

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA RUSJAN

**VREDNOTENJE LIOTROPNIH TEKOČIH KRISTALOV Z
ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO REZONANCO PO
VGRADNJI RESVERATROLA**

**EVALUATION OF LYOTROPIC LIQUID CRYSTALS
USING ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE
AFTER INCORPORATING RESVERATROL**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

LJUBLJANA, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm. Analizo tekočih kristalov z elektronsko paramagnetno resonanco smo opravljali na Institutu Jožef Stefan, pod vodstvom dr. Marjete Šentjunc.

Iskreno se zahvaljujemizr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za njegovo pomoč, nasvete in usmeritve pri izvajanju in pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm. za njene nasvete na začetku izvajanja laboratorijskega dela. Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem na Inštitutu Jožef Stefan na oddelku za biofiziko za njihovo pomoč pri izvedbi in interpretaciji rezultatov spektrov EPR.

Zahvala gre tudi moji družini in prijateljem za njihovo pomoč, podporo in motivacijo v celotnem času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.

PETRA RUSJAN

Ljubljana, 2017

Predsednica komisije:izr. prof. dr. Petra Kocbek

Članica komisije: doc. dr. Urša Pečar Fonović

VSEBINA

Kazalo vsebine

VSEBINA.....	iii
POVZETEK.....	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD.....	1
1.1 ANTIOKSIDANTI	1
1.2 RESVERATROL.....	2
1.3 TEKOČI KRISTALI	3
1.3.1 DELITEV TK.....	4
LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI.....	4
1.3.2 FAZNI PREHODI LIOTROPNIH TEKOČIH KRISTALOV.....	5
1.3.3 FAZNI DIAGRAMI	6
1.3.4 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI TEKOČIH KRISTALOV ...	6
1.4 Elektronska paramagnetna resonanca.....	8
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali	13
3.1.1 Sestavine tekočih kristalov	13
3.1.2 Kozmetično aktivne sestavine in zdravilne učinkovine	14
3.1.3 Topila	15
3.1.4 Raztopine spinskih označevalcev	16
3.1.5 Laboratorijski material	17
3.2 METODE	17
3.2.1 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV IN SPINSKO OZNAČEVANJE	17
3.2.2 METODA EPR ZA VREDNOTENJE TK Z RESVERATROLOM.....	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	20
4.1 IZBIRA KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE.....	20
4.2 IZBIRA SPINSKEGA OZNAČEVALCA	21
4.3 VREDNOTENJE MAKSIMALNEGA HIPERFILNEGA RAZCEPA.....	23
4.4 ANALIZA SPEKTROV PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH.....	26
4.4.1 Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih s SO 5P.....	26
4.4.2 Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih z 10P	29

4.4.3	Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih s SO SO-PC.....	31
5.	SKLEPI	33
6.	VIRI IN LITERATURA.....	35

Kazalo slik

Slika 1: Izomerizacija resveratrola iz trans- v cis- obliko	2
Slika 2: Vrednost θt nam prikazuje odmaknjenost smeri molekule TK od povprečne smeri prikazane z n	4
Slika 3: Prikaz parametrov d_1 , d_0 , d_{-1} , h_1 , h_0 , h_{-1} in a_N na spektru EPR	11
Slika 4: Kemijska struktura 5P (C ₂₉ H ₅₈ N ₂ O ₆ P•)	16
Slika 5: Kemijska struktura 10P (C ₂₉ H ₅₈ N ₂ O ₆ P•)	16
Slika 6: Kemijska struktura SO-PC (C ₄₄ H ₈₆ N ₂ O ₁₀ P•)	16
Slika 7: EPR spektri SO-PC v TK z vgrajenimi različnimi kozmetično aktivnimi sestavinami (1% (m/m)).....	20
Slika 8: spekter EPR 5P v TK, posnet pri 32 °C	22
Slika 9: spekter EPR 10P v TK, posnet pri 32 °C	22
Slika 10: Spekter EPR SO-PC v TK, posnet pri 32 °C	23
Slika 11: Odvisnost $2A_{max}$ od temperature za 5P v TK brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m))	24
Slika 12: Odvisnost $2A_{max}$ od temperature za 10P v TK brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m)).....	25
Slika 13: Odvisnost $2A_{max}$ od temperature za SO-PC v TK5 brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m)).....	26
Slika 14: Spektri EPR 5P v TK brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 32 °C.....	27
Slika 15: Spektri EPR 5P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) posneti pri 7 °C.....	27
Slika 16: Spektri EPR 5P v TK5 brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 57 °C	28
Slika 17: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 7 °C.....	29
Slika 18: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 32 °C.....	30
Slika 19: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 57 °C	30
Slika 20: Normalizirani spektri EPR SO-PC v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 32 °C	31
Slika 21: Normalizirani spektri EPR SO-PC v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 7 °C	32

POVZETEK

Resveratrol je antioksidant, ki je na trgu vedno bolj prisoten kot prehransko dopolnilo in sestavina v kozmetiki. Je spojina naravnega izvora. Kot antioksidant v prehranskih dopolnilih se uporablja za zaščito pred kardiovaskularnimi boleznimi, za preprečevanje oksidativnih poškodb in zaradi pozitivnih učinkov na vseh stopnjah karcinogeneze. Zaradi zaviranja staranja kože pod vlivom žarkov UV je priljubljena tudi njegova uporaba v kozmetiki. Pogosto ga vgrajujemo v dostavne sisteme s prirejenim sproščanjem, kot so na primer tekoči kristali. Tekoči kristali združujejo lastnosti tekočin – tok, in trdnih snovi – anizotropnost, dvolomnost. Delimo jih na termotropne in liotropne, ki nastanejo ob dodatku amfifilnih snovi v topilo in se lahko oblikujejo v heksagonalne, lamelarne ali kubične faze.

V sklopu raziskovalnega dela za diplomsko nalogo smo v lipofilno zmes lecitina, izopropilmiristata in površinsko aktivne snovi Tweena 80 dodali bidestilirano vodo, da so nastali tekoči kristali. Vanje smo vgradili različne kozmetično aktivne sestavine in se kasneje odločili, da bomo z metodo elektronske paramagnetne resonance podrobneje preučili vgradnjo različnih koncentracij resveratrola. Tako smo tekoče kristale s petimi različnimi deleži resveratrola spinsko označili s tremi različnimi spinskimi označevalci in pomerili spekter elektronske paramagnetne resonance v temperaturnem območju med 7 °C in 62 °C. Iz spektrov smo odčitali maksimalni hiperfilni razcep in ugotavljali urejenost sistema. Ugotovili smo, da je urejenost sistema večja pri nižji temperaturi, z višanjem temperature se urejenost sistema manjša, gibljivost molekul pa povečuje. Prav tako se urejenost sistema povečuje z naraščanjem koncentracije resveratrola in je pri 10 m/m % največja. S pomočjo različnih spinskih označevalcev smo ugotovili, da sta viskoznost in urejenost večja v bližini polarnih glav fosfolipidov, v notranjosti fosfolipidnega dvosloja pa je gibljivost molekul večja, urejenost pa manjša.

Pridobljeni rezultati so v skladu s pričakovanji, obnašanje tekočih kristalov (urejenost sistema, gibljivost molekul) z resveratrolom je podobno tistim, ki te kozmetično aktivne sestavine nimajo vgrajene.

Ključne besede: resveratrol, elektronska paramagnetna resonanca, tekoči kristali, spinski označevalec

SEZNAM OKRAJŠAV

AFC – avtomatski kontroler frekvence

AFM – mikroskopija na atomsko silo

AO – antioksidant

AP – askorбилpalmitat

CW – kontinuiran način delovanja EPR

DCM – diklorometan

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija

EPR – elektronska paramagnetna resonanca

IPM – izopropilmiristat

KAS – kozmetično aktivna sestavina

KMK – kritična micelarna koncentracija

NMR – jedrska magnetna resonanca

PAS – površinsko aktivna snov

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

RSV – resveratrol

SO – spinski označevalec

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija

TK – tekoči kristal

UV – ultravijolično

1. UVOD

1.1 ANTIOKSIDANTI

Največji in eden najpomembnejših človeških organov je koža, ki je prva obrambna linija pred mikrobi iz okolja. Zaradi njene pomembne vloge je karkoli, kar jo ogroža, odločilno za zdravje posameznika.

Vzroki za kožne poškodbe so lahko različni. Lahko so dedni ali prihajajo iz zunanjega okolja (UV-sevanje, cigaretni dim, ozon, kemikalije, sevanje...). Med njimi je najbolj pomembno prav izpostavljanje žarkom UV, ki lahko vodi do pospešenega staranja kože in kožnega raka. Žarki UV so lahko razlog za mutacije DNA, ki v celicah povzročijo nepopravljivo škodo (1).

Kisik je element, ki nastopa v mnogih biokemičnih procesih. Je nujno potreben za dihanje in za celično dihanje pri vseh aerobnih organizmih (2). Pri celičnem dihanju se tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki med drugim vključujejo radikale, kot so superoksidni anion, hidroksilni in peroksilni radikal ter diamagnetne reaktivne zvrsti kot sta peroksi nitrit in singletni kisik. ROS lahko sprožijo peroksidacijo membranskih lipidov, ki vodi v kopičenje lipidnih peroksidov. Čeprav so ROS v fizioloških koncentracijah potrebne za delovanje normalnih celic, lahko poškodujejo ključne molekule, kot so nukleinske kisline, lipidi, proteini, maščobne kisline, kar povzroča staranje organizma in številne bolezni (2, 3).

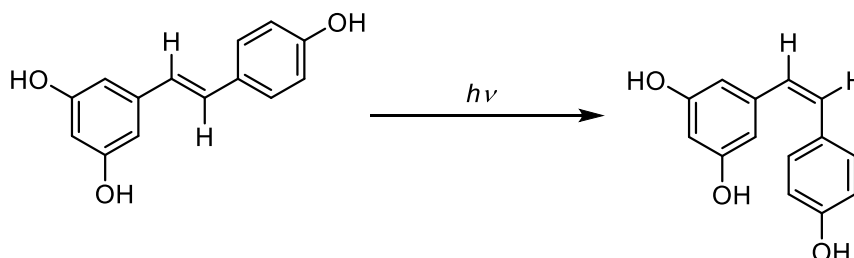
Oksidativni in antioksidativni procesi so v zdravem organizmu v ravnovesju, zato imajo vsi aerobni organizmi antioksidativno obrambo. To predstavljajo tudi encimi in antioksidativne sestavine hrane, ki odstranijo ali zamenjajo poškodovane molekule (3). Porušeno ravnovesje med nastajanjem ROS in antioksidativno obrambo povzroča prekomerno nastajanje radikalov in takrat je organizem v stanju oksidativnega stresa. Starejši, kot je organizem, težje se upira radikalskim poškodbam biomolekul in zato je pomemben vnos hranil z antioksidativnim delovanjem (2).

Antioksidanti (AO) so snovi, ki upočasnijo, preprečijo ali odstranijo možnost oksidativne poškodbe ciljne molekule. Delujejo tako, da oddajo svoj elektron ali vodikov atom radikalu, ki postane neaktiven (2).

AO lahko ločimo po tem, ali so encimski ali neencimski, lahko jih pa ločimo tudi po njihovi kemijski strukturi: aminokisline, fenoli in kinoni, flavonoidi, karotenoidi, organske kisline, peptidi in encimi.

1.2 RESVERATROL

Resveratrol ali (*E*)-3,5,4-trihidroksistilben spada med stilbene, za katera sta značilna dva aromatska obroča, ki ju povezuje metilenski most. Obstaja v dveh oblikah, *trans*- in *cis*-. Najpogostejši, stabilnejši in biološko aktiven je *trans*- izomer (4). Kot je prikazano na sliki 1, prehod iz *trans*- v *cis*- izomer lahko sproži UV-sevanje, ki posledično lahko tudi zmanjša AO učinke resveratrola. V ta namen se v npr. sončne kreme dodaja fotostabilizator etilheksilmetoksikrilen, ki močno zavira pretvorbo *trans*-resveratrola pod vplivom UV (4).



Slika 1: Izomerizacija resveratrola iz *trans*- v *cis*- obliko

V naravi je resveratrol prisoten v jagodičevju, japonskem dresniku (*Fallopia japonica*), v zemeljskih oreščkih (*Arachis hypogaea*), najbolj pa je značilna njegova prisotnost v pravi vinski trti (*Vitis vinifera*) oz. v rdečem vinu (2). Prečiščen resveratrol se nahaja v obliki belega prahu, ki je skoraj netopen v vodi. Po peroralnem zaužitju se slabo absorbira, njegov metabolizem *in vivo* pa je hiter. Za doseganje ugodnih bioloških učinkov so potrebne visoke koncentracije (5). Deluje tako, da reagira z radikali (donira jim $H^{\bullet}$), ki so lahko atomi ali molekule s prostim elektronom: superkosidni anion, peroksilni in

hidroksilni radikal. Nekateri izmed teh ROS so dovolj reaktivni, da sprožijo verižne radikalske reakcije, ki poškodujejo celične membrane, proteine in DNA (4).

Njegova uporaba je vedno bolj razširjena. Prvi pozitivni učinki so bili odkriti pri zaščiti pred kardiovaskularnimi boleznimi zaradi preprečevanja oksidativnih poškodb, spodbujanja vazodilatacije in preprečevanja agregacije trombocitov (1, 3). Dokazani so bili tudi ugodni učinki pri treh pomembnih korakih nastajanja rakavih celic: iniciacija, pospeševanje in napredovanje. Na živalskih modelih je resveratrol zaviral proces nastajanja tumorjev z zaviranjem celične proliferacije. Pozitivni učinki so se pokazali tudi na obtočilih, saj zavira nastajanje ateroskleroze (3).

Iz kozmetološkega vidika je zelo pomemben učinek resveratrola na kožo, saj zavira staranje kože pod vplivom žarkov UV. Zaradi pozitivnih učinkov, ki kožo varujejo pred rakom in vnetnimi motnjami, je njegova uporaba vedno bolj priljubljena in zaželena.

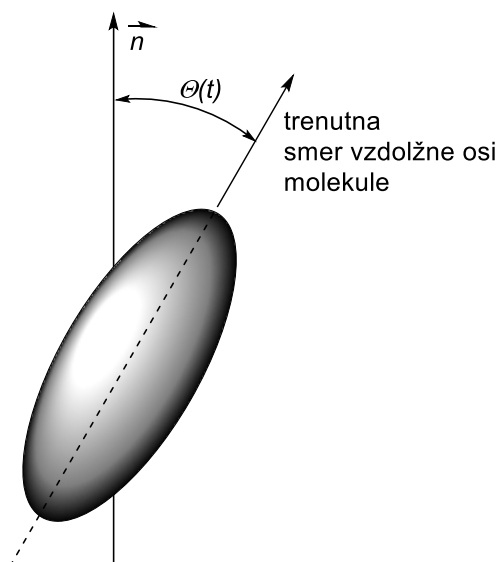
Poleg tega ščiti rastline pred okužbami z bakterijami in plesnimi in na podoben način deluje na naši koži. Je učinkovita sestavina v kozmetičnih izdelkih za preprečevanje staranja, saj pomaga pri boljši obnovi in presnovi celic (2). Prednost resveratrola je tudi to, da je nizko toksičen in ima malo neželenih učinkov (1).

1.3 TEKOČI KRISTALI

Tekoči kristali (TK) predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim. Združujejo lastnosti tekočin – tok in kristaliničnih trdnih snovi – anizotropnost, dvolomnost, urejenost, za katere je značilna urejenost na dolge in kratke razdalje. Tvorijo jih molekule, ki jih imenujemo mezogeni. Značilnost TK so različne strukture oziroma faze, ki jih imenujemo mezofaze, med katerimi lahko prehajajo in sicer v specifičnem zaporedju in pod določenimi pogoji (6).

Značilnost TK sta pozicijska (ko so molekule urejene v mrežo) in orientacijska urejenost (orientacija molekul v isto smer). Da lahko opišemo orientacijsko urejenost, potrebujemo dva podatka. Prvi je ureditveni parameter (S) (slika 2), ki nam pove stopnjo urejenosti molekul in je definiran:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta(t) - 1 \rangle \quad \text{Enačba 1}$$



Slika 2: Vrednost $\theta(t)$ nam prikazuje odmaknjenost smeri molekule TK od povprečne smeri prikazane z $\vec{n}$.

Njegova vrednost je lahko največ 1, ko so vse molekule med seboj vzporedne, pri vrednosti 0 so molekule obrnjene vsaka v svojo smer (7). TK imajo običajno vrednost S med 0,3 in 0,9. Drugi podatek je ureditveni normalni vektor $\vec{n}$, ki odraža smer, v katero so v povprečju orientirane molekule v sistemu. TK so bolj stabilni, ko je vrednost parametra $\vec{n} = 0$, takrat imajo vse molekule smer vektorja $\vec{n}$. To območje je veliko le nekaj mikrometrov. Na smer vektorja lahko vplivajo tudi zunanji dejavniki, kot so električno/magnetno polje, površine vsebnikov,... Ko smeri vektorja na meji med dvema območjema ne moremo določiti, govorimo o defektu orientacije vektorja oz. o defektu tekočega kristala (6).

1.3.1 DELITEV TK

Glede na nastanek delimo TK na termotropne in liotropne. Tisti, ki so običajno sestavljeni iz podolgovatih molekul ali molekul v obliki diska, s togim osrednjim delom in gibljivimi stranskimi verigami ter nastanejo s segrevanjem trdne snovi, so termotropni. Čeprav se termotropne TK uporablja v plastičnih filmih in digitalnih termometrih, se bolj srečujemo z liotropnimi TK, ki nastanejo z dodajanjem topila PAS, in imajo specifično strukturo podolgovatih amfifilnih molekul (8).

LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI

Sestavljeni so iz treh faz: površinsko aktivne snovi (PAS), oljne in vodne faze. Nastanejo z raztapljanjem amfifilnih molekul v topilu (8). To so molekule, ki imajo polarno glavo in

nepolaren rep. Pri različnih razmerjih posameznih komponent nastajajo strukture, ki jih prikažemo s (psevdo)trikomponentnim faznim diagramom.

Če oljna faza ni prisotna, se PAS raztapljajo pri točno določeni koncentraciji (kritični micelarni koncentraciji (KMK)) in se spontano uredijo v asociate koloidnih velikosti, ki jih imenujemo miceli. Ob pomanjkanju vode se hidrofilni deli obrnejo navznoter, hidrofobni navzven in nastanejo reverzni miceli. Z naraščanjem koncentracije PAS nastajajo specifične strukture, ki imajo značilno 3D urejenost. Če pri KMK še dodamo PAS, pride do spremembe iz izotropne micelarne raztopine v anizotropno, poveča se viskoznost in v določenem koncentracijskem in temperaturnem območju nastanejo TK (6).

Različne koncentracije posameznih komponent v sistemu omogočajo urejanje TK v specifične strukture, ki imajo vsaka svojo molekularno ureditev v topilu. Te strukture so lamelarne, heksagonalne in kubične. Hidrati ali solvati PAS, ki so gradniki liotropnih TK, imajo lahko obliko valja ali stožca. Molekule v obliki valja se urejajo v lamelarne plasti, tiste v obliki stožca pa v heksagonalne. Tretja oblika so inverzne heksagonalne faze, ki jih tvorijo obrnjeni stožci (6).

1.3.2 FAZNI PREHODI LIOTROPNIH TEKOČIH KRISTALOV

Heksagonalna faza: nastaja v širokem temperaturnem območju, pri koncentraciji PAS 30-50 m/m%. Zaradi dvodimenzionalne ureditve se pri nastanku heksagonalnih faz viskoznost močno poveča. Gibanje poteka samo vzdolž dolžine TK. Če so polarne glave molekul PAS usmerjene v notranjost heksagonalnih struktur, nastanejo reverzne heksagonalne faze (6, 8).

Lamelarne faze: za lamelarne faze je značilno, da nastanejo v najširšem koncentracijskem in temperaturnem območju, viskoznost takih sistemov pa je zelo nizka. Sestavljene so iz dveh plasti PAS, običajno v koncentraciji do 50 m/m%, njihova debelina je približno enaka eni do dvema dolžinama PAS. Plasti lahko drsijo druga ob drugi, omejeno je le gibanje z ravnino plasti. Lamelarne faze so lahko različno urejene, tekoče so najmanj, gibanje znotraj plasti ni omejeno zaradi gibljivih lipofilnih verig. Poznamo še lamelarno gelsko in lamelarno kristalinično fazo (6, 8).

Kubične faze: so edine, ki ne izkazujejo dvolomnosti, ker so izotropne. Zaradi tridimenzionalne ureditve agregatov so zelo viskozne. Čeprav nimajo orientacijske urejenosti, jih zaradi visoke viskoznosti uvrščamo med TK (6, 8).

1.3.3 FAZNI DIAGRAMI

S faznimi diagrami najlažje prikažemo obnašanje amfifilnih molekul v vodi (8). To so planarni fazni diagrami v obliki enakostraničnega trikotnika. Z njim lahko prikažemo KMK, pod katero se miceli ne tvorijo in Krafftovo točko, pod katero so kristali topni v vodi. Nad to točko se tvorijo TK.

1.3.4 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI TEKOČIH KRISTALOV

Razlike med fazami TK in mezofazami so minimalne, in jih lahko zaznamo samo s preciznimi analitskimi metodami, ki so lahko posredne ali neposredne. Pri nekaterih TK lahko uporabimo samo eno metodo, uporaba več metod skupaj, pa nam daje komplementarne rezultate.

Neposredne metode:

1.3.4.1 Polarizacijska mikroskopija

S to metodo dokazujemo in opazujemo dvolomnost anizotropnih TK. To pomeni, da če svetloba potuje skozi snov v različnih smereh, se ob prehodu obnaša različno. Ko med pravokotno postavljena polarizatorja vstavimo vzorec, svetloba potuje skozi prvi polarizator in če se polarizacija obrne in ni več pravokotna na analizator, vidimo svetlo barvo. Zaradi te svetlobe, ki je bela, vidimo tipično črno-belo teksturo TK. Pri različnih fazah TK vidimo različne strukture – heksagonalne zaradi stožčaste oblike PAS ločimo po pahljačasti obliki, pri lamelarnih pa prepoznamo oljne črte z malteškimi križi (6).

S to metodo lahko vidimo tudi defekte v TK, ki se pokažejo kot specifične črne črte, skupine črt in pike (6, 8).

1.3.4.2 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Primerna je za preučevanje notranjosti sistema. Za uporabo te metode so potrebne posebne predpriprave vzorca. Da ne bi pod visokim vakuumom izgubili vode, uporabimo tehniko zamrzovalnega lomljenja, kjer uporabimo repliko vzorca in je bolj primerna za viskozne sisteme. S to tehniko obravnavamo prehode med različnimi fazami liotropnih TK (6).

1.3.4.3 Rentgensko sipanje

To je ena izmed najbolj uporabljenih metod za ugotavljanje strukture koloidnih sistemov. Z njo lahko zaznamo interference, ki nam pomagajo pri računanju razdalje med plastmi molekul in s pomočjo zaporedja teh interferenc prepoznamo, za kateri tip TK gre (6).

1.3.4.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Poznamo več različnih NMR tehnik, ki jih izberemo glede na sestavo sistema. Pomagajo nam, da lažje določimo parameter S, ker z njim lahko ločimo med različnimi molekularnimi segmenti (6).

1.3.4.5 Mikroskopija na atomsko silo (AFM)

Je metoda, kjer merimo medatomske sile med ostro preiskovalno konico nanometrskih dimenzij in površino vzorca. Poznamo kontaktni in nekontaktni način snemanja vzorca. Običajno jo uporabljamo pri preučevanju lipidnih dvoslojev, ki se urejajo v različne tipe lamelarnih faz (6, 8).

Posredni metodi:

1.3.4.6 Reologija

Sisteme lahko razdelimo na kapljevine, poltrdne in trdne sisteme, ki jih uvrščamo med ne-Newtonovske. To pomeni, da je njihova viskoznost odvisna od delovanja strižne sile na sistem in viskoznosti. Plini, voda, mineralna olja, raztopine topljencev z nizko molekulsko maso so idealizirane tekočine in spadajo med Newtonovske sisteme, ki niso odvisni od delovanja in trajanja strižne sile (6).

Pri TK lahko opazujemo različne reološke lastnosti. Viskoznost Newtonovskih sistemov opisujemo s koeficientom dinamične viskoznosti η – pri lamelarnih TK je vrednost koeficienta nižja, pri kubičnih in heksagonalnih pa višja (6).

1.3.4.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Spremembe med fazami so lahko posledica spremembe entalpije ali entropije sistema. To lahko preučujemo z DSC. Za prehod iz kristaliničnega v amorfnost stanje je potrebno veliko energije, iz kristaliničnega v TK, iz TK v amorfnost in prehodi med različnimi kristalnimi stanji pa porabijo manjše količine energije (6, 8).

1.4 Elektronska paramagnetna resonanca

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) ali elektronska spinska resonanca je spektroskopska metoda, ki temelji na absorpciji elektromagnetnega sevanja in z njo zaznavamo prehode med energijskimi nivoji elektronskih spinov povzročenih z elektromagnetnim valovanjem (10). Za prehod je potrebna določena frekvenca elektromagnetnega valovanja, ki je odvisna od jakosti magnetnega polja (11). S to metodo raziskujemo paramagnetne snovi oz. radikale, ki so lahko atomi, ioni, molekule z vsaj enim nesparjenim elektronom. Ker poteka meritev EPR v nanosekundnem časovnem območju, so spremembe konformacij daljših polimerov prepočasne in jih naprava ne zazna. Primerna pa je za spremembe konformacije kratkih verig (npr. lipidi) (11).

Rezultat meritve EPR je energija mikrovalov v odvisnosti od intenzitete magnetnega polja, ki je prvi odvod absorpcijskega spektra. Poznamo dva načina merjenja: kontinuiran način delovanja (CW), kjer majhna intenziteta sevanja kontinuirano obseva vzorec, in pulzno metodo, s kratkimi a močnimi pulzi sevanja, rezultati pa se beležijo, ko sevanje ni prisotno. V sklopu svoje diplomske naloge se bom posvečala metodi CW (9, 10).

Ker gre pri EPR za interakcijo med elektromagnetnim valovanjem in magnetnim momentom, ki izvira iz elektrona, je pomemben spin elektrona. To je kotni moment, ki je definiran po velikosti in smeri v prostoru. Magnetni moment elektrona definiramo s kvantnim številom $S = 1/2$. V zunanjem magnetnem polju so magnetni momenti orientirani paralelno ali antiparalelno glede na smer polja, kar imenujemo Larmorjeva precesija. Ob prisotnosti magnetnega polja se energija elektronov razdeli na dva nivoja, tisti z višjo energijo na $m_s = 1/2$ (α stanje), tisti z nižjo pa na $m_s = -1/2$ (β stanje), kar imenujemo Zeemanov efekt. Ko pride do interakcije med zunanjim magnetnim poljem in elektroni, ki imajo magnetne momente povezane z vrtilno količino, to imenujemo Zeemanova interakcija. Energijsko razliko med obema stanjema lahko opišemo z enačbo (9, 10):

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = g \cdot \beta_N \cdot B = h \cdot \nu, \quad \text{Enačba 2}$$

kjer je:

- ΔE energijska razlika
- B gostota magnetnega polja
- β_N Bohrov magneton
- g spektroskopski cepitveni tenzor ($g = 2,0023$)
- ν frekvenca elektromagnetnega valovanja ($\nu = 9,5 \text{ GHz}$)
- h Planckova konstanta ($h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)

Resonančni pogoj je izpolnjen, ko je energija mikrovalov ($h \cdot \nu$) enaka energijski razliki med obema stanjema elektronov (ΔE).

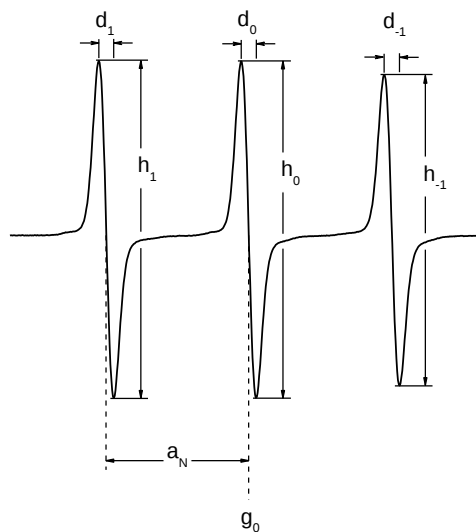
Spektrometer EPR je sestavljen iz resonatorja, sistema magnetov, mikrovalovnega mostu in detektorja. Vzorec vstavimo v resonator, ki ustvari primerno magnetno polje in pretvori odziv vzorca v mikrovalovni signal. Ker so vzorci in njihove velikosti različne, so razvili dva optimalna resonatorja: resonator z valovito votlino, z odprtino veliko približno 30 mm in resonator z luminiranim (točkovnim) vezjem dimenzij 1-5 mm. Med seboj se razlikujeta tudi po gostoti magnetnega polja. Sestavni deli mikrovalovnega mostu so nihalo, referenčna faza, črpalka, resonator, mikrovalovni detektor, ojačevalec in atenuator. Pomemben parameter pri magnetnem mostu je avtomatski kontroler frekvence (AFC), ki mora biti lociran na sredini absorpcijske krivulje resonatorja.

Magnetni sistem se uporablja kot napajalna enota in kot senzor in regulator polja. Ko vrednosti mikrovalovnih frekvenc in magnetnega polja izpolnijo resonančno stanje vzorca, se začne spinski prehod. Na koncu se signal prenese iz analognega v digitalni konverter (ADC), ki spremeni signal EPR v primernejši format (9).

Metodo EPR lahko uporabljamo pri študiju vzorcev s paramagnetnimi centri organskega in anorganskega izvora, kot so atomi in ioni prehodnih kovin, elektronski defekti v trdnih snoveh, tripletna stanja molekul, oksido-redukcijski procesi, obnašanje kratkoživih radikalov, encimskih reakcij,... Če vzorec nima paramagnetnih centrov, jih lahko dodamo, kar imenujemo *spinsko označevanje*. Za ta proces potrebujemo spinske označevalce (SO), ki nam pomagajo pri opazovanju dinamičnih lastnosti molekul: njihovo urejenost, merimo koncentracijo kisika, polarnost,... (10). Da lahko uporabimo SO, mora ta ustrezati kriterijem in sicer ogrodje SO mora stabilizirati radikal, radikal

mora biti kemijsko stabilen in obstojen in SO ne sme spremeniti preučevanega sistema. Za večjo stabilnost lahko poskrbimo tako, da uporabimo SO s šest- ali petčlenskim obročem in z dodajanjem različnih substituentov na obroč. Že majhna sprememba v strukturi SO vodi v različne lastnosti le-teh (12). Najpogosteje uporabljeni SO so nitroksidni radikali, kjer je $-\text{NO}$ skupina z nesparjenim elektronom pretežno v dušikovi π -orbitali kovalentno povezana preko dušika v štiri-, pet-, šest- ali sedem členski obroč. Pri teh radikalih je pomembno tudi upoštevanje interakcij z magnetnim momentom jedra dušikovega atoma z jedrskim spinom, ker je zaradi hiperfilnega razcepa spekter EPR sestavljen iz treh absorpcijskih črt. Nitroksidni radikali so zelo uporabni zaradi njihove obstojnosti, ker nesparjen elektron leži med štirimi metilnimi skupinami in ker nam podajo informacijo o mikrookolju radikala. Odvisni so od polarnosti medija in mobilnosti radikala. Poleg spinskega označevanja so SO pomembni zato, ker nam dajo informacije o svoji okolici, o kisiku, polarnosti, pH-ju, viskoznosti in urejenosti preiskovanega vzorca (9, 11, 12).

Pri analizi spektrov glede na površino pod krivuljo najprej ugotovimo, koliko paramagnetnih centrov je v vzorcu. Iz dobljenega spektra lahko razberemo dva parametra: številčno vrednost sklopitve a_N in faktor g_0 , ki je izmerjen na sredini signala. Za prosti elektron je vrednost $g = 2,00232$. Hiperfini razcep (a_N) nam poda podatke o polarnosti okolice nitroksidnega radikala. Število paramagnetnih centrov v vzorcu je enako intenziteti spektra EPR oz površini pod integrirano krivuljo. Podatke o gibljivosti nitroksidne skupine dobimo iz rotacijsko-korelacijskega časa, ki je povezan z obliko spektra in s širino (d) in višino (h) črte (slika 3) (10, 11).



Slika 3: Prikaz parametrov d_1 , d_0 , d_{-1} , h_1 , h_0 , h_{-1} in A_N na spektru EPR

Če pride do razcepa signala EPR zaradi sosednjih jeder, to imenujemo hiperfilna interakcija (A), preko katere lahko dobimo informacije o številu jeder in razdalji do naslednjega elektrona. Intenzitete črt so odvisne od tega, koliko jeder vstopa v to interakcijo. Če vstopa samo eno, imajo vse črte enako intenziteto, če jih vstopa več, so porazdelitve izpeljane glede na spin. Število črt lahko izračunamo po formuli (11):

$$2NI + 1,$$

Enačba 3

kjer je

N = število ekvivalentnih jeder

I = jedrsko spinsko kvantno število

2. NAMEN DELA

V vsakodnevni uporabi na koži so vedno bolj priljubljeni antioksidanti, ki lovijo radikale in s tem upočasnjujejo proces staranja kože, nastajanja gub, zmanjšanja elastičnosti kože, vnetij in rakavih sprememb na koži. Resveratrol je AO, ki je zaradi svojih lastnosti izziv za vgradnjo v kozmetične izdelke in se zato preizkuša njegovo vgrajevanje v sodobne dostavne sisteme.

Eden izmed teh sistemov so tudi tekoči kristali, ki se vedno bolj raziskujejo za parenteralno, dermalno in ostale vrste aplikacij. Namen naše diplomske naloge je bil, da v že poznano in večkrat vrednoteno formulacijo TK s Tweenom 80, IPM-jem, lecitinom in vodo vgradimo kozmetično aktivno sestavino (KAS) in TK s KAS ovrednotimo z metodo EPR.

V TK bomo vgradili askorbilpalmitat, resveratrol, rutin, kojično kislino, alantoin, benzofenon in d-pantenol. Tekoče kristale z vgrajenimi KAS bomo spinsko označili s spinskim označevalcem SO-PC in pri sobni temperaturi pomerili spekter EPR s spektrometrom MiniScope MS400 (Magnettech) na Fakulteti za farmacijo.

V drugem delu bomo izbrali KAS za vgradnjo v TK v različnih deležih. Z metodo EPR bomo posneli spekter TK z 1 m/m% KAS na Fakulteti za farmacijo, kasneje pa to in še vse ostale koncentracije na Inštitutu Jožef Stefan s spektrometrom ELEXSYS E500. V temperaturnem območju med 280 K in 335 K bomo s tremi različnimi SO dobili spektre in maksimalne hiperfilne razcepe (A_N), ki jih bomo uporabili za vrednotenje lipofilnega dela TK s KAS.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Sestavine tekočih kristalov

1. Lecitin je naravna zmes lipidov, predvsem stearinske, palmitinske in oleinske kisline, ki so vezane na fosfatidilholin. Najdemo ga tudi v hrani, kot je soja in jajčni rumenjaki. V kozmetičnih izdelkih se uporablja kot emulgator in emolient (23).

Lipoid S-100® (Lipoid GmbH, Nemčija): je vrsta sojinega lecitina rumene barve in voskaste konsistence.

2. **Izopropilmiristat (IPM) (Sigma-Aldrich, Nemčija)** oz. izopropilheksadekanoat je kemijska zmes estrov propan-2-ola in nasičenih maščobnih kislin (običajno miristinske). Je bistra, brezbarvna nizkoviskozna tekočina brez vonja, ki je dražeca za oči in kožo. Topen je v ricinusovem olju, olju bombažnih semen, acetonu, kloroformu, etilacetatu, toluenu, etanolu in v mineralnih oljih, netopen pa v glicerolu in propilen glikolu. Pogosto se uporablja kot topilo, v kozmetičnih izdelkih pa je prisoten kot emolient. Je tudi sestavina poltrdnih podlag in pomožna snov v mikroemulzijah in emulzijah s podaljšanim sproščanjem (22, 24).

3. **Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Nemčija)** ali polisorbat 80 (kemijsko polioksietilen-20-sorbitan monooleat) je ester višje maščobnih kislin in sorbitola kopolimeriziran z etilen oksidom na mestu sorbitana. Je tekočina rumenkaste barve z značilnim vonjem, ki se uporablja kot PAS in sicer kot emulgator, solubilizator in močljivec. Topen je v vodi, metanolu, etil acetatu in toluenu, netopen pa v mineralnih oljih (22).

4. **Bidestilirana voda** pripravljena na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani z napravo Mili-Q Advantage A10, Millipore.

3.1.2 Kozmetično aktivne sestavine in zdravilne učinkovine

1. **Resveratrol (LOTTO N°, Italija)** je beli prah, ki je skoraj netopen v vodi. Zaradi stabilnosti in biološke aktivnosti je v kozmetičnih izdelkih najpogostejše obliki *trans-resveratrola*, ki se uporablja kot učinkovit AO.
2. **Askorbilpalmitat (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Nemčija)** ali *(S)-2-((R)-3,4-dihidroksi-5-okso-2,5-dihidrofuran-2-il)-2-hidroksietil palmitat*. Kemijsko je ester askorbinske in palmitinske kisline. Je belo rumenkasti prah brez vonja, topi se v lipidih. Uporablja se kot zelo učinkovit AO, ki je bolj stabilen od askorbinske kisline (15, 22).
3. **Rutin** ali *3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-O-rutinozid* je flavonoid. Nastane po metabolni poti ali preko encimskih modifikacij. Uporablja se kot protimikrobno, protiglivično in protialergijsko sredstvo. Dandanes poteka veliko raziskav o uporabi rutina za zdravljenje različnih bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen, visok krvni tlak,... (17).
4. **Kojična kislina (MakingCosmetics, ZDA)** je metabolit nekaterih bakterij in gliv (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Acetobacter*). V kozmetiki se najpogostejše uporablja kot sredstvo za posvetlitev kože, ker deluje tako, da zavira katalazno aktivnost tirozinaze. Ima tudi učinke AO in konzervansa. Najpogostejše jo najdemo v izdelkih proti pegavosti, starostnim pegam, hiperpigmentaciji in aknam (18).
5. **Alantoin (MERCK, Nemčija)** ali *5-ureidohidantoin*. Kemijsko je diureid glikolne kisline. Alantoin je produkt oksidacije sečne kisline. V kozmetičnih izdelkih ga uporabljamo kot učinkovino za celjenje ran in za zmanjšanje draženja kože (16).
6. **Benzofenon (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Nemčija)** ali *difenilketon*. Ker se nahaja v sadju, najpogostejše v grozdju, se ga uporablja kot korigens okusa. Substituirana benzofenona (benzofenon-3 in benzofenon-4) sta zelo pogosta UV-filtra in se uporabljata v kremah za zaščito pred soncem (19).

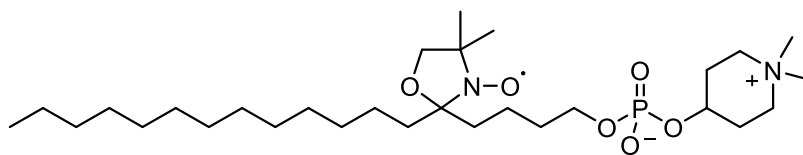
7. **Ketoprofen (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Nemčija)** ali 2-(3-benzoilfenil)propionska kislina je zelo učinkovita nesteroidna protivnetna zdravilna učinkovina (NSAID). Uporablja se pri zdravljenju akutnih, kroničnih in pooperacijskih bolečin, pri bolnikih z osteoartritisom in revmatoidnim artritisom. Deluje na ta način, da zavira encim ciklooksigenazo-2 (COX-2) (20, 21).
8. **D-pantenol** je provitamin in sicer alkoholni derivat vitamina B5. Deluje tako, da prodre v kožo in se oksidira do pantotenske kisline. Najdemo ga v kremah za nego suhe in poškodovane kože, ki je posledica sončnih opeklin in razdraženosti. Deluje tako, da pospešuje delitev celic in epitelizacijo. Poleg tega deluje protivnetno in pomirja srbenje. Pojavlja se tudi v izdelkih za nego las (27).

3.1.3 Topila

1. **Diklorometan (Merck KGaA, Nemčija)** (kemijska formula: CH_2Cl_2). Je najbolj stabilen klorirani derivat metana, ki se uporablja kot topilo za lipide, smole in druge nepolarne snovi. Po izgledu je brezbarvna zelo hlapna tekočina značilnega vonja (22).
2. **Etanol (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francija)** je bistra brezbarvna, tekoča in vnetljiva spojina, ki se uporablja kot topilo v kozmetičnih in farmacevtskih oblikah (22).

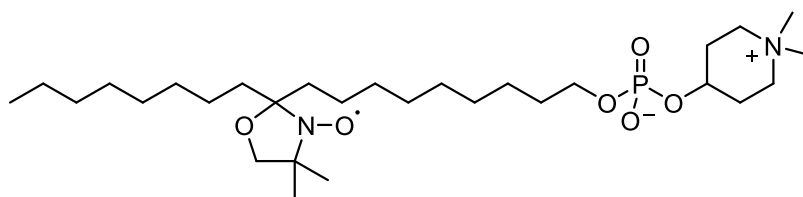
3.1.4 Raztopine spinskih označevalcev

- 0,01 M raztopina 5P v absolutnem etanolu



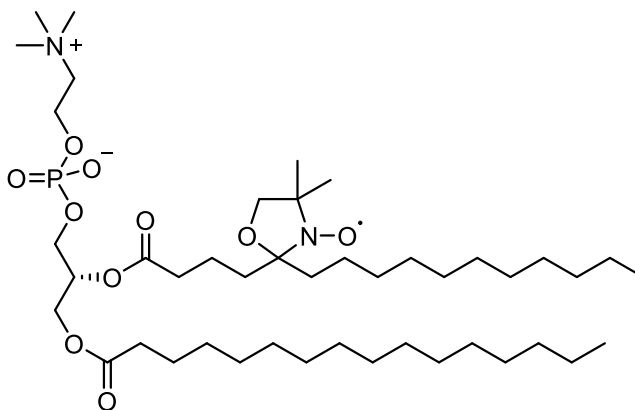
Slika 4: Kemijska struktura 5P (C₂₉H₅₈N₂O₆P•)

- 0,01 M raztopina 10P v absolutnem etanolu



Slika 5: Kemijska struktura 10P (C₂₉H₅₈N₂O₆P•)

- 0,01 M raztopina SO-PC v absolutnem etanolu



Slika 6: Kemijska struktura SO-PC (C₄₄H₈₆N₂O₁₀P•)

Vsi trije spinski označevalci so bili sintetizirani na Fakulteti za farmacijo (28).

3.1.5 Laboratorijski material

- Analitska tehtnica Excellence Plus; Mettler, Toledo, Španija
- Magnetno mešalo
- Vibracijsko mešalo Vibromix
- Rotavapor Büchi R-14
- Hladilnik Gorenje
- Plinska črpalka
- Sušilnik za lase Remington
- Avtomatske pipete 10-100 μL in 100-1000 μL
- Nastavki za pipete
- Kapalke
- Plastične in kovinske palčke
- Magnetna mešala
- Stekleni inventar: erlenmajerice, bučke, čaše, epruvete, kapilare
- Plinski gorilnik
- Parafilm
- Brizge
- Injekcijske igle

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV IN SPINSKO OZNAČEVANJE

Za izdelavo TK smo uporabili že znano formulacijo (27). V erlenmajerico z obrušom smo natančno natehtali lecitin, Tween 80 in IPM. Erlenmajerico smo zamašili in zmes lipidov z magnetnim mešalom mešali čez noč do nastanka homogene mešanice.

Sestava TK je podana v Preglednici I:

Preglednica I: Sestava TK brez vgrajenih SO

Lecitin (% , m/m)	Tween 80 (% , m/m)	IPM (% , m/m)	Bidestilirana voda (% , m/m)
21	21	18	40

V 0,7 g lipidne zmesi smo vmešali kozmetično aktivne sestavine v koncentraciji 1 % (m/m). Ko se je KAS vgradila, smo pripravili SO. V epruveto smo odmerili 22 μ L raztopine SO, etanol odparili na rotavaporju, nato pa še na membranski črpalki. V epruveto s pripravljenim filmom SO na steni epruvete smo natančno natehtali približno 0,5 g lipidne zmesi, mešali na vodni kopeli (60 °C) približno 10 min in kasneje dodali še 150 μ L bidestilirane vode (volumen vode smo prilagodili natančni masi zmesi lipidov). Da so nastali TK, smo zmes 10 min mešali na vodni kopeli pri temperaturi 60 °C in vibracijskem mešalu.

Pri nadaljnji raziskavi, smo se odločili za izbiro resveratrola, ki smo ga v TK vgradili v različnih masnih deležih: 1 % (m/m), 2 % (m/m), 5 % (m/m), 7,5 % (m/m), 10 % (m/m), 15 % (m/m) in 20 % (m/m). Postopek vgrajevanja je bil podoben, količino SO pa smo zmanjšali na 10 μ L. Zaradi slabše topnosti višjih koncentracij smo resveratrol vgrajevali pod atmosfero argona tako, da smo balonček napolnili s plinom, ga z iglo namestili na septum bučke in mešali z magnetnim mešalom. Vzorcem z 2 % (m/m), 5 % (m/m), 7,5 % (m/m), 10 % (m/m), 15 % (m/m) in 20 % (m/m) resveratrola smo dodali topilo DCM, da se je resveratrol popolnoma raztopil. Topilo smo nato uparili s pomočjo rotavaporja in membranske črpalke.

3.2.2 METODA EPR ZA VREDNOTENJE TK Z RESVERATROLOM

spektre EPR smo posneli pri sobni temperaturi na Fakulteti za farmacijo s spektrometrom MiniScope MS400 (Magnettech). Pripravljene vzorce smo s pomočjo brizge napolnili v steklene kapilare z notranjim premerom 1 mm, jih zaprli s plastelinom, da vzorec ne bi iztekel in vstavili v večjo stekleno cevko v resonatorju spektrometra EPR. Vse tekoče kristale, v katere smo vgradili kozmetične sestavine, smo spinsko označili s SO SO-PC in

spektre EPR pomerili s programom Miniscope Control 6.51 (Magnettech). Meritev smo izvedli trikrat, v razmaku 10 minut. Pred merjenjem smo vnesli ustrezne parametre:

- središčna jakost magnetnega polja (B_0 -field): 3350 G,
- obseg meritve (Sweep): 100 G,
- časovni obseg meritve (Sweep time): 60 s,
- število ponovitev (Number (pass)): 4
- modulacijska amplituda (Modulation): 1000 mG,
- atenuacija mikrovalov (MW atten): 10 dB,
- smooth: 0
- steps: 4096
- ojačenje (Gain): 50-60 dB prilagodimo vsakemu vzorcu posebej

Meritve smo izvozili v program Analysis, kjer smo spektre integrirali in izračunali površino pod krivuljo. Drugi program za analizo spektrov je Multiplot, ki nam je rezultate pretvoril v tako obliko, ki smo jo lahko uvozili v Microsoft Excell.

Spektre EPR vzorcev TK z vgrajenim resveratrolom smo posneli v Laboratoriju za biofiziko na Inštitutu Jožef Stefan. Uporabili smo tri različne SO (5P, 10P, SO-LC) in pomerili spektre TK brez resveratrola, ter z 1, 2, 5, 7,5, in 10 % (utežno utežni %) vgrajenega resveratrola. Spektrometer ELEXSYS E500 (Bruker) nam omogoča merjenje pri točno določeni temperaturi. Mi smo si izbrali temperaturno območje med 280 K in 335 K v intervalih po 5 K z maksimalnim dovoljenim odstopanjem 0,5 K od izbrane temperature. Segrevanje in ohlajanje vzorca poteka s pomočjo termostata s tekočim dušikom. Tudi pri merjenju EPR s tem spektrometrom smo vnesli zelene parametre:

- središčna jakost magnetnega polja (B_0 -field): 3320 G,
- polje v centru (field position): 3270 G
- obseg meritve (sweep): 100 G,
- časovni obseg meritve (Sweep time): 41,94 s,
- število ponovitev (Number of pass): 1
- modulacijska amplituda (Modulation): 1000 mG,
- število točk (number of points): 1024
- Modulacijska faza (modulation phase): 0
- harmonic: 1

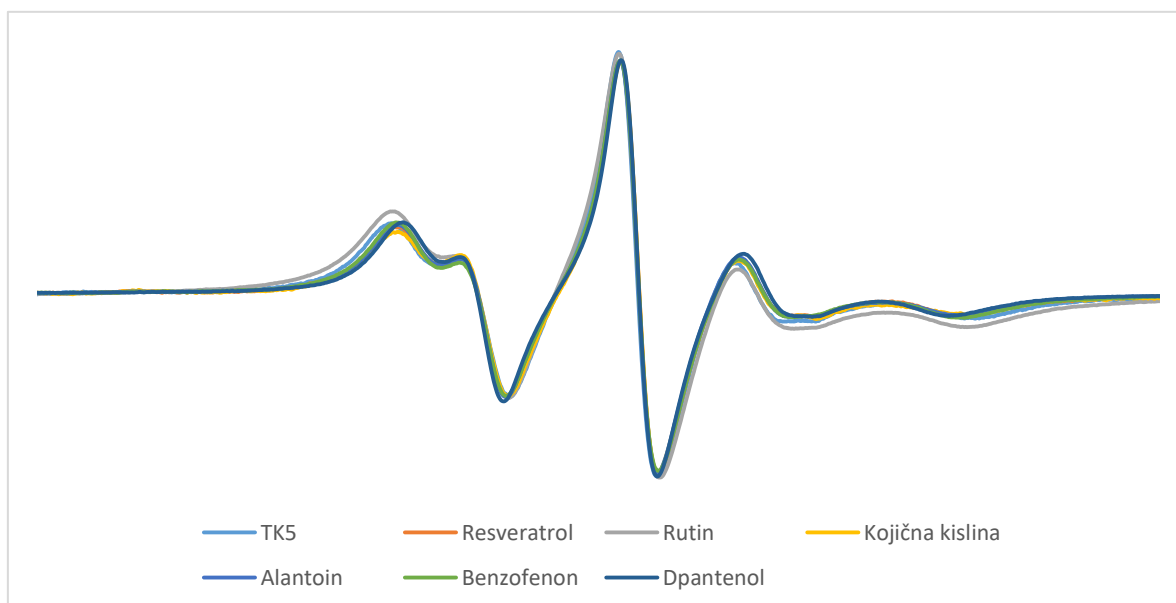
- atenuacija mikrovalov (MW atten): 10 dB,
- ojačenje (Receiver gain): 50 dB,
- časovna konstanta (Time constant): 40,96 ms
- število meritev (number of points): 12 temperaturnih območij
- temperaturno odstopanje (tolerance): 0,5 K
- čas termostatisiranja na želeni temperaturi (temperature setting time): 60 s
- moč mikrovalov (power): 10 mW

Glede na to, da smo meritve izvajali pri povišanih temperaturah, kapilare nismo zamašili s plastelinom, ampak smo jo zatalili, da vzorec ne bi iztekel. Vsak vzorec smo pomerili pri 12-ih različnih temperaturah in za vsako meritev smo iz spektra odčitali širino spektra oz. maksimalni hiperfilni razcep ($2A_{\max}$).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZBIRA KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE

V sklopu diplomske naloge smo v TK vgradili različne aktivne učinkovine, jih spinsko označili s SO **SO-PC** in trikrat pomerili spekter EPR pri sobni temperaturi (tako po pripravi vzorca, nato še po 10 in 30 minutah).



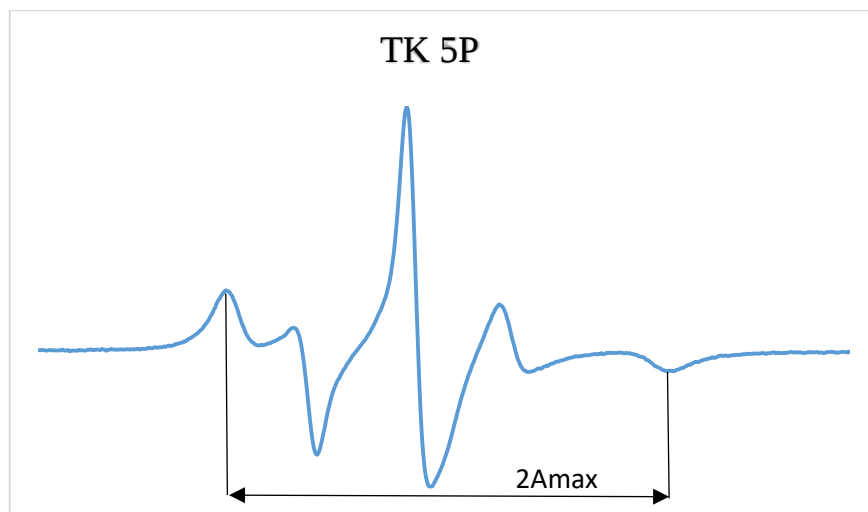
Slika 7: EPR spektri SO-PC v TK z vgrajenimi različnimi kozmetično aktivnimi sestavinami (1% (m/m))

Askorbilpalmitat je hitro reagiral s spinskim označevalcem (nitroksid se je reduciral do hidroksilamina), zato je spekter po določenem času samo ravna črta. Askorbilpalmitat zato ni primerna KAS za študij s to metodo spinskega označevanja. Pri ostalih KAS je po 40 minutah intenziteta spektra EPR ostala enaka in so zato vse primerne za študij s to metodo (slika 4). Na podlagi dobljenih spektrov in vedno večje priljubljenosti pri uporabi, smo se odločili, da podrobneje analiziramo resveratrol in spekter EPR pomerimo pri različnih temperaturah in z različnimi SO.

4.2 IZBIRA SPINSKEGA OZNAČEVALCA

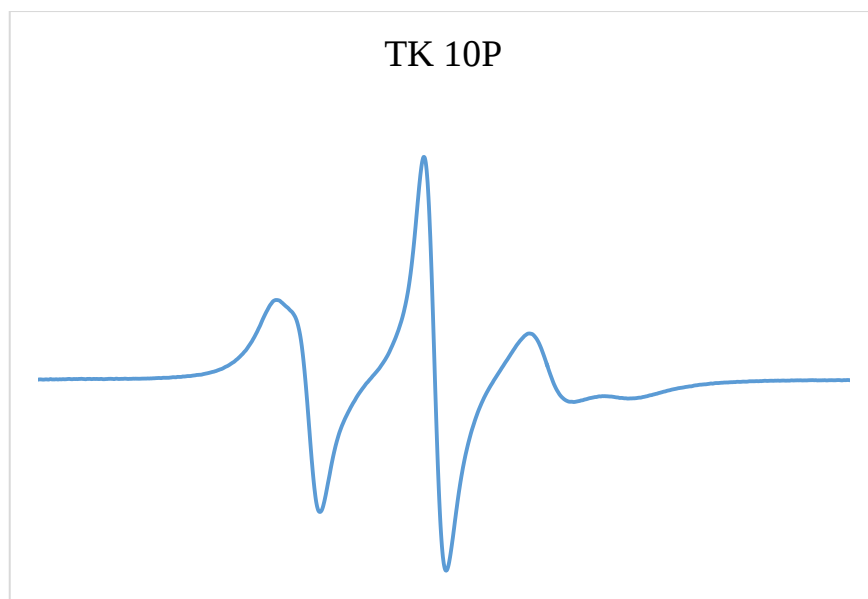
Za najboljše rezultate je potrebno izbrati takšne SO, ki so najbolj podobni preučevanemu vzorcu, saj so že pri manjših spremembah le –teh rezultati lahko drugačni. Mi smo uporabili dva derivata alkilfosfolipidov (**5P** in **10P**) (28) ter spinsko označen derivat fosfolipida **SO-PC**. Spinski označevalci se med seboj razlikujejo po lokaciji doksilne skupine (ki je nosilec radikala) na alkilni verigi in posledično po vrednosti KMK.

SO **5P** in **10P** se med seboj razlikujeta po položaju doksilne skupine, oba imata 18 C-atomov dolgo alkilno verigo in enako polarno glavo. Zaradi lokacije doksilne skupine blizu polarne glave je spekter EPR SO **5P** v TK5 nekoliko širši v primerjavi s spektrom **10P** (sliki 5 in 6). Posledica lokacije doksilne skupine je tudi nižja vrednost KMK pri 5P, kar pomeni, da ima 5P najdaljšo alkilno verigo, med vsemi tremi SO, ki se učinkovito sidra v biološke membrane (28).



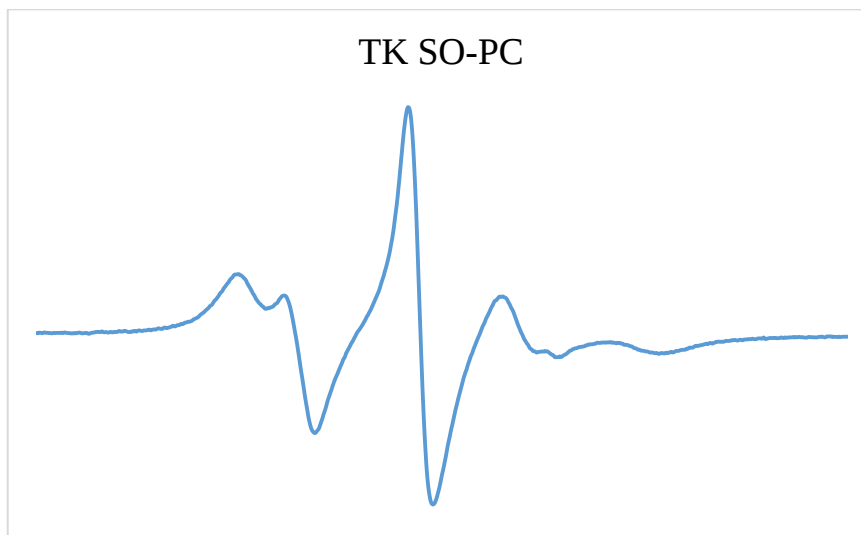
Slika 8: spekter EPR 5P v TK, posnet pri 32 °C

SO **10P** je sestavljen iz 18 C-atomov dolge alkilne verige z doksilno skupino na desetem mestu in polarne glave, ki posnema fosfatidilholin; posledično ima višjo KMK in ožji EPR spekter kot pa **5P** ali **SO-PC** (slike 5, 6 in 7).



Slika 9: spekter EPR 10P v TK, posnet pri 32 °C

Struktura SO-PC je najbolj podobna fosfolipidom, ki so prisotni v lecitinu. Glicerol je na eni –OH skupini zaestren s fosfatidilholinom, na drugih dveh –OH skupinah pa z dvema palmitinskima kislinama, pri čemer je tista na drugem mestu spinsko označena. Doksilna skupina se nahaja na petem mestu palmitinske kisline.



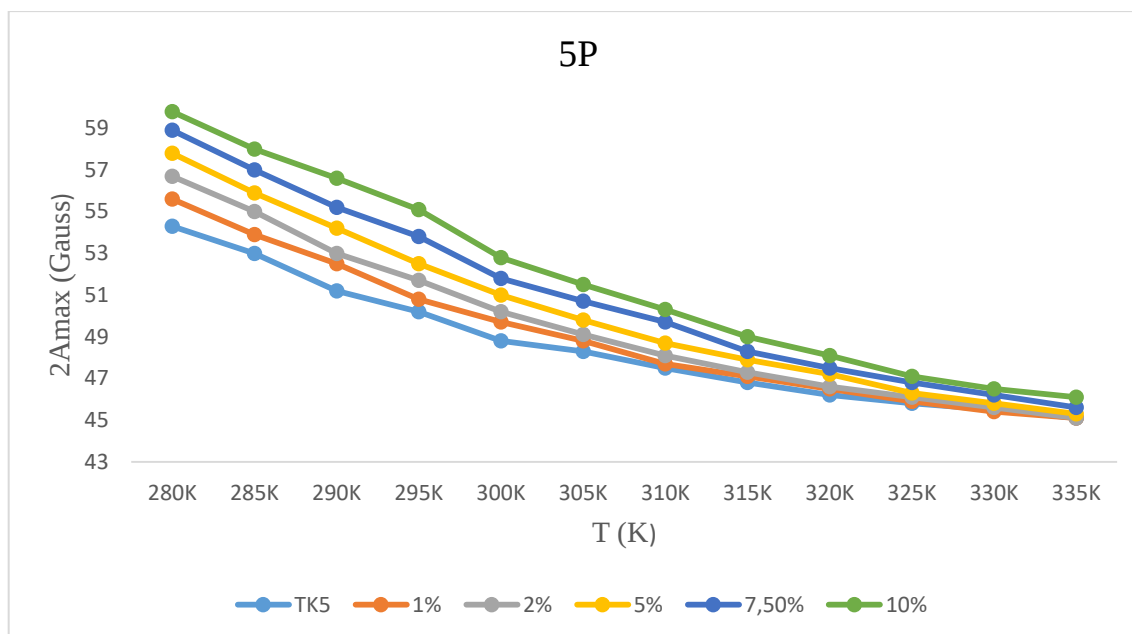
Slika 10: Spekter EPR SO-PC v TK, posnet pri 32 °C

Orientacija vseh treh SO v lipidnem dvosloju je takšna, da so doksilne skupine v lipidnem dvosloju različno blizu stika membrane z vodno fazo. Najbližje vodni fazi je doksilna skupina pri **5P**, sledi **SO-PC**, najgloblje v biološki membrani pa je doksilna skupina pri **10P** (28).

4.3 VREDNOTENJE MAKSIMALNEGA HIPERFILNEGA RAZCEPA

V TK smo vgradili sedem različnih deležev resveratrola. Ker se najvišji koncentraciji 15 in 20% (m/m) nista vgradili, nadaljnjih raziskav pri teh dveh in še višjih deležih resveratrola nismo opravili. Meritve smo izvajali s pomočjo spektrometra EPR s tremi različnimi SO, pri peth različnih deležih resveratrola v temperaturnem območju 280-335 K (v intervalih po 5 K in z odstopanjem +/- 0,5 K). Za vsako koncentracijo resveratrola v TK smo pripravili po dva vzorca in iz dobljenega spektra odčitali $2A_{\max}$ oz maksimalni hiperfilni razcep, na grafu pa predstavili povprečje obeh vrednosti $2A_{\max}$.

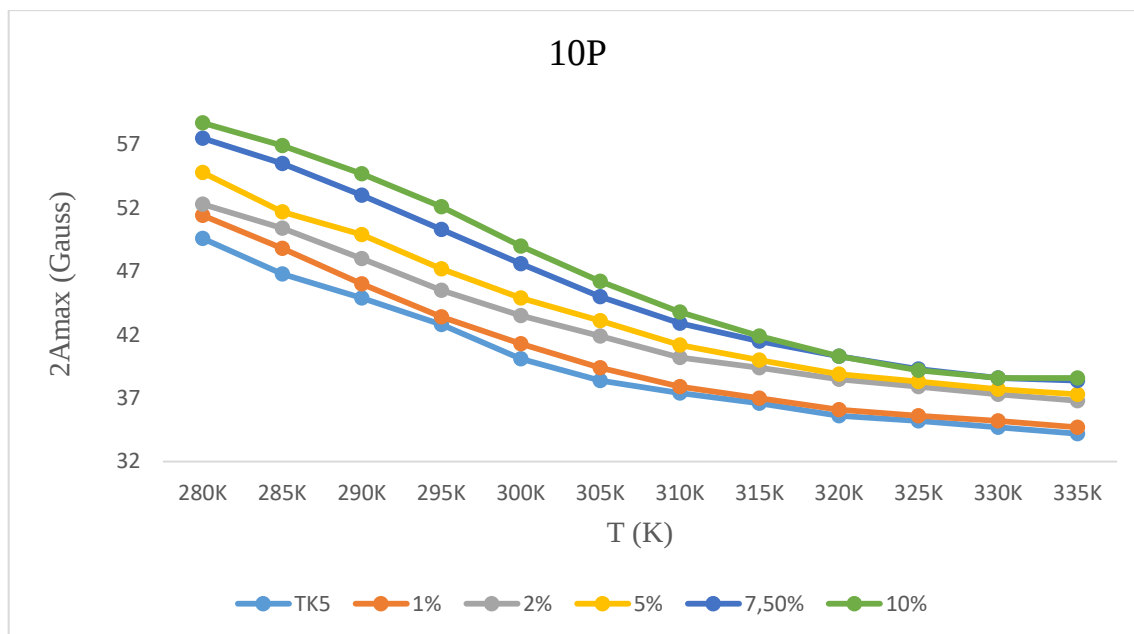
Vrednosti $2A_{\max}$ so bile najvišje pri TK z resveratrolom označenimi s **5P** (slika 8). Vrednosti $2A_{\max}$ se višajo s koncentracijo resveratrola v TK, to pa zato, ker je sistem bolj urejen, ko se v TK vgradi več resveratrola.



Slika 11: Odvisnost $2A_{\max}$ od temperature za 5P v TK brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m))

Največje razlike $2A_{\max}$ so pri najnižji temperaturi (280 K), z naraščanjem temperature se razlike med vrednostmi $2A_{\max}$ manjšajo. Največji padec $2A_{\max}$ je pri TK z 10% (m/m) deležem resveratrola.

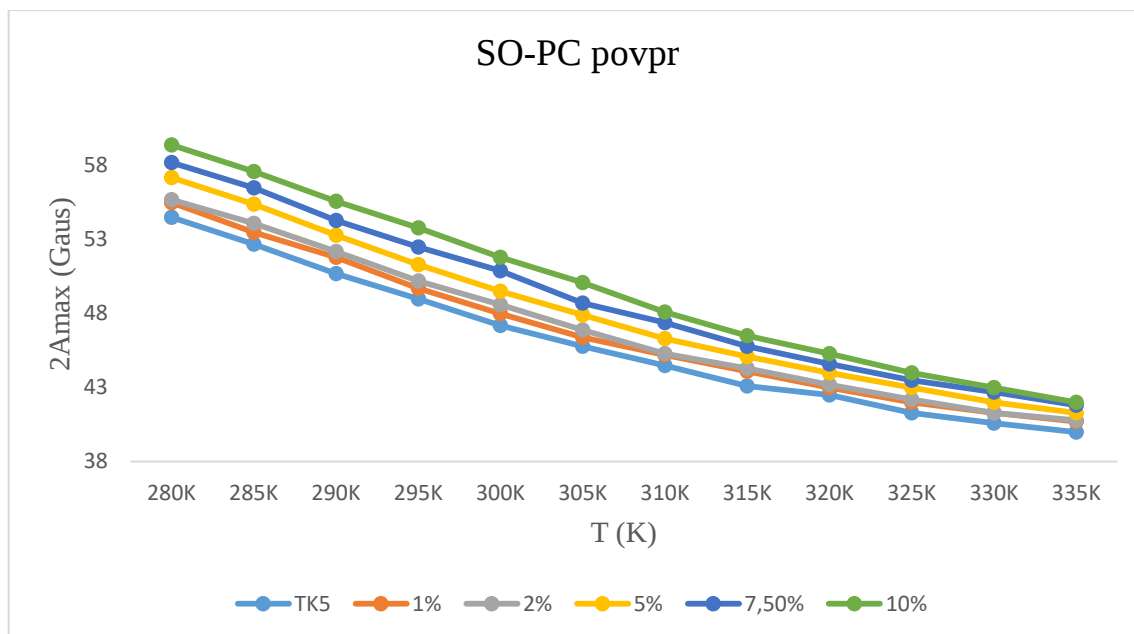
Vrednosti $2A_{\max}$ pri TK z resveratrolom označenih z **10P** so najnižje v primerjavi z ostalima dvema SO in se manjšajo z nižanjem temperature (slika 9). Razlike v vrednostih $2A_{\max}$ pa so pri isti temperaturi največje in se manjšajo z višanjem temperature. Višji kot je delež resveratrola, večja je vrednost $2A_{\max}$. Tudi razlika med vrednostjo $2A_{\max}$ pri najnižji in najvišji temperaturi je največja pri TK z 10% (m/m) resveratrolom. Največje razlike v vrednosti $2A_{\max}$ so pričakovane pri tem SO, saj je lokacija doksilne skupine na najbolj neurejenem območju fosfolipidnega dvosloja (najgloblje v membrani), posledično se tam molekule bolj prosto gibljejo.



Slika 12: Odvisnost $2A_{\max}$ od temperature za 10P v TK brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m))

Pri **SO-PC** so razlike med različnimi deleži resveratrola najmanjše in se z višanjem temperature še zmanjšujejo. Tudi v primeru tega SO je najvišja vrednosti $2A_{\max}$ pri 10 % (m/m) resveratrola, najnižja pa pri vzorcu, kjer resveratrol sploh ni vgrajen (oznaka TK5 na sliki 10).

Pri vseh treh SO opazimo razlike v $2A_{\max}$ že pri 1 % (m/m) resveratrola v primerjavi z vzorcem, ki ga ne vsebuje (oznaka TK5).

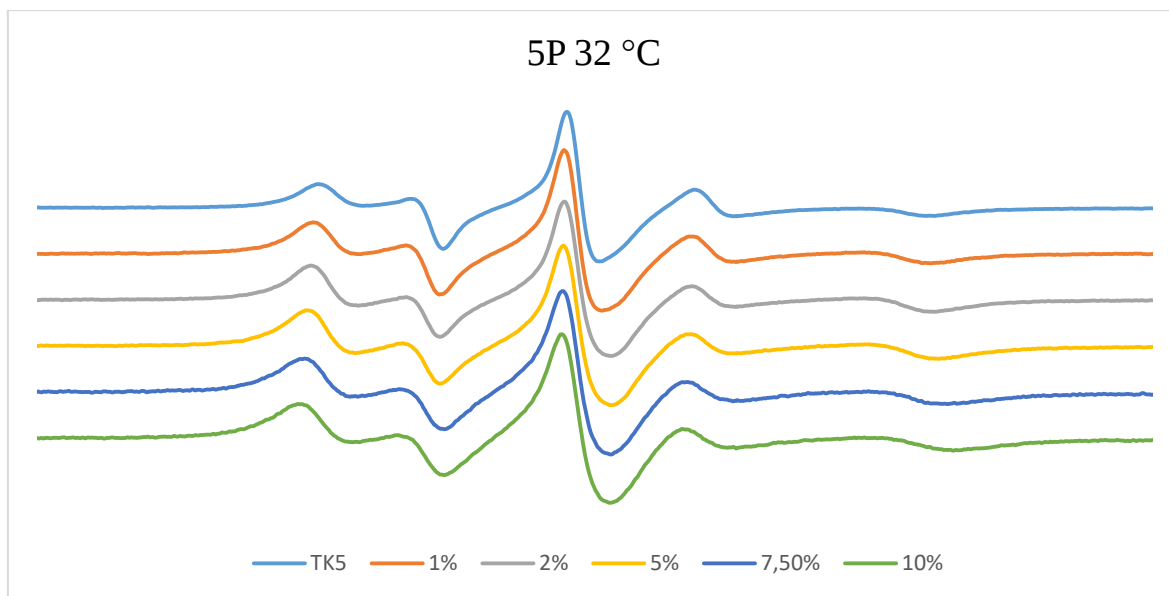


Slika 13: Odvisnost 2Amax od temperature za SO-PC v TK5 brez resveratrola in pri različnih deležih resveratrola (% (m/m))

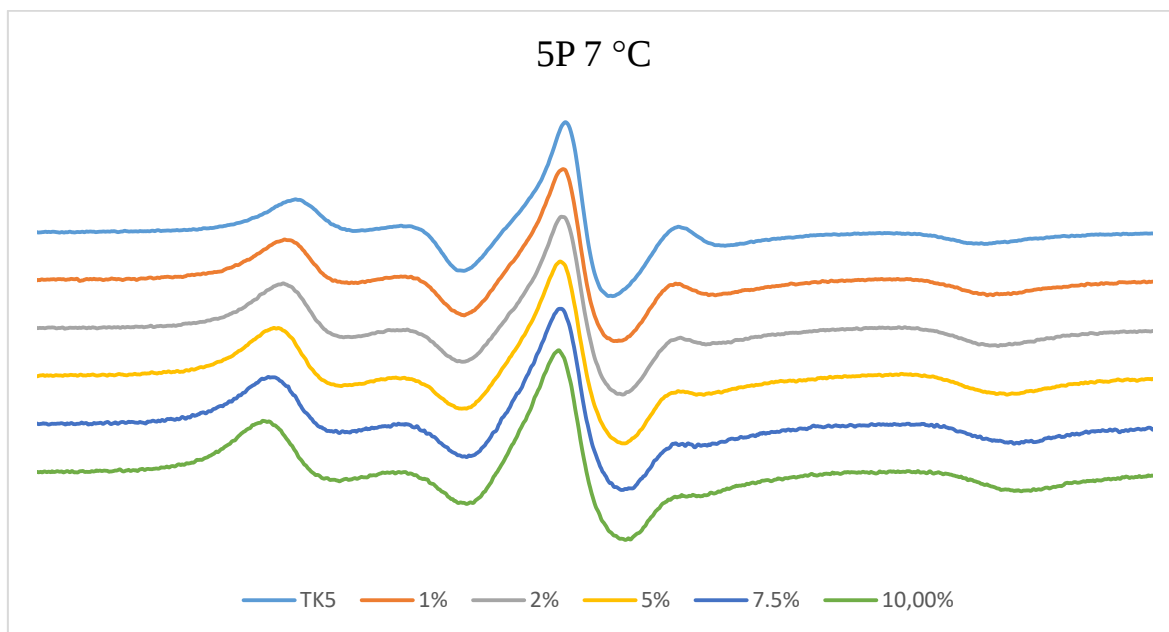
4.4 ANALIZA SPEKTROV PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH

4.4.1 Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih s SO 5P

Spektri so posneti pri treh različnih temperaturah: 7, 32 in 57 °C. Razlike med različnimi deleži resveratrola so takoj opazne. Najširši spekter ima vzorec TK z 10 % (m/m) resveratrola. Pri nizki temperaturi so spektri širši in nižji, z višanjem temperature so spektri ožji in višji, ker so molekule bolj gibljive.

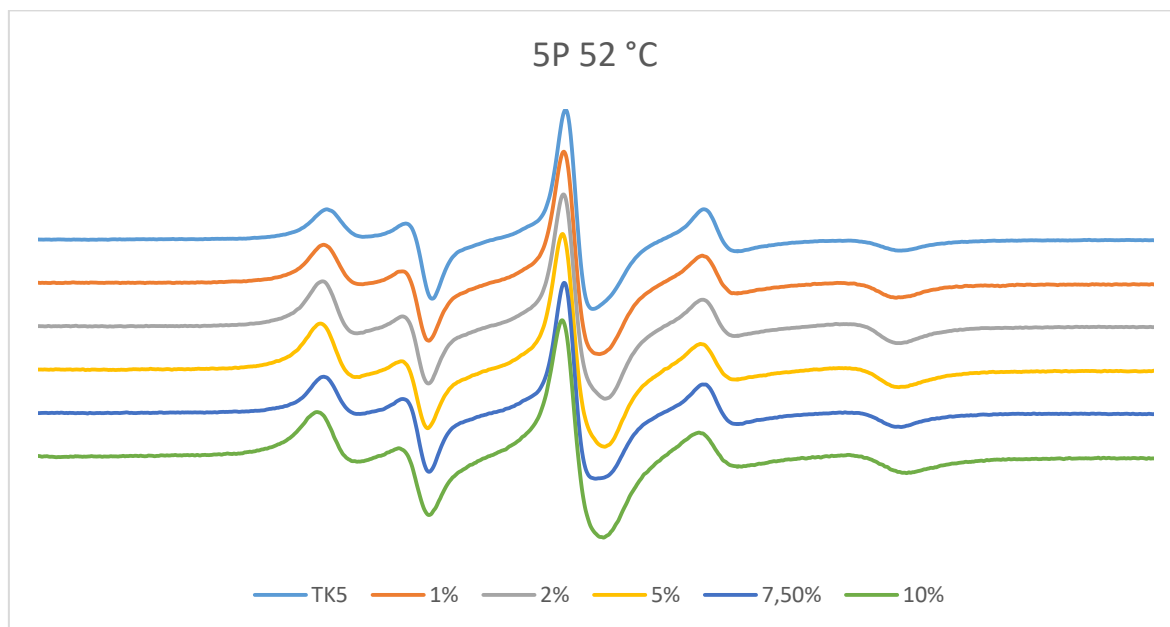


Slika 14: Spektri EPR 5P v TK brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 32 °C



Slika 15: Spektri EPR 5P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) posneti pri 7 °C

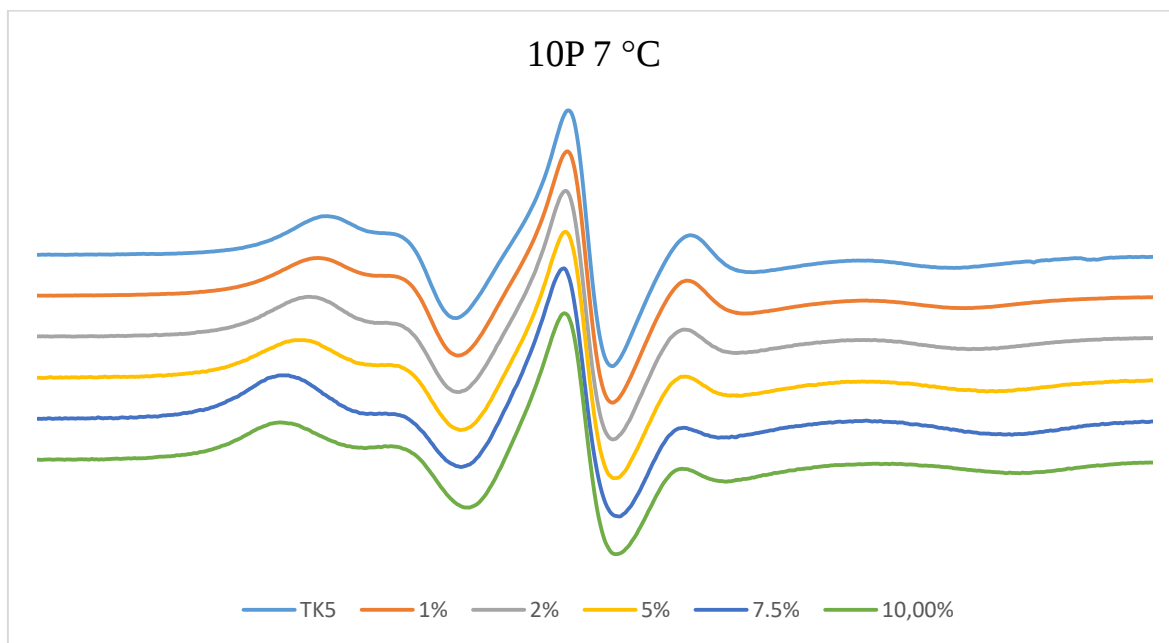
Zaradi lege doksilne skupine, ki je v najbolj urejenem območju fosfolipidnega dvosloja, so spektri **5P** v TK5 z različnim deležem resveratrola najširši (slike 11, 12, 13). Razlike med različnimi deleži resveratrola so opazne in imajo vpliv na urejanje območja v bližini polarnih glav fosfolipidov.



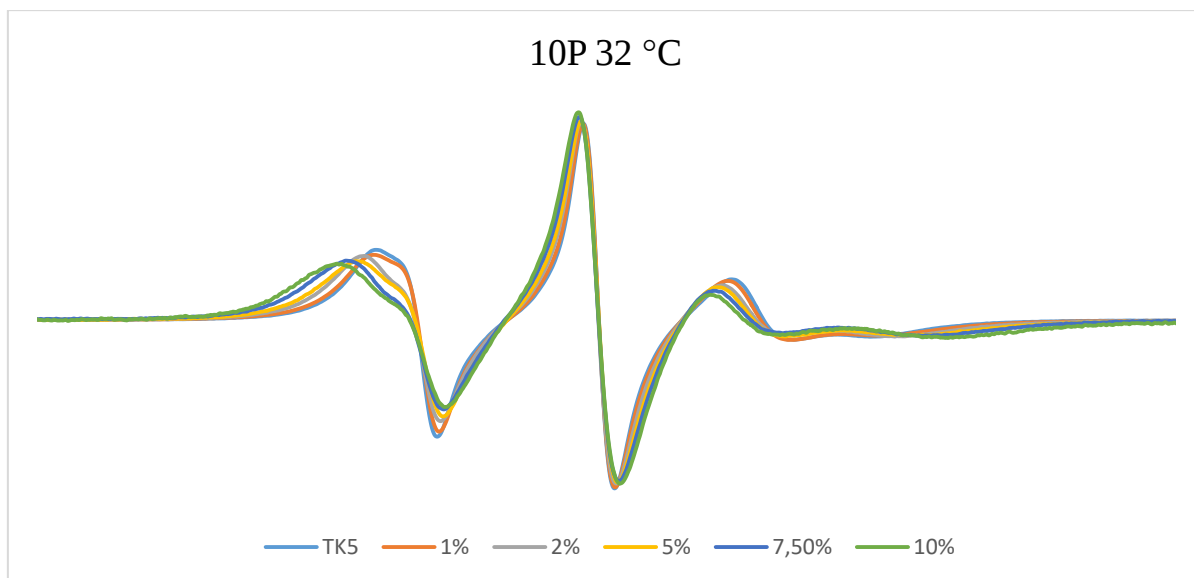
Slika 16: Spektri EPR 5P v TK5 brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 57 °C

4.4.2 Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih z 10P

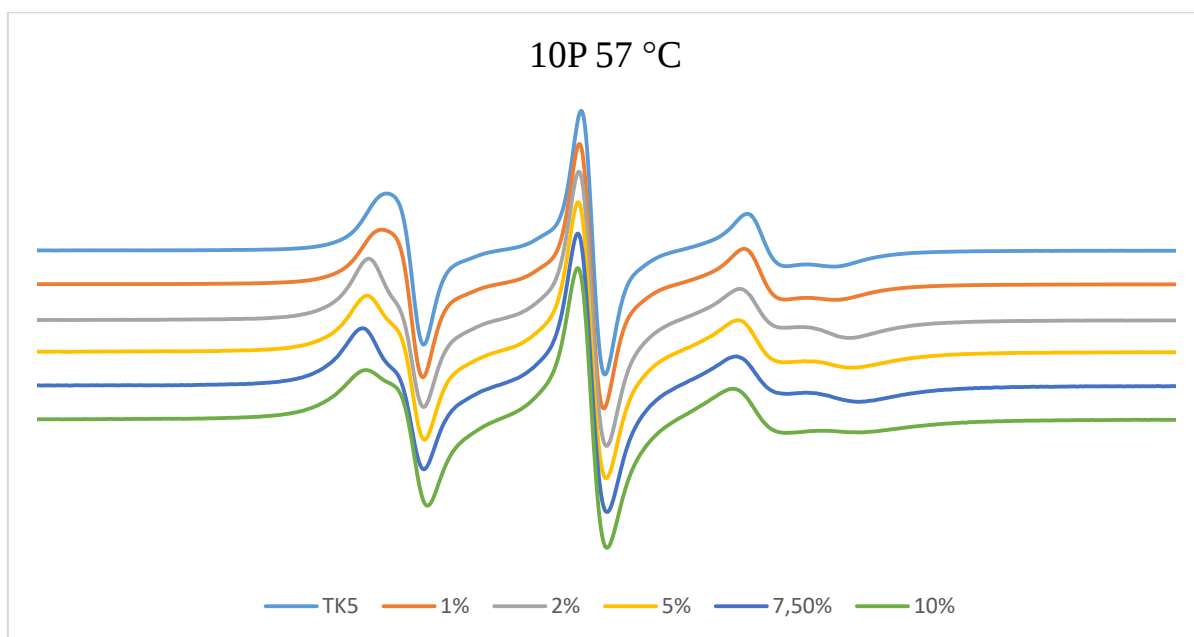
SO **10P** v TK z resveratrolom nam da informacijo dogajanju na območju znotraj lipidnega dvosloja. Razlike so opazne pri različnih deležih resveratrola pri isti temperaturi. Širina spektra se večja z višanjem deleža resveratrola in z višanjem temperature (slika 14, 15, 16).



Slika 17: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnimi deleži resveratrola (% (m/m)) posneti pri 7 °C



Slika 18: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 32 °C

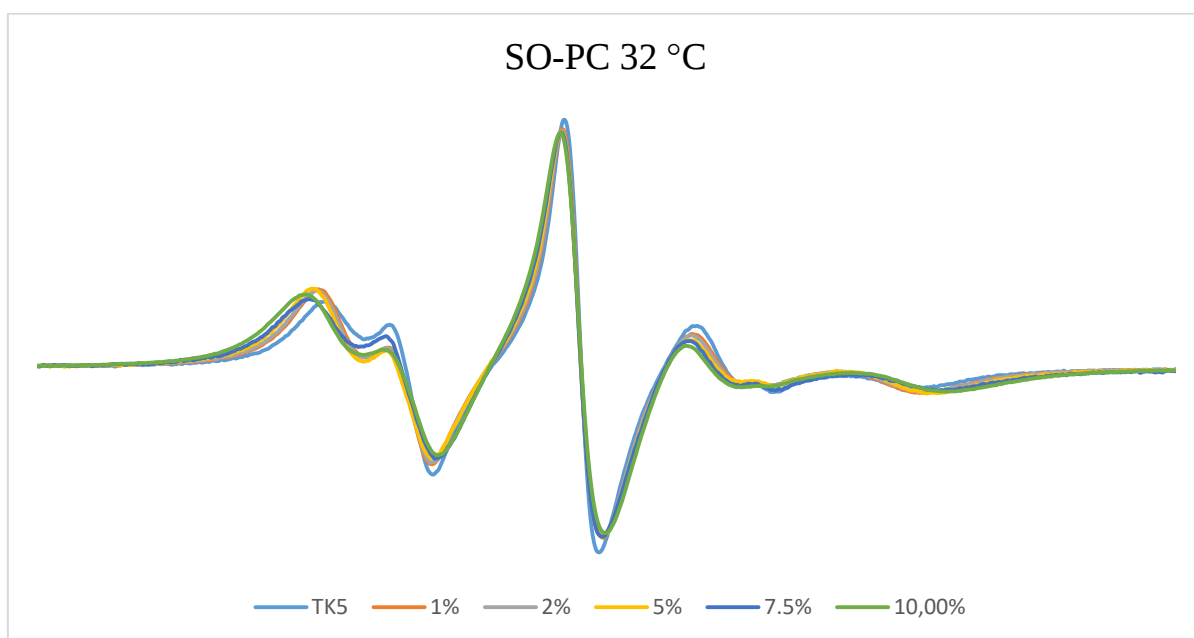


Slika 19: Spektri EPR 10P v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 57 °C

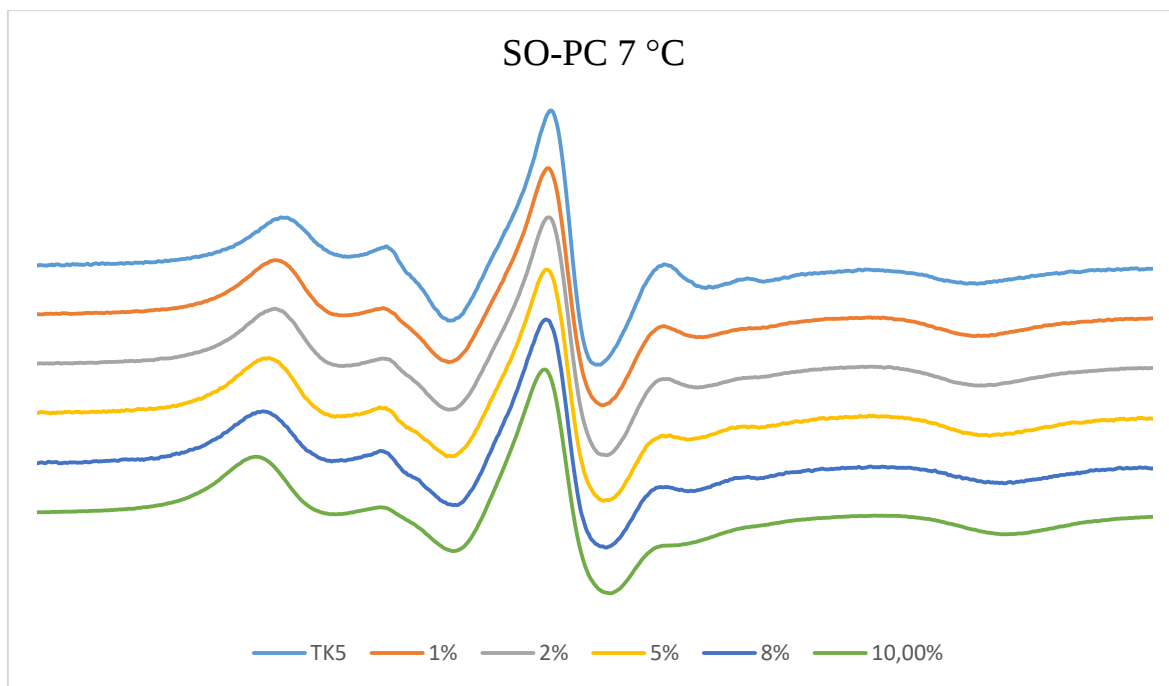
Z višanjem temperature so spektri EPR vedno ožji in vedno višji, kar vpliva na urejenost TK.

4.4.3 Analiza spektrov TK z resveratrolom označenih s SO SO-PC

Normalizirani spektri **SO-PC** pri 32 °C so si med seboj precej podobni (sliki 17 in 18). Z višanjem temperature so vedno ožji in višji, med različnimi deleži resveratrola pa ni tako velikih razlik. Zaradi lokacije doksilne skupine v bližini vodno-lipidnega stika je spekter širok in s tem spinskim označevalcem preučujemo dogajanje v okolici zgornje tretjine lipidnega monosloja.



Slika 20: Normalizirani spektri EPR SO-PC v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 32 °C



Slika 21: Normalizirani spektri EPR SO-PC v TK brez resveratrola in z različnim deležem resveratrola (% (m/m)) pri 7 °C

5. SKLEPI

V sklopu diplomske naloge smo pripravili TK sestavljene iz izopropilmiristata, lecitina, Tweena 80 in bidestilirane vode. Vanje smo vgradili različne koncentracije resveratrola. Pri deležih 15 in 20 % (m/m) se ves resvertol ni vgradil v TK, zato smo meritve opravili le pri 1, 2, 5, 7,5 in 10% (m/m) resveratrola v TK. Pripravljene TK smo spinsko označili s **SO 5P**, **10P** in **SO-PC** in jim pomerili EPR spektre. Meritve smo izvajali pri dvanajstih različnih temperaturah, v območju od 280 K – 335 K.

Zaradi lokacije doksilne skupine v bližini polarne glave molekul, smo s **SO 5P** in **SO-PC** opazovali dogajanje v bližini vodno-lipidnega dvosloja, **SO 10P** pa ima doksilno skupino pomaknjeno bolj na sredino verige in zato z njim opazujemo urejenost in dinamiko bolj v notranjosti fosfolipidnega dvosloja. Iz dobljenih spektrov smo razbrali širino maksimalnega hiperfilnega razcepa. Zanimalo nas je, kako se spreminjata $2A_{\max}$ in urejenost strukture v odvisnosti od koncentracije resveratrola in temperature. Ugotovili smo, da se urejenost TK zmanjšuje z zviševanjem temperature. Pri 335 K se molekule najhitreje gibljejo, struktura pa je najmanj urejena. Tudi z večanjem koncentracije resveratrola se vrednost maksimalnega hiperfilnega razcepa viša. Največje razlike v vrednosti $2A_{\max}$ smo opazili pri TK z resveratrolom označenimi s **SO 10P**, najmanjše pa pri **SO SO-PC**. Razlike v vrednostih $2A_{\max}$ so največje pri najnižji temperaturi in se z višanjem le-te zmanjšujejo. To pomeni, da ima vgrajevanje resveratrola večji vpliv na dogajanje v notranjosti fosfolipidnega dvosloja, kot pa na predelih višje oz. bližje polarnemu delu, ker so lipidne verige že sicer bolj urejene.

Po opazovanju spektrov pri različnih temperaturah smo pri vseh SO ugotovili, da površina pod krivuljo ostaja vedno enaka (nitroksidi se ne reducirajo), krivulja spektra EPR pa je vedno višja in ožja pri višji temperaturi. Taki rezultati so pričakovani in kažejo na to, da je pri višji temperaturi okolje manj urejeno, molekule pa so bolj gibljive.

V sklopu celotnega raziskovalnega dela smo ugotovili, da že pri 1% vgrajenega resveratrola pride do sprememb v maksimalnem hiperfinem razcepu, kar bolj vpliva na urejanje molekul v notranjosti fosfolipidnega dvosloja, kot v višje ležečih predelih. Obnašanje TK z resveratrolom je pri EPR meritvah v odvisnosti od temperature podobno tistim TK, kjer resveratrola nismo vgradili, saj se pri vseh manjša urejenost pri naraščanju

temperature. Ugotovili smo, da so taki TK so primerni za dermalno uporabo, ki z vgrajeno antioksidativno učinkovino omejujejo staranje kože.

Ker so TK vedno bolj uporabljena dostavna oblika s prirejenim sproščanjem, so rezultati študije EPR pomemben doprinos k že vsem prej opravljenim študijam z drugimi raziskovalnimi metodami, ko so resveratrol vgradili v druge dostavne sisteme npr. liposome (4).

6. VIRI IN LITERATURA

1. Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N: The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenger, Arch Biochem Biophys 2011; 508(2): 164-170.
2. Janeš D, Kočevar Glavač N: Sodobna kozmetika, Širimo dobro besedo, d.o.o., Velenje, 2015. 246-248, 252.
3. Gülçin İ: Antioxidant properties od resveratrol: A structure-activity insight, Innovative Food Science and Emerging Technologies 2010; 11: 210-218.
4. Bonda C, Zhang J, Pavlovic A, The HallStar Company: The Photostability and Photostabilization of *trans*-Resveratrol, Cosmetics&Toiletries, 2011; 652: 126-129.
5. Balanč D. B, Ota A, Djordjević B. V, Šentjerc M, Nedović A. V, Bugarski M. B, Ulrih Poklar N: Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2015; 117: 1615-1626.
6. Gosenca Matjaž M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje, Farm. vestnik 2011; 62: 15-25.
7. Vilfan M, Muševič I: Tekoči kristali, DMFA, Ljubljana, 2002. 10-16, 25-37.
8. Collings J. P, Hird M: Introduction to liquid crystals, Taylor & Francis, London, 1997, 1-17, 133-147.
9. Giamello E, Brustolon M: Eletron paramagnetic resonance a practitioner's toolkit, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2009, 3-9, 37-50, 83-84, 135-139, 391.
10. Mravljak J: Reaktivni kisikovi in dušikovi intermediati, demonstracijske vaje. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
11. Geschwind S: Electron paramagnetic resonance, Plentum press, New York, 1972
12. Haugland M. M., Anderson A. E., Lovett E.J.: Tuning the properties of nitroxide spin labels for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy through chemical modification of nitroxide framewrok, EPR-Electron paramagnetic resonance 25, 2016, 1-34.
13. Atkins P, De Paula J: Atkins' Physical Chemistry, 9th edition, Oxford 2010; 553-559.
14. Matjaž M.G, Mravljak J, Rogač Bešter M, Šentjerc M, Gašperlin M, Pobirk Zvonar A: Microstructure evaluation of dermally applicable liquid crystals as a function of

- water content and temperature: Can electron paramagnetic resonance provide complementary data?, *Int J Pharmaceut*, 2017.
15. Bamidele O.P., Duodu K.G., Emmambux M.N.: Encapsulation and antioxidant activity of ascorbyl palmitate with maize starch during pasting, *Carbohydrate Polymers*, 2017 (166), 202-208.
 16. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=204, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/204> (dostop 12.6.2017) ALANTOIN.
 17. Al-Dhabi A. N, Arasu V. M, Park Ha C, Park Un S: An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities, *EXCLI J* 2015; 14: 59-63 RUTIN.
 18. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F: Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(12): 982-985 (KOJIČNA KISLINA).
 19. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water BENZOPHENONE, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 101, 2013.
 20. Sarzi-Putini P, Atzeni F, Lanata L, Bagnasco M, Colombo M, Fischer F, D'Imporzano M.: Pain and ketoprofen: What is its role in clinical practice?, *Reumatismo* 2010; 62(3): 172-188.
 21. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3825, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825> Dostop: 12.6.2017
 22. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Dolenc Sollner M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015.
 23. Fiume Z: Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *Int J Toxicol*. 2001; 20, 21-45.
 24. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=8042, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8042> (accessed June 12, 2017).

25. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5281955, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281955> (accessed June 12, 2017).
26. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Sci., 4th Ed.. Publ., 2007
27. Islamović S: Vrednotenje strukture liotropnih tekočih kristalov z elektronsko paramagnetno resonanco. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana, 2017
28. MRAVLJAK, Janez, ZEISIG, Reiner, PEČAR, Slavko. Synthesis and biological evaluation of spin-labelled alkylphospholipid analogs. *Journal of medicinal chemistry*, 2005, vol. 48, no. 20, str. 6393-6399