

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marko Z Krstić

FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA
ČVRSTIH SAMO-DISPERGUJUĆIH NOSAČA
KARBAMAZEPINA IZRAĐENIH SA
POROZNIM ADSORBENSIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marko Z Krstić

FORMULATION AND
CHARACTERIZATION
OF SOLID SELF-DISPERSING CARRIERS OF
CARBAMAZEPINE PREPARED WITH
POROUS ADSORBENTS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

Mentor

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Komisija

Dr sc. Marija Primorac, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Slavica Ražić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Dragana Vasiljević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr Nenad Lazarević, naučni saradnik,
Centar za fiziku čvrstog stanja i nove materijale,
Institut za fiziku, Beograd

Datum odbrane _____

Veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, posvećenosti, razumevanju i bezrezervnoj moralnoj i stručnoj podršci tokom svih faza izrade doktorske disertacije dugujem mentoru prof. dr Svetlani Ibrić.

Želim posebno da se zahvalim prof. dr Slavici Ražić, na nesebičnoj pomoći, ohrabrenjima i stručnim savetima koje mi je pružila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, kao i na izuzetnoj stalnoj dostupnosti za mene dugi niz godina.

Srdačno se zahvaljujem i prof. dr Dragani Vasiljević na podršci, razumevanju i savetima koji su nesumnjivo doprineli kvalitetu objavljenih publikacija i same doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Mariji Primorac na iskazanoj moralnoj podršci i na stručnim sugestijama koje mi je pružila tokom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i naučnom saradniku dr Nenadu Lazareviću na snimanju Ramanskih spektara i sugestijama tokom pisanja disertacije.

Iskreno se zahvaljujem svojim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na podršci i razumevanju.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegici doc. dr Ljiljani Đekić za pomoć u prvim fazama izbora tečnih samo-dispergujućih nosača, kao i kolegici dipl. farm. Sofiji Beloici na saradnji u in silico modelovanju permeabilnosti lekovite supstance. Zahvaljujem se i kolegi dr Vladimiru Dobričiću na kolegijalnosti pri izvođenju PAMPA testa.

Zahvaljujem se i kolegama sa Katedre za analitičku hemiju na podršci tokom svih godina.

Zahvalnost dugujem i svim svojim studentima na posebnoj vrsti energije koju su mi davali, a posebno hvala studentima koji su mi u okviru Centra za naučno-istraživački rad studenata pomogli da produbim svoja istraživanja.

Posebno hvala mojim prijateljima koji su uvek tu za mene, koji me razumeju i podržavaju u svakom mom životnom koraku.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, roditeljima i sestri, koji su mi bili osnovna inspiracija i motivacija za izradu ove doktorske disertacije. Hvala im na beskrajnoj ljubavi, podršci i razumevanju koju mi pružaju.

SAŽETAK

Poslednjih godina sve veći broj novosintetisanih lekovitih supstanci su nisko rastvorljive u vodi. Jedan od načina za povećanje brzine rastvaranja/rastvorljivosti lekovitih supstanci jeste formulacija čvrstih samo-dispergujućih sistema.

Sveobuhvatni **cilj** ove doktorske disertacije jeste formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom, uz korišćenje prirodnih i sintetskih adsorpcionih nosača, radi povećanja brzine rastvaranja i permeabilnosti karbamazepina.

U **prvoj fazi** istraživanja izvršen je odabir tečnih samo-dispergujućih sistema, različitog stepena disperziteta, za različite kombinacije ulja/surfaktanta/kosurfaktanta (korastvarača). U prvom delu su, nakon metode titracije vodom, za sisteme trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL/Makrogol 400/voda, konstruisani pseudo-ternerni fazni dijagrami. Odabran je **tečni samo-mikroemulgujući nosač** (SMEDDS) trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL/Makrogol 400 (10:66,75:22,25). U nastavku ove faze je na isti način odabran **tečni samo-emulgujući nosač** (SEDDS) trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP (20:60:20). Primenom eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, odabran je **tečni samo-nanoemulgujući nosač** (SNEDDS) za kombinaciju trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/Transcutol[®] HP (21,21:21,12:21,12:36,64). U ovoj fazi je pokazano veliko slaganje između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti za veličinu kapi i Pdl.

U **drugoj fazi** istraživanja izvršena je formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih nosača. U prvom delu, izrađene su **binarne čvrste disperzije** karbamazepina i adsorpcionih nosača (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320, dijatomiti), uz variranje odnosa karbamazepin/nosač 1:1, 1:2 i 1:6 i dve metode izrade, uparavanja etanola na sobnoj temperaturi i na 70 °C. Uočeno je da se formulacijom čvrstih disperzija sa Neusilin[®]-om UFL2, Neusilin[®]-om FL2 i Sylysia[®]-om 320, pri odnosima karbamazepin/nosač 1:2 i 1:6 postiže značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, dok je iz čvrstih disperzija sa karbamazepinom, pri odnosu 1:1 i u svim formulacijama sa dijatomitima brzina oslobađanja slična prašku karbamazepina. U svim formulacijama je došlo do prelaska karbamazepina u amorfni oblik ili u polimorfni oblik II. U nastavku ove faze pristupilo se formulaciji, izradi i karakterizaciji **čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom** (SSMEDDS), pri čemu je udeo karbamazepina bio stalan (20%), dok je odnos SMEDDS/nosač (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320 i dijatomiti) variran i iznosio je 1:1 ili 3:1. Formulacije su izrađene korišćenjem dve metode (metoda direktne adsorpcije i metoda uparavanja). Uočeno je da metoda uparavanja, uz korišćenje etanola, nije pogodna zbog prelaska karbamazepina u polimorfni oblik II. Iz SSMEDDS postiže se značajno povećanje brzine rastvaranja (preko 90% za 30 minuta). Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih SSMEDDS pokazuju da se redosled brzine oslobađanja karbamazepina smanjuje redom korišćenjem sledećih nosača Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti. Značajna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina iz formulacija izrađenih sa različitim odnosima adsorpcioni nosač/SMEDDS nije uočena. **Čvrsti samo-nanoemulgujući sistemi sa karbamazepinom** (SSNEDDS) izrađen su metodom direktne adsorpcije, uz variranje odnosa SNEDDS/nosač (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320 i dijatomiti) 1:1 ili 2:1, pri čemu je udeo karbamazepina bio stalan (20%). Formulacija SSNEDDS iz koje je postignuto najbrže oslobađanje

karbamazepina sadrži jednak udeo SNEDDS-a i adsorpcionog nosača (Sylsya[®] 320), iz ove formulacije je za 30 minuta oslobođeno oko 90% karbamazepina. **Čvrsti samo-emulgujući sistem sa karbamazepinom** (SSEDSS) je formulisan primenom dizajna smeše uz variranje udela karbamazepina, SEDDS-a i Neusilin[®]-a UFL2, u sledećim odnosima: 30-50%, 10-30%, 40-60%, redom. Nakon optimizacije dobijeni su matematički modeli koji opisuju uticaj komponenti SSEDSS na brzinu oslobađanja karbamazepina. Rezultati pokazuju da je postignuto veliko slaganje između predviđenih i dobijenih vrednosti (faktori sličnosti za tri test formulacije od 77,17 do 81,78), da je formulisan sistem sa visokim udelom karbamazepina (40%), iz koga se za 30 min oslobodi preko 80% lekovite supstance.

Primenom **PAMPA testa** utvrđeno je da se iz odabrane formulacije čvrstih disperzija i samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom značajno povećava permeabilnost karbamazepina (koeficijent prividne permeabilnosti) u odnosu na čist karbamazepin. Najveće povećanje se postiže primenom SSMEDDS-a (Papp $(21,42 \pm 1,67) \times 10^{-6}$ cm/s), u odnosu na čist karbamazepin (Papp $(11,77 \pm 0,34) \times 10^{-6}$ cm/s). Primenom **komputerskog programa Simcyp[®]** pokazano je da se formulacije SSMEDDS, izrađene metodom direktne adsorpcije, sa Neusilin[®]-om UFL2, Sylsya[®]-om 320 Neusilin[®]-om FL2, mogu smatrati optimalnim zbog značajno bržeg postizanja maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi (t_{max} 2,52-3,36 h), uz očuvanje optimalnih vrednosti C_{max} i PIK, u poređenju sa referentnim preparatom, tabletama karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem kod koga je vrednost t_{max} 7,2h.

U prvom delu četvarte faze pristupilo se izradi **čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom** uz primenu metode brzog hlađenja otopljene mase. Primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna došlo se do optimalne formulacije koja sadrži 75% poloksamer 338, 10% Brij[®] 35, 15% karbamazepina, a mešavina surfaktantne smeše i Neusilin[®] UFL2 kao nosača je u odnosu 2:1. Iz ove formulacije se za 30 minuta oslobađa 95,66% karbamazepina. Međutim, pokazano je da u formulaciji čvrstih surfaktantnih sistema dolazi do prelaska karbamazepina u amorfni oblik. U nastavku su formulisane **tablete karbamazepina sa trenutnim** oslobađanjem, dobijene komprimovanjem granulata izrađenog metodom topljenja, koji u svom sastavu sadrži samo-emulgujući sistem, uz primenu frakcionog faktorskog i centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna. Dobijeni su matematički modeli koji opisuju zavisnost procenta oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta od udela Labrafil[®]-a 2130CS i Cremophor[®]-a RH40. Vrednost koeficijentata korelacije za dobijene modele je izrazito visoka i kreće se u opsegu od 0,9220 do 0,9863. Utvrđeno je i da se najveća brzina oslobađanja karbamazepina postiže pri višim udelima Labrafil[®]-a 2130CS (20%) i nižim udelima Cremophor[®]-a RH40. Optimalna formulacija tableta sadržala je 20% karbamazepina, a iz nje se za 30 minuta oslobodilo 88% karbamazepina. Primenom analitičkih tehnika je utvrđeno da je karbamazepin u tabletama prisutan u polimorfnom obliku III i da su tablete stabilne 2 meseca, čuvanjem pod ambijentalnim uslovima.

Ključne reči: *čvrsti samo-dispergujući sistemi, adsorpcioni nosači, PAMPA test, Simcyp[®], fazno ponašanje, veličina kapi, indeks polidisperziteta, eksperimentalni dizajn, polimorfni oblik karbamazepina.*

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.213:[615.015.14:004.896(043.3)]

ABSTRACT

In latest years, an increasing number of newly synthesized drugs have low solubility in water. Formulation of solid self-dispersing drug delivery systems is one of many approaches to increase the dissolution rate/solubility of these drugs.

The overall **aim** of this doctoral dissertation is formulation, making and characterization of solid self-dispersing drug delivery systems with carbamazepine, using natural and synthetic solid carriers, in order to increase the dissolution rate and permeability of carbamazepine.

In **phase I** of this research, proper selection of solid self-dispersing drug delivery systems, with different dispersity degree, for different oil/surfactant/cosurfactant (cosolvent) ratio was done. In the first part, after titration with water, pseudo-ternary phase diagrams were constructed for systems medium chain triglycerides/Polysorbate 80/Macrogol 400/water, and medium chain triglycerides/Cremophor® EL/Macrogol 400/water. **Liquid self-emulsifying system** (SEDDS) composed of medium chain triglycerides/Cremophor® EL/Macrogol 400, in a 10:66,75:22,25 ratio was selected. Furthermore, **liquid self-nanoemulsifying system** (SNEDDS) composed of medium chain triglycerides/Polysorbate 80/Transcutol® HP, in 20:60:20 ratio was also selected. Using mixture experimental design, **liquid self-nanoemulsifying system** (SNEDDS) composed of medium chain triglycerides/Polysorbate 80/Labrasol®/ Transcutol® HP, in 21,21:21,12:21,12:36,64 was selected. In this phase, a high matching between the predicted and the experimentally obtained values for droplet size and PDI was demonstrated.

In **phase II** of the research, formulation, preparation and characterization of solid dispersing drug delivery systems were conducted. In its first stage, **binary solid dispersions** of carbamazepine and solid carriers (Neusilin® UFL2, Neusilin® FL2, Sylysia® 320, diatomites) were prepared, varying the carbamazepine/carrier ratio (1:1, 1:2 and 1:6) and two formulation methods - evaporation of ethanol at room temperature, and at 70 °C. It was observed that solid dispersions made of Neusilin® UFL2, Neusilin® FL2 and Sylysia® 320, with carbamazepine/carrier ratios 1:2 and 1:6 leads to a significant increase in the dissolution rate of carbamazepine, whereas in formulations with a 1:1 carbamazepine/carrier ratio, and also in all formulations with diatomites, the dissolution rate of carbamazepine was similar to carbamazepine powder. In all formulations, carbamazepine was converted to the amorphous form or to polymorph form II. In the next stage of this phase, formulation, preparation and characterization of **solid self-microemulsifying drug delivery systems with carbamazepine** (SSMEDS) were done. The carbamazepine ratio was constant (20%), while the SMEDDS/carrier (Neusilin® UFL2, Neusilin® FL2, Sylysia® 320, diatomites) ratio was varied (1:1 and 3:1). Formulations were made using two methods (direct adsorption and evaporation with ethanol (99,5% v/v)). It was noted that the ethanol formulation method is not adequate, because of the conversion of carbamazepine into polymorph form II. A significant increase in the dissolution rate of carbamazepine from SSMEDS occurred (more than 90% in 30 minutes). The results of the dissolution test show that the dissolution rate of carbamazepine from SSMEDS formulations decreases with use of Neusilin® UFL2, Sylysia® 320, Neusilin® FL2 and diatomites, respectively. A significant difference in dissolution rate of carbamazepine from formulations with different carbamazepine/carrier ratio was not observed. **Solid self-nanoemulsifying drug delivery system with carbamazepine** (SSNEDS) was made by direct adsorption method, whereby carbamazepine ratio was constant (20%), and the SNEDDS/carrier (Neusilin® UFL2,

Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320, diatomites) ratio was varied (1:1 and 2:1). The SNEEDS formulation that showed the highest release rate of carbamazepine was the one containing an equal amount of SNEDDS and adsorbent carrier Sylysia[®] 320 (about 90% in 30 minutes). **The solid self-emulsifying drug delivery system with carbamazepine (SSEDDS)** was formulated using mixture experimental design, varying carbamazepine, SEDDS and Neusilin[®] UFL2 ratios (30-50 %, 10-30%, 40-60%, respectively). Mathematical models that describe the influence of SSEDS on dissolution rate of carbamazepine were obtained after optimization. Results show that a high matching was attained between the predicted and experimentally obtained values (similarity factors for three test formulations 77,17-81,78) and that a system with a high carbamazepine ratio (40%), that releases over 80% of carbamazepine in 30 minutes, was formulated.

Using the **PAMPA test**, it was shown that the permeability of carbamazepine (apparent permeability coefficient) from the selected solid dispersion formulations, as well as selected self-dispersing drug delivery systems with carbamazepine is significantly increased, compared to pure carbamazepine. The greatest increase was achieved using SSMEDDS (Papp $(21,42 \pm 1,67) \times 10^{-6}$ cm/s), compared to pure carbamazepine (Papp $(11,77 \pm 0,34) \times 10^{-6}$ cm/s). **Simcyp[®]** computer software has shown that SSMEDS formulations, made by direct adsorption method, with Neusilin[®] UFL2, Sylysia[®] 320, Neusilin[®] FL2 can be considered optimal, due to faster achievement of maximal concentration of carbamazepine in plasma (t_{\max} 2,52-3,36 h), while preserving optimal values of C_{\max} i PIK, compared to reference formulation, immediate-release carbamazepine tablets with a 7,2h t_{\max} value.

In the first part of phase IV **solid surfactant systems with carbamazepine** were made using the fast cooling of melted mass method. Using fraction experimental design, the optimal formulation was determined, containing 75% Poloksamer 338, 10% Brij[®] 35, 15% carbamazepine, and surfactant mixture/Neusilin[®] UFL2 in 2:1 ratio. This formulation, after 30 minutes of dissolution test releases 95,66% of carbamazepine. However, it was shown that in formulations of surfactant systems carbamazepine is converted to amorphous form. Further, **immediate-release tablets with carbamazepine** were formulated, by compression of the granulate, earlier obtained by hot-melt granulation method, containing a self-emulsifying system, by use of fraction experimental design and central composite design. Mathematical models that describe the dependence of the amount of released carbamazepine after 10, 20, 30, 45, 60 and 120 minutes, from Labrafil[®] 2130CS and Cremophor[®] RH40 ratio were obtained. The value of correlation coefficients for the obtained models is extremely high, ranging between 0,9220 and 0,9863. It was concluded that the highest dissolution rate of carbamazepine was achieved with higher ratios of Labrafil[®] 2130CS, and lower ratios of Cremophor[®] RH40. The optimal tablet formulation contained 20% of carbamazepine and released 88% of the drug after 30 minutes of the dissolution test. Using analytic techniques, it was determined that carbamazepine in tablets was in polymorph form III and that these tablets are stable for 2 months, under ambient conditions.

Key words: *solid self-dispersing drug delivery systems, adsorbent carriers, PAMPA test, Simcyp[®], phase behavior, droplet size, polydispersity index, experimental design, polymorph form of carbamazepine.*

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.213:[615.015.14:004.896(043.3)]

Lista skraćenica

ACAT	Advanced Compartmental Absorption and Transit model
ADAM	Advanced Dissolution Absorption and Metabolism
ADME	Absorption Distribution Metabolism Excretion
BHA	Butilhidroksianizol
BHT	Butilhidroksitoluen
BLM	Black lipid membrane
BSK	Biofarmaceutski Sistem Klasifikacije
BCS	Biopharmaceutics Classification System
CYP	Citohrom P
DAMPA	Double Artificial Membrane Permeability Assay
DG	Digliceridi
DSC	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
DTS	Dispersion Technology Software
EDTA	Etilendiamintetrasirćetne kiseline
EMA	European Medicines Agency
<i>eng.</i>	engleski
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom
GIT	Gastrointestinalni trakt
GRAS	Generally Recommended as Safe
HLB	Hidrofilno-lipofilni balans
HPLC	Visokoeffikasna tečna hromatografija
HPMC	Hidroksipropilmetilceluloza
HSM	Mikroskopija na vrućoj ploči
KMK	Kritična micelarna koncentracija
LOD	Limit detekcije
LOQ	Limit kvantifikacije
MCC	Mikrokristalna celuloza
MDCK	Mardin-Darby Canine Kidney
MG	Monogliceridi
MK	Masna kiselina
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PdI	Indeks polidisperziteta

PEG	Polietilenglikol
Ph. Eur	European Pharmacopoeia
PIK	Površine ispod krive
PVDF	Hidrofilni poliviniliden difluorida
PXRD	Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu
SAD	Sjedinjene Američke države
Sar.	Saradnici
SEDDS	Self-Emulsifying Drug Delivery System
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SMEDDS	Self-Microemulsifying Drug Delivery System
SNEDDS	Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System
SSEDDS	Solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems
SSMEDDS	Solid Self-Microemulsifying Drug Delivery System
SSNEDDS	Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System
TEM	Transmisiona elektronska mikroskopija
TG	Trigliceridi
TGA	Termogravimetrijska analiza
TPGS	D- α -tokoferol polietilen glikol 1000 sukcinat
U/V	Ulje-u-vodi
UK	United Kingdom
USP-NF	United States Pharmacopoeia-National Formulary
UV/VIS	Ultra violet/visible
V/U	Voda-u-ulju

Sadržaj

UVOD	1
1. UVOD	2
OPŠTI DEO	4
2. LIPIDNE FORMULACIJE/NOSAČI ZA PERORALNU PRIMENU LEKOVITE SUPSTANCE	5
2.1. Klasifikacija lipidnih formulacija/nosača	5
2.2. Aktivne i pomoćne supstance koje ulaze u sastav lipidnih formulacija	10
2.3. Ponašanje lipidnih formulacija/nosača lekovite supstance u organizmu	19
2.4. Studije faznog ponašanja	23
3. ČVRSTI SAMO-DISPERGUJUCI SISTEMI	27
3.1. Postupci za prevođenje tečnih samo-emulgujućih sistema u čvrste samo-emulgujuće sisteme	28
4. ADSORPCIONI NOSACI	32
5. PROCENA PERMEABILNOSTI LEKOVITE SUPSTANCE KROZ MEMBRANU GASTROINTESTINALNOG TRAKTA	39
5.1. In vitro testovi za procenu permeabilnosti	42
5.1.1. Primena Caco-2 ćelije u proceni permeabilnosti lekovite supstance	43
5.1.2. Primena PAMPA testa u proceni permeabilnosti lekovite supstance	44
5.1.3. Primena DAMPA testa u proceni permeabilnosti lekovite supstance	47
5.2. In silico metode da procenu permeabilnosti lekovite supstance	49
5.2.1. Simcyp® kompjuterski program	49
6. FIZIČKOHEMIJSKE OSOBINE, STABILNOST, DELOVANJE I UPOTREBA KARBAMAZEPINA	52

7. CILJEVI ISTRAZIVANJA	56
EKSPERIMENTALNI DEO	58
8. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA TEČNIH SAMO-DISPERGUJUĆIH NOSAČA LEKOVITE SUPSTANCE (FAZA 1.)	59
8.1. Odabir tečnog samo-mikroemulgujućeg nosača za kombinacije trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor® EL /Makrogol 400 (Faza 1.1.)	62
8.1.1. Metode	62
8.1.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor® EL/Makrogol 400	62
8.1.1.2. Određivanje veličine kapi i polidisperziteta emulzija primenom fotonske korelacione spektroskopije	63
8.1.2. Rezultati i diskusija	64
8.1.2.1. Fazno ponašanje pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor® EL/Makrogol 400	64
8.1.2.2. Uticaj odnosa lipid/surfaktantna faza na veličinu kapi i indeks polidisperziteta emulzija	68
8.2. Odabir tečnog samo-emulgujućeg nosača za kombinaciju trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/ Transcutol® HP (Faza 1.2.)	73
8.2.1. Metode	73
8.2.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol® HP i određivanje veličine kapi i indeksa polidisperziteta	73
8.2.2. Rezultati i diskusija	74
8.2.2.1. Fazno ponašanje pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/ Transcutol® HP	74
8.2.2.2. Veličina kapi i indeks polidisperznosti odabranih formulacija	76
8.3. Odabir tečnog samo-nanoemulgujućeg nosača primenom dizajna smeše za kombinacije trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol®/ Transcutol® HP (Faza 1.3.)	78
8.3.1. Metode	78
8.3.1.1. Formulacija tečnog samo-nanoemulgujućeg sistema	78
8.3.1.2. Modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom dizajna smeše	79
8.3.2. Rezultati i diskusija	81
8.3.2.1. Modelovanje uticaja komponenti tečnog samo-nanoemulgujućeg sistema na veličinu kapi i indeks polidisperznosti	81
8.3.2.2. Optimizacija formulacije samo-nanoemulgujućeg sistema	86

9. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTIH SAMO-DISPERGUJUĆIH SISTEMA SA KARBAMAZEPINOM IZRAĐENIH METODOM DIREKTNE ADSORPCIJE I METODOM UPARAVANJA (FAZA 2)	89
9.1. Formulacija i karakterizacija binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i adsorpcionih nosača (Faza 2.1.)	91
9.1.1. Materijal i metode	91
9.1.1.1. Izrada čvrstih disperzija	91
9.1.1.2. Karakterizacija čvrstih disperzija sa karbamazepinom	93
9.1.2. Rezultati i diskusija	94
9.1.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija	94
9.1.2.2. Karakterizacija čvrstih disperzija	103
9.2. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom (Faza 2.2.)	108
9.2.1. Materijal i metode	108
9.2.1.1. Izrada čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom	108
9.2.1.2. Karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom	109
9.2.2. Rezultati i diskusija	111
9.2.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema	111
9.2.2.2. Karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih terpijskih sistema sa karbamazepinom	120
9.3. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom (Faza 2.3.)	132
9.3.1. Materijal i metode	132
9.3.1.1. Izrada čvrstih samo-nanoemulgujućih terpijskih sistema sa karbamazepinom	132
9.3.1.2. Karakterizacija izrađenih čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom	133
9.3.2. Rezultati i diskusija	133
9.3.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz SSNEDDS	133
9.3.2.2. Karakterizacija čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom	136
9.4. Formulacija čvrstih samo-emulgujućih sistema uz korišćenje eksperimentalnog dizajna i njihova karakterizacija (Faza 2.4.)	144
9.4.1. Materijal i metode	144
9.4.1.1. Eksperimentalni plan dobijen korišćenjem dizajna smeše	144
9.4.1.2. Karakterizacija čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom	147
9.4.2. Rezultati i diskusija	148
9.4.2.1. Optimizacija formulacija čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom	148
9.4.2.2. Karakterizacija odabranih optimalnih formulacija čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom	161

10. PROCENA PERMEABILNOSTI KARBAMAZEPINA IZ ČVRSTIH SAMO-DISPERGUJUĆIH SISTEMA PRIMENOM <i>IN VITRO</i> I <i>IN SILICO</i> METODA (FAZA 3.)	163
10.1. Procena permeabilnosti karbamazepina iz čvrstih samo-dispergujućih sistema primenom PAMPA testa (Faza 3.1.)	164
10.1.1. Materijal i metode	165
10.1.1.1. PAMPA test	165
10.1.2. Rezultati i diskusija	166
10.2. Procena permeabilnosti primenom <i>in silico</i> metoda uz korišćenje kompjuterskog programa Simcyp® Population-Based Simulator (version 13.2; Certara™, SAD) (Faza 3.2.)	171
10.2.1. Gastrointestinalna simulacija	171
10.2.2. Rezultati i diskusija	174
10.2.2.1. Razvoj karbamazepin specifičnog PBPK modela	174
10.2.2.2. <i>In silico</i> simulacije resorpcije karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema	174
11. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTIH SAMO-DISPERGUJUĆIH SISTEMA SA KARBAMAZEPINOM IZRAĐENIH METODOM BRZOG HLAĐENJA OTOPLJENOG MATERIJALA I GRANULACIJOM TOPLJENJEM (FAZA 4.)	179
11.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom (Faza 4.1.)	181
11.1.1. Materijal i metode	181
11.1.1.1. Izrada čvrstih surfaktantnih sistema	181
11.1.1.2. Karakterizacija izrađenih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom	184
11.1.2. Rezultati i diskusija	185
11.1.2.1. Procena uticaja faktora formulacije na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema	185
11.1.2.2. Karakterizacija optimalne formulacije čvrstog surfaktantnog sistema sa karbamazepinom	194
11.2. Formulacija i karakterizacija tableta karbamazepina dobijenih komprimovanjem čvrstog samo-dispergujućeg sistema izrađenog postupkom granulacije topljenjem (Faza 4.2.)	200
11.2.1. Materijal i metode	200
11.2.1.1. Formulacija tableta karbamazepina primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna	200
11.2.1.2. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna	203
11.2.2. Rezultati i diskusija	206

11.2.2.1. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna	206
11.2.2.2. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna	211
12. ZAKLJUČAK	221
13. LITERATURA	230
14. BIOGRAFIJA AUTORA	250
15. PRILOG	251
Prilog A: Validacija HPLC metode za određivanje karbamazepina u PAMPA testu	251
Prilog B: Publikovani i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije	253
Prilog C: Izjava o autorstvu	255
Prilog D: Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	256
Prilog E: Izjava o korišćenju	257

UVOD

1. Uvod

Većina lekova dostupnih danas na svetskom tržištu se primenjuje peroralno. Efikasnost ovih lekova zavisi od njihove biorasploživosti, koja je uslovljena različitim faktorima, a najvažniji su rastvorljivost lekovite supstance u vodenoj sredini i permeabilnost kroz lipofilne membrane.

Oko 70 – 80% postojećih i oko 40% novosintetisanih lekovitih supstanci ima lipofilni karakter i pokazuje nisku rastvorljivost u vodi, a peroralno primenjeni lekovi mogu se u potpunosti resorbovati samo ako se dobro rastvaraju u tečnosti gastrointestinalnog trakta (GIT) (Lipinski, 2002; Palmer, 2003; Bandopadhyay i sar., 2009). Na osnovu faktora rastvorljivosti u vodi i permeabilnosti lekovitih supstanci kroz biološke membrane profesor Amidon i saradnici su 1995. godine uveli Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova (BSK, *eng.* Biopharmaceutics Classification System (BCS)). Po ovom sistemu, sve supstance su svrstane u četiri grupe u zavisnosti od njihove rastvorljivosti u vodi i permeabilnosti kroz biološke membrane (Tabela 1.1.) (Amidon i sar., 1995).

Tabela 1.1. Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova (Amidon i sar., 1995)

Klasa I (visoko rastvorljive, visoko permeabilne)	Klasa II (nisko rastvorljive, visoko permeabilne)
Klasa III (visoko rastvorljive, nisko permeabilne)	Klasa IV (nisko rastvorljive, nisko permeabilne)

Prema kriterijumu BSK, nisko rastvorljivim lekovitim supstancama se smatraju supstance koje će se u količini jednakoj maksimalnoj terapijskoj dozi rastvoriti u 250 ml (čahi), ili manje vodenog medijuma, čija je pH vrednost od 1,0 do 7,5, na temperaturi od $37\pm 0,5$ °C. U suprotnom, supstanca se smatra slabo rastvorljivom. Pod permeabilnošću se, u smislu BSK lekova, podrazumeva efektivna permeabilnost kroz membranu humanog jejunuma. Supstanca se smatra visoko permeabilnom ukoliko se resorbuje više od 90% primenjene količine lekovite supstance i ukoliko nema dokumentovanih podataka o nestabilnosti supstance u gastrointestinalnom traktu. Ako se resorbuje u manjem procentu, kaže se da je nisko permeabilna (Amidon i sar., 1995).

Veliki broj novijih lekovitih supstanci danas spada u II grupu po Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, što jeste jedan od osnovnih problema za njihovo pojavljivanje na tržištu, uprkos tome što poseduju odličnu terapijsku aktivnost. Zbog esencijalnog uticaja rastvorljivosti lekovite supstance na bioraspoloživost, razvijene su brojne strategije za poboljšanje rastvorljivosti, kao što su (Leuner i Dressman, 2000; Mohanachandran i sar., 2010):

- formulisanje farmaceutskih oblika sa prolekom;
- promena pH;
- izrada soli;
- formulisanje eutektičkih smeša;
- primena korastvarača;
- hidrotropija;
- prevođenje lekovite supstance u amorfnu stanje;
- smanjenje veličine čestica;
- primena nanotehnologija;
- kompleksacija sa ciklodekstrinima;
- formulisanje čvrstih disperzija;
- formulisanje lipidnih formulacija.

OPŠTI DEO

2. Lipidne formulacije/nosači za peroralnu primenu lekovite supstance

Primena lipidnih formulacija u cilju poboljšanja gastrointestinalne resorpcije slabo rastvorljivih lekovitih supstanci je dobro dokumentovana u literaturi. Primećeno je da peroralna primena teško rastvorljivih lekovitih supstanci sa masnom hranom povećava njihovu resorpciju, samim tim i biološku raspoloživost (Gursoy i Benita, 2004; Humberstone i Charman, 1997).

Samo-dispergujući nosači lekovitih supstanci, kao jedna vrsta lipidnih formulacija predstavljaju homogene, izotropne smeše ekscipijenasa tipa lipida i/ili surfaktanata i hidrofilnih korastvarača. Lekovita supstanca može biti rastvorena ili suspendovana u formulaciji. Prilikom razblaživanja, u vodenom medijumu, ove formulacije se transformišu u nosače tipa micela, emulzija ili mikroemulzija sa solubilizovanom aktivnom supstancom u nosaču. Lekovi na bazi samo-dispergujućih nosača su prisutni na tržištu više od 2 decenije i čine oko 2-4% registrovanih lekova na tržištu Velike Britanije, Sjedinjenih Američkih država (SAD) i Japana. Farmaceutski oblici ovih lekova su oralni rastvori, meke ili tvrde kapsule, pri čemu tvrde kapsule mogu biti izrađene od želatine ili hidroksipropilmetilceluloze (HPMC). Pojedinačna doza lekovite supstance u kapsulama iznosi od 0,25 µg do 500 mg, a u oralnim rastvorima od 1 µg/ml do 100 mg/ml. Dnevna doza lekovite supstance koja se može primeniti u navedenim oblicima iznosi od 0,25 µg do 2000 mg (Haus, 2007).

2.1. Klasifikacija lipidnih formulacija/nosača

Pouton je 2000. godine uveo sistem klasifikacije ovog tipa nosača koji su originalno označeni kao „lipidne formulacije“ (*eng.* Lipid Formulation Classification System, LFCS). Prema ovom sistemu klasifikacije lipidne formulacije mogu se podeliti na četiri osnovna tipa. Klasifikacija je zasnovana na vrsti i udelu korišćenih pomoćnih supstanci i morfologiji lipidnih agregata, koji se formiraju prilikom razblaživanja u vodenom medijumu (Pouton, 2000). Klasifikacija je dopunjena 2006. godine, kada je Pouton podelio samo-dispergujuće nosače tipa III na tip IIIA i tip IIIB, na osnovu odnosa između lipofilnih i hidrofilnih komponenti i tipa koloidnog nosača koji se formira

(Pouton, 2006). U tabeli 2.1. je prikazan sastav, osnovne karakteristike i prednosti i nedostaci pojedinačnih tipova samo-dispergujućih nosača. Ovaj klasifikacioni sistem olakšava izbor najprikladnije formulacije za određenu lekovitu supstancu, u skladu sa njenim fizičko-hemijskim karakteristikama i omogućava lakše tumačenje *in vivo* studija (Pouton, 2000; Pouton, 2006; Song, 2011).

Samo-dispergujući nosači tipa I su jednostavni i u svom sastavu sadrže samo uljanu fazu, ali je osnovni nedostatak ovog tipa nosača što imaju mali kapacitet za rastvaranje lekovite supstance. Pogodne lekovite supstance za inkorporiranje u ovaj tip nosača jesu izrazito lipofilne aktivne supstance, sa koeficijentom lipidno-vodene raspodele (logP) većim od 4 i one koje imaju zadovoljavajuću rastvorljivost u upotrebljenom uljanom vehikulumu. Nosač se uobičajeno sastoji od dugolančanih ili srednjelančanih triglicerida, samostalno ili u smeši sa parcijalnim gliceridima (Tabela 2.1.). Od proizvoda parcijalne lipolize triglicerida u GIT-u (slobodne masne kiseline i monogliceridi), koji imaju površinsku aktivnost, endogenih fosfolipida, proteina i polisaharida iz hrane i sastojaka žuči formiraju se mešane micide u kojima je solubilizovana lekovita supstanca. Ovaj tip lipidnih formulacija nije pogodan za lekovite supstance koje nisu izrazito lipofilnog karaktera, podložne su oksidaciji, a resorpcija lekovitih supstanci je uslovljena varenjem lipida u GIT-u. Primeri registrovanih preparata sa samo-dispergujućim nosačima tip I su: Fortovase[®], meke kapsule (Hoffman-La Roche) (rastvor sakvinavira u srednje-lančanim mono- i digliceridima); Depakene[®], meke kapsule (Abbott) (rastvor valproinske kiseline u kukuruznom ulju), Marinol[®], meke kapsule (Roxane and Unimed) (rastvor dronabinola u susamovom ulju); Prometrium[®], meke kapsule (Solay) (rastvor progesterona u kikirikijevom ulju); Roaccutane[®], meke kapsule (Hoffman-La Roche) (rastvor izotretinoina u smeši hidrogenizovanog sojinog ulja, hidrogenizovanog biljnog ulja, sojinog ulja, pčelinjeg voska, uz dodatak butilhidroksianizola (BHA) i etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA)); Avodart[®], meke kapsule (Catalent France Beenheim s.a.) (rastvor dutasterida u kaprilno-kaprinskim mono- i digliceridima, uz dodatak BHT); Rocaltrol[®], meke kapsule (Hoffman-La Roche) (rastvor kalcitriola u srednjelančanim trigliceridima kokosovog ulja); Rocaltrol[®], oralni rastvor (Hoffman-La Roche) (rastvor kalcitriola u srednjelančanim trigliceridima palminog ulja); Vesanoid[®], meke kapsule (Hoffman-La Roche) (rastvor tretinoina u smeši hidrogenizovanog

sojinog ulja, sojinog ulja, pčelinjeg voska, uz dodatak BHA i EDTA) (Pouton, 2006; Song, 2011; Elektronska baza podataka *i*).

Tabela 2.1. Sistem klasifikacije lipidnih formulacija (Pouton, 2000; Pouton, 2006; Song, 2011)

Sastav	Tip I	Tip II	Tip III		Tip IV
	Ulja	SEDDS	IIIA (SNEDDS)	IIIB (SMEDDS)	
Gliceridi (TG, DG, MG)	100%	40-80%	40-80%	<20%	-
Surfaktanti (HLB<12) (HLB>12)	- -	20-60% -	- 20-40%	- 20-50%	0-20% 20-80%
Hidrofilni korastvarači	-	-	0-40%	20-50%	0-80%
Veličina kapi	Gruba disperzija	250-2000 nm	100-250 nm	<100 nm	<50 nm
Uticaj vodenog medijuma	Ograničen uticaj	Ne utiče na solubilizacioni kapacitet	Smanjenje solubilizacionog kapaciteta	Moguća destabilizacija sistema i precipitacija lekovite supstance	Moguća destabilizacija sistema i precipitacija lekovite supstance
Značaj procesa varenja lipida	Neophodan	Odigrava se, ali nema presudnu ulogu na dispergovanje	Nije od ključnog značaja	Nema značaja	Nema značaja
Prednosti	GRAS status, jednostavna formulacija, visoka kompatibilnost sa kapsulama	Mala verovatnoća gubitka solubilizacionog kapaciteta prilikom dispergovanja	Bistra ili skoro bista disperzija, resorpcija aktivne supstance bez varenja		Formulacija poseduje dobru sposobnost rastvaranja velikog broja aktivnih supstanci
Nedostaci	Formulacija ima loš kapacitet za rastvaranje osim ako je supstanca izuzetno lipofilna	Zamućena U/V disperzija (veličina kapi 0,25-2µm)	Moguć gubitak solubilizacionog kapaciteta prilikom dispergovanja, teže za varenje		Verovatan gubitak kapaciteta rastvarača prilikom dispergovanja, može biti nesvarljiva

TG- trigliceridi, DG- digliceridi, MG- monogliceridi, HLB- hidrofilno-lipofilna ravnoteža

Samo-dispergujući nosači tipa II (*eng.* Self-Emulsifying Drug Delivery System, SEDDS) se sastoje od lako disperzibilne smeše ulja, surfaktanta i aktivne supstance, koja prilikom razblaženja u GIT-u spontano formira finu ulje-u-vodi (U/V) emulziju. Prisustvo površinski aktivnih supstanci i korastvarača obezbeđuje značajno veću rastvorljivost lekovitih supstanci, sa vrednošću $\log P$ između 2 i 4 (tj., imaju slabu rastvorljivost u vodi i lipidima). SEDDS sistemi su u vidu zamućene disperzije, sa veličinom kapi većom od 250 nm. Samo-dispergujući nosači tipa IIIA (*eng.* Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System, SNEDDS) spontano formiraju U/V nanoemulziju (veličina kapi: 100 - 250 nm). Samo-dispergujući nosači tipa IIIB (*eng.* Self-Microemulsifying Drug Delivery System, SMEDDS) spontano formiraju U/V mikroemulziju (veličina kapi: 10 - 100 nm). Prilikom razblaživanja, SMEDDS formiraju male kapljice (mikroemulzije), pa je disperzija transparentna, tečna, optički izotropna i termodinamički stabilna. Ključna razlika između mikroemulzija i nano- i (makro)emulzija je njihova različita fizička stabilnost. Mikroemulzije su termodinamički stabilni sistemi dok nanoemulzije i emulzije predstavljaju kinetički stabilizovane disperzije. Takođe, mikroemulzije su po svom izgledu transparentni sistemi, dok su nanoemulzije i (makro)emulzije opalescentne ili mlečno bele boje. Za nastajanje mikroemulzija nije neophodan utrošak energije (rad) i jednom formirana mikroemulzija je neograničeno stabilna. Za dobijanje emulzija potreban je rad i ovi sistemi se odlikuju kinetički kontrolisanom nestabilnošću. Uvođenjem surfaktanata i korastvarača, pored ulja, poboljšava se kapacitet za rastvaranje lekovite supstance i disperzibilnost formulacije prilikom razblaživanja u vodenoj sredini gastrointestinalnog trakta. Pri razblaženju sa vodom, aktivna supstanca se nalazi u kapljicama uljane faze i/ili surfaktanta, koji obrazuje međupovršinski film na granici između vodene i uljane faze. Kao rezultat velike površine međupovršinskog filma kod mikroemulzija, dolazi do povećanja brzine rastvaranja aktivne supstance, čime se omogućava održavanje slabo rastvorljivih supstanci u rastvorenom obliku (Song, 2011). Primeri lekova sa samo-dispergujućim nosačima tip II i III koji su prisutni na tržištu su: Sandimmune[®], oralni rastvor i meke kapsule (Novartis) (ciklosporin A, SEDDS (kukuruzno ulje/maslinovo ulje, Labrafil[®] M 1944 CS, etanol, d- α -tokoferol)), Neoral[®], oralni rastvor i meke kapsule (Novartis) (ciklosporin A, SMEDDS (mono-, di- i trigliceridi kukuruznog ulja, Cremophor[®] RH40, propilenglikol, etanol, d- α -tokoferol)), Norvir[®], meke kapsule

(Aesica Queenborough) (ritonavir, SEDDS (oleinska kiselina, Cremophor[®] EL, etanol, BHT)), Kaletra[®], meke kapsule (Abbott) (lopinavir + ritonavir, SEDDS (oleinska kiselina, Cremophor[®] EL, propilenglikol)), Rapamune[®], oralni rastvor (Wyeth-Ayerst) (sirolimus, SMEDDS (Phosal[®] 50, mono- i digliceridi, masne kiseline iz sojinog ulja, Polisorbat 80, etanol, propilenglikol, askorbil-palmitat)). Nedostaci samo-dispergujućih nosača tip II i III su: mogućnost precipitacije lekovite supstance u GIT-u, mogućnost za nastanak neželjenih dejstava zbog visoke koncentracije surfaktanata u ovim formulacijama, kao i to da je razvoj ovakvih nosača izuzetno kompleksan (Pouton, 2006; Strickley, 2007; Song, 2011; Elektronska baza podataka *i*).

Samo-dispergujući nosači tipa IV su izrađeni od surfaktanata ili smeše surfaktanata i korastvarača, u kojima je lekovita supstanca rastvorena/solubilizovana. Prilikom razblaženja, u vodenom medijumu formira se micelarni rastvor što dovodi do brzog oslobađanja i povećanja brzine resorpcije lekovite supstance (Song, 2011). Kod ovog tipa formulacije postoji visok rizik za precipitaciju lekovite supstance tokom prolaska kroz GIT. S druge strane, izuzetno visoka koncentracija surfaktanata može dovesti do iritacije sluzokože i loše gastrointestinalne podnošljivosti. Primeri lekova sa samo-dispergujućim nosačima tip IV su: Targretin[®], meke kapsule (Ligand) (beksaroten sa polisorbatom 20, makrogolom 400, povidonom i BHA), Lipirex[®], meke kapsule (Sanofi-Aventis) (fenofibrata sa Gelucire[®]-om 44/14, makrogolom 20 000, makrogolom 800) i Cicloral[®], meke kapsule (Salutas Pharma) (ciklosporina A sa Cremophor[®]-om RH 40, makrogolom 400, tokofersolanom, etanolom) Gengraf[®], tvrde kapsule (Abbott) (ciklosporin A sa Cremophor[®]-om EL, etanolom, propilenglikolom, polisorbatom 80, polietilenglikolom, sorbitan monooleatom) (Pouton, 2006; Strickley, 2007; Song, 2011; Elektronska baza podataka *i*).

2.2. Aktivne i pomoćne supstance koje ulaze u sastav lipidnih formulacija

Prilikom izrade lipidnih formulacija veoma je bitno prvo razmotriti karakteristike same aktivne supstance, a nakon toga odabrati odgovarajući tip lipidnih formulacija i odabrati odgovarajuće pomoćne supstance. Intenzivan napredak farmaceutskih nauka i tehnologije omogućio je razvoj velikog broja pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav samo-dispergujućih nosača lekovitih supstanci, ali je njihov izbor i dalje vrlo složen. Postoji veliki broj ulja, surfaktanata i kosurfaktanata, različitih osobina, koji utiču na svojstva ovih sistema i njihovom izboru treba posvetiti veliku pažnju. Prilikom izbora pomoćnih supstanci treba uzeti u obzir potencijal za iritaciju, bezbednost pri peroralnoj primeni, disperzibilnost, svarljivost, stabilnost i kapacitet za rastvaranje/solubilizaciju lekovite supstance, kao i njihovu cenu (Yadav i sar., 2011). Mada se u formulacijama koriste pomoćne supstance koje su odobrene za farmaceutsku primenu, za većinu ne postoje podaci o posledicama hroničnog unosa u organizam, u relativno velikim količinama. Generalno, primena surfaktanata, kosurfaktanta i korastvarača povećava rizik od alergijskih reakcija, iritacije GIT-a ili toksičnih efekata. Zbog toga je imperativ pri izboru pomoćnih supstanci fiziološka prihvatljivost surfaktanata i kosurfaktanata i smanjenje njihovih koncentracija u formulaciji. U SAD, Američka agencija za hranu i lekove (*eng.* Food and Drug Administration (FDA)) je objavila listu supstanci koje su generalno prepoznate kao bezbedne (imaju GRAS status (*eng.* Generally Recognized As Safe)). FDA je takođe izdala „*Inactive Ingredient Guide*“. Ovaj vodič je koristan jer pruža podatke o dozvoljenim pomoćnim supstancama i njihovim maksimalnim količinama/koncentracijama u sastavu formulacija. Tokom izbora pomoćnih supstanci treba voditi računa i o kompatibilnosti sa lekovitom supstancom i njenom biofarmaceutskom klasifikacijom. Prilikom formulacije lipidnih nosača od primarnog značaja je sposobnost dispergovanja samo-dispergujućeg nosača i solubilizacija lekovite supstance, kao i maksimalno povećanje rastvorljivosti lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu (Haus, 2007; O'Driscoll i sr., 2008).

Lekovita supstanca

Samo-dispergujući nosači mogu da predstavljaju potencijalno rešenje za poboljšanje bioraspodivnosti lekovitih supstanci, posebno onih koji pripadaju II i IV klasi prema BSK. Kandidati za samo-dispergujuće nosače su lekovite supstance kod kojih je ograničenje resorpcije posledica loše rastvorljivosti i male brzine rastvaranja, gde permeabilnost nije ograničavajući faktor (npr. BSK klasa II) i gde pristupi razvoju formulacija kao što su, na primer, smanjivanje veličine čestica, formiranje soli, dodavanje tenzida, nisu dali rezultate u poboljšavanju rastvorljivosti, a time i resorpcije lekovite supstance. Osnovni kriterijum pri odabiru komponenti lipidnih formulacija su lipofilnost lekovite supstance i rastvorljivost u odgovarajućim lipidnim ekscipijensima, kojih treba da bude u dovoljnoj količini da obezbede da se celokupna doza lekovite supstance primeni u jednoj jedinici doziranja. Da bi se predvidelo da li će lekovita supstanca ispoljiti odgovarajuću resorpciju i permeabilnost, „Lipinskijevo pravilo petice“ je naširoko korišćen model. Pravilo petice objašnjava da loša resorpcija i permeabilnost lekovite supstance postoje u situaciji kada je broj donora vodoničnih veza veći od 5, broj akceptora vodoničnih veza veći od 10, molekulska masa veća od 500 i logP veći od 5. Oba, BSK i „Lipinskijevo pravilo petice“ su korišćeni uglavnom u ranim fazama preformulacionog odabira komponenti samo-dispergujućih nosača, ali oni imaju i ograničenja. Smatra se da se „Lipinskijevo pravilo petice“ primenjuje samo za jedinjenja koja nisu supstrati za aktivne transportere na nivou enterocita. Međutim, istraživanja poslednjih godina ukazuju da je većina lekovitih supstanci supstrat za aktivne transportere (efluks i inluks transportere), što značajno može ograničiti primenu ovog pravila (Kohli i sar., 2010). Takođe, značajno je istaći da sama lekovita supstanca može uticati na proces samo-dispergovanja i to prilikom formulacije treba uzeti u obzir. Upotreba samo-dispergujućih sistema je opravdana i kod lekovitih supstanci kod kojih je uočen jak pozitivni uticaj hrane, tj. povećanje resorpcije kada se lekovita supstanca primenjuje uz masni obrok, za razliku od primene na prazan stomak. To ukazuje na potencijalnu korist odgovarajućih nosača u čiji sastav ulaze lipidi za smanjenje uticaja hrane na resorpciju aktivnih supstanci.

Ulja

Ulja predstavljaju najznačajnije pomoćne supstance, koje omogućavaju rastvaranje velike količine lipofilnih lekovitih supstanci. Zaslužna su i za povećanje transporta lipofilnih lekovitih supstanci putem limfotoka. Egzogeni lipidi produžavaju vreme pražnjenja želuca, a time i prisustvo lekovite supstance u tankom crevu, koje za veliki broj lekovitih supstanci predstavlja glavno mesto za resorpciju. Takođe, lipidni ekscipijensi indukuju sekreciju žuči i pankreasnog soka, i pospešuju formiranje mešanih micela od žučnih soli, fosfolipida i holesterola, tako da se povećava ukupan solubilizacioni kapacitet GIT-a za teško rastvorljive lekovite supstance (Patel i sar., 2010; Porter i sar., 2008; Yanez i sar., 2011).

Biljna ulja, pre svega zbog svoje bezbednosti, predstavljaju jednu od poželjnih komponenti samo-dispergujućih nosača lekovitih supstanci, ali je njihova upotreba ograničena, pre svega zbog slabe rastvorljivosti lipofilnih lekovitih supstanci i loših samo-dispergujućih osobina. Molekulska struktura ulja utiče na sposobnost emulgovanja (Shah, 2011). Poslednji godina se smatra da treba ograničiti upotrebu nezasićenih lipida, koji podležu oksidaciji, jer dovode do stvaranja peroksida, koji mogu prouzrokovati oštećenje omotača kapsule i nepovoljno uticati na oslobađanje lekovite supstance. Biljna ulja se sastoje od mešavine triglicerida različite dužine lanaca masnih kiselina i stepena nezasićenosti. Trigliceridi se mogu podeliti na kratkolančane (manje od 5 ugljenikovih atoma), srednjelančane (6-12 ugljenikovih atoma) i dugolančane (više od 12 ugljenikovih atoma) trigliceride. Srednjelančani i dugolančani trigliceridi, različitog stepena zasićenja, koriste za rastvaranje liposolubilnih lekovitih supstanci pri formulaciji samo-dispergujućih nosača. Tačka topljenja određenih ulja povećava se srazmerno sa povećanjem dužine lanca masnih kiselina, a smanjuje sa povećanjem stepena nezasićenja što povećava relativnu podložnost oksidaciji. Generalno, biljna ulja su bogata nezasićenim dugolančanim trigliceridima, sa izuzetkom kokosovog i palminog ulja, koja su bogata zasićenim srednjelančanim trigliceridima. Srednjelančani trigliceridi su poželjniji zbog većeg kapaciteta za rastvaranje lekovite supstance i otpornosti prema oksidaciji. Osim toga, brže se vare, usled čega je i resorpcija leka brža, u odnosu na resorpciju iz formulacija sa dugolančanim trigliceridima. S druge strane, produkti varenja dugolančanih triglicerida povećavaju transport lekovite supstance

limfotokom u većem obimu od triglicerida srednje dužine lanca (Williams i sar., 2012; Kalepu i sar., 2013). Dugolančani trigliceridi se dobijaju iz biljnih izvora kao što su sojino, šafranovo, maslinovo, kikirikijevo, suncokretovo i susamovo ulje, dok se trigliceridi srednje dužine lanca dobijaju esterifikacijom frakcionisanih masnih kiselina iz kokosovog ulja.

Radi prevazilaženja nedostataka biljnih ulja sve češće se koriste hidrogenizovana biljna ulja, koja se dobijaju hidrogenizacijom nezasićenih veza prisutnih u uljima čime se povećava stabilnost, jer su manje podložna oksidaciji (npr. hidrogenizovano ulje semena pamuka (Lubritab[®], JRS Pharma), hidrogenizovano palmino ulje (Dynasan[®], Cremer Oleo Division), hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cutina HR[®], BASF Care Creations) i hidrogenizovano sojino ulje (Lipo[®], Vantage). Takođe, široko se istražuju i modifikovana hidrogenizovana biljna ulja, pre svega zato što njihovi proizvodi razgradnje imaju sličnosti sa krajnjim proizvodim gastrointestinalnog varenja. Galaktolipidi pokazuju dobra emulgujuća svojstva, slična fosfolipidima, s tim što, za razliku od fosfolipida, ne poseduju naelektrisanje i smatraju se bezbednim za dugotrajnu upotrebu (Gursoy i sar., 2004; Hauss, 2007 a, b; Shobhit i sar., 2012). Zbog visoke fluidnosti, kapaciteta solubilizacije i potencijala samo-emulgovanja, ove pomoćne supstance su pogodne za formulaciju samo-dispergujućih nosača lekovite supstance (Patravale i sar., 2003).

Smeše parcijalnih glicerida dobijaju se parcijalnom hidrolizom triglicerida prisutnih u biljnom ulju i čine smešu mono-, di- i triglicerida. Separacijom prirodnih proizvoda ulja u njihove sastavne gliceridne frakcije, maksimalno se poboljšavaju njihove željene fizičke osobine i pozitivan uticaj na resorpciju lekovite supstance, dok se istovremeno smanjuju problemi kao što je podložnost oksidaciji.

Fizičko-hemijske osobine i HLB vrednost ulja, zavise od masnih kiselina i stepena esterifikacije. Kao lipidna komponenta često se koriste trigliceridi srednje dužine lanca, dobijeni iz kokosovog ulja, koji predstavljaju smešu kaprilne i kaprinske kiseline u odnosu 55:45 (Prajapati i sar., 2012).

Surfaktanti

Surfaktanti su pomoćne materije amfifilnog karaktera, koje pomažu rastvaranje lipofilnih lekovitih supstanci. U lumenu gastrointestinalnog trakta surfaktanti sprečavaju precipitaciju, što produžava prisustvo lekovitih supstanci, a samim tim i njihovu raspoloživost za resorpciju. Pokazano je da neki surfaktanti imaju značajnu ulogu u usporavanju pražnjenja želuca, čime se produžava vreme za koje se lekovita supstance može rastvoriti i resorbovati. Ispitivanja su pokazala da, na primer, kaprilno-kaprilinski makrogolgliceridi ispoljavaju ovakav efekat i time povećavaju biološku raspoloživost lekovitih supstanci (Shah, 2011).

Pored nezamenljive uloge u formulaciji samo-dispergujućih nosača, često je značajna uloga surfaktanata u poboljšanju resorpcije lekovite supstance, usled promene u permeabilnosti biološkim membranama (Shobhit i sar., 2012). Visoka HLB vrednost i posledična hidrofilitnost surfaktanta neophodna je za trenutno formiranje U/V emulzije, obezbeđujući dobre samo-dispergujuće osobine nosača (Bandopadhyay i sar., 2009; Bhupinder i sar., 2013). Osnovni faktor za odabir nekog ekscipijensa jeste bezbednost primene. Izbor surfaktanata ograničen je na mali broj, s obzirom na to da je malo onih koji su prihvatljivi za peroralnu primenu. Smatra se da su surfaktanti prirodnog porekla bezbedniji od sintetskih i preporučuje se njihova primena u formulaciji samo-dispergujućih nosača, uprkos ograničenoj sposobnosti samo-emulgovanja. Surfaktanti nerastvorljivi u vodi teže da penetriraju i fluidiziraju biološke membrane, dok surfaktanti rastvorljivi u vodi poseduju mogućnost solubilizacije komponenti bioloških membrana. Zbog toga svi surfaktanti, nezavisno od tipa, poseduju mogućnost iritacije i posledične niske tolerancije. Pored vrste surfaktanta, neophodno je dobro razmotriti i njegov udeo u konačnoj formulaciji. Takođe je poznato da su nejonski surfaktanti manje toksični u poređenju sa jonskim površinski aktivnim materijama. Katjonski surfaktanti su više toksični u odnosu na anjonske, koji su više toksični u odnosu na nejonske surfaktante. Prilikom formulacije lipidnih sistema najviše se koriste nejonski surfaktanti tipa polisorbata ili polioksietilovana jestiva ulja. Postoji veliki broj nejonskih surfaktanta, za koje postoje podaci o njihovoj bezbednosti prilikom peroralne primene. Većina nejonskih surfaktanata poseduje peroralnu LD50 vrednost od 50 g/kg, tako da se 1 g surfaktanta u formulaciji namenjenoj za jednokratnu peroralnu primenu dobro

podnosi (Attwood i Florence, 1983). Kada su lipidne formulacije namenjene za lečenje hroničnih bolesti, prilikom izbora surfaktanta treba biti obazriv, zbog nedostatka podataka o njihovoj toksičnosti nakon peroralne primene u toku dužeg vremenskog perioda (Strickley, 2007).

Surfaktanti niskog stepena etoksilacije imaju ograničenu rastvorljivost u vodi i najčešće se u vodi disperguju. Ove pomoćne supstance formiraju micelle, ali zbog nedovoljne hidrofilnosti imaju nisku sposobnost za samo-dispergovanje. Surfaktanti sa HLB oko ili veće od 12 mogu formirati micelarne rastvore, rastvarajući se u vodi u koncentraciji koja je iznad kritične micelarne koncentracije. Ove supstance se mogu sintetisati iz makrogola sa hidrolizovanim biljnim uljima. Alternativno, alkoholi mogu da reaguju sa etilenoksidom i da nagrade alikil etar etoksilat koji, se uobičajeno koristi kao surfaktant (npr. cetostearil alkohol etoksilat, cetomakrogol). Reakcijom sorbitanskih estara sa etilenoksidom nastaju polisorbati (Rowe i sar., 2006). Makrogol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor[®] RH40, BASF) i makrogol-60 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor[®] RH60, BASF) su primeri pomoćnih supstanci dobijenih iz hidrogenizovanog ricinusovog ulja. Makrogolglicerol ricinioleat (Cremophor[®] EL, BASF) koji nije hidrogenizovan se takođe široko koristi u formulisanju samo-dispergujućih nosača (Collnot i sar, 2006; Cuine i sar., 2007).

Prilikom formulacije samo-dispergujućih nosača lekovitih supstanci koncentraciju surfaktanata i kosurfaktanata treba svesti na minimum. Više koncentracije surfaktanta u samo-dispergujućoj formulaciji ne dovode uvek do smanjenja veličine kapi unutrašnje faze emulzija dobijenih nakon razblaživanja samo-dispergujućih nosača vodom, već mogu dovesti čak i do povećanja (Kommuru i sar., 2001; Craig i sar., 1995). Povećanje veličine kapi se dešava usled povećanja penetracije vode i posledičnog narušavanja međupovršinskog filma, što dovodi do izbacivanja uljanih kapi u spoljašnju vodenu fazu (Pouton, 1997).

Kosurfaktanti/korastvarači

Kosurfaktanti povećavaju elastičnost međupovršinskog filma između dispergovanih kapi i spoljašnje faze koji formira surfaktant i smanjuje međupovršinski napon. Kao posledica toga dolazi do smanjenja dijametra kapi i povećanja stepena solubilizacije za lekovitu supstancu u odnosu na čist surfaktant (Patel i sar., 2007). Korastvarači omogućavaju rastvaranje većih količina hidrofilnog surfaktanta ili lekovite supstance u odgovarajućem lipidu. Alkoholi i isparljivi korastvarači se koriste retko, jer mogu da prodiru u zid kapsula čime se narušava mehanička stabilnost, menja sastav formulacije i povećava rizik za precipitaciju lekovite supstance (Pouton, 2006).

U samo-dispergujućim nosačima se, u kombinaciji sa surfaktantima, najčešće koriste kosurfaktanti HLB vrednosti od 10 do 14. Oni snižavaju međupovršinski napon, fluidizuju ugljovodonični lanac u međupovršinskom filmu i omogućavaju spontani nastanak mikroemulzije. Izbor surfaktanta i kosurfaktanta je kritična tačka ne samo u formulaciji samo-dispergujućih nosača, već i za njihovu sposobnost dispergovanja i solubilizacije lekovite supstance (Patravale i sar., 2003).

U formulaciji samo-dispergujućih nosača lekovite supstance obično se kombinuju dve površinski aktivne supstance (surfaktant i kosurfaktant). Friberg (2012) navode da kosurfaktanti:

- povećavaju fluidnost međupovršine između dispergovanih kapi i spoljašnje faze;
- sprečavaju formiranje faze tečnih kristala, koja onemogućava proces mikroemulgovanja;
- utiču na raspodelu molekula surfaktanta na međupovršini i doprinose njenom širenju.

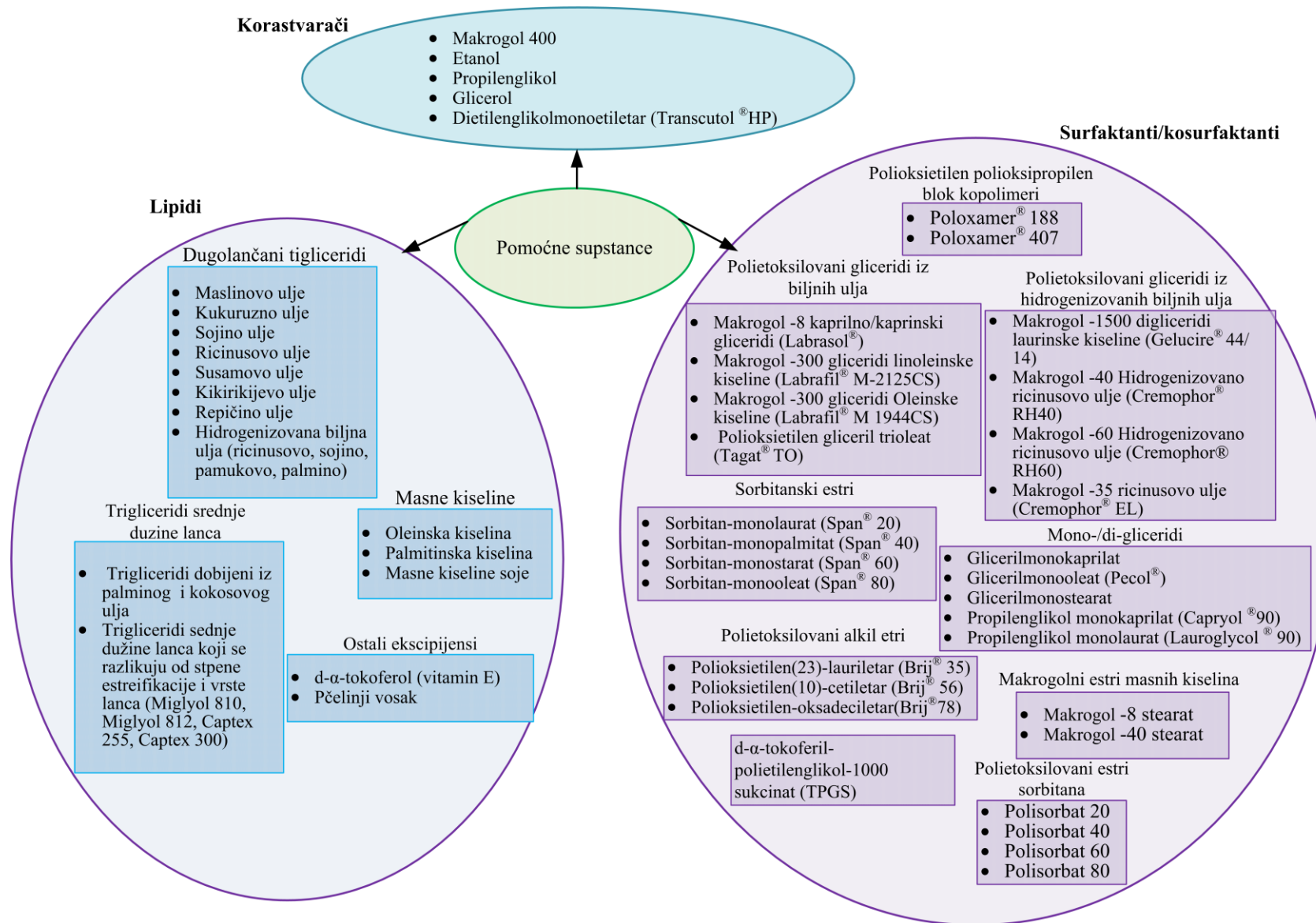
Najčešće korišćeni lipidi, surfaktanti, kosurfaktanti i korastvarači u formulaciji samo-dispergujućih nosača prikazani su na slici 2.1.

U formulaciji samo-dispergujućih nosača se pored opisanih pomoćnih supstanci često koriste i druge pomoćne supstance kao što su: sredstva za povećanje viskoziteta, sredstva za modifikaciju oslobađanja lekovite supstance, antioksidansi. Sredstva za povećanje viskoziteta, kao što su tragakanta, cetil alkohol, stearinska kiselina ili pčelinji

vosak, mogu se dodavati u cilju modifikacije konzistencije i poboljšanja fizičke stabilnosti samo-dispergujućih sistema (Osol, 1975).

Za postizanje produženog oslobađanja iz samo-dispergujućih nosača koriste se inertni polimeri koji ne jonizuju u fiziološkom opsegu pH vrednosti i koji mogu da formiraju matriks, u koncentracijama od 5 do 40%. Mogu se koristiti hidroksipropilmetilceluloza i etilceluloza (Barthelemy i Benameur, 2001; Alexander i sar., 2011).

U cilju zaštite formulacije od oksidacije, mogu se koristiti razni lipofilni antioksidansi: α -tokoferol, β -karoten, propil galat, butilhidroksitoluol (BHT) ili butilhidroksianizol (BHA) (Gibson, 2007).



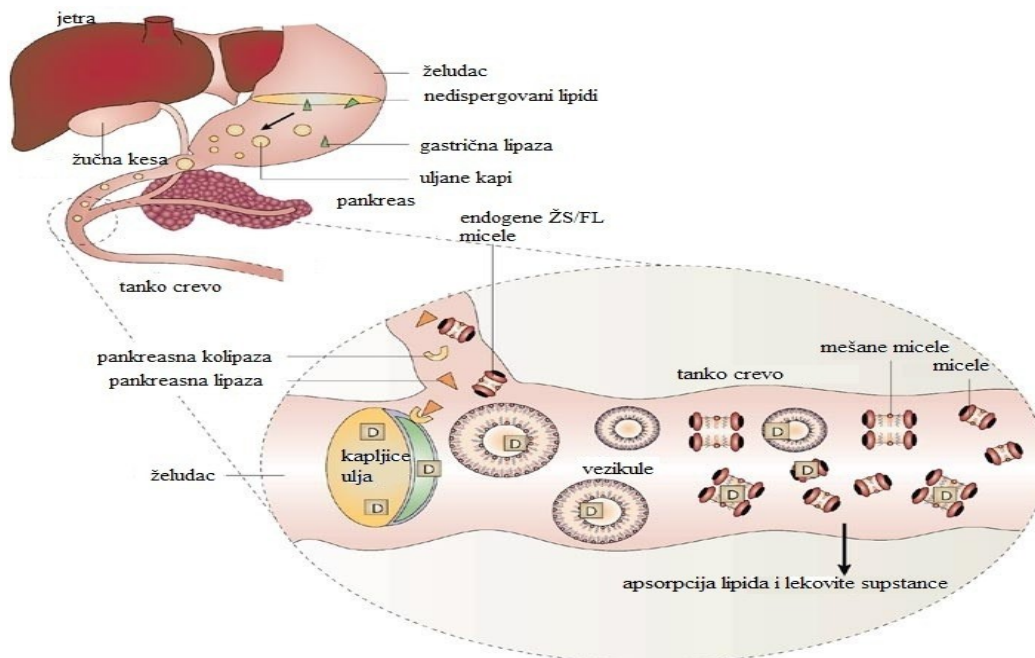
Slika 2.1. Najčešće korišćene pomoćne supstance u formulacijama samo-dispergujućih nosača lekovite supstance (Song, 2011; Williams i sar., 2012; Kalepu i sar., 2013; Strickley, 2007)

2.3. Ponašanje lipidnih formulacija/nosača lekovite supstance u organizmu

Smatra se da je primarni mehanizam kojim lipidne formulacije poboljšavaju resorpciju, isporuka aktivne supstance u solubilizovanom obliku u gastrointestinalni trakt, na taj način što ubrzavaju stvaranje micela koje sadrže teško rastvorljivu supstancu unutar intestinuma. Takođe, smatra se da ubrzavanje stvaranja micela nije toliko posledica direktnog delovanja lipida, koji ulaze u sastav formulacije, koliko posledica proizvoda njihovog varenja, prvenstveno mono- i di- glicerida zahvaljujući njihovoj površinskoj aktivnosti. Pri izradi lipidnih formulacija, lipofilna lekovita supstanca se rastvara, rede suspenduje, u lipidnom medijumu koji je dodatno štiti od hemijske i enzimske degradacije.

Nakon primene lipidnih formulacija dolazi do niza promena u GIT-u. U želucu, pod dejstvom gastrične lipaze, koja se oslobađa iz mukoze želuca, dolazi do hidrolize triglicerida (TG - predstavljaju najzastupljenije lipidne komponente lipidnih nosača) i oslobađanja diglicerida (DG) i slobodnih masnih kiselina (MK) kao produkata hidrolize (koji imaju potencijalnu sposobnost solubilizacije lekovite supstance). Gastrična lipaza pokazuje veću selektivnost ka srednjelančanim MK u odnosu na dugolančane MK. Motilitet želuca, brzina pražnjenja želuca, kao i prisustvo fosfolipida, proteina i polisaharida i amfifilnih proizvoda parcijalne lipolize triglicerida olakšavaju proces emulgovanja. U želucu se formiraju grube emulzije, čija je veličina kapi od 1-100 µm. Lipidne formulacije iz želuca prelaze u tanko crevo. Prisustvo lipidnih formulacija u duodenumu stimuliše sekreciju žučnih soli, fosfolipida (pre svega fosfatidilholina) i holesterola iz žučne kese i pankreasnog soka (koji sadrži pankreasnu lipazu/kolipazu) iz pankreasa. Neki fosfolipidi i holesterol se adsorbuju na površinu emulgovanih kapi i zajedno sa produktima razgradnje triglicerida i žučnim solima koje su prisutne u duodenumu doprinose stabilnosti sistema i smanjenju veličine nastalih kapi, uz povećanje slobodne površine. Ove promene olakšavaju dalju razgradnju masti posredovanu aktivnošću pankreasne lipaze i kolipaze i oslobađanje 2-monoglicerida i slobodnih MK. Ovi proizvodi razgradnje (masne kiseline i monogliceridi) su efikasni emulgujući agensi, a masne kiseline dodatno stimulišu vezivanje lipaza/kolipaza kompleksa za površinu emulzije (*eng.* emulsion surface), čineći ovaj proces

autokatalitičkim. U prisustvu žučnih soli proizvodi hidrolize se inkorporiraju u multilamelarne i unilamelarne vezikule, micide i mešane micide. Oni zajedno doprinose solubilizaciji lipofilnih lekovitih supstanci (Slika 2.2.) (Haus, 2007; Porter i sar., 2008).



Slika 2.2. Varenje lipida i solubilizacija lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu iz lipidnih formulacija (ŽS/FL - žučne soli/fosfolipidi) (prilagođeno iz: Porter i sar., 2008).

Mešane micide omogućavaju olakšano dopremanje lipofilnih komponenti do enterocita. Iako njihovo prisustvo u GIT-u uslovljava veću permeabilnost spoljašnje membrane enterocita, takvi složeni sistemi se ne mogu resorbovati u intaktnom obliku. Mogu se resorbovati u enterocite tek nakon disociranja i oslobađanja emulgovanih lipidnih sistema, što je uslovljeno kontaktom sa crevnim resicama i nižom pH vrednošću koja vlada u tom području. Transport se vrši ili pasivnom difuzijom ili uz pomoć posebnih proteina nosača na nivou spoljašnje membrane enterocita. Kratko- i srednjelančane MK sa solubilizovanom lekovitom supstancom se dalje transportuju uglavnom portalnim krvotokom do jetre, pa onda dospevaju u sistemsku cirkulaciju, a kompleks dugolančanih MK sa solubilizovanom lekovitom supstancom se na nivou endoplazmatskog retikuluma enterocita reesterifikuju do TG i u obliku hilomikrona transportuje putem limfe do sistemske cirkulacije, zaobilazeći jetru i efekat prvog

prolaza (Haus, 2007). Takođe, prisustvo lipida u gastrointestinalnom traktu dovodi do odlaganja pražnjenja želuca. Kao rezultat toga povećava se vreme zadržavanja lipofilne lekovite supstance u tankom crevu, što obezbeđuje bolje rastvaranje lekovite supstance na mestu resorpcije, a samim tim i povećanje resorpcije (Ingle i sar., 2013). Limfatični transport omogućen je i kod visoko lipofilnih lekovitih supstanci ($\text{LogP} > 5$) koje pokazuju visoku rastvorljivost u trigliceridima (manje od 50 mg/ml). Visoko lipofilne lekovite supstance se resorbuju preko limfnih sudova koji su odgovorni za resorpciju lipida. Time se zaobilazi metabolizam u jetri što za posledicu ima povećanje biološke raspoloživosti ovih lekovitih supstanci. Pokazano je da lipidni sistemi koji se sastoje od estara nezasićenih dugolančanih masnih kiselina povećavaju biološku raspoloživost određenih lekovitih supstanci olakšavajući transport limfnim putem. Na primer, ontazolast, ima izražen metabolizam prvog prolaza, ali upotreba ove lekovite supstance sa gliceril monooleatom (Peceol™, Gattefosse) omogućava resorpciju preko limfnih sudova i time zaobilazanje metabolizma u jetri (Haus i sar., 1998). U literaturi se navodi sa se limfnim putem resorbuje sakvinavir iz formulacija sa poligliceril-3 dioleatom (Plurol® Oleique CC497, Gattefosse) ili makrogol glicerol ricinoleatom (Cremophor® EL, BASF) i halofantrina iz formulacija sa različitim trigliceridima i njihovim derivatima (Haus, 2007; Khoo i sar., 1998).

Takođe, novija istraživanja pokazuju da određeni lipidi poboljšavaju biološku raspoloživost lekovitih supstanci inhibicijom P-glikoproteina, proizvoda MDR1 gena, koji predstavlja glavni protein-nosač, odgovoran za efluks ksenobiotika. Uočeno je da pojedine komponente lipidnih formulacija dovode do inhibicije aktivnosti CYP 450, enzima koji dovodi do metaboličke degradacije lekovitih supstanci u crevnom epitelu (Haus, 2007). Inhibitorski efekti nekih surfaktanata (npr. Polisorbata, Cremophor®-a i D- α -tokoferol makrogol 1000 sukcinat (D- α -tokoferol polietilen glikol 1000 sukcinat (TPGS)) na CYP3A i efluks P-glikoproteina, omogućavaju povećanje biološke raspoloživosti. Posle peroralne primene mekih kapsula Neoral® inhibitorski efekat na CYP3A i efluks P-glikoproteina se može pripisati delovanju Cremophor®-a RH40 koji ulazi u sastav ovog preparata. Slični mehanizmi uticaja pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav formulacije, na povećanje biološke raspoloživosti nisko rastvorljivih lekovitih supstanci nakon peroralne primene su opisani i za talinolol i sakvinavir, iz formulacija koje u svom sastavu sadrže nejonski surfaktant TPGS ili Cremophor® EL (Agrawal i

sar., 2009; Agrawal i sar., 2012; Collnot i sar., 2006; Cuine i sar., 2007; Grove i sar., 2007; Shono i sar., 2004; Hugger i sar., 2002). Surfaktanti iz grupe Cremophor[®]-a smatraju se inhibitorima efluks pumpe, ali mehanizam inhibicije još nije utvrđen. Pretpostavlja se da su u pitanju nespecifične konformacione promene efluks pumpe izazvane penetracijom molekula surfaktanata u plazma membrani, adsorpcijom surfaktanata na spoljašnjoj površini efluks pumpe ili interakcijom malih molekula sa intraćelijskim domenima efluks pumpe. Međutim, hemijska heterogenost ovih ekscipijenasa otežava identifikaciju preciznog mehanizma inhibicije efluks pumpe (Shah, 2011).

Većina surfaktanata dovodi do inhibicije efluksnih transportera na nivou enterocita, kao što su: TPGS, Cremophor[®] EL i RH40, polioksilgliceridi i makrogolni estri kao što su Labrasol[®], Gelucire[®] 44/14, polioksietilen (40) stearat (Myrj[®] 52, Croda) ili makrogol (15) hidrosistearat (Solutol[®] HS15, BASF), estri sorbitana (etoksilovani ili ne) ili čak parcijalni gliceridi. Osobine koje treba da poseduju pomoćne supstance, posebno surfaktanti, da bi doveli do inhibicije efluksa P-glikoprotein supstrata su rastvorljivost u vodi, prisustvo estarske veze, da sadrže srednjelančane masne kiseline i polietoksilovane grupe. Labrasol[®] poseduje prethodno navedene osobine i označen je kao najefikasniji među deset ispitivanih pomoćnih supstanci (Haus, 2007; Shah, 2011).

Mnoge pomoćne supstance, u prvom redu surfaktanti (npr. Cremophor[®] EL, polisorbitat 80, Labrasol[®]), su odgovorni za fluidizaciju intestinalne ćelijske membrane, narušavaju strukturnu organizaciju membrane i time povećavaju njenu permeabilnost (Shah, 2011; Ingle i sar., 2013).

Sumarno gledano mehanizmi kojima lipidi i lipidni ekscipijensi povećavaju bioraspoloživost su (Porter i sar., 2007):

- solubilizacija lekovite supstance u intestinalnoj tečnosti;
- izmena transportnih mehanizama u enterocitima;
- izmena puta lekovite supstance u sistemsku cirkulaciju (portalni krvotok vs. limfni sudovi).

Međutim, neki autori smatraju da SMEDDS ne podležu ovakvim promenama na nivou GIT-a i da nije potrebno da dođe do njihove digestije pošto je lekovita supstanca u

mikroemulgovanom obliku, u kom vrlo lako može da penetrira kroz spoljašnju membranu enterocita (Kyatanwar i sar., 2010). Sa druge strane, jedna *in vivo* studija u kojoj je procenjen uticaj primene samo-mikroemulgujućeg sistema na bioraspoloživost sirolimusa, kao model supstance, nakon peroralne primene, pokazala je značajan uticaj komponenti formulacije, lipida i surfaktanata na povećanje bioraspoloživosti. Naime, iz formulacije bez lipida resorpcija lekovite supstance se uglavnom odvijala portalnim krvotokom, dok se iz formulacije sa samo-mikroemulgujućim sistemom, koja sadrži više od 25% srednjelančanih triglicerida transport odvijao prvenstveno putem limfe. Na osnovu ove studije je zaključeno da je glavni doprinos povećanju bioraspoloživosti sirolimusa iz samo-mikroemulgujućih sistema, resorpcija lekovite supstance limfnim putem. Osim toga, veći sadržaj surfaktanata može pozitivno da utiče na biološku raspoloživost, ali je taj uticaj relativno slabiji (Sun i sar., 2011). Može se zaključiti da je ponašanje ovakvih sistema u živom organizmu još nedovoljno ispitano i da se zbog toga ne može zaključiti sa potpunom sigurnošću, koje su to tačno promene kojima podleže primenjeni sistem.

2.4. Studije faznog ponašanja

Pri formulisanju samo-dispergujućih nosača lekovitih supstanci moraju se pažljivo razmotriti usklađenost fizičkohemijskih osobina pomoćnih supstanci i njihovih koncentracija ili odnosa, jer ovi parametri imaju veliki uticaj na osobine formiranih nosača. Proces samo-emulgovanja je specifičan za pojedine kombinacije pomoćnih supstanci, a zavisi od vrste i odnosa ulja i surfaktanta, koncentracije surfaktanta i temperature na kojoj se samo-emulgovanje dešava. Prvi korak u formulaciji samo-dispergujućih nosača je identifikacija specifičnih kombinacija pomoćnih supstanci i konstruisanje faznog dijagrama, koji prikazuje različite koncentracije pomoćnih supstanci koje imaju sposobnost samo-emulgovanja. Tokom izbora pomoćnih supstanci bitna je i njihova sposobnost mešanja. Trigliceridi dugolančanih masnih kiselina se obično ne mešaju sa hidrofilnim surfaktantima i korastvaračima. Polarna ulja, kao što su mešani gliceridi, dobro se mešaju sa hidrofilnim surfaktantima i na taj način pomažu u samo-dispergovanju formulacije. Različitost hemijske prirode ulja može dovesti do razdvajanja komponenti samo-emulgujućeg sistema tokom čuvanja, pa je neophodno obaviti ispitivanja fizičke stabilnosti formulacija. Ako se koriste voskovi (čvrste masne

komponente) moraju se otopiti pre mešanja sa ostalim tečnim ekscipijensima. Međutim, ovo može dovesti do mešanja zasićenih masnih kiselina sa ostalim pomoćnim supstancama i rastvaranja lekovite supstance na povišenoj temperaturi, ali prilikom hlađenja na sobnoj temperaturi može doći do precipitacije lekovite supstance ili do razdvajanja komponenti samo-dispergujućeg nosača, usled očvršćavanja voskova. Ispitivanja sa promenama temperature mogu pomoći u identifikaciji potencijalnih problema koji tokom čuvanja (hlađenja) mogu dovesti do nestabilnosti samo-dispergujućih formulacija (Müllertz i sar., 2010).

Veliki je broj različitih vrsta ulja, surfaktanata i kosurfaktanata, koji se koriste u formulaciji samo-dispergujućih nosača, ali je malo sistematskog ispitivanja uticaja osobina ovih komponenata, kao što su HLB vrednosti i dužine lanca lipida, na formiranje i osobine mikroemulzija. Polarnost uljane faze je jedan od faktora koji utiče na oslobađanje lekovite supstance iz samo-dispergujućih nosača. Na polarnost kapi utiču HLB vrednost, dužina lanca, stepen nezasićenosti masnih kiselina, molekulske mase hidrofilne supstance i koncentracija i kritični parametar pakovanja surfaktanta. Nepostojanje sistemskog ispitivanja otežalo je donošenje opšteg zaključka ili koncepta iz literature kojim bi se napravio brži i jednostavniji odabir pomoćnih supstanci prilikom formulacije samo-dispergujućih nosača lekovite supstance. Sistem klasifikacije samo-dispergujućih nosača, koji primenjuje osnovne fizičko-hemijske osobine lipida i surfaktanata, dao je veliki doprinos racionalizaciji razvoja ovakve vrste nosača (Müllertz i sar., 2010).

Pronalaženje optimalnog odnosa odabranih komponenti tradicionalno obuhvata promenu količine jedne po jedne komponente (pristup jedan-po-jedan faktor). Za određivanje mikroemulziona oblasti koriste se studije faznog ponašanja. U istraživanjima faznog ponašanja sistema koriste se različiti tipovi faznih dijagrama. Fazni dijagrami sadrže podatke o uzajamnoj rastvorljivosti sastojaka u dvokomponentnim i višekomponentnim sistemima. Fazni trougao je jednakostranični trougao, a svaka tačka unutar trougla odgovara smeši komponenata sistema određenog procentnog sastava sistema. Za sistem sastavljen od tri komponente, svaka strana trougla odgovara jednoj komponenti sistema, pri čemu teme trougla predstavlja 100% jedne komponente tog sistema. Stranice trougla predstavljaju nezavisno promenljive

parametre, najčešće njihovu koncentraciju. Svaka tačka unutar faznog dijagrama predstavlja sastav rezultujuće termodinamički ravnotežne faze na određenoj temperaturi (Đekić, 2011; Djekić i sar., 2012).

Pri ispitivanju faznog ponašanja četvorokomponentnih i složenijih sistema najčešće se koristi fazni dijagram tipa faznog trougla, kod koga se dve komponente, u određenom masenom odnosu predstavljaju kao jedna promenljiva u faznom dijagramu (tzv. pseudo-komponenta). Tada se fazni dijagram označava kao pseudo-dijagram. Najčešće je pseudo-komponenta smeša surfaktanta i kosurfaktanta/korastvarača ili smeša ulja i kosurfaktanta (Friberg i Aikens, 2009.). Primenom pseudo-ternernih dijagrama može se mapirati oblast nanoemulzija/mikroemulzija. Pseudo-ternerni fazni dijagram se koristi za određivanje optimalnog raspona koncentracija ekscipijensa u skladu sa veličinom kapi, sposobnošću samo-emulgovanja i stabilnosti nakon dispergovanja. Konstrukcija faznih dijagrama obuhvata eksperimentalno određivanje položaja i veličine oblasti različitih faza u faznom dijagramu. Za kreiranje faznih dijagrama može se primeniti titraciona metoda, gde se mešavinama ulja sa surfaktantima i kosurfaktantima (korastvaračima), u različitim odnosima dodaje vodena faza (u malim količinama, kap po kap). Tokom titracije detektuju se transformacije jedne faze u drugu (fazni prelazi) tokom sukcesivnog dodavanja jedne komponente smeši preostalih sastojaka. Homogene transparentne termodinamički ravnotežne faze (micele, mikroemulzije i tečni kristali) vizuelno se razlikuju od nanoemulzija i (makro)emulzija (Alany i sar., 2009; Đekić, 2011).

Veličina i položaj mikroemulzione oblasti se procenjuju preko kapaciteta za solubilizaciju vodene faze na granici oblasti mikroemulzija (Fanun, 2008). Ovaj parametar opisuje potencijal mikroemulzionih koncentrata (smeša ulja i surfaktanta) za razblaživanje vodenom fazom bez narušavanja termodinamičke stabilnosti sistema (Fanun, 2009; Ezarhi i sar., 2005; Lee i sar., 2005). Kod faznog dijagrama mikroemulzija je područje bistrih i izotropnih sistema (Sprunk i sar., 2012).

Iako ovaj pristup može otkriti uticaj individualnih komponenti na osobine samo-dispergujućih nosača, zahteva utrošak velike količine pomoćnih materija, pri čemu se interakcija između komponenti ne može proučavati pa se ni optimalna formulacija ne može naći. Ovakav pristup zahteva dugotrajan rad i pripremu velikog broja

potencijalnih smeša koje se ispituju. Osim toga, interakcije između sastojaka, na molekulskom nivou, jako su složene i otežavaju uspostavljanje korelacije između fizičko-hemijskih osobina sastojaka, njihove koncentracije i faznog ponašanja sistema (Đekić, 2011). Razvoj samo-dispergujućih nosača može biti efikasniji primenom *in silico* pristupa u praćenju faznog ponašanja. Ovim pristupom se istovremeno menjaju, više promenljivih koje utiču na svojstva formulacije u širem opsegu vrednosti. Rezultat *in silico* pristupa su manji broj eksperimenata, identifikacija interakcija promenljivih i efikasniji odabir optimalne formulacije. Eksperimentalni dizajn, hemometrija i veštačke neuronske mreže korišćene su u nekoliko studija za optimizaciju razvoja samo-dispergujućih nosača (Đekić, 2011; Djekić i sar 2008; Meng i Zheng, 2006; Gao i sar., 2004; Jeirani i sar., 2012). Međutim, u literaturi nije opisan sistematski pristup koji istovremeno identifikuje najbolji izbor pomoćnih supstanci kao i njihov najbolji odnos.

3. Čvrsti samo-dispergujući sistemi

Samo-dispergujući nosači nude niz prednosti u rešavanju problema slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci, a samim tim i postizanje adekvatne biološke raspoloživosti; sledeći problem koji ostaje jeste pronalaženje prihvatljivog farmaceutskog oblika sa ovim nosačima. Peroralni put primene leka, često je najprihvatljiviji za pacijenta, a lipidne formulacije nude velike mogućnosti jer se mogu naći u tečnim, polučvrstim i čvrstim farmaceutskim oblicima za peroralnu primenu. Međutim, konvencionalni farmaceutski oblici sa samo-dispergujućim nosačima, najčešće su tečni, a to za sobom nosi određene nedostatke, kao što su: niska stabilnost, ireverzibilna precipitacija lekovite supstance, visoki troškovi proizvodnje, otežan i zahtevan transport i relativno nizak stepen ponovljivosti, nizak sadržaj lekovite supstance u samoj formulaciji, visok sadržaj surfaktanta koji mogu dovesti do potencijalne iritacije na nivou GIT-a, kao i mali broj tečnih farmaceutskih oblika za peroralnu primenu. Da bi se ovi problemi prevazišli, poslednjih godina istraživanja su usmerena ka razvoju čvrstih samo-dispergujućih sistema (*eng.* solid self-emulsifying drug delivery systems (SSEDDS)). Ovi sistemi se dobijaju prevođenjem tečnih samo-emulgujućih sistema u prašak, od kojih će se proizvesti različiti čvrsti farmaceutski oblici. Tečni SEDDS mogu da se prevodu u čvrsto stanje bez uticaja na oslobađanje lekovite supstance, ili čak mogu dovesti do povećanja brzine i obima oslobađanja lekovite supstance. Prema tome, SSEDDS kombinuju prednosti SEDDS (poboljšane rastvorljivosti i bioraspoloživosti) sa prednostima čvrstih farmaceutskih oblika (visoka stabilnost i reproduktivnost, kompaktan oblik za doziranje, jednostavnost rukovanja i transporta, niži troškovi proizvodnje, lakši prenos sa laboratorijskog na industrijski nivo, bolja prihvatljivost od strane pacijenta) (Prajapati i Patel, 2007; Tang i sar., 2008). Nakon prevođenja tečnih u čvrste samo-dispergujuće sisteme mogu se dobiti suve emulzije, pelete, čvrste disperzije, mikrosfere, nanočestice, iz kojih se nakon toga mogu izraditi različiti čvrsti farmaceutski oblici kao što su: tablete, kapsule, supozitorije, implantati (Tang i sar., 2008; Attama i sar., 2003; Nazzal i Khan, 2006; Jannin i sar., 2008; Abdalla i Mader, 2007; Katteboina i sar., 2009).

3.1. Postupci za prevođenje tečnih samo-emulgujućih sistema u čvrste samo-emulgujuće sisteme

Velika pažnja istraživača je usmerena na razvoj postupaka za prevođenje tečnih samo-emulgujućih sistema u čvrste samo-emulgujuće sisteme. Kao najčešće korišćeni postupci u literaturi se navode: adsorpcija na čvrst nosač, granulacija topljenjem, ekstruzija i sferonizacija i direktno punjenje kapsula tečnim samo-emulgujućim formulacijama.

Adsorpcija na čvrst nosač

Adsorbovanje tečne samo-emulgujuće formulacije na određeni nosač predstavlja jednostepeni postupak, koji uključuje mešanje formulacije i nosača, korišćenjem različitih tehnika mešanja. Upotrebom novijih adsorbenasa, sa posebnim fizičko-hemijskim karakteristikama (specifična aktivna površina, porozitet, hemijski obrađena površine itd.) kao nosača za tečne samo-emulgujuće formulacije otvara se veliki broj mogućnosti poboljšanja i modifikovanja oslobađanja lekovite supstance. Najčešće korišćeni su različiti nosači na bazi silicijum-dioksida, magnezijum-aluminometasilikata, mikroporozni kalcijum-silikat, magnezijum-hidroksid, talk, umreženi povidon (krospovidon), karboksimetilceluloza i njeni derivati, metakrilna kiselina i njeni derivati (Boltri i sar., 1997; Venkatesan i sar., 2005; Balakrishnan i sar., 2009). Umreženi polimeri na bazi derivata celuloze, na bazi metakrilne kiseline i povidona, osim što dovode do povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance, sprečavaju ili usporavaju taloženje i precipitaciju lekovite supstance (Boltri i sar., 1997). Upotrebom poroznih nosača, visoke specifične površine, ostvaruje se dodatno povećanje brzine rastvaranja slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Dobra ujednačenost sadržaja i visok stepen adsorbovanja su prednosti metode adsorbovanja na čvrst nosač za dobijanje SSEDDS. Jedan od nedostataka je što se ovom metodom dobijaju formulacije sa niskim sadržajem lekovite supstance (Katteboinaa i sar., 2009; Milović i sar., 2012).

Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je jedna od široko korišćenih metoda prevođenja tečnih SEDDS u čvrste SEDDS. Ova metoda podrazumeva pripremu uzorka mešanjem lipidnih ekscipijenasa, lekovite supstance i čvrstog nosača rastvorenog (dispergovanog) u pogodnom rastvaraču (vehikulumu). Nakon toga vrši se atomiziranje mešavine i raspršivanje u komori za sušenje, pri čemu dolazi do isparavanja lako isparljivih komponenti (npr. vode iz emulzije, ili korišćenog rastvarača - vode, etanola, nekog drugog organskog rastvarača) pod kontrolisanim uslovima temperature i protoka vazduha. Prašak koji se dobija potom se može tabletirati ili puniti u kapsule (Yi i sar., 2008; Tang i sar., 2008; Tao i sar., 2008). Kao čvrsti nosači za ovu namenu najčešće se koriste silicijum-dioksid (Aerosil[®] 200, Pharma) suspendovan u etanolu (99,5 v/v) (Balakrishnan i sar., 2009) ili dekstran 40 rastvoren u vodi (Yi i sar., 2008).

Granulacija topljenjem

Granulacija topljenjem predstavlja proces u kome se granulacija praška postiže dodatkom sredstva za vezivanje koje se omekšava ili se topi na relativno niskoj temperaturi. Ovaj postupak je pogodan zbog svoje jednostavnosti i zato što nije potrebno koristiti rastvarače, a osim toga moguće ga je izvoditi u jednom koraku. Parametre koje treba kontrolisati su brzina i vreme mešanja i viskozitet otopljenog sredstva za vezivanje. Kao sredstvo za vezivanje može se koristiti veliki broj ekscipijenasa kao što je grupa ekscipijenasa pod zaštićenim nazivom Gelucire[®] (smeša mono-, di- i triglicerida i estra polietilen glikola), lecitin, parcijalni gliceridi, polisorbati. U svim slučajevima ekscipijensi koji se koriste moraju biti polučvrste konzistencije na sobnoj temperaturi. U literaturi se navodi da se ovom metodom u formulaciju može inkorporirati i do 80% lekovite supstance (Gupta i sar., 2001; Gupta i sar., 2002; Verreck i Brewster, 2004; Seo i sar., 2003;).

Ekstruzija i sferonizacija

Ekstruzija i sferonizacija podrazumevaju: mešanje lekovite supstance i smeše lipidnih pomoćnih materija, vlažnu granulaciju dodavanjem rastvora sredstva za vezivanje, a nakon toga ekstruziju i sferonizaciju. Relativna količina vode i tečnog SEDDS koje se koristi u ovom procesu imaju uticaj na raspodelu veličina dobijenih peleta, hrapavost

površine peleta i brzinu oslobađanja. Povećanjem udela vode u masi za ekstruziju, najčešće dolazi do sporije brzine oslobađanja lekovite supstance. Ovu tehniku karakteriše visok stepen inkorporacije lekovite supstance u formulaciji, uz izraženu ujednačenost sadržaja (Newton i sar., 2001; Newton i sar., 2005; Jannin i sar., 2008; Abdalla i sar., 2008; Iosio i sar., 2011).

Direktno punjenje u kapsule

Prednosti punjenja samo-dispergujućih sistema u kapsule su: jednostavnost proizvodnje i mogućnost jednostavne promene doze lekovite supstance promenom volumena punjenja kapsule. Ukoliko je samo-dispergujuća formulacija tečna, proces punjenja kapsula je dvostepen i uključuje punjenje i zaptivanje kapsula bilo dodatnom zaštitom na spoju dva dela tvrde želatinske kapsule ili mikrosprej zaptivanjem (oblaganje kapsula zaštitnim omotačem korišćenjem mikrospreja) (Jannin i sar., 2008). Punjenje polučvrste samo-dispergujuće formulacije u kapsule se vrši u četiri koraka: zagrevanje smeše lipidnih pomoćnih supstanci 20 °C iznad temperature topljenja smeše pomoćnih supstanci, rastvaranje ili suspendovanje lekovite supstance u rastopu (rastvoru), punjenje kapsula sa rastopom (rastvorom) i naknadno hlađenje na sobnoj temperaturi. Prilikom odabira lipidnih ekscipijenasa neophodno je uzeti u obzir njihovu kompatibilnost sa omotačem kapsule. Spisak kompatibilnih tečnih i polučvrstih lipidnih ekscipijenasa sa zidom tvrdih kapsula navode Cole i saradnici (Cole i sar., 2008).

Smrzavanje/hlađenje raspršivanjem (eng. spray cooling)

Kod ovog postupka se sadržaj koji je u tečnom agregatnom stanju raspršuje pomoću spreja u komoru za hlađenje i u kontaktu sa hladnim vazduhom tečne kapljice prelaze u čvrste sferne čestice koje potom padaju na dno komore i mogu da se skupljaju kao fini prašak. Ovaj prašak se može koristiti za izradu tableta ili puniti u kapsule (Rodriguez i sar., 1999; Cavallari i sar., 2005; Passerini i sar., 2006).

Liofilizacija

Liofilizacija se koristi za dobijanje „suvih emulzija“ od ulja-u-vodi emulzija. Proces započinje mešanjem lekovite supstance i samo-dispergujućeg nosača i rastvaranjem u zajedničkom rastvaraču, nakon čega se vrši zamrzavanje, a nakon toga sublimacija

rastvarača. Na kraju procesa se dobija liofilizat, fini prašak visokog poroziteta. Usporeno hlađenje i dodavanje amorfnih krioprotektora (npr. maltodekstrin) je jedan od načina da se poveća stabilnost nastalog liofilizata (Bamba i sar., 1995; El-Badry i Fathy; 2006).

Osim ovih opisanih postupaka u fazi istraživanja se ispituju i druge metode za prevođenje tečnih u čvrste samo-dispergujuće sisteme (Tang i sar., 2008; Katteboinaa i sar., 2009; Cha i sar., 2012):

- primena superkritičnog fluida;
- primena homogenizacije pod visokim pritiskom;
- metoda kapanja;
- metoda očvršćavanja (metoda brzog hlađenja otopljenog materijala);
- oblaganje praška (peleta) u komori sa fluidizirajućim vazduhom.

4. Adsorpcioni nosači

Poslednjih godina veliki broj adsorpcionih nosača prirodnog i sintetskog porekla privlače sve više pažnje zbog svoje biokompatibilnosti, prihvatljivih ekoloških i toksikoloških osobina, velike mogućnosti za modifikaciju fizičko-hemijskih osobina, jednostavnog dobijanja, visoke stabilnosti i relativno niske cene. Ovi nosači su slične hemijske strukture, najčešće neorganskog porekla, a međusobno se razlikuju po poroznosti struktura, specifičnoj površini, veličini, zapremini i obliku pora kao i mogućnosti funkcionalizacije površine. Adsorpcioni nosači se danas široko koriste kao pomoćne supstance u formulaciji farmaceutskih oblika, sa ciljem da povećaju brzinu rastvaranja lekovite supstance, a samim tim i biološku raspoloživost, ali i u formulaciji preparata sa modifikovanim ili ciljanim oslobađanjem lekovite supstance u određeno tkivo. Najčešće se koriste u izradi čvrstih disperzija sa slabo rastvorljivom lekovitom supstancom, ili kao adsorbensi za različite lipidne formulacije (Malmsten, 2013, Mamaeva i sar., 2013, Vallet-Regi i sar., 2007).

Porozni adsorbensi su hemijski najčešće silikatni nosači ili nosači na bazi kalcijum-fosfata. Upotreba silikatnih nosača počinje početkom 21. veka, kada je prvi put jedan sintetisani mezoporozni silikatni nosač, označen kao MCM-41, korišćen za lokalnu isporuku ibuprofena (Vallet-Regi i sar., 2001). Od tada, istraživanja vezana za primene ovih nosača u razvoju sistema za isporuku lekovite supstance beleže pravu ekspanziju. Razvijeno je više poroznih adsorpcionih nosača kao što su MCM – 48, SBA mezoporozni nosači (SBA – 15, SBA – 1, SBA – 3, SBA – 16), HMS nosači, MSU nosači (Taguchi i Schuth, 2005).

Adsorpcija lekovite supstance na nosač može biti fizička ili hemijska (Rupprecht i Lee, 1988). Fizička adsorpcija se ostvaruje zahvaljujući Van der Waals-ovim silama, vodoničnim vezama, kao i elektrostatičkim silama, dok hemijska adsorpcija predstavlja stvaranje novih kovalentnih veza između adsorbensa i adsorptivnog materijala. Adsorpcija leka na adsorbens sa velikom specifičnom aktivnom površinom povećava kontaktnu površinu između lekovite supstance i medijuma, što može potencijalno povećati brzinu rastvaranja. Kada porozni hidrofobni nosač, na koji je adsorbovana lekovita supstanca, dođe u kontakt sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranja,

oslobađanje lekovite supstance se dešava rastvaranjem lekovite supstance sa površine nosača i iz pora koje su ispunjene medijumom, kao i difuzijom lekovite supstance kroz kanale koji su ispunjeni medijumom (Gurny i sar., 1981). Prema Neyes Whitney – evoj jednačini brzina prenosa mase rastvorenih čestica u kontinualnu fazu tj. brzina rastvaranja lekovite supstance direktno je proporcionalna specifičnoj aktivnoj površini adsorpcionog nosača (formula 4.1.).

$$dm/dt = DACs/h \quad (4.1.)$$

gde je (Serajuddin, 2007):

dm/dt – brzina prenosa mase/brzina rastvaranja;

D – koeficijent difuzije;

A – površina čestica koje se rastvaraju (specifična aktivna površina);

C_s – koncentracija čestica na graničnom sloju;

h – visina graničnog sloja.

Postoji mogućnost da lekovita supstanca nakon adsorpcije u manjem ili većem obimu pređe iz kristalnog u amorfni oblik, prilikom čega se brzina rastvaranja u najvećem broju slučajeva povećava. Nakon adsorpcije vodenog/nevodenog rastvora lekovite supstance, moguć je i suprotan proces, naknadna kristalizacija, što dovodi do smanjenja brzine rastvaranja.

Noviji sintetski, amorfni, porozni nosači se sastoje od magnezijum-aluminometasilikata (poznati pod komercijalnim nazivom Neusilin[®], Fuji Chemical Industry Co., Ltd, Japan) kao i od silicijum-dioksida (poznati pod komercijalnim nazivom Sylsya[®], Fuji Sylsya Chemical, Japan). Navedeni nosači se danas intenzivno istražuju zbog prihvatljivih bioloških i toksikoloških osobina, ali pre svega zbog velike specifične površine i potencijalne mogućnosti za povećanje brzine rastvaranja nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, kao i zbog mogućnosti za adsorbovanje velike količine tečnih lipidnih formulacija (Milovic i sar., 2012; Planišek i sar., 2011).

Neusilin[®] predstavlja multifunkcionalni ekscipijens koji se može koristiti za izradu tableta postupkom direktne kompresije, kao i postupkom vlažne granulacije. Široko se koristi u formulaciji tableta, praškova, granula i kapsula. U svom sastavu sadrži 29,1-35,5% Al_2O_3 ; 11,4-14% MgO i 29,2-35,6% SiO_2 računato na suvi ostatak. Praktično je

nerastvorljiv u vodi i etanolu. U specifikacijama proizvođača se navodi da je Neusilin[®] bezbedan za peroralnu primenu, bez izveštaja o neželjenim reakcijama. Magnezijum-aluminometasilikat oficinalan je u Američkoj i Japanskoj farmakopeji. FDA i USP 38 - NF 33 ne daju maksimalne granice za peroralnu primenu ovog ekscipijensa (Elektronska baza podataka *ii*; USP 38 - NF 33; Japanska farmakopeja). Za razliku od toga u Japanu je dozvoljena upotreba Neusilin[®]-a, koji pokazuju bazne osobine, kao antacida do 4 g dnevno i upotreba različitih Neusilin[®]-a kao pomoćnih supstanci u preparatima za peroralnu primenu do 1,05 g (Elektronska baza podataka *ii*). Neusilin[®]-i poseduju veliku specifičnu površinu (110-300 m²/g; Tabela 4.1.), pa samim tim i mogućnost za adsorpciju velike količine tečnosti (ulja ili vode). Osnovne karakteristike pojedinih vrsta Neusilin[®] nosača date su u tabeli 4.1.

Prilikom adsorpcije lekovite supstance na različite Neusilin[®] nosače dolazi do stvaranja vodoničnih veza između silanolnih grupa nosača i različitih proton-donorskih grupa lekovite supstance. Kada je lekovita supstanca lako rastvorljiva u medijumu, pomoću koga se nanosi na površinu adsorbensa, nakon adsorpcije rastvorena lekovita supstanca će u značajnoj meri difundovati na površinu Neusilin[®] nosača, prilikom čega će se formirati veliki broj vodoničnih veza. Kada se lekovita supstanca sa relativno niskom rastvorljivošću u medijumu nanosi na površinu Neusilin[®] nosača rastvorena lekovita supstanca ne može lako da difunduje do površine, zbog čega se stvara znatno manji broj vodoničnih veza. Zbog toga prilikom adsorbovanja lekovitih supstanci uz pomoć medijuma u kome je data supstanca loše rastvorljiva, kristalizacija će biti dominantni mehanizam koji dovodi do smanjenja brzine rastvaranja leka tokom čuvanja (Wen, 2007).

Tabela 4.1. Osnovne karakteristike nosača tipa Neusilin® (El. baze podataka ii, iii)

Izgled	Neusilin® UFL2 Beo prašak	Neusilin® US2 Bele granule	Neusilin® FL2 Beo prašak	Neusilin® S1 Bele granule	Neusilin® S2 Bele granule
Kiselo-bazne osobine	Neutralan	Neutralan	Bazan	Bazan	Bazan
Rastvorljivost u vodi	niska	niska	niska	visoka	niska
Stepen čistoće (%)	>95	>95	>95	>95	>95
Gubitak sušenjem (%), 110 °C, 7 h	<7	<7	<5	13-20	<5
Nasipna gustina (g/ml)	0,06-0,11	0,13-0,18	0,15-0,19	0,30-0,37	0,29-0,37
Tapkana gustina (g/ml)	0,10-0,17	0,16-0,22	0,22-0,20	0,36-0,43	0,34-0,42
Specifična gustina (g/ml)	2,2	2,2	2,2	2,0	2,2
Prosečna veličina čestica (µm)	3,1	106	-	112	115
Specifična površina (m ² /g)	300	300	150	110	110
Nasipni ugao (°)	45	30	45	30	30
Kapacitet adsorpcije ulja (ml/g)	2,7-3,4	2,7-3,4	1,5	1,3	1,4
Kapacitet adsorpcije vode (ml/g)	2,4-3,1	2,4-3,1	1,3	1	1,2
Kapacitet adsorpcije kiseline (ml/g)	>210	>210	>210	>210	>210
pH (4% rastvora)	6-8	6-8	8,5-10	8,5-10	8,5-10
Sredstvo za dopunjavanje u čvrstim farmaceutskim oblicima (%)	30-90	30-90	-	30-90	30-90
Vezivno sredstvo, sredstvo za raspadanje u tabletama (%)	1-10	1-10	5-15	5-20	5-20
Sredstvo za klizanje, antiadheziv (%)	0,5-5	-	-	-	-
Adsorpciono sredstvo u formulaciji čvrstih farmaceutskih oblika (%)	30-50	30-50	-	-	-
Stabilizator suspenzija (%)	1-5	-	-	-	-
Ugušivač (%)	5-15	5-15	-	-	-
Komponenta čvrste disperzija, SSEDSS (%)	20-50	20-50	-	-	-

Sylsya[®] nosači predstavljaju amorfni silicijum-dioksid visokog stepena čistoće i visokog poroziteta, koji se široko koristi u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj industriji, industriji boja, plastike. Nalazi se na FDA listi neaktivnih sastojaka hrane i lekova (GRAS status). Japansko ministarstvo zdravlja navodi da je ova pomoćna supstanca bezbedna za ljudsku primenu. Koristi se kao sredstvo za zaštitu preparata od vlage, antiadheziv, lubrikans, sredstvo za klizanje, sredstvo za podešavanje viskoziteta, sredstvo za geliranje. Takođe, ovi nosači se usled svoje visoke specifične površine (300-700 m²/g; Tabela 4.3.), poslednjih godina sve više istražuju (Elektronska baza podataka *iv*). Karakteristike određenih komercijalnih nosača iz grupe Sylsya[®] predstavljene su u tabeli 4.2. i tabeli 4.3.

Tabela 4.2. Opšte karakteristike nosača tipa Sylsya[®] (Elektronska baza podataka *iv*)

Prosečna veličina čestica (µm)	3,1 – 20,0
Gustina (lbs/ft ³)	7,5 – 11,0
Adsorpcija ulja (lbs/100 lbs)	190 – 310
pH	6 – 8
Srednja veličina pora (ml/g)	1,25 – 1,60
Sadržaj SiO ₂	99,5% min
Čistoća	94% min
Gubitak sušenjem (145°C, 4 h)	5,0 % max

Tabela 4.3. Fizičke karakteristike pojedinačnih tipova Sylsya[®] nosača (Elektronska baza podataka *iv*)

Komercijalni naziv	Srednja veličina čestica (µm)	Specifična površina (m ² /g)	Veličina pora (nm)	Zapremina pora (ml/g)
Sylsya [®] 320	1,6	300	Nema podataka	Nema podataka
Sylsya [®] 350	3,9	300	21,0	1,60
Sylsya [®] 470	14,1	300	17,0	1,25
Sylsya [®] 440	6,2	300	17,0	1,25
Sylsya [®] 740	5,0	700	2,5	0,44

Brzina rastvaranja nisko rastvorljivih lekovitih supstanci adsorbovanih na pomenute nosače je obično veća u odnosu na brzinu rastvaranja same lekovite supstance. Veća specifična površina nosača obično znači veću kontaktnu površinu između adsorbovanog materijala i medijuma u kome se vrši ispitivanje, što bi trebalo da vodi većoj brzini rastvaranja, međutim to nije uvek slučaj. Hidrofobne interakcije lekovite supstance sa adsorbensom, kao i stvaranje vodoničnih veza, obično dovode do nastanka amorfno oblika lekovite supstance, koji skoro uvek pokazuje brže rastvaranje u odnosu na kristalni oblik (Salonen i sar., 2005). Takođe, nemogućnost obrazovanja kristalne rešetke unutar pora adsorbensa, usled malog prostora i jakih interakcija dovodi do stvaranja molekulske disperzije lekovite supstance, unutar pora koja je dostupna za brzo ispiranje medijumom. Međutim, ukoliko dođe do hemijske adsorpcije, stvaranjem hemijskih veza između lekovite supstance i adsorbensa, kao i naknadne kristalizacije lekovite supstance na površini adsorbensa, brzina i obim rastvaranja lekovite supstance mogu biti znatno smanjeni (Wen, 2007).

U novije vreme, pored prethodno navedenih silikatnih nosača sintetskog porekla, sve više se razmatra upotreba diјatomitnih mikrokapsula ili diјatomita kao prirodnih poroznih nosača za različite lekovite supstance (Aw i sar., 2011). Diјatomiti predstavljaju skelet jednoćelijskih fotosintetičkih algi sa kompleksnom 3D mikrostrukturom i multifunkcionalnim karakteristikama. Visoko uređena porozna struktura velike specifične površine, prisustvo reaktivnih silanolnih grupa na površini, koje omogućavaju laku funkcionalizaciju, biokompatibilnost i niska toksičnost, kao i široka dostupnost diјatoma, čine njihovu frustulu (diјatomite) atraktivnim materijalom za razvoj sistema za isporuku lekovitih supstanci. Diјatomiti se sastoje od 92% amorfnoг silicijum-dioksida (SiO_2), 1–3% aluminijum-oksida (Al_2O_3), 0,5–1% gvožđe(III)oksida (Fe_2O_3), 0,1–0,3% magnezijum-oksida (MgO), 0,2–0,5% kalcijum-oksida (CaO), 0,07–0,1% kalijum-oksida (K_2O), sa tragovima titan-dioksida (TiO_2) i fosfor(V)oksida (P_2O_5) (Yu i sar., 2009).

Diјatomiti poseduju kombinaciju strukturnih, mehaničkih i hemijskih karakteristika koje mogu da posluže za prevazilaženje uobičajenih prepreka na koje se nailazi formulisanjem konvencionalnih terapijskih sistema. Njihova specifična površina iznosi

30,9 m²/g, volumen pora 0,052 ml/g, a dijametar pora 13,6 nm (Sumper i Brunner, 2006).

Prirodni diatomiti poseduju nekoliko prednosti u odnosu na sintetske silika nosače: karakterističnu strukturu sa šupljom i velikom sredinom i prisustvo mikro- i makroporoziteta, odličnu biokompatibilnost, posedovanje površine koja se lako može modifikovati, netoksičnost, nisku gustinu i sposobnost imitacije prirodnih konstituenata kostiju kao i imitacije medicinskog implanta. Velika prednost diatomita u odnosu na sintetske nosače je ta da se za njihovo dobijanje ne koriste toksični rastvarači i jedinjenja, već se dobijaju jednostavnim prečišćavanjem dijatomejske zemlje, koja je dostupna u velikim količinama u rudarskoj industriji (Sumper i Brunner, 2006; Yu i sar., 2009; Milović i sar., 2014).

5. Procena permeabilnosti lekovite supstance kroz membranu gastrointestinalnog trakta

Permeabilnost lekovite supstance je, pored rastvorljivosti i brzine rastvaranja iz farmaceutskog oblika, najznačajniji faktor koji utiče na resorpciju lekovite supstance, a samim tim i na biološku raspoloživost i raspodelu lekovite supstance u organizmu (Lipka i Amidon, 1999).

Pod permeabilnošću lekovite supstance podrazumeva se njena sposobnost da prođe kroz biološke membrane. Prema podacima Evropske agencije za lekove (EMA) supstanca se smatra dobro permeabilnom ukoliko je ispitivanjima kod ljudi pokazano da je njen stepen resorpcije veći od 85%, odnosno ukoliko se najmanje 85% nepromenjenog leka izluči urinom (EMA, 2010).

Ukupnoj permeabilnosti lekovite supstance doprinose svi putevi prolaska lekovite supstance kroz membranu, odnosno mehanizmi resorpcije (Smetanova i sar, 2011):

- pasivna difuzija, paracelularno;
- pasivna difuzija, transcelularno;
- pasivna difuzija uz učešće nosača (olakšani transport);
- aktivni transport;
- efluksni transporter;
- metabolizam prvog prolaza u crevima praćen resorpcijom lekovite supstance i njenih metabolita;
- transcitoza posredovana receptorom.

S obzirom na to da su ćelijske membrane lipidne strukture, najveći broj lekovitih supstanci se resorbuje transcelularno, mehanizmom pasivne difuzije. Ovo podrazumeva transport liposolubilnih lekovitih supstanci kroz polupropustljivu membranu u pravcu koncentracionog gradijenta, sa mesta veće na mesto manje koncentracije, odnosno iz vanćelijskog u unutarćelijski prostor, do trenutka kada se stvori ravnoteža i koncentracije lekovite supstance se izjednače. Naime, molekul lekovite supstance se prvo rastvori u lipidnoj membrani u zavisnosti od liposolubilnosti i koeficijenta lipidno-vodene raspodele, zatim napušta lipidnu membranu i rastvara se u vodenoj sredini u

unutrašnjosti ćelije. Nakon toga lekovita supstanca prolazi kroz drugu membranu usled generisanja novog koncentracionog gradijenta i na taj način prelazi iz unutarćelijskog prostora u krvotok. Pokazano je da supstance sa vrednošću $\log D$ u opsegu od 0 do 3, predstavljaju idealne kandidate za prolazak lekovite supstance mehanizmom pasivne difuzije, procesom koji je determinisan permeabilnošću. Vrednosti $\log P$ ili $\log D$ koje su manje od 0 odgovaraju hidrofilnim molekulima, koje karakteriše mala permeabilnost. Međutim, vrednosti ovih parametara iznad 3 su karakteristične za izrazito liposolubilne lekovite supstance usled čega njihova raspodela između ćelijske membrane i okolnog prostora (vodene sredine) ograničava permeaciju lekovite supstance kroz enterocite (Navia i Chaturvedi, 1996).

Joni nisu liposolubilni i ne prolaze kroz membranu, ali većinu lekovitih supstanci čine elektroliti, slabe kiseline ili slabe baze, pa pK_a lekovite supstance i pH na mestu resorpcije određuju stepen jonizacije, tj. količinu nejonizovane lekovite supstance koja će se resorbovati. Pored liposolubilnosti, transport lekovite supstance kroz zid intestinalnog lumena procesom pasivne difuzije, zavisi od veličine molekula (molekulske mase), kao i mogućnosti za građenje vodoničnih veza.

Kao što je već naglašeno, stepen i obim resorpcije lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta zavise od dva ključna faktora - rastvorljivosti i permeabilnosti. Dobra rastvorljivost lekovite supstance u vodenoj sredini gastrointestinalnog trakta je skoro uvek preduslov za dobru bioraspoloživost lekovite supstance nakon peroralne primene. Međutim, tokom izrade formulacija u kojima se povećava rastvorljivost lipofilnih supstanci, može doći do promene permeabilnosti, odnosno uticaja na resorpciju (Dahan i Miller, 2012). Prilikom povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance, najčešće dolazi do formiranja struktura koje su veće od molekula same lekovite supstance. Veličina čestica je važan faktor koji utiče na resorpciju lekovite supstance, naročito onih koji su loše rastvorljive u vodi ili biološkim tečnostima (Pokrajac, 2008). Kao posledica formiranja struktura koje su veće od molekula same lekovite supstance, potencijalno može nastati problem sa permeabilnošću ovakvih formulacija. Samo-dispergujući sistemi u GIT-u dovode do formiranja mikro-, nano-, ili grubih emulzija, ili stvaranja micela. Nastali koloidni nosači najčešće dovode do značajnog povećanja brzine rastvaranja i rastvorljivosti, ali

frakcija slobodne lekovite supstance koja prolazi kroz membranu je smanjena. Smanjena frakcija slobodne lekovite supstance dovodi do smanjenja koncentracionog gradijenta koji je termodinamička pokretačka sila za njen prolaz kroz membranu. Zato se smanjenje permeabilnosti sa povećanjem rastvorljivosti može pripisati uticaju slobodne frakcije lekovite supstance, odnosno može se posmatrati kao „protiv usluga“. Istraživanja pokazuju da do smanjenja permeabilnosti lekovite supstance iz formulacije samo-dispergujućih sistema, najčešće dolazi pri koncentraciji površinski aktivnih materija iznad kritične micelarne koncentracije. Međutim, određeni surfaktanti mogu uticati na permeabilnost usled interakcija sa membranom dovodeći do povećanja propustljivosti, ili inhibicijom efluksnih transportera. Iz tog razloga, pri formulaciji preparata čiji je osnovni cilj povećanje brzine rastvaranja i rastvorljivosti, treba utvrditi kako povećanje brzine rastvaranja i rastvorljivosti utiče na permeabilnost same lekovite supstance. Cilj razvoja formulacija, sa nisko rastvorljivim lekovitim supstancama, treba da bude uspostavljanje kompromisa između povećanja brzine rastvaranja i rastvorljivosti sa jedne i permeabilnosti sa druge strane, bez obzira na frakciju slobodne lekovite supstance, kako bi ukupni efekat primene ovakvih formulacija bio povećanje biološke raspoloživosti lekovitih supstanci (Löbenberg i Amidon, 2000; Dahan i Miller, 2012).

Testovi za procenu permeabilnosti lekovite supstance se mogu podeliti u tri velike kategorije: *in vitro*, *in vivo* i *in silico* testovi.

➤ *In vitro* testovi:

- Crne lipidne membrane (eng. Black lipid membrane (BLM)) (Avdeef, 2003; Mueller i sar., 1962);
- Primena mikrofiltera (Thompson i sar., 1982; Cools i Jansen, 1983)
- PAMPA test (eng. Parallel artificial membrane permeability assay) (Miller i sar., 2012; Dahan i Miller, 2012);
- DAMPA test (eng. Double artificial membrane permeability assay) (Kataoka i sar., 2014);
- Primena ćelijskih kultura (Caco-2 ćelije, MDCK ćelije, TC-7, HT29-MTX, 2/4/A1, T-84, LLC-PK1, A549) (Smetanova i sar., 2011; Breemen i Li, 2005; Grassi i sar., 2007; Irvine i sar., 1999)
- Ispitivanja na vrećicama od creva žaba (Trapani i sar., 2004).

- *In vivo* testovi:
 - *Log-I-Gut* testovi (Intubaciju humanim dobrovoljcima, uz pomoć savitljive sterilne cevi) (Lennernas i sar., 1992; Lipka i sar., 1998);
 - Ispitivanje na pacovima (Fagerholm i sar., 1996; Kale i sar., 2007);
 - Farmakokinetičke studije na ljudima (određivanje apsolutne biološke raspoloživosti; studije balansa mase (eng. *Mass Balance Studies*) (Roffey i sar., 2007).
- *In silico* metode podrazumevaju primenu određenih kompjuterskih programa, kao što su:
 - GastroPlus™ softver (ACAT model) (Grbić, 2011);
 - Simcyp® softver (ADAM model) (Jamei i sar., 2009; Kostewicz i sar., 2014);
 - PK-Sim® softver; Cloe® PK softver; Cloe® HIA softver; INTELLIPHARM® PKCR softver (modeli dinamičkog tipa) (Willmann i sar., 2003; 2004; Kostewicz i sar., 2014);
 - Upotreba molekulskih deskriptora (SMILES® kompjuterski program) (Stenberg i sar., 2002).

U nastavku ovog poglavlja biće prikazane karakteristike nekih od testova za procenu permeabilnosti lekovite supstance, koji se često koriste u razvoju formulacije farmaceutskih oblika za peroralnu primenu.

5.1. In vitro testovi za procenu permeabilnosti

Kao rezultat sticanja novijih saznanja o različitim aspektima intestinalne resorpcije i potrebe da se proceni uticaj različitih faktora na resorpciju lekovite supstance, a sa ciljem da se smanje ispitivanja na ljudima i životinjama, stalno se razvijaju i unapređuju *in vitro* modeli za procenu resorpcije lekovite supstance. *In vitro* modeli, kao što su monoslojevi Caco-2 ćelija poreklom iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma i epitelne ćelije bubrega koker španijela - MDCK ćelije (eng. Mardin-Darby canine kidney), široko se koriste sa veoma velikim uspehom u predviđanju resorpcije lekovite supstance nakon peroralne primene kod ljudi (Kataoka i sar., 2014). Zbog određenih prednosti, sve veći značaj imaju nećelijske *in vitro* metode, koje podrazumevaju primenu veštačkih membrana.

5.1.1. Primena Caco-2 ćelije u proceni permeabilnosti lekovite supstance

Caco-2 kultura ćelija dobija se od humanih epitelnih ćelija kolorektalnog adenokarcinoma. Tokom kultivisanja i diferencijacije ovih ćelija formiraju se čvrste veze, tako da ovim modelom može proceniti paracelularni prolazak ispitivanih supstanci. Pored toga, dolazi do eksprimiranja transportnih proteina, efluksnih proteina i enzima druge faze metabolizma, pa može poslužiti za modeliranje različitih transcelularnih puteva, kao i za metaboličke transformacije ispitivanih supstanci. Caco-2 ćelijski monosloj imitira crevni epitel, što je i pokazano različitim studijama. Jedna od funkcionalnih razlika između normalnih i Caco-2 ćelija je nedostatak ekspresije citohrom P450 izoenzima, posebno CYP3A4, koji je normalno prisutan u crevima u visokom procentu. Ipak, njegova povećana ekspresija može biti indukovana tretiranjem Caco-2 ćelija vitaminom D3 (Smetanova i sar., 2011; Breemen i Li, 2005; Dahan i sar., 2010).

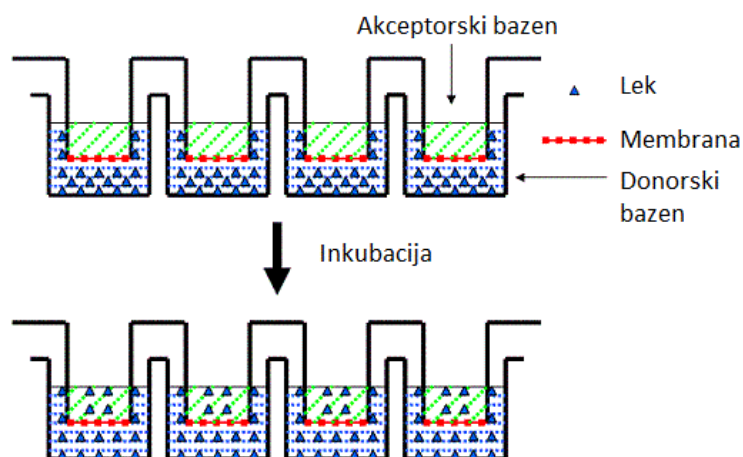
Brojne sličnosti Caco-2 ćelija sa enterocitima omogućavaju korišćenje ovog *in vitro* modela za predviđanje resorpcije lekovite supstance, putem više različitih mehanizama kao što su pasivna difuzija (transcelularno i paracelularno), pomoću nosača (aktivni transport, olakšana difuzija, efluks lekovite supstance) i transcitoza posredovana receptorom. Takođe, studijama koje su izvedene korišćenjem Caco-2 monosloja pokazan je visok stepen korelacije između vrednosti dobijenih ovom metodom i vrednosti za humanu resorpciju, što joj daje značajnu prednost u proceni permeabilnosti lekovitih supstanci (Smetanova i sar., 2011; Breemen i Li, 2005; Gershanik i sar., 2000).

Ono što je nedostatak ove metode jesu troškovi kultivisanja ćelija i dugo vreme trajanja testa, kao i velika varijabilnost u rezultatima dobijenim u različitim laboratorijama i sa ćelijama koje pripadaju različitim ćelijskim linijama (Prieto i sar., 2010). Takođe, na Caco-2 ćelijama se ne mogu eksprimirati svi transportni sistemi koji su prisutni u enterocitima, pa se ne može određivati permeabilnost supstanci koje su supstrati takvih transportera (Hilgendorf i sar., 2007).

5.1.2. Primena PAMPA testa u proceni permeabilnosti lekovite supstance

Prvi sistem za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci zasnovan na primeni PAMPA modela (*eng.* Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay) osmišljen je u kompaniji Hoffmann-La Roche (Kansy i sar., 1998). PAMPA predstavlja brz, jeftin i jednostavan metod, kojim se može ispitati permeabilnost lekovitih supstanci pasivnom difuzijom transcelularno. Simulacija bioloških membrana postiže se adekvatnim odabirom rastvarača i supstanci od kojih se formira veštačka membrana. Dugi niz godina PAMPA test se koristi za procenu permeabilnosti novosintetisanih lekovitih supstanci, a tek poslednjih godina je ova metoda počela da se istražuje kao metoda za procenu permeabilnosti lekovite supstance iz farmaceutskih oblika (Dahan i sar., 2010; Dahan i Miller, 2012).

Sistem za ispitivanje permeabilnosti primenom PAMPA testa se sastoji iz 96 „bazena“ (odeljaka) donorske i akceptorske ploče. Dno bazena akceptorske ploče izrađeno je od hidrofilnog poliviniliden difluorida (PVDF), koji ima ulogu nosača veštačke membrane. Donorski odeljak sadrži rastvor/suspenciju ispitivane supstance u pogodnom rastvaraču (vehikulumu), a akceptorski odeljak sadrži samo rastvarač (vehikulum). Spajanjem donorskog i akceptorskog odeljka formira se PAMPA „sendvič“ u kome se odvija difuzija ispitivane supstance kroz veštačku membranu u pravcu gradijenta koncentracije - iz donorskog u akceptorski odeljak (Slika 5.1.). U ovom ispitivanju se meri sposobnost lekovite supstance da difunduju iz bazena donorske u bazene akceptorske ploče kroz veštačku lipidnu membranu koja predstavlja alternativu membrani gastrointestinalnog trakta (Shahbazi i Santos, 2013).



Slika 5.1. Šema modela za izvođenje PAMPA testa.

PAMPA test i Caco-2 monosloj ćelija su različiti sistemi u tom smislu što prvi imitira samo pasivni transcelularni transport leka, dok Caco-2 u određenom stepenu oponaša dodatne mehanizme kao što su transport leka paracelularno (kroz čvrste veze između ćelija), aktivni transport preko transportera, kao i efluks leka dejstvom P-glikoproteina. Stoga se idealna korelacija između permeabilnosti veštačke membrane i Caco-2 monosloja ne može očekivati. Međutim, s obzirom na to da se većina lekovitih supstanci resorbuje pasivnim (ili delimično pasivnim) transcelularnim transportom, određeni stepen korelacije između ovih sistema postoji. To je i potvrđeno brojnim studijama. Jedna od njih utvrdila je visok stepen korelacije, između rezultata PAMPA testa i ispitivanja na Caco-2 ćelijama, gde je u PAMPA testu ispitivanje vršeno na pH vrednosti 7,4, a korišćeno je 49 model lekovitih supstanci. Kao prednost PAMPA testa istaknut je veliki kapacitet modela (96 bazena za simulaciju transporta), a veštačka membrana je potencijalno dostupnija za procenu u širem opsegu pH vrednosti u odnosu na Caco-2, što obezbeđuje bolju pokrivenost crevnog opsega pH vrednosti (Zhu i sar., 2002).

S obzirom na to da se pomoću Caco-2 monosloja predviđa pasivni i aktivni transport istovremeno, informacije dobijene njegovom primenom ne mogu se lako tumačiti bez rezultata PAMPA testa izvedenog sa istom lekovitom supstancom. Može se zaključiti da su ova dva testa komplementarna i trebalo bi ih paralelno koristiti za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci pasivnim i aktivnim transportom. Ovi testovi danas pronalaze primenu u proceni permeabilnosti leka iz formulacije (Kerns i sar., 2004).

Generalno, rezultati objavljeni u literaturi ukazuju na dobru korelaciju između rezultata dobijenih primenom PAMPA testa i korišćenjem Caco-2 ćelija, kao i primenom PAMPA testa i *in vivo* studija. Ovo ukazuje na potencijalnu mogućnost da se PAMPA test koristi za simulaciju *in vivo* koncentracija lekovite supstance u zavisnosti od vremena i kao test permeabilnosti za biofarmaceutsku klasifikaciju lekovitih supstanci kada je on u ranoj fazi otkrića (Sugano i sar., 2003).

Kao ključne prednosti PAMPA testa izdvajaju se sledeće karakteristike (Shahbazi i Santos, 2013; Augustijns i Brewster, 2007):

- jednostavan i brz test za procenu permeabilnosti lekovite supstance transcelularnim pasivnim transportom;
- dobra korelacija između podataka dobijenih primenom PAMPA testa i *in vivo* intestinalne resorpcije lekovitih supstanci koje se resorbuju pasivnim putem;
- kraće trajanje u poređenju sa *in vivo* modelima i *in vitro* modelima sa ćelijskim kulturama, pri čemu je mogućnost predviđanja resorpcije slična kao kod primene Caco-2 ćelija;
- ne spada u skupe tehnike;
- mogućnost ispitivanja uticaja pH na permeabilnost, podešavanjem pH rastvora koji se koristi u ispitivanju;
- mogućnost automatizacije procesa.

Međutim, PAMPA test ima i određene nedostatke (Shahbazi i Santos, 2013; Augustijns i Brewster, 2007):

- nemogućnost predviđanja resorpcije lekovitih supstanci preko transportera, efluksnih sistema i paracelularnom difuzijom, odnosno aktivnim i paracelularnim transportom;
- nema intracelularnog rastvora, ne odražava uticaj intracelularnog pH na supstance koje jonizuju.

Zbog nepostojanja standardnog PAMPA modela za procenu permeabilnosti lekovite supstance, u svetu se istražuju različiti modeli. Grupa naučnika iz Japana, Sugano i sar. (2001) proučavali su korelaciju između bio-mimetičkog PAMPA modela (sadrži sastav lipida sličan sastavu četkastog pokrova membrane ćelija intestinuma) u kombinaciji sa određenom matematičkom funkcijom i vrednosti za humanu intestinalnu permeabilnost,

na 18 lekovitih supstanci koje su poslužile kao model. Mikrofilter Roche-ovog modela je impregniran rastvorom lecitina iz jaja u dodekanu. Rezultati studija sprovedenih u Roche-u pokazali su da postoji korelacija između koeficijenata permeabilnosti dobijenih PAMPA testom i vrednosti permeabilnosti u organizmu za supstance koje prolaze mehanizmom pasivne difuzije. Postoji i nekoliko modifikacija kao što su Novartis-ov PAMPA model (polikarbonatni filteri impregnirani heksadekanom) (Wohnsland i Faller, 2001), Chugai model (membrana impregnirana rastvorom smeše fosfolipida u 1,7-oktadienu) (Sugano i sar., 2001), model Aventis-a (specijalni hidrofilni filteri sa malom moći vezivanja proteina u medijumu dobijenom rastvaranjem lecitina iz jaja u dodekanu) (Zhu i sar., 2002) i pION modeli (sistem sličan Roche-ovom, sa određenim izmenama i mogućnošću određivanja vremena zadržavanja u membrani; za impregnaciju su korišćene različite mešavine lipida) (Avdeef i sar., 2001).

PAMPA test se dugi niz godina koristio u proceni permeabilnosti novosintetisanih lekovitih supstanci, a tek poslednjih godina dobijeni su obećavajući rezultati u ispitivanju permeabilnosti lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika i savremenih nosača.

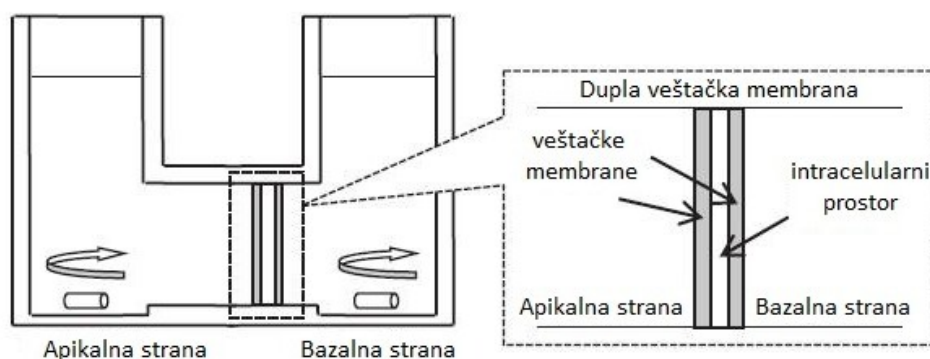
5.1.3. Primena DAMPA testa u proceni permeabilnosti lekovite supstance

Iz potrebe da se unapredi i da se prevaziđu neki od nedostataka PAMPA testa, kao i da se izbegne korišćenje ćelijskog modela, Caco-2 monosloja, grupa naučnika iz Japana osmislila je tzv. DAMPA test (*eng.* Double artificial membrane permeability assay), a prvi rezultati ovog testa objavljeni su 2014. godine (Kataoka i sar., 2014). Naime, kod PAMPA testa supstance prolaze kroz jedan lipidni sloj. Kada jedinjenje prolazi kroz ćelijsku membranu transcelularno postoje dva procesa permeacije:

- kroz spoljašnju membranu u intracelularni prostor;
- iz intracelularnog prostora kroz unutrašnju membranu.

Ponašanje, odnosno difuzija nejonizovanih supstanci kroz jednu veštačku membranu može simulirati resorpciju iz gastrointestinalnog trakta, što je slučaj kod PAMPA testa. S druge strane, smatra se da intracelularni pH (fiziološki pH 7,4), utiče na permeaciju jonizovanih supstanci iz intracelularnog prostora kroz spoljašnju membranu. Stoga, za

predviđanje intestinalne permeabilnosti jonizovanih jedinjenja treba razmotriti ovaj uticaj i to je bio cilj izvedenog DAMPA testa. Kataoka i sar. ispitivali su permeabilnost 20 lekovitih supstanci, kiselih i baznih, primenom DAMPA testa na fiziološkom pH (spoljašnji 6,5; intracelularni i unutrašnji 7,4) (Slika 5.2.). Dobijeni rezultati ukazuju na to da je permeabilnost svih 20 ispitivanih supstanci u dobroj korelaciji sa izračunatim faktorom koji pokazuje njihovu permeabilnost *in vivo*. Za sada je utvrđeno da DAMPA model, kao simulacija ćelijskog modela, u kombinaciji sa određenim matematičkim funkcijama, može da zameni Caco-2 monosloj ćelija kako bi se skratilo vreme izvođenja i smanjili troškovi vezani za kultivisanje ćelija (Kataoka i sar., 2014).



Slika 5.2. Šema modela za izvođenje DAMPA testa (prilagođeno iz Kataoka i sar., 2014).

Prednosti DAMPA testa su (Kataoka i sar., 2014):

- dobijena je dobra korelacija sa uslovima *in vivo* kada su u pitanju supstance koje jonizuju;
- može da zameni Caco-2 ćelijski monosloj kako bi se skratilo vreme i smanjili troškovi vezani za kultivisanje ćelija;
- s obzirom na to da sistem sadrži intracelularni prostor, može se proceniti:
 - efekat esterazama-posredovane hidrolitičke aktivacije na resorpciju proleka nakon peroralne primene;
 - metabolizam lekovite supstance tokom intestinalne resorpcije.

S obzirom da je DAMPA test, do sada korišćen samo u jednom istraživanju, potrebno je optimizovati uslove kao što su sastav lipida sa obe strane veštačke membrane i sastav intracelularnog rastvora, kako bi ovaj obećavajući test našao širu primenu. (Kataoka i sar., 2014).

5.2. *In silico* metode da procenu permeabilnosti lekovite supstance

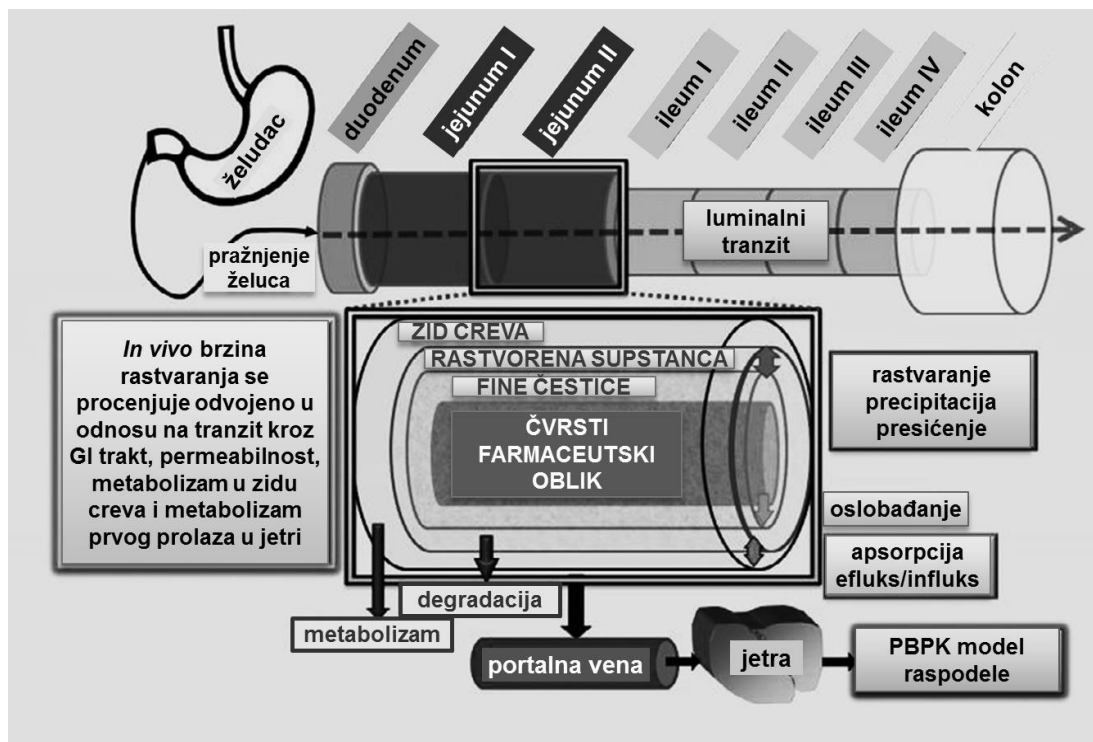
Poslednje dve decenije sa razvojem informacionih tehnologija, javila se potreba da se laboratorijska *in vitro* i *in vivo* ispitivanja delimično zamene, ili eventualno upotpune *in silico* metodama. *In silico* modeli za procenu permeabilnosti, odnosno resorpcije lekovite supstance, podrazumevaju različite matematičke modele i algoritme koji na osnovu određenih ulaznih parametara (fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, fizioloških parametara, osobina farmaceutskog oblika, *in vitro* rezultata ispitivanja brzine rastvaranja) predviđaju vrednosti koje predstavljaju željene ishode ispitivanja (maksimalna koncentracija leka u plazmi (C_{max}), vreme postizanja C_{max} (t_{max}), vrednosti „površine ispod krive“ (PIK), koncentracije lekovite supstance u pojedinim tkivima).

5.2.1. Simcyp[®] kompjuterski program

Simcyp[®] kompjuterski program (*eng.* Simcyp[®] Population-based ADME Simulator Certara[™], SAD) predstavlja jedan od osnovnih softvera u koje su implementirani principi ADAM modela (*eng.* Advanced Dissolution Absorption and Metabolism). Prema ADAM modelu, GIT je podeljen na devet anatomskih celina, počevši od želuca, zaključno sa kolonom (Slika 5.3.). Resorpcija lekovite supstance iz svakog segmenta se opisuje kao funkcija oslobađanja lekovite supstance iz preparata, njenog rastvaranja, precipitacije, luminalne degradacije, permeabilnosti, metabolizma, transporta i prelaza iz jednog segmenta u drugi.

Vreme zadržavanja farmaceutskog oblika u želucu i kolonu su definisani na osnovu srednjeg vremena zadržavanja u ovim regionima. Vreme prolaska leka kroz svaki segment tankog creva zavisi od ukupnog vremena zadržavanja u tankom crevu i proporcionalno je dužini određenog segmenta (Jamei i sar., 2009; Kostewicz i sar., 2014).

Modelovanje preko Simcyp[®] programa se zasniva na primeni različitih diferencijalnih jednačina. U zavisnosti od složenosti odabranog modela (npr. jednodimenzionalni model ili PBPK model za određeni set organa), kombinuje se nekoliko stotina diferencijalnih jednačina da bi se izvršila samo jedna simulacija (Jamei i sar., 2013).



Slika 5.3. Struktura ADAM modela (prilagođeno iz Kostewicz i sar., 2014).

Simcyp[®] softver koristi nekoliko grupa faktora prilikom modelovanja (Jamei sar., 2009; Jamei sar., 2013):

➤ Fiziološke parametre

- vreme praznjenja želuca;
- vreme prolaska farmaceutskog oblika kroz tanko crevo;
- pH vrednost u različitim delovima GIT-a;
- promena volumena tečnosti u toku vremena;
- enzimska razgradnja u zidu creva;
- aktivnost intestinalnih transportera;
- protok krvi kroz intestinalno tkivo;
- uticaj hrane.

➤ Osobine lekovite supstance

- rastvorljivost i brzina rastvaranja;
- permeabilnost;
- transport i metabolizam u zidu tankog creva;
- luminalna degradacija.

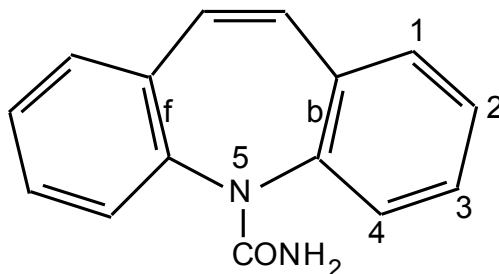
➤ Faktore formulacije

- veličina čestica lekovite supstance;
- vrsta preparata (trenutno ili modifikovano oslobađanje lekovite supstance).

Ono što izdvaja Simcyp[®] program od ostalih paketa za ADME simulaciju, kod kojih bazični moduli uglavnom služe za predviđanje biološke raspoloživosti lekovite supstance kod „prosečnog“ ispitanika, je to što Simcyp[®] prilikom svake simulacije uzima u obzir varijabilnost u fiziološkim faktorima između različitih subjekata. Pri tome je za izabranu grupu ispitanika/pacijenata potrebno definisati uzrast, pol, rasu, genetska svojstva i, eventualno, zdravstveno stanje (prisustvo bolesti), kao i da li se lek uzima „na gladno“ ili u „stanju sitosti“ (Jamei sar., 2009; Jamei sar., 2013).

6. Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina

Karbamazepin (5H-dibenzo[b,f]azepin-5-karboksamid) je derivat dibenzoazepina, po svojoj strukturi sličan tricikličnim antidepresivima, a može se posmatrati i kao derivat karboksamida (Registar lekova 2014; Radulović i sar., 2005). Koristi se u lečenju epilepsije i to kod parcijalnih napada i primarno generalizovanih tonično-kloničnih napada, u terapiji bipolarnih afektivnih poremećaja i trigeminalne neuralgije (Ugrešić i sar., 2011). Struktura karbamazepina prikazana je na slici 6.1. (Radulović i sar., 2005).



Slika 6.1. Strukturna formula karbamazepina.

U monografiji karbamazepina u Ph. Eur. 8.0 se navodi da je molekulska formula karbamazepina $C_{15}H_{12}N_2O$ i molarna masa 236,27 g/mol. To je beo ili skoro beo kristalan prašak, bez mirisa, bez ukusa ili blago gorkog ukusa, gotovo nerastvorljiv u vodi. Karbamazepin je praktično nerastvorljiv u etru, a rastvorljiv je u etanolu i hloroformu u odnosu 1:10. Za identifikaciju karbamazepina se koristi tačka topljenja, koja je u rasponu temperatura od 189°C do 193°C, kao i poređenje IR spektara (Ph. Eur. 8.0; Martindale, 2014).

Karbamazepin je supstanca slabo baznog karaktera. Zbog visoke vrednosti konstante disocijacije, pKa između 13 i 14 (Talukder i sar., 2011; Tadkaew i sar., 2010; Queiroz i sar., 2008) ne jonizuje u fiziološkom opsegu pH vrednosti pa se može reći da ima pH nezavisnu rastvorljivost. Takođe, eksperimentalno dobijeni podaci za rastvorljivost karbamazepina u medijumima različite pH vrednosti su pokazali da pH vrednost u opsegu fizioloških pH 1,2-9 ne utiče na rastvorljivost karbamazepina (Grbić, 2011).

Prema kriterijumima BSK-a pripada klasi II, koja se odlikuje niskom rastvorljivošću i visokom permeabilnošću. Eksperimentalni podaci za rastvorljivost karbamazepina u vodi na 25 °C značajno variraju od 0,113 mg/ml (Sethia i sar., 2002) do 0,26 mg/ml (Loftsson i sar., 2006). Vrednost za logaritam particionog koeficijenta oktanol/voda je takođe varijabilna i kreće se od 2,45 (Sethia i sar., 2002) do 2,673 (Lu i sar., 2009).

Karbamazepin kao visoko permeabilna supstanca ima relativno visoku bioraspoloživost (80%), a u procentu od 75% se vezuje za proteine plazme. Maksimalne koncentracije u plazmi dostižu se u proseku nakon 6 sati, nakon primene pojedinačne doze. Volumen distribucije iznosi 1-2 l/kg. U jetri se intenzivno metaboliše, pri čemu nastaje karbamazepin 10,11-epoksid, koji dalje u organizmu podleže hidroksilaciji, glukuronidaciji i konjugaciji. Karbamazepin je induktor CYP3A4 izoenzima, tako da je kod ponovljene primene, usled autoindukcije metabolizma, smanjena koncentracija u plazmi i skraćeno poluvreme eliminacije. Poluvreme eliminacije karbamazepina nakon pojedinačne primene je oko 36 sati, a kod ponovljene primene od 16 do 24 sata (Grbić, 2011; Martindale, 2014).

Karbamazepin pokazuje izraženi polimorfizam, naročito pri farmaceutsko-tehnološkim operacijama usitnjavanja i mešanja, kao i pri svim operacijama koje uključuju zagrevanje uzorka (Hickey i sar., 2007; Otsuka i sar., 1997, 1999; Rahman i sar., 2011). Poznata su četiri polimorfna oblika i bar jedan dihidratni oblik (Kaneniwa i sar., 1987). Različiti polimorfni oblici pokazuju različitu biološku raspoloživost (Kobayashi i sar., 2000; Xu i sar., 2011). Grzesiak i sar. (2003) su primenom diferencijalno skenirajuće kalorimetrije ispitivali stabilnost četiri različita polimorfna oblika karbamazepina. Utvrdili su da je najstabilniji polimorfni oblik III, a za njim slede oblici I, IV i II. Važno je istaći da je razlika u stabilnosti mala i da iznosi 0,7 kcal/mol između najstabilnijeg i najmanje stabilnog oblika (Grzesiak i sar., 2003). Takođe, u literaturi se navodi i da polimorfni oblik III ima najveću rastvorljivost (Kobayashi i sar., 2000).

Radi procene polimorfnog oblika lekovite supstance i međusobnih interakcija između lekovite supstance i pomoćnih supstanci u sastavu formulacije koriste se sledeće analitičke tehnike (Grzesiak i sar., 2003; Kobayashi i sar., 2000; Lazarevic i sar., 2014; Milovic i sar., 2012):

- Termogravimetrijska analiza (*eng.* Thermal Gravimetric Analysis (TGA));

- Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*eng.* Differential Scanning Calorimetry (DSC));
- Mikroskopija na vrućoj ploči (*eng.* Hot Stage Microscopy (HSM));
- Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (*eng.* Powdered X-Ray Diffraction (PXRD));
- Ramanova spektroskopija;
- Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (*eng.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR));
- Skenirajuća elektronska mikroskopija (*eng.* Scanning Electron Microscopy (SEM));
- Transmisiona elektronska mikroskopija (*eng.* Transmission Electron Microscopy (TEM)).

Karbamazepin je supstanca na kojoj se mnogo istraživalo i koja je dosta opisana u literaturi, ali zbog specifičnih karakteristika ove supstance, u ovoj doktorskoj disertaciji je korišćena kao model supstanca:

- Supstanca niske rastvorljivosti, a visoke permeabilnosti (BSK klasa II), cilj je formulacijom farmaceutskog oblika povećati brzinu rastvaranja/rastvorljivost, uz očuvanje ili povećanje permeabilnosti same lekovite supstance;
- Niska rastvorljivost i vrednost $\log P$ oko 2,5, čine ovu supstancu dobrim kandidatom za formulaciju lipidnih sistema tipa II, IIIa, IIIb i IV;
- Reč je o visokodoziranoj lekovitoj supstanci (pojedinačna doza 200 mg), izazov je razviti čvrst samo-dispergujući nosač, adekvatne mase, sa ovako visokodoziranom supstancom;
- Posедуje više polimorfni oblika i pod uticajem procesnih i formulacionih parametara, kao i uslova čuvanja preparata može da prelazi iz jednog u drugi polimorfni oblik, pri čemu je samo jedan kristalni oblik, polimorfni oblik III farmakološki aktivan;
- Zbog amfifilne strukture utiče na proces samo-dispergovanja u medijumu;
- Poseduje usku terapijsku širinu i izražene toksične efekte, koji se mogu minimizirati odgovarajućim oslobađanjem lekovite supstance iz farmaceutskog oblika.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

7. Ciljevi istraživanja

Sveobuhvatni cilj ove doktorske disertacije jeste formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom, uz korišćenje prirodnih i sintetskih adsorpcionih nosača. Ovaj cilj će biti realizovan kroz 4 faze eksperimentalnog rada i više pojedinačnih ciljeva.

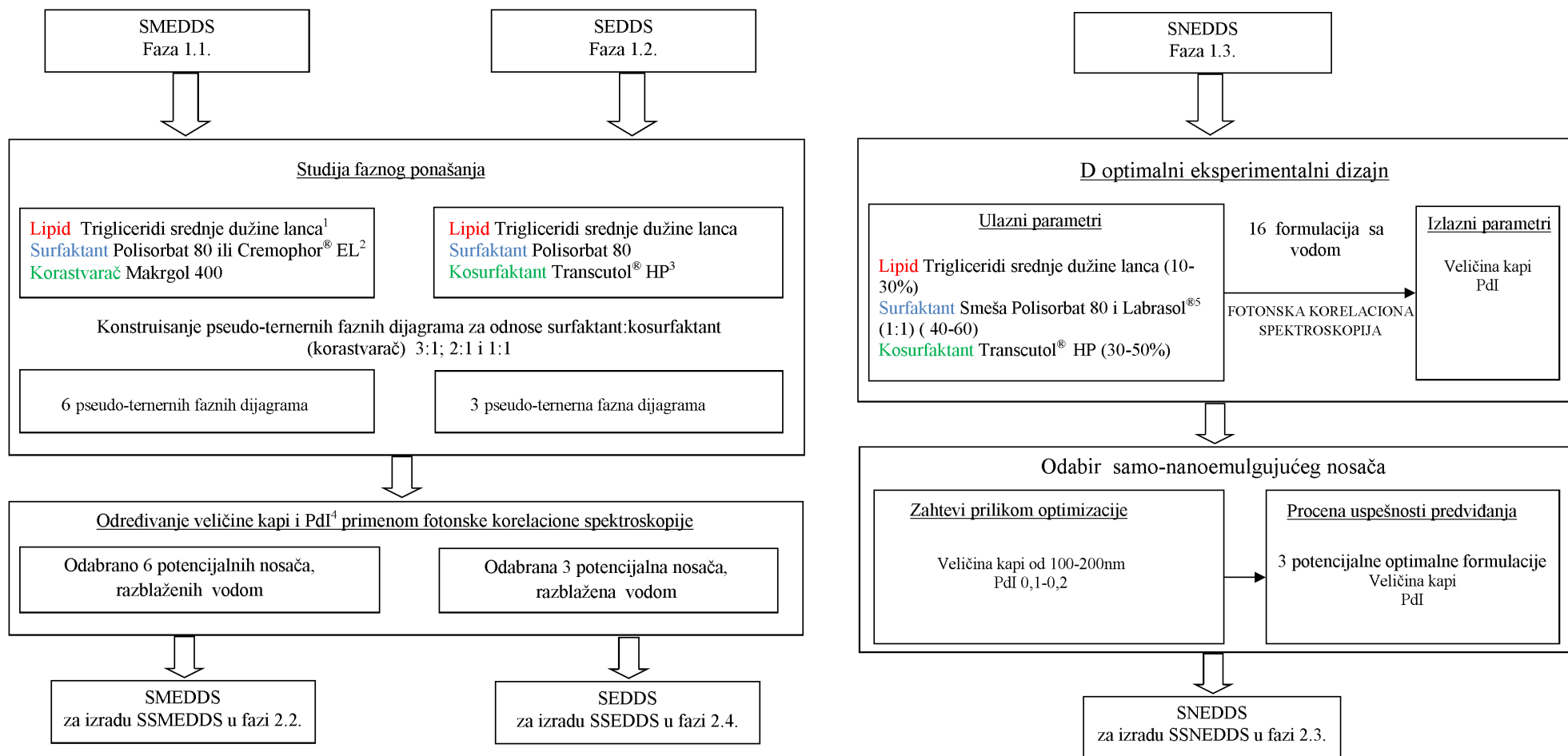
- Cilj prve faze eksperimentalnog rada bio je ispitivanje uticaja koncentracije i fizičko-hemijskih osobina ulja, surfaktanata i kosurfaktanata (korastvarača) na mogućnost dobijanja samo-dispergujućih nosača lekovite supstance. Cilj je bio da se studijama faznog ponašanja i konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama, kao i primenom eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, odaberu tečni samo-mikroemulgujući, samo-nanoemulgujući i samo-emulgujući nosači, koji će u narednoj fazi istraživanja biti korišćeni za izradu čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom.
- Cilj druge faze eksperimentalnog rada bio je formulacija, izrada i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa visokim udelom karbamazepina korišćenjem prirodnih i sintetskih adsorpcionih nosača na bazi silicijum-dioksida i magnezijum-aluminometasilikata. Cilj ovog dela istraživanja bila je procena uticaja vrste i udela adsorpcionog nosača, kao i vrste tečnog samo-dispergujućeg nosača i metode izrade (metoda direktne adsorpcije ili metoda uparavanja) na brzinu rastvaranja i stabilnost karbamazepina.
- Cilj treće faze eksperimentalnog rada bio je procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih čvrstih samo-dispergujućih sistema, korišćenjem *in vitro* testa (PAMPA test) i *in silico* metode (Simcyp[®] kompjuterski program).
- Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada bila je procena mogućnosti primene dve različite metode (brzog hlađenja otopljene mase i granulacije topljenjem) u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom. Cilj prvog dela ove faze bio je da se izvrši formulacija i karakterizacija surfaktantnih sistema dobijenih metodom brzog hlađenja otopljene mase. Cilj drugog dela ove faze bio je da se izvrši formulacija i karakterizacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, dobijenih komprimovanjem granulata izrađenog

metodom topljenja, koji u svom sastavu sadrži samo-dispergujući nosač. Cilj ove faze je bio i da se ispita mogućnost primene tehnika eksperimentalnog dizajna u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom.

EKSPERIMENTALNI DEO

8. Formulacija i karakterizacija tečnih samo-dispergujućih nosača lekovite supstance (Faza 1.)

U prvoj fazi istraživanja izvršen je odabir tečnih samo-dispergujućih nosača, koji su u drugoj fazi korišćeni za formulisanje čvrstih samo-dispergujućih nosača sa karbamazepinom. Cilj ove faze bio je da se ispita mogućnost primene različitih kombinacija ulja/surfaktanata/kosurfaktanata (korastvarča) za izradu tečnih samo-dispergujućih nosača, kao i da se odaberu nosači različitog disperziteta (samo-emulgujući, samo-nanoemulgujući i samo-mikroemulgujući nosači), kako bi se u narednoj fazi procenio uticaj stepena disperziteta samo-emulgujućeg nosača na brzinu oslobađanja i permeabilnost lekovite supstance. U ovoj fazi primenjene su metode konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama i eksperimentalnog dizajna - dizajna smeše (*engl.* Mixture design) u određivanju faznog ponašanja samo-dispergujućih nosača. U fazama 1.1. i 1.2 je korišćena tehnika konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama, gde je smeši ulja, surfaktanta i kosurfaktanta dodavana vodena faza u kapima. Promene u sistemu su praćene vizuelno, što ovu dugotrajnu metodu čini prilično nepouzdanom. Iz tog razloga, u fazi 1.3. ispitana je potencijalna mogućnost primene eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, u odabiru tečnog samo-dispergujućeg nosača, kao alternativa konstruisanju pseudo-ternernih faznih dijagrama. Na osnovu rezultata ove faze rada odabrani su tečni samo-dispergujući nosači, koji su u kasnijim fazama korišćeni za izradu čvrstih samo-dispergujućih sistema. Prvi deo istraživanja se odvijao kroz više faza i plan eksperimenata je prikazan na slici 8.1.



Slika 8.1. Plan eksperimenata prve faze.

¹ Mygliol® 812; ² Makrogolglicerol ricinooleat;

³ Dietilen-glikolmonoetiletar; ⁴ Indeks polidisperziteteta;

⁵ PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi.

Materijali korišćeni u prvoj fazi eksperimentalnog rada

Pomoćne supstance korišćene u prvoj fazi eksperimentalnog rada, u formulaciji tečnih samo-dispergujućih nosača, njihovi farmakopejski nazivi, zaštićeni nazivi, proizvođači, kao i drugi nazivi koji se koriste u literaturi, i uloge u formulacijama prikazani su u tabeli 8.1. Voda korišćena u studijama faznog ponašanja i prilikom razblaživanja samo-dispergujućih nosača za određivanje veličine kapi i indeksa polidisperziteta, bila je visoko prečišćena voda.

Tabela 8.1. Pomoćne supstance korišćene u prvoj fazi eksperimentalnog rada

Farmakopejski naziv	Zaštićeni naziv, proizvođač	Ostali nazivi	Uloga u formulacijama
Trigliceridi srednje dužine lanca	Mygliol [®] 812; Sasol GmbH, Nemačka	Kaprilno-kaprinski trigliceridi	Uljana faza u svim formulacijama
Makrogol-glicerol ricinooleat	Cremophor [®] EL; BASF, Nemačka	PEG glicerol ricinooleat	Surfaktant u fazi 1.1.
Polisorbat 80	Polisorbat 80; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka	Tween [®] 80 Polioksietilen-(20)-sorbitan monooleat	Surfaktant u fazi 1.1.
Dietilen-glikolmonoetiletar	Transcutol [®] HP, Gattefosse Batch, Francuska		Kosurfaktant u fazama 1.2. i 1.3.
Makrogol-8 kaprilno/kaprinski gliceridi	Labrasol [®] , Gattefosse Batch, Francuska	PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi	Surfaktant u fazi 1.3.
Makrogol 400		Polietilenglikol 400 (PEG 400)	Korastvarač u fazi 1.1.

8.1. Odabir tečnog samo-mikroemulgujućeg nosača za kombinacije trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL /Makrogol 400 (Faza 1.1.)

U fazi 1.1. eksperimentalnog rada izvršen je odabir tečnog samo-mikroemulgujućeg nosača, za kombinacije trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/ Cremophor[®] EL /Makrogol 400. Cilj ove faze bio je da se uporede dva surfaktanta Polisorbat 80 i Cremophor[®] EL, u stabilizaciji samo-mikroemulgujućih nosača lekovite supstance, kao i da se odaberu adekvatni odnosi uljana faza/surfaktant/korastvarač za izradu samo-mikroemulgujućih nosača.

8.1.1. Metode

8.1.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL/Makrogol 400

Pri formulaciji tečnog samo-mikroemulgujućeg nosača lekovite supstance ispitivana je mogućnost primene Cremophor[®]-a EL i Polisorbat-a 80 kao potencijalnih surfaktanata, u odnosu sa korastvaračem (Makrogol 400) 3:1, 2:1 i 1:1. Odnosi surfaktanta/korastvarača, koji su ispitivani, su određeni na osnovu preliminarnih ispitivanja. Kao uljana faza korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanca.

Surfaktantnu fazu činili su smeša surfaktanta i korastvarača u definisanom odnosu. Prethodno pripremljene surfaktantne smeše, upotrebljene su za pripremu smeša sa uljanom fazom u odnosima 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 i 9:1. Za svaki pojedinačan odnos surfaktanta i korastvarača, u okviru surfaktantne faze izrađeno je deset smeša sa uljanom fazom. Kako su ispitivana dva surfaktanta (Cremophor[®] EL i Polisorbat 80) i tri odnosa surfaktant/korastvarač (3:1, 2:1 i 1:1), ukupno je izrađeno 60 smeša surfaktant/korastvarač/uljana faza. Smešama surfaktant/korastvarač/ulje dodavana je visoko prečišćena voda u kapima na sobnoj temperaturi, uz mešanje na magnetnoj mešalici (IKAmag, IKA Staufen, Nemačka), u cilju uspostavljanja ravnoteže

u sistemu. Tok titracije praćen je vizuelno i uočavane su promene izgleda sistema od transparentnog do opalescentnog ili zamućenog, odnosno definisane su granice oblasti mikroemulzija. Tokom dodavanja vodene faze, sistemi ostaju transparentni sve dok koncentracija vode ne premaši kapacitet izrađenih smeša (uljana faza, surfaktant, korastvarač) za solubilizaciju vodene faze, tj. gornju granicu oblasti transparentnih sistema, nakon čega dolazi do zamućenja. Na početku titracije, dolazi do emulgovanja vode u dati sistem i formiranja V/U emulzija, a nakon dodavanja većih količina vode, uz blago mešanje, došlo do inverzije i formiranja U/V emulzija. Za dalje razmatranje odabrani su sistemi koji su bili sve vreme bistri (pretpostavlja se da je u pitanju mikroemulzija) (Haus, 2007; Đekić i sar., 2011).

Nakon konstruisanja pseudo-ternernih faznih dijagrama odabrano je 6 nosača, kod kojih je došlo do najmanjih promena tokom titracije vodom. Sistemi su nakon izrade razblaženi visoko prečišćenom vodom (u odnosu samo-dispergujući sistem/voda 10:90 (m/m)) i izmešani na mešalici (Vortex mixer VI plus, Boeco, Nemačka). Da bi došlo do stabilizacije sistema čuvani su 72h na sobnoj temperaturi i nakon toga im je primenom fotonske korelacione spektroskopije određena veličina kapi i polidisperzitet.

8.1.1.2. Određivanje veličine kapi i polidisperziteta emulzija primenom fotonske korelacione spektroskopije

Veličina kapi i polidisperzitet emulzija određivana je tehnikom fotonske korelacione spektroskopije pri čemu je korišćen uređaj Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija), na temperaturi od $20 \pm 0,1$ °C. Uređaj je opremljen He-Ne laserom koji generiše upadnu koherentnu monohromatsku svetlost talasne dužine 633 nm. Svetlost rasuta nakon prolaska kroz kivetu sa uzorkom detektuje se pod uglom od 90 °. Rad uređaja je integrisan sa softverom (Dispersion Technology Software, DTS). Dobijeni rezultati prikazani su kao prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperziteta (PDI), tri uzastopna merenja.

8.1.2. Rezultati i diskusija

8.1.2.1. Fazno ponašanje pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL/Makrogol 400

Tokom titracije vodom, uočeno je da su sistemi u kojima je odnos surfaktant/korastvarač 3:1 pri odnosu uljana faza/surfaktantna faza 1:9 bili sve vreme transparentni. Kod sistema sa većim udelom uljane faze tokom titracije dolazilo do pojave opalescencije i potom do potpunog zamućenja. Konstruisani su pseudo-ternerni dijagrami za ispitivane sisteme (Slika 8.2. i Slika 8.3.). Duž linija na pseudo-ternernim dijagramima prikazani su sistemi ulje/surfaktant/korastvarač/voda koji su ispitani i koji su sve vreme bili bistri, homogeni i transparentni. Tačke u faznom dijagramu predstavljaju koncentraciju vodene faze u sistemu, pri kojim dolazi do promena, i povezane su linijama koje olakšavaju sagledavanje oblasti jednofaznih transparentnih sistema. Osenčena oblast predstavlja pretpostavljene mikroemulzione regione. Na konstruisanim faznim dijagramima sistema u kojima je odnos surfaktant/korastvarač 3:1 (Slike 8.2. c i 8.3. c), bez obzira na upotrebljeni surfaktant, može se uočiti da se pri ovom odnosu surfaktanta i korastvarača formira kontinuirana oblast mikroemulzija. Ovakav tip oblasti mikroemulzije predstavlja U-tip mikroemulzija. Mikroemulzioni sistemi U-tipa su veoma značajni za formulaciju nosača lekovitih supstanci tipa mikroemulzija i samo-mikroemulgujućih nosača lekovitih supstanci, jer se mikroemulzije mogu formirati u širokom rasponu koncentracija vodene, uljane i surfaktantne faze, tako da se mogu pripremiti i formulacije koncentrata mikroemulzija koje se mogu kontinuirano razblaživati vodenom fazom bez narušavanja termodinamičke stabilnosti (Garti i sar., 2006; Mehta i sar., 2009).

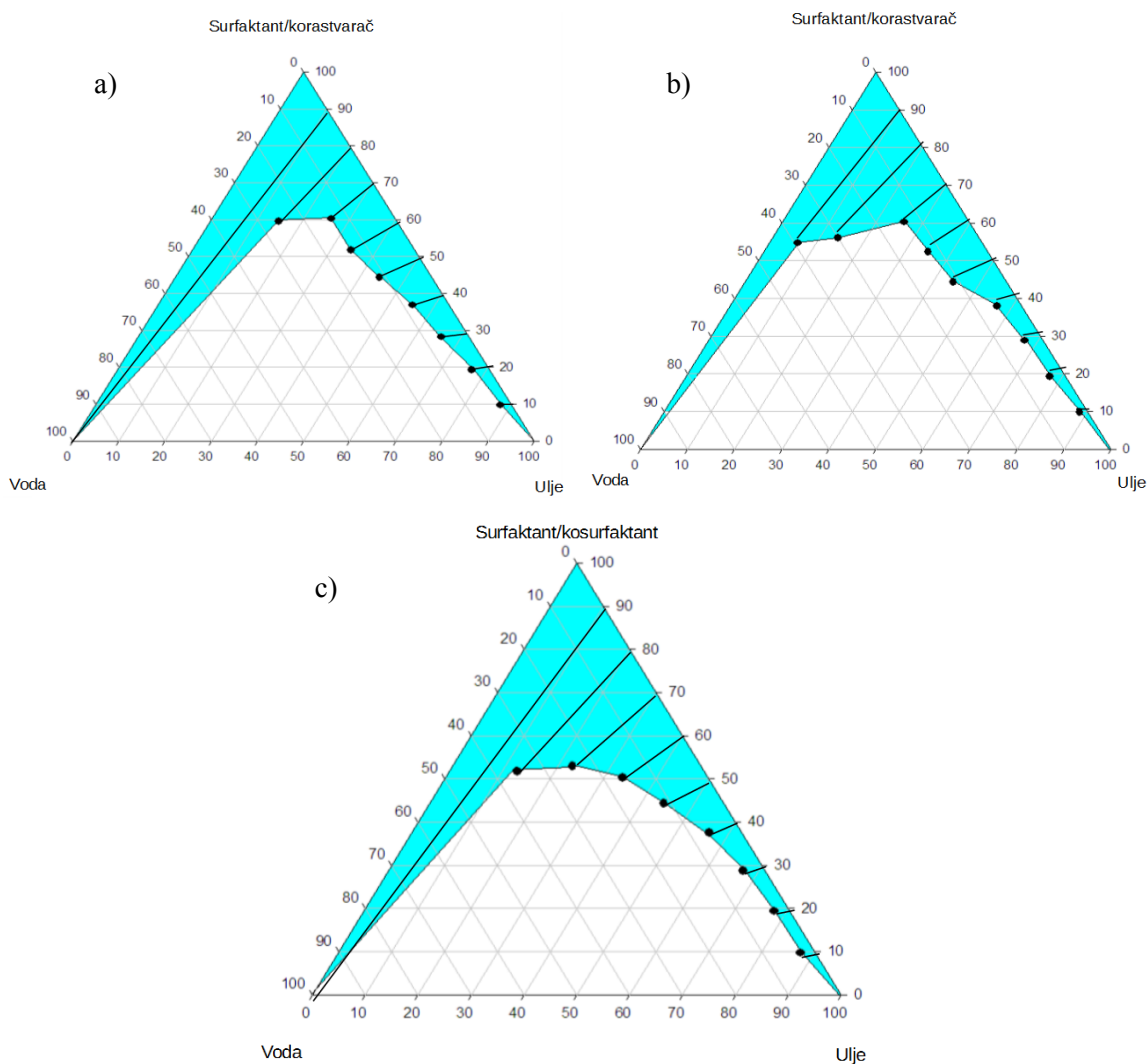
Oba sistema sa odnosom surfaktant/korastvarač 3:1 pri odnosu uljana faza/surfaktantna faza 1:9 (za oba ispitivana surfaktanta) (Slike 8.2. c i 8.3. c) tokom titracije vodom su sve vreme bili transparentni. Takođe i sistem sa odnosom Polisorbat 80/makrogol 400 1:1 (Slika 8.2. a), pri odnosu uljana faza/surfaktantna faza 1:9, tokom titracije vodom je bio sve vreme bistar. Može se pretpostaviti, da ovi sistemi sa malim dodatkom vode daju V/U mikroemulzije, koje sa dodatkom veće količine vodene faze prelaze u stabilne U/V mikroemulzije. Kod svih ostalih izrađenih smeša uljana/surfaktantna faza, uočava

se nakon dodatka određene količine vode, gubitak transparentnosti sistema i pojava zamućenja, ili mlečno bele boje. Sa povećanjem udela uljane faze u sistemu, zamućenje ili mlečno bela boja se javlja pri nižim udelima vodene faze. Na osnovu toga se može pretpostaviti da se kod ovih sistema formiraju samo V/U mikroemulzije, koje pri daljem razblaženju vodom gube termodinamičku stabilnost i prelaze u nano-, odnosno grube emulzije (Haus, 2007; Đekić i sar., 2011).

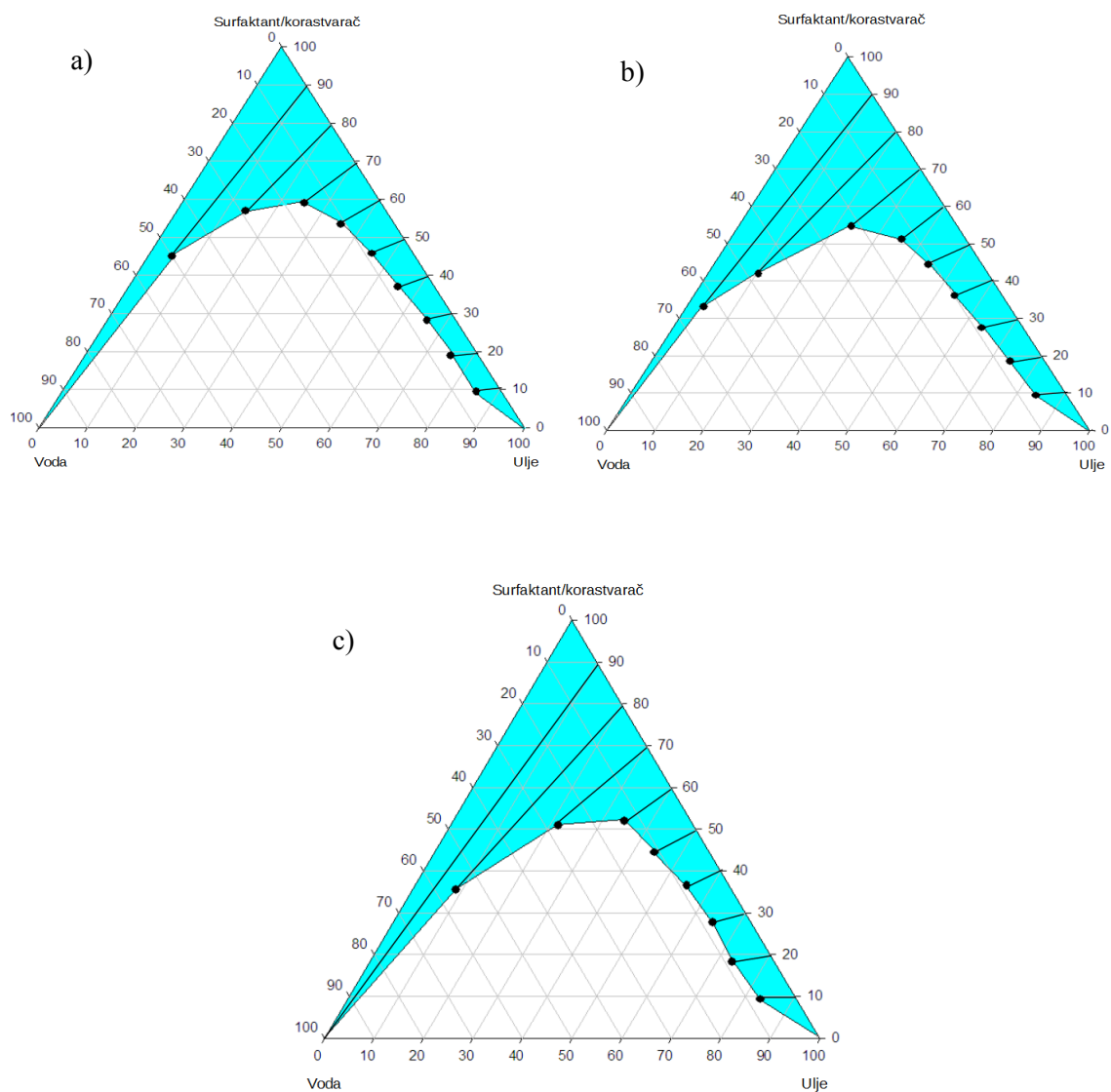
Sistemi sa odnosima surfaktant/korastvarač 2:1 i 1:1 formiraju uže mikroemulzione oblasti od sistema surfaktant/korastvarač 3:1.

Iz konstruisanih faznih dijagrama može se videti da sistem u kome se kao surfaktant koristi Cremophor[®] EL (Slika 8.3.) daje nešto širu mikroemulzionu oblast, u poređenju na sistem u kome je kao surfaktant korišćen Polisorbat 80 (Slika 8.2.). Na osnovu razlike u HLB vrednosti upotrebljenih surfaktanata (Cremophor[®] EL HLB 14, Polisorbat 80 HLB 15) očekivano je da sistem u kome je Polisorbat 80 upotrebljen kao surfaktant daje širu mikroemulzionu oblast. Međutim, razlike u širini mikroemulzione oblasti posledica su razlike u hemijskoj strukturi korišćenih surfaktanata, ali i složenosti izrađenih emulzija. Pokazano je da je solubilizaciona moć surfaktanata veća ukoliko ima veću hidrofilnu glavu i duži hidrofobni rep (Kahlweit, 1999; Sjöblom i sar., 1996). Sa povećanjem hidrofobnog karaktera, kritična micelarna koncentracija (KMK) se smanjuje u vodenom medijumu. Kod ispitivanih surfaktanata, Cremophor[®] EL ima duži hidrofobni region i veću hidrofilnu glavu, u poređenju sa Polisorbat-om 80. Takođe, sa povećanjem broja jedinica etilen-oksida u molekulu surfaktanta, dolazi do smanjenja KMK. Ovaj efekat se javlja usled voluminoznih hidrofobnih grupa u molekulu, koje stvaraju skoro paralelan raspored molekula surfaktanata u miceli. (Rosen, 2004). Kako Cremophor[®] EL sadrži od 33 do 36 etilen-oksidnih jedinica, a Polisorbat 80 u svojoj strukturi ima 20 etilen-oksidnih jedinica, ovo je još jedan od razloga zašto Cremophor[®] EL ima nižu KMK i zašto samo-emulgujućim nosačima sa njim daju širu mikroemulzionu oblast u odnosu na samo-emulgujuće nosače Polisorbat-om 80.

Zbog šire mikroemulzione oblasti koje daju nakon razblaženja vodom, a samim tim i potencijalno veće stabilnosti, sistemi sa odnosom surfaktant/korastvarač 3:1, za oba surfaktanta, su odabrani za dalje razmatranje.



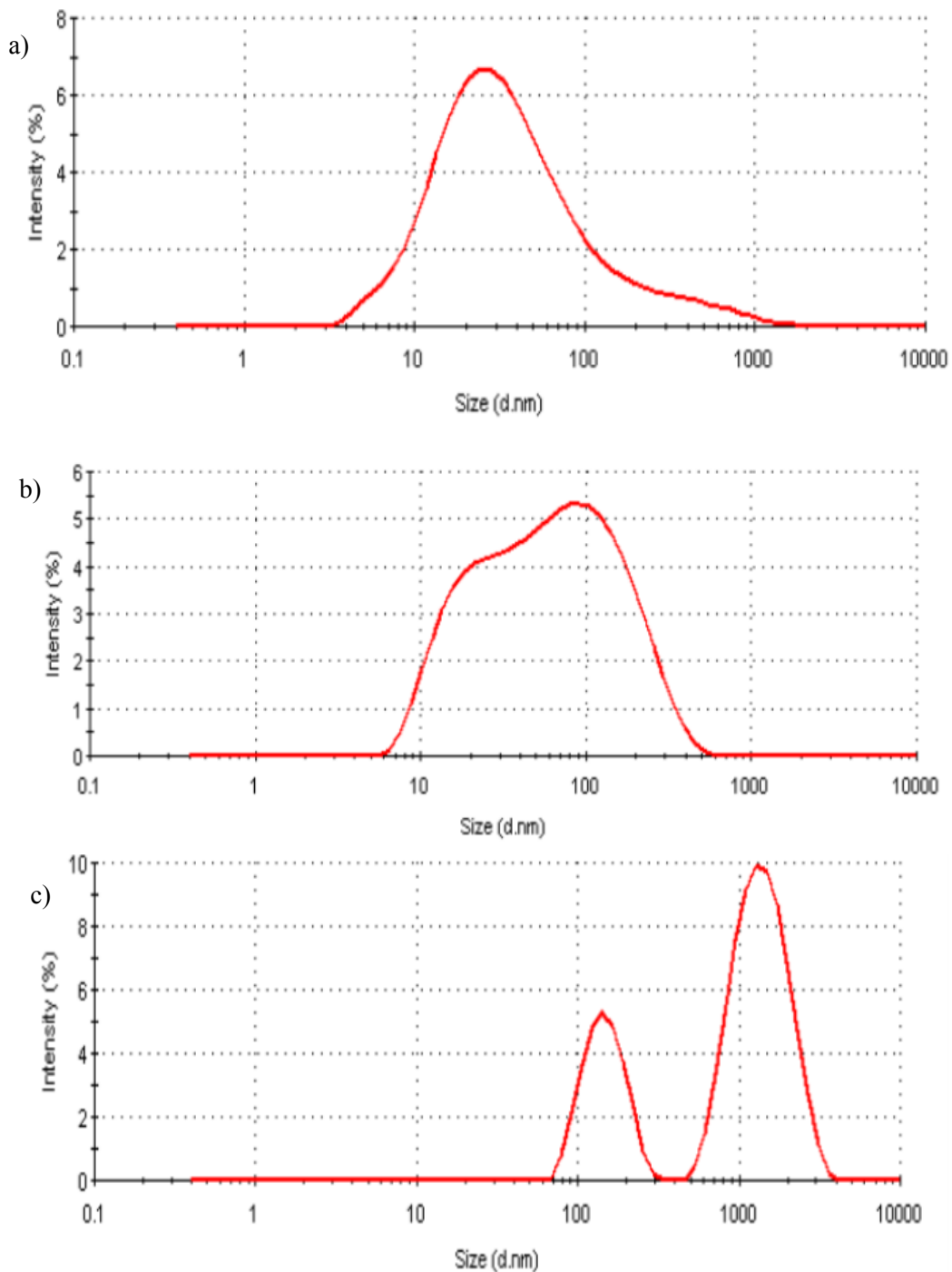
Slika 8.2. Pseudo-ternerni fazni dijagram za sisteme voda/ Polisorbat 80/makrogol 400/ trigliceridi srednje dužine lanca, pri odnosu Polisorbat 80/makrogol 400: a) 1:1; b) 2:1; c) 3:1. Duž linija je predstavljena ispitivana oblast mikroemulzije. Obojena oblast je predviđena oblast mikroemulzija.



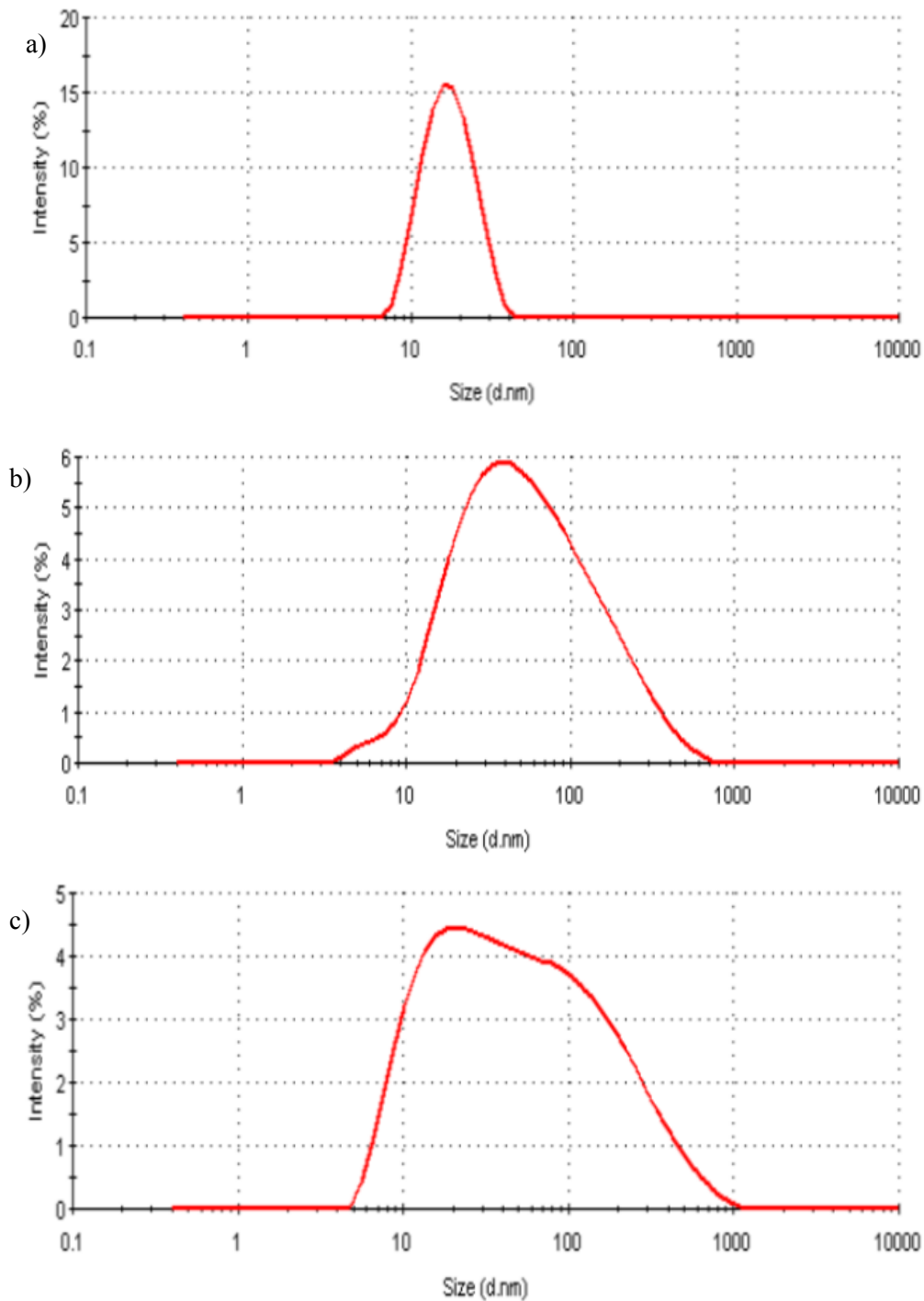
Slika 8.3. Pseudo-ternerni fazni dijagram za sistem voda/ Cremophor[®] EL/makrogol 400/ trigliceridi srednje dužine lanca, pri odnosu Cremophor[®] EL/makrogol 400: a) 1:1; b) 2:1; c) 3:1. Duž linija je predstavljena ispitivana oblast mikroemulzije. Obojena oblast je predviđena oblast mikroemulzija.

8.1.2.2. Uticaj odnosa lipid/surfaktantna faza na veličinu kapi i indeks polidisperziteta emulzija

Određivanje veličine kapi i indeksa polidisperziteta izvedena je kod uzoraka emulzija dobijenih razblaživanjem samo-emulgujućih sistema vodom, u kojima je odnos surfaktant/korastvarač 3:1, za oba ispitivana surfaktanta. Pripremljeni su uzorci u kojima je odnos uljane i surfaktantne faze bio 1:9, 2:8 i 3:7. Krive raspodele veličine kapi, prema intenzitetu, ispitivanih mikroemulzija date su na slikama 8.4. i 8.5. Na krivoj raspodele veličine kapi za uzorak sa Polisorbat-om 80 i odnosom uljane i surfaktantne faze 3:7 (Slika 8.4. c) uočava se heterogena raspodela sa dva razdvojena pika, koji odgovaraju frakcijama kapi čija se veličina značajno razlikuje, tako da prosečna veličina kapi nema realan značaj. Na krivoj raspodele veličine kapi za uzorak sa Cremophor[®]-om EL u kome je odnos uljane i surfaktantne faze 1:9, (Slika 8.5. a) uočen je jedan intenzivan pik, sa veličinom kapi ispod 100 nm. Ravna bazna linija i strma funkcija ukazuju na malu veličinu kapi i nizak indeks polidisperziteta. Ostali uzorci (Slika 8.4. a i b; Slika 8.5. b i c) pokazuju unimodalnu raspodelu veličine kapi, ali sa širokim intervalom veličine kapi. Široka raspodela veličine kapi, koja ukazuje na potencijalnu nestabilnost ovih sistema, najverovatnije je posledica nedovoljne koncentracije surfaktanta i korastvarača na međupovršini između uljane i vodene faze, što dovodi do destabilizacije mikroemulzionog sistema, ukрупnjavanja sitnih kapi, a samim tim i široke raspodele veličine kapi. Razlika u solubilizacionoj aktivnosti korišćenih surfaktanata objašnjene su u poglavlju 8.1.2.1. Pošto je Cremophor[®] EL snažniji solubilizator od Polisorbat-a 80 verovatno u manjoj meri migrira sa međupovršine u vodenu fazu pri čemu doprinosi očuvanju integriteta međupovršinskog filma i stabilizaciji sistema (Kahlweit, 1999; Sjöblom i sar., 1996; Rosen, 2004).



Slika 8.4. Raspodela veličine prečnika kapi (size (d. nm) prema intenzitetu (Intensity (%)) emulzije dobijene razblaživanjem samo-emulgujućeg sistema vodom, u odnosu 10:90 (m/m). Samo-emulgujući sistem čine: trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/makrogol 400, pri odnosu Polisorbat 80/makrogol 400 3:1, a odnos uljana faza/surfaktantna faza: a) 1:9; b) 2:8; c) 3:7.



Slika 8.5. Raspodela veličine prečnika kapi (size (d. nm) prema intenzitetu (Intensity (%)) emulzije dobijene razblaživanjem samo-emulgujući sistem vodom, u odnosu 10:90 (m/m). Samo-emulgujući sistem čine: trigliceridi srednje dužine lanaca/ Cremophor[®] EL /makrogol 400, pri odnosu Cremophor[®] EL/makrogol 400 3:1, a odnos uljana faza/surfaktantna faza: a) 1:9; b) 2:8; c) 3:7.

Tabela 8.2. Prosečne vrednosti veličine kapi (nm) i indeksa polidisperziteta (PdI) ispitivanih emulzija

Surfaktant	Odnos		PdI
	Uljana/surfaktantna faza	Veličina kapi (nm)	
Cremophor [®] EL	1:9	17,66 ± 0,17	0,104 ± 0,005
Cremophor [®] EL	2:8	82,51 ± 3,24	0,439 ± 0,014
Cremophor [®] EL	3:7	93,40 ± 5,86	0,488 ± 0,021
Polisorbat 80	1:9	75,34 ± 3,26	0,410 ± 0,034
Polisorbat 80	2:8	85,95 ± 5,87	0,488 ± 0,035
Polisorbat 80	3:7	1448 ± 7,36 (71,4%)	0,752 ± 0,041
		149,5 ± 6,82 (28,6%)	

*Kao uljana faza u svim formulacijama korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanca, a kao korastvarač makrogol 400. Odnos surfaktant/korastvarač, u okviru surfaktantne faze, u svim formulacijama bio je 3:1.

Vrednosti prosečne veličine kapi kao i indeksa polidisperziteta ispitivanih emulzija navedene su u tabeli 8.2. Prosečna veličina kapi svih uzoraka, osim uzorka koji pokazuje bimodalnu raspodelu, je u opsegu veličina kapi mikroemulzija (<100 nm). Sistem sa odnosom uljana/surfaktantna faza 1:9 i Cremophor[®]-om EL kao surfaktantom ima najmanje kapi od svega 17,66 nm i najmanju vrednost PdI, što ukazuje na potencijalno najveću stabilnost ovog sistema. Svi ostali uzorci pokazuju visok indeks polidisperziteta, što se dovodi u direktnu vezu sa destabilizacijom sistema na granici oblasti mikroemulzija. Sistem sa Polisorbat-om 80, kao surfaktantom, i odnosom uljana/surfaktantna faza 3:7 ima bimodalnu raspodelu. Kod ovog sistema se uočava jedna frakcija (28,6% ukupnog broja kapi) sa manjom veličinom kapi od oko 150 nm i jedna frakcija (71,4% ukupnog broja kapi) u kojoj je veličina kapi oko 1450 nm, koja je posledica ukрупnjavanja sitnijih kapi. Na nestabilnost ovog sistema ukazuje i najviša vrednost PdI od 0,752.

Na osnovu dobijenih rezultata za veličinu kapi i indeksa polidisperziteta emulzija, kao najpogodniji tečni samo-mikroemulgujući nosač, odabran je uzorak sa odnosom ulje/surfaktantna faza 1:9, gde surfaktantnu fazu čine Cremophor[®] EL i Makrogol 400 u odnosu 3:1. Ovaj sistem je korišćen u fazi 2.2. eksperimentalnog

rada (poglavlje 9.2.), za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom.

8.2. Odabir tečnog samo-emulgujućeg nosača za kombinaciju trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/ Transcutol[®] HP (Faza 1.2.)

U fazi 1.2 eksperimentalnog rada odabran je tečni samo-emulgujući nosač izrađen od triglicerida srednje dužine lanaca/Polisorbat-a 80/Transcutol[®]-a HP. Na osnovu rezultata faze 1.1. (poglavlje 8.1.) utvrđeno je da sistem koji se sastojao od triglicerida srednje dužine lanaca/Polisorbata 80/Makrogola 400 nakon razblaživanja vodom daje emulzije sa visokom vrednošću PdI, što ukazuje na potencijalnu nestabilnosti ovih emulzija. Cilj ove faze je bio da se ispita uticaj kosurfaktanta Transcutol[®] -a HP na stabilizaciju samo-emulgujućih nosača, kao i da se uporedi njegova efikasnost u odnosu na korastvarač Makrogol 400 i da se odabere jedan samo-emulgujući nosač za izradu čvrstog samo-emulgujućeg sistema sa karbamazepinom (faza 2.4; poglavlje 9.4.).

8.2.1. Metode

8.2.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP i određivanje veličine kapi i indeksa polidisperziteta

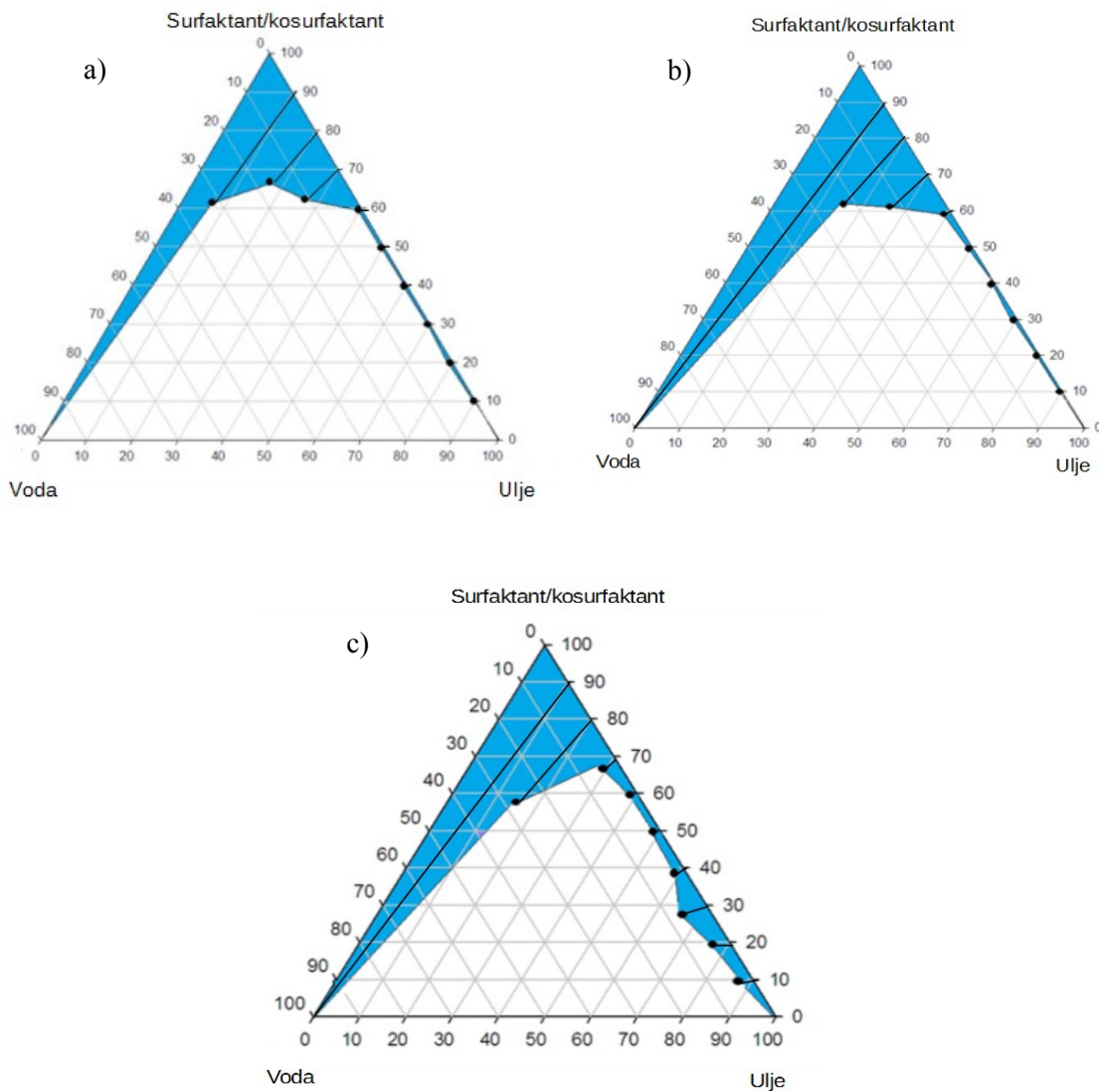
Ispitivanje faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP izvedeno je na način opisan u poglavlju 8.1.1.1. U okviru surfaktantne faze ispitana su tri odnosa surfaktant/kosurfaktant (Polisorbat 80/Transcutol[®] HP) 3:1, 2:1 i 1:1. Izrađeno je ukupno 30 smeša surfaktant/kosurfaktant/uljana faza. Ove smeše su titrirane visoko prečišćenom vodom i na osnovu dobijenih rezultata konstruisana su tri pseudo-ternerna fazna dijagrama. Nakon toga su odabrana dva samo-emulgujuća sistema, kojima je nakon razblaživanja visoko prečišćenom vodom određena veličina kapi i indeks polidisperziteta na način opisan u poglavlju 8.1.1.2.

8.2.2. Rezultati i diskusija

8.2.2.1. Fazno ponašanje pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/ Transcutol® HP

Na slici 8.6. su prikazani pseudo-ternerni fazni dijagrami za sisteme trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol® HP. Duž linija na pseudo-ternernim dijagramima prikazani su sistemi ulje/surfaktant/kosurfaktant/voda koji su ispitani i koji su bili bistri, homogeni i transparentni i za koje se može pretpostaviti da se radi o mikroemulzijama. Osenčena oblast predstavlja pretpostavljeni mikroemulzioni region. Tačke na dijagramima predstavljaju udele komponenata sistema pri kojima dolazi do pojave zamućenja.

Kod sva tri ispitivana sistema uočena je uska mikroemulziona oblast. Sistemi sa odnosima surfaktant/kosurfaktant 3:1 i 2:1 (Slika 8.6. b; c) pri odnosu uljana/surfaktantna faza 1:9, pri titraciji vodom su sve vreme bili bistri. Za ove sisteme se može pretpostaviti da se radi o mikroemulzijama, tačnije da sa malim dodatkom vode daju V/U mikroemulzije koje dodatkom veće količine vodene faze prelaze u stabilne U/V mikroemulzije (Haus, 2007; Đekić i sar., 2011). Pri ova dva odnosa surfaktant/kosurfaktant (3:1 i 2:1), pri odnosu uljana/surfaktanta faza 2:8 tokom titracije sistema vodom uočena je blaga opalescencija. Pri većim udelima uljane faze nakon dodatka par kapi vode dolazi do pojave opalescencije ili mlečno bele boje. Ovo ukazuje verovatno na činjenicu da kod ovih sistema dolazi do formiranja samo V/U mikroemulzija, koje pri daljem razblaženju vodom gube termodinamičku stabilnost i prelaze u nano-, odnosno grube emulzije (Haus, 2007; Đekić i sar., 2011). Sistem sa odnosom surfaktant/kosurfaktant 1:1 (Slika 8.6. a) daje značajno užu mikroemulzionu oblast u odnosu na sisteme sa odnosom surfaktant/kosurfaktant 2:1 i 3:1 (Slika 8.6. b; c). Ovaj sistem (sa odnosom surfaktant/kosurfaktant 1:1) nije dao transparentan i stabilan sistem ni pri jednom odnosu uljane i surfaktantne faze, tokom čitave titracije vodom. Sličan uticaj Transcutol®-a na fazno ponašanje sistema sa različitim uljima i surfaktantima uočen je i u studijama Hua i sar. (2004 a, b), Parikh i Ghosh (2005) i Zhang i sar. (2004), pri čemu je istaknuto da je za širenje oblasti mikroemulzija stabilizovanih nejonskim surfaktantima uz Transcutol® kao kosurfaktant, poželjno da udeo surfaktanta bude veći u odnosu na kosurfaktant.



Slika 8.6. Pseudo-ternerni fazni dijagram za sistem voda/ Polisorbat 80 / Transcutol[®] HP / trigliceridi srednje dužine lanca, pri odnosu Polisorbat 80/ Transcutol[®] HP: a) 1:1; b) 2:1; c) 3:1. Duž linija je predstavljena ispitivana oblast mikroemulzije. Obojena oblast je predviđena oblast mikroemulzija.

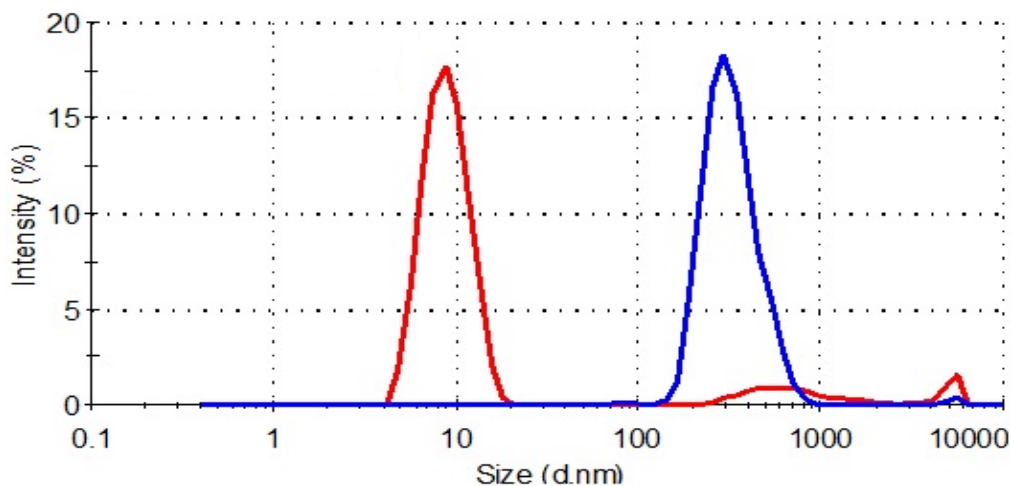
Prema preporuci direktive EMA iz 2013. godine Transcutol[®] P, ali i visoko prečišćeni Transcutol[®] HP, u preparatima za peroralnu primenu može dovesti do potencijalnih neželjenih dejstava, zbog prisustva etilenglikola koji se može javiti kao nečistoća. Udeo etilenglikola prema preporukama u Transcutol[®]-u treba biti manji od 0,1% (EMA, 2013). Iako se u specifikaciji za Transcutol[®] HP navodi da je dozvoljeno prisustvo etilenglikola u izrazito niskom procentu (manje od 20 ppm), udeo Transcutola[®] HP u

finalnoj formulaciji treba svesti na minimum (Elektronska baza podataka v). Uz to, kako pri odnosu surfaktant/kosurfaktant 2:1 nije uočena šira mikroemulziona oblast u odnosu na odnos 3:1, **za dalja ispitivanja je korišćen sistem u kome je odnos Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1.**

8.2.2.2. Veličina kapi i indeks polidisperznosti odabranih formulacija

Za merenje veličine kapi unutrašnje faze nastalih emulzija i indeksa polidisperznosti (PdI) odabrani su sistemi sa odnosom Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1 i odnosom uljana/surfaktantna faza 1:9 i 2:8. Rezultati merenja veličine kapi unutrašnje faze prikazani su na slici 8.7. Sistem sa odnosom uljana/surfaktantna faza 1:9 imao je malu veličinu kapi oko 9 nm, dok je sistem sa odnosom 2:8 imao veće kapi od 332,7 nm, ali je takođe kod ovog sistema postignuta unimodalna distribucija 99,5% kapi unutrašnje faze. Zanimljivo je, da je sistem sa odnosom uljana/surfaktantna faza 2:8 imao nižu vrednost PdI (0,210) u odnosu na sistem sa odnosom 1:9 (PdI 0,263). Iako se na osnovu izmerenih vrednosti PdI može zaključiti da oba ispitivana uzorka imaju vrlo homogenu veličinu kapi (PdI < 0,3), niža vrednost PdI ukazuje na to da je sistem sa odnosom uljana/surfaktantna faza 2:8 ima nešto veću stabilnost. Nešto viša vrednost PdI pri većem udelu surfaktantne faze na prvi pogled nije očekivana, ali verovatno predstavlja posledicu koalescencije izrazito sitnih kapi koje su detektovane kao frakcija malog intenziteta na 747,7 nm (Slika 8.7.). Povećanje veličine kapi pri odnosu uljana/surfaktantna faza 2:8 u poređenju sa sistemom u kome je odnos ulje/surfaktantna faza 1:9 povezano je sa povećanjem sadržaja uljane faze i verovatno formiranjem ulje-u-vodi emulzije. Zanimljivo je primetiti i da pri povećanju udela uljane faze, integritet filma surfaktant/kosurfaktant ostaje sačuvan i da raspodela veličine kapi ostaje veoma uska. Poređenjem pseudo-ternernih sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400 (faza 1.1.; poglavlje 8.1.) i trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP (faza 1.2.) (Slika 8.2. i Slika 8.6.) utvrđeno je da se korišćenjem Transcutol[®]-a HP dobija sistem sa značajno nižom vrednošću PdI i sa uniformnijom raspodelom veličine kapi, što ukazuje na potencijalno veću stabilnost ovog sistema. Pri odnosu uljana/surfaktantna faza 1:9 uz primenu Makrogola 400 veličina kapi je 75,34 nm, a PdI 0,410; dok je primenom Transcutol[®]-a HP dobijena veličina kapi od 9 nm, a PdI je 0,263. Pri odnosu uljana/surfaktantna faza 2:8 uz

primenu Makrogol-a 400 veličina kapi je 85,95 nm, a PDI 0,488; dok su primenom Transcutol[®]-a HP dobijene nešto veće kapi od 332,7 nm, međutim ovaj sistem je imao relativno nisku vrednost PDI od 0,210, što ukazuje potencijalno na njegovu visoku stabilnost.



Slika 8.7. Raspedela veličine prečnika kapi (size (d. nm) prema intenzitetu (Intensity (%)) emulzije dobijene razblaživanjem samo-emulgujućeg sistem vodom. Samo-emulgujući čine: trigliceridi srednje dužine lanaca/ Polisorbat 80/Transcutol[®] HP, pri odnosu Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1, a odnos uljana/surfaktantna faza 1:9 (crvena kriva), odnosno 2:8 (plava kriva).

Na osnovu rezultata ove faze, za izradu čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom (faza 2.4.; poglavlje 9.4.), odabran je pseudo-ternerni sistem sa odnosom Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1 i odnosom uljana/surfaktantna faza 2:8.

8.3. Odabir tečnog samo-nanoemulgujućeg nosača primenom dizajna smeše za kombinacije trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/ Transcutol[®] HP (Faza 1.3.)

U fazi 1.2. (poglavlje 8.2.) utvrđeno je da se korišćenjem trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP može formulirati samo-emulgujući nosač, koji nakon razblaživanja vodom daje emulziju sa sitnim kapima i niskom vrednošću indeksa polidisperznosti. Cilj ove faze bio je da se ispita mogućnost formiranja samo-nanoemulgujućeg nosača, kao i da se proceni uticaj udela komponenti samo-emulgujućeg sistema na veličinu kapi i PDI, pri čemu je umesto jednog surfaktanta (Polisorbat 80) u prethodnoj fazi, korišćena smeša surfaktanata Polisorbat-a 80 i Labrasol[®]-a u odnosu 1:1. Cilj ove faze je bio i da se izvrši odabir sistema primenom eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, pri čemu je cilj bio i da se ispita širi opseg vrednosti odnosa surfaktant/kosurfaktant, kao i da se odabere stabilan sistem sa većim udelom uljane faze, koji bi potencijalno imao veću bezbednost pri peroralnoj primeni. Na osnovu rezultata ove faze odabran je jedan samo-nanoemulgujući nosač koji je u fazi 2.3. (poglavlje 9.3.) korišćen za izradu čvrstog samo-nanoemulgujućeg sistema sa karbamazepinom.

8.3.1. Metode

8.3.1.1. Formulacija tečnog samo-nanoemulgujućeg sistema

Primenom optimizacione tehnike, dizajna smeše, uz pomoć kompjuterskog programa *Design Expert[®]* (version 8.0.7.1, Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, SAD), definisan je D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše koju čine tri komponente, sastojci samo-emulgujućeg sistema (SEDDS): uljana faza (A - trigliceridi srednje dužine lanaca), surfaktant (B – smeša Polisorbat 80 i Labrasol[®] u odnosu 1:1) i kosurfaktant (C - Transcutol[®] HP). Ove tri komponente predstavljaju ulazne parametre i njihov ukupan udeo je 100%. Granične vrednosti udela (opsezi) ovih komponenti postavljene su na osnovu prethodno izvedenih preliminarnih ispitivanja (Tabela 8.3.).

Primenom D-optimalnog eksperimentalnog dizajna dobijen je eksperimentalni plan (Tabela 8.4.), koji se sastojao od 16 predloženih formulacija SEDDS.

Tabela 8.3. Granične vrednosti udela komponenti u formulaciji tečnih samo-emulgujućih nosača

Granična vrednost	A	B	C
	Trigliceridi srednje dužine lanaca	Polisorbat 80/ Labrasol® (1:1)	Transcutol® HP
Donja (%)	10	40	30
Gornja (%)	30	60	50

Nakon razblaživanja 16 izrađenih SEDDS sa visoko prečišćenom vodom u odnosu 10:90 (m/m) i mešanja na mešalici (Vortex mixer V1 plus, Boeco, Nemačka), sistemi su čuvani na sobnoj temperaturi 72h radi stabilizacije. Dobijenim emulzijama određene su veličina kapi (Y_1) i indeks polidisperziteta (Y_2), kao izlazni parametri. Merenje veličine kapi i indeksa polidisperziteta izrađenih emulzija izvršeno na način opisan u poglavlju 8.1.1.2.

8.3.1.2. Modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom dizajna smeše

Primenom D-optimalnog eksperimentalnim dizajna, moguće je dobiti odgovarajući matematički model, koji opisuje uticaj udela komponenata SEDDS-a kao nezavisno promenljivih, na veličinu kapi i PdI, kao zavisno promenljivih. Modeli, koje je moguće dobiti su:

$$\textit{linearni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C \quad (8.1.)$$

$$\textit{kvadratni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC \quad (8.2.)$$

$$\textit{specijalni kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC \quad (8.3.)$$

$$\textit{kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC + \gamma_{12}AB(A-B) + \gamma_{13}AC(A-C) + \gamma_{23}BC(B-C) \quad (8.4.)$$

gde su b_1 - b_{123} i γ_{12} - γ_{23} koeficijenti, koji pokazuju uticaj nezavisno promenljivih, kao i njihovih međusobnih interakcija na vrednost zavisno promenljive. Vrednosti

koeficijenata izračunavane su regresionom analizom, korišćenjem softvera *Design Expert*[®].

Matematički model, tj. finalna jednačina, razmatra L-Pseudo vrednosti ulaznih parametara (A, B, C), koje se kreću od 0 do 1. Vrednost 0 se dodeljuje donjoj granici, a vrednost 1 gornjoj granici ulaznih parametara, dok se sve ostale vrednosti izračunavaju iz sledećih jednačina:

Trigliceridi srednje dužine lanaca (A)

$$A_{1(L-Pseudo)}=(A_1-10)/20 \quad (8.5.)$$

Polisorbat 80: Labrasol[®] (1:1) (smeša surfaktanata) (B)

$$B_{1(L-Pseudo)}=(B_1-40)/20 \quad (8.6.)$$

Transcutol[®] HP (kosurfaktant) (C)

$$C_{1(L-Pseudo)}=(C_1-30)/20 \quad (8.7.)$$

gde su A_1 , B_1 i C_1 bilo koje vrednosti udela uljane faze, surfaktanta i kosurfaktanta, redom, u okviru postavljenih granica.

Matematički model koji najbolje opisuje vezu između ulaznih i izlaznih parametara bira se na osnovu poređenja nekoliko statističkih parametara, uključujući standardnu devijaciju (Sd), koeficijent višestruke korelacije (R^2), prilagođen koeficijent višestruke korelacije (prilagođeni R^2). Vrednosti za R^2 i prilagođeni R^2 za odabrani model treba da budu veće u odnosu na druge modele, dok vrednost standardne devijacije treba da bude manja. Kompromisom između postavljenih zahteva vrši se odabir pogodnog matematičkog modela.

Nakon dobijanja modela izvršena je optimizacija sa zahtevima da veličina kapi bude od 100 do 200 nm, a PdI od 0,1 do 0,2. Pod ovim uslovima, dva odgovora su kombinovana tako da se odredi optimizaciona oblast i dobije samo-nanoemulgujući sistem (SNEDDS) sa niskom vrednošću PdI, što potencijalno ukazuje na visoku stabilnost ovog sistema. Iz različitih delova optimizacione oblasti odabrane su tri formulacije SNEDDS-a, kojima

je nakon razblaživanja vodom određena veličina kapi i PDI, radi procene uspešnosti predviđanja.

8.3.2. Rezultati i diskusija

8.3.2.1. Modelovanje uticaja komponenti tečnog samo-nanoemulgujućeg sistema na veličinu kapi i indeks polidisperznosti

U tabeli 8.4. prikazani su ulazni i izlazni parametri, koji odgovaraju eksperimentalnom planu dobijenom korišćenjem softvera *Design Expert*[®]. Jasno se vidi da se sa malim variranjem udela lipida, surfaktanta i kosurfaktanta dobijaju velike razlike u veličini kapi i vrednosti PDI. Tako se veličina kapi kreće u rasponu od 118,7 nm u formulaciji SEDDS-4 do 513,1 nm u formulaciji SEDDS-3 (Tabela 8.4.). Takođe, između izrađenih emulzija uočena je i velika razlika u vrednosti PDI, što ukazuje na potencijalnu razliku u stabilnosti dobijenih emulzija. Neočekivano, formulacija SEDDS-3 sa najmanjim udelom lipida, a najvećim udelom kosurfaktanta, imala je vrednost PDI 1, što potencijalno ukazuje na visoku nestabilnost, a osim toga ima i najveće kapi. Ova formulacija potencijalno ukazuje da kosurfaktant (Transcutol[®] HP), čiji je udeo u ovoj formulaciji na najvišem nivou ima najmanji pozitivni uticaj na stabilnost sistema. Sa druge strane formulacija SEDDS-15 imala je najmanju vrednost PDI od 0,076, što potencijalno ukazuje da ovaj sistem ima najveću stabilnost. Generalno slabija sposobnost za emulgovanje vodene faze, sa povećanjem udela Transcutol[®]-a HP, mogla bi da se pripíše kompetitivnom uticaju kosurfaktanta (Transcutol[®] HP) za solubilizaciju ulja na međupovršini uljane i vodene faze. Transcutol[®] HP, kao hidrofilni solubilizator, verovatno istim mehanizmom koji je pretpostavljen kod kosurfaktanata tipa alkohola (Fanun, 2007), menja polarnost uljane i vodene faze i penetrira u međupovršinski film surfaktanata utičući na njegovu geometriju tako da ulje biva potisnuto, tj. smanjuje se efikasnost surfaktant/kosurfaktant smeše za njegovu solubilizaciju. Uticaj Transcutol[®]-a HP postaje izraženiji sa porastom relativnog udela kosurfaktanta u smeši sa surfaktantom, što je u saglasnosti sa rezultatima u literaturi (Đekić, 2011).

Tabela 8.4. Eksperimentalni plan dobijen primenom dizajna smeše (ulazni i izlazni parametri)

Broj formulacije	Ulazni parametri			Izlazni parametri	
	A	B	C	Y ₁	Y ₂
	Trigliceridi srednje dužine lanaca	Polisorbat 80: Labrasol® (1:1)	Transcutol® HP	Veličina kapi	PdI
SEDDS-1	15,05	42,07	42,88	232,6±28,85	0,151±0,041
SEDDS-2	13,70	52,86	33,44	162,7±3,52	0,291±0,019
SEDDS-3	10,01	40,00	49,99	513,1±5,25	1,000±0,009
SEDDS-4	20,64	40,00	39,36	118,7±5,29	0,213±0,025
SEDDS-5	15,05	42,07	42,88	232,6±28,85	0,151±0,041
SEDDS-6	10,01	59,99	30,00	193,0±2,29	0,205±0,006
SEDDS-7	20,70	49,30	30,00	150,0±5,11	0,226±0,010
SEDDS-8	10,00	49,07	40,93	188,7±7,21	0,283±0,014
SEDDS-9	20,64	40,00	39,36	118,7±5,29	0,213±0,025
SEDDS-10	23,81	43,04	33,15	189,8±6,07	0,300±0,020
SEDDS-11	29,99	40,01	30,00	202,1±6,52	0,387±0,010
SEDDS-12	10,01	59,99	30,00	193,0±2,29	0,205±0,006
SEDDS-13	16,57	46,42	37,01	318,7±6,60	0,459±0,008
SEDDS-14	29,99	40,01	30,00	202,1±6,52	0,387±0,010
SEDDS-15	13,64	42,85	43,51	233,6±8,56	0,076±0,013
SEDDS-16	20,70	49,30	30,00	150,0±5,11	0,226±0,010

Uzimajući u obzir prethodno pomenute statističke parametre (S_d , R^2 , prilagođeni R^2) izabrani matematički model koji najbolje opisuje odnos između ulaznih parametara i veličine kapi, kao izlaznog parametra tj. odgovora sistema je specijalni kubni model (Tabela 8.5.). Nakon isključivanja parametara koji nemaju statistički značaj ($p > 0,05$) dobijena je konačna jednačina (Tabela 8.6.). Vrednosti koeficijenata uz A, B i C ukazuju na efekat ovih promenljivih na odgovor. Pozitivan znak koeficijenta ukazuje na sinergistički efekat, dok negativan označava antagonistički efekat na odgovor, tj. veličinu kapi. Takođe, veći koeficijent uz nezavisnu promenljivu ima veći uticaj na promenu odgovora.

Tabela 8.5. Odabir pogodnog matematičkog modela za veličinu kapi i PdI

Modeli	Standardna devijacija (SD)	Koeficijent višestruke korelacije (R^2)	Prilagođeni R^2	Predviden R^2
promenljiva Y_1: VELIČINA KAPI				
Linearni	81,59	0,3485	0,2483	-0,1702
Kvadratni	60,01	0,7289	0,5933	-0,1078
<u>Specijalni kubni</u>	<u>34,09</u>	<u>0,9213</u>	<u>0,8688</u>	<u>-0,2700</u>
Kubni	31,01	0,9566	0,8914	-10,7779
promenljiva Y_2: PdI				
Linearni	0,21	0,1152	-0,0209	-0,7328
Kvadratni	0,16	0,5987	0,3981	-2,5261
Specijalni kubni	0,17	0,6322	0,3869	-4,0083
<u>Kubni</u>	<u>0,092</u>	<u>0,9245</u>	<u>0,8111</u>	<u>-19,4836</u>

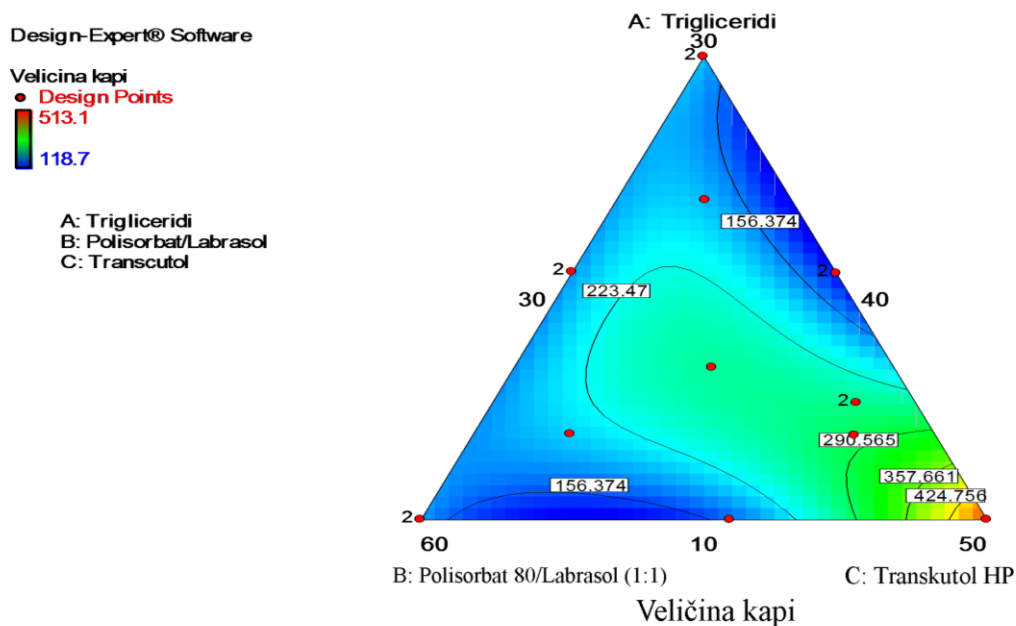
Na isti način je izvršena statistička obrada za drugi izlazni parametar, PdI, pri čemu je odabran kubni model i na osnovu njega formirana finalna matematička jednačina (Tabela 8.5. i Tabela 8.6.).

Tabela 8.6. Faktori modela i njegovog redukovanog oblika i dobijeni matematički model za odgovore (promenljive): veličinu kapi i PdI

Faktori i njihova značajnost pre redukovanja modela		Faktori i njihova značajnost nakon redukovanja modela	
promenljiva Y₁: VELIČINA KAPI			
Faktori	p vrednost	Faktori	p vrednost
Faktori AB	0,1310	Nije značajan	/
Faktori AC	< 0,0001	Faktori AC	<0,0001
Faktori BC	0,0012	Faktori BC	0,0020
Faktori ABC	0,0011	Faktori ABC	0,0023
Matematički model redukovanog <i>Specijalnog kubnog</i> modela za veličinu kapi:			
Veličina kapi=+189,93 * A +173,72 * B +491,85 * C -906,92 * A * C -720,63 * B * C +4027,17 * A * B * C			
promenljiva Y₂: PdI			
Faktori	p vrednost	Faktori	p vrednost
Faktori AB	0,6966		
Faktori AC	0,0086	Faktori AC	0,0093
Faktori BC	0,1180		
Faktori ABC	0,3892		
Matematički model redukovanog <i>Kubnog</i> modela za PDI:			
PdI= +0,41 * A +0,16 * B +0,71 * C -1,73 * A * C			

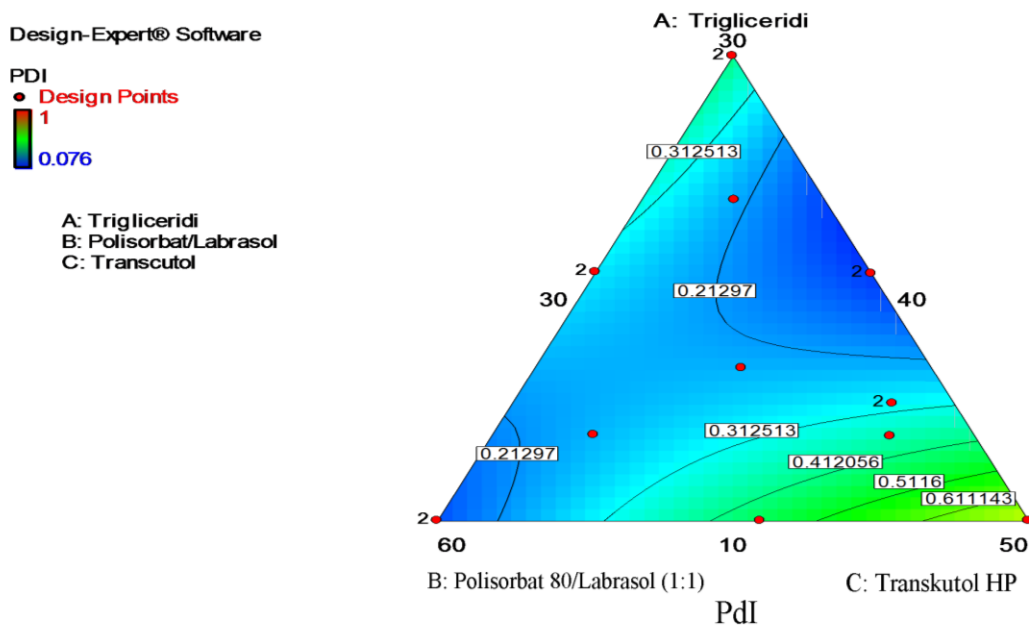
Konturni dijagrami, koji pokazuju promene vrednosti veličine kapi i PdI u zavisnosti od udela komponenata SEDDS, prikazani su na slikama 8.8. i 8.9. U uglovima dijagrama su smešteni maksimalni udeli triglicerida srednje dužine lanaca, smeše Polisorbat[®] 80/Labrasol[®] (1:1) i Transcutol[®]-a HP, dok se njihovi minimalni udeli nalaze na stranama dijagrama nasuprot uglovima. Između uglova i suprotnih strana dijagrama vrednosti komponenata smeše se postepeno smanjuju. Crvene tačke na konturnom dijagramu predstavljaju izrađene i ispitane formulacije SEDDS. Generalno su konturni dijagrami predstavljeni rasponom boja od najtamnije plave, do najintenzivnije crvene, gde najtamnijoj plavoj boji odgovaraju najniže vrednosti za veličinu kapi i PdI, dok

najintenzivnijoj crvenoj odgovaraju najviše vrednosti za veličinu kapi i PdI u formulacijama.



Slika 8.8. 2D konturni dijagram koji opisuje uticaj ulaznih parametara na veličinu kapi, emulzija dobijenih razblaživanjem SEDDS vodom.

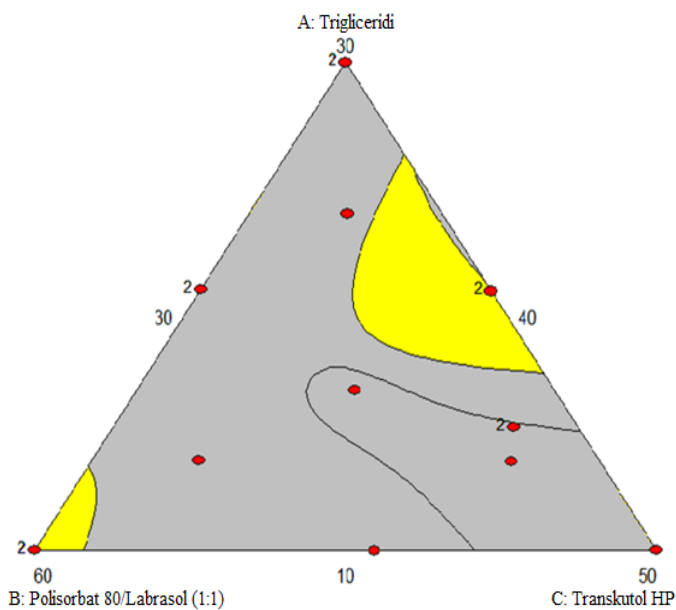
Sa slika 8.8 i 8.9 jasno se vidi da se sa povećanjem udela surfaktanta, a smanjenjem udela ulja i kosurfaktanta dobijaju se SEDDS koji nakon razblaživanja vodom, imaju manje kapi i manji PdI, što je značajno sa aspekta stabilnosti dobijenih sistema.



Slika 8.9. 2D konturni dijagram koji opisuje uticaj ulaznih parametara na PdI emulzija dobijenih razblaživanjem SEDDS vodom.

8.3.2.2. Optimizacija formulacije samo-nanoemulgujućeg sistema

Na slici 8.10. žutom bojom je prikazana optimizaciona oblast, u kojoj se ukrštaju zadate vrednosti odgovora (veličina kapi od 100 do 200 nm i PdI od 0,1 do 0,2).



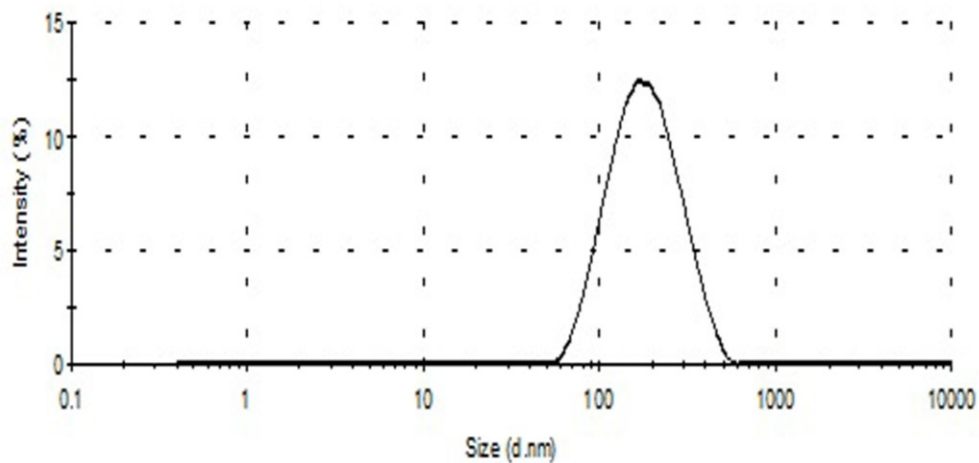
Slika 8.10. 2D konturni dijagram sa oblastima u kojima se nalaze optimalne formulacije.

Tri formulacije koje zadovoljavaju postavljene kriterijume za veličinu kapi i Pdl odabrane su iz različitih delova optimizacione oblasti konturnog dijagrama radi procene uspešnosti dizajna smeše da predvidi izlazne parametre za zadate vrednosti ulaznih parametara. Rezultati koji su dobijeni merenjem veličine kapi i Pdl izrađenih SNEDDS-a nakon razblaženja vodom, upoređeni su sa predviđenim vrednostima kako bi se proverilo da li odabrani matematički modeli daju dobru korelaciju (Tabela 8.7.). Poređenjem dobijenih i predviđenih vrednosti, za veličinu kapi i Pdl, uočava se da se primenom dizajna smeše može pouzdano predvideti veličina kapi i Pdl izrađenih SNEDDS-a, jer je razlika koja postoji između predviđenih i dobijenih vrednosti za veličinu kapi i Pdl u okviru standardne devijacije izmerenih odgovora.

Tabela 8.7. Udeli komponenata tri odabrane optimalne formulacije, predviđene i dobijene vrednosti veličine kapi i Pdl

	Ulazni parametri (%)			Izlazni parametri		
	Trigliceridi srednje dužine lanca	Polisorbat 80/Labrasol® (1:1)	Transcutol® HP		Veličina kapi (nm)	Pdl
T₁	22,27	43,06	34,67	Predviđena	150,96	0,192
				Dobijena	153,2±3,56	0,194±0,023
T₂	21,12	42,24	36,64	Predviđena	147,94	0,161
				Dobijena	157,02±9,21	0,184±0,036
T₃	11,14	58,15	30,71	Predviđena	171,07	0,187
				Dobijena	160,80±9,84	0,176±0,012

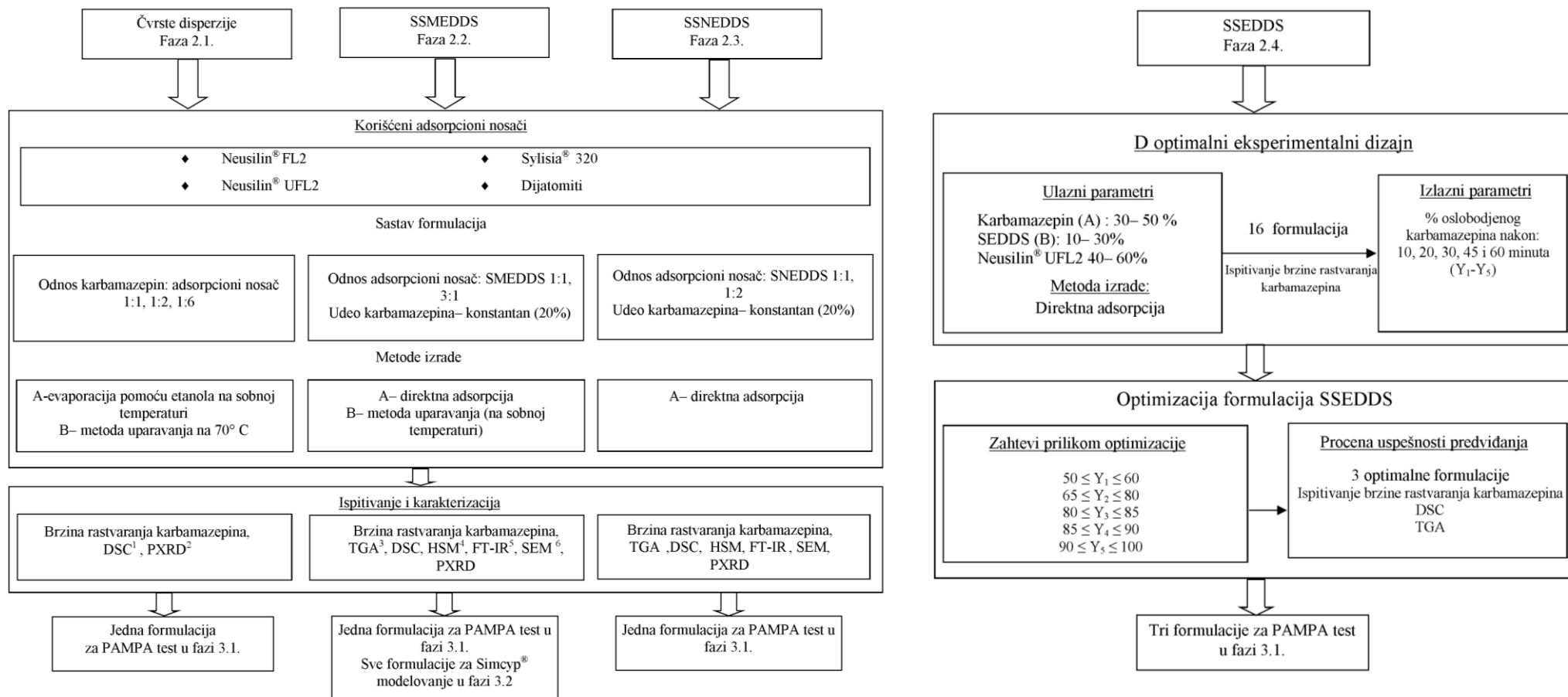
Formulacija T₂ je odabrana za izradu SSNEDDS (faza 2.4.; poglavlje 9.4.), pored toga što zadovoljava zadate opsege za veličinu kapi i Pdl, ima i visok udeo triglicerida (21,12%), a niži udeo surfaktanta (42,24%), što je značajno sa aspekta bezbednosti. Raspodela veličine kapi, prema intenzitetu, odabranog samonanoemulgujućeg nosača nakon razblaživanja vodom prikazana je na slici 8.11.



Slika 8.11. Raspodela veličine prečnika kapi (size (d. nm) prema intenzitetu (Intensity (%)) emulzije dobijene razblaživanjem odabranog samo-nanoemulgujućeg nosača (T₂) vodom.

9. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom izrađenih metodom direktne adsorpcije i metodom uparavanja (Faza 2)

U drugoj fazi eksperimentalnog rada pristupilo se formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom. Metode korišćene za izradu čvrstih samo-dispergujućih nosača bile su metoda direktne adsorpcije i metoda uparavanja, uz korišćenje poroznih adsorbenasa prirodnog i sintetskog porekla. Kao model lekovita supstanca korišćen je karbamazepin. Takođe se pristupilo i izradi binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i poroznih adsorbenasa, kako bi se ispitaio potencijalni efekat nosača na povećanje brzine rastvaranja karbamazepina. U fazama 2.2.; 2.3 i 2.4. pristupilo se izradi čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom, korišćenjem poroznih adsorbenasa i odabranih formulacija tečnih samo-dispergujućih nosača u prvoj fazi eksperimentalnog rada. Iz ove faze eksperimentalnog rada odabrane su formulacije čvrstih samo-dispergujućih nosača iz kojih je u narednoj fazi procenjena permeabilnost karbamazepina primenom *in vitro* i *in silico* metoda. Plan eksperimenata ove faze prikazan je na slici 9.1.



Slika 9.1. Plan eksperimenata druge faze.

¹Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija; ²Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu; ³Termogravimetrijska analiza;

⁴Mikroskopija na vrućoj ploči; ⁵Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom; ⁶Skenirajuća elektronska mikroskopija

9.1. Formulacija i karakterizacija binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i adsorpcionih nosača (Faza 2.1.)

Pre formulisanja čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom pristupilo se formulaciji binarnih čvrstih disperzija karbamazepina i poroznih adsorbensa, kako bi se proceno uticaj vrste i udela poroznog adsorbensa, kao i metode izrade čvrstih disperzija, na brzinu rastvaranja i polimorfni oblik karbamazepina.

9.1.1. Materijal i metode

Karbamazepin je korišćen kao model supstance i odgovara zahtevima navedenim u monografiji Ph. Eur. 8.0. Kao adsorpcioni nosači sintetskog porekla korišćeni su nosači tipa magnezijum-aluminometasilikata (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2) dobijeni od Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Japan i tipa silicijum-dioksida (Sylsya[®] 320) dobijena iz Fuji Sylsya Chemical, Japan. Kao prirodni adsorbensi korišćeni su diatomiti, koji su prečišćeni, i isporučeni od Mount Sylvia, Pty. Ltd, Queensland, Australia. Etanol 99,5% v/v odgovara specifikaciji navedenoj u Ph. Eur. 8.0.

9.1.1.1. Izrada čvrstih disperzija

Karbamazepin, rastvoren u etanolu (99,5% v/v), je nanošen na sledeće nosače: Neusilin[®] FL2, Neusilin[®] UFL2, Sylsya[®] 320 i diatomite, u tri odnosa karbamazepin/nosač: 1:1, 1:2 i 1:6. Za izradu čvrstih disperzija korišćena je metoda primene rastvarača na sobnoj (metoda A) i povišenoj temperaturi (metoda B). Kod metode A, nakon mešanja etanolnog rastvora karbamazepina i adsorpcionog nosača, dobijene smeše su čuvane 72 h na sobnoj temperaturi, kako bi etanol ispario. Metoda B je podrazumevala uparavanje etanola iz izrađenih disperzija u vakuum uparivaču (IKA RV 05, Staufen, Germany) na temperaturi od 70 °C, pri brzini rotacije od 70 obrtaja/min tokom 40 minuta. Izrađene čvrste disperzije (metoda A i B) su nakon izrade prosejane kroz sito veličine promera 300 µm. Do ispitivanja su čuvane zaštićene od svetlosti i vlage. Na ovaj način je izrađeno 24 uzoraka čvrstih disperzija čiji je sastav i metod izrade prikazan u tabeli 9.1.

Tabela 9.1. Sastav, postupak izrade i oznaka izrađenih čvrstih disperzija

Upotrebljeni nosač	Odnos karbamazepin/nosač	Metode izrade	Oznaka formulacije
Neusilin [®] UFL2	1:1	A	KBZ_NUFL2_1_1_A
Neusilin [®] UFL2	1:2	A	KBZ_NUFL2_1_2_A
Neusilin [®] UFL2	1:6	A	KBZ_NUFL2_1_6_A
Neusilin [®] UFL2	1:1	B	KBZ_NUFL2_1_1_B
Neusilin [®] UFL2	1:2	B	KBZ_NUFL2_1_2_B
Neusilin [®] UFL2	1:6	B	KBZ_NUFL2_1_6_B
Neusilin [®] FL2	1:1	A	KBZ_NFL2_1_1_A
Neusilin [®] FL2	1:2	A	KBZ_NFL2_1_2_A
Neusilin [®] FL2	1:6	A	KBZ_NFL2_1_6_A
Neusilin [®] FL2	1:1	B	KBZ_NFL2_1_1_B
Neusilin [®] FL2	1:2	B	KBZ_NFL2_1_2_B
Neusilin [®] FL2	1:6	B	KBZ_NFL2_1_6_B
Sylsya [®] 320	1:1	A	KBZ_Syl_1_1_A
Sylsya [®] 320	1:2	A	KBZ_Syl_1_2_A
Sylsya [®] 320	1:6	A	KBZ_Syl_1_6_A
Sylsya [®] 320	1:1	B	KBZ_Syl_1_1_B
Sylsya [®] 320	1:2	B	KBZ_Syl_1_2_B
Sylsya [®] 320	1:6	B	KBZ_Syl_1_6_B
Dijatomi	1:1	A	KBZ_Dij_1_1_A
Dijatomi	1:2	A	KBZ_Dij_1_2_A
Dijatomi	1:6	A	KBZ_Dij_1_6_A
Dijatomi	1:1	B	KBZ_Dij_1_1_B
Dijatomi	1:2	B	KBZ_Dij_1_2_B
Dijatomi	1:6	B	KBZ_Dij_1_6_B

9.1.1.2. Karakterizacija čvrstih disperzija sa karbamazepinom

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina sprovedeno je iz uzoraka izrađenih čvrstih disperzija, komercijalno dostupnih tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem i praška karbamazepina. Za ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina korišćena je aparatura sa rotirajućim lopaticama (Erweka DT70, Nemačka) pri brzini 50 obrtaja/min. Kao medijum za ispitivanje korišćena je prečišćena voda zapremine 900 ml, pri temperaturi od 37 °C. Po 4 ml uzorka je uzimano u unapred utvrđenim vremenskim intervalima, uz nadoknađivanje medijuma. Za izrađene čvrste disperzije uzorkovanje je vršeno nakon 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta. Svi uzorci su filtrirani kroz membranski filter (0,45 µm). Karbamazepin je određivan UV spektrofotometrijom na talasnoj dužini 287 nm. Korišćen je UV/VIS spektrofotometar Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija). Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija, sadržaj karbamazepina u svakoj formulaciji je bio konstantan i iznosio je 200 mg. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponovljena ispitivanja.

Poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija

Da bi se uporedili profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz različitih formulacija u literaturi se preporučuje primena tzv. faktora razlike f_1 (*eng.* difference factor) i faktora sličnosti f_2 (*eng.* similarity factor) (Moore, 1996). Faktori se mogu izračunati prema sledećim formulama:

$$f_1 = 100 \times \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \quad (9.1.)$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (9.2.)$$

gde je n broj tačaka u profilu brzine rastvaranja, R_t i T_t predstavljaju vrednosti procenta rastvorene supstance za referentni (R) i ispitivani (T) uzorak u vremenu t . Metoda računanja faktora razlike i sličnosti odobrena je od strane FDA kao prihvatljiva metoda za poređenje profila brzine rastvaranja (Guidance for Industry; 1995, 1997). Vrednosti

za faktor f_1 0-15 i vrednosti za faktor f_2 50-100 ukazuju na to da su poređeni profili brzine rastvaranja slični. Metoda izračunavanja faktora razlike i sličnosti je korišćena u različitim fazama ispitivanja čvrstih disperzija i čvrstih samo-dispergujućih sistema, kako bi se utvrdila razlika između određenih formulacija, ili kako bi se procenila uspešnost predviđanja brzine oslobađanja lekovite supstance dobijena eksperimentalnim dizajnom.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC merenja izvršena su na DSC Q2000 termalnom analizatoru (TA Instruments, Nemačka). Precizno odmerena masa uzorka (1–5 mg) stavljena je u T-Zero[®] aluminijumske posude, koje su potom hermetički zatvarane, i merene u temperaturnom opsegu od 20 do 200 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min, u struji azota, sa protokom od 50 ml/min. Instrument je kalibrisan korišćenjem standarda indijuma. Korišćenjem originalnog softvera (TA Instruments, Nemačka) automatski su izračunavane entalpija, početne temperature i temperature topljenja.

Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD)

PXRD analiza je izvršena na difraktometru Bruker D8 Advance (Bruker, Nemačka), na sobnoj temperaturi. Difraktometar je opremljen bakarnom anodom ($\lambda = 0,15418$ nm, 40 kV, 40 mA). Uzorci, po potrebi prethodno usitnjeni, stavljani su na kvarcnu ploču sa aluminijumskim držačem. Reflektovana svetlost je detektovana na Lynx-eye PSD detektoru.

9.1.2. Rezultati i diskusija

9.1.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija

Procenti rastvorenog karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija sa različitim nosačima prikazani su u tabelama 9.2.-9.5., a profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija prikazani su na slikama 9.2.-9.5.

Tabela 9.2. Procenti rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2 i iz praška karbamazepina

Oznaka formulacije	Procentat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)										
	5	10	15	20	30	45	60	90	120	150	180
KBZ_NUFL2_1_1_B	16,38	20,52	23,54	26,56	29,34	35,26	46,04	48,02	47,08	48,85	49,84
KBZ_NUFL2_1_2_B	7,45	14,33	20,41	25,40	32,59	41,41	48,71	55,37	56,71	59,31	62,22
KBZ_NUFL2_1_6_B	43,50	57,35	55,38	61,00	63,62	61,62	61,81	65,52	64,03	66,08	66,71
KBZ_NUFL2_1_1_A	7,33	10,32	13,10	16,25	16,40	20,89	24,13	27,50	31,90	36,58	40,39
KBZ_NUFL2_1_2_A	22,75	32,59	38,94	40,23	46,06	57,29	58,78	70,82	70,44	74,97	83,69
KBZ_NUFL2_1_6_A	53,82	63,02	69,23	71,84	73,52	76,46	75,79	81,62	81,28	85,86	91,35
Karbamazepin	2,00	4,91	17,54	26,42	41,56	41,43	48,85	53,00	59,41	62,06	62,73

Tabela 9.3. Procenti rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om FL2 i iz praška karbamazepina

Oznaka formulacije	Procentat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)										
	5	10	15	20	30	45	60	90	120	150	180
KBZ_NFL2_1_1_B	3,41	7,22	10,60	13,44	21,34	30,71	35,11	42,35	46,07	45,24	48,95
KBZ_NFL2_1_2_B	12,26	17,61	21,31	25,02	30,63	34,44	40,58	45,85	44,86	46,45	49,50
KBZ_NFL2_1_6_B	33,71	46,60	54,98	55,02	56,39	61,69	65,24	67,89	69,31	71,55	73,50
KBZ_NFL2_1_1_A	3,92	6,22	8,79	10,75	14,03	17,33	13,59	15,42	19,41	18,46	21,58
KBZ_NFL2_1_2_A	8,87	17,91	25,41	32,71	35,17	43,07	44,42	58,30	62,97	63,98	63,98
KBZ_NFL2_1_6_A	24,39	38,80	39,31	40,93	41,87	49,67	50,40	51,31	56,27	57,67	60,75
Karbamazepin	2,00	4,91	17,54	26,42	41,56	41,43	48,85	53,00	59,41	62,06	62,73

Tabela 9.4. Procenti rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Sylysia®-om 320 i iz praška karbamazepina

Oznaka formulacije	Procentat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)										
	5	10	15	20	30	45	60	90	120	150	180
KBZ_Syl_1_1_B	4,66	17,88	24,40	30,92	35,02	39,19	43,76	47,22	49,21	51,27	53,35
KBZ_Syl_1_2_B	25,41	34,64	41,43	48,23	54,89	57,36	64,08	70,94	74,00	76,65	79,21
KBZ_Syl_1_6_B	29,73	40,88	42,07	42,22	43,64	44,98	45,00	44,21	45,26	45,75	46,01
KBZ_Syl_1_1_A	5,35	8,24	11,04	14,03	18,61	20,04	22,55	26,33	31,03	35,02	39,55
KBZ_Syl_1_2_A	8,82	21,21	33,50	41,94	43,17	49,87	54,83	62,44	68,80	72,80	81,52
KBZ_Syl_1_6_A	42,69	54,01	58,73	63,93	66,34	70,25	75,40	79,98	87,54	88,51	91,54
Karbamazepin	2,00	4,91	17,54	26,42	41,56	41,43	48,85	53,00	59,41	62,06	62,73

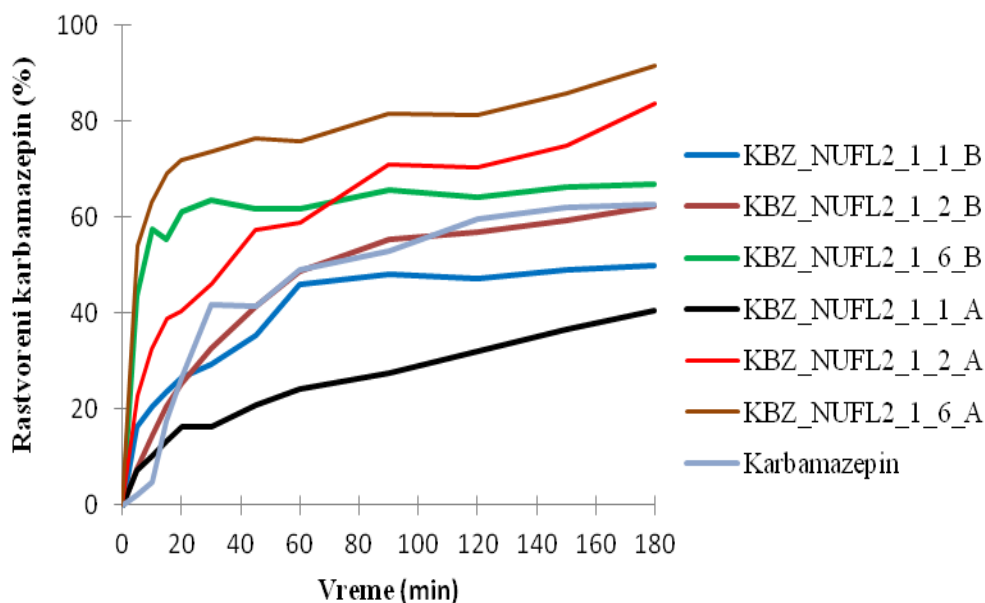
Tabela 9.5. Procenti rastvorenog karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa dijatomitima i iz praška karbamazepina

Oznaka formulacije	Procentat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)										
	5	10	15	20	30	45	60	90	120	150	180
KBZ_Dij_1_1_B	3,18	4,48	6,24	7,97	11,91	16,27	21,69	28,73	35,51	41,41	45,75
KBZ_Dij_1_2_B	2,67	4,11	6,07	8,03	11,83	15,63	20,31	27,79	35,23	40,52	44,73
KBZ_Dij_1_6_B	9,53	13,61	16,47	19,32	23,48	28,23	32,47	39,34	44,53	48,94	51,64
KBZ_Dij_1_1_A	0,51	10,19	18,13	29,22	35,71	41,74	46,77	48,42	55,74	65,48	71,45
KBZ_Dij_1_2_A	0,52	12,15	19,99	33,00	40,54	43,48	46,75	51,77	60,39	67,33	69,50
KBZ_Dij_1_6_A	1,32	13,61	22,11	36,04	45,14	46,79	49,49	59,24	65,38	73,14	75,06
Karbamazepin	2,00	4,91	17,54	26,42	41,56	41,43	48,85	53,00	59,41	62,06	62,73

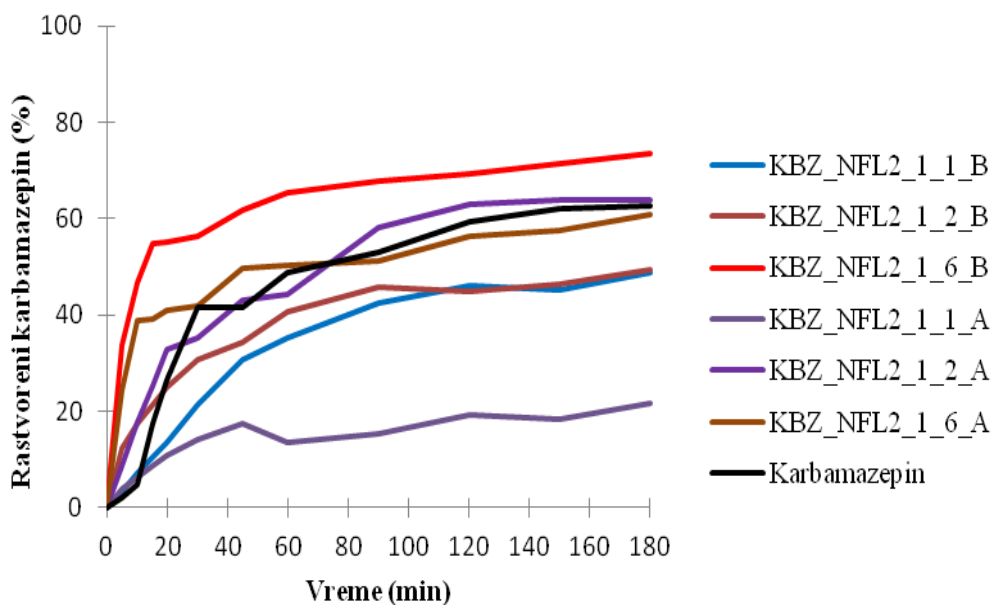
Posmatrajući profile brzine oslobađanja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa Neusilin[®]-om UFL2 (Slika 9.2.) može se zaključiti da jedino čvrste disperzije sa odnosom karbamazepin/nosač 1:1, izrađene metodom B (uparavanjem etanola na 70 °C), pokazuju veću brzinu oslobađanja u odnosu na čvrste disperzije izrađene metodom A (uparavanjem etanola na sobnoj temperaturi). Iz čvrstih disperzija sa odnosima karbamazepin/adsorpcioni nosač 1:2 i 1:6, u kojima je kao adsorpcioni nosač korišćen Neusilin[®] UFL2, veća brzina oslobađanja karbamazepina se postiže iz čvrstih disperzija izrađenih metodom A. Izračunavanjem faktora sličnosti i faktora razlike (Tabela 9.6.) pokazano je da između formulacija istog sastava, izrađenih različitim metodama postoji značajna razlika ($f_2 < 50$). Najveća brzina oslobađanja postignuta je iz čvrstih disperzija kod kojih je odnos karbamazepin/Neusilin[®] UFL2 1:6, izrađene metodom A (nakon 30 min oslobođeno je 73,52% karbamazepina, Tabela 9.2.). Čvrste disperzije izrađene metodama A i B, uz korišćenje Neusilin[®]-a UFL2, u kojima je odnos karbamazepin/nosač 1:6 inicijalno pokazuju znatno veću brzinu oslobađanja karbamazepina, u poređenju sa ostalim formulacijama. Brzina oslobađanja karbamazepina iz izrađenih formulacija opada sa smanjenjem udela nosača u formulaciji.

Sa slike 9.3. može se videti da se kod čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om FL2, jedino pri odnosu karbamazepin/nosač 1:2 veća brzina oslobađanja karbamazepina postiže u slučaju primene metode A u odnosu na metodu B. Slično u formulacijama sa Neusilin[®]-om UFL2, i ovde se uočava značajna razlika između profila oslobađanja karbamazepina, u zavisnosti od metode izrade. Najveća brzina oslobađanja ponovo je postignuta kod formulacije sa najvećom količinom nosača, izrađenom metodom B. Takođe, poput formulacija sa Neusilin[®]-om UFL2, pri odnosu karbamazepin/adsorpcioni nosač 1:6, bez obzira na metodu izrade, i iz formulacije sa Neusilin[®]-om FL2, pri istom odnosu, bez obzira na metodu izrade uočena je inicijalno veća brzina oslobađanja karbamazepina u odnosu na druge formulacije, što je verovatno posledica boljeg kvašenja karbamazepina. U literaturi ne postoje istraživanja u kojima je vršena formulacija čvrstih disperzija karbamazepina sa adsorpcionim nosačima iz grupe Neusilin[®]-a. Međutim, Khvanfar i saradnici (2013) su prilikom formulacije čvrstih disperzija Neusilin[®]-a i irbesartana došli do sličnih zaključaka. Pokazali su da se sa povećanjem udela Neusilin[®]-a u formulaciji čvrstih disperzija sa irbesartanom povećava

i brzina rastvaranja lekovite supstance, što objašnjavaju visokom specifičnom površinom Neusilina ($300 \text{ m}^2/\text{g}$) na koju se adsorbuje lekovita supstanca. Dodatno, u istoj studiji je uočeno da se veća brzina oslobađanja irbesartana postiže iz čvrstih disperzija izrađenih metodom uparavanja etanola, nego iz čvrstih disperzija izrađenih metodom adsorpcije, što je posledica inkorporiranja lekovite supstance u mikro i nano strukture sistema (Khanfar i sar., 2013).



Slika 9.2. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2 kao adsorpcionim nosačem i praška karbamazepina.



Slika 9.3. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om FL2 kao adsorpcionim nosačem i praška karbamazepina.

Tabela 9.6. Poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih različitim metodama- faktori razlike (f1) i sličnosti (f2)

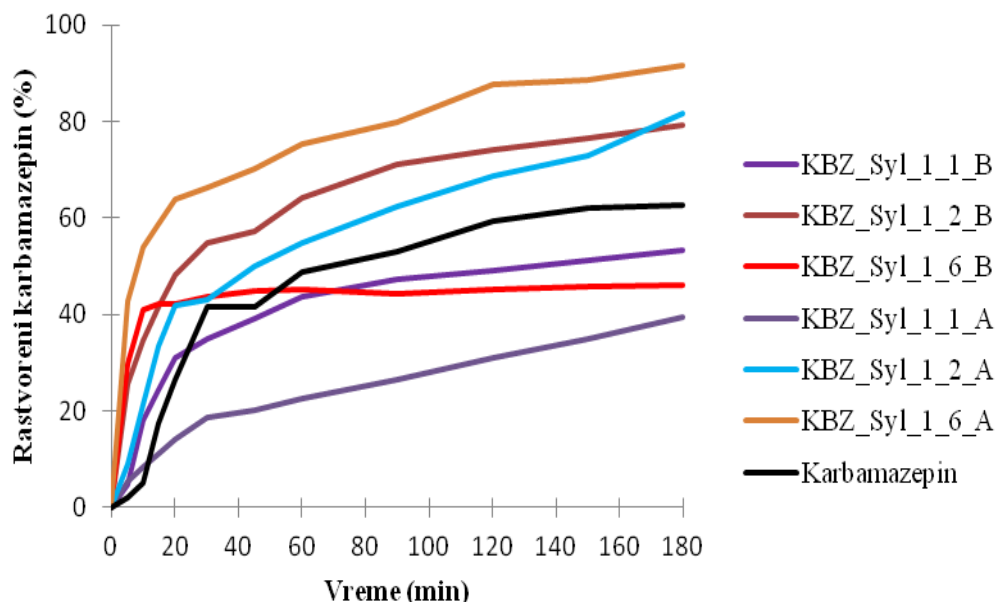
Poredene formulacije		f1	f2
KBZ_NFL2_1_1_A	KBZ_NFL2_1_1_B	50,89	33,62
KBZ_NFL2_1_2_A	KBZ_NFL2_1_2_B	19,32	45,55
KBZ_NFL2_1_6_A	KBZ_NFL2_1_6_B	22,03	40,19
KBZ_NUFL2_1_1_A	KBZ_NUFL2_1_1_B	37,46	39,24
KBZ_NUFL2_1_2_A	KBZ_NUFL2_1_2_A	28,94	36,37
KBZ_NUFL2_1_6_A	KBZ_NUFL2_1_6_B	19,08	37,52
KBZ_Syl_1_1_A	KBZ_Syl_1_1_B	41,60	36,12
KBZ_Syl_1_2_A	KBZ_Syl_1_2_B	16,32	47,97
KBZ_Syl_1_6_A	KBZ_Syl_1_6_B	65,82	22,42
KBZ_Dij_1_1_A	KBZ_Dij_1_1_B	47,23	31,19
KBZ_Dij_1_2_A	KBZ_Dij_1_2_B	51,24	28,61
KBZ_Dij_1_6_A	KBZ_Dij_1_6_B	32,60	34,04

Sa slike 9.4. se uočava da se pri korišćenju Sylysia[®] 320 kao adsorpcionog nosača, jedino iz čvrstih disperzija sa odnosom karbamazepin/nosač 1:6, izrađenih metodom A, postiže veća brzina oslobađanja karbamazepina u odnosu na čvrste disperzije izrađene metodom B. U slučaju adsorbensa Sylysia[®] 320 najveća brzina oslobađanja karbamazepina je postignuta iz formulacije sa najvećim udelom nosača, izrađene metodom A.

Slične rezultate sa adsorbensima iz grupe Sylysia[®]-a, uz korišćenje karvedilola kao lekovite supstance su dobili i drugi autori. Planinšek i saradnici su pokazali da se sa povećanjem udela karvedilola u čvrstim disperzijama sa Sylysia[®]-om 350, smanjuje brzina rastvaranja lekovite supstance. Ovo objašnjavaju smanjenjem ukupne površine adsorbensa dostupne za rastvaranje, usled punjenja pora adsorbensa karvedilolom, kao i smanjenjem kvašenja usled povećanog udela lekovite supstance. Takođe, sa povećanjem udela lekovite supstance u formulaciji, povećava se i vreme potrebno za rastvaranje leka koji se nalazi u porama adsorbensa (Planinšek i sar., 2011). Drugo istraživanje iste istraživačke grupe pokazalo je da na brzinu rastvaranja karvedilola, utiču količina amornog i kristalnog karvedilola u formulaciji, kao i poroznost i hidrofilnost čestica adsorbensa. Amorfne čestice su se pokazale boljim za ispunjavanje pora silicijum-dioksida, pri čemu je došlo do jačih interakcija između karvedilola i silanolnih grupa nosača. Ovim je poboljšano kvašenje i smanjena aglomeracija karvedilola. Kada medijum za rastvaranje dospe u pore nosača, dolazi do potpunog zasićenja visoko hidrofilnih silanolnih grupa, čime se kompetitivno istiskuju hidrofobni molekuli lekovite supstance sa hidrofilne površine nosača. Sa povećanjem udela lekovite supstance u formulaciji čvrstih disperzija dolazi do usporavanja prodiranja medijuma za rastvaranje u pore, što ima za posledicu usporeno oslobađanje lekovite supstance. Čvrste disperzije sa visokim udelom karvedilola su imale hidrofobniju površinu i smanjenu poroznost, usled gustog pakovanja, što je imalo negativan uticaj na kvašenje čestica (Kovačić i sar., 2011).

Na slici 9.5. jasno se vidi da pri primeni diatomita kao nosača, u formulaciji čvrstih disperzija izrađenih metodom B nije došlo do značajne promene u brzini rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija u odnosu na čistu supstancu, dok je kod formulacija izrađenih metodom A primećeno značajno smanjenje brzine rastvaranja karbamazepina,

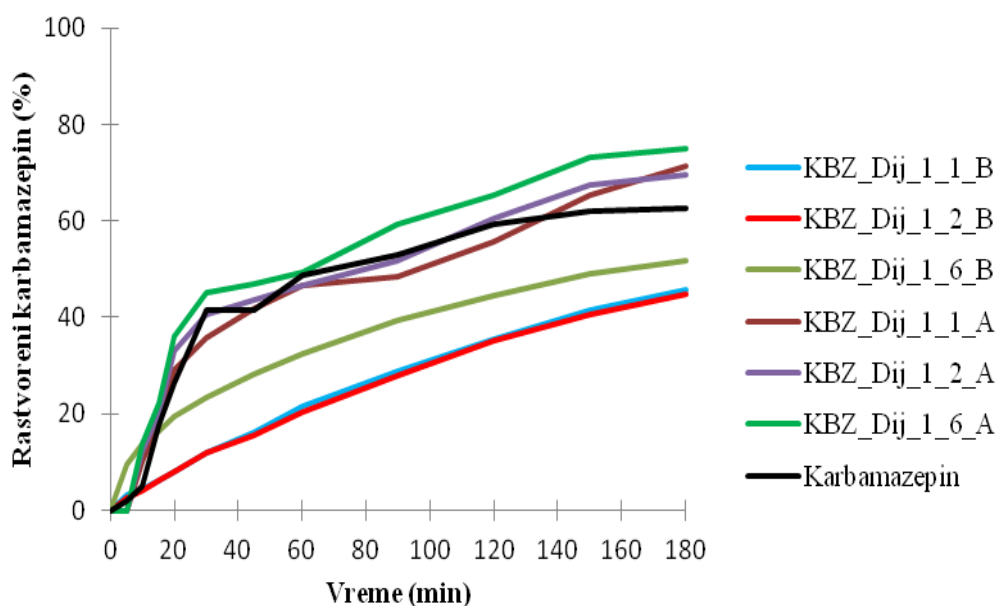
u odnosu na čistu supstancu. Takođe je uočeno da sa porastom udela dijatomita u čvrstim disperzijama dolazi do neznatnog povećanja brzine oslobađanja karbamazepina. Kod čvrstih disperzija sa dijatomitima, iz kojih je postignuta najveća brzina oslobađanja karbamazepina, odnos karbamazepin/dijatomi je 1:6, a primenjena metoda izrade je bila metoda A. Sa slike 9.5. vidi se da se u prvih 30 min oslobađa oko 40% karbamazepina iz formulacija čvrstih disperzija izrađenih sa dijatomitima, a nakon toga, postepeno, u narednih 150 min, još 20%, što ukazuje na potencijalnu mogućnost primene dijatomita kao adsorpcionih nosača za produženo oslobađanje lekovite supstance.



Slika 9.4. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa Sylysia[®]-om 320 kao adsorpcionim nosačem i praška karbamazepina.

Primenom Neusilin[®]-a UFL2, Neusilin[®]-a FL2 i Sylysia[®] 320 u formulaciji čvrstih disperzija, pri odnosu nosač/karbamazepin 1:1, bez obzira na metodu izrade, primećuje se manji procenat rastvorenog karbamazepina u poređenju sa čistom supstancom, nakon 30 minuta (Tabele 9.2-9.5.). Na slikama 9.2.- 9.4. se vidi da pri primeni ovih nosača u izradi disperzija sa drugim odnosima adsorpcioni nosač/karbamazepin (1:2 i 1:6), dolazi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina i to najvećeg kod formulacija čvrstih disperzija sa odnosom 1:6. To je i očekivano, jer je veća kontaktna površina za kvašenje medijumom i samim tim, veća je i brzina rastvaranja. Osim toga, pri većim udelima

karbamazepina u formulaciji čvrstih disperzija (odnos nosač/karbamazepin 1:1), potrebno je veće vreme za rastvaranje lekovite supstance koja se nalazi u porama adsorbensa. Takođe, veći udeo amorfnih adsorpcionih nosača u formulaciji čvrstih disperzija verovatno dovodi do prelaska većeg procenta karbamazepina u amorfnu formu, a kako amorfnu oblik lekovite supstance ima veću rastvorljivost u odnosu na kristalni oblik, ovo je verovatno još jedan razlog zašto se iz ovih formulacija postiže najveća brzina oslobađanja karbamazepina. Ove pretpostavke će biti razmatrane, nakon rezultata DSC i PXRD.



Slika 9.5. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija izrađenih sa dijamitima kao adsorpcionim nosačima i praška karbamazepina.

Na osnovu procenta oslobođenog karbamazepina iz čvrstih disperzija sa različitim adsorpcionim nosačima (Tabele 9.2. - 9.5) vidi se da je redosled brzine oslobađanja karbamazepina iz čvrstih disperzija, bez obzira na korišćen odnos adsorpcioni nosač/karbamazepin, sledeći: dijamiti, Neusilin[®] FL2, Syllysia[®] 320, Neusilin[®] UFL2, počevši od najsporijeg. Neusilin[®] UFL2 se pokazao kao adsorpcioni nosač, koji u formulaciji čvrstih disperzija dovodi od najvećeg povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Ovakav rezultat je očekivan, jer ovaj nosač ima najveću specifičnu površinu u odnosu na ostale nosače. Neusilin[®] UFL2 ima specifičnu površinu 300 do 310 m²/g, a Syllysia[®] 320 - 300 m²/g, pa samim tim neznatno brže oslobađanje

karbamazepina iz čvrstih disperzija sa Neusilin[®]-om UFL2, može se pripisati ovoj razlici. Neusilin[®] FL2 ima značajno manju specifičnu površinu od 150 m²/g i zbog čega je značajno manja brzina rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa ovim adsorbensom, što se može objasniti manjom površinom za kontakt sa medijumom i slabijim kvašenjem karbamazepina (Elektronske baze podataka *ii, iii, iv*). Iz čvrstih disperzija sa diatomitima, usled najniže specifične površine dijatomita od 30,92 m²/g (Löbenberg i Amidon, 2000), očekivano se postiže najsporije oslobađanje karbamazepina. Osim male specifične površine, struktura dijatomita takođe ima značajnu ulogu u oslobađanju karbamazepina. Inicijalno dolazi do oslobađanja lekovite supstance adsorbovane na površini dijatomita, dok kasnije dolazi do postepenog oslobađanja lekovite supstance zarobljene u unutrašnjoj šupljini čestica dijatomita.

Na osnovu rezultata ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija, može se zaključiti da se ne može uspostaviti jasna zavisnost između brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija i metode izrade, odnosno odnosa karbamazepin/adsorpcioni nosač. Međutim, u većini slučajeva je pokazano da porozni adsorbensi dovode do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija i to najčešće tako što sa povećanjem udela adsorbensa dolazi do značajnijeg povećanja brzine rastvaranja karbamazepina.

9.1.2.2. Karakterizacija čvrstih disperzija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Na DSC krivoj karbamazepina (Slika 9.6.) uočava se tokom zagrevanja, jedan uzak endotermni pik na 175 °C koji je posledica topljenja polimorfnog oblika III, nakon čega se uočava egzotermni pik na 178 °C, koji potiče od rekristalizacije polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I. Na 190,95 °C uočava se još jedan endotermni pik, koji potiče od topljenja polimorfnog oblika I karbamazepina. Ovi rezultati za čist karbamazepin su u saglasnosti sa podacima u literaturi za polimorfni oblik III karbamazepina (Grzesiak i sar, 2003).

Na DSC krivama formulacija čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om FL2 (Slika 9.6. a) uočavaju se slabo izraženi endotermni pikovi u opsegu temperatura od 130 do

160 °C. Karakteristična temperatura topljena za polimorfni oblik II karbamazepina je u opsegu temperatura od 135 do 170 °C, pa ovi pikovi mogu biti posledica prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II (Grzesiak i sar, 2003). Pikovi su izrazito slabog intenziteta, što može biti posledica malog udela karbamazepina u formulacijama. S druge strane udeo karbamazepina u formulacijama je od 14,28 do 50%, tako da intenzitet ovih pikova ne bi trebao da bude tako slab, pa se pretpostavlja da je došlo do prelaska određene količine karbamazepina iz polimorfnog oblika III u amorfnu formu.

Na DSC krivama čvrstih disperzija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2 (Slika 9.6. b) uočavaju se gotovo identični termalni događaji kao kod čvrstih disperzija sa Neusilin[®]-om FL2. Jedan do dva slaba endotermna pika u opsegu temperatura od 135 °C do 170 °C, ukazuju na mogućnost da je karbamazepin i u ovim formulacijama prešao delom u amorfni oblik, a delom u polimorfni oblik II (Grzesiak i sar, 2003).

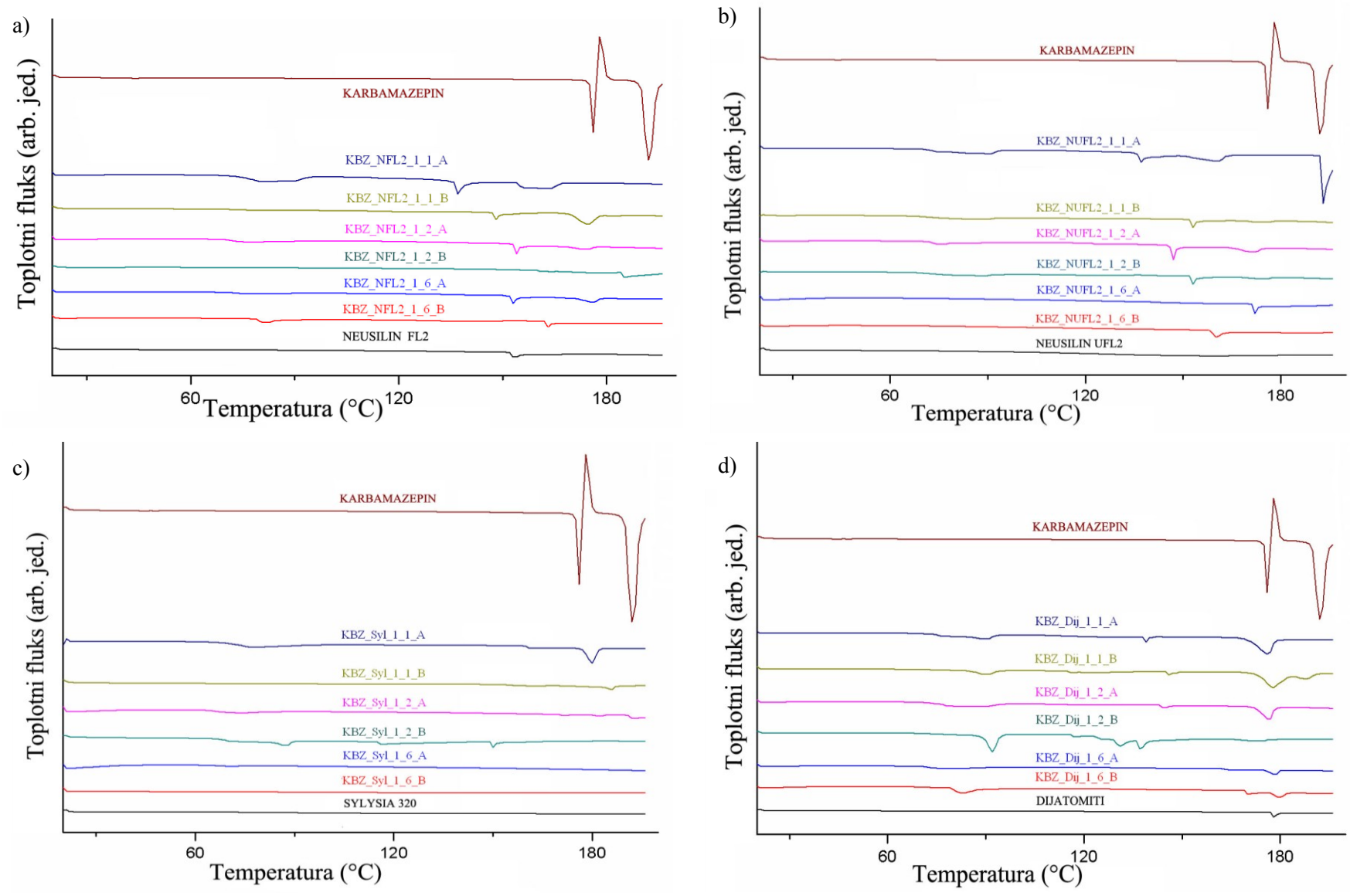
Na DSC krivama čvrstih disperzija karbamazepina izrađenih sa Sylysia[®]-om 320 (Slika 9.6. c), gotovo da nema pikova, osim kod formulacije KBZ_Syl_1_1_A, gde se uočava blag endotermni pik na oko 180 °C i kod formulacije KBZ_Syl_1_2_B, gde je zapažen blagi endotermni pik na oko 150 °C. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je karbamazepin u čvrstim disperzijama sa adsorbensom Sylysia[®] 320 prešao u amorfnu formu (Grzesiak i sar, 2003).

Čvrste disperzije karbamazepina izrađene sa diatomitima (Slika 9.6. d), pokazuju slične termalne osobine kao i čvrste disperzije sa ostalim adsorbensima. Kod pojedinih formulacija sa diatomitima uočavaju se blagi endotermni pikovi u opsegu temperatura od 70 do 90 °C, koji su verovatno posledica isparavanja rezidua etanola, koji je korišćen za izradu ovih formulacija. Kod određenih formulacija pojavljuju se blagi endotermni pikovi u opsegu temperatura od 130 do 180 °C.

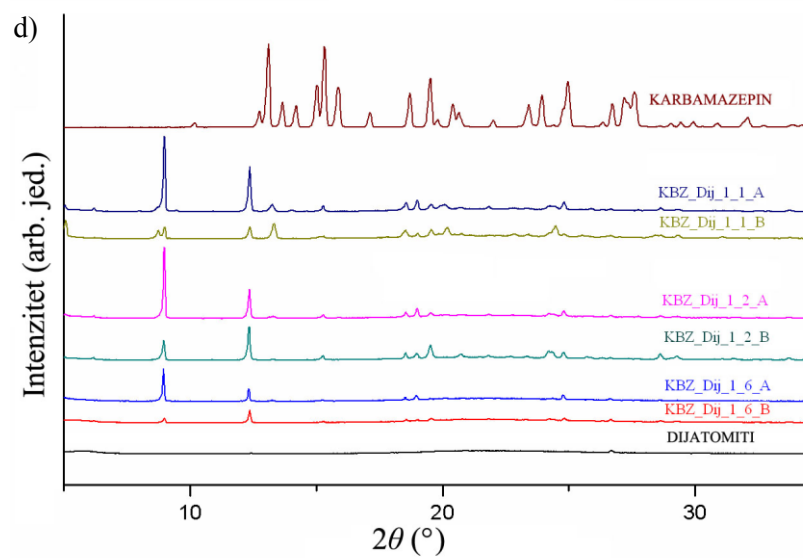
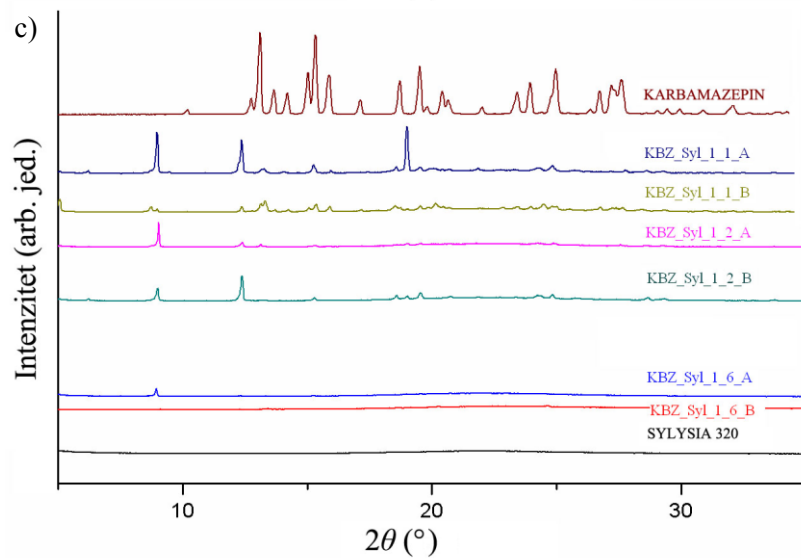
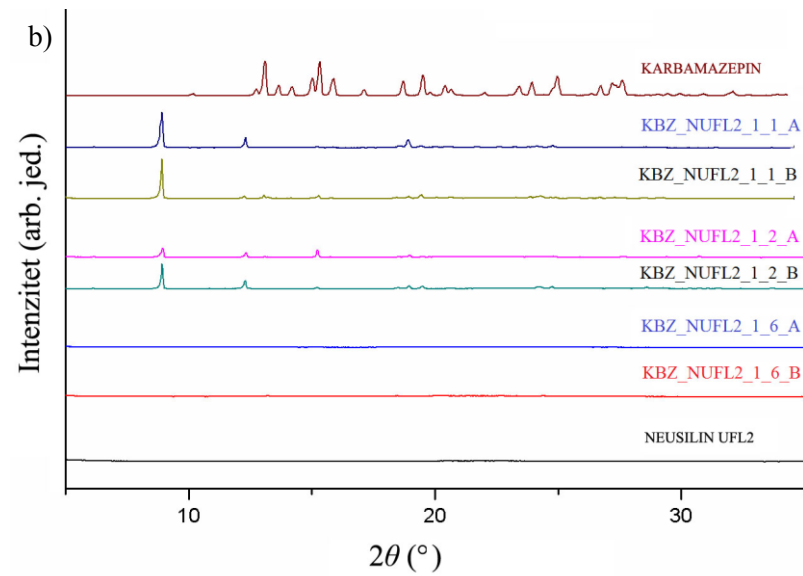
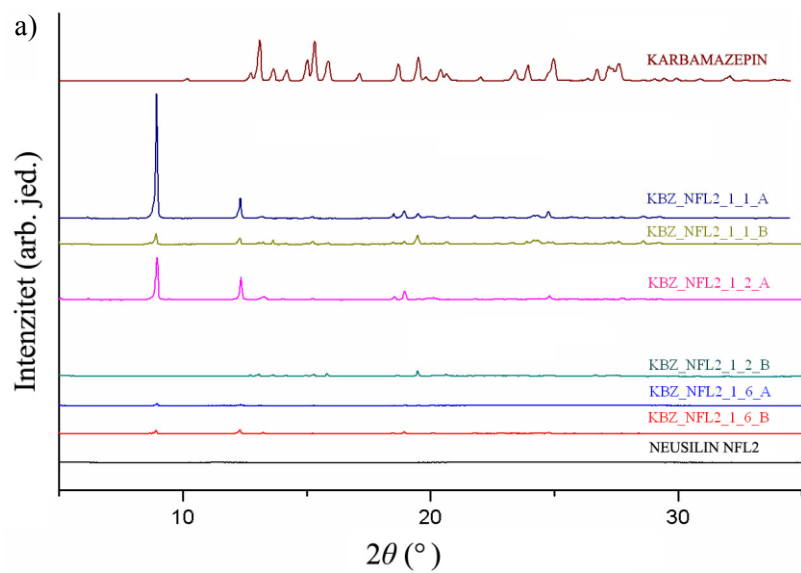
Rezultati DSC analize ukazuju da je u gotovo svim formulacijama čvrstih disperzija došlo do polimorfnog prelaza karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II, ili u amorfnu formu, a najverovatnije da su u formulaciji prisutna oba oblika karbamazepina. Ove pretpostavke će biti razmatrane u narednim ispitivanjima primenom PXRD analize.

Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD)

Na difraktogramu čistog karbamazepina (Slika 9.7.) uočavaju se veoma izraženi difrakcioni pikovi za sledeće uglove: 2θ - 13,02 °, 15,22 °, 15,78 °, 19,40 °, 24,92 °, 27,50 °, 31,86 °, koji potvrđuju rezultate dobijene DSC analizom, da je čist karbamazepin prisutan u kristalnom polimorfnom obliku III (Grzesiak i sar., 2003). Na difraktogramima čvrstih disperzija (Slika 9.7.) izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2, Neusilin[®]-om FL2, Sylisia[®]-om 320, pri odnosu karbamazepin/nosač 1:6 ne uočava se ni jedan difrakcioni pik, što potvrđuje pretpostavku da je u ovim formulacijama došlo do prelaska polimorfnog oblika III karbamazepina u amorfnu formu. Prelazak karbamazepina u amorfnu formu je još jedan od razloga, osim velike specifične površine ovih adsorpcionih nosača, zašto je iz ovih formulacija postignuto najbrže oslobađanje u odnosu na čvrste disperzije sa drugim odnosima karbamazepin/nosač. Kod ostalih odnosa za ova tri nosača se uočavaju, difrakcioni pikovi blagog intenziteta, za karakterističnu vrednost ugla 2θ od 8,70 °. Ovaj pik je karakterističan za polimorfni oblik II karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003), čime je potvrđena pretpostavka dobijena DSC analizom, da je u ovim formulacijama deo karbamazepina prešao u amorfnu formu, a deo u polimorfni oblik II. Frakcija karbamazepina koja je iz polimorfnog oblika III prešla u manje rastvorljiv polimorfni oblik II je možda još jedan od razloga zašto se karbamazepin sporije oslobađa iz čvrste disperzije sa odnosima karbamazepin/adsorpcioni nosač 1:1 i 1:2, u odnosu na one sa odnosom 1:6. Na difraktogramima svih čvrstih disperzija karbamazepina sa diatomitima (Slika 9.7. d) uočava se pik za vrednost ugla 2θ od 8,70 ° i više pikova slabijeg intenziteta, što ukazuje na to da je u ovim formulacijama deo karbamazepina prešao u polimorfni oblik II, a kako su pikovi izrazito slabog intenziteta, može se zaključiti da je deo karbamazepina prešao i u amorfnu formu. Prelazak karbamazepina u polimorfnu formu II i specifična struktura diatomita su sigurno uzrokovali znatno manje brzine oslobađanja karbamazepina iz ovih formulacija u odnosu na ostale adsorbense, pa čak i sam karbamazepin.



Slika 9.6. DSC krive karbamazepina, adsorpcijskih nosača i čvrstih disperzija izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.



Slika 9.7. PXRD difraktogrami karbamazepina, adsorpcijskih nosača i čvrstih disperzija izrađenih sa: a) Neusilin[®] -om FL2; b) Neusilin[®] -om UFL2; c) Sylysia[®] -om 320; d) dijamitima.

9.2. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom (Faza 2.2.)

U fazi 2.2. izvršena je formulacija i karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, uz korišćenje 4 različita porozna adsorbensa. Cilj je bio da se ispita uticaj udela i vrste poroznog adsorbensa, kao i postupka izrade na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema, kao i da se utvrdi polimorfni oblik karbamazepina, prisutan u izrađenim čvrstim samo-mikroemulgujućim sistemima.

9.2.1. Materijal i metode

Tečni samo-mikroemulgujući sistem (trigliceridi srednje dužine lanca (10%), Cremophor[®] EL (67,5%), Makrogol 400 (22,5%)) odabran u fazi 1.1. eksperimentalnog rada (poglavlje 8.1.), korišćen je za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema. Kao porozni adsorbensi korišćeni su Neusilin[®] FL2, Neusilin[®] UFL2, Sylsya[®] 320 i dijatomiti, isti kao u prethodnoj fazi eksperimentalnog rada. Etanol 99,5% v/v odgovara specifikaciji navedenoj u Ph. Eur. 8.0.

9.2.1.1. Izrada čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom

Čvrsti samo-mikroemulgujući terapijski sistemi su izrađeni od prethodno odabranog tečnog samo-mikroemulgujućeg terapijskog sistema i adsorpcionog nosača, primenom dve metode: metoda direktne adsorpcije (metoda A) i metoda uparavanja (metoda B). U metodi direktne adsorpcije, tečni SMEDDS je adsorbovan na smešu adsorpcionog nosača i karbamazepina. U metodi uparavanja, rastvor karbamazepina (karbamazepin rastvoren u minimalnoj količini etanola) je dodat smeši tečnog SMEDDS-a i adsorpcionog nosača, nakon čega je vršeno uparavanje etanola na sobnoj temperaturi 72 h. Svi izrađeni uzorci su, nakon homogenizacije prosejani kroz sito 300 µm. Ukupno je izrađeno 16 formulacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema (Tabela 9.7), u kojima je odnos adsorpcioni nosač/tečni SMEDDS bio 3:1 ili 1:1, dok je udeo karbamazepina bio stalan i iznosio 20%.

Tabela 9.7. Sastav, postupak izrade i oznaka čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Nosač	Odnos nosač/SMEDDS	Metoda izrade	Oznaka formulacije
Neusilin [®] UFL2	1:1	A	NUFL2_SMEDDS_1_1_A
Neusilin [®] UFL2	3:1	A	NUFL2_SMEDDS_3_1_A
Sylsia [®] 320	1:1	A	Syl_SMEDDS_1_1_A
Sylsia [®] 320	3:1	A	Syl_SMEDDS_3_1_A
Dijatomi	1:1	A	Dij_SMEDDS_1_1_A
Dijatomi	3:1	A	Dij_SMEDDS_3_1_A
Neusilin [®] FL2	1:1	A	NFL2_SMEDDS_1_1_A
Neusilin [®] FL2	3:1	A	NFL2_SMEDDS_3_1_A
Neusilin [®] UFL2	1:1	B	NUFL2_SMEDDS_1_1_B
Neusilin [®] UFL2	3:1	B	NUFL2_SMEDDS_3_1_B
Sylsia [®] 320	1:1	B	Syl_SMEDDS_1_1_B
Sylsia [®] 320	3:1	B	Syl_SMEDDS_3_1_B
Dijatomi	1:1	B	Dij_SMEDDS_1_1_B
Dijatomi	3:1	B	Dij_SMEDDS_3_1_B
Neusilin [®] FL2	1:1	B	NFL2_SMEDDS_1_1_B
Neusilin [®] FL2	3:1	B	NFL2_SMEDDS_3_1_B

9.2.1.2. Karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, kao i PXRD i DSC analiza su izvedeni na način opisan u poglavlju 9.1.1.2. Osim toga u ovom delu eksperimentalnog rada sprovedene su i TGA, HSM, FT-IR i SEM analiza, radi detaljnije analize interakcije karbamazepina i komponenti čvrstog samo-mikroemulgujućeg sistema, kao i polimorfnog oblika karbamazepina.

Termogravimetrijska analiza (TGA)

TGA merenja su izvršena na TGA Q5000 termalnom analizatoru (TA Instruments, SAD) sa dvadesetpetopozicionim autosemplerom. Tokom analize su korišćene aluminijumske posude, u koje su stavljeni uzorci u količini od 3 do 5 mg, mereni u temperaturnom opsegu od 20 do 320 °C, pri brzini zagrevanja uzorka od 10 °C/min, u struji azota, sa protokom od 25 ml/min. Instrument je bio kalibrisan korišćenjem standarda indijuma.

Mikroskopija na vrućoj ploči (HSM)

HSM snimanja izvršena su korišćenjem Mettler Toledo Hot Stage mikroskopa (Hot-Stage FP82HT, Controller/processor FP 90, Microscope DME Model 13595, Camera PL-A622 firewire camera, Mettler Toledo, Nemačka) i softvera *Studio Capture* 3.1, u temperaturnom opsegu od 20 do 250 °C.

Infracrvena spektrofotometrija sa Furijevom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektri formulisanih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom su dobijeni korišćenjem Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrometra spojenog sa horizontalnim Golden Gate MKII jedno-reflektivnim ATR sistemom (Specac, 214 Kent, Velika Britanija), opremljenog sa Zy-Se sočivom.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Praškasti uzorci samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom su fiksirani na odgovarajuće nosače za uzorke, zatim su sušeni na vazduhu, a nakon toga obloženi ultra tankim slojem zlata (10 nm). SEM snimanja su izvršena na uređaju HITACHI SU 8000 (Hitachi, Japan), pri naponu od 2000 V.

9.2.2. Rezultati i diskusija

9.2.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija, praška karbamazepina i komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem prikazani su tabelarno (Tabela 9.8. i Tabela 9.9.) i grafički na slikama 9.8. i 9.9.

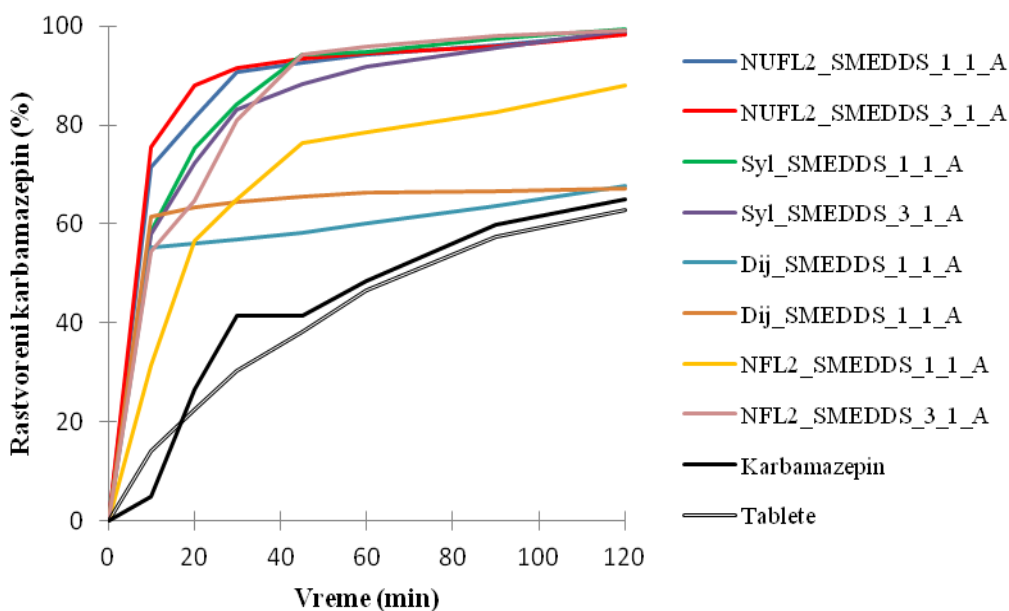
Sve izrađene formulacije inicijalno su pokazale povećanje brzine rastvaranja karbamazepina u odnosu na čistu supstancu i komercijalne tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Formulacija izrađena metodom direktne adsorpcije (A), sa Neusilin[®]-om UFL2, pri odnosu adsorpcioni nosač/SMEDDS 3:1 pokazala je najbrže rastvaranje karbamazepina od svih ispitivanih (75,5% nakon 10 minuta). Nakon 30 minuta ispitivanja, iz obe formulacije sa Neusilin[®]-om UFL2, izrađene metodom A, rastvorilo se više od 90% karbamazepina, čime je zadovoljen osnovni farmakopejski zahtev za preparate sa trenutnim oslobađanjem (više od 80% lekovite supstance za 30 minuta) (USP 38 - NF 33). Međutim, formulacije sa dijatomitima, izrađene metodom B, pokazuju gotovo sporije oslobađanje karbamazepina u odnosu na čist karbamazepin i komercijalne tablete karbamazepina. Tako je iz formulacija sa dijatomitima, izrađenih metodom B, za 30 minuta postignuto oslobađanje karbamazepina od 35,73% i 42,86%, u zavisnosti od odnosa dijatomiti/SMEDDS (Tabela 9.9.). Nakon toga sledi usporeno oslobađanje karbamazepina, pa je tako za 120 minuta oslobođeno svega 43,70%, odnosno 48,3% karbamazepina, pri čemu je veća brzina oslobađanja postignuta pri odnosu dijatomiti/SMEDDS 3:1.

Tabela 9.8. Procenti rastvorenog karbamazepina iz SSMEDDS (izrađenih metodom direktne adsorpcije), praška karbamazepina i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

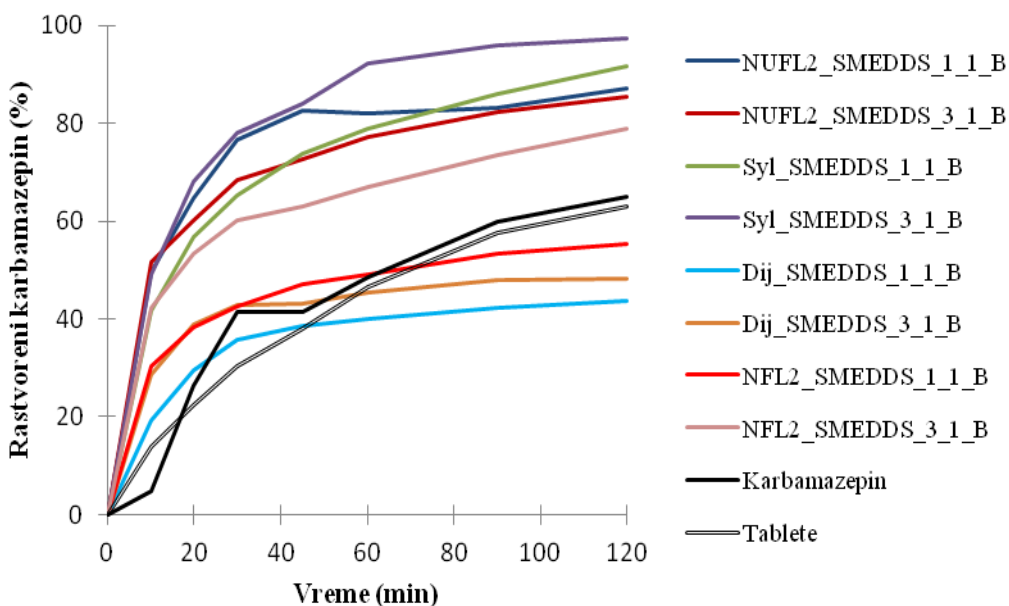
Oznaka formulacije	Procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)						
	10	20	30	45	60	90	120
NUFL2_SMEDDS_1_1_A	71,35	81,47	90,63	92,55	94,22	96,07	98,56
NUFL2_SMEDDS_3_1_A	75,50	87,94	91,56	93,39	94,37	95,75	98,14
Syl_SMEDDS_1_1_A	58,41	75,18	84,27	94,11	94,79	97,47	99,25
Syl_SMEDDS_3_1_A	58,04	72,38	83,03	88,22	91,81	95,64	99,03
Dij_SMEDDS_1_1_A	55,24	56,11	56,76	58,13	60,06	63,62	67,67
Dij_SMEDDS_3_1_A	61,55	63,38	64,37	65,62	66,42	66,66	67,04
NFL2_SMEDDS_1_1_A	31,30	56,72	65,03	76,25	78,42	82,58	87,88
NFL2_SMEDDS_3_1_A	54,51	64,69	80,83	94,26	95,86	98,06	99,09
Karbamazepin	4,91	26,42	41,56	41,43	48,45	59,83	65,08
Tablete	13,99	22,52	30,36	38,08	46,45	57,52	62,86

Tabela 9.9. Procenti rastvorenog karbamazepina iz SSMEDDS (izrađenih metodom uparavanja), praška karbamazepina i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

Oznaka formulacije	Procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)						
	10	20	30	45	60	90	120
NUFL2_SMEDDS_1_1_B	49,79	64,80	76,65	82,55	82,02	83,03	87,24
NUFL2_SMEDDS_3_1_B	51,73	60,18	68,42	72,70	77,15	82,21	85,31
Syl_SMEDDS_1_1_B	41,61	56,80	65,12	73,76	78,87	86,03	91,62
Syl_SMEDDS_3_1_B	49,14	67,98	78,00	83,86	92,34	95,97	97,37
Dij_SMEDDS_1_1_B	19,22	29,58	35,73	38,45	40,11	42,33	43,70
Dij_SMEDDS_3_1_B	28,76	38,74	42,86	43,17	45,48	47,89	48,30
NFL2_SMEDDS_1_1_B	30,31	38,25	42,42	47,00	49,00	53,24	55,24
NFL2_SMEDDS_3_1_B	42,18	53,29	60,20	62,95	66,95	73,38	78,94
Karbamazepin	4,91	26,42	41,56	41,43	48,45	59,83	65,08
Tablete	13,99	22,52	30,36	38,08	46,45	57,52	62,86



Slika 9.8. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih metodom A (direktna adsorpcije), praška karbamazepina i karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 9.9. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih metodom B (metoda uparavanja) praška karbamazepina i karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

Vrednosti faktora razlike (f1) i faktora sličnosti (f2) ispitivanih formulacija u odnosu na čist karbamazepin i tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem su izračunate pomoću jednačina 9.1 i 9.2 i prikazane u tabeli 9.10. Na osnovu izračunatih vrednosti f1 i f2 može se zaključiti da se profili brzine rastvaranja karbamazepina iz svih formulacija, osim za formulaciju sa dijatomitima, izrađenu metodom uparavanja, pri odnosu dijatomiti/SMEDDS 1:1, značajno razlikuju od profila brzine rastvaranja čistog karbamazepina i tableta sa trenutnim oslobađanjem, na osnovu čega se može zaključiti da je iz ovih formulacija postignuto povećanje brzine oslobađanja karbamazepina. Faktor sličnosti za formulaciju sa dijatomitima, izrađenu metodom uparavanja, pri odnosu dijatomiti/SMEDDS 1:1 ima vrednost preko 50, kako u poređenju sa čistim karbamazepinom, tako i u poređenju sa tabletama sa trenutnim oslobađanjem, što ukazuje na to da nema značajne razlike između ove formulacije, čiste supstance i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

Procena uticaja metode izrade čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema na brzinu oslobađanja karbamazepina

Analizom rezultata ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz svih formulacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, utvrđeno je da se iz formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije postiže veća brzina rastvaranja karbamazepina od formulacija identičnog sastava, izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola.

Iz formulacije u kojoj je kao porozni adsorbens korišćen Neusilin[®] FL2, izrađene metodom A, pri odnosu adsorpcioni nosač/SMEDDS 1:1, postignut je donekle sličan procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 min, kao i iz formulacije istog sastava izrađene metodom B (Tabele 9.8 i 9.9). Pri odnosu adsorpcioni nosač/SMEDDS 3:1, veća brzina rastvaranja karbamazepina, nakon 10 min, postiže se iz formulacije izrađene metodom A (direktna adsorpcija) u poređenju na formulaciju izrađenu metodom B (uparavanje). U kasnijim vremenskim intervalima se značajno veća brzina oslobađanja karbamazepina postiže iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih metodom direktne adsorpcije (metoda A), bez obzira na odnos adsorpcioni nosač/SMEDDS.

Tabela 9.10. Poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa praškom karbamazepina i tabletama karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem - faktori razlike (f1) i sličnosti (f2)

		NUFL2_SMEDD S_1_1_A	NUFL2_SMEDD S_3_1_A	Syl_SMEDDS_1_ 1_A	Syl_SMEDDS_3_ 1_A	Dij_SMEDDS_1_ 1_A	Dij_SMEDDS_1_ 1_A	NFL2_SMEDDS_ 1_1_A	NFL2_SMEDDS_ 3_1_A
Karbamazepin	f1	62,17	43,98	59,98	58,63	43,14	49,35	47,10	58,28
	f2	15,37	14,29	17,48	18,68	29,23	24,98	28,66	22,03
Tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem	f1	56,50	57,31	54,96	53,79	34,91	40,27	43,16	53,72
	f2	15,94	15,11	17,43	18,51	32,04	27,50	27,40	18,52
		NUFL2_SMEDD S_1_1_B	NUFL2_SMEDD S_3_1_B	Syl_SMEDDS_1_ 1_B	Syl_SMEDDS_3_ 1_B	Dij_SMEDDS_1_ 1_B	Dij_SMEDDS_3_ 1_B	NFL2_SMEDDS_ 1_1_B	NFL2_SMEDDS_ 3_1_B
Karbamazepin	f1	54,25	50,70	48,52	56,16	21,24	21,19	21,36	43,00
	f2	22,52	25,26	27,42	20,91	56,38	47,72	46,57	31,59
Tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem	f1	48,34	45,39	44,96	51,87	23,57	24,98	21,39	37,93
	f2	22,89	25,62	26,27	20,20	50,67	47,83	49,60	32,03

Iz formulacija izrađenih metodom direktne adsorpcije (metoda A), sa Neusilin[®]-om UFL2 kao adsorpcionim nosačem, takođe se postiže veća brzina rastvaranja karbamazepina u poređenju sa formulacijama identičnog sastava izrađenih metodom uparavanja (metoda B) (Tabele 9.8 i 9.9). Inicijalna razlika u količini oslobođenog karbamazepina je oko 20%, dok se kasnije tokom ispitivanja ova razlika smanjuje.

Iz formulacija sa Sylysia[®]-om 320 (Tabele 9.8 i 9.9), bez obzira na odnos nosač/SMEDDS, takođe je uočena značajna razlika u brzini rastvaranja karbamazepina u zavisnosti od metode izrade, pri čemu je veća brzina rastvaranja postignuta iz formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije (metoda A).

Iz formulacija izrađenih metodom direktne adsorpcije, sa dijatomitima kao adsorpcionim nosačem, nakon prvih 10 minuta ispitivanja rastvori se više nego dvostruko karbamazepina u poređenju sa identičnim formulacijama izrađenih metodom uparavanja (Tabele 9.8 i 9.9). Tokom daljih ispitivanja, razlika u brzini oslobađanja se smanjuje, ali do kraja ispitivanja procenat oslobođenog karbamazepina iz formulacija izrađenih direktnom adsorpcijom (sa dijatomitima) ostaje za oko 20% veći u odnosu na odgovarajuće formulacije izrađene metodom uparavanja.

Izračunavanjem faktora sličnosti i faktora razlike (Tabela 9.11.) za poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija izrađenih različitim metodama, uočava se značajna razlika između svih upoređivanih formulacija, osim za formulacije izrađene sa Sylysia[®]-om 320 i odnosom adsorpcioni nosač/SMEDDS 3:1. Ovo ukazuje na to da je izbor metode izrade čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema značajan faktor koji utiče na brzinu oslobađanja karbamazepina, a samim tim i potencijalno postizanje odgovarajuće biorasploživosti.

Niži procenat oslobođenog karbamazepina iz formulacija izrađenih metodom evaporacije pomoću etanola verovatno je posledica hidrofobnih interakcija između karbamazepina i adsorpcionog nosača, do koje je došlo tokom procesa uklanjanja etanola iz formulacija, i posledično tome precipitaciji karbamazepina na površinu adsorpcionog nosača.

Tabela 9.11. Poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih različitim metodama-faktori razlike (f1) i sličnosti (f2)

Poređene formulacije		f1	f2
NUFL2_SMEDDS_1_1_A	NUFL2_SMEDDS_1_1_B	15,81	43,22
NUFL2_SMEDDS_3_1_A	NUFL2_SMEDDS_3_1_B	21,82	35,82
Syl_SMEDDS_1_1_A	Syl_SMEDDS_1_1_B	18,16	40,89
Syl_SMEDDS_3_1_A	Syl_SMEDDS_3_1_B	4,28	67,89
Dij_SMEDDS_1_1_A	Dij_SMEDDS_1_1_B	40,34	31,83
Dij_SMEDDS_3_1_A	Dij_SMEDDS_3_1_B	35,12	33,08
NFL2_SMEDDS_1_1_A	NFL2_SMEDDS_1_1_B	34,03	31,22
NFL2_SMEDDS_3_1_A	NFL2_SMEDDS_3_1_B	25,44	33,83

Procena uticaja vrste adsorpcionog nosača na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS primećeno je da najveća razlika postoji između formulacija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2 kao adsorpcionim nosačem, koje pokazuju veći obim i brzinu oslobađanja karbamazepina u poređenju sa odgovarajućim formulacijama izrađenih sa dijatomitima. Nakon 120 minuta ispitivanja, iz formulacija izrađenih sa Neusilin[®]-om UFL2 rastvara se skoro potpuna količina karbamazepina (85,31-98,56%), dok je rastvaranje karbamazepina iz formulacija sa dijatomitima nepotpuno i ne prelazi 70% od ukupne količine lekovite supstance (43,70-67,67%) (Tabele 9.8. i 9.9.).

Razlika u brzini rastvaranja karbamazepina iz formulacija koje se međusobno razlikuju samo po vrsti korišćenog adsorpcionog nosača posledica je različite specifične adsorpcione površine ovih nosača, veličine čestica i njihove specifične strukture, odnosno prisustva mikro- i makroporoziteta u nosaču.

Prilikom adsorpcije tečnog SMEDDS-a na adsorpcioni nosač može doći do parcijalnog ili potpunog popunjavanja pora nosača, što zavisi od specifične površine nosača. Tip interakcije, određuje ukupnu kontaktnu površinu između tečnog SMEDDS-a i površine adsorbensa ili zidova njegovih pora. Povećanje kontaktne površine između tečnog

SMEDDS-a i površine adsorbensa povećava se potencijal za nukleaciju, a samim tim smanjuje se obim oslobađanja lekovitih supstanci. Prisustvo silanolnih grupa na površini nosača, čine nosače potencijalnim donatorom, ali i akceptorom protona. Indukcija nisko energetske veze, poput Van der Waals-ovih sila između površine adsorbensa i hidrofobnog molekula karbamazepina, može dovesti do agregacije ili koalescencije leka. Kod nosača manje specifične površine, veća količina SMEDDS-a je u direktnom kontaktu sa adsorbensom, što dovodi do precipitacije i posledično niže brzine oslobađanja leka. Najmanji obim nukleacije se očekuje kod adsorbensa sa visokom specifičnom površinom ($\geq 300 \text{ m}^2/\text{g}$), kod kojih se mikropore ponašaju kao kapilarni kanali u kojima je tečni SMEDDS „zarobljen“, a ne adsorbovan na površinu nosača. Prisustvo SMEDDS-a na površini adsorbensa, nasuprot njegovom zadržavanju u porama ima negativan uticaj na brzinu oslobađanja lekovite supstance. Prisustvo veće količine SMEDDS-a koja je u direktnom kontaktu sa površinom adsorbensa povećava kontaktnu površinu između karbamazepina i adsorbensa, što dovodi do precipitacije karbamazepina iz SMEDDS-a usled hidrofobnih interakcija između karbamazepina i površine adsorbensa. Precipitacija karbamazepina nastaje kao posledica njegove niske rastvorljivosti u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja (Agarwal i sar., 2009).

Generalno, rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih samo-mikroemulgujućih terpijskih sistema pokazuju da redosled brzine rastvaranja karbamazepina opada u zavisnosti od adsorbensa sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti. Neusilin[®] UFL2 pokazuje visok kapacitet adsorbovanja tečnog SMEDDS-a, usled svoje visoke specifične površine od $300 \text{ m}^2/\text{g}$ (Elektronska baza podataka *ii*, *iii*). Može se pretpostaviti da u formulacijama sa Neusilin[®]-om UFL2 tečni SMEDDS delimično ispunjava duge i uske pore ovog nosača, a delimično biva adsorbovan na površini. Iz formulacije sa Sylysia[®]-om 320 postiže se značajno manja brzina oslobađanja karbamazepina, iako Sylysia[®] 320 ima istu specifičnu površinu, kao Neusilin[®] UFL2. Manja brzina oslobađanja karbamazepina iz formulacije sa Sylysia[®]-om 320 verovatno je posledica razlike u veličini čestica, kao i veličini i dužini pora (Agarwal i sar., 2009). Neusilin[®] FL2 ima znatno manju specifičnu površinu od Neusilin[®]-a UFL2 ($150 \text{ m}^2/\text{g}$), što je razlog manje brzine oslobađanja karbamazepina iz ovih formulacija (Milović i sar., 2012; Hailu i Bogner, 2011). Dijatomiti predstavljaju nosač male specifične površine ($30,92 \text{ m}^2/\text{g}$) (Löbenberg

i Amidon, 2000), usled čega dolazi do adsorpcije tečnog SMEDDS-a na površinu čestica dijamita, što povećava kontaktnu površinu i dovodi do precipitacije karbamazepina na površini nosača. Osim toga, na profilima brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija sa dijamitima mogu se uočiti dve faze (Slika 9.8. i Slika 9.9.). Prva, u kojoj dolazi do relativno brzog oslobađanja karbamazepina, i druga, u kojoj je brzina oslobađanja usporena. Može se pretpostaviti da u prvoj fazi dolazi do oslobađanja karbamazepina adsorbovanog na površini dijamita, dok u drugoj fazi dolazi do usporenog oslobađanja karbamazepina, koje je posledica njegovog „zarobljavanja“ u unutrašnjoj šupljini strukture dijamita. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Aw i sar., 2012).

Procena uticaja udela adsorpcionog nosača na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

Analizom profila brzine rastvaranja karbamazepina primećeno je da brzina rastvaranja nešto veća iz formulacija sa odnosom adsorpcioni nosač: SMEDDS 3:1, u poređenju sa odnosom 1:1. Međutim, izračunavanjem faktora razlike i faktora sličnosti utvrđeno je da ova razlika nije značajna (Tabela 9.12.). Pretpostavka je da je veći udeo adsorpcionog nosača doprinosi bržem oslobađanju karbamazepina, usled veće kontaktne površine sa medijumom za rastvaranje. Izuzetak su: formulacija sa Sylysia[®]-om 320, pri odnosu nosač/SMEDDS 3:1, izrađena metodom direktne adsorpcije i formulacija sa Neusilin[®]-om UFL2 i odnosom nosač/SMEDDS 3:1, izrađena metodom uparavanja, gde je nešto veća brzina oslobađanja postignuta pri odnosu adsorpcioni nosač/SMEDDS 1:1. Takođe, iz tabele 9.12. se vidi da je značajna razlika postignuta jedino iz formulacija u kojima je korišćen Neusilin[®] FL2 kao adsorbens, međutim odnos koji dovodi do značajnijeg povećanja brzine rastvaranja karbamazepina nije jasno uočljiv i očitavo zavisi od primenjene metode. Kod metode direktne adsorpcije uz korišćenje Neusilin[®]-a FL2 se veća brzina oslobađanja karbamazepina postiže pri odnosu adsorbens/SMEDDS 3:1, dok je kod uzoraka izrađenih metodom uparavanja, suprotna situacija.

Iz svega navedenog se može zaključiti da odnos adsorpcioni nosač/SMEDDS ima najmanji uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema, u odnosu na vrstu adsorpcionog nosača i postupak izrade, kao i da uticaj ovog faktora nije moguće jasno utvrditi.

Tabela 9.12. Poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa različitim odnosima adsorpcioni nosač: tečni-samomikroemulgujući sistem-faktori razlike (f1) i sličnosti (f2)

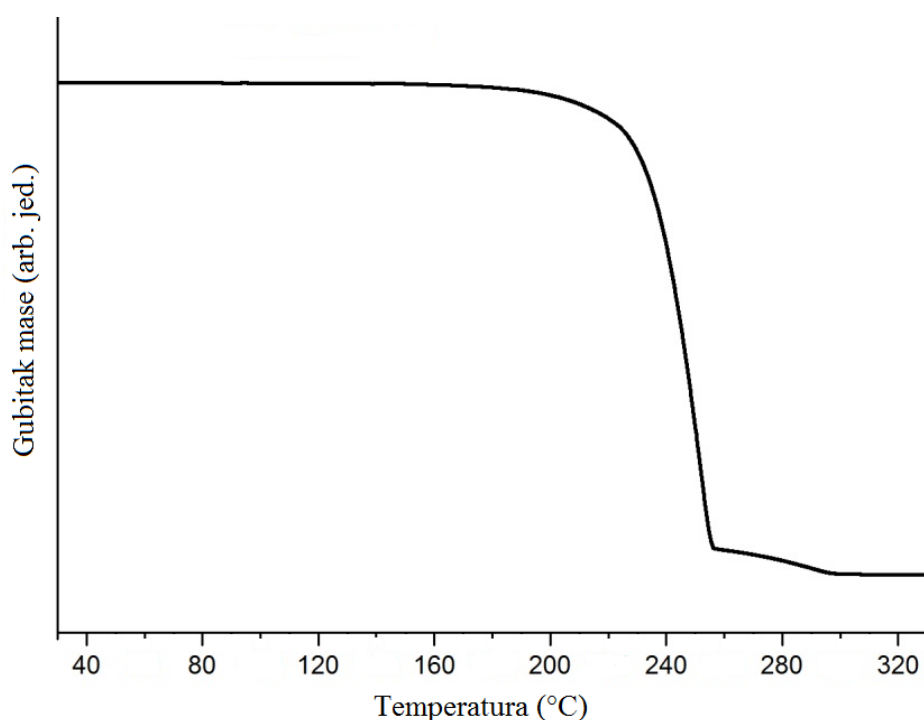
Poređene formulacije		f1	f2
NUFL2_SMEDDS_1_1_A	NUFL2_SMEDDS_3_1_A	2,12	76,61
Syl_SMEDDS_1_1_A	Syl_SMEDDS_3_1_A	2,53	77,35
Dij_SMEDDS_1_1_A	Dij_SMEDDS_3_1_A	9,27	62,00
NFL2_SMEDDS_1_1_A	NFL2_SMEDDS_3_1_A	22,81	40,87
NUFL2_SMEDDS_1_1_B	NUFL2_SMEDDS_3_1_B	6,13	61,72
Syl_SMEDDS_1_1_B	Syl_SMEDDS_3_1_B	14,34	50,40
Dij_SMEDDS_1_1_B	Dij_SMEDDS_3_1_B	18,50	59,39
NFL2_SMEDDS_1_1_B	NFL2_SMEDDS_3_1_B	38,80	38,84

9.2.2.2. Karakterizacija čvrstih samo-mikroemulgujućih terpijskih sistema sa karbamazepinom

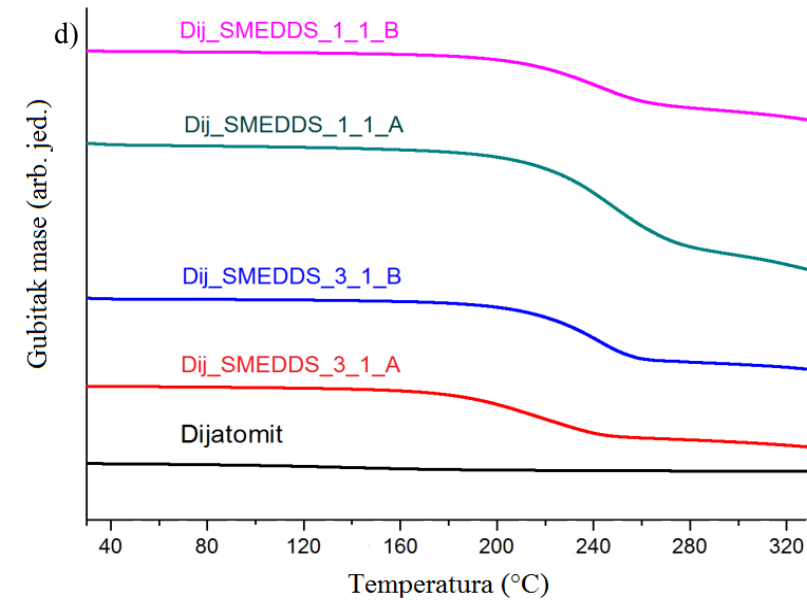
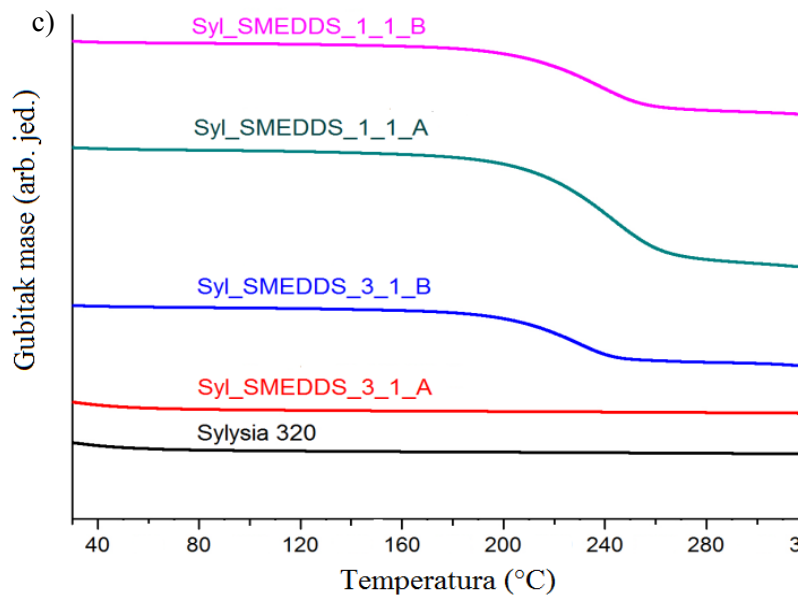
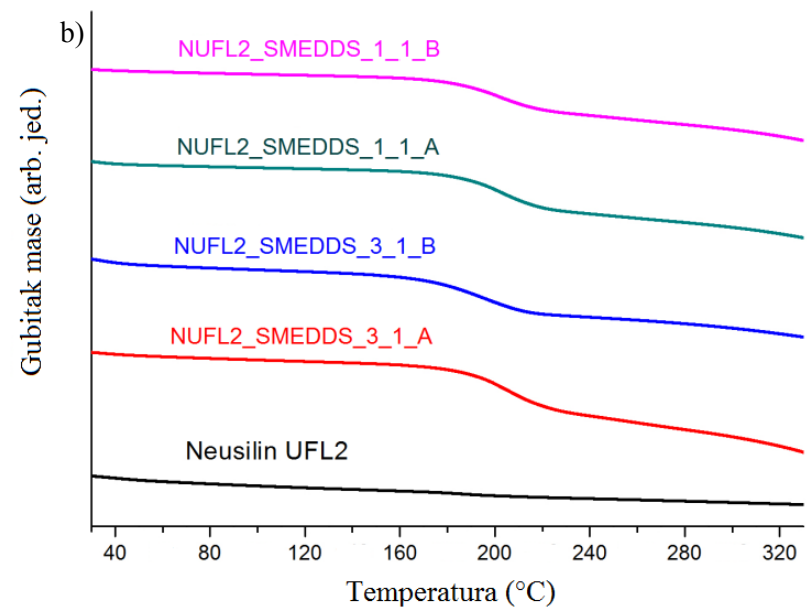
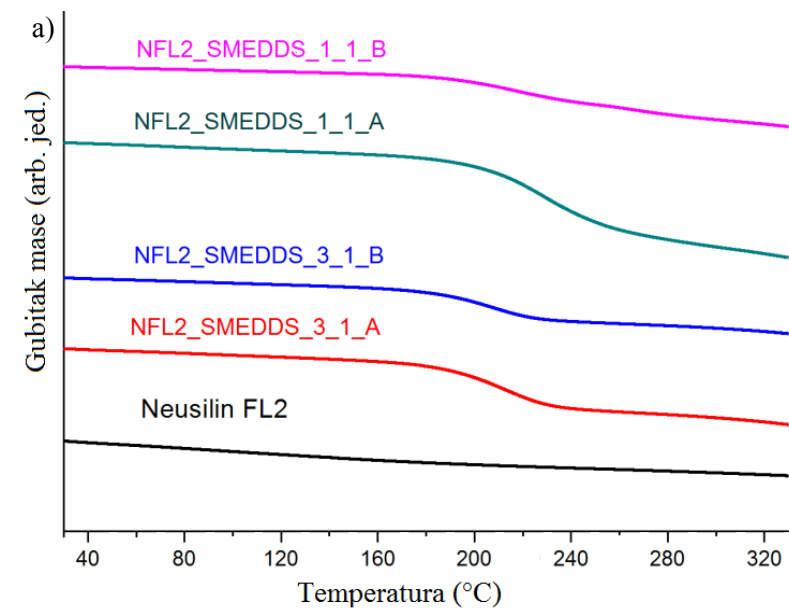
Termogravimetrijska analiza (TGA)

TGA kriva čistog karbamazepina (Slika 9.10.) pokazuje da je izrazito stabilan tokom zagrevanja u temperaturnom opsegu od sobne temperature do 200 °C, uz gubitak mase manji od 1%. Međutim, u temperaturnom opsegu od 200 do 250 °C uočava se nagli gubitak mase (oko 75% od početne mase uzorka), što je verovatno posledica degradacije same supstance. Do sličnog zaključka da na temperaturi preko 200 °C počinje degradacija karbamazepina su došli i drugi autori (Qi i sar., 2014). Porozni adsorbensi su se pokazali stabilnim tokom zagrevanja u temperaturnom opsegu od sobne temperature do 300 °C (Slika 9.11.) i nisu uočene značajnije promene u masi: Neusilin[®] UFL2 20%; Neusilin[®] FL2 16,14%; dijamiti 5,4%; Sylysia[®] 320 3,1%. Kod Neusilin[®]-a UFL2 i Neusilin[®]-a FL2 najznačajniji gubitak mase je uočen do temperature od 100 °C, što je verovatno posledica gubljenja vlage koju su ovi nosači adsorbovali tokom čuvanja (Slika 9.11.). Sve formulacije SSMEDDS su se pokazale

izrazito stabilnim tokom zagrevanja, u temperaturnom opsegu od sobne temperature do 300 °C (Slika 9.11.). Značajniji gubitak mase je zabeležen tek nakon temperature od 200 °C, što je i očekivano, na osnovu pretpostavke da na tako visokoj temperaturi dolazi do degradacije same supstance. Generalno, skoro sve formulacije SSMEDDS su pokazale slično ponašanje, jer su sve sadržale istu količinu karbamazepina. Rezultati TGA ukazuju na to da su izrađene formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom stabilne tokom zagrevanja (do 300 °C) i ukazuju na to da kombinacija odabranih korišćenih ekscipijenasa i karbamazepina nije dovela do značajnih interakcija koje bi uticale na stabilnost.



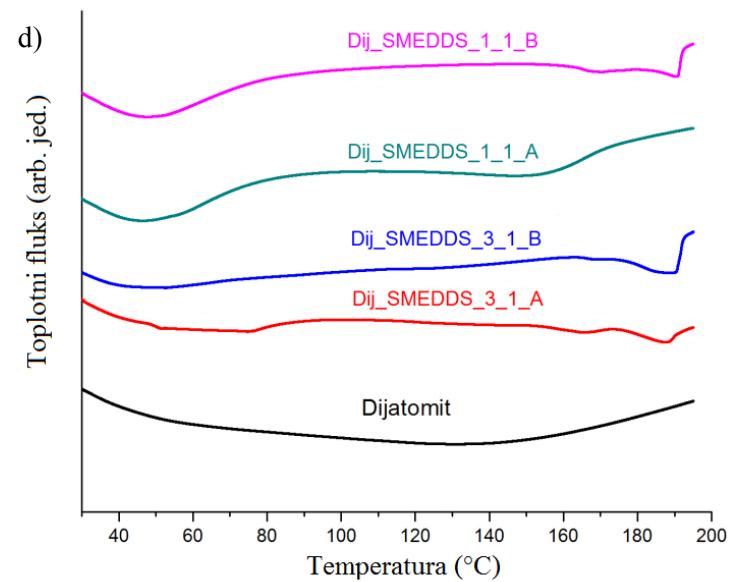
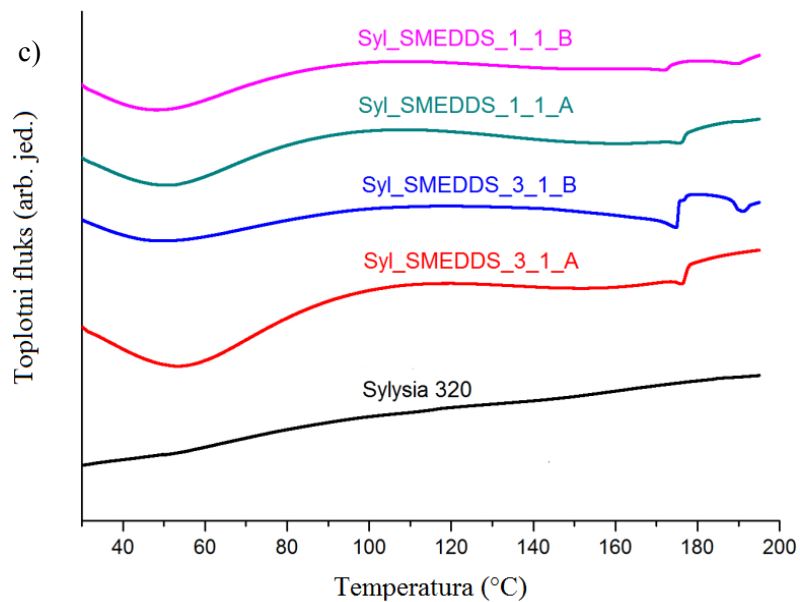
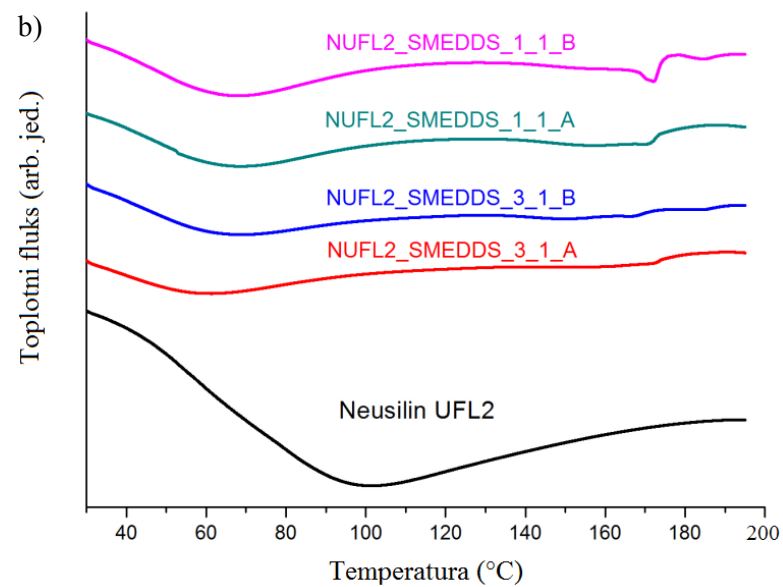
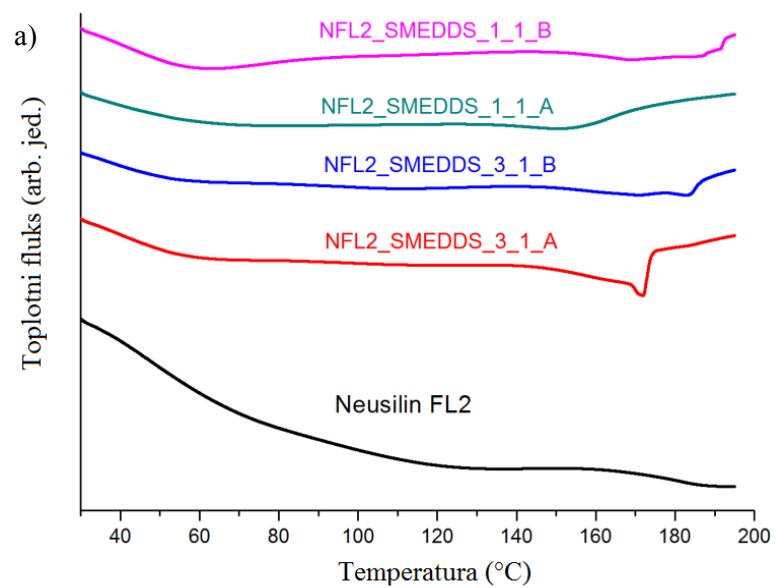
Slika 9.10. TGA kriva gubitka mase karbamazepina u temperaturnom opsegu od 30 do 320 °C.



Slika 9.11. TGA krive gubitka mase, u temperaturnom opsegu od 30-320°C, adsorpcionih nosača i formulacija SSMEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

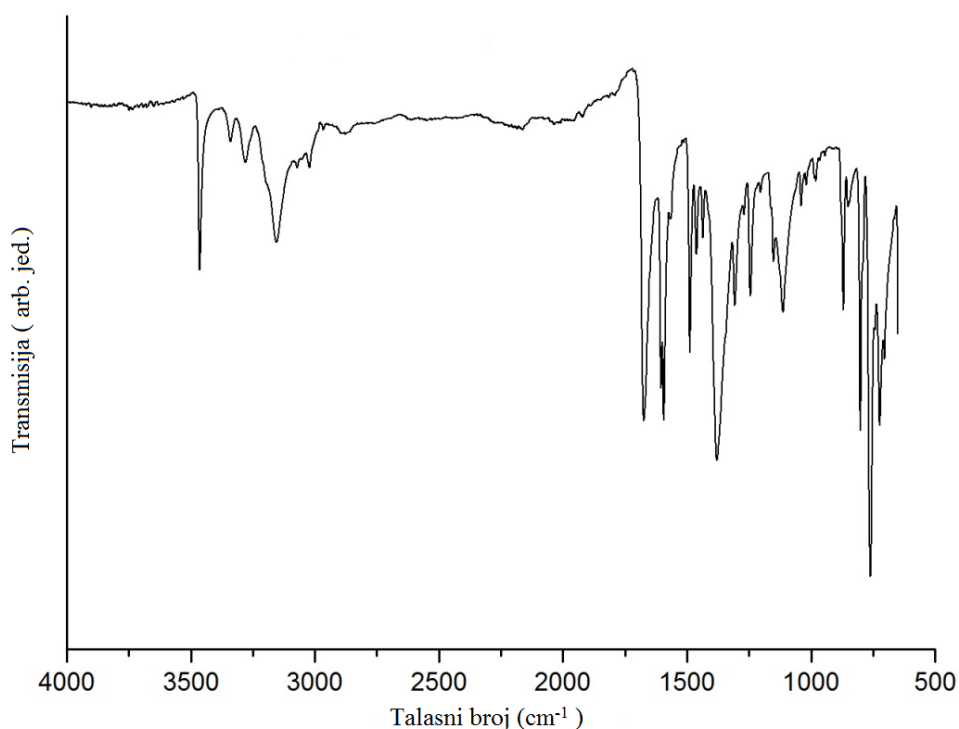
Na DSC krivama adsorpcionih nosača, Neusilin[®] FL2, Neusilin[®] UFL2, Sylysia[®] 320, dijatomita, (Slika 9.12.) uočavaju se širi, ne tako izraženi endotermni pikovi, što verovatno predstavlja posledicu inicijalnog gubitka vlage. Na DSC krivama izrađenih formulacija uočava se niz termalnih događaja (Slika 9.12.). Kod svih formulacija se na početku zagrevanja uočava širi endotermni pik koji je verovatno posledica merne nesigurnosti instrumenta, ili isparavanja vlage, odnosno rezidua etanola koji je korišćen za izradu formulacija metodom B. Široki endotermni pikovi su uočljivi na svim DSC krivama u širokom opsegu temperatura od 150 - 190 °C, što verovatno ukazuje na činjenicu da je karbamazepin prisutan u kristalnom obliku i to najverovatnije u polimorfnom obliku III. Intenzitet ovih pikova je značajno slabiji u odnosu na čist karbamazepin, verovatno iz razloga što je udeo karbamazepina u formulaciji svega 20%. Takođe, u formulacijama u kojima je odnos adsorpcioni nosač/SMEDDS 1:1, usled većeg udela tečnog SMEDDS intenzitet ovih endotermnih pikova je slabiji, verovatno zbog rastvaranja dela karbamazepina u komponentama tečnog SMEDDS. Ovo je slučaj kod svih adsorpcionih nosača, osim kod Neusilin[®]-a UFL2, gde su pikovi izraženiji pri odnosu 1:1, verovatno zbog značajne amorfности ovog nosača i velike specifične površine, pa sam tim i jače interakcije karbamazepina i nosača, pri većim udelima adsorbenasa. Rezultati DSC analize ukazuju da je karbamazepin u formulacijama prisutan u kristalnoj formi, najverovatnije u polimorfnom obliku III, što će biti analizirano primenom drugih analitičkih tehnika.



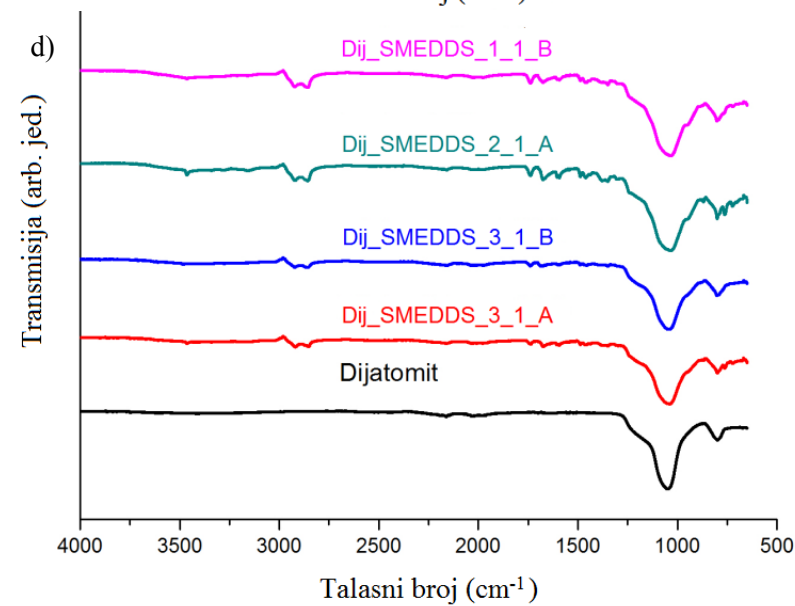
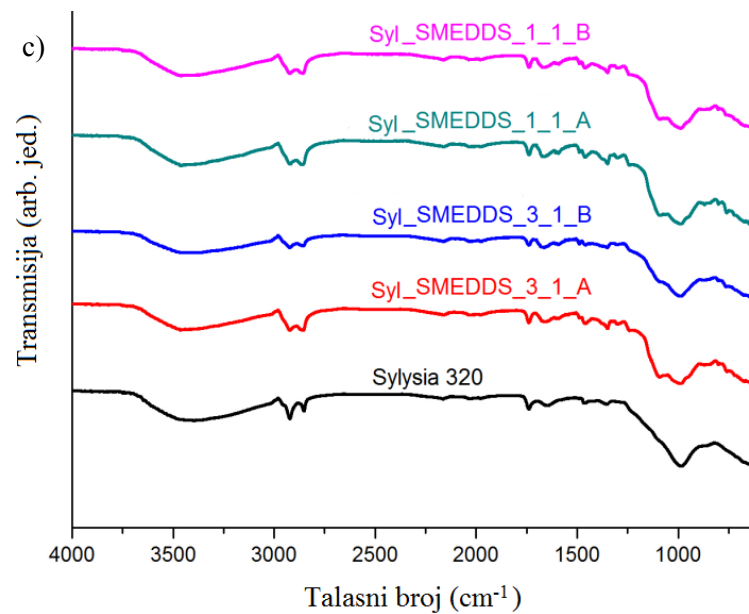
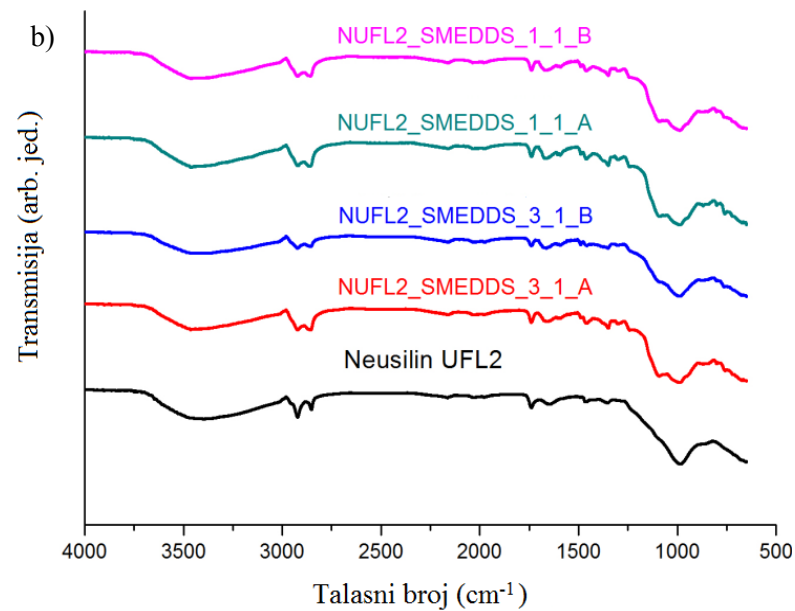
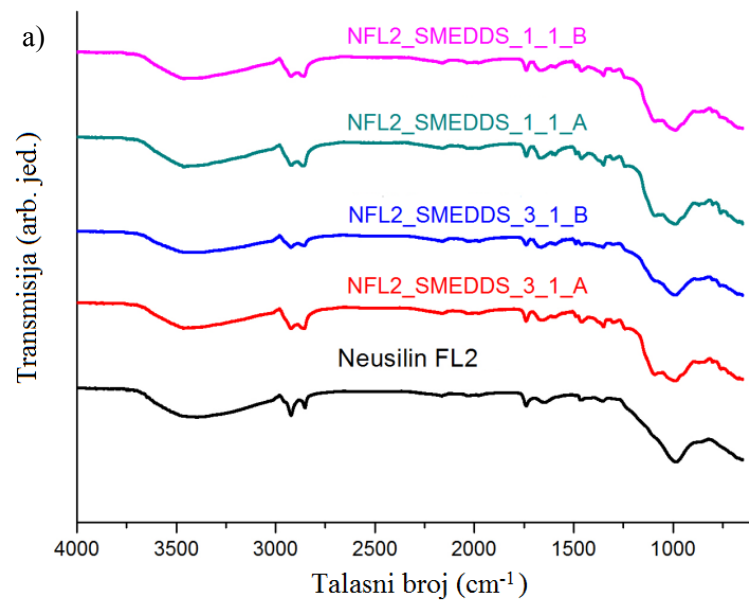
Slika 9.12. DSC krive adsorpcijskih nosača i formulacija SSMEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.

Infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Na slikama 9.13. i 9.14. je prikazan spektar karbamazepina, adsorpcionih nosača i formulacija SSMEDDS. Spektar čistog karbamazepina ukazuje da je on u polimorfnom obliku III. Na taj zaključak ukazuju karakteristične trake na 3462 cm^{-1} ($-\text{NH}$ valenciona vibracija), 1674 cm^{-1} ($-\text{CO}-\text{R}$ vibracija), 1593 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} (opseg za $-\text{C}=\text{C}-$ i $-\text{C}=\text{O}$ vibraciju i $-\text{NH}$ deformaciju) (Grzesiak i sar, 2003). Na FT-IR spektrima izrađenih formulacija SSMEDDS uočene su ove karakteristične trake za polimorfni oblik III karbamazepina. Međutim, sve četiri trake su slabijeg intenziteta, zbog svega 20% prisutnog karbamazepina u formulacijama. Traka na 3462 cm^{-1} je najslabije uočljiva što ukazuje na verovatno postojanje određene interakcije između nosača i karbamazepina. Takođe, treba istaći da se sve karakteristične trake adsorpcionih nosača uočavaju i na FT-IR spektrima izrađenih formulacija. Sve ovo ukazuje na to da je u formulacijama SSMEDDS došlo do određenih interakcija, ali na osnovu prisutnih karakterističnih traka može se pretpostaviti da je karbamazepin ostao u polimorfnom obliku III, jedinom farmakološki aktivnom obliku.



Slika 9.13. FT-IR spektar karbamazepina.



Slika 9.14. FT-IR spektri adsorpcionih nosača i formulacija SSMEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.

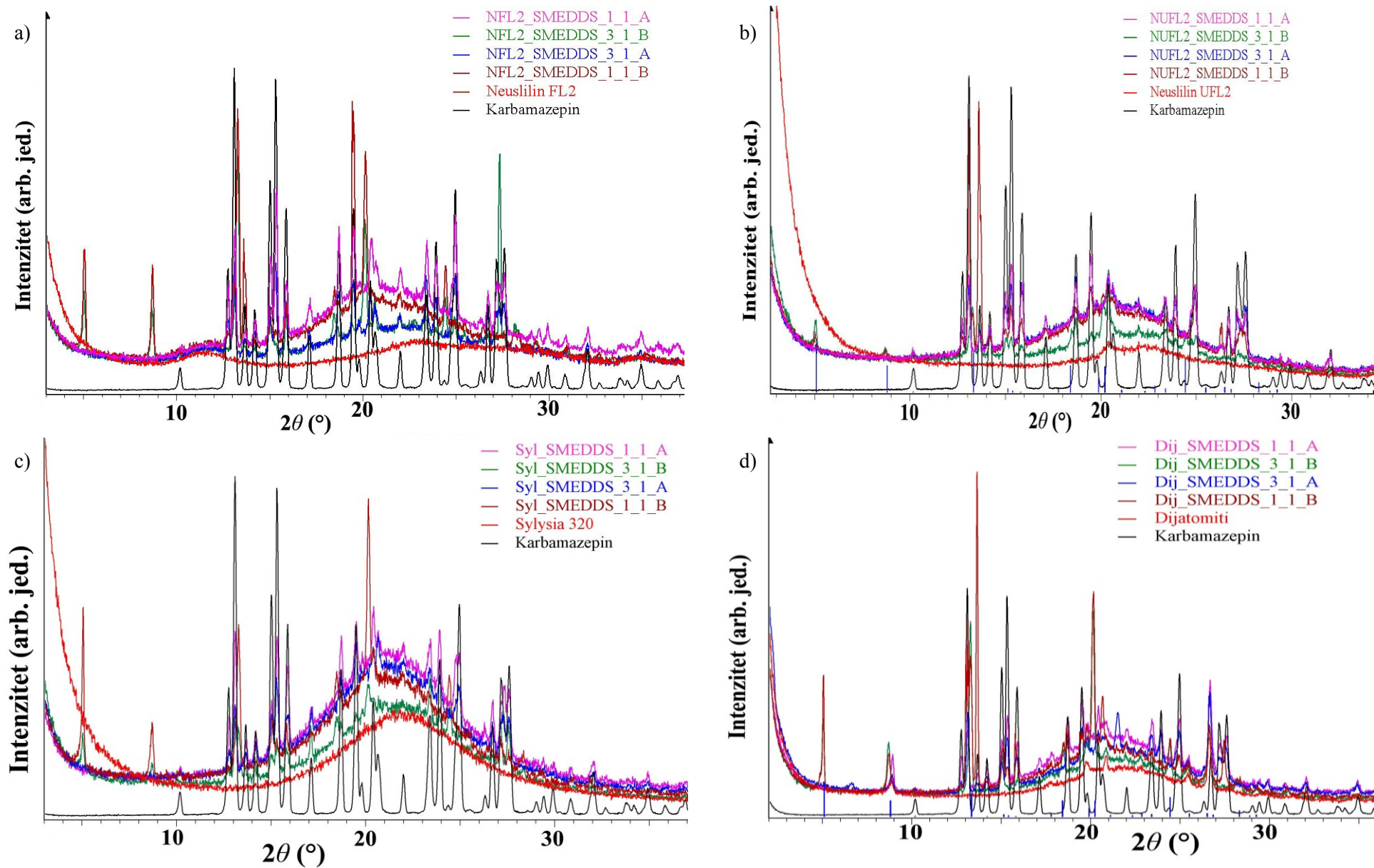
Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD)

Na difraktogramu čistog karbamazepina (Slika 9.15.) uočavaju se visokointenzivni difrakcioni pikovi za sledeće uglove: 2θ - 13,02 °, 15,22 °, 15,78 °, 19,40 °, 24,92 °, 27,50 °, 31,86 °, koji su u skladu sa literaturnim rezultatima karakterističnim za kristalni oblik III karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003). Očekivano je da se na difraktogramu nosača ne uočavaju nikakvi pikovi jer je sam nosač u amorfnom stanju. Na difraktogramu formulacija SSMEDDS (Slika 9.15.) uočavaju se svi ovi karakteristični pikovi. Svi difraktogrami uzoraka su poprimili oblik karakterističan za amorfnu formu, kao posledica velikog udela adsorbensa. Međutim, kod određenih formulacija, izrađenih metodom B (metodom uparavanja) uočava se pik za ugao 2θ od oko 8,70 °. Ovaj pik je karakterističan za polimorfni oblik II karbamazepina (Grzesiak i sar., 2003). U ovim formulacijama su prisutni pikovi karakteristični i za polimorfni oblik III, pa se može zaključiti da je u ovim formulacijama deo karbamazepina prešao u polimorfni oblik II, a deo ostao u polimorfnom obliku III. Ove razlike nisu bile uočljive primenom DSC analize, jer ova dva polimorfna oblika imaju gotovo identične temperature topljenja. Pretpostavljenim prelaskom karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II se može objasniti i značajna razlika u brzini rastvaranja karbamazepina iz formulacija izrađenih različitim metodama. Poznato je da polimorfni oblik III karbamazepina ima najveću rastvorljivost od svih kristalnih oblika karbamazepina (Kobayashi i sar., 2000). Prelazak karbamazepina u polimorfni oblik II u formulacijama izrađenim metodom B (metodom uparavanja) jeste jedan od razloga zašto je pokazana značajno manja brzina oslobađanja karbamazepina iz ovih formulacija u odnosu na brzinu oslobađanja karbamazepina iz formulacija izrađenih metodom A (direktnom adsorpcijom). Prelazak karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II, kod formulacija u kojima je za izradu korišćen etanol je opisan i u sličnim studijama u literaturi (Grzesiak i sar., 2003; Milović i sar., 2014). Grzesiak i sar. su u svojim istraživanjima rastvarali karbamazepin u etanolu (99,5% v/v) na 80 °C, a potom hladili do temperature od 5 °C, pri čemu je došlo do polimorfnog prelaza karbamazepina iz kristalnog oblika III u kristalni oblik II (Grzesiak i sar., 2003). Milović i sar. su tokom formulacije čvrstih samo-emulgujućih fosfolipidnih suspenzija, rastvarali karbamazepin u etanolu (99,5% v/v), nanosili rastvor na određeni adsorbens i nakon toga vršili uparavanje etanola, na

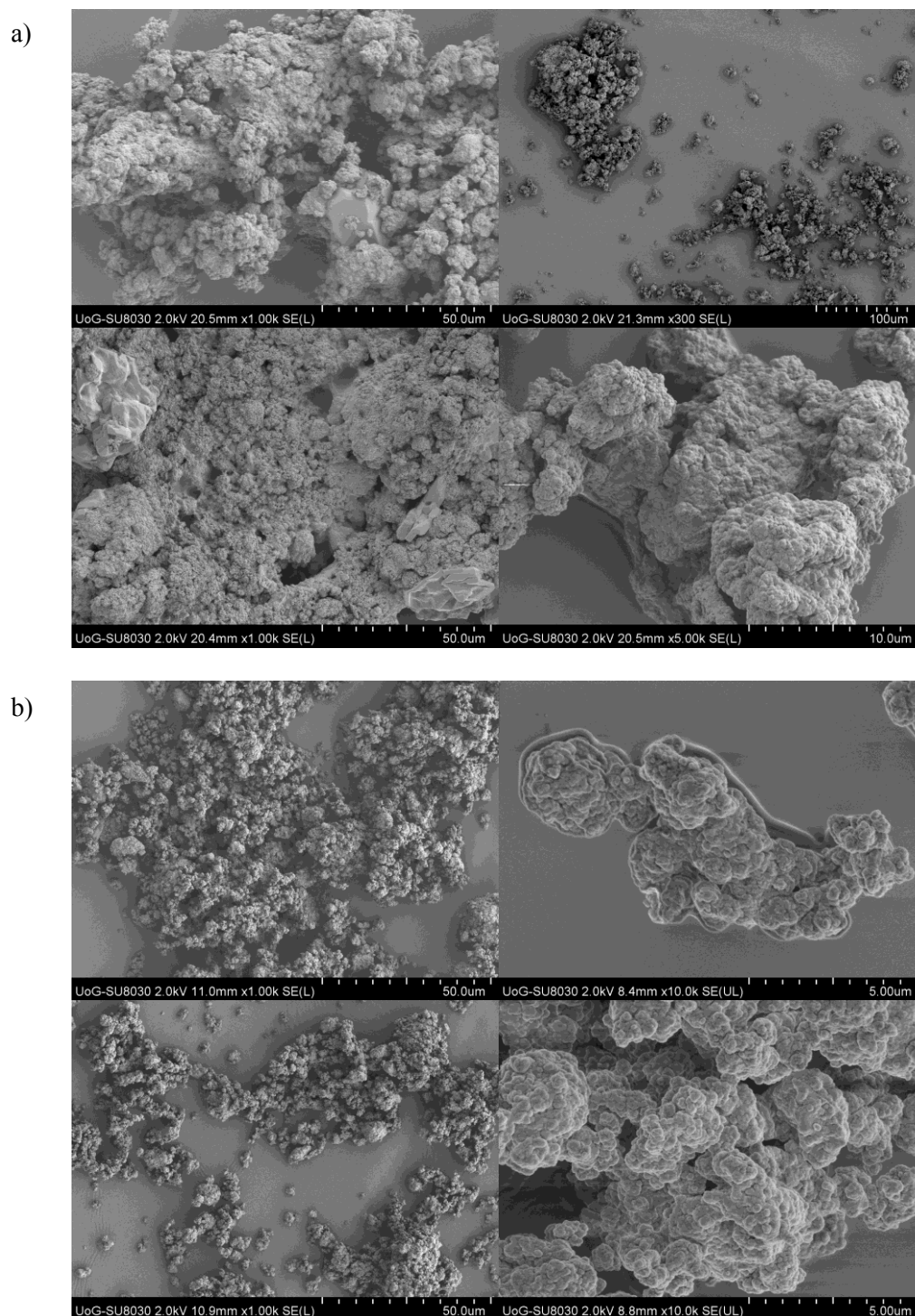
40 °C, pri čemu je uočen isti polimorfni prelaz (Milović i sar., 2014). Rezultati karakterizacije izrađenih formulacija SSMEEDDS ukazuju na to da bez obzira na primenjenu temperaturu tokom uparavanja etanola (99,5% v/v), dolazi do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II. Takođe, u prethodnoj fazi prilikom formulacije čvrstih disperzija sa karbamazepinom, uz uparavanje etanola, uočen je polimorfni prelaz. Ovo je verovatno posledica toga što je jedan od ključnih faktora prilikom stabilizacije polimorfnog oblika III karbamazepina stvaranje vodoničnih veza. U literaturi se navodi da rastvarači, koji su akseptori vodoničnih veza, prvenstveno dovode do rekristalizacije u polimorfni oblik II karbamazepina, dok rastvarači koji su donori u nastanku vodoničnih veza dominantno dovode do kristalizacije karbamazepina u polimorfnom obliku III (Kelly i Rodríguez-Hornedo, 2009; Gua i sar., 2004). Kako je poznato da je jedini farmakološki aktivan polimorfni oblik III karbamazepina (Ph. Eur. 8.0), metoda izrade SSMEEDDS uz uparavanje etanola nije prihvatljiva zbog prelaska polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II. Primenom metode direktne adsorpcije (metoda A), karbamazepin u svim formulacijama, bez obzira na nosač, ostaje u polimorfnom obliku III, pa se ova metoda može smatrati pogodnom za izradu SSMEEDDS.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

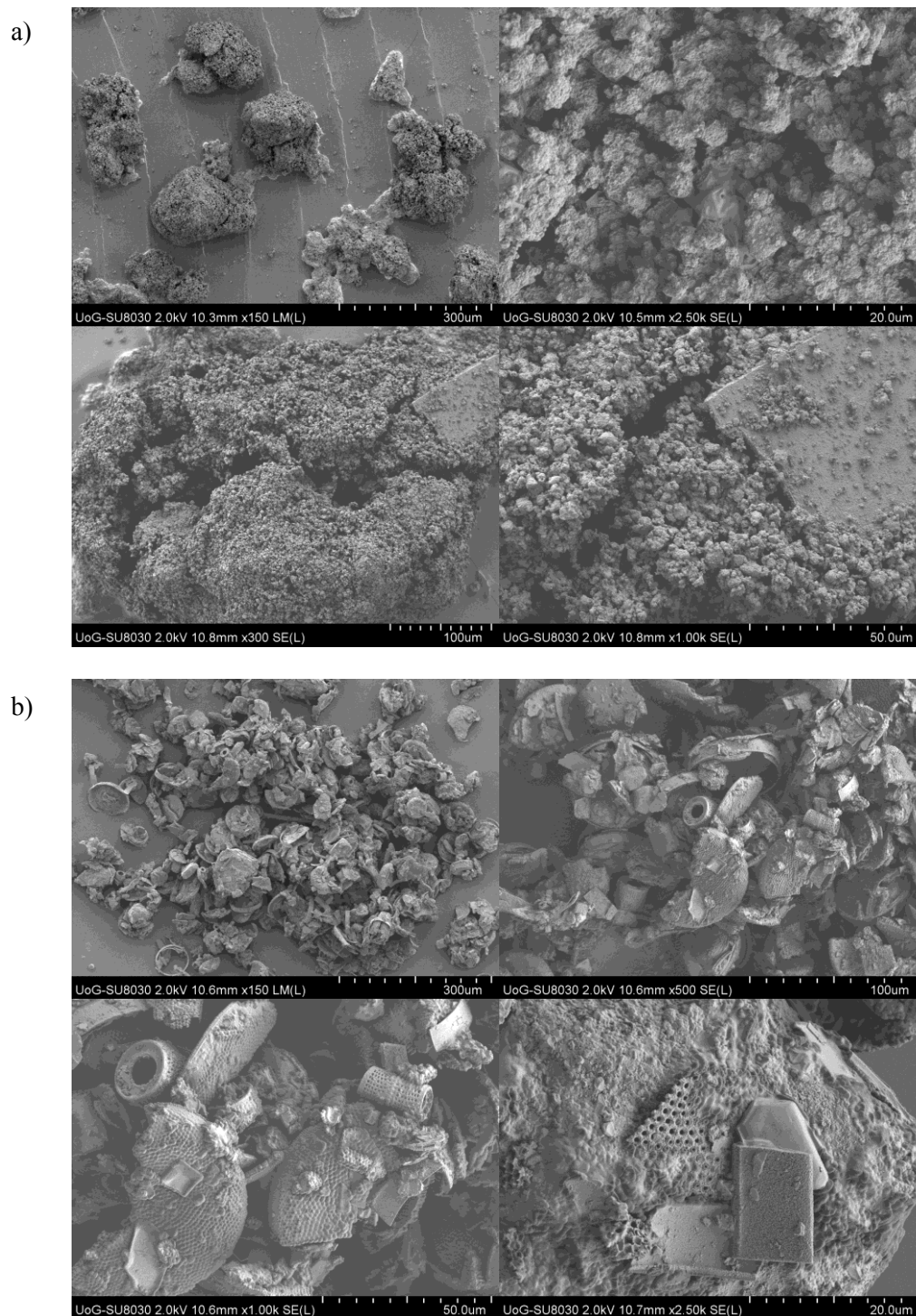
Na mikrografijama formulacija SSMEEDDS snimljenim skenirajućim elektronskim mikroskopom prikazanim na slikama 9.16. i 9.17. uočavaju se neravnine, koje su prvenstveno posledica prisutnih kristala karbamazepina. Na pojedinim delovima mikrografija vide se i strukture samih poroznih nosača, kako pri malom tako i pri velikom uvećanju. Tako se npr. pod velikim uvećanjem na mikrografijama formulacija izrađenih sa Neusilin[®] -om UFL2 uočavaju uske pore specifične za ovaj nosač, koje izgledaju kao tačke na neravnoj površini (Slika 9.16. b). Mikrografije sa dijametrima (Slika 9.17. b) pokazuju izrazito specifičnu strukturu ovog adsorbensa. Uočava se površina adsorbensa, sa koje verovatno dolazi do inicijalnog oslobađanja lekovite supstance, ali i unutrašnja struktura ovog nosača, iz koje verovatno dolazi do kasnijeg postepenog oslobađanja lekovite supstance.



Slika 9.15. PXRD difraktogrami čistog karbamazepina, adsorpcijskih nosača i formulacija SSMEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®] -om FL2; b) Neusilin[®] -om UFL2; c) Sylysia[®] -om 320; d) dijatomitima.



Slika 9.16. SEM mikrografije formulacija SSMEDDS (različita uveličanja, označena na mikrografiji) sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2.



Slika 9.17. SEM mikrografije formulacija SSMEDDS (različita uveličanja, označena na mikrografiji) sa: a) Sylysia[®]-om 320; b) diatomitima.

9.3. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom (Faza 2.3.)

U ovoj fazi istraživanja pristupilo se formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom. Na osnovu rezultata prethodne faze istraživanja uočeno je da metoda izrade čvrstih samo-dispergujućih sistema uz uparavanje etanola nije prihvatljiva zbog prelaska karbamazepina u polimorfni oblik II. Metoda korišćena za izradu čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom bila je metoda direktne adsorpcije (metoda A).

9.3.1. Materijal i metode

Tečni samo-nanoemulgujući sistem (trigliceridi srednje dužine lanca (21,12%), Polisorbat 80 (21,12%), Labrasol[®] (21,12%), Transcutol[®] HP (36,64%)) odabran u fazi 1.3. eksperimentalnog rada (poglavlje 8.3.) korišćen je za izradu čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema. Kao porozni adsorbensi korišćeni su Neusilin[®] FL2, Neusilin[®] UFL2, Sylysia[®] 320 i diјatomiti.

9.3.1.1. Izrada čvrstih samo-nanoemulgujućih terpijskih sistema sa karbamazepinom

Izrađeni tečni SNEDDS je nanet na 4 različita adsorpciona nosača (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320 i diјatomite). Udeo KBZ-a u sastavu čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema (SSNEDDS) bio je konstantan (20%), a odnos tečnog SNEDDS i adsorpcionog nosača variran u odnosu 1:1 i 2:1. Formulacije SSNEDDS su izrađene tako što je prethodno pripremljenoj homogenoj smeši adsorpcionog nosača i karbamazepina postepeno, u malim količinama, uz mešanje dodavan tečni SNEDDS do dobijanja uniformne smeše, koja je nakon toga prosejana kroz sito 300 µm. Izrađeno je 8 formulacija, čiji je sastav prikazan u tabeli 9.13.

Tabela 9.13. Sastav i oznaka formulisanih čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema

Nosač	Odnos Nosač/SNEDDS	Oznaka formulacije
Neusilin [®] FL2	1:1	NFL2_SNEDDS_1_1
Neusilin [®] FL2	1:2	NFL2_SNEDDS_1_2
Neusilin [®] UFL2	1:1	NUFL2_SNEDDS_1_1
Neusilin [®] UFL2	1:2	NUFL2_SNEDDS_1_2
Sylysia [®] 320	1:1	Syl_SNEDDS_1_1
Sylysia [®] 320	1:2	Syl_SNEDDS_1_2
Dijatomi	1:1	Dij_SNEDDS_1_1
Dijatomi	1:2	Dij_SNEDDS_1_2

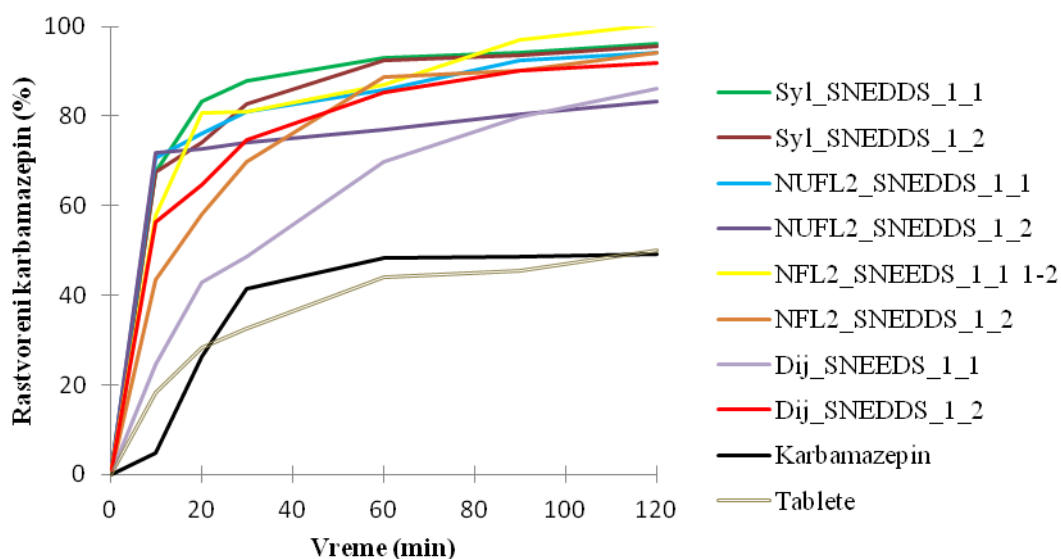
9.3.1.2. Karakterizacija izrađenih čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih SSNEDDS, TGA, DSC, HSM, PXRD, FT-IR i SEM analiza su izvedene na način opisan u poglavlju 9.2.1.

9.3.2. Rezultati i diskusija

9.3.2.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz SSNEDDS

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih SSNEDDS, kao i profil brzine rastvaranja čistog karbamazepina i karbamazepina iz komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem prikazani su na slici 9.18., a procenti rastvorenog karbamazepina u funkciji vremena prikazani su tabelarno (Tabela 9.14.). Sa grafika se može videti da izrađeni SSNEDDS-a povećavaju brzinu rastvaranja karbamazepina. Povećanje brzine rastvaranja se može pripisati sinergizmu između komponenti SNEDDS-a i adsorpcionog nosača. SNEDDS dovodi do povećanja brzine rastvaranja prvenstveno usled solubilizacije karbamazepina, a adsorpcioni nosači dovode do povećanja brzine rastvaranja usled boljeg kvašenja, zahvaljujući velikoj specifičnoj površini.



Slika 9.18. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema, čistog karbamazepina i karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.

Tabela 9.14. Procenti rastvorenog karbamazepina iz SSNEDDS, praška karbamazepina i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

Oznaka formulacije	Procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)					
	10	20	30	60	90	120
NFL2_SNEEDS_1_1	57,75	80,81	80,98	87,04	96,97	100,4
NFL2_SNEDDS_1_2	43,33	57,94	69,95	88,63	90,15	94,27
NUFL2_SNEDDS_1_1	70,76	76,19	80,94	85,81	92,31	94,12
NUFL2_SNEDDS_1_2	71,81	72,82	74,00	76,97	80,34	83,21
Syl_SNEDDS_1_1	67,48	83,24	87,86	93,13	94,24	96,03
Syl_SNEDDS_1_2	67,64	74,05	82,6	92,36	93,57	95,57
Dij_SNEEDS_1_1	24,57	43,00	48,61	69,84	79,85	86,23
Dij_SNEDDS_1_2	56,27	64,63	74,63	85,31	90,13	91,88
Karbamazepin	4,91	26,42	41,56	48,45	48,58	49,32
Tablete karbamazepina	18,19	28,26	32,72	44,11	45,34	50,02

U prvih 10 minuta se iz svih 8 formulacija SSNEDDS postiže visok procenat oslobođenog karbamazepina, koji se kreće u rasponu od 24,57 do 71,81% karbamazepina, a čistog karbamazepina svega 4,91%, odnosno 18,19% karbamazepina

iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Najverovatnije u tih prvih 10 minuta dolazi do oslobađanja karbamazepina sa površine adsorpcionih nosača. Razlike koje postoje su verovatno posledica razlika u specifičnoj površini adsorpcionih nosača. Najveće povećanje brzine rastvaranja karbamazepina u prvih 10 minuta, postignuto je korišćenjem Neusilin[®]-a UFL2, zatim Sylysia[®] 320, pa Neusilin[®]-a FL2 i najmanje povećanje korišćenjem diјatomita. Ovakvi rezultati su očekivani imajući u vidu specifičnu površinu datih nosača. Sylysia[®] 320 i Neusilin[®] UFL2 imaju specifičnu površinu od 300 m²/g, Neusilin[®] FL2 150 m²/g (Milović i sar., 2012; Hailu i Bogner, 2011; Elektronske baze podataka *iii*, *iv*) dok je specifična površina diјatomita daleko manja i iznosi 30,92 m²/g (Aw i sar., 2011, 2012). Formulacija koja je pokazala najveći procenat oslobođenog karbamazepina jeste formulacija koja sadrži jednak udeo SNEDDS-a i adsorpcionog nosača (Sylysia[®] 320), iz ove formulacije je za 30 minuta oslobođeno oko 88% karbamazepina. Nakon 30 minuta kod obe formulacije sa Sylysia[®]-om 320 uočeno je oslobađanje više od 80% karbamazepina, što odgovara farmakopejskom zahtevu za preparate sa trenutnim oslobađanjem. Razlike koje se javljaju nakon 20 minuta u brzini oslobađanja karbamazepina iz formulacija u kojima su kao nosači korišćeni Sylysia[®] 320 i Neusilin[®] UFL2 su posledice specifične strukture ova dva nosača. Poznato je da Neusilin[®] UFL2 ima malu veličinu čestica (2-8 μm) i da poseduje uske i duge pore (Agarwal i sar., 2009) u koje tečni SNEDDS može da uđe nakon adsorbovanja i „zarobi” određenu količinu KBZ-a, pa je to možda razlog za nešto niži procenat oslobođenog karbamazepina u odnosu na sisteme sa Sylysia[®]-om 320. Sa profila brzina oslobađanja karbamazepina iz formulacija sa različitim odnosima SNEDDS i adsorpcionog nosača, uočava se veće povećanje brzine oslobađanja karbamazepina iz formulacijama kod kojih je jednak odnos SNEDDS i adsorpcionog nosača, u odnosu na formulacije gde je odnos SNEDDS/nosač 2:1. Ovaj uticaj smanjenja brzine rastvaranja karbamazepina sa povećanjem udela SNEDDS-a je u suprotnosti sa rezultatima koje su dobili Milović i saradnici (Milović i sar., 2012), a može se objasniti time da se povećanjem udela SNEDDS-a zatvara određeni broj pora na samom nosaču, pa se time „zarobljava” dodatna količina karbamazepina i na taj način usporava njegovo oslobađanje. Pri primeni diјatomita, u prvih 10 minuta dolazi do oslobađanja od 24,57 do 56,27% karbamazepina, pri čemu procenat oslobođenog karbamazepina zavisi od odnosa diјatomita i SNEDDS. U početnom trenutku verovatno

dolazi do oslobađanja karbamazepina adsorbovanog na površini nosača, a nakon toga dolazi do postepenog oslobađanja karbamazepina iz šupljina nosača zbog njegove specifične strukture (Sumper i Brunner, 2006; Yu i sar., 2009; Aw i sar., 2011; Milović i sar., 2015).

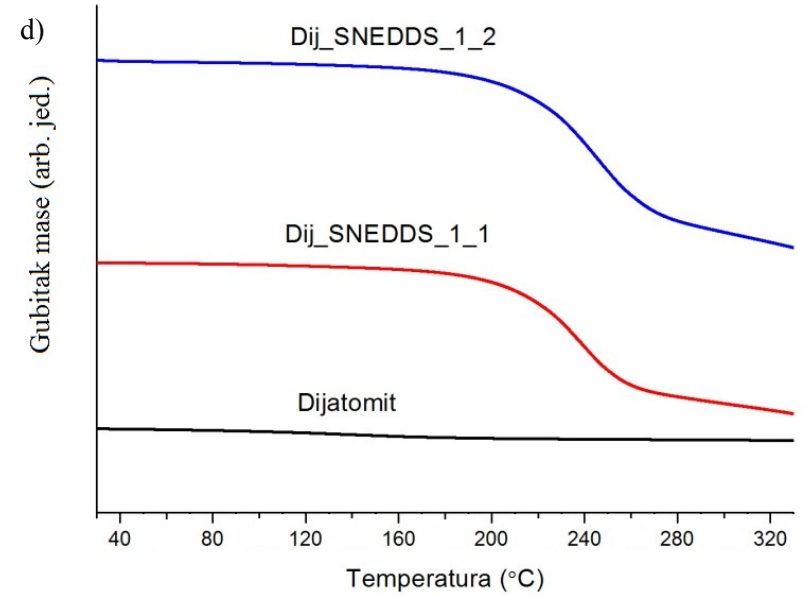
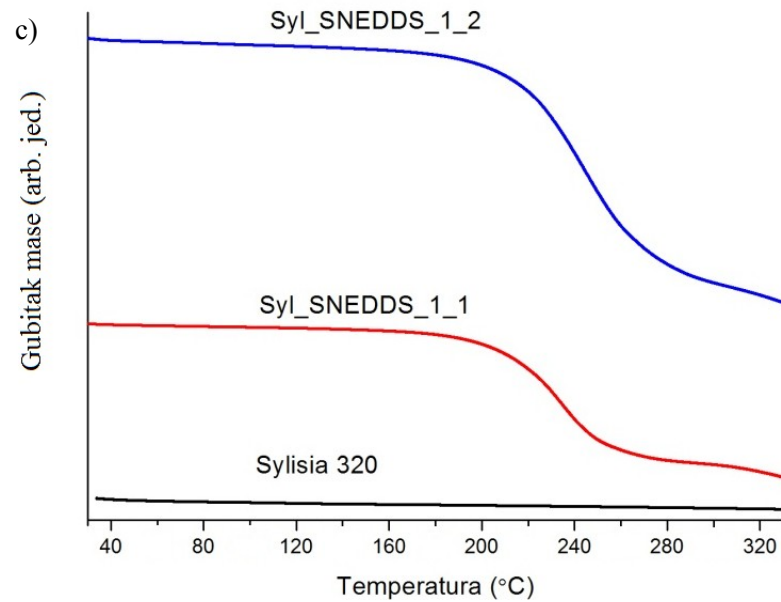
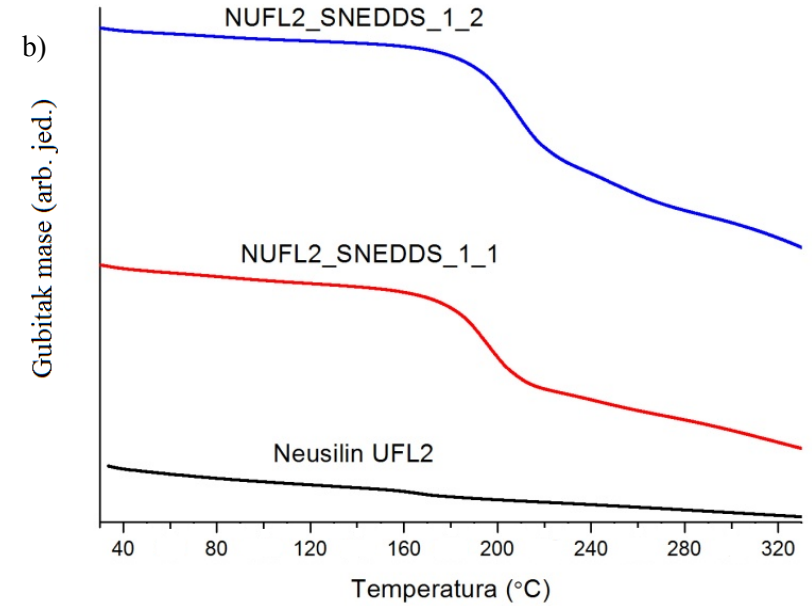
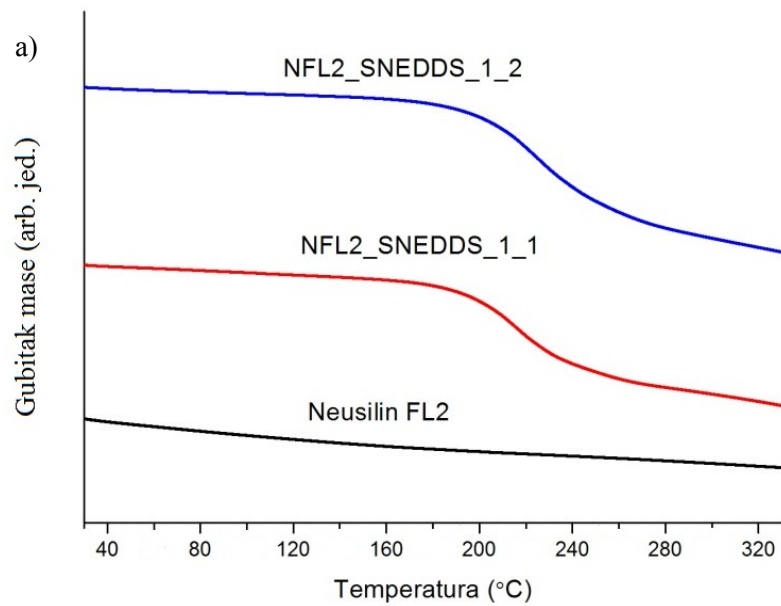
9.3.2.2. Karakterizacija čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom

Termogravimetrijska analiza (TGA)

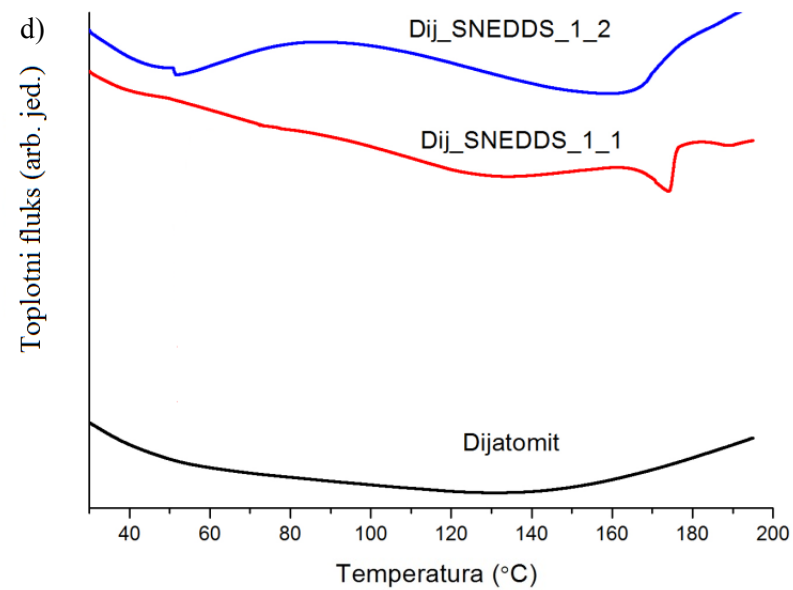
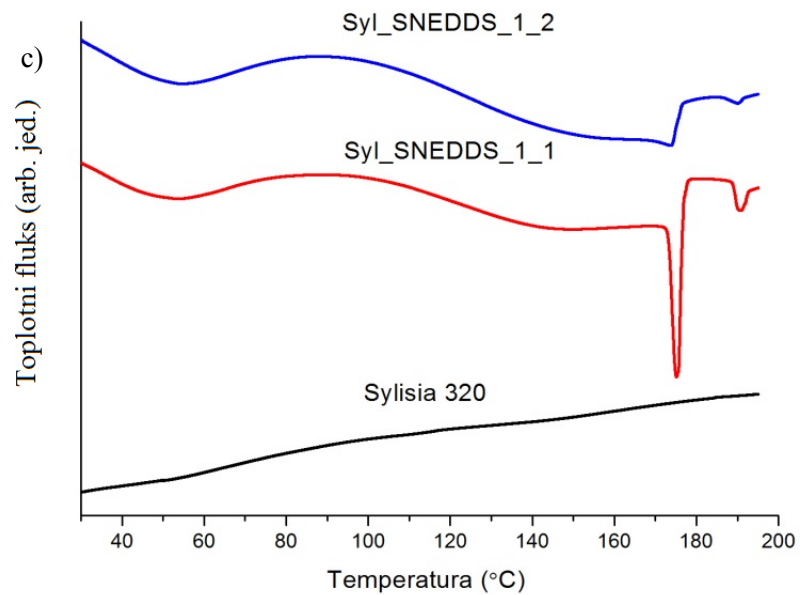
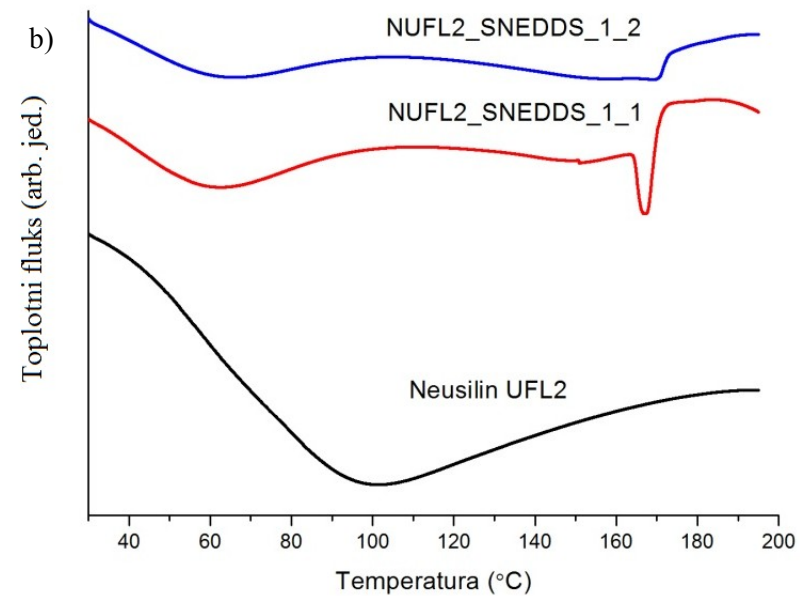
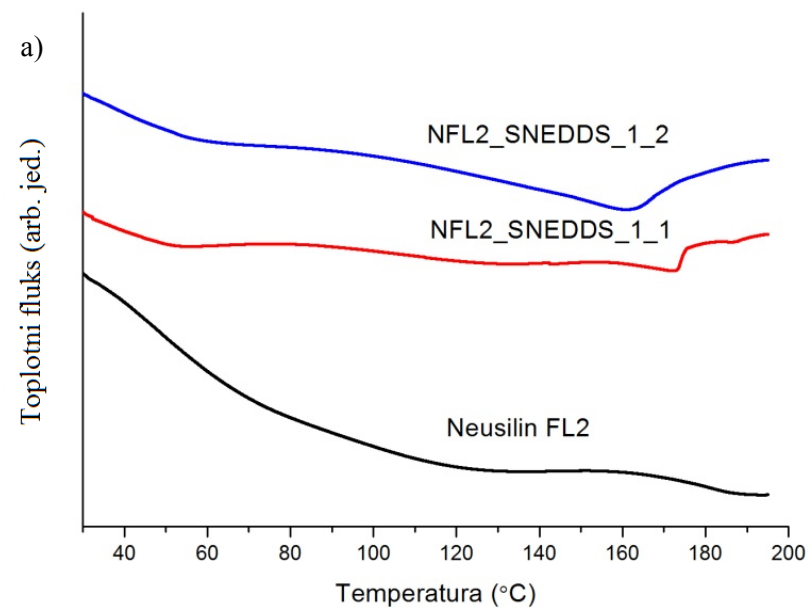
Na slici 9.19. prikazane su TGA krive uzoraka SSNEDDS i adsorpcionih nosača. Svi nosači su se pokazali stabilnim, a tokom zagrevanja nije uočen veći gubitak mase. Kod ispitivanih formulacija SSNEDDS uočen je mali gubitak mase do 200 °C. Međutim, na temperaturama višim od 200 °C uočava se nagla promena mase što odgovara degradaciji karbamazepina (Qi i sar., 2014). Trend gubitka mase je sličan u svim formulacijama, jer je udeo karbamazepina u svim formulacijama isti, a gubitak mase uzorka (formulacije SSNEDDS) tokom zagrevanja prati trend gubitka mase samog karbamazepina. Rezultati TGA pokazuju da su ispitivane formulacije SSNEDDS stabilne u ispitivanom opsegu temperatura.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Na slici 9.20. prikazani su DSC termogrami adsorpcionih nosača i formulacija SSNEDDS. Na DSC krivama svih izrađenih formulacija SSNEDDS, bez obzira na adsorpcioni nosač, uočavaju se endotermni pikovi topljenja u opsegu temperatura od 160 do 175 °C, koji verovatno predstavljaju pikove topljenja polimorfnog oblika III karbamazepina. Nakon toga se, kod nekih formulacija, uočavaju rekristalizacioni pikovi prelaska polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I, a nakon toga još jedan endotermni pik topljenja polimorfnog oblika I. Ovi pikovi se javljaju na nešto nižim temperaturama u odnosu na čist karbamazepin i literaturne podatke (Grzesiak i sar., 2003), što je verovatno posledica međusobne interakcije karbamazepina sa ekscipijensima. U svim formulacijama u kojima je veći udeo tečnog samo-nanoemulgujućeg nosača, bez obzira na nosač, javljaju se slabije izraženi pikovi, verovatno kao posledica rastvaranja dela karbamazepina u tečnom samo-nanoemulgujućem nosaču.



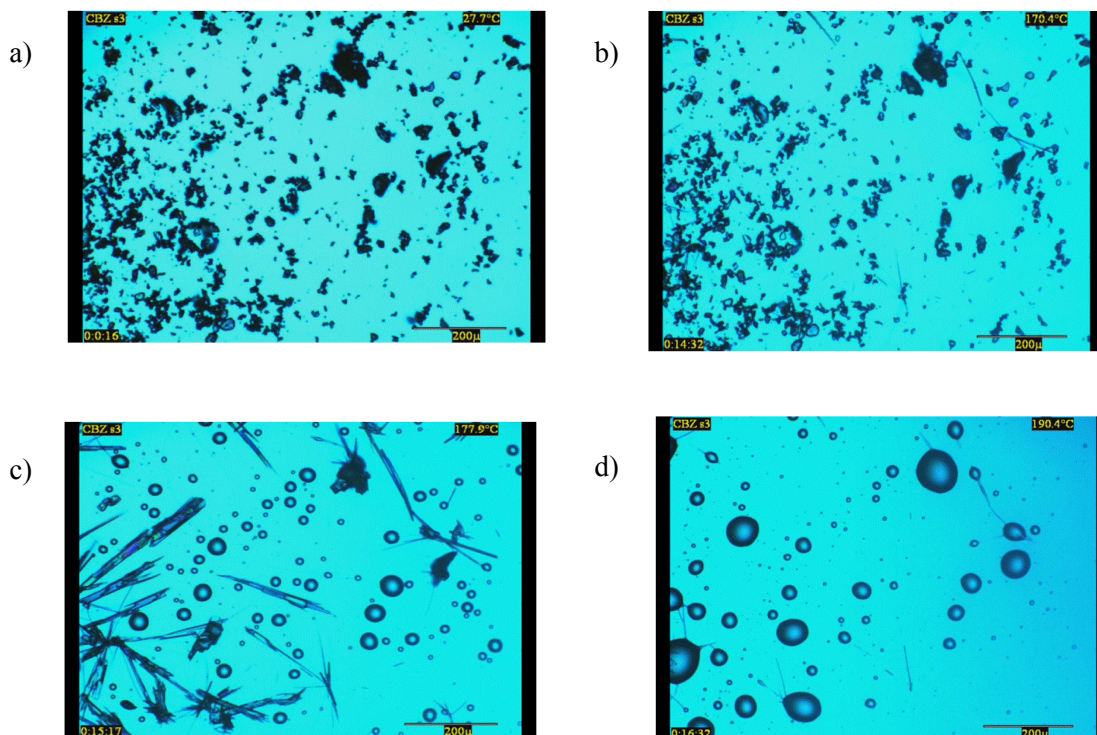
Slika 9.19. TGA krive gubitka mase adsorpcionih nosača i formulacija SSNEDDS, u temperaturnom opsegu od 30 do 320 °C, izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.



Slika 9.20. DSC krive adsorpcionih nosača i formulacija SSNEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.

Mikroskopija na vrućoj ploči (HSM)

Na mikrografiji čistog karbamazepina snimljenoj primenom mikroskopije na vrućoj ploči (Slika 9.21.) do temperature od oko 160 °C ne uočavaju se nikakve promene. Na temperaturi od 170,4 °C dolazi do topljenja prizmatičnih kristala karbamazepina (polimorfni oblik III, što odgovara prvom endotermnom piku na DSC termogramu). Nakon toga na temperaturi od oko 177,9 °C dolazi do naknadne rekristalizacije i pojave igličastih kristala, što odgovara rekristalizacionom piku na DSC krivoj čistog karbamazepina (prelazak karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik I). Na temperaturi od 190,4 °C dolazi do topljenja kristalnog oblika I, što odgovara drugom endotermnom piku na DSC krivoj čistog karbamazepina. Zbog male količine karbamazepina (20%) kod formulacija SSNEDDS se teško uočavaju jasne promene kao kod čistog karbamazepina.



Slika 9.21. Mikrografije čistog karbamazepina snimljene uz zagrevanje na: a) 27,7 °C; b) 170,4 °C; c) 177,9 °C d) 190, 4 °C.

Infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

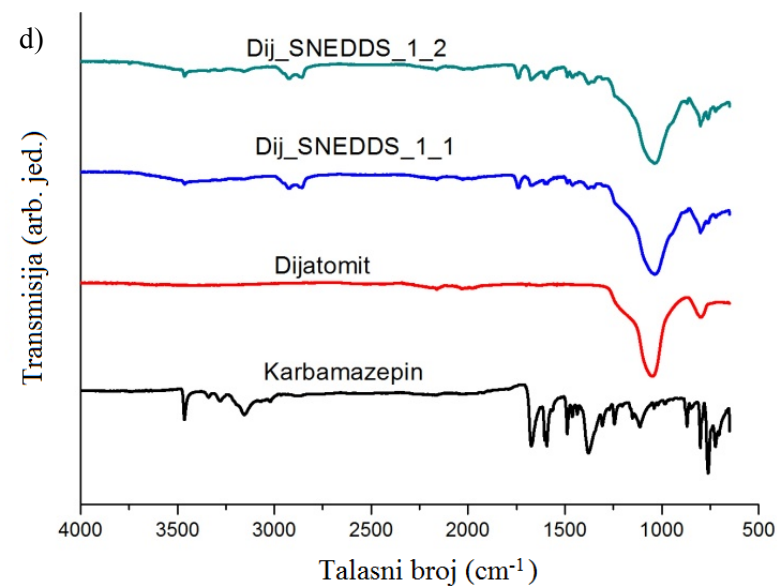
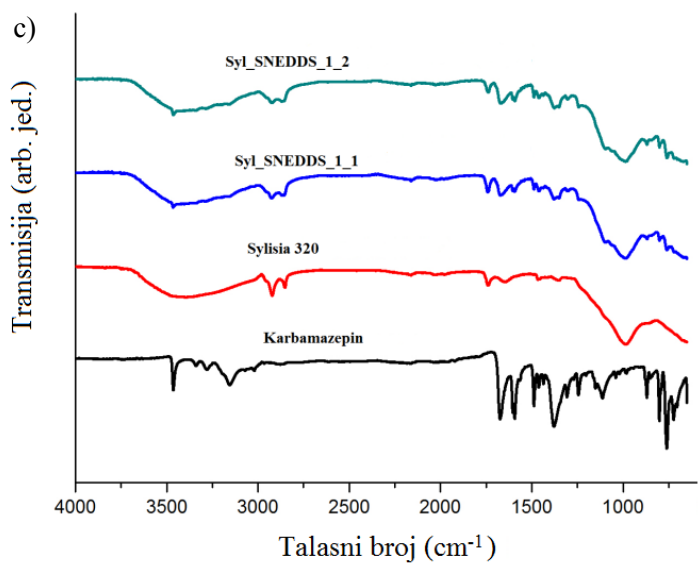
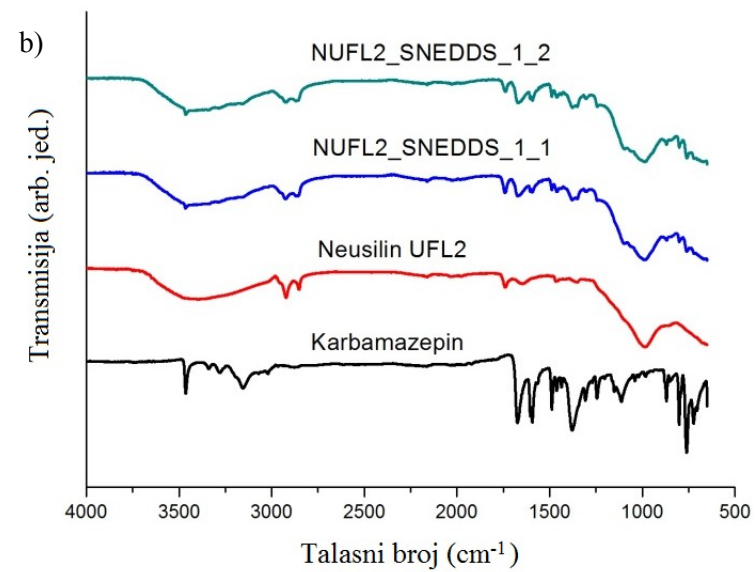
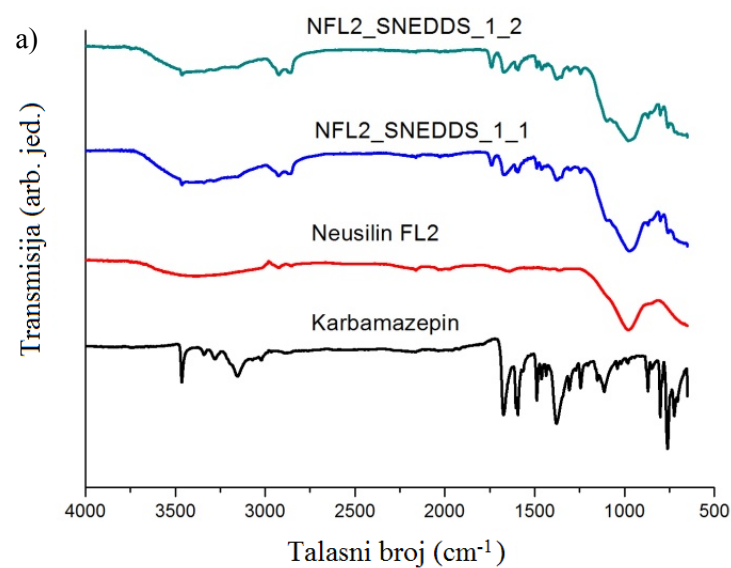
Na slici 9.22. prikazani su FT-IR spektri karbamazepina, adsorpcionih nosača i formulacija SSNEDDS. U svim formulacijama izrađenih SSNEDDS uočene su trake karakteristične za polimorfni oblik III karbamazepina na 3462 cm^{-1} ($-\text{NH}$ valenciona vibracija), 1674 cm^{-1} ($-\text{CO}-\text{R}$ vibracija), 1593 cm^{-1} i 1605 cm^{-1} (opseg za $-\text{C}=\text{C}-$ i $-\text{C}=\text{O}$ vibraciju i $-\text{NH}$ deformaciju) (Grzesiak i sar., 2003; Rustichelli i sar., 2000). Takođe, uočene su i karakteristične trake adsorpcionih nosača, pa se može zaključiti da nije došlo do značajne interakcije između komponenata formulacije SSNEDDS i da je karbamazepin ostao u polimorfnom obliku III. Kao što se i očekivalo intenzitet traka na spektrima ispitivanih formulacija je slabiji u odnosu na intenzitet traka na spektru samog karbamazepina, jer je udeo karbamazepina u formulaciji 20%.

Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXR)

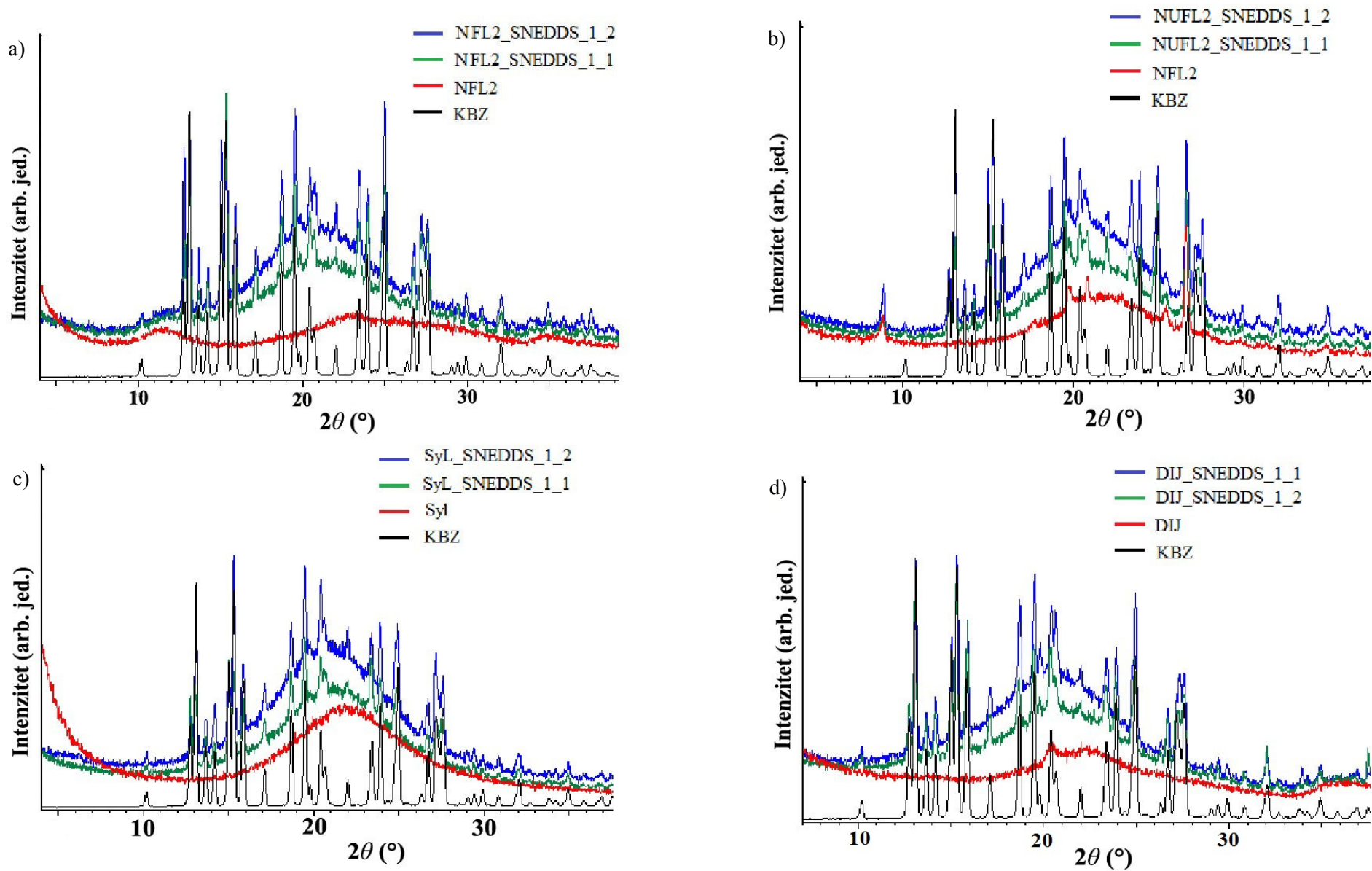
Na slici 9.23. prikazani su PXR difraktogrami karbamazepina i odgovarajućih formulacija SSNEDDS. Na difraktogramima svih ispitivanih formulacija uočavaju se visokointenzivni difrakcioni pikovi za sledeće uglove: $2\theta - 13,02^\circ$, $15,22^\circ$, $15,78^\circ$, $19,40^\circ$, $24,92^\circ$, $27,50^\circ$, $31,86^\circ$, što potvrđuje pretpostavku da je karbamazepin u svim formulacijama ostao u polimorfnom obliku III (Grzesiak i sar., 2003). Ovi pikovi su nešto slabijeg intenziteta u odnosu na čist karbamazepin, jer je u formulacijama udeo karbamazepina 20%. Difraktogrami ispitivanih formulacija poprimaju oblik karakterističan za amorfni oblik, zbog visokog udela adsorpcionog nosača u formulaciji.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

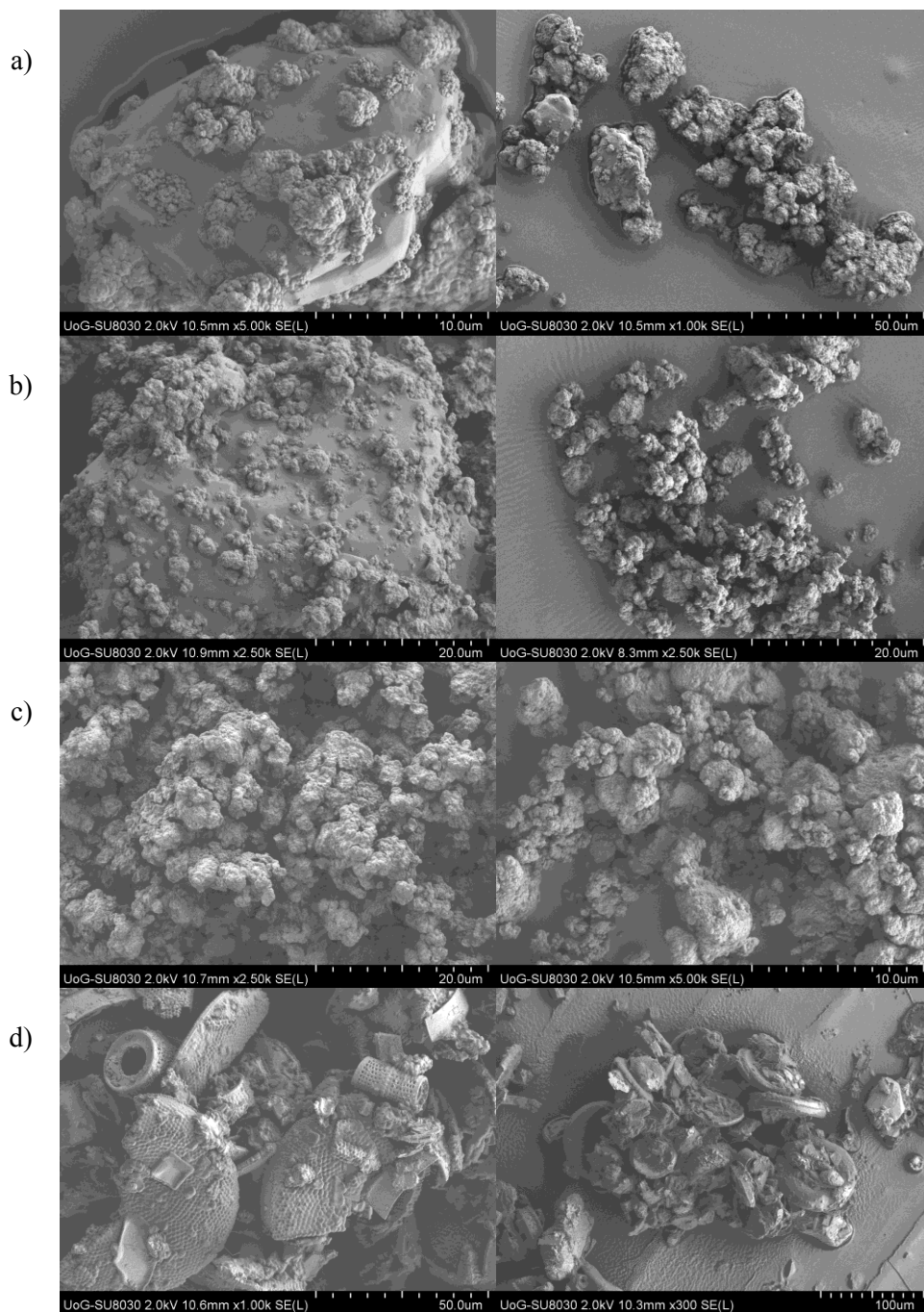
Na slici 9.24. prikazane su SEM mikrografije izrađenih formulacija SSNEDDS pod različitim uveličanjem. Na mikrografijama svih uzoraka uočavaju se neravnine koje potiču od kristala karbamazepina.



Slika 9.22. FT-IR spektri adsorpcionih nosača i formulacija SSMEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylysia[®]-om 320; d) dijatomitima.



Slika 9.23. PXRD difraktogrami čistog karbamazepina, adsorpcijskih nosača i formulacija SSNEEDDS izrađenih sa: a) Neusilin[®] -om FL2; b) Neusilin[®] -om UFL2; c) Sylvania[®] -om 320; d) dijatomitima.



Slika 9.24. SEM mikrografije formulacije SSNEDDS pod različitim uvećanjem sa:
a) Neusilin[®]-om FL2; b) Neusilin[®]-om UFL2; c) Sylvania[®]-om 320; d) dijatomitima.

9.4. Formulacija čvrstih samo-emulgujućih sistema uz korišćenje eksperimentalnog dizajna i njihova karakterizacija (Faza 2.4.)

U ovoj fazi eksperimentalnog rada pristupilo se formulaciji čvrstih-samoemulgujućih sistema (SSEDDS), primenom tehnike eksperimentalnog dizajna (dizajna smeše). Za izradu je korišćena metoda direktne adsorpcije tečnog samo-emulgujućeg sistema na porozni adsorbens, jer se ova metoda u prethodnim fazama pokazala kao pogodna, pre svega iz razloga očuvanja karbamazepina u polimorfnom obliku III. Kao porozni adsorpcioni nosač korišćen je Neusilin[®] UFL2, za koji je u prethodnim fazama utvrđeno da se formulacijom čvrstih samo-dispergujućih sistema sa njim postiže najveća brzina rastvaranja karbamazepina u odnosu na ostale ispitivane adsorbense. Osim toga, on poseduje i najveću specifičnu površinu pa samim tim i najveći kapacitet za adsorpciju tečnog samo-emulgujućeg sistema. Cilj ove faze je bio da se ispita mogućnost primene metode eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, u formulaciji SSEDDS, kao i da se ispita uticaj udela komponenti SSEDDS na brzinu oslobađanja karbamazepina. Cilj ove faze je bio i da se formuliše sistem sa visokim udelom karbamazepina (većim nego u prethodnim fazama) kako bi se dobio konačan farmaceutski oblik prihvatljive veličine za primenu.

9.4.1. Materijal i metode

Tečni samo-emulgujući sistem (trigliceridi srednje dužine lanca (20%), Polisorbat 80 (60%), Transcutol[®] HP (20%)) odabran u fazi 1.2. eksperimentalnog rada (poglavlje 8.2.) korišćen je za izradu čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom. Kao porozni adsorbens korišćen je Neusilin[®] UFL2.

9.4.1.1. Eksperimentalni plan dobijen korišćenjem dizajna smeše

Primenom optimizacione tehnike, dizajna smeše, uz pomoć kompjuterskog programa *Design Expert[®]* (version 8.0.7.1, Stat-Ease, Inc, SAD), definisan je D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše, koji čine tri komponente, sastojci čvrstog samo-emulgujućeg sistema: karbamazepin (A), odabrani tečni samo-emulgujući sistem -

SEDDS (B) i adsorpcioni nosač - Neusilin[®] UFL2 (C). Ove tri komponente predstavljaju ulazne parametre i njihov ukupan udeo je 100%. Granične vrednosti (Tabela 9.15.) postavljene su na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih ispitivanja koja su izvedena. Kao izlazni parametri praćeni su procenti oslobođenog karbamazepina iz izrađenih čvrstih samo-emulgujućih sistema nakon 10, 20, 30, 45 i 60 min (Y_1 - Y_5 , redom). Dobijeni eksperimentalni plan obuhvatao je ispitivanje 16 formulacija čvrstog samo-emulgujućeg sistema (Tabela 9.17.) od čega je bilo 11 različitih, a 5 ponovljenih radi izračunavanja eksperimentalne greške.

Tabela 9.15. Granične vrednosti komponenata u formulaciji čvrstog samo-emulgujućeg nosača

Granične vrednosti	A	B	C
	Karbamazepin	SEDDS	Neusilin [®] UFL2
Donja (%)	30	10	40
Gornja (%)	50	30	60

Čvrsti samo-emulgujući sistemi su izrađeni metodom direktne adsorpcije, na način opisan u poglavlju 9.2.1.1. Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija je izvedeno na način opisan u poglavlju 9.1.1.2., pri čemu je uzorkovanje vršeno nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta.

Modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom dizajna smeše

D-optimalnim eksperimentalnim dizajnom smeše moguće je dobiti odgovarajući matematički model, koji opisuje uticaj udela komponenata SEDDS-a kao nezavisno promenljivih, na procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta, kao zavisno promenljivih. Modeli, koje je moguće dobiti su:

$$\text{linearni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C \quad (9.3.)$$

$$\text{kvadratni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC \quad (9.4.)$$

$$\text{specijalni kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC \quad (9.5.)$$

$$\text{kubni: } Y = b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC + \gamma_{12}AB(A-B) + \gamma_{13}AC(A-C) + \gamma_{23}BC(B-C) \quad (9.6.)$$

gde su b_1 - b_{123} i γ_{12} - γ_{23} koeficijenti koji pokazuju uticaj nezavisno promenljivih, kao i njihovih međusobnih interakcija na vrednost zavisno promenljive. Vrednosti koeficijenata izračunavane su regresionom analizom, korišćenjem *Design Expert*[®] softvera.

Matematički model, tj. finalna jednačina, razmatra L-Pseudo vrednosti ulaznih parametara (A, B, C), koje se kreću od 0 do 1. Vrednost 0 se dodeljuje donjoj granici, a vrednost 1 gornjoj granici ulaznih parametara, dok se sve ostale vrednosti izračunavaju iz sledećih jednačina:

Udeo karbamazepina (A)

$$A_{1(L-Pseudo)}=(A_1-30)/20 \quad (9.7.)$$

Udeo SEDDS (B)

$$B_{1(L-Pseudo)}=(B_1-10)/20 \quad (9.8.)$$

Udeo adsorpcionog nosača (Neusilin[®] UFL2) (C)

$$C_{1(L-Pseudo)}=(C_1-40)/20 \quad (9.9.)$$

gde su A_1 , B_1 i C_1 bilo koje vrednosti udela karbamazepina, SEDDS-a i Neusilin[®]- a UFL2, redom, u okviru postavljenih granica.

Prilikom odabira matematičkog modela potrebno je razmotriti statističke parametre kao što su: predviđeni koeficijent determinacije (predviđeni R^2 - pokazuje koliko dobro model predviđa vrednost odgovora), koeficijent determinacije prilagođen broju eksperimenata (prilagođeni R^2 - odražava frakciju varijacije koja se može objasniti modelom, pri čemu je prilagođen uzimajući u obzir broj članova u modelu, u odnosu na broj tačaka u dizajnu), interval pouzdanosti ($p < 0,05$). Prilikom odabira matematičkog modela, treba se rukovoditi sledećim pravilima: p vrednost treba da bude manja od 0,05 kako bi parametar imao statističku značajnost, eksperimentalna greška treba da bude što manja, a vrednosti prilagođenog i predviđenog koeficijenta determinacije treba da budu pozitivne, bliske i što bliže jedinici.

Optimizacija formulacije čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom

Nakon dobijanja matematičkih modela izvršena je optimizacija. Opseg vrednosti zadatih izlaznih parametara prilikom optimizacije dat je u tabeli 9.16.

Tabela 9.16. Postavljeni kriterijumi za optimizaciju formulacije čvrstog samo-emulgujućeg sistema.

Izlazni parametar	Raspon procenta rastvorenog karbamazepina
Y ₁ (nakon 10 min)	od 50 do 60
Y ₂ (nakon 20 min)	od 65 do 80
Y ₃ (nakon 30 min)	od 80 do 85
Y ₄ (nakon 45 min)	od 85 do 90
Y ₅ (nakon 60 min)	od 90 do 100

Nakon izvršene optimizacije, iz različitih delova optimizacione oblasti su odabrane 3 formulacije (O₁, O₂, O₃), radi procene uspešnosti predviđanja u čitavoj optimizacionoj oblasti. Ove tri formulacije su izrađene i iz njih je ispitana brzina rastvaranja karbamazepina, radi procene uspešnosti predviđanja. Predviđeni i stvarni profili oslobađanja karbamazepina iz čvrstih samo-emulgujućih sistema su poređeni izračunavanjem faktora sličnosti i faktora razlike.

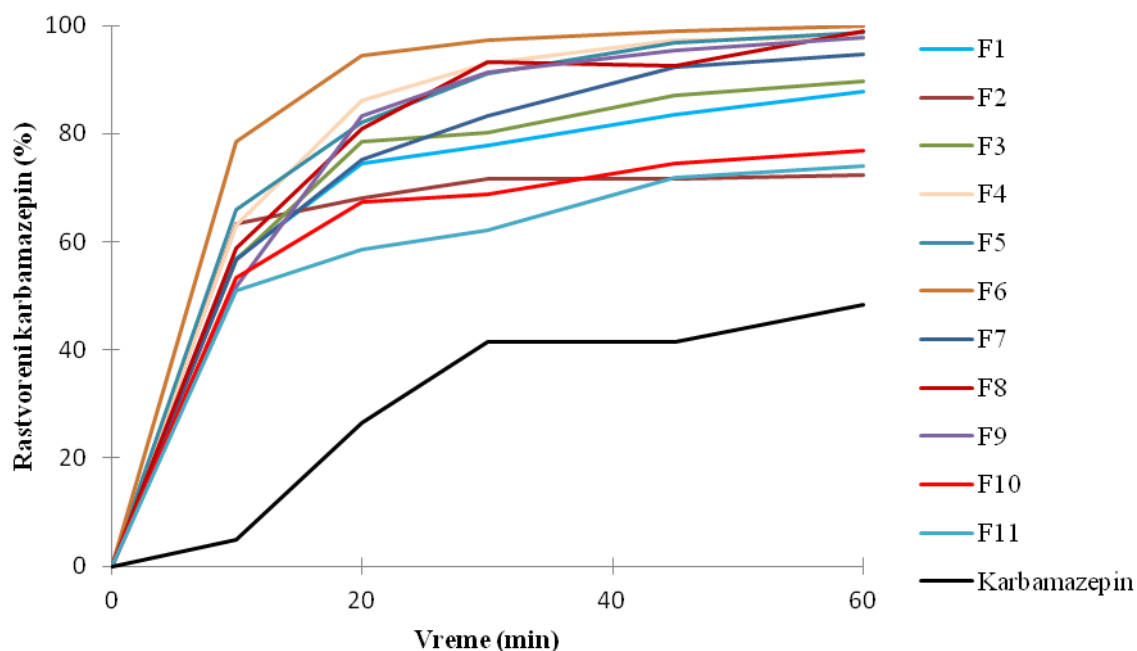
9.4.1.2. Karakterizacija čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom

Tri odabrane optimalne formulacije su okarakterisane primenom TGA i DSC analize radi određivanja termičkih svojstava formulacija i čistog karbamazepina. Postupak je podrazumevao precizno odmeravanje mase uzoraka (5–10 mg), koji je nakon toga stavljan u T-Zero[®] aluminijske posude, koji su potom hermetički zatvarane. Termalna svojstva su ispitana u opsegu od sobne temperature do 250 °C na uređaju SDT Q600 TGA / DSC instrument (TA Instrument, Nemačka) u struji azota (protok: 100 cm³/min) uz brzinu zagrevanja od 20 °C/min.

9.4.2. Rezultati i diskusija

9.4.2.1. Optimizacija formulacija čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija (F1 - F11), kao i profil brzine rastvaranja karbamazepina dati su na slici 9.25. Nakon 30 minuta postiže se oslobađanje karbamazepina u rasponu od 60 do 100%. Pravilnim odabirom udela komponenata čvrstog samo-emulgujućeg sistema (SSEDSS) se već nakon 20 minuta može postići potpuno oslobađanje karbamazepina. Formulacijom SSEDSS se iz svih formulacija postiže značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina u odnosu na prašak karbamazepina.



Slika 9.25. Profili brzine rastvaranja praška karbamazepina i karbamazepina iz čvrstih samo-emulgujućih sistema.

Procena uticaja faktora formulacije čvrstih samo-emulgujućih sistema na profil brzine rastvaranja karbamazepina

Eksperimentalni plan i vrednosti ulaznih i izlaznih parametara dobijenih primenom dizajna smeše, uz korišćenje softvera *Design-Expert*[®] dati su u tabeli 9.17.

Tabela 9.17. Eksperimentalni plan dobijen primenom dizajna smeše - ulazni i izlazni parametri

Redni broj formulacije	Ulazni parametri (%)			Izlazni parametri (%)				
	A	B	C	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
F1	30	22	48	56,97	74,39	77,88	83,54	87,71
F2	50	10	40	63,45	68,15	71,72	71,57	72,32
F3	30	10	60	56,73	78,53	80,1	87,13	89,76
F4	40	20	40	63,09	85,16	92,99	97,23	97,78
F5	30	30	40	65,89	82,05	91,23	96,89	98,7
F6	41	10	49	78,51	94,48	97,38	98,96	99,93
F7	33	14	52	56,66	75,31	83,32	92,41	94,7
F8	36	18	46	58,92	80,99	93,23	92,55	99,01
F9	34	24	42	51,58	83,33	91,3	95,32	97,71
F10	44	13	43	53,46	67,31	68,8	74,58	76,8
F11	40	14	46	51,05	58,59	62,25	71,93	74,1
F12	41	10	49	78,51	94,48	97,38	98,96	99,93
F13	30	10	60	56,73	78,53	80,1	87,13	89,76
F14	50	10	40	63,45	68,15	71,72	71,57	72,32
F15	30	30	40	65,89	82,05	91,23	96,89	98,7
F16	30	22	48	56,97	74,39	77,88	83,54	87,71

A, B, C: procenat karbamazepina, SEDDS-a, Neusilin[®]-a UFL2, redom.

Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅ : procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 min, redom.

Nakon ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija izvršeno je modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre, odabirom adekvatnog matematičkog modela.

U tabeli 9.18. prikazan je pregled modela za izlazni parametar Y₁ (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta), sa vrednostima statističkih parametara.

Tabela 9.18. Odabir pogodnog modela za izlazni parametar Y_1 (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta)

Model	p vrednost	Prilagođeni R^2	Predviđeni R^2
Linearni	0,6519	-0,0803	-0,2821
Kvadratni	0,0312	0,3986	-0,1886
<u>Specijalni kubni</u>	<u>0,0129</u>	<u>0,6762</u>	<u>0,1475</u>
Kubni	0,0041	0,9390	-93,2310

Na osnovu analize statističkih parametara prikazanih u Tabela 9.18. odabran je specijalni kubni model.

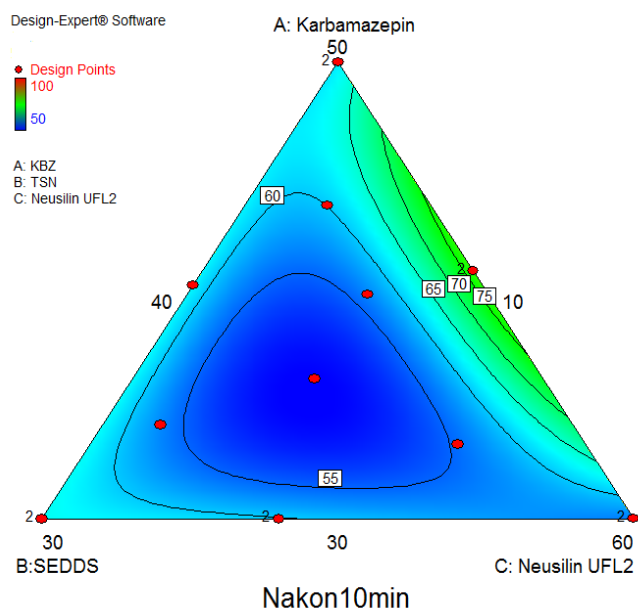
Nakon odabira matematičkog modela, primenom ANOVA testa isključeni su koeficijenti uz parametre koji nisu statistički značajni ($p > 0,05$). Na taj način je dobijen redukovani model koji daje matematički model, tj. finalnu jednačinu za izlazni parametar Y_1 (Tabela 9.19.). Isključivanjem određenih parametara utiče se na poboljšanje vrednosti predviđenog i prilagođenog koeficijenta korelacije, kao i na značajnost primene tog modela. Na osnovu dobijenog matematičkog modela moguće je za bilo koje vrednosti ulaznih parametara, a u okviru postavljenih graničnih vrednosti, predvideti procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenima.

Tabela 9.19. Faktori modela i njegovog redukovanog oblika, kao i dobijeni matematički model

<i>Faktori i njihova značajnost pre redukovanja modela</i>		<i>Faktori i njihova značajnost nakon redukovanja modela</i>	
<i>Faktori</i>	<i>p vrednost</i>	<i>Faktori</i>	<i>p vrednost</i>
Faktori AB	0,3938		
Faktori AC	0,0021	Faktori AC	0,0007
Faktori BC	0,3141		
Faktori ABC	0,0129	Faktori ABC	0,0006
Matematički model redukovanog specijalnog kubnog modela ($p=0,0016$; prilagođeni $R^2=0,6867$; predviđeni $R^2=0,4916$):			
$Y_1=61,58A+63,01B+56,14C+73,41 AC -479,04ABC$			

Na slici 9.26. dat je konturni dijagram promene vrednosti procenta oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta, u zavisnosti od udela komponenata čvrstog samo-

emulgujućeg sistema. U uglovima dijagrama su smešteni maksimalni udeli karbamazepina, SEDDS-a i Neusilin[®]-a UFL2, dok se njihovi minimalni udeli nalaze na stranama dijagrama nasuprot uglovima. Između uglova i suprotnih strana dijagrama vrednosti komponenata smeše se postepeno smanjuju. Crvene tačke na konturnom dijagramu predstavljaju izrađene i ispitane formulacije čvrstog samo-emulgujućeg sistema. Generalno su konturni dijagrami predstavljeni rasponom boja od najtamnije plave, do najintenzivnije crvene, gde najtamnijoj plavoj boji odgovara najniži procenat oslobođenog karbamazepina (50%), dok najintenzivnijoj crvenoj odgovara najviši procenat oslobođenog karbamazepina (100%) iz formulacija. Sa konturnog dijagrama (Slika 9.26.) može se zaključiti da se početno brzo oslobađanje karbamazepina jedino postiže pri najnižem udelu tečnog samo-emulgujućeg sistema, pri čemu udeli karbamazepina i Neusilin[®]-a UFL2 nemaju veliki uticaj na ovo oslobađanje.



Slika 9.26. 2D konturni dijagram uticaja udela komponenata SEDDS na procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta (Y_1).

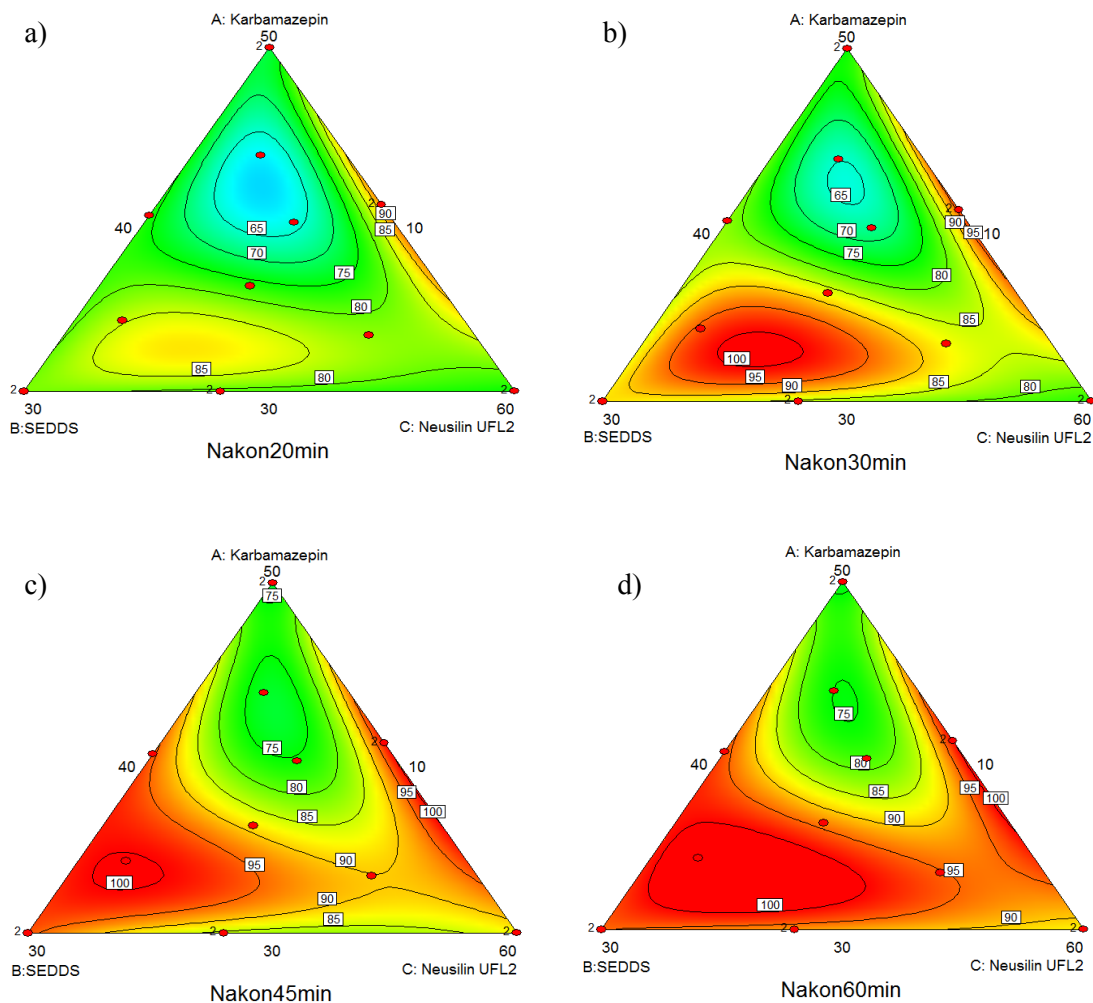
Kao i u slučaju prvog izlaznog parametra (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 min) i za sve ostale izlazne parametre (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 20, 30, 45 i 60 min) odabran je pogodni matematički model. Vrednosti faktorskih efekata, odabrani modeli i njihovi statistički parametri dati su u tabeli 9.20.

Tabela 9.20. Vrednosti faktorskih efekata, odabrani modeli i njihovi statistički parametri, za izlazne parametre $Y_2 - Y_5$

	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
A	+71,50	+74,99	+71,65	+72,59
B	+ 81,17	+ 89,07	+ 95,96	+ 95,15
C	+ 75,35	+ 76,82	+ 87,45	+ 87,91
AB	-	-	+ 48,87	+ 50,86
AC	+ 80,60	+ 83,57	+ 81,74	+ 80,96
BC	-	-	- 35,27	-
A ² BC	- 1938,18	- 2202,84	- 1778,53	- 1783,21
AB ² C	+ 1013,28	+ 1610,13	+ 938,45	+ 981,67
Odabrani model	Specijalni kvadratni	Specijalni kvadratni	Specijalni kvadratni	Specijalni kvadratni
p	0,0034	0,0040	<0,0001	0,0004
Prilagođeno R ²	0,6881	0,6782	0,9204	0,8383
Predviđeno R ²	0,4866	0,4537	0,6821	0,5441

A, B, C: L- pseudo vrednosti udela karbamazepina, SEDDS, Neusilin[®]-a UFL2, redom.
 Y_2, Y_3, Y_4, Y_5 : procenat oslobođenog karbamazepina nakon 20, 30, 45, 60 min, redom.

Sa konturnih dijagrama (Slika 9.27.) koji opisuju uticaj ulaznih parametara (udeli komponenti SSEDSS) na izlazne parametre (procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45 i 60 min) može se zaključiti da sa vremenom uticaj udela tečnog samo-emulgujućeg nosača postaje značajniji, da bi se pri visokom udelu tečnog samo-emulgujućeg nosača postiglo maksimalno oslobađanje karbamazepina nakon 45 i 60 minuta, što je i očekivano.



Slika 9.27. 2D konturni dijagram uticaja udela komponenata SSEDDS na procenat oslobođenog karbamazepina nakon: a) 20 minuta (Y_2); b) 30 minuta (Y_3); c) 45 minuta (Y_4); d) 60 minuta (Y_5).

Udeo karbamazepina u sastavu SSEDDS ima značajan uticaj na njegovu brzinu oslobađanja. Najbrže oslobađanje karbamazepina se postiže kada je ova lekovita supstanca prisutna u količini koja je bliža donjoj graničnoj vrednosti (oko 30% karbamazepina u formulaciji). Moguće je da je količina od 50% karbamazepina u formulaciji visoka i da primenjeni tečni samo-emulgujući nosač i adsorpcioni nosači ne mogu da utiču na brzinu rastvaranja celokupne mase karbamazepina. Što se tiče adsorpcionog nosača, Neusilin[®]-a UFL2, vidi se da njegov uticaj na procenat oslobođenog karbamazepina zavisi od udela drugih komponenata smeše, tj. da sa njima stupa u interakciju. Generalno, pri širokom rasponu udela tečnog samo-emulgujućeg

nosača i Neusilin[®]-a UFL2, a za vrednosti karbamazepina bliže donjim graničnim vrednostima, postiže se brzo oslobađanje karbamazepina.

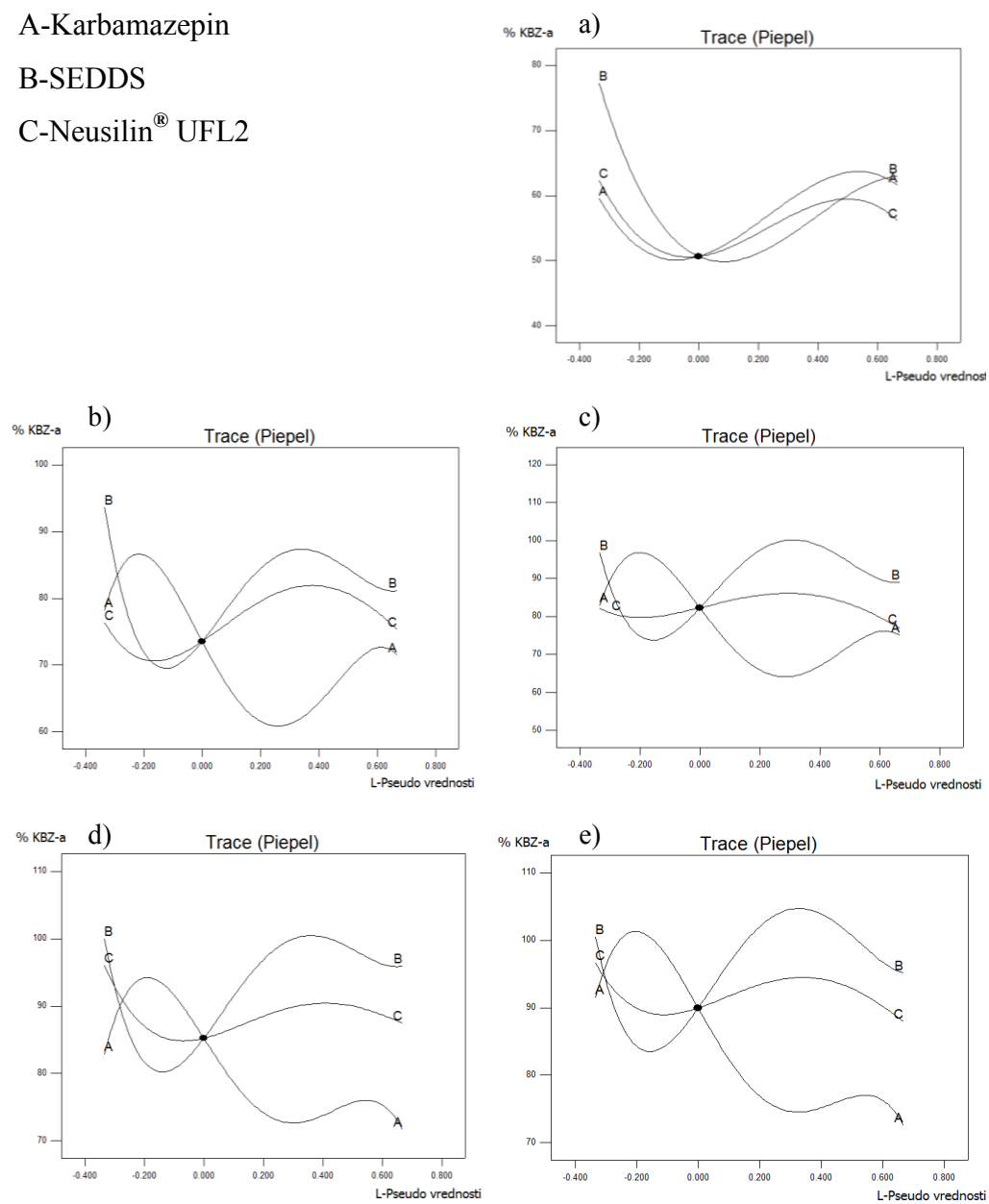
Trace dijagrami pokazuju kakav uticaj ima promena udela jedne komponente smeše, dok je odnos između ostalih komponenata smeše stalan, što znači da ako raste udeo jedne komponente u smeši, udeli druge dve komponente se smanjuju bez narušavanja odnosa između njih. Analizom *trace* dijagrama potvrđeni su rezultati dobijeni analizom 2D konturnih dijagrama. *Trace* dijagrami za izlazne parametre Y_1 - Y_5 prikazani su na slici 9.28. Sa slike 9.28. se vidi da najveći uticaj na procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10 minuta ima udeo SEDDS i da se najviše vrednosti procenta oslobođenog karbamazepina postižu pri niskim udelima SEDDS. Takođe, nakon 10 minuta uočava se (Slika 9.28.) da uticaj promene udela karbamazepina značajno raste i to tako što se sa smanjenjem udela karbamazepina u smeši povećava brzina njegovog oslobađanja, dok do istog efekta dovodi i povećanje udela SEDDS-a u formulaciji. Promena udela Neusilin[®]-a UFL2 generalno ne pokazuje veliki uticaj na procenat oslobođenog karbamazepina, pri niskim udelima karbamazepina.

Iz svega ovoga se može zaključiti da najveći uticaj na procenat oslobođenog karbamazepina pokazuje udeo samog karbamazepina u formulaciji.

A-Karbamazepin

B-SEDDS

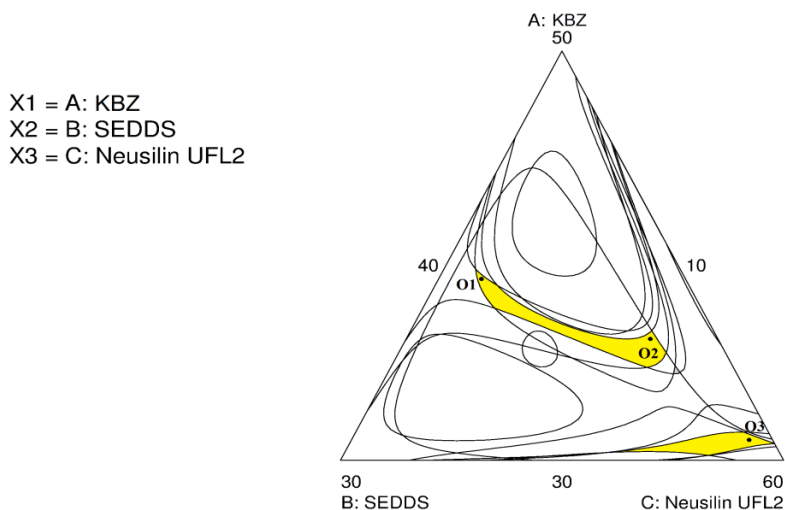
C-Neusilin® UFL2



Slika 9.28. Trace dijagram uticaja udela komponenti SSEDSS na procenat oslobođenog karbamazepina nakon: a) 10 min (Y_1); b) 20min (Y_2); c) 30 min (Y_3); d) 45 min (Y_4); e) 60 min (Y_5).

Optimizacija formulacije čvrstog samo-emulgjućeg sistema sa karbamazepinom

Za optimizaciju formulacije SSEDDS korišćen je opseg vrednosti izlaznih parametara koji je naveden u tabeli 9.16. Konturni dijagram, koji pokazuje oblasti u okviru kojih se nalaze optimalne formulacije, dat je na slici 9.29.



Slika 9.29. Konturni dijagram sa oblastima u kojima se nalaze optimalne formulacije.

Formulacije koje se nalaze u okviru obojenih regija konturnog dijagrama (Slika 9.29.) date su u tabeli 9.21., pri čemu su odabrane tri optimalne formulacije čvrstog samo-emulgjućeg sistema označene kao O₁, O₂, O₃ (Tabela 9.22.).

Treba istaći, da je optimizacijom formulacije čvrstog samo-emulgjućeg sistema sa karbamazepinom, u gotovo svim predloženim optimalnim formulacijama (Tabela 9.21.), formulisan sistem sa visokim udelom karbamazepina (oko 35-36%), a niskim udelom tečnog samo-emulgjućeg sistema (oko 13%). Visok udeo karbamazepina je značajan, zato što za pojedinačne doze karbamazepina od 100 ili 200 mg treba izraditi čvrsti samo-emulgjući sistem mase od 350 do 600 mg što je prihvatljiva masa za peroralni put primene leka. Nizak udeo tečnog samo-emulgjućeg nosača poželjan zbog smanjenja potencijalnih neželjenih efekata, koje mogu izazvati njegove komponente, pre svega surfaktanti.

Tabela 9.21. Optimalne formulacije predložene od strane softvera *Design Expert*[®] ulazni i izlazni parametri

Ulazni parametri			Izlazni parametri				
A	B	C	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
35,40	12,78	51,83	59,67	79,51	83,14	88,60	91,97
36,25	12,82	50,93	59,81	77,58	81,13	86,90	90,12
36,57	16,59	46,85	50,71	73,86	82,50	85,38	90,16
31,10	12,13	56,78	58,20	79,48	82,11	88,40	91,89
37,72	19,00	43,28	52,33	73,25	83,31	88,70	92,17
31,03	12,45	56,53	57,89	79,42	82,21	88,02	91,92
35,46	13,25	51,29	58,06	78,54	82,68	87,71	91,44
31,10	12,70	56,19	57,75	79,71	82,68	88,05	92,24
35,03	13,10	51,87	58,45	79,67	83,68	88,67	92,38
37,03	18,51	44,46	50,75	74,46	84,97	88,35	92,59
38,71	19,29	42,00	55,21	72,34	81,09	89,49	91,94
35,19	13,64	51,17	56,80	78,89	83,34	87,80	91,90
36,59	17,45	45,97	50,18	74,63	84,39	86,88	91,65
35,60	13,45	50,95	57,44	77,91	82,27	87,17	91,02
30,96	13,75	55,29	57,09	79,88	83,44	87,29	92,64
34,87	13,87	51,26	56,15	79,26	84,23	88,24	92,59
35,15	13,38	51,47	57,59	79,07	83,39	88,13	92,04
30,54	12,11	57,36	57,54	77,88	80,28	88,87	90,43
30,91	10,55	58,54	59,12	78,67	80,53	89,51	90,83

A, B, C: procenat karbamazepina, SEDDS, Neusilin[®]-a UFL2, redom.

Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅ : procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 min, redom.

Procena uspešnosti optimizacije formulacije čvrstog samo-emulgujućeg sistema sa karbamazepinom

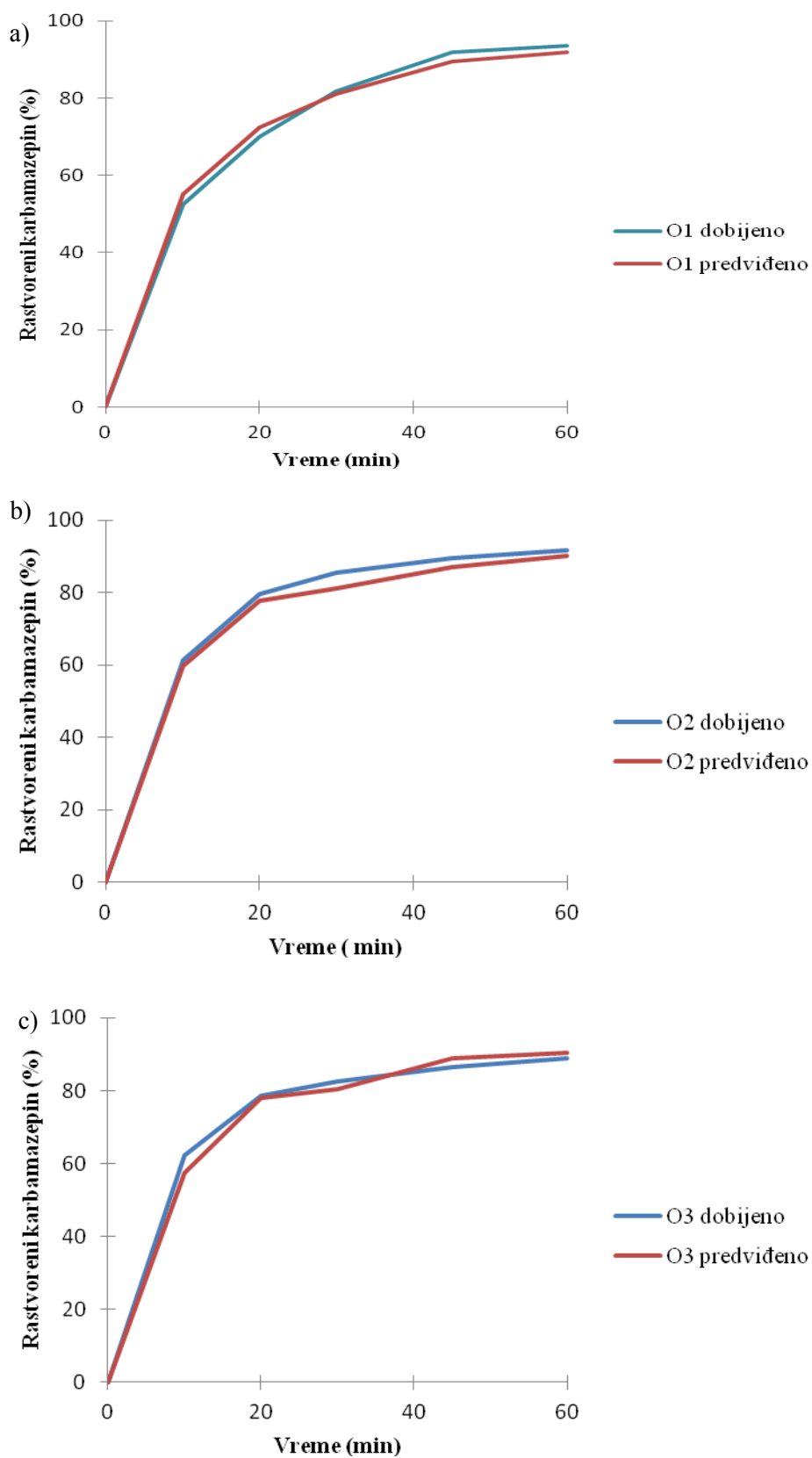
Iz različitih delova optimizacione oblasti konturnog dijagrama odabrane su tri predložene optimalne formulacije O_1 , O_2 i O_3 (Tabela 9.22.), radi procene uspešnosti optimizacije i predviđanja. Formulacije O_1 , O_2 i O_3 su izrađene i iz njih je ispitana brzina rastvaranja karbamazepina. Dobijeni i predviđeni procenti oslobađanja karbamazepina iz tri odabrane formulacije su dati u tabeli 9.22. Profili brzine oslobađanja karbamazepina iz odabranih formulacija prikazano su na slici 9.30. Na osnovu izračunatih faktora razlike (f_1) i faktora sličnosti (f_2) (Tabela 9.23.) može se zaključiti da između dobijenih i predviđenih profila brzine oslobađanja karbamazepina iz tri odabrane optimalne formulacije ne postoji značajna razlika i da se na osnovu toga proces optimizacije može smatrati uspešnim.

Tabela 9.22. Udeli komponenata tri optimalne formulacije, kao i vrednosti procenta oslobođenog karbamazepina (KBZ) dobijene njihovim ispitivanjem

Ulazni parametri				Izlazni parametri					
F	Udeo KBZ-a (%)	Udeo SEDDS-a (%)	Udeo Neusilin®-a UFL2 (%)		Oslobođen KBZ nakon 10 min (%)	Oslobođen KBZ nakon 20 min (%)	Oslobođen KBZ nakon 30 min (%)	Oslobođen KBZ nakon 45 min (%)	Oslobođen KBZ nakon 60 min (%)
O ₁	39	19	42	dobijeno	52,47	70,12	81,87	91,96	93,56
				predviđeno	55,21	72,34	81,09	89,49	91,94
O ₂	36	13	51	dobijeno	61,39	79,45	85,38	89,43	91,7
				predviđeno	59,81	77,58	81,13	86,9	90,12
O ₃	31	12	57	dobijeno	62,23	78,62	82,65	86,56	89,03
				predviđeno	57,54	77,88	80,28	88,87	90,43

Tabela 9.23. Poređenje dobijenih i predviđenih profila brzine rastvaranja karbamazepina iz 3 odabrane optimalne formulacije faktori razlike (f₁) i faktori sličnosti (f₂)

Formulacija	O ₁	O ₂	O ₃
Faktor razlike (f ₁)	2,98	2,52	2,41
Faktor sličnosti (f ₂)	77,17	81,78	78,77



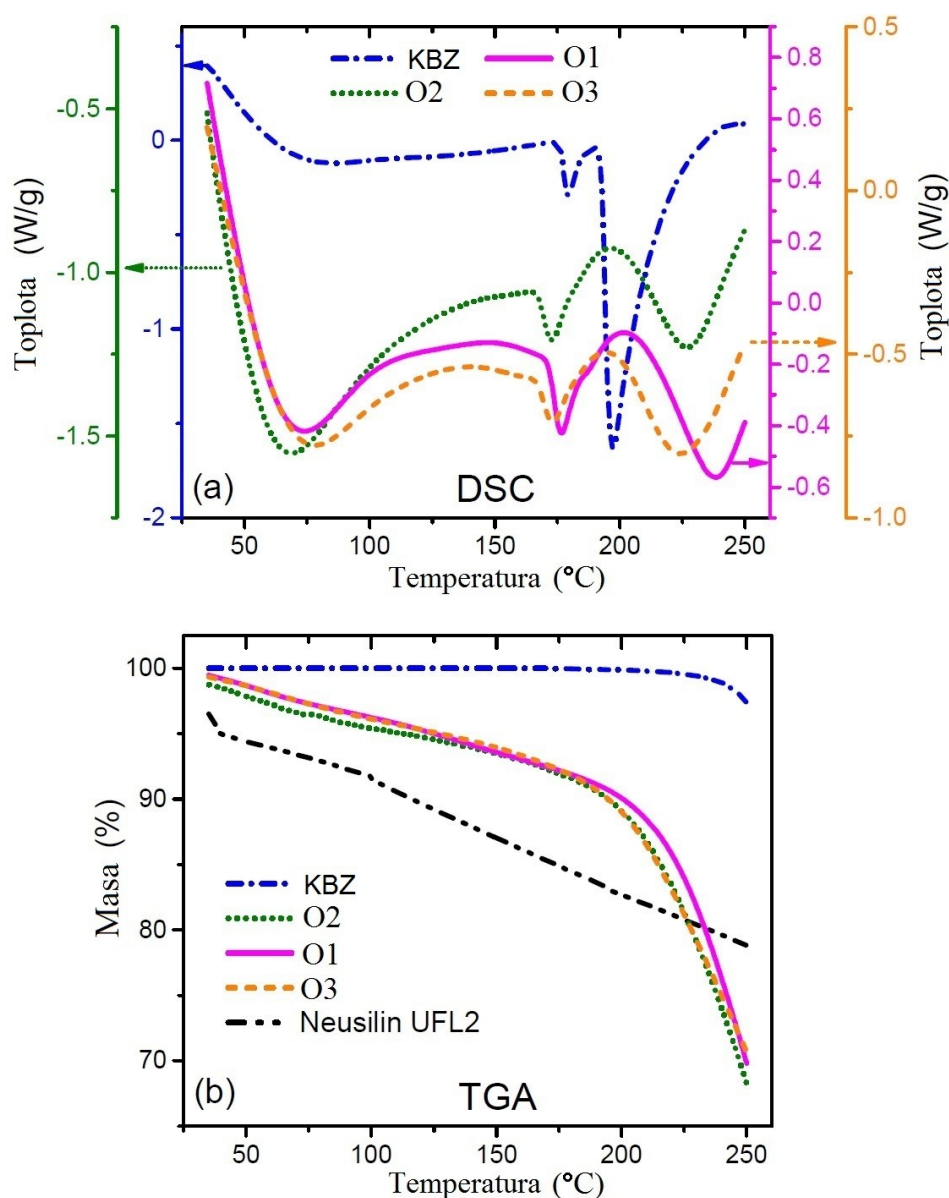
Slika 9.30. Poređenje predviđenog i dobijenog profila brzine oslobađanja karbamazepina iz formulacije: a) O₁; b) O₂; c) O₃.

9.4.2.2. Karakterizacija odabranih optimalnih formulacija čvrstih samo-emulgjućih sistema sa karbamazepinom

Rezultati TGA analize odabranih formulacija SSEDDS, Neusilin[®]-a UFL2 i karbamazepina (Slika 9.31.) pokazuju da u opsegu temperatura od 100 do 200 °C najveći gubitak mase od gotovo 8%, ima sam Neusilin[®] UFL2. Ovaj gubitak je manji nego pri merenju istog nosača u fazi 2.2. čime se potvrđuje pretpostavka da je uzorak tokom čuvanja u prethodnoj fazi adsorbovao značajnu količinu vlage. Kod ispitivanih uzoraka O₁, O₂ i O₃ gubitak mase je 6,16%, 6,3% i 7,1%, redom. Ovakav rezultat je očekivan, jer kod ovih uzoraka imamo i odgovarajuće povećanje udela Neusilina[®]-a UFL2. Kod karbamazepina se u opsegu temperatura od 100 do 200 °C uočava malo smanjenje u masi od svega 0,14%, dok u opsegu temperatura od 200 do 250 °C nagli gubitak mase od 2,5%, što je najverovatnije posledica degradacije same supstance. Gubitak mase u opsegu temperatura od 200 do 250 °C je značajno manji u odnosu na isti u fazi 2.2. eksperimentalnog rada (poglavlje 9.2.), verovatno kao posledica veće brzine zagrevanja uzorka i samim tim „kašnjenja“ termalnog događaja i uspostavljanja ravnoteže. Međutim, u oba merenja uzorka karbamazepina je uočen isti trend da na temperaturi nešto iznad 200 °C počinje degradacija karbamazepina.

Sa DSC krivih (Slika 9.31.) kod ispitivanih formulacija (O₁, O₂, O₃) i kod čistog karbamazepina se uočava endotermni pik na oko 60 °C. Ovaj pik je verovatno rezultat merne nesigurnosti instrumenta jer je uređaj kalibrisan u opsegu temperatura 60 - 800 °C. Čist karbamazepin je u polimorfnom obliku III, što se može zaključiti na osnovu dva endotermna pika na 178 °C i 195,6 °C (Grzesiak i sar., 2003). Prvi pik je pik topljenja polimorfnog oblika III, koji nakon toga prelazi u polimorfni oblik I, čije je topljenje posledica drugog pika. Ovi pikovi su blago pomereni za par stepeni ka višim vrednosima u odnosu na pikove koje su dobili Grzesiak i sar. pri DSC analizi čistog karbamazepina u polimorfnom obliku III. Pomeranje je posledica različitih brzina zagrevanja pri DSC analizi. U ovom ispitivanju brzina je veća (20 °C/min > 10 °C/min), pa se samim tim ravnoteža u sistemu postiže kasnije i potrebno je više vremena do pojave određenih promena. Takođe, kao posledica u razlici eksperimentalnih uslova, na DSC krivoj za čist karbamazepin se ne uočava jasan egzotermni pik rekristalizacije i prelaska u polimorfni oblik I. Kod sve tri formulacije (O₁, O₂, O₃) se uočava jedan oštar

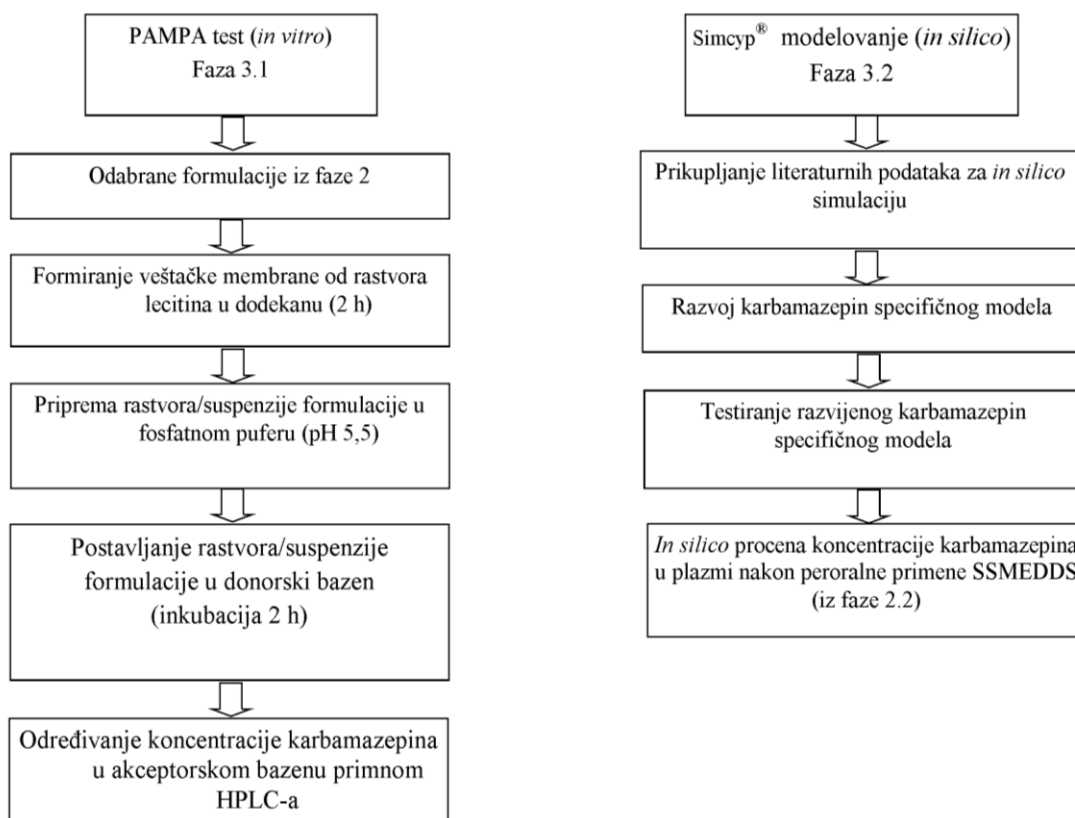
endotermni pik na temperaturama od 172,9 °C, 173,3 °C i 176,7 °C. Ova promena, kao što je već spomenuto, predstavlja karakterističan pik topljenja polimornog oblika III, koji se najčešće javlja u opsegu od 150-175,8 °C. Takođe, u svim uzorcima ispitivanih formulacija se uočava još jedan širi endotermni pik oko 230-240 °C. Ovo verovatno predstavlja pik početka degradacije karbamazepina. Treba istaći da je karbamazepin u svim ispitivanim formulacijama ostao u kristalnom obliku i to u početnom polimornom obliku III i da je njegova brzina rastvaranja iz datih formulacija značajno povećana.



Slika 9.31. DSC i TGA krive odabranih optimalnih formulacija, čistog karbamazepina i Neusilina[®] UFL2.

10. Procena permeabilnosti karbamazepina iz čvrstih samo-dispergujućih sistema primenom *in vitro* i *in silico* metoda (Faza 3.)

U trećoj fazi eksperimentalnog rada vršena je procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih formulacija samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom (iz faze 2). Ova faza može se podeliti na dva dela, u prvom delu vršena je procena permeabilnosti primenom *in vitro* PAMPA testa, a u drugoj fazi vršena je procena resorpcije karbamazepina iz samo-mikroemulgujućih sistema primenom *in silico* metode, korišćenjem kompjuterskog programa Simcyp® Population-Based Simulator (version 13.2; Certara™, SAD). Plan eksperimenata ove faze dat je na slici 10.1.



Slika 10.1. Plan eksperimenata treće faze.

10.1. Procena permeabilnosti karbamazepina iz čvrstih samo-dispergujućih sistema primenom PAMPA testa (Faza 3.1.)

Procena permeabilnosti lekovite supstance vršena je primenom PAMPA testa. U prethodnoj fazi su odabrane formulacije koje su pokazale najveću brzinu rastvaranja karbamazepina, kako bi se procenio uticaj sastava formulacije i povećanja brzine rastvaranja karbamazepina na permeabilnost. Cilj je bio i da se ispita uticaj vrste nosača i stepena disperziteta samo-dispergujućeg nosača na permeabilnost karbamazepina. U tabeli 10.1. dati su sastav ispitivanih formulacija, procenti oslobođenog karbamazepina iz datih formulacija u različitim vremenskim intervalima i veličina kapi tečnih samo-dispergujućih nosača, nakon razblaživanja vodom. Radi lakšeg praćenja izvršeno je preimenovanje formulacija.

Tabela 10.1. Formulacije iz kojih je vršena procena permeabilnosti primenom PAMPA testa

Oznaka formulacije u prethodnoj fazi	Procenat oslobođenog karbamazepina nakon				Veličina kapi (nm)	Oznaka formulacije u ovoj fazi
	10 min	30 min	60 min	120 min		
KBZ_NUFL2_1_6_A (čvrste disperzije-faza 2.1.)	63,02	73,52	75,79	81,28	-	PAMPA-SD
NUFL2_SMEDDS_3_1_A (SSMEDDS iz faze 2.2.)	75,50	91,56	94,37	98,14	17,66	PAMPA-SSMEDDS
NUFL2_SNEDDS_1_1 (SSNEDDS iz faze 2.3.)	70,76	80,94	85,81	94,12	157,02	PAMPA-SSNEDDS
O ₁ (SSEDSS iz faze 2.4.)	52,47	81,87	93,56	95,21	332,7	PAMPA-SSEDSS1
O ₂ (SSEDSS iz faze 2.4.)	61,39	85,38	91,7	94,30	332,7	PAMPA-SSEDSS2
O ₃ (SSEDSS iz faze 2.4.)	62,23	82,65	89,03	92,14	332,7	PAMPA-SSEDSS3

10.1.1. Materijal i metode

Dodekan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i lecitin jajeta (*Lipoid GmbH, Germany*) korišćeni su u PAMPA testu. Svi drugi reagensi koji su korišćeni za HPLC analizu bili su analitičke čistoće.

10.1.1.1. PAMPA test

Procena permeabilnosti karbamazepina iz odabranih formulacija i čistog karbamazepina izvršena je korišćenjem PAMPA testa. Kao nosač veštačke membrane i akceptorski panel korišćen je filtracioni panel sa 96 bazena, izrađen od hidrofilnog poliviniliden difluorida (PVDF) (*Millipore, Bedford, MA, SAD*). U bazene akceptorske ploče naneto je po 5 μ l rastvora lecitina jajeta u dodekanu (1%, m/V) i ostavljeno 2h na sobnoj temperaturi, da rastvarač u potpunosti ispari. Ovako je dno akceptorske ploče impregnirano lecitinom i formirana je veštačka membrana, koja u kontaktu sa rastvorom pufera formira multilamelarni lipidni dvosloj između pora filtera. Akceptorska ploča je postavljena na donorsku, u čije je bazene prethodno naneto po 300 μ l suspenzije čistog karbamazepina i odabranih formulacija u fosfatnom puferu pH 5,5. Istovremeno je u bazene akceptorske ploče naneto po 300 μ l fosfatnog pufera pH 5,5. Akceptorska ploča je poklopljena folijom kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača. Ispitivanje za svaki uzorak je vršeno u triplikatu, a rezultat je predstavljen kao srednja vrednost.

Nakon inkubacije od 2h na sobnoj temperaturi, koncentracija karbamazepina u bazenima akceptorske ploče određivana je HPLC-om. HPLC analiza vršena je na Dionex Ultimate 3000 sistemu (*Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka*) opremljenim Dionex Ultimate 3000 kvaternom pumpom, autosemplerom i UV detektorom. Za analizu podataka korišćen je Chromeleon 7 software (*Thermo Fisher Scientific, Nemačka*). Za analizu je upotrebljena kolona Zorbax Extend-C18 (150 mm \times 4,6 mm, veličine čestica 5 μ m). Mobilna faza sadržala je metanol i 1% sirćetnu kiselinu (50:50, v/v). Temperatura kolone bila 25 °C, a protok mobilne 1 ml/min. UV detekcija vršena je na 254 nm. Validacija korišćene HPLC metode data je u Prilogu A.

Koeficijenti permeabilnosti (Papp) izračunati su primenom sledećih formula:

$$\%T = 100 \times \frac{A_R V_R}{A_{D0} V_D} \quad (10.1)$$

$$P_{app} = \frac{V_D V_R}{(V_D + V_R) S t} \ln \left[\frac{100 V_D}{100 V_D - \%T (V_D + V_R)} \right] \quad (10.2)$$

Gde su:

V_D i V_R – zapremine donorskog i akceptorskog rastvora (ml);

A_{D0} i A_R – HPLC površine pikova inicijalnog i akceptorskog rastvora;

S – površina membrane između komora (0,28 cm², prema proizvođaču);

t – vreme inkubacije (s) (Zhu i sar., 2002).

10.1.2. Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja permeabilnosti karbamazepina iz ispitivanih formulacija i čistog karbamazepina dati su u tabeli 10.2. Dobijena vrednost koeficijenta permeabilnost za čist karbamazepin bila je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima u sličnom ispitivanju (Zhu i sar., 2002). Rezultati PAMPA testa ukazuju da je iz svih formulacija postignuto povećanje permeabilnosti karbamazepina u odnosu na čist karbamazepin.

Tabela 10.2. Vrednost koeficijenata permeabilnost karbamazepina iz odabranih formulacija i čistog karbamazepina

Formulacija	$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/s)
PAMPA-SD	16,12 ± 2,27
PAMPA-SSMEDDS	21,42 ± 1,67
PAMPA-SSNEDDS	19,12 ± 0,87
PAMPA-SSEDDS1	16,13 ± 2,75
PAMPA-SSEDDS2	17,11 ± 2,72
PAMPA-SSEDDS3	20,37 ± 1,71
Čist karbamazepin	11,77 ± 0,34

Povećanje permeabilnosti karbamazepina iz formulacije čvrstih disperzija verovatno je posledica redukcije veličine čestice i prelaska karbamazepina u amorfnu formu. Takođe, povećanje permeabilnosti može biti rezultat prezasićenja (supersaturacije) koje potiče od amorfnih čvrstih disperzija. Za razliku od drugih postupaka za povećanje rastvorljivosti postupkom formulacije čvrstih disperzija ne menja se ravnoteža rastvorljivosti lekovite supstance; umesto toga omogućava nastajanje nestabilnog presićenog rastvora. Povećanje brzine rastvaranja korišćenjem surfaktanata i kosurfaktanata/korastvarača može dovesti do smanjenja permeabilnosti lekovite supstance kroz membranu. Ovo se dešava kao posledica veće rastvorljivosti lekovite supstance u vodenoj fazi, usled čega dolazi do smanjenja particionog koeficijenta između membrane i vodene faze, koji primarno određuje permeabilnost lekovite supstance kroz membranu GIT-a. Permeabilnost se smanjuje sa povećanjem rastvorljivosti lekovite supstance, time se smanjuje pokretačka sila za permeabilnost lekovite supstance kroz membranu GIT-a (Miller i sar., 2012). S druge strane, povećanje rastvorljivosti usled supersaturacije ne dovodi do smanjenja particionog koeficijenta. Takvo ponašanje je posledica činjenice da particioni koeficijent zavisi od ravnotežne rastvorljivosti lekovite supstance. Kako supersaturacija pokazuje neravnotežnu rastvorljivost, ona neće uticati na particioni koeficijent. Takođe, ne utiče ni na prividnu permeabilnost kroz membrane, dok se fluks (proizvod prividne rastvorljivosti i prividne permeabilnosti) značajno povećava. „Nanoagregati” adsorpcionog nosača i karbamazepina malih dimenzija koji su formirani u rastvoru imaju značajnu ulogu u održavanju supersaturacije usled inhibicije rekristalizacije (Miller i sar., 2012).

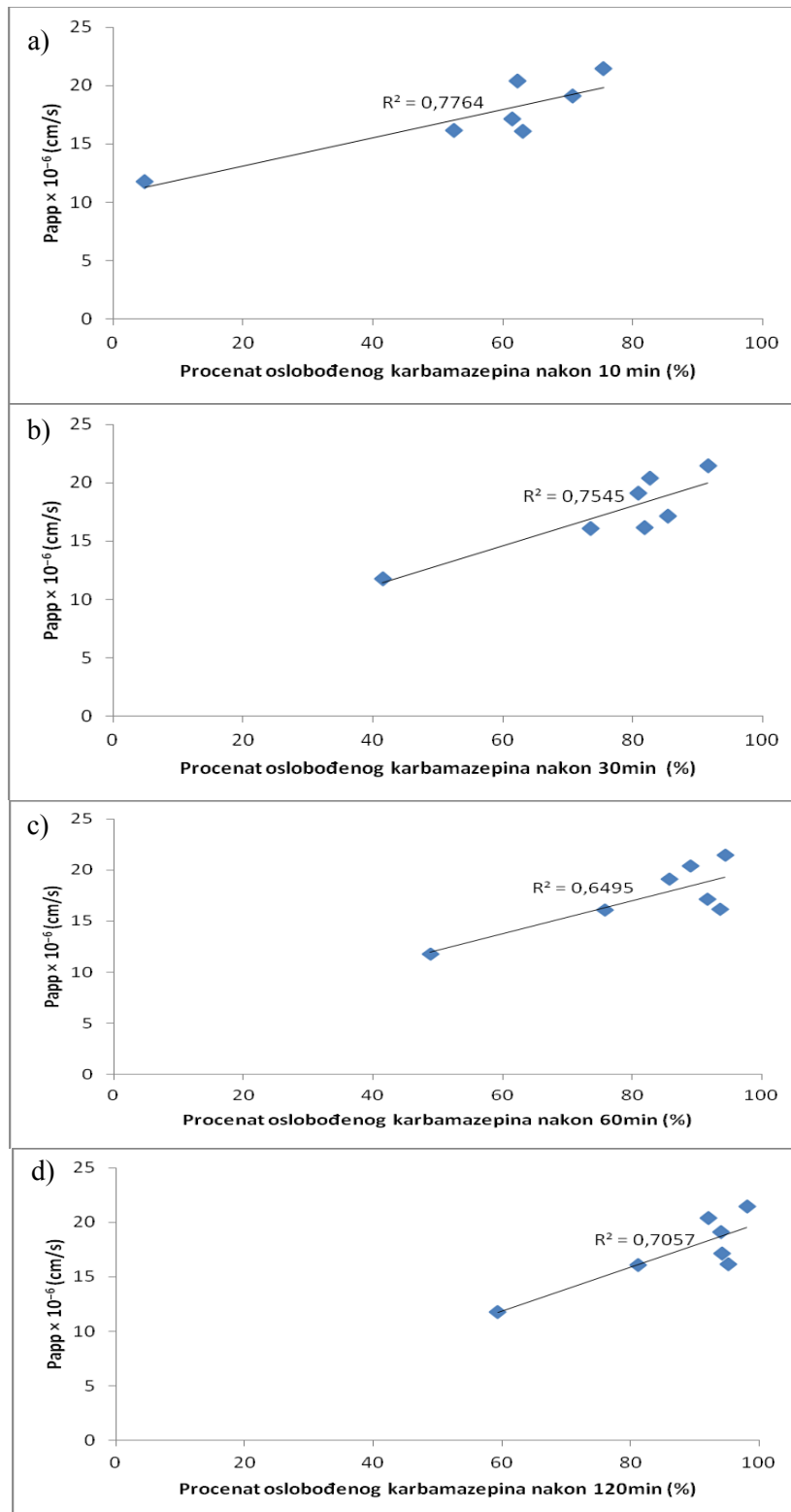
Korišćenjem surfaktanata za povećanje rastvorljivosti na različite načine može promeniti permeabilnost. Surfaktanti mogu povećati permeabilnost membrane za lekovite supstance visoke rastvorljivosti u vodi, a niske permeabilnosti (BSK klasa III), tako što dovode do narušavanja integriteta membrane i povećanja paracelularnog transporta. Međutim, primena surfaktanata za povećanje rastvorljivosti lipofilnih lekovitih supstanci, koje pokazuju visoku permeabilnost, kakav je i sam karbamazepin (BSK klasa II), može dovesti do smanjenja slobodne frakcije lekovite supstance, što posledično vodi smanjenju permeabilnosti. Smanjenje slobodne frakcije lekovite supstance nastaje kao posledica toga što lekovita supstanca u koncentraciji surfaktanata

iznad KMK biva inkorporirana u micelle. Smanjenje frakcija slobodne lekovite supstance u rastvoru, dovodi do smanjenja koncentracionog gradijenta, koji predstavlja osnovnu pokretačku silu za permeabilnost lekovite supstance (Dahan i Miller, 2012). Iz svih formulacija čvrstih samo-dispergujućih sistema postignuto je povećanje permeabilnosti karbamazepina. Povećanje vrednosti koeficijenta prividne permeabilnosti se kretalo u opsegu od 40% (PAMPA-SSEDDS1) do 82% (PAMPA-SSMEDDS), u odnosu na čist karbamazepin. Povećanje permeabilnosti je verovatno posledica povećanja rastvorljivosti/brzine rastvaranja karbamazepina, ali verovatno i interakcije surfaktanata i kosurfaktanata/korastvarača sa veštačkom membranom. Slični rezultati su opisani i u literaturi kao posledica promene fluidnosti membrane (Alqahtani i sar., 2014). Takođe, još jedan od razloga za povećanje permeabilnosti karbamazepina može biti i interakcija karbamazepina i adsorpcionog nosača. Najveće povećanje permeabilnosti karbamazepina postignuto je iz formulacije PAMPA-SSMEDDS (formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema), verovatno kao posledica najmanje veličine kapi. Međutim, jasna razlika između stepena disperziteta samo-dispergujućeg nosača i permeabilnosti nije uočena. Permeabilnost karbamazepina iz formulacije čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema (PAMPA-SSNEDDS) je veća u odnosu na dve formulacije čvrstih samo-emulgujućih sistema (PAMPA-SSEDDS1, PAMPA-SSEDDS2), ali manja u odnosu na jednu formulaciju čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema (PAMPA-SSEDDS3). Poređenjem formulacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom (PAMPA-SSEDDS1, PAMPA-SSEDDS2, PAMPA-SSEDDS3) uočen je zanimljiv trend, da se sa smanjenjem udela tečnog samo-emulgujućeg nosača i karbamazepina u formulaciji, a povećanjem udela Neusilin[®]-a UFL2, povećava permeabilnost karbamazepina. Međutim, primenom jednofaktorskog ANOVA testa uočeno je da ova razlika nije statistički značajna (PAMPA-SSEDDS1 i PAMPA-SSEDDS3: $p = 0,72$; PAMPA-SSEDDS1 i PAMPA-SSEDDS2: $p = 0,28$; PAMPA-SSEDDS2 i PAMPA-SSEDDS3: $p = 0,29$).

Generalno, sa povećanjem brzine rastvaranja povećava se permeabilnost karbamazepina. Grafici zavisnosti koeficijenta permeabilnosti karbamazepina od procenta rastvorenog karbamazepina nakon 10, 30, 60 i 120 minuta prikazani su na slici 10.2. Koeficijenti korelacije između ova dva parametra kreću se u opsegu od 0,6495 (nakon 60 min) do 0,7764 (nakon 10 min), pa se može zaključiti da se najveći stepen

korelacije postiže između koeficijenta permeabilnosti karbamazepina i procenta rastvorenog karbamazepina nakon 10 minuta.

Na osnovu rezultata PAMPA testa se može zaključiti da se formulacijom čvrstih samo-dispergujućih sistema postiže i povećanje koeficijenta permeabilnosti karbamazepina.



Slika 10.2. Zavisnost koeficijenta prividne permeabilnosti karbamazepina od procenta rastvorenog karbamazepina iz SSMEDDS nakon: a) 10 min, b) 30 min, c) 60 min, d) 120 min.

10.2. Procena permeabilnosti primenom *in silico* metoda uz korišćenje kompjuterskog programa Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.2; Certara[™], SAD) (Faza 3.2.)

U ovoj fazi eksperimentalnog rada izvršena je *in silico* procena resorpcije karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema. Cilj ove faze je bio da se razvije model za predviđanje profila koncentracije karbamazepina u plazmi, nakon peroralne primene, kao i da se predvide profili koncentracije karbamazepina nakon peroralne primene čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih u fazi 2.2 (poglavlje 9.2.). Cilj je bio i da se proceni uticaj sastava formulacija i postupka izrade na osnovne farmakokinetičke parametre PIK, t_{max} , C_{max} , kao i da se utvrdi da li razlike u brzini rastvaranja karbamazepina dobijene *in vitro* imaju uticaj na navedene farmakokinetičke parametre.

10.2.1. Gastrointestinalna simulacija

Za *in silico* simulaciju resorpcije/koncentracije lekovite supstance u plazmi korišćen je kompjuterski program Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.2; Certara[™], SAD), koristeći fizičko-hemijske, biofarmaceutske i farmakokinetičke parametre iz literature ili *in silico* procenjene. Osnovni ulazni parametri potrebni za simulaciju navedeni su u tabeli 10.3.

Tabela 10.3. Ulazni parametri za simulaciju resorpcije karbamazepina pomoću Simcyp[®] kompjuterskog programa

Parametar	Vrednost
Molekulska težina	236,27 g/mol
log P	2,38 ^a
Tip jedinjenja	Monoprotonska baza ^a
pKa	11,83 ^b
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1,6 ^b
Slobodna frakcija leka u plazmi	0,25 ^b
Resorpcija	
Model	ADAM
Efektivna humana permeabilnost, P_{eff}	$4,3 \times 10^{-4}$ cm/s ^c
Rastvorljivost na pH 5,76	0,21 mg/ml ^d
Maksimalni odnos supersaturacije	10 ^h
Konstanta precipitacije	4 h^{-1} ^h
Veličina čestice	180 μm ^e
Gustina čestice	1,2 ^h
Raspodela	
Model	potpuni PBPK
Volumen distribucije u stabilnom stanju, V_{ss}	1,14 l/kg ^f
Eliminacija	
Klirens, CL_{po}	1,3 l/h ^g
Dizajn studije	
Predstavnik populacije zdravih dobrovoljaca	
Doza	200 mg
Vreme simulacije	168 h

^aPodaci uzeti iz literature (Chen i Yu; 2009); ^bPodaci uzeti iz literature (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons); ^cPodatak uzet iz literature (Lennernas i sar., 1996); ^dPodatak uzet iz literature (Grbić, 2011); ^eVrednost dobijena korišćenjem opcije Simcyp[®] Parameter Estimation; ^fVrednost izračunata pomoću Simcyp[®]-a korišćenjem modela raspodele potpuni PBPK; ^gPodatak uzet iz literature (Walker i Whittlesea, 2012); ^hPodrazumevana Simcyp vrednost

U osnovi simulacije korišćen je ADAM model (*eng.* Advanced Dissolution Absorption and Metabolism). U okviru ovog modela kretanje lekovite supstance u tečnom ili čvrstom stanju kroz različite segmente GI trakta se posmatra kao proces koji se odvija

kinetikom prvog reda. Tanko crevo je podeljeno na 7 subsegmenata tako da svaki ima isto tranzitno vreme. Prilikom izvođenja simulacija softver koristi više različitih grupa podataka, koji su navedeni u poglavlju 5.

Kao model distribucije korišćen je potpuni PBPK model. Ovaj model koristi brojne diferencijalne jednačine kako bi simulirao koncentracije lekovite supstance u plazmi. Karakteristike prosečnih ispitanika u *in silico* studiji su odabrane tako da odgovaraju karakteristikama ispitanika u *in vivo* studiji (na primer starosno doba i odnos broja muškaraca i žena). Simulacija je izvedena za prosečnog ispitanika za definisanu populaciju.

Validacija dobijenog modela izvršena je na osnovu rezultata dobijenih u *in vivo* studiji za srednju koncentraciju karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem objavljenim u studiji Gérardin et al. (Gérardin i sar., 1976). Za procenu greške predviđanja (%PE) između *in vivo* dobijenih i *in silico* predviđenih pojedinačnih farmakokinetičkih parametara korišćen je sledeći izraz:

$$PE[\%] = \frac{PK_{predviđeno} - PK_{dobijeno}}{PK_{dobijeno}} \times 100 \quad (10.3)$$

gde je PE (%) – greška predviđanja izražena u procentima, $PK_{dobijena}$ – uočena (eksperimentalna) vrednost i $PK_{predvidena}$ - simulirana vrednost relevantnih farmakokinetičkih parametara (t_{max} , PIK, C_{max}). Predviđanje se smatra uspešnim ukoliko je prosečna apsolutna greška predviđanja manja od 10% (Guidance for Industry, FDA/CDER 1997).

Nakon toga kako bi se predvideo profil koncentracije karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, profili brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija su korišćeni kao ulazni parametri za karbamazepin-specifični razvijeni PBPK model.

10.2.2. Rezultati i diskusija

10.2.2.1. Razvoj karbamazepin specifičnog PBPK modela

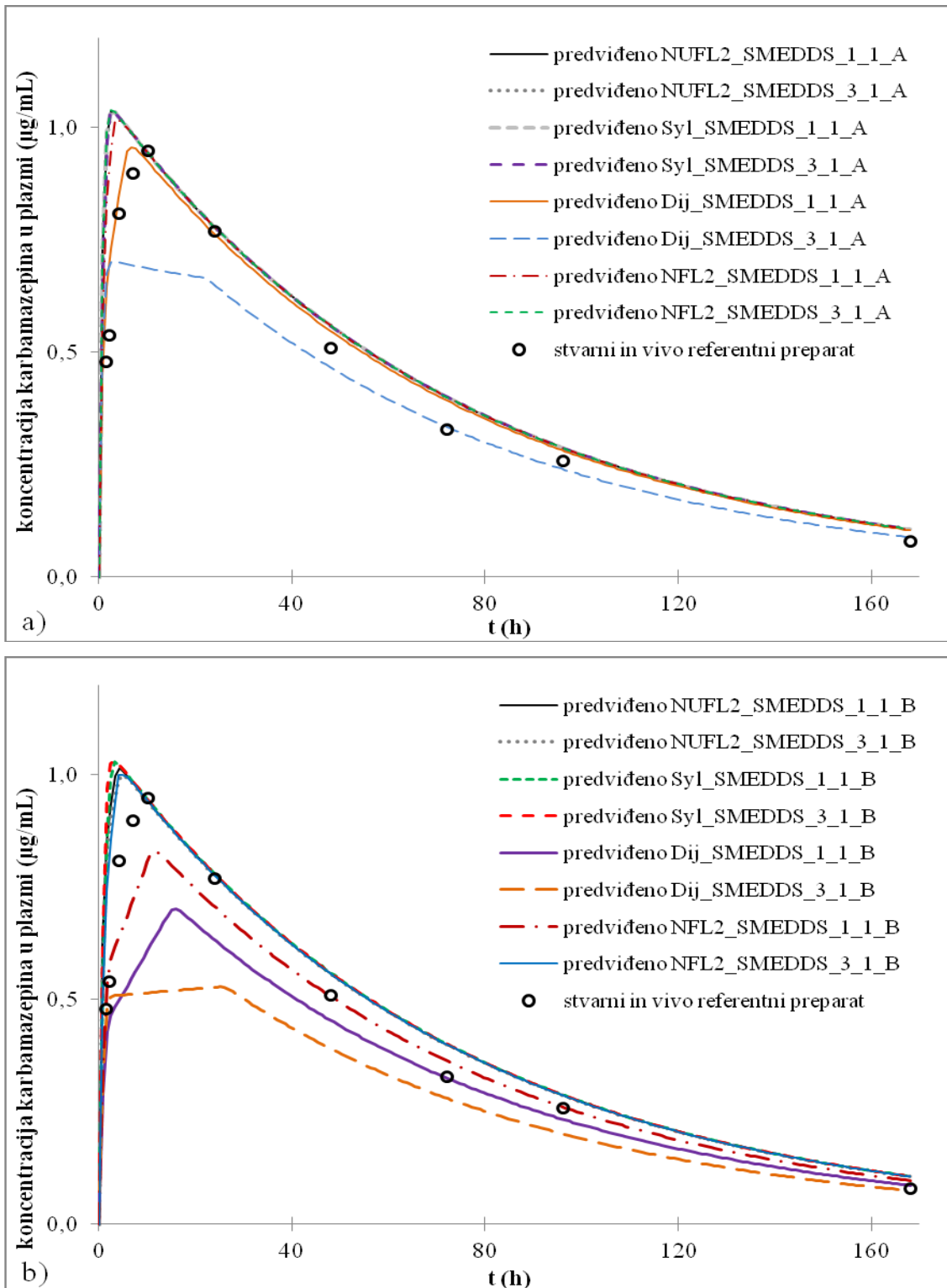
Karbamazepin je visoko permeabilna, nisko rastvorljiva lekovita supstanca koju karakteriše pH nezavisna rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti (Grbić, 2011). U razvoju modela korišćeni su literaturni podaci za vrednost rastvorljivosti na pH 5,76, efektivnu humanu permeabilnost ($P_{\text{eff,man}}$), odnos koncentracije leka u krvi/plazmi, frakcija slobodnog leka u plazmi i vrednost klirensa (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons; Lennernas i sar., 1996; Grbić, 2011). Vrednost za volumen distribucije predstavlja vrednost dobijenu potpunim PBPK modelovanjem (Rodgers i Rowland, 2007). Veličina čestice optimizovana je korišćenjem *Simcyp*[®] *Parametar Estimation* opcije.

Procenat greške u predviđanju (%PE) za farmakokinetičke parametre C_{max} , t_{max} i PIK, redom iznosi 7,92%, 6,32%, i 5,66%. Na osnovu dobijenih vrednosti može se zaključiti da generisani PBPK model daje dobro predviđanje profila koncentracije karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene.

10.2.2.2. *In silico* simulacije resorpcije karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema

PBPK model je korišćen za simulaciju resorpcije karbamazepina iz čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema i za ispitivanje potencijalnog uticaja *in vitro* profila brzine rastvaranja karbamazepina na biološku raspoloživost.

Simcyp[®] predviđeni profili resorpcije karbamazepina iz formulacije čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom i referentnih tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, nakon peroralne primene pojedinačne doze od 200 mg, prikazani su na slici 10.3. Vrednosti određenih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , t_{max} , PIK) prikazane su u tabeli 10.4.



Slika 10.3. *In silico* predviđeni profili resorpcije/koncentracije karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene čvrstih samo-mikremulgujućih sistema sa karbamazepinom izrađenih metodom: a) direktne adsorpcije; b) uparavanja; *in vivo* profil koncentracije karbamazepina za referentni preparat.

Tabela 10.4. Predviđeni farmakokinetički parametri za koncentraciju karbamazepina nakon peroralne primene čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema; *in vivo* dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara za referentni preparat

Formulacija	Predviđeni farmakokinetički parametri		
	C_{max} (µg/ml)	t_{max} (h)	PIK (µgh/ml)
NUFL2_SMEDDS_1_1_A	1,04	2,52	70,0
NUFL2_SMEDDS_3_1_A	1,04	2,52	70,0
Syl_SMEDDS_1_1_A	1,04	2,52	70,0
Syl_SMEDDS_3_1_A	1,04	2,52	70,0
Dij_SMEDDS_1_1_A	0,95	6,72	67,4
Dij_SMEDDS_3_1_A	0,70	3,36	56,5
NFL2_SMEDDS_1_1_A	1,02	3,36	69,6
NFL2_SMEDDS_3_1_A	1,04	2,52	70,0
NUFL2_SMEDDS_1_1_B	1,01	4,20	69,6
NUFL2_SMEDDS_3_1_B	1,00	5,04	69,3
Syl_SMEDDS_1_1_B	1,03	3,36	69,8
Syl_SMEDDS_3_1_B	1,03	3,36	69,9
Dij_SMEDDS_1_1_B	0,70	15,96	53,6
Dij_SMEDDS_3_1_B	0,52	25,2	46,0
NFL2_SMEDDS_1_1_B	0,83	11,76	61,2
NFL2_SMEDDS_3_1_B	1,00	5,04	69,1
Stvarni <i>in vivo</i> farmakokinetički parametri za referentni preparat	1,01	7,9	71,0

Na osnovu *in silico* simulacije resorpcije/koncentracije lekovite supstance u plazmi može se zaključiti da se nakon peroralne primene formulacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, izrađenih metodom direktne adsorpcije (metoda A) postiže značajno niža vrednost t_{max} (maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi), u odnosu na formulacije izrađene metodom uparavanja (metoda B). Ovakva razlika je donekle očekivana, imajući u vidu da je ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih formulacija pokazano da se značajno veća brzina oslobađanja postiže primenom metode A i da je na osnovu karakterizacije izrađenih formulacija utvrđeno da je u formulacijama izrađenih metodom B, došlo do

prelaska karbamazepina u manje rastvorljiv polimorfni oblik II. Međutim, treba istaći da na osnovu rezultata ispitivanja brzine rastvaranja, nije očekivana ovako značajna razlika u postizanju maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi. U svim formulacijama izrađenih metodom direktne adsorpcije (metoda A) postignuto je barem 2 puta brže dostizanje maksimuma lekovite supstance u plazmi u odnosu na formulacije izrađene metodom uparavanja (metoda B). Formulacija kod koje je uočena najveća razlika bila je formulacija izrađena sa diјatomitima, pri odnosu diјatomiti/tečni SMEDDS 3:1, kod koje je uz korišćenje metode A u izradi postignuta vrednost t_{max} od 3,36 h, a kod metode B vrednost od 25,2 h. Ovim je pokazana prednost metode izrade direktne adsorpcije (metode A), u odnosu na metodu uparavanja (metoda B), obzirom na to da je postignuta značajno niža vrednost t_{max} , uz očuvanje optimalnih vrednosti C_{max} i PIK, koje su postignute primenom referentnog preparata, tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Promena vrednosti C_{max} i PIK u odnosu na referentni preparat, tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, nije ni očekivana, znajući da literaturni podaci za karbamazepin ukazuju na dobru biološku raspoloživost ove supstance nakon peroralne primene (Chiou i Buehler, 2002), a uz to imajući u vidu da se radi o preparatu sa trenutnim oslobađanjem registrovanom na tržištu.

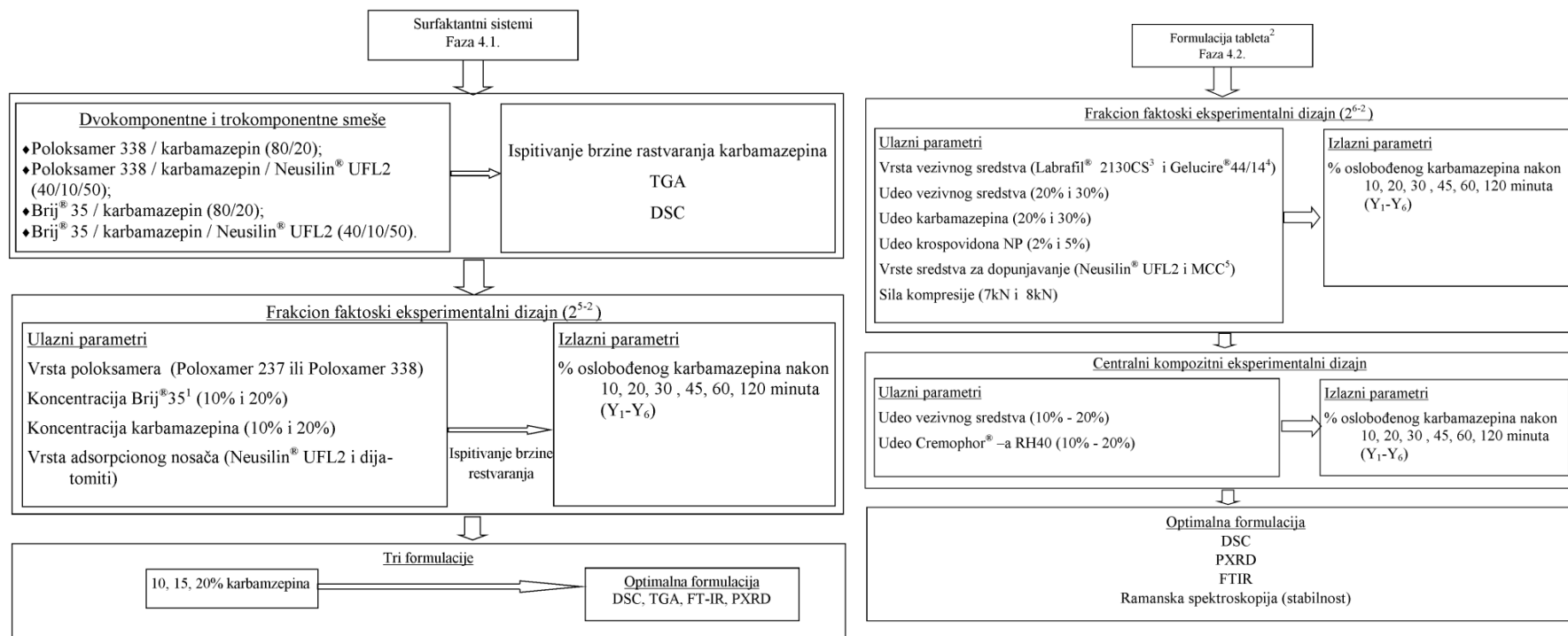
Poređenjem farmakokinetičkih parametara dobijenih za formulacije izrađene sa različitim adsorpcionim nosačima, uočava se da se najkasnije postizanje maksimuma koncentracije karbamazepina u plazmi (najviša vrednost t_{max}) postiže korišćenjem diјatomita uz značajno niže vrednosti C_{max} i PIK u poređenju sa referentnim preparatom. Ovo je verovatno posledica specifične strukture diјatomita i „zarobljavanja“ dela lekovite supstance u porama nosača, na osnovu čega se može zaključiti da ovi nosači nisu pogodni za formulaciju preparata sa trenutnim oslobađanjem. *In silico* profili resorpcije/koncentracije karbamazepina u plazmi ukazuju na to da se nakon peroralne primene formulacija čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom najbrže dostizanje maksimuma koncentracija karbamazepina postiže u slučajevima kad su kao nosači korišćeni Neusilin[®] UFL2 i Sylysia[®] 320, bez obzira na odnos adsorpcioni nosač/SMEDDS. Pri primeni ovih formulacija maksimalna koncentracija lekovite supstance u plazmi se dostiže nakon 2,52 h, što je daleko brže u odnosu na referentni preparat, kod koga vrednost t_{max} iznosi 7,9 h. Zanimljivo je, da rezultati za formulacije izrađene sa Neusilin[®]-om FL2 imaju

gotovo identične farmakokinetičke parametre (t_{\max} , C_{\max} i PIK), kao i formulacije izrađene sa Neusilin[®]-om UFL2 i Sylysia[®]-om 320, iako je u *in vitro* ispitivanju brzine rastvaranja pokazana značajno manja brzina rastvaranja iz formulacija sa Neusilin[®]-om FL2. Takođe, razlike koje su u *in vitro* ispitivanju brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija sa Neusilin[®]-om UFL2 i Sylysia[®]-om 320 zabeležene, u *in silico* predviđanju profila koncentracija karbamazepina nakon peroralne primene nisu potvrđene. Razlika u vrednostima farmakokinetičkih parametara za formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije sa Neusilin[®]-om UFL2, Sylysia[®]-om 320 i Neusilin[®]-om FL2 gotovo i da ne postoje. Jasna razlika se uočava samo u vrednosti t_{\max} , kod formulacije izrađene sa Neusilin[®]-om FL2, sa različitim odnosima adsorpcioni nosač/SMEDDS, pri čemu je niža vrednost postignuta pri odnosu 3:1, nego pri odnosu 1:1. Ova razlika je uočena i pri *in vitro* ispitivanju brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija.

Generalno se može zaključiti da se na osnovu *in silico* profila resorpcije/koncentracije karbamazepina u plazmi, nakon peroralne primene formulacija izrađenih metodom direktne adsorpcije sa Neusilin[®]-om UFL2, Sylysia[®]-om 320 i Neusilin[®]-om FL2, ove formulacije mogu smatrati optimalnim zbog značajno bržeg postizanja maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi (t_{\max} 2,52-3,36 h), uz očuvanje optimalnih vrednosti C_{\max} i PIK, u poređenju sa referentnim preparatom, tabletama karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem kod koga je vrednost t_{\max} 7,2 h.

11. Formulacija i karakterizacija čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom izrađenih metodom brzog hlađenja otopljenog materijala i granulacijom topljenjem (Faza 4.)

U četvrtoj fazi eksperimentalnog rada izvršena je formulacija i karakterizacija čvrstih surfaktantnih sistema i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem (Slika 11.1.). Čvrsti surfaktantni sistemi su izrađeni metodom brzog hlađenja otopljenog materijala, a tablete komprimovanjem granulata izrađenog metodom granulacije topljenjem, uz korišćenje lipidnih ekscipijenasa. Cilj ove faze rada bio je da se ispita mogućnost primene dva nova postupka za dobijanje čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom, kao i da se ispita mogućnost primene tehnika eksperimentalnog dizajna u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom.



Slika 11.1. Plan eksperimenata četvrte faze.

¹ Polioksietilen(23)-lauriletar; ² Komprimovanjem granulata izrađenog metodom topljenja; ³ Lauroil makrogol-6 glicerid;

⁴ Lauroil makrogol-32 glicerid; ⁵ Mikrokristalna celuloza

11.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom (Faza 4.1.)

Čvrsti surfaktantni sistemi sa karbamazepinom izrađeni su metodom brzog hlađenja otopljene mase. U prvom delu ove faze izrađene su smeše surfaktanta/kosurfaktanta sa karbamazepinom, sa i bez dodatka adsorpcionih nosača, kako bi se procenio uticaj pojedinačnih komponenti na brzinu oslobađanja i polimorfni oblik karbamazepina. Nakon toga je primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna izvršena procena uticaja većeg broja formulacionih parametara na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema. U završnom delu ove faze variran je udeo karbamazepina u formulaciji, kako bi se dobio čvrst surfaktantni sistem sa visokim udelom lekovite supstance.

11.1.1. Materijal i metode

U ovoj fazi su kao surfaktanti korišćeni Poloksamer 237 (Kolliphor™ P237, BASF ChemTrade GmbH, Nemačka) i Poloksamer 338 (Kolliphor™ P338, BASF ChemTrade GmbH, Nemačka). Kao kosurfaktant korišćen je polioksietilen(23)-lauriletar (Brij® 35, Sigma-Aldrich, Nemačka). Neusilin® UFL2 i dijatomiti su korišćeni kao adsorbensi.

11.1.1.1. Izrada čvrstih surfaktantnih sistema

Sve formulacije izrađene su otapanjem surfaktanta i kosurfaktanta na 60 °C. Nakon toga, u rastopljenu masu je dodat karbamazepin, uz snažno mešanje do dobijanja homogene disperzije. Brzim hlađenjem na ledenom kupatilu, uz energično mešanje, došlo je do očvršćavanja smeše. Nakon toga je izvršeno usitnjavanje, a zatim i prosejavanje svih izrađenih smeša kroz sito veličine promera 300 µm. Prosejane smeše su mešane sa adsorpcionim nosačem (dijatomiti ili Neusilin® UFL2) i dobijeni su uzorci za ispitivanje.

Eksperimentalni plan

Eksperimentalni deo ove faze se može podeliti na dva dela.

U prvom setu eksperimenata ispitivani su pojedinačni uticaji ekscipijena na brzinu rastvaranja karbamazepina.

Pripremljene su sledeće dvokomponentne i trokomponentne smeše:

- Poloksamer 338 / karbamazepin (80:20);
- Poloksamer 338 / karbamazepin / Neusilin[®] UFL2 (40:10:50);
- Brij[®] 35 / karbamazepin (80:20);
- Brij[®] 35 / karbamazepin / Neusilin[®] UFL2 (40:10:50).

U drugom delu ove faze ispitivan je uticaj faktora formulacije na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema, primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna (2^{5-2}). Ulazni parametri i nivoi na kojima su varirani prikazani su u tabeli 11.1. Eksperimentalni plan dat je u tabeli 11.2. Prvo je, prema eksperimentalnom planu, izrađena smeša karbamazepina, Brij[®] 35 i poloksamera (surfaktantni sistem) u odgovarajućem odnosu, tako da zbir njihovih udela čini 100%. Vrednosti udela karbamazepina, Brij[®] 35 i poloksamera naznačeni su u tabeli 11.1. Adsorpcioni nosač je dodat u ovu smešu u kasnijoj fazi. Pripremljeni odnos surfaktantni sistem/adsorpcioni nosač je variran na dva nivoa: 2:1 i 1:2 (Tabela 11.1.).

Tabela 11.1. Varirani parametri u drugom setu eksperimenata i nivoi na kojima su varirani

Parametar (promenljiva)	Oznaka promenljive	Donji nivo (-1)	Gornji nivo (+1)
Vrsta poloksamera	X ₁	Poloksamer 237 (P237)	Poloksamer 338 (P338)
Koncentracija Brij [®] 35 (%)	X ₂	10	20
Koncentracija karbamazepina (%)	X ₃	10	20
Vrsta adsorpcionog nosača	X ₄	Neusilin [®] UFL2	Dijatomi
Udeo nosača (%)	X ₅	33,33	66,67

Tabela 11.2. Šema drugog seta eksperimenata prema frakcionom faktorskom eksperimentalnom dizajnu (2^{5-2})

Formulacija	Ulazni parametri				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
F17	+1	-1	-1	-1	-1
F18	-1	+1	+1	-1	-1
F19	-1	+1	-1	-1	+1
F20	+1	+1	+1	+1	+1
F21	-1	-1	-1	+1	+1
F22	+1	+1	-1	+1	-1
F23	-1	-1	+1	+1	-1
F24	+1	-1	+1	-1	+1

Kao izlazni parametar praćen je procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta (Y_1 - Y_6). Izračunati su uticaji ispitivanih ulaznih parametara na izlazne parametre (tj. faktorski efekti), u skladu sa 2^{5-2} frakcionim faktorskim eksperimentalnim dizajnom. Svaki odgovor je proporcionalan linearnoj kombinaciji variranih parametara, što se može predstaviti jednačinom 11.1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \varepsilon, \quad (11.1.)$$

gde je:

Y – posmatrani odgovor sistema;

X_1 - X_5 – varirani parametri;

β_0 – srednji efekat;

β_1 - β_5 – pojedinačni uticaji ulaznih parametara na izlazne parametre (faktorski efekti);

ε – eksperimentalna greška.

Koeficijenti β_1 - β_5 pokazuju uticaj svakog od parametara. Vrednosti koeficijenata izračunavane su regresionom analizom, korišćenjem softvera *Design Expert*[®].

Nakon analize faktorskih efekata odabran je surfaktantni sistem iz koga je postignuta najveća brzina rastvaranja karbamazepina. U odabranoj formulaciji variran je udeo karbamazepina na tri nivoa: 10%, 20% i 30%. Nakon ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz ove tri formulacije, odabrana je optimalna formulacija, koja je imala najveću brzinu rastvaranja karbamazepina. Profil brzine rastvaranja karbamazepina iz

optimalne formulacije je poređen sa profilom brzine rastvaranja praška karbamazepina i karbamazepina iz komercijalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem.

11.1.1.2. Karakterizacija izrađenih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih surfaktantnih sistema

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih surfaktantnih sistema je izvedeno na način opisan u poglavlju 9.1.1.2. uz uzorkovanje nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta.

Karakterizacija čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom

Radi utvrđivanja uticaja pojedinačnih ekscipijenasa na polimorfni oblik karbamazepina odabrani su sledeći uzorci, za karakterizaciju primenom DSC i TGA analize: Poloksamer 338/karbamazepin (80:20); Poloksamer 338/ karbamazepin/Neusilin[®] UFL2 (40:10:50); Brij[®] 35/karbamazepin (80:20); Brij[®] 35/karbamazepin/Neusilin[®] UFL2 (40:10:50). Optimalna formulacija je okarakterisana primenom DSC, TGA, FT-IR i PXRD analize. Radi praćenja stabilnosti optimalna formulacija je čuvana 2 meseca na temperaturi od 25 °C i vlažnosti vazduha 40%, nakon čega je ponovo izvršena karakterizacija primenom pomenutih tehnika.

DSC, TGA i FT-IR analiza su izvedene na način opisan u poglavlju 9.2.1.2.

PXRD analiza je izvršena na Ital Structure APD2000 X-ray difraktometru sa Bragg–Brentano geometrijom sa bakarnom anodom ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, u rasponu ugla 2θ od 4° to 45°), na sobnoj temperaturi. Uzorci, po potrebi prethodno usitnjeni, stavljeni su na kvarenu ploču sa aluminijumskim držačem.

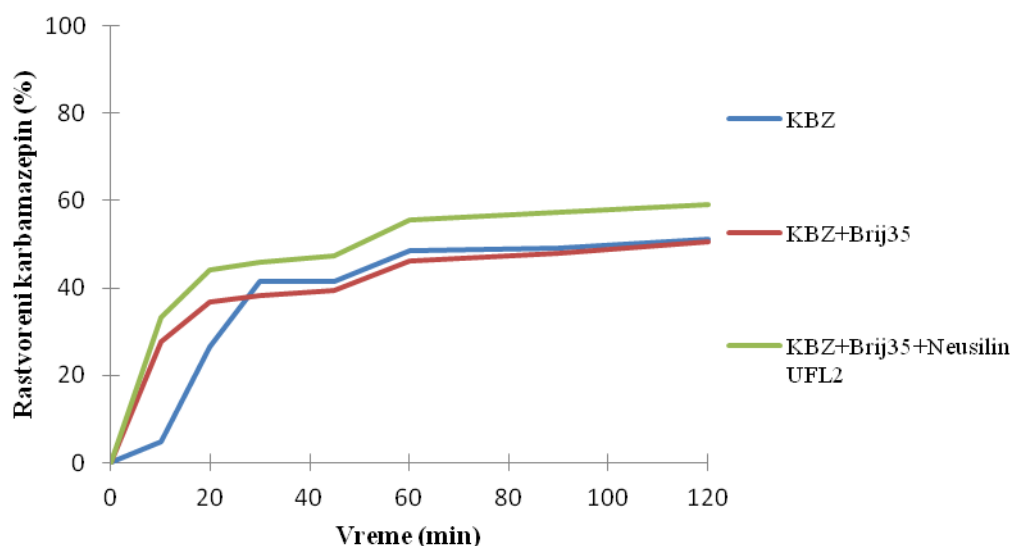
11.1.2. Rezultati i diskusija

11.1.2.1. Procena uticaja faktora formualacije na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema

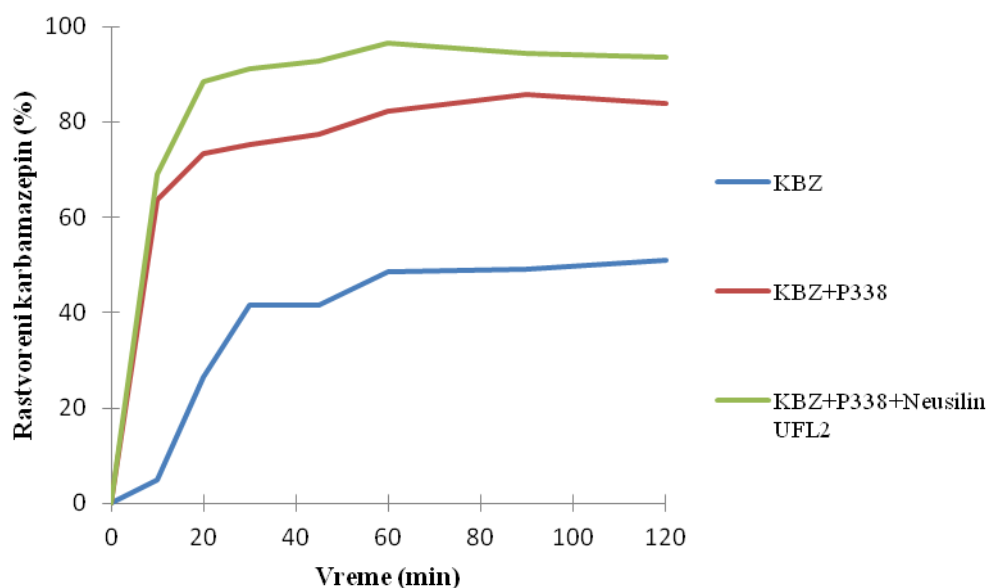
Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz dvokomponentnih i trokomponentnih smeša iz prvog seta eksperimenata dati su na slikama 11.2. i 11.3., a procenti oslobođenog karbamazepina prikazani su u tabeli 11.3.

Tabela 11.3. Procenat rastvorenog karbamazepina iz dvokomponentnih i trokomponentnih smeša

Oznaka formulacije	Procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)						
	10	20	30	45	60	90	120
KBZ+ Brij [®] 35	27,7	36,67	38,14	39,45	46,29	48,02	50,65
KBZ+ Brij [®] 35+ Neusilin [®] UFL2	33,24	44,01	45,76	47,34	55,54	57,23	59,12
KBZ+ P338	63,69	73,26	75,21	77,29	82,33	85,66	83,94
KBZ+ P338+ Neusilin [®] UFL2	69,15	88,45	91,14	92,82	96,51	94,39	93,6



Slika 11.2. Profili brzine rastvaranja praška karbamazepina i karbamazepina iz smeša sa Brij[®] 35 sa i bez dodatka Neusilin[®]-a UFL2.



Slika 11.3. Profili brzine rastvaranja praška karbamazepina i karbamazepina iz smeša sa Poloksamerom 338 (P338) sa i bez dodatka Neusilin[®]-a UFL2.

Poređenjem profila brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih dvokomponentnih i trokomponentnih smeša sa profilom brzine rastvaranja praška karbamazepina utvrđeno je da obe pomoćne materije (Brij[®] 35 i Poloksamer 338), kao i dodatak adsorpcionog nosača, povećavaju brzinu rastvaranja karbamazepina. Izračunati su faktori razlike i faktori sličnosti za profile brzine rastvaranja karbamazepina iz svih izrađenih smeša u odnosu na profil brzine rastvaranja čistog karbamazepina i prikazani u tabeli 11.4.

Tabela 11.4. Poređenje brzine rastvaranja karbamazepina iz dvokomponentnih i trokomponentnih smeša sa profilom brzine rastvaranja čistog karbamazepina - faktori razlike (f1) i faktori sličnosti (f2)

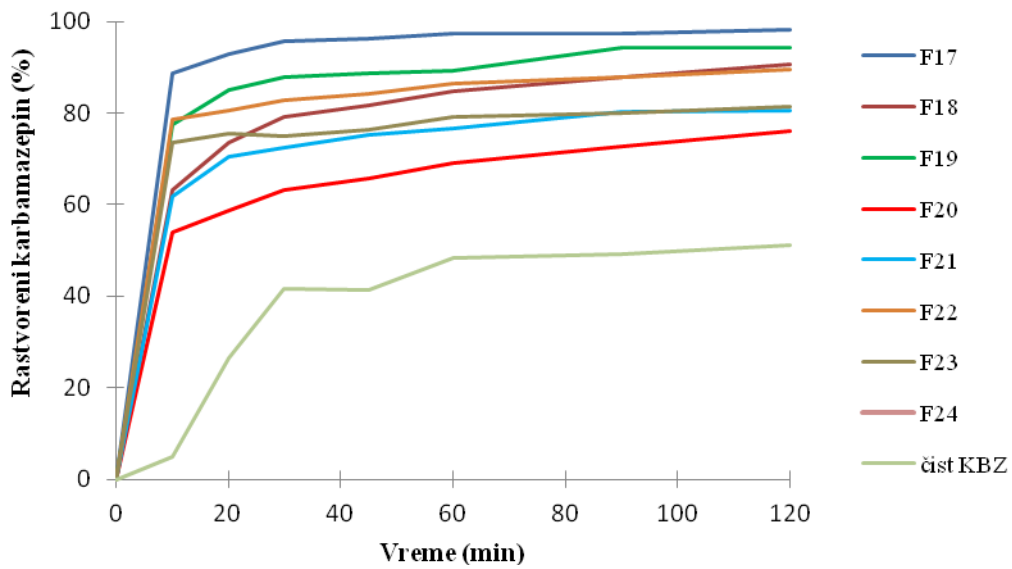
Smeša	f1	f2
Karbamazepin +Brij [®] 35	8,32	62,15
Karbamazepin +Brij [®] 35+ Neusilin [®] UFL2	23,14	36,41
Karbamazepin +Poloksamer 338	51,41	9,15
Karbamazepin + Poloksamer 338+ Neusilin [®] UFL2	57,98	3,38

Na osnovu dobijenih faktora razlike i sličnosti (Tabela 11.4.) može se zaključiti da se brzina oslobađanja karbamazepina značajno povećava dodatkom Brij[®] 35 sa Neusilin[®] -om UFL2 i dodatkom Poloksamera 338 (sa ili bez Neusilin[®] -a UFL2).

Povećanje brzine rastvaranja karbamazepina dodatkom surfaktanta poloksamera 338 je očekivano, zbog njegovih solubilizacionih osobina i visoke HLB vrednosti – 27 (Elektronska baza podataka *vi*). Adsorpcioni nosač (Neusilin[®] UL2) zbog svoje velike specifične površine dovodi do boljeg kvašenja supstance i većeg kontakta sa medijumom za rastvaranje, što takođe povećava brzinu rastvaranja supstance (Ito i sar., 2005). Veći uticaj na brzinu rastvaranja karbamazepina ima dodatak poloksamera 338 u odnosu na dodatak Brij[®] 35, što je i očekivano, usled razlike u HLB vrednostima ($HLB_{P338}=27$, $HLB_{Brij^{®}35}=16,9$) (Elektronska baza podataka *vi*).

U drugom setu eksperimenata poloksamer (Poloksamer 237 ili Poloksamer 338) je korišćen kao surfaktant, u kombinaciji sa Brij[®] 35, kao kosurfaktantom, iz razloga međusobnog sinergizma dva surfaktanta. Rezultat sinergizma je smanjenje kritične micelarne koncentracije smeše u odnosu na pojedinačne komponente što ima za posledicu da smeša poseduje veći kapacitet solubilizacije lekovite supstance (Clausse i sar., 1983).

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz osam različitih formulacija čvrstih surfaktantnih sistema (F17-F24) prikazani su na slici 11.4. Uočava se da postoji značajno povećanje brzine oslobađanja karbamazepina iz izrađenih surfaktantnih sistema, u odnosu na čist karbamazepin, kao i da postoji razlika između samih formulacija.



Slika 11.4. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema (izrađenih prema frakcionom faktorskom eksperimentalnom dizajnu) i čistog karbamazepina.

Kao izlazni parametri, posmatrani su procenti oslobođenog karbamazepina iz formulacija nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta (Y_1 - Y_6). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 11.5.

Tabela 11.5. Procenat oslobođenog karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema u odgovarajućim vremenskim intervalima

Formulacija	Izlazni parametri					
	Y ₁ % KBZ nakon 10min	Y ₂ % KBZ nakon 20min	Y ₃ % KBZ nakon 30min	Y ₄ % KBZ nakon 45min	Y ₅ % KBZ nakon 60min	Y ₆ % KBZ nakon 120min
F17	88,61	92,84	95,66	96,32	97,45	98,21
F18	63,31	73,48	79,22	81,67	84,63	90,74
F19	77,53	85,01	87,96	88,68	89,23	94,34
F20	54,03	58,63	63,22	65,59	69,01	76,14
F21	61,72	70,52	72,49	75,21	76,58	80,58
F22	78,51	80,57	82,91	84,21	86,36	89,65
F23	73,64	75,50	74,88	76,41	79,13	81,46
F24	63,80	74,97	80,73	83,95	85,94	90,32

Vrednosti faktorskih efekata prema fracionom faktorskom eksperimentalnom dizajnu (2^{5-2}), prikazani su u tabeli 11.6. Apsolutna vrednost koeficijenta upućuje na veličinu uticaja koji taj parametar ima na brzinu oslobađanja karbamazepina. Predznak ispred koeficijenta pokazuje da li je taj uticaj pozitivan ili negativan, odnosno da li se promenom vrednosti parametra sa nižeg na viši nivo brzina oslobađanja karbamazepina povećava (pozitivan uticaj) ili smanjuje (negativan uticaj).

Tabela 11.6. Vrednosti koeficijenata (veličina uticaja parametara) za svaki posmatrani odgovor

Ulazni parametri	Faktorski efekti	Izlazni parametri					
		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
vrsta poloksamera (X ₁)	β_1	+1,09	+0,31	+1	1,01	+1,15	0,9
udeo Brij [®] 35 (X ₂)	β_2	-1,8	-2,02	-1,31	-1,47	-1,23	0,037
udeo KBZ (X ₃)	β_3	-6,45	-5,8	-5,12	-4,6	-3,86	-3,02
vrsta nosača (X ₄)	β_4	-3,17	-5,13	-6,26	-6,15	-5,77	-5,72
udeo nosača (X ₅)	β_5	-5,87	-4,16	-3,53	-3,15	-3,55	-2,33
interakcija udela Brij [®] 35 i KBZ (X ₂ *X ₃)	β_{23}	-3,23	-2,57	-1,99	-1,81	-1,62	-1,26
interakcija udela Brij [®] 35 i nosača (X ₂ *X ₅)	β_{25}	+3,31	+1,55	+0,8	+0,24	+0,16	-0,14
srednji efekat	β_0	+70,14	+76,44	+79,63	+81,51	+83,54	+87,68

Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅, Y₆ : procenti oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta, redom.

Do tridesetog minuta, najveći uticaj na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema ima udeo karbamazepina (X_3). Uticaj ovog parametra je negativan, s obzirom na to da je karbamazepin teško rastvorljiva supstanca. Promenom udela karbamazepina od 10% na 20%, procenat oslobođenog karbamazepina iz izrađenih čvrstih surfaktantnih sistema se smanjuje.

Od tridesetog minuta, najveći uticaj na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema ima vrsta nosača (X_4). Može se pretpostaviti da se u početku karbamazepin oslobađa sa površine oba nosača. Usled veće specifične površine Neusilin[®] UFL2 (300 m²/g) u odnosu na dijatomite (30,9 m²/g), brže oslobađanje karbamazepina postiže se primenom Neusilin[®] UFL2 (Sinn i sar., 2011; Agarwal i sar., 2009; Krupa i sar., 2010). Značajnost ovog faktora raste sa vremenom. Nakon 30 minuta, karbamazepin se verovatno iz sistema sa Neusilin[®] UFL2 oslobađa sa površine usled lakšeg kvašenja, a iz sistema sa dijatomitima verovatno dolazi do oslobađanja karbamazepina iz unutrašnjosti sistema, slično rezultatima koje su u svom istraživanju sa ovim adsorbensima dobili Leuner i Dressman (2000). Zbog specifične strukture dijatomita (Sinn i sar., 2011) verovatno dolazi do odlaganja oslobađanja karbamazepina, jer dijatomiti adsorbuju supstancu u svojoj unutrašnjosti, odakle se postepeno oslobađaju.

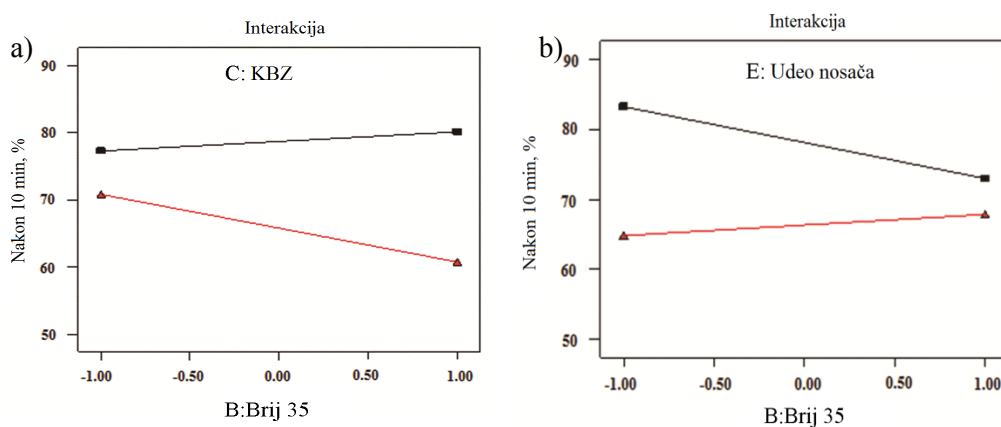
Veliki udeo nosača (X_5) ima negativan uticaj na brzinu rastvaranja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema. Veća brzina oslobađanja se postiže kada je udeo nosača na nižem nivou (33,33%). Prema radu Agarwal i sar. (2009), adsorbens magnezijum–aluminometasilikat, velike specifične aktivne površine (300 m²/g) i male veličine čestica (2–8 μm), poseduje pore u koje adsorbovani sadržaj može da uđe posredstvom kapilarnih sila u kojima je eventualna kristalizacija supstance onemogućena. Smanjena brzina rastvaranja nakon adsorpcije je posledica precipitacije lekovite supstance na površini adsorbensa i „zarobljavanja” leka u nosaču. Ovo je naročito izraženo nakon 10 i 20 minuta, kada je procenat oslobođene supstance mali usled male dostupnosti karbamazepina medijumu.

Vrsta poloksamera (X_1) ima vrlo mali uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema. Surfaktantni sistemi izrađeni sa P338 (HLB 27) su pokazali nešto veću brzinu rastvaranja karbamazepina u odnosu na sisteme izrađene sa

P237 (HLB 24), s obzirom na veću HLB vrednost (Elektronska baza podataka *vi*). Takođe, P338 ima manju kritičnu micelarnu koncentraciju od P237 ($2,2 \times 10^{-5}$ mol/l, $9,1 \times 10^{-5}$ mol/l), što znači da ima jaču solubilizacionu moć (Batrakova i sar., 1999; Kabanov i sar., 1995).

Udeo Brij[®] 35 (X₂) ima mali uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz čvrstih surfaktantnih sistema. Formulacija sa većim udelom Brij[®] 35 ima manji udeo poloksamera. U prvom setu eksperimenata je pokazano da dodatak poloksamera ima značajniji uticaj na povećanje brzine oslobađanja karbamazepina. Zbog toga veći udeo Brij[®] 35 ima negativan uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz izrađenih formulacija.

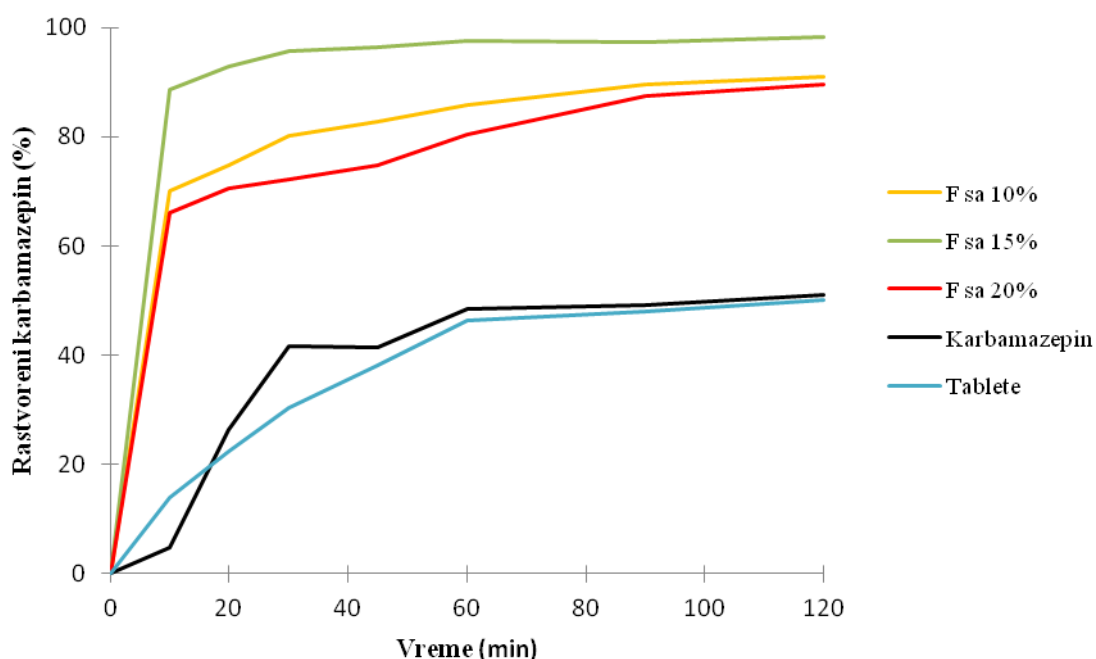
Postoji značajna interakcija između udela karbamazepina i udela Brij[®] 35 (Slika 11.5.). Kada je udeo karbamazepina na višem nivou, što i jeste cilj kod formulacija sa visokodoziranim supstancama, veći procenat oslobođene supstance se dobija sa udelom Brij[®] 35 na nižem nivou.



Slika 11.5. Značajna interakcija između udela Brij[®]-a 35 i: a) udela karbamazepina; b) udela adsorpcionog nosača.

Analiza je pokazala još jednu značajnu interakciju, i to između udela Brij[®]-a 35 i udela adsorpcionog nosača (Slika 11.5.). Kada je udeo nosača na nižem nivou, promena udela Brij[®]-a 35 sa 10% na 20% bi smanjila procenat oslobađanja supstance. Iz prethodne interakcije se zaključuje da se veća brzina oslobađanja postiže sa 10% Brij[®]-a 35 u formulaciji. U tom slučaju, veća brzina oslobađanja supstance dobija se kada je udeo nosača na nižem nivou, odnosno 33,33%.

Na osnovu analize dobijenih rezultata određen je sastav formulacije koja će se koristiti za nastavak istraživanja. U sastav ove formulacije ulaze: Poloksamer 338, 10% Brij[®] 35 i Neusilin[®] UFL2 kao nosač, sa udelom 33,33%. Nastavljeno je ispitivanje uticaja udela karbamazepina sa ključnim ciljem da se formuliše surfaktantni sistem sa što većim udelom karbamazepina, koja će dati optimalne rezultate brzine oslobađanja karbamazepina. U daljem istraživanju udeo karbamazepina je variran na tri nivoa: 10%, 15% i 20%. Najbrže oslobađanja karbamazepina je postignuto iz surfaktantnog sistema sa 15% ove lekovite supstance (Slika 11.6.). Ova formulacija je odabrana kao optimalna. Profil brzine rastvaranja karbamazepina iz optimalne formulacije je upoređen sa profilom brzine rastvaranja karbamazepina iz komercijalnih tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem i čistog karbamazepina (Slika 11.6.). Dobijene vrednosti faktora razlike i sličnosti ($f_1=67,85$, $f_2=6,16$, $f_1=65,43$, $f_2=6,94$) pokazuju da je formulacijom surfaktantnog sistema sa 15% karbamazepina postignuto značajno povećanje brzine rastvaranja lekovite supstance u odnosu na prašak karbamazepin i komercijalne tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.



Slika 11.6. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz formulacija surfaktantnih sistema sa 10%, 15% i 20% karbamazepina, praška karbamazepina i tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

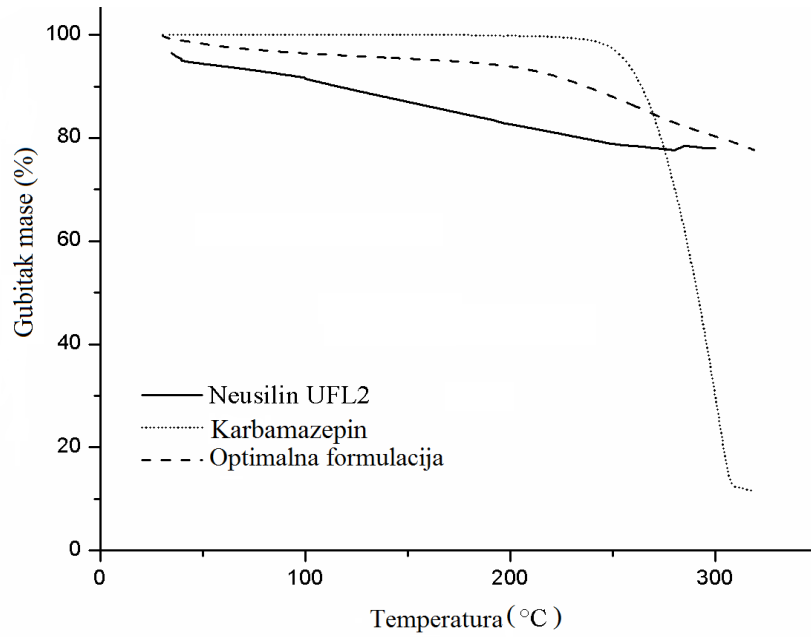
11.1.2.2. Karakterizacija optimalne formulacije čvrstog surfaktantnog sistema sa karbamazepinom

Termogravimetrijska analiza (TGA)

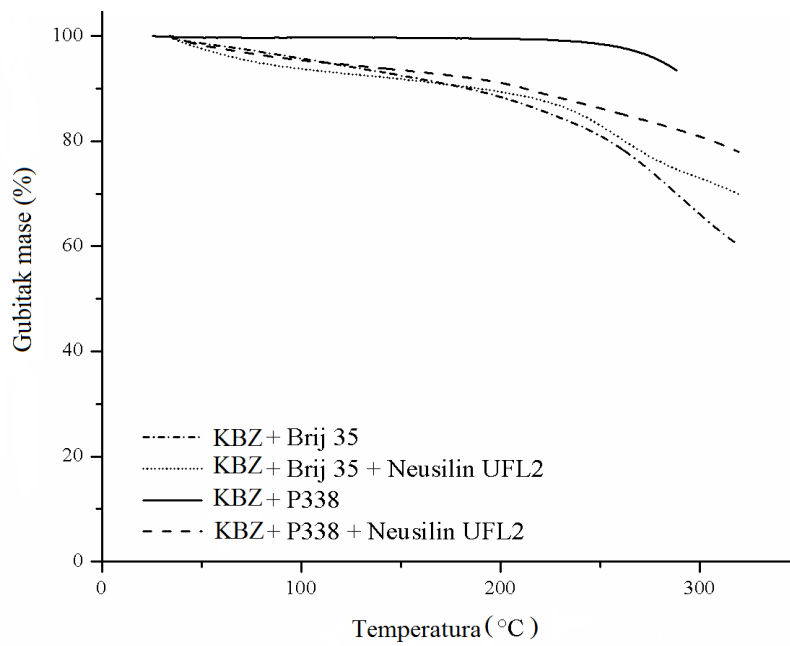
Rezultati TGA analize prikazani su na slikama 11.7. i 11.8. Gubitak mase za dvokomponentne i trokomponentne smeše, pripremljene u prvom delu eksperimenata, u temperaturnom opsegu od 100 °C do 200 °C, prikazan je u tabeli 11.7. Nešto veći gubitak mase zabeležen je kod uzoraka u kojima je korišćen Brij[®] 35. Međutim, značajan gubitak mase u svim uzorcima je registrovan u temperaturnom opsegu od 200 °C do 250 °C, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim za čist karbamazepin (Slika 11.7.). Rezultati TGA analize ukazuju da su ispitivane smeše relativno stabilne tokom zagrevanja i da kombinacijom ekscipijenasa nije došlo do interakcije koja bi ugrozila stabilnost formulacije.

Tabela 11.7. Gubitak mase pri TGA analizi dvokomponentnih i trokomponentnih smeša, u opsegu temperatura od 100 °C do 200 °C

Ispitivana smeša	Gubitak mase (%) 100 °C < T < 200 °C
Karbamazepin +Brij [®] 35	7,31
Karbamazepin +Brij [®] 35+ Neusilin [®] UFL2	4,34
Karbamazepin +P338	0,19
Karbamazepin +P338+ Neusilin [®] UFL2	4,31
Optimalna formulacija	4,32



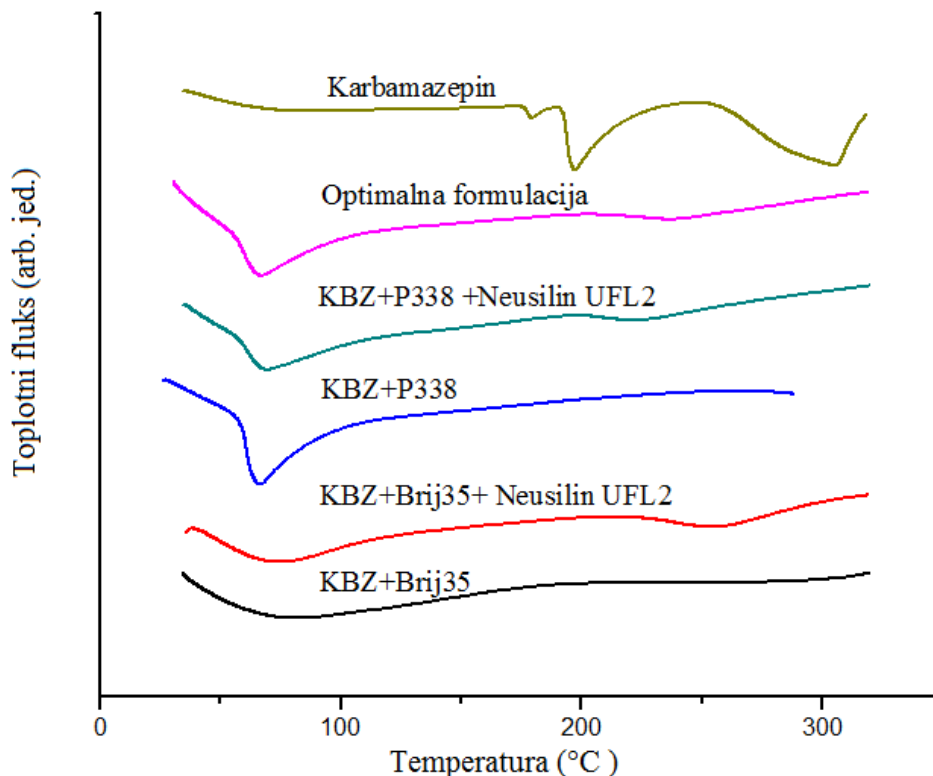
Slika 11.7. TGA krive gubitka mase karbamazepina, Neusilin[®]-a UFL2 i optimalne formulacije, u temperaturnom opsegu od 30 do 320 °C.



Slika 11.8. TGA krive gubitka mase dvokomponentnih i trokomponentnih smeša u temperaturnom opsegu od 30 do 320 °C.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

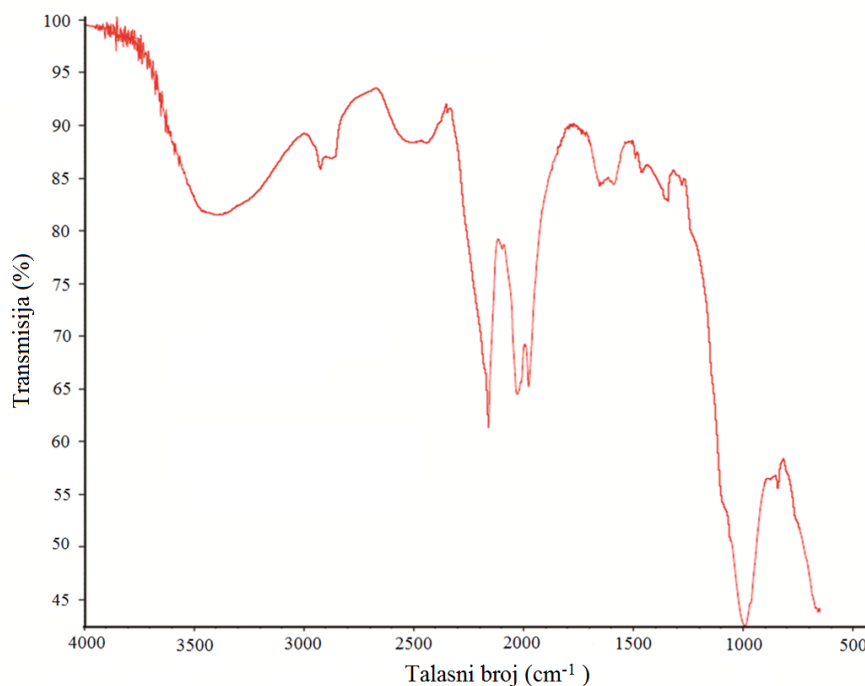
Na DSC krivama ispitivanih uzoraka i čistog karbamazepina uočava se endotermni pik na oko 60 °C (Slika 11.9.). Imajući u vidu veoma širok spektar temperature u kojem je uređaj kalibrisan (60 - 800 °C), ovaj pik bi mogao poticati od merne nesigurnosti, odnosno nepreciznosti instrumenta. U uzorcima koji sadrže Poloksamer, ovaj pik je bio nešto širi jer predstavlja preklopljena 2 pika: pik koji potiče od otapanja Poloksamera i pik koji potiče od merne nesigurnosti samog instrumenta (Marsac i sar., 2009). Na DSC krivama ispitivanih smeša nema karakterističnih pikova topljenja polimorfnog oblika III karbamazepina u temperaturnom opsegu od 150 do 175,8 °C (Grzesiak i sar., 2003; Yu i sar., 2000). Pored toga, nisu registrovani ni drugi pikovi karakteristični za topljenje neke druge kristalne polimorfne forme karbamazepina. Na osnovu toga može se pretpostaviti da je došlo prelaska karbamazepina iz kristalnog polimorfnog oblik III u amorfni oblik. Razlog ove promene može biti primena pojedinih surfaktanata (Poloksamer 338 i Brij[®] 35, sa ili bez dodatka Neusilin[®] UFL2), ili sam postupak izrade. Iako je DSC uobičajeno korišćena tehnika za određivanje polimorfnog oblika kristalne lekovite supstance i odsustvo endotermnih pikova topljenja može da nagovesti formiranje amorfne faze (Leuner i Dressman, 2000), treba voditi računa u tumačenju rezultata DSC analize, naročito kada formulacije sadrže Poloksamer. Budući da se Poloksameri tope na znatno nižim temperaturama od samog karbamazepina, postoji mogućnost da se kristalni karbamazepin postepeno rastvara u istopljenom polimernom surfaktantu tokom samog izvođenja DSC analize. Kad se dostigne temperatura koja odgovara tački topljenja karbamazepina, može se desiti da karakteristični endotermni pikovi topljenja izostanu zbog nedovoljne količine nerastvorenog karbamazepina (Yang i sar., 2010). Iz tog razloga je dalja karakterizacija optimalne formulacije izvršena PXR i FT-IR analizom, da bi se potvrdila ili opovrgla pretpostavka dobijena DSC analizom da je karbamazepin u optimalnoj formulaciji prešao iz polimorfnog oblika III u amorfni oblik.



Slika 11.9. DSC krive dvokomponentnih i trokomponentnih smeša, čistog karbamazepina i optimalne formulacije čvrstog surfaktantnog sistema.

Infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

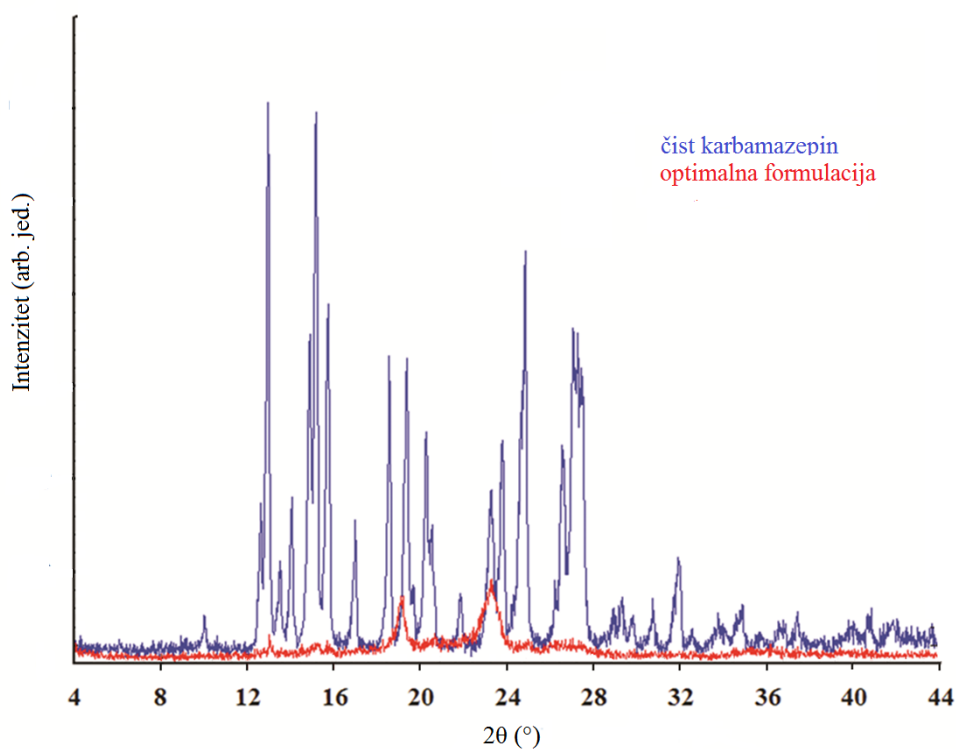
FT-IR spektar optimalne formulacije dat je na slici 11.10. Na FT-IR spektru optimalne formulacije uočavaju se deformacije karakterističnih traka za polimorfni oblik III karbamazepina na 1605 cm^{-1} i 1593 cm^{-1} ($\text{-C}=\text{O}$ vibracija i -NH deformacija) (Slika 11.10.). Ove deformacije na FT-IR spektru optimalne formulacije mogu sugerisati da dolazi do stvaranja vodoničnih veza između karbonilne grupe karbamazepina i silanolne grupe adsorbensa, koje učestvuju u prevođenju karbamazepina u amorfno stanje. Do sada su u literaturi opisani slični fenomeni prelaska lekovite supstance iz kristalnog u amorfni oblik, usled stvaranja vodoničnih veza između lekovite supstance i poroznog magnezijum-aluminometasilikata (Planinšek i sar., 2011; Bahl i Bogner, 2008; Gupta i sar., 2003). Iz rezultata FT-IR analize se može potvrditi pretpostavka dobijena DSC analizom da je karbamazepin u optimalnoj formulaciji prisutan u amorfnom stanju, verovatno kao posledica stvaranja vodoničnih veza između karbamazepina i adsorbensa.



Slika 11.10. FT-IR spektar optimalne formulacije čvrstog surfaktantnog sistema.

Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD)

Na slici 11.11. prikazani su difraktogrami čistog karbamazepina i optimalne formulacije. Karakteristični difrakcioni pikovi za polimorfni oblik III karbamazepina se ne mogu uočiti na difraktogramu optimalne formulacije (Grzesiak i sar., 2003; Rustichelli i sar., 2000), što potvrđuje rezultate dobijene DSC i FT-IR analizom da je karbamazepin prešao iz polimorfnog oblika III u amorfni oblik. Dva široka pika (za uglove 2θ 19 i 23 °) koja se pojavljuju na difraktogramu optimalne formulacije, potiču od Poloksamer-a 338 (Ali i sar., 2010) .



Slika 11.11. PXRD difraktogram čistog karbamazepina i optimalne formulacije čvrstog surfaktantnog sistema.

DSC, TGA, FT-IR i PXRD analizom optimalne formulacije, koja je čuvana pod ambijentalnim uslovima tri meseca, nisu uočene značajne promene u formulaciji. Karbamazepin je ostao u amorfnom stanju te je stabilnost formulacije je potvrđena.

11.2. Formulacija i karakterizacija tableta karbamazepina dobijenih komprimovanjem čvrstog samo-dispergujućeg sistema izrađenog postupkom granulacije topljenjem (Faza 4.2.)

U poslednjem delu istraživanja izvršena je formulacija i karakterizacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Tablete su dobijene komprimovanjem granulata izrađenog metodom topljenja. Cilj ove faze je bio da se ispita mogućnost primene metode granulacije topljenjem u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema, korišćenjem pogodnih lipidnih ekscipijenasa, a sve sa ciljem da se formulišu tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Cilj ove faze je bio i da se ispita mogućnost primene tehnika eksperimentalnog dizajna (frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna i centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna) u formulaciji čvrstih samo-dispergujućih sistema.

11.2.1. Materijal i metode

Kao sredstva za dopunjavanje u tabletama korišćeni su Neusilin[®] UFL2 (Fuji Chemical Industry Co., Japan) i mikrokristalna celuloza (Vivapur[®] Type 101, Ph. Eur. 8.0). Lauroil makrogol-32 glicerid (Gelucire[®] 44/14, Gattefose, Francuska) i lauroil makrogol-6 glicerid (Labrafil[®] 2130CS, Gattefose, Francuska) korišćeni su kao vezivna sredstva i komponente samo-emulgujućeg sistema, makrogol-glicerolhidroksistearat (Cremophor[®] RH 40, BASF, Nemačka) kao nejonski surfaktant. Umreženi povidon (krospovidon NP) (Ph. Eur. 8.0) je korišćen kao superdezintegrator u tabletama, a magnezijum-stearat (Ph. Eur. 8.0) je korišćen kao lubrikans.

11.2.1.1. Formulacija tableta karbamazepina primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna

U prvoj fazi eksperimenta sve formulacije su izrađene mešanjem karbamazepina, krospovidona NP i sredstva za dopunjavanje (Neusilin[®] UFL2 ili mikrokristalna celuloza), a zatim je dodavano vezivno sredstvo, prethodno otopljeno na 50 °C (Gelucire[®] 44/14 ili Labrafil[®] 2130CS). Pre tabletiranja, svakom granulatu je ispitana protočnost određivanjem Hausnerovog odnosa i Carrovog indeksa. Nakon toga je u granulatu dodato 0,5% magnezijum-stearata koji ima ulogu lubrikansa. Tablete su

izrađivane na ekscenter tablet mašini (*Eko Korsch, Nemačka*), pri čemu je masa tableta bila stalna i iznosila 500 mg, a količina karbamazepina bila je 100 ili 150 mg, u zavisnosti od formulacije.

Primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna (2^{6-2}), korišćenjem softvera *Design Expert*, ispitivan je uticaj faktora formulacije, kao i procesnih parametara na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta. Ulazni parametri su varirani na dva nivoa, što je prikazano u tabeli 11.8.

Eksperimentalni plan (2^{6-2} faktorski dizajn) je prikazan u tabeli 11.9.

Kao izlazni parametar praćen je procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta (Y_1 - Y_6). Uticaj ulaznih na izlazne parametre, pomoću 2^{6-2} faktorskog dizajna je izračunat na osnovu dobijenih rezultata i linearnog modela prikazanog u jednačini:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \varepsilon \quad (11.2.)$$

gde je : y - izlazni parametar, X_1 - X_6 – ulazni parametri, β_1 – β_6 – efekti pojedinačnih ulaznih parametara na izlazne parametre, ε – eksperimentalna greška.

Tabela 11.8. Varirani parametri u prvoj fazi eksperimenta

Parametar	Oznaka parametra	Donji nivo (-1)	Gornji nivo (+1)
Vrsta vezivnog sredstva	X_1	Labrafil® 2130CS	Gelucire® 44/14
Udeo vezivnog sredstva (%)	X_2	20	30
Udeo karbamazepina (%)	X_3	20	30
Udeo krosprovidona NP (%)	X_4	2	5
Vrsta sredstva za dopunjavanje	X_5	Neusilin® UFL2	Mikrokristalna celuloza (MCC)
Sila kompresije (kN)	X_6	7	8

Tabela 11.9. Eksperimentalni plan prema frakcionom faktorskom eksperimentalnom dizajnu

Formulacija	Ulazni parametri					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
F-I-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
F-I-2	+1	-1	-1	-1	-1	+1
F-I-3	-1	-1	+1	+1	-1	-1
F-I-4	+1	+1	-1	+1	-1	-1
F-I-5	+1	+1	+1	+1	+1	+1
F-I-6	-1	-1	-1	+1	+1	+1
F-I-7	-1	+1	-1	-1	+1	-1
F-I-8	-1	+1	+1	-1	-1	+1

Ispitivanje protočnosti granulata

Pre tabletiranja određivana je protočnost, nasipna i tapkana gustina i izračunat Hausnerov odnos i Carr-ov indeks izrađenih granulata.

Ispitivanje protočnosti granula vršeno je metodom propisanom u USP 38 - NF 33. Izvodi se tako što se prenosi 50 g uzorka granula u levak aparata za ispitivanje protočnosti (Flowmeter GDT, Erweka, Nemačka), a zatim se meri vreme, potrebno da ova količina uzorka prođe kroz otvor dijametra 12 mm. Protočnost je iskazana kao vrednost izračunata iz odnosa mase i izmerenog vremena. Rezultati su srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena merenja.

Nasipna gustina je određivana pomoću menzure zapremine 50 ml. Uzorak u količini od 15 g je sipan u menzuru, a nasipna gustina je izračunata na osnovu odnosa mase i očitane zapremine. Nakon toga, određivana je tapkana gustina blagim udaranjem i tapkanjem menzure o čvrstu površinu do 100 puta. Tapkana gustina je izračunata na osnovu odnosa mase i očitane zapremine nakon udaranja. Zatim su, pomoću odgovarajućih formula (USP 38 - NF 33), izračunati:

Hausnerov odnos = tapkana gustina/nasipna gustina (11.3.)

Carr-ov indeks = (tapkana gustina-nasipna gustina)/tapkana gustina (11.4.)

Ispitivanje čvrstine izrađenih tableta

Nakon tabletiranja određivana je čvrstina tableta. Ispitivanje je izvedeno na aparatu Erweka TB24 (Erweka, Nemačka), koji meri silu (N) koja je potrebna da se tableta polomi. Rezultati su iskazani kao srednje vrednosti 10 ponovljenih merenja.

Ispitivanje brzine rastvaranja

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih tableta izvršeno je na način opisan u poglavlju 9.1.1.2. Na osnovu rezultata dobijenih u prvom setu eksperimenata, u drugoj fazi su korišćeni oni nivoi ulaznih parametara, koji su pokazali da dovode do povećanja brzine oslobađanja karbamazepina.

11.2.1.2. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna

U drugom delu ove faze eksperimentalnog rada, sve tablete su izrađene mešanjem karbamazepina, kros повідona NP i sredstva za dopunjavanje, nakon čega je dodavan prvo Cremophor® RH 40, prethodno otopljen na temperaturi od 30 °C, a zatim odabrano vezivno sredstvo na temperaturi od 50 °C. Pre tabletiranja svakoj smeši je dodato 0,5% magnezijum-stearata, kao lubrikansa. Tablete su izrađivane na ekscenter tablet mašini (Eko Korsch, Nemačka), pri čemu je masa svih tableta bila stalna i iznosila 500 mg, a sadržaj karbamazepina 100 mg.

Za formulaciju tableta, eksperimentalni plan je dobijen korišćenjem centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna, uz primenu softvera *Design Expert*. Varirani su udeo vezivnog sredstva (X_1) i udeo Cremophor®-a RH 40 (X_2). Eksperimentalni plan druge faze eksperimenata prikazan je u Tabela 11.10., a sastojao se iz 13 formulacija tableta, od kojih su devet različitih formulacija, a četiri ponovljene u centralnoj tački radi izračunavanja i smanjenja greške u predviđanju. Kao izlazni parametri praćeni su procenti oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta (Y_1 - Y_6).

Brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta je ispitana na isti način kao u prethodnim fazama.

Tabela 11.10. Plan drugog seta eksperimenata prema centralnom kompozitnom eksperimentalnom dizajnu

Broj eksperimenta	Varirani parametar	
	X ₁	X ₂
	Vezivno sredstvo (%)	Cremophor [®] RH40 (%)
F-II-1	15,00	7,93
F-II-2	15,00	15,00
F-II-3	10,00	10,00
F-II-4	20,00	10,00
F-II-5	10,00	20,00
F-II-6	20,00	20,00
F-II-7	15,00	22,07
F-II-8	22,07	15,00
F-II-9	7,93	15,00
F-II-10	15,00	15,00
F-II-11	15,00	15,00
F-II-12	15,00	15,00
F-II-13	15,00	15,00

Nakon dobijanja vrednosti izlaznih parametara izvršeno je modelovanje uticaja ulaznih na izlazne parametre primenom softvera *Design Expert*[®] pomoću centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna. Predviđanje odgovora za bilo koju vrednost faktora tj. nezavisnih promenljivih se odvija definisanjem matematičkog modela koji uzima u obzir i potencijalne interakcije između ispitivanih faktora, zasnovan na primeni metodologije površine odgovora. Pri odabiru pogodnog matematičkog modela za ispitivane vremenske intervale, razmatrani su sledeći parametri: koeficijent determinacije R^2 , interval pouzdanosti (p) i *lack of fit* (eksperimentalna greška). Vrednosti R^2 treba da budu pozitivne i što bliže jedinici (0,9-1), p vrednost treba da bude manja od 0,05 kako bi parametar imao statističku značajnost, a eksperimentalna greška treba da bude što manja. Prilikom analize faktorskih efekata uzimaju se u obzir

interakcije ispitivanih faktora, kao i kvadratni efekti ispitivanih parametara. Značajnost uticaja ispitivanih faktora procenjena je ANOVA testom. Parametri koji nisu pokazivali statističku značajnost primenom ANOVA testa ($p > 0,05$) isključivani su, nakon čega je dobijen finalni matematički model koji opisuje zavisnost izlaznih od ulaznih parametara.

Nakon analize podataka odabrana je optimalna formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem iz koje je postignuta najveća brzina rastvaranja karbamazepina.

Karakterizacija optimalne formulacije tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

Optimalna formulacija tableta karbamazepina je okarakterisana primenom DSC, FT-IR, PXRD analize (na način opisan u poglavlju 9.2.1.2.) i Ramanske spektroskopije.

Ramanska spektroskopija

Optimalna formulacija tableta karbamazepina je čuvana pod kontrolisanim uslovima (25 °C, 40% RH) 2 meseca. Ramanski spektri optimalne formulacije su snimljeni u trenutku izrade, nakon 1 i 2 meseca čuvanja pod kontrolisanim uslovima.

Merenje Ramanskog spektra je izvedeno korišćenjem JY T64000 Raman sistema sa rešetkom 1800/1800/1800 žljebova/mm u pozadinskom sketeru mikro-Raman konfiguracije. Kao izvor zračenja korišćen je laser gasne mešavine Ar⁺/Kr⁺ na 514,5 nm. U cilju smanjenja lokalnog zagrevanja, gustina snage lasera je održavana na niskom nivou.

11.2.2. Rezultati i diskusija

11.2.2.1. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom frakcionog faktorskog eksperimentalnog dizajna

Ispitivanje protočnosti granulata

Na osnovu vrednosti dobijenih za protočnost granulata (Hausnerov odnos i Carr-ov indeks), a prema USP klasifikacijskom sistemu (USP 38 - NF 33) može se zaključiti da su granulati F-I-2 i F-I-8 veoma loše protočnosti, F-I-3 i F-I-4 loše protočnosti, F-I-1, F-I-6 i F-I-7 prihvatljive protočnosti, a F-I-5 je granulat prosečne protočnosti (Tabela 11.11.).

Tabela 11.11. Protočnost, Hausnerov odnos i Carr-ov indeks granulata; čvrstina tableta

	<i>Protočnost (g/s)</i>	<i>Hausnerov odnos</i>	<i>Carr-ov indeks (%)</i>	<i>Sila (N)</i>
F-I-1	2,5	1,33	25	42,1
F-I-2	0,42	1,47	32	108,3
F-I-3	0,43	1,37	27	117
F-I-4	0,46	1,35	26	104,4
F-I-5	3,96	1,21	17	52,7
F-I-6	2,29	1,33	25	17,5
F-I-7	2,77	1,33	25	13,7
F-I-8	0,57	1,5	33	83,4

Formulacije koje pokazuju veoma lošu i lošu protočnost (F-I-2, F-I-3, F-I-4 i F-I-8), sadrže kao sredstvo za dopunjavanje Neusilin[®] UFL2. Moguće objašnjenje ovih rezultata leži u činjenici da je dijametar čestica Neusilin[®] UFL2 5 μm , njegova specifična površina je 300-310 m^2/g , kao i da je to jako voluminozan prašak (Agarwal i sar., 2009). Kako protočnost granulata zavisi od veličine čestica i njihovog „pakovanja“ u prostoru (konsolidovani granulat pokazuje veći otpor proticanju), jasno je da male čestice Neusilin[®]-a UFL2, bolje „pakovanje“ tih čestica, izraženih kohezionih i

adhezionih sila tokom proticanja, dovodi do lošije protočnosti. Sa druge strane, prihvatljivu i prosečnu protočnost pokazuju formulacije koje kao sredstvo za dopunjavanje sadrže mikrokristalnu celulozu. Takođe, zbog većeg udela Gelucire[®]-a 44/14 u granulatu nastaju krupnije granule što doprinosi boljoj protočnosti. Formulacija koja ima najbolju protočnost je F-I-5, koja je opisana kao prosečna.

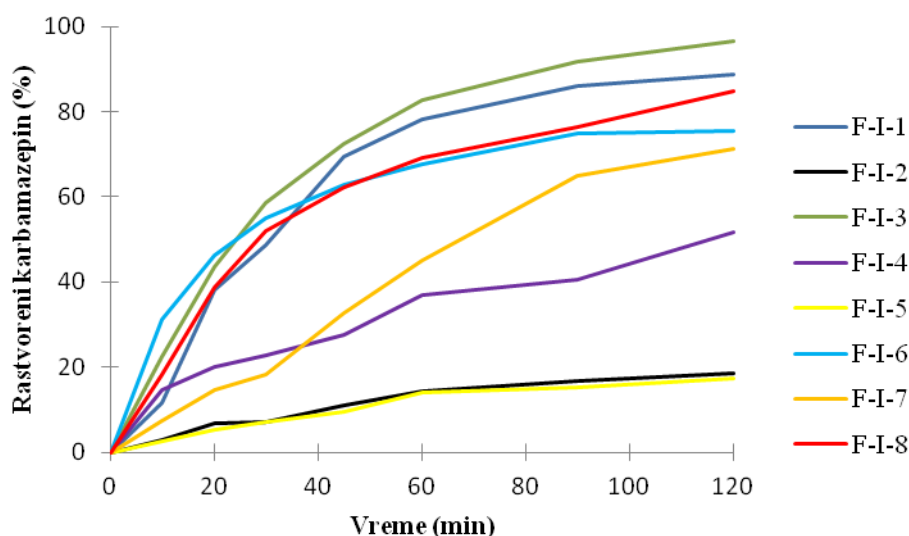
Ispitivanje čvrstine izrađenih tableta

Tablete, koje kao sredstvo za dopunjavanje sadrže Neusilin[®] UFL2, pokazuju znatno veću čvrstinu od tableta sa mikrokristalnom celulozom kao sredstvom za dopunjavanje. Ovo je očekivano, s obzirom da čestice Neusilin[®]-a UFL2 kao su značajno manjih dimenzija, sferične, porozne i bez oštrih ivica usled čega dolazi do boljeg „pakovanja“ granula (Agarwal i sar., 2009). Takođe, čvršće su tablete koje su izrađene primenom veće sile kompresije, što je i očekivano. Čvrstina tableta prikazana je u tabeli 11.11.

Najveću čvrstinu ima F-I-3, a najmanju čvrstinu ima F-I-7. Rezultati dobijeni za čvrstinu tableta su ohrabrujući, jer ukazuju da se Neusilin[®] UFL2, kao još nedovoljno ispitan ekscipijens, što se tiče njegovih kompresibilnih i kompaktilnih karakteristika, može koristiti i u izradi tableta. Njegovom upotrebom se dobijaju tablete zadovoljavajuće čvrstine, koje se mogu porediti sa tabletama izrađenim sa mikrokristalnom celulozom, koja je dugi niz godina upotrebljavana kao sredstvo za dopunjavanje. Takođe, zbog svoje velike specifične površine, Neusilin[®] UFL2 može adsorbovati značajnu količinu SEDDS, pri čemu nastaje suv prašak, što je veoma važno pri procesu tabletiranja (Agarwal i sar., 2009).

Rezultati brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

Na slici 11.12. prikazani su profili brzine oslobađanja karbamazepina iz tableta (F-I-1 do F-I-8). Nijedna formulacija nije pokazala oslobađanje karbamazepina koje je u skladu sa propisom USP za preparate sa trenutnim oslobađanjem (više od 80% nakon 30 minuta). Formulacija F-I-3 pokazala je najveću brzinu oslobađanja karbamazepina, a spadala je u grupu tableta visoke čvrstine (117 N), pri čemu je tabletna smeša loše proticala.



Slika 11.12. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta karbamazepina izrađenih u prvom setu eksperimenata.

Utjecaji variranih parametara na brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta u prvom setu eksperimenata prikazani su tabelarno (Tabela 11.12.). Za sve varirane parametre izračunate su vrednosti faktorskih efekata. Apsolutna vrednost upućuje na veličinu uticaja koju taj parametar ima na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta.

Tabela 11.12. Koeficijenti jednačine dobijene u prvom setu eksperimenata korišćenjem softvera Design Expert[®]

	X ₁ Tip vezivnog sredstva	X ₂ Udeo vezivnog sredstva	X ₃ Udeo KBZ	X ₄ Udeo krospovidona	X ₅ Vrsta sredstva za dopunjavanje	X ₆ Sila kompresije	X ₁ X ₆
Y ₁	-6,02	-3,25	-0,097	+3,80	-0,64	-0,098	-4,95
Y ₂	-9,25	-7,13	+4,88	+1,99	-0,54	-2,32	-9,04
Y ₃	-12,37	-8,81	+7,95	+2,09	-1,34	-3,29	-10,82
Y ₄	-14,26	-10,58	+10,05	-0,57	+0,25	-6,94	-11,89
Y ₅	-15,33	-9,87	+10,21	-0,84	+0,44	-9,49	-11,76
Y ₆	-19,20	-7,05	+9,10	-3,11	+0,39	-13,75	-11,88

Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅, Y₆ - procenat oslobođenog karbamazepina iz tableta nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta.

Prema vrednostima koeficijenata (Tabela 11.12.) u jednačini dobijenoj primenom Design Expert[®]-a može se zaključiti da najveći uticaj na brzinu rastvaranja

karbamazepina iz tableta ima vrsta vezivnog sredstva (X_1). Ovaj uticaj je negativan, što znači da se promenom ovog parametra sa nižeg na viši nivo (prelazak sa Labrafil[®]-a 2130CS na Gelucire[®] 44/14) smanjuje brzina oslobađanja karbamazepina. Uticaj raste vremenom.

Udeo vezivnog sredstva (X_2) ima negativan uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta. Dakle, veća brzina rastvaranja se postiže kada je udeo vezivnog sredstva na nižem nivou (20%). Povećanje udela vezivnog sredstva može dovesti do povećanja hidrofobnosti sistema i smanjene brzine oslobađanja supstance. Takođe, međučestične veze su jače, pa je samim tim oslobađanje karbamazepina sporije.

Uticaj udela karbamazepina (X_3) na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz tableta, je u početku negativan, što je i očekivano, s obzirom na to da je teško rastvorljiva supstanca. Međutim, već nakon 20 minuta povećanje udela karbamazepina na 30% pokazuje pozitivan uticaj na njegovo oslobađanje. Ovaj rezultat je značajan, jer je to značilo da u drugoj fazi mogu da se koriste formulacije sa većim udelom karbamazepina (30%). Sa većim udelom lekovite supstance u tabletama postiže se da se pri primeni leka uzima manji broj tableta, čime se svakako povećava komplijansa, ali i bezbednost pacijenta, usled smanjenja udela surfaktanata i ispoljavanja potencijalnih gastrointestinalnih i ostalih neželjenih dejstava.

Uticaj udela krosповidona (X_4) na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta je, očekivano, pozitivan jer on omogućava raspadanje tablete i dostupnost karbamazepina medijumu, dakle brže oslobađanje supstance. Ovaj uticaj opada sa vremenom, jer se tableta vremenom raspada.

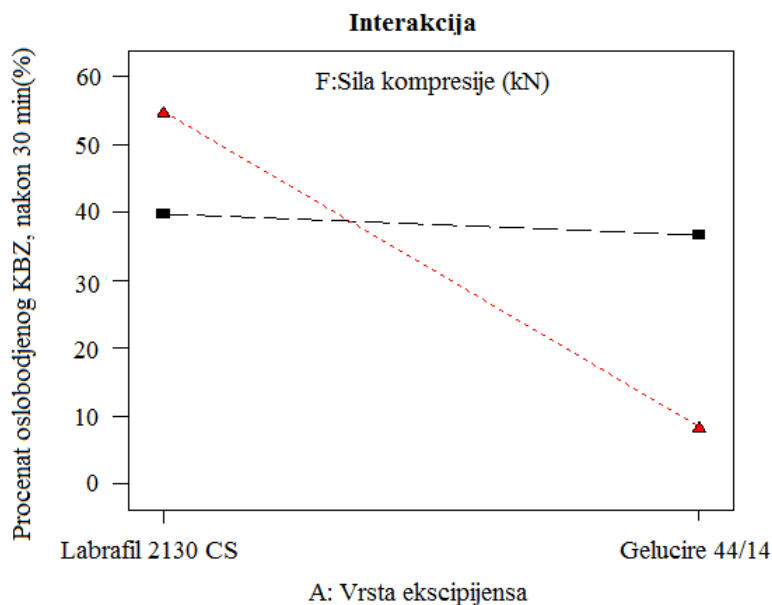
Kao sredstvo za dopunjavanje (X_5) Neusilin[®] UFL2 dovodi do bržeg oslobađanja karbamazepina iz tableta, posebno u prvih sat vremena oslobađanja. Ovaj efekat se može pripisati činjenici da usled velike specifične površine ($300 \text{ m}^2/\text{g}$) i relativno male veličine čestica ($5 \text{ }\mu\text{m}$) Neusilin[®]-a UFL2 olakšava kvašenje i ubrzava proces oslobađanja lekovite supstance (Agarwal i sar., 2009).

Uticaj sile kompresije (X_6) na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta je negativan. Veća brzina rastvaranja karbamazepina je dobijena kada je sila kompresije na nižem

nivou, što se može objasniti time da je tableta manje kompaktna i da se brže raspada ukoliko je izrađena manjom silom kompresije.

Postoji značajna interakcija između vrste vezivnog sredstva i sile kompresije. Analizom pojedinačnih faktorskih efekata je već pokazano da se bolji rezultati dobijaju sa Labrafil®-om 2130CS, u odnosu na Gelucire® 44/14. Ukoliko se kao vezivno sredstvo koristi Labrafil® 2130CS, veća brzina oslobađanja karbamazepina postiže se primenom sile kompresije od 8 kN. Ova interakcija je prikazana na slici 11.13. Uticaj interakcije je značajniji od pojedinačnog uticaja sile kompresije, što se može videti iz tabele 11.12. Za postizanje veće brzine oslobađanja karbamazepina bolje je koristiti silu kompresije od 8 kN, što je i učinjeno u daljim eksperimentima.

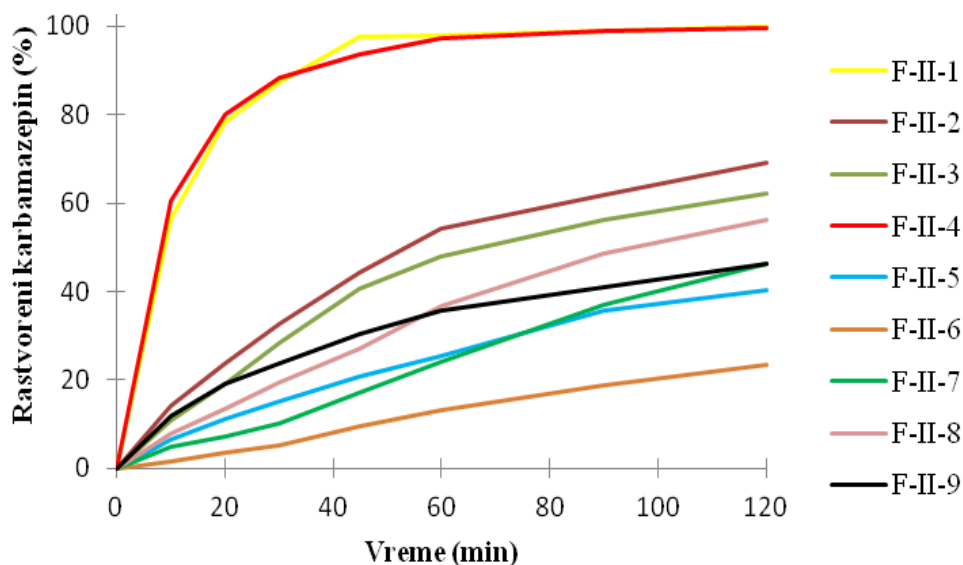
Nakon obrade rezultata u softveru *Design Expert*® zaključeno je na kom nivou treba da bude svaki od variranih parametara, da bi procenat oslobađanja karbamazepina bio što veći. Odabrani parametri za drugu fazu eksperimenta bili su: sila kompresije 8 kN, Labrafil® 2130CS (20%), karbamazepin (30%), krosповidon NP (5%) i Neusilin® UFL2.



Slika 11.13. Interakcija između vrste vezivnog sredstva i sile kompresije u prvom setu eksperimenta.

11.2.2.2. Formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna

U drugoj fazi eksperimenta ispitivana je brzina rastvaranja karbamazepina iz izrađenih tableta. Dve od devet izrađenih formulacija (F-II-1 i F-II-4 (Tabela 11.13.) su pokazale adekvatno oslobađanje lekovite supstance koje je u skladu sa propisom USP 38 - NF 33 (više od 80% nakon 30 minuta). Na slici 11.14. su prikazani profili oslobađanja karbamazepina iz tableta, izrađenih u drugoj fazi eksperimentalnog rada.



Slika 11.14. Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta izrađenih u drugoj fazi eksperimenata.

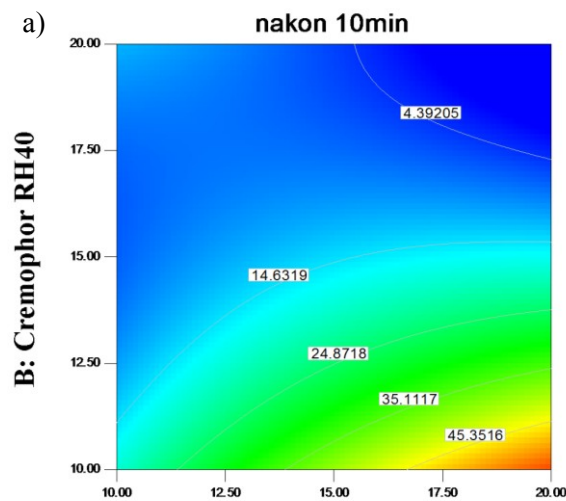
Tabela 11.13. Procenat oslobođenog karbamazepina iz tableta (izrađenih prema centralnom kompozitnom dizajnu)

	Procenat oslobođenog karbamazepina u različitim vremenskim intervalima (min)						
	10	20	30	45	60	90	120
F-II-1	56,55	78,38	87,33	97,64	98,65	99,76	99,86
F-II-2	14,18	23,69	32,53	44,37	54,33	61,88	69,15
F-II-3	10,90	19,04	28,24	40,53	47,95	56,30	62,31
F-II-4	60,38	80,17	88,49	93,65	97,15	99,00	99,77
F-II-5	6,47	10,98	15,08	20,89	25,44	35,54	40,18
F-II-6	1,37	3,46	5,30	9,32	13,22	18,68	23,38
F-II-7	4,82	7,12	10,23	17,07	23,98	36,86	46,18
F-II-8	7,86	13,46	19,54	27,08	36,65	48,54	56,23
F-II-9	11,76	19,02	23,85	30,31	35,60	40,99	46,24

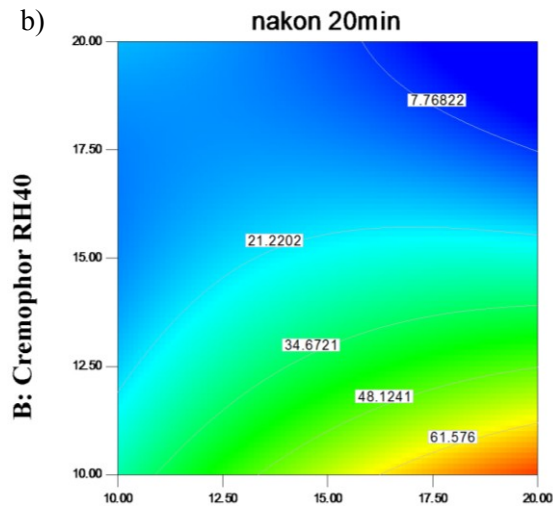
Nakon analize statističkih parametara za sve izlazne parametre (Y_1 - Y_6) odabran je kvadratni model. Na osnovu vrednosti p ($p < 0,05$) za sve dobijene modele koji opisuju zavisnost izlaznih od ulaznih parametara vidi se da su modeli statistički značajni, dok relativno visoka vrednost koeficijenta korelacije ($R^2 > 0,922$), ukazuje na dobru korelaciju između predviđenih i stvarnih vrednosti izlaznih parametara (Tabela 11.14). Na slici 11.15. prikazani su 2D konturni dijagrami, koji opisuju zavisnost izlaznih od ulaznih parametara. Efekti nezavisno promenljivih (ulaznih parametara), sa koeficijentima regresije, na zavisno promenljive (izlazne parametre - procenat oslobođenog karbamazepina iz tableta u različitim vremenskim intervalima) dati su u tabeli 11.14. Ako se kao odgovor posmatra procenat oslobođenog karbamazepina nakon 30 minuta (Y_3) može se videti da najveći uticaj na ovaj parametar ima udeo Cremophor[®]-a RH40. U ovom slučaju, vrednost koeficijenta regresije je -25,67, a $p < 0,0001$ (Tabela 11.14). Negativna vrednost koeficijenta regresije ukazuje da se sa povećanjem udela Cremophora[®] RH40, smanjuje brzina rastvaranja karbamazepina, što je donekle neočekivano. Iz tabele 11.14. se vidi da najmanji uticaj na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta ima udeo Labrafil[®]-a 2130CS. Sa povećanjem udela Labrafil[®]-a 2130CS, dolazi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina. Pojedinačan uticaj udela Cremophor[®]-a RH 40 na brzinu oslobađanja karbamazepina iz tableta raste sa

vremenom, dok uticaj Labrafil[®]-a 2130 CS postaje statistički značajan ($p < 0,05$), tek nakon 60 minuta. Iz svega navedenog za izlazni parametar Y_3 se vidi da je značajniji uticaj međusobne kombinacije Cremophor[®]-a RH40 i Labrafil[®]-a 2130CS, nego samog Labrafil[®]-a 2130CS na brzinu oslobađanja karbamazepina, što je verovatno posledica složenosti same formulacije, a ovaj trend se nastavlja vremenom. Analizom faktorskih efekata se može pojasniti uticaj ove interakcije na brzinu oslobađanja karbamazepina. Ukoliko je udeo Labrafil[®]-a CS2130 na gornjem nivou, za postizanje veće brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta, potrebno je da udeo Cremophor[®]-a RH 40 bude na nižem nivou. Ovaj uticaj raste vremenom.

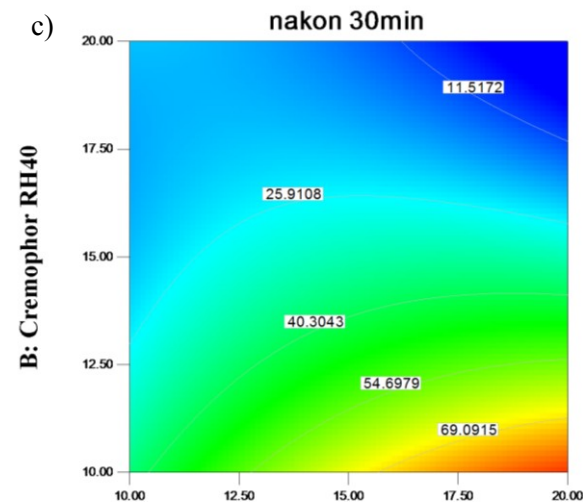
Formulacija sa najvećom brzinom oslobađanja karbamazepina, F-II-4 u kojoj je udeo Labrafil[®]-a CS2130 20% a udeo Cremophor[®]-a RH 40 10%, potvrđuje uočene uticaje, da se najveća brzina rastvaranja karbamazepina postiže kada je udeo Labrafil[®]-a CS2130 na višem i udeo Cremophor[®]-a RH 40 na nižem nivou. Dobijeni rezultati pokazuju da su tehnike eksperimentalnog dizajna pouzdane za procenu uticaja faktora formulacije, na karakteristike iste. Formulacija F-II-4 odabrana je kao optimalna za dalju karakterizaciju i praćenje stabilnosti, jer je uočeno da se iz ove formulacije za 30 minuta oslobađa oko 88% karbamazepina, čime je ispunjen zahtev USP 38 - NF 33 za preparate sa trenutnim oslobađanjem.



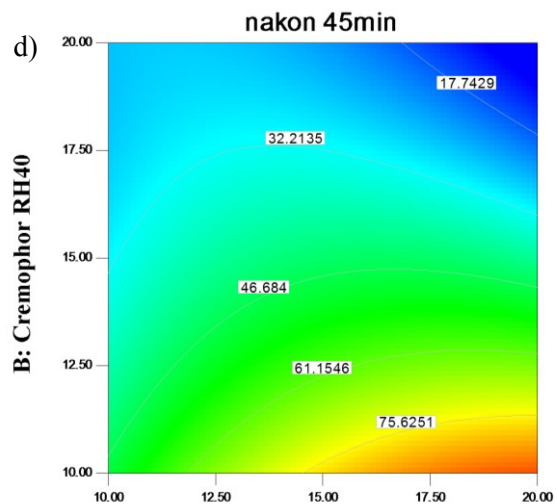
A: Labrafil 2130CS



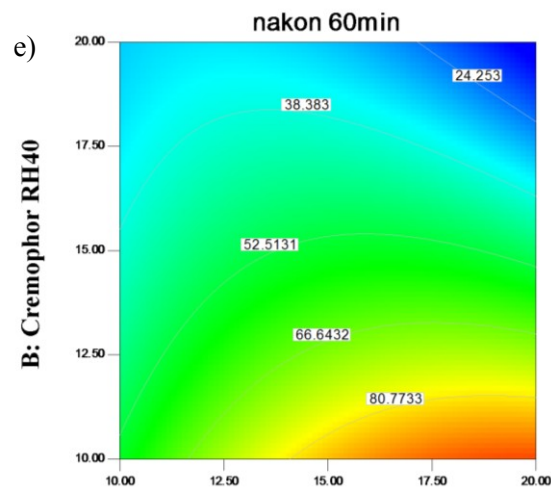
A: Labrafil 2130CS



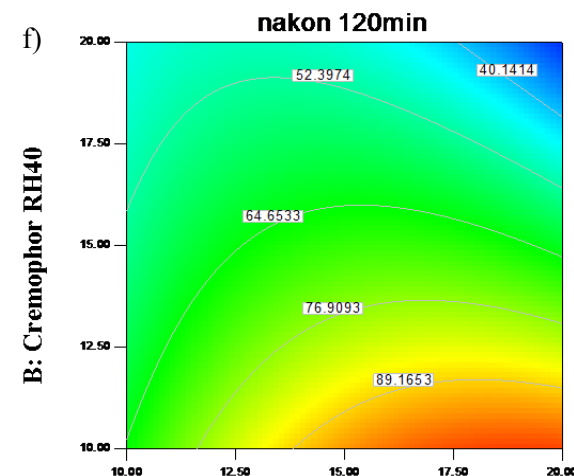
A: Labrafil 2130CS



A: Labrafil 2130CS



A: Labrafil 2130CS



A: Labrafil 2130CS

Slika 11.15. 2D konturni dijagrami koji opisuju uticaj ulaznih parametara na procenat oslobođenog karbamazepina nakon: a) 10 min; b) 20 min; c) 30 min; d) 45 min; e) 60 min; f) 120 min.

Tabela 11.14. Regresioni koeficijenti koji povezuju varirane ulazne parametre (A- Labrafil® 2130CS; B-Cremophor® RH 40) sa odgovorom (Y₁- Y₆- procenat oslobođenog karbamazepina nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta)

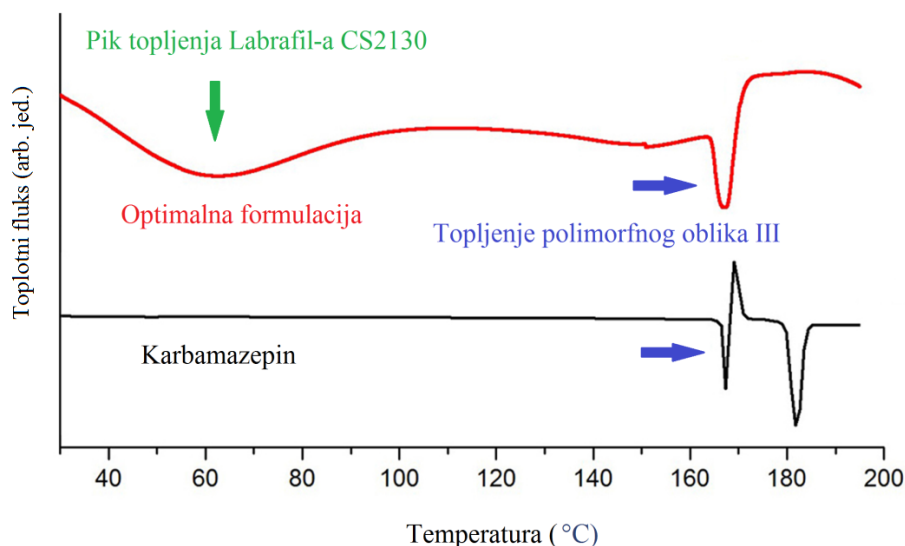
	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄		Y ₅		Y ₆	
	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost
Model	+14,18	16,48 0,0009	+23,69	18,04 0,0007	+32,53	24,87 0,0003	+44,37	39,15 <0,0001	+54,33	59,57 <0,0001	+69,15	101,15 <0,0001
A	+4,86	4,09 0,0830	+5,72	3,61 0,0991	+5,55	4,08 0,0830	+4,62	4,19 0,0799	+4,81	7,04 0,0328	+4,35	12,36 0,0098
B	-17,07	50,48 0,0002	-23,19	59,45 0,0001	-25,67	87,49 <0,0001	-27,24	145,42 <0,0001	-27,04	222,62 <0,0001	-23,04	365,26 <0,0001
AB	-13,65	16,12 0,0051	-17,16	16,28 0,0050	-17,51	20,34 0,0028	-16,17	25,63 0,0015	-15,36	35,91 0,0005	-13,56	65,76 <0,0001
A2	-2,30	0,80 0,4014	-4,00	1,53 0,2054	-5,66	3,69 0,0960	-8,32	11,80 0,0109	-9,98	26,41 0,0013	-10,82	51,29 0,0002
B2	+8,40	9,97 0,0160	+9,26	8,24 0,0240	+7,88	7,18 0,0316	+6,01	6,16 0,0421	+3,36	2,99 0,1274	+1,82	5,62 0,0496
R ²	0,922		0,928		0,9467		0,9655		0,9770		0,9863	

R²-koeficijent korelacije

Karakterizacija optimalne formulacije tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

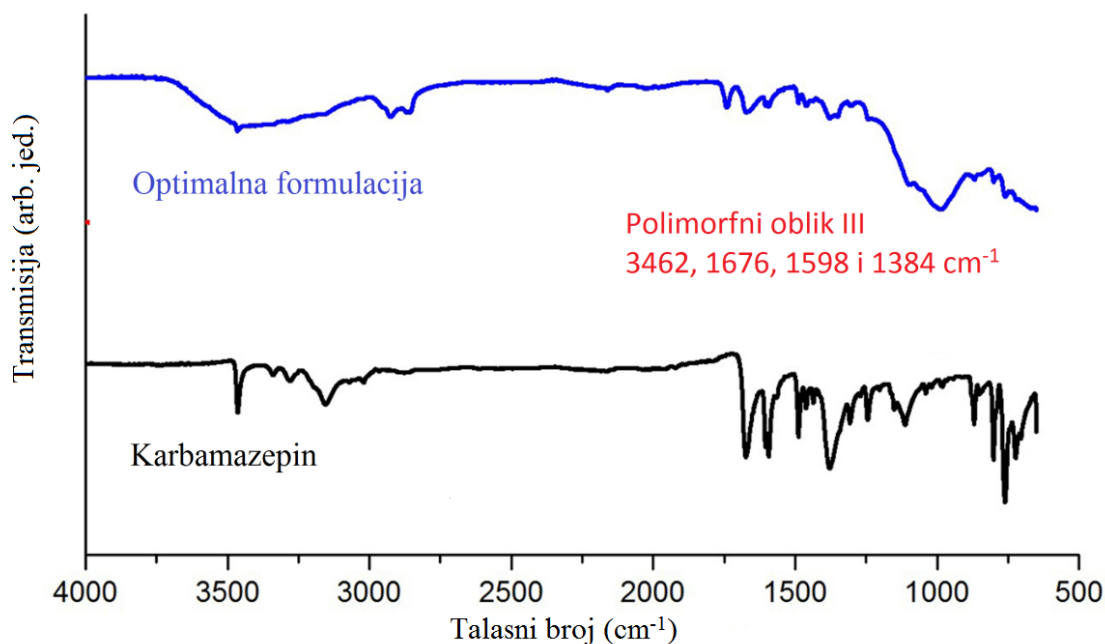
Na DSC krivoj čistog karbamazepina (Slika 11.16.), na osnovu karakterističnih pikova, može se zaključiti da je karbamazepin u polimorfnom obliku III (Grzesiak i sar., 2003; Yu i sar., 2000). Na DSC krivoj ispitivanog uzorka optimalne formulacije tableta uočava se endotermni pik na 52,36 °C, koji je verovatno posledica topljenja Labrafil[®]-a CS2130. Endotermni pik na 161,26 °C ukazuje na topljenje polimorfnog oblika III karbamazepina, a egzotermni pik na 187,3 °C predstavlja rekristalizaciju polimorfnog oblika III karbamazepina u polimorfni oblik I. Topljenje polimorfnog oblika I je verovatno uzrok pojave endotermnog pika na 187,91 °C. Karakteristični pikovi topljenja polimorfnog oblika III karbamazepina u temperaturnom opsegu od 150 do 175,8 °C (Grzesiak i sar., 2003; Yu i sar., 2000) su uočeni na DSC krivoj optimalne formulacije, što ukazuje da je karbamazepin u optimalnoj formulaciji najverovatnije ostao u polimorfnom obliku III, što treba analizirati i potvrditi drugim analitičkim tehnikama.



Slika 11.16. DSC kriva karbamazepina i optimalne formulacije tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

Infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektri karbamazepina i optimalne formulacije tableta dati su na slici 11.17. Karakteristične trake za polimorfni oblik III karbamazepina prisutne su i na spektru čistog karbamazepina kao i na FT-IR spektru optimalne formulacije tableta (Grzesiak i sar., 2003; Yu i sar., 2000). Intenzitet traka je manji u poređenju sa čistim karbamazepinom, što je posledica manjeg sadržaja karbamazepina u optimalnoj formulaciji u odnosu na čist karbamazepin. Postojanje karakterističnih pikova na spektru optimalne formulacije ukazuje da nije došlo do značajne interakcije između karbamazepina i ostalih pomoćnih supstanci u formulaciji, niti do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u neki drugi polimorfni oblik ili u amorfno stanje.

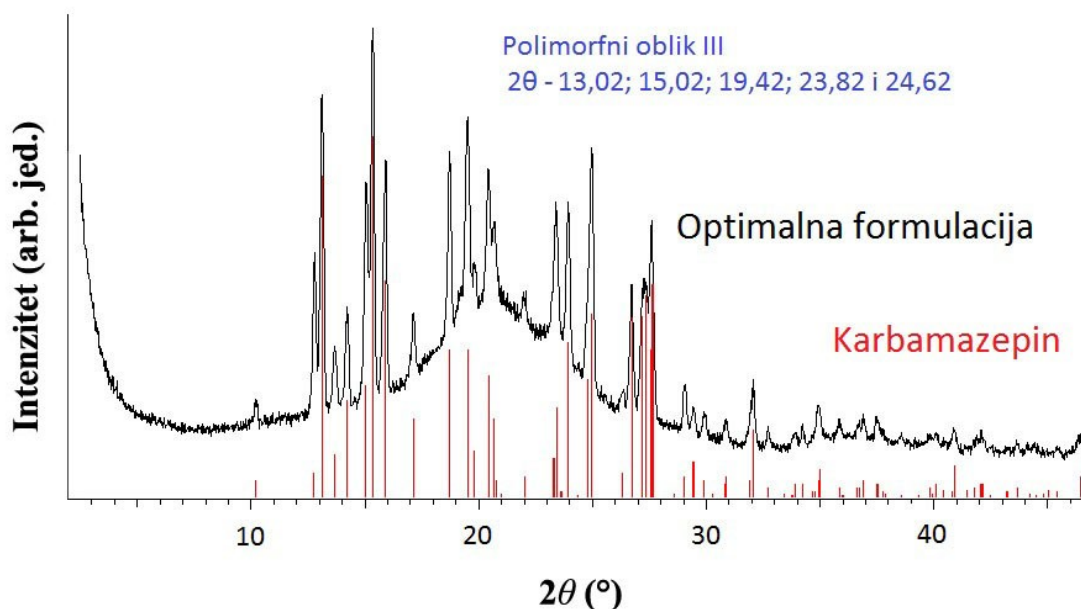


Slika 11.17. FT-IR spektar čistog karbamazepina i optimalne formulacije tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem.

Difrakcija X-zraka na uzorcima u prahu (PXRD)

PXRD difraktogrami čistog karbamazepina i optimalne formulacije tableta karbamazepina su prikazani na slici 11.18. Na PXRD difraktogramu čistog karbamazepina i optimalne formulacije uočavaju se karakteristični difrakcioni pikovi visokog intenziteta na 13,02 °, 15,22 °, 15,78 °, 19,40 °, 24,92 °, 27,50 ° i 31,86 ° 2θ,

čime se na osnovu literaturnih podataka potvrđuje da je karbamazepin u kristalnom polimorfnom obliku III (Grzesiak i sar., 2003; Yu i sar., 2000). Rezultati PXRD analize su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim drugim analitičkim tehnikama (DSC i FT-IR).

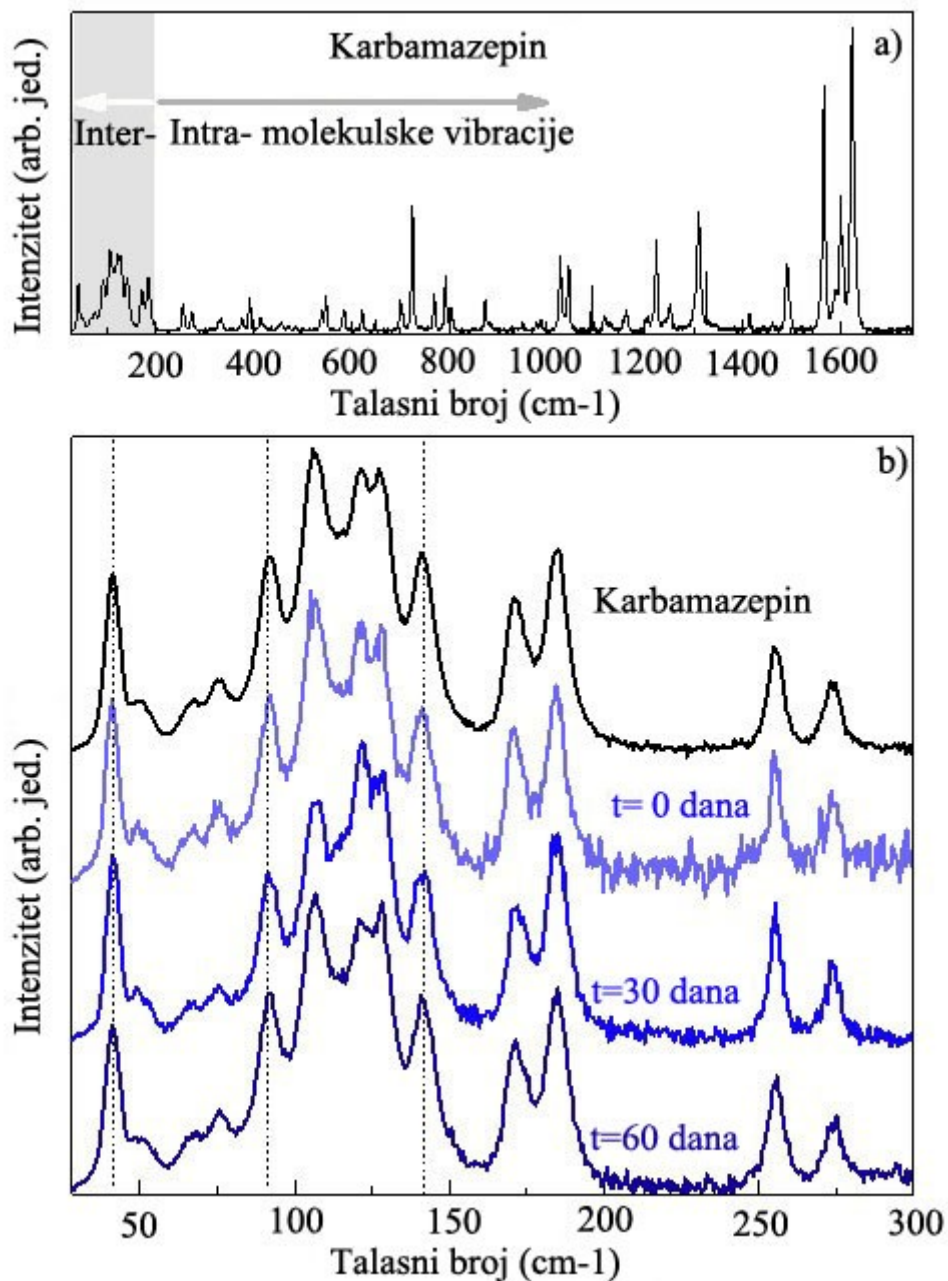


Slika 11.18. Difraktogram čistog karbamazepina i optimalne formulacije.

Ramanska spektroskopija

Na slici 11.19. a) je prikazan spektar Ramanovog rasejanja karbamazepina. U molekularnom kristalu, generalno, mogu se razlikovati dva odvojena regiona spektra Ramanovog rasejanja. Visoko energetska (konvencionalna) regija, koja se sastoji od intramolekulskih vibracija, i niska energetska oblast (u daljem tekstu 200 cm^{-1}) u kojoj dominiraju intermolekulskih vibracije (Slika 11.19. a)) (Lazarević i sar., 2014). Iako visoka energetska oblast takođe ima informacije u vezi kristalne strukture, uočljive promene između različitih polimorfni oblika su obično prilično male i ograničene na promene u delu Ramanskog spektra niskog intenziteta. Istraživanje nisko energetske regije nudi direktniji pristup zbog raspodele intermolekularnih vibracija koje direktno odgovaraju kristalnoj strukturi materijala. Ramanski spektri niske energije karbamazepina i optimalne formulacije u trenutku izrade i nakon 30 i 60 dana su prikazani na slici 11.19. b). Svi karakteristični pikovi Ramanskog spektra za polimorfni oblik III karbamazepina su prisutni sa naglaskom na pikove na oko 40 , 91 i 141 cm^{-1}

(Saikat i sar., 2013). Isti pikovi su prisutni i u uzorku optimalne formulacije nakon 30 i 60 dana, čime se potvrđuje očuvanje polimorfnog oblika III, nakon 30 i 60 dana.



Slika 11.19. a) Ramanski spektar karbamazepina; b) nisko energetske Ramanski spektar karbamazepina i optimalne formulacije nakon 0, 30 i 60 dana.

ZAKLJUČAK

12. Zaključak

- Studija faznog ponašanja pseudoternernih faznih sistema: trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda i trigliceridi srednje dužine lanaca/Cremophor[®] EL/Makrogol 400/voda, pokazala je da maseni udeli komponenti imaju značajnu ulogu u solubilizaciji vodene faze. Tokom titracije vodom, uočeno je da su sistemi u kojima je odnos surfaktant/korastvarač 3:1, bez obzira na tip upotrebljenog surfaktanta (Polisorbat 80 ili Cremophor[®]-a EL), pri odnosu uljana faza/surfaktantna faza 1:9, sve vreme bili transparentni. Sa povećanjem udela uljane faze, u toku titracije vodom, dolazilo je do pojave opalescencije, a nakon toga do potpunog замуćenja. Kod sistema sa odnosima surfaktant/korastvarač 2:1 i 1:1 formirana je značajno uža mikroemulziona oblast, u poređenju sa sistemom u kome je odnos surfaktant/korastvarač bio 3:1. Kod sistema sa odnosom surfaktant/korastvarač 2:1 i 1:1, bez obzira na odnos uljane i surfaktantne faze, tokom titracije dolazi do nastanka bistrih, transparentnih sistema (verovatno mikroemulzija), koji su daljim dodatkom vode prelazili u opalescentne ili mlečno bele sisteme (verovatno nanoemulzije ili (makro)emulzije). Detaljnom analizom pseudoternernih faznih dijagrama, zaključeno je da se odnosom surfaktant/korastvarač 3:1 može dobiti najšira mikroemulziona oblast i ovaj odnos je korišćen za formulaciju sistema za dalja istraživanja.
- Poređenjem širine mikroemulziona oblasti, koju daju sistemi izrađeni sa Polisorbat-om 80 ili Cremophor[®]-om EL, uočeno je da sistemi sa Cremophor[®]-om EL daju nešto širu mikroemulzionu oblast. Razblaživanjem samo-emulgujućih sistema vodom (u odnosu 10:90 (m/m)), jedino je sistem sa odnosom surfaktantna faza:uljana faza 9:1, uz korišćenje Cremophor[®]-a EL kao surfaktanta imao sitne kapi ($17,66 \pm 0,17$ nm) i nisku vrednost indeksa polidisperziteteta (PdI $0,104 \pm 0,005$), što ukazuje na potencijalno veću stabilnost ovog uzorka. Navedeni sistem je okarakterisan kao samo-mikroemulgujući nosač (SMEDDS) i korišćen je za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom. Samo-emulgujući nosači sa višim udelima uljane faze, uz korišćenje Cremophor[®]-a EL kao surfaktanta, kao i sistemi sa odnosima

surfaktantna faza:uljana faza 1:9, 2:8 i 3:7, uz korišćenje Polisorbat-a 80, nakon razblaživanja vodom, davali su emulzije sa vrednošću PDI u od 0,410 do 0,752, što može da ukazuje na nestabilnost ovih sistema, koji se nisu mogli okarakterisati kao samo-mikroemulgujući nosači.

- Studijama faznog ponašanja pseudo-ternernih sistema: trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP/voda, pri odnosu surfaktant/kosurfaktant 3:1 i 2:1 i pri odnosu uljana/surfaktantna faza 1:9, tokom titracije vodom, dobijali su se sistemi koji su sve vreme bili bistri i stabilni i mogli su se smatrati mikroemulzijama. Sistem sa odnosom surfaktant/kosurfaktant 1:1, ni pri jednom odnosu uljana/surfaktantna faza nije dao stabilan i transparentan sistem tokom titracije vodom. Takođe, pri ovom odnosu surfaktant/kosurfaktant se dobija značajno uža mikroemulziona oblast. Kako se povećanjem udela Transcutol[®]-a HP ne dobija šira mikroemulziona oblast, u daljim ispitivanjima korišćen je odnos Polisorbat 80/Transcutol[®] HP 3:1.
- Odabran sistem sa odnosom surfaktant/kosurfaktant (Polisorbat 80/Transcutol[®] HP) 3:1 i sa odnosom uljana/surfaktantna faza 1:9, nakon razblaživanja vodom, daje emulzije sa izrazito sitnim kapima (oko 9 nm), koje verovatno koalesciraju, pa se dobija nešto viša vrednost PDI (0,263). Odabrani sistem sa odnosom uljana/surfaktantna faza 2:8, nakon razblaživanja vodom, daje emulzije sa veličinom kapi unutrašnje faze od 332,7 nm, i relativno niskom vrednošću PDI od 0,210, pa je zbog svoje potencijalno veće stabilnosti, korišćen za formulaciju čvrstih samo-emulgujućih sistema (SEDDS).
- Poređenjem pseudo-ternernih sistema: trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Makrogol 400/voda i trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Transcutol[®] HP/voda utvrđeno je da se upotrebom Transcutol[®]-a HP dobija značajno šira mikroemulziona oblast, uniformnija raspodela veličine kapi i niža PDI vrednost.
- Primenom eksperimentalnog dizajna, dizajna smeše, sa mnogo manjim brojem eksperimenata utvrđeno je fazno ponašanje sistema trigliceridi srednje dužine lanaca/Polisorbat 80/Labrasol[®]/Transcutol[®] HP,. Pokazano je da se najmanje kapi unutrašnje faze emulzija dobijaju razblaživanjem samo-emulgujućeg

sistema vodom, kada sistem sadrži oko 15% uljane faze, oko 42,5% smeše surfaktanata i oko 42,5% kosurfaktanta.

- Takođe, utvrđeno je da se primenom dizajna smeše postiže visok stepen korelacije između predviđenih i stvarnih (eksperimentalno dobijenih) vrednosti za veličinu kapi i PdI. Razlike koje se javljaju kreću se u opsegu standardnih devijacija i za veličinu kapi iznose od 3-10 nm, a za PdI od 0,002-0,023. Na osnovu optimizacije odabran je sistem koji je sadržao 21,21% uljane faze, 42,24% surfaktantne smeše i 36,64% kosurfaktanta. Ovaj sistem je nakon razblaženja vodom, imao veličinu kapi unutrašnje faze od 157 nm i PdI 0,184, te je definisan je kao samo-nanoemulgujući nosač (SNEDDS), koji je u drugoj fazi korišćen za izradu čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom.
- Iz čvrstih disperzija izrađenih sa adsorbensima: Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2 i Sylsya[®] 320, pri odnosu nosač:karbamazepin 1:1, primećeno je smanjenje brzine oslobađanja karbamazepina u poređenju sa čistim karbamazepinom. Iz čvrstih disperzija sa odnosima nosač:karbamazepin 1:2 i 1:6 dolazi do povećanja brzine rastvaranja karbamazepina, pri čemu se najbrže rastvaranje karbamazepina postiže iz formulacija sa odnosom nosač:karbamazepin i 1:6. Ovo je posledica veće slobodne kontaktne površine za kvašenje medijumom i samim tim je veća brzina rastvaranja. Jasna korelacija između brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih disperzija sa navedenim adsorbensima i metode izrade nije uočena. Formulacijom čvrstih disperzija sa dijatomitima kao nosačima, izrađenih metodom uparavanja, nije došlo do značajne promene u brzini oslobađanja karbamazepina u odnosu na prašak karbamazepina, dok je kod formulacija izrađenih istom metodom, ali na sobnoj temperaturi, primećeno značajno smanjenje brzine oslobađanja karbamazepina, u odnosu na čistu supstancu. Takođe je uočeno da sa porastom udela dijatomita u čvrstoj disperziji dolazi do povećanja brzine oslobađanja karbamazepina, ali ne značajno. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz izrađenih čvrstih disperzija pokazuju da redosled brzine rastvaranja karbamazepina opada, u zavisnosti od upotrebljenog adsorbensa, sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylsya[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti.

- Primenom DSC i PXRD analize kod čvrstih disperzija izrađenih sa nosačima Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylysia[®] 320, pri odnosu karbamazepin:nosač 1:6, utvrđeno je da je u ovim formulacijama došlo do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u amorfnu formu. Iz ovih formulacija postignuto je najbrže oslobađanje karbamazepina, u poređenju sa čvrstim disperzijama sa drugim odnosima karbamazepin:nosač. Kod čvrstih disperzija sa drugim odnosima karbamazepin:nosač, za navedena tri nosača, utvrđeno je da je deo karbamazepina prešao u amorfnu formu, a deo u polimorfni oblik II. Frakcija karbamazepina koja je iz polimorfnog oblika III prešla u manje rastvorljiv polimorfni oblik II je možda još jedan od razloga zašto se karbamazepin sporije oslobađa iz čvrste disperzije sa odnosima karbamazepin/nosač 1:1 i 1:2, u odnosu na one sa odnosom 1:6. DSC i PXRD analizom čvrstih disperzija sa dijatomitima se takođe uočava da je deo karbamazepina prešao u polimorfni oblik II, a deo u amorfnu formu.
- Formulacijom čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, uz upotrebu poroznih adsorbenasa, postiže se značajno povećanje brzine rastvaranja karbamazepina, u odnosu na čistu supstancu i tablete karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Najveća brzina rastvaranja karbamazepina postignuta je iz formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije, sa Neusilin[®]-om UFL2, iz koje se za 30 min rastvorilo preko 90% aktivne supstance. Analizom rezultata brzine rastvaranja karbamazepina utvrđeno je da se iz formulacija izrađenih metodom direktne adsorpcije postiže veća brzina rastvaranja karbamazepina u poređenju sa formulacijama identičnog sastava, izrađenih metodom uparavanja. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih-samomikroemulgujućih terpijskih sistema pokazuju da se redosled brzine oslobađanja karbamazepina smanjuje, u zavisnosti od nosača, sledećim redom: Neusilin[®] UFL2 > Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] FL2 > dijatomiti. Značajna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina iz formulacija izrađenih sa različitim odnosima adsorpcioni nosač:SMEDDS nije uočena, pri čemu se nešto veća brzina rastvaranja postiže iz formulacija sa odnosom adsorpcioni nosač/SMEDDS 3:1, u poređenju sa formulacijama u kojima je odnos 1:1.

- TGA, DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da u formulacijama čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom izrađenih metodom uparavanja dolazi do prelaska karbamazepina iz polimorfnog oblika III u polimorfni oblik II. Kako je polimorfni oblik III karbamazepina jedini farmakološki aktivan oblik, ova metoda izrade se ne može smatrati pogodnom za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom. DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da u formulacijama čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema izrađenih metodom direktne adsorpcije karbamazepin ostaje u polimorfnom obliku III, uz značajno povećanje brzine oslobađanja karbamazepina, pa se ova metoda izrade može smatrati pogodnom.
- Formulisanjem čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema sa karbamazepinom povećava se brzina rastvaranja karbamazepina. Brzina rastvaranja karbamazepina iz čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema smanjuje se, u zavisnosti od nosača, sledećim redom: Sylysia[®] 320 > Neusilin[®] UFL2 > Neusilin[®] FL2 > diatomiti. Formulacija iz koje se oslobađa najveći procenat karbamazepina sadrži jednak udeo SNEDDS-a i adsorpcionog nosača Sylysia[®] 320. Iz ove formulacije je za 30 minuta oslobođeno oko 90% karbamazepina. Jasna razlika u brzini oslobađanja karbamazepina između formulacija izrađenih sa različitim udelima adsorpcioni nosač:SNEDDS nije uočena.
- TGA, DSC, PXRD, FT-IR i SEM analizom utvrđeno je da je karbamazepin u čvrstim samo-nanoemulgujućim sistemima, izrađenim metodom direktne adsorpcije, ostao u polimorfnom obliku III, bez obzira na upotrebljeni adsorpcioni nosač.
- Dizajn smeše se može koristiti kao pogodna tehnika prilikom formulacije čvrstih samo-emulgujućih sistema sa karbamazepinom. Korišćenjem dizajna smeše formulisan je čvrst samo-emulgujućih sistem sa visokom delom karbamazepina od oko 40%, iz koga je za 30 minuta oslobođeno preko 80% karbamazepina. Poređenjem eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja karbamazepina, sa predviđenim, postignuto je veliko slaganje (faktori sličnosti za tri ispitivane formulacije bili su od 77,17-81,78). Takođe, u ovim formulacijama je karbamazepin ostao u kristalnom polimorfnom obliku III.

- Poređenjem brzine rastvaranja karbamazepina iz sistema koji u svom sastavu sadrže samo-dispergujuće nosače različitog stepena disperziteta, nije uočena jasna korelacija.
- Primenom PAMPA testa utvrđeno je da se odabranom formulacijom čvrstih disperzija i odabranim formulacijama čvrstih samo-dispergujućih sistema sa karbamazepinom značajno povećava permeabilnost navedene aktivne supstance (koeficijent prividne permeabilnosti), u odnosu na čist karbamazepin. Najizraženije povećanje se postiže primenom SSMEDDS (Papp $(21,42 \pm 1,67) \times 10^{-6}$ cm/s), u odnosu na čist karbamazepin (Papp $(11,77 \pm 0,34) \times 10^{-6}$ cm/s). Jasna razlika između stepena disperziteta samo-dispergujućeg nosača i koeficijenta efektivne permeabilnosti nije uočena. Poređenjem permeabilnosti karbamazepina iz formulacija čvrstih samo-nanoemulgujućih sistema, sa različitim odnosima adsorpcioni nosač:karmamazepin:tečni SNEDDS, utvrđeno je da se veća permeabilnost karbamazepina postiže iz formulacija sa nižim udelom karbamazepina i tečnog SNEDDS, ali ova razlika nije statistički značajna. Generalno, iz formulacija sa većom brzinom rastvaranja karbamazepina postiže se veća permeabilnost karbamazepina, međutim ne može se postaviti direktna korelacija. Najveći stepen korelacije se postiže između koeficijenta efektivne permeabilnosti i procenta oslobođenog karbamazepina nakon 10 min (koeficijent korelacije 0,7764).
- Primenom kompjuterskog programa Simcyp[®] Population-Based Simulator (version 13.2; Certara[™], SAD), uspešno je razvijen karbamazepin specifični PBPK model za farmakokinetičke parametre C_{max} , t_{max} i PIK_t , sa niskom vrednošću procenta greške u predviđanju (%PE) od 7,92%, 6,32%, i 5,66%, redom. Na osnovu *in silico* profila resorpcije/koncentracije karbamazepina u plazmi nakon peroralne primene čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema, može se zaključiti da su optimalne formulacije izrađene metodom direktne adsorpcije sa Neusilin[®]-om UFL2, Sylysia[®]-om 320 Neusilin[®]-om FL2, zbog značajno bržeg postizanja maksimalne koncentracije karbamazepina u plazmi (t_{max} 2,52-3,36 h), uz očuvanje optimalnih vrednosti C_{max} i PIK , u poređenju sa referentnim preparatom, tabletama karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem, kod koga je

vrednost t_{\max} 7,2h. Takođe, na osnovu vrednosti farmakokinetičkih parametara zaključeno je da je metoda direktne adsorpcije pogodnija za izradu čvrstih samo-mikroemulgujućih sistema sa karbamazepinom, u odnosu na metodu uparavanja.

- Formulacija čvrstih surfaktantnih sistema sa karbamazepinom pokazala je da dodatak poloksamera (237 ili 338), Brij[®] 35 i adsorpcionog nosača (Neusilin[®] UFL2 ili dijatomiti) dovodi do povećanja brzine oslobađanja karbamazepina. Najveći pozitivan uticaj na brzinu oslobađanja ima poloksamer. Adsorpcioni nosač još više povećava brzinu oslobađanja karbamazepina. Najbrže oslobađanje karbamazepina se postiže iz optimalne formulacije, čija se surfaktantna smeša sastojala od 75% poloksamer-a 338, 10% Brij[®] 35 i 15% karbamazepina, pri čemu je odnos surfaktantne smeše i Neusilin[®]-a UFL2, kao nosača, iznosio 2:1. Iz ove formulacije se za 30 minuta oslobađa 95,66% karbamazepina.
- Primenom TGA, DSC, FT-IR i PXRD analize je pokazano da je u čvrstim surfaktantnim sistemima karbamazepin prešao u amorfni oblik i da je formulacija stabilna 3 meseca, kada se čuva na sobnim uslovima (25 °C i 40% vlažnost vazduha). Prelazak karbamazepina u amorfni oblik se dešava i pod uticajem pojedinačnih ekscipijenasa. Na osnovu rezultata ove faze može se zaključiti da se metoda brzog hlađenja otopljenog materijala može koristiti za izradu čvrstih samo-dispergujućih nosača, jer se postiže povećanje brzine rastvaranja. Međutim, korišćena kombinacija ekscipijenasa dovodi do prelaska karbamazepina u amorfni oblik, što nije poželjno.
- Na osnovu rezultata drugog dela četvrte faze može se zaključiti da se tehnika granulacije topljenjem može sa velikim uspehom koristiti za izradu čvrstih samo-dispergujućih sistema. Labrafil[®] 2130CS se pokazao kao vezivno sredstvo čijom se primenom može postići veća brzina rastvaranja karbamazepina iz granulata, u poređenju sa granulatom, u kome je kao vezivno sredstvo korišćen Gelucire[®] 44/14. Poređenjem Neusilin[®]-a UFL2 i mikrokristalne celuloze, kao sredstava za dopunjavanje, pokazano je da se veća čvrstina tableta i veća brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta postiže primenom Neusilin[®]-a UFL2. U drugom delu ove faze dobijeni su matematički modeli koji opisuju zavisnost procenta oslobođenog karbamazepina (nakon 10, 20, 30, 45, 60 i 120 minuta) od

udela Labrafil[®] -a 2130CS i Cremophor[®] -a RH40. Vrednosti koeficijenata korelacije za dobijene modele su izrazito visoke i u opsegu od 0,9220 do 0,9863. Utvrđeno je i da se najveća brzina oslobađanja karbamazepina postiže pri višim udelima Labrafil[®] -a 2130CS (20%) i nižim udelima Cremophor[®] -a RH40 (10%). Takođe, u ovoj fazi je pokazano da se eksperimentalni dizajn može sa velikim uspehom koristiti u optimizaciji formulacija tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Iz optimalne formulacije tableta karbamazepina postignuto je oslobađanje karbamazepina od oko 88%, za 30 minuta.

- Primenom DSC, FT-IR i PXRD analize potvrđeno je da je karbamazepin u formulaciji tableta prisutan u polimorfnom obliku III. Ramanskom spektroskopijom je potvrđeno da je odabrana formulacija tableta stabilna 2 meseca, uz čuvanje na sobnim uslovima (25 °C i 40% vlažnost vazduha).

LITERATURA

13. Literatura

- Abdalla, A., Klein, S., Mäder, K., 2008. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: Characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35(5), 457-464.
- Abdalla, A., Mader, K., 2007. Preparation and characterization of a self-emulsifying pellet formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 220–226.
- Avdeef, A., 2003. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Agarwal, V., Siddiqui, A., Ali, H., Nazzal, S., 2009. Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *Int. J. Pharm.* 366, 44–52.
- Agrawal, S., Giri, T.K., Tripathi, D.K., Alexander, A., 2012. A Review on Novel Therapeutic Strategies for the Enhancement of Solubility for Hydrophobic Drugs through Lipid and Surfactant Based Self Micro Emulsifying Drug Delivery System: A Novel Approach, *Am. J. Drug Discov. Devel.* 2(4), 143-183.
- Alany, R.G., El Maghraby, G.M.M., Krauel-Goellner, K., Graf, A., 2009. Microemulsion Systems and Their Potential as Drug Carriers, in: Fanun, M. (Ed.), *Microemulsions: Properties and Application*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. pp. 247-291.
- Alexander, A., Ajazuddin, M., Swarna, M., Sharma, M., Tripathi, D.K., 2011. Polymers and permeation enhancers: Specialized components of mucoadhesives. *Stamford J. Pharm. Sci.* 4, 91-95.
- Al-Hamidi, H., Edwards, A.A., Mohammad, A.M., Nokhodchi, A., 2010. To enhance dissolution rate of poorly water-soluble drugs: Glucosamine hydrochloride as a potential carrier in solid dispersion formulations. *Colloids Surf. B.* 76,170-178.
- Al-Hamidi, H., Edwards, A.A., Mohammad, A.M., Nokhodchi, A., 2010. Glucosamine HCl as a new carrier for improved dissolution behaviour: Effect of grinding. *Colloids Surf. B.* 81, 96-109.
- Ali, W., Williams, A.C., Rawlinson, C.F., 2010. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: Poloxamer solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 391(1-2), 162-168.

- Alqahtani, S., Alayoubi, A., Nazzal, S., Sylvester, P.W., Kaddoumi, A., 2014. Enhanced solubility and oral bioavailability of γ -tocotrienol using a self-emulsifying drug delivery system (SEEDS). *Lipids*. 49, 819–829.
- Amidon G.L, Lennernas H, Shah V.P, Crison J.R., 1995. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420.
- Attama, A.A., Nzekwe, I.T., Nnamani, P.O., Adikwu, M.U., Onugu, C.O., 2003. The use of solid self-emulsifying systems in the delivery of diclofenac. *Int. J. Pharm.* 262, 23–28.
- Attwood, D., Florence, A.T., 1983. Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology, Chapman and Hall, London, United Kingdom. 794 p.
- Augustijns, P., Brewster, M.E., 2007. Biotechnology Pharmaceutical Aspect: Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. AAPS Press. 459 p.
- Avdeef, A., Strafford, M., Block, E., Balogh, M.P., Chambliss, W., Khan, I., 2001. Drug absorption in vitro model: Filter-immobilized artificial membranes. 2. Studies of the permeability properties of lactones in piper methysticum forst. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 271-80.
- Aw, M.S., Simović, S., Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2012. Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications. *Powder Technol.* 223, 52-58.
- Aw, M.S., Simovic, S., Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2011. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine*. 6(7), 1159-1173.
- Bahl, D., Bogner, R.H., 2008. Amorphization Alone Does Not Account for the Enhancement of Solubility of Drug Co-ground with Silicate: The Case of Indomethacin. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 9, 146-153.
- Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim J.O., Hong M.J., Jee J.P., Kim J.A., Yoo B.K., Woo J.S., Yong C.S., Choi H.G., 2009. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (3), 539–545.

- Bamba, J., Cave, G., Bensouda, Y., Tchoreloff, P., Puisieux, F., Couarraze, G., 1995. Cryoprotection of emulsions in freeze-drying: freezing process analysis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21(15), 1749–1760.
- Bandopadhyay, S., Shantanu, B., Rishi, K., Ramandeep, S., Katare, O. P., 2009. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 26(5), 427 – 451.
- Barthelemy, P., Benameur, H., 2001. Composition with sustained release of active principle capable of forming microemulsion. United State Patent 6309665.
- Batrakova, E., Lee, S., Li, S., Venne, A., Alakhov, V., Kabanov, A., 1999. Fundamental Relationships Between the Composition of Pluronic Block Copolymers and Their Hypersensitization Effect in MDR Cancer Cells. *Pharm. Res.* 16, 1373-1379.
- Bhupinder, M., Roy, G.S., Bajwa, B.S., Sandeep, K., 2013. Self emulsified drug delivery system for the enhancement of oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 2(3), 427 - 436.
- Boltri, L., Cocceani N., Del Curto D., Dobetti L., Esposito P., 1997. Enhancement and modification of etoposide release from crospovidone particles loaded with oil-surfactant blends. *Pharm. Dev. Technol.* 2, 373–381.
- Cavallari, C., Rodriguez, L., Albertini, B., Passerini N., Rosseti F., Fini A., 2005. Thermal and fractal analysis of diclofenac/Gelucire 50/13 microparticles obtained by ultrasound-assisted atomization. *J. Pharm. Sci.* 94(5), 1124-1134.
- Cha, K., Cho, K., Kim, M., Kim, J., Park, H., Park, J., Cho, W., Park, J., Hwang, S., 2012. Enhancement of the dissolution rate and bioavailability of fenofibrate by a melt-adsorption method using supercritical carbon dioxide. *Int J Nanomedicine.* 7, 5565-5575.
- Chen M.L., Yu L., 2009. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Mol. Pharm.* 6(1), 74-81.
- Chiou, W.L., Buehler, P.W., 2002. Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. *Pharm Res.* 19(6), 868-74.
- Clause, M., Payerlasse, J., Boned, C., Heil, J., Nicoles, L., Zradba, A., 1983. Solution Properties of Surfactants. Plenum Press, New York.

- Cole, E.T., Cade D., Benamener H., 2008. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60(6), 747–756.
- Cools, A.A., Janssen, L.H., 1983. Influence of sodium ion-pair formation on transport kinetics of warfarin through octanol-impregnated membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 35(10), 689-691.
- Collnot, E.M., Baldes, C., Wempe, M.F., Hyatt, J., Navarro, L., Edgar K.J., Schaefer U.F., Lehr C.-M., 2006. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J Control. Release.* 111, 35–40.
- Craig, D.Q.M., Barker, S.A., Banning, D., Booth, S.W., 1995. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 114, 103–110.
- Cuine, J.F., Charman, W.N., Pouton, C.W., Edwards, G.A., Porter, C.J., 2007. Increasing the proportional content of surfactant (Cremophor EL) relative to lipid in self-emulsifying lipid-based formulations of danazol reduces oral bioavailability in beagle dogs. *Pharm. Res.* 24,748–757.
- Dahan, A., Miller, JM., 2012. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *The AAPS Journal.* 14(2), 244-251.
- Dahan, A., Miller, M. J., Hoffman, A., Amidon, E. G., Amidon, L. G., 2010. The solubility - permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. *J. Pharm. Sci.* 99 (6), 2739 - 2749.
- Douroumis, D., Fahr, A., 2007, Stable carbamazepine colloidal systems using the cosolvent technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 367–374.
- Djekic, L., Primorac, M., Filipic, S., Agbaba, D., 2012. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int. J. Pharm.* 433, 25– 33.
- Djekic, L., Primorac, M., Jockovic, J., 2011. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. *J. Mol. Liq.* 160, 81-87.

- Djekic, Lj., Ibrić, S., Primorac, M., 2008. The application of artificial neural networks in the prediction of microemulsion phase boundaries in PEG-8 caprylic/capric glycerides based systems. *Int. J. Pharm.* 361, 41–46.
- Đekić, Lj., 2011. Formulaciona istraživanja nejonskih mikroemulzija kao potencijalnih nosača za lokalnu primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- El-Badry, M., Fathy, M., 2006. Enhancement of the dissolution and permeation rates of meloxicam by formation of its freeze-dried solid dispersions in polyvinylpyrrolidone K-30. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 32(2), 141–150.
- EMA, Guideline on the investigation of bioequivalence. 2010.
- EMA, Opinion On Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGEE). Scientific Committee on Consumer Safety SCCS, SCCS/1507/13. 2013.
- European Pharmacopoeia, 8th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2014.
- Ezarhi, S., Tuval, E., Aserin, A., Garti, N., 2005. The effect of structural variation of alcohols on water solubilization in nonionic microemulsions 1. From linear to branched amphiphiles-General considerations. *J. Colloid Interf. Sci.* 291, 263-272.
- Fagerholm, U., Johansson, M., Lennernas, H., 1996. Comparison between permeability coefficients in rats and human jejunum. *Pharm. Res.* 13, 1335-1341.
- Fanun, M., 2007. Conductivity, viscosity, NMR and diclofenac solubilization capacity studies of mixed nonionic surfactants Microemulsions. *J.Mol. Liq.* 135, 5-13.
- Fanun, M., 2008. Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions. *J. Mol. Liq.* 139, 14-22.
- Fanun, M., (Ed.), 2009. *Microemulsions: Properties and Application*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 560 p.
- Friberg, S.E., Aikens, P.A. A Phase Diagram Approach to Microemulsions, in: Fanun, M. (Ed.), 2009. *Microemulsions: Properties and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. pp. 1-15.
- Friberg, S., Buraczewska, I., Ravey, J.C., 2012. Solubilization by nonionic surfactant in the HLB Temperature Range. In: *Micellization, solubilization and Microemulsions, Vol.2* (R.K.Mittal, ed.), Plenum press, New York. pp. 901-911.

- Gao, P., Witt, M.J., Haskell, R.J., Zamora, K.M., Shifflett, J.R., 2004. Application of a mixture experimental design in the optimization of a self-emulsifying formulation with a high drug load. *Pharm. Devel. Tech.* 9(3), 301-309.
- Garti, N., Avrahami, M., Aserin, A., 2006. Improved solubilization of Celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution. *J. Colloid. Interf. Sci.* 299, 352-365.
- Gérardin A.P., Abadie F.V., Campestrini J.A., Theobald W., 1976. Pharmacokinetics of carbamazepine in normal humans after single and repeated oral doses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 4(6), 521-535.
- Gershanik, T., Haltner, E., Benita, S., 2000. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 211, 29-36.
- Gibson, L. Lipid-based excipients for oral drug delivery. Hauss DJ (Ed.), 2007. Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs. Informa Healthcare USA Inc., New York. pp. 33–61.
- Grassi, M., Grassi, G., Lapasin, R., Colombo, I., eds, 2007. Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Grbić, S., 2011. Razvoj biorelevantnog medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, Doktorska disertacija. Beograd: Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Grove, M., Mullertz, A., Pedersen, G.P., Nielsen, J.L., 2007. Bioavailability of seocalcitol III. Administration of lipid-based formulations to minipigs in the fasted and fed state. *Eur. J. Pharm. Sci.* 31, 8–15.
- Grzesiak, A., Lang, M., Kim, K., Matzger, A., 2003. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *J. Pharm. Sci.* 92, 2261-2271.
- Gua, C., Lib, H., Gandhia, R., Raghavana, K., 2004. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. *Int. J. Pharm.* 283, 117–125.
- Guidance for Industry: Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations. US Department of Health and Human

- Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997.
- Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In vitro Dissolution Testing and In vivo Bioequivalence Documentation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1995.
 - Guidance for Industry. SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms, Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In vitro* Dissolution Testing and *In vivo* Bioequivalence Documentation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997.
 - Gupta, M.K., Goldman, D., Bogner, R.H., Tseng Y.C., 2001. Enhanced drug dissolution and bulk properties of solid dispersions granulated with a surface adsorbent. *Pharm. Dev. Technol.* 6(4), 563-572.
 - Gupta, M.K., Tseng, Y.C., Goldman, D., Bogner, R.H., 2002. Hydrogen bonding with adsorbent during storage governs drug dissolution from solid-dispersion granules. *Pharm. Res.* 19, 1663-1672.
 - Gupta, M., Vanwert A., Bogner, R.H., 2003. Formation of physically stable amorphous drugs by milling with Neusilin. *J. Pharm. Sci.* 92(3), 536-551.
 - Gurny, R., Doelker, E., Peppas, N.A., 1981. Modelling of sustained release of water soluble drugs from porous, hydrophobic polymers. *Biomaterials.* 3, 27-32.
 - Gursoy, R.N., Benita, S., 2004. Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) for Improved Oral Delivery of Lipophilic Drugs. *Biomed. Pharmacother.* 58, 173-182.
 - Hailu, S., Bogner, R., 2011. Complex Effects of Drug/Silicate Ratio, Solid-State Equivalent pH, and Moisture on Chemical Stability of Amorphous Quinapril Hydrochloride Coground with Silicates, *J. Pharm. Sci.* 100, 1503–1515.
 - Hauss, D.J., 2007. Oral Lipid Based Formulations Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. CRC Press. 368 p.
 - Hauss, D.J., 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(7), 667–676.

- Hauss, D., Fogal, S.E., Ficorilli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A., Keirns, J.J., 1998. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB₄ inhibitor. *J. Pharm. Sci.* 87, 164–169.
- Hickey, M.B., Peterson, M.L., Scoppettuolo, L.A., Morrisette, S.L., Vetter, A., Guzman, H., Remenar, J.F., Zhang, Z., Tawa, M.D., Haley, S., Zaworotko, M.J., Almarsson, O., 2007. Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 112–119.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, AL., Karlsson, J., 2007. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug. Metab. Dispos.* 35(8), 1333 - 1340.
- Hua, L., Weisan, P., Jiayu, L., Hongfei, L., 2004. Preparation and evaluation of microemulsion of vinpocetine for transdermal delivery. *Pharmazie.* 59, 274-278.
- Hua, L., Weisan, P., Jiayu, L., Ying, Z., 2004. Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 30, 657-666.
- Hugger, E.D., Novak, B.L., Burton, P.S., Audus, K.L., Borchardt, R.T., 2002. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro*. *J Pharm Sci.* 91, 1991–2002.
- Humberstone, A.J., Charman, W.N., 1997. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25(1), 103–28.
- Ingle, L.M., Wankhade, V.P., Udasi, T.A., Tapar, K.K., 2013. New Approaches for Development and Characterization of SMEDDS. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci. Res.* 3(1), 7 - 14.
- Iosio, T., Voinovich, D., Perissutti, B., Serdoz, F., Hasa, D., Grabnar, I., Dall'Acqua, S., Zara, G.P., Muntoni, E., Pinto, J.F., 2011. Oral bioavailability of silymarin phytocomplex formulated as self-emulsifying pellets. *Phytomedicine.* 18 (6), 505–512.
- Irvine, J.D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J.W., Selick, H.E., Grove, J.R., 1999. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 88(1), 28-33.
- Ito, Y., Arai, H., Uchino, K., Iwasaki, K., Shibata, N., Takada, K., 2005. Effect of adsorbents on the absorption of lansoprazole with surfactant. *Int. J. Pharm.* 289(1-2), 69-77.

- Jamei, M., Marciniak, S., Edwards, D., Wragg, K., Feng, K., Barnett, A., Rostami-Hodjegan A., 2013. The simcyp population based simulator: architecture, implementation, and quality assurance. *In silico Pharmacol.* 1(9), 1-14.
- Jamei, M., Turner, D., Yang, J., Neuhoff, S., Polak, S., Rostami-Hodjegan, A., Tucker, G. 2009. Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *AAPS J.* 11 (2), 225-237.
- Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., 2008. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60(6), 734–746.
- Japanese Pharmacopoeia, 16th ed. Ministry of Health, Labour and Welfare, No. 65, Japan, 2011.
- Jeirani, Z., Jan, B.M., Ali, B.S., Noor, I.M., Hwa, S.C., Saphanuchart, W., 2012. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion, *Chemometr. Intell. Lab.* 112, 1-7.
- Kabanov, A.V., Nazarova, I.R., Astafieva, I.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., Yaroslavov, A.A., Kabanov, V.A., 1995. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules*, 28, 2303-2314.
- Kahlweit, M., 1999. Microemulsions. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C*, 95, 89-115.
- Kale, V.V., Kasliwal, R.H., Avari, J.G., 2007. Attempt to Design Continuous Dissolution-Absorption System Using Everted Intestine Segment for In Vitro Absorption Studies of Slow Drug Release Formulations. *Diss. Technol.* 31-36.
- Kalepu, S., Manthina, M., Padavala, V., 2013. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharmaceut*, 3(6), 361-372.
- Kaneniwa, N., Ichikawa, J., Yamaguchi, T., Hayashi, K., Watari, N., Sumi, M., 1987. Dissolution behavior of carbamazepine polymorphs. *Yakugaku Zasshi.* 107, 808–813.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 41, 1070-110.
- Kataoka, M., Tsuneishi, S., Maeda, Y., Masaoka, Y., Sakuma, S., Yamashita, S., 2014. A new in vitro system for evaluation of passive intestinal drug absorption: Establishment of a double artificial membrane permeation assay. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88(3), 840-846.

- Katteboina, S., Chandrasekhar, P., Balaji, S., 2009. Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. *Asian J. Pharm. Sci.* 4(4), 240-253.
- Kelly, C.R., Rodriguez-Hornedo, N., 2009. Solvent effects on the crystallization and preferential nucleation of carbamazepine anhydrous polymorphs: a molecular recognition perspective. *Organic Process Res. Develop.* 13, 1291–1300.
- Kerns, E.H., Di, L., Petusky, S., Farris, M., Ley, R., Jupp, P., 2004. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* 93(6), 1440-1453.
- Khanfar, M., Fares, M.A., Salem, M.S., Qandil, A.M., 2013. Mesoporous silica based macromolecules for dissolution enhancement of irbesartan drug using pre-adjusted pH method. *Microporous Mesoporous Mater.* 173, 22-28.
- Khoo, SM., Humberstone, A.J., Porter, C.J., Edwards, G.A., Charman, W.N., 1998. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int. J. Pharm.* 167, 155–164.
- Kobayashi, Y., Ito, S., Itai, S., Yamamoto, K., 2000. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int. J. Pharm.* 193, 137-146.
- Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., Khar, R.K., 2010. Self-emulsifying drug delivery system: An approach to enhance the oral bioavailability. *Drug Discov. Today.* 15, 958-965.
- Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K., 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int. J. Pharm.* 212, 233–246.
- Kostewicz, E.S., Aarons, L., Bergstrand, M., Bolger, M.B., Galetin, A., Hatley, O., Jamei, M., Lloyd, R., Pepin, X., Rostami-Hodjegan, A., Sjögren, E., Tannergren, C., Turner, D.B., Wagner, C., Weitschies, W., Dressman, J., 2014. PBPK models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 300-321.
- Kovačič, B., Vrečer, F., Planinšek, O., 2011. Solid Dispersions of Carvedilol with Porous Silica. *Chem. Pharm. Bull.* 59(4), 427-433.

- Krupa, A., Majda, D., Jachowicz, R., Mozgawa, W., 2010. Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin US2. *Thermochim. Acta.* 509, 12-17.
- Kyatanwar, A.V., Jadhav, K.R., Kadam, V.J., 2010. Self Micro-Emulsifying Drug Delivery System (SMEDDS): Review. *Indian J. Pharm.* 3(1), 75-83.
- Lazarević, J.J., Uskoković-Marković, S., Jelikić-Stankov, M., Radonjić M., Tanasković D., Lazarević N., Popović, Z.V., 2014. Intermolecular and low-frequency intramolecular Raman scattering study of racemic ibuprofen. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 126, 301-305.
- Lee, J., Lee, Y., Kim, J., Yoon, M., Choi, Y.W., 2005. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aclofenac. *Acrh. Pharm. Res.* 28, 1097-1102.
- Lennernas H., Knutson L., Knutson T., Lesko L., Salmonson T., Amidon G.L., 1996. Human effective permeability data for atenolol, metoprolol, propranolol, desipramine and carbamazepine to be used in the proposed biopharmaceutical classification for IR products. *Eur. J. Pharm. Sci.* 4, S69–S71.
- Lennernas, H., Ahrenstedt, O., Hallgren, R., Knutson, I., Ryde, M., Paalzow, L.K., 1992. Regional jejuna perfusion, a new in vivo approach to study oral drug absorption in man. *Pharm. Res.* 9, 1243-1251.
- Leuner, C., Dressman, J., 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 47-60.
- Lipinski, C., 2002. Poor aqueous solubility-an industry wide problem in drug discovery. *Am. Pharm. Rev.* 5, 82–85.
- Lipka E., Amidon G.L., 1999. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J. Control Release.* 62, 41-49.
- Lipka, E., Spahn-Langguth H., Mutschler E., Amidon, G.I., 1998. In vivo non-linear intestinal permeability of celiprolol and propranolol in conscious dogs. Evidence for intestinal secretion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 75-81.
- Löbenberg, R., Amidon, G.L., 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 3-12.
- Loftsson, T., Hreinsdottir, D., 2006. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 7(1), E29-E32.

- Lu, R., Sun, J., Wang, Y., Li, H., Lui, J., Fang, L., He, Z., 2009. Characterization of biopartitioning micellar chromatography system using monolithic column by linear solvation energy relationship and application to predict blood-brain barrier penetration. *J. Chromatogr. A.* 1216, 5190-5198.
- Malmsten, M., 2013. Inorganic nanomaterials as delivery systems for proteins, peptides, DNA, and siRNA. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 18, 468-480.
- Mamaeva, V., Sahlgren, C., Linden, M., 2013. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 689-702.
- Marsac, P.J., Li, T., Taylor, L.S., 2009. Estimation of Drug-Polymer Miscibility and Solubility in Amorphous Solid Dispersions Using Experimentally Determined Interaction Parameters. *Pharm. Res.* 26, 139-151.
- Sweetman, S.C., 2014. Martindale: The Complete Drug Reference. 38th ed. Pharmaceutical Press, London. pp. 4688.
- Mehta, S.K., Kaur, G., Mutneja, R., Bhasin, K.K., 2009. Solubilization, microstructure, and thermodynamics of fully dilutable U-type Brij Microemulsion. *J. Colloid. Interf. Sci.* 338, 542-549.
- Meng, J., Zheng, L., 2007. Application of mixture experimental design to simvastatin apparent solubility predictions in the microemulsification formed by self-microemulsifying. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33(9), 927-931.
- Miller, J.M., Beig, A., Carr, R.A., Spence, J.K., Dahan, A., 2012. A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: Supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of intestinal membrane permeability. *Mol. Pharm.* 9, 2009–2016.
- Milović, M., Đuriš, J., Đekić, Lj., Vasiljević, D., Ibrić, S., 2012. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int. J. Pharm.* 436, 58-65.
- Milović, M., Simović, S., Lošić, D., Dashevskiy, A., Ibrić, S., 2014. Solid self-emulsifying phospholipid suspension (SSEPS) with diatom as a drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 63, 226-232.
- Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., (Eds.), 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd ed. Pharmaceutical Press: London and Chicago. 1248 p.

- Mohanachandran, P.S., Sindhumol, P.G., Kiran, T.S., 2010. Enhancement of solubility and dissolution rate: an overview. *Pharmacie Globale (IJCP)*. 4(11), 1-10.
- Moore, J.W., Flanner, H.H., 1996. Mathematical Comparison of curves with an emphasis on *in vitro* dissolution profiles. *Pharm. Tech.* 20(6), 64-74.
- Mueller, P., Rudin, D., Tien, H., Wescott, W., 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an existable system. *Nature*. 194, 979-980.
- Müllertz, A., Ogbonna, A., Ren, S., Rades, T., 2010. New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 62, 1622–1636.
- Navia, M.A., Chaturvedi, P.R., 1996. Design principles for orally bioavailable drugs. *Drug. Discov. Today*. 1(5), 179-189.
- Nazzal, S., Khan, M., 2006. Controlled release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: Stability assessment and optimization of some processing parameters. *Int. J. Pharm.* 315, 110–121.
- Newton, J.M., Godinho, A., Clarke, A.P., Booth, S.W., 2005. Formulation variables on pellets containing selfemulsifying systems. *Pharm. Tech. Eur.* 17, 29–33.
- Newton, M., Petersson, J., Podczek, F., Clarke, A., Booth, S., 2001. The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture. *J.Pharm. Sci.* 90, 987–995.
- O'Driscoll, C.M., Griffin B.T., 2008. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility- the potential impact of lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 617-624.
- Osol, A., 1975. *Emulsifying and Suspending Agents*. 15th Edn. Mack Publishing, USA. 1246 p.
- Otsuka, M., Hasegawa, H., Matsuda, Y., 1997. Effect of polymorphic transformations during extrusion-granulation process on the pharmaceutical properties of carbamazepine granules. *Chem. Pharm. Bull.* 45, 894-898.
- Otsuka, M., Hasegawa, H., Matsuda, Y., 1999. Effect of polymorphic forms od bulk powders on pharmaceutical properties of carbamazepine granules. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 852-856.
- Palmer, A.M., 2003. New horizons in drug metabolism, pharmacokinetics and drug discovery. *Drug News Perspect.* 16, 57–62.

- Parikh, D.K., Ghosh, T.K., 2005. Feasibility of transdermal delivery of fluoxetine. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6(2), E144-E149.
- Passerini, N., Albertini, B., Perissuti, B., Rodriguez, L., 2006. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int. J. Pharm.* 318, 92-102.
- Patel, M., Patel, R., Parikh, J., Bhatt, K., 2007. Microemulsions: As Novel Drug Delivery Vehicle. *Pharm. Rev.* 5(6).
- Patel, M.J., Patel, S.S., Patel, N., Patel, M.M., 2010. A Self-microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 4(3), 29-35.
- Patravale, V.B., Date, A.A., Kale, A.A., 2003. Oral Self-microemulsifying system: Potential in DDS. *Pharm. Technol. Express Pharm. Pulse Spec. Feature.* 29, 44-48.
- Planinšek, O., Kovačić, V., Vrečer, F., 2011. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int. J. Pharm.* 406, 41-48.
- Pokrajac, M., 2008. Farmakokinetika. Grafolik, Beograd.
- Porter, C., Trevaskis, N., Charman, W., 2007. Nature Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 231-248.
- Porter, C.J.H., Pouton, C.W., Cuine, J.F., Charman, W.N., 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(6), 673-691.
- Pouton, C.W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: nonemulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, S93-S98.
- Pouton, C.W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29(3-4), 278-287.
- Pouton, C.W., 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 47-58.
- Prajapati, H., Dalrymple, D., Serajuddin, A., 2012. A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid/Surfactant/Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development. *Pharm Res.* 29, 285-305.

- Prajapati, B.G., Patel, M.M., 2007. Conventional and alternative pharmaceutical methods to improve oral bioavailability of lipophilic drugs. *Asian J. Pharm.* 1, 1–8.
- Prieto, P., Hoffmann, S., Tirelli, V., Tancredi, F., Gonzalez, I., Bermejo, M., De Angelis I., 2010. An exploratory study of two Caco-2 cell models for oral absorption: a report on their within-laboratory and between-laboratory variability, and their predictive capacity. *Altern. Lab. Anim.* 38(5), 367 - 386.
- Qi, Z., Zhang, D., Chen, F., Miao, J., Ren, B., 2014. Thermal decomposition and non-isothermal decomposition kinetics of carbamazepine, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 8(13), 2308-2313.
- Queiroz, R.H.C., Bertucci, C., Majfar, W.R., Dreossi, S.A.C., Chaves, A.R., Valerio, D.A.R., Queiroz, M.E.C., 2008. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 428-434.
- Radulović, D., Vladimirov, S., 2005. Farmaceutska hemija I deo, Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Rahman, Z., Agarabi, C., Zidan, A.S., Khan, S.R., Khan, M.A., 2011. Physico-mechanical and stability evaluation of carbamazepine cocrystal with nicotinamide. *Pharm. Dev. Technol.* 12(2), 693-704.
- Rodriguez, L., Passerini, N., Cavallari, C., Cini, M., Sancin, P., Fini, A., 1999. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing process. *Int. J. Pharm.* 183, 133-143.
- Rodgers, T., Rowland, M., 2007. Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: Understanding the processes. *Pharm. Res.* 24, 918-933.
- Roffey, S.J., Obach, R.S., Gedge, J.I., Smith, D.A., 2007. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug. Metab. Rev.* 39(1), 17-43.
- Rosen, M J., 2004. Surfactants and interfacial phenomena. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 444 p.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owenm S.C., 2006. Handbook of pharmaceutical excipients (5th Ed.). American Pharmaceutical Association and London: The Pharmaceutical Press, Washington DC. 918 p.

- Rupprecht, H., Lee, G., Adsorption at solid surfaces. In: Swarbrick, J., Boylan, J.C., Eds. 1988. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1st Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 73–114.
- Rustichelli, C., Gamberini, G., Ferioli, V., Gamberini, M.C., Ficarra, R., Tommasini, S., 2000. Solid-state study of polymorphic drugs: Carbamazepine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23(1), 41-54.
- Saikat, R., Chamberlin, B., Matzger, A.J., 2013. Polymorph Discrimination Using Low Wavenumber Raman Spectroscopy. *Org. Process Res. Dev.* 17(7), 976-980.
- Salonen, J., Laitinen, L., Kaukonen, A.M., Tuura, J., Björkqvist, M., Heikkilä, T., Vähä-Heikkilä, K., Hirvonen, J., Lehto, V.P., 2005. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs. *J. Controll. Release.* 108, 362–374.
- Seo, A., Holm, P., Kristensen, H.G., Schaefer, T., 2003. The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *Int. J. Pharm.* 259, 161-171.
- Serajuddin, A.T.M., 2007. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Del. Rev.* 34, 34-39.
- Sethia, S., Squillante, E., 2002. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *J. Pharm. Sci.* 91, 1948-1957.
- Shah, I., 2011. Development and characterization of oil-in-water nanoemulsions from self-microemulsifying mixtures. The University of Toledo Digital Repository, Theses and Dissertations.
- Shahbazi, M., Santos, H., 2013. Improving oral absorption via drug-loaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. *Curr. Drug Metab.* 14, 28 - 56.
- Shobhit, K., Satish, K.G., Pramod, K.S., 2012. Self-emulsifying drug delivery systems for oral delivery of lipid based formulations - a review. *Afr. J. Basic Appl. Sci.* 4(1), 7 – 11.
- Shono, Y., Nishihara, H., Matsuda, Y., Furukawa, S., Okada, N., Fujita, Yamamoto, A., 2004. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by cremophor EL and other

- surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J. Pharm. Sci.* 93, 877–885.
- Sjöblom, J., Lindbergh, R., Friberg, SE., 1996. Microemulsions – phase equilibria characterization, structures, application and chemical reactions. *Adv. Colloid. Interfac.* 65,125-287.
 - Smetanova, L., Stetinova, V., Svoboda, Z., Kvetina, J., 2011. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 54(1), 3 -8.
 - Song, L., 2011, Studies of solubilization of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of a model lipid-based drug delivery system and in mixed micelles. Doctoral dissertation, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, UK.
 - Sprunk, A., Strachan, C.J., Graf, A., 2012. Rational formulation development and *in vitro* assessment of SMEDDS for oral delivery of poorly water soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46, 508–515.
 - Stenberg, P., Bergstrom, C.A., Luthman, K., Artursson, P., 2002. Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development. *Clin. Pharmacokinet.* 41(11), 877-899.
 - Strickley, R.G., Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drugs products and excipients, in: Hauss, D.J. (Ed.), 2007. Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs. Informa Healthcare, Inc., New York. pp. 1–31.
 - Sugano, K., Hamada, H., Machida, M., Ushio, H., Saitoh, K., Terada, K., 2001. Optimized conditions of biomimetic artificial membrane permeability assay. *Int. J. Pharm.* 228, 181-188
 - Sugano, K., Nabuchi, Y., Machida, M., Aso, Y., 2003. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* 257, 245–251.
 - Sumper, M., Brunner, E., 2006. Learning from diatoms: nature's tools for the production of nanostructured silica. *Adv. Funct. Mater.* 16(1), 17–26.
 - Sun, M., Zhai, X., Xue, K., Hu, L., Yang, X., Li, G., Si, L., 2011. Intestinal absorption and intestinal lymphatic transport of sirolimus from self-microemulsifying drug delivery systems assessed using the single-pass intestinal perfusion (SPIP) technique and a

- chylomicron flow blocking approach: linear correlation with oral bioavailabilities in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43(3), 132 – 140.
- Tang, B., Cheng, G., Gu, J.C., Xu, C.H., 2008. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discov. Today.* 13, 606-612.
 - Tadkaew, N., Sivakumar, M., Khan, S.J., McDonald, J.A., Nghiem, L.D., 2010. Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresource Tehnol.* 101, 1494-1500.
 - Taguchi, A., Schuth, F., 2005. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Micropor. Mesopor. Mat.* 77, 1–45.
 - Talukder, R., Reed, C., Dürig, T., Hussain, M., 2011. Dissolution and Solid-State Characterization of Poorly Water-Soluble Drugs in the Presence of a Hydrophilic Carrier. *AAPS PharmSciTech.* 12(4), 1227-1233.
 - Tao, Y., Jiangling, W., Huibi, X., Xiangliang Y., 2008. A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 439-444.
 - Thompson, M., Lennox, R.B., McClelland, R.A., 1982. Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. *Anal. Chem.* 54, 76-81.
 - Trapani, G., Franco, M., Trapani, A., Lopodota, A., Latrofa, A., Gallucci, E., Micelli, S., Liso, G., 2004. Frog intestinal sac: a new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. *J. Pharm. Sci.* 93(12), 2909-2919.
 - Ugrešić, N., Stepanović-Petrović, R., Savić, M., 2011. Farmakoterapija za farmaceute, Farmaceutski fakultet, Beograd.
 - United States Pharmacopoeia 38, National Formulary 33. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2014.
 - Vallet-Regi, M., Balas, F., Arcos, D., 2007. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 7548-7558.
 - Vallet-Regi, M., Ramila, A., Del Real, R.P., Perez-Pariente, J., 2001. A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chem. Mater.* 13, 308-311.
 - Van Breemen, R.B., Li, Y., 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1(2), 175 - 185.

- Venkatesan, N., Yoshimitsu, J., Ito, Y., Shibata, N., Takada, K., 2005. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials*. 26, 7154-7163.
- Verreck, G., Brewster, M.E., 2004. Melt extrusion-based dosage forms: excipients and processing conditions for pharmaceutical formulations. *Gattefoss'e Bulletin Technique*. 97, 85–95.
- Walker R. and Whittlesea C. ed. 2012. *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 5th ed. Churchill Livingstone. 998 p.
- Wen, H., Adsorption at Solid Surfaces: Pharmaceutical Applications. In: Swarbrick J. ed. 2007. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Informa Healthcare. pp. 34-42.
- Williams, R.O., Watts, A.B., Miller, D.A. 2012. *Formulating poorly water soluble drugs*. AAPS Press. pp 648.
- Willmann, S., Schmitt, W., Keldenich, J., Lippert, J., Dressman, J., 2004. A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans. *J. Med. Chem.* 47(16), 4022-4031.
- Willmann, S., Schmitt, W., Keldenich, J., Dressman J., 2003. A physiological model for simulating gastrointestinal flow and drug absorption in rats. *Pharm. Res.* 20(11), 1766-1771.
- Wohnsland, F., Faller, B., 2001. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* 44, 923-930.
- Xu, C., Zou, M., Liu, Y., Ren, J., Tian, Y., Yan, J., Wang, Y., Cheng, G., 2011. Pharmacokinetics of carbamazepine polymorphs and dihydrate in rats, related to dogs and humans. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1973-1982.
- Yadav, O.P., Yadav, Y.K, Das, A.R., Dey, T., Kakkar, S., Singla, M.L., 2011. Catalytic oxidation of carbonmonoxide using platinum nanoparticles synthesized in microemulsion. *Asian J. Scient. Res.* 1, 79-84.
- Yanez, J.A., Wang, S.W.J., Knemeyer, I.W., Wirth, M.A., Alton K.B., 2011. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(10–11), 923-942.
- Yang, M., Wang, P., Huang, C.Y., Ku, M.S., Liu, H., Gogos, C., 2010. Solid dispersion of acetaminophen and poly(ethylene oxide) prepared by hot-melt mixing. *Int. J. Pharm.* 395, 53-61.

- Yi, T., Wan, J., Xu, H., Yang, X., 2008. A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70(2), 439-444.
- Yu, L., Reutzel-Edens, S.M., Mitchell, C.A., 2000. Crystallization and Polymorphism of Conformationally Flexible Molecules: Problems, Patterns, and Strategies. *Org. Process Res. Dev.* 4(5), 396-402.
- Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2009. Development of nanocolloidal diatomaceous earth particles into advanced material for water treatment applications. Presented at: CHEMECA 2009. Perth, Australia, Conference paper 0108, 27–30.
- Zhang, Q., Jiang, X., Jiang, W., Lu, W., Su, L., Shi, Z., 2004. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on targeting efficiency to the brain. *Int. J. Pharm.* 275, 85-96.
- Zhu, C., Jiang, L., Chen, T.M., Hwang, K.K., 2002. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high-throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 399-407.

Elektornske baze podataka

- i <http://www.alims.gov.rs/>, poslednji pristup 30.6.2015
- ii <http://www.neusilin.com>, poslednji pristup 01. 07. 2015. godine.
- iii Fuji Chemical Industry Co., Ltd. (2009). The Specialty Excipient Neusilin® . Dostupno na linku: http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusilin.pdf, poslednji pristup 30.06.2015. godine
- iv <http://www.fujisilysia.com>, poslednji pristup 01. 07. 2015. godine.
- v <http://www.gattefosse.com/node.php?articleid=171>, poslednji pristup 01. 07. 2015. godine.
- vi Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers, Solublizer Compendium, BASF, <http://www.pharma-ingredients.basf.com>, poslednji pristup 15. 06. 2015. godine.

14. Biografija autora

Marko Krstić rođen je 20.04.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu Pavle Savić i gimnaziju prirodnog smera završio je u Beogradu. Bio je matematičar generacije Prve beogradske gimnazije.

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2006/2007. godine. Diplomirao je 2011. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom studiranja 9,29. Dobitnik je stipendije Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Doktorske akademske studije je upisao na Farmaceutskom fakultetu školske 2011/12. godine, modul farmaceutska tehnologija. Od novembra 2011. do juna 2014. godine bio je zaposlen kao istraživač-pripravnik, a od juna 2014. do danas kao istraživač saradnik na realizaciji projekta TR 34007: „Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Iz doktorske disertacije publikovao je jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), tri rada u međunarodnim časopisima (M23), pet saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33), jedno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34) i jedno saopštenja sa skupa nacionalnog značaja, štampano u izvodu (M64) (Prilog B).

Za svoj naučno istraživački rad nagrađivan je 4 puta.

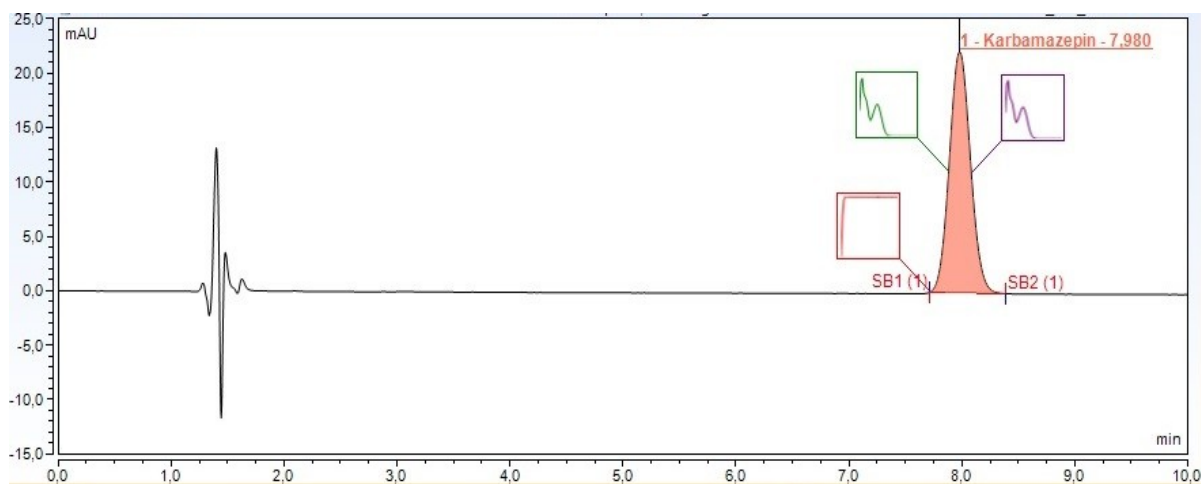
Učestvovao u realizaciji praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutska tehnologija II i Analitička hemija II.

15. Prilog

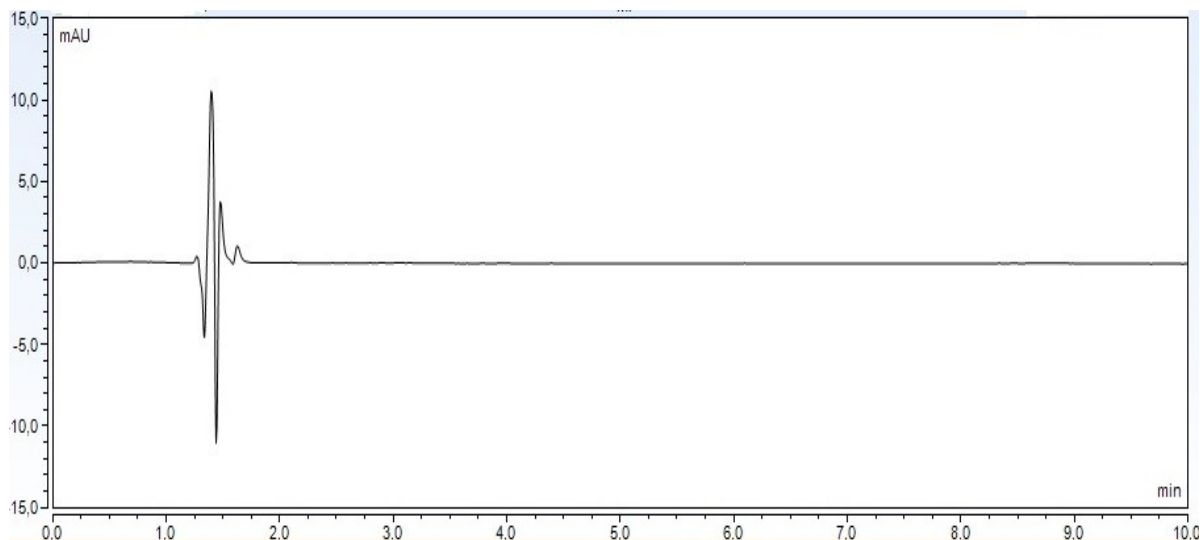
Prilog A: Validacija HPLC metode za određivanje karbamazepina u PAMPA testu

Robusnost – Robusnost metode je procenjena na osnovu promena površine pika karbamazepina u zavisnosti od malih promena odabranih hromatografskih parametara: temperature kolone (23 °C i 27 °C), sastava mobilne faze (48% i 52% vodene faze), protoka mobilne faze (0,95 ml/min i 1,05 ml/min) i talasne dužine detekcije (253 nm i 255 nm). Promene površina pikova su manje od 5% u odnosu na površinu pika karbamazepina dobijenu pod optimalnim hromatografskim uslovima.

Selektivnost – Poređenjem hromatograma standardnog rastvora karbamazepina (Slika A.1.) i rastvora placebo (formulacija bez karbamazepina) (Slika A.2.) pokazano je da na retencionom vremenu karbamazepina nema interferencije od strane komponenata placebo.



Slika A.1. Hromatogram standardnog rastvora karbamazepina



Slika A.2. Hromatogram rastvora placeba

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) – LOD i LOQ su koncentracije standardnih rastvora karbamazepina za koje je odnos signal-šum 3:1, odnosno 10:1 (LOD = 0,03 g/ml; LOQ = 0,10 g/ml).

Linearnost – Linearnost je ispitana u opsegu koncentracija od 0,10 g/ml (LOQ) do 12,50 g/ml. Regresiona jednačina je $y = 463,15x - 0,2472$, koeficijent korelacije (r) je 0,9998, a odsečak kalibracione krive nije statistički značajan ($p = 0,54$).

Preciznost injektovanja – Preciznost injektovanja potvrđena je na osnovu relativne standardne devijacije (RSD) površine pikova karbamazepina za deset uzastopnih injektovanja: RSD = 0,61% (zahtev: < 1%).

Prilog B: Publikovani i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Krstić M**, Popović M, Dobričić V, Ibrić S. Influence of Solid Drug Delivery System Formulation on Poorly Water-Soluble Drug Dissolution and Permeability. *Molecules*. 2015; 20: 14684-14698.

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Krstić M**, Ražić S, Vasiljević D, Spasojević Đ, Ibrić S. Application of experimental design in the examination of the dissolution rate of carbamazepine from formulations. Characterization of the optimal formulation by DSC, TGA, FT-IR and PXRD analysis. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2015; 80 (2): 209-222.
2. **Krstić M**, Ražić S, Đekić Lj, Dobričić V, Momčilović M, Vasiljević D, Ibrić S. Application of a mixture experimental design in the optimization of the formulation of solid self-emulsifying drug delivery systems containing carbamazepine. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2015; 34 (5): 885-894.
3. **Krstić M**, Ibrić S. Primena dizajna smeše u formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. *Hemijska industrija*. Rad u štampi. DOI:10.2298/HEMIND150623059K

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u celini (M33)

1. Vukosavljević B, **Krstić M**, Đuriš J, Đurić Z, Ibrić S. Evaluation of magnesium-aluminum metasilicate and silica carriers for improving oral bioavailability of poorly soluble drug. *International porous and Powder Materials Symposium and Exhibition*. Izmir, Turkey, September 3-6, 2013. p. 545-549.
2. **Krstić M**, Momčilović M, Ražić S, Vasiljević D, Ibrić S. Optimization of drug release from solid self-emulsifying drug delivery systems by means of mixture experimental design. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon/Portugal, March 31-April 3, 2014.
3. **Krstić M**, Stanković S, Parojčić J, Đurić Z, Ibrić S. Evaluating potential for enhanced oral bioavailability of carbamazepine SMEDDS formulations using PBKP modelling. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical

Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farmaceutski vestnik 2014; 65:151-153.

4. **Krstić M**, Spasojević Đ, Ražić S, Vasiljević D, Ibrić S. Influence of surfactants and adsorption carriers on drug release rate from solid drug delivery systems. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož/Slovenia, September 18 – 20, 2014. Farmaceutski vestnik 2014; 65: 154-156.
5. **Krstić M**, Ibrić S, Vujić Z, Đurić Z. Formulation of solid self-microemulsifying drug delivery system with porous carriers using mixture experimental design. International porous and Powder Materials Symposium and Exhibition. Izmir, Turkey, September 15-18, 2015. p. 308-312.

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34)

1. **Krstić M**, Petrović O, Potpara J, Đurić Z, Đuriš J, Ibrić S. Primena frakcionog eksperimentalnog dizajna u formulaciji tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem. Drugi kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, 28-31. maj 2015, Budva. Knjiga sažetaka 229-231.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Krstić M**, Popović M, Pešić A, Pavlović N, Dobričić V, Ibrić S. Uticaj formulacije čvrstog terapijskog sistema na brzinu oslobađanja i permeabilnost karbamazepina. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. Beograd, 15-19. oktobar 2014. Zbornik sažetaka, p 388-389.

Prilog C: Izjava o autorstvu

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марко Крстић
број индекса 29/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Формулација и карактеризација чврстих само-диспергујућих носача
карбамазепина израђених са порозним адсорбенсима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14.10.2015.



Prilog D: Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Крстић
Број индекса 29/11
Студијски програм Докторске академске студије из Фармацеутске технологије
Наслов рада Формулација и карактеризација чврстих само-диспергујућих носача карбамазепина израђених са порозним адсорбенсима
Ментор проф. др Светлана Ибрић

Потписани/а Марко Крстић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 14.10.2015.



Prilog E: Izjava o korišćenju**Прилог 3.****Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Формулација и карактеризација чврстих само-диспергујућих носача карбамазепина израђених са порозним адсорбенсима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 14.10.2015.

Потпис докторанда

