

KAZALO VSEBINE

1. POVZETEK	3
2. ABSTRACT	5
3. SEZNAM OKRAJŠAV	8
4. UVOD	9
4.1 STRUKTURE V VEČKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMIH	9
4.1.1 Mikroemulzije	11
4.1.2 Tekoči kristali (mezofaze)	13
4.1.3 Bikontinuirane strukture	14
4.1.4 Miceli	14
4.1.5 Samo(mikro)emulgirajoči sistemi (S(M)ES)	14
4.2 KOŽA KOT TARČNI ORGAN DERMALNIH IZDELKOV	15
4.2.1 Zgradba kože	15
4.2.2 Dermalna in transdermalna dostava učinkovin	16
4.2.3 Mikroemulzije in tekoči kristali kot novejši dermalni dostavni sistem	19
4.3 ASKORBILPALMITAT IN NJEGOVA ANTIOKSIDATIVNA VLOGA	22
4.3.1 Ultravijolično sevanje in vpliv na kožo	22
4.3.2 Obrambni mehanizem telesa pred škodljivimi učinki radikalov	23
4.3.3 Učinki askorbinske kisline na koži	24
4.3.4 Askorbilpalmitat	25
5. NAMEN DELA	27
6. MATERIALI IN METODE	28
6.1 MATERIALI	28
6.2 METODE	32
6.2.1 Izdelava večkomponentnega faznega diagrama	32
6.2.2 Merjenje viskoznosti	33
6.2.3 Priprava nosilnih sistemov z AP	34
6.2.3.1 Določanje maksimalnega deleža AP v nosilnih sistemih	35
6.2.3.2 Spremljanje stabilnosti AP v nosilnih sistemih	35
6.2.3.2.1 Določanje vsebnosti AP v nosilnih sistemih s HPLC metodo	36
6.2.4. In vitro vrednotenje sproščanja in permeacije AP iz nosilnih sistemov	38
6.2.4.1 Sproščanje AP iz izbranih nosilnih sistemov preko umetne membrane	38
6.2.4.2 Permeabilnost AP iz izbranih nosilnih sistemov skozi kožo prašičjega uhlja	40

7. REZULTATI IN RAZPRAVA	41
7.1 IZDELAVA VEČKOMPONENTNEGA FAZNEGA DIAGRAMA	41
7.2 VREDNOTENJE NASTALIH KOLOIDNIH SISTEMOV	43
7.2.1 Določanje maksimalnega deleža vgrajenega AP v nosilnih sistemih	44
7.2.2 Določanje viskoznosti.....	45
7.2.3 Stabilnost AP	52
7.3 PREHOD AP V/SKOZI KOŽO	55
7.3.1 Izbira ustreznega receptorskega medija	56
7.3.2 Sproščanje AP skozi umetne membrane v izbrane receptorske medije	59
7.3.3 Permeabilnost AP skozi kožo prašičjega uhlja	66
8. SKLEP	70
9. VIRI IN LITERATURA	72
10. PRILOGA	75

1. POVZETEK

Mikroemulzije (ME) in tekoči kristali (TK) so novejši koloidni nosilni sistemi, ki izkazujejo ugodne lastnosti za dermalno dostavo vgrajenih učinkovin. ME odlikuje njihova termodinamska stabilnost, spontan nastanek in velika sposobnost solubilizacije učinkovin. Lamelarni TK pa zaradi visoke viskoznosti in strukturne podobnosti z intercelularnimi lipidi v epidermisu omogočajo povečano mobilnost, sproščanje in permeacijo učinkovine brez ireverzibilnih sprememb kože. Zaradi omenjenih prednosti smo ME in TK izbrali kot nosilni sistem za vgradnjo lipofilnega derivata vitamina C, askorbilpalmitata (AP).

Namen diplomskega dela je razvoj novih sistemov za dermalno dostavo AP in vrednotenje prehoda AP iz koloidnih sistemov v/skozi kožo.

Kot netoksične in biokompatibilne sestavine za izdelavo koloidnih sistemov smo uporabili izopropilmiristat kot oljno fazo, lecitin in Tween[®] 80 kot emulgatorja, butanol kot koemulgator ter bidestilirano vodo. Področja nastanka ME smo določili z izdelavo večkomponentnega faznega diagrama s titracijsko metodo. Za nadaljnje vrednotenje smo izbrali koloidne sisteme dilucijske linije v sestavi: 60 % emulgatorske in koemulgatorske zmesi v razmerju 1:1 in 40 % lipofilne faze, ki ji ustreza tudi sestava predhodno razvitih TK. Tako smo se osredotočili na SMES-e (samomikroemulgirajoče sisteme), V/O ME, TK, O/V ME in E (emulzije). V nastale potencialne nosilne sisteme smo vgradili AP v koncentraciji 1 m/m % in v maksimalnem deležu značilnem za posamezni sistem. Ugotovili smo, da je največ lipofilnega AP mogoče vgraditi v sistem z največjim deležem lipofilne faze, to so SMES-i, V/O ME in TK. Z rezultati meritev viskoznosti smo ugotovili, da se viskoznost preiskovanih sistemov povečuje z višanjem deleža PAS (površinsko aktivnih snovi) in vode. Potrdili smo tudi temperaturno odvisnost viskoznosti izbranih nosilnih sistemov. Bistveno višja viskoznost TK v primerjavi z ostalimi sistemi je posledica tvorbe vodikovih vezi med vodo in hidrofilno glavo fosfatidilholina, ki začne nabrekati in konsistenca se poveča. Zmanjšanje viskoznosti TK z naraščanjem temperature pa si razlagamo na dva načina, in sicer kot posledico faznega prehoda: gel – tekoče kristalno in izhlapevanja vode. Ugotovili smo, da 1 m/m % AP vgrajenega v SMES-e in V/O ME bistveno ne vpliva na viskoznost sistema, medtem ko jo maksimalni delež AP občutno poveča. Z vgraditvijo AP v TK pa se je viskoznost le-teh zmanjšala, in sicer z 1 m/m % AP bolj kot pa z vgrajenim maksimalnim deležem.

S študijo stabilnosti smo proučevali vpliv nosilnega sistema in začetne koncentracije na stabilnost AP. Ugotovili smo, da obseg razgradnje AP narašča z večanjem deleža hidrofilne faze in je manjši v sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem AP.

Z *in vitro* študijami sproščanja AP skozi umetno membrano smo ugotovili, da je obseg sproščanja AP odvisen od hidro-lipofilnih lastnosti receptorskega medija, nosilnega sistema in njegove viskoznosti ter AP in njegove koncentracije. Največ AP se je tako sprostilo iz lipofilnih nosilnih sistemov nizke viskoznosti z vgrajenim maksimalnim deležem AP.

V raziskavah prehoda AP v/skozi kožo, ki smo jih izvedli *in vitro* z modelom prašičje kože, smo ovrednotili medsebojne interakcije nosilnih sistemov in učinkovine s kožo ter ugotavljali njihov vpliv na prehod AP. Permeabilnost AP se razlikuje od vrste uporabljenega nosilnega sistema in količine vgrajenega AP. Lamelarna struktura TK omogoča povečano difuzijo in perkutano absorpcijo AP, povečana permeacija je prav tako opazna pri nosilnih sistemih z manjšim deležem hidrofilne faze. Razlog je v večji sposobnosti solubilizacije AP in posledično večjemu koncentracijskemu gradientu.

Na osnovi eksperimentalno dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so ME s svojo termodinamsko stabilnostjo, spontanim nastankom in zmožnostjo povečanja solubilizacije, obsega in hitrosti prehoda lipofilnega AP skozi kožo, skupaj z lamelarnimi TK z ugodno konsistenco in prostorsko ureditvijo, potencialni dermalni dostavni sistem za AP in si zaslužijo posebno mesto na trgu dermalnih izdelkov.

2. ABSTRACT

Microemulsions and liquid crystals are novel colloidal carrier systems which demonstrate favourable characteristics for dermal delivery of incorporated active substances. Microemulsions are distinguished for their thermodynamic stability, spontaneous existence and high solubilizing power of active substances. However, lamellar liquid crystals, on the account of high viscosity and structure similarity with intercellular lipids within the epidermis enable an augmented mobility, release and permeation of active substance without irreversible skin changes. Owing to these advantages, we chose the microemulsions and liquid crystals as carrier systems for incorporation of lipophilic vitamin C derivative, ascorbyl palmitate.

The purpose of this diploma work was to develop new systems for dermal delivery of the ascorbyl palmitate and the evaluation of the ascorbyl palmitate ability to permeate from colloidal systems into/through the skin.

As atoxic and biocompatible constituents for the generation of colloidal systems we used isopropylmyristate as the oil phase, lecithin and Tween[®] 80 as surfactants, butanol as cosurfactant and bidistilled water. The areas of microemulsion existence were determined by designing a multi-component phase diagram with the titration method. For further evaluation we chose colloidal systems of the dilution line, consisting of: 60% surfactant and cosurfactant's composition in the ratio 1:1 and 40% of the lipophilic phase to which the structure of previously developed liquid crystals corresponds, too. Thus we focused on the SMES's (Self Micro-Emulsifying Systems), w/o microemulsions, liquid crystals, o/w microemulsions and emulsions. The ascorbyl palmitate in the concentration of 1 m/m % and in the maximum share typical of the particular system was incorporated into the emerged potential carrier systems. We ascertained that the most of lipophilic ascorbyl palmitate can be incorporated into the system that bears the maximum share of the lipophilic phase, i.e. the SMES's, w/o microemulsions and liquid crystals. Viscosity measurements gave us the results to establish that the viscosity of investigated systems increases when the share of the SAM (Surface Active Matter) and water augments. We also confirmed the temperature dependency from the viscosity of selected carrier systems. An essentially higher viscosity of liquid crystals compared to other systems is a consequence of the formation of hydrogen ties between water and the hydrophilic head of

the phosphatidylcholine, which starts to swell (up) and the consistence increases. The decline in the viscosity of liquid crystal resulting from the rising temperature can be explained in two different ways, namely as a consequence of the phase transition: gel – liquid crystal, and the evaporation of water. We established that 1 m/m % of ascorbyl palmitate incorporated into the self emulsifying systems (SMES) and w/o microemulsions did not affect the system viscosity, while on the other hand, the maximum share of ascorbyl palmitate increases the viscosity considerably. However, by incorporating the ascorbyl palmitate into liquid crystals the viscosity decreased, namely with 1 m/m % of ascorbyl palmitate more than with the maximum share incorporated.

The study of stability aimed to investigate the impact of carrier system and the initial concentration on the stability of ascorbyl palmitate. We ascertained that the extent of decomposition of the ascorbyl palmitate increases by augmenting the portion of the hydrophilic phase and is lower in the systems incorporating the maximum share of the ascorbyl palmitate.

The *in vitro* studies on the release of ascorbyl palmitate through the artificial membrane led us to the finding that the extent of the ascorbyl palmitate release depends on the hydro-lipophilic properties of the receptor medium, carrier system and its viscosity, and on the ascorbyl palmitate and its concentration. The highest concentration of the ascorbyl palmitate released from the lipophilic carrier systems that had a lower viscosity and the maximum share of ascorbyl palmitate incorporated.

In the studies concerning the permeation of the ascorbyl palmitate into/through skin, which was implemented *in vitro* with the porcine skin model, we evaluated the mutual interactions between carrier systems and active substance with the skin and we evaluated their impact on the ascorbyl palmitate permeation. The permeability of ascorbyl palmitate is distinguished according to the applied carrier system and the quantity of ascorbyl palmitate incorporated. The lamellar structure of liquid crystal enables augmented diffusion and percutaneous absorption of the ascorbyl palmitate, and the increased permeation is also perceivable in carrier systems with a lower portion of the hydrophilic phase. The reason lies in a higher capacity of the ascorbyl palmitate solubilization and consequentially, in a higher concentration gradient.

On the basis of experimental results we may conclude that microemulsions with their thermodynamic stability, spontaneous existence and capacity to increase the solubilization, the extent and speed of lipophilic ascorbyl palmitate permeation through the skin, together

with lamellar liquid crystals with a favourable consistence and spatial structure, are a potential dermal delivery system for ascorbyl palmitate and deserve a particular place on the market of dermal products.

3. SEZNAM OKRAJŠAV

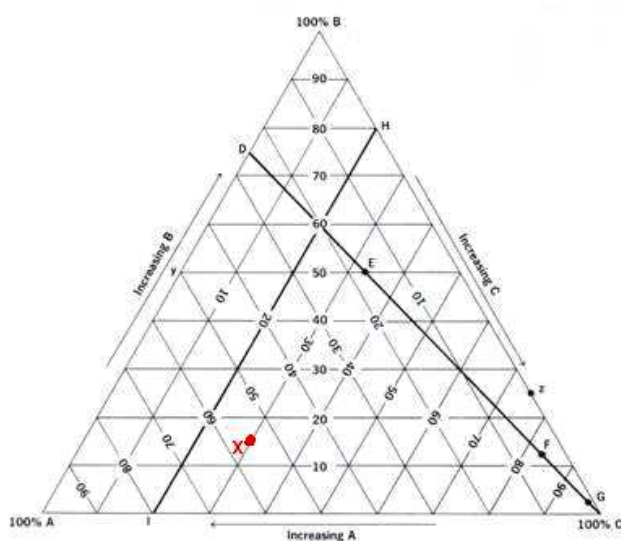
AP	askorbilpalmitat
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E	emulzija, makroemulzija
Em+KoEm	zmes emulgatorja in koemulgatorja
IPM	izopropilmiristat
ME	mikroemulzija
O/V	mikroemulzije tipa olje v vodi, hidrofilne mikroemulzije
PAS	površinsko aktivna snov
RM	receptorski medij
ROS	reaktivne kisikove spojine
SDS	natrijev lavrilsulfat
SMES	samomikroemulgirajoči sistem
TK	tekoči kristali
UV	ultravijolično
V/O	mikroemulzije tipa voda v olju, lipofilne mikroemulzije

4. UVOD

4.1 STRUKTURE V VEČKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMIH

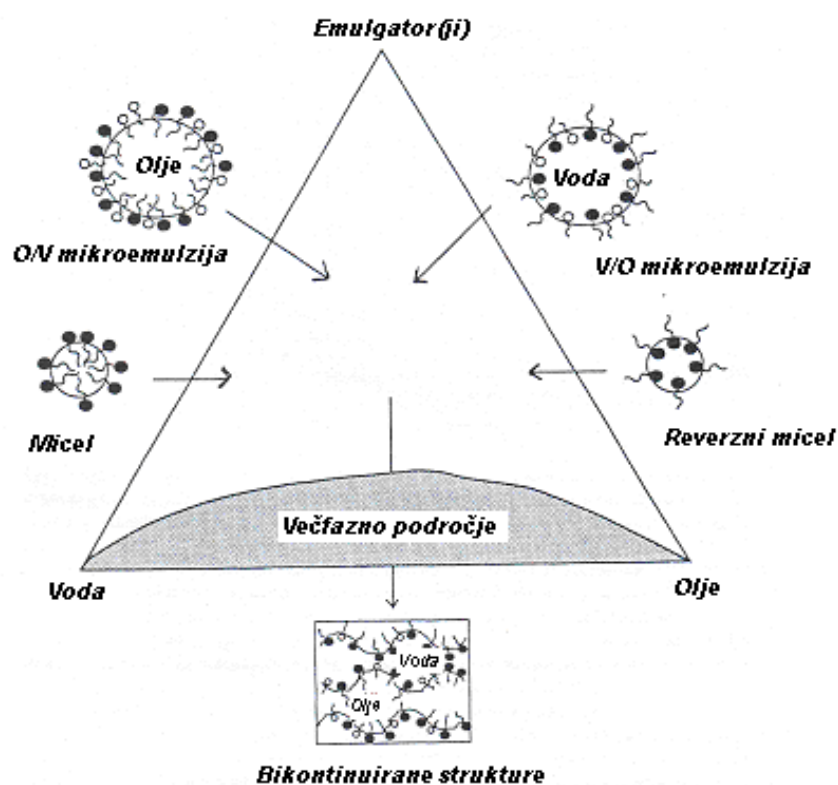
Fazni diagram omogoča grafično ponazoritev različnih faz, ki so definirane kot homogeni deli heterogenega sistema, faza pa je lahko sestavljena iz ene ali več komponent.

Za opis štirikomponentnega sistema (olje, voda, emulgator in koemulgator) bi potrebovali fazni diagram v obliki tetraedra, v katerem vsako oglišče predstavlja eno od komponent, robovi tetraedra pa zmesi dveh komponent. Ponavadi pa fazni diagram poenostavimo tako, da konstruiramo planarni fazni diagram v obliki enakostraničnega trikotnika. To storimo tako, da ohranjamo eno komponento ves čas konstantno, ali pa dve komponenti (navadno emulgator in koemulgator) združimo v konstantnem razmerju. Vsako oglišče predstavlja 100% ene od komponent. Stranice trikotnika predstavljajo zmesi dveh komponent (AB, AC oz. BC). Površina znotraj trikotnika predstavlja vse možne kombinacije treh komponent A, B in C. Vzporednice stranici AB predstavljajo sisteme s konstantnim deležem komponente C. Delež le-te narašča od 0% na stranici AB, do 100% na samem oglišču C. V točki x na sliki 1 lahko tako odčitamo delež komponente C s pomočjo vzporednice stranici AB, ki teče skozi točko x in je ekvivalentna 30% C oz. 70% A in B skupaj. Analogno lahko odčitamo vsebnost komponente A s pomočjo vzporednic stranici BC oz. vsebnost komponente B s pomočjo vzporednic stranici AC (1).



Slika 1: Interpretacija planarnega trikomponentnega faznega diagrama (1).

Z izdelavo faznega diagrama lahko s kombinacijami različnih sestavin (oljne in vodne faze ter emulgatorja in koemulgatorja), odvisno od fizikalno kemijskih lastnosti in koncentracije posamezne sestavine, temperature ter tlaka, ugotovimo področja nastanka številnih možnih asociacijskih struktur (2). V splošnem velja, da mikroemulzije, tekoči kristali in bikontinuirane faze nastanejo pri visokih koncentracijah površinsko aktivnih snovi (PAS). Ob odsotnosti olja pa se PAS pri dovolj veliki koncentraciji urejajo v micle. V prisotnosti oljne in vodne faze ter nizke koncentracije PAS pa prevladuje nastanek makroemulzij (2,3). Večina avtorjev pa uvršča med mikroemulzije tudi samo(mikro)emulgirajoče sisteme (S(M)ES).



Slika 2: Sistemi, ki se pojavijo, ko pomešamo olje, vodo in površinsko aktivne snovi v različnih razmerjih (2).

4.1.1 MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije (ME) so koloidni nosilni sistemi, razviti z namenom nadzorovane dostave vgrajenih učinkovin. Po definiciji so ME termodinamsko stabilne, nizko viskozne, optiĉno izotropne disperzije dveh tekoĉin (olja in vode), ki se med sabo ne mešata, stabilizirane z emulgatorskim filmom na medfazi. Vsebujejo lahko samo enega ali veĉ emulgatorjev kakor tudi druge dodatke (2).

ME imajo zelo nizko medfazno napetost, katere posledica je spontan nastanek, termodinamiĉna stabilnost in majhna velikost struktur dispergirane faze. Nizko medfazno napetost ($<0,6 \text{ mNm}^{-1}$), ki poveĉa stabilnost sistema, dosežemo z ustrezno izbiro emulgatorja in koemulgatorja, ki tvorita gibljiv film okrog kapljic in imata ustrezne hidro-lipofilne lastnosti (2, 3).

Velikost podroĉij dispergirane faze je manjša od 140 nm, zato ME šibko sipljejo svetlobo, kar jim daje prozoren ali opalescenten izgled. Zaradi majhne velikosti podroĉij notranje faze je medfazna površina v ME zelo velika (1, 2).

Transparentnost, spontan nastanek in termodinamiĉna stabilnost so karakteristike, ki loĉijo ME od emulzij (makroemulzij). Ostale razlike med ME in emulzijami so podane v preglednici I.

Preglednica I: Primerjava lastnosti mikroemulzij in emulzij.

	Mikroemulzije	Emulzije
Spontan nastanek	Da	Ne
Termodinamiĉna stabilnost	Da	Ne
Izgled	Prozoren do opalescenten	Moten
Velikost dispergirane faze	$< 0.2 \mu\text{m}$	$0.5 - 5 \mu\text{m}$
Koncentracija PAS	$> 10 \%$	$1 - 20 \%$
Uporaba koemulgatorja	Da	Ne
Koncentracija dispergirane faze	$1 - 30 \%$	$1 - 30 \%$
Viskoznost	Nižja	Višja
Elektriĉna prevodnost	Nižja	Višja

Glede na hidro-lipofilne lastnosti zunanje faze loĉimo dva osnovna tipa ME. Hidrofilne (O/V) ME vsebujejo oljna podroĉja, obdana z emulgatorskim filmom v kontinuirani vodni

fazi. V lipofilnih (V/O) ME pa se področja vodne faze nahajajo v kontinuirani oljni fazi (2).

Sestavine za izdelavo ME morajo zadostovati kriterijem netoksičnosti ter sposobnosti tvorbe kakovostnih ME kot nosilnih sistemov za optimalno učinkovitost na tarčnem mestu. Najpogosteje uporabljane sestavine za izdelavo peroralnih, parenteralnih in dermalnih ME so predstavljene v preglednici II.

Preglednica II: Najpogostejše sestavine mikroemulzij.

Vodna faza	Voda, pufri, raztopine elektrolitov, propilenglikol, polietilenglikol, makrogoli
Oljna faza	Rastlinska olja, sintetična olja, estri maščobnih kislin, trigliceridi
Emulgator	<ul style="list-style-type: none"> • kationski: heksadeciltrimetilamonijev bromid, didodecilamonijev bromid • anionski: natrijev bis-2-etilheksilsulfosukcinat • neionski: polioksietilenski emulgatorji (Brij[®] 35), estri sladkorjev (sorbitan monooleat ali Span[®] 80) • zwitterionski: fosfolipidi, lecitin
Koemulgator	kratkoverižni alkoholi (etanol, propanol, butanol), derivati glikolov, poligliceroli ali propilenglikoli

Za ME je značilno, da vsebujejo precejšen delež emulgatorjev in koemulgatorjev, kar je eden od glavnih omejitvenih faktorjev za njihovo terapevtsko uporabo. PAS so znane kot potencialno toksične snovi, saj rušijo strukturo celične membrane in na ta način povečujejo permeabilnost celic. Omenjene lastnosti lahko sicer pri nizkih koncentracijah izkoriščamo za povečanje absorpcije polarnih učinkovin skozi membrane, pri visokih koncentracijah pa lahko pride do poškodb membrane in posledično do apoptoze celic. Stopnja toksičnosti posameznega emulgatorja je torej odvisna od njegove kemijske strukture in *in vivo* koncentracije. Med farmacevtsko najsprejemljivejšimi emulgatorji so fosfolipidi (lecitin, izolecitin). Prav tako se veliko uporabljajo neionski emulgatorji (Tween-i, Brij-i), ki niso občutljivi na spremembe vrednosti pH, so pa bolj občutljivi na spremembo temperature. Kot varni emulgatorji so znani tudi srednjedolgi gliceridi pridobljeni iz kokosovega olja (2, 3). Kot koemulgatorje uporabljamo v farmaciji tudi kratkoverižne alkohole (etanol, 1-

propanol, 1-butanol, 1-pentanol) (4), vendar je omejitveni faktor njihova potencialna toksičnost. Prav tako se, ker so dobro topni v vodi, boljše porazdeljujejo v vodno fazo, posledično se zmanjša njihova koncentracija na medfazi in ME lahko postane nestabilna (3, 5). Alternativni koemulgatorji (npr. Plurol oleique) so sposobni tvoriti ME z različnimi olji in emulgatorji v širokom območju, povzročajo manj iritacij in tako razširijo spekter uporabe ME za uporabo v farmaciji in kozmetologiji.

Nastanek ME je možen tudi z uporabo zgolj ene PAS (npr. lecitin), vendar se s takim pristopom izdelave potem zmanjša področje nastanka ME (2). Lecitin je namreč amfifilna, netoksična molekula naravnega izvora, ki lahko tvori ME in lamelarne strukture brez dodatka koemulgatorja, vendar le na ozkem področju kombinacij ustreznih komponent, saj je sam preveč lipofilen za tvorbo uravnoveženih mikroemulzijskih struktur. Vzrok naj bi bil v njegovem visokem ureditvenem parametru (ratio R), ki znaša 0,8. Za razširitev mikroemulzijskega področja bi bile potrebne nižje (za O/V mikroemulzije) oziroma višje (za V/O ME) vrednosti parametra R (4, 6, 7).

Suk-Young Choi in sodelavci so tako dokazali, da dodatek kratkoverižnih alkoholov (etanol, propan-1-ol, butan-1-ol, pentan-1-ol) kot koemulgatorjev, zmanjša vrednosti parametra R, saj se le-ti vključijo v medfazni film in tudi v vodno fazo in na ta način zmanjšajo njeno hidrofilitnost. V kombinaciji z lecitinom kot emulgatorjem povečajo gibljivost in ukrivljenost emulgatorskega medfaznega filma in tako zmanjšajo izredno veliko tendenco lecitina za tvorbo rigidnih struktur; TK in bikontinuiranih faz (4).

4.1.2 TEKOČI KRISTALI (MEZOFAZE)

Tekoče kristale (TK) sestavljajo koherentni dvosloji površinsko aktivnih snovi laminarne ali heksagonalne anizotropne strukture. Izraz »tekoči kristal« dobro opisuje fazo, ki združuje tako lastnosti trdne snovi (anizotropnost, dvolomnost, urejenost, mehanska stabilnost) kot tekočine (pretok). Snovi, ki tvorijo mezofaze, imenujemo mezogeni. Mezogeni so najpogosteje snovi z obliko, ki teži k paralelnemu urejanju. Značilno zanje je, da so rigidne organske molekule s podolgovato, linearno obliko in vsebujejo dipole ter lahko polarizabilne skupine (1, 8). Glede na nastanek TK delimo na termotropne (nastanejo s segrevanjem trdne snovi) in liotropne. Termotropne TK delimo na smektične in nematične. V smektičnem stanju so molekule mobilne v dveh smereh in lahko rotirajo okoli ene osi. Tudi nematične faze rotirajo okoli ene osi, vendar so gibljive v treh

dimenzijah. Liotropni TK pa nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi in jih navadno tvorijo amfifilne snovi. Delimo jih na lamelarne, heksagonalne in kubične. Struktura liotropnih TK je odvisna od interakcij z drugimi komponentami sistema in njihovih koncentracij. Liotropni TK so razširjeni v naravi, najdemo jih npr. v celičnih membranah, pogosta oblika pa so tudi v farmacevtskih formulacijah, medtem ko so termotropni TK predvsem sinteznega izvora (1, 8).

4.1.3 BIKONTINUIRANE STRUKTURE

Bikontinuirane strukture se od TK razlikujejo po tem, da gre za izotropne sisteme, pri katerih medfazni film emulgatorja neprestano fluktuirata in med seboj ločuje oljno in vodno fazo. Emulgatorski film se v teh sistemih ne zaključi, zato niti voda niti olje ne predstavljata dispergirane faze, ampak sta obe fazi kontinuirani. Zaradi omenjene izotropnosti bikontinuirane strukture velikokrat uvrščamo med ME (2).

4.1.4 MICELI

V primeru odsotnosti olja se površinsko aktivne snovi v vodi urejajo v micelle, pri čemer se lipofilni del obrne navznoter, hidrofilni del pa navzven. V nasprotnem primeru, torej ko ni prisotne vode, PAS v oljni fazi tvorijo reverzne micelle, s hidrofilnim delom v notranjosti micela in lipofilnim delom orientiranim proti zunanosti (2).

Miceli nastanejo spontano, brez uporabe koemulgatorja, so termodinamsko stabilni ter prozornega videza. Koncentracija PAS v njihovi strukturi je < 5%. Velikost dispergirane faze, katere koncentracija je manjša od 1%, je manjša od 0,01 μm (9).

4.1.5 SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI (S(M)ES)

S(M)ES so po definiciji izotropne zmesi lipida, PAS, enega ali več hidrofilnih topil in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo emulzije tipa V/O ali ME. Velikost kapljic ME, ki nastanejo iz SMES-ov, je pod 100 oz. 50 nm, porazdelitev njihove velikosti pa ozka. Proces samo-emulgiranja poteče spontano, saj je prosta energija, ki je potrebna za tvorbo ME, nizko pozitivna ali negativna, prav tako

je specifičen za določeno koncentracijo PAS ter kombinacijo in razmerje lipida in PAS. Iz teh razlogov zgolj točno določene koncentracije osnovnih sestavin tvorijo sisteme z zadovoljivim samo-emulgirajočim učinkom (10).

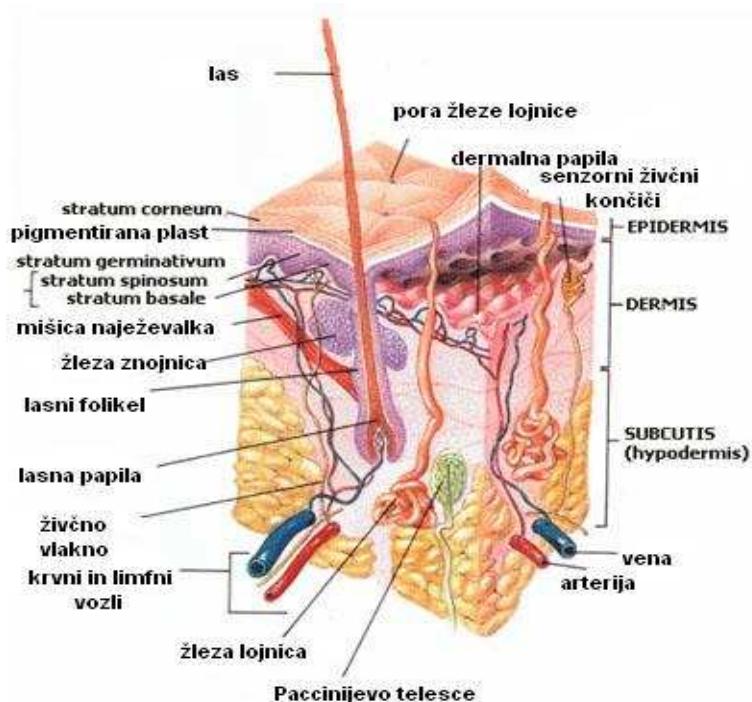
4.2 KOŽA KOT TARČNI ORGAN DERMALNIH IZDELKOV

4.2.1 ZGRADBA KOŽE

Koža je glede na površino telesa največji človeški organ, ki ščiti organizem pred škodljivimi zunanjimi vplivi (fizikalnimi, kemičnimi, mikrobiološkimi) in je ključna pri vzdrževanju temperature, elektrolitov in tekočinskega ravnovesja (11).

Sestavljajo jo tri plasti, ki so predstavljene na sliki 3:

- zunanja plast- povrhnjica (epidermis)
- srednja plast- usnjica (dermis)
- spodnja plast-podkožje (subcutis) (11).



Slika 3: Zgradba kože (12).

Epidermis je najtanjša plast kože, sestavljena iz večplastnega epitelija in keratinocitov, med katerimi so še melanociti, Langerhansove celice, Merkleve celice in druga tipalna telesa. Debelina epidermisa je 100-150 μm in ga sestavljajo štiri plasti: stratum basale (bazalna plast, kjer dozorevajo keratinociti), stratum spinosum (trnasta plast, kjer keratinociti dozorevajo in se sintetizira keratin), stratum granulosum (zrnasta plast, kjer pride do sinteze novih strukturnih proteinov) in stratum corneum (rožena plast, kjer poteka zadnja stopnja diferenciacije keratinocitov v korneocite in s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, ki napravi kožo nepropustno oz. selektivno propustno za vodo, ione in druge snovi). Dermis je vezivno tkivo, v katerem so limfatični in krvni žilni spleti, ki so bistveni za oskrbovanje epidermisa s hranljivimi snovmi in kisikom. Podkožje je iz različno velikih prostorov, ki jih pregrajuje vezivno tkivo, kjer so maščobne celice. V septah potekajo večje krvne in limfne žile ter živci. V zgornjem delu maščobnih blazin ležijo apokrine in ekrine žleze ter čebulice večjih lasnih foliklov. Podkožje služi kot termoizolator, depo energije in mehanski blažilec ter omogoča premakljivost kože in podkožja. Pomemben del kože pa so tudi žleze lojnice in znojnice, lasje oz. dlake v lasnih foliklih in nohti (11).

4.2.2 DERMALNA IN TRANSDERMALNA DOSTAVA UČINKOVIN

Za učinkovito farmacevtsko obliko velja, da dostavi zdravilno učinkovino na mesto delovanja v terapevtski koncentraciji z minimalnimi stranskimi učinki in stopnjo neugodja za pacienta. Koža je tarčni organ pri dermalni aplikaciji, ko želimo doseči lokalni učinek ter pri transdermalni aplikaciji, ko želimo doseči absorpcijo učinkovine v sistemski krvni obtok. S transdermalno dostavo se izognemo učinku prvega prehoda skozi jetra in nihanjem v plazemskih koncentracijah. Dodatni prednosti pa sta še enostavna uporaba in možnost takojšnje prekinitve zdravljenja. Pri dermalni aplikaciji lahko zdravilne učinkovine delujejo v različnih predelih kože: na površini, v roženi plasti, v živem delu vrhnjice, v usnjici, v žilnem spletu, v lojnicah in znojnicah (2).

a) PREHOD UČINKOVIN SKOZI KOŽO

Da učinkovine dosežejo mesto delovanja v koži, morajo najprej preiti roženo plast, ki predstavlja največjo penetracijsko bariero. Prehod spojin skozi kožo je torej odvisen od

bioloških (starost, stanje kože, anatomsko mesto, metabolizem v koži, prekrvavitev kože) in fizikalno-kemijskih dejavnikov (hidratacija kože, vezava spojin na sestavine kože, temperatura). Na prehod učinkovin vplivajo tudi dodatki pospeševalcev penetracije, uporaba fizikalnih metod in ustreznost nosilnega sistema oz. farmacevtske oblike. Sestavine nosilnega sistema so namreč zaradi medsebojnih interakcij in interakcij s kožo omejujoč faktor pri prehodu učinkovine skozi roženo plast (2). Skozi omejujočo bariero rožene plasti učinkovine prehajajo po treh poteh: transcelularni, intercelularni, transglandularni oz. transfolikularni. Ker žleze in lasni folikli zavzemajo le manjši del površine kože, ne predstavljajo pomembne difuzijske poti. Večina spojin prehaja skozi roženo plast po transcelularni in intercelularni poti (5).

b) VREDNOTENJE DERMALNE ABSORPCIJE UČINKOVIN

Testiranje dermalne absorpcije je bistvenega pomena pri vrednotenju dermalnih in transdermalnih farmacevtskih oblik. Izraz dermalna absorpcija opisuje difuzijo učinkovin skozi kožo in obsega tri procese:

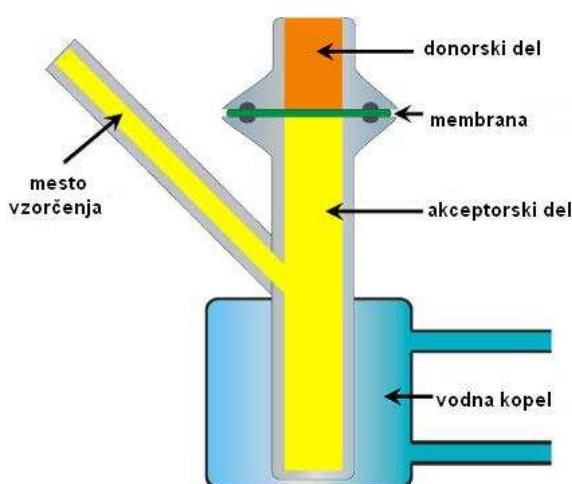
- *Penetracija* (vstop učinkovine v posamezne plasti kože),
- *Permeacija* (prehod učinkovine med plastmi, ki so strukturno in funkcionalno različne),
- *Absorpcija* (privzem učinkovine v krvožilni in limfni sistem) (13).

Ker so testiranja na ljudeh pogosto etično sporna, draga in dolgotrajna, vrednosti dobljenih rezultatov v takih primerih pa inter- in intravariabilne, je vrednotenje dermalne absorpcije *in vivo* težko izvedljivo. Zato je pomembno, da imamo razvit zanesljiv in ustrezno zasnovan *in vitro* sistem vrednotenja dermalne absorpcije (13).

c) IN VITRO SISTEMI ZA VREDNOTENJE DERMALNE ABSORPCIJE UČINKOVIN

Za *in vitro* vrednotenja se uporabljajo različne difuzijske celice, največkrat statične Franz-ove difuzijske celice. Sistem Franz-ove difuzijske celice, ki je predstavljen na sliki 4, je razdeljen na donorski del, membrano in receptorski del. V donorskem delu je učinkovina, raztopljena v določenem pufri ali vgrajena v različne formulacije. Membrano, ki jo pri testiranju dermalnih in transdermalnih pripravkov predstavlja koža ali njeni nadomestki, namestimo z roženo plastjo obrnjeno proti donorskemu delu Franz-ove celice. Receptorski

del je običajno napolnjen s fiziološkim medijem (pufer, pH=7,4), bistvena zahteva pa je zadostna topnost učinkovine v receptorskem mediju. Temperaturo receptorske tekočine lahko vzdržujemo na 32°C, kar ustreza temperaturi na površini kože, ali pa vzpostavimo temperaturni gradient (32°C na površini kože in 37°C v receptorskem delu). Izbran receptorski medij ne sme poškodovati membrane. Iz receptorskega dela v določenih časovnih intervalih jemljemo vzorce in z ustreznimi analiznimi metodami kvantitativno določimo vsebnost učinkovine. Rezultate podamo kot kumulativno količino sproščene učinkovine v določenem časovnem intervalu (13).



Slika 4: Franz-ova difuzijska celica.

Za in vitro testiranje dermalne absorpcije je pomembna izbira membrane, ki naj oponaša barierno funkcijo kože. Ločimo umetne in naravne membrane. Med umetne prištevamo polimerne in filtrske membrane ter membrane prevlečene z mešanico lipidov, med naravne pa živalske kože in rekonstruirane celične kožne modele.

1. Umetne membrane se v difuzijskih celicah uporabljajo predvsem za proučevanje vpliva različnih nosilnih sistemov na sproščanje učinkovine. Največkrat so to polimerne membrane, ki so komercialno dostopne, enotne sestave znotraj serij, stabilne in enostavne za rokovanje. Kljub obsežni uporabi umetnih membran, ki oponašajo človeško kožo, transport skozi membrano ne velja kot ekvivalenten model dermalne absorpcije, saj umetna membrana največkrat ne predstavlja difuzijske bariere, ampak zgolj fizično. Barierne lastnosti porozne membrane so

odvisne od sposobnosti učinkovine, da vstopa in difundira skozi pore, kar je povezano z njeno molekulsko maso, obliko in elektrostatskimi interakcijami z membrano. Difuzija učinkovin skozi neporozne membrane pa je otežena; barierne lastnosti so v tem primeru povezane s topnostjo učinkovine v polimernem ogrodju in sposobnostjo difuzije skozi polimer (13).

2. Za vrednotenje dermalne absorpcije na naravni membrani se uporablja predvsem živalska koža, ki je zaradi omejenih virov in etičnih omejitev nadomestila človeško kožo, vendar so rezultati zaradi različne strukture kože težko primerljivi. Ker pa je živalska koža bolj dostopna kot človeška, lahko optimiziramo mesto odvzema kože, starost in spol živali in na ta način zmanjšamo variabilnost rezultatov. Testiranja se sicer izvajajo na različnih živalskih kožnih modelih (opice, miši, podgane, prašiči, zajci, kače), raziskave pa so pokazale, da je človeška koža najbolj primerljiva s prašičjo in opičjo kožo. Na prašičjem uhlju so debelina rožene plasti (21-26 μm) in epidermisa (66-72 μm), pa tudi število dlak (20 dlak na cm^2) in struktura kožnih izvodil približno enake kot pri človeku, le da je premer lasnih foliklov pri prašiču približni enkrat večji. Podobna je tudi struktura kolagenskih vlaken in žilnega spleta v dermisu ter vsebnost glikosfingolipidov in ceramidov v roženi plasti. Velja pa splošno pravilo, da je dermalna absorpcija skozi živalsko kožo večja v primerjavi s človeško (13).

4.2.3 MIKROEMULZIJE in TEKOČI KRISTALI KOT NOVEJŠI DERMALNI DOSTAVNI SISTEM

Novejši koloidni nosilni sistemi (liposomi, ME, TK, nanosistemi) imajo veliko prednosti pred tradicionalnimi dermalnimi farmacevtskimi oblikami (mazila, kreme, geli, emulzije, losjoni, raztopine), saj izboljšajo dermalno absorpcijo (2). Mobilnost, sproščanje in permeacija učinkovin so namreč povečani v omenjenih sistemih, brez ireverzibilnih sprememb kože. Pospešena dermalna absorpcija je posledica interakcij s sestavinami kože, možne pa so tudi dodatne modifikacije nosilnih sistemov (14).

Zaradi velikega izbora emulgatorjev, primernih za dermalno aplikacijo, so dermalne ME najbolj raziskan del teh nosilnih sistemov. V številnih raziskavah je dokazana boljša dermalna dostava zdravilnih učinkovin, vgrajenih v ME, v primerjavi tako s klasičnimi

farmacevtskimi oblikami kakor tudi s sorodnimi koloidnimi nosilnimi sistemi za dermalno uporabo (2). Specifična zgradba ME omogoča vgradnjo hidrofilnih, lipofilnih in amfifilnih zdravilnih učinkovin z namenom povečanja topnosti učinkovine, povečanja biološke uporabnosti, doseganja kontroliranega sproščanja, zaščite labilnih učinkovin, zmanjšanja inter- in intrasubjektivne variabilnosti biološke uporabnosti in zakrivanja neprijetnega okusa in vonja (3).

Ker lahko učinkovina iz nosilnega sistema v kožo prehaja samo v raztopljeni obliki, so ME zelo ugoden sistem zaradi velike solubilizacijske kapacitete (2). Z vgradnjo v vodi zelo slabo topne učinkovine v oljno fazo ME lahko močno pospešimo hitrost sproščanja učinkovine v biološkem sistemu, koži. Če namreč majhne kapljice oljne raztopine učinkovine dispergiramo v vodnem mediju, se zaradi velike stične površine med oljno in vodno fazo poveča prehajanje učinkovine v hidrofilno fazo. Ker pa se učinkovina v telesu (tj. v fiziološkem vodnem mediju) iz hidrofilne faze neprestano odstranjuje, je ves čas vzpostavljen koncentracijski gradient med oljno in vodno fazo. Povečana količina lipofilne učinkovine v vodi se *in vivo* odraža kot povečana biološka uporabnost zdravilne učinkovine (3). Velik koncentracijski gradient učinkovin iz ME v kožo se prav tako vzpostavi z večjo koncentracijo učinkovine v nosilnem sistemu. Ugotovili so namreč, da največjo dermalno uporabo zagotavljajo sistemi, v katerih je prisotna učinkovina v koncentraciji blizu nasičenja (2).

Na dermalno absorpcijo močno vpliva tudi kvali- in kvantitativna sestava ME, saj le-ta pogojuje interakcije sestavin ME s kožnimi lipidi in s tem vpliva na zmanjšanje bariere za prehod učinkovin. Pri tem so pomembne predvsem interakcije PAS kot pospeševalcev penetracije. PAS, ki zmanjšajo bariero rožene plasti, povečajo dermalno in transdermalno dostavo, medtem ko pospeševalci, ki temeljijo na vzpostavitvi večjega koncentracijskega gradienta, povečajo samo dermalno dostavo učinkovin. Prav tako vsebnost vode v mikroemulzijskem sistemu spremeni hidro-lipofilno ravnotežje lipidnega dvosloja in tako poveča hidratacijo kože ter posledično absorpcijo. Na ugodno dermalno absorpcijo pa vpliva tudi struktura ME; vgradnja učinkovine v notranjo fazo, ki nato difundira v zunanjo fazo in se iz nje sprošča v kožo, omogoča učinek podaljšane absorpcije. Dodatno pa absorpcijo izboljša dober ME s kožo po celotni površini aplikacije, kar je posledica nizke medfazne napetosti ME (14).

Kreilgaard in sodelavci so ugotovili, da je mobilnost učinkovine v izbranem nosilnem sistemu eden izmed glavnih dejavnikov za učinkovito dermalno absorpcijo. ME so namreč zelo dinamični sistemi, zato je mobilnost učinkovin znotraj teh sistemov visoka, posledično je difuzija učinkovine na površino kože hitrejša in transdermalni tok povečan (15).

Schmalfuss s sodelavci je ugotovil, da je prehod hidrofilnih učinkovin skozi kožo odvisen od sestave ME. Z dodatkom holesterola v ME je povečal prehod hidrofilne učinkovine. Holesterol naj bi se vgradil med ceramide v koži, lipidni dvosloji naj bi se razmaknili, poveča se hidratiranost polarnih delov in olajša prehod hidrofilnih učinkovin (16).

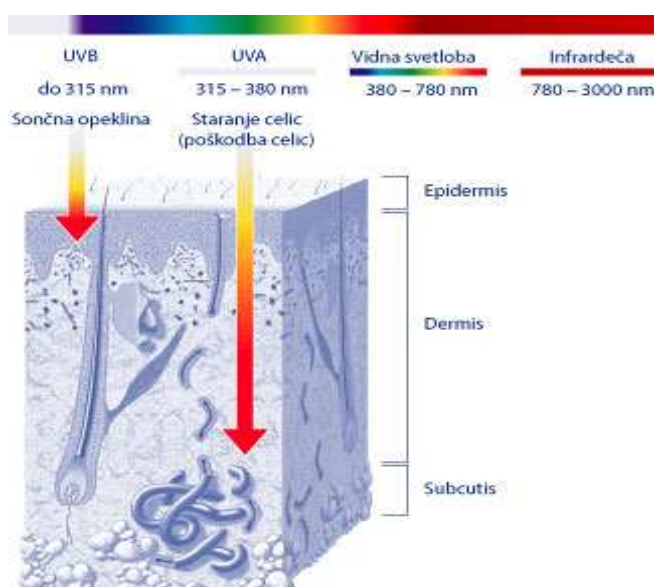
Prav tako je bilo veliko raziskav z namenom razvoja novih dermalnih farmacevtskih oblik narejenih tudi s TK, saj njihova lamelarna struktura ponazarja neizmerno podobnost s strukturo intercelularnih lipidnih membran v koži. Zaradi nizke medfazne napetosti na medfazni meji, dosežene z uporabo neionskih emulgatorjev, izkazujejo dobre penetracijske lastnosti in tako omogočajo postopno difuzijo učinkovin v kožo in tudi v sistemski krvni obtok, hkrati pa ne povzročajo ireverzibilnih iritacij kože. Imajo veliko solubilizacijsko kapaciteto, zato povečajo topnost netopnih oziroma slabo topnih učinkovin. Nadalje, lamelarna struktura TK omogoča vključitev strukturne vode v hidrofilna področja. Na ta način se v primerjavi z O/V emulzijami zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacija kože. Njihova dermalna uporaba tako nudi ugoden občutek na koži, odlikuje pa jih tudi ugodna konsistenca in atraktiven videz (17).

Makai in sodelavci so razvili lamelarne TK z nizko vsebnostjo PAS, pri čemer so kot koemulgator uporabili kratkoverižni alkohol, glicerol. Oljno fazo je predstavljal tekoči vazelin in kot emulgator so uporabili Brij[®] 96. V nosilni sistem so vgradili hidrofilni efedrinijev klorid in nevodotopni tenoksikam. Nosilne sisteme so ovrednotili z mikroskopskimi, reološkimi in difraktometričnimi metodami. Dokazali so, da vgrajeni učinkovini ohranita lamelarno strukturo TK. TK pa so izkazali ugodne solubilizacijske lastnosti za vgraditev nevodotopnih učinkovin in omogočili učinek podaljšanega sproščanja za hidrofilni efedrinijev klorid (17).

4.3 ASKORBILPALMITAT IN NJEGOVA ANTIOKSIDATIVNA VLOGA

4.3.1 Ultravijolično sevanje in vpliv na kožo

Koža varuje telo pred vdorom škodljivih snovi v telo ter kozmičnim sevanjem. Sončno sevanje sestavlja nenehno elektromagnetno valovanje z valovno dolžino med 200 in 400 nm in je razdeljeno v tri področja: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) in UVA (320-400 nm). Ozonska plast zadrži le žarke z valovno dolžino pod 280 nm, t.j. UV-C žarke, preostali pa se na koži odbijejo ali prodrejo vanjo. Prodor UV žarkov skozi plasti kože je predstavljen na sliki 5. UVB sevanje prodre vse do bazalne membrane povrhnjice in je glavni povzročitelj sončnih opeklin (sončnega eritema), poškodb DNK in kožnega raka. UVA sevanje prodre globoko v vezivno tkivo kože in lahko vodi do nepopravljivih sprememb, kot je prezgodnje staranje kože. Pod vplivom UV sevanja, zlasti UVA sevanja, nastanejo iz kisika visoko reaktivne kisikove spojine (ROS), ki poškodujejo celice in v koži povzročijo poškodbe lipidov, proteinov in nukleinskih kislin. Tako spremenijo permeabilnost celičnih membran, ob reakcijah s proteini pride do premreženja in ireverzibilne denaturacije proteinov (npr. kolagena), reakcije z nukleinskimi kislinami pa vodijo do premreženja DNK verig. Vse te poškodbe pa vodijo do prezgodnjega staranja, vnetja, povečane pigmentacije in rakavih sprememb kože (18).



Slika 5: Prodor UV žarkov skozi plasti kože (18).

4.3.2 Obrambni mehanizem telesa pred škodljivimi učinki radikalov

Tekom evolucije so se razvili obrambni mehanizmi za odstranjevanje ROS iz celic. Celica se v prvi vrsti štiti s svojo strukturno in funkcijsko integriteto. Poškodovana DNK se pred radikali štiti z reparacijskimi sistemi, bolj specifična zaščita pa temelji na sposobnosti posameznih encimov (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza), da odstranjujejo radikale in druge kisikove zvrsti in na delovanju antioksidantov, ki niso encimi, vendar preprečujejo, zmanjšujejo ali ustavljajo oksidativne reakcije, sprožene z radikali (19). Pregled encimskih in neencimskih antioksidantov je predstavljen v preglednici III.

Preglednica III : Encimski in neencimski antioksidanti (9).

ENCIMSKI	NEENCIMSKI
<ul style="list-style-type: none"> • Superoksid dismutaza (SOD): katalizira pretvorbo superoksidnega radikala v vodikov peroksid $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ • Katalaza (CAT): odstranjuje vodikov peroksid iz celice, če je ta prisoten v velikih koncentracijah $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ • Glutathion peroksidaza (GP): katalizira redukcijo vodikovega peroksida in prostih organskih peroksidov, pri čemer se glutathion (GSH) oksidira v disulfid (GSSG) $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$ • Glutathion reduktaza (GR): reducira nastali glutathion disulfid do glutationa $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Askorbinska kislina (vitamin C): v hidrofilnem okolju celice v obliki monoaniona-askorbata deluje kot reducent in lovilec ROS • α-tokoferol (vitamin E): hidrofobni antioksidant, ki reagira z lipidnimi radikali. V reakciji nastane relativno stabilen α-tokoferilni radikal, ki se regenerira s pomočjo vitamina C. • β-karoten: karotenoidni pigment, predstopnja vitamina A in lovilec singletnega kisika. • Koencim Q: redoks člen membranskega elektronskega transportnega sistema, sodeluje pri preprečevanju lipidne peroksidacije.

Koža pa ima razvite lastne zaščitne mehanizme, s katerim se lahko brani pred negativnimi učinki UV-žarkov. Sem spadajo pigmentacija in odebelitev poroženele plasti, reparacijski mehanizmi poškodovane DNK, tvorba koži lastnih filtrskih snovi, kot je urokaninska kislina in aktivacija telesu lastnih antioksidantov. Celice kože imajo encime (npr. superoksiddizmutaza, peroksidaze ali glutation), ki skrbijo za zaščito pred učinki radikalov, ki so škodljivi za celice. Najučinkovitejši lovilci radikalov pa so snovi, ki jih v telo vnašamo s hrano. To so tokoferoli, β -karoten in askorbinska kislina (18).

4.3.3 Učinki askorbinske kisline na koži

Askorbinska kislina (L-askorbinska kislina) oz. vitamin C je za človeka esencialna spojina, saj je zaradi pomanjkanja L-gulono- γ -laktone oksidaze, zadnjega encima v sintezi askorbinske kisline iz glukoze, ki katalizira konverzijo L-gulono- γ -laktone v L-askorbinsko kislino, ne more sintetizirati sam. Pri fiziološkem pH je askorbinska kislina v obliki monoaniona-askorbata, ki je zelo dober reducent. Ko askorbat odda en proton in en elektron, se pretvori v askorbilni radikal (semidehidroaskorbat), ki se v naslednji stopnji oksidira do dehidroaskorbata (9, 20). Pri ireverzibilnem odprtju laktonskega obroča pa iz dehidroaskorbata nastane 2,3-diketogulonska kislina, ki se nato v nadaljnjih reakcijah pretvori v oksalno in treoninsko kislino (21).

Zaradi svojih elektrondonorskih lastnosti deluje askorbat, glavni vodotopni neencimski antioksidant, kot lovilce radikalov in vpliva na aktivnost mnogih encimov, ki imajo za prostetično skupino kovinske ione. Askorbat namreč vzdržuje kovinske ione v reducirani obliki, ki je potrebna za njihovo delovanje. Zaradi slednje funkcije je ključnega pomena tudi v biosintezi kolagena. Učinek vitamina C je v tem primeru viden kot direktna stimulacija sinteze kolagena v fibroblastih in kot antioksidativna zaščita že nastalih kolagenskih struktur pred škodljivimi učinki radikalov. Njegova dodatna pomembna vloga pa se kaže v njegovi zmožnosti regeneracije tokoferilnega radikala v α -tokoferol. Gre za neencimsko regeneracijo na medfazi voda/lipidne membrane. Vitamin C se tudi uporablja kot antioksidant v kombinaciji z UV filtri, saj ščiti pred UV poškodbami, vpleta pa se tudi v melanogenezo. Sinteza melanina je pod vplivom vitamina C inhibirana preko mehanizma direktne inhibicije tirozinaze. Vitamin C namreč spremeni aktivni center

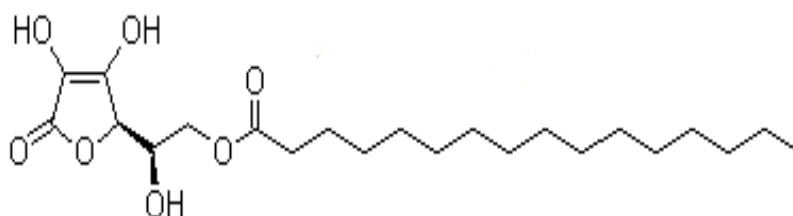
encima ter reducira o-kinone, intermediate v sintezi melanina, tako da melanin ne more nastati, dokler ni oksidirana vsa askorbinska kislina (9, 20, 21, 22).

Ker pa je askorbinska kislina praktiĉno neuporabna za vgrajevanje v konĉne farmacevtske izdelke, se namreĉ zelo hitro oksidira (v aerobnih pogojih in pod vplivom svetlobe) in razgradi do biološko neaktivnih oblik, so s kemijskimi modifikacijami pripravili stabilnejše derivate vitamina C. Gre za fosfatne estre askorbinske kisline, estre vitamina C z maščobnimi kislinami in etre le-teh z glukozo (21, 23).

4.3.4 Askorbilpalmitat

Askorbilpalmitat (AP) je ester askorbinske kisline s palmitinsko kislino (slika 6) in ima moĉno izraĉene lipofilne lastnosti. Palmitinska kislina je lahko pripeta na mestu 2, 3 ali 6. Esterifikacija na mestu 2 in 3 prepreĉuje oksidacijo obroĉa in ti derivati nimajo reducirajoĉih lastnosti. Z esterifikacijo na mestu 6 pa ohranimo te lastnosti, hkrati pa kot ester nima izraĉenih kislih lastnosti in ne povzroĉa iritacije koĉe, zaradi lipofilnih lastnosti pa zlahka prehaja roĉeno plast, zato je smiselna uporaba tega derivata. Esterifikacija s palmitinsko kislino sicer zmanjĉa hidrolizo askorbinske kisline, kljub temu pa ne zagotovi zadostne stabilnosti v konĉnih izdelkih, zato je pomembna izbira optimalnega nosilnega sistema (24, 25).

AP se v kozmetiĉnih izdelkih uporablja kot antioksidant za zaĉitno lipofilnih sestavin ali kot kozmetiĉno aktivna snov, saj se s hidrolizo pretvori v aktivno askorbinsko kislino. Za zaĉitno izdelkov se uporablja v koncentracijah od 0,05 do 0,1 %. Će pa ga Źelimo uporabiti kot aktivno sestavino z uĉinki v koĉi, ga moramo vgraditi v koncentracijah 1 do 2 % (21).



Slika 6: Strukturna formula askorbilpalmitata.

Austria in sodelavci so proučevali stabilnost derivatov vitamina C v raztopini in različnih dermalnih farmacevtskih sistemih. Primerjali so stabilnost lipofilnega in hidrofilnega derivata vitamina C, AP in magnezijevega askorbilfosfata glede na askorbinsko kislino. Dokazali so, da oba derivata izkazujeta večjo stabilnost v primerjavi z askorbinsko kislino. Esterifikacija s palmitinsko kislino na mestu 6 sicer ni preprečila hidrolize molekule, niti v raztopini niti v emulziji. Izkazalo se je, da je stabilnost AP odvisna od strukturnih lastnosti nosilnega sistema. Kremni geli z večjo viskoznostjo so bolj primerni za vgraditev AP kot pa emulzije tipa O/V, pa čeprav slednji izkazujejo videz gela. Esterifikacija na mestu 2 s fosforno kislino pa ima zaščitno vlogo pred degradacijo endiolskega sistema in izkazuje ugodne lastnosti za uporabo v dermalnih izdelkih (25).

Stabilnost hidrofilnega (natrijev askorbilfosfat) in lipofilnega (AP) derivata vitamina C, vgrajenega v ME O/V in V/O, je proučevala tudi P. Špiclin s sodelavci. Stabilnostne študije AP je opravljala pod različnimi pogoji z namenom ugotavljanja vpliva koncentracije učinkovine, kisika, pogojev hranjenja in porazdelitve učinkovine v ME na stabilnost. Dokazala je, da na stabilnost AP v ME bistveno vpliva njegova koncentracija (večja stabilnost pri višjih koncentracijah), prisotnost kisika in pogoji hranjenja. Svetloba pospeši razgradne procese. Askorbilfosfat pa je izkazal večjo stabilnost v obeh tipih ME (26).

V nadaljnjih raziskavah so P. Jurkovič in sodelavci vgradili AP v ME in proučevali njegovo antioksidativno vlogo na prašičji koži z metodo EPR (elektronska paramagnetna resonanca). Prašičjo kožo so obsevali z UV in spremljali nastanek radikalov. Nato so na obsevano kožo nanegli sistem z AP in potrdili, da AP zmanjša stopnjo tvorbe radikalov. Njegova učinkovitost je odvisna od koncentracije vgrajene učinkovine kakor tudi od tipa nosilnega sistema (ME O/V in V/O). Za ugodnejše so se izkazale ME tipa O/V. V obeh primerih pa je bila antioksidativno delovanje večje pri višji koncentraciji AP (27).

5. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je razvoj novih sistemov za dermalno dostavo AP in vrednotenje prehoda AP v/skozi kožo. V okviru predhodnih raziskav na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so že bili izdelani lamelarni TK na osnovi lecitina, Tweena[®] 80, izopropilmiristata in bidestilirane vode. Raziskovalno delo bomo zato nadaljevali z optimizacijo omenjenega sistema. V le-tega bomo vključili še butanol, ki kot nizkomolekularni alkohol poveča fleksibilnost emulgatorskega filma in tako omogoči nastanek ME.

Najprej bomo izdelali fazni diagram, sestavljen iz emulgatorske zmesi Tweena[®] 80 in lecitina v masnem razmerju 1:1; koemulgatorja butanola (v razmerju 1:1 glede na emulgatorsko zmes) ter izopropilmiristata in bidestilirane vode. Nastale sisteme bomo ocenili organoleptično ter poskušali določiti tip nastalega sistema (V/O oz. O/V) s pomočjo kobaltovih papirčkov in z merjenjem električne prevodnosti.

Nato bomo izbrali strukturno različne sisteme, ki ležijo na isti razredčitveni liniji faznega diagrama (SMES, V/O ME, TK, O/V ME in emulzija). Sestavljeni so iz istih komponent v različnih razmerjih, izjema so le TK, ki se nahajajo na isti razredčitveni liniji, vendar ne vsebujejo butanola kot koemulgatorja. Vanje bomo vgradili AP v 1 % (m/m) in maksimalnem deležu specifičnem za posamezni sistem. Sisteme bomo ovrednotili s stališča fizikalne stabilnosti in jim določili viskoznost v odvisnosti od temperature.

Posebej se bomo osredotočili na SMES-e, TK in ME tipa V/O. V nadaljevanju bomo tako primerjali vpliv nosilnega sistema na stabilnost AP ter uporabnost izbranih sistemov za dermalno aplikacijo ovrednotili z *in vitro* sproščanjem AP skozi umetno membrano in študijo permeabilnosti skozi kožo prašičjega uhlja.

6. MATERIALI IN METODE

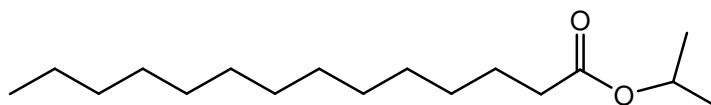
6.1 MATERIALI

a) Sestavine mikroemulzij

LIPOFILNA FAZA

- **Izopropilmiristat (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)**

Izopropilmiristat (slika 7) je bistra, oljnata tekočina z nizko viskoznostjo, brez barve in vonja. Kemijsko je izopropilnega alkohola in miristinske kisline, ki se meša z alkoholom, maščobnimi olji, tekočim parafinom, acetonom, kloroformom, ne meša pa se z vodo in glicerolom. Odporen je na oksidacijo in hidrolizo, zato je dokaj stabilen. Na koži deluje emolientno. Je netoksičen in ne povzroča iritacij, zato se široko uporablja kot komponenta poltrdnih oblik in kot topilo za mnoge dermalne pripravke v farmaciji in kozmetiki. Ker dobro prodira v kožo, se pogosto uporablja kot pospeševalec absorpcije v transdermalnih pripravkih (28, 29).



Slika 7: Kemijska struktura izopropilmiristata.

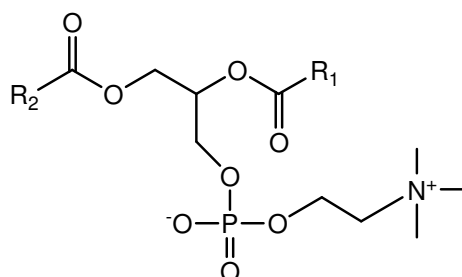
EMULGATOR

- **Lipoid S-100[®] (Lipoid GmbH, Nemčija)**

Izraz lecitin označuje kompleksno zmes večih komponent, tako fosfolipidov kot ostalih sestavin (fosfatidiletanolamina, fosfatidilinozitola, trigliceridov, maščobnih kislin, sterolov). Najpomembnejša komponenta lecitina je fosfatidilholin (slika 8), ki je zmes različno substituiranih glicerol-3-fosfatidilholinskih ogrodij. V posameznih vrstah lecitina ga najdemo v različnih koncentracijah, v odvisnosti od vrste lecitina in njegove čistote. Preostale sestavine v lecitinu so še fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, trigliceridi, maščobne kisline, steroli. Prisotnost le-teh prav tako variira med posameznimi vrstami lecitinov. Lipoid S-100[®] je prečiščena vrsta sojinega lecitina, ki ne vsebuje manj kot 94%

fosfatidilholina. V manjših količinah vsebuje tudi fosfatidiletanolamin, lizofosfatidilholin, trigliceride, D1- α -tokoferol ter vodo. Je rumenkasta snov voskaste konsistence, značilnega vonja ter dobro topna v etru in maščobnem olju. V vodi tvori koloidno raztopino. Lecitin je komponenta celičnih membran in je biokompatibilen in popolnoma biorazgradljiv. Pridobivamo ga iz naravnih virov, predvsem iz jajčnega rumenjaka in sojinih semen, nahaja pa se tudi v semenih bombaževca, oljni repici in arašidih. Ker ne povzroča iritacij na živalski in človeški koži, je primeren za dermalno aplikacijo. Na koži deluje emolientno in poveča hidriranost kože. Kot netoksičen se je izkazal tudi v peroralnih in subkroničnih dermalnih študijah na živalih, pa tudi v raziskavah mutagenosti in reproduktivne toksičnosti. Fosfatidilholin je pomemben pri fetalnem razvoju, lecitin pa ščiti pred alkoholno cirozo jeter, znižuje stopnjo holesterola v serumu in izboljša mentalno in fizično počutje (30, 31).

Fosfatidilholin je amfifilna molekula, sestavljena iz »zwitterionske« glave in dveh nepolarnih verig pripadajočih maščobnih kislin. Ustrezna struktura in predhodno omenjena netoksičnost in biokompatibilnost so lastnosti, ki omogočajo njegovo široko uporabo v farmaciji in kozmetiki. Uporablja se kot emulgator in stabilizator v peroralnih, intravenskih, intramuskularnih in dermalnih pripravkih. (28, 32).

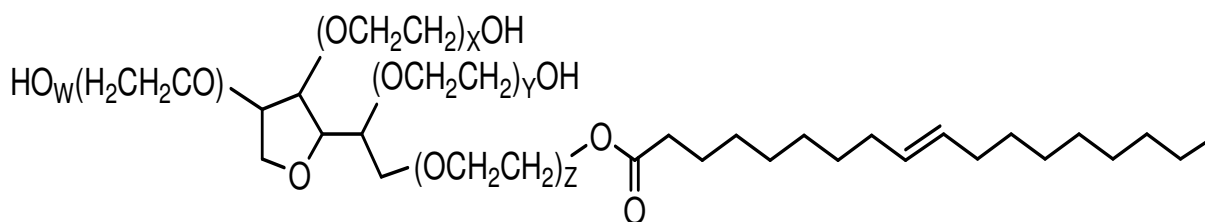


Slika 8: Kemijska struktura fosfatidilholina (R₁, R₂ predstavljata maščobni kislini). V lecitinu, pridobljenem iz soje, prevladuje linoleinska kislina.

- **Tween 80[®] (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)**

Tween 80[®] (polysorbate 80) na sliki 9 je rumena, viskozna, higroskopna tekočina, topna v vodi, etanolu in toluenu, ter netopna v maščobnih oljih in tekočem parafinu. Gre za zmes

monoestrov sorbitola in anhidrida sorbitola z oleinsko kislino, etoksiliranih s približno 20 moli etilen oksida na vsako molekulo sorbitola oz. anhidrida sorbitola. Tween 80[®] je hidrofilni, neionski emulgator s HLB vrednostjo 15 ter dobro sprejemljiv za človeško kožo. Je netoksičen in ne povzroa iritacij, zato se široko uporablja kot emulgator, solubilizator in moljivec v dermalnih in parenteralnih farmacevtskih oblikah, v kozmetiki, pa tudi v prehrabeni industriji (28, 33).



Slika 9: Kemijska struktura Tweena[®] 80 ($x + y + z + w = 20$).

KOEMULGATOR

- **Butan-1-ol (Riedel-de Haën, GmbH & Co. KG, Germany)**

Butan-1-ol je prozorna, nevtralna tekočina značilnega vonja, ki se dobro meša z drugimi alkoholi, ketoni, estri, aldehydi, etri, glikoli in drugimi aromatskimi in alifatskimi ogljikovodiki. V vodi je zmerno topen (7,7 g/ 100 ml). Uporablja se v prehrabeni, tekstilni, lesni, naftni, farmacevtski in kozmetični industriji kot koemulgator, saj se uredi v medfazni film in tako dodatno zmanjša medfazno napetost (34). V kombinaciji z lecitinom kot emulgatorjem poveča gibljivost emulgatorskega medfaznega filma in tako zmanjša tendenco lecitina za tvorbo rigidnih struktur; omogoči torej večjo ukrivljenost filma, kar je pomembno za nastanek oz. povečanje območje nastanka mikroemulzij (4, 34).

HIDROFILNA FAZA

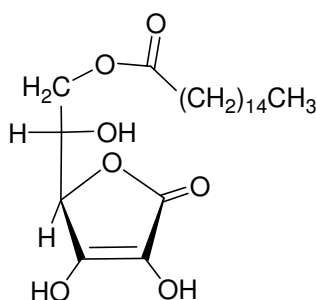
- **Bidestilirana voda**

Bidestilirana voda je pridobljena s postopkom dvojne destilacije na Katedri za klinično kemijo na Fakulteti za farmacijo.

UČINKOVINA

- **Askorbilpalmitat** (Fluka, BioChemika, Nemčija)

Askorbilpalmitat (AP), (slika 10), je kemijsko ester askorbinske kisline s palmitinsko (heksadekanojsko) kislino z molekulske formulo $C_{22}H_{38}O_7$ (24).



Slika 10: Strukturna formula askorbilpalmitata.

AP je rahel, bel do rumenkasto bel prah, značilnega vonja in mastnega otipa. Je skoraj netopen v vodi, kloroformu, etru, metilenkloridu in maščobnih oljih, lahko topen pa je v etanolu in metanolu. Tako kot askorbinska kislina ima kisle in redukativne lastnosti (24).

Pridobivajo ga sintezno s kislinsko katalizirano esterifikacijo askorbinske kisline in palmitinske kisline. V farmacevtski in prehrambeni industriji se uporablja kot učinkovina ali antioksidant za zaščito pripravkov in učinkovin, občutljivih na kisik. V kombinaciji z α -tokoferolom se uporablja kot stabilizator za olja v peroralnih farmacevtskih pripravkih zaradi sinergističnega delovanja (24).

b) Ostale kemikalije

- metanol (CH_3OH), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava mobilne faze in redčenje vzorcev pred injiciranjem
- acetonitril (CH_3CN), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava mobilne faze
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava fosfatnega pufra
- orto-fosforjeva (V) kislina 85% (H_3PO_4), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava fosfatnega pufra

- fosfatni pufer (0,01M, pH=3,5), p.a.
uporaba: priprava mobilne faze
- natrijev tiosulfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava metanolne raztopine za redčenje vzorcev pred injiciranjem
- natrijev klorid (NaCl), p.a. (Merck KGaA, Germany)
uporaba: priprava fiziološke raztopine oz. receptorskega medija
- Brij[®] 98, (Aldrich Chemistry, Germany)
Uporaba: priprava receptorskega medija
- Tween[®] 40, (Merck Schuchardt OHG, Germany)
Uporaba: priprava receptorskega medija
- Brij[®] 72, (Ici Surfactants, UK)
Uporaba: priprava receptorskega medija
- Natrijev dodecil sulfat, (SDS), (Merck KGaA, Germany)
Uporaba: priprava receptorskega medija
- Albumin from chicken egg, white, Grade II, (Sigma Aldrich, Germany)
Uporaba: priprava receptorskega medija.

6.2 METODE

6.2.1 Izdelava večkomponentnega faznega diagrama

Izdelali smo sistem, ki vključuje štiri oz. pet komponent: oba emulgatorja, koemulgator ter oljno in vodno fazo. Izdelava tetraedričnega faznega diagrama, kjer bi spreminjali razmerja med vsemi štirimi komponentami, bi bilo dolgotrajno in zahtevno delo, zato sistem poenostavimo tako, da združimo tri spremenljivke v eno. V praksi to pomeni, da delamo pri konstantnem masnem razmerju obeh emulgatorjev in koemulgatorja. Tako dobimo trikomponentni fazni diagram v obliki enakostraničnega trikotnika, kjer vsaka komponenta predstavlja eno oglišče.

Trikomponentni fazni diagram smo izdelali z metodo titracije, kar pomeni, da znani količini zmesi emulgatorjev, koemulgatorja in oljne faze postopoma dodajamo vodo. Prednost te metode je manjša poraba surovin in hitrejši čas izdelave.

V čašo smo na analitski tehtnici (Exacta 2200EB, Tehtnica Slovenija) natehtali oba emulgatorja in izopropilmiristat v določenem razmerju. Komponente smo mešali čez noč na magnetnem mešalu, na vodni kopeli (25°C) do homogenosti. Naslednji dan smo homogeni zmesi dodali butanol in mešali na vodni kopeli 1 uro. Nato smo pripravljene zmesi postopno z mikropipeto dodajali bidestilirano vodo. Po vsakem dodatku vode smo nastalo disperzijo še ročno premešali in ocenili organoleptične lastnosti (bistrost, viskoznost, homogenost). Nastali disperziji smo z merjenjem električne prevodnosti in s kobaltovim papirčkom določili tip sistema. Kobaltov papirček se je v primeru o/v disperznih sistemov obarval roza zaradi vezave vode iz zunanje faze, v primeru v/o disperznih sistemov pa je ostal nespremenjene svetlo modre barve. Nastalim sistemom smo po vsakem dodatku vode izmerili specifično električno prevodnost s konduktometrom Iskra Conductivity meter MA 5964, Iskra, Ljubljana. Meritve smo izvajali pri 25°C, konstanta celica je znašala $0,7265\text{cm}^{-1}$. Postopno dodajanje vode nam je dalo vrsto točk, ki opisujejo eno razredčitveno linijo, opredeljeno s konstantnim razmerjem med emulgatorji in oljem, spreminja pa se delež vodne faze. S postopnim dodajanjem vode in spreminjanjem razmerja med emulgatorji in oljno fazo, smo dobili toliko razredčitvenih linij, da smo pokrili celoten fazni diagram.

6.2.2. Merjenje viskoznosti

Izbranim sistemom brez in z vgrajenim AP smo izmerili viskoznost z aparaturo VIBRO VISCOMETER, SV-10, A&D Company, Japan (slika 11) v temperaturnem intervalu od 20°C do 38°C.

Prednost viskometrov serije SV-10 oz. SV-100 je, da lahko merijo viskoznost vzorca v njegovem naravnem stanju, ne da bi ga ob tem poškodovali ali vplivali na njegovo temperaturo. Natančno izmerijo tudi temperaturo, kar omogoča merjenje viskoznosti s sočasnim spreminjanjem temperature.

Viskometer SV-10 ima dve tanki senzorski ploščici, ki ju poganja elektromagnetna sila, ki vzdržuje stalno amplitudo valovanja. Ploščici sinusno nihata z isto frekvenco v nasprotni smeri. Viskometer izmeri viskoznost tako, da zazna električni tok, ki je potreben, da senzorski ploščici nihata v resonanci pri stalni frekvenci 30 Hz in amplitudi, manjši od 1mm (35, 36).

Rezultat meritve Vibro Viscometra je produkt viskoznosti in specifične teže (teža določenega volumna preiskovane tekočine v primerjavi z enakim volumenom vode pri 4°C). Absolutno vrednost viskoznosti našega vzorca bi dobili torej tako, da bi morali izmerjeno vrednost deliti z njegovo specifično težo. Ker pa nas je bolj kot absolutna vrednost viskoznosti zanimala relativna primerjava med vzorci in spreminjanje viskoznosti s temperaturo, tega nismo storili.



Slika 11: Vibro viscometer SV-10.

6.2.3 Priprava nosilnih sistemov z AP

Učinkovino AP smo vgradili v izbrane sisteme iste razredčitvene linije (razredčitvena linija 8), katere začetna sestava je 60% PAS (dva emulgatorja v medsebojnem razmerju 1:1 in koemulgator v razmerju 1:1 glede na emulgatorja) in 40 % izopropilmiristata. Na omenjeni razredčitveni liniji smo izbrali samomikroemulgirajoč sistem (SMES), lipofilno mikroemulzijo (V/O), hidrofilno mikroemulzijo (O/V) in emulzijo (klasično emulzijo). Vsi sistemi so iz enakih sestavin, spremenjeno je le razmerje med njimi. Izjema so TK, ki se nahajajo na isti razredčitveni liniji, vendar ne vsebujejo butanola kot koemulgatorja. Emulgatorska zmes je sestavljena zgolj iz lecitina in Tweena[®] 80 v razmerju 1:1. Preglednica IV predstavlja recepturo nastalih nosilnih sistemov.

Preglednica IV : Receptura nosilnih sistemov (m/m%).

Sestavine	SMES	V/O ME	TK	O/V ME	E
<i>Lecitin</i>	15 %	13,49 %	22,5 %	3,0 %	0,75 %
<i>Tween 80</i>	15 %	13,83 %	22,5 %	3,07 %	0,77 %
<i>Izopropilmiristat</i>	40 %	35,87 %	30 %	7,97 %	1,99 %
<i>Butanol</i>	30 %	26,81 %	0 %	5,96 %	1,49 %
<i>voda</i>	0 %	10 %	25 %	80 %	95 %

6.2.3.1 Določanje maksimalnega deleža AP v nosilnih sistemih

Maksimalni delež AP v nosilnih sistemih smo določali po 24-ih urah. V erlenmajerico z obrusom smo natehtali ustrezno količino posamezne komponente in mešali na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi do homogenosti. Nato smo v sistem dodali presežno količino AP, zaščitili pred svetlobo in pustili mešati čez noč (24 ur). Drugi dan smo vzorce odstavili z mešala, počakali do vzpostavitve ravnotežja in jih nato centrifugirali na ultracentrifugi pod naslednjimi pogoji: 25000 min⁻¹, 20 min, temperatura 21°C. Dobljeni supernatant smo filtrirali skozi RC filter z velikostjo por 0,45 µm in ga analizirali na HPLC. Za določanje maksimalnega deleža vgrajenega AP smo uporabili metodo zunanega standarda. S primerjavo površin kromatografskih vrhov raztopin standarda in vzorcev smo določili količino AP v sistemih. Maksimalno količino vgrajenega AP smo podali kot delež vgrajenega AP glede na celotno količino analiziranega nosilnega sistema.

6.2.3.2 Spremljanje stabilnosti AP v nosilnih sistemih

AP smo vgradili v izbrane sisteme v koncentraciji 1% m/m in maksimalnem deležu značilnem za posamezni sistem. AP smo vgradili v predhodno narejene sisteme, vsakega smo izdelali v treh paralelah, masa posameznega vzorca pa je bila 15 g. Vzorce smo hranili v erlenmajericah z obrusom, tesno zaprte pri sobni temperaturi in zaščitene pred svetlobo. Vsebnost AP smo s HPLC metodo določali prvi, tretji, sedmi, štirinajsti, enaindvajseti, osemindvajseti dan, triinštirideseti in šestinpetdeseti dan.

6.2.3.2.1 Določanje vsebnosti AP v nosilnih sistemih s HPLC metodo

Vsebnost AP v vzorcih smo določali s HPLC (high performance liquid chromatography) metodo. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je metoda, ki nam omogoča, da se komponente vzorca ločijo na osnovi različne hitrosti potovanja skozi kolono, kjer iz mobilne faze stopajo v interakcije s stacionarno fazo. Metoda je uporabna za identifikacijo in kvantitativno določevanje spojin v zmesi.

a) Meritve smo izvajali na HPLC sistemu naslednje konfiguracije:

- razplinjevalec: WellChrom K-5004, Knauer, Nemčija;
- črpalka: Knauer K-501, Knauer, Nemčija;
- injektor: Knauer 079 s šestimi odprtinami, Knauer, Nemčija;
- detektor: LKB Bromma 2151 z možnostjo spremembe valovne dolžine, LKB Bromma, Švedska;
- integrator: računalniški program Barspec Data System (BDS) 1.12, Barspec System Inc., ZDA (37).

b) Kromatografski pogoji:

Mobilno fazo, ki so jo razvili in uporabljali za analizo AP na Katedri za FT (9) v sestavi: metanol : acetonitril : fosfatni pufer (0,02 M, pH=3,5) = 75 : 10 :15 smo dodatno spremenili, da bi se izognili obarjanju soli v mobilni fazi (zaradi prevelikih temperaturnih nihanj v laboratoriju) in cepitvi kromatografskih vrhov. Problem smo skušali rešiti s spremembo pH (znižanje na 2,5) in koncentracije puфра. Za optimalno rešitev se je izkazala sprememba koncentracije puфра na 0,01 mg/mL in ohranitev pH na 3,5. Meritve smo torej izvajali pod naslednjimi kromatografskimi pogoji:

- kolona: Eurospher[®] C18 (5 μ m), 120x4 mm;
- mobilna faza: metanol : acetonitril : fosfatni pufer (0,01 M, pH=3,5) = 75 : 10 :15;
- pretok: 1,5 ml/min;
- valovna dolžina detekcije: $\lambda = 254$ nm;
- volumen injiciranja: 50 μ l.

Za določanje vsebnosti AP smo uporabili metodo eksternega standarda. S primerjavo površin kromatografskih vrhov raztopin standarda in vzorcev smo določili vsebnost AP v vzorcih.

c) Priprava raztopin za HPLC meritve

- **Priprava raztopin standarda**

Raztopino standarda AP s koncentracijo 0,1mg/ml smo pripravili z 0,008 M natrijevim tiosulfatom v metanolu. Natrijev tiosulfat smo uporabili za stabilizacijo nestabilnega AP. Ustreznost kromatografskega sistema smo preverili s petkratnim zaporednim injiciranjem raztopine standarda. Relativna standardna deviacija površin kromatografskih vrhov mora biti manjša ali enaka 2 %, kar je ustrezalo tudi v našem primeru, saj je bila relativna standardna deviacija v povprečju manjša od 1 %.

- **Priprava raztopin vzorca**

250 mg vzorca z 1% m/m deležem AP smo raztopili v 25 ml bučki z 0,008 M natrijevim tiosulfatom v metanolu. Zaradi nestabilnosti AP smo vzorce vedno pripravili neposredno pred analizo, posamezen vzorec smo injicirali dvakrat. Vzorce z maksimalnim deležem vgrajenega AP pa smo pripravili tako, da smo 100 mg vzorca natehtali v 10 ml bučko, redčili za faktor 10 in dvakrat analizirali.

d) Izračun vsebnosti

Vsak vzorec smo dvakrat injicirali in izračunali povprečje površin kromatografskih vrhov ter upoštevali, da je površina kromatografskih vrhov direktno sorazmerna s koncentracijo AP. Iz znane začetne mase vgrajenega AP in povprečne površine kromatogramov vzorcev smo izračunali koncentracijo oz. maso AP v vzorcih. Vsebnost smo določili z metodo eksternega standarda in jo podali kot % nerazgrajenega AP glede na začetno količino vgrajenega AP.

6.2.4. In vitro vrednotenje sproščanja in permeacije AP iz nosilnih sistemov

Sproščanje AP iz izbranih nosilnih sistemov in porazdelitev v kožo smo spremljali s Franz-ovo difuzijsko celico, sestavljeno iz donorskega in akceptorskega dela, med katera namestimo umetno membrano ali kožo. Velikost odprtine med donorskim in akceptorskim delom je 1 cm oz. 0,785 cm². Volumen akceptorskega dela je 8 ml z delom za odvzem vzorca oz. nadomeščanje receptorskega medija. Celico postavimo v vodno kopel z namenom vzdrževanja konstantne temperature.

6.2.4.1 Sproščanje AP iz izbranih nosilnih sistemov preko umetne membrane

a) Priprava vzorcev

Vzorci z 1 % m/m in maksimalno vsebnostjo AP smo pripravili 24 ur pred izvedbo poskusa, tako, da se je učinkovina popolnoma vgradila v sistem. Pripravili smo 5 g vzorca v dveh oz. štirih paralelah. Na membrano v donorskem delu Franz-ove celice smo nanegli 600 mg formulacije.

b) Izbira receptorskega medija

Z namenom, da bi za sproščanja AP uporabili optimalen receptorski medij, smo predhodno testirali različne receptorske medije. V preglednici V so predstavljene kombinacije sestavin za različne vodne (medij: prečiščena voda) oz. lipofilne (medij: izopropilmiristat) receptorske medije. Na osnovi rezultatov vgrajenega maksimalnega deleža in stabilnosti AP v posameznem receptorskem mediju ter glede na izgled kromatografskih vrhov, smo se odločili za dva receptorska medija na osnovi vodne faze v sestavi: 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®]98 + 0,01 M natrijev tiosulfat in 0,9 % NaCl + 0,5 % Tween[®]40 + 0,01 M natrijev tiosulfat ter za lipofilni receptorski medij z 1 % Tween[®]40 v izopropilmiristatu (IPM).

Preglednica V: Kombinacije sestavin za ustrezn receptorski medij.

Organski receptorski medij	Fiziološki vodni receptorski medij
Izopropil miristat (IPM) + 1 % albumin	0,9 % NaCl + 2 % albumin + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 1 % natrijev dodecildulfat (SDS)	0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 72 + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 1 % Tween [®] 40	0,9 % NaCl + 0,5 % Tween [®] 40 + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 1 % Imwitor [®] 308	0,9 % NaCl + 0,5 m/V % SDS + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 0,5 % Tween [®] 40 + 0,5 % Imwitor [®] 308	0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 72 + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 0,01 M natrijev tiosulfat	0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat
IPM + 1 % Brij [®] 72	
IPM + 1 % Brij [®] 98	

c) Vzorčenje in analiza

Sproščanje AP smo izvedli skozi celulozno acetatno membrano (Sartorius, Göttingen, Germany) z velikostjo por 0,2 μm , katero smo 24 ur pred izvedbo poskusa namakali v ustreznem receptorskem mediju. Temperatura receptorskega medija je bila $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Poskus je potekal 6 oz. 24 ur, in sicer v dveh oz. štirih paralelah. V naprej določenih intervalih smo vzorčili 650 μl receptorskega medija, in sicer smo v prvi uri odvzeli 4 vzorce vsakih 15 minut, nato 4 vzorce v polurnih razmikih in še 3 vzorce v enournih razmikih. Vsebnost AP v vzorcih smo kvantitativno določili s HPLC analizo. Predhodna priprava vzorcev receptorskega medija z vodno osnovo ni bila potrebna, vzorce z lipofilnim medijem pa smo predhodno redčili z 0,008M raztopino natrijevega tiosulfata v metanolu.

Količino sproščenega AP smo izračunali glede na eksterni standard AP v istem receptorskem mediju. Rezultat smo podali kot kumulativno količino sproščenega AP na enoto površine za sproščanje ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

6.2.4.2 Permeabilnost AP iz izbranih nosilnih sistemov skozi kožo prašičjega uhlja

a) Priprava vzorcev

Vzorci z 1 % m/m in maksimalnim deležem AP smo pripravili vedno 24 ur pred izvedbo samega poskusa in jih pustili, tako da se je učinkovina popolnoma vgradila v sistem. Pripravili smo 10 g vzorca in poskus izvedli v štirih paralelah. Na kožo v donorskem delu Franz-ove celice smo nanесли 1000 mg formulacije.

b) Priprava kože

Poskus permeabilnosti AP smo izvedli skozi izolirano kožo prašičjega uhlja. Prašičje uhlje smo dobili iz domače reje. Sveže vzorce prašičjih ušes smo oprali, posušili z brisačo in jih shranjevali v zamrzovalniku. Pred uporabo smo ušesa odtajali pri sobni temperaturi približno eno uro, jih nato previdno oprali, odstranili dlake in s skalpelom ločili plast dermisa in epidermisa (debelina plasti cca. 1mm) od hrustanca. S spodnje strani vzorca kože smo previdno odstranili ostanke maščobe in plast kože v velikosti približno 5 cm² vstavili v Franz-ovo difuzijsko celico. Akceptorski del Franz-ove difuzijske celice smo napolnili s vodnim receptorskim medijem (0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat) in tako pripravljene vzorce dali v vodno kopel pri 37 °C čez noč. Pred izvedbo poskusa smo receptorski medij zamenjali z 8 ml svežega receptorskega medija iste sestave.

c) Vzorčenje in analiza

Permeacijo AP skozi kožo prašičjega uhlja smo spremljali 6 ur. Temperatura receptorskega medija je bila 37 ± 0,5°C. V naprej določenih časovnih intervalih (na 30 minut prvo uro, nato vsako uro) smo vzorčili 1 ml vzorca. Po šestih urah smo iz površine kože odstranili formulacijo in s segrevanjem ločili plasti dermisa in epidermisa. Obe plasti smo nato razrezali na male koščke in iz obeh ekstrahirali AP v 0,008 M raztopino tiosulfata v metanolu s steklenimi kroglicami na vorteksu. Ekstrakcijo iz epidermisa smo izvedli dvakrat s 600 µl oz. iz dermisa trikrat z 1,2 ml ekstrakcijske raztopine. Vzorce smo filtrirali skozi PTFE filtre z velikostjo por 0,45 µm.

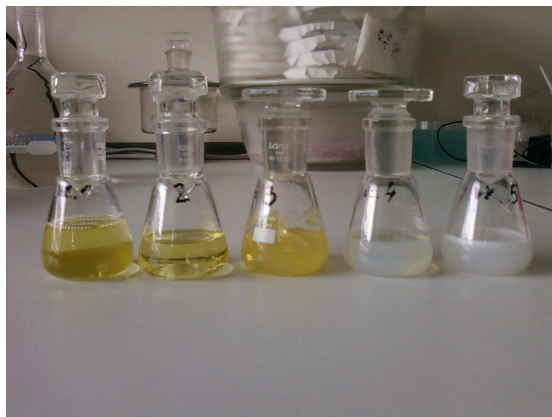
AP v vzorcih smo kvantitativno določili s HPLC analizo. Predhodna priprava vzorcev ni bila potrebna. Količino sproščenega AP smo izračunali iz površine kromatografskega vrha glede na eksterni standard AP v receptorskem mediju. Rezultat smo podali kot kumulativno količino sproščenega AP na enoto površine kože (µg/ cm²).

7. REZULTATI IN RAZPRAVA

7.1 IZDELAVA VEČKOMPONENTNEGA FAZNEGA DIAGRAMA

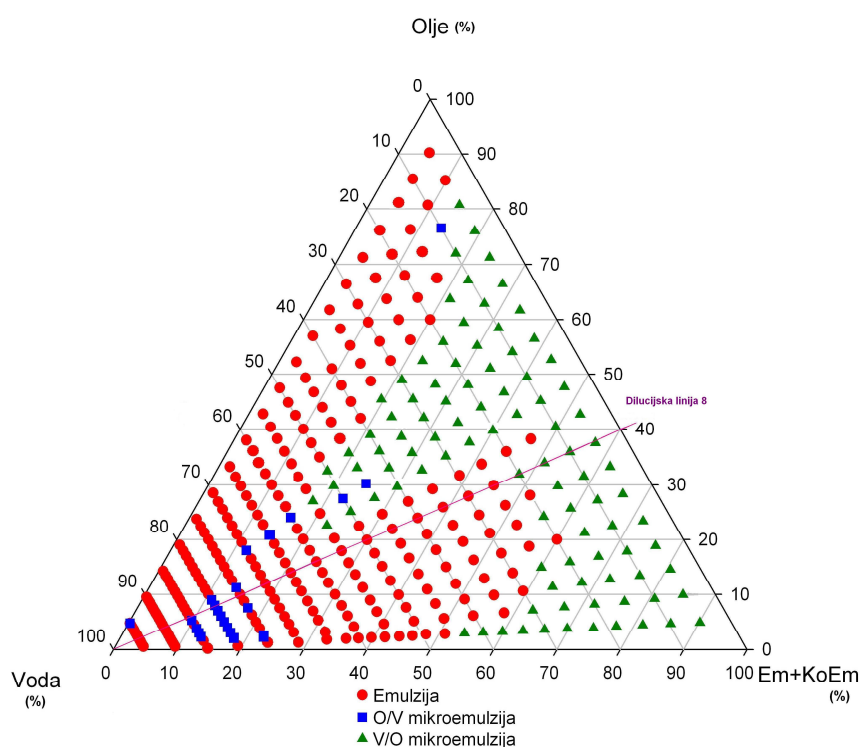
Proučevali in vrednotili smo štirikomponentni sistem sestavljen iz oljne in vodne faze ter emulgatorja in koemulgatorja. Izdelali smo fazni diagram, ki velja za enega izmed uporabnih pristopov za prikaz interakcij in struktur, ki nastanejo v takih sistemih. Večkomponentne sisteme smo izdelali iz lecitina in Tweena[®] 80 kot emulgatorjev, butanola kot koemulgatorja, izopropilmiristata kot oljne faze ter bidestilirane vode kot hidrofilne faze. Izopropilmiristat in Tween[®] 80 sta pogosto uporabljani komponenti dermalnih izdelkov, saj sta netoksični in ne povzročata iritacij. Lecitin poleg netoksičnosti, neiritabilnosti, biokompatibilnosti in biorazgradljivosti izkazuje še emolientno delovanje. Butanol kot koemulgator pa zaradi interakcij z lecitinom poveča področja nastanka mikroemulzij.

Za vse nastale strukturno različne sisteme je značilno konstantno razmerje emulgatorske (Tween[®] 80 : lecitin = 1:1) in koemulgatorske (butanol) zmesi 1:1. Fazni diagram smo izdelali s titracijsko metodo, kar pomeni, da smo izbrani izhodni sestavi oljne faze in emulgatorske zmesi postopoma, med mešanjem, dodajali vodo. Sisteme, ki so nastali, smo ocenili organoleptično (bistrot, konsistenca, izgled), določili tip disperzije s kobaltovim papirčkom ter izmerili električno prevodnost. Izgled nastalih sistemov predstavlja slika 12. Na njej je prikazan tudi sistem s TK (vzorec 3), ki so bili predhodno razviti na Katedri za farmacevtsko tehnologijo in imajo enako sestavo komponent, vendar ne vsebujejo butanola. Nastali sistemi se razlikujejo po bistroti in viskoznosti. SMES-i in V/O ME so bistri, transparentni, nizko viskozni koloidni sistemi. Z večanjem deleža vode postanejo sistemi opalescentni v primeru O/V ME in motni v primeru emulzij (E). V obeh primerih pa je ohranjena nizka viskoznost. Večjo viskoznost in manjšo transparentnost v primerjavi s SMES-i in V/O ME pa je mogoče opaziti pri TK.



Slika 12: Izbrani nosilni sistemi (1- SMES, 2- V/O ME, 3- TK, 4- O/V ME, 5- E).

Nastanek različnih struktur, ki so nastale iz začetne zmesi lipofilne faze in emulgatorjev (SMES-i) ob postopnem dodajanju vode in po mešanju na magnetnem mešalu ter njihova območja, prikazuje slika 13. Iz SMES-ov so tako po določeni količini dodane vode najprej nastale V/O ME, z nadaljnjim naraščanjem deleža vode O/V ME in na koncu še emulzije (O/V).



Slika 13: Večkomponentni fazni diagram (izopropilmiristat/ lecitin/ Tween[®] 80/ butanol/ voda), ki prikazuje območja nastanka V/O ME, O/V ME in emulzij.

Nastalim sistemom smo s pomočjo kobaltovih papirčkov in merjenjem prevodnosti določili tip nastalega sistema (O/V oz. V/O). V sistemih tipa O/V, kjer je zunanja faza voda, se papirček obarva roza; kjer pa je zunanja oljna faza, ostane na papirčku le moder, oljnat madež. Sprememba barve v prisotnosti vode temelji na kemični reakciji prehoda $\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, ki je modre barve, v roza $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Papirčki spremenijo barvo tudi v prisotnosti vlage iz zraka, zato jih shranjujemo v zaprtih posodah s silikagelom, ki nase veže prisotno vlago ter tako ohranja obliko $\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (30).

7.2 VREDNOTENJE NASTALIH KOLOIDNIH SISTEMOV

Z izdelavo pseudoternarnega faznega diagrama smo iz začetnih SMES-ov ugotovili področja nastanka V/O ME, O/V ME in emulzij. Zanimala so nas predvsem območja nastanka ME zaradi njihovih številnih ugodnih lastnosti za dermalno aplikacijo. Za nadaljnji študij smo na osnovi faznega diagrama izbrali strukturno različne nosilne sisteme, ki ležijo na isti razredčitveni liniji in imajo ohranjeno razmerje med lipofilno fazo in emulgatorji. V našo študijo smo vključili tudi sisteme, ki so bili predhodno razviti na Katedri za farmacevtsko tehnologijo in po svoji sestavi ustrezajo sistemom izbrane razredčitvene linije, označene na sliki 13, vendar ne vsebujejo butanola. Gre za liotropne tekoče kristale, katerih konsistenca je prav tako ugodna za dermalno aplikacijo. Sestavo sistemov izbrane razredčitvene linije predstavlja preglednica VI.

Preglednica VI : Sestava nastalih sistemov (m/m %.)

Sestavine	SMES	V/O ME	TK	O/V ME	E
<i>Lecitin</i>	15 %	13,49 %	22,5 %	3,0 %	0,75 %
<i>Tween[®] 80</i>	15 %	13,83 %	22,5 %	3,07 %	0,77 %
<i>Izopropilmiristat</i>	40 %	35,87 %	30 %	7,97 %	1,99 %
<i>Butanol</i>	30 %	26,81 %	0 %	5,96 %	1,49 %
<i>voda</i>	0 %	10 %	25 %	80 %	95 %

Zaradi ugodne konsistence in videza smo želeli nastale sisteme z lecitinom podrobneje ovrednotiti in proučiti njihov vpliv na dermalno aplikacijo modelne učinkovine AP.

Nastalim sistemom smo najprej izmerili viskoznost v odvisnosti od temperature, nato pa vanje vgradili lipofilni derivat vitamina C, askorbilpalmitat (AP), ki se zaradi svoje amfifilne strukture porazdeljuje na medfazi in kot antioksidant izkazuje številne ugodne učinke v koži. V izbranih sistemih smo določili maksimalni delež in stabilnost vgrajenega AP. Vzorce, v katerih je bila stabilnost AP največja, smo nadalje uporabili v študijah sproščanja AP skozi umetno membrano ter permeacije skozi kožo prašičjega uhlja.

7.2.1 Določanje maksimalnega deleža vgrajenega AP v nosilnih sistemih

Maksimalni delež vgrajenega AP v preiskovanih nosilnih sistemih je največja količina AP, ki jo je možno vgraditi v posamezni sistem. Odvisen je od hidro-lipofilnih lastnosti komponent nosilnega sistema ter medsebojnih interakcij med njimi in učinkovino. Maksimalno količino vgrajenega AP v posamezni nosilni sistem, izraženo v % in podano kot razmerje med količino vgrajenega AP in maso nosilnega sistema z vgrajeno učinkovino, predstavlja preglednica VII.

Preglednica VII: Maksimalni delež vgrajenega AP v posameznem nosilnem sistemu v %.

Nosilni sistem	% vgrajenega AP
SMES	16,04
V/O ME	11,69
TK	6,90
O/V ME	0,109
E	0,073

Z vidika sposobnosti vgrajevanja AP so se kot najboljši izkazali SMES-i, sledijo jim V/O ME in TK. V O/V ME in emulzije pa lahko vgradimo manj kot 1% AP, zato smo ta dva sistema iz nadaljnjih raziskav izključili. 1 (m/m) % AP je namreč tista najmanjša koncentracija, ki je še učinkovita v izdelkih za dermalno aplikacijo.

Z določitvijo maksimalnega deleža AP v posameznem sistemu smo ugotovili, da je v sisteme z večjim deležem lipofilne faze mogoče vgraditi večjo količino AP. Posledično, z večanjem deleža hidrofilne faze maksimalni delež vgrajenega AP pada. V SMES-e, ki vsebujejo zgolj lipofilno fazo in emulgatorje, lahko vgradimo največ AP, kar je bilo tudi pričakovano. Z večanjem deleža vode v ostalih sistemih (V/O ME, TK, O/V ME in E) pa

se je delež vgrajenega AP zmanjševal, kar potrjuje prevladujoče izražene lipofilne lastnosti AP.

7.2.2 Določanje viskoznosti

V preiskovanih sistemih smo z Vibro viskometrom SV-10 določali spreminjanje viskoznosti v odvisnosti od temperature. Natančneje smo želeli ovrednotiti predvsem vpliv strukture in vgrajene učinkovine na viskoznost. Meritve smo izvajali v temperaturnem razponu od 20° do 38°C. Ta temperaturni interval zajema sobno temperaturo (20-25°C), temperaturo na površini kože (32°C) in telesno temperaturo (37°C).

Najprej smo izmerili viskoznost osnovnim komponentam: bidestilirani vodi, izopropilmiristatu, Tweenu® 80 in butanolu. Rezultati teh meritev so prikazani v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Temperaturna odvisnost viskoznosti osnovnih komponent.

T (°C)	Viskoznost komponente (mPas)			
	bidestilirana voda	IPM	Tween® 80	butanol
20	0,87	3,46	789	58,6
21	0,84	3,35	771	56,3
22	0,83	3,21	666	53,7
23	0,81	3,14	615	53,3
24	0,8	3,04	570	50,6
25	0,8	2,96	524	48,5
26	0,79	2,81	480	47,7
27	0,79	2,77	440	48,2
28	0,78	2,7	404	48,6
29	0,78	2,62	377	47,5
30	0,77	2,54	352	46,6
31	0,73	2,46	328	45,4
32	0,73	2,38	309	44,7
33	0,72	2,31	290	44,3
34	0,71	2,19	272	43
35	0,7	2,13	250	42
36	0,68	2,08	236	40,6
37	0,68	2,01	222	40,3
38	0,67	1,97	208	39,8

Izmerjene vrednosti viskoznosti osnovnih komponent v preglednici VIII kažejo, da ima od osnovnih komponent najvišjo viskoznost Tween® 80, ki je bistveno bolj viskozen kot voda, IPM in butanol. Zato pričakujemo, da bo najbolj vplival tudi na viskoznost nosilnih

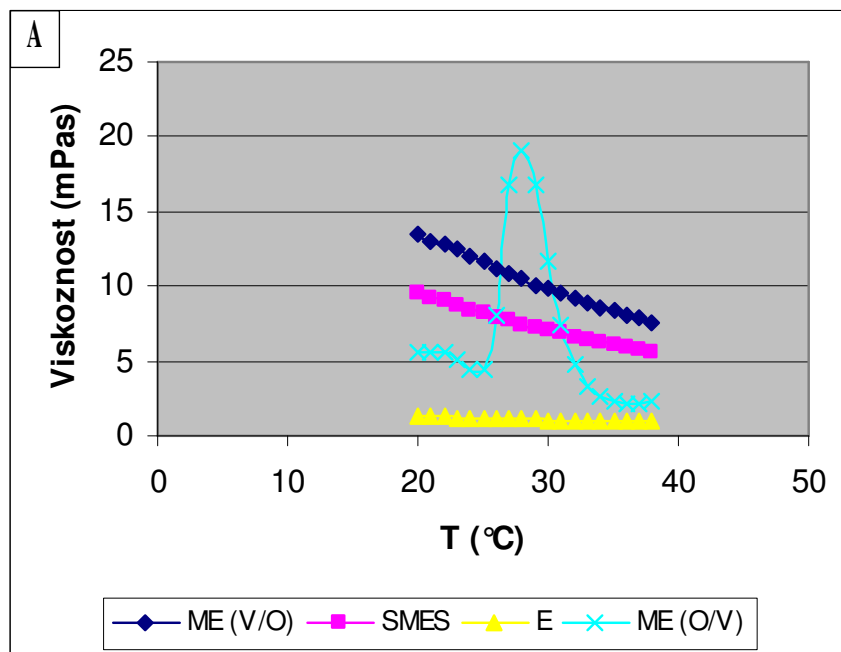
sistemov. Vendar je potrebno izpostaviti, da na viskoznost sistemov vpliva tudi notranja strukturiranost disperzij, ki je odvisna od vsebnosti PAS in deleža vode ter njihovih medsebojnih interakcij.

V nadaljevanju smo izmerili viskoznost nosilnim sistemom v odvisnosti od temperature, kar je predstavljeno v preglednici IX in na sliki 14. Ker imajo TK v primerjavi z ostalimi sistemi bistveno večjo viskoznost (za faktor 1000), smo njihove vrednosti viskoznosti predstavili ločeno.

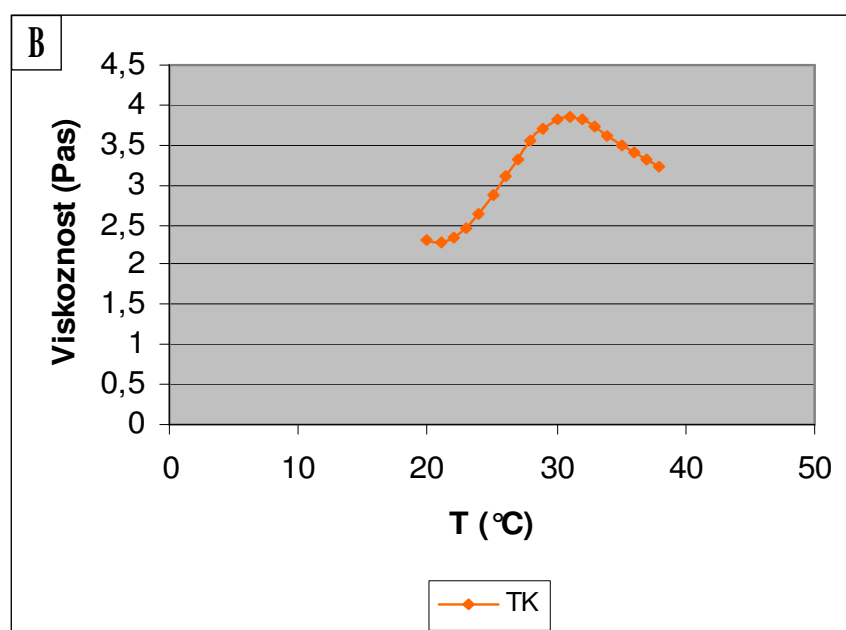
Preglednica IX: Spreminjanje viskoznosti nosilnih sistemov: SMES-ov, V/O ME, TK, O/V ME in emulzij (E) s temperaturo.

T (°C)	Viskoznost (mPas)				Viskoznost (Pas)
	V/O ME	SMES	E	O/V ME	TK
20	13,45	9,585	1,295	5,645	2,295
21	13,05	9,265	1,275	5,565	2,27
22	12,75	9	1,24	5,51	2,335
23	12,45	8,73	1,21	5,13	2,465
24	11,95	8,425	1,19	4,44	2,635
25	11,6	8,18	1,16	4,44	2,87
26	11,2	7,935	1,145	8,055	3,11
27	10,8	7,68	1,115	16,75	3,31
28	10,45	7,47	1,095	19,15	3,54
29	10,1	7,21	1,075	16,7	3,7
30	9,795	7,045	1,055	11,7	3,815
31	9,485	6,845	1,035	7,475	3,855
32	9,18	6,63	1,02	4,77	3,83
33	8,885	6,47	1,005	3,275	3,735
34	8,59	6,29	0,985	2,59	3,615
35	8,33	6,115	0,97	2,3	3,495
36	8,085	5,96	0,95	2,125	3,395
37	7,83	5,815	0,94	2,11	3,31
38	7,595	5,625	0,925	2,255	3,225

*Vse vrednosti so povprečje dveh meritev.



Slika 14: A) Spreminjanje viskoznosti SMES-ov, V/O ME, O/V ME in E s temperaturo.



Slika 14: B) Spreminjanje viskoznosti TK s temperaturo.

Najvišjo viskoznost imajo TK, sledijo jim V/O ME, SMES-i, O/V ME in emulzije. Ugotovili smo, da se viskoznost preiskovanih sistemov povečuje z višanjem deleža PAS in vode (do približno 80 %), kar dokazuje, da ima poleg Tweena[®] 80 na viskoznost odločilen vpliv tudi voda oziroma njene interakcije z lecitinom, ki je del emulgatorskega filma. V/O ME imajo tako v primerjavi s SMES-i zaradi večjega deleža vode tudi večjo viskoznost.

Sistemi O/V ME in E vsebujejo 80 oz. 95 % vode in zelo nizek delež PAS-lecitina, ki bi interagiral z vodo, zato je njihova viskoznost nižja. Lecitin namreč s svojim nabrekanjem sistem zgosti.

Iz slike 14 je tudi razvidno, da se pri V/O ME, SMES-ih in E viskoznost linearno zmanjšuje s temperaturo, medtem ko je krivulja spreminjanja viskoznosti pri O/V ME podobna kot pri TK in ima obliko parabole.

Slika 14B posebej prikazuje viskoznost TK, ki vsebujejo 25 % vode. Le-ta se povečuje do ~ 30°C, največja je pri 31°C, tj. 3,855Pas, nato pa z višanjem temperature pada. Bistveno višja viskoznost TK v primerjavi z ostalimi sistemi je posledica tvorbe vodikovih vezi med vodo in hidrofilno glavo fosfatidilholina. Fosfatidilholin začne nabrekati in konsistenca se poveča. Zmanjšanje viskoznosti TK z naraščanjem temperature pa si razlagamo na dva načina, in sicer kot posledica faznega prehoda: gel – tekoče kristalno in izhlapevanja vode. Značilnost amfifilnih fosfolipidov, kakršen je tudi lecitin, je, da pri specifični temperaturi, ki jo imenujemo temperatura faznega prehoda, prehajajo iz ene faze v drugo. Pod to temperaturo je urejenost verig maščobnih kislin v fosfatidilholinu, ki predstavlja najmanj 94% uporabljenega lecitina (Lipoid S-100[®]), velika, gibljivost pa majhna, zato to fazo imenujemo gel oz. trda faza. Nad temperaturo faznega prehoda pa je kinetična energija molekul in gibljivost večja, njihova urejenost pa manjša, zato se to stanje imenuje tekoče kristalno stanje (38). Temperatura faznega prehoda je karakteristična za čiste fosfolipide in za Lipoid S-100[®] znaša 65°C (39). Njena vrednost se spreminja s pH okolja, prisotnostjo kovinskih ionov v sistemu, stopnjo urejenosti molekule, vpliv pa ima tudi masno razmerje med komponentami sistema (38). Sklepamo, da je zadnji dejavnik, to je masno razmerje med lecitinom in vodo v TK, ki je 1: 1,1, ključnega pomena za znižanje temperature faznega prehoda na 30-31°C. Upoštevati velja, da pride z višanjem temperature do izhlapevanja vode in do posledičnega zmanjšanja interakcij med lecitinom in vodo, preureditve v lamelarni strukturi TK, manjšega nabrekanja, kar vse povzroči znižanje viskoznosti. Do podobnega pojava je prišlo tudi pri O/V ME, ki vsebujejo 80 % vode (Slika 14A) in v katerih je razmerje med lecitinom in vodo 1:26. Ta pojav si razlagamo na podoben način, le da je v tem primeru delež lecitina v primerjavi s TK manjši. Dokaz za spremembe v notranjosti strukture O/V ME so tudi vidne organoleptične spremembe. Pri 27°C, kjer je dosežena maksimalna vrednost viskoznosti, je prej opalescentna O/V ME postala motna.

Preverili smo, ali obstaja linearna odvisnost viskoznosti posameznega nosilnega sistema od temperature in izračunali vrednosti temperaturnega koeficienta za posamezni nosilni sistem. Dobljeni rezultati so predstavljeni v preglednici X.

Preglednica X: Linearna odvisnost viskoznosti od temperature in vrednosti temperaturnega koeficienta za posamezni nosilni sistem.

Nosilni sistem	R ²	Temperaturni koeficient (%/°C)
SMES	0,9893	-2,98
V/O ME	0,9938	-3,16
TK	0,9717 (naraščajoč del), 0,9892 (padajoč del)	1,61
O/V ME	0,9533 (naraščajoč del), 0,8274 (padajoč del)	-2,76
E	0,9881	-1,89

Odnos med temperaturo in viskoznostjo je obratno sorazmeren, kar pomeni, da se viskoznost sistemov pri višji temperaturi zmanjša. Medsebojno odvisnost viskoznosti in temperature ponazarja temperaturni koeficient (*enačba 1*), ki je podan kot razmerje med spremembo viskoznosti in temperature ter povprečne vrednosti viskoznosti v izbranem temperaturnem intervalu, podano v %/°C. Če je temperaturni koeficient blizu nič, pomeni, da se viskoznost s temperaturo ne spreminja bistveno. Bolj ko je temperaturni koeficient negativen, bolj viskoznost s temperaturo pada, kar nakazuje na strukturne spremembe.

$$\text{Temp. koef.} = \frac{\eta(\text{končna}) - \eta(\text{začetna})}{T(\text{končna}) - T(\text{začetna})} \cdot 100 \quad (\%/^{\circ}\text{C}) \quad (\text{enačba 1})$$

Ugotovili smo, da je linearna odvisnost viskoznosti od temperature izražena pri V/O ME, SMES-ih in emulzijah. Pri TK se je izkazalo, da viskoznost dokaj linearno narašča do maksimalne vrednosti in potem spet dokaj linearno pada. Pri O/V ME pa ne moremo govoriti o linearni odvisnosti.

Iz izračunanih vrednosti temperaturnega koeficienta vidimo, da je le-ta najbolj negativen pri V/O ME. Sledijo jim SMES-i, O/V ME in emulzije. Pri TK pa je vrednost temperaturnega koeficienta pozitivna, kar se sicer ne sklada z izgledom temperaturne

odvisnosti viskoznostne krivulje. Negativne vrednosti temperaturnega koeficienta so tako še dodatno potrdile, da je sprememba viskoznosti posledica strukturnih sprememb.

V nadaljevanju smo nato proučevali vpliv vgrajenega AP na viskoznost. AP smo v nosilne sisteme vgradili v dveh koncentracijah: a) 1 m/m % in

b) maksimalnem deležu značilnem za posamezni sistem.

Izbrali pa smo zgolj sisteme, v katere lahko vgradimo najmanj 1 m/m % učinkovine; torej SMES-e, V/O ME in TK. Vpliv vgrajenega AP na njihovo viskoznost je predstavljen v preglednici XI in na sliki 15.

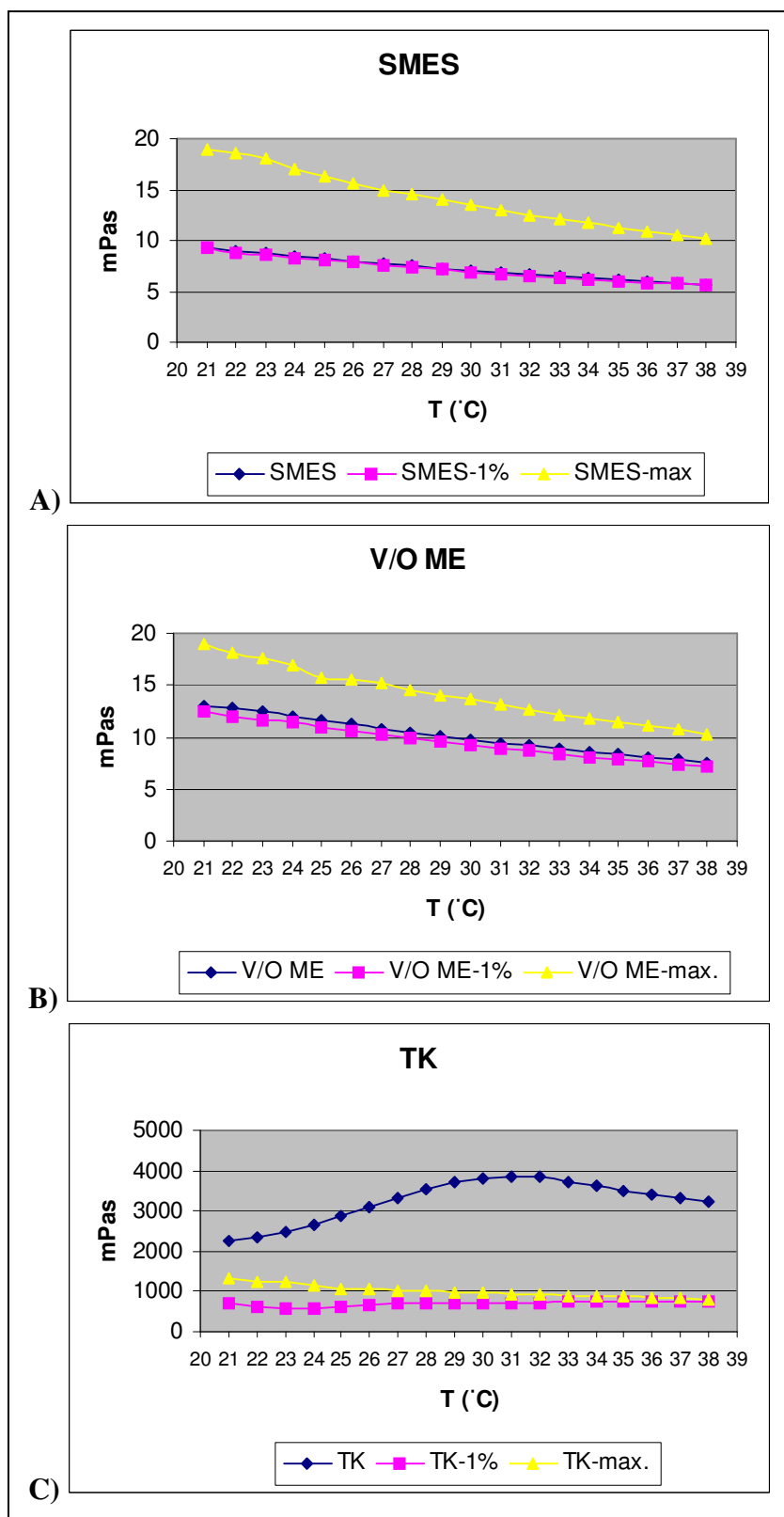
Preglednica XI: Spreminjanje viskoznosti izbranih nosilnih sistemov z vgrajenim AP v odvisnosti od temperature pri:

- 1m/m % AP,

- maksimalnem deležu AP v izbranem nosilnem sistemu.

Viskoznost (mPas) / Sistem									
T	V/O ME	V/O ME	V/O ME	SMES	SMES	SMES	TK	TK	TK
(°C)		- 1%	- max.		-1%	-max		-1%	-max.
21	13,05	12,4	19	9,27	9,23	18,9	2270	688	1310
22	12,75	12	18,1	9	8,84	18,6	2335	612	1260
23	12,45	11,7	17,6	8,73	8,55	18	2465	573	1220
24	11,95	11,4	16,9	8,43	8,31	17	2635	595	1160
25	11,6	11	15,8	8,18	8,07	16,3	2870	632	1080
26	11,2	10,6	15,5	7,94	7,82	15,6	3110	671	1060
27	10,8	10,2	15,2	7,68	7,59	15	3310	687	1030
28	10,45	9,88	14,6	7,47	7,36	14,5	3540	700	1010
29	10,1	9,56	14,1	7,21	7,13	14	3700	709	982
30	9,8	9,25	13,6	7,05	6,92	13,5	3815	714	966
31	9,48	8,92	13,1	6,85	6,73	13	3855	719	944
32	9,18	8,64	12,7	6,63	6,55	12,5	3830	724	921
33	8,89	8,39	12,2	6,47	6,36	12,1	3735	731	903
34	8,59	8,1	11,8	6,29	6,17	11,7	3615	739	881
35	8,33	7,87	11,4	6,12	6,04	11,3	3495	747	864
36	8,09	7,62	11,1	5,96	5,87	10,9	3395	754	845
37	7,83	7,3	10,7	5,82	5,72	10,6	3310	760	829
38	7,6	7,19	10,3	5,63	5,55	10,2	3225	765	812

* Vse vrednosti so povprečje dveh meritev.



Slika 15: Spreminjanje viskoznosti sistemov z vgrajenim AP v odvisnosti od temperature pri 1 m/m % koncentraciji AP in maksimalnem deležu AP v izbranem nosilnem sistemu (A-SMES, B-V/O ME, C-TK).

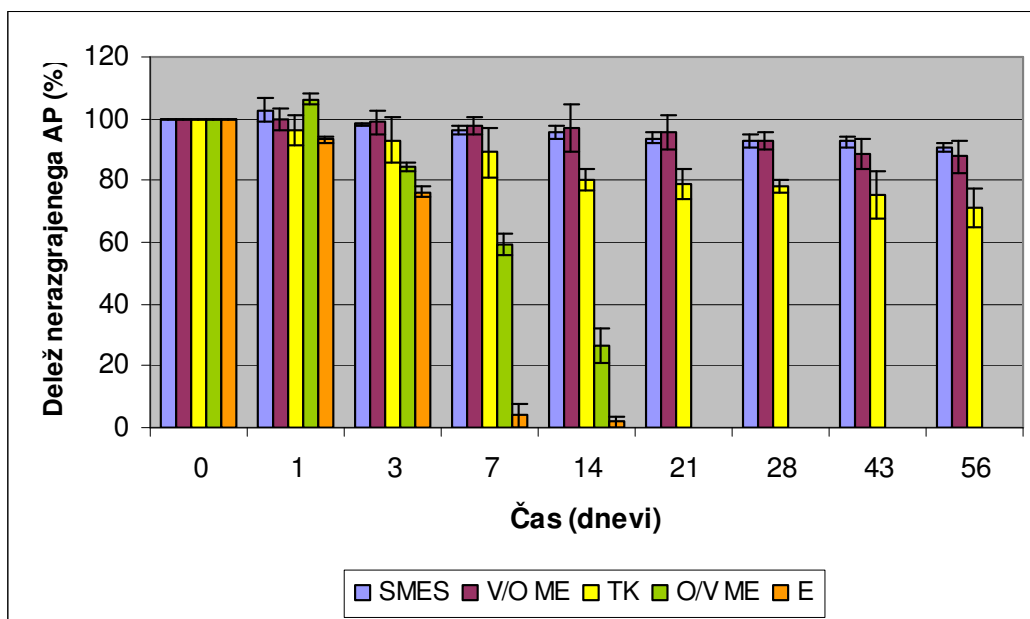
Ugotovili smo, da 1 m/m % koncentracija AP v SMES-u in V/O ME ne vpliva bistveno na viskoznost in posledično konsistenco nosilnega sistema, medtem ko maksimalni delež vgrajenega AP bistveno poveča viskoznost sistemov. AP vgrajen v TK pa je zmanjšal njihovo viskoznost, in sicer pri 1 % koncentraciji bolj kot pri vgrajeni maksimalni količini. Iz slike 15C je razvidno tudi, da vgrajen AP vpliva na strukturo v TK, saj se oblika krivulje, ki prikazuje temperaturno odvisnost viskoznosti, spremeni v dokaj linearni odnos. Sklepamo, da se AP zaradi amfifilne strukture porazdeli med molekule lecitina in zmanjša interakcije med njim in vodo, ki so odgovorne za večjo viskoznost.

7.2.3 Stabilnost AP

Kot modelno učinkovino smo v diplomski nalogi proučevali AP, ki je bil sintetiziran z namenom povečanja stabilnosti vitamina C.

Esterifikacija na mestu 6 s palmitinsko kislino sicer zmanjša hidrolizo askorbinske kisline, vendar pa ne zagotovi zadostne stabilnosti v končnih izdelkih, zato je za dermalno učinkovitost AP pomembna izbira optimalnega nosilnega sistema (24).

Nestabilnost AP je namreč posledica oksidativne razgradnje, ki je katalizirana s svetlobo in/ali kovinskimi ioni in poteka v večjem obsegu v bolj razredčenih sistemih. Zato smo proučevali vpliv nosilnega sistema ter začetne koncentracije AP na njegovo stabilnost. AP smo vgradili v maksimalnem deležu v vse nastale sisteme: SMES-e, V/O ME, TK, O/V ME in E ter v 1 m/m % koncentraciji zgolj v sisteme, v katerih je maksimalna količina vgrajenega AP večja od 1 m/m %, t.j. SMES, V/O ME in TK. Deleži nerazgrajenega AP po 56 dneh shranjevanja v temi so predstavljeni na slikah 16 in 17.

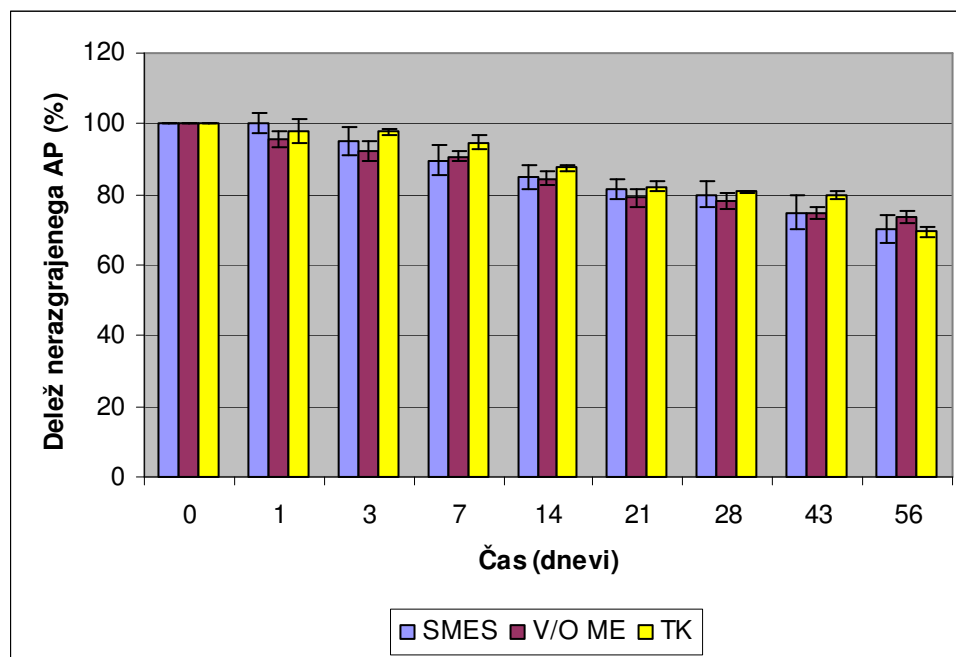


Slika 16: Grafični prikaz stabilnosti vgrajenega AP v sistemih z maksimalnim deležem v odvisnosti od časa podanega v dnevih (n=3).

V sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem AP je največji delež nerazgrajenega AP po 56-ih dneh v SMES-ih, sledijo V/O ME in TK. Delež nerazgrajenega je v vseh treh primerih večji od 70 %. V O/V ME in emulzijah je ves AP razpadel že do 21. dne.

Ugotovili smo, da obseg razgradnje AP narašča z večanjem deleža hidrofilne faze v nosilnem sistemu in da je delež nerazgrajenega AP največji v lipofilnih sistemih.

Nadalje smo vpliv koncentracije AP na njegovo stabilnost proučevali še v sistemih z 1 m/m % učinkovine; torej v SMES-ih, V/O ME in TK. Rezultati so grafično predstavljeni na sliki 17.



Slika 17: Grafični prikaz stabilnosti sistemov z 1 m/m % AP v odvisnosti od časa podanega v dnevih (n=3).

V sistemih z 1 m/m % AP je do 43. dne največji delež nerazgrajenega AP v TK, sledijo jim SMES-i in V/O ME. Po 56. dnevu pa je bil AP najbolj stabilen v V/O ME, vendar so razlike med posameznimi sistemi majhne. V vseh sistemih je bil delež nerazgrajenega AP po 56-ih dneh približno enak, tj. okrog 71 %.

Ugotovili smo, da je v nosilnih sistemih z vgrajenim 1 m/m % AP delež nerazgrajenega AP manjši v primerjavi s sistemi z vgrajeno maksimalno količino AP, kar potrjuje dejstvo, da je razpad AP odvisen od koncentracije vgrajene učinkovine in da oksidativne reakcije potekajo v večjem obsegu v bolj razredčenih sistemih.

Večja stabilnost AP v sistemih z večjim deležem lipofilne faze je posledica različne porazdelitve AP v sistemu. AP se zaradi svoje kemijske strukture vključuje v emulgatorski film na medfazi olje/voda. Z lipofilnim delom, tj. palmitinsko verigo, se orientira v oljno fazo, hidrofilni del molekule AP, laktonski obroč, ki je občutljiv na oksidacijo, pa se orientira v hidrofilno fazo. V SMES-ih, ki so sposobni vgraditi največjo količino AP, je količina učinkovine v presežku glede na kisik. Dostop kisika, ki je bolj topen v lipofilni fazi, pa je do hidrofilnega laktonskega obroča omejen. Tudi struktura V/O ME omogoča,

da je na oksidacijo občutljiv laktonski obroč AP v notranji fazi V/O ME in tako zaščiten pred vplivom kisika. Oksidacijski procesi AP sicer potekajo z omejeno količino kisika raztopljenega v notranji fazi pred in med izdelavo sistema. Dodaten vdor kisika preprečuje tudi medfaza V/O, ki deluje kot bariera za vdor kisika. V mikroemulzijah nasprotnega tipa, O/V ME, pa je laktonski obroč obrnjen v zunanjo fazo in je bolj izpostavljen vplivu kisika, ki se lahko še dodatno nadomešča iz okolice. Posledično so zato oksidacijski procesi v sistemih z večjim deležem vodne faze občutno večji.

Kot omejitveni faktor za vdor kisika velja omeniti tudi samo viskoznost nosilnega sistema, ki je največja pri TK. Zaradi povečane viskoznosti so zmanjšane van der Waalove interakcije med AP in kisikom in posledično je oksidativna razgradnja v TK omejena. Ker je delež nerazgrajene učinkovine je v TK z vgrajenim 1 m/m % AP in maksimalno količino AP po 56-ih dneh zelo podoben (69,48% oz. 71,3% nerazgrajenega AP), sklepamo, da je pri TK zaščitni faktor njihova lamelarna struktura, ki omejuje difuzijo kisika v sistem in da ima koncentracija vgrajene učinkovine v tem primeru manjši vpliv kot pri SMES-ih in V/O ME. Rezultati se ujemajo tudi s proučevanjem viskoznosti, kjer je spreminjanje viskoznosti s temperaturo skoraj neodvisno od koncentracije AP (slika 15C).

7.3 PREHOD AP V/SKOZI KOŽO

Sposobnost prehoda učinkovine iz dermalnega pripravka v kožo in povzročitev učinka na/v koži kot tarčnem mestu delovanja je ključnega pomena pri razvoju in vrednotenju izdelkov za dermalno uporabo. Da pride do učinka, se mora učinkovina najprej sprostiti iz nosilnega sistema na površino kože in preiti roženo plast, ki predstavlja glavno penetracijsko bariero. Omejitveni faktorji so tako lastnosti bariere kakor tudi nosilnega sistema ter fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine. Uporabnost učinkovine za dermalno aplikacijo vrednotimo z *in vitro* in *in vivo* študijami. Z *in vitro* študijami skozi umetne membrane lahko spremljamo sproščanje učinkovine iz nosilnega sistema. *In vitro* kožni modeli ali *in vivo* eksperimenti na živalih pa nam poleg sproščanja učinkovine omogočijo še vrednotenje permeacije in perkutane absorpcije učinkovin. Permeacija je definirana kot prehod učinkovine med strukturno in funkcionalno različnimi plastmi kože, perkutana absorpcija pa kot privzem učinkovine v krvožilni in limfni sistem.

V diplomski nalogi smo sproščanje AP iz izbranih nosilnih sistemov skozi umetno membrano spremljali 6 oz. 24 ur; odvisno od uporabljenega receptorskega medija. Permeabilnost AP skozi posamezne plasti kože pa smo spremljali 6 ur. Uporabili smo receptorski medij, ki se je pri predhodnih študijah sproščanja izkazal za najugodnejšega.

Hoteli smo proučiti, kako na sproščanje in permeabilnost AP vplivajo nastali strukturno različni nosilni sistemi enake sestave, različne konsistence in sposobnosti vgradnje AP ter začetna koncentracija le-tega.

7.3.1 IZBIRA USTREZNEGA RECEPTORSKEGA MEDIJA

Za sproščanje AP skozi umetno membrano smo iz nabora receptorskih medijev v literaturi želeli selekcionirati tiste medije, ki bi bili za AP v proučevanih nosilnih sistemih najbolj ustrezni. V preglednici XII so predstavljene kombinacije sestavin za različne fiziološke vodne (medij: prečiščena voda) oz. lipofilne (organske) (medij: izopropilmiristat (IPM)) receptorske medije. Z izbiro fiziološkega vodnega medija smo se želeli čim bolj približati fiziološkemu pH v koži, namen izbire lipofilnega medija pa je bil približati se lipofilnim lastnostim intercelularnih lipidov v epidermisu kože.

Preglednica XII: Potencialni nabor receptorskih medijev za testiranje sproščanja AP skozi umetne membrane.

Sestava RM	Maksimalna površina kromatografskega vrha / Površina po 30 minutnem segrevanju supernatanta pri 37 °C	Izgled kromatografskega vrha; opombe
<i>Organski RM</i>		
IPM + 1 % albumin	237460 / 159085	Nesimetričen, razvlečen vrh
IPM + 1 % SDS		Komponenti se ne mešata
IPM + 1 % Tween® 40	383505 / 352660	Simetričen vrh
IPM + 1 % Imwitor® 308	2917357 / 245095	Simetričen vrh z dvignjeno bazno linijo

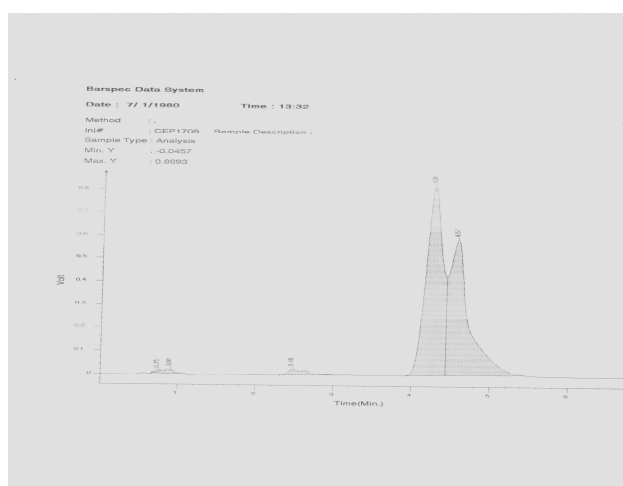
IPM + 0,5 % Tween [®] 40 + 0,5 % Imwitor [®] 308 IPM + 0,01 M natrijev tiosulfat	439590/ 327035	Slabo simetričen vrh z dvignjeno bazno linijo Komponenti se ne mešata, pojav usedline
IPM + 1 % Brij [®] 72	238995 /215110	Simetričen vrh
IPM + 1 % Brij [®] 98	2787701/ 2741121	Simetričen vrh
Vodni RM		
0,9 % NaCl + 2 % albumin + 0,01 M natrijev tiosulfat		Svetlo-rumena, penasta suspenzija, razplastitev zmesi
0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 72 + 0,01 M natrijev tiosulfat		Brij [®] 72 se ne raztopi
0,9 % NaCl + 0,5 % Tween [®] 40 + 0,01 M natrijev tiosulfat	168208/ 126219	Lep, simetričen vrh
0,9 % NaCl + 0,5 m/V % SDS + 0,01 M natrijev tiosulfat		Razcepljen vrh
0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat	364352 /313318	Lep, simetričen vrh

Za izbor ustreznega receptorskega medija (RM) za sproščanje AP iz nosilnih sistemov smo postavili naslednje kriterije:

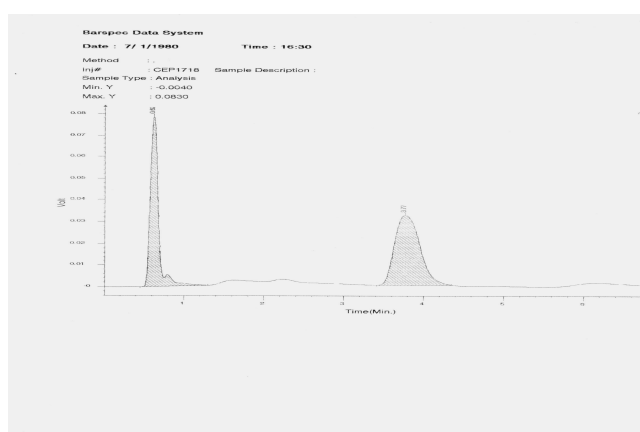
- kompatibilnost komponent RM in AP,
- ustrezna maksimalna topnost AP v RM,
- ustrezna stabilnost AP v RM,
- ustrezen izgled kromatografskih vrhov (simetričnost, ozka porazdelitev),
- sestava RM čimbolj podobna fiziološkim pogojem v koži.

Na osnovi rezultatov maksimalne topnosti, ki je podana s površino kromatografskega pika in stabilnosti AP (primerjava površin kromatografskih pikov po 30 minutnem segrevanju pri 37 °C) v posameznem receptorskem mediju ter glede na izgled kromatografskih vrhov in težnje k izbiri receptorskega medija, ki se najbolj približa fiziološkim razmeram v koži, smo se odločili za dva receptorska medija na osnovi fiziološke vodne faze v sestavi: 0,9 %

NaCl + 0,5% Brij[®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat in 0,9 % NaCl + 0,5 % Tween[®] 40 + 0,01 M natrijev tiosulfat ter za lipofilni receptorski medij z 1 % Tween[®] 40 v IPM. Ker je AP teŹko topen in tudi nestabilen v vodnih raztopinah, smo vodnemu receptorskemu mediju dodali Tween[®] 40 oz. Brij[®] 98 (1 m/m %) kot solubilizator in natrijev tiosulfat kot stabilizator. V organskem mediju dodatek natrijevega tiosulfata ni potreben, dodali pa smo Tween[®] 40 (0,5 m/m %) kot solubilizator. Sliki 18A in 18B prikazujeta primer kromatografskega vrha ustreznega (IPM + 1 % Tween[®] 40) in neustreznega receptorskega medija (0,9 % NaCl + 0,5 m/V % SDS + 0,01 M natrijev tiosulfat).



18A: FizioloŹski vodni receptorski medij s SDS-om (0,9 % NaCl + 0,5 m/V % SDS + 0,01 M natrijev tiosulfat) kot primer neustreznega receptorskega medija.



18B: Organski receptorski medij s Tween[®]-om 40 (IPM + 1 % Tween[®] 40) kot primer ustreznega receptorskega medija.

V izbranih receptorskih medijih smo določili tudi maksimalno topnost AP, ki je predstavljena v preglednici XIII in je podana kot mg AP/ ml analiziranega RM z AP.

Preglednica XIII: Maksimalna topnost AP v izbranih receptorskih medijih.

Receptorski medij	Maksimalna topnost AP (mg/ml)
0,9 % NaCl + 0,5 % Tween [®] 40 + 0,01 M natrijev tiosulfat	0,3725
0,9 % NaCl + 0,5% Brij [®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat	0,5933
IPM + 1 % Tween [®] 40	0,8682

Rezultati v preglednici XIII potrjujejo izrazite lipofilne lastnosti AP, saj je maksimalna topnost AP v lipofilnem receptorskem mediju v primerjavi s hidrofilnima receptorskima medijema bistveno večja. Izmed dveh fizioloških hidrofilnih receptorskih medijev pa se je kot boljši izkazal receptorski medij z Brijem[®] 98 kot solubilizatorjem.

7.3.2 SPROŠČANJE AP SKOZI UMETNE MEMBRANE V IZBRANE RECEPTORSKE MEDIJE

In vitro študije sproščanja so le približek *in vivo* razmeram, kljub temu pa so ključnega pomena pri razvoju ustreznega nosilnega sistema za dermalno uporabo. Umetna membrana med donorskim in akceptorskim delom Franz-ove celice je za razliko od kože le fizična bariera. Študije sproščanja nam tako omogočajo ovrednotenje vpliva različnih parametrov nosilnega sistema na dermalno uporabnost učinkovine in medsebojno primerjavo različnih nosilnih sistemov. Na sproščanje učinkovine iz nosilnega sistema vplivata viskoznost in strukturne lastnosti sistema (velikost kapljic, hidro-lipofilne lastnosti komponent nosilnega sistema), fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine in interakcije učinkovine s komponentami nosilnega sistema.

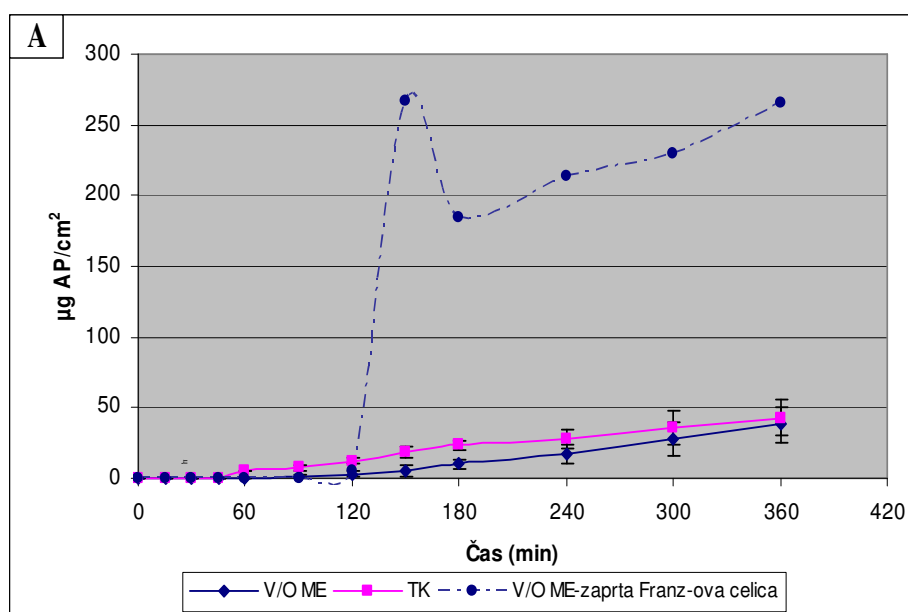
Pri eksperimentih sproščanja pa je zelo pomembna pravilna izbira receptorskega medija, zato smo predhodno testirali oz. iskali ustrezno receptorsko tekočino, do katere bi imel AP veliko afiniteto in je hkrati najbolj podoben fiziološkim razmeram v koži. Za študije sproščanja smo izbrali dva receptorska medija na osnovi fiziološke raztopine z dodanim emulgatorjem ter stabilizatorjem ter organski receptorski medij z emulgatorjem.

Za vrednotenje sproščanja smo v izbrane nosilne sisteme: SMES-e, V/O ME in TK vgradili AP v 1 m/m % ter maksimalnem deležu značilnem za posamezni sistem. Za fizično bariero smo izbrali celulozno acetatno umetno membrano z velikostjo por 0,2 μm .

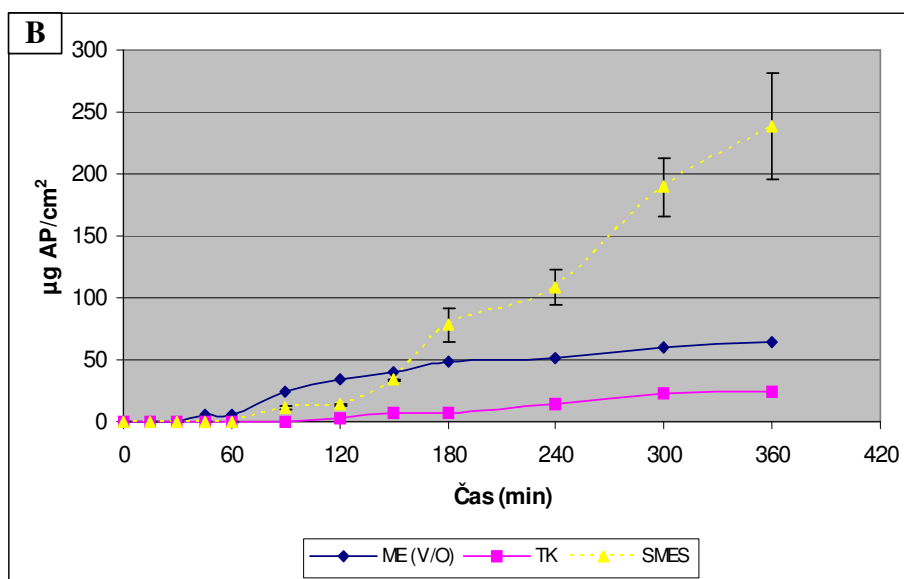
Rezultati sproščanja AP skozi umetno membrano v različne receptorske medije so predstavljeni na slikah 19-21 in so podani kot μg sproščene AP na cm^2 .

a) Receptorski medij: Tween[®] 40 v fiziološki raztopini z dodatkom natrijevega tiosulfata
(0,9 % NaCl + 0,5 % Tween[®] 40 + 0,01 M natrijev tiosulfat)

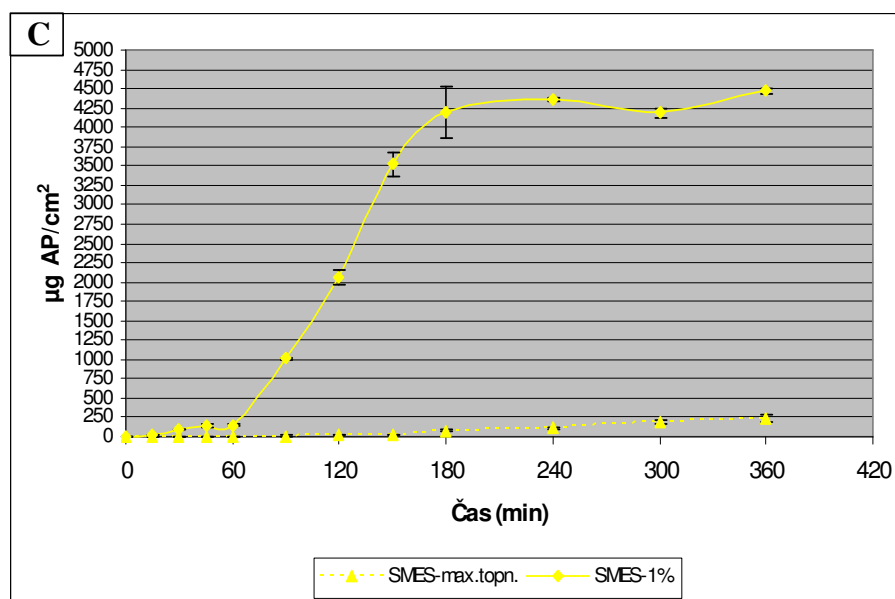
Na sliki 19A-C je predstavljena količina sproščene AP vgrajenega v obeh predhodno določenih koncentracijah v SMES-e, V/O ME in TK. Zaradi boljše preglednosti in primerjave je sproščanje iz SMES-ov predstavljeno posebej, saj je količina sproščene AP iz teh sistemov v primerjavi z ostalima precej večja. Na sliki 19A je s črtkano modro linijo predstavljen tudi vpliv zaprte Franz-ove celice na sproščanje AP.



Slika 19A: Sproščanje AP iz V/O ME in TK vgrajenega v 1 m/m %.



Slika 19B: Sproščanje AP iz SMES-ov, V/O ME in TK vgrajenega v maksimalnem deležu.



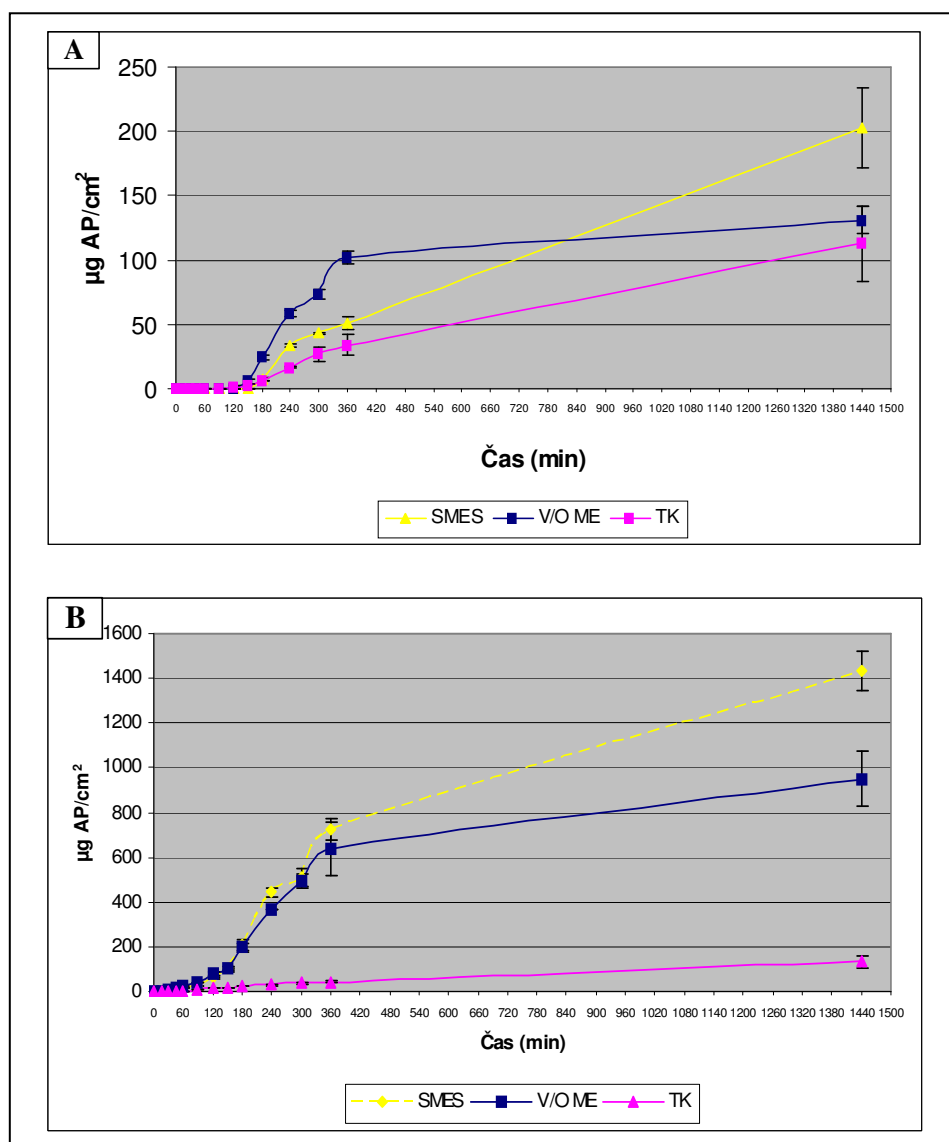
Slika 19C: Sproščanje AP iz SMES-ov vgrajenega v 1 m/m % in maksimalnem deležu.

Iz slike 19A-C je razvidno, da se je največ AP vgrajenega v 1 m/m % koncentraciji sprostil iz SMES-ov, sledijo mu TK in V/O ME. Sproščanje AP pri vgrajeni maksimalni količini pa je največje iz SMES-ov, nato iz V/O ME, sledijo pa TK (slika 19B). Nepričakovano pa se je iz SMES-ov z 1 m/m % AP sprostil več učinkovine kot iz SMES-ov z vgrajenim maksimalnim deležem AP (Slika 19C).

Proučevali smo tudi vpliv samih pogojev v Franz-ovi celici na sproščanje AP iz sistemov, in sicer s primerjavo sproščanja AP iz odprtega in zaprtega donorskega dela Franz-ove celice. Zaprta Franzova celica ponazarja efekt okluzije (npr. po nanosu zdravilnih obližev), medtem ko z odprtim donorskim delom najbolj ponazorimo dejanske razmere po aplikaciji dermalnih izdelkov, tj. potencialno izhlapevanje hlapnih substanc, sušenje nosilnega sistema... Primerjavo pogojev smo izvedli na primeru V/O ME z 1 m/m % AP. Ugotovili smo, da pride v zaprti Franz-ovi celici po določenem času (150 min) do maksimalne količine sproščenega AP iz nosilnega sistema v receptorski medij, čeprav tudi v tej točki še vedno veljajo sink pogoji. Ta maksimalna koncentracija AP v naslednje pol ure potem izrazito pade, medtem, ko po eni uri začne ponovno naraščati. Na koncu eksperimenta se količina sproščenega AP približa maksimalni sproščeni količini AP po 150 minutah. Pojav si razlagamo kot posledico interakcij med butanolom kot komponento nosilnega sistema in celulozno umetno membrano. Sklepamo, da butanol interagira s celulozo in membrano naluknja oz. poveča velikost por. Posledično pride do povečanega toka AP iz donorskega v akceptorski del. Predvidevamo, da koncentracija po 30-ih minutah pade zaradi nestabilnosti AP oz. presežene kapacitete natrijevega tiosulfata, v nadaljevanju pa ponovno naraste zaradi novega dotoka AP iz nosilnega sistema. Zaradi navedenih razlogov in boljše ponazoritve razmer po aplikaciji izbranih nosilnih sistemov smo nadaljnje sproščanje izvajali v odprtih Franz-ovih celicah.

b) Receptorski medij: Brij[®] 98 v fiziološki raztopini z dodatkom natrijevega tiosulfata
(0,9 % NaCl + 0,5% Brij[®] 98 + 0,01 M natrijev tiosulfat)

Slika 20 predstavlja sproščanje AP iz izbranih nosilnih sistemov v fiziološki receptorski medij z dodanim Brijem[®] 98 in natrijevim tiosulfatom. V tem primeru smo podaljšali tudi čas izvedbe poskusa na 24 ur, saj smo želeli zaradi prejšnjih dokaj nepričakovanih rezultatov in težav pri izvedbi eksperimenta preveriti tudi časovno odvisnost sproščanja.



Slika 20: Sproščanje AP iz V/O ME, SMES-ov in TK z: A) 1 m/m % AP, B) maksimalnim deležem AP.

Količina sproščenega AP vgrajenega v 1 m/m % je po 24-ih urah največja iz SMES-ov, sledijo V/O ME in TK (Slika 20A). Po 6-ih urah pa se ga je največ sprostil iz V/O ME. Primerljiv vrstni red količine sproščenega AP opazimo tudi v sistemih vgrajeno maksimalno količino AP (Slika 20B). Največ AP se sprosti iz SMES-ov, sledijo V/O ME in TK.

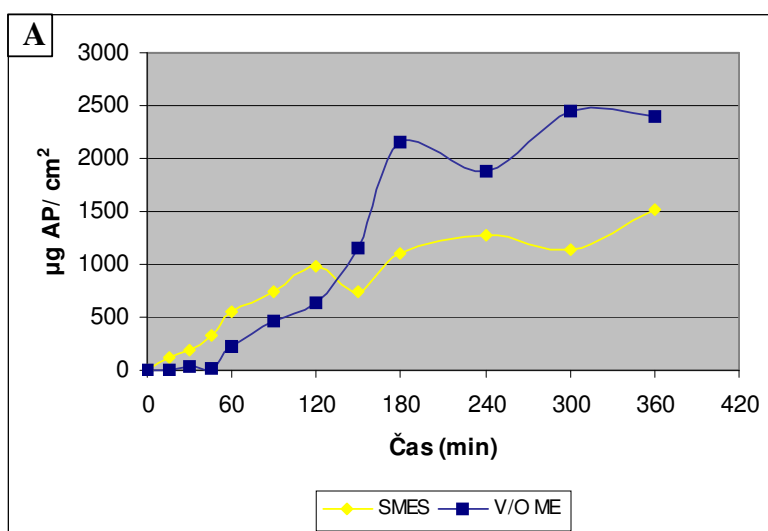
Če primerjamo količino sproščenega AP po 6. urah, opazimo, da se ga iz sistemov z 1 m/m % sprosti največ iz V/O ME. AP se v V/O ME zaradi svojih lipofilnih lastnosti nahaja v zunanji fazi nosilnega sistema in je prehod iz sistema v receptorski medij olajšan. SMES-i

pa so zaradi svoje lipofilne sestave ugoden nosilni sistem za lipofilne učinkovine, zato na začetku poskusa ni vidne tendence AP do prehajanja v hidrofilni receptorski medij. Le-ta se poveča po večurnem kontaktu med lipofilnim nosilnim sistemom in fiziološkim receptorskim medijem. V sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem AP pa se skozi celoten poskus zaradi koncentracijskega gradienta iz SMES-ov sprošča več AP.

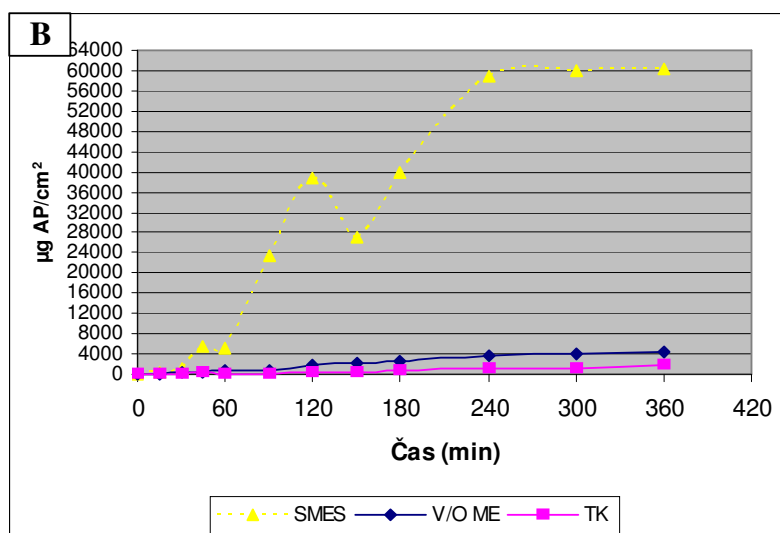
V obeh primerih pa se najmanj AP sprosti iz TK, čeprav le-ti v svoji strukturi vsebujejo največji delež vode. Vzrok je v njihovi notranji strukturi in posledično porazdelitvi AP ter v sami konsistenci sistema. TK imajo v primerjavi z ostalimi sistemi povečano viskoznost, ki je omejujoč faktor pri prehodu AP v receptorski medij.

c) Receptorski medij: Tween[®] 40 v izopropilmiristatu (IPM + 1 % Tween[®] 40)

Na sliki 21 so predstavljeni rezultati sproščanja AP v 1 m/m % in maksimalni koncentraciji skozi umetne membrane v lipofilni receptorski medij. Sproščanja iz TK z 1 m/m % AP nismo izvedli, saj se je za ta nosilni sistem fiziološki receptorski medij z Brijem[®] 98 izkazal za optimalnega. Za prikaz količine sproščenega AP v izbran organski RM s Tween[®] -om 40 smo lahko uporabili le eno izmed štirih paralel in je posledično rezultat zgolj informativne narave; v ostalih treh paralelah se AP namreč sploh ni sproščal v RM.



Slika 21A: Sproščanje AP iz V/O ME in SMES-ov z vgrajenim 1 m/m % AP.



Slika 21B: Sproščanje AP iz V/O ME, SMES-ov in TK z vgrajenim maksimalnim deležem AP.

Slika 21A predstavlja sproščanje AP v koncentraciji 1 m/m % v organski receptorski medij s Tweenom[®] 40 iz SMES-ov in V/O ME. Največ AP se je sprostilo iz V/O ME. Ker slednje vsebujejo v svoji sestavi poleg večinskega deleža lipofilne faze tudi 10 % vode (hidrofilne faze), sklepamo, da je to vzrok večje tendence lipofilnega AP do popolnoma lipofilnega organskega receptorskega medija. V SMES-ih vode ni prisotne in zato AP nima povečane tendence do prehoda v receptorski medij. Iz slike 21A je razvidno tudi, da je sproščanje AP v receptorski medij zelo neenakomerno. Kot vzrok za nastalo nihajočo sproščanje AP smo eksperimentalno napako izključili. Nihanja v sproščanju se namreč pojavijo tudi iz sistemov z maksimalnim deležem vgrajenega AP, in sicer ob istem času v posameznem sistemu. Sklepamo, da so vzrok temu interakcije izopropilmiristata z umetno membrano. Že, ko smo membrane čez noč namakali v organskem receptorskem mediju, smo opazili nastanek vidnih, prozornih sprememb (lis) na celulozni membrani. Dodatno smo še preverili, ali je neustrezno sproščanje posledica preseženih sink pogojev. V različnih časovnih točkah smo preverili koncentracijo sproščenega AP; le-ta ni presegla maksimalne topnosti AP v organskem receptorskem mediju in je bila manjša od 30 % dosežene maksimalne topnosti, kar pomeni, da smo imeli konstantno vzdrževane sink pogoje.

Količina sproščenega AP iz nosilnih sistemov ustreza sposobnosti vgradnje AP značilne za posamezni sistem. Iz nosilnih sistemov z maksimalnim deležem AP se zaradi večjega koncentracijskega gradienta sprošča v obeh primerih več AP kot v istem sistemu z

vgrajenim 1 m/m % AP; iz SMES-ov z maksimalnim deležem AP celo štiridesetkrat več v primerjavi s SMES-i z 1 m/m % AP.

Če primerjamo rezultate sproščanja AP iz izbranih nosilnih sistemov v preizkušane receptorske medije ugotovimo, da so najbolj primerljivi tisti, dobljeni iz poskusov sproščanja v fiziološka vodna receptorska medija. V organski receptorski medij se sicer sprosti več AP v primerjavi s fiziološkim vodnim medijem, vendar dobljeni rezultat zaradi bistvenih razlik med paralelami ni relevanten. Zavedamo se, da poskus sproščanja AP v organski receptorski medij ni optimalen in je potrebno njegovo izvedbo dodatno proučiti in nadgraditi.

Ugotovili smo, da je obseg sproščanja AP odvisen od hidro-lipofilnih lastnosti receptorskega medija, AP in uporabljenega nosilnega sistema ter viskoznosti le-tega. Izraziti vpliv na količino sproščene učinkovine ima tudi koncentracija vgrajenega AP v nosilni sistem. Izpostaviti je potrebno tudi vpliv samih interakcij med komponentami nosilnega sistema in receptorskega medija s celulozno membrano.

V skladu s pričakovanji se je največ AP sprostil iz nosilnih sistemov z vgrajeno maksimalno koncentracijo AP z nizko viskoznostjo in izraženimi lipofilnimi lastnostmi. AP je v primeru SMES-ov in V/O ME vgrajen v zunanjo fazo sistema in mu je na ta način omogočen neposreden stik z membrano. Le-ta mu namreč omejuje prehod v receptorski medij. Hkrati pa tudi nizka viskoznost in visoka kapacitivnostna sposobnost SMES-ov in V/O ME za vgradnjo AP omogoča lažjo difuzijo AP v sistemu. V TK, ki imajo večjo viskoznost, je bilo sproščanje AP zmanjšano.

7.3.3 PERMEABILNOST AP SKOZI KOŽO PRAŠIČJEGA UHLJA

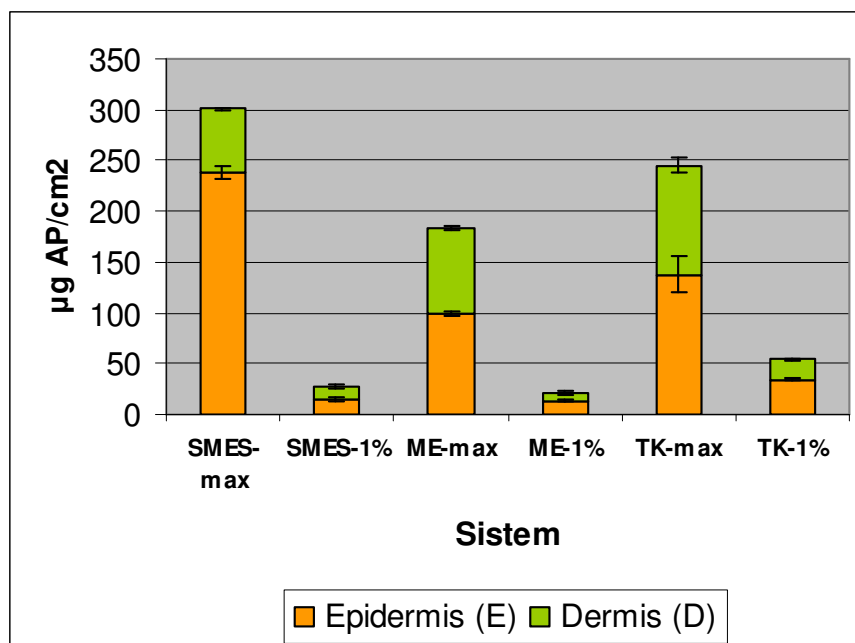
V diplomski nalogi smo se osredotočili na vrednotenje prehoda AP v/skozi kožo. Za optimalno dermalno učinkovitost AP ga moramo uspešno dostaviti na/v tarčno mesto njegovega delovanja-kožo. AP s svojimi antioksidativnimi lastnostmi varuje predvsem zgornje plasti kože pred negativnimi učinki UV sevanja. Na ta način podpre delovanje naravnih obrambnih mehanizmov v epidermisu in dermisu kože.

Za maksimalni prehod AP v/skozi kožo je pomembna ustrezna izbira nosilnega sistema. Dokazano je, da mikroemulzije v primerjavi s klasičnimi dermalnimi farmacevtskimi oblikami povečajo permeacijo učinkovin v kožo, saj zaradi povečane solubilizacijske sposobnosti in lastnosti samih sestavin delujejo kot pospeševalci absorpcije in povečajo koncentracijski gradient učinkovin iz vehikla v kožo. Na dermalno uporabnost pa vpliva tudi notranja struktura mikroemulzij in mobilnost učinkovine v nosilnem sistemu (15, 38).

Odločilnega pomena za nadaljevanje študije uporabnosti AP za dermalno aplikacijo je bila izbira ustreznega receptorskega medija. Na osnovi dobljenih rezultatov z *in vitro* študijami sproščanja AP skozi umetno membrano v prejšnjem poglavju, s katerimi smo ugotavljali vpliv lastnosti nosilnega sistema na sproščanje učinkovine v receptorski medij, smo za izvajanje permeabilnosti AP skozi kožo prašičjega uhlja izbrali fiziološki receptorski medij z Brijem[®] 98 in natrijevim tiosulfatom. Rezultati so bili v tem primeru pričakovani in tudi celulozna membrana je v tem primeru izkazala zgolj lastnosti fizične bariere, brez neugodnih interakcij s komponentami receptorskega medija oz. nosilnega sistema.

Nadaljnje študije permeabilnosti AP skozi posamezne plasti kože pa so nam omogočile ovrednotiti interakcije izbranih nosilnih sistemov in učinkovine s kožo ter ugotoviti njihov vpliv na prehod AP v/skozi kožo. Permeabilnost AP iz SMES-ov, V/O ME in TK v epidermis in dermis kože prašičjega uhlja smo spremljali *in vitro* s Franz-ovimi difuzijskimi celicami. Prašičja koža se zaradi svoje morfološke podobnosti in podobnosti v sestavi lipidov s človeško kožo zelo pogosto uporablja kot model za študij permeabilnosti in transdermalne dostave učinkovin.

Študijo permeabilnosti AP smo izvedli z enakimi nosilnimi sistemi kot sproščanje; torej iz SMES-ov, V/O ME in TK z vgrajenim 1 m/m % in maksimalnim deležem AP značilnim za posamezni sistem. Količino sproščene AP smo določili tako v epidermisu kot dermisu in jo podali v $\mu\text{g AP}/\text{cm}^2$. Rezultati permeabilnosti so predstavljeni na sliki 22.



Slika 22: Permeabilnost AP iz nosilnega sistema v epidermis in dermis kože prašičjega uhlja (n=4).

Po šestih urah poskusa smo AP lahko analizirali le v različnih plasteh kože, medtem ko v receptorski medij ni prehajal v nobenem primeru. Slednje smo tudi pričakovali, saj je za lipofilne učinkovine značilno, da se v *in vitro* pogojih v dermisu ustvari depo učinkovine in tako ne prehajajo v receptorsko tekočino kljub dodatku solubilizatorjev. V *in vivo* pogojih efekt ni tako očiten, saj imajo učinkovine kljub lipofilnim lastnostim tendenco za prehod v krvožilni sistem kože.

Iz slike 22 je razvidno, da AP iz vseh nosilnih sistemov bolje prehaja skozi roženo plast v epidermis kot pa globlje v dermis. Prehod AP v posamezne plasti kože se razlikuje od vrste uporabljenega nosilnega sistema in količine vgrajene učinkovine. V vseh primerih je permeabilnost sorazmerna s koncentracijo vgrajene učinkovine in v vseh primerih je več AP v epidermisu. Med sistemi z vgrajenim 1 m/m % AP se je kljub večji viskoznosti v primerjavi z ostalima sistemoma največ učinkovine sprostilo iz TK. Sledijo jim SMES-i in V/O ME. Sklepamo, da je vzrok za ugodne permeabilnostne lastnosti TK v njihovi strukturi, saj njihova lamelarna struktura ustreza lamelarni ureditvi intercelularnih lipidov v epidermisu kože, kar omogoča večjo percutano absorpcijo. SMES-i pa so v primerjavi z V/O ME manj viskozni, zato sta difuzija in mobilnost AP v njih povečana. Posledično je večja iz njih tudi količina sproščenega AP.

V sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem AP pa se je največ učinkovine sprostito iz SMES-ov, sledijo jim TK in V/O ME . Vzrok je v povečani sposobnosti vgradnje AP. V/O ME so kljub nižji viskoznosti in večji kapacitivni sposobnosti za AP izkazale slabše permeabilnostne lastnosti za AP. V primeru TK je imela odločilni pomen sama struktura in organiziranost nosilnega sistema, ki ima veliko podobnost z lamelarno ureditvijo intercelularnih lipidov v epidermisu.

Študija permeabilnosti je pokazala, da plast epidermisa predstavlja bariero za permeabilnost AP, saj se prehod skozi epidermis v dermis zmanjša pri vseh uporabljenih nosilnih sistemih. Razlika v količini difundiranega AP v posamezno plast je odvisna od koncentracije vgrajene učinkovine, vrste nosilnega sistema in njegovih interakcij s kožo. V sistemih z nižjo viskoznostjo (SMES-i) lahko namreč same komponente nosilnega sistema zaradi povečane mobilnosti lažje interagirajo s kožo in spremenijo njene barierne lastnosti in povečajo prehod AP. Vzrok povečanega prehoda AP iz TK kljub njihovi viskoznosti pa je v njihovi notranji organizacijski strukturi, ki je podobna ureditvi intercelularnih lipidov v epidermisu kože in tako odločilnega pomena pri prehodu učinkovin.

Ker UV sevanje povzroča poškodbe v epidermisu in dermisu, je smiselno ti plasti dodatno zaščititi z antioksidanti. Izražena tendenca AP do zadrževanja v zgornjih plasteh kože, predvsem v epidermisu, je ključnega pomena pri uporabi AP kot antioksidanta v izdelkih za dermalno aplikacijo. Za njegovo dermalno učinkovitost pa je potrebna ustrezna izbira nosilnega sistema. Glede na dobljene rezultate bi lahko trdili, da preiskovani SMES-i, V/O ME in TK vsekakor kažejo potencial koloidnih nosilnih sistemov za dermalno aplikacijo AP.

8. SKLEP

Za izdelavo dermalnih koloidnih sistemov smo uporabili IPM kot oljno fazo, lecitin in Tween[®] 80 kot emulgatorja, butanol kot koemulgator ter bidestilirano vodo. Z izdelavo večkomponentnega faznega diagrama smo opredelili sisteme, ki jih tvorijo izbrane sestavine v različnih razmerjih, določili področja nastanka ME ter tip nastalega sistema (z merjenjem električne prevodnosti in kobaltovimi papirčki). Za nadaljnje vrednotenje smo se osredotočili na sisteme, ki nastanejo po razredčitveni liniji, kateri po sestavi ustrezajo tudi predhodno razviti TK. Izbrali smo naslednje strukturno različne sisteme s stalnim razmerjem med emulgatorsko in lipofilno fazo: SMES-e, V/O ME, TK, O/V ME in E, v katere smo vgradili AP v koncentraciji 1 m/m % in v maksimalnem deležu, značilnem za posamezni sistem.

V skladu s pričakovanji smo potrdili, da je največ AP mogoče vgraditi v sisteme z največjim deležem lipofilne faze, to so SMES-i, V/O ME in TK.

Ugotovili smo, da se viskoznost preiskovanih sistemov povečuje z višanjem deleža PAS in vode (do približno 80 %). Najbolj viskozni so bili TK, katerih viskoznost je do določene temperature linearno naraščala do maksimuma, nato pa spet linearno padala. Bistveno višja viskoznost TK v primerjavi z ostalimi sistemi je posledica tvorbe vodikovih vezi med vodo in hidrofilno glavo fosfatidilholina. Zmanjšanje viskoznosti TK z naraščanjem temperature pa si razlagamo kot posledico faznega prehoda: gel – tekoče kristalno in izhlapevanja vode. Proučevali smo tudi vpliv vgradnje AP na viskoznost in ugotovili, da 1 m/m % AP vgrajenega v SMES-e in V/O ME bistveno ne vpliva na viskoznost sistema, nasprotno pa jo maksimalni delež AP občutno poveča. Z vgraditvijo AP v TK pa se je viskoznost le-teh zmanjšala, in sicer bolj pri sistemih z 1 m/m % AP.

V študijah stabilnosti smo ugotovili, da obseg razgradnje AP narašča z večanjem deleža hidrofilne faze. Prav tako vpliva koncentracija vgrajene učinkovine, saj je delež nerazgrajenega AP v sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem večji v primerjavi s sistemi z 1 m/m % AP. Stabilnostno študijo bi bilo v prihodnje smiselno še razširiti in primerjati stabilnost same askorbinske kisline in AP v preučevanih nosilnih sistemih.

Z *in vitro* študijami sproščanja AP skozi umetno membrano smo ugotavljali vpliv lastnosti nosilnega sistema na sproščanje učinkovine. Za receptorski medij smo izbrali fiziološki receptorski medij z Brijem[®] 98 kot solubilizatorjem in natrijevim tiosulfatom kot stabilizatorjem. Ugotovili smo, da je obseg sproščanja AP odvisen od hidro-lipofilnih

lastnosti receptorskega medija, AP in komponent nosilnega sistema ter njegove viskoznosti in strukturnih lastnosti. Na količino sproščene učinkovine ima izrazit vpliv delež vgrajenega AP. Največ AP se je tako sprostilo iz lipofilnih nosilnih sistemov nizke viskoznosti z vgrajenim maksimalnim deležem AP, t.j. SMES-i in V/O ME, kjer je AP porazdeljen v zunanji fazi sistema.

Z izbranim receptorskim medijem smo na koncu izvedli še študijo permeabilnosti AP skozi posamezne plasti kože prašičjega uhlja in ovrednotili medsebojne interakcije nosilnih sistemov in učinkovine s kožo ter ugotavljali njihov vpliv na prehod AP v/skozi kožo. Ugotovili smo, da AP zaradi svojih strukturnih lastnosti bolje prehaja skozi roženo plast v epidermis kot pa globlje v dermis. Permeabilnost AP se razlikuje od vrste uporabljenega nosilnega sistema in količine vgrajenega AP. Največ AP vgrajenega v 1 m/m % se je sprostilo iz TK. Sklepamo, da je perkutana absorpcija povečana zaradi njihove lamelarne strukture, ki je sorodna strukturiranosti intercelularnih lipidov v epidermisu kože. V sistemih z vgrajenim maksimalnim deležem AP pa so največjo sposobnost permeacije izkazali lipofilni SMES-i.

V diplomski nalogi smo potrdili, kako pomembna je izbira nosilnega sistema za vgradnjo učinkovine za dermalno aplikacijo. Ugotovili smo, da so glavni omejitveni faktorji prehoda fizikalno-kemijske lastnosti nosilnega sistema in učinkovine, lastnosti bariere in njihove medsebojne interakcije. Zavedamo se, da so opravljene *in vitro* študije le približek *in vivo* razmeram; so pa ključnega pomena pri razvoju ustreznega nosilnega sistema za dermalno uporabo.

Rezultati diplomske naloge potrjujejo, da so vrednoteni koloidni sistemi z lecitinom; SMES-i, V/O ME in TK, zaradi svoje termodinamske stabilnosti, spontanega nastanka, ugodne konsistence in zmožnosti povečanja solubilizacije, obsega in hitrosti prehoda lipofilnega AP skozi kožo, primerni dostavni sistem za dermalno aplikacijo AP.

9. VIRI IN LITERATURA

1. Martin A: Physical pharmacy 4th ed., Lea&Febriger, 1993 London: 127-128.
2. Jurkovič P, Gašperlin M: Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin. Farm Vestn 2004; 55: 565-571.
3. Rozman B, Bogataj M: Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo. Farm Vestn 2006; 57: 189-195.
4. Choi S.Y, Oh S. G, Bae S. Y, Moon S. K: Effect of short-chain alcohols as co-surfactants on pseudo-ternary phase diagrams containing lecithin. Korean J. Chem.Eng. 1999, 16 (3), 377-381.
5. Kogan A, Garti N: Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. Advances in Colloid and Interface Science 2006; 123-126, 369-385.
6. Kumar R, Katare P. O: Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery. AAPS PharmSciTech 2005; 6: E298-E310.
7. Yuan S. J, Acosta J E: Extended release of lidocaine from linker-based lecithin microemulsions. International Journal of Pharmaceutics 2009; 368: 63-71.
8. Stevenson C. L, Bennett D. B, Lechuga-Ballesteros D: Pharmaceutical Liquid Crystals: The Relevance of Partially Ordered Systems, Minireview. Journal of Pharmaceutical Sciences 2005; 9: 1861-1880.
9. Jurkovič P: Proučevanje vpliva izbranih mikroemulzij na učinkovitost derivatov vitamina C v koži, Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2003.
10. Zvonar A: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi-alternativen pristop k izboljšanju biološke uporabosti lipofilnih učinkovin. Seminar pri predmetu Razvoj novih farmacevtskih oblik, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007.
11. Kristl J, Gašperlin M, Jeras M: Izbrane vsebine iz kozmetologije (učbenik za kozmetologijo), Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2005.
12. Elektronskivir:<http://www.zdravstvena.info/vsznj/wpcontent/uploads/2009/12/zgradba-koze-koza-zgrajena-derma.jpg>
13. Gosenca M, Gašperlin M: Membrane za in vitro testiranje dermalne absorpcije. Farm Vestn 2009; 60:8-12.

14. Santos P, Watkinson A.C, Hadgraft J., Lane M.E.: Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* 2008;21:246-259.
15. Kreilgaard M: Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 Suppl. 1 (2002): S77-S98.
16. Schmalfluss U, Neubert R, Wohlrab W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. *J Controlled Rel* 1997; 46: 279-285.
17. Makai M, Csányi E, Németh Zs, Pálkás J, Erős I: Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 256: 95-107.
18. Čerpnjak K: Alergije na sonce in kozmetična linija Eucerin za kožo občutljivo na sonce, Seminarska naloga pri Kozmetologiji, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008.
19. Šuput D: Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije – 9.izdaja; Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2005; 25 – 37.
20. Rozman B: Topical microemulsions containing vitamins C and E: from formulation optimisation to evaluation using reconstructed human epidermis, Doctoral dissertation, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Ljubljana 2009.
21. Špiclin P, Gašperlin M: Vitamin C in koža. *Farm Vestn* 2001; 52: 287-293.
22. Rozman B, Gašperlin M, Tinois-Tessoneaud E, Pirot F, Falson F: Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 72: 69-75.
23. Tai A, Takebayashi J, Ueno A, Gohda E, Yamamoto I: An isocratic HPLC method for the simultaneous determination of novel stable lipophilic ascorbic acid derivatives and their metabolites. *Journal of Chromatography* 2006; 840: 38-43.
24. Vaupotič Č. V, Krbavčič A: Askorbilpalmitat. *Farm Vestn* 2000; 51: 133-140.
25. Austria R, Semenzato A, Bettero A: Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 15: 795-801.

26. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int. J. Pharm* 2001; 222: 271-279.
27. Jurkovič P, Šentjurc M, Gašperlin M, Kristl J, Pečar S: Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2003; 56: 59-66.
28. Rowe C, Sheskey PJ, Weller JP: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th ed., Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association 2003: 123-131, 479-483, 340-341.
29. O'Neill JM, Smith A, Heckelman EP: *The Merck Index* 13th ed., Merck&Co. Inc., Whitehouse Station 2001: 933, 971.
30. Kralj L: Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama, *Diplomska naloga*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
31. Lipoid S-100 specifikacija, Lipoid Nemčija
32. Fiume Z.: Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *Int. J. Toxicol.* 2001; 20 Suppl 1:21-45.
33. Hoepfner EM, Reng A, Schmidt PC: *Fiedler Encyclopedia of Excipients for Pharmaceuticals, Cosmetics and Related Areas* vol 2 5th ed., Editio Cantor Verlag Aulendorf 2002: 1640, 961.
34. Elektronski vir: <http://www2.basf.us/oxoproducts/pdfs/n-but.pdf>
35. Vibro Viscometer SV-10: navodila za uporabo
36. Elektronski vir: http://www.aandd.jp/products/test_measuring/sv10/sv10.html
37. Gosenca M: Vpliv oksima OMG 12 na stabilnost askorbilpalmitata v mikroemulzijah, *Diplomska naloga*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007.
38. Harms M, Mackeben S, Müller-Goymann C.C: Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/isopropyl myristate/water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2005; 259: 81–87.
39. Elektronski vir: http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/1999report/part2/contrib/73/1295.pdf

10. PRILOGA

Preglednica XIV: Sestava in opredelitev nastalih sistemov v sestavi:

lecitin/Tween® 80/butanol/izopropilmiristat/voda.

Em+ KoEm (%)	Olje (%)	Voda (%)	Co papir	Prevodnost (μ S/cm)	Izgled	Tip sistema
95	5	0	M	/	bistra, olivna raztopina	SMES
90,16	4,84	5,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
85,65	4,60	9,75	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
81,37	4,37	14,26	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
77,30	4,15	18,55	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
73,43	3,94	22,62	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
69,76	3,75	26,49	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
66,27	3,56	30,17	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
62,96	3,38	33,66	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
59,81	3,21	36,98	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
56,82	3,05	40,13	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
53,97	2,90	43,13	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
51,27	2,75	45,97	M/R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
48,71	2,62	48,68	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
46,27	2,48	51,24	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
43,96	2,36	53,68	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
41,76	2,24	56,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
39,67	2,13	58,20	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
37,69	2,02	60,29	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
35,80	1,92	62,28	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
33,20	1,78	65,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
28,45	1,53	70,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
23,72	1,27	75,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
18,97	1,02	80,00	R	/	bistra, rumena, transparentna raztopina	O/V ME
14,23	0,76	85,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
9,49	0,51	90,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
4,74	0,25	95,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
90	10	0	M	/	bistra, olivna raztopina	SMES
85,32	9,67	5,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
80,83	9,17	10,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
76,34	8,66	15,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
71,85	8,15	20,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
67,36	7,64	25,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
62,76	7,12	30,13	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
58,38	6,62	35,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
53,76	6,10	40,14	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
49,40	5,60	45,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
44,91	5,09	50,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
40,42	4,58	55,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
35,93	4,07	60,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
31,43	3,56	65,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
26,94	3,06	70,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
22,45	2,55	75,00	R	/	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME

17,96	2,04	80,00	R	/	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
13,47	1,53	85,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
8,98	1,02	90,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
4,49	0,51	95,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
84,83	15,17	0	M	/	bistra, olivna raztopina	SMES
80,58	14,41	5,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
76,35	13,66	10,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
72,11	12,90	15,00	M/R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
67,86	12,14	20,00	R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
63,62	11,38	25,00	R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
59,38	10,62	30,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
55,14	9,86	35,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
50,90	9,10	40,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
46,65	8,34	45,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
42,41	7,59	50,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
38,17	6,83	55,00	R	/	temnorumen, moten sistem	E
33,93	6,07	60,00	R	/	temnorumen, moten sistem	E
29,69	5,31	65,00	R	/	temnorumen, moten sistem	E
25,45	4,55	70,00	R	/	temnorumen, moten sistem	E
21,21	3,79	75,00	R	/	temnorumen, moten sistem	E
16,97	3,03	80,00	R	/	bister, transparenten sistem, videz gela	O/V ME
12,72	2,28	85,00	R	/	bister, transparenten sistem, videz gela	O/V ME
8,48	1,52	90,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
4,24	0,76	95,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
80,16	19,84	0,00	M	/	bistra, olivna raztopina	SMES
76,15	18,85	5,00	M	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
72,14	17,86	10,00	M/R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
68,13	16,87	15,00	R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
64,12	15,88	20,00	R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
60,12	14,88	25,00	R	/	bistra, olivna raztopina	V/O ME
56,11	13,89	30,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
52,10	12,90	35,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
48,09	11,91	40,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
44,09	10,91	45,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
40,08	9,92	50,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
36,07	8,93	55,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
32,06	7,94	60,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
28,05	6,95	65,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
24,05	5,95	70,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
20,04	4,96	75,00	R	/	moten sistem, ki se začne bistriti ob stenah čaše	E
16,03	3,97	80,00	R	/	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
12,02	2,98	85,00	R	/	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
8,02	1,98	90,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
4,01	0,99	95,00	R	/	moten, mlečnatobel sistem	E
75,01	24,99	0,00	M	/	bistra, olivna raztopina	SMES
71,27	23,74	5,00	M	2,414	bistra, olivna raztopina	V/O ME
67,51	22,49	10,00	M	3,201	bistra, olivna raztopina	V/O ME
63,76	21,24	15,00	M	3,993	bistra, olivna raztopina	V/O ME
60,01	19,99	20,00	M/R	4,8	svetlorumen moten sistem	E
56,26	18,74	25,00	R	5,462	svetlorumen moten sistem	E

52,51	17,49	30,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
48,76	16,24	35,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
45,01	14,99	40,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
41,26	13,74	45,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
37,51	12,49	50,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
33,76	11,24	55,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
30,01	9,99	60,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
26,26	8,74	65,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
22,50	7,50	70,00	R	/	svetlorumen moten sistem	E
18,75	6,25	75,00	R	8,75	moten sistem, ki se začne bistriti ob stenah čaše	E
15,00	5,00	80,00	R	1,646	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
11,25	3,75	85,00	R	1,652	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
7,50	2,50	90,00	R	6,815	moten, mlečnatobel sistem	E
3,75	1,25	95,00	R	6,048	moten, mlečnatobel sistem	E
69,80	30,21	0,00	M	1,564	bistra, olivna raztopina	SMES
66,30	28,69	5,00	M/R	2,599	bistra, olivna raztopina	V/O ME
62,82	27,18	10,00	R	3,185	bistra, olivna raztopina	V/O ME
59,33	25,67	15,00	R	3,582	bistra, olivna raztopina	V/O ME
55,84	24,16	20,00	R	3,943	bistra, olivna raztopina	V/O ME
52,35	22,65	25,00	R	4,289	svetlorumen moten sistem	E
48,86	21,14	30,00	R	4,632	svetlorumen moten sistem	E
45,37	19,63	35,00	R	4,917	svetlorumen moten sistem	E
41,88	18,12	40,00	R	5,211	svetlorumen moten sistem	E
38,39	16,61	45,00	R	5,542	svetlorumen moten sistem	E
34,90	15,10	50,00	R	5,685	svetlorumen moten sistem	E
31,41	13,59	55,00	R	5,87	svetlorumen moten sistem	E
27,92	12,08	60,00	R	6,233	svetlorumen moten sistem	E
24,43	10,57	65,00	R	6,311	svetlorumen moten sistem	E
20,94	9,06	70,00	R	5,921	svetlorumen moten sistem	E
17,45	7,55	75,00	R	8,719	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
13,96	6,04	80,00	R	1,054	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
10,47	4,53	85,00	R	4,171	moten, mlečnatobel sistem	E
6,98	3,02	90,00	R	7,857	moten, mlečnatobel sistem	E
3,49	1,51	95,00	R	6,34	moten, mlečnatobel sistem	E
65,02	34,98	0,00	M	1,645	bistra, olivna raztopina	SMES
61,77	33,23	5,00	M	1,744	bistra, olivna raztopina	V/O ME
58,52	31,48	10,00	M	2,174	bistra, olivna raztopina	V/O ME
55,27	29,73	15,00	M	2,471	bistra, olivna raztopina	V/O ME
41,96	22,57	35,46	M/R	2,669	svetlorumen moten sistem	E
48,77	26,23	25,00	R	2,78	svetlorumen moten sistem	E
45,52	24,48	30,00	R	2,935	svetlorumen moten sistem	E
42,27	22,74	35,00	R	3,063	svetlorumen moten sistem	E
39,01	20,99	40,00	R	3,201	svetlorumen moten sistem	E
35,76	19,24	45,00	R	3,414	svetlorumen moten sistem	E
32,51	17,49	50,00	R	3,81	svetlorumen moten sistem	E
29,26	15,74	55,00	R	3,039	svetlorumen moten sistem	E
26,01	13,99	60,00	R	2,87	svetlorumen moten sistem	E
22,76	12,24	65,00	R	3,254	svetlorumen moten sistem	E
19,51	10,49	70,00	R	3,528	svetlorumen moten sistem	E
16,26	8,74	75,00	R	3,112	svetlorumen moten sistem	E

13,00	7,00	80,00	R	1,201	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
9,75	5,25	85,00	R	4,609	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
6,50	3,50	90,00	R	7,275	moten, mlečnatobel sistem	E
3,25	1,75	95,00	R	6,904	moten, mlečnatobel sistem	E
60,13	39,87	0,00	M	0,975	bistra, olivna raztopina	SMES
57,13	37,88	5,00	M	1,3	bistra, olivna raztopina	V/O ME
54,12	35,88	10,00	M	1,65	bistra, olivna raztopina	V/O ME
51,11	33,89	15,00	M	1,752	bistra, olivna raztopina	V/O ME
48,11	31,89	20,00	M/R	1,814	bistra, olivna raztopina	V/O ME
45,10	29,90	25,00	R	1,903	svetlorumen moten sistem	E
42,09	27,91	30,00	R	1,964	svetlorumen moten sistem	E
39,09	25,91	35,00	R	2,077	svetlorumen moten sistem	E
36,08	23,92	40,00	R	2,139	svetlorumen moten sistem	E
33,07	21,93	45,00	R	2,268	svetlorumen moten sistem	E
30,07	19,93	50,00	R	2,237	svetlorumen moten sistem	E
27,06	17,94	55,00	R	2,031	svetlorumen moten sistem	E
24,05	15,95	60,00	R	1,837	svetlorumen moten sistem	E
21,05	13,95	65,00	R	1,78	svetlorumen moten sistem	E
18,04	11,96	70,00	R	1,846	svetlorumen moten sistem	E
15,03	9,97	75,00	R	4,564	svetlorumen moten sistem	E
12,03	7,97	80,00	R	0,614	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
9,02	5,98	85,00	R	7,417	moten, mlečnatobel sistem	E
6,01	3,99	90,00	R	8,032	moten, mlečnatobel sistem	E
3,01	1,99	95,00	R	6,112	moten, mlečnatobel sistem	E
55,08	44,92	0,00	M	0,7916	bistra, olivna raztopina	SMES
52,33	42,67	5,00	M	0,9935	bistra, olivna raztopina	V/O ME
49,57	40,43	10,00	M	1,196	bistra, olivna raztopina	V/O ME
46,82	38,18	15,00	M/R	1,1918	svetlorumen moten sistem	E
44,07	35,93	20,00	R	1,165	svetlorumen moten sistem	E
41,31	33,69	25,00	R	1,227	svetlorumen moten sistem	E
38,83	31,66	29,51	R	1,278	svetlorumen moten sistem	E
35,80	29,20	35,00	R	1,387	svetlorumen moten sistem	E
33,05	26,95	40,00	R	1,505	svetlorumen moten sistem	E
30,30	24,71	45,00	R	1,579	svetlorumen moten sistem	E
27,54	22,46	50,00	R	1,75	svetlorumen moten sistem	E
24,79	20,21	55,00	R	1,589	svetlorumen moten sistem	E
22,03	17,97	60,00	R	1,426	svetlorumen moten sistem	E
19,28	15,72	65,00	R	1,616	svetlorumen moten sistem	E
16,52	13,48	70,00	R	2,789	svetlorumen moten sistem	E
13,77	11,23	75,00	R	1,81	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
11,02	8,98	80,00	R	3,636	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
8,26	6,74	85,00	R	8,716	moten, mlečnatobel sistem	E
5,51	4,49	90,00	R	8,571	moten, mlečnatobel sistem	E
2,75	2,25	95,00	R	6,091	moten, mlečnatobel sistem	E
49,84	50,16	0,00	M	0,5456	bistra, olivna raztopina	SMES
47,35	47,65	5,00	M	0,7299	bistra, olivna raztopina	V/O ME
44,86	45,14	10,00	M/R	0,7068	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
42,37	42,63	15,00	R	0,6327	bister, rumenzelen sistem	V/O ME
39,88	40,13	20,00	R	0,6867	bister, rumenzelen sistem	V/O ME
37,38	37,62	25,00	R	0,7936	bister, rumenzelen sistem	V/O ME

34,89	35,11	30,00	R	0,8823	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
32,40	32,60	35,00	R	0,9851	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
29,91	30,10	40,00	R	1,389	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
27,41	27,59	45,00	R	1,895	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
24,92	25,08	50,00	R	3,264	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
22,43	22,57	55,00	R	5,607	bister, rumenozelen sistem	V/O ME
19,94	20,06	60,00	R	2,17	moten, mlečnatobel sistem	E
17,44	17,56	65,00	R	1,772	moten, mlečnatobel sistem	E
14,95	15,05	70,00	R	7,401	moten, mlečnatobel sistem	E
12,46	12,54	75,00	R	12,822	moten, mlečnatobel sistem	E
9,97	10,03	80,00	R	13,86	moten, mlečnatobel sistem	E
7,48	7,52	85,00	R	12,302	moten, mlečnatobel sistem	E
4,98	5,02	90,00	R	9,55	moten, mlečnatobel sistem	E
2,49	2,51	95,00	R	5,686	moten, mlečnatobel sistem	E
45,05	54,95	0,00	M	0,546	rumena, bistra raztopina	SMES
42,80	52,21	5,00	M	0,4856	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
40,54	49,46	10,00	M	0,3262	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
38,29	46,71	15,00	M	0,3276	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
36,04	43,96	20,00	M/R	0,5945	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
33,78	41,21	25,00	R	1,547	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
31,53	38,47	30,00	R	3,35	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
29,28	35,72	35,00	R	4,641	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
27,03	32,97	40,00	R	5,386	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
24,78	30,22	45,00	R	5,516	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
22,52	27,48	50,00	R	3,867	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
20,27	24,73	55,00	R	1,375	moten, mlečnatobel sistem	E
18,02	21,98	60,00	R	3,133	moten, mlečnatobel sistem	E
15,77	19,23	65,00	R	8,194	moten, mlečnatobel sistem	E
13,51	16,49	70,00	R	11,478	moten, mlečnatobel sistem	E
11,26	13,74	75,00	R	11,88	moten, mlečnatobel sistem	E
9,01	10,99	80,00	R	11,522	moten, mlečnatobel sistem	E
6,76	8,24	85,00	R	12,161	moten, mlečnatobel sistem	E
4,50	5,50	90,00	R	9,075	moten, mlečnatobel sistem	E
2,25	2,75	95,00	R	5,401	moten, mlečnatobel sistem	E
39,93	60,07	0,00	M	0,2948	rumena, bistra raztopina	SMES
37,94	57,07	5,00	M	0,4173	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
35,94	54,06	10,00	M/R	0,2802	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
33,94	51,06	15,00	R	0,2277	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
31,94	48,06	20,00	R	0,3139	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
29,95	45,05	25,00	R	0,5714	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
27,95	42,05	30,00	R	0,9361	zamotnitev sistema ob dodatku vode,	V/O ME

					nato zbistritev	
25,96	39,05	35,00	R	1,2816	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
23,96	36,04	40,00	R	1,676	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
21,96	33,04	45,00	R	2,135	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
19,97	30,04	50,00	R	2,883	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
17,97	27,03	55,00	R	4,175	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
15,97	24,03	60,00	R	2,986	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
13,98	21,03	65,00	R	1,716	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
11,98	18,02	70,00	R	5,57	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
9,98	15,02	75,00	R	9,544	moten, mlečnatobel sistem	E
7,99	12,01	80,00	R	10,046	moten, mlečnatobel sistem	E
5,99	9,01	85,00	R	8,934	moten, mlečnatobel sistem	E
3,99	6,01	90,00	R	7,834	moten, mlečnatobel sistem	E
2,00	3,00	95,00	R	4,835	moten, mlečnatobel sistem	E
35,09	64,91	0,00	M	0,2528	rumena, bistra raztopina	SMES
33,33	61,67	5,00	M	0,2285	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
31,58	58,42	10,00	M	0,1609	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
29,82	55,18	15,00	M/R	0,1609	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
28,07	51,93	20,00	R	0,4327	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
26,32	48,69	25,00	R	1,1223	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
24,56	45,44	30,00	R	2,379	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
22,81	42,19	35,00	R	3,599	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
21,05	38,95	40,00	R	4,58	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
19,30	35,70	45,00	R	6,157	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
17,54	32,46	50,00	R	6,332	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
15,79	29,21	55,00	R	2,227	moten, mlečnatobel sistem	E
14,03	25,96	60,00	R	7,71	moten, mlečnatobel sistem	E
12,28	22,72	65,00	R	10,15	moten, mlečnatobel sistem	E
10,53	19,47	70,00	R	13,43	moten, mlečnatobel sistem	E
8,77	16,23	75,00	R	12,85	moten, mlečnatobel sistem	E
7,02	12,98	80,00	R	11,28	moten, mlečnatobel sistem	E
5,26	9,74	85,00	R	9,397	moten, mlečnatobel sistem	E
3,51	6,49	90,00	R	6,9	moten, mlečnatobel sistem	E
1,75	3,25	95,00	R	4,2	moten, mlečnatobel sistem	E
30,12	69,88	0,00	M	0,122	rumena, bistra raztopina	SMES
28,61	66,39	4,99	M	0,1164	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
27,11	62,89	10,00	M	0,0773	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
25,60	59,40	15,00	R	0,1644	zamotnitev sistema ob dodatku vode,	V/O ME

					nato zbistritev	
24,09	55,91	20,00	R	1,2503	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
22,59	52,41	25,00	R	3,203	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
21,08	48,92	30,00	R	4,72	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
19,58	45,42	35,00	R	4,895	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
18,07	41,93	40,00	R	4,59	moten, mlečnatorumen sistem	E
16,56	38,43	45,00	R	2,193	moten, mlečnatorumen sistem	E
15,06	34,94	50,00	R	5,013	moten, mlečnatorumen sistem	E
13,55	31,45	55,00	R	8,691	moten, mlečnatorumen sistem	E
12,05	27,95	60,00	R	11,088	moten, mlečnatorumen sistem	E
10,54	24,46	65,00	R	11,774	moten, mlečnatorumen sistem	E
9,04	20,96	70,00	R	11,225	moten, mlečnatorumen sistem	E
7,53	17,47	75,00	R	11,632	moten, mlečnatorumen sistem	E
6,02	13,98	80,00	R	10,097	moten, mlečnatorumen sistem	E
4,52	10,48	85,00	R	8,246	moten, mlečnatorumen sistem	E
3,01	6,99	90,00	R	6,237	moten, mlečnatorumen sistem	E
1,51	3,49	95,00	R	3,807	moten, mlečnatorumen sistem	E
25,04	74,96	0,00	M	0,1371	rumena, bistra raztopina	SMES
23,79	71,21	5,00	M	0,0679	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
22,53	67,46	10,00	M/R	0,0576	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
21,28	63,72	15,00	M/R	1,1946	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
20,03	59,97	20,00	R	0,969	moten, mlečnatorumen sistem	E
18,78	56,22	25,00	R	0,7896	moten, mlečnatorumen sistem	E
17,53	52,47	30,00	R	1,899	moten, mlečnatorumen sistem	E
16,28	48,72	35,00	R	5,723	moten, mlečnatorumen sistem	E
15,02	44,98	40,00	R	7,672	moten, mlečnatorumen sistem	E
13,77	41,23	45,00	R	11,577	moten, mlečnatorumen sistem	E
12,52	37,48	50,00	R	11,722	moten, mlečnatorumen sistem	E
11,27	33,73	55,00	R	13,28	moten, mlečnatorumen sistem	E
10,02	29,98	60,00	R	12,663	moten, mlečnatorumen sistem	E
8,76	26,24	65,00	R	11,662	moten, mlečnatorumen sistem	E
7,51	22,49	70,00	R	11,47	moten, mlečnatorumen sistem	E
6,26	18,74	75,00	R	10,258	moten, mlečnatorumen sistem	E
5,01	14,99	80,00	R	8,844	moten, mlečnatorumen sistem	E
3,76	11,24	85,00	R	7,206	moten, mlečnatorumen sistem	E
2,50	7,50	90,00	R	5,502	moten, mlečnatorumen sistem	E
1,25	3,75	95,00	R	3,337	moten, mlečnatorumen sistem	E
20,06	79,94	0,00	M	0,075	rumena, bistra raztopina	SMES
19,06	75,94	5,00	M	0,0429	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
18,06	71,94	10,00	M/R	0,1967	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
17,06	67,95	15,00	R	0,1025	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
16,05	63,95	20,00	R	0,2425	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
15,05	59,95	25,00	R	1,369	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
14,05	55,95	30,00	R	7,131	moten, mlečnatobel, gost sistem	E

13,04	51,96	35,00	R	10,096	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
12,04	47,96	40,00	R	11,908	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
11,04	43,96	45,00	R	11,888	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
10,03	39,97	50,00	R	11,752	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
9,03	35,97	55,00	R	11,473	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
8,03	31,97	60,00	R	11,228	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
7,02	27,98	65,00	R	10,683	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
6,02	23,98	70,00	R	9,872	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
5,02	19,98	75,00	R	8,769	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
4,01	15,99	80,00	R	7,638	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
3,01	11,99	85,00	R	5,005	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
2,01	7,99	90,00	R	4,404	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
1,00	4,00	95,00	R	2,836	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
15,01	84,99	0,00	M	0,0597	rumena, bistra raztopina	SMES
14,26	80,74	5,00	M	0,0217	zamotnitev sistema ob dodatku vode, nato zbistritev	V/O ME
13,51	76,49	10,00	M/R	0,0099	opalescenten, bister sistem, videz gela	O/V ME
12,76	72,24	15,00	R	0,3876	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
12,01	67,99	20,00	R	0,5025	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
11,26	63,74	25,00	R	7,193	moten, mlečnatobel, gost sistem	E
10,51	59,49	30,00	R	7,815	moten, mlečnatobel sistem	E
9,76	55,24	35,00	R	8,043	moten, mlečnatobel sistem	E
9,01	50,99	40,00	R	8,9	moten, mlečnatobel sistem	E
8,26	46,74	45,00	R	8,941	moten, mlečnatobel sistem	E
7,51	42,49	50,00	R	8,761	moten, mlečnatobel sistem	E
6,76	38,24	55,00	R	7,704	moten, mlečnatobel sistem	E
6,00	33,99	60,00	R	7,431	moten, mlečnatobel sistem	E
5,25	29,75	65,00	R	7,719	moten, mlečnatobel sistem	E
4,50	25,50	70,00	R	7,257	moten, mlečnatobel sistem	E
3,75	21,25	75,00	R	6,213	moten, mlečnatobel sistem	E
3,00	17,00	80,00	R	5,517	moten, mlečnatobel sistem	E
2,25	12,75	85,00	R	4,928	moten, mlečnatobel sistem	E
1,50	8,50	90,00	R	3,921	moten, mlečnatobel sistem	E
0,75	4,25	95,00	R	2,429	moten, mlečnatobel sistem	E
10,34	89,66	0,00	M	0,0108	rumena, bistra raztopina	SMES
9,82	85,18	5,00	M	0,0088	moten, mlečnatobel sistem	E
9,31	80,69	10,00	R	0,7483	moten, mlečnatobel sistem	E
8,79	76,21	15,00	R	1,614	moten, mlečnatobel sistem	E
8,27	71,72	20,00	R	2,417	moten, mlečnatobel sistem	E
7,76	67,25	25,00	R	0,2664	moten, mlečnatobel sistem	E
7,24	62,76	30,00	R	5,412	moten, mlečnatobel sistem	E
6,72	58,28	35,00	R	6,683	moten, mlečnatobel sistem	E
6,20	53,79	40,00	R	6,15	moten, mlečnatobel sistem	E
5,69	49,31	45,00	R	6,212	moten, mlečnatobel sistem	E
5,17	44,83	50,00	R	6,584	moten, mlečnatobel sistem	E
4,65	40,35	55,00	R	5,834	moten, mlečnatobel sistem	E
4,14	35,86	60,00	R	6,059	moten, mlečnatobel sistem	E
3,62	31,38	65,00	R	5,335	moten, mlečnatobel sistem	E
3,10	26,90	70,00	R	5,251	moten, mlečnatobel sistem	E
2,59	22,41	75,00	R	4,61	moten, mlečnatobel sistem	E
2,07	17,93	80,00	R	3,983	moten, mlečnatobel sistem	E

1,55	13,45	85,00	R	3,622	moten, mlečnatobel sistem	E
1,03	8,97	90,00	R	2,894	moten, mlečnatobel sistem	E
0,52	4,48	95,00	R	1,97	moten, mlečnatobel sistem	E
5,05	94,95	0,00	M	0,0051	prozorna raztopina	SMES
4,80	90,20	5,00	M/R	0,0056	moten, nehomogen sistem	E
4,55	85,45	10,00	R	0,0013	moten, nehomogen sistem	E
4,29	80,70	15,00	R	0,0054	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
4,04	75,95	20,00	R	0,0079	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
3,79	71,21	25,00	R	0,0088	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
3,54	66,46	30,00	R	0,0154	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
3,28	61,72	35,00	R	0,0058	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
3,03	56,97	40,00	R	0,0142	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
2,78	52,22	45,00	R	0,0056	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
2,53	47,47	50,00	R	0,0349	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
2,27	42,73	55,00	R	0,0162	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
2,02	37,98	60,00	R	0,0903	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
1,77	33,23	65,00	R	0,1241	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
1,52	28,48	70,00	R	0,2699	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
1,26	23,74	75,00	R	0,2058	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
1,01	18,99	80,00	R	0,9609	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
0,76	14,24	85,00	R	0,6178	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
0,51	9,49	90,00	R	1,84	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E
0,25	4,75	95,00	R	1,53	moten, nehomogen sistem, sesirjenega videza, ločitev faz	E

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KATJA ČERPŃAK

**VREDNOTENJE KOLOIDNIH SISTEMOV Z LECITINOM
ZA DERMALNO APLIKACIJO ASKORBILPALMITATA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KATJA ČERPŃAK

**VREDNOTENJE KOLOIDNIH SISTEMOV Z LECITINOM
ZA DERMALNO APLIKACIJO ASKORBILPALMITATA**

**EVALUATION OF COLLOIDAL SYSTEMS WITH
LECITHIN FOR DERMAL APPLICATION OF ASCORBYL
PALMITATE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof.dr.

Mirjane Gašperlin, mag.farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof.dr. Mirjani Gašperlin, mag.farm. in delovni mentorici Mirjam Gosenca, mag.farm. za njune napotke in vsestransko pomoč. Zahvalo izrekam tudi staršem in prijateljem, ki so me podpirali in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof.dr.Mirjane Gašperlin, mag.farm.

Katja Čerpnjak