

Određivanje najpovoljnijeg sastava niozoma kao transportnog sistema za flurbiprofen

Vezikule koje sadrže nejonske surfaktante predstavljaju savremeni transportni sistem za lekove (niozomi), kao nosači kako hidrofилnih tako i lipofilnih medikamenata. U ovom radu određivan je najpovoljniji sastav niozoma u cilju dizajniranja što efikasnijeg transportnog sistema za flurbiprofen. Niozomi su sintetisani modifikovanim metodama hidratacije tankog filma i ubrizgavanja etra. Metoda hidratacije tankog filma se pokazala kao efikasnija u odnosu na metodu ubrizgavanja etra. Ispitivan je i uticaj ultrazvuka na veličinu, oblik i efikasnost inkapsulacije niozoma. Veličina i oblik niozoma određivani su optičkom mikroskopijom. Najveću efikasnost inkapsulacije leka (53%) pokazali su niozomi dobijeni mešanjem surfaktanta i holesterola u odnosu Span 40 : holesterol 1 : 1. Pokazan je negativan uticaj ultrazvuka na veličinu niozoma i efikasnost inkapsulacije.

Uvod

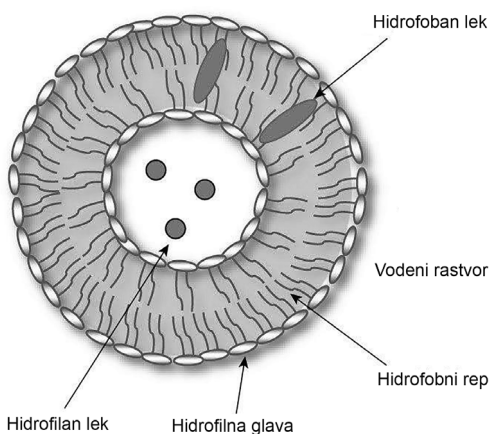
Niozomi su vezikule mikroskopskih dimenzija koji predstavljaju savremene sisteme za transport medikamenata ili drugih malih molekula. Niozomi su unilamelarne ili multilamelarne vezikule kod kojih jedna lamela predstavlja jedan lipidni dvosloj. Sastoje se od nejonskog surfaktanta i mogu biti stabilizovani holesterolom ili anjonskim surfaktantom, kao što je dicetil fosfat. Hidratacijom u vodi surfaktant obrazuje lipidni dvosloj, pa se u niozomima mogu prenositi kako hidrosolubilni, u vodenom delu

unutar vezikule okruženom membranom, tako i liposolubilni lekovi, inkapsulirani u samu membranu (Akhilesh *et al.* 2012). Prečnici vezikula kreću se od 20 nm do 50 μm (Kumar *et al.* 2011), i u zavisnosti od veličine pokazuju veći, odnosno manji udeo inkapsulacije leka. Osnovna prednost ovakvog sistema u odnosu na uobičajen unos medikamenta je kontrolisano i ciljano oslobađanje medikamenta, povećanje biodostupnosti i konkretno za transdermalni unos medikamenta, dublje prodiranje leka kroz kožu. Niozomi mogu prolongirati dejstvo leka što smanjuje učestalost unošenja leka u organizam. U poređenju sa lipozomima niozomi imaju određene prednosti koje se ogledaju u većoj stabilnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti i većoj dostupnosti kada se koriste za komercijalne svrhe (Madhav i Saini 2011).

Flurbiprofen, odnosno 2-(3-fluoro-4-fenil-fenil) propionska kiselina (slika 2) je nesteroidni antiinflamatorni lek (NSAIL) koji se koristi protiv bolova i zapaljenja kao i oboljenja poput reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Ima analgetsko, antipiretičko i antiinflamatorno dejstvo. Flurbiprofen inhibira enzim ciklooksigenazu koji katalizuje sintezu prostaglandina i tromboksana. Ima kratko poluvreme eliminacije pa se stoga daje u češćim intervalima. Flurbiprofen nema veliku transdermalnu propustljivost pa je zbog toga smanjena i biodostupnost leka. Pokazuje neželjena dejstva kao što su ulceracije i krvarenje u želucu. Svođenje rizika od neželjenih dejstava na minimum, povećana propustljivost kroz kožu i biodostupnost mogu se postići formulacijom odgovarajućeg prenosnog sistema za medikament – niozoma (Prajapati *et al.* 2012).

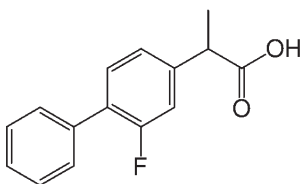
Ana Urošević (1995), Valjevo, Dr Pantića 124/1, učenica 3. razreda Valjevske gimnazije

MENTOR: dr Nenad Milosavić, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za biohemiju



Slika 1. Struktura niozoma (Lembo 2010)

Figure 1. Structure of niosome (Lembo 2010)



Slika 2. 2-(3-fluoro-4-fenil-fenil) propionska kiselina

Figure 2. 2-(3-fluoro-4-phenylphenyl)propanoic acid

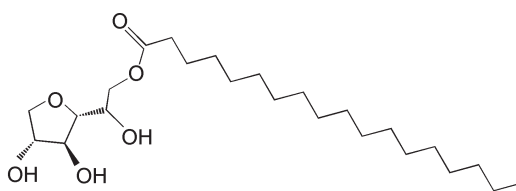
Cilj ovog rada je optimizacija sastava niozoma kako bi se sintetisao najpovoljniji transportni sistem za flurbiprofen, pogodan za transdermalni unos, kao i ispitivanje uticaja ultrazvuka na veličinu i efikasnost inkapsulacije niozoma.

Materijali i metode

Upoređene su dve modifikovane metode sa sintezu niozoma, metoda hidratacije tankog filma i metoda ubrizgavanja etra. Pri poređenju je korišćen isti odnos surfaktanta (Span 60) i holesterola. Metoda koja je pokazala veću efikasnost inkapsulacije korišćena je za sintezu niozoma u daljem istraživanju, pri čemu su od-

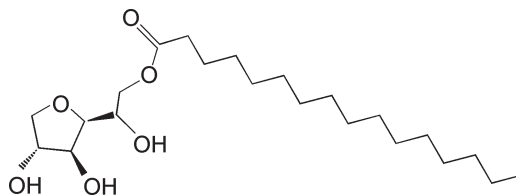
nosi surfaktanta (Span 60 i Span 40) i holesterola u sastavu niozoma varirani, a količina flurbiprofena bila nepromenjena. Veličina i efikasnost inkapsulacije određivani su i pre i nakon izlaganja suspenzija niozoma ultrazvuku. Oblik i veličina vezikula ispitivani su optičkom mikroskopijom, a veličina određivana merenjem prečnika tri puta i uzimanjem srednje vrednosti za veličinu vezikule.

Span 60 (slika 3) i Span 40 (slika 4) su bili donacija Crode GmbH (Nemačka). Flurbiprofen je bio donacija Galenike a. d. (Beograd, Srbija).



Slika 3. Span 60, sorbitan monostearat

Figure 3. Span 60, sorbitan monostearate



Slika 4. Span 40, sorbitan monopalmitat

Figure 4. Span 40, sorbitan monopalmitate

Kalibraciona kriva za flurbiprofen u PBS-u

Za pripremu pufera (pH 7.4) (Jugoslovenska farmakopeja (2000)) 2.38 g dinatrijum-hidrogen fosfata, 0.19 g kalijum-hidrogen fosfata i 8 g natrijum hlorida su rastvoreni u 1 L vode. Za određivanje apsorpcionog maksimuma spektar rastvora flurbiprofena u PBS-u koncentracije 10 µg/mL je sniman na talasnim dužinama od 200

do 400 nm. Iz početnog rastvora flurbiprofena u PBS-u (100 µg/mL) napravljena su razblaženja od 1, 2, 5, 10, 15 i 20 µg/mL i snimana su na 248 nm, sa PBS-om kao slepom probom na osnovu čega je dobijena kalibraciona kriva

$$y = 0.07563x + 0.02726 \quad (R^2 = 0.99861).$$

Kalibraciona kriva za flurbiprofen u izopropanolu

Iz početnog rastvora flurbiprofena u izopropanolu (100 µg/mL) napravljena su razblaženja od 1-10 µg/mL i snimana su na talasnoj dužini 210 nm sa izopropanolom kao slepom probom. Dobijena je kalibraciona kriva

$$y = 0.06965x + 0.0598, \quad R^2 = 0.97367.$$

Sinteza niozoma

U cilju biranja najpovoljnije metode upoređene su metode ubrizgavanja etra i hidratacije tankog filma kao dve od najčešće korišćenih metoda za sintezu niozoma:

Ubrizgavanje etra. Niozomi su sintetisani putem izmenjene Ether Injection metode. Surfaktant, holesterol (Merck) i flurbiprofen su rastvoreni u 8 mL dietil etra i metanola (2 : 1). Rastvor je ubrizgavan mikrošpicem u 5 mL PBS-a na temperaturi od 60°C. Brzo isparavanje etra dovodi do stvaranja niozoma. Fosfatni pufer 7.4 (PBS; phosphate buffer saline) je napravljen prema Jugoslovenskoj farmakopeji (2000).

Hidratacija tankog filma. Surfaktant i holesterol su rastvoreni u 10 mL hloroforma i metanola (4:1) u balonu od 100 mL. Rastvor je uparavan na vakuum uparivaču (IKA RV 10 control) na 100 rpm, i postepeno smanjivanom pritisku od 650 mbar do 450 mbar na temperaturi od 25 od 40°C do pojave tankog providnog filma (Singh 2011). Film je hidratisan na vodenom kupatilu (IKA HB 10 control) jedan sat na 60°C bez vakuuma sa 10 mL rastvora flurbiprofena u PBS-u (100 µg/mL). Šest uzoraka je stavljeno na ultrazvučno kupatilo na 2 minuta. Svi uzorci su stavljani u frižider preko noći da se dalje hidratišu i čuvani su u frižideru za dalju analizu.

Određivanje zarobljenog flurbiprofena u niozmima

Alikvoti od svih proba su centrifugirani na 14 000 rpm 30 min. Supernatant je odvojen i nio-

zomi su isprani 2 puta PBS-om i recentrifugirani. Da bi se odredio procenat leka u niozomima vezikule su razbijane izopropanolom i koncentracija leka je određivana spektrofotometrijski (Thermo Scientific Evolution 605) u UV-Vis oblasti na 210 nm.

Efikasnost inkapsulacije je određivana po formuli:

$$\text{efikasnost inkapsulacije} = \frac{C_Z}{C_U} \cdot 100\%$$

gde je C_Z – koncentracija zarobljenog leka, a C_U – ukupna koncentracija leka

Izabrana je metoda hidratacije tankog filma zato što je pokazala veću efikasnost u odnosu na metodu ubrizgavanja etra za 12% (poređene su probe Span 60 : Holesterol – 1.5 : 1 za obe metode) i ona je korišćena u daljem radu.

Određivanje veličine i oblika niozoma

Veličina i oblik niozoma određivani su putem optičke mikroskopije (Zeiss Axio Lab.A1) Fotomikrografije su analizirane u ImageJ-u. Prečnici pojedinačnih vezikula mereni su tri puta. Ukupno je izmereno 100 niozoma za svaku probu (tabela 1).

Tabela 1. Formula, količina leka i sastav niozoma (surfaktant i holesterol 150 µmol)

Surfaktant	Kod formule	Flurbiprofen [µg/mL]	Surfaktant : Holesterol
Span 60	H1	100	1 : 1
	H2	100	1.5 : 1
	H3	100	3 : 1
Span 40	H4	100	1 : 1
	H5	100	1.5 : 1
	H6	100	3 : 1
Span 60	H1 u*	100	1 : 1
	H2 u	100	1.5 : 1
	H3 u	100	3 : 1
Span 40	H4 u	100	1 : 1
	H5 u	100	1.5 : 1
	H6 u	100	3 : 1

*suspenzije niozoma izložene ultrazvuku

Rezultati i diskusija

Efikasnost inkapsulacije pokazuje da je Span 40 efikasniji u odnosu na Span 60 (slika 5). Efikasnost inkapsulacije niozoma koji u sastavu imaju Span 40 pokazuje zavisnost od količine holesterola tako da je ona srazmerna količini holesterola. Ova zavisnost kod niozoma koji u sastavu imaju Span 60 nije pokazana. U oba slučaja pokazan je negativan uticaj ultrazvuka na efikasnost inkapsulacije i veličinu niozoma. Vezikule sa odnosom holesterol : surfaktant 1 : 1 u sastavu poseduju najveću efikasnost inkapsulacije. Metodom hidratacije tankog filma dobijene su multilamelarne vezikule sa širokom distribucijom veličina. Vezikule izložene ultrazvuku su bile unilamelarne.

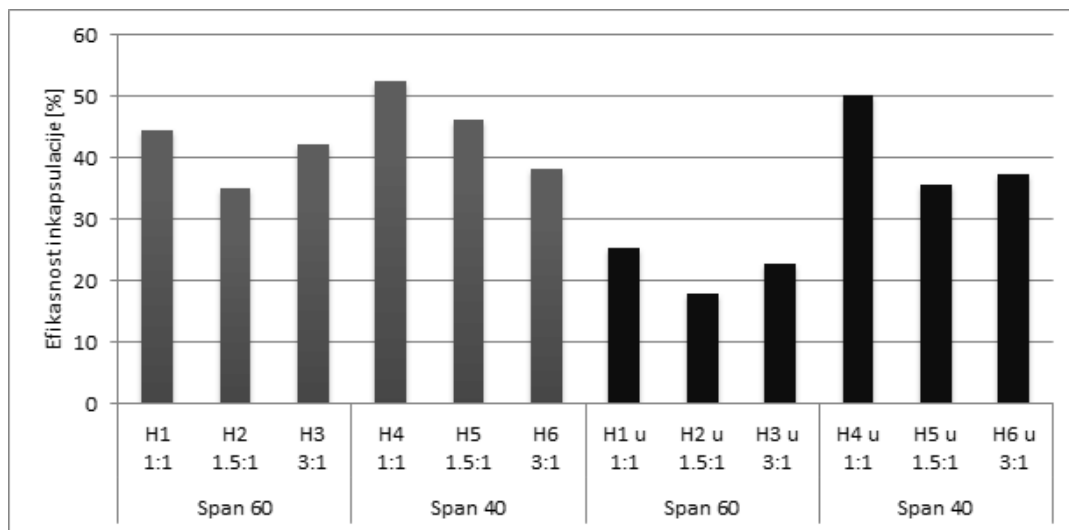
Uticaj surfaktanta na formiranje niozoma

Moguće je da je Span 60 efikasniji od Span-a 40 zbog temperature na kojoj surfaktanti menjaju fazu. Span 60 ima višu temperaturu topljenja (50 - 60°C) u odnosu na Span 40 (44 - 51°C). Visoka temperatura topljenja prouzrokuje brzo ispu-

štanje leka iz vezikula (Srnivas *et al.* 2010). Veličina niozoma se povećava sa smanjenjem HLB vrednosti (vrednost koja pokazuje koliko je surfaktant liposolubilisan odnosno hidrosolubilisan). Pretpostavlja se da je veličina niozoma određena dužinom lanca surfaktanta. Span 60 (C16) ima veći alkil lanac u odnosu na Span 40 (C14), pa su i prečnici niozoma sa Span-om 60 veći (Singh 2011) (tabela 3).

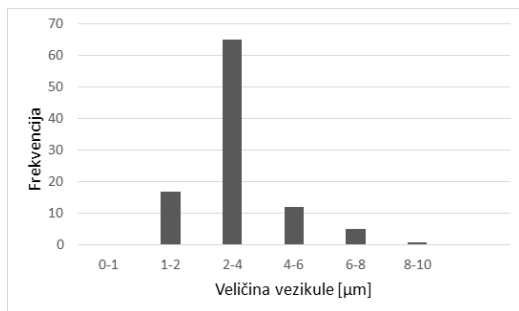
Uticaj holesterola na formiranje niozoma

Efikasnost inkapsulacije flurbiprofena u niozomima dobijenim korišćenjem Span-a 60 i holesterola nije pokazala zavisnost od sastava niozoma, ali je u ovom slučaju pokazan negativan uticaj ultrazvuka, pa je procenat efikasnosti leka sa oko 40% pao na oko 23%. Rezultati dobijeni korišćenjem Span-a 40 i holesterola za dobijanje niozoma pokazali su da efikasnost inkapsulacije raste sa povećanjem udela holesterola u vezikulama. Takođe je pokazano da veća koncentracija lipida obezbeđuje veću efikasnost inkapsulacije, kao što se navodi i u literaturi (Jadon *et al.* 2009), kao i da holesterol povećava stabilnost niozoma i



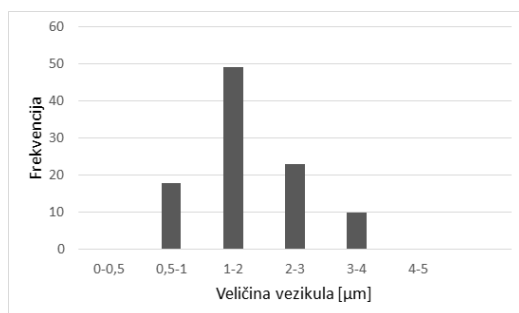
Slika 5. Efikasnost inkapsulacije niozoma sintetisanih putem metoda hidratacije tankog filma (slovom u su označene vezikule izlagane ultrazvuku)

Figure 5. Entrapment efficiency of niosomes prepared by Thin Film Hydration Method (the letter u denotes sonicated vesicles)



Slika 6a. Raspodela veličina Span 40 niozoma u molarnom odnosu 1 : 1 pre izlaganja ultrazvuku

Figure 6a. Size distribution of Span 40 niosomes in molar ratio 1 : 1 pre sonication



Slika 6b. Raspodela veličina Span 40 niozoma u molarnom odnosu 1 : 1 nakon izlaganja ultrazvuku

Figure 6b. Size distribution of Span 40 niosomes in molar ratio 1 : 1 after sonication

omogućava veći procenat inkapsulacije sprečavajući gubitak leka iz niozoma, što takođe odgovara podatku iz literature (Akhilesh *et al.* 2012). U ovom istraživanju pokazano je da odnos holesterol : surfaktant 1:1 poseduje najveću efikasnost inkapsulacije, koja je pokazana i u literaturi (Jadon *et al.* 2009) (slika 5). Niozomi sa najvećom efikasnošću (53%) inkapsulacije flurbiprofena bili su oni dobijeni mešanjem Span-a 40 i holesterola u odnosu 1 : 1.

Veličina i oblik niozoma

Metodom hidratacije tankog filma dobijeni su sferni niozomi sa širokom distribucijom veli-

čina (tabela 3). Ovi niozomi imaju multilamelarnu strukturu. Niozomi podvrgnuti ultrazvuku su unilamelarni, uniformniji i manji od niozoma koji nisu tretirani ultrazvukom, što se navodi i u literaturi (Nasir *et al.* 2012), kako je prikazano na slici 7 (b) i (d). Najveći broj vezikula pre izlaganja ultrazvuku imao je prečnike između 2 i 4 μm, a nakon izlaganja ultrazvuku duplo manje (slike 6 a i b). Shodno tome imaju i manju efikasnost inkapsulacije (slika 5).

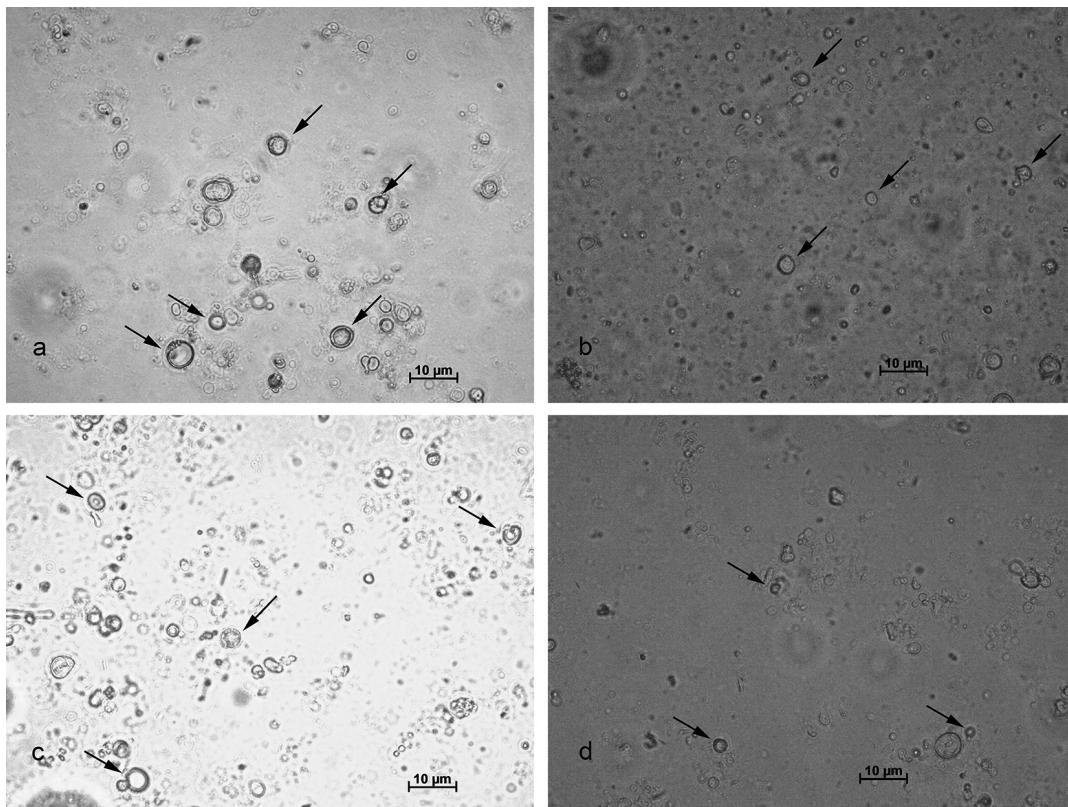
Tabela 3. Veličina vezikula

Surfaktant	Kôd formule	Veličina vezikule (M±SD)* [μm]
Span 60	H1	6±2
	H2	7±4
	H3	3.4±1.6
Span 40	H4	3.2±1.4
	H5	2.7±1.5
	H6	2.3±1.4
Span 60	H1 u	5.1±1.7
	H2 u	1.4±0.6
	H3 u	1.9±0.9
Span 40	H4 u	1.8±0.8
	H5 u	1.7±0.7
	H6 u	2±1

* Srednja vrednost ± standardna devijacija

Zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da je modifikovana metoda hidratacije tankog filma pogodna za sintetisanje sfernih niozoma sa velikom distribucijom veličina. Razbijanjem multilamelarnih do unilamelarnih vezikula na ultrazvučnom kupatilu smanjuje se veličina niozoma i dobijaju se uniformne vezikule približne veličine. Najveći procenat inkapsulacije (53%) postignut je sa niozomima sintetisanim sa Span-om 40 (Span 40 : Holesterol 1 : 1). Veća količina lipida povećava efikasnost inkapsulacije, a holesterol povećava lipofilnost niozoma i samim tim povećava i



Slika 7.

- (a) H3 (Span 60: Holesterol 3 : 1);
- (b) H3 u (Span 60: Holesterol 3 : 1);
- (c) H4 (Span 40: Holesterol 1 : 1);
- (d) H4 u (Span 40 : Holesterol 1 : 1).

Strelice ukazuju na neke od vezikula. Na slikama (a) i (c) su niozomi koji nisu izloženi ultrazvuku, a na (b) i (d) se nalaze niozomi nakon izlaganja ultrazvuku. Prečnici niozoma su manji nakon izlaganja ultrazvuku.

Figure 7.

- (a) H3 (Span 60: Cholesterol 3 : 1);
- (b) H3 u (Span 60: Cholesterol 3 : 1);
- (c) H4 (Span 40: Cholesterol 1 : 1);
- (d) H4 u (Span 40 : Cholesterol 1 : 1).

Arrows indicate some of the vesicles. Pictures (a) and (c) show niosomes which were not sonicated whereas pictures (b) and (d) show sonicated niosomes. Vesicle diameters are smaller after sonication.

efikasnost inkapsulacije sprečavajući gubitak leka iz niozoma. Imajući u vidu dobijene rezultate otvaraju se mogućnosti za dalje istraživanje koje se tiče karakterizacije niozoma, njihove stabilnosti i *in vitro* oslobađanja leka iz niozoma.

Zahvalnost. Posebnu zahvalnost dugujem mom mentoru dr Nenadu Milosaviću na nesebičnoj pomoći i podršci. Takođe se zahvaljujem Ivanu Mrkiću, doktorantu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći u izvođenju eksperimenta.

Literatura

Akhilesh D., Bini K. B., Kamath J. V. 2012. Review on Span-60 Based Non-Ionic Surfactant vesicles (Niosomes) as Novel Drug Delivery System. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **3** (1): 7.

Das M. K., Palei N. N. 2011. Sorbitan Esters niosomes for topical niosomal delivery of rofecoxib. *Indian Journal of Experimental Biology*, **49**: 438.

Jadon P. S., Gajbhiye V., Jadon R. S., Gajbhiye K. R., Ganesh N. 2009. Enhanced Oral Bioavailability of Griseofulvin via Niosomes. *AAPS PharmSciTech*, **10** (4): 1186.

Jigar V., Puja V., Krutika S. 2011. Formulation and evaluation of topical niosomal gel of erythromycin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3** (1): 123.

Kumar A., Pal J. L., Jaiswal A., Singh V. 2011. Review on niosomes as novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy*, **2** (5): 61.

Leombo D. I., Cavalli R. 2010. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs, Review. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **21**: 53.

Lingan M. A., Sathali A. H., Kumar V. M. R., Gokila A. 2011. Formulation and evaluation of topical drug delivery containing clobetasol propionate niosomes. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, **1** (1): 7.

Madhav N., Saini A. 2013. Niosomes, A novel drug delivery system. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, **1**: 498.

Nasir A., Harikumar S. L., Amanpreet K. 2012. Niosomes: An Excellent tool for drug delivery. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, **2** (2): 479-487

Prajapati S. K., Kumar S., Sahu V. K., Prakash G. 2012. Proniosomal gel of flurbiprofen: formulation and evaluation. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **2** (1): 105

Singh C. H., Jain C. P., Kumar B. N. 2011. Formulation, characterization, stability and

invitro evaluation of nimesulide niosomes. *Pharmacophore*, **2** (3): 168.

Srnivas S., Anand Kumar Y., Hemanth A., Anitha M. 2010. Preparation and evaluation of niosomes containing Aceclofenac. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **5** (1): 249.

Yasin M. N., Hussain S., Malik F., Hameed A., Sultan T., Qureshi F., Riaz H., Parveen G., Wajid A. 2012. Preparation and characterization of chloramphenicol niosomes and comparison with chloramphenicol eye drops (0.5% w/v) in experimental conjunctivitis in albino rabbits. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **25** (1): 117.

Ana Urošević

Determination of the Most Suitable Formula of Niosomes as a Drug Delivery System for Flurbiprofen

Niosomes are non-ionic surfactant vesicles that are microscopic in size. They can have either unilamellar or multilamellar structure. Non-ionic surfactant vesicles represent a novel drug delivery system as carriers for both hydrophilic and lipophilic drugs. The objective of this study was to optimize the niosomal formula as a carrier for the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) Flurbiprofen. Niosomes were prepared by the modified Thin Film Hydration method in terms of temperature and pressure. Different molar ratios of non-ionic surfactants (Span 40 and Span 60) and cholesterol were used in niosomal preparation. The effect of sonication on vesicle size, shape and entrapment efficiency was also studied. Vesicle shape and size were determined by means of optical microscopy. Furthermore, Entrapment Efficiency was investigated for different niosomal formulations. The highest entrapment efficiency (52.58%) was obtained with Span 40 niosomes (molar ratio of surfactant : cholesterol – 1 : 1). Sonication reduces the size of vesicles thus lowering the entrapment efficiency. 