

Parenteralne nanoemulzije diazepama: fizičko-hemijska karakterizacija i *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja

Sanela Đorđević¹, Tanja Isailović¹, Nebojša Cekić^{2,3}, Gordana Vuleta¹, Snežana Savić^{1,*}

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Nišu - Tehnološki fakultet, Bulevar Oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija

³ DCP Hemigal d.o.o., Tekstilna 97, 16000 Leskovac, Srbija

* Autor za korespondenciju: Dr Snežana Savić, vanredni profesor

Tel.: +381 11 3951 366 E-mail: snexs@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Cilj ovog istraživanja bio je da se razviju parenteralne nanoemulzije sa rastućom koncentracijom uljane faze (20, 30 i 40% smeše triglicerida srednje dužine lanca i sojinog ulja u odnosu 4:1), stabilizovane kombinacijom lecitina i polisorbata 80, i da se proceni njihova pogodnost kao nosača za slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance. U tu svrhu, homogenizacijom pod visokim pritiskom izrađene su nanoemulzije sa diazepamom kao model lekovitom supstancom i okarakterisane u pogledu veličine kapi, indeksa polidisperznosti, površinskog naelektrisanja, viskoziteta, pH vrednosti i električne provodljivosti. Takođe, primenom reverzne tehnike sa dijaliznim vrećicama procenjena je brzina oslobađanja diazepama iz razvijenih nanoemulzija, uz karakterizaciju dobijenih profila oslobađanja primenom različitih matematičkih modela. Nakon izrade, sve formulacije imale su malu prosečnu veličinu kapi (206 ± 7 nm), sa uskom raspodelom veličina ($0,116 \pm 0,012$) i zeta potencijalom oko -50 mV, što je u skladu sa farmakopejskim zahtevima (USP 39–NF 34) pri čemu se vrednosti navedenih parametara nisu značajno promenile nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja pokazalo je da se 40–50% diazepama oslobodi iz ispitivanih nanoemulzija tokom 1 h, pri čemu se kinetika oslobađanja može opisati Korsmeyer–Peppas modelom. Dobijeni rezultati ukazuju da formulisane parenteralne nanoemulzije predstavljaju obećavajuće nosače za brzu isporuku slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci.

Ključne reči: nanoemulzija; parenteralna primena; diazepam; stabilnost; reverzna tehnika sa dijaliznim vrećicama.

UVOD

Ulje-u-vodi (U/V) nanoemulzije sa veličinom kapi u submikronskom opsegu, najčešće 200–400 nm, više od pola veka bezbedno se koriste u parenteralnoj ishrani za isporuku esencijalnih masnih kiselina i velike količine energije (pr. Lipofundin[®], Intralipid[®], Lipovenös[®]). Imajući u vidu dobro dokumentovanu biokompatibilnost, biodegradabilnost, fizičku stabilnost i relativno jednostavnu proizvodnju, poslednjih godina postoji sve veće interesovanje za razvoj nanoemulzija kao obećavajućih nosača lekovitih/biološki aktivnih supstanci za različite puteve primene, posebno za parenteralnu primenu (1,2). Primeri klinički odobrenih lipidnih nanoemulzija za intravensku isporuku lipofilnih lekovitih supstanci prikazani su u Tabeli I (3).

Tabela I Primeri registrovanih nanoemulzija za intravensku primenu slabo rastvorljivih lekovitih supstanci (3).

Table I A representative list of marketed nanoemulsions for intravenous delivery of poorly water-soluble drugs (3).

Lekovita supstanca	Zaštićeni naziv preparata	Proizvođač	Indikacije/Upotreba
Diazepam	Diazemuls [®]	Kabi-Pharmacia, Švedska	Ekscitacija, anksioznost, napetost, sedacija, mišićni spazam, konvulzije, tetanus, delirijum
	Diazepam-Lipuro [®]	Braun, Nemačka	
	Dizac [®]	Ohmeda Pharmaceuticals, SAD	
Etomidat	Etomidat-Lipuro [®]	Braun, Nemačka	Opšta anestezija
Propofol	Diprivan [®]	Zeneca Pharmaceuticals, SAD	Opšta anestezija
Deksametazon-palmitat	Limethason [®]	Green Cross, Japan	Hronični reumatoidni artritis
Flurbiprofen-aksetil	Lipo-NSAID [®] Ropion [®]	Kaken Pharmaceutical Co., Japan	Postoperativni i kancerski bol
Alprostadil (PGE1)	Liple [®]	Green Cross, Japan	Oboljenja perifernog vaskularnog sistema, otvoreni <i>ductus arteriosus</i> , Impotencija
Perfluorodekalin, perfluorotripropilamin	Fluosol-DA [®]	Green Cross, Japan	Veštački supstituenti krvi

Uzimajući u obzir karakteristike formulacije i fizičko-hemijska svojstva, prednosti nanoemulzija kao nosača lekovitih supstanci su niska koncentracija surfaktanta, ujednačena i veoma mala veličina kapi, nizak viskozitet i visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance. Dodatno, poboljšana penetracija kroz biološke barijere, povećanje biološke raspoloživosti, smanjenje iritacije i/ili toksičnosti, produženo oslobađanje i ciljna isporuka lekovite supstance u različite organe mogu se očekivati nakon primene nanoemulzionih sistema (4–6). Na osnovu navedenih činjenica, ne iznenađuje da nanoemulzije predstavljaju privlačnu alternativu za savladavanje krvno-moždane barijere i poboljšanu isporuku slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci (kakav je diazepam) u mozak, parenteralnim putem, naročito u urgentnim stanjima i kada postoje problemi sa gutanjem.

U skladu sa načinom primene, parenteralne nanoemulzije izrađuju se iz visoko bezbednih i biokompatibilnih ulja (sojino, trigliceridi srednje dužine lanca, suncokretovo, maslinovo, riblje) i emulgatora (fosfolipidi, polisorbati, poloksameri), najčešće metodom homogenizacije pod visokim pritiskom (6,7). Komercijalno dostupni preparati nanoemulzija uglavnom sadrže 10 ili 20% uljane faze; povećanje udela ulja omogućilo bi inkorporiranje veće količine liposolubilne lekovite supstance, a otuda i smanjenje volumena injektovanja ili infuzije. Međutim, visoka koncentracija ulja može imati za posledicu povećanje veličine kapi i viskoziteta nanoemulzionog sistema, što dalje može kompromitovati podnošljivost primene i bezbednost pacijenta (1,8). S tim u vezi, Američka farmakopeja u monografiji <729> navodi da tokom roka upotrebe prosečna veličina kapi parenteralnih nanoemulzija treba da bude ≤ 500 nm, a zapreminski procenat uljanih kapi većih od $5 \mu\text{m}$ (PFAT₅) $\leq 0,05\%$ (9,10).

Cilj ovog istraživanja bio je da se razviju parenteralne nanoemulzije sa većim kapacitetom za inkorporiranje lekovite supstance i da se kroz sistematičnu fizičko-hemijsku i biofarmaceutsku karakterizaciju proceni njihova pogodnost kao nosača za slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance. U tu svrhu, metodom homogenizacije pod visokim pritiskom izrađene su nanoemulzije sa lekovitom supstancom, stabilizovane kombinacijom lecitina i polisorbata 80, variranjem sadržaja uljane faze – 20, 30 i 40% smeše triglicerida srednje dužine lanca i sojinog ulja u odnosu 4:1. Diazepam, referentni benzodiazepin koji se uobičajeno koristi u prekliničkim ispitivanjima novih psihofarmakoloških lekova, inkorporiran je u nanoemulzije kao model lipofilne, u vodi slabo rastvorljive lekovite supstance. U istraživanju je praćen uticaj rastuće koncentracije uljane faze na veličinu i raspodelu veličina kapi, površinsko naelektrisanje, viskozitet i stabilnost razvijenih nanoemulzija tokom godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Dodatno, u cilju predviđanja *in vivo* ponašanja i ispitivanja kinetike mehanizma oslobađanja diazepama inkorporiranog u nanoemulzije, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja diazepama iz

razvijenih nanoemulzija primenom reverzne tehnike sa dijaliznim vrećicama, uz karakterizaciju dobijenih profila oslobađanja primenom različitih matematičkih modela.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijali

Za izradu nanoemulzija korišćeni su: diazepam (Galenika a.d., Srbija); trigliceridi srednje dužine lanca (engl. medium-chain triglycerides, MCT) (Fagron GmbH & KG, Nemačka); sojino ulje (Lipoid Purified Soybean Oil 700), sojin lecitin (Lipoid® S75, fosfolipidi soje koji sadrže 70% fosfatidilholina) (Lipoid GmbH, Nemačka); butilhidroksitoluen (BHT), polisorbat 80 (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka); glicerol (Merck KGaA, Nemačka); natrijum hidroksid, kalijum dihidrogen fosfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka); sveže dobijena ultračista voda (TKA GenPure, TKA Wasseranbereitungssysteme GmbH, Nemačka).

Metode

Izrada nanoemulzija

Na osnovu prethodno sprovedenih ispitivanja (11), odabrane formulacije nanoemulzija sa diazepamom kao model lekovitom supstancom i rastućom koncentracijom uljane faze – 20, 30 i 40% (DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40, respektivno), izrađene su metodom homogenizacije pod visokim pritiskom (hladni postupak). Sve nanoemulzije izrađene su sa smešom MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1 kao uljanom fazom, fosfatnim puferom (0,01 M, pH 8) kao vodenom fazom, dok su lecitin i polisorbat 80 u odnosu 1:1 upotrebljeni kao emulgatori, pri čemu je maseni odnos uljane faze i emulgatora u svim formulacijama bio konstantan (5:1).

Uljana i vodena faza pripremljene su odvojeno. U uljanoj fazi rastvoreni su lecitin i 0,05% BHT (antioksidans) zagrevanjem na 70°C na magnetnoj mešalici (RH basic 2 IKAMAG®; IKA® Werke GmbH & Company KG, Nemačka). Ova faza je zatim ohlađena na 25°C i u njoj rastvoren diazepam (2 mg/g nanoemulzije). U vodenoj fazi (25°C) rastvoreni su polisorbat 80 i 2,5% glicerola (sredstvo za izotonizaciju). Vodena faza je zatim dodata u uljanu fazu i izrađena preemulzija mešanjem na rotor-stator homogenizatoru (IKA Ultra-Turrax® T25 digital; IKA® Werke GmbH & Company KG) 3 min, pri brzini od 8000 obrtaja/min, na 25°C. Da bi se dobila finalna nanoemulzija, ovako izrađena gruba emulzija propuštena je kroz homogenizator pod visokim pritiskom (EmulsiFlex-C3; Avestin Inc., Kanada) 9 puta, pri pritisku od 500 bar i temperaturi od 25°C. Dobijene nanoemulzije filtrirane su pod aseptičnim uslovima kroz membranski filter (0,22 µm) i čuvane u dobro zatvorenim staklenim bočicama na 25 ±

2°C, a 24 h nakon izrade, sprovedena je njihova sveobuhvatna karakterizacija. Sva merenja izvedena su u triplikatu za svaki uzorak.

Karakterizacija nanoemulzija

Analiza veličine kapi. Prosečna veličina kapi (engl. intensity-weighted mean diameter, Z-average diameter – Z-Ave) i raspodela veličina kapi (indeks polidisperznosti, PDI) nanoemulzija određene su tehnikom foton korelacione spektroskopije primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Da bi se umanjio uticaj gustine i viskoziteta nanoemulzija na rezultate merenja, uzorci nanoemulzija su pre merenja razblaženi 0,01 M fosfatnim puferom (1:500, v/v). Merenje je sprovedeno na 25°C, pod uglom rasipanja svetlosti od 90°, primenom He–Ne lasera na 633 nm.

Mikroskopska analiza. U cilju detekcije eventualnog prisustva većih mikrometarskih kapi, agregata kapi ili nerastvorenih kristala model lekovite supstance, uzorci nanoemulzija posmatrani su pod svetlosnim/polarizacionim mikroskopom Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 (Zeiss, Nemačka) integrisanim sa AxioCam ICc1 digitalnom kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom.

Analiza zeta potencijala. Površinsko naelektrisanje kapi nanoemulzija određeno je primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.), merenjem elektroforetske pokretljivosti kapi u električnom polju koja se softverski prevodi u zeta potencijal. Merenje je sprovedeno na 25°C, odmah nakon razblaživanja uzoraka ultračistom vodom (1:500, v/v) čija je provodljivost podešena na 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ dodatkom rastvora elektrolita (0,1 M fosfatni pufer).

Reološka analiza. Reološko ponašanje nanoemulzija procenjeno je primenom rotacionog reometra (DV-III ULTRA Programmable Rheometer; Brookfield Engineering Laboratories, Masačusets), upotrebom CP40 konus–ploča mernog sistema. Merenja su izvedena na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pri brzini rotiranja konusa od 25 do 250 obrtaja/min. Vrednosti prividnog viskoziteta, očitane sa krivih viskoziteta pri brzini rotiranja konusa od 200 obrtaja/min, korišćene su za karakterizaciju uzoraka nanoemulzija.

Merenje pH vrednosti. pH vrednost izrađenih nanoemulzija merena je direktnim uranjanjem elektrode pH metra (HI 9321; Hanna Instruments Inc., Mičigen) u ispitivani uzorak, na $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Merenje električne provodljivosti. Električna provodljivost nanoemulzija merena je direktnim uranjanjem elektrode konduktometra (sensIONTM + EC71; ShangHai Shilu Instruments Co., Ltd., Kina) u uzorak nanoemulzije, na $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

U cilju procene dugoročne stabilnosti izrađenih nanoemulzija, sprovedena su merenja veličine kapi, indeksa polidisperznosti, zeta potencijala, viskoziteta, pH vrednosti i električne provodljivosti primenom prethodno opisanih metoda, inicijalno (jedan dan nakon izrade), i ponovljena nakon godinu dana čuvanja uzoraka na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / $55 \pm 5\%$ RH.

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja diazepama iz formulisanih nanoemulzija sprovedeno je primenom *bulk equilibrium* reverzne tehnike sa dijaliznim vrećicama. Dijalizne vrećice (celulozna membrana, Mr *cut-off* 12000) napunjene sa 5 mL medijuma – akceptorska faza – uronjene su u 350 mL istog medijuma u kome je, nakon uspostavljanja ravnoteže, dispergovano 3 mL ispitivane nanoemulzije diazepama – donorska faza. Kao medijum je korišćena smeša fosfatnog pufera pH 7,4 (USP) i metanola u odnosu 80:20, a studije oslobađanja izvedene su na temperaturi od $37 \pm 1^\circ\text{C}$, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, kako bi se simulirali *in vivo* uslovi. U definisanim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 40, i 60 min) izvršeno je uzorkovanje sadržaja dijalizne vrećice i iste zapremine okolnog medijuma, a koncentracija oslobođenog diazepama u uzorcima određena UV spektrofotometrijski primenom Evolution 300 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, SAD) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije diazepama ($\lambda = 230$ nm). Kinetika oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija procenjena je primenom različitih matematičkih modela (nultog reda, prvog reda, Higuchi, Baker–Lonsdale, Korsmeyer–Peppas) pomoću DDSolver paketa za Microsoft Excel aplikacije.

Statistička analiza

Statistička analiza razlika u izmerenim fizičko-hemijskim parametrima nanoemulzija izvršena je primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (za tri grupe podataka) ili Student *t*-testa (za dve grupe podataka) (PASW Statistics v.18.0; SPSS Inc., Illinois), dok je poređenje profila oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija izvršeno primenom univarijantne ANOVA. *P* vrednost $< 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

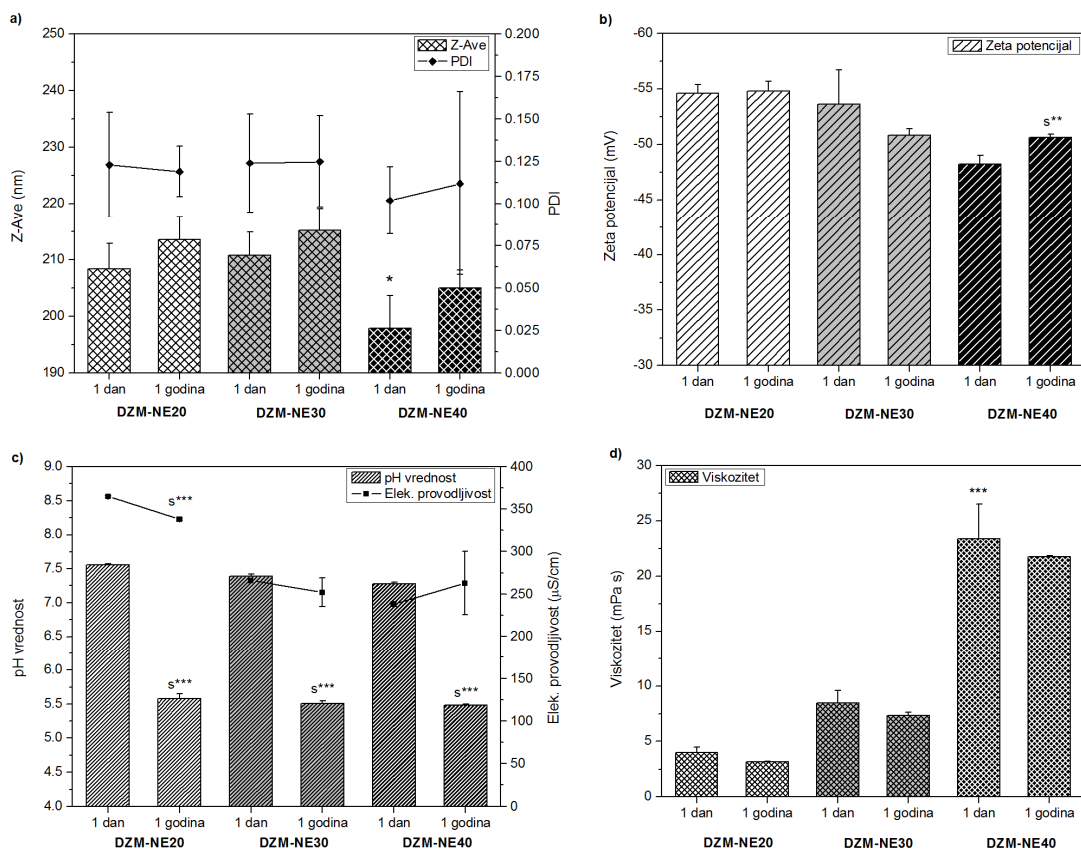
REZULTATI I DISKUSIJA

Izrada i karakterizacija nanoemulzija

Nakon izbora odgovarajuće uljane faze, vodene faze i emulgatora (11), metodom homogenizacije pod visokim pritiskom na hladno (kako bi se izbegla kristalizacija i precipitacija lekovite supstance) izrađene su tri formulacije nanoemulzija diazepama – DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40, variranjem sadržaja uljane faze na 20, 30 i 40%, respektivno. Nakon izrade, sve nanoemulzije bile su tečne, homogene, mlečnobeke sa plavičastim odsjajem. Reprezentativni fizičko-hemijski parametri razvijenih nanoemulzija (Z-Ave, PDI, ZP, viskozitet, pH vrednost i električna provodljivost) jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}/55 \pm 5\% \text{RH}$ prikazani su na Slikama 1a–1d.

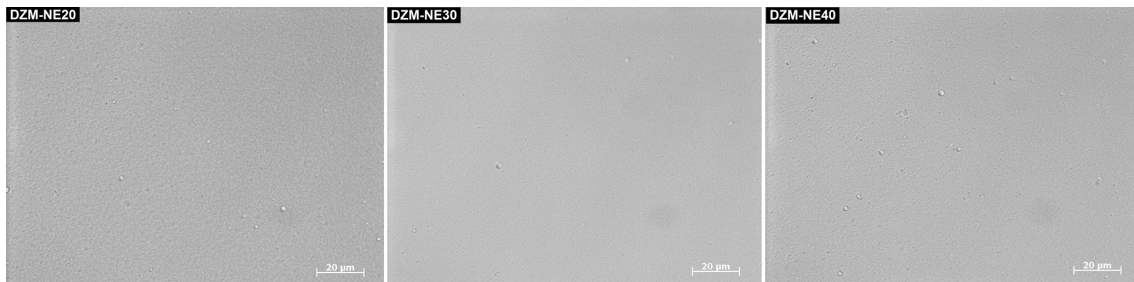
Veličina kapi i raspodela veličina kapi jedne su od najvažnijih karakteristika parenteralnih nanoemulzija; predstavljaju kritične parametre ne samo sa aspekta kvaliteta i stabilnosti emulzionog sistema, već i sa aspekta bezbednosti pacijenta (kapi veće od $5 \mu\text{m}$ mogu da izazovu plućnu emboliju). Osim toga, sudbina emulzionih kapi u organizmu (engl. *in vivo* fate), određena je, između ostalog, njihovom veličinom i raspodelom veličina (4,5,7,8). Prosečna veličina kapi komercijalno dostupnih lipidnih emulzija za parenteralnu ishranu kreće se oko 200 do 300 nm (1), a generalno je poželjno da bude manja od $1 \mu\text{m}$ (12), odnosno 500 nm (13), dok se za PDI, koji predstavlja meru za širinu distribucije kapi po veličini i ukazuje na homogenost disperzije, vrednost manja od 0,25 smatra prihvatljivom (14).

Analiza veličine kapi sprovedena u ovoj studiji (Slika 1a) pokazuje da su jedan dan nakon izrade sve formulacije nanoemulzija diazepama imale prosečnu veličinu kapi, merenu foton korelacionom spektroskopijom, u nanometarskom opsegu (Z-Ave $206 \pm 7 \text{ nm}$), sa relativno uskom raspodelom veličina (PDI $0,116 \pm 0,012$), u skladu sa kriterijumima parenteralnog puta primene. Da bi se detektovalo eventualno prisustvo male frakcije kapi većih od $1 \mu\text{m}$, kao dodatna metoda za procenu veličine kapi primenjena je svetlosna mikroskopija. Slika 2 prikazuje primere mikrografija nanoemulzija diazepama sa 20, 30 i 40% uljane faze, na kojima se može videti svega nekoliko većih kapi u opsegu od 2 do $4 \mu\text{m}$, pri čemu je njihov broj sličan za sve tri ispitivane nanoemulzije, što ukazuje na zadovoljavajući kvalitet za parenteralnu primenu (1) kako nanoemulzije sa 20%, tako i nanoemulzija sa većim sadržajem ulja (30 i 40%). Pored toga, imajući u vidu da intravenska primena viskoznih sistema može biti udružena sa bolom (8), nizak prividni viskozitet ispitivanih nanoemulzija diazepama ($12 \pm 9 \text{ mPa s}$, Slika 1d), kao i pH vrednost od $7,4 \pm 0,1$ (Slika 1c), dodatno potvrđuju da su razvijene nanoemulzije sa 20, 30 i 40% uljane faze pogodne za parenteralnu primenu i isporuku lekovitih supstanci.



Slika 1. Reprezentativni fizičko-hemijski parametri parenteralnih nanoemulzija diazepam sa 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40) uljane faze jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); * $p < 0,05$, DZM-NE40 vs. DZM-NE30 jedan dan nakon izrade (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,324$, $p = 0,027$); * $p < 0,001$, DZM-NE40 vs. DZM-NE20/DZM-NE30 jedan dan nakon izrade (ANOVA, $F_{(2,6)} = 80,69$, $p < 0,001$); ^{S**} $p < 0,01$, u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade; ^{S***} $p < 0,001$, u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade.**

Figure 1. Representative physicochemical parameters of diazepam-loaded parenteral nanoemulsions containing 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) and 40% (DZM-NE40) of oil phase one day after preparation and after one year of storage at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (mean \pm standard deviation, $n = 3$); * $p < 0.05$, DZM-NE40 vs. DZM-NE30 one day after preparation (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6.324$, $p = 0.027$); * $p < 0.001$, DZM-NE40 vs. DZM-NE20/DZM-NE30 one day after preparation (ANOVA, $F_{(2,6)} = 80.69$, $p < 0.001$); ^{S**} $p < 0.01$, compared to the same sample one day after preparation; ^{S***} $p < 0.001$, compared to the same sample one day after preparation.**



Slika 2. Svetlosne mikrografije nanoemulzija diazepama sa sadržajem uljane faze od 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40), pod uveličanjem 400x.

Figure 2. Light microscopy pictures of diazepam-loaded nanoemulsions with oil content of 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) and 40% (DZM-NE40), magnification 400-fold.

Pored veličine kapi, ZP je druga važna karakteristika nanoemulzija i veoma dobar pokazatelj stabilnosti nanoemulzionog sistema. Visoke apsolutne vrednosti ZP dovode do elektrostatičkog odbijanja kapi emulzije čime se povećava njihova stabilnost na koalescenciju (4,8). Generalno je prihvaćeno da apsolutne vrednosti ZP veće od 30 mV ukazuju na dobru fizičku stabilnost, dok vrednosti iznad 60 mV ukazuju na veoma dobru stabilnost koloidnog sistema (1). Kao što se može videti na Slici 1b, sve tri formulacije nanoemulzija diazepama sa 20–40% uljane faze imale su, jedan dan nakon izrade, vrednost ZP oko -50 mV, slično parenteralnim emulzijama prisutnim na tržištu (1). To znači da lecitin sa svojim negativno naelektrisanim fosfolipidima na pH formulacije, u prisustvu polisorbata 80 kao kostabilizatora, može da proizvede dovoljno veliko negativno površinsko naelektrisanje kapi (15), koje potencijalno može da obezbedi dobru dugoročnu stabilnost razvijenih parenteralnih nanoemulzija diazepama.

Dobro je poznato da parametri formulacije (vrsta i koncentracija ulja i emulgatora), parametri procesa izrade (temperatura, pritisak, i broj ciklusa homogenizacije), kao i inkorporiranje lekovite supstance u unutrašnju, uljanu fazu nanoemulzije, mogu značajno da utiču na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzionog sistema (4–6,11). Tako se povećanjem udela uljane faze može povećati solubilizacioni kapacitet nanoemulzije za lipofilne lekovite supstance. Međutim, što je veća koncentracija ulja očekuje se veća veličina kapi nanoemulzije (5,8). S tim u vezi, kod parenteralnog puta primene treba biti posebno obazriv, odnosno osigurati da prosečna veličina kapi, kao i udeo većih kapi, u nanoemulzijama sa većim sadržajem uljane faze ($> 20\%$) budu u skladu sa farmakopejskim zahtevima (USP 39).

Jedan od ciljeva sprovedenog istraživanja bio je da se ispita korelacija između rastuće koncentracije uljane faze (20, 30 i 40%) i fizičko-hemijskih karakteristika, pre

svega veličine kapi i viskoziteta kao ograničavajućeg faktora injektabilnosti, razvijenih nanoemulzija za parenteralnu primenu diazepama. Rezultati pokazuju da je prosečna veličina kapi ispitivanih nanoemulzija ostala manje ili više ista, nezavisno od koncentracije uljane faze, odnosno zapaženo je neznatno, mada statistički značajno (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,324$; $p = 0,031$) smanjenje prosečne veličine kapi pri povećanju koncentracije ulja sa 30 na 40% (Slika 1a).

Pošto su sve nanoemulzije izrađene pod istim uslovima (500 bar, 25°C, devet ciklusa), ista količina energije primenjena je na veću količinu uljane faze koja treba da bude dispergovana, te bi se teorijski očekivalo da se veličina kapi poveća sa povećanjem sadržaja uljane faze (1). Međutim, pokazano je da ako se maseni odnos emulgatora/stabilizatora i dispergovane, uljane faze drži konstantnim, tj. ako se sa povećanjem koncentracije uljane faze povećava i koncentracija emulgatora, onda u sistemu dolazi do smanjenja međupovršinskog napona i nastanka manjih kapi (16). Ovo zapažanje delimično je potvrđeno u sprovedenom istraživanju (Slika 1a). Dodatno, nije bilo statistički značajne razlike u pogledu PDI i ZP između nanoemulzija sa različitom koncentracijom uljane faze (Slike 1a i 1b).

Na Slici 1d mogu se videti promene prividnog viskoziteta ispitivanih nanoemulzija diazepama sa rastućom koncentracijom uljane faze. Naime, povećanje koncentracije uljane faze sa 20 na 30% dovelo je do značajnog povećanja viskoziteta nanoemulzije, koji je postao još veći sa povećanjem koncentracije ulja na 40% (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,324$; $p < 0,001$). Međutim, ove vrednosti viskoziteta su i dalje dovoljno niske, što se verovatno može objasniti malom veličinom kapi u nanometarskom opsegu (1), da se dobijene nanoemulzije mogu primeniti parenteralnim putem.

Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

Stabilnost nanoemulzija je složeno pitanje i zavisi od brojnih faktora kao što su sastav, metod izrade, uslovi čuvanja (pr. temperatura, svetlost) (6). Ako se obezbedi odgovarajuća pH vrednost sistema, emulzije stabilizovane fosfolipidima mogu biti relativno stabilne pod ambijentalnim uslovima; rok upotrebe komercijalno dostupnih parenteralnih emulzija obično iznosi dve godine (17). U cilju procene dugoročne stabilnosti razvijenih parenteralnih nanoemulzija diazepama, uzorci izrađenih nanoemulzija čuvani su u dobro zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom krimp kapičicom tokom godinu dana na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ i praćeni u pogledu Z-Ave, PDI, ZP, viskoziteta, pH vrednosti i električne provodljivosti (Slike 1a–1d).

Veličina kapi i površinsko naelektrisanje smatraju se najreprezentativnijim parametrima u kontroli stabilnosti nanoemulzija. Povećanje veličine kapi je zapravo prvi indikator nestabilnosti emulzionog sistema (1,16). Na osnovu analize veličine (Z-Ave) i raspodele veličina kapi (PDI) može se zaključiti da su sve ispitivane

nanoemulzije diazepama bile fizički stabilne nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bez značajnih promena u navedenim parametrima (Slika 1a). PDI je bio manji od 0,15 što ukazuje na relativno homogenu raspodelu kapi i potvrđuje da nije došlo do značajnog procesa agregacije u ispitivanim sistemima.

U prilog ovim nalazima idu i rezultati merenja ZP (Slika 1b). Kao što je već objašnjeno, veliko površinsko naelektrisanje kapi smatra se jednim od ključnih parametara u održavanju stabilnosti nanoemulzija. Brojni faktori kao što su pH, jonska jačina, vrsta i koncentracija emulgatora, i prisustvo elektrolita mogu da utiču na ZP emulzionog sistema (5). Nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, vrednosti ZP izrađenih nanoemulzija diazepama bile su gotovo nepromenjene. Jedino su kod nanoemulzije sa 40% uljane faze (DZM-NE40) zabeležene nešto negativnije vrednosti ZP u odnosu na vrednosti dobijene jedan dan nakon izrade (*t*-test, $p < 0,01$). Ovako visoke negativne vrednosti ZP potvrđuju, dakle, dobru fizičku stabilnost razvijenih parenteralnih nanoemulzija diazepama. Takođe, rezultati dobijeni reološkom analizom pokazuju da u toku godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nije došlo do značajnih promena viskoziteta ispitivanih nanoemulzija (Slika 1d).

Slika 1c pokazuje promene pH vrednosti i električne provodljivosti nanoemulzija diazepama u toku čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Kod svih formulacija došlo je do značajnog opadanja pH vrednosti u funkciji vremena čuvanja (*t*-test, $p < 0,001$), što je verovatno posledica oslobađanja slobodnih masnih kiselina usled hidrolize lecitina i triglicerida iz uljane faze. Formiranje lizolecitina i slobodnih masnih kiselina se takođe smatra odgovornim i za uočeno povećanje ZP (negativnije vrednosti) nanoemulzija tokom čuvanja (6,18). Takođe, kod svih nanoemulzija zapažene su izvesne promene u električnoj provodljivosti, sa statistički značajnom razlikom jedino kod nanoemulzije sa 20% uljane faze (DZM-NE20) (*t*-test, $p < 0,001$), pri čemu nije bilo znakova inverzije faza.

***In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja**

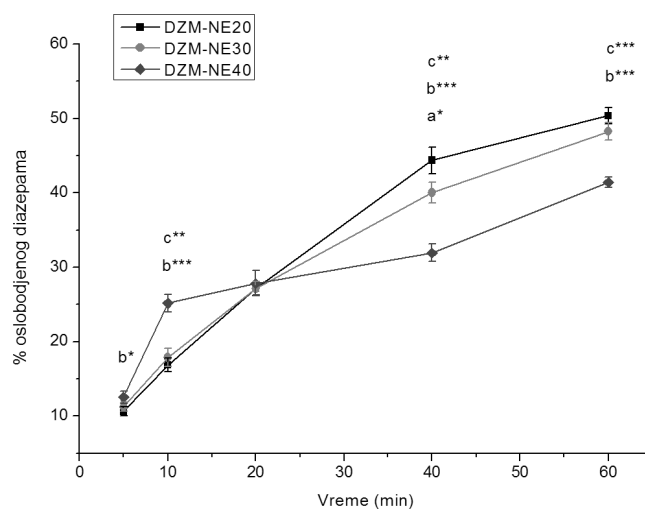
Pri dizajniranju parenteralnih nanoemulzija kao koloidnih nosača lekova, ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nosača od posebnog je značaja; podaci dobijeni ovim ispitivanjem mogu da se koriste za procenu preparata u fazi razvoja, u kontroli kvaliteta i za predviđanje *in vivo* performansi/ponašanja razvijenog nosača. Za razliku od oralnih i transdermalnih farmaceutskih oblika, za parenteralne preparate ne postoji standardni farmakopejski ili neki drugi regulatorno propisan metod za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance (19–22). Metode koje su do sada korišćene u tu svrhu, sa više ili manje uspeha, uključuju metode uzorkovanja i odvajanja (engl. sample-and-separate methods), kontinuirane protočne metode (engl. continuous flow methods), *in situ* metode, i membranske metode (engl. membrane barrier methods) u koje spada metoda sa difuzionom ćelijom (engl. side-by-side

diffusion cell method) i metoda sa dijaliznom vrećicom (engl. dialysis sac/bag method) (21,23). Među trenutno dostupnim aparaturama, za karakterizaciju *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz parenteralnih emulzija preporučuje se USP aparatura 4 (protočna ćelija), uz odgovarajuću modifikaciju, kao i tradicionalna i reverzna tehnika sa dijaliznim vrećicama (22).

U ovom istraživanju, *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja diazepama iz formulisanih parenteralnih nanoemulzija sa 20, 30 i 40% uljane faze sprovedeno je primenom reverzne tehnike sa dijaliznim vrećicama, u kojoj čist medijum napunjen u dijalizne vrećice predstavlja akceptorsku fazu, a ispitivana nanoemulzija dispergovana u odgovarajućoj zapremini medijuma koji okružuje dijalizne vrećice predstavlja donorsku fazu (23). Na taj način postiže se maksimalno (teorijski beskonačno) razblaženje nanoemulzije u medijumu, a oslobađanje lekovite supstance odvija pod savršenim *sink* uslovima (24). Naime, u nerazblaženoj nanoemulziji, u stanju ravnoteže, lekovita supstanca je raspodeljena između unutrašnje uljane faze, spoljašnje vodene faze, i micela prisutnih u vodenoj fazi nanoemulzije (25). Nakon razblaživanja nanoemulzije medijumom, uspostavlja se nova ravnoteža i diazepam se raspodeljuje između uljanih kapi nanoemulzije i medijuma (engl. sink solution, *sink* rastvor), koji sada postaje spoljašnja faza nanoemulzije. Diazepam koji se oslobodi iz uljanih nanokapi difunduje najpre u *sink* rastvor, a zatim u dijaliznu vrećicu, do uspostavljanja ravnoteže, pri čemu je uočeno da se koncentracija lekovite supstance povećava u dijaliznoj vrećici, a ostaje praktično nepromenjena u *sink* rastvoru. Dodatna prednost metode jeste direktna izloženost velike slobodne površine nanoemulzionih kapi velikoj zapremini *sink* rastvora, čime se oponašaju biološki uslovi nakon parenteralne primene (24).

Procenat oslobođenog diazepama iz ispitivanih formulacija nanoemulzija izračunat je iz odnosa koncentracije diazepama u dijaliznim vrećicama, izmerene u prethodno definisanim vremenskim intervalima, i ukupne koncentracija diazepama u *sink* rastvoru (24), a dobijeni profili oslobađanja prikazani su na Slici 3. Kao što se može videti, *in vitro* oslobađanje diazepama iz ispitivanih parenteralnih nanoemulzija odlikovalo se bifaznim profilom (posebno izraženo kod nanoemulzije sa 40% uljane faze), sa inicijalno bržim oslobađanjem (moguće usled difuzije slobodne lekovite supstance, ili lekovite supstance solubilizovane u micelle iz donorske faze u akceptorski medijum), praćenim sporijim oslobađanjem (verovatno usled oslobađanja lekovite supstance iz uljanih kapi u kontinuiranu donorsku fazu, te difuzije kroz membranu dijalizne vrećice u akceptorski medijum) (23). Poređenjem dobijenih profila (Slika 3) može se zaključiti da su profili oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20 i 30% uljane faze slični ($p < 0,05$ jedino u 40 min), a da se značajne razlike mogu uočiti između nanoemulzija sa 20 i 40, odnosno 30 i 40% uljane faze. Rezultati pokazuju da je nakon 60 min ukupni procenat oslobođenog diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20 i 30% uljane faze bio značajno veći (ANOVA, $F_{(2,6)} = 63,553$, $p < 0,001$) u

poređenju sa nanoemulzijom sa 40% uljane faze ($50,39 \pm 1,12\%$ i $48,27 \pm 1,18\%$ vs. $41,43 \pm 0,67\%$, respektivno). Sveukupno gledano, može se zaključiti da je oslobađanje diazepama iz ispitivanih parenteralnih nanoemulzija relativno brzo i da se sa povećanjem koncentracije uljane faze smanjuje frakcija oslobođenog diazepama, verovatno usled dužeg zadržavanja lekovite supstance u većoj količini emulzionih kapi. Dobijeni *in vitro* profili oslobađanja diazepama iz ispitivanih parenteralnih nanoemulzija relativno dobro koreliraju sa farmakokinetičkim rezultatima navedenim u literaturi (11).



Slika 3. Profili oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40) uljane faze (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); $a^* p < 0,05$, DZM-NE20 vs. DZM-NE30; $b^* p < 0,05$, DZM-NE20 vs. DZM-NE40; $b^{*} p < 0,001$, DZM-NE20 vs. DZM-NE40; $c^{**} p < 0,01$, DZM-NE30 vs. DZM-NE40; $c^{***} p < 0,001$, DZM-NE30 vs. DZM-NE40.**

Figure 3. Diazepam release profiles from investigated nanoemulsions containing 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) and 40% (DZM-NE40) of oil (mean \pm standard deviation, $n = 3$); $a^* p < 0,05$, DZM-NE20 vs. DZM-NE30; $b^* p < 0,05$, DZM-NE20 vs. DZM-NE40; $b^{*} p < 0,001$, DZM-NE20 vs. DZM-NE40; $c^{**} p < 0,01$, DZM-NE30 vs. DZM-NE40; $c^{***} p < 0,001$, DZM-NE30 vs. DZM-NE40.**

U cilju sticanja boljeg uvida u kinetiku oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija, dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su u odgovarajuće matematičke modele – nultog reda, prvog reda, Higuchi, Baker–Lonsdale, Korsmeyer–Peppas (26), a izračunati parametri prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Kinetika oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20, 30 i 40% uljane faze (DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40, respektivno).

Table II *In vitro* drug release kinetics of diazepam from investigated nanoemulsions containing 20, 30 and 40% of oil phase (DZM-NE20, DZM-NE30 and DZM-NE40, respectively).

Kinetički model	Parametar	Formulacija		
		DZM-NE20	DZM-NE30	DZM-NE40
Nultog reda	K	0,972	0,921	0,809
	R ²	0,7992	0,7290	-0,2426
	R ² _{adjusted}	0,7992	0,7290	-0,2426
	AIC	29,33	29,68	33,55
Prvog reda	K	0,014	0,013	0,011
	R ²	0,9327	0,8839	0,1072
	R ² _{adjusted}	0,9327	0,8839	0,1072
	AIC	23,87	25,44	31,90
Higuchi	K	6,440	6,148	5,592
	R ²	0,9637	0,9886	0,8208
	R ² _{adjusted}	0,9637	0,9886	0,8208
	AIC	20,78	13,84	23,87
Baker–Lonsdale	K	0,001	0,001	0,001
	R ²	0,9419	0,9733	0,8606
	R ² _{adjusted}	0,9419	0,9733	0,8606
	AIC	23,13	18,10	22,61
Korsmeyer–Peppas	K	4,409	4,949	8,960
	N	0,605	0,560	0,367
	R ²	0,9854	0,9970	0,9059
	R ² _{adjusted}	0,9806	0,9960	0,8745
	AIC	18,22	9,18	22,65

k, konstanta brzine oslobađanja; R², koeficijent determinacije; R²_{adjusted}, prilagođeni koeficijent determinacije; AIC, Akaikeov informacijski kriterijum; n, eksponent oslobađanja/difuzije (n ≤ 0,43 – Fickova difuzija; 0,43 < n < 0,85 – anomalno ponašanje, ne-Fickova difuzija; n ≥ 0,85 – oslobađanje nultog reda (26)).

k, release rate constant; R², coefficient of determination; R²_{adjusted}, adjusted coefficient of determination; AIC, Akaike Information Criterion; n, diffusion release exponent (n ≤ 0.43 – Fick diffusion; 0.43 < n < 0.85 – anomalous transport, non-Fickian diffusion; n ≥ 0.85 – zero order release (26)).

Na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adjusted}) i AIC vrednosti (engl. Akaike Information Criterion) (26), model koji najbolje opisuje oslobađanje diazepama iz ispitivanih nanoemulzija jeste Korsmeyer–Peppas model (najveći R^2 i R^2_{adjusted} , najmanji AIC). Poređenjem konstanti brzine oslobađanja uočeno je da je brzina oslobađanja diazepama iz nanoemulzije sa 40% uljane faze značajno veća u poređenju sa nanoemulzijama sa 20 i 30% ulja (ANOVA, $F_{(2,6)} = 47,886$, $p < 0,001$). Na osnovu vrednosti eksponenta oslobađanja/difuzije (n) koji ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance u Korsmeyer–Peppas modelu (26), može se zaključiti da je kod nanoemulzija sa 20 i 30% uljane faze dominantan anomalni transport diazepama ($0,43 < n < 0,85$), koji se pripisuje kombinaciji difuzije i erozije kod čvrstih matriksa, a o kome se malo zna u slučaju emulzija. Neki autori pripisuju anomalni transport faznim prelazima surfaktanta, kao što je formiranje lamelarnih ili kubnih faza (27). Kod nanoemulzije sa 40% uljane faze je pak prisutno difuzijom-kontrolisano oslobađanje diazepama ($n \leq 0,43$).

Zaključak

Homogenizacijom pod visokim pritiskom (500 bar, 25°C, 9 ciklusa) uspešno su izrađene parenteralne nanoemulzije sa rastućom koncentracijom uljane faze (20, 30 i 40% smeše triglicerida srednje dužine lanca i sojinog ulja, 4:1), te većim kapacitetom za inkorporiranje lekovite supstance, stabilizovane kombinacijom lecitina i polisorbata 80, uz upotrebu diazepama kao model lekovite supstance. Fizičko-hemijske karakteristike, pre svega mala prosečna veličina kapi ($Z\text{-Ave } 206 \pm 7 \text{ nm}$), uska raspodela veličina ($PDI < 0,15$), visoke vrednosti ZP (oko -50 mV) i nizak prividni viskozitet, kao i stabilnost tokom godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ukazuju na pogodnost formulisanih nanoemulzija za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja pokazalo je da se 40–50% diazepama oslobodi iz ispitivanih nanoemulzija u toku 1 h, pri čemu se kinetika oslobađanja može opisati Korsmeyer–Peppas modelom.

Specifični zahtevi koje u pogledu kvaliteta i bezbednosti nameće parenteralni put primene, uticaj različitih faktora (formulacionih, procesnih i prisustva lekovite supstance) na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija, kao i uticaj samog nanoemulzionog sistema kao nosača na ponašanje inkorporirane lekovite supstance (njegovo oslobađanje iz nanoemulzije, farmakokinetičko ponašanje i, posledično, terapijski efekat), čine razvoj parenteralnih nanoemulzija izazovnim i zahtevaju ulaganje određenih napora u cilju optimizacije formulacije, stabilnosti i sveukupnog ponašanja ovih sistema.

Zahvalnica

Rad je urađen u okviru projekta tehnološkog razvoja TR34031 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Autori se zahvaljuju Jeleni Mitrović, Vladimiru Stamenkoviću i Ivanu Milićeviću, studentima integrisanih akademskih studija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, za pomoć u eksperimentalnom radu.

Literatura

1. Müller RH, Harden D, Keck CM. Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012 Apr;38(4):420–30.
2. Hörmann K, Zimmer A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions – a review. *J Control Release*. 2016 Feb;223:85–98.
3. Fast JP, Mecozzi S. Nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS, editors. *Nanotechnology in drug delivery*. New York: Springer-Verlag New York; 2009. p. 461–89.
4. Benita S, Levy MY. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci*. 1993 Nov;82(11):1069–79.
5. Hippalgaonkar K, Majumdar S, Kansara V. Injectable lipid emulsions – advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Dec;11(4):1526–40.
6. Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *J Drug Del Sci Tech*. 2011 Jan;21(1):55–76.
7. Floyd AG. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci Technol Today*. 1999 Apr;4(2):134–43.
8. Jumaa M, Müller BW. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *Int J Pharm*. 1998 Mar;163(1–2):81–9.
9. Driscoll DF. Commercial lipid emulsions and all-in-one mixtures for intravenous infusion – composition and physicochemical properties. *World Rev Nutr Diet*. 2015;112:48–56.
10. Driscoll DF. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharm Res*. 2006 Sep;23(9):1959–69.
11. Đorđević S, Radulović T, Cekić N, Ranđelović D, Savić M, Krajišnik D, Milić J, Savić S. Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: physicochemical and pharmacokinetic performances. *J Pharm Sci*. 2013 Nov;102(11):4159–72.
12. Gao K, Sun J, Liu K, Liu X, He Z. Preparation and characterization of a submicron lipid emulsion of docetaxel: submicron lipid emulsion of docetaxel. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008 Nov;34(11):1227–37.
13. The United States Pharmacopeia, 39th edition, National formulary 34, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

14. Müller RH, Schmidt S, Buttle I, Akkar A, Schmitt J, Brömer S. SolEmuls® – novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int J Pharm.* 2004 Jan;269(2):293–302.
15. Đorđević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, Savić SD. Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Hem Ind.* 2013 Sep–Okt;67(5):795–809.
16. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 May;108–109:303–18.
17. Wu WH. Parenteral nanoemulsions – composition, preparation and cellular uptake [dissertation]. [Freiburg (Germany)]: University of Freiburg; 2007. 45 p.
18. Sila-on W, Vardhanabhuti N, Ongpipattanakul B, Kulvanich P. Influence of incorporation methods on partitioning behavior of lipophilic drugs into various phases of a parenteral lipid emulsion. *AAPS PharmSciTech.* 2008 Jun;9(2):684–92.
19. Burgess DJ, Crommelin DJ, Hussain AS, Chen ML. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS PharmSci.* 2004 Mar;6(1):100–11.
20. Brown CK, Friedel HD, Barker AT, Buhse LF, Keitel S, Cecil TL et al. FIP/ AAPS joint workshop report: dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 2011 Jun;12(2):782–94.
21. Shen J, Burgess DJ. Accelerated in-vitro release testing methods for extended-release parenteral dosage forms. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Jul;64(7):986–96.
22. Shah VP, DeMuth J, Hunt DG. Performance test for parenteral dosage forms. *Dissolution Technol.* 2015 Nov;22(4):16–21.
23. Chidambaram N, Burgess DJ. A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. *AAPS PharmSci.* 1999;1(3):1–9.
24. Levy MY, Benita S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int J Pharm.* 1990 Dec;66(1–3):29–37.
25. Friedman D, Benita S. A mathematical model for drug release from o/w emulsions: application to controlled release morphine emulsions. *Drug Dev Ind Pharm.* 1987;13(9–11):2067–85.
26. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001 May;13(2):123–33.
27. Marín-Quintero D, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Montes-López MJ, Clares-Naveros B, Del Pozo-Carrascosa A. Formulation design and optimization for the improvement of nystatin-loaded lipid intravenous emulsion. *J Pharm Sci.* 2013 Nov;102(11):4015–23.

Diazepam-loaded parenteral nanoemulsions: physicochemical characterization and *in vitro* release study

Sanela Đorđević¹, Tanja Isailović¹, Nebojša Cekić^{2,3}, Gordana Vuleta¹, Snežana Savić^{1,*}

¹ University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

² Faculty of Technology, University of Niš, Bulevar Oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Serbia

³ DCP Hemigal d.o.o., Tekstilna 97, 16000 Leskovac, Serbia

*Corresponding author: Dr Snežana Savić, Associate Professor

Tel.: +381 11 3951 366 E-mail: snexs@pharmacy.bg.ac.rs (S. Savić)

Summary

The aim of the present study was to develop parenteral nanoemulsions containing increasing content of oil phase (20, 30 and 40%, w/w of medium-chain triglycerides–soybean oil mixture at 4:1 ratio), stabilized by lecithin–polysorbate 80 mixture, and to assess their feasibility as carriers for poorly water-soluble psychopharmacological drugs. To this purpose, nanoemulsions loaded with diazepam as a model drug were prepared through high pressure homogenization and characterized regarding droplet size, polydispersity, surface charge, viscosity, pH value, and electrical conductivity. Furthermore, the *in vitro* release of diazepam from developed nanoemulsions was examined using reverse dialysis bag technique, and drug release kinetics was evaluated through several mathematical models. After preparation, all formulations revealed small mean droplet size (206 ± 7 nm), with narrow size distribution (0.116 ± 0.012) and zeta potential around -50 mV, complying with pharmacopoeial requirements (USP 39–NF 34), wherein there were no significant changes in monitored parameters after one year of storage at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. *In vitro* drug release study demonstrated that 40–50% of diazepam was released from actual nanoemulsions within 1 h, while the kinetic release process could be described by Korsmeyer–Peppas model. The results obtained suggest that formulated parenteral nanoemulsions might be promising carriers for rapid delivery of lipophilic, poorly water-soluble psychopharmacological drugs.

Key words: nanoemulsion; parenteral administration; diazepam; stability; reverse dialysis bag technique.
