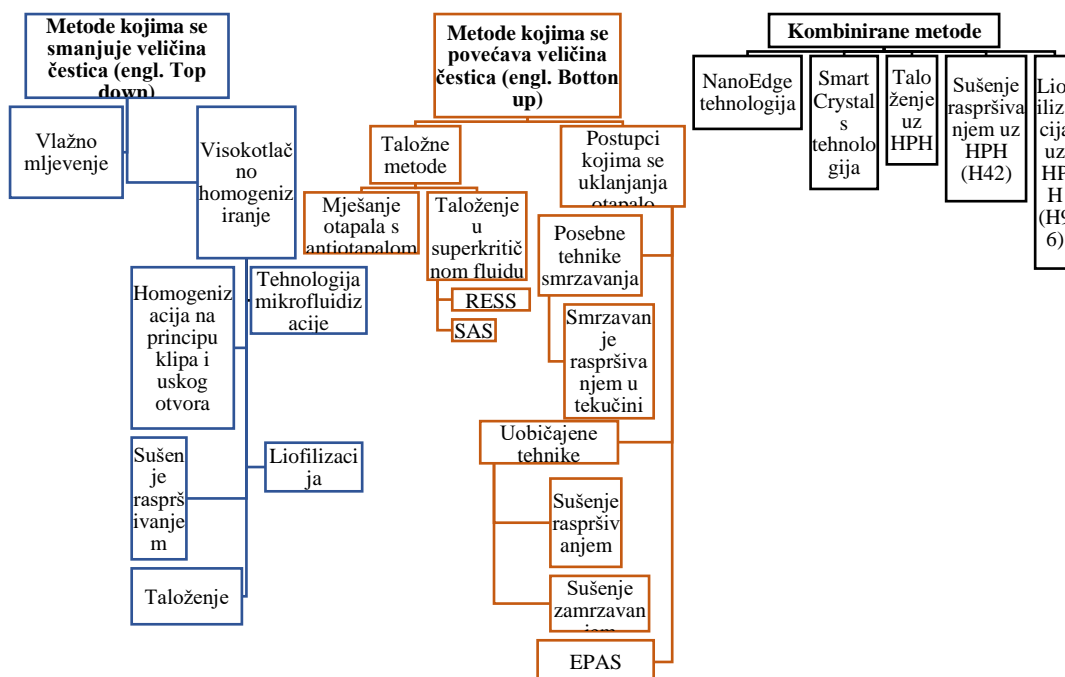


**Slika 4.:** Shematski prikaz procesa koji rezultiraju fizičkom (aglomeracija, taloženje i rast kristala procesom Ostwaldovog zrenja) i kemijskom (razgradnja djelatne tvari) nestabilnošću djelatne tvari u obliku nanosuspenzije te način stabilizacije nanokristala mehanizmima ionske ili steričke stabilizacije (Lovrić i sur., 2015).

Za rješenje problema nestabilnosti moguće je više opcija, a ističu se oblaganje nanokristala sredstvima za stabilizaciju i izrada suhog oblika nanokristala djelatne tvari. Za oblaganje nanokristala koriste se površinski aktivne tvari (PAT) koje povećavaju stabilnost elektrostatskom stabilizacijom i polimerni stabilizatori koji povećavaju stabilnost steričkom stabilizacijom. Ključni čimbenici pri izboru pravilnog sredstva za oblaganje nanokristala su vrsta stabilizatora i omjer nanokristala i stabilizatora. Sredstva za stabiliziranje koriste se u relativno malim udjelima, na primjer za nanokristale veličine 500 nm, debljina adsorpcijskog sloja stabilizatora je u rasponu od 2 do 10 nm pri čemu taj sloj čini svega 6 % volumena nanokristala djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015).

### 1.1.3. Metode izrade nanokristala

Metode izrade nanokristala djelatne tvari mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: metode kojima se smanjuje veličina čestica (engl. *top-down methods*) i metode kojima se povećavaju veličine čestica (engl. *bottom-up methods*) te kombinacija tih dviju metoda (Slika 5.). Kod metoda smanjenja veličina čestica, polazna djelatna tvar je veličine iznad nanometarske veličine te se smanjuje određenim postupcima, najjednostavnije mljevenjem, do nanometarskih veličina, a kod metode povećanja veličine čestica je djelatna tvar otopljena u otapalu te se taloži dodatkom antiotapala do nanometarske veličine (Lovrić i suradnici, 2015).



**Slika 5.** Klasifikacija tehnologija za izradu nanokristala djelatne tvari. Značenje kratica: RESS – brza ekspanzija superkritične otopine, SAS – superkritično antiotapalo, EPAS – isparavajuće taloženje u vodenoj otopini (prilagođeno prema Sharma i sur., 2016).

### 1.1.3.1. Metode smanjenja veličina čestica

#### *Metoda vlažnog mljevenja*

Metoda vlažnog mljevenja je prvi puta predstavljena 1992. godine u obliku zaštićene Nanocrystal® tehnologije (Sharma i sur., 2016) i danas je najkorištenija metoda izrade nanokristala djelatne tvari u farmaceutskoj industriji (Lovrić i sur. 2015). U jednostavnijem obliku koristi se postupak niskoenergetskog vlažnog mljevenja (engl. *low energy wet ball milling*), a u složenijem obliku koristi se postupak visokoenergetskog vlažnog mljevenja (engl. *high energy wet ball milling*). Kod niskoenergetskog vlažnog mljevenja, dispergirana mikroionizirana djelatna tvar puni se u sustav uz najmanje jedan stabilizator te se podvrgava mljevenju (pomoću kuglica i mješača) koje djeluje smičnim naprezanjem na velike suspendirane čestice djelatne tvari. Uspješnost procesa ovisi o čvrstoći čestica djelatne tvari, utrošku energije, vremenu mljevenja i koncentraciji stabilizatora (Lovrić i sur., 2015). Druga opcija vlažnog mljevenja je visokoenergetsko vlažno mljevenje, koje danas predstavlja standard u izradi nanokristala djelatne tvari u farmaceutskoj industriji. U takvoj metodi smanjenje veličine čestica djelatne tvari temelji se na utjecaju visoke energije unutar komore za mljevenje, točnije na djelovanju sila smicanja i tlaku unutar komore za mljevenje (Lovrić i sur., 2015). Takva metoda koristi kuglice od visoko umreženog polistirena izrazito elastičnih svojstava zbog smanjenja kontaminacije nanokristala ostacima cirkonijeva oksida iz klasičnih kuglica za mljevenje. Glavne prednosti vlažnog mljevenja su relativno jednostavna prilagodba industrijskom mjerilu, smanjenje mogućnosti kontaminacije i mogućnost ekološke proizvodnje zbog izostanka korištenja organskih otapala (Sharma i sur., 2016). Glavni je nedostatak, uz težinu cirkonijevih kuglica u industrijskom mjerilu i toplinu koja se oslobađa u procesu, to što 70 % volumena spremnika uređaja zauzima materijal za mljevenje, a samo 30 % volumena ostaje raspoloživo za suspenziju djelatne tvari, a to ograničava metodu u industrijskom mjerilu (Moschwitzer, 2013).

#### *Metoda visokotlačnog homogeniziranja*

Metode visokotlačnog homogeniziranja druga su važna skupina metoda smanjenja veličina čestica djelatne tvari u procesu izrade nanokristala. Ističu se tri važne tehnologije: mikrofluidizacija (IDD-P® tehnologija) (SkyePharma Canada), homogenizacija na principu klipa i uskog otvora (engl. *piston gap homogenization*) u vodenom (Disso-cubes® tehnologija) (SkyePharma) ili nevodenom mediju (Nanopure® tehnologija) (PharmaSol) (Lovrić i sur., 2015). Tehnologija mikrofluidizacije temelji se na parno-mlaznom homogeniziranju (engl. *jet steam homogenization*). Djelatna tvar se zbog kolizijskih, kavitacijskih i sila smicanja smanjuje do nanometarskih dimenzija u komori mikrofluidizatora Z ili Y tipa kroz više mikrofluidizacijskih ciklusa (Lovrić i sur., 2015). Homogenizacija na temelju korištenja klipa je jednostavnija metoda slična vlažnom mljevenju. Čestice djelatne tvari se smanjuju na temelju nižeg tlaka unutar homogenizatora temeljenog na korištenju klipa i atmosferskog tlaka što vodi do vrenja otapala na sobnoj temperaturi. Kada otapalo ispari, formirani mjehurići implodiraju nakon prolaska kroz uski otvor i dolazi do smanjenja veličina čestica djelatne tvari na temelju kolizijskih, kavitacijskih i sila smicanja (Fontana i sur., 2018). Prvo se izradi nanosuspenzija djelatne tvari i ona se predobrađuje visokoturažnim miješanjem, a zatim nanosuspenzija prolazi kroz nekoliko visokotlačnih homogenizacijskih ciklusa te se tlak u sustavu postupno povećava od 10 % do 100 % kako bi se izbjeglo začepljenje uskog otvora homogenizatora (do 25 µm) (Lovrić i sur., 2015). U sustavu je prisutan tlak do 4000 bara, ali koji u prosjeku varira između 1500 i 2000 bara (Fontana i sur., 2018). Kod tehnologije Nanopure®, homogeniziranje se temelji na principu klipa i uskog otvora, ali proces se odvija u nevodenom mediju ili mediju sa smanjenim udjelom vode, a time je smanjena mogućnost hidrolize djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015). Smanjenje veličina čestica djelatne tvari je posljedica sila smijavanja i kolizije čestica, dok je kavitacija izbjegnuta zbog nižeg tlaka, a zbog nižih temperatura moguća je i obrada termolabilnih djelatnih tvari. Prednosti visokotlačnog homogeniziranja su manje onečišćenje nanokristala uslijed abrazije materijala u procesu izrade, dok je glavni nedostatak varijabilnost veličina nanokristala djelatne tvari.

### **1.1.3.2. Metode povećanja veličina čestica**

Metoda povećanja veličine čestica djelatne tvari (engl. *bottom up*) je najstarija metoda izrade nanokristala (Gao i sur., 2008) te je ujedno i jednostavna metoda nakon što se odrede uvjeti taloženja (Lovrić i sur., 2015). Metoda se temelji na otapanju djelatne tvari u otapalu u kojem je ona relativno dobro topljiva i mješanju takve otopine sa antiotapalom koje dovodi do

taloženja nanokristala. Otapala su najčešće organska, dok se kao antiotapala najčešće koriste voda, etanol ili aceton. Otapalo i antiotapalo se mješaju, ali djelatna tvar je samo relativno topljiva u otapalu kako bi došlo do taloženja nanokristala prilikom mješanja sa antiotapalom. Miješanje otapala s otopljenom djelatnom tvari i antiotapala provodi se u uređajima za miješanje koji se osnivaju na rotaciji, mlaznom miješanju (engl. *liquid jets*) ili višekanalnom vrtložnom miješanju (engl. *multi-inlet vortex mixing*) (Lovrić i sur., 2015). U takvim uređajima vrlo brzo dolazi do stvaranja nanokristala, a na proces nukleacije i daljnji rast kristala utjecaj imaju brzina mješanja, vrijeme soniciranja/ultrasoniciranja, uvjeti taloženja poput koncentracije djelatne tvari u otapalu, volumni odnos antiotapala i otopljene djelatne tvari, temperatura, dodatak stabilizatora itd. Taloženje nanokristala moguće je i pomoću superkritičnih fluida, primjerice superkritični ugljikov dioksid, ultrazvučnim valovima, kontroliranim uklanjanjem otapala i kemijskim reakcijama acido-bazne neutralizacije (Lovrić i sur., 2015). Nanokristali djelatne tvari izrađeni metodama povećanja veličine čestica mogu biti kristalne ili amorfne prirode. Unatoč jednostavnosti metode, ona je industrijski neprimjenjiva zbog težine određivanja uvjeta taloženja i razlike u brzini taloženja u laboratorijskim i industrijskim mjerilima (primjerice, u većem volumenu je brzina taloženja manja i razlika u veličini nanokristala je veća).

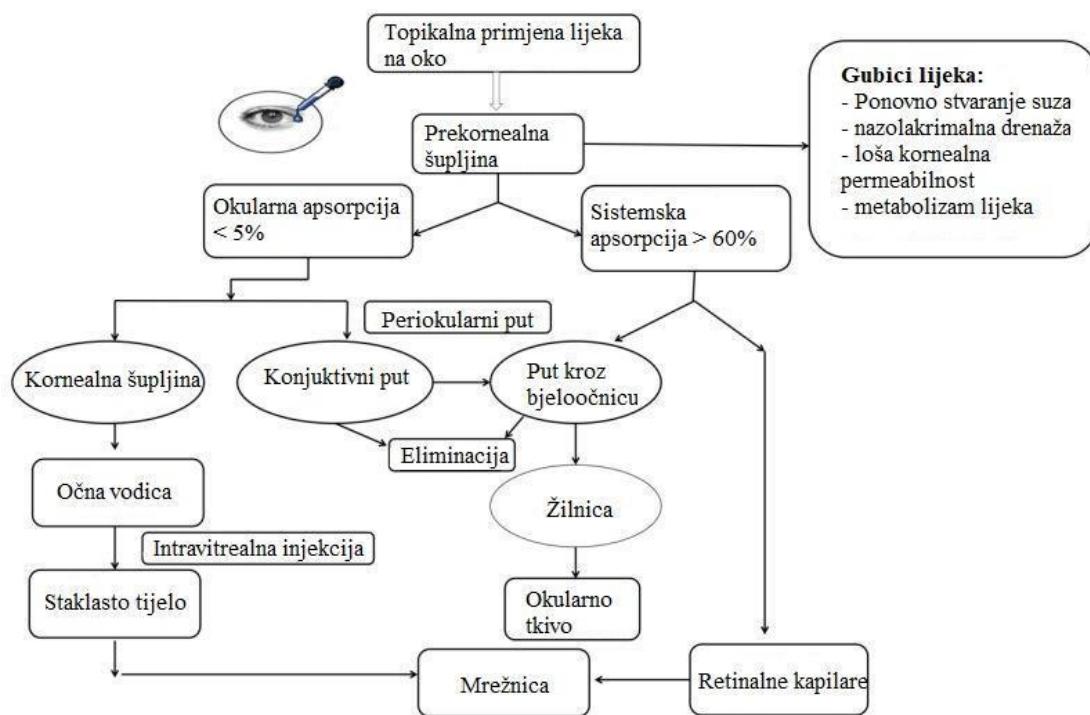
### **1.1.3.3. Kombinirane tehnologije**

U kombiniranim tehnologijama izrade nanokristala ističu se NanoEdge™ tehnologija (Baxter), smartCrystal® tehnologija (Soliqs/Abbvie) i ARTcrystal® tehnologija (Keck). Sličnost svih kombiniranih tehnologija pronalazi se u dva osnovna koraka. Prvi korak je korištenje metoda za povećanje veličina čestica djelatne tvari u predobradi djelatnih tvari, a drugi korak je smanjenje veličina čestica djelatne tvari. U drugom se koraku najčešće koristi metoda visokotlačne homogenizacije (HPH), a predobrada djelatne tvari smanjuje broj potrebnih ciklusa i silu potrebnu pri visokotlačnoj homogenizaciji. Veličina čestica nanokristala izrađenih kombiniranim tehnologijama može biti manja i od 200 nm (Sharma i sur., 2016).

## **1.2. Oftalmička primjena nanokristala**



U liječenju većine problema vezanih uz prednji dio oka koriste se topikalni pripravci u obliku otopina ili mikrosuspenzija. Često se koriste i masti, čija je bioraspoloživost nešto bolja, ali izazivaju zamućenje vida pa je manja suradljivost pacijenata. Sudbina djelatne tvari nakon primjene topikalnim putem na oko je zahtjevno područje za farmakologe i formulatore lijekova zbog kompleksnosti anatomije i fiziologije oka. Cilj nanonizacije djelatne tvari za oftalmičku primjenu je maksimizirati bioraspoloživost djelatne tvari nakon topikalne primjene (Sharma i sur., 2016).



**Slika 6.:** Sudbina djelatne tvari nakon topikalne primjene lijeka na oko (prilagođeno prema Sharma i sur., 2016).

Glavni je problem klasičnih kapi za oko relativno mala bioraspoloživost zbog brzog gubitka djelatne tvari s površine oka i relativne nepermeabilnosti rožnice (Lovrić i sur., 2015). Mala bioraspoloživost posljedica je prekornealnog gubitka i dinamičkih prepreka (Sharma i sur., 2016.). Zbog potrebe za dugotrajnom terapijom, suradljivost pacijenata opada s vremenom zbog pomanjkanja vidljivih rezultata terapije. Za razliku od klasičnih kapi, kapi temeljene na suspenzijama nanokristala pokazuju smanjenu iritaciju površine oka, suženje i uklanjanje iz prekornealnog područja. Poboljšana adhezivnost nanokristala produljuje vrijeme kontakta s površinom oka, a samim time su unaprijeđena i biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva djelatne tvari nakon primjene kapi u obliku nanosuspenzija (Lovrić i sur., 2015). Glavne prednosti nanokristalnih suspenzija nad klasičnim suspenzijama uviđaju se prilikom

formulacije lijekova s teško topljivom djelatnom tvari poput loteprednol etabonata. Prva velika prednost je povećana sigurnost lijeka zbog manje koncentracije surfaktanta ili ulja kao solubilizatora. Manja koncentracija solubilizatora je posljedica bolje topljivosti nanokristala naspram mikrokristala i makrokristala teško topljive djelatne tvari, a solubilizatori često uzrokuju crvenilo, iritaciju i smanjuju protok suza. Sljedeća prednost je povećano zadržavanje lijeka u dijelu spojnice (konjunktive) oka. Zbog izmjene suzne tekućine, dolazi do brze eliminacije primijenjene suspenzije/nanosuspenzije kroz nazolakrimalni kanal. Zbog svoje veličine i veće specifične površine, nanokristali brže i u većem broju prolaze kroz mukuzni sloj na površini oka i dolaze do rožnice (Sharma i sur., 2016). Time im je omogućeni i bolji prijenos kroz rožnicu za liječenje intraokularnih problema. Neka su istraživanja pokazala i multiendocitozne puteve prolaska nanokristala kroz rožnicu, a to su fagocitoza, makropinocitoza, klatrin i ne-klatrin povezani putevi (Sharma i sur., 2016). Za razliku od ostalih nanosustava, nanokristali imaju veliki udio djelatne tvari pa imaju i bolju bioraspodivnost u oku od ostalih nanosustava koji imaju manji udio djelatne tvari u formulaciji. Djelatna tvar u obliku nanokristala može imati brzi i produljeni učinak. Takav učinak posljedica je velike specifične površine nanokristala i svojstva mukoadhezivnosti, što rezultira s više međudjelovanja s biološkim membranama i duljem vremenu zadržavanja u dijelu spojnice (konjunktive) oka, a samim time je produljeno i djelovanje lijeka (Sharma i sur., 2016). Za razliku od klasičnih suspenzija, kod nanosuspenzija djelatne tvari smanjeno je zamućenje vida nakon primjene farmaceutskog oblika. Glavni problem kod oftalmičkih nanosuspenzija djelatne tvari je nestabilnost nanosuspenzija uzrokovana agregacijom i aglomeracijom. Taj problem se pokušava riješiti odabirom prikladnog stabilizatora, bilo to polimernog, ionskog i neionskog surfaktanta. Trenutno je na europskom i američkom tržištu dostupno nekoliko odobrenih lijekova temeljenih na nanotehnologiji. Prednjače nanoemulzije (Restasis®, Ikervis® i Vekacia®) uz jednu nanosuspenziju Ilevro® (Novartis Pharms Corp) (Tablica 2.).

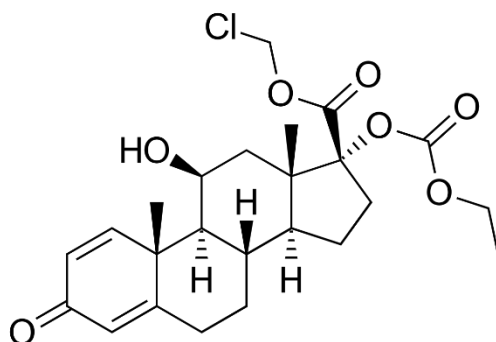
**Tablica 2.:** Odobreni lijekovi (FDA, EMA) temeljeni na nanotehnologiji za oftalmičku primjenu (prilagođeno prema Camasmie i sur., 2019).

Lijek/ Medicinski proizvod	Djelatna tvar	Metoda izrade	Vrsta pripravka	Indikacija	Godina odobranja ili klinička faza
Restasis® (Allergan)	Ciklosporin A 0,05 %	Miješanje smicanjem i visokotlačna	Nanoemulzij a	Sindrom suhog oka	2002. (FDA)

		homogenizacij a			
Retaine® MGD™ (Ocusoft, SAD) ili Cationorm (Santen, EU)	/	Visokotlačna homogenizacij a	Kationska nanoemulzija	Sindrom suhog oka	2008. (Francuska)
Ilevro® (Novartis Pharms Corp)	Nepafenak	Vlažno mljevenje	Nanokristali	Upala i bol nakon operacije katarakte	2012. (FDA) 2013. (EMA)
Ikervis® (Santen Pharmaceutica l Co., Ltd.)	Ciklosporin 0,1 %	Miješanje smicanjem i visokotlačna homogenizacij a	Kationska nanoemulzija	Teški keratitis kod bolesti suhog oka	2015. (EMA)
Vekacia® (Santen Pharmaceutica l Co., Ltd.)	Ciklosporin 0,1 %	Visokotlačna homogenizacij a	Kationska nanoemulzija	Teški vernalni keratokonjuktiviti s	2018. (EMA)

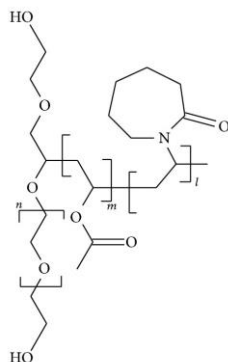
## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolest suhog oka predstavlja veliki problem u zdravstvu zbog činjenice da je oko primarni osjetilni organ. Za liječenje bolesti suhog oka u SAD-u se koristi djelatna tvar loteprednol etabonat koji je odobren u nekoliko lijekova u različitim formulacijama: 0,5 % gel Lotemax® (Bausch and Lomb INC), 0,5 % mast Lotemax® (Bausch and Lomb INC), 0,38 % gel Lotemax SM® (Bausch and Lomb INC), 0,5 % gel Loteprednol etabonat (Akorn operating CO LLC), 0,25 % kapi EysuVIS® (Kala Pharmaceuticals), kapi 1 % Inveltys® (Kala Pharmaceuticals) i 0,2 % kapi Alrex® (Bausch and Lomb INC). Loteprednol etabonat je sintetiziran i patentiran 1980. godine od strane Bausch and Lomb INC, a na tržištu u SAD-u se pojavio 1998. u obliku 0,5 % gela pod imenom Lotemax®, a 2020. godine je dobio odobrenje za liječenje sindroma suhog oka. Loteprednol etabonat je agonist kortikosteroidnog hormonalnog receptora, no molekularni mehanizam o vezanju na receptor ovisnoj modulaciji imunskog odgovora nije razjašnjen, ali potiče se protuupalni odgovor kroz inhibiciju: stvaranja edema, taloženja fibrina i kolagena, migracije leukocita, kapilarne dilatacije i proliferacije. Kao i ostali kortikosteroidi, djeluje i na inhibiciju fosfolipidaze A2 koja je bitna u mehanizmu sinteze proupalnih prostaglandina i leukotriena. Loteprednol etabonat (Klorometil (8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-17-etokskarbonsiloksi-11-hidroksi-10,13-dimetil-3-okso-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahidro-6H-ciklopenta[a]fenantren-17-carboksilat) (Slika 7.) je oftalmički kortikosteroid koji je retrometabolički sintetiziran promjenama iz inaktivnog metabolita prednizolon acetata i ima 17β-klorometil ester na C-20 atomu umjesto keto skupine prednizolon acetata. Takva promjena u strukturi pridonosi bržem metabolizmu loteprednol etabonata u odnosu na prednizol acetat te kraćem vremenu izlaganja pa se time smanjuje mogućnost nuspojava lijeka, a farmakološka svojstva lijeka su zadržana (Beckman i sur., 2020).



**Slika 7.** Strukturna formula loteprednol etabonata

SoluPlus® je kemijskom strukturom polivinil karbolaktam-polivinil acetat-polietilen glikol kopolimer (PCL-PVAc-PEG 6000) (Slika 8.). To je relativno novi polimer s amfoternim svojstvima. Za razliku od klasičnih solubilizatora, SoluPlus® je bifunkcionalnih sposobnosti (matriksni polimer za krute farmaceutske oblike i aktivni solubilizator u vodi jer tvori micelle) te se svrstava u četvrtu generaciju solubilizatora (Shamma i sur., 2013).



**Slika 8.:** Strukturna formula SoluPlus®.

Cilj eksperimentalnog diplomskog rada je izraditi nanokristale, čim manjih dimenzija, loteprednol etabonata suspendirane pomoću PCL-PVAc-PEG 6000 polimera (SoluPlus®) metodom vlažnog mljevenja. Specifični ciljevi diplomskog rada su: ispitati utjecaj korištenja fosfatnog pufera (pH 7,4) na učinkovitost PCL-PVAc-PEG 6000 polimera (SoluPlus®), ispitati veličinu čestica i indeks polidisperznosti nanokristala loteprednol etabonata nakon 24 i 48 sati vlažnog mljevenja, ispitati utjecaj masenog omjera loteprednol etabonata i PCL-PVAc-PEG 6000 polimera (SoluPlus®) na veličinu čestica izrađenih nanokristala.

### 3. MATERIJALI I METODA

#### 3.1. Materijali

Prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištene su sljedeće tvari:

- loteprednol etabonat mikroionizirani (Industriale Chemica S.R.L., Italija)
- SoluPlus®-karbolaktam-polivinil acetat-polietilen glikol kopolimer (PCL-PVAc-PEG 6000) (BASF, Njemačka)
- fosfatni pufer pH = 7,4
- pročišćena voda

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Izrada micela SoluPlusa® u vodi i fosfatnom puferu

Pripravljena je ishodna otopina SoluPlus® (10 %, m/V) otapanjem 1 g SoluPlus® izvaganog na analitičkoj vagi (Mettler-Toledo, Španjolska) i kvantitativno prenesenog u tikvicu od 10 mL te nadopunjeno do oznake pročišćenom vodom ili fosfatnim puferom (pH = 7,4). Ishodna otopina je homogenizirana miješanjem na magnetnom višekanalnom mješaču (Magnetic stirrer MIX 15eco, Njemačka) tek nakon dopunjavanja do oznake, kako bi se izbjeglo pjenjenje. Zatim je pripravljen koncentracijski niz otopina/disperzija SoluPlus® s pročišćenom vodom ili fosfatnim puferom (Tablica 3. i Tablica 4.). Uzorci su pripremljeni u duplikatu.

##### 3.2.2. Određivanje hidrodinamičkog promjera i indeksa polidisperznosti micela SoluPlusa® u vodi i fosfatnom puferu

Otopine/disperzije SoluPlus® mjerene na Zetasizer Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) te su dobiveni podaci za hidrodinamički promjer (veličinu čestica)  $d_h$  i indeks polidisperznosti  $PDI$  (Tablica 3. i Tablica 4.). Uzorci su filtrirani kroz membranski filter (RC-20/25, 0,20  $\mu\text{m}$ ) u jednokratne kivete DTS1070 (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) i mjereni su pri kutu detekcije od 173 ° i pri temperaturi od 25 °C. Uzorci su mjereni u triplikatima te je izračunana srednja vrijednost i standardna devijacija. Uređaj mjeri veličinu čestica na principu dinamičkog raspršivanja svjetlosti (engl. *Dynamic light scattering*, DLS). DLS je tehnika kojom se mjeri Brownovo gibanje (nasumično i neprestano gibanje čestica), a povezuje brzinu gibanja i

veličinu čestica kroz Stokes-Einsteinovu jednadžbu (veće čestice se sporije gibaju, a manje brže, dok se čestice brže gibaju pri višoj temperaturi).

**Tablica 3.:** Veličina micela (nm) i indeks polidisperznosti otopina SoluPlus® u vodi pri 25°C uz filtriranje kroz membranski filter RC-20/25 0,20 µm.

<b>C PCL-PVAc-PEG 6000 (% , m/V)</b>	<b>Srednja vrijednost d<sub>h</sub> (nm)</b>	<b>SD</b>	<b>Srednja vrijednost PDI</b>	<b>SD</b>
1 % 1.	<b>62,31</b>	0,637	<b>0,028</b>	0,006
1 % 2.	<b>62,91</b>	1,024	<b>0,023</b>	0,020
0,5 % 1.	<b>62,25</b>	0,900	<b>0,027</b>	0,008
0,5 % 2.	<b>61,89</b>	0,657	<b>0,020</b>	0,007
0,1 % 1.	<b>63,31</b>	0,686	<b>0,018</b>	0,009
0,1 % 2.	<b>62,69</b>	0,882	<b>0,018</b>	0,005
0,05 % 1.	<b>64,70</b>	0,835	<b>0,028</b>	0,013
0,05 % 2.	<b>64,85</b>	0,654	<b>0,013</b>	0,012
0,0003 % 1.	<b>128,23</b>	11,437	<b>0,339</b>	0,077
0,0003 % 2.	<b>352,17</b>	300,688	<b>0,408</b>	0,152
0,0001 % 1.	<b>177,30</b>	3,064	<b>0,228</b>	0,025
0,0001 % 2.	<b>134,37</b>	7,767	<b>0,369</b>	0,058

**Tablica 4.:** Veličina (nm) i indeks polidisperznosti micela SoluPlus® u fosfatnom puferu (pH = 7,4) pri 25°C uz filtriranje kroz membranski filter RC-20/25 0,20 µm.

<b>C PCL-PVAc-PEG 6000 (% , m/V)</b>	<b>Srednja vrijednost d<sub>h</sub> (nm)</b>	<b>SD</b>	<b>Srednja vrijednost PDI</b>	<b>SD</b>
1 % 1.	<b>79,82</b>	2,023	<b>0,049</b>	0,013
1 % 2.	<b>78,90</b>	1,802	<b>0,057</b>	0,016
0,5 % 1.	<b>78,73</b>	2,056	<b>0,053</b>	0,009
0,5 % 2.	<b>79,23</b>	2,826	<b>0,043</b>	0,007
0,1 % 1.	<b>74,38</b>	8,154	<b>0,100</b>	0,097
0,1 % 2.	<b>74,44</b>	1,612	<b>0,035</b>	0,006

0,05 % 1.	<b>80,78</b>	2,156	<b>0,041</b>	0,018
0,05 % 2.	<b>79,41</b>	2,935	<b>0,051</b>	0,031
0,0003 % 1.	<b>229,93</b>	31,924	<b>0,317</b>	0,051
0,0003 % 2.	<b>136,43</b>	15,857	<b>0,267</b>	0,026
0,0001 % 1.	<b>314,67</b>	18,225	<b>0,302</b>	0,028
0,0001 % 2.	<b>275,87</b>	6,921	<b>0,163</b>	0,132

### 3.2.3. Određivanje UV/VIS apsorpcijskih maksimuma disperzija SoluPlusa®.

Otopine SoluPlus® mjerene su na UV-VIS spektrofotometru (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) te su dobiveni podaci o apsorpcijskim maksimumima u UV-VIS području valnih duljina (Tablica 3. i Tablica 4.). Ovo mjerenje je bilo potrebno zbog ograničenosti UV-VIS detektora HPLC-a.

**Tablica 5.:** Određivanje apsorpcijskih maksimuma u UV-VIS području valnih duljina otopina SoluPlusa® u vodi pri različitim koncentracijama.

<b>c PCL-PVAc-PEG 6000 (% , m/V)</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> (nm)</b>
0,01 % 1.	200
0,01 % 2.	205
0,05 % 1.	210
0,05 % 2.	205
0,1 % 1.	<190
0,1 % 2.	<190
0,5 % 1.	235, <190
0,5 % 2.	235, <190
1% 1.	230
1% 2.	208, 233, <190

**Tablica 6.:** Određivanje apsorpcijskih maksimuma u UV-VIS području valnih duljina otopina SoluPlusa® u fosfatnom puferu (pH 7,4) pri različitim koncentracijama.

<b>c PCL-PVAc-PEG (% , m/V)</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> (nm)</b>
0,01% 1.	<190



0,01% 2.	<190
0,05% 1.	<190
0,05% 2.	<190
0,1% 1.	<190
0,1% 2.	<190
0,5% 1.	235, 205, <190
0,5% 2.	235, 210, <190
1% 1.	258, 232, 205, <190
1% 2.	210, 225, 252, 265, <190

### 3.2.4. Izrada nanosuspenzija loteprednol etabonata i SoluPlusa®

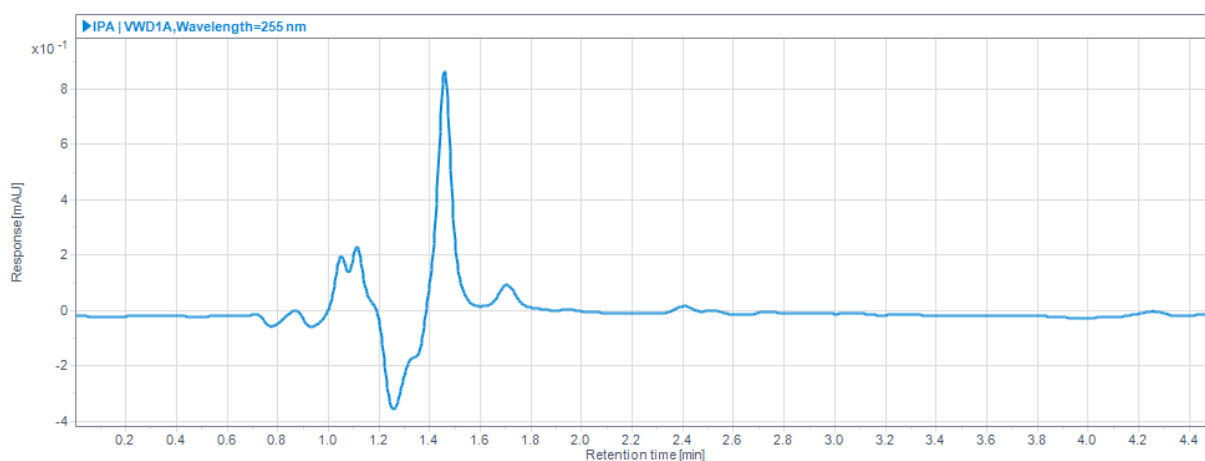
Izrađuju se 1 % nanosuspenzije loteprednol etabonata u različitim koncentracijama otopina/disperzija SoluPlusa®. 0,05 g loteprednol etabonata izvagano je na analitičkoj vagi (Mettler-Toledo, Španjolska) i kvantitativno preneseno u tikvicu od 5 mL i nadopunjeno do oznake otopinom/disperzijom SoluPlusa® različitih koncentracija. Uzorci su izrađeni u duplikatima. Zatim se uzorak melje tehnikom vlažnog mljevenja. U ampule visine 35 mm i promjera 12 mm dodane su kuglice itrij stabiliziranog cirkonijevog oksida različitih promjera: 0,5 g kuglica 0,4 – 0,6 mm, 0,5 g kuglica 0,2 mm i 0,5 g kuglica 0,1 mm. U ampule je zatim dodano 2,5 g nanosuspenzije i 5 cilindričnih magnetskih mješača duljine 10 mm i promjera 6 mm te se ampula zatvorila parafilmom. Ampule su stavljene na magnetni višekanalni mješač (Magnetic stirrer MIX 15eco, Njemačka) i nanosuspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 24 ili 48 sati na 350 okretaja po minuti.

### 3.2.5. Određivanje hidrodinamičkog promjera i indeksa polidisperznosti nanosuspenzija loteprednol etabonata

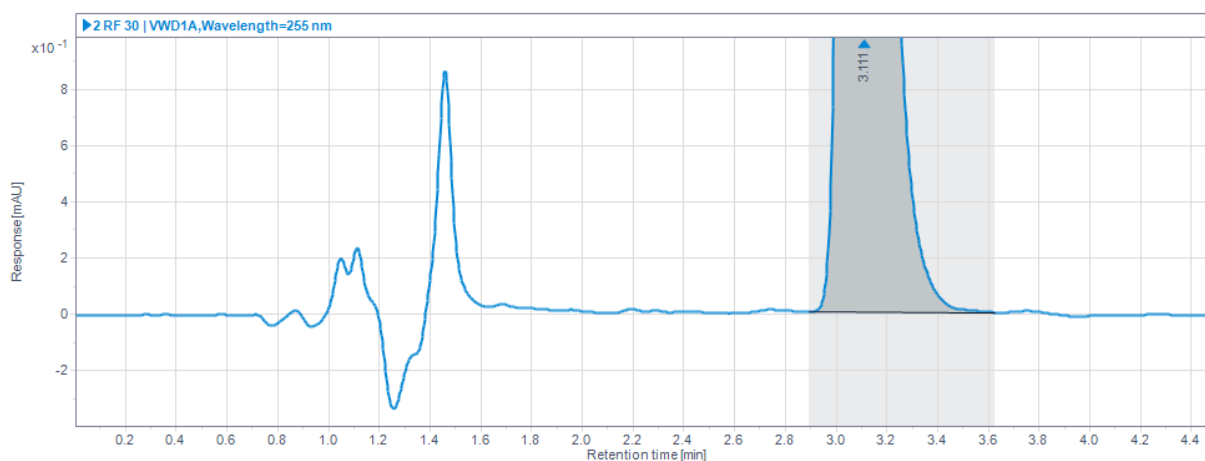
Nanosuspenzije loteprednol etabonata u otopini/disperziji SoluPlus® mjerene su na Zetasizeru Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) i dobiveni su podaci za hidrodinamički promjer i indeks polidisperznosti (Tablica 5. i 6.). Uzorci su mjereni u triplikatima te je izračunana srednja vrijednost i standardna devijacija. Uzorci nanosuspenzija prije mjerenja razrijeđeni su s 1 % otopinom SoluPlus® 50 puta kako bi se izbjegnulo višestruko raspršivanje svjetlosti uzrokovano previsokom koncentracijom nanokristala.

### 3.2.6. Ispitivanje nanosuspenzija loteprednol etabonata HPLC metodom

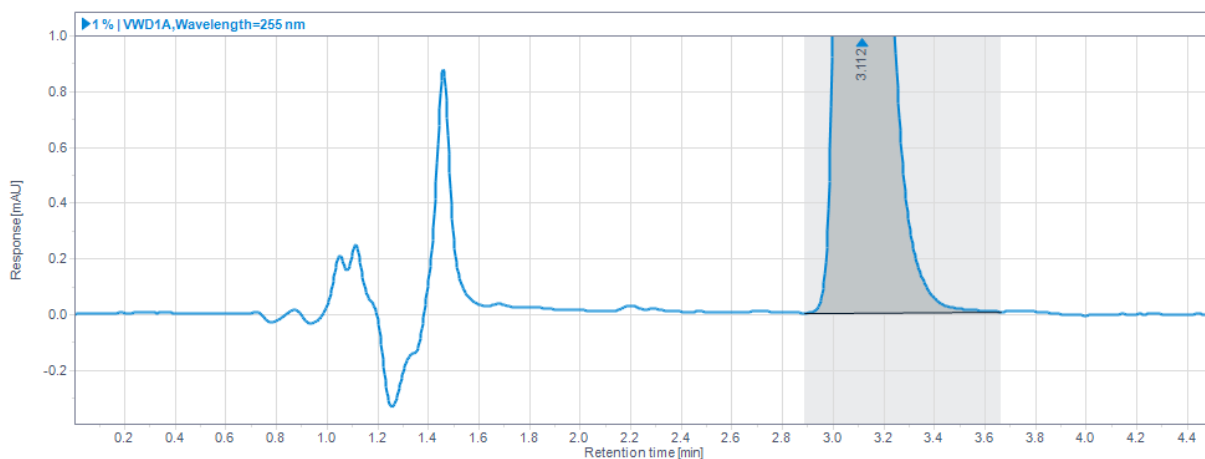
1 % nanosuspenzija loteprednol etabonata u otopini/disperziji SoluPlus® koncentracije 1 % i 0,0003 % mjerene su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (engl. High-performance liquid chromatography, HPLC) kako bi se utvrdila prisutnost loteprednol etabonata u nanosuspenzijama. Uređaj je Agilent 1260 Infinity 2 (Agilent, SAD), a kolona je Waters Xbridge 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, SAD). Parametri HPLC-a su: mobilna faza izrađena od ultračiste vode (42%) i acetonitrila (58 %), diluent je izopropanol, valna duljina detekcije je 255 nm, temperatura kolone je 45°C, brzina protoka mobilne faze kroz kolonu je 1 mL/min, volumen injektiranja je 5  $\mu\text{L}$ , retencijsko vrijeme je 2,8 min, vrijeme mjerenja je 4,5 min i tlak u koloni je približno 90 bara.



Slika 9. Kromatograf čistog diluenta (izopropanola).



Slika 10. Kromatograf standarda loteprednol etabonata.



**Slika 11.** Kromatograf 1 % nanosuspenzije loteprednol etabonata.

### 3.2.7. TEM analiza nanosuspenzija loteprednol etabonata

Korišten je TEM Morgagni 268 (FEI, SAD) transmisijski elektronski mikroskop (engl. Transmission electron microscopy, TEM) koji radi na 70 kV. Više je čimbenika koji utječu na kvalitetu slike dobivene TEM analizom, ali glavni su korištena energija elektrona koja se koristi za mikroskopiranje (prosječna je 100 keV, a za visoko kvalitetne slike je i do 1 MeV), elektronska gustoća uzorka, debljina i gustoća uzorka te energija elektrona (Mifof i Fratzl, 2011.). Priprema uzorka se sastoji od stavljanja kapi uzorka na mrežicu Formvar®/Carbon bakrenu mrežicu širine polja na mrežici od 149  $\mu\text{m}$  (Emtec GmbH, Njemačka) i zatim se uzorak osuši na sobnoj temperaturi i spreman je za mikroskopiranje.

### 3.2.8. Ispitivanje stabilnosti nanosuspenzija loteprednol etabonata

Ispitivana je stabilnost nanosuspenzija loteprednol etabonata u vremenskom razdoblju od 7 dana. Izrađene nanosuspenzije ostavljene su na sobnoj temperaturi i mjerene su veličine čestica 1., 2. i 7. dan nakon završetka vlažnog mljevenja. Nanosuspenzije su redispergirane prije mjerenja veličine čestica metodom fotonske korelacijske spektrofotometrije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada sastoji se od nekoliko postupaka izrade i karakterizacije nanosuspenzija loteprednol etabonata. Prvo je ispitivan surfaktant SoluPlus® i svojstva te tvari u pročišćenoj vodi i fosfatnom puferu (pH = 7,4), prvenstveno veličina micela koje se formiraju iznad kritične micelizacijske koncentracije  $c_{cmc}$  te apsorpcijski maksimumi SoluPlus® radi daljnje analize nanosuspenzija na HPLC uređaju sa UV-VIS detektorom. Zatim su izrađene nanosuspenzije loteprednol etabonata metodom vlažnog mljevenja 24 sata i 48 sati te je tako ispitan utjecaj duljine mljevenja na veličinu čestica nanosuspenzija. Izrađenim nanosuspenzijama mjerena je veličina čestica te je HPLC metodom potvrđena prisutnost loteprednol etabonata u uzorcima. U sljedećem koraku, uzorci nanosuspenzija su obrađeni TEM metodom kako bi se vizualizirala i karakterizirale čestice nanosuspenzije. Na kraju je ispitana i stabilnost nanosuspenzija pri sobnoj temperaturi.

### 4.1. Utjecaj pH na veličinu micela i indeks polidisperznosti SoluPlus®

U prvom dijelu eksperimentalnog dijela ovog rada, pristupilo se izradi otopina SoluPlus® u različitim koncentracijama iznad i ispod kritične micelizacijske koncentracije  $c_{cmc}$ . SoluPlus® predstavlja četvrtu generaciju surfaktanata, a njegov kemijski sastav čine 13 % PEG 6000, 57 % vinil kaprolaktam i 30 % vinil acetat. Literaturna vrijednost kritične micelizacijske koncentracije  $c_{cmc}$  prema proizvođaču (BASF, Njemačka) iznosi 7,6 mg/L te su micelle koje nastaju promjera između 70 i 100 nm pri pH 7,0. U ovome ispitivanju pri pH 7,0 (pročišćena voda), srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera micela iznosila je između 61,89 nm i 64,85 nm (Tablica 3.) pri koncentracijama iznad  $c_{cmc}$ . Uz mjerenje prosječne veličine čestica, mjeren je i indeks polidisperznosti koji predstavlja mjeru heterogenosti uzorka temeljenu na veličini čestica, točnije na raspodjeli veličine čestica u uzorku. Prema ISO (International standards organizations), uzorci s indeksom polidisperznosti ispod vrijednosti 0,05 smatraju se monodisperznim sustavima, dok se uzorci s indeksom polidisperznosti iznad vrijednosti 0,7 smatraju polidisperznim sustavima (standardi ISO 22, 412: 2017 i ISO 22, 412: 2017) (Mudalige i sur., 2019). Uzimajući u obzir ISO standarde, otopine SoluPlus® iznad koncentracije  $c_{cmc}$ , smatraju se homogenim i monodisperznim sustavima jer im vrijednost indeksa polidisperznosti u prosjeku 0,022. Uzorci čija je koncentracija ispod  $c_{cmc}$  i kod kojih nije došlo do stvaranja micela, prosječna veličina čestica iznosi 198,02 nm, a vrijednost indeksa

polidisperznosti iznosi u prosjeku 0,336 te se takav sustav ne smatra homogenim ni monodisperznim. Otopine SoluPlus® izrađene u fosfatnom puferu (pH = 7,4) u koncentracijama iznad  $c_{cmc}$  (Tablica 4.) prosječne su veličine čestica u promjeru između 74,38 nm i 80,78 nm. Vrijednosti indeksa polidisperznosti otopina SoluPlus® iznad  $c_{cmc}$  iznose u prosjeku 0,054 te su malo iznad ISO standarda za homogeni i monodisperzni sustav. Otopine SoluPlus® ispod  $c_{cmc}$ , pri kojima nije došlo do stvaranja micela, prosječne su veličine čestica 239,23 nm i vrijednost indeksa 0,262 te se ne smatraju homogenim ni monodisperznim sustavima. Uz mjerenje veličine čestica, na uređaju UV-VIS spektrofotometru (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD) određeni su i apsorpcijski maksimumi otopina SoluPlus® u vodi i fosfatnom puferu radi daljnje HPLC analize nanosuspenzija loteprednola. U HPLC metodi, detekcija se provodi na 255 nm gdje loteprednol pokazuje apsorpcijski maksimum (Slika 9., Slika 10. i Slika 11.), a SoluPlus® ne apsorbira te se tako potvrđuje prisutnost loteprednol etabonata u nanosuspenzijama. Usporedbom kromatograma potvrđena je prisutnost loteprednol etabonata u nanosuspenzijama. Kao medij za daljnje ispitivanje korištena je pročišćena voda.

#### **4.2. Utjecaj formulacijskih i procesnih parametara na izradu nanosuspenzija loteprednol etabonata**

Prije izrade nanosuspenzija metodom vlažnog mljevenja, izmjerena je veličina čestica loteprednol etabonata koji dolazi u mikroniziranom obliku što je i mjerenje na Zetasizeru Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) te su njegove čestice u prosjeku veće od 3  $\mu\text{m}$  te je indeks polidisperznosti gotovo jednak 1. Izmjerenim indeksom polidisperznosti utvrđuje se disperzija veličine čestica loteprednol etabonata. Zbog takvih rezultata indeksa polidisperznosti, zaključuje se da suspenzija loteprednola nije homogena. Zatim su metodom vlažnog mljevenja usitnjene čestice loteprednol etabonata uz korištenje kuglica mase 1,5 g (0,1 mm, 0,2 mm i 0,4 – 0,6 mm; 0,5 g svakih kuglica). Prilikom vlažnog mljevenja loteprednol etabonata u otopini SoluPlus® ispod  $c_{cmc}$ , točnije u otopini gdje nije došlo do stvaranja micela, nije došlo do formiranja nanokristala djelatne tvari te je loteprednol etabonat ostao u mikroniziran i veličine iznad 2,8  $\mu\text{m}$ . Nanosuspenzija mljevena 24 sata sa 1 % loteprednol etabonata i 1 % SoluPlus® je mliječne boje i homogena izgleda (Slika 12.).



**Slika 12.** 1 % nanosuspenzija loteprednol etabonata u 1 % otopini SoluPlus® nakon 24 sata vlažnog mljevenja.

Veličina nanokristala izmjerenih metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti nakon 24 sata vlažnog mljevenja iznosi u prosjeku oko 180 nm uz polidisperzni prosječni indeks polidisperznosti oko 0,35. Fizikalne karakteristike, prije svega veličina nanokristala, ovise o brojnim čimbenicima: veličini kuglica za mljevenje, koncentraciji djelatne tvari i o koncentraciji stabilizatora (Bartos i sur., 2018). U pravilu, konačna veličina čestica nakon mljevenja je tisuću puta manja od kuglica koje su korištene u procesu mljevenja. Ipak, ne odabiru se kuglice jedne veličine zbog povećanog rizika od mehaničkog oštećenja opreme te zbog stvaranja kinetičke energije usred brzog smanjivanja veličine čestica te se time povećava mogućnost agregacije (Romero i sur. 2016). Nakon 48 sati mljevenja, čestice nanosuspenzija su se smanjile za približno 50 nm, ali se povećao indeks polidisperznosti na više od 0,5.

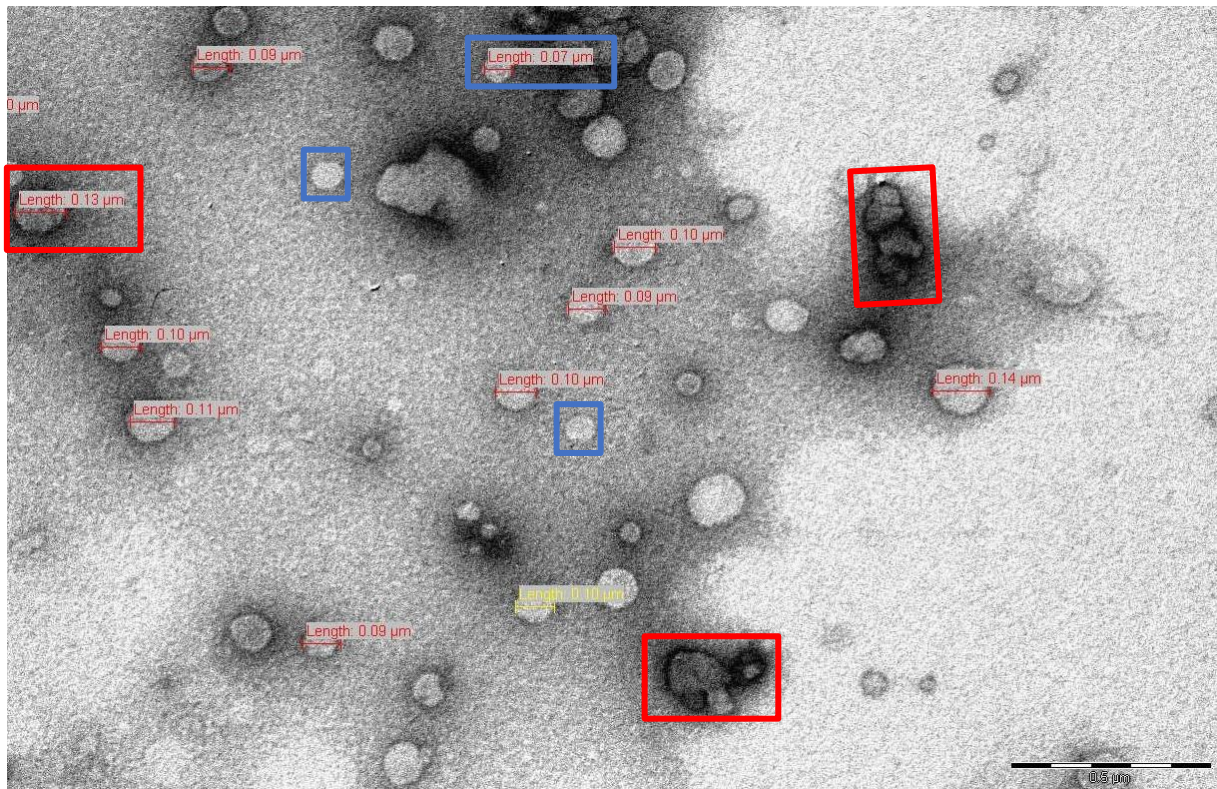
**Tablica 7.:** Veličina (hidrodinamički promjer; nm) nanokristala i indeks polidisperznosti nanosuspenzija SoluPlus® i loteprednol etabonata u vodi pri 25°C prije i nakon 24 h mljevenje ( $C_{LE} = 1 \%$ ).

<b>c PCL-PVAc-PEG (% m/V)</b>	<b>Vrijeme mljevenja (h)</b>	<b>Srednja vrijednost <math>d_h</math> (nm)</b>	<b>SD</b>	<b>Srednja vrijednost PDI</b>	<b>SD</b>
1	0	<b>3025,67</b>	231,742	<b>0,783</b>	0,161
1	0	<b>2910</b>	351,642	<b>0,9653</b>	0,060
0,0003	24	<b>2838,33</b>	391,040	<b>0,903</b>	0,167
0,0003	24	<b>2715</b>	1337,648	<b>0,9664</b>	0,058

1	24	<b>174,37</b>	39,816	<b>0,310</b>	0,036
1	24	<b>184,50</b>	50,388	<b>0,449</b>	0,016
1	48	<b>123,70</b>	7,375	<b>0,503</b>	0,017
1	48	<b>120,37</b>	24,123	<b>0,346</b>	0,029

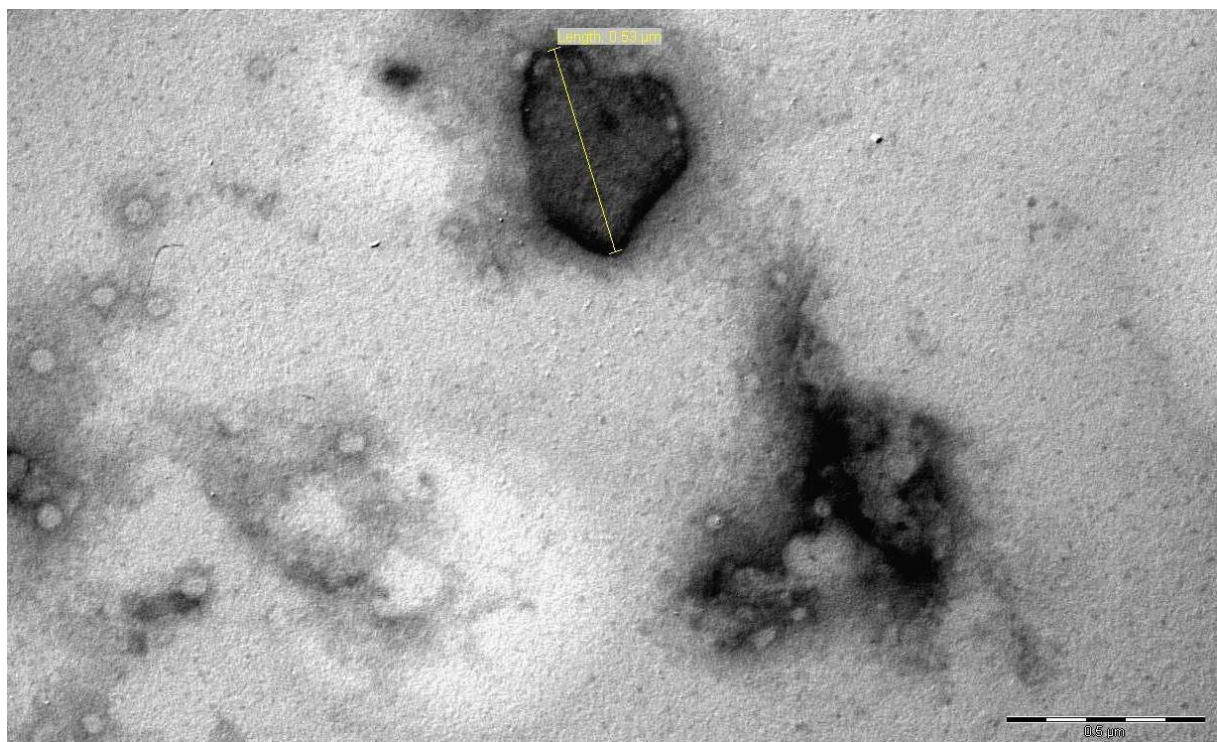
#### 4.3. TEM analiza nanosuspenzija loteprednol etabonata

Zbog ograničenosti uobičajene metode mjerenja veličine čestica temeljene na dinamičkom raspršenju svjetlosti, mjerenje veličina čestica nanosuspenzija treba biti popraćeno dodatnim tehnikama poput transmisijske elektronske mikroskopije (Malamatari i sur., 2018). Transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission electron microscopy*, TEM) spada u metodu analize uzorka s ciljem dobivanja visoko kvalitetnih slika mikroniziranih i nanoniziranih uzoraka. U ovome eksperimentalnom diplomskom radu korišten je TEM Morgagni 268 (FEI, SAD) na 70 keV. Cilj korištenja ove metode je vizualizacija i karakterizacija uzoraka prethodno obrađenih na Zetasizeru Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo). Dobiveni nanokristali su prosječne veličine 180 nm (Tablica 7.) (označeno crvenom bojom na Slici 13.) dok su svijetlije obojene micelle manjih dimenzija (označeno plavom bojom na Slici 13.) micelle SoluPlus®.



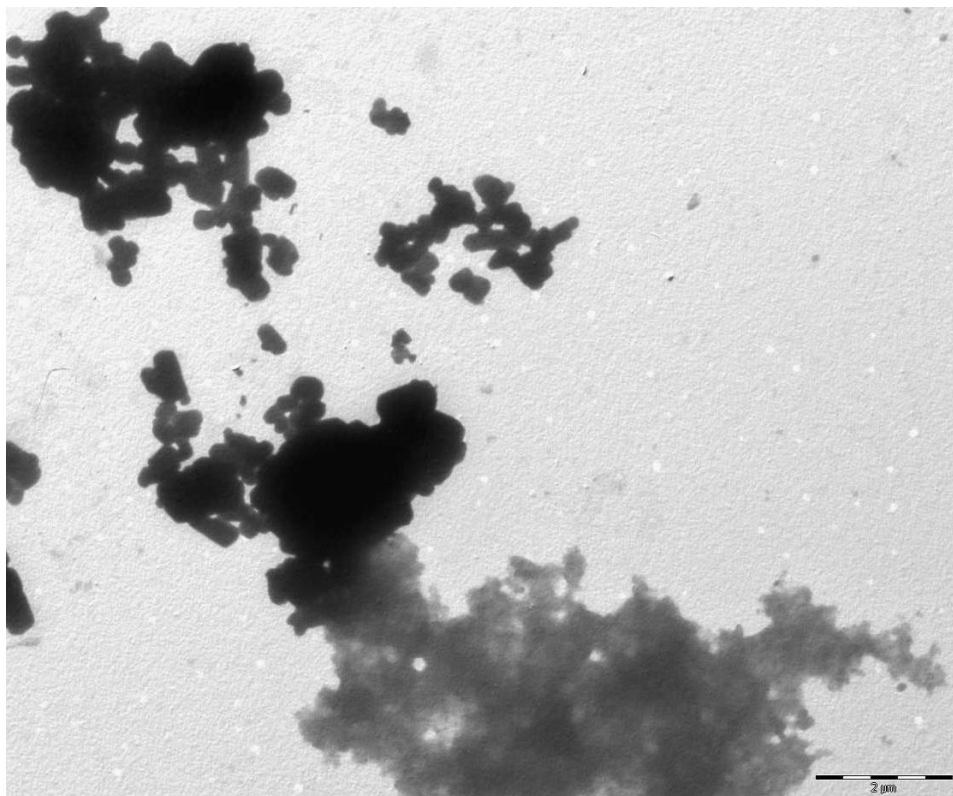
**Slika 13.** TEM analiza nanosuspenzije loteprednol etabonata u otopini SoluPlus® koncentracije iznad  $c_{cmc}$ .

Prilikom izrade nanosuspenzija s koncentracijama SoluPlus® ispod  $c_{cmc}$ , ne uočavaju se nanokristali djelatne tvari već kristali čistog loteprednol etabonata (Slika 14.).

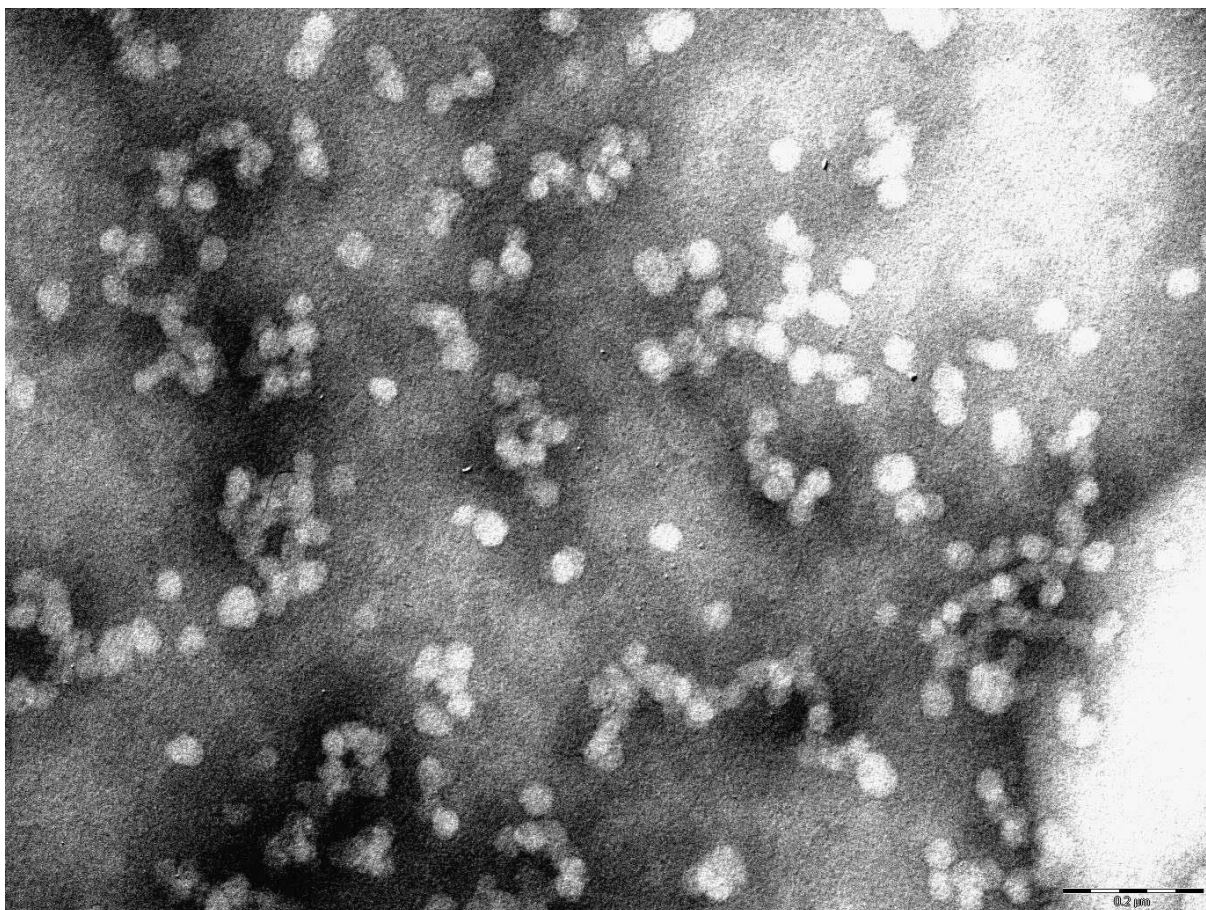




**Slika 14.** TEM analiza suspenzije loteprednol etabonata u otopini SoluPlus® koncentracije ispod  $C_{cmc}$ .



**Slika 15.** TEM analiza suspenzije loteprednol etabonata u pročišćenju vodi.



**Slika 16.** TEM analiza otopine SoluPlus® koncentracije iznad  $c_{cmc}$ .

Prilikom TEM analize zasebno loteprednol etabnoata, uočavaju se veliki kristali u mikrometarskome rasponu (Slika 15.). Prilikom TEM analize otopine SoluPlus® koncentracije iznad  $c_{cmc}$ , uočavaju se micelle prosječnih veličina od 70 nm (Slika 16.).

#### **4.4. Ispitivanje stabilnosti nanosuspenzija loteprednol etabonata**

Kod 1 % nanosuspenzija loteprednol etabonata uočena je nestabilnost u vidu taloženja (Slika 17.). Nakon redispergiriranja i mjerenja veličine čestica metodom fotonske korelacijske spektrofotometrije, utvrđeno je da su forme nanokristala nakon jednog dana postojane i nema većeg odstupanja od veličine čestica, a nakon 7 dana došlo je do povećanja veličina čestica (Tablica 8.). Mjerenja su provedena za 24 satno mljevene 1 % nanosuspenzije.



**Slika 17.** 1 % nanosuspenzija loteprednol etabonata nakon 24 sata pri sobnoj temperaturi (25°C)

**Tablica 8.** Veličina čestica 1 % nanosuspenzije loteprednol etabonata nakon određenog broja dana na 25°C.

<b>Dan</b>	<b>Srednja vrijednost <math>d_h</math> (nm)</b>	<b>SD</b>	<b>Srednja vrijednost PDI</b>	<b>SD</b>
1.	<b>184,50</b>	50,388	<b>0,449</b>	0,015
2.	<b>161,60</b>	1,682	<b>0,484</b>	0,040
7.	<b>217,90</b>	51,154	<b>0,498</b>	0,063

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu pripremljene su 1 % nanosuspencije čestica loteprednol etabonata i površinski aktivne tvari SoluPlus®. Nanosuspencije su izrađene metodom vlažnog mljevenja koja pripada skupini metoda kojima se smanjuje veličina čestica (engl. *top-down methods*). Veličina čestica i indeks polidisperznosti mjereni su postupkom fotonske korelacijske spektroskopije. U eksperimentalnom dijelu izrade nanosuspencija uočeno je da veličina čestica nanosuspencije ovisi o udjelu površinski aktivne tvari te o vremenu vlažnog mljevenja.

U otopinama SoluPlus® pH vrijednost medija utječe na veličinu micela koje nastaju pri koncentracijama iznad kritične micelizacijske koncentracije  $c_{cmc}$ . Veličine micela u pročišćenoj vodi su približno 10 nm manje od micela u fosfatnom puferu (pH = 7,4).

Uzorci loteprednol etabonata koji su mljeveni uz koncentraciju SoluPlus® ispod kritične micelizacijske koncentracije  $c_{cmc}$  nisu dali povoljne rezultate, točnije veličina čestica je ostala u mikrometarskome rasponu (oko 3  $\mu\text{m}$ ). Nanosuspencije koje su mljevene 24 sata imaju veličinu čestica oko 180 nm, a one mljevene 48 sati su i do 50 nm manje, uz povoljniji indeks polidisperznosti pri uzorcima mljevenima 24 sata (0,310).

TEM analize nanosuspencija i uzoraka čistog loteprednol etabonata i SoluPlus®, potvrdila su se mjerenja veličina čestica temeljena na postupku fotonske korelacijske spektroskopije.

Prilikom ispitivanja stabilnosti, utvrđeno je da su nanosuspencije podložne taloženju, ali se mjerenjima veličine čestica metodom fotonske korelacijske spektrofotometrije nakon redispergiriranja nanosuspencija utvrdilo da je veličina čestica ostala postojana nakon 24 sata, ali ne i nakon tjedan dana kada je došlo do povećanja veličine čestica.

Nanosuspencije su mliječno-bijelog izgleda (Slika 12.) što predstavlja problem pri primjeni takvog gotovog lijeka u obliku kapi za oko. Također, nanosuspencija je pokazala nestabilnost pri sobnoj temperaturi te ju je potrebno redispergirati (Slika 17.).

Iz svega navedenog zaključeno je da je 1 % nanosuspencija loteprednol etabonata uz surfaktant SoluPlus® uspješno izrađena metodom vlažnom mljevenja u trajanju od 24 ili 48 sati. Na temelju postignutih rezultata, ostaju brojna moguća ispitivanja na nanosuspencijama koja bi mogla dati rješenje na problem mliječno-bijelog izgleda te nestabilnosti pri sobnoj temperaturi.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

° - stupanj

°C – stupanj Celzijusev

A – specifična površina krutine koja se otapa

API – aktivna djelatna tvar (engl. *active pharmaceutical ingredient*)

BSC – biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*)

$c_{cmc}$  – kritična micelizacijska koncentracija

$c_s$  – topljivost krutine

$c_x$  – koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu

D – prividni koeficijent difuzije tvari

DLS – dinamičko raspršivanje svjetlosti (engl. *Dynamic light scattering*)

$dc_x/dt$  – brzina otapanja krutine

$d_h$  – hidrodinamički promjer (veličina čestica)

EMA – europska agencija za lijekove i medicinske proizvode (engl. *European Medicines Agency*)

EPAS – isparavajuće taloženje u vodenoj otopini

FDA – agencija za hranu i lijekove SAD-a (engl. *U.S. Food & Drug Administration*)

h – debljina difuzijskog sloja

HPH – visokotlačna homogenizacija

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*)

ISO – International standards organizations

k – konstanta brzine otapanja

PAT – površinski aktivna tvar

PCL-PVAc-PEG 6000 - polivinil karbolaktam-polivinil acetat-polietilen glikol kopolimer

PDI – indeks polidisperznosti

R – opća plinska konstanta

RESS – brza ekspanzija supekritične otopine

r – polumjer čestica krutine

SAD – Sjedinjene Američke Države

SAS – superkritično otapalo

SD – standardna devijacija

T – termodinamička temperatura

t – vrijeme

TEM - transmisijski elektronski mikroskop (engl. *Transmission electron microscopy*)

V – molarni volumen čestica krutine

$\lambda_{\max}$  – apsorpcijski maksimum

$\rho$  – gustoća krutine

$\sigma$  – površinska napetost na graničnoj površini krutina/tekućina

## 7. LITERATURA

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995., 12, 413-420.

Afzal O, Altamimi ASA, Nadeem MS, Alzarea SI, Almalki WH, Tariq A, Mubeen B, Murtaza BN, Iftikhar S, Riaz N, Kazmi I. Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials*, 12, 2022.

Aulton M., Taylor K. Aulton's Pharmaceutics, *Elsevier*, Nizozemska, 2021., str. 407.

Bartos C, Jójárt-Laczkovich O, Katona G, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Deli MA, Szabó-Révész P. Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension. *Drug Des Devel Ther.* 2018, 12, 1567-1580.

Beckman K, Katz J, Majmudar P, Rostov A. Loteprednol Etabonate for the Treatment of Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2020, 36, 497-511.

Camasmie Peters MC, Neto ES, Monteiro LM, Yukuyama MN, Mendes Machado MG, Fernandes de Oliviera I, Ambrosio Zanin MH, Löbenberg, Bou-Chacra N. Advances in ophthalmic preparation: the role of drug nanocrystals and lipid-based nanosystems. *J Drug Targeting*, 2019, 28, 259-270.

Chen Z, Wu W, Lu Y. What is the future for nanocrystal-based drug-delivery systems? *Ther Deliv., Epub*, 2020, 11, 225-229.

Fischer J, Ganellin CR. Analogue-based Drug Discovery. *John Wiley & Sons.* 2006., str. 488.

Fontana F, Figueiredo P, Zhang P, Hirvonen JT, Liu D, Santos HA. Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018, 131, 3-21.

Gao L, Zhang DR, Chen MH. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 2008, 10, 845–862.

Jahangir, M.A., Imam, S.S., Muheem, A. et al. Nanocrystals: Characterization Overview, Applications in Drug Delivery, and Their Toxicity Concerns. *J Pharm Innov*, 2020. 17, 237–248.

Junghanns JUAH, Muller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed*, 2008, 3, 295–309.

Lakshmi P. i Kumar G.A. Nanosuspension technology: A review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2010, 2, 35-40.

Lobenberg R, Amidon GL, Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 3–12.

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

Loteprednol etabonate, 2005., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loteprednol-etabonate#section=Drug-and-Medication-Information>, pristupljeno 23.05.2023.

Malamatari, M., Taylor, K. M. G., Malamataris, S., Douroumis, D., & Kachrimanis, K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discovery Today*, 2018., 23, 534–547.

Misof, B., Roschger, P., & Fratzl, P. Imaging Mineralized Tissues in Vertebrates. *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011, str. 407–426.

Mohammad IS, Hu H, Yin L, He W. Drug nanocrystals: Fabrication methods and promising therapeutic applications. *Int J Pharm*. 2019, 562, 187-202.



Moschwitz JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process, *Int J Pharm*, 2013, 453, 42-56.

Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., & Ingle, T. Characterization of Nanomaterials. Nanomaterials for Food Applications, *Elsevier*, 2019., str. 311-337.

Muller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products, in *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*, A. Prokop, Editor. 2011, *Springer Science+Business Media: Berlin*. str. 411–432.

Paaver U, Tamm I, Laidmäe I, Lust A, Kirsimäe K, Veski P, Kogermann K, Heinämäki J. Soluplus graft copolymer: potential novel carrier polymer in electrospinning of nanofibrous drug delivery systems for wound therapy. *Biomed Res Int.*, 2014, 2014:789765, 1-7.

Patel N, Nakrani H, Raval M, Sheth N. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. *Drug Deliv*. 2016, 23, 3712-3723.

Patel VR, Agrawal YK. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011, 2, 81.-87.

Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16, 71.

Pepić, Ivan; Kaić, Nika; Filipović-Grčić, Jelena Nanočestice kao terapijski sustav za primjenu lijeka u oko, *Farmaceutski glasnik : glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, 2011, 2,73-86.

Romero GB, Keck CM, Müller RH. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm*, 2016, 501, 239-244.

Sakamoto K., Lochhead R.Y., Maibach H.I., Yamashita Y., *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications. Elsevier, 2017. str. 39-76*

Senjković R. *Osnove oblikovanja lijekova, Školska Knjiga, Zagreb, 2003., str. 13.-14.*

Shamma, R. N., & Basha, M. Soluplus®: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersions: Formulation design and effect of method of preparation, *Powder Technology, 2013, 237, 406–414.*

Sharma OP, Patel V, Mehta T. Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. *Drug Deliv Transl Res, 2016, 6, 399-413.*

Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State MaterSci, 2012, 16, 295–301.*

Voorhees, P.W. The theory of Ostwald ripening. *J Stat Phys 1985, 38, 231–252.*

Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., & Zhang, D. (2013). Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release, 2013, 172, 1126–1141.*

Williams, R. J., Phillips, J. N., & Mysels, K. J. The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25° C. *Trans. Faraday Soc, 1955, 51, 728–737.*

T, Yuan K, Zhang W, Song S, Chen F, Yang X. Prodrugs incorporated into nanotechnology - based drug delivery systems for possible improvement in bioavailability of ocular drugs delivery. *Asian J Pharm Sci. 2013, 8, 207–17.*

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

U ovom eksperimentalnom diplomskom radu izrađene su nanosuspenzije loteprednol etabonata uz dodatak površinski aktivne tvari SoluPlusa® metodom vlažnog mljevenja. Vlažno mljevenje je provedeno u ampulama uz dodatak kuglica itrij stabiliziranog cirkonijevog oksida i magnetskih mješača na višekanalnom mješaču pri sobnoj temperaturi brzinom od 350 okretaja u minuti. Ispitivan je i utjecaj vremena vlažnog mljevenja na veličinu čestica nanosuspenzije loteprednol etabonata kao bitnog procesnog parametra. Karakterizacija nanosuspenzija provedena je metodom fotonske korelacijske spektroskopije i transmisijskom elektronskom mikroskopijom. Izrađivane su micelle SoluPlusa® u pročišćenoj vodi i u fosfatnom puferu s ciljem ispitivanja utjecaja pH na veličinu micela. Ishodne mikrosuspenzije loteprednol etabonata prosječne su veličine čestica više od 3000 nm, dok su nanokristali izrađeni vlažnim mljevenjem prosječne veličine čestica oko 180 nm, a indeks polidisperznosti nanosuspenzija iznosila je u prosjeku oko 0,4. Nanosuspenzijama je ispitivana stabilnost u vremenskom razdoblju od 7 dana. Izrađene nanosuspenzije su pokazale nestabilnost kroz taloženje i agregiranje čestica nanokristala te su bile mliječno bijele boje.

In this experimental thesis, nanosuspensions of loteprednol etabonate were prepared with the addition of the surfactant SoluPlus® using the wet milling method. Wet millin was performed in ampoules with the addition of a ball of yttrium stabilized zirconium oxide and magnetic stirrers on a multi-channel mixer at room temperature at a speed of 350 revolutions per minute. The influence of wet milling time on the particle size of loteprednol etabonate nanosuspension was also examined as an important process parameter. The characterization of the nanosuspension was carried out by the method of photon correlation spectroscopy and transmission electron microscopy. SoluPlus® micelles were made in purified water and in phosphate buffer in order to test the effect of pH on the micelle size. The resulting loteprednol etabonate microsuspensions have an average particle size of more than 3000 nm, while the nanocrystals produced by wet milling have an average particle size of about 180 nm, and the polydispersity index of the nanosuspension was on average about 0.4. Nanosuspensions were tested for stability over a period of 7 days. The prepared nanosuspensions showed instability through precipitation and aggregation of nanocrystal particles and were milky white in color.

## **9. TEMELJNA IDENTIFIKACIJSKA KARTICA**

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### IZRADA I KARAKTERIZACIJA NANOSUSPENZIJA LOTEPREDNOL ETABONATA

Andrija Špoljar

#### SAŽETAK

U ovom eksperimentalnom diplomskom radu izrađene su nanosuspencije loteprednol etabonata uz dodatak površinski aktivne tvari SoluPlusa® metodom vlažnog mljevenja. Vlažno mljevenje je provedeno u ampulama uz dodatak kuglica itrij stabiliziranog cirkonijevog oksida i magnetskih mješača na višekanalnom mješaču pri sobnoj temperaturi brzinom od 350 okretaja u minuti. Ispitivan je i utjecaj vremena vlažnog mljevenja na veličinu čestica nanosuspencije loteprednol etabonata kao bitnog procesnog parametra. Karakterizacija nanosuspencija provedena je metodom fotonske korelacijske spektroskopije i transmisijskom elektronskom mikroskopijom. Izrađivane su micelle SoluPlusa® u pročišćenoj vodi i u fosfatnom puferu s ciljem ispitivanja utjecaja pH na veličinu micela. Ishodne mikrosuspencije loteprednol etabonata prosječne su veličine čestica više od 3000 nm, dok su nanokristali izrađeni vlažnim mljevenjem prosječne veličine čestica oko 180 nm, a indeks polidisperznosti nanosuspencija iznosila je u prosjeku oko 0,4. Nanosuspencijama je ispitivana stabilnost u vremenskom razdoblju od 7 dana. Izrađene nanosuspencije su pokazale nestabilnost kroz taloženje i agregiranje čestica nanokristala te su bile mliječno bijele boje.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 17 grafičkih prikaza, 8 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanokristali, nanosuspencije, loteprednol etabonat

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

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

**Dr. sc. Anita Hafner** redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Jablan** izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### PREPARATION AND CHARACTERIZATION NANOSUSPENSION OF LOTEPREDNOL ETABONATE

Andrija Špoljar

#### SUMMARY

In this experimental thesis, nanosuspensions of loteprednol etabonate were prepared with the addition of the surfactant SoluPlus® using the wet milling method. Wet millin was performed in ampoules with the addition of a ball of yttrium stabilized zirconium oxide and magnetic stirrers on a multi-channel mixer at room temperature at a speed of 350 revolutions per minute. The influence of wet milling time on the particle size of loteprednol etabonate nanosuspension was also examined as an important process parameter. The characterization of the nanosuspension was carried out by the method of photon correlation spectroscopy and transmission electron microscopy. SoluPlus® micelles were made in purified water and in phosphate buffer in order to test the effect of pH on the micelle size. The resulting loteprednol etabonate microsuspensions have an average particle size of more than 3000 nm, while the nanocrystals produced by wet milling have an average particle size of about 180 nm, and the polydispersity index of the nanosuspension was on average about 0.4. Nanosuspensions were tested for stability over a period of 7 days. The prepared nanosuspensions showed instability through precipitation and aggregation of nanocrystal particles and were milky white in color.

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

Thesis includes: 41 pages, 17 figures, 8 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanocrystals, nanosuspensions, loteprednol etabonate

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

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.