

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TEPEŠ

**RAZVOJ SAMO-MIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMOV NA
OSNOVI MEŠANIH GLICERIDOV ZA DOSTAVO SLABO
VODOTOPNE UČINKOVINE KARVEDILOLA**

**DEVELOPMENT OF MIXED GLYCERIDES BASED SELF-
MICROEMULSIFYING SYSTEMS WITH POORLY WATER-
SOLUBLE DRUG CARVEDILOL**

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za Farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom dr. Alenke Zvonar Pobirk.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Alenki Zvonar Pobirk za vso pomoč, usmerjanje in nasvete pri izdelavi ter pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi tehničnima sodelavkama na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, gospema Mojci Keržan in Tatjani Hrovatič za vsestransko praktično pomoč pri diplomski nalogi ter prof. dr. Roku Dreu za pomoč pri izdelavi fotografij.

Prisrčna zahvala pa je namenjena družinskim članom in prijateljicam za vso podporo in vztrajno spodbujanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice dr. Alenke Zvonar Pobirk.

Janja Tepeš

POVZETEK

Med zdravilnimi učinkovinami se predvsem zaradi novo odkritih spojin povečuje delež slabo vodotopnih spojin, precej jih tudi slabo prehaja biološke membrane. Zaradi slabe vodotopnosti se po peroralni aplikaciji počasi raztapljajo, slabo absorbirajo in posledično izkazujejo slabo biološko uporabnost.

Namen našega dela je bil razviti samo-mikroemulgirajoče sisteme (SMES), primerne za izboljšanje topnosti učinkovine karvedilol, ki jo po biofarmaceutski klasifikaciji uvrščamo v II. razred (slaba topnost, dobra permeabilnost). Izdelali smo 14 različnih SMES, ki smo jih titrirali z vodo in vizualno ocenili nastanek mikroemulzije (ME). Z računalniškim programom smo rezultate našega dela predstavili v obliki (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov, s katerimi smo ocenili obseg nastanka ME. Sistemom smo izmerili velikost kapljic nastalih ME ter solubilizacijsko kapaciteto in stabilnost vgrajene učinkovine.

Pripravljeni SMES so vsebovali mešane srednje- in dolgoverižne monogliceride in trigliceride (oljna faza) in hidrofilne površinsko aktivne snovi (emulgator). Največje področje nastanka stabilnih ME smo ugotovili pri sistemu Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40. Velikost kapljic in vrednost polidisperznega indeksa (PDI) sta potrdila nastanek ME v širokem področju (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama.

Izbrani SMES ima zadovoljivo solubilizacijsko kapaciteto in ohrani visoko stabilnost vgrajene učinkovine po 4 tednih staranja pri sobni temperaturi (25 °C) kot tudi pri povišani temperaturi (40 °C). Vsebnost vgrajene učinkovine karvedilol je bila v vseh primerih višja od 90 % začetne koncentracije. Izbrani SMES je relativno primeren za vgrajevanje izbrane zdravilne učinkovine, še zlasti ob sočasni pretvorbi sistema v trdno farmacevtsko obliko.

Ključne besede: mikroemulzije, samo-mikroemulgirajoči sistem (SMES), (psevdo)trikomponentni fazni diagram, velikost kapljic, solubilizacijska kapaciteta.

ABSTRACT

Among the active ingredients the proportion of poorly water-soluble compounds increases mainly due to newly discovered compounds, many of them badly pass biological membranes. Due to low solubility in water after oral administration they slowly dissolve, poorly absorb and consequently exhibit poor bioavailability.

The purpose of our work was to develop self-microemulsifying systems (SMES), suitable to improve the solubility of the active ingredient carvedilol which is, according to the biopharmaceutical classification, classified into class II (poor solubility, good permeability). We made 14 different SMES that we titrated with water and visually assessed the formation of micro-emulsion (ME). With the computer programme we presented the results of our work in the form of ternary diagrams by which we assessed the extent of the formation of the ME. We measured droplet size, ME and solubilizing capacity and stability of the incorporated active ingredient of the system.

The prepared SMES contained mixed medium and long chain monoglycerides and triglycerides (oil phase) and a hydrophilic surfactant (emulsifier). The largest area of the formation of stable ME was found in the system Capmul MCM EP / castor oil = 2: 1 / Cremophor CO 40. Droplet size and value of the polydisperse index (PDI) confirmed the formation of the ME in the broad field of ternary diagram.

The selected SMES has a sufficient solubilizing capacity and maintains high stability of the incorporated ingredient after 4 weeks of aging at room temperature (25 °C) as well as at elevated temperature (40 °C). The content of the incorporated active substance carvedilol was in all cases greater than 90 % of the initial concentration. The selected SMES is relatively suitable for incorporation of the selected active ingredient, in particular with the conversion of a system into a solid pharmaceutical form.

Keywords: microemulsion, self-microemulsifying system (SMES), ternary diagram, droplet size, solubilization capacity.

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

BU - biološka uporabnost

DG - digliceridi

dv-MG - dolgoverižni monogliceridi

dv-TG - dolgoverižni trigliceridi

FDA - Food and Drug Administration (Urad za hrano in zdravila v ZDA)

GIT - gastro-intestinalni trakt

GRAS - Generally recognised as safe (splošno priznano, da je uporaba varna)

ME - mikroemulzija

MG - monogliceridi

PDI - polidisperzni indeks

PEG - polietilenglikol

PTFD - psevdo-trifazni diagram

sdv-MG - srednjedolgoverižni monogliceridi

sdv-TG - srednjedolgoverižni trigliceridi

SES - samoemulgirajoči sistemi

SMES – samo mikro-emulgirajoči sistemi

TG - trigliceridi

ZU - zdravilna učinkovina

KAZALO

POVZETEK	ii
ABSTRACT	iii
SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV	iv
KAZALO	v
KAZALO SLIK	vii
KAZALO PREGLEDNIC	viii
1. UVOD	1
1.1. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI	1
1.2. KLASIFIKACIJA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV	3
1.2.1. Razred I	4
1.2.2. Razred II	5
1.2.3. Razred III	6
1.2.4. Razred IV	7
1.3. SAMO (MIKRO-/NANO-) EMULGIRAJOČI SISTEMI	8
1.4. MEHANIZEM SAMO – MIKROEMULGIRANJA	10
1.5. SESTAVA SAMO – MIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMOV	10
1.5.1. Splošna pravila	11
1.5.2. Trigliceridi (TG) in mešani gliceridi	11
1.5.3. Emulgatorji	12
1.5.4. Sotopila	14
1.6. PSEVDO – TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM (PTFD)	14
1.7. KARVEDILOL	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1. Materiali	19
3.2. Metode	23
3.2.1. Izdelava psevdo – trikomponentnega faznega diagrama (PTFD)	23
3.2.2. Določanje solubilizacijske kapacitete izbranih komponent in SMES za učinkovino karvedilol	28
3.2.3. Določanje stabilnosti karvedilola v izbranih komponentah in SMES	29
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1. IZDELAVA PSEVDO-TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV (PTFD) ...	30
4.2. DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC (MIKRO)EMULZIJ	53

4.2.1. Sistemi s Capmulom GMO.....	53
4.2.2. Sistemi s Capmulom MCM EP.....	55
4.2.3. Ostali sistemi.....	58
4.3. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE IN STABILNOSTI KARVEDI- LOLA	59
5. SKLEPI	63
6. LITERATURA.....	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Način uporabe/interpretacije (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, povzeto po (1)-----	16
Slika 2: Različni tipi sistemov, ki nastanejo znotraj področja (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, povzeto po (12)-----	16
Slika 3: Prikaz razredčitvenih premic na psevdo-trikomponentnem faznem diagramu-----	26
Slika 4: Zetasizer Nano ZS, aparat za merjenje velikosti kapljic (mikro)emulzij, nastalih z redčenjem SMES z vodo-----	28
Slika 5: PTFD za sistem Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	31
Slika 6: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode v sistemih je 95 %.-----	31
Slika 7: PTFD za sistem Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	33
Slika 8: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	34
Slika 9: PTFD za sistem Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	34
Slika 10: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	35
Slika 11: PTFD za sistem Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	36
Slika 12: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	36
Slika 13: PTFD za sistem Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	38
Slika 14: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	39
Slika 15: PTFD za sistem Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije-----	40
Slika 16: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	40
Slika 17: PTFD za sistem Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije-----	41
Slika 18: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	41
Slika 19: PTFD za sistem Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.-----	43
Slika 20: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.-----	43
Slika 21: PTFD za sistem Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije-----	45
Slika 22: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95	

%.....	45
Slika 23: PTFD za sistem (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20, modre točke predstavljajo mikroemulzije.....	46
Slika 24: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 z vodo; vsebnost vode je 95 %..	47
Slika 25: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20, modre točke predstavljajo mikroemulzije.....	48
Slika 26: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 z vodo; vsebnost vode je 95 %..	48
Slika 27: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/PEG 400, modre točke predstavljajo mikroemulzije.....	50
Slika 28: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/PEG 400 z vodo; vsebnost vode je 95 %..	50
Slika 29: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 : PEG 400 = 4:1, modre točke predstavljajo mikroemulzije.....	52
Slika 30: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 : PEG = 4:1 z vodo; vsebnost vode je 95 %.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava na lipidih osnovanih sistemov, za katere smo izdelali PTFD.....	24
Preglednica 2: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40.....	53
Preglednica 3: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/ Kolliphor HS 15.....	54
Preglednica 4: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40.....	54
Preglednica 5: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15.....	54
Preglednica 6: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40.....	56
Preglednica 7: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15.....	56
Preglednica 8: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40.....	56
Preglednica 9: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15.....	57
Preglednica 10: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40.....	58
Preglednica 11: Nasičena topnost karvedilola (v mg ZU/g komponente) pri sobni temperaturi in stabilnost kavedilola v izbranih sistemih po 4 tednih staranja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) oz. povišani temperaturi (40 °C) (podana kot % vsebnosti kavedilola glede na nasičeno topnost določeno ob času t = 0).	60
Preglednica 12: Nasičena topnost karvedilola (v mg ZU/g SMES) pri sobni temperaturi in stabilnost kavedilola v izbranih SMES po 4 tednih staranja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) oz. povišani temperaturi (40 °C) (podana kot % vsebnosti kavedilola glede na nasičeno topnost določeno ob času t = 0). Številki 2 in 4 ob sestavi SMES pomenita 2. linijo (80 % emulgatorja, 20 % oljne faze) in 4. linijo (60 % emulgatorja, 40 % oljne faze).	61

1. UVOD

Z različnimi računalniškimi programi ves čas intenzivno iščejo nove kemične spojine, ki bi lahko bile terapevtsko uporabne. Na ta način razvijejo precej novih zdravilnih učinkovin (ZU) ali pa optimizirajo že prej poznane. Med novimi ZU pa jih je na žalost zelo veliko (kar 40 %) v vodi slabo topnih, zaradi česar je tudi njihova absorpcija slabša (1).

Topnost ZU vpliva na njeno hitrost raztapljanja. Slabo vodotopne snovi so pogosto problematične prav zaradi počasnega raztapljanja, zaradi česar dosežejo slabšo absorpcijo in slabšo biološko uporabnost (BU) pri peroralni aplikaciji. V takšnem primeru običajno pacient dobi večji odmerek zdravila, da po absorpciji iz prebavnega trakta lahko dosežemo ustrezno koncentracijo ZU v krvi (terapevtska koncentracija). Zaradi visokih odmerkov je večja verjetnost za toksične učinke v gastro-intestinalnem traktu (GIT), posledica pa je zmanjšanje compliance (pacienti so precej manj pripravljeni sodelovati v procesu zdravljenja) (2).

Peroralna aplikacija zdravil je najbolj priljubljena, posebno pri kroničnih bolnikih (3,4).

Intravensko apliciranje ima več možnih slabih strani – poleg najočitnejše (agresivna aplikacija, saj je potrebno večkratno zbadanje z injekcijsko iglo ali celo namestitev intravenskega katetra) je možna tudi ekstravazacija, infekcija na mestu, kjer je uveden kateter in tromboza. Vse naštetu predstavlja razloge v prid peroralne aplikacije.

Veliko ZU pa je manj primernih za vgradnjo v peroralne farmacevtske oblike, ker so slabo vodotopne, slabo permeabilne (v manjši meri prehajajo biološke membrane) in se lahko hitro metabolizirajo, vse to pa zmanjša njihovo BU (4). Pri takšnih ZU v fazi njihove optimizacije očitno niso mogli izboljšati lastnosti ZU, ki vplivajo na njihovo zmanjšano BU, kar verjetno pomeni, da so nezaželene lastnosti povezane s tistimi deli kemijske strukture ZU, ki so nujno potrebni za njeno terapevtsko delovanje (5).

Že v fazi razvoja ZU lahko nastanejo težave, saj je treba preveriti številne biološke lastnosti:

učinkovitost, genotoksičnost, prehajanje bioloških membran. Če je ZU slabo topna ali precipitira (v vodnem mediju, ki simulira pogoje raztapljanja *in vitro*, se zaradi slabe topnosti obori), predklinične študije ne dajo zanesljivih podatkov. Prav tako ne morejo biti zanesljivi *in vivo* toksikološki testi, pri katerih uporabljajo višje koncentracije ZU in klinični testi, saj slaba BU pomeni tudi slabši terapevtski potencial ZU (v kliničnih testih primerjajo izboljšanje simptomov bolezni po aplikaciji uveljavljenega zdravila in novega zdravila; ne morejo dokazati precej boljše učinkovitosti novega zdravila, ker je njegova ZU slabo vodotopna in se absorbira le v manjši meri) (2).

Slabo vodotopnost lahko izboljšajo z naslednjimi kemijskimi ali fizikalnimi spremembami ZU ali z različnimi tehnološkimi pristopi (npr. z vgradnjo ZU v drugačno farmacevtsko obliko ali v novejši dostavni sistem):

- kristalna modifikacija (metastabilni polimorfi, soli, kokristali),
- sprememba pH,
- nastanek amorfnosti snovi,
- zmanjšanje velikosti delcev (mikronizacija, nanokristali),
- lipidne formulacije (kapsule, polnjene z lipidom, samo-emulgirajoči sistemi) (2,3).

1.1. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Ugotovili so, da je BU nekaterih ZU precej povečana, če jih pacienti zaužijejo s hrano, ki vsebuje precej maščobe (4,6,7). Na ta način je možno izboljšati absorpcijo slabo vodotopnih učinkovin. Masten obrok omogoči fiziološke odzive organizma: povečana sekrecija žolča in pankreatičnih sokov, povečanje permeabilnosti črevesne membrane, daljše zadrževanje vsebine zaužitega obroka v želodcu in poveča se transport v limfatični sistem. Vpliv hrane na povečano absorpcijo ZU je tako izrazit, da se v nekaterih primerih pojavljajo celo pomisleki o ustreznosti takšne aplikacije. Težave lahko nastanejo pri zagotavljanju ustrezne koncentracije ZU v plazmi, ki se zelo poveča zaradi hrane (presnova maščob) in pri ZU z ozkim terapevtskim indeksom lahko povzroči povečanje števila in resnosti stranskih učinkov. Nasprotno pa pri slabo vodotopnih ZU velja, da brez povečane absorpcije ne dosežemo terapevtske koncentracije v plazmi, zato je potrebno daljše zdravljenje (4).

Soodvisnost med hrano in zadovoljivo absorpcijo so obšli z razvojem na lipidih osnovanih sistemov, ki omogočijo, da se v GIT vzpostavijo podobni pogoji kot po obroku hrane, ki vsebuje precej maščob (FDA v dokumentu Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence navaja, da obrok z veliko maščob vsebuje 50-65 % maščob, 25-30 % ogljikovih hidratov, 15-20 % beljakovin in skupno 800-1000 kalorij) (4).

1.2. KLASIFIKACIJA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV

ZU, vgrajena v na lipidih osnovane sisteme, mora oz. naj bi v čim večjem obsegu ostala raztopljena v lipidni formulaciji tudi po dispergiranju slednje v prebavnih sokovih želodca, duodenuma in črevesja ter med celotnim procesom presnove, da se ZU lahko absorbira iz GIT. Če se ZU obori, nastanejo trdni delci, ki se morajo pred absorpcijo najprej ponovno raztopiti v vodnem okolju GIT, to pa je problematično za slabo vodotopne ZU. Pri le-teh je ravno hitrost raztapljanja omejujoč dejavnik za učinkovito absorpcijo (8,9).

Pomembna je tudi velikost kapljic emulzije, ki nastane po dispergiranju na lipidih osnovanih sistemov v GIT, saj lahko manjše kapljice (mikro- in nano- metrske), ki difundirajo skozi vodno plast do črevesne sluznice, omogočijo hitrejšo absorpcijo ZU. Zato so sistemi, ki že vsebujejo majhne kapljice notranje faze z ZU (mikroemulzije, nanoemulzije) ali le-te spontano nastanejo ob stiku sistemov z vodnim okoljem GIT (samo(mikro)emulgirajoči sistemi – S(M)ES) uspešnejši pri zagotavljanju ustrezne absorpcije ZU (8,9).

Na lipidih osnovane sisteme sestavljajo:

- lipidi,
- emulgatorji (za emulgiranje lipidov, solubiliziranje ZU),
- sotpila (raztapljanje ZU in hidrofilnih emulgatorjev v lipidu, dispergiranje).

Od relativnih deležev posameznih komponent na lipidih osnovanih sistemov je odvisno,

kakšna bo topnost ZU v formulaciji, disperzibilnost lipidne formulacije, transport ZU (če je ZU dispergirana v sotopilu, ki zaradi svoje polarnosti lahko prehaja v vodno okolje GIT, se bo solubilizacijska kapaciteta za raztapljanje ZU znižala, ZU se bo oborila, pred absorpcijo se bo zato morala raztopiti v vodnem okolju prebavnih sokov, to pa bo počasen proces, saj je ZU slabo vodotopna). Deleži komponent na lipidih osnovanih sistemov vplivajo tudi na metabolizem formulacije, na njeno stabilnost in kompatibilnost s kapsulami, v kolikor želimo tekočo na lipidih osnovano formulacijo pretvoriti v trdno obliko s polnjenjem v mehke ali trde kapsule.

Za vgradnjo v na lipidih osnovane sisteme obstaja veliko primernih spojin, še precej več pa je možnih kombinacij med njimi. Zato je Pouton leta 2000 (9) razvil klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov (LFCS – lipid formulation classification system), zdaj pa se uporablja dopolnjena različica klasifikacijskega sistema iz leta 2006 (8), ki je delo istega avtorja.

Klasifikacijski sistem je razdeljen na 4 razrede, glede na deleže posameznih komponent (lipidov, emulgatorjev in sotopil) v formulaciji. Omogočil je primerjavo lastnosti različnih na lipidih osnovanih sistemov, njihove kapacitete za vgradnjo nekaterih ZU, velikosti kapljic nastalih emulzij, njihovega obsega absorpcije in vpliva na izboljšanja biološke uporabnosti vgrajenih ZU. Še pomembneje pa je, da klasifikacijski sistem predstavlja korak naprej v smeri vnaprejšnje identifikacije najprimernejših formulacij za posamezne ZU in napovedovanje verjetnosti obarjanja ZU pri redčenju sistema med procesom prebave v GIT.

1.2.1. Razred I

To je najpreprostejši na lipidih osnovan sistem, v katerem so ZU (npr. v oljih topni vitamini A, D in E) raztopljeni v oljni fazi (TG) in napolnjeni v kapsule. Po zaužitju se kapsula razgradi v prebavnih sokovih GIT, lipidni sistem z vgrajeno učinkovino se sprosti in zaradi krčenja in praznjenja želodca ter peristaltike nastane groba emulzija. Pod vplivom želodčne in črevesne lipaze se začne razgradnja TG do DG in MG. TG in DG se ne raztapljajo v vodnem okolju GIT, MG pa po mešanju z vodo na površini oljne kapljice spontano tvorijo sloj tekočih kristalov. Tako nastali produkti presnove so bolj amfifilni, zato stabilizirajo emulzijo (8,11).

Sistemi razreda I ne vsebujejo emulgatorjev, zato se zelo slabo dispergirajo v vodi in šele med prebavo sistema nastanejo spojine, ki so v solubilizirani obliki v mešanih micelih.

TG se prebavljajo do DG, MG in prostih maščobnih kislin s pomočjo pankreatične lipaze, zaradi spojin iz žolčnega soka se prebavni produkti lipidov vgradijo v različne strukture – multilamelarne in unilamelarne vezikle ter mešane micide, ki so solubilizirani v vodnem okolju GIT.

ZU je raztopljena v rastlinskem olju ali v srednje dolgo-verižnem trigliceridu (sdv-TG), ki imajo GRAS status (GRAS je okrajšava za generally recognised as safe, kar pomeni, da so ta olja splošno priznana kot varna). Biološka uporabnost slabo vodotopnih ZU, vgrajenih v na lipidih osnovane sisteme razreda I je izboljšana. TG se hitro razgradijo do prostih maščobnih kislin in 2-monogliceridov, ki se v prisotnosti žolčnih kislin vgradijo v mešane micide (poteče solubilizacija). V notranjosti mešanih micelov je ujeta koloidna disperzija prostih maščobnih kislin, 2-monogliceridov in hidrofobne ZU, ki se nato absorbira.

Razred I ima slabo kapaciteto raztapljanja ZU, saj so v teh sistemih topne le zelo lipofilne ZU ($\log P > 4$), ki se lahko raztapljajo v oljih brez prisotnosti emulgatorja. Manj lipofilne ZU pa potrebujejo sistem, sestavljen iz mešanih gliceridov, ki vključujejo TG, DG in MG. Presnova ni otežena, saj so dodani DG in MG zelo podobni DG in MG, ki nastanejo pri prebavi TG (8,9,10,11).

1.2.2. Razred II

Sestavljajo ga lipidi in lipofilni emulgatorji ($HLB < 12$), ki izboljšajo emulgiranje sistema v prisotnosti vode, lahko pa tudi izboljšajo topnost ZU v lipidnem sistemu. Ko na lipidih osnovan sistem razreda II pride v vodno okolje GIT, ob rahlem mešanju (zaradi krčenja in praznjenja želodca in peristaltike) nastane koloidna disperzija. Zato jih imenujemo samo-emulgirajoči sistemi (SES). V laboratoriju (*in vitro*) pa samo-emulgiranje poteče ob rahlem mešanju oz. stresanju sistema, pri čemer nastane stabilna emulzija O/V z velikostjo delcev 100 – 250 nm; po nekaterih literaturnih virih je lahko velikost kapljic emulzije tudi večja.

Za pripravo teh sistemov uporabljajo srednje-dolgoverižne TG (sdv-TG) ali kombinacijo sdv-TG z DG in MG. Po dodatku emulgatorja (večina emulgatorjev ima HLB vrednost približno 11) poteče samoemulgiranje, torej spontano nastane emulzija, če je emulgatorja več kot 25

m/m %. Samo-emulgiranje je optimalno pri 30 – 40 m/m % emulgatorja, če delež emulgatorja povečajo na 50 m/m % (10) ali nad 65 m/m % (9), je samo-emulgiranje počasnejše, ker na medfazi olje/voda nastaja viskozen sloj tekočih kristalov. Sistemi z visokim deležem emulgatorja tvorijo zelo stabilne emulzije po homogeniziranju z ustreznim aparatom (rotor-stator homogenizator), vendar je za nastanek emulzije potrebna dodatna energija (mešanje). V tem primeru ne poteče t.i. samo-emulgiranje, zato nastalih sistemov ne imenujemo samo-emulgirajoči sistemi (SES) (8,9,10,11).

1.2.3. Razred III

Na lipidih osnovane sisteme razreda III dobimo, ko lipidni sistem vsebuje lipide, hidrofilne emulgatorje (HLB > 12) in hidrofilna sotpila (npr. etanol, propilenglikol, polietilenglikol). Ob rahlem mešanju v laboratoriju (*in vitro*) ali v fizioloških pogojih (*in vivo* v GIT-u) ob redčenju z vodo spontano nastane stabilna emulzija.

Razred III razdelimo na 2 podrazreda: III A in III B, ki se precej razlikujeta.

Za razred III A je značilno, da vsebujejo precej lipidov in manj emulgatorjev in sotpil. Takšni lipidni sistemi so samo-emulgirajoči sistemi (SES), ki tvorijo motne emulzije z velikostjo kapljic > 200 nm.

Razred III B pa predstavljajo sistemi z manjšo vsebnostjo lipidov (< 20 %) in večjim deležem hidrofilnih emulgatorjev in hidrofilnih sotpil. Sisteme poznamo pod imenom SMES (samomikro-emulgirajoči sistemi). Po dispergiranju SMES-a v vodnem okolju nastanejo emulzije z zelo majhnimi kapljicami (< 100 nm), zato nastanejo bistre ali rahlo opalescentne mikro- oz. nanoemulzije.

SMES-i se veliko proučujejo in tudi uporabljajo za vgradnjo različnih slabo vodotopnih ZU, pogosta sotpila so etanol, propilenglikol in polietilenglikol, izmed hidrofilnih emulgatorjev pa zlasti derivata ricinusovnega olja Kolliphor EL in Kolliphor RH 40.

Najpomembnejša razlika med razredoma II in III je večja možnost obarjanja ZU iz na lipidih osnovanih sistemov razreda III. Med dispergiranjem v vodnem okolju se lahko ločijo hidrofilne in lipofilne komponente sistema, pri čemer se vodotopne spojine lahko raztopijo v vodnem mediju, zmanjša se solubilizacijska kapaciteta in ZU se obori (8,9,10,11).

1.2.4. Razred IV

Sistemi vsebujejo le emulgatorje ali emulgatorje in sotpila. Ker ne vsebujejo lipidov, lahko solubilizirajo hidrofobne ZU, ne pa tudi lipofilnih ZU. Ti sistemi so najbolj hidrofilni od vseh 4 razredov. Ko pride tak sistem v vodno okolje v GIT, tvori zelo fino disperzijo – micelarno raztopino z delci velikosti pod 20 nm. V zadnjih letih so postali takšni sistemi precej priljubljeni, saj visok delež hidrofilnih emulgatorjev in sotpil omogoča večjo topnost slabo vodotopnih ZU, posledično lahko v sistem vgradijo več ZU. Zavedati pa se je treba, da lahko precejšnja težava povzroča obarjanje ZU. Če je slabo vodotopna ZU raztopljena le v hidrofilnih sotpilih, bo po dispergiranju v vodnem okolju GIT zelo hitro nastala oborina. Potencialna prednost obarjanja je v nastanku suspenzije zelo majhnih kristaliničnih ali amorfni delcev (ti. nanosuspenzija), vendar se ZU ne obori vedno na ta način.

Rezultati nekaterih študij kažejo, da sprememba kapacitete solubilizacije ni tako izražena, če je ZU raztopljena le v hidrofilnih emulgatorjih. Ugotovili so tudi, da se sistem, ki vsebuje le ZU in emulgatorje, počasneje raztaplja. Slednje je verjetno povezano z dogajanjem na medfazi med emulgatorjem in vodo, kjer nastajajo viskozni tekoči kristali. Viskozna gmota se lahko tudi prilepi na želodčno ali črevesno steno, kar poveča nevarnost poškodb GIT zaradi dražečega delovanja emulgatorja (8,10,11).

Splošne značilnosti različnih razredov (I, II, III in IV)

V različnih raziskavah so odkrili nekaj splošnih značilnosti na lipidih osnovanih sistemov:

- le pri razredu I šele prebava formulacije omogoči njeno dispergiranje v vodnem okolju GIT,
- pri razredih II, III in IV emulgatorji omogočijo spontano dispergiranje formulacije,
- sistemi iz razreda I vsebujejo največ lipidov, zato so najbolj občutljivi za prebavo,
- formulacije iz razreda IV tvorijo najmanjše delce po dispergiranju, saj vsebujejo največ emulgatorja oz. solubilizatorja, ki omogoči tvorbo micelov (8).

Poznamo različne vrste na lipidih osnovanih sistemov: oljne raztopine, emulzije, samo-emulgirajoče sisteme (SES), samo-mikroemulgirajoče sisteme (SMES), samo-nanoemulgirajoče sisteme (SNES), v širšem pomenu se v to skupino sistemov uvrščajo tudi trdni lipidni nanodelci in nanostrukturirani lipidni nosilci ter liposomi (8).

Potrebna je velika pazljivost pri izbiri sestavin na lipidih osnovanih sistemov za zagotavljanje ustrezne varnosti formulacij, zato je FDA (Agencija za hrano in zdravila v ZDA) izdala spiske spojin, ki imajo GRAS status (so splošno priznani kot varni) in zbirko podatkov o varnih pomožnih sestavinah zdravil (Inactive Ingredient Guide), ki nam je v veliko pomoč pri razvoju novih (dostavnih) sistemov (12).

1.3. SAMO (MIKRO-/NANO-) EMULGIRAJOČI SISTEMI

Samo-emulgirajoči sistemi so definirani kot brezvodne izotropne zmesi olja, emulgatorja, koemulgatorja, sotopila in ZU, ki v prisotnosti vodne faze in ob rahlem mešanju hitro tvorijo emulzijo tipa O/V. Velikost kapljic nastale emulzije je zelo majhna:

- 100-250 nm: emulzije, nastane samo-emulgirajoči sistem (SES),
- 50-100 nm: mikroemulzija (nastane samo-mikroemulgirajoči sistem: SMES) ali
- nanoemulzija (nastane samo-nanoemulgirajoči sistem: SNES).

V človeškem telesu za rahlo mešanje poskrbi krčenje in praznjenje želodca in peristaltika v GIT-u, vodno fazo pa predstavljajo želodčni in črevesni sokovi (14,15,8).

Lipofilna ZU je solubilizirana v oljni fazi SMES-a, emulgator omogoči dispergiranje oljne faze z ZU v GIT-u in nastane mikroemulzija ali nanoemulzija (4).

V teoriji velja, da lahko med omenjenima sistemoma razlikujemo na osnovi vpliva zaporedja mešanja komponent sistema na velikost nastalih kapljic (pri mikroemulzijah je lahko vrstni red dodajanja sestavin poljuben, pri nanoemulzijah pa je nujno, da najprej zmešamo emulgator in oljno fazo in šele nato dodajamo vodo) in s spremljanjem vpliva redčenja sistema z vodno fazo na velikost kapljic (pri nanoemulzijah se velikost kapljic ohranja, pri mikroemulzijah pa lahko opazimo spremembe) (36). Ker v večini primerov ni bistveno, ali nastanejo mikro-ali nanoemulzije, bomo v diplomski nalogi uporabljali skupen termin SMES za oba sistema.

Za lažji nastanek mikro- ali nano-emulzije je pomembna ustrezna sestava SMES-a, ki vsebuje emulgatorje, koemulgatorje in sotopila. Medtem ko SES večinoma vsebuje le lipofilne emulgatorje ($HLB < 12$), so v SMES in SNES prisotni predvsem ali zgolj hidrofilni

emulgatorji ($HLB > 12$). Emulgatorji zmanjšajo medfazno napetost med oljno in vodno fazo in omogočijo spontan nastanek stabilne mikro- ali nano-emulzije le z rahlim mešanjem sistema (16,9).

Dobre lastnosti SMES-ov :

1. relativno preprosta izdelava (potrebno je le rahlo mešanje) in dobra stabilnost sistema;
2. relativno hitro dispergiranje formulacije in ohranjanje ZU v raztopljenem stanju ves čas (oz. večino časa - v realnih pogojih) njenega zadrževanja v GIT;
3. zmanjšano draženje želodčne stene v primerjavi z bolj viskozni sistemi (kapljice nastale mikroemulzije so zadosti majhne, da se enakomerno porazdelijo po želodčnem soku in s tem po volumnu želodca ter se ne prilepijo na njegovo steno) (1,10);
4. po dispergiranju v vodi nastanejo zelo majhne kapljice z veliko specifično površino, iz katerih se ZU hitreje sprošča (lažje prehaja iz oljne v vodno fazo), to pa izboljša biološko uporabnost ZU;
5. vgradnja v SMES nudi zaščito ZU, ki so občutljive na spremembe pH ali na delovanje encimov v GIT (ZU je ujeta v oljnih kapljicah emulzije);
6. izboljšanje BU ZU preko različnih mehanizmov: daljše zadrževanje ZU v GIT (in posledično boljša absorpcija ZU), povečano izločanje žolčnih in pankreatičnih sokov (nastanejo mešani miceli, ki povečajo solubilizacijsko kapaciteto za ZU), inhibicija nekaterih metabolnih encimov in stimuliranje limfatičnega transporta (lipofilne ZU ($\log P > 5$), ki so dobro topne v oljni fazi ($> 50 \text{ mg/mL}$), se iz črevesja absorbirajo v limfni obtok in se tako izognejo jetrom in metabolizmu prvega prehoda);
7. povečanje permeabilnosti črevesne stene: emulgatorji in nekateri lipidi lahko interagirajo s celičnimi membranami in zmanjšajo njihovo urejenost, lahko tudi nastanejo pore, skozi katere lažje prehaja ZU oz. pride do odprtja tesnih stikov (z izbiro sestavin moramo zagotoviti, da so omenjeni procesi čim bolj reverzibilni);
8. nekatere sestavine SMES (lipidi in emulgatorji) inhibirajo transportne proteine v membrani enterocitov (npr. P-glikoprotein (P-gp)) in tako zmanjšajo efluks ZU iz enterocitov v GIT; če so ZU substrati za P-gp, lahko le-ta pomembno zmanjša njihovo absorpcijo in posledično BU (1,5,8,16).

1.4. MEHANIZEM SAMO – MIKROEMULGIRANJA

Ko SMES pride v stik z vodo (v človeškem organizmu v vodnem okolju GIT) spontano nastane koloidna emulzija tipa O/V, ki je stabilna disperzija dveh faz, ki se med seboj ne mešata. Ta proces imenujemo samo-mikroemulgiranje.

Proces lahko opišemo z naslednjo enačbo (enačba 1) :

$$\Delta G = \Sigma N \pi r^2 \sigma$$

ΔG ...prosta energija N ...število kapljic r ...polmer kapljic σ ...medfazna energija

Enačba pove, da se z zmanjšanjem medfazne energije zmanjša tudi prosta energija.

Prosta energija emulzije je zelo velika, saj je potrebno vložiti veliko energije za nastanek nove površine med dvema površinama, ki se med seboj ne mešata (oljna in vodna faza). Zato emulzija ni stabilna, ampak se fazi sčasoma ločita. Pri SMES-u pa mikroemulzija nastane spontano oz. le ob rahlem mešanju, ker je prosta energija sistema zelo nizka zaradi velike vsebnosti površinsko aktivne snovi.

Ko SMES (olje in emulgator / koemulgator) in vodo rahlo premešamo, med oljno in vodno fazo nastane medfaza, skozi katero počasi prehaja voda, ki jo emulgatorji solubilizirajo. V določeni točki je presežena kapaciteta solubilizacije, tedaj začnejo nastajati tekoči kristali. Nastaja vedno več tekočih kristalov, dokler ne prekrijejo vse površine medfaze. To pa je kritična točka. Če se koncentracija vode še povečuje, ob rahlem mešanju voda hitro prodira skozi medfazo, zato se ta »raztrga« in nastanejo oljne kapljice, ki jih obdaja plast tekočih kristalov. To je tudi razlog za stabilnost nastale mikroemulzije (1,3).

1.5. SESTAVA SAMO-MIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMOV

1.5.1. Splošna pravila

Pri načrtovanju SMES-ov je treba paziti na ustrezno razmerje oljne faze in emulgatorja / koemulgatorja, sposobnost medsebojnega mešanja, vrsto emulgatorja (ki naj že v nizkih koncentracijah omogoči nastanek mikroemulzije, ker ustrezno zniža medfazno napetost), pomembni so podatki o toksičnosti in draženju emulgatorjev, sposobnosti samodispergiranja, prebavljivosti, kompatibilnosti s kapsulami, izredno pomembni pa so tudi čistost, kemična stabilnost in cena sestavin (3,4,10).

1.5.2. Trigliceridi (TG) in mešani gliceridi

Na lipidih osnovani sistemi vsebujejo trigliceride iz rastlinskih olj, ki so še posebno primerni zaradi varnosti (uporabljamo jih tudi v prehrani); znano je, da se dobro prebavijo in popolnoma absorbirajo. TG so estri glicerola in maščobnih kislin. Maščobne kisline imajo različno število C-atomov, zato poznamo različne TG: kratko-verižne (kv-TG) z manj kot 5 C-atomov, srednje-dolgoverižne (sdv-TG) z 6 do 12 C-atomov in dolgoverižne (dv-TG) z več kot 12 C-atomov.

Rastlinska olja kljub nedvomni varnosti niso vedno najboljša izbira. Bolj uporabna so modificirana olja rastlinskega izvora, ki imajo boljše sposobnosti emulgiranja. Pogosto uporabljajo poliglikozilirane gliceride z različno dolgimi verigami maščobnih kislin in različno dolgo polietilenglikolno (PEG) verigo, saj jih ljudje dobro prenašajo (ne povzročajo težav po zaužitju) (1,4,10).

Za pripravo SMES-ov se uporabljajo predvsem dv-TG in sdv-TG.

Sdv-TG so dobro prebavljivi, imajo boljšo sposobnost raztapljanja hidrofobnih ZU in samo-emulgiranja kot dv-TG (zaradi večje polarnosti), prav tako so manj dovzetni za oksidativno razgradnjo (imajo manj nenasičenih vezi oz. jih nimajo). Primer sdv-TG je gliceril trikaprilat/kaprat.

Dv-TG pa imajo pomembno prednost, ker lahko izboljšajo biološko uporabnost zelo lipofilnih ZU, saj stimulirajo limfatični transport ZU. Za limfatični transport pa ni pomembna le vrsta, ampak tudi koncentracija lipida (> 25 % lipidov v sestavi SMES pospeši limfatični transport). (1,4,10)

Mešane gliceride pridobivajo iz TG, in sicer izvedejo delno hidrolizo rastlinskih olj. S to metodo dobijo zmes z različnimi deleži mono-, di- in trigliceridov. Natančna sestava je odvisna od vrste triglicerida in obsega hidrolize.

Marsikateri „monogliceridni“ produkt lahko vsebuje kar precej di- in trigliceridov, zato je potrebno natančno preučiti tehnične podatke o posameznem proizvodu.

Mešani dv-gliceridi so pogosta sestavina SMES-ov (razred II in III), ker olajšajo medsebojno mešanje komponent lipofilne in hidrofilne faze ter proces emulgiranja (zaradi amfifilnih

lastnosti), precej bolje kot TG tudi raztapljajo ZU (razen najbolj lipofilnih).

Pri mešanih sdv-gliceridih so navedeni učinki še bolj izraziti (večja kapaciteta solubiliziranja ZU, hitrejša emulgiranje), zato so pogosta sestavina SMES-ov (4,10).

Raziskave potrjujejo, da je pogosto smiselna sočasna uporaba ne le TG in mešanih gliceridov, temveč tudi kombinacij, ki se dodatno razlikujejo še po dolžini verig maščobnih kislin. SMES iz ricinusovega olja (dv-TG) in Capmul-a MCM (zmes sdv-MG in sdv-DG) se je tako z vidika učinkovitosti samoemulgiranja kot solubilizacijske kapacitete za resveratrol izkazala za učinkovitejšo od sistemov, ki so vsebovali le dv-TG in dv-mešane gliceride oz. sdv-TG in sdv-mešane gliceride (37).

1.5.3. Emulgatorji

Emulgatorji so nujna sestavina SMES, saj povzročijo zmanjšanje medfazne napetosti med oljno in vodno fazo, potrebne za proces samoemulgiranja in nastanek mikroemulzije. Pogosto v SMES vgradijo med 30-60 % emulgatorja. Ker se z velikimi koncentracijami emulgatorjev poveča tveganje za pojav neželenih učinkov, je treba uporabiti najnižje možne koncentracije, ki še omogočajo spontan nastanek stabilne emulzije.

Pri izbiri emulgatorjev je predvsem pomembno upoštevati njihovo toksičnost, ki je odvisna tako od koncentracije uporabljenega emulgatorja, kot tudi od načina pridobivanja (naravni emulgatorji so manj toksični od sinteznih) in od kemijske strukture (kationski > anionski > neionski).

Visok delež emulgatorjev v SMES-u povzroča težave zaradi draženja in poškodb sluznice GIT, vpliva pa tudi na zmanjšanje sposobnosti samo-emulgiranja formulacije; v optimalni koncentraciji molekule emulgatorja obdajo nastale oljne kapljice v tankem sloju in stabilizirajo emulzijo. Pri povečevanju koncentracije emulgatorja nastajajo tekoči kristali, ki so zelo viskozni, to pa lahko omeji emulgiranje.

Emulgatorji so potrebni tudi zaradi sposobnosti solubiliziranja slabo vodotopne ZU, ki mora biti raztopljena v oljnih kapljicah mikroemulzije ves čas zadrževanja v GIT, s čimer se lahko izognemo fazi raztapljanja ZU, ki je pogosto počasna in odgovorna za slabo absorpcijo ZU.

Izbira emulgatorja pomembno vpliva tudi na permeabilnost ZU in njen predsystemski metabolizem, kot je podrobneje opisano v odstavku, ki opisuje prednosti uporabe SMES (1,17).

Lipofilni emulgatorji

So skupina emulgatorjev s srednjo vrednostjo HLB (HLB = 8-12), ki niso dovolj hidrofilni za raztapljanje v vodi in tvorbo micelov, so pa dovolj hidrofilni, da omogočijo samo-emulgiranje na lipidih osnovanih sistemov (močno se adsorbirajo na medfazo olje/voda in ob mešanju olajšajo nastanek stabilne emulzije). Uporabljajo se predvsem za pripravo SES (razred II).

Pogosto se uporabljajo oleatni estri, npr. polioksietilen (20) sorbitan trioleat (polisorbat 85 - Tween 85) in polioksietilen (25) gliceriltriolate (Tagat TO) (4,10).

Hidrofilni emulgatorji

Uporabljajo se za izdelavo SMES (razred III) in na lipidih osnovanih sistemov, ki jih uvrščamo v razred IV.

Imajo visoko vrednost HLB (HLB \geq 12), zaradi velike hidrofilnosti se v vodi raztopijo in tvorijo micelle, ko njihova koncentracija preseže kritično micelarno koncentracijo. Pridobivajo jih na različne načine: iz polietilenglikola (PEG) in hidroliziranih rastlinskih olj ali z reakcijo med alkoholi in etilenoksidi (nastanejo alkileter etoksilati).

Pri reakciji med PEG in hidroliziranimi olji nastanejo mono- in di- estri maščobnih kislin s PEG (pa tudi delni gliceridi in nezaestreni PEG).

Pogosto se uporabljajo različni Cremophor-ji oz. Kolliphor-ji, ki imajo v strukturi različno nasičene maščobne kisline in so zelo heterogena skupina emulgatorjev. Cremophor RH 40 (oz. Kolliphor RH 40; Kolliphor CO 40) in Cremophor RH 60 sta etoksilirana hidrogenirana derivata ricinusovega olja (imata nasičene alkilne verige), Cremophor EL (oz. Kolliphor EL) pa je etoksilirano ricinusovo olje (ni hidrogeniran, zato vsebuje nenasičene vezi).

Cremophor-ji/Kolliphor-ji, sintetizirani z etilenoksidom, so skupina emulgatorjev, ki se razlikujejo po številu polietilenskih verig (pripetih na hidroksilno skupino ricinoleinske kisline, ki je pomembna maščobna kislina ricinusovega olja). Cremophor-ji/Kolliphor-ji so pogosta sestavina SMES-ov, saj izkazujejo dobro solubilizacijsko kapaciteto za širok spekter ZU ter dobro sposobnost samoemulgiranja. Inhibirajo tudi P-gp ter nekatere metabolne encime, kar še dodano pripomore k izboljšanju biološke uporabnosti ZU (4,10).

V vlogi emulgatorjev v SMES pogosto zasledimo tudi polisorbate (Tween-e), ki nastanejo pri reakciji med estri sorbitana in etilenoksidom. Tweeni so hidrofilni emulgatorji, topni ali disperzibilni v vodi. Topnost v vodnem okolju se poveča z večjo stopnjo etoksilacije. Pri nespremenljivi stopnji etoksilacije pa se vodotopnost poveča z večjo molekulsko maso maščobnih kislin. Primer: Tween 20 (PEG-20 sorbitan monolavrat) je delno topen v vodi, Tween 80 (PEG-20 sorbitan monooleat) pa je dobro topen v vodi. (4,10,36)

1.5.4. Sotopila

SMES-i (razredi IIIa, IIIb) in na lipidih osnovani sistemi iz razreda IV lahko vsebujejo tudi hidrofilna sotopila, najpogosteje kratkoveržne alkohole: etanol, n-butanol, propilenglikol, polietilenglikol (PEG 400) in glicerol. Dodajajo jih, ker izboljšajo raztapljanje hidrofobnih ZU v formulaciji, pa tudi mešanje hidrofilnih emulgatorjev z lipidno fazo formulacije.

Sotopila povečajo kapaciteto raztapljanja za tiste ZU, ki so v njih dobro topne, vendar se solubilizacijska kapaciteta pomembno izboljša le, če je koncentracija sotopila visoka. Slednje pa je pogosto nezaželeno, tako z vidika sprejemljivosti formulacije kot sposobnosti le-te, da prepreči obarjanje ZU *in vivo*. Pri razredčevanju SMES-a v vodnem okolju sotopilo namreč difundira v vodno fazo, zato se koncentracija sotopila v dispergirajoči formulaciji hitro zmanjša. To ima za posledico velik padec solubilizacijske kapacitete in obarjanje ZU.

Pri izbiri sotopila je potrebno upoštevati sposobnost mešanja s komponentami oljne faze, (ne)kompatibilnost z ovojnico kapsule (sotopila se lahko adsorbirajo nanjo oz. vanjo penetri- rajo, zato sledi obarjanje ZU, lahko pride tudi do zmečanja ali premreženja kapsule in mož- no draženje sluznice GIT (1,4,10).

1.6. PSEVDO – TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM (PTFD)

Področje nastanka mikroemulzije iz SMES-ov proučujemo tako, da SMES-u, sestavljenemu iz olja, emulgatorja (ter koemulgatorja in/ali sotopila) postopoma dodajamo vodo. Po vsakem dodatku vode se spremeni razmerje med komponentami sistema, ki jim sledi fazna sprememba. To spremembo vizualno predstavimo z izdelavo PTFD, ki je prikazan kot enakostranični trikotnik. Oglišča trifaznega diagrama predstavljajo posamezno komponento (olje, emulgator, vodo). SMES pa pogosto vsebuje še dodatno 4. komponento (koemulgator

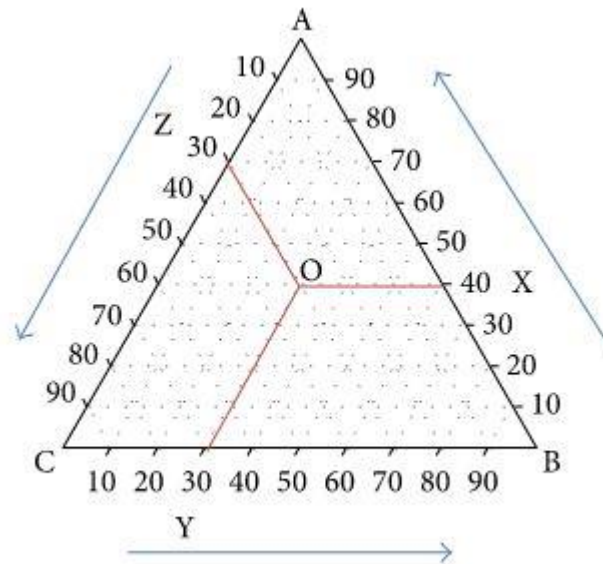
in/ali sotopilo), ki je ni mogoče predstaviti v treh ogliščih enakostraničnega trikotnika. Zato eno oglišče predstavlja zmes več komponent, običajno emulgator/koemulgator (in/ali sotopilo), v znanem razmerju. Nastali fazni diagram tako imenujemo psevdo–trikomponentni fazni diagram. Prikazuje ga slika 1.

Razlaga PTFD:

Tri oglišča PTFD predstavljajo tri komponente sistema, torej olje, vodo in emulgator/koemulgator (in/ali sotopilo), v vsakem oglišču (A, B, C) imamo 100 % masni delež posamezne komponente. Stranice (AB, BC, CA) predstavljajo zmesi dveh komponent. Posamezno stranico je mogoče razdeliti na 100 delov, v tem primeru en del ustreza 1 % mase posamezne komponente.

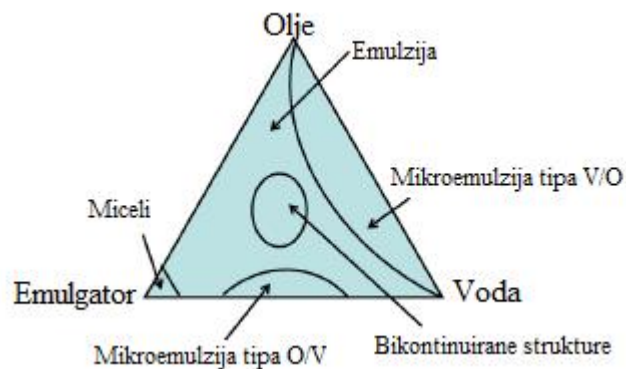
V oglišču A je 100 % masni delež komponente A in 0 % komponente C. Od te točke proti točki C se zmanjšuje delež komponente A in narašča delež komponente C. V točki C imamo 100 % komponente C. Puščice na PTFD označujejo povečevanje posamezne komponente, puščica od A proti C pomeni povečevanje komponente C od 0% v točki A do 100 % v točki C. Na enak način lahko pojasnimo deleže vsake komponente na katerikoli stranici. V notranjosti PTFD pa so možne vse kombinacije vseh komponent, njihovo določanje je pojasnjeno na primeru točke O.

Narišemo črto, ki je vzporedna stranici AC proti točki O. Na mestu, kjer preseka stranico CB, odčitamo delež komponente B. Delež komponente A dobimo, ko narišemo vzporednico CB proti točki O. Na stičišču s stranico AB, vidimo, kakšen je delež komponente A. Delež komponente C dobimo na podoben način z vzporednico stranici AB proti točki O, na presečišču s stranico AC odčitamo delež komponente C.



Slika 1: Način uporabe/interpretacije (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, povzeto po (1)

Ko se spreminjajo razmerja med posameznimi komponentami sistema, nastajajo različne strukture: mikroemulzije tipa O/V in V/O, miceli, reverzni miceli, lamelarni miceli in bikontinuirane strukture (prikazano na sliki 2) (1,18).



Slika 2: Različni tipi sistemov, ki nastanejo znotraj področja (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, povzeto po (12)

1.7. KARVEDILOL

Kardiovaskularne bolezni so velika in zelo raznolika skupina bolezni, odgovorne za veliko obolevnost in smrtnost po vsem svetu (po podatkih WHO so vzrok za kar 30 % vseh smrti v letu 2008). Za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni uporabljajo različne skupine zdravil, saj imajo pacienti pogosto različne simptome. Najpogosteje se uporablja peroralen vnos zdravil (najbolj preprosto, največja vodljivost pacientov). Precej zdravil pa je slabo vodotopnih in nanje močno vpliva metabolizem prvega prehoda, zato jih za izboljšanje biološke uporabnosti vgradijo v na lipidih osnovane sisteme (19,20).

Karvedilol je antagonist adrenergičnih receptorjev z neselektivnim delovanjem na β -₁ in β -₂ receptorje (β -₁ receptorji so predvsem v srčni mišici, β -₂ pa predvsem v bronhialnih mišicah in v mišicah žil), blokira pa tudi α - adrenergične receptorje.

Karvedilol je učinkovit pri zdravljenju hipertenzije (zaradi blokade vseh treh tipov receptorjev zniža krvni tlak brez refleksne tahikardije, frekvenca bitja srca in sistolična funkcija - moč kontrakcije ostajata enaki, krvni tlak se zniža zaradi vazodilatacije, saj prevlada vpliv na α -receptorje). Zelo uspešen je pri zdravljenju koronarnih bolezni: pri nestabilni angini pectoris zniža frekvenco srčnega utripa, krvni tlak ter število in čas trajanja ishemičnih napadov. Pri zdravljenju miokardnega infarkta se uporablja v začetni fazi – v prvih 24 urah po infarktu zmanjša velikost področja, ki ga je prizadel infarkt (vazodilatacija poveča prekrvavitev, tako izboljša preskrbo s kisikom v času, ko so ishemične poškodbe še reverzibilne) in zmanjša ventrikularno aritmijo. Če je minilo dlje časa od infarkta, vpliva predvsem na preprečevanje novih ishemičnih dogodkov (ponoven infarkt, ishemija, možna smrt kot posledica obsežnih poškodb srčne mišice ali pa stanje vodi v nastanek srčnega popuščanja). V primeru srčnega popuščanja se karvedilol uporablja kot dolgotrajna terapija. Opuščanje takšnega zdravljenja bi poslabšalo zdravje pacientov (karvedilol namreč zmanjša frekvenco in poveča minutni volumen srca).

Karvedilol zmanjša smrtnost, pa tudi število hospitalizacij in poveča kvaliteto življenja pacientov. Njegovo pomembnost je potrdila tudi FDA, saj je edini antagonist β -adrenergičnih receptorjev, odobren za zdravljenje srčnega popuščanja (21,22).

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je razvoj samo-mikroemulgirajočih sistemov (SMES), primernih za izboljšanje topnosti zdravilne učinkovine karvedilol, ki jo po biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo v II. razred (zdravilne učinkovine s slabo topnostjo in dobro permeabilnostjo). Slaba topnost karvedilola v vodnem okolju GIT je razlog za njegovo manjšo biološko uporabnost. Slednjo želimo izboljšati z razvojem SMES-ov, ki bodo primerni za peroralni vnos karvedilola.

Izdelali bomo SMES-e, ki bodo kot oljno fazo vsebovali različne kombinacije TG in monogliceridov (MG) s srednje- in dolgoverižnimi maščobnimi kislinami, kot emulgator pa hidrofilne površinsko aktivne snovi.

Za oljno fazo bomo uporabili Capmul GMO (nenasičen dv-MG), Capmul GMS (nasičen dv-MG), Capmul MCM EP (sdv-MG), Capmul MCM C10 (sdv-MG), Capmul MCM C8 (sdv-MG) ter ricinusovo olje (dv-TG) in Captex 355 EP/NF (sdv-TG).

Kot emulgator bomo uporabili dve hidrofilni površinsko aktivni snovi: Cremophor CO 40 in Kolliphor HS 15. Kot hidrofilno sotopilo bomo uporabili PEG 400.

Pripravljene SMES bomo postopno titrirali z vodo. Po vsakem dodatku vode bomo vizualno spremljali spremembe ter identificirali nastanek mikroemulzije. Za vse SMES-e bomo izdelali psevdo-trikomponentne fazne diagrame (PTFD) in na osnovi njih določili področje nastanka mikroemulzije. Sistemom, ki bodo tvorili stabilne mikroemulzije, bomo določili tudi velikost kapljic z uporabo fotonske korelacijske spektroskopije. Stabilnost nastalih mikroemulzij bomo spremljali do 7 dni.

V ločenem sklopu bomo ovrednotili tudi solubilizacijsko kapaciteto izbranih sestavin SMES (lipidi, emulgatorji, sotopila in njihove kombinacije) za učinkovino karvedilol. Po izdelavi PTFD bomo določili tudi solubilizacijsko kapaciteto izbranih SMES in spremljali stabilnost karvedilola med eno-mesečnim staranjem vzorcev pri sobni temperaturi ter pri povišani temperaturi (40° C).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Capmul GMO-50 EP/NF (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul GMO-50 EP/NF (glicerol monooleat) je zmes monogliceridov, zlasti z oleinsko kislino in manjšega deleža di- in trigliceridov. Uvrščamo ga med dv-lipide. Pri sobni temperaturi je viskozna tekočina jantarjeve barve z rahlim vonjem in rahlim okusom po maščobah (pri sobni temperaturi se lahko delno strdi, zato je vsebnik potrebno najprej rahlo segreti do popolne homogenosti vsebine in šele nato tehtati). Uporablja se kot emulgator in emoliens (23).

Capmul GMS-50 K (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul GMS-50 K (glicerol monostearat) je zmes monogliceridov, zlasti s stearinsko in v manjši meri palmitinsko kislino (40-45 %), z manjšim deležem di- (30-45 %) in trigliceridov (5-15 %). Uvrščamo ga med dv-lipide. Pri sobni temperaturi je bela ali svetlo rumena voskasta snov značilnega vonja in okusa po maščobah. Uporablja se kot emulgator, stabilizator, emoliens, topilo in drsilo pri tabletiranju (23).

Capmul MCM EP (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul MCM EP (glicerol monokaprilokaprat) je zmes monoestrov glicerola s kaprilno ali kaprinsko kislino, v manjši meri pa vsebuje tudi di- in triestre. Uvrščamo ga med sdv- lipide. Pri sobni temperaturi je brezbarvna do rahlo rumenkasta viskozna tekočina ali poltrdna snov (potrebno rahlo segrevanje do homogene snovi v vsebniku pred tehtanjem). Uporablja se kot emulgator in emoliens, poveča absorpcijo in biološko uporabo slabo vodotopnih ZU (23,24).

Capmul MCM C8 (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul MCM C8 (gliceril monokaprilat) je zmes mono- in digliceridov kaprilne kisline (zmes estrov glicerola s kaprilno kislino, v kateri prevladuje gliceril 1-oktanoat). Pri sobni temperaturi je bel, poltrden (zato je najprej treba segreti vsebnik). Uporablja se kot emoliens in emulgator (23).

Capmul MCM C10 (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul MCM C10 (gliceril monokaprat) je zmes mono- in digliceridov kaprinske kisline (monoester glicerola in dekanajske kisline). Pri sobni temperaturi je bela ali skoraj bela, vosku podobna snov (pred tehtanjem je potrebno segrevanje vsebnika). Uporablja se kot emolients in emulgator (23).

Ricinusovo olje (Caelo, Nemčija)

Ricinusovo olje (Oleum Ricini raffinatum) je ricinovo olje, pridobljeno po različnih postopkih in nato prečiščeno. To je zmes trigliceridov različnih maščobnih kislin, največ je ricinoleinske (85-92 %), oleinske (2,5-6 %), linolne (2,5-7 %), stearinske (2,5 %) in palmitinske (2 %). Pri sobni temperaturi je bistra tekočina, brezbarvna do svetlo rumena, skoraj brez vonja. V farmacevtski industriji se uporablja kot topilo v intramuskularnih injekcijah, deluje tudi emolientno, zato je pogosta sestavina kozmetičnih izdelkov (različnih krem in mazil za dermalno uporabo) (23,24).

Captex 355 EP/NF (Abitec Corporation, ZDA)

Captex 355 EP/NF (triglicerid kaprilo / kaprilat) je sdv-TG, pridobljen z zaestritvijo glicerola z maščobnimi kislinami, predvsem kaprilno in kaprinsko. Vsebuje približno 55 % kaprilne kisline (8 C-atomov) in 35 % kaprinske kisline (10 C-atomov). Pri sobni temperaturi je brezbarvna ali svetlo rumena bistra tekočina. Uporablja se kot lipofilni vehikel in topilo (npr. za vitamin D), ter kot oljna faza krem in mazil (25,26).

Cremophor CO 40 (BASF, Nemčija)

Cremophor CO 40 (PEG-40 hidrogenirano ricinovo olje) je neionski solubilizator in emulgator, pridobivajo ga z reakcijo med ricinovim oljem in etilenoksidom. Njegova HLB vrednost je 14-16, zato spada med hidrofilne površinsko aktivne snovi. Hidrofobni del emulgatorja je polietilenglikol oksistearat, hidrofilni del pa polietilenglikol in gliceril etoksilat. Pri sobni temperaturi je bela do rumenkasta mehka ali tekoča poltrdna snov. Uporablja se za solubiliziranje eteričnih olj, sestavin parfumov, vitaminov in hidrofobnih ZU (27).

Kolliphor HS 15 (BASF, Nemčija)

Kolliphor HS 15 (makrogol 15 hidroksi stearat) je neionski solubilizator in emulgator, pridobljen z reakcijo med etilenoksidom in 12-hidroksi stearinsko kislino. Njegova vrednost HLB je 14-16, torej je hidrofilni emulgator. Sestavljajo ga poliglikol mono- in diestri 12-hidroksi stearinske kisline (lipofilni del) in približno 30 % prostega polietilenglikola (hidrofilni del). Pri sobni temperaturi je rumenkasto – bela poltrdna snov. Uporablja se za izdelavo vodnih parenteralnih pripravkov vitaminov A, D, E in K (kot solubilizator) in različnih lipofilnih ZU (23,28).

PEG 400 (BASF, Nemčija)

PEG 400 (polietilenglikol 400, makrogol 400) ima povprečno molekulsko maso približno 400 g/mol, zato oznaka PEG 400. Pri sobni temperaturi je bistra, viskozna, brezbarvna tekočina z rahlim, značilnim vonjem in grenkim okusom. Uporablja se kot (so)topilo, tako v prehrambeni industriji kot kozmetični (v kremah, olajša dispergiranje delcev v zobnih pastah) in farmacevtski industriji (tudi sestavina hidrofilnih mazil in podlag za svečke) (23,29).

Materiali, uporabljeni le za določanje solubilizacijske kapacitete za karvedilol

Tween 20 (Calbiochem, Nemčija), **Tween 40** (Merck, Nemčija), **Tween 80** in **Tween 85** (Fluka, Nemčija)

Vsi Tweeni delujejo kot neionski emulgatorji in solubilizatorji, pogosti so v farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih. Vsi so polioksietilenski estri sorbitana, vsebujejo 20 enot etilenoksida, 1 sorbitol in različne maščobne kisline.

Vsi so hidrofilni emulgatorji (HLB > 12) (23).

Tween 20 (polioksietilen 20 sorbitan monolavrat) je bistra, rumena do rumeno-zelena tekočina, HLB = 16,7 (hidrofilni emulgator) (30).

Tween 40 (polioksietilen 20 sorbitan monopalmitat) je bistra do motna, rahlo do temno rumena viskozna tekočina, HLB = 15,6 (31).

Tween 80 (polioksietilen 20 sorbitan monooleat) je citronsko do jantarjevo rumena viskozna tekočina z rahlim, značilnim vonjem, HLB = 15,0 (23).

Tween 85 (polioksietilen 20 sorbitan trioleat) je jantarjevo rumena, viskozna tekočina brez vonja (23).

Span 80 (Merck, Nemčija)

Span 80 je ester polietoksiliranega sorbitana in oleinske kisline. Deluje kot neionski emulgator, uporablja se v prehrani in kozmetiki ter v farmaciji. Pri sobni temperaturi je viskozna, rumena tekočina (32).

Cremophor EL (BASF, Nemčija)

Cremophor EL (ricinovo olje, polioksi etilirano) je ricinovo olje, v katerem prevladujejo glicerol ricinoleati, etoksilirani s 30-50 oksietilenskimi enotami. Pri sobni temperaturi je bistra, rumena, viskozna tekočina ali poltrdna snov, ki se uporablja kot emulgator, solubilizator in topilo.

Karvedilol (Krka, d.d.)

Prečiščena voda

Na Fakulteti za farmacijo se pridobiva z reverzno osmozo.

Aparature

Analitska tehtnica AG 245 (Mettler Toledo)

Magnetni mešalnik Rotamix 560 MMH

Magnetni mešalnik IKA RTC Basic

Centrifuga Sorvall WX Ultra Series Centrifuge (Thermo Scientific)

Zetasizer Nano (Nano ZS, Malvern Instruments)

3.2. Metode

3.2.1. Izdelava psevido – trikomponentnega faznega diagrama (PTFD)

PTFD smo izdelali tako, da smo najprej pripravili posamezne homogene sisteme (z ustreznim razmerjem med oljno fazo, emulgatorjem / koemulgatorjem in sotopilom), ki smo jih nato titrirali z vodo.

Za pripravo oljne faze smo uporabili Capmul GMO – 50 EP / NF, Capmul GMS – 50 K, Capmul MCM EP, Capmul MCM C8 in Capmul MCM C 10 ter ricinusovo olje in Captex 355 EP / NF, v različnih kombinacijah in medsebojnih razmerjih.

Kot hidrofilen emulgator in sotopilo smo uporabili Cremophor CO 40, Kolliphor HS 15 in Tween 20 ter PEG 400, prav tako v različnih kombinacijah in razmerjih s komponentami oljne faze.

Sestava na lipidih osnovanih sistemov, za katere smo izdelali PTFD, je prikazana v preglednici 1.

Za izdelavo vsakega PTFD smo pripravili 9 izhodiščnih SMES, ki smo jih nato titrirali z vodno fazo. Na analitski tehtnici smo točno zatehtali izbrane količine posameznih sestavin SMES. Upoštevali smo, da bo skupna masa SMES 5 gramov in glede na predhodno določena razmerja natehtali ustrezne količine olja, emulgatorja, koemulgatorja in sotopila. Vse sestavine smo natehtali v 100 ml stekleno čašo, ki smo jo nato segrevali pri temperaturi 40 °C tako dolgo, da so se vse komponente stalile. Nato smo v čašo dodali magnetno mešalo in pri nizki hitrosti (50 rpm) mešali do popolne homogenosti sistema. Mešanje pri višjih hitrostih ni prineslo dobrega rezultata, saj se je v tem primeru v zmes vmešalo precej zraka, ki je motil opazovanje sistema v naslednjih fazah izdelave PTFD (med titracijo z vodo).

Preglednica 1: Sestava na lipidih osnovanih sistemov, za katere smo izdelali PTFD.

Oljna faza	Emulgator
Capmul GMO : ricinusovo olje = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul GMO : ricinusovo olje = 2 : 1	Kolliphor HS 15
Capmul GMS : ricinusovo olje = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul GMO : Captex 355 = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul GMO : Captex 355 = 2 : 1	Kolliphor 355
Capmul MCM : ricinusovo olje = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul MCM : ricinusovo olje = 2 : 1	Kolliphor HS 15
Capmul MCM : Captex 355 = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul MCM : Captex 355 = 2 : 1	Koliphor HS 15
Capmul MCM C10 : ricinusovo olje = 2 : 1	Cremophor CO 40
Capmul MCM C8 : ricinusovo olje = 2 : 1	Tween 20
Capmul MCM C8 : ricinusovo olje = 2 : 1	PEG
Capmul MCM : ricinusovo olje = 2 : 1	Tween 20
Capmul MCM C8 : ricinusovo olje = 2 : 1	Tween 20 : PEG = 4 : 1

Homogeniziranje sistema je potrebno po vsakem dodajanju katerekoli izmed sestavin, ker le v homogenem sistemu lahko odčitavamo rezultate. Homogen sistem smo ohladili na sobno temperaturo, ga ponovno kratko premešali (2 minuti mešanja pri 50 rpm), nato pa smo ga titrirali z vodo.

Za vsak na lipidih osnovan sistem smo pripravili 9 posameznih SMES, in sicer smo natehtali oljno fazo in (ko)emulgator v razmerjih 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80 in 10 : 90. Prva številka pomeni količino oljne faze, druga številka pa količino (ko)emulgatorja. Zato razmerje 90 : 10 pomeni, da smo v čašo natehtali 90 % oljne faze in 10 % emulgatorja. Seveda pa moramo upoštevati tudi razmerja med posameznimi sestavinami oljne in emulgatorske faze.

Vsako izmed naštetih razmerij (90 : 10,..., 10 : 90) predstavlja eno razredčitveno premico, na kateri leži 19 točk, ki jih dobimo po titriranju SMES z vodo.

Brezvodnemu SMES smo postopno dodajali po 5 % (m/m) prečiščene vode, ogrete na sobno temperaturo, dokler ni bila vsebnost vode v sistemu 95 % (tj. zadnja točka razredčitvene premice). Potrebno količino dodane vode smo izračunali z enačbo 2:

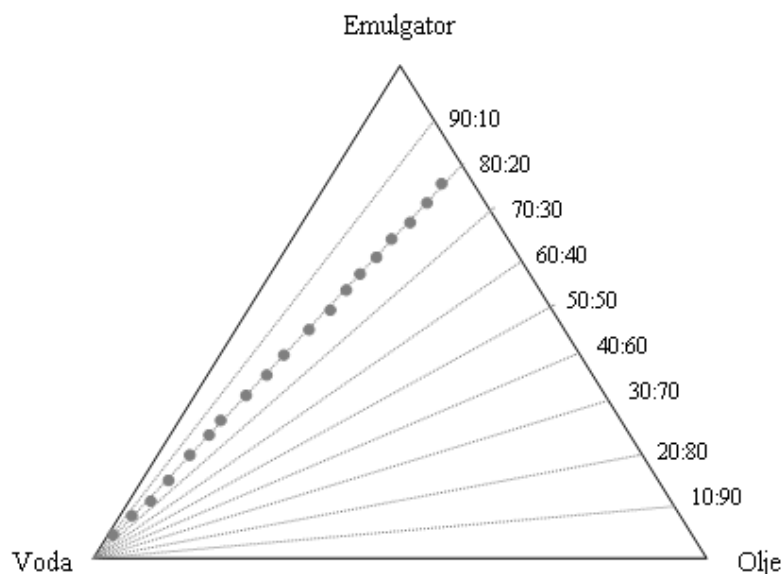
$$\% \text{ vode} = m(\text{voda}) / m(\text{oljnafaza}) + m(\text{emulgator})$$

Po vsakem dodajanju vode z mikropipeto smo SMES premešali na magnetnem mešalniku (50 rpm). Po 3-5 minutah mešanja smo v homogenem sistemu vizualno ocenili nastale spremembe. Preverili smo bistrost, transparentnost, ločevanje faz, nastanek gela.

Ker smo vodo dodajali postopno (po 5 %), smo na vsaki razredčitveni premici dobili 19 točk, ki ustrezajo dodatku 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 in 95 % dodane vode.

V vsaki točki smo glede na izgled sistema ocenili, ali je nastala mikroemulzija.

Na ta način smo izdelali PTFD za posamezen na lipidih osnovan sistem (kar prikazuje slika 3).



Slika 3: Prikaz razredčitvenih premic na psevdotrikomponentnem faznem diagramu

Po redčenju SMES z vodno fazo smo disperzije, ki so nastale v zadnji točki razredčitvene premice (slednje vsebujejo 95 % vodne faze) pustili mirovati 1 teden. Tako smo dobili 1 vzorec za vsako porazdelitveno premico (skupno največ 9 vzorcev za posamezen SMES; ker so se nekateri sistemi razplastili, je bilo število vzorcev za analizo manjše). Nato smo izbrali stabilne mikroemulzije (transparentni oz. opalescentni sistemi, ki se niso razplastili) in jim določili velikost delcev z aparatom Zetasizer Nano ZS.

Priprava vzorcev in izvedba meritev:

Po nastanku mikroemulzije v končni točki razredčitvene premice smo del vzorca prelili v epruveto, jo zaprli s para-filmom in alu-folijo. Epruvete smo postavili v kovinski nosilec in jih shranili na polici omare. Vsak dan smo preverili, ali so se morda sistemi spremenili. Po 1 tednu smo stabilnim mikroemulzijam izmerili velikost delcev.

S plastično kapalko smo približno 1 mL vzorca prenesli v plastično kiveto in jo zaprli s priloženim pokrovčkom. Potrebno je paziti na ustrezno napolnjenost kivete, kar se sprti (pred vsako meritvijo) preverja v delu aparata, kamor smo vstavili epruveto (na tem delu je označena napolnjenost kivete, za ustrezno meritev je potrebna napolnjenost med oznako za minimalno in maksimalno napolnjenost). Prav tako v kiveti ne sme biti mehurčkov zraka, sicer bi jih aparat zaznal kot delce in bi dobili napačen rezultat. Popolnoma suho kiveto (zunanost pobrišemo s papirnatim robčkom) smo vstavili v Zetasizer Nano aparat.

Meritev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo smo izvedli pri naslednjih pogojih: čas ekvibracije 120 sekund, konstantna temperatura (25 °C), 2 seta meritev (vsak obsega do 20 posameznih meritev).

Število meritev pomeni, da v vsako kiveto laser posveti do $20 \times$ (vsakokrat pod drugačnim kotom), nato pa vse še enkrat ponovi. Tako naprava omogoči zaznavanje vseh delcev, ki so prisotni kjerkoli v mikroemulziji.

Rezultat meritve je podan s povprečno velikostjo kapljic (izmerjen je hidrodinamski premer kapljice), distribucijo porazdelitve (naprava izriše 1 ali več vrhov) ter napiše velikost delcev in širino distribucije ter intenzivnost posameznih vrhov. Prav tako dobimo tudi polidisperzni indeks, iz katerega ugotovimo stopnjo homogenosti vzorca. Vrednost polidisperznega indeksa je lahko med 0 (homogen sistem) in 1 (heterogen sistem).

Zelo dobre mikroemulzije imajo $PDI \leq 0,2$.

Zetasizer Nano ZS

To je aparat, ki se uporablja v številnih laboratorijih po svetu. Z njim vrednotijo velikost koloidnih delcev. Omogoča pridobivanje zanesljivih rezultatov (visoko avtomatiziran sistem, ni človeških napak, uravnavanje temperature), za meritev zadošča že majhna količina vzorca, ni navzkrižne kontaminacije (vsakokrat lahko uporabimo novo kiveto).

Aparatura uporablja metodo z dinamičnim sipanjem svetlobe (dynamic light scattering). Majhni delci se ves čas gibljejo, to je t.i. Brownovo gibanje, naključno gibanje koloidnih delcev v disperziji zaradi trkov z molekulami disperznega medija. Gibanje je odvisno od velikosti delcev, majhni delci se gibljejo hitreje kot večji. Pomembno vlogo ima temperatura – pri višji temperaturi je gibanje hitrejše, zato Zetasizer vzdržuje konstantno temperaturo. (slika 4)

Meritev poteka tako, da laserski žarek posveti skozi kiveto pod različnimi koti in zazna delce. Število in velikost delcev zazna fotodetektor kot spremembe v intenzivnosti sipanja svetlobe. Spremembe intenzitete aparat analizira z digitalnim avtokorelatorjem in izdela korelacijsko krivuljo, ki pokaže velikost in distribucijo velikosti delcev (33).



Slika 4: Zetasizer Nano ZS, aparat za merjenje velikosti kapljic (mikro)emulzij, nastalih z redčenjem SMES z vodo

3.2.2. Določanje solubilizacijske kapacitete izbranih komponent in SMES za učinkovino karvedilol

Solubilizacijsko kapaciteto izbranih komponent in SMES za učinkovino karvedilol smo določali pri sobni temperaturi. V 25 ml čašo smo odmerili približno 3,0 g posamezne komponente oz. SMES in dodali prebitek karvedilola. Vsebino čaš smo pri nizkih obratih mešali ~48 ur in nato pustili mirovati, da je presežek ZU sedimentiral. Supernatant smo nato prenesli v ultracentrifugirke (1,5 mL) in jih 20 minut centrifugirali pri 20 000 rpm pri 25 °C. Po ustreznem redčenju supernatanta smo koncentracijo karvedilola v vzorcih določili s HPLC analizo. Rezultati solubilizacijskih kapacitet so povprečje dveh paralelk in so podani kot mg karvedilola, ki se raztopi v 100 mg izbrane komponente oz. SMES.

3.2.3. Določanje stabilnosti karvedilola v izbranih komponentah in SMES

Nasičene raztopine karvedilola v izbranih komponentah in SMES smo en mesec starali pri sobni ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) in pri povišani temperaturi ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vsebnost karvedilola v izbranih vzorcih smo določili s HPLC analizo ob času $t = 0$ (v sveže pripravljenih vzorcih) in po enem mesecu staranja vzorcev pri sobni oz. povišani temperaturi. Vsebnost karvedilola v posameznem vzorcu predstavlja povprečje dveh paralelk in je podana kot odstotek (%) vsebnosti karvedilola ob času $t = 1$ mesec glede na čas 0 (vsebnost ob času 0 predstavlja 100 %).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil razvoj SMES-ov, primernih za vgradnjo ZU karvedilol, ki bodo omogočili izboljšanje topnosti in s tem BU karvedilola po peroralni aplikaciji.

Izdelali smo SMES-e, v katerih oljno fazo predstavljajo različne kombinacije TG in MG s srednje- in dolgoverižnimi maščobnimi kislinami. Kot oljno fazo smo uporabili Capmul GMO (nenasičen dv-MG), Capmul GMS (nasičen dv-MG), Capmul MCM EP (sdv-MG), Capmul MCM C10 (sdv-MG), Capmul MCM C8 (sdv-MG) ter ricinusovo olje (dv-TG) in Captex 355 (sdv-TG). V oljni fazi smo vedno imeli kombinacijo 2 lipidnih komponent, pri čemer smo dv-TG kombinirali z dv- ali s sdv-MG, sdv-TG pa s sdv- ali z dv-MG.

Kot emulgator smo uporabili dve hidrofilni površinsko aktivni snovi – Cremophor CO 40 in Kolliphor HS 15 ter Tween 20, kot hidrofilno sotopilo pa PEG 400. Sestava posameznih SMES-ov je prikazana v preglednici 2.

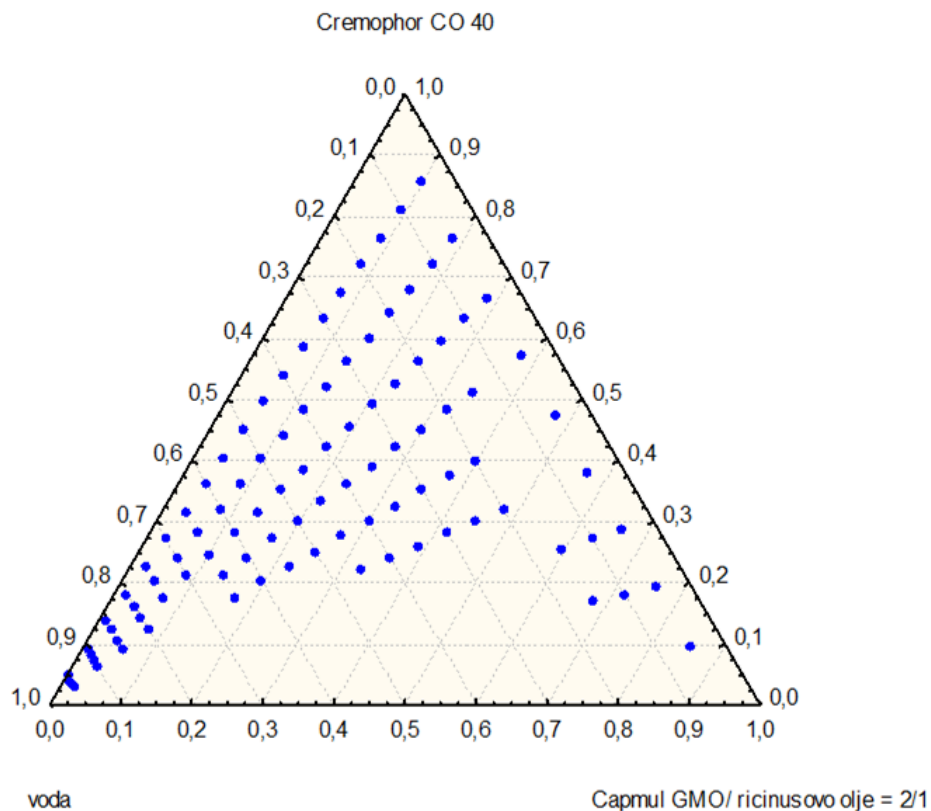
SMES-e smo titrirali z vodo (vsak dodatek vode pomeni 5 % dodane vode glede na celotno maso sistema) ter vizualno ovrednotili sistem glede nastanka mikroemulzije. Za vse SMES-e smo izdelali PTFD, saj se na ta način lepo prikaže področje in obseg nastanka ME (njihovo stabilnost smo spremljali 7 dni). Stabilnim ME smo pomerili tudi velikost kapljic. Za izbrane komponente in SMES-e smo določili tudi solubilizacijsko kapaciteto za karvedilol in njegovo stabilnost v sistemih.

4.1. IZDELAVA PSEVDO-TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV (PTFD)

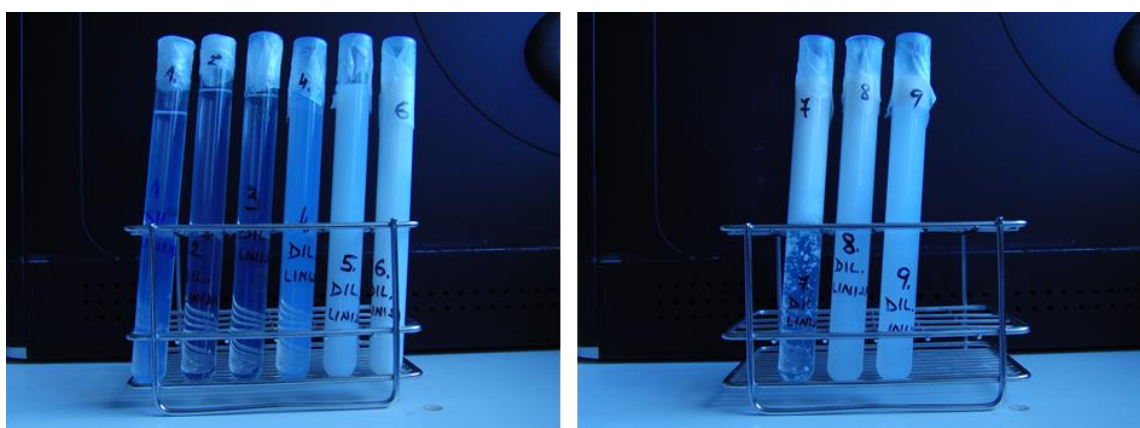
Najprej smo izdelali PTFD za sisteme, ki so kot oljno fazo vsebovali kombinacijo Capmul GMO (nenasičen dv-MG) in ricinusovo olje (dv-TG) v razmerju 2:1, kot emulgator pa Cremophor CO 40 (slika 5 in slika 6) oz. Kolliphor HS 15 (slika 7 in slika 8).

Na sliki 5 vidimo, da so po titriranju SMES-a z vodo nastale ME v širokem področju PTFD, in sicer vzdolž celotne 1., 2. in 3. dilucijske linije (razredčitvene premice). Popolno redčenje sistema, ki vodi v nastanek ME, je možno tudi za sistem na 4. dilucijski liniji. Kot ME smo opisali sisteme, ki so bili po dodatku vode transparentni. Natančneje smo opazili nastanek transparentnih gelskih struktur, ki smo jih ovrednotili kot ME, saj so nastale spontano (glede na njihovo konsistenco pa sklepamo, da te strukture verjetno predstavljajo tekoče kristale). Slednje so nastajale po 1.-5. dilucijski liniji, največ v 1. dilucijski liniji (pri 30-60 % dodatka

vode), nato v vedno manjšem obsegu, v 5. dilucijski liniji le še pri 45-50 % dodane vode. To je tudi v skladu s pričakovanji, saj je znano, da se tekoči kristali najpogosteje tvorijo iz SMES z visokim deležem emulgatorja.



Slika 5: PTFD za sistem Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 6: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode v sistemih je 95 %.

V točkah, v katerih ni nastala ME, smo opazili nastanek motnih ali belih emulzij, ki bi jih glede na velikost kapljic uvrstili med grobo disperzne sisteme; slednjih nismo analizirali. Edina posebnost teh sistemov je bil nastanek kremastih struktur bele barve, ki so nastale na 6. dilucijski liniji (40 % emulgatorja, 60 % oljne faze, 65-75 % dodane vode) in na 7. dilucijski liniji (30 % emulgatorja, 70 % oljne faze, 55 % dodane vode). Očitno pri povečevanju količine oljne faze in zmanjševanju količine emulgatorja v sistemu potečejo določene spremembe – sistem postaja bolj viskozen, pojavijo se poltrdne strukture. Na 7., 8. in 9. dilucijski liniji (70-90 % oljne faze ter 10-30 % emulgatorja) smo opazili ločevanje faz, ko je bila vsebnost vode več kot 65 %. Pojav je zelo dobro viden po shranjevanju vzorcev pri sobni temperaturi, na temnem prostoru (zaprta omarica) po 7 dneh. Izgled sistema je prikazan na sliki 6.

Pri naslednjih SMES-ih smo izmenično spreminjali sestavo oljne faze in emulgatorja ter spremljali razlike v obsegu nastanka ME ter v njihovi stabilnosti. Iskali smo najboljši SMES, kjer bi nastala ME v največjem obsegu PTFD. ME naj bi bila stabilna vsaj 1 teden, velikost kapljic naj bi bila v območju ME, kapljice naj bi bile čim bolj enakomernih velikosti ($PDI < 0,2$).

V novem SMES-u smo ohranili oljno fazo (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1), kot emulgator pa smo uporabili Kolliphor HS 15 (slika 7 in slika 8). V primerjavi s prejšnjim SMES z enako oljno fazo in emulgatorjem Cremophorjem CO 40 se opazi znatno zmanjšanje področja nastanka ME (prikazano na sliki 7). ME so nastale le po celotni 1. dilucijski liniji (90 % emulgatorja, 10 % oljne faze) ter delno v dilucijskih linijah 2, 3 in 4.

Od 5.-9. dilucijske linije (10-50 % emulgatorja, 50-90 % oljne faze) pa je ME nastala le pri dodatku 5 % vode, pri povečevanju deleža vode pa ME niso več nastajale. Verjetno je razlog v manjši sposobnosti Kolliphorja HS 15 za tvorbo ME v kombinaciji z izbrano oljno fazo, saj ME nastajajo le na področju z večjo koncentracijo emulgatorja.

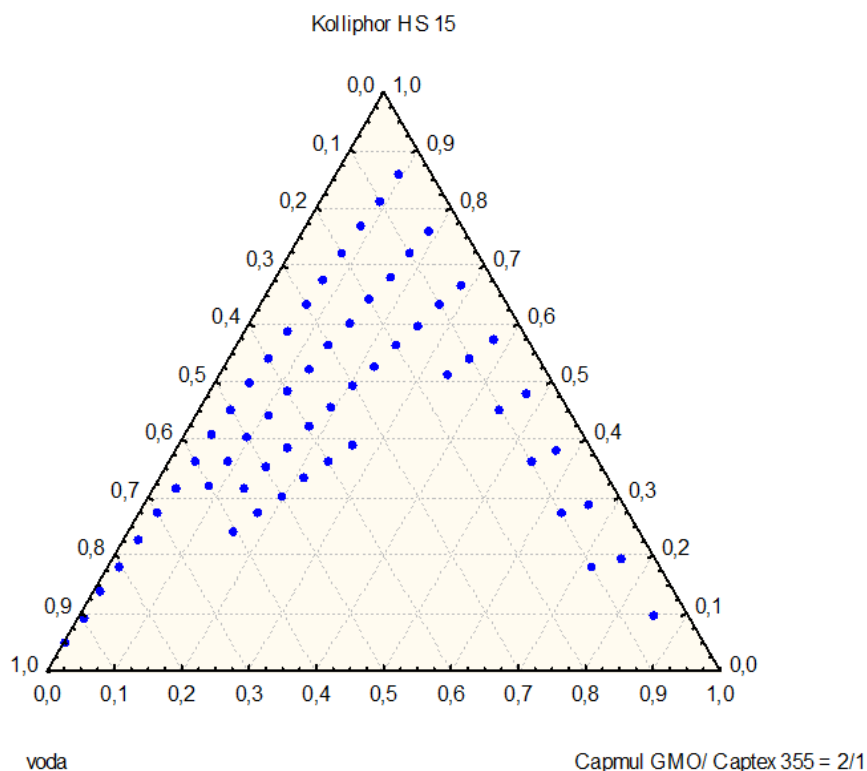
Tudi pri SMES-ih s Kolliphorjem HS 15 smo opazili pojav transparentnih gelskih struktur, ki pa so nastale v manjšem obsegu, in sicer le na 1., 2. in 3. dilucijski liniji (pri dodatkih vode v območju 25-50 %). Verjetno so tudi v tem primeru nastali tekoči kristali.

Pojav poltrdnih struktur (krema) smo opazili le na 6. dilucijski liniji (40 % emulgatorja, 60 % oljne faze, 50-60 % vode). Treba pa je omeniti, da je bila viskoznost teh sistemov manjša kot pri SMES-u s Cremophorjem CO 40.

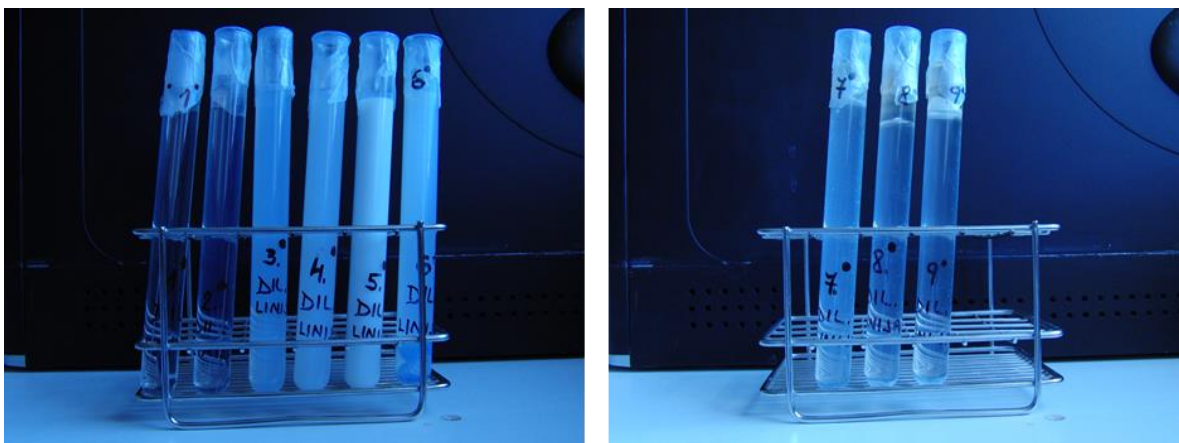
Po 1 tednu hranjenja vzorcev smo tudi pri tem sistemu opazili ločevanje faz na 7., 8. in 9.

dilucijski liniji, kjer imamo malo emulgatorja (10-30 %) in precej oljne faze (70-90 %). Očitno je zaradi premalo emulgatorja prišlo do fizikalne nestabilnosti emulzij. V točkah, kjer ni nastala ME ampak netransparentna tekočina (motna oz. popolnoma bela), so verjetno nastale grobe emulzije. Do točke, kjer smo opazili ločevanje faz, so bile emulzije stabilne. Izgled sistemov po 7 dneh prikazuje slika 8.

Na osnovi predstavljenih rezultatov sklepamo, da je za samo-mikroemulgiranje sistema, ki kot oljno fazo vsebuje Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1, Cremophor CO 40 učinkovitejši pri tvorbi ME v širokem področju PTFD kot Kolliphor HS 15.

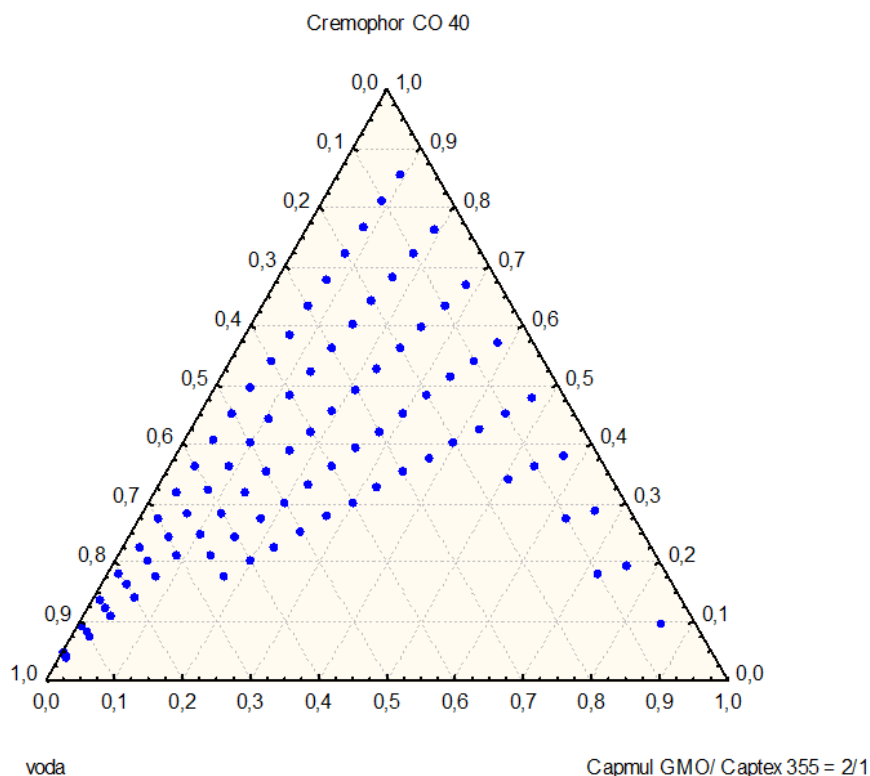


Slika 7: PTFD za sistem Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 8: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

V nadaljevanju smo nekoliko spremenili oljno fazo, in sicer smo dv-TG (ricinusovo olje) nadomestili s sdv-TG (Captex 355) – kot oljno fazo smo tako uporabili Capmul GMO/Captex 355 = 2:1, kot emulgatorja pa ponovno Cremophor CO 40 (slika 9 in slika 10) oz. Kolliphor HS 15 (slika 11 in slika 12).



Slika 9: PTFD za sistem Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.

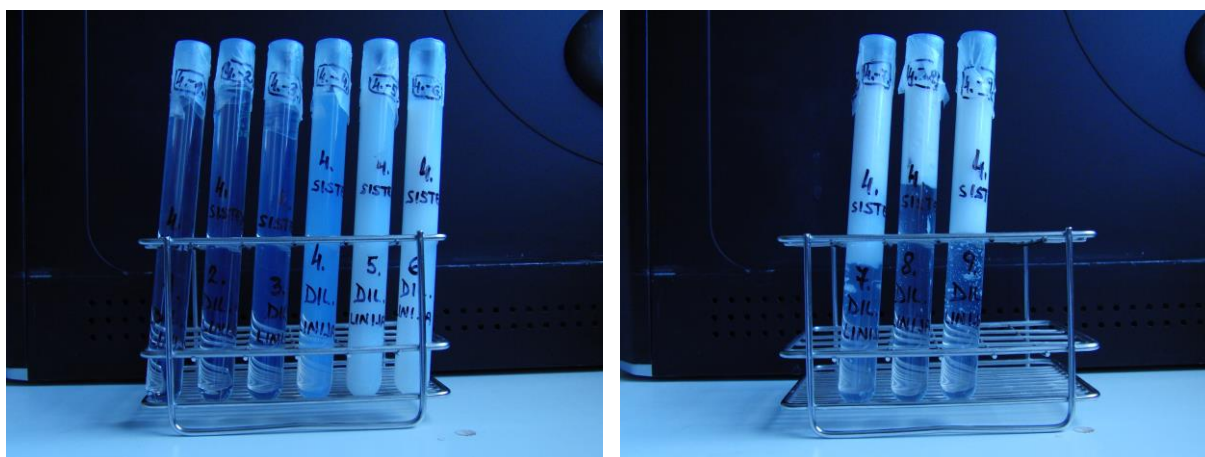
V primerjavi s sistemom, ki je v oljni fazi vseboval ricinusovo olje (slika 5), smo pri sistemu s Captex-om 355 (slika 9) zaznali rahlo povečanje obsega nastanka ME (1.-3. dilucijska linija cela, 4. in 5. v nekoliko večjem obsegu, 6. malo manj, pri 7.-9. dilucijski liniji pa ni sprememb).

Transparentne gelske strukture nastanejo od 1.-5. dilucijske linije pri visokih koncentracijah emulgatorja (50-90 %) in manjšem deležu oljne faze (10-50 %), ob dodatku 25-55 % vode. Vidimo, da pri nastanku gelskih struktur med primerjanima sistemoma skorajda ni razlik.

Gosta poltrdna struktura se prav tako pojavi na 6. in 7. dilucijski liniji (30-40 % emulgatorja, 60-70 % oljne faze, 45-60 % vode), kar je primerljivo s sistemom z ricinusovim oljem. Na splošno se v vseh sistemih, ki so v oljni fazi poleg TG vsebovali MG Capmul GMO, viskoznost povečuje z večjo vsebnostjo oljne faze v formulaciji.

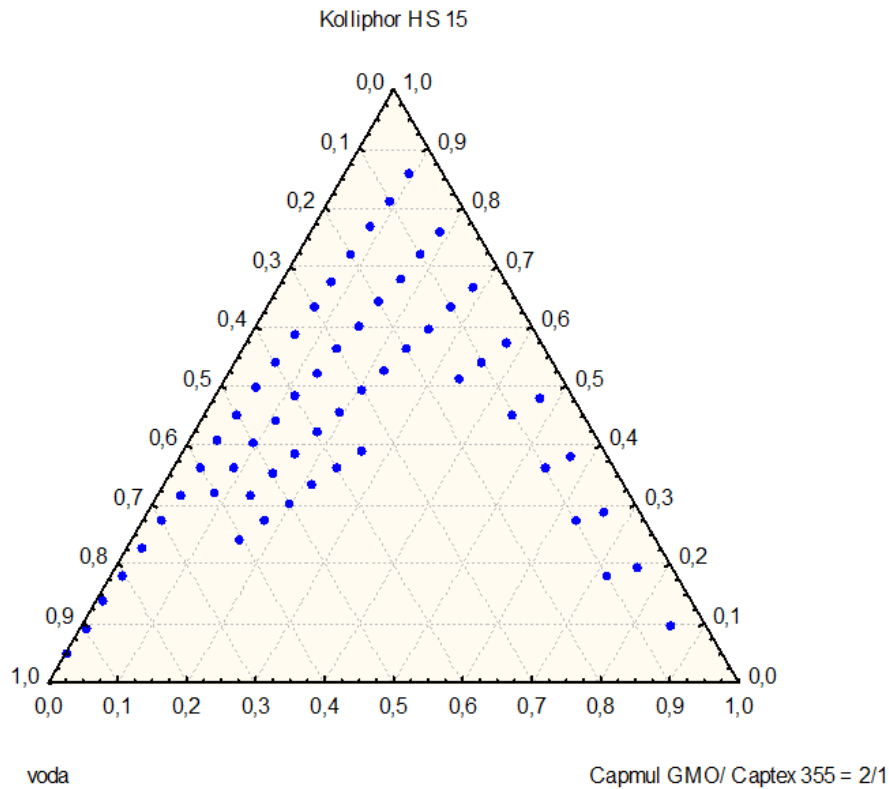
Po 1 tednu hranjenja vzorcev pri sobni temperature smo razplastitev opazili od 6. dilucijske linije naprej, to pomeni, ko je SMES vseboval 40 % emulgatorja ali manj (v primeru sistema z ricinusovim oljem so se razplastili sistemi od 7. dilucijske linije naprej – s 30 % emulgatorja). V obeh primerih se je razplastitev prvič pojavila na področju dilucijske linije s 65% vode. Pri opazovanju sistema 7 dni po izdelavi je razplastitev zelo jasno vidna (prikazano na sliki 10).

Če primerjamo 1. in 3. sistem, ki se razlikujeta v eni komponenti oljne faze (ricinusovo olje ali Captex 355), vidimo zelo podobno obnašanje sistema in primerljivo področje nastanka ME.

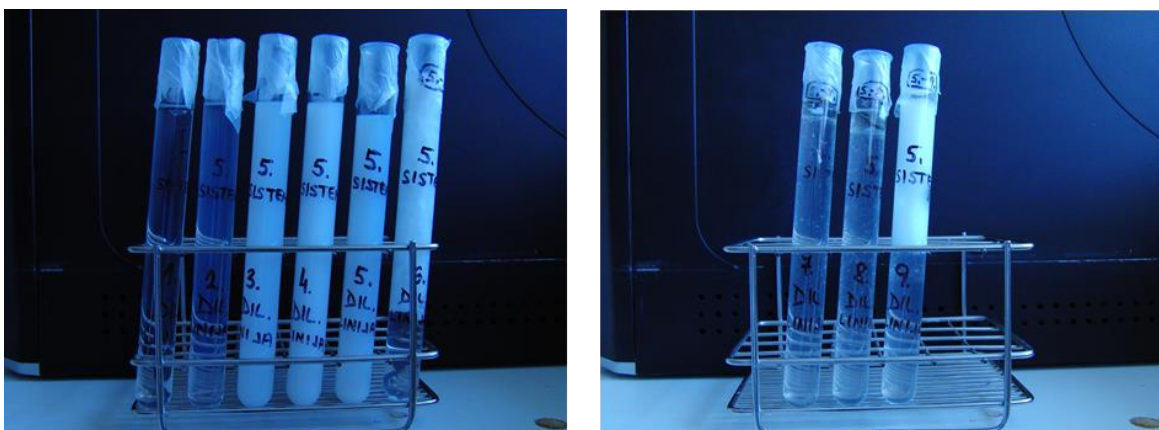


Slika 10: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

V sistemu Capmul GMO/Captex 355 = 2:1 / Kolliphor HS 15 (slika 11) smo Cremophor CO 40 (slika 9) nadomestili s Kolliphor-jem HS 15. Ta sistem lahko primerjamo tudi s sistemom Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15 (slika 7), od katerega se razlikuje v sestavi oljne faze – Captex 355 namesto ricinusovega olja.



Slika 11: PTFD za sistem Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 12: (Mikro)emulzije (po 7 dneh staranja), nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

Če primerjamo PTFD na slikah 11 in 7, lahko na prvem opazimo povečanje področja nastanka ME, predvsem na 2., 3. in 4. dilucijski liniji, v naslednjih dilucijskih linijah pa komaj opazno.

Transparentne gelske strukture smo videli od 1. do 4. dilucijske linije (60-90 % emulgatorja v SMES-u), kar je nekoliko več kot pri sistemu, ki je vseboval ricinusovo olje. Nastajajo v podobnem območju titracije (25-50 % dodane vode), v kolikor je vsebnost emulgatorja v sistemu 90% pa gelsko strukturo izkazujejo sistemi s 25-30 % vode. Nastanek poltrdnega sistema (kremasta struktura) je v sistemu s Captex-om 355 bolj izrazit (kot v sistemu z ricinusovim oljem), saj se pojavlja od 5.-9. dilucijske linije (10-50 % emulgatorja, 50-90 % oljne faze, 55-70 % vode).

Tudi razplastitev opazimo nekoliko prej – pojavi se že v 6. dilucijski liniji in se nadaljuje do 9. dilucijske linije (10-40 % emulgatorja).

Izgled sistemov po 7 dneh je predstavljen na sliki 12. Transparentni sta ostali le dilucijski liniji 1 in 2, liniji 3 in 4 pa sta se zamotnili oz. sta postali mlečno beli; verjetno so se iz emulzij s koloidno velikostjo kapljic med 1 tedenskim staranjem vzorcev oblikovale grobe emulzije. Dilucijske linije 6-9 so se razplastile. V dilucijski liniji 6 opazimo spodaj belo tekočino (verjetno groba emulzija), nad njo pa belo, bolj viskozno snov (slednja ima očitno nižjo gostoto od emulzije, zato predvidevamo, da vsebuje večji delež oljne faze). V končni točki dilucijskih linij 7 in 8 je lepo vidna razmejitev med vodno in oljno fazo, v končni točki dilucijske linije 9 pa po 1 tednu soobstajajo 3 sistemi: vodna faza, bel viskozen sistem in oljna faza (faze si sledijo od dna proti vrhu epruvete).

Izmed SMES, ki so v oljni fazi vsebovali dv-MG Capmul GMO (slika 5, slika 7, slika 9 in slika 11), je največje področje nastanka ME izkazoval sistem Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40. Očitno je ta kombinacija optimalna.

Pri nadaljnjem delu smo v oljni fazi nadomestili dv-MG (Capmul GMO) s sdv-MG (Capmul MCM) in izdelali PTFD za enake kombinacije oljne faze in emulgatorje.

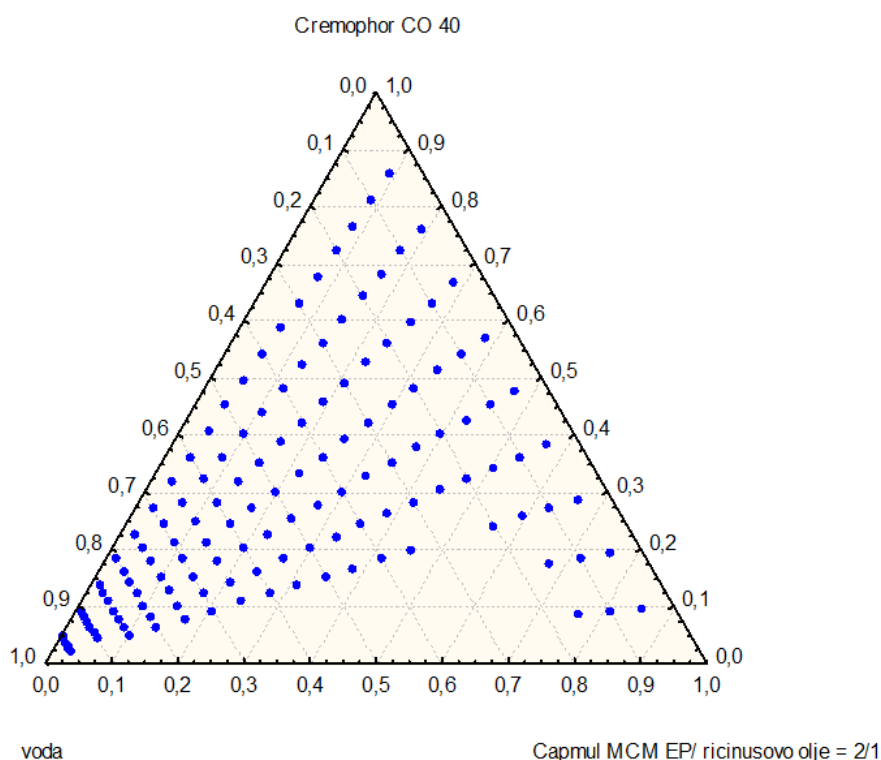
PTFD za Capmul MCM EP /ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 prikazuje slika 13. Iz slednje je vidno, da je ta SMES po titraciji z vodo tvoril ME v najširšem področju PTFD izmed vseh do sedaj predstavljenih sistemov (vzdolž celotnih dilucijskih linij 1-6 in vzdolž večine dilucijske linije 7, torej pri koncentracijah emulgatorja 30-90 %. Posamezni nepovezani sistemi s strukturo ME so nastali tudi pri 10-20 % emulgatorja. Nastajanje ME pri nižjih koncentracijah emulgatorja je ugodno predvsem zato, ker visoke koncentracije

slednjega lahko dražijo sluznico GIT; to zmanjša njihovo praktično uporabnost (niso primerne za kronične bolnike).

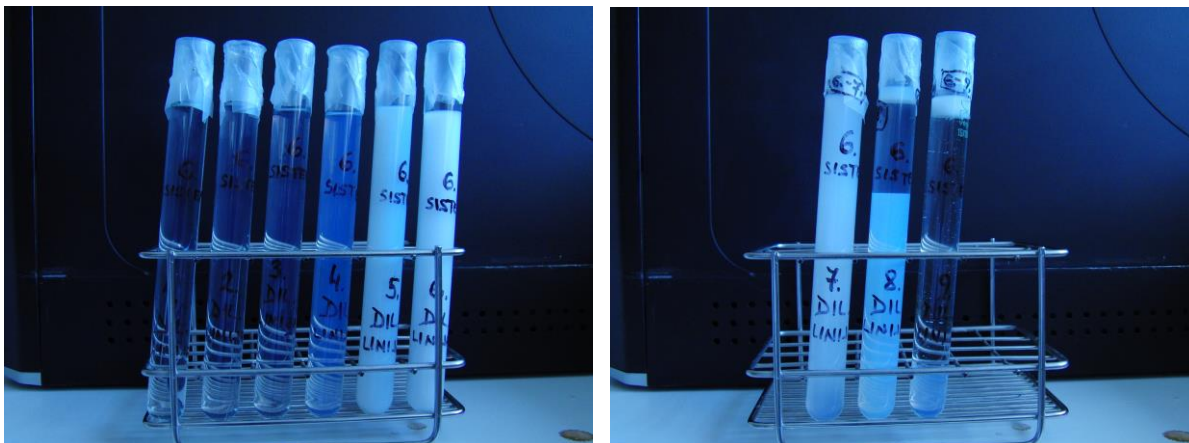
Pojav transparentnih gelskih struktur smo pri tem sistemu opazili le v manjšem obsegu na 1., 2. in 3. dilucijski liniji (70-90 % emulgatorja v SMES-u) pri 40-50 % dodane vode.

Nastanka poltrdnih kremastih struktur nismo opazili, možno je, da je tvorba slednjih značilna za sisteme z nenasičenimi dv-MG, kot je Capmul GMO. V točkah PTFD, kjer ni nastala mikroemulzija, smo opazili nastanek bele tekočine - emulzija. Takoj po izdelavi v nobeni končni točki dilucijskih premic ni bila vidna razplastitev nastalih (mikro)emulzij, po 7 dneh shranjevanja vzorcev pri sobni temperaturi (slika 14) pa so transparentne le še dilucijske linije 1-4 (60-90 % emulgatorja), linije 5-7(30-50 % emulgatorja) so bele barve – popolnoma netransparentne (verjetno emulzije). Na dilucijskih linijah 8 in 9 (10-20 % emulgatorja) pa verjetno nastanejo t.i. Windsorjevi sistemi, kjer so v ravnotežju ME, vodna in oljna faza (od dna do vrha epruvete) (34,35).

Lahko zaključimo, da je opisani SMES po titriranju z vodo omogočil nastanek ME v zelo širokem področju PTFD, vendar pa ME niso ostale dolgo stabilne; vse so bile stabilne 1 dan, le tiste z veliko emulgatorja pa so ostale homogene 7 dni.



Slika 13: PTFD za sistem Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2/1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.

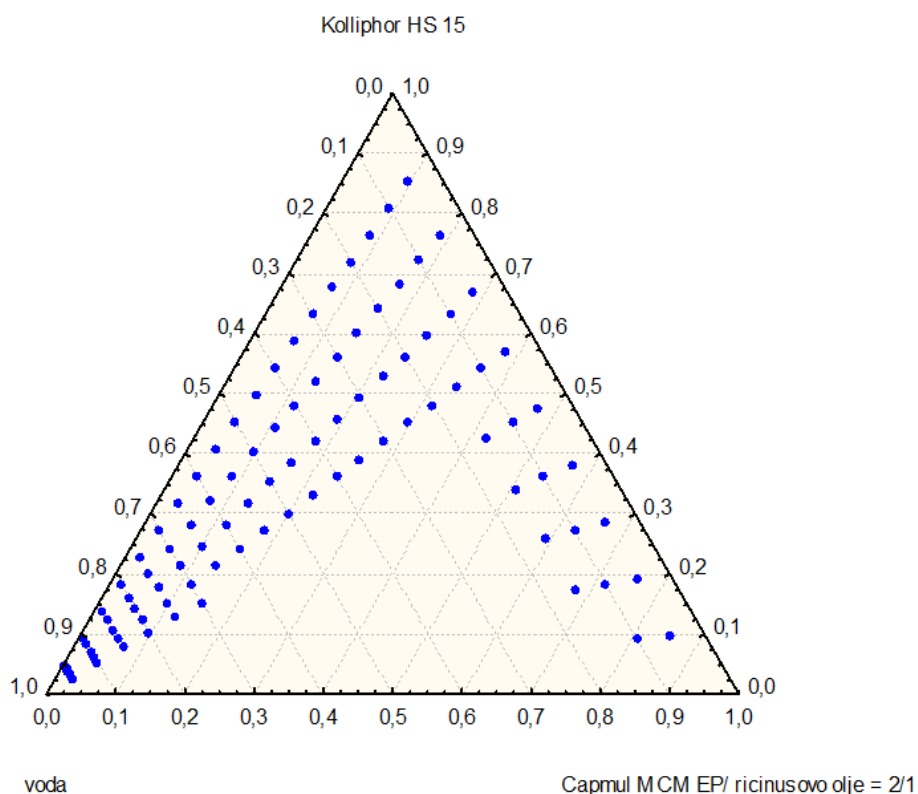


Slika 14: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

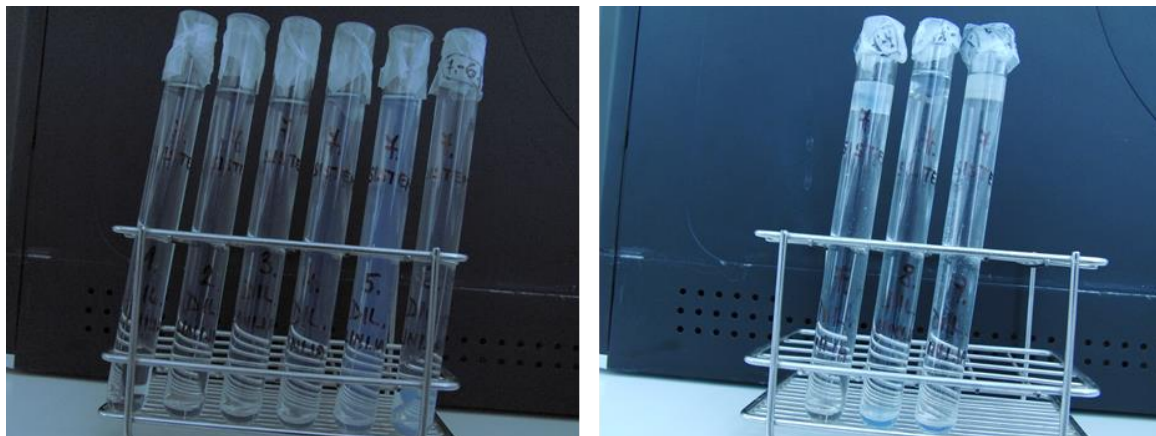
Slika 15 prikazuje PTFD za sistem (Capmul MCM EP / ricinusovo olje = 2:1) / Kolliphor HS 15; v primerjavi s sistemom, prikazanim na sliki 13, smo emulgator Cremophor CO 40 nadomestili s Kolliphor-jem HS 15.

Vidimo, da je v tem primeru področje nastanka ME precej manjše; ME nastanejo le vzdolž celotnih dilucijskih linij 1-4 (z visoko koncentracijo emulgatorja 60-90 %), na ostalih dilucijskih linijah pa le v posamičnih točkah. Transparentne gelske strukture med redčenjem tega sistema niso nastale (Kolliphor HS 15 v kombinaciji s to oljno fazo ne omogoča nastanka tekočih kristalov), ravno tako ne opazimo tvorbe poltrdnih kremastih sistemov.

Po 7 dneh opazamo razplastitev pri 7., 8. in 9. dilucijski liniji (SMES-i z manjšim deležem (10-30 %) emulgatorja). Videz sistemov 7 dni po izdelavi prikazuje slika 16.



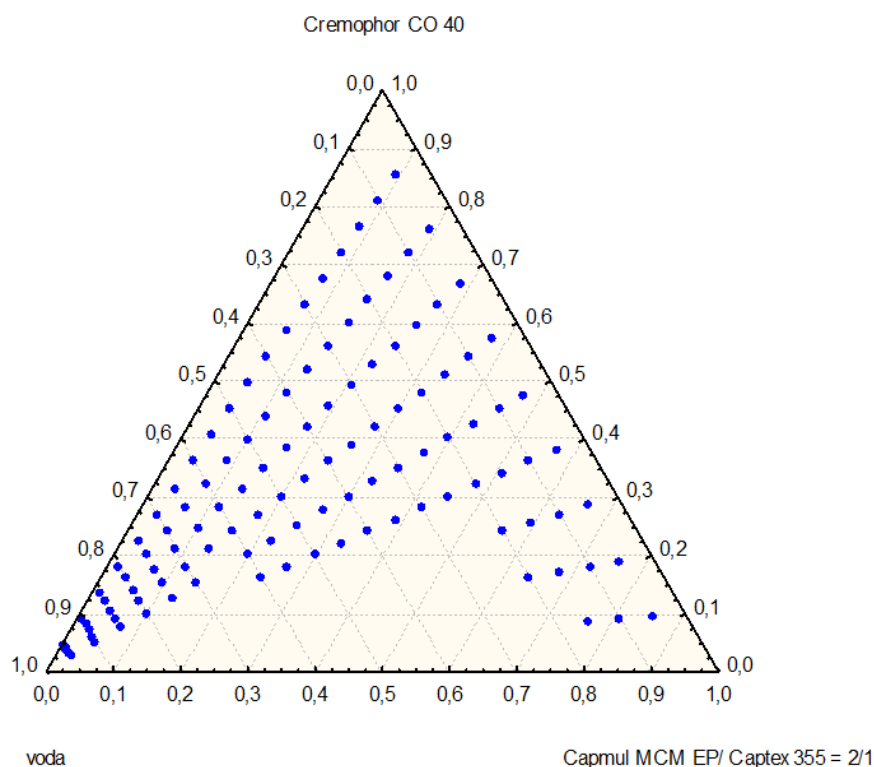
Slika 15: PTFD za sistem Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



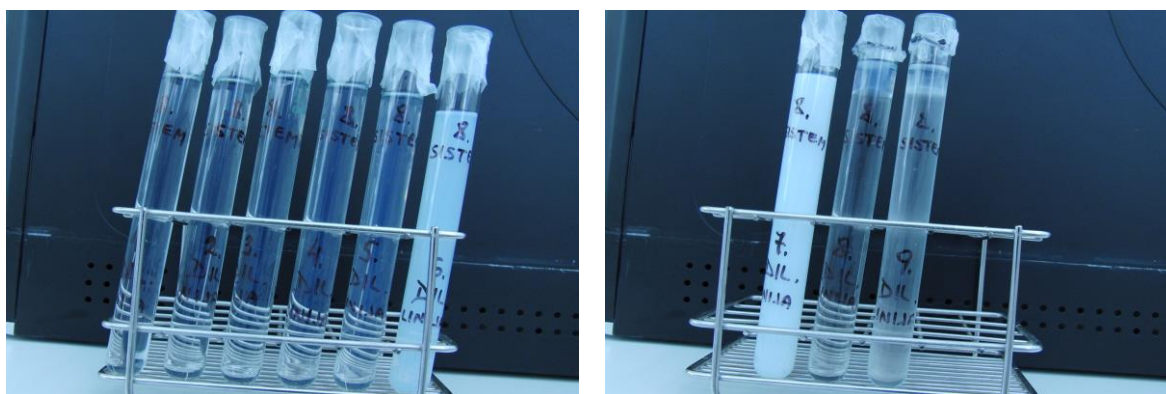
Slika 16: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

Slika 17 prikazuje PTFD za sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40; v primerjavi s sistemoma na slikah 13 in 15 smo spremenili oljno fazo – zamenjava ricinusovega olja (dv-TG) s Captexom 355 (sdv-TG). Sistem na sliki 17 kot emulgator vsebuje Cremophor CO 40. Izgled (mikro)emulzij, ki nastanejo v končni točki razredčitvenih

premic, prikazuje slika 18.



Slika 17: PTFD za sistem Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 18: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

V nasprotju s pričakovanji smo ugotovili, da je Captex 355 v primerjavi z ricinusovim oljem (primerjava PTFD na slikah 13 in 17) manj ugodna komponenta oljne faze, saj je precej zmanjšal področje nastalih ME, in sicer predvsem pri sistemih s srednjo vrednostjo emulgatorja (30-50 %) na razredčitvenih premicah 5-7. Ker so sdv-TG bolj polarni kot dv-TG,

običajno izkazujejo boljšo sposobnost samo-emulgiranja. Verjetno k večji učinkovitosti ricinusovega olja pripomore tudi ricinoleinska maščobna kislina, ki je hidroksi- maščobna kislina in bistveno poveča polarnost tega olja. Velja tudi, da tvori ricinusovo olje še zlasti z emulgatorji, ki so njegovi derivati (kot Cremophor CO 40) zelo učinkovite SMES.

V primerjavi s sistemom (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 je v primeru sistema s Captex-om 355 opazno manjše tudi področje nastanka transparentnih gelov; nastali so le pri 1. dilucijski liniji (90 % emulgatorja) ob dodatku 35-55 % vode. Pri manjših koncentracijah emulgatorja v SMES se v tem področju sicer nekoliko poveča viskoznost sistema, vendar gel ne nastane. To je v skladu s pričakovanji, saj je znano, da so sdv-TG kot Captex 355 manj primerni za nastanek tekočih kristalov kot ricinusovo olje (še zlasti v kombinaciji z emulgatorji, ki so derivati le-tega).

Na neoznačenih področjih PTFD je nastala netransparentna ali bela disperzija (emulzija), ki se je razplastila na 9. dilucijski liniji že pri titraciji SMES z vodo (pri vsebnosti slednje 65 % in več). Izgled sistema po 7 dneh prikazuje slika 18. Razplastitev opazimo le pri 8. in 9. vzorcu (10-20 % emulgatorja v SMES), ostali vzorci so stabilni.

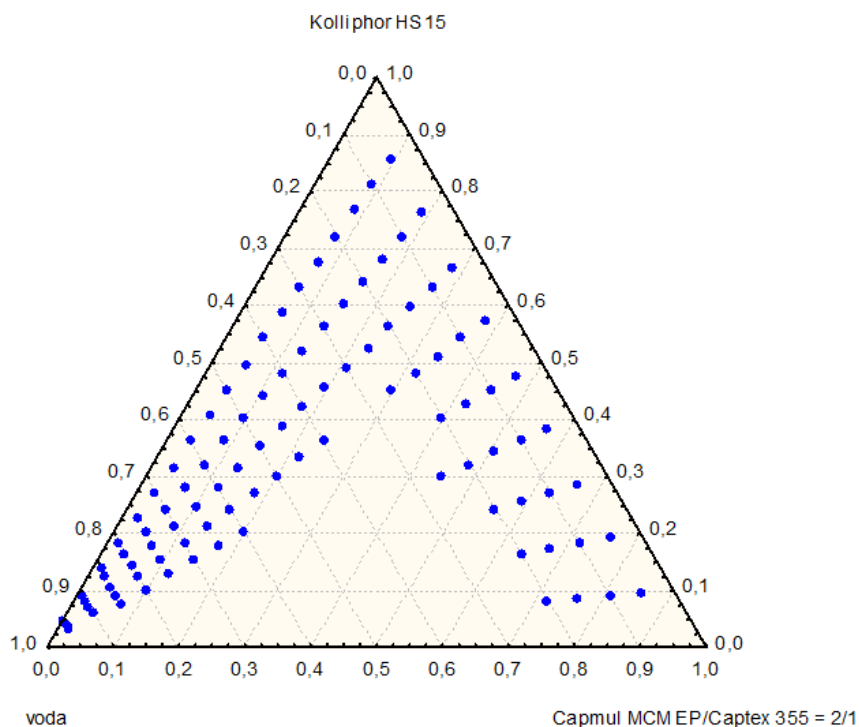
Ugotovili smo, da je sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 (slika 17) manj ugoden glede področja nastanka ME, vendar nastale ME v večji meri ostajajo stabilne tudi pri nižjih koncentracijah emulgatorja (40-60 %) v primerjavi s SMES-om, ki pa ima namesto Captexa 355 v oljni fazi ricinusovo olje (slika 13).

Pri naslednjem sistemu smo ohranili sestavo oljne faze (Capmul MCM EP/Captex 355 v razmerju 2:1), zamenjali pa smo emulgator in uporabili Kolliphor HS 15. Po titraciji z vodo smo izdelali PTFD (slika 19).

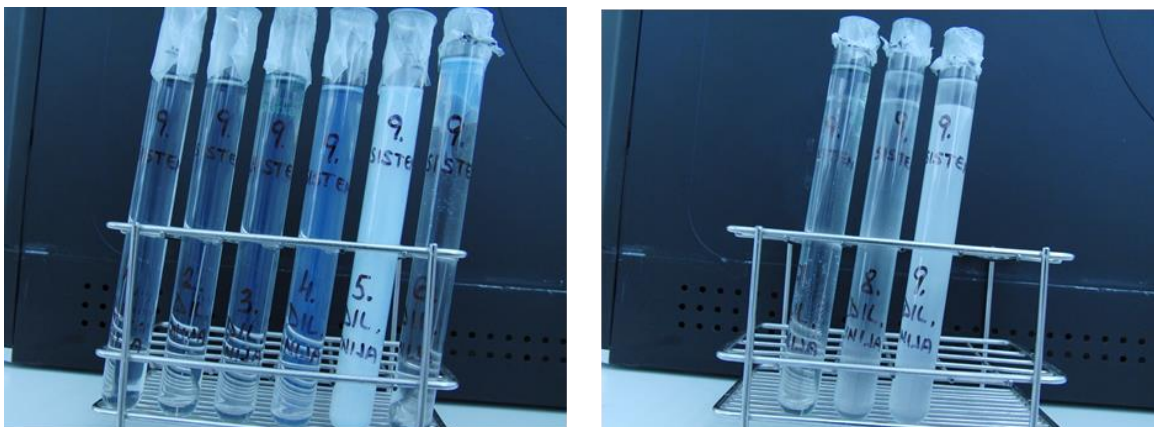
Če primerjamo ta sistem s podobnim sistemom, ki pa je v oljni fazi vseboval ricinusovo olje (slika 15), ugotovimo delno povečanje obsega nastanka ME v območju nižjih koncentracij emulgatorja (10-50 %), kar je ugodno.

Tvorbe gela nismo opazili, razplastitev opazimo pri 7.-9. dilucijski liniji (10-30 % emulgatorja v SMES-u), oboje enako kot pri primerljivem sistemu.

Stabilnost vzorcev po 7 dneh prikazuje slika 20, na kateri je razvidna razplastitev v vzorcih 6-9 (10-40 % emulgatorja v SMES), ostali vzorci so stabilni.



Slika 19: PTFD za sistem Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 20: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

Zaključimo lahko, da je sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 nekoliko ugodnejši od primerljivega sistema z ricinusovim oljem (slika 15) z vidika obsega nastanka ME, pri vsem ostalem pa ni razlik. Področje nastanka ME se je povečalo zaradi spremembe komponent oljne faze (sdv-TG Captex 355 namesto dv-TG ricinusovega olja). Capmul MCM EP je sicer izkazoval največji obseg nastanka ME v kombinaciji z ricinusovim

oljem in Cremophorjem CO 40 (slika 13), vendar je bila stabilnost nastalih disperzij po 7 dneh omejena (stabilne ME nastanejo le pri visokih koncentracijah emulgatorja – 80-90 %, sistemi s 50-70 % emulgatorja tvorijo stabilno emulzijo, pri koncentracijah emulgatorja pod 50 % pa poteče razplastitev sistema).

Sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2/1) /Kolliphor HS 15 tvori ME v sicer nekoliko manjšem področju PTFD, vendar slednje v večjem obsegu nastanejo tudi pri nižjih koncentracijah emulgatorja (10-50%). Pomembno je, da so sistemi, ki so nastali v končni točki razredčitvene premice tudi bolj stabilni.

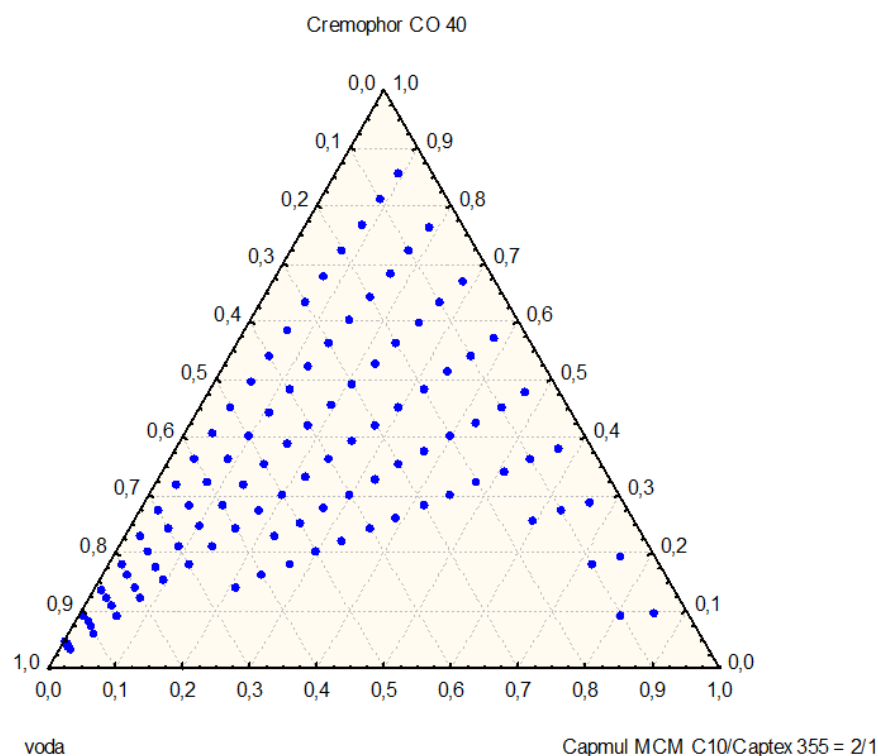
V nadaljevanju nas je zanimalo, kako na nastanek ME vplivata še obe posamezni komponenti, ki sestavljata Capmul MCM EP, to sta Capmul MCM C8 (bolj polaren, manj viskozen) in Capmul MCM C10 (manj polaren, bolj viskozen).

Najprej smo pripravili PTFD za sistem z naslednjo sestavo: Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1 (oljna faza) in Cremophor CO 40 (emulgator) (slika 21). Captex 355 smo izbrali, ker so v kombinaciji s Capmul-om MCM EP ME nastajale v večjem obsegu tudi pri nižjih koncentracijah emulgatorja (v primerjavi z ricinusovim oljem), Cremophor CO 40 pa zaradi velikega področja nastanka ME pri vseh koncentracijah emulgatorja (tako v kombinaciji s Captex-om 355 kot z ricinusovim oljem). PTFD za sistem (Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 prikazuje slika 21.

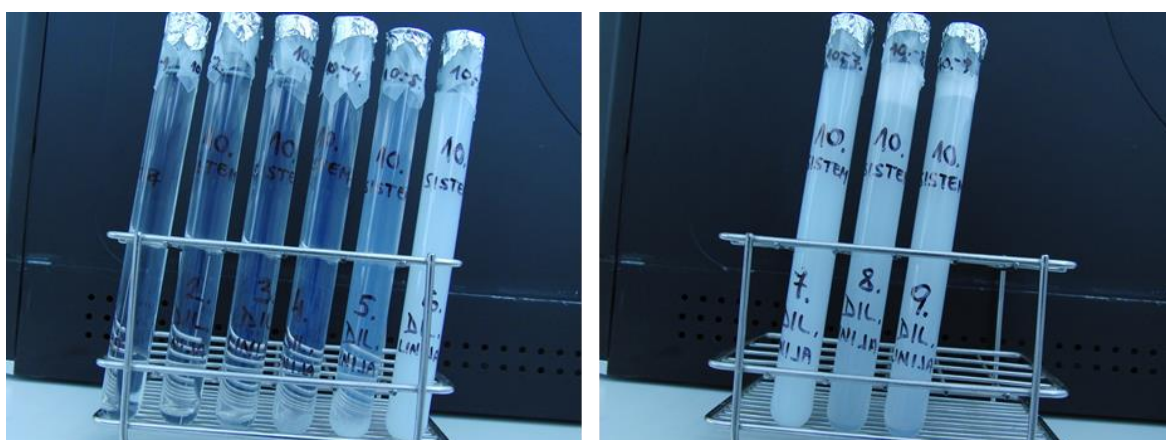
Opazili smo nastanek ME vzdolž celotne 1.-4. dilucijske linije (60-90 % emulgatorja v SMES), v veliki meri vzdolž 5. in 6. dilucijske linije (40-50 % emulgatorja), ter posamezna področja na 7.-9. dilucijski liniji (10-30 % emulgatorja). ME torej nastanejo v širokem območju PTFD.

Če primerjamo ta sistem (slika 21) s podobnim sistemom, ki namesto Capmula MCM C10 vsebuje Capmul MCM EP (slika 17), ugotovimo veliko stopnjo ujemanja med obema PTFD-jema (razlika le v manjšem obsegu nastanka ME v 5. dilucijski liniji (50 % emulgatorja) pri SMES-u z Capmulom MCM C10).

Transparentne gelske strukture so nastale vzdolž dilucijskih linij 1-6 (30-90 % emulgatorja v SMES), in sicer v širšem področju – pri 25-60 % dodane vode; pri sistemih z višjim deležem emulgatorja so geli nastali pri manjši količini dodane vode.



Slika 21: PTFD za sistem Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 22: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

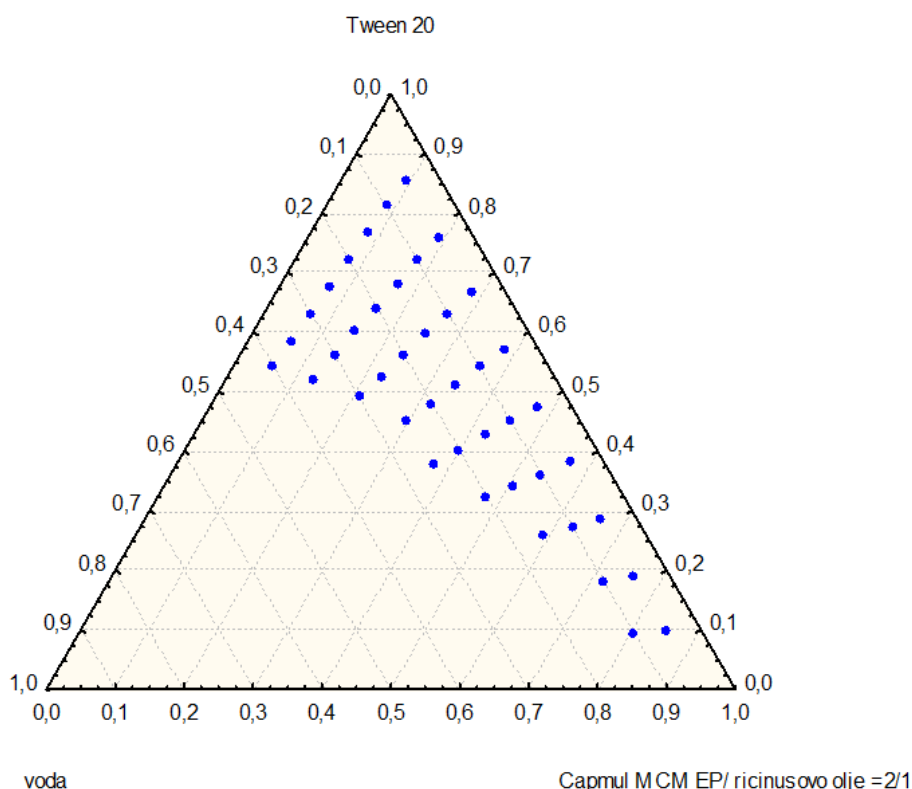
Čeprav sta tako Capmul MCM EP kot Capmul MCM C10 sdv-MG, je zanimivo, da so transparentne gelske strukture (najverjetneje tekoči kristali) nastale v bistveno večjem področju PTFD pri SMES s Capmulom MCM C10.

Stabilnost sistema 7 dni po izdelavi prikazuje slika 22; razplastitev opazimo le pri 8. in 9. vzorcu (končni točki 8. in 9. razredčitvene premice), ostali so bili stabilni.

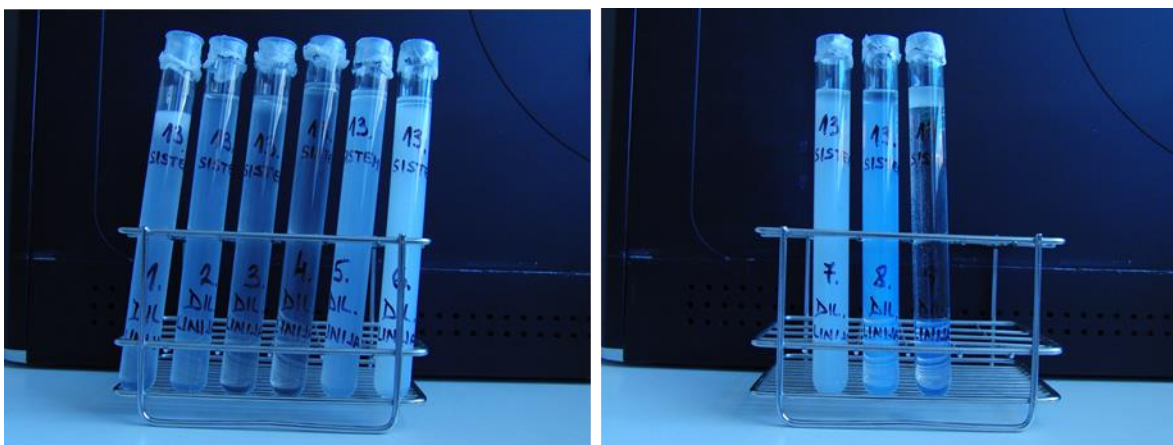
Sistema, ki smo ju primerjali ((Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 vs. (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40), sta tvorila ME v podobnem področju PTFD, vendar je Capmul MCM C10 omogočil obsežnejši nastanek gelskih struktur. Slednje je v nekaterih primerih lahko prednost, saj morda lahko pripomore k tvorbi prenasičenih sistemov, ki se veliko proučujejo za izboljšanje BU slabo vodotopnih učinkovin.

V nadaljevanju smo kot emulgator uporabili še Tween 20, ki po literarnih podatkih izkazuje še večjo hidrofilnost (HLB = 16,7) kot Cremophor CO 40 in Kolliphor HS 15 s HLB vrednostima 14-16.

Slika 23 prikazuje PTFD za sistem, katerega oljna faza vsebuje Capmul MCM EP in ricinusovo olje v razmerju 2:1, za emulgator pa smo izbrali Tween 20.



Slika 23: PTFD za sistem (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 24: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM EP/ ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

Iz slike 23 je razvidno, da je ME nastala v manjšem območju PTFD, vendar kljub temu tudi pri nižjih koncentracijah emulgatorja v SMES-u. Velika pomajkljivost sistema je, da ne omogoča popolnega redčenja SMES (ME ne nastanejo v končni točki razredčitvenih premic).

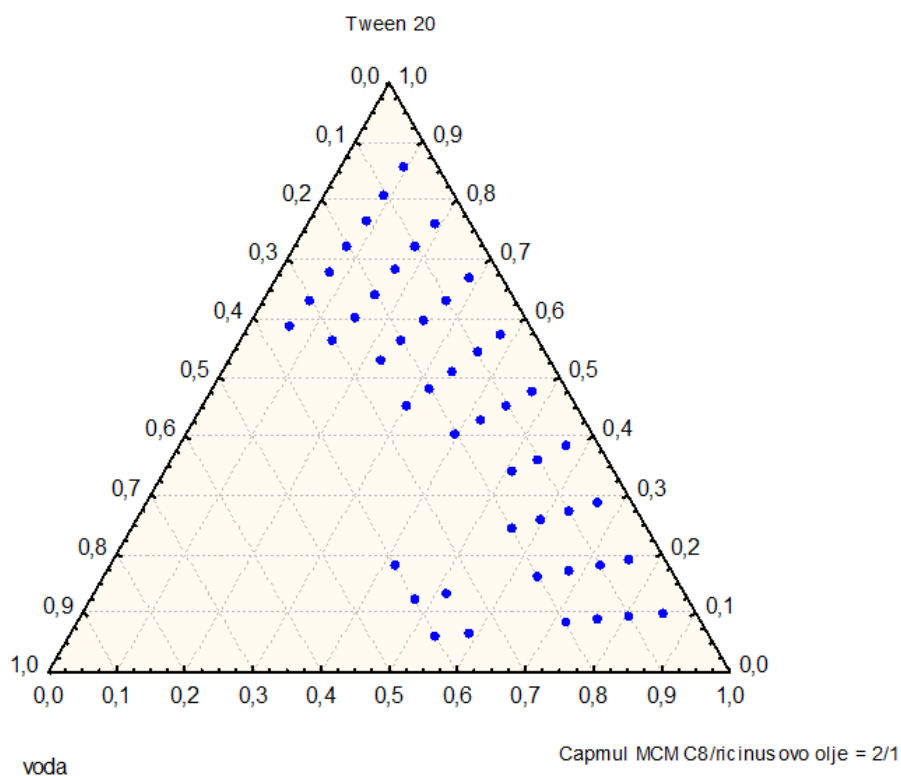
Na področjih, kjer ni nastala ME, so nastale netransparentne in mlečno obarvane emulzije.

Vzdolž 6.-8. dilucijske linije (20-40 % emulgatorja v SMES) smo tudi pri tem sistemu opazili povečanje viskoznosti sistema in nastanek poltrdnih (kremastih) struktur po dodatku 45-60 % vode. Slednje je bilo posebno izrazito pri 6. dilucijski liniji (40 % emulgatorja), kjer so poltrdne strukture nastale pri dodatku 45-50% vode (v 7. in 8. dilucijski liniji pa po dodatku 60 oz. 55 % vode).

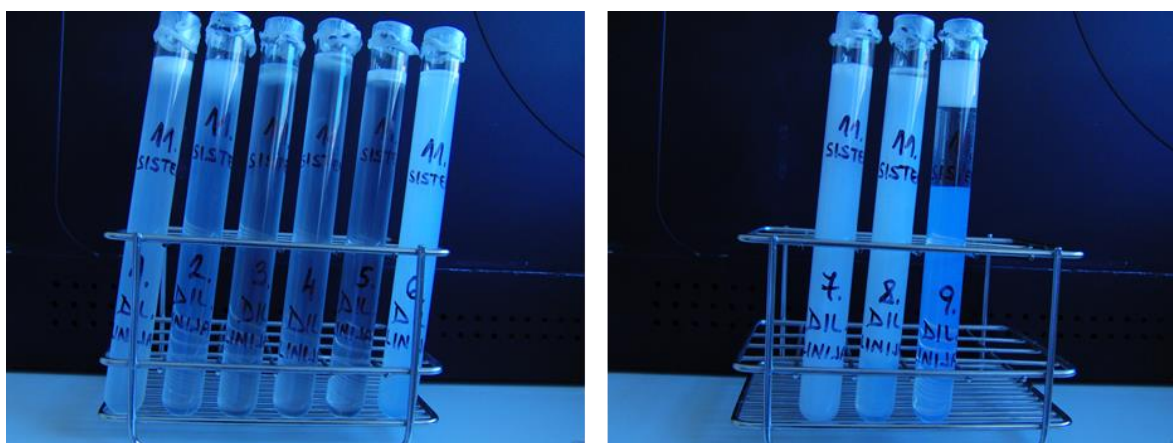
Že med titracijo z vodo je bila vidna razplastitev v končni točki vseh dilucijskih linij, razen na 1. dilucijski liniji (torej pri 90 % emulgatorja v SMES). Z vidika stabilnosti je zato ta sistem najslabši izmed vseh predhodno predstavljenih. Stabilnost po 7 dneh (slika 24) je bila še slabša – pri vseh vzorcih, razen pri 1. vzorcu je zelo dobro vidna razplastitev (ločitev vodne in oljne faze), pri 1. vzorcu je na vrhu epruvete vidna bela pena (morda večje kapljice, ker je nastala emulzija).

Zanimalo nas je, ali lahko obseg nastanka ME in njihovo stabilnost povečamo, če Tween 20 uporabimo v kombinaciji z drugo oljno fazo ali z drugim emulgatorjem oz. hidrofilnim sotpilom.

Slika 25 tako prikazuje PTFD za sistem (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20, stabilnost nastalih disperzij po 7 dneh pa je razvidna iz slike 26.



Slika 25: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tweeen 20, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



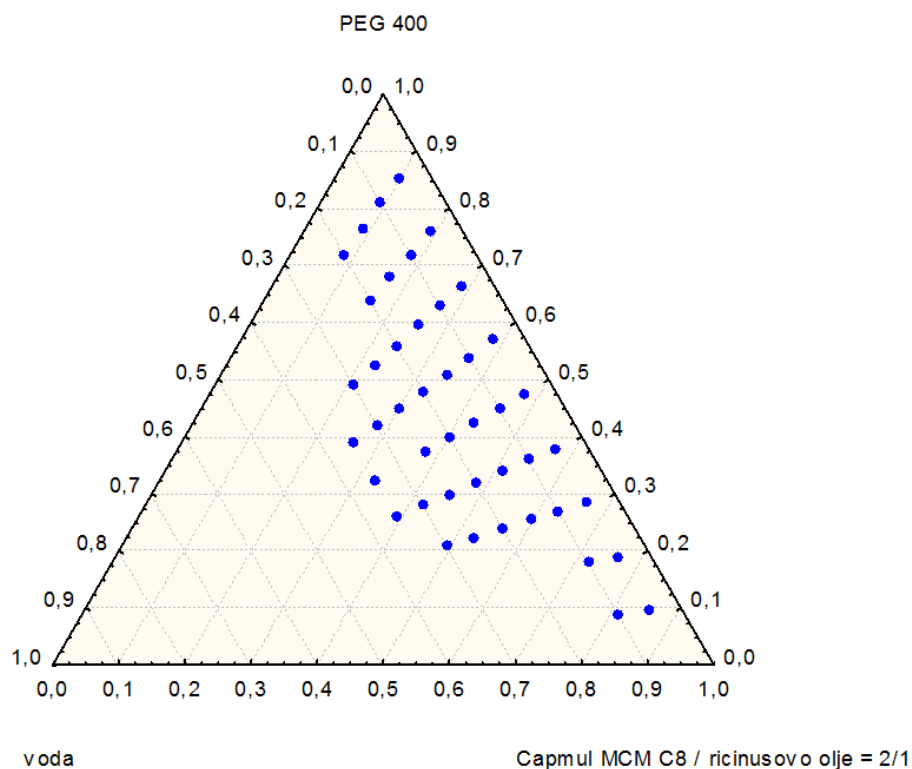
Slika 26: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tweeen 20 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

Na sliki 25 vidimo, da je področje nastanka ME pri SMES z višjimi koncentracijami emulgatorja podobno kot pri sistemu s Capmulom MCM EP, pri SMES z nižjimi koncentracijami emulgatorja (10-30 %) pa nastanejo ME v večjem obsegu PTFD, kar je

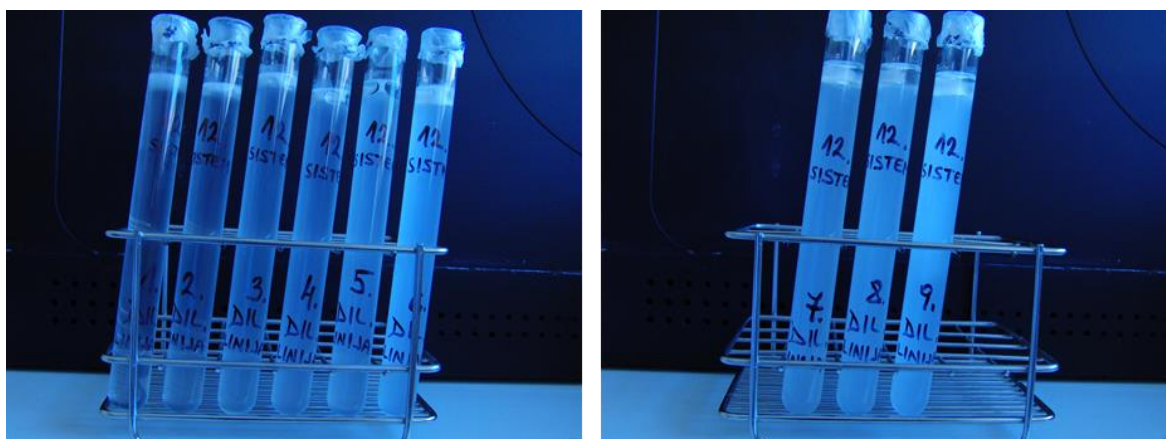
ugodno. Na 7.-9. dilucijski liniji smo opazili, da tvorbi ME sledi področje brez ME, nato pa spet nastanejo ME. Ta pojav je bil pri vseh dilucijskih linijah opažen na enakem področju PTFD (in pri enaki količini dodane vode), zato sklepamo, da v tem primeru ME res nastanejo le pri točno določenem razmerju med posameznimi komponentami sistema.

Od 7.-8. dilucijske linije opazamo povečanje viskoznosti sistemov, v 7. dilucijski liniji v območju 50-70 % dodane vode (v 8. dilucijski liniji pa pri 50-60 % dodane vode). To sta sistema, ki vsebujeta 20-30 % emulgatorja v SMES, pri 10 % vsebnosti emulgatorja (9. dilucijska linija) pa pojav ni več opazen. Že med titracijo z vodo je bila vidna razplastitev sistemov, ki nastanejo v končnih točkah 3.-9. dilucijske linije (10-70 % emulgatorja), po 7 dneh pa ni stabilen noben vzorec (prikazano na sliki 26). Pri 1. in 2. vzorcu smo na vrhu epruvete opazili peno (verjetno večje kapljice – emulzija), pri vzorcih 3-9 pa je dobro vidna ločitev oljne in vodne faze. Pri 9. vzorcu smo opazili nastanek t.i. Windsorjevega sistema (v spodnjem delu epruvete vodna faza, nad njo pa ME in oljna faza).

Področje nastanka ME je pri Capmulu MCM C8 ugodnejše tudi pri SMES z nižjimi koncentracijami emulgatorja (10-30 %), zato smo ga uporabili kot komponento lipidne faze tudi pri izdelavi sistema na osnovi Tween-a 20 v prisotnosti sotpila. Stabilnost sistema s Capmulom MCM C8 se v primerjavi s Capmulom MCM EP sicer ni povečala. Zanimalo nas je, kako na dispergiranje oljne faze Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2/1 v vodi vpliva hidrofilno topilo PEG 400, ki se v SMES pogosto uporablja kot sotpilo. PTFD za sistem (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/PEG 400 prikazuje slika 27.



Slika 27: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/PEG 400, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 28: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/PEG 400 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

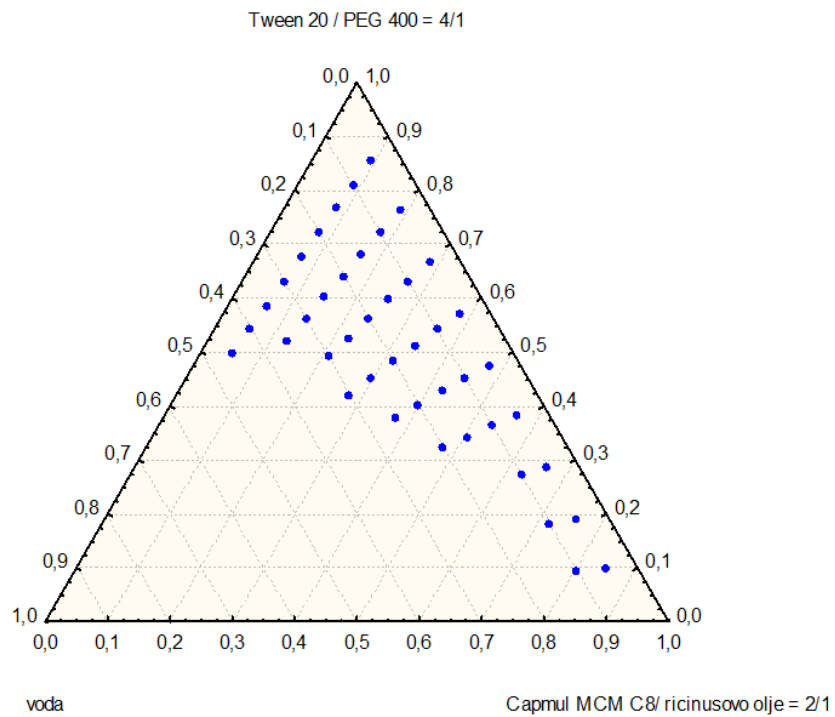
V primerjavi s sistemom z emulgatorjem Tween-om 20, sistem na osnovi so-topila PEG 400 izkazuje drugačen vzorec področij nastanka ME. Pri SMES z visokimi koncentracijami sotopila (80-90 %) se je območje ME precej zmanjšalo, pri 60-70 % sotopila pa povečalo. Zelo izrazito povečanje območja ME smo opazili pri srednjih koncentracijah sotopila (30-

50 %), pri nizkih koncentracijah (10-20 %) pa se to področje precej zmanjša.

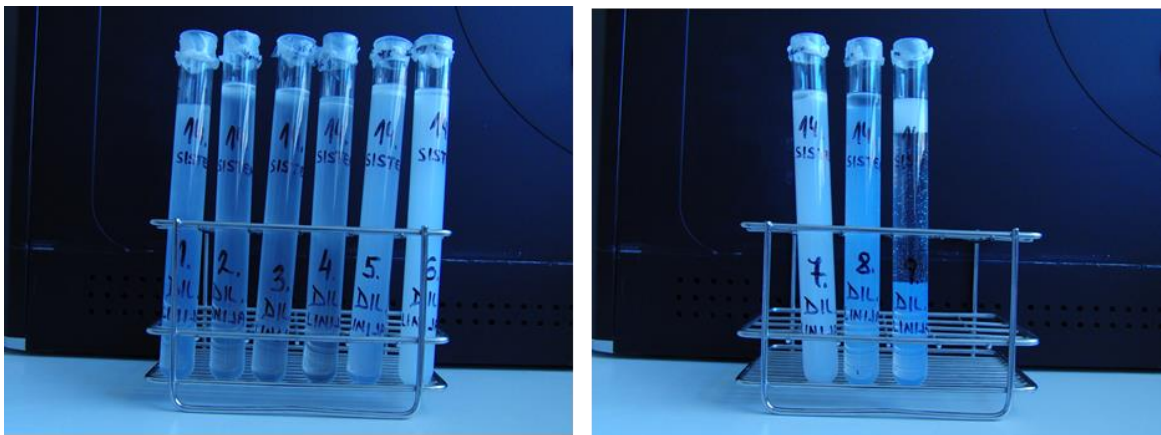
Na področjih, kjer ni nastala emulzija, so se sistemi izredno hitro razplastili. Pri 1. in 2. dilucijski liniji (80-90 % sotopila) smo razplastitev opazili že pri manjšem deležu dodane vode (25 %), pri dilucijskih linijah 3-7 (30-70 % sotopila) so se sistemi razplastili pri 40 % dodane vode, pri 8. in 9. dilucijski liniji (10-20 % sotopila v SMES) pa smo ločevanje faz opazili pri 50 % dodane vode. Ločevanje faz smo opazovali v čaši med postopkom titracije z vodo kot pojav drobnih, nato pa vse večjih kapljic. Nestabilnost omenjenih sistemov je sicer deloma pričakovana, saj je PEG 400 sotopilo in ne emulgator, zato ne zmore ustrezno stabilizirati nastalih emulzij. Stabilnost slednjih je tako v opisanem sistemu odvisna zlasti od Capmul-a MCM C8, ki je glede na kemizem mešani glicerid in s tem emulgator tipa voda-v-olju. Pri redčenju tega sistema tako skoraj zagotovo niso nastale ME, temveč se je oljna faza dispergirala v PEG 400 in vodi (pri sistemih z visoko vsebnostjo slednjega). Stabilnost sistema po 7 dneh pokaže enako – vsi vzorci so se razplastili (prikazano na sliki 28).

Glede na vse rezultate smo se odločili izdelati še kombinacijo sistemov s Tween-om 20 in PEG 400. Slika 29 prikazuje PTFD za sistem (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/(Tween 20:PEG = 4:1).

Če primerjamo ta sistem s sistemom, ki vsebuje le emulgator Tween 20 (slika 25) ugotovimo, da se je v prisotnosti PEG obseg nastanka ME zmanjšal, sistemi pa so se prej razplastili. Kombinacija Tween-a 20 s PEG 400 očitno ni primerna kot emulgatorska faza za sistem, ki kot oljno fazo vsebuje Capmul MCM C8 in ricinusovo olje.



Slika 29: PTFD za sistem Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 : PEG 400 = 4:1, modre točke predstavljajo mikroemulzije.



Slika 30: (Mikro)emulzije, nastale v končni točki razredčitvenih premic 1-9 po titraciji sistema Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1/Tween 20 : PEG = 4:1 z vodo; vsebnost vode je 95 %.

4.2. DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC (MIKRO)EMULZIJ

Po izdelavi PTFD za različne SMES-e smo izbrali vzorce iz zadnje točke razredčitvene premice (95 % dodane vode), ki po 7 dneh hranjenja pri sobni temperaturi niso izkazovali ločitve faz in so bili na videz transparentni ali opalescentni. Izbranim vzorcem smo izmerili velikost kapljic notranje faze na aparatu Zetasizer Nano ZS. Maksimalno število vzorcev za posamezen sistem je tako 9 vzorcev (za vsako razredčitveno premico eden).

V preglednicah so predstavljeni povprečni premeri kapljic (d), polidisperzni indeks (PDI) in natančnejša analiza (v primeru več vrhov je podan povprečni premer kapljic (nm) in njihov delež (%)) za najbolj zastopano velikost kapljic).

4.2.1. Sistemi s Capmulom GMO

Rezultati merjenja velikosti kapljic za sistem (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1) / Cremophor CO 40 so prikazani v preglednici 2, za sistem (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1) / Kolliphor HS 15 v preglednici 3, za sistem (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1) / Cremophor CO 40 v preglednici 4 in za sistem (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1) / Kolliphor HS 15 v preglednici 5.

Preglednica 2: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40.

Dilucijska linija	d (nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	$36,15 \pm 6,66$	$0,31 \pm 0,01$	7,55 nm (84%)
2	$9,06 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,00$	9,58 nm (95%)
3	$9,29 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,00$	1 vrh
4	$39,49 \pm 0,19$	$0,57 \pm 0,01$	8,71 nm (81%)
5	$77,24 \pm 1,30$	$0,38 \pm 0,07$	125,9 nm (91%)

Preglednica 3: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/ Kolliphor HS 15.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	6,52 ± 0,04	0,05 ± 0,01	1 vrh
2	15,38 ± 0,01	0,06 ± 0,00	1 vrh
3	124,2 ± 1,91	0,62 ± 0,01	258,1 nm (83%)
4	107,8 ± 0,92	1 ± 0	550,6 nm (69%)
5	371,4 ± 4,73	0,49 ± 0,01	384,0 nm (68%)

Preglednica 4: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	14,73 ± 0,02	0,06 ± 0,01	1 vrh
2	16,39 ± 0,03	0,08 ± 0,01	1 vrh
3	23,3 ± 0,01	0,31 ± 0,01	1 vrh
4	87,39 ± 3,18	0,39 ± 0,01	146,8 nm (87%)
5	161,4 ± 1,49	0,27 ± 0,01	1 vrh

Preglednica 5: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	13,69 ± 0,06	0,05 ± 0,00	1 vrh
2	31,45 ± 0,20	0,72 ± 0,01	289,7 nm (50%)
3	217,1 ± 3,25	0,3 ± 0,01	297,9 nm (93%)
4	314,8 ± 4,31	0,48 ± 0,00	456,9 nm (86%)
5	1560 ± 137,2	1 ± 0	366,2 nm (86%)

Glede na literaturne podatke lahko kot SMES identificiramo sisteme z velikostjo kapljic pod 100 nm oz. pod 50 nm, kot samo-emulgirajoče sisteme (SES) pa tiste z velikostjo kapljic 100-250 (300) nm.

Med SMES lahko torej uvrstimo naslednje sisteme:

- (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5).
- (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1) /Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8 (dilucijski liniji 1-2)
- (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 (dilucijske linije 1-4)
- (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8 (dilucijski liniji 1-2).

V ostalih vzorcih so (glede na velikost kapljic) nastale emulzije, zato lahko te sisteme opredelimo kot samo-emulgirajoče sisteme (SES). Izjemi sta oba sistema s Kolliphorjem, kjer so v končni točki 5. dilucijske linije nastale večje kapljice.

Polidisperzni indeks (PDI) je merilo homogenosti sistema z mejnimi vrednostmi v območju od $PDI = 0$ (homogen sistem) do $PDI = 1$ (nehomogen sistem). Zaželeno je, da je PDI izbranih sistemov $\leq 0,2$. Glede na to merilo smo kot homogene opredelili naslednje vzorce:

- (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 2:8 in 3:7 (dilucijske linije 2-3)
- (Capmul GMO/ricinusovo olje = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9 in 2:8 (dilucijski liniji 1-2)
- (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9 in 2:8 (dilucijski liniji 1-2)
- (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9 in 2:8 (dilucijski liniji 1-2).

4.2.2. Sistemi s Capmulom MCM EP

Rezultati merjenja velikosti kapljic za sistem (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1) /Cremophor CO 40 so prikazani v preglednici 6, za sistem (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Kolliphor HS 15 v preglednici 7, za sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v preglednici 8 in za sistem (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15) v preglednici 9.

Preglednica 6: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Cremophor CO 40.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	13,47 ± 0,01	0,04 ± 0,00	1 vrh
2	20,69 ± 0,35	0,25 ± 0,01	21,89 nm (93%)
3	17,49 ± 0,07	0,10 ± 0,00	1 vrh
4	38,74 ± 0,26	0,21 ± 0,01	1 vrh
5	146,9 ± 0,85	0,07 ± 0,03	1 vrh
6	686,5 ± 9,41	0,60 ± 0,02	1166 (92%)

Preglednica 7: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1/Kolliphor HS 15.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	13,99 ± 0,06	0,12 ± 0,02	1 vrh
2	14,44 ± 0,11	0,03 ± 0,00	1 vrh
3	21,48 ± 0,10	0,21 ± 0,01	25,14 (97%)
4	19,83 ± 0,01	0,06 ± 0,00	1 vrh
5	34,04 ± 0,27	0,16 ± 0,00	1 vrh

Preglednica 8: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	14,06 ± 0,06	0,09 ± 0,01	1 vrh
2	14,45 ± 0,05	0,03 ± 0,00	1 vrh
3	15,48 ± 0,04	0,05 ± 0,00	1 vrh
4	16,60 ± 0,16	0,05 ± 0,01	1 vrh
5	19,26 ± 0,04	0,05 ± 0,01	1 vrh
6	170,7 ± 5,52	0,61 ± 0,06	400,5 nm (80%)
7	433,5 ± 13,51	0,50 ± 0,03	674,7 nm (84%)

Preglednica 9: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Kolliphor HS 15.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	13,27 ± 0,02	0,09 ± 0,00	1 vrh
2	19,53 ± 0,11	0,20 ± 0,00	1 vrh
3	21,76 ± 0,38	0,22 ± 0,01	25,83 nm (96%)
4	34,83 ± 0,11	0,22 ± 0,01	1 vrh
5	830,5 ± 108,5	0,57 ± 0,02	924,3 nm (62%)

Na osnovi rezultatov, ki so prikazani v preglednicah 7-10 lahko kot SMES (velikost kapljic nastalih (mikro)emulzij je pod 100 oz. 50 nm) opredelimo naslednje sisteme: (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 (dilucijske linije 1-4).

- (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5)
- (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5)
- (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 (dilucijske linije 1-4).

Pri ostalih vzorcih so nastale emulzije z velikostjo kapljic precej nad 250 nm, torej jih ne moremo opredeliti niti kot samo-emulgirajoče sisteme.

Glede na vrednost PDI lahko kot homogene ($PDI \leq 0,2$) opredelimo naslednje sisteme:

- (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5)
- (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5)
- (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 in 5:5 (dilucijske linije 1-5)
- (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Kolliphor HS 15 v razmerjih 1:9, 2:8, 3:7 in 4:6 (dilucijske linije 1-4)

Vsi omenjeni sistemi so bili zelo homogeni (PDI zelo nizek).

4.2.3. Ostali sistemi

Rezultati merjenja velikosti kapljic za sistem (Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 so prikazani v preglednici 10. Iz preglednice 10 je razvidno, da lahko sistem (Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 v razmerju 1:9 in 2:8 opredelimo kot SMES, saj so na obeh dilucijskih linijah nastale ME (velikost kapljic manjša od 100 oz. 50 nm), prav tako nastanek homogenega sistema potrjujeta izmerjeni vrednosti PDI ($PDI \leq 0,2$).

Preglednica 10: Velikost kapljic (mikro)emulzije v zadnji točki razredčitvenih premic sistema Capmul MCM C10/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40.

Dilucijska linija	d(nm)	PDI	Natančnejša analiza
1	13,82 ± 0,04	0,06 ± 0,02	1 vrh
2	14,77 ± 0,04	0,04 ± 0,01	1 vrh

Dvema sistemoma (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20 in (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/PEG 400 nismo izmerili velikosti kapljic, saj ni bila stabilna nobena izmed zadnjih točk razredčitvenih premic (vsi sistemi so se razplastili).

Pri redčenju sistema (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20 je nastala stabilna disperzija v končni točki 1. razredčitvene premice. In sicer je nastala heterogena groba emulzija z velikostjo kapljic $719,7 \pm 163,1$ nm in $PDI = 0,96 \pm 0,06$ (natančnejša analiza = 4475nm (50%)), ki je ne moremo opredeliti niti kot SMES niti kot SES.

Pri redčenju sistema (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/(Tween 20 : PEG 400 = 4:1) je bila prav tako stabilna le disperzija v končni točki 1. razredčitvene premice – nastala je heterogena emulzija z velikostjo kapljic $371,9 \pm 41,58$ in $PDI 0,66 \pm 0,03$ (natančnejša analiza = 287,8 nm (91 %)).

Če povzamemo vse rezultate (velikost kapljic nastale emulzije in PDI), ki so predstavljeni v tem poglavju, lahko kot najboljše opredelimo sisteme s Capmulom MCM EP v oljni fazi, saj omogočijo tvorbo stabilnih ME pri najnižjih (min. 50 %) koncentracijah emulgatorja v SMES.

4.3. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE IN STABILNOSTI KARVEDILOLA

Pri razvoju SMES je treba najprej preveriti raztapljanje in stabilnost učinkovine v izbranih komponentah (lipidih, emulgatorjih, sotoilih), njihovih kombinacijah in v končni fazi tudi v iz njih izdelanih SMES. Zato smo najprej določili nasičeno topnost karvedilola v posameznih komponentah, ki bi jih lahko uporabili za izdelavo SMES, nato pa še solubilizacijsko kapaciteto izbranih SMES. Ker je pomembna tudi stabilnost karvedilola v izbranih komponentah in tudi v SMES, smo vse pripravljene vzorce tudi 4 tedne starali pri sobni oz. povišani temperaturi (40 °C) in jim nato ponovno določili vsebnost karvedilola. Rezultati so povprečje 2 paralelek, zapisali smo jih v obliki % raztopljenega karvedilola, to pomeni mg karvedilola, ki se raztopi v 100 mg izbrane komponente oz. SMES (predstavljeno v preglednicah 11 in 12).

Iz preglednice 11 vidimo, da imajo največjo solubilizacijsko kapaciteto za karvedilol naslednje komponente: PEG, Labrasol, Tween 20, Tween 40 in Tween 80, v katerih se raztopi več kot 100 mg ZU/100 mg posamezne komponente. Karvedilol se najbolje raztaplja v PEG 400, v katerem lahko raztopimo 176 mg karvedilola/100 mg PEG 400 oz. 17,6 mg karvedilola/g PEG 400. Vse snovi z najvišjo solubilizacijsko kapaciteto so emulgatorji in solubilizatorji oz. sotoilo.

Karvedilol se v najmanjšem obsegu raztaplja v Captex-u 355 in zmesi Capmul MCM C10/Captex 355 = 1:2.

Preverili smo tudi solubilizacijsko kapaciteto izbranih SMES za vgradnjo karvedilola in sicer za SMES z razmerjem emulgatorske in oljne faze 8:2 (2. emulgatorska linija) in 6:4 (4. emulgatorska linija). Rezultati določanja nasičene topnosti in stabilnosti karvedilola v izbranih sistemih so predstavljeni v preglednici 13. Največjo solubilizacijsko kapaciteto izkazujejo sistemi (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/(Tween 20 : PEG = 4:1), (Capmul MCM EP/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20 in (Capmul MCM C8/ricinusovo olje = 2:1)/Tween 20. V vseh primerih imajo SMES 8:2 (2. linija) večjo kapaciteto za raztapljanje karvedilola kot SMES z razmerjem emulgatorske in oljne faze 6:4 (4. linija). To je tudi v skladu s topnostjo karvedilola v posameznih komponentah, saj se je učinkovina bistveno bolje raztapljala v emulgatorjih kot v komponentah oljne faze.

Preglednica 11: Nasičena topnost karvedilola (v mg ZU/g komponente) pri sobni temperaturi in stabilnost kavedilola v izbranih sistemih po 4 tednih staranja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) oz. povišani temperaturi (40 °C) (podana kot % vsebnosti kavedilola glede na nasičeno topnost določeno ob času $t = 0$).

Pogoji shranjevanja vzorcev		25 °C	40 °C
Čas določanja vsebnosti karvedilola	t = 0	t = 4 tedni	t = 4 tedni
Sestavine oz. zmes sestavin	Nasičena topnost (mg ZU / 100 mg)	% glede na t = 0	% glede na t = 0
Capmul MCM EP : Captex 355 = 2 : 1	19,7	54,3	25,8
Capmul MCM C8 : Captex 355 = 2 : 1	23,6	56,5	24,3
Capmul MCM C10 : Captex 355 = 1 : 2	6,4	57,4	24,9
Cremophor CO 40 : ricinusovo olje = 2 : 1	56,7	94,6	89,4
Kolliphor HS 15 : ricinusovo olje = 2 : 1	49,6	86,2	81,6
Capmul GMO : ricinusovo olje = 1 : 1	14,2	66,4	32,7
Capmul MCM EP : ricinusovo olje = 2 : 1	24,1	58,9	28,7
Captex 355	1,7	90,9	91,0
Cremophor EL	95,0	93,9	90,0
Ricinusovo olje	9,6	85,6	65,7
Labrasol	120,9	90,7	80,8
PEG	176,1	94,9	93,7
Tween 20	118,3	95,4	92,3
Tween 40	102,3	95,7	91,3
Tween 80	100,9	94,6	91,5
Span 80	41,1	89,8	68,6
Tween 85	69,0	92,3	87,0
Peceol	17,4	73,5	33,6

Iz preglednice 12 vidimo, da se količina raztopljenega ZU v posameznih komponentah SMES s časom znižuje tako v primeru shranjevanja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) kot tudi pri povišani temperaturi (40 °C). To kaže, da kemijska stabilnost karvedilola v izbranih SMES ni najboljša.

Preglednica 12: Nasičena topnost karvedilola (v mg ZU/g SMES) pri sobni temperaturi in stabilnost kavedilola v izbranih SMES po 4 tednih staranja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) oz. povišani temperaturi (40 °C) (podana kot % vsebnosti kavedilola glede na nasičeno topnost določeno ob času $t = 0$). Številki 2 in 4 ob sestavi SMES pomenita 2. linijo (80 % emulgatorja, 20 % oljne faze) in 4. linijo (60 % emulgatorja, 40 % oljne faze).

Pogoji shranjevanja vzorcev		25 °C	40 °C
Čas določanja vsebnosti karvedilola	t = 0	t = 4 tedni	t = 4 tedni
SMES	Nasičena topnost (mg ZU / 100 mg)	% glede na t = 0	% glede na t = 0
Capmul MCM EP/ricinusovo olje (2 : 1)/Cremophor CO 40 (2)	92,8	99,0	92,3
Capmul MCM EP/ricinusovo olje (2 : 1)/Cremophor CO 40 (4)	73,0	94,2	79,3
Capmul MCM EP/Captex 355 (2 : 1)/Cremophor CO 40 (2)	94,4	99,5	93,3
Capmul MCM EP/Captex 355 (2 : 1)/Cremophor CO 40 (4)	69,5	93,5	82,1
Capmul MCM C8/ricinusovo olje (2 : 1)/Tween 20 (2)	105,1	98,1	89,5
Capmul MCM C8/ricinusovo olje (2 : 1)/Tween 20 (4)	78,1	94,7	74,0
Capmul MCM C8/ricinusovo olje (2 : 1)/(Tween 20 : PEG = 4: 1) (2)	119,3	98,0	90,6
Capmul MCM C8/ricinusovo olje (2 : 1)/(Tween 20 : PEG = 4: 1) (4)	91,4	94,3	76,4
Capmul GMO/Captex 355 (2 : 1)/Cremophor CO 40 (2)	83,3	99,2	91,6
Capmul GMO/Captex 355 (2 : 1)/Cremophor CO 40 (4)	61,6	95,0	81,7
Capmul GMO/ricinusovo olje (2 : 1)/Cremophor CO 40 (2)	86,4	101,0	92,7
Capmul GMO/ricinusovo olje (2 : 1)/Cremophor CO 40 (4)	64,8	95,3	83,7
Capmul MCM EP/ricinusovo olje (2 : 1)/Tween 20 (2)	105,2	96,8	90,0
Capmul MCM EP/ricinusovo olje (2 : 1)/Tween 20 (4)	81,4	92,5	74,9

Shranjevanje izbranih komponent in njihovih zmesi pri sobni temperaturi (25 °C) in povišani temperaturi (40 °C)

Po 4 tednih staranja vzorcev izkazuje karvedilol najboljšo stabilnost v emulgatorjih/solubilizatorjih (Tween 40, Tween 20, PEG 400, Tween 80 in v zmesi Cremophor CO 40/ricinusovo olje = 2:1) (Preglednica 11). V vseh opisanih primerih je vsebnost karvedilola še vedno ~95 %. Karvedilol je nekoliko v nasprotju s pričakovanji najmanj stabilen v lipidni komponenti Captex 355 ter v njegovih zmesih. Tudi po 4 tednih staranja vzorcev pri povišani temperaturi (40 °C) izkazujejo najboljšo stabilnost karvedilola (> 90 %) komponente PEG 400, Tween 20, Tween 80 in Tween 40. Najnižjo stabilnost (< 30 %) smo določili pri sistemih s Capmulom MCM (Capmul MCM C8 < Capmul MCM C10 < Capmul MCM EP).

Shranjevanje izbranih SMES pri sobni temperaturi (25 °C) in povišani temperaturi (40 °C)

Koncentracija karvedilola v posameznih SMES-ih se prav tako s časom znižuje, in sicer tako med shranjevanjem vzorcev pri sobni kot tudi pri povišani temperaturi.

Po 4 tednih staranja vzorcev pri sobni temperaturi (25 °C) je karvedilol najbolj stabilen (> 99 %) v naslednjih SMES (z razmerjem emulgatorjev in oljne faze 8:2; 2. linija): (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40 in (Capmul GMO/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40. Pri nobenem sistemu pa vsebnost karvedilola ni padla pod 90%.

Po 4 tednih staranja SMES pri povišani temperaturi (40°C) je vsebnost karvedilola ostala visoka (> 90 %) v vseh SMES z razmerjem emulgatorjev in oljne faze 8:2 (2. linija), z izjemo sistemov, ki imajo kot emulgator le Tween 20 (brez sotpila PEG). Z vidika stabilnosti karvedilola se je kot najboljši izkazal SMES (Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1)/Cremophor CO 40.

5. SKLEPI

- V diplomskem delu smo izdelali 13 različnih samo-mikroemulgirajočih sistemov (SMES). Izmenično smo spreminjali sestavo oljne faze in emulgatorja ter spremljali njun vpliv na obseg nastanka ME ter njihovo stabilnost. Vsi sistemi, ki smo jih opredelili kot ME, so bili stabilni vsaj 24 ur, mnogi pa tudi 7 dni in več. Stabilnim ME smo po 7 dneh pomerili velikost kapljic, ki naj bi bila v območju 50-100 nm. Kapljice naj bi bile čimbolj enakomernih velikosti ($PDI < 0,2$), izgled sistemov pa transparenten ali opalescenten. V primeru zamotnitve vzorca so verjetno nastale emulzije.
- ME smo ocenjevali iz vidika področja in obsega nastanka ME. Zelo ugodno območje nastalih ME smo opazili pri Capmulu GMO ter še boljše pri Capmulu MCM EP (vendar so takšni SMES-i manj stabilni). Dodatek Cremophorja CO 40 je omogočil nastanek ME v najširšem področju PTFD, Kolliphor HS 15 pa je to področje opazno zmanjšal.
- Pri spreminjanju oljne faze smo ugotovili, da je ricinusovo olje boljše izbira kot Captex 355 glede obsega, predvsem pa glede področja nastanka ME, ki nastanejo tudi pri nižjih koncentracijah emulgatorja v SMES. Dodatek emulgatorja Tween 20 zagotovi nekoliko večji nastanek ME, vendar je sistem problematičen zaradi nizke stabilnosti. Dodatek PEG 400 ni ugoden, saj le dispergira PEG v oljni fazi, ME pa ne nastajajo. Ko smo Capmul MCM EP zamenjali s Capmulom MCM C8 ali MCM C10, smo opazovali nastanek ME pri nižjih koncentracijah emulgatorja v SMES, vendar so bili ti SMES-i manj stabilni (hitrejša razplastitev).
- Velikost kapljic ME je 50-100 nm (podatki iz literature). Capmul GMO tvori ME v večjem obsegu PTFD, če je emulgator Cremophor CO 40, pri Capmulu MCM EP pa izbira emulgatorja ni pomembna. Vrednost $PDI < 0,2$ nam opredeli nastanek homogene ME, ki nastane pri visokih vrednostih emulgatorja (vsaj 80 %) v primeru Capmula GMO. Pri Capmulu MCM EP so vrednosti emulgatorjev lahko nižje (vsaj 50 %), kar je precej ugodnejše.

- Največjo solubilizacijsko kapaciteto za karvedilol smo določili za PEG 400, Tween 20, Tween 40 in Tween 80 ter SMES-e, ki imajo v svoji sestavi enega od Tweenov ali PEG 400. Na splošno imajo 2. linije višjo solubilizacijsko kapaciteto od 4. linij istega sistema.
- Koncentracija učinkovine v proučevanih vzorcih s časom pada in sicer tako v vzorcih, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi (25 °C) kot tudi v vzorcih, shranjevanih pri povišani temperaturi (40 °C). SMES-i, ki so ohranili 90 % raztopljenih ZU (sistema Capmul MCM EP/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40 in Capmul GMO/Captex 355 = 2:1/Cremophor CO 40), so stabilni in primerni za vgrajevanje ZU.

6. LITERATURA

1. Akula S., Gurram A. K., Devireddy S. R.: Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems : An Attractive Strategy for Enhanced Therapeutic Profile. *International Scholarly Research Notices*; Volume 2014; 2014; 1-11.
2. Kawabata Y., Wada K., Nakatani M., Yamada S., Onoue S.: Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*; 420; 2011; 1-10.
3. Zvonar A., Gašperlin M., Kristl J.: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik*; 59; 2008; 237-284.
4. Kalepu S., Manthina M., Padavala V.: Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*; 3(6); 2013; 361-372.
5. Kuentz M.: Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discovery Today: Technologies / Formulation technologies to overcome poor drug-like properties*; Vol. 9; No. 2 2012; 97-104.
6. Charman W. N., Porter C. J., Mithani S., Dressman J. B.: Physiochemical and physiological mechanisms for the effect of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 86; 1997; 269-282.
7. Winstanley P. A., Orme M. L. E.:The effects of food on drug bioavailability; *Br. J. Clin. Pharmacol*; 28; 1989; 621-628.
8. Feeney O. M., Crum M. F., McEvoy C. L., Trevaskis N. L., Williams H. D., Pouton C.W., Charman W. N., Bergström C. A. S., Porter C. J. H.: 50 years of oral lipid-based formulations : Provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 101; 2016; 167-194.
9. Pouton C. W.: Lipid formulations for oral administrations of drugs : non-emulsifying, self-emulsifying and ‘self-microemulsifying’ drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 11; Suppl. 2; 2000; S93-S98.
10. Pouton C. W., Porter C. J. H.: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration : Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 60; 2008; 625-637.
11. Müllertz A., Ogbonna A., Ren S., Rades T.: New perspectives on lipid and surfactant

based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 62; 2010; 1622-1636.

12. Chen M.-L.: Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development : A regulatory perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 60; 2008; 768-777.

13. Desai P. P., Date A. A., Patravale V. B.: Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – opportunities and limitations. *Drug Delivery Today: Technologies / Formulation technologies to overcome poor drug-like properties*; Vol. 9; No. 2; 2012; 87-95.

14. Date A. A. et al.: Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine*; 5; 2010; 1595-1616.

15. Rao S., Tan A., Thomas N., Prestidge C. A.: Perspective and potential of oral lipid-based delivery to optimize pharmacological therapies against cardiovascular diseases. *Journal of Controlled Release*; 193; 2014; 174-187.

16. Rozman B., Bogataj M.: Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo. *Farmacevtski vestnik*; 57; 2006; 189-195.

17. Bummer P. M.: Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery – solid lipid nanoparticles. *Crit. Rev. Ther. Drug carr. Syst.*; 21; 2004; 1-19.

18. Rao S., Tan A., Thomas N., Prestidge C.A.: Perspective and potential of oral lipid-based delivery to optimize pharmacological therapies against cardiovascular diseases. *Journal of Controlled Release*; Volume 193; 2014; 174-187.

19. Singh. B., Singh R., Bandyopadhyay S., Kapil R., Garg B.: Optimized nanoemulsifying systems with enhanced bioavailability of carvedilol. *Colloides and Surfaces B: Biointerfaces*; 101; 2013; 465-474.

20. Palazzuoli A., Calabria P., Verzuri M. S., Auteri A.: Carvedilol: something else than a simple betablocker? *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 6; 2002; 115-126.

21. Glavni urednik Robert Berkow, pomočnik urednika Mark H. Beers, urednik Andrew J. Fletcher: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002, 121-130.

22. Obreza A., Bevc B., Baumgartner S., Sollner Dolenc M., Humar M.: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu, Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije, e-knjiga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana,

2015, 24-249.

23. http://www.gopharm.si/varnostni_listi/zdravila/CL-7334-1L%2008001-79-4.pdf
(dostopano 13.7.2016)

24. http://www.abiteccorp.com/wp-content/files_mf/1309521057ABITEC_PharmaBrochure_Web_FP_sm.pdf (dostopano 13.7.2016)

25. <http://www.abiteccorp.com/product-lines/captex> (dostopano 13.7.2016)

26. <https://doc.chemipan.org/home/images/chemipan/document/product/certificate/CC/CC0308-Cremophor%20RH40/CC0308-SPEC-Cremophor-RH40.pdf> (dostopano 13.7.2016)

27. http://www.rumapel.com.ar/pharma_excipientes/ficha_tecnica/Kolliphor_HS_15.pdf
(dostopano 24.9.2016)

28. https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol (dostopano 27.8.2016)

29. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p9416pis.pdf (dostopano 27.8.2016)

30. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1504?lang=en®ion=SI>
(dostopano 27.8.2016)

31. https://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80 (dostopano 27.8.2016)

32. <http://www.malvern.com/es/Assets/MRK1839.pdf> (dostopano 27.8.2016)

33. Šifrar S.: Proučevanje tipa mikroemulzij z metodo DSC in ugotavljanje vpliva vgradnje ketoprofena, Diplomaska naloga, Ljubljana, 2005, 6-7.

34. Swabrick J., Boylan J. C.: Microemulsions. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Volume 9, New York: Marcel Dekker Inc., 1994, 375-421.

35. <https://www.google.si/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Span+and+Tween+Croda> (dostopano 24.9.2016)

36. Čerpnjak K., Zvonar A., Vrečer F., Gašperlin M.: Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharmaceutica*; 63; 2013; 427-445.

37. Bolko K., Zvonar A., Gašperlin M.: Mixed lipid phase SMEDDS as an innovative approach to enhance resveratrol solubility. *Drug Dev. Ind. Pharm.*; 40(1); 2014; 102-109.