

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA GOLOB

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

PRIMERJAVA LIPAZNE INHIBICIJE REFERENČNIH IN GENERIČNIH KAPSUL  
ORLISTAT

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JANA GOLOB**

**PRIMERJAVA LIPAZNE INHIBICIJE REFERENČNIH  
IN GENERIČNIH KAPSUL ORLISTAT**

**Comparison of lipase inhibition by referent and generic  
orlistat capsules**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2010

Diplomsko naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča in somentorstvom doc. dr. Mojce Lunder.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanetu Srčiču in somentorici doc. dr. Mojci Lunder. Posebno bi se rada zahvalila Biljani Govedarici za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomskega dela.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naloge samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, somentorice doc. dr. Mojce Lunder.

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Član komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Ljubljana, 2010

Jana Golob

# KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>5</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>6</b>
1.1. Značilnosti lipaz.....	9
1.1.1 <i>In vitro</i> metode za merjenje aktivnosti lipaze.....	11
1.2 Potencialni inhibitorji pankreasne lipaze.....	14
1.2.1 ORLISTAT.....	14
1.3 Validacija analizne metode.....	18
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Materiali.....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Surovina, kemikalija.....	21
3.1.2 Reagenti.....	21
3.1.3 Vzorci.....	23
<b>3.2 Metode.....</b>	<b>23</b>
3.2.1.1. DSC.....	23
3.2.1.2. SEM.....	24
3.2.2 <i>IN VITRO</i> OCENJEVANJE PODOBNOSTI MED VZORCI ORLISTATA DVEH PROIZVAJALCEV.....	24
3.2.3 <i>IN VITRO</i> TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA.....	28
3.2.4 MODIFICIRAN <i>IN VITRO</i> TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA.....	29
3.2.5 OCENITEV KONCENTRACIJSKO ODVISNIH UČINKOV KAPSUL ORLISTATA S TESTOM SPROŠČANJA IN <i>IN VITRO</i> TESTOM INHIBICIJE LIPAZE.....	31
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>33</b>
4.1 DSC, SEM.....	33
4.2 <i>IN VITRO</i> OCENJEVANJE PODOBNOSTI MED VZORCI ORLISTATA DVEH PROIZVAJALCEV.....	35

4.3 <i>IN VITRO</i> TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA.....	43
4.4 MODIFICIRAN <i>IN VITRO</i> TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA.....	45
4.5 OCENITEV KONCENTRACIJSKO ODVISNIH UČINKOV KAPSUL ORLISTATA S TESTOM SPROŠČANJA IN <i>IN VITRO</i> TESTOM INHIBICIJE LIPAZE.....	53
<b>5. SKLEP.....</b>	<b>55</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>56</b>

## POVZETEK

Lipidi so bistvene sestavine vseh živih organizmov, saj predstavljajo strukturne elemente in so tudi vir energije. Pri povečanem vnosu pa lahko pride do razvoja debelosti in različnih patoloških zapletov. Eden od farmakoloških pristopov zdravljenja debelosti predstavlja inhibicijo encimov, ki so potrebni za prebavo zaužitih lipidov. To predstavljajo nove učinkovine za uporabo v kronični terapiji debelosti v kombinaciji z nizko kalorično dieto in ustrezno fizično aktivnostjo. Novemu razredu farmakoloških učinkovin pripada tudi tetrahidrolipstatin (orlistat), ki deluje lokalno v gastrointestinalnem traktu, ker inhibira pankreasno in želodčno lipazo in posledično preprečuje absorpcijo lipidov. V primeru učinkovin, ki delujejo lokalno, se bioekvivalentna študija izvaja kot klinična študija, medtem ko se med formulacijskimi raziskavami lahko uporabi *in vitro* metoda. Namen diplomske naloge je bil, da bi razvili enostaven *in vitro* test za ocenjevanje podobnosti med vzorci orlistata dveh proizvajalcev, prav tako tudi ustrezni test za primerjanje učinkovitosti različnih odmerkov. S farmakološkega zornega kota je  $IC_{50}$  ustrezni parameter za potrditev enake učinkovitosti. Rezultati kažejo na enako  $IC_{50}$  med analiziranimi vzorci orlistatov (Ranbaxy®, Biocon® in Standard). Uporabljen *in vitro* test za določanje aktivnosti lipaze v prisotnosti orlistata smo potrdili kot specifičen, natančen in linearen v območju koncentracij orlistata med 0,1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$ . Poleg proučevanja vzorcev orlistata smo *in vitro* lipazni test uporabili tudi za preizkušanje inhibitorne aktivnosti kapsul orlistata različnih odmerkov. Glede na pridobljene rezultate ni bilo značilnih razlik v odstotkih inhibicije lipaze med preiskovanimi orlistat kapsulami (Alli®, Xenical®, Polpharma 120 in 60 mg). Glavni razlog za takšen rezultat je slaba topnost orlistata v pufru pH 4,5 in tako hiter doseg nasičene koncentracije. Iz tega razloga smo uporabljeno metodo modificirali, da bi zagotovili razlike v odstotkih inhibicije lipaze med preiskovanimi formulacijami. Odstotki inhibicije lipaze Xenical®-a so bili značilno večji v primerjavi z Alli® kapsulami. Metoda pri kateri smo uporabili kombinacijo testa sproščanja (dissolution test) in *in vitro* test inhibicije lipaze prav tako kaže na večje odstotke inhibicije lipaze Xenical®-a v primerjavi z Alli® kapsulami. Po drugi strani pa metodi nista zagotovili koncentracijsko odvisnega učinka orlistata, ki je potrjen v *in vivo* študijah. Ostali dejavniki kot so sestava hrane, čas zadrževanja v želodcu, prisotnost

žolčnih kislin v tankemu črevesu in motiliteta črevesja, so izjemno pomembni dejavniki, ki v *in vivo* študijah gotovo značilno vplivajo na zagotovitev inhibitornega učinka odvisnega od odmerka orlistata.

## ABSTRACT

Lipids are essential compounds for all living organisms. Essential roles of lipids in organisms are energetic and building functions. Their increased intake contributes to development of obesity and multiple pathological complications. Inhibition of the digestion of dietary lipids is a potential target in pharmacology. This represents new medicinal products which could be used in chronic treatment together in conjunction with a reduced-calorie diet and physical activity. Orlistat belongs to a new class of pharmacological agents, which acts locally in the gastrointestinal tract, inhibiting the pancreatic and gastric lipase from digesting triglycerides. For locally active products is bioequivalence study performed as clinical study, whereas in formulation studies *in vitro* method can be used. The main scope of research was to develop the simple *in vitro* test for comparison of equality between orlistat substances provided by two different suppliers. Furthermore, objective was also concerned on developing of appropriate *in vitro* test for measuring the effects of orlistat capsules with different doses. It has been demonstrated that orlistat samples (Ranbaxy<sup>®</sup>, Biocon<sup>®</sup> and Standard) have the same  $IC_{50}$ , that is from the pharmacological point of view appropriate parameter for confirming their similarity in efficacy. The used *in vitro* test for the determination of lipase activity in the presence of orlistat as inhibitor has been confirmed to be linear in the range of concentration between 0,1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M, specific and precise. We also used *in vitro* lipase inhibitory test in experiments for inhibitory effects of orlistat capsules with different doses. According to the obtained results, no significant differences could be identified in the extent of lipase inhibition among the investigated orlistat capsules (Alli<sup>®</sup>, Xenical<sup>®</sup>, Polpharma 120 and 60 mg). The main reason for such results is quick establishment of saturation, because of its poor solubility in buffer pH 4,5. For this reason we modified method in order to demonstrate differences in percentage of lipase inhibition among investigating formulations. Evidently, Xenical<sup>®</sup> inhibited lipase in larger percentage in comparison to Alli<sup>®</sup>. The combination of dissolution test in buffer pH 4,5 for sample preparation and described lipase inhibitory test also shows that Xenical<sup>®</sup> inhibited lipase in larger percentage in comparison to Alli<sup>®</sup>, but dose-dependent effect still has not been proven in both utilized methods. Other physiological factors such as food, motility of intestine, bile salts, residual time in

stomach, are of great importance for providing the dose-dependent effect in *in vivo* studies.

# SEZNAM OKRAJŠAV

<b>DSC</b>	diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
<b>p-NPP</b>	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
<b>p-NP</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>ORL</b>	orlistat (tetrahidrolipstatin)
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija, ki zmanjša aktivnost lipaze za 50%
<b>K<sub>i(app)</sub></b>	navidezna konstanta inhibicije
<b>SEM</b>	vrstični elektronski mikroskop (angl. <i>Scanning Electron Microscope</i> )
<b>NaDC</b>	Natrijev deoksiholat
<b>NaTDC</b>	Natrijev taurodeoksiholat
<b>RSD</b>	relativna standardna deviacija (angl. <i>relative standard deviation</i> )
<b>STD</b>	standardna deviacija (angl. <i>standard deviation</i> )

# 1. UVOD

Zdravilne učinkovine se redkokdaj uporabljajo kot čiste snovi in so najpogosteje vključene v različne farmacevtske oblike. Za formulacijo različnih farmacevtskih oblik se poleg zdravilnih učinkovin uporabljajo pomožne snovi kot so polnila, površinsko aktivne snovi, razgrajevala, drsljivci, itd. Osnovni namen načrtovanja farmacevtskih oblik predstavlja dostavo učinkovine na tarčno mesto delovanja, zagotavljanje ustrezne terapevtske učinkovitosti in možnost industrijske proizvodnje visoko kakovostnega izdelka. Za uspešno formulacijo farmacevtskih oblik je potrebno upoštevati naslednje dejavnike:

- ❖ fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin
- ❖ terapevtske dejavnike
- ❖ biofarmacevtske dejavnike kot so absorpcija, permeabilnost in vpliv hrane

Pozornost je predvsem usmerjena na zmanjšanju razlik v biološki uporabnosti, posebej med oblikami, ki vsebujejo enak odmerek zdravilne učinkovine. Optimizacija biološke uporabnosti vključuje predvsem primerno izbiro fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine (kar vpliva na topnost in hitrost sproščanja), dodatek pomožnih snovi z različnimi funkcijami in izbiro ustreznega proizvodnega postopka ter pakiranja (1).

Predformulacijske študije so zelo pomembne v razvoju učinkovitega, varnega in kakovostnega zdravila. Za izvedbo predformulacijskih študij se uporabljajo različne metode odvisno od osnovnih lastnosti učinkovin ali pomožnih snovi (Preglednica 1).

Najpogostejši parametri, ki se določajo v predformulacijskih študijah so:

- ❖ velikost in oblika delcev
- ❖ topnost v različnih topilih
- ❖ pH odvisen stabilnostni profil
- ❖ polimorfizem
- ❖ porazdelitveni koeficient
- ❖ permeabilnost zdravilnih učinkovin
- ❖ profil in kinetika raztopljanja
- ❖ kompatibilnost oz. interakcije z izbranimi pomožnimi snovmi (2).

Mnoge fizikalno-kemijske lastnosti snovi lahko proučujemo s termoanaliznimi tehnikami. Ena od najpogosteje uporabljenih termoanaliznih tehnik v farmaciji je diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC-Differential Scanning Calorimetry). Obsega nadzorovano segrevanje, hlajenje vzorca ali vzdrževanje konstantne temperature ter opazovanje fizikalnih in kemijskih sprememb, ki medtem potekajo. Je metoda pri kateri merimo topotni tok ( $dQ/dt$ ) iz/v vzorec kot funkcijo temperature in/ali časa. Rezultat merjenja je krivulja odvisnosti topotnega toka od temperature/ali časa. Z vrhovi (peaki) označujemo spremembo entalpije in območje temperature, v katerem je prišlo do spremembe. S to metodo lahko proučujemo polimorfizem, določamo vsebnost nečistot ter naslednje fizikalno-kemijske lastnosti snovi :

- Tališče, temperaturno območje taljenja, temperaturo kristalizacije
- Entalpijo taljenja
- Topotno kapaciteto
- Odparevanje, desorpcijo
- Steklasti prehod
- Termično stabilnost
- Oksidacijske razpade
- Kinetiko reakcije razpada in nekaterih drugih reakcij (3)

Neposredno opazovanje površine vzorcev nam omogoča vrstični elektronski mikroskop-SEM. Deluje na principu elektronskega žarka, ki potuje po površini vzorca in izbija sekundarne elektrone, ki jih zbira detektor. Scintilator spreminja sekundarne elektrone v fotone, ki se pretvorijo v električni signal, katerega na televizijskem zaslonu zaznamo kot sliko površine preparata (4).

**Preglednica 1: Metode za izvedbo predformulacijskih študij (2)**

Mikroskopija (optična, vrstična elektronska, transmisijska elektronska)
Termična analiza (DSC, diferenčna termična analiza, termogravimetrična analiza)
Rentgenska difrakcijska analiza (X-ray)
Nuklearna magnetna resonanca in elektronska spinska resonanca (NMR, ESP)
Masna spektrometrija
UV-VIS spektrofotometrija
IR spektroskopija
Kromatografske metode (tankoplastna, tekočinska visoke ločljivosti, plinska)
Topnost in hitrost raztopljanja (Intrinzična topnost)

Načrtovanje in priprava farmacevtskih oblik zahteva najvišje standarde s previdno izbranimi postopki za preverjanje kakovosti in enakosti med formulacijami z enakim odmerkom zdravilne učinkovine. S tega stališča se morajo tudi v primeru učinkovin, ki delujejo lokalno, uporabljati testi, s katerimi se preverja enakost učinkovitosti (bioekvivalenčne študije) (1).

V nadaljevanju je prikazano testiranje kapsul orlistata z uporabo poskusa inhibicije pankreasne lipaze.

## 1.1 Značilnosti lipaz

Lipidi so bistvenega pomena za življenje organizma, saj shranjujejo energijo, imajo strukturne funkcije v celični membrani in so udeleženi pri različnih signalnih poteh v celicah (5). Prebava dolgoverižnih trigliceridov je visoko učinkovit proces, saj sestavlja posamezne korake kot so emulzifikacija, hidroliza z lipazami v maščobne kisline in monoacilglicerole, disperzija nastalih produktov v vodnem okolju in prevzem z enterociti (6). Produkti žolča (soli žolčnih kislin) so bistveni za intestinalno emulgiranje zaužitih maščob in v maščobah topnih vitaminov (7).

Lipaze (E.C.3.1.1.3-NC IUBMB, Encimska nomenklatura) so definirane kot karboksiesteraze, ki hidrolizirajo acilgliceride z acilno verigo večjo od 10C atomov (8). Lipaza katalizira hidrolizo estrske vezi, kar vključuje acilacijske in deaciljske korake (9). Lipaze so različnih izvorov (živali, rastline, glice, bakterije), pridobivamo jih z uporabo različnih metod (5, 7). Medsebojno se razlikujejo v svojih fizikalnih lastnostih in biokemijskih značilnostih, pri čemer so selektivne glede na dolžino maščobno kislinske verige (9). Večina lipaz so vodotopni encimi, ki hidrolizirajo estrsko vez v vodi netopnih substratov (5, 10). Lipoliza je primer heterogene biokatalize, zato so lipolitične reakcije močno odvisne od medfazne aktivnosti, difuzijske kinetike, porazdelitve substrata, produktov in inhibitorjev (7). Lipaze so zmožne tudi kataliziranja reakcij, ki se izvajajo v organskem mediju (8). Osnovne značilnosti lipaz predstavljene v raziskovanih študijah so naslednje:

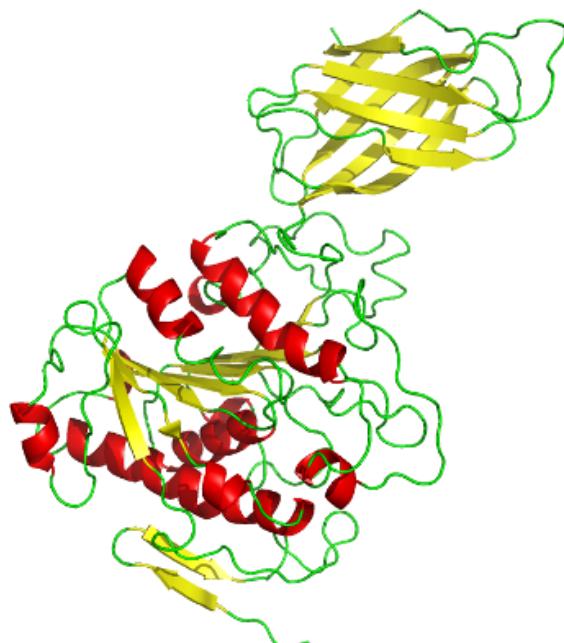
- ❖ Lipaze izražajo največjo aktivnost pri pH 8 (izjema je želodčna lipaza).
- ❖ Aktivnost določenih lipaz (izoliranih iz bakterij) ni odvisna le od pH, ampak tudi od izbire pufra. Najvišja aktivnost je dosežena z uporabo fosfatnega pufra v primerjavi s citratnim in Tris pufrom.
- ❖ Različne vrste lipaz običajno niso stabilne pri temperaturah višjih od 40°C.
- ❖ Stabilnost v organskih topilih: Organska topila, ki se mešajo z vodo (aceton, eter) inhibirajo aktivnost lipaz, medtem, ko tista, ki se ne mešajo z vodo (alkani, halogenoalkani), ohranjajo njihovo aktivnost. Aktivnosti v organskih medijih so običajno nižje kot v vodnem mediju, kar lahko pripisujemo nižji stopnji

- ❖ Aktivnost lipaz je najpogosteje povišana v prisotnosti ionov kot so  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  (8).

Na aktivnost lipaze vplivajo tudi emulgatorji. Emulgatorji s strukturo podobno maščobnim kislinam (kot je Triton x-100) inhibirajo lipazo. Lipaza lahko hidrolizira emulgatorje (kot je Tween 20), ti pa lahko tudi tekmujejo s substratom. Močni emulgatorji denaturirajo encim (porušitev terciarne strukture), posledica tega pa je izguba aktivnosti (5).

Človeška pankreasna lipaza (slika 1) je pomemben encim in je odgovoren za prebavo trigliceridov. Izloča se iz pankreasa v duodenum kot odgovor na emulgirane lipide, ki pridejo v duodenum (11). Svojo fiziološko funkcijo izvaja v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta v prisotnosti žolčnih soli, predvsem v nevtralnem pH območju.

Ena najcenejših in najbolj pogosto uporabljenih lipaz v biotehnologiji je neprečiščen pripravek prašičje pankreasne lipaze (angl. porcine pancreatic lipase) (12). Pogosto jo uporabljajo za biotransformacijo ne-naravnih substratov (13). Ta eksokrini encim katalizira hidrolizo emulgiranih gliceridov (estrov glicerola in maščobnih kislin) na medfazni površini (voda/oljna faza) (12).



**Slika 1:** Trodimenzionalna struktura človeške pankreasne lipaze, PDB koda: 2PPL (14)

### **1.1.1 *In vitro* metode za merjenje aktivnosti lipaze**

Izbira ustreznih metod in naravnih substrata je odločilna za natančno določitev aktivnosti. Večina metod temelji na določanju absorbance v vodni fazi po hidrolizi izbranega substrata z lipazo (15). Encim izkazuje široko specifičnost za substrate, kar so v raziskavah potrdili s tvorbo tetraedričnega intermediata v acilacijskem koraku reakcije, ki jo katalizira (8, 9).

Rutinski analizni postopek za določitev aktivnosti lipaze predstavlja titrimetrija in kolorimetrija. Detekcija in ocenitev aktivnosti lipaze z uporabo kromogenega *p*-nitrofenil palmitata (*p*-NPP) in poznejše meritve absorbance/koncentracije sproščenega *p*-nitrofenola (*p*-NP) se je izkazala kot ena od najbolj enostavnih in najpogosteje uporabljenih kolorimetrijskih metod (16). Princip delovanja metode temelji na merjenju absorbance sproščenega *p*-NP spektrofotometrično pri 405 nm in 37 °C. Encimska aktivnost se določa z merjenjem naraščanja absorbance na minuto. Razlika med encimsko aktivnostjo kontrole in vzorca predstavlja inhibitorno aktivnost proučevane učinkovine (5, 17).

Neprimerne lastnosti *p*-NPP kot substrata za pankreasno lipazo so naslednje:

- ❖ Niso specifični substrat za lipazo, ker jih lahko hidrolizirajo tudi nespecifične lipaze in proteaze prisotne v bioloških vzorcih.
- ❖ Fenolni estri so sekundarni alkoholi, pri čemer velika množica znanih lipaz deluje predvsem na primarne estre na C1 in C3 v triacilglicerolih.
- ❖ Karbonilna skupina sekundarnih estrov je elektronsko aktivirana (delno pozitiven naboj zaradi delokalizacije elektronov na aromatskem obroču v prisotnosti NO<sub>2</sub> skupine). To pomeni, da so sekundarni estri zlahka podvrženi ne-encimskim hidrolizam v prisotnosti kisline ali baze (10).

Zaradi naštetih lastnosti tega substrata se priporoča izvedba poskusa s čistim encimom, ki izključuje prisotnost drugih karboksiesteraz (10). Meritve aktivnosti lipaze se morajo izvajati v nevtralnem ali alkalnem pH, kisel pH namreč močno vpliva na absorbanco *p*-NP (5).

## Pregled drugih metod za ocenitev aktivnosti lipaze:

### FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

#### 1. Reakcija s substratom

- a) nefelometrija, turbidimetrija (obarvani indikatorji kot substrati)
- b) Wilhelmy plate metoda (čisti eno-molekulski film kot substrat)
- c) IR spektroskopija

#### 2. Nastanek produktov hidrolize

##### a) Sprostitev protona kot indirektna metoda

- Obarvani indikatorji
- Titrimetrija

Dobro znana **pH-stat metoda** se običajno uporablja kot referenčna tehnika za določanje aktivnosti lipaze. V primerjavi z drugimi metodami je ta tehnika ena izmed najbolj primernih analitskih postopkov za merjenje aktivnosti lipaze večje od 0,1 IU (IU ali International Unit ali mednarodna enota za aktivnost encima). Predstavlja priporočljivo metodo za karakterizacijo specifičnosti in aktivnosti lipaze, prav tako tudi medfaznega aktivacijskega fenomena. Lipazna aktivnost z uporabo pH-stat metode se meri na mehanično obdelani emulziji naravnih ali sintetičnih triacilglicerolov, z nevtralizacijo sproščenih maščobnih kislin z dodatkom titriranega NaOH za vzdrževanje pH-ja na konstantni vrednosti končne točke.

PH-stat metodo uporabljajo tudi za določitev aktivnosti lipaze v serumu, plazmi in prebavnem soku. Glavna slabost pH-stat metode je omejeno območje pH vrednosti, ki jih lahko proučujemo. Če pri izbranih pH vrednostih sproščene maščobne kisline niso polno ionizirane, je njihova nadaljna titracija nenatančna ali nezmožna izvedbe, četudi z upoštevanjem korekcijskega faktorja.

## b) Detekcija sproščenih maščobnih kislin

### 1. Glicerol karboksilni estri kot substrati

- Kolorimetrija
- Fluorimetrija
- Kromatografija (tankoplastna, tekočinska visoke ločljivosti, plinska)
- Encimski testi
- Elektronska mikroskopija »in –situ«

### 2. Sintetični karboksilni estri kot substrati

- Radioaktivno določanje
- Kolorimetrija
- Fluorimetrija

### 3. Detekcija sproščenega alkohola ali tiola

a) Določitev sproščenega glicerola iz triacilglicerolov

Za detekcijo glicerola se uporabljajo naslednji postopki:

- Oksidacija do formaldehida
- Bioluminiscenca
- Fosforilacija glicerola do glicerol-3-fosfata in konverzija nastalega produkta v dihidroksiaceton-fosfat pri čemer ta razpade do hidrogen-peroksidu

### 4. *Oil - drop* metoda

Princip delovanja temelji na merjenju razlik v medfazni napetosti v olju in vodi kot funkcija časa med hidrolizo z lipazo. V primerjavi z drugimi medfaznimi tehnikami, predstavlja oil-drop tenziometer prednost, saj se lahko spremišča aktivnost lipaze na naravnih dolgoverižnih triacilglicerolih na kontrolirani medfazi olje/voda. Prav tako se lahko proučuje površinsko obnašanje lipaze na medfazi olje/voda pod podobnimi pogoji. Oil-drop metoda zahteva uporabo čistega olja, saj lahko površinsko aktivne snovi zmanjšajo začetno medfazno napetost.

## **1.2 Potencialni inhibitorji pankreasne lipaze**

Pankreasno lipazo lahko inhibira sprememba fizikalnih dejavnikov kot sta T ali pH, ali vpliv kemijskih dejavnikov kot je npr. kovalentna vezava inhibitorja na katalitičnem centru (18). Obstajata dva pristopa za zmanjšanje absorpcije maščob po njihovem vnosu. To sta: lipazni inhibitorji in maščobni nadomestki (7).

Nekateri najpogosteje uporabljeni kovalentni inhibitorji lipaze so:

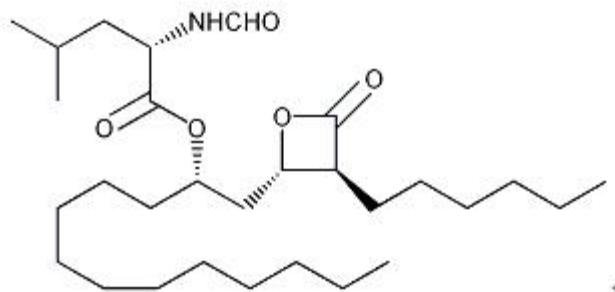
1. Ser-aktivne spojine: dietil-*p*-nitrofenil-fosfat (E-600), *o*-metil-*o*-(*p*-nitrofenil) *n*-undecilfosfonat (C11-P), orlistat (ORL) in cetilstat (še v kliničnem razvoju);
2. Csy-aktivne spojine: 4, 4' ditiopiridin (4-PDS);
3. Lys-aktivne spojine: ciklični anhidrid sulfobenzojske kisline (SBA)

Obstajajo štiri različne metode za študije učinkov naštetih inhibitorjev, ki pa so odvisne od zaporedja dodajanja lipaze, substrata in inhibitorja (19).

### **1.2.1 ORLISTAT**

Orlistat (tetrahidrolipstatin) (slika 2) pripada novemu razredu učinkovin, ki deluje lokalno v gastrointestinalnem traktu in inhibira lipazo, kar posledično inhibira tvorbo maščobnih kislin ter preprečuje absorpcijo lipidov. ORL je s sintezo dobljen derivat lipstatina, ki ga pridobivajo iz *Streptomyces toxytricini* (20).

ORL je specifični inhibitor želodčne, pankreasne lipaze in karboksiester hidrolaze, medtem ko na druge hidrolaze nima učinka (18). Med vsemi najbolj inhibira pankreasno lipazo, ki deluje v tankem črevesu, natančneje v duodenumu in zgornjem delu jejunuma (21). Stranski učinki ORL niso posledica sistemskega delovanja. Po peroralni aplikaciji se skoraj ves vnesen ORL izloči s fecesom (11). Z blokado lipaze, se maščobe iz hrane ne morejo metabolizirati do primarnih produktov, zaradi česar se približno četrtnina maščob izloči skozi črevo neprebavljenih (22). ORL so razvili z namenom zdravljenja dislipidemij, odkar pa so ugotovili, da lahko priomore k nastanku negativne energijske bilance, ga uporabljajo za zdravljenje debelosti (23). Poleg ORL se za zdravljenje debelosti uporabljata tudi sibutramin in rimonabant (24).



**Slika 2:** Kemijска структура ORL ((1S)-1-[ (2S, 3S)-3-heksil-4-okso-oksetan-2-il]metil dodecil] (2S)-2-formamido-4-metil-pentanoat (25)

### Značilnosti ORLISTATA

Komercialno je dostopen v obliki belega kristaliničnega praška, z zelo nizko topnostjo v vodi znotraj fizioloških pH vrednosti (21). Obstaja v dveh polimorfnih modifikacijah, A in B. Obliko B pridobivajo le po sintetični poti. V teoriji je možnih 16 stereoizomerov. Običajno se ga jemlje v odmerkih od 60 mg do 120 mg po obroku in odmerjanje je neodvisno od telesne mase (21).

Na trgu obstajata dva izdelka ORL: originatorsko zdravilo Xenical® (120 mg, Hoffmann-La Roche, Švica) in generično zdravilo Alli® (60 mg, GlaxoSmithKline, UK). Xenical® in Alli® sta prisotna (slika 3, 4) v obliki trdih želatinastih kapsul, ki vsebujejo pelete z aktivno substanco.

#### *Formulacija Alli®*

##### Vsebina kapsule:

Mikrokristalna celuloza (polnilo),  
 Natrijev karboksimetilškrob (razgrajevalo),  
 Natrijev lavrilsulfat (površinsko aktivna snov),  
 povidon (vezivo),  
 smukec (lubrikant);

##### Vsebina Ovojnice kapsul:

želatina,  
 indigotin,  
 titanov dioksid,  
 natrijev lavrilsulfat,  
 sorbitan monolavrat;

##### Črnilo za tisk na kapsulo:

šelak,  
črni železov oksid,  
propilenglikol (22, 26).

Formulacija Xenical® kapsul je podobna Alli® kapsulam, razen različne sestave ovojnice kapsul (želatina, indikotin, titanov dioksid, črnilo za tisk na kapsulo; amonijev hidroksid in kalijev hidroksid) (26). ORL se zaradi lipofilne narave razporeja predvsem v lipofilni fazi, ne glede na sestavo vodne faze. Žolčne kisline so fiziološke površinsko aktivne snovi, ki v koncentraciji nad svojo kritično micelarno koncentracijo solubilizirajo produkte prebave v mešane micle in pospešijo njihov prehod skozi membrano enterocitov (27).

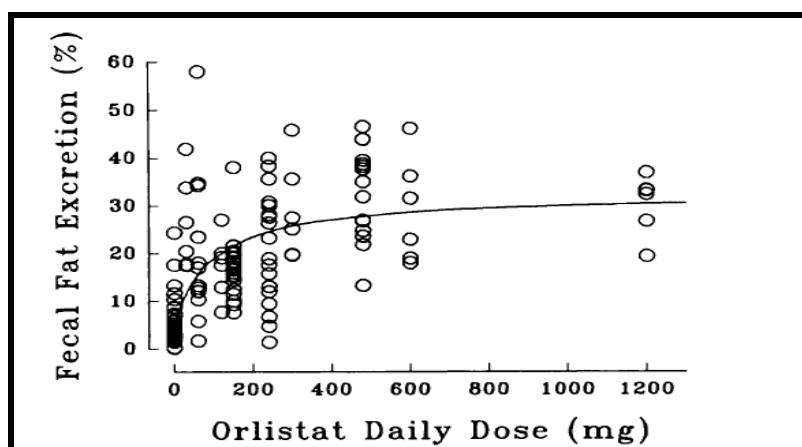


**Slika 3, 4:** Kapsule Xenical (28), Alli (29)

Inhibicija človeške pankreasne lipaze z ORL je ireverzibilnega tipa, saj se tvori kovalentna vez in posledično kompleks encim-substrat-inhibitor (30). V novejših študijah pa so dokazali hitro in delno reverzibilnost v prisotnosti emulzije kratkih in dolgo verižnih triacilglicerolov (31).

Spremljanje učinkov ORL v odvisnosti od odmerka lahko poteka tako "in vivo" kot "in vitro". Izbira eksperimentalnih pogojev za simulacijo prebave maščob *in vitro*, temelji na *in vivo* podatkih (32).

Za merjenje farmakološkega učinka ORL so v *in vivo* študijah na prostovoljcih z normalno in povečano telesno težo spremljali izločanje maščobe s fecesom. Pri jemanju 50 mg ORL 3-krat dnevno je prišlo do razlik v izgubi odvečnih kilogramov v primerjavi z zdravljenjem s placebo. Določili so, da pri vrednosti 400 mg/dan nadaljno naraščanje odmerka ne povzroči značilno spremembo učinka, oz. da je dosežen plato v % izločenih maščob (slika 5) (33).



**Slika 5:** Vpliv velikosti odmerka na učinek ORL (33)

Pri različnih študijah na živalih (npr. miši, podgane) se je ORL izkazal kot izjemno učinkovit inhibitor lipaze (34, 35). Študije, ki jih je izvedel *Isler s sod.* na miših, so pokazale, da je pri dodatku 10 µmol/kg (5 mg/kg) ORL eliminacija vnesenih maščob s fecesom 20%, pri 100 µmol/kg (49,6 mg/kg) 70%, 1000 µmol/kg (496 mg/kg) pa 80%. Na ta način so potrdili učinek ORL, ki je odvisen od odmerka (35). V veliko literaturnih podatkih so predstavljene razlike v odstotkih inhibicije (34, 35). Študije dokazujojo, da ORL v kapsulah povzroči manj učinkovite učinke v primerjavi z ORL, ki je bil direktno zmešan med obroke hrane (34). V kliničnih študijah na zdravih prostovoljcih zmanjša

ORL (80 mg) absorpcijo maščob za 10-20%, pri višjih odmerkih pa 25-30%. ORL je enako učinkovit v inhibiciji absorpcije maščob iz olja ali celega izvora hrane (11). Raziskovali so izgubo telesne mase v 12-tedenskih študijah z odmerki med 10 in 120 mg, pri katerih so se le odmerki med 60 mg in 120 mg izkazali kot značilni v izgubi telesne mase. Višji odmerki (nad 240 mg) ne izboljšajo učinkovitost (23).

### **1.3 Validacija analizne metode**

Statistična ocenitev uporabljeni metode je nujna, saj lahko šele s tem potrdimo zanesljivost metode in ocenimo kakovost rezultatov. Validacija analizne metode vključuje vrednotenje vrste pomembnih parametrov kot so:

1. natančnost
2. točnost
3. specifičnost
4. linearnost
5. selektivnost
6. območje merjenja
7. limita detekcije
8. limita kvantizacije
9. robustnost
10. občutljivost (36)

Katere parametre validiramo je odvisno tudi od uporabljeni metode. Pri validaciji encimske metode z uporabo *p*-NPP metode se najpogosteje določa:

#### **1) Specifičnost**

Specifičnost encimske reakcije, ki jo katalizira lipaza v prisotnosti *p*-nitrofenilnega estra kot substrata, določi dolžina maščobno kislinskih verig. Potrdili so, da nitrofenilni estri

dolgo verižnih maščobnih kislin (več kot 10C atomov) predstavljajo specifične substrate za pankreasno lipazo (9).

## **2) Linearnost**

Pomembna parametra linearnosti za analizne postopke sta glede na Q2 (R1) ICH specifikacijo koeficient korelacije ( $r$ ) in determinacijski koeficient ( $R^2$ ) (36). Linearnost ocenimo z najmanj petimi različnimi koncentracijami.  $r$ -vrednost indicira relativno močno odvisnost med spremenljivkami. Uporaben parameter za merjenje jakosti linearne odvisnosti je  $R^2$  (36).

## **3) Natančnost**

Natančnost analiznega postopka izraža približek rezultatov med serijami meritev pridobljenih z večkratnim vzorčenjem istega homogenega vzorca pod določenimi pogoji. Koeficient variacije (relativna standardna deviacija, angl. relative standard deviation-RSD) glede na ICH Q2(R1) specifikacijo navajamo kot parameter natančnosti (36).

## **2. NAMEN DELA**

Osnovni cilj diplomske naloge je razviti enostaven in uporaben *in vitro* test za primerjanje učinkovitosti med vzorci ORL dveh proizvajalcev (Ranbaxy® in Biocon®). Za ta namen bomo uporabili test določanja inhibicije lipaze z uporabo kromogenega estra *p*-NPP.

Poleg ocenjevanja čistih učinkovin, je namen raziskovanja razviti tudi ustrezен *in vitro* test za ORL kapsule različnih proizvajalcev (60 mg Alli®, 120 mg Xenical®, Polpharma 60 in 120 mg). S pomočjo tega testa bomo ocenili in primerjali odstotke inhibicije lipaze in uporabljeni metodo validirali.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Materiali**

##### **3.1.1 Surovina, kemikalija**

- ❖ Natrijev deoksiholat,  $C_{24}H_{39}NaO_4$  (D6750, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- ❖ Natrijev taurodeoksiholat,  $C_{26}H_{44}NO_6SNa$  (580221, Calbiochem, Merck, Frankfurt, Nemčija)
- ❖ Lipaza iz prašičjega pankreasa (L3126, Sigma Aldrich, Tip II, 358 enot/mg proteina pri uporabi olivnega olja ali 50 enot/mg proteina pri uporabi triacetina kot substrata)
- ❖ NaCl (S7653, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- ❖ Tris (hidroksimetil) aminometan,  $H_2NC(CH_2OH)_3$  (154563, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- ❖ Brezvodni Natrijev acetat,  $CH_3COONa$  (S8750 Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- ❖ 4-nitrofenilpalmitat,  $C_{22}H_{35}NO_4$  (N2725, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- ❖ Kalijev natrijev tartrat tetrahidrat,  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$  (108087, Merck, Frankfurt, Nemčija)
- ❖ Kalcijev klorid,  $CaCl_2$  (102378, Merck, Frankfurt, Nemčija)
- ❖ Acetonitril,  $CH_3CN$  (UN1648, Merck)
- ❖ Etanol,  $CH_3CH_2 OH$  (96%, KEFO d.o.o.)

##### **3.1.2 Reagenti**

- ❖ **Tris pufer** - Tris (hidroksimetil) aminometan smo raztopili v destilirani vodi, da smo dobili raztopino s končno koncentracijo 41 mM. Pufersko raztopino smo umerili s pH metrom ( MA235, pH ion analyzer) na 8,4 z 1 M HCl.
- ❖ **Tartratni pufer** - Kalijev natrijev tartrat tetrahidrat smo raztopili v destilirani vodi, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1,6 mM. Pufersko raztopino smo

- ❖ **Raztopina I** - Mešanica **Tris pufra** pH 8,4 z 1,8 mM natrijevim deoksiholatom (NaDC) in 7,2 mM natrijevim taurodeoksiholatom (NaTDC). Raztopina I (100 ml) mora biti sveže pripravljena.
- ❖ **Raztopina II**- Mešanica **Tartratnega pufra**, pH 4,0 z 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>. Raztopina II (50 ml) mora biti sveže pripravljena.
- ❖ **Raztopina za encimsko reakcijo:** Mešanica raztopine I in II v volumskem razmerju 8,5:1,5.
- ❖ **Raztopina substrata:** 4-nitrofenilpalmitat smo raztopili v acetonitrilu, da smo dobili osnovno raztopino s koncentracijo 10 mM. Nato smo osnovno raztopino redčili z **raztopino za encimsko reakcijo**, da smo dobili končno koncentracijo 0,25 mM. Pripravljeni raztopini smo hranili pri temp. -20 °C.
- ❖ **Suspenzija lipaze:** Lipazo iz prašičjega pankreasa smo suspendirali v Tris pufru pH 8,4, da smo dobili koncentracijo 5 mg/ml. Suspenzijo smo centrifugirali in supernatant smo uporabili za encimsko reakcijo. Suspenzija lipaze je bila pripravljena pred eksperimentom in shranjena pri 2-8 °C.
- ❖ **Raztopine orlistata:** Standardno raztopino orlistata različnih proizvajalcev (1mM) smo pripravili z natančnim tehtanjem 4,95 mg ORL (Ranbaxy®, Biocon® in Standard) v 10 ml temno bučko in dopolnili z etanolom do oznake. Alikvote standardne raztopine smo prenesli v 10 ml temne bučke in dopolnili z etanolom do oznake, da smo dobili končne koncentracije 10 µM, 6 µM, 5 µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM in 0,1 µM.
- ❖ **1 M klorovodikova kislina** – 103,0 g koncentrirane HCl smo razredčili do 1000 ml z destilirano vodo.
- ❖ **Raztopina pH 1,5** - 2 g NaCl smo raztopili v destilirani vodi in dodali 31,6 ml **1 M klorovodikove kisline** in razredčili do 1000 ml z destilirano vodo.
- ❖ **Raztopina pufra pH 4,5** – 2,28 g tris (hidroksimetil) aminometana in 1,77 g brezvodnega natrijevega acetata smo raztopili v **raztopini klorovodikove kisline pH 1,5**, ki je opisana zgoraj.

### **3.1.3 Vzorci**

Vzorci ORL:

- ❖ **ORL Ranbaxy®** (vzorec 1) (Polpharma)
- ❖ **ORL Biocon®** (vzorec 2) (Polpharma)
- ❖ **ORL standard** ( vzorec 3) (Polpharma)

ORL kapsule:

- ❖ **60 mg Polpharma (Poljska)**
- ❖ **120 mg Polpharma (Poljska)**
- ❖ **60 mg Alli®** (GlaxoSmithKline, Anglija)
- ❖ **120 mg Xenical®** (Hoffman-La Roche, Švica)

## **3.2 Metode**

### **3.2.1.1 DSC**

Na začetku poskusov smo DSC metodo uporabili za primerjavo orlistatov (čista substanca).

Z DSC napravo (Mettler Toledo, DSC 1, Star-e System) smo določili temperaturo tališča in polimorfne modifikacije ORL dveh različnih proizvajalcev (Biocon®, Ranbaxy®).

#### **a) Določitev čistosti**

**Vzorci:** Biocon (serija proizvajalca: BO840507/01040) 5,50 mg, Ranbaxy (serija proizvajalca: 1835905) 6,39 mg.

**Pogoji merjenja:**

**Merilna celica:** DSC

**Posodica:** Al 40µl

**DSC meritev:** segrevanje od 0-100°C pri 5K/min

**Atmosfera:** N<sub>2</sub>, 50 cm<sup>3</sup>/min

#### **b) Določitev polimorfnih modifikacij**

**Vzorci:** Biocon 5,70 mg, Ranbaxy 5,36 mg

**Pogoji:**

**Merilna celica:** DSC

**Posodica:** Al

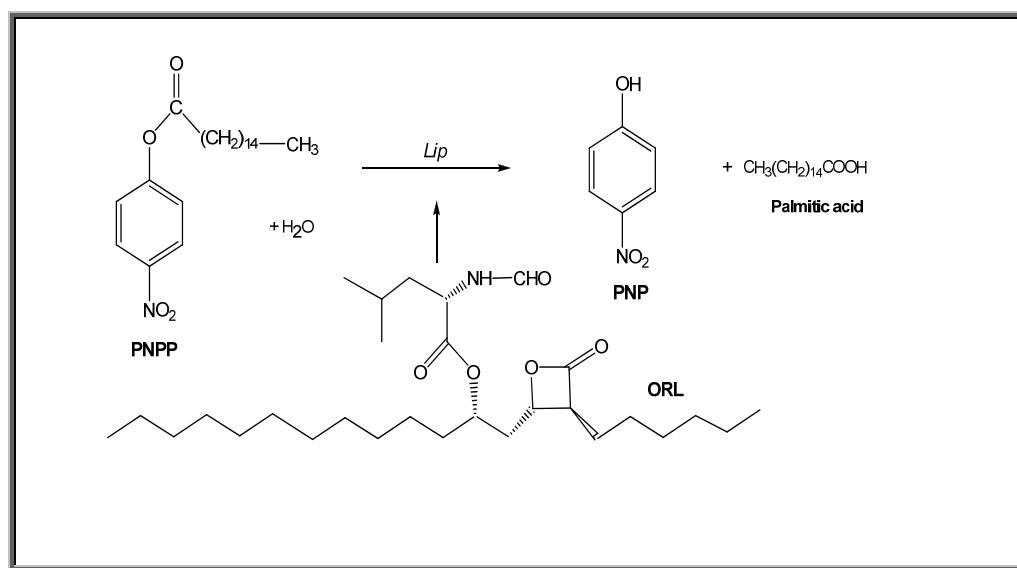
**DSC meritev:** segrevanje od 0-60 °C, ohlajanje na 0 °C, nato še enkrat segrevanje od 0-60°C. Pretok na začetku 5K/min, ohlajanje 40K/min in nato segrevanje 2K/min.

**Atmosfera:** N<sub>2</sub>, 80 cm<sup>3</sup>/min

### 3.2.1.2 SEM METODA

Opazovali smo vzorce orlistata proizvajalcev Biocon® in Ranbaxy®. Določili smo tudi velikost delcev in obliko kristalov.

### 3.2.2 IN VITRO OCENJEVANJE PODOBNOSTI MED VZORCI ORLISTATA DVEH PROIZVAJALCEV



**Slika 6:** Prikaz hidrolize p-NPP z lipazo in potencialna inhibicija z ORL

**Pogoji merjenja:** T=37°C, pH=8,0, λ=405 nm

**Postopek:**

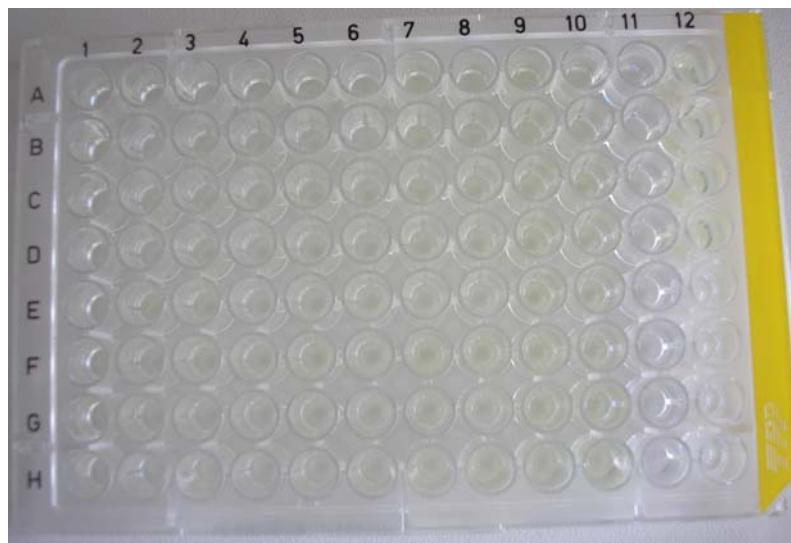
Reakcijska zmes:

- ❖ 78 µL raztopine za encimsko reakcijo
- ❖ 20 µL supernatanta lipaze

- ❖ 2 µL raztopine ORL ( 10 µM, 6 µM, 5µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM, 0,1 µM)
- ❖ 100 µL raztopine substrata

ORL smo inkubirali v vodnem mediju z lipazo 20 minut pri 37°C. Po inkubaciji smo dodali 100 µL substrata in reakcijsko zmes inkubirali pri 37°C še 10 minut pred meritvijo aktivnosti. Rezidualno aktivnost lipaze smo merili ločeno.

Absorbanco smo merili pri 405 nm s 60 s intervali 65 minut pri 37°C na aparaturi Tecan Safire® mikroplate detektor (Tecan® Trading AG, Švica).



**Slika 7:** Mikrotitrtska ploščica za analizo

**Stolpec 1:** 10 µM orlistat

**Stolpec 2:** 6 µM orlistat

**Stolpec 3:** 5 µM orlistat

**Stolpec 4:** 4 µM orlistat

**Stolpec 5:** 3 µM orlistat

**Stolpec 6:** 2 µM orlistat

**Stolpec 7:** 1 µM orlistat

**Stolpec 8:** 0,1 µM orlistat

**Stolpec 9, 10: Pozitivna kontrola:** 80 µL raztopine za encimsko reakcijo, 20 µL supernatanta lipaze in 100 µL raztopine substrata

**Stolpec 11: Negativna kontrola:** 100 µL raztopine za encimsko reakcijo in 100 µL raztopine substrata

Na začetku smo izmerili naklone z matematično funkcijo (SLOPE) v Microsoft Excelu iz dobljenih absorbanc v 65 minutah. Za vsako koncentracijo ORL smo izračunali povprečje naklonov 8 ponovitev, standardno deviacijo (STD) in RSD.

**Pozitivna kontrola-** predstavlja rezidualno aktivnost lipaze. Upoštevana je pri izračunih odstotkov inhibicije, ni pa posebej prikazana na slikah v rezultatih.

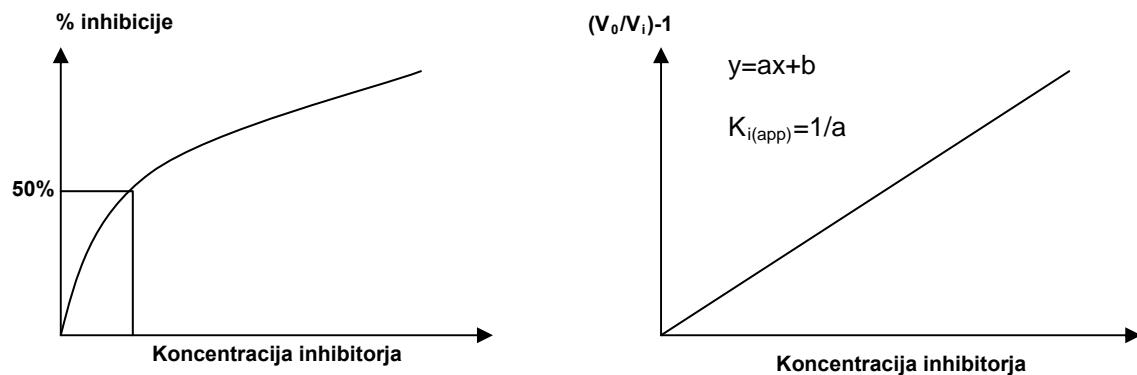
**Negativna kontrola-** izvajali smo jo za preverjanje substrata (da ni podvržen spontani hidrolizi)

Vse vzorce, pozitivno in negativno kontrolo smo analizirali v treh serijah.

#### Parametri inhibicije hidrolize:

**IC<sub>50</sub>** - koncentracija, ki zmanjša aktivnost lipaze za 50% (Enačba 1)

**K<sub>i(app)</sub>** - navidezna konstanta inhibicije



**Slika 8:** Določitev IC<sub>50</sub> in K<sub>i(app)</sub>

Povp. naklonov (vzorca)

$$\% \text{ inhibicije} = \left( 1 - \frac{\text{Povp. naklonov (vzorca)}}{\text{Povprečje naklona (poz.kontrole)}} \right) \times 100 \quad (\text{Enačba 1})$$

$K_{i(app)}$  smo določili iz hitrosti hidrolize substrata brez ( $V_o$ ) in z ( $V_i$ ) inhibitorjem. Naklon premice ( $V_o/V_i$ ) - 1 v odvisnosti od koncentracije inhibitorja prikazuje  $1/K_{i(app)}$ .

$V_o$  - povprečni naklon pozitivne kontrole

$V_i$  - povprečni naklon vzorca specifične koncentracije (10, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1  $\mu\text{M}$ )

### b) Validacija analizne metode

Pri validaciji uporabljene metode testa inhibicije lipaze smo določili:

#### 1) Specifičnost

Kot substrat izbora smo uporabili *p*-NPP.

#### 2) Linearnost

Koeficient korelacije in determinacijski koeficient smo izračunali z analizo regresije (Analysis data, Regression, Microsoft Excel) po treh serijah za vsako od koncentracij inhibitorja.

Povezava med hitrostjo inhibicije lipaze (odvisna spremenljivka) in koncentracijo inhibitorja (neodvisna spremenljivka) s časom definira linearost.

#### 3) Natančnost

Izvedli smo tri serije za vsako koncentracijo in izračunali RSD (preglednica 6, 7, 8). Ustreznost RSD smo ocenili s Horwitzovim kriterijem.

$$RSD_R[\%] = 2^{(1-(0.5\log C))} \quad (\text{Enačba 2})$$

Enačbo 2 smo uporabili za ocenitev kakovosti primerjave znotraj laboratorija z uporabo Horratove vrednosti (Enačba 3), ki določa primerjavo dejanske izračunane natančnosti z natančnostjo, ki jo predvideva Horwitzova enačba.

### 3.2.3 IN VITRO TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA

**Pogoji merjenja:** T=37°C, pH=7,2, λ=405 nm

**Postopek analize:**

**Vzorec:** ORL kapsule (Polpharma, Alli®, Xenical®) smo raztopljal v 200 ml **puferske raztopine pH=4,5** in mešali z magnetnim mešalom (300 rpm) 30 minut pri 37°C v vodni kopeli (Thermo, Variomag Telesystem, Waltham). Po 30 minutah inkubacije ORL kapsul v pH 4,5, smo s pomočjo ustreznih odmerkov Tris-a in brezvodnega natrijevega acetata zvišali pH na 7,2, glede na predpis v Ph. Eur. VI (37). Nato smo v zmes dodali 0,772 g NaTDC, 0,153 g NaDC in 2 g lipazne iz prašičjega pankreasa. Na koncu smo dodali 2,5 ml raztopine substrata (*p*-NPP) in mešanje nadaljevali pri 37°C v vodni kopeli 30 minut.

10 ml alikvote smo zbirali pri 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutah, nato centrifugirali pri 17.000 rpm (Sorwall®, RC 5C Plus) 5 minut in pomerili absorbanco pri 405 nm na UV/VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, 8453).

**Pozitivna kontrola:** 200 ml **puferske raztopine pH=4,5** smo mešali z magnetnim mešalom (300 rpm) 30 minut pri 37°C v vodni kopeli (Thermo, Variomag Telesystem, Waltham). Po 30 minutah inkubacije smo s pomočjo ustreznih odmerkov Tris-a in brezvodnega natrijevega acetata zvišali pH na 7,2, glede na predpis v Ph. Eur. VI (37). Za tem smo v zmes dodali 0,772 g NaTDC, 0,153 g NaDC in 2 g lipaze iz prašičjega pankreasa. Na koncu smo dodali 2.5 ml raztopine substrata in mešali pri 37°C v vodni kopeli 30 minut.

10 ml alikvote smo zbirali pri 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutah, centrifugirali pri 17.000 rpm 5 minut in pomerili absorbanco supernatanta pri 405 nm na UV/VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, 8453).

**Negativna kontrola:** Negativno kontrolo smo pripravili enako kot pozitivno le brez dodatka lipaze.

Vse vzorce, pozitivno in negativno kontrolo smo analizirali v treh ponovitvah. Rezultati so prikazani kot povprečje treh ponovitev za vsako od uporabljenih formulacij.

**Pozitivna kontrola** predstavlja rezidualno aktivnost lipaze. Upoštevana je pri izračunih odstotkov inhibicije, ni pa posebej prikazana na slikah v rezultatih.

**Negativna kontrola-** izvajali smo jo za preverjanje substrata (da ni podvržen spontani hidrolizi).

### **Validacija analiznega postopka**

Določili smo specifičnost, linearost in natančnost analiznega postopka kot je opisano v metodah pod 3.2.2.

Linearost smo izračunali po treh ponovitvah za vsako od formulacij.

### **3.2.4 MODIFICIRAN *IN VITRO* TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA**

#### **Postopek analize:**

300 ml **Puferske raztopine pH 4,5** smo temperirali 15 minut pri 37°C v vodni kopeli (Thermo, Variomag Telesystem, Waltham). Po tem času smo dodali ORL kapsulo (Alli®, Xenical®) in mešali z magnetnim mešalom (300 rpm) 5 minut, nato vzeli 100 ml vzorca, ga centrifugirali pri 17000 rpm 5 minut. 100 ml vzorec smo po centrifugiranju vrnili v vodno kopel in nadaljevali s poskusom. Dodali smo 0,228 g Tris-a in 0,117 g brezvodnega Natrijevega acetata za zvišanje pH na 7,2 glede na Eur. Ph. VI (37). Nato smo dodali 0,386 g NaTDC (7,2 mmol/L), 0,0765 g NaDC (1,8 mmol/L), 1 g lipaze iz prašičjega pankreasa (10 mg/ml) in na koncu še 1,25 ml substrata (*p*-NPP). ORL in lipazo smo pred dodatkom substrata inkubirali 1 minuto.

10 ml alikvote smo zbirali pri 5, 15, 30, 45, 60, 90 in 120 minutah po dodatku substrata, centrifugirali pri 17000 rpm 5 minut in pomerili absorbance supernatantov pri 405 nm na UV-VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, 8453).

Nadaljnje eksperimente smo izvedli z zbiranjem 100 ml vzorca po 10, 15, 20 in 30 minutah mešanja (po dodatku kapsule) in nato centrifugirali pri 17000 rpm 5 minut (Sorwall® RC 5C Plus). Po tem, ko smo vzeli 100 ml vzorca so bili eksperimentalni postopki isti kot so opisani zgoraj.

#### **Pozitivna kontrola :**

300 ml **puferske raztopine pH 4,5** smo mešali z magnetnim mešalom (300rpm) 15 minut pri 37°C v vodni kopeli (Thermo, Variomag Telesystem, Waltham). Po tem času smo vzeli 100 ml vzorca, ga centrifugirali pri 17000 rpm 5 minut. Glede na Eur. Ph. VI (37), smo v vzorec dodali 0,228 g Tris-a in 0,177 g brezvodnega Natrijevega acetata za zvišanje pH na 7,2. Nato smo dodali 0,386 g NaTDC, 0,0765 g NaDC, 1 g lipaze iz prašičjega pankreasa in na koncu 1.25 ml substrata (*p*NPP).

10 ml alikvote smo zbirali pri 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutah po dodatku substrata, centrifugirali pri 17.000 rpm 5 minut in pomerili absorbanco supernatanta pri 405 nm na UV/VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, 8453).

**Negativna kontrola:** Negativno kontrolo smo pripravili enako kot pozitivno le brez dodatka lipaze.

Vse vzorce, pozitivno in negativno kontrolo smo analizirali v treh ponovitvah.

Rezultati so prikazani kot povprečje treh ponovitev za vsako od uporabljenih formulacij.

**Pozitivna kontrola** predstavlja rezidualno aktivnost lipaze. Upoštevana je pri izračunih odstotkov inhibicije, ni pa posebej prikazana v rezultatih.

**Negativna kontrola-** izvajali smo jo za preverjanje substrata (da ni podvržen spontani hidrolizi).

#### **Validacija analiznega postopka**

Validacija analiznega postopka je potekala kot je opisano v metodah pod 3.2.2.

Linearnost smo določili glede na tri ponovitve za vsako od formulacij.

### **3.2.5 OCENITEV KONCENTRACIJSKO ODVISNIH UČINKOV KAPSUL ORLISTATA S TESTOM SPROŠČANJA IN *IN VITRO* TESTOM INHIBICIJE LIPAZE**

#### **Medij za sproščanje:**

Za izvedbo testa sproščanja smo uporabili aparat II (metoda z vesli) po USP. Tip medija, ki smo ga uporabili v študijah je bil pufer pH 4,5 glede na Ph Eur VI (37). V posodo z vesli, ki je vsebovala 900 ml medija za raztpljanje smo dali kapsule ORL (Alli®, Xenical®). Hitrost mešanja je bila 75 obratov, temperatura pa je bila nastavljena na 37°C skozi ves poskus. Alikvote (10 ml) smo vzeli po 5, 15, 30, 45, 60 in 90 minutah. Vzorce smo nato centrifugirali pri 17000 rpm 5 minut in supernatante kasneje uporabili za nadaljno analizo.

#### ***In vitro* določitev inhibicije lipaze z ORL**

##### **Postopek:**

Reakcijska zmes:

- ❖ 78 µL raztopine za encimsko reakcijo
- ❖ 20 µL supernatanta lipaze
- ❖ 2 µL supernatanta ORL
- ❖ 100 µL raztopine substrata

Po inkubaciji inhibitorja z lipazo v prisotnosti žolčnih soli 20 minut pri 37°C, smo dodali 100 µL substrata in takoj začeli z meritvami absorbanc pri 405 nm s 60 s intervali 50 minut pri 37°C na aparaturi Tecan Safire® mikroplate (Tecan® Trading AG, Švica).

Nanašanje na mikrotitrsko ploščico:

**Stolpec 1:** Supernatant ORL po 5 minutah raztpljanja kapsule

**Stolpec 2:** 15 minutah

**Stolpec 3:** 30 minutah

**Stolpec 4:** 45 minutah

**Stolpec 5:** 60 minutah

**Stolpec 6:** 90 minutah

**Stolpec 7: Pozitivna kontrola:** 80 µL raztopine za encimsko reakcijo, 20 µL supernatanta lipaze (c=5 mg/ml) in 100 µL raztopine substrata

**Stolpec 8: Negativna kontrola:** 100 µL raztopine za encimsko reakcijo in 100 µL raztopine substrata

Na začetku smo izmerili naklone z matematično funkcijo (SLOPE) v Microsoft Excelu iz dobljenih absorbanc v 50 minutah. Za vsako formulacijo ORL smo izračunali povprečje naklonov 8 ponovitev, STD in RSD.

**Pozitivna kontrola** predstavlja rezidualno aktivnost lipaze. Upoštevana je pri izračunih odstotkov inhibicije, ni pa posebej prikazana na slikah v rezultatih.

**Negativna kontrola-** izvajali smo jo za preverjanje substrata (da ni podvržen spontani hidrolizi).

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev.

% aktivnosti in inhibicijo lipaze z ORL smo izračunali iz enačbe 4 in 5.

$$\% \text{ aktivnosti lipaze} = \text{Naklon}_{\text{povp.}} \text{ (vzorec)} / \text{Naklon}_{\text{povp.}} \text{ (poz. kontrola)} \times 100$$

*Enačba 4*

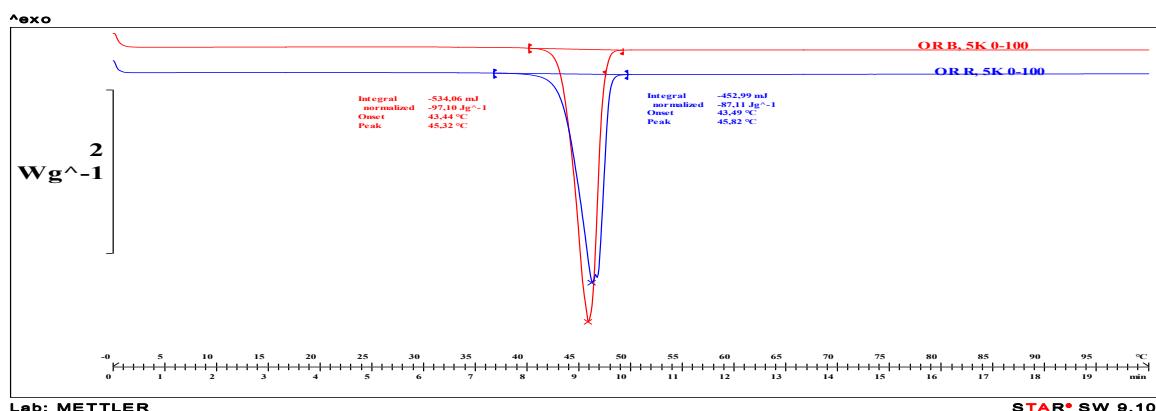
$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \% \text{ aktivnosti lipaze}$$

*Enačba 5*

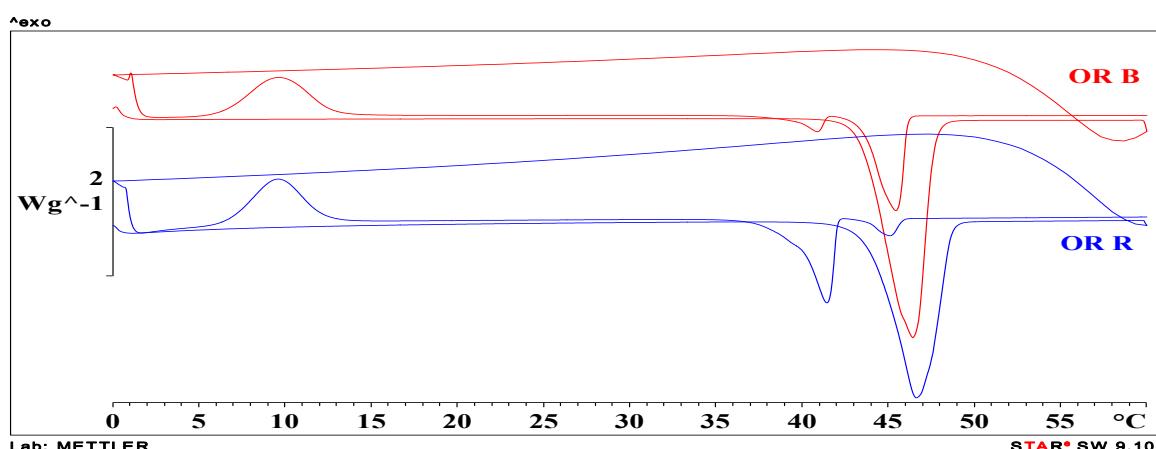
## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1

Z DSC metodo smo izvedli primerjavo ORL Biocon® in Ranbaxy®. Iz slike 9 je razvidno, da imata ORL podobno temperaturo tališča (ORR-43,49°C, ORB-43,44°C). Z uporabo te metode smo določali tudi možne polimorfne modifikacije. Prvo segrevanje kaže na to, da ORL obstaja v stabilni obliki. Če temu sledi hitro ohlajanje in ponovno segrevanje se pojavi steklasti prehod in kristalizacija. Iz slike 10 je razvidno, da takšna vzorca vsebuje dve polimorfni modifikaciji.

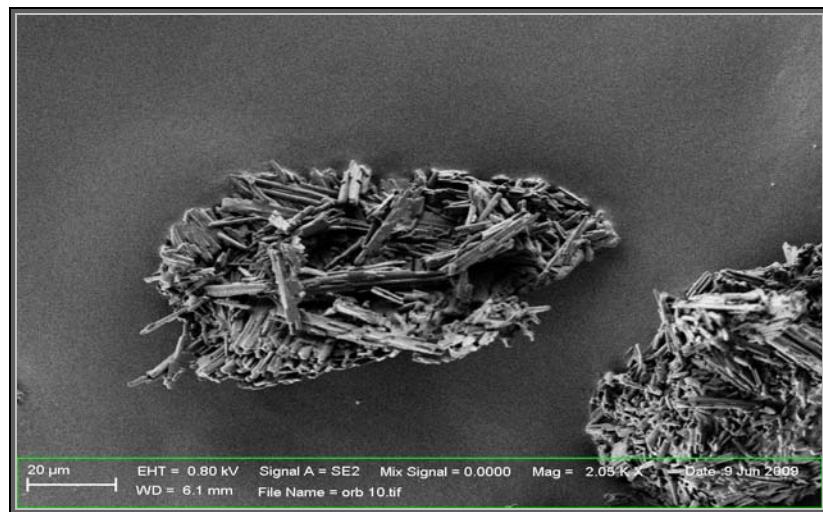


Slika 9: Določitev tališča vzorcev orlistata Biocon® in Ranbaxy®

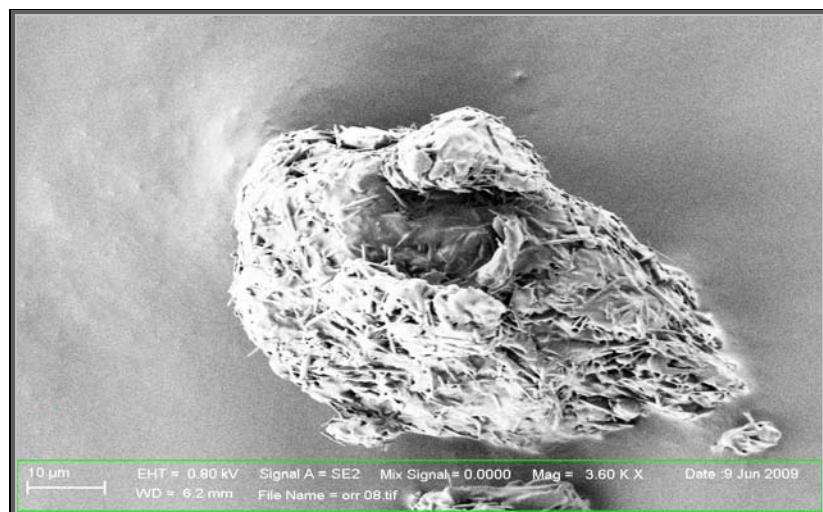


Slika 10: DSC analiza vzorcev orlistata Biocon® in Ranbaxy®

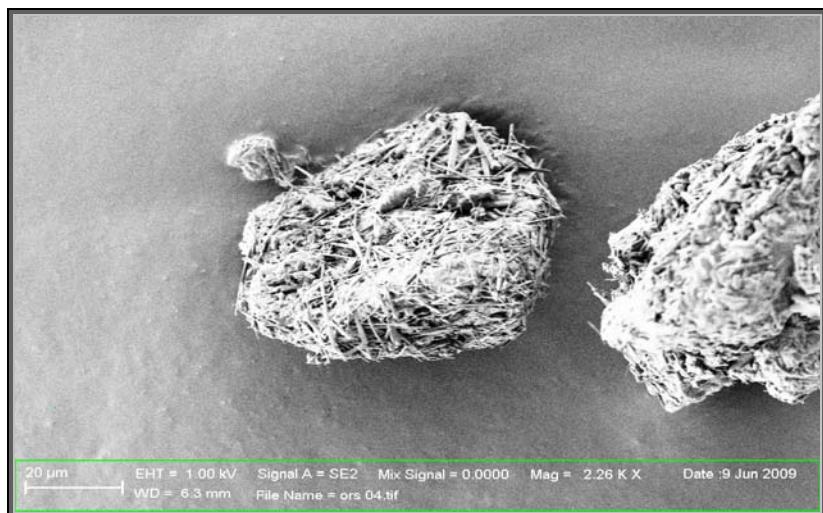
Vzorec Biocon® vsebuje delce velikosti približno 20 µm pri čemer so kristali ploščati v primerjavi z Ranbaxy® ORL. Delci Ranbaxy® ORL so igličasti in velikosti okrog 10 µm. ORL Ranbaxy® ima podobno zgradbo kristalov kot standard. Pri snemanju vzorcev s pomočjo SEM analize je nizko tališče ORL omejitev, saj lahko vakum in elektronski curek povzročita taljenje vzorcev, kar je razvidno tudi iz slik 11b in 11c.



a) ORL Biocon®



b) ORL Ranbaxy®



### c) ORL Standard

**Slika 11:** SEM vzorcev ORL (*a*-Biocon®, *b*-Ranbaxy®, *c*-Standard)

## 4.2 IN VITRO OCENJEVANJE PODOBNOSTI MED VZORCI ORLISTATA DVEH PROIZVAJALCEV

Pankreatin je zmes lipaze in drugih encimov kot so holesterol esteraze, proteaze ( $\alpha$ -kimotripsin, tripsin), karboksipeptidaze B in amilaze. Taka zmes se uporablja za določitev aktivnosti lipaze glede na predpise v Ph. Eur. in USP XXXI. Cilj izbire pankreatina kot encima je, da bi omogočili pogoje, ki so bolj podobni *in vivo* sistemom, kjer lipaza deluje v prisotnosti različnih biomolekul in encimov (13, 37, 38).

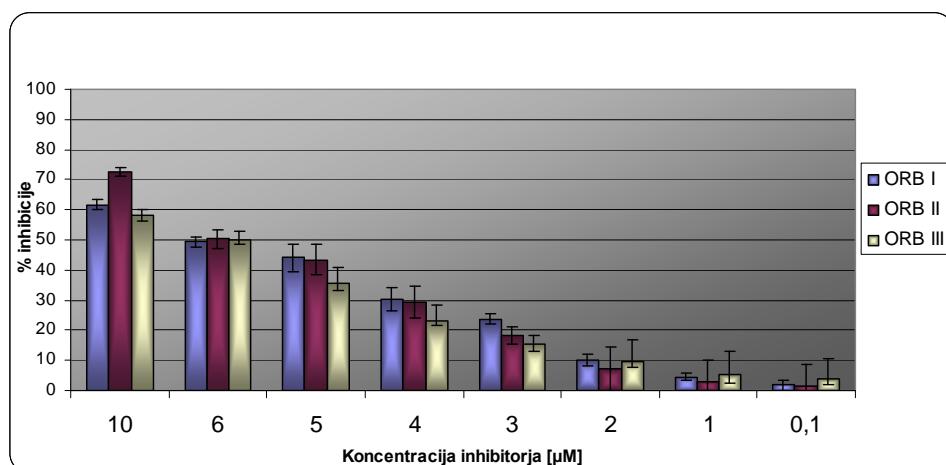
Karboksiesteraze in proteaze prisotne v neprečiščenem pripravku prašičje pankreasne lipaze, ki smo jo uporabili v eksperimentih, lahko prav tako povzročita cepitev estrske vezi *p*-NPP kot lipaza, pri čemer nastanejo velike razlike v hitrosti nastanka obarvanega produkta *p*-NP (13).

Kratkoverižne estre *p*-NP kot sta acetat ali butirat uporabljajo za merjenje aktivnosti esteraze, medtem ko lavrat, palmitat ali oleat uporabljajo za merjenje aktivnosti lipaze. Kratkoverižni acilni estri so topni v vodnih pufrih, raztopljanje substratov kot je nitrofenil lavrat, palmitat ali oleat pa zahtevajo prisotnost emulgatorjev (5).

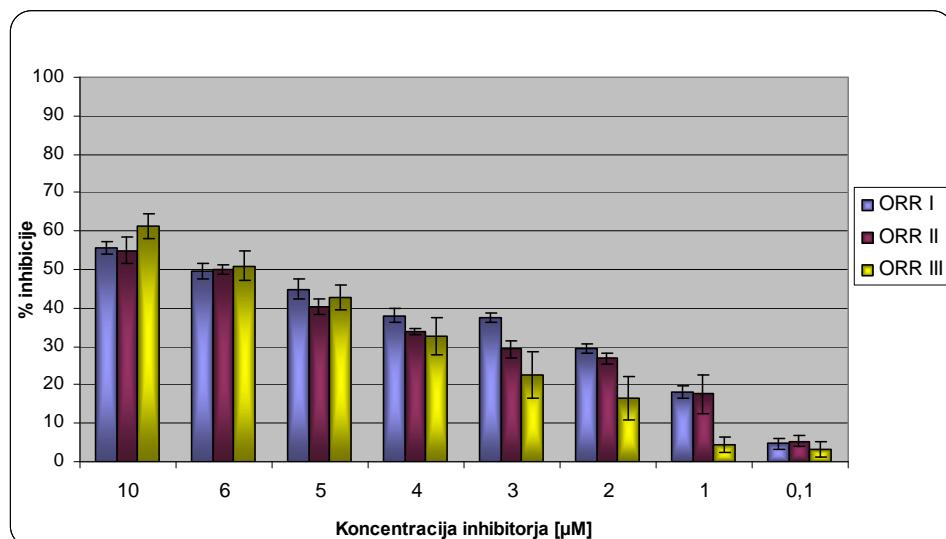
Koncentracija ORL pri kateri dosežemo 50 odstotno inhibicijo aktivnosti lipaze je  $IC_{50}$ , s katero ocenimo učinkovitost encimskega inhibitorja. Prav tako je tudi priporočen parameter za validacijo encimske metode (39).

Slike 12, 13 in 14 prikazujejo odstotke inhibicije lipaze v odvisnosti od koncentracije inhibitorja glede na tri serije za vsako od uporabljenih koncentracij inhibitorja. Z uporabo različnih koncentracij inhibitorja, smo za vsak ORL določili  $IC_{50}$ . Iz slik je jasno razvidno, da je  $IC_{50}$  za ORL Ranbaxy<sup>®</sup>, Biocon<sup>®</sup> in standard 6  $\mu\text{M}$ . Vrednosti  $IC_{50}$  za orlistate smo statistično analizirali z enosmernim ANOVA LSD post hoc testom. Razlike med vrednostmi so značilne, ko je  $*p < 0.05$  (interval zaupanja).

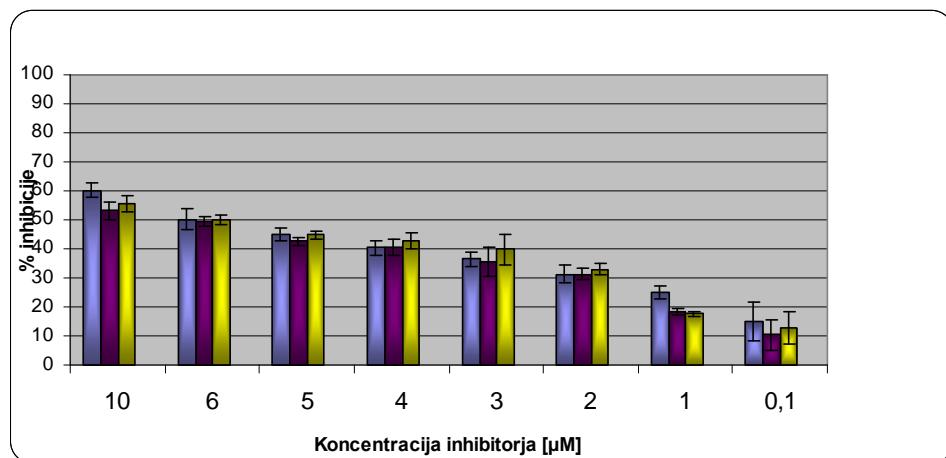
Glede na rezultate pridobljene z ANOVA ni značilnih razlik med  $IC_{50}$  za ORL Ranbaxy<sup>®</sup> in Biocon<sup>®</sup> v primerjavi s standardom.



**Slika 12:** Inhibicija aktivnosti lipaze z ORL- Biocon<sup>®</sup> glede na 3 serije (ORB I- prva serija z ORL-Biocon<sup>®</sup>, ORB II- druga serija z ORL-Biocon<sup>®</sup>, ORB III- tretja serija z ORL-Biocon<sup>®</sup>)



**Slika 13:** Inhibicija aktivnosti lipaze z ORL-Ranbaxy® glede na 3 serije (ORR I- prva serija z ORL-Ranbaxy®, ORR II- druga serija z ORL-Ranbaxy®, ORR III- tretja serija z ORL-Ranbaxy®)



**Slika 14:** Inhibicija aktivnosti lipaze z ORL-standard glede na 3 serije (modri stolpec- prva serija z ORL-standard, vijolični stolpec-druga serija z ORL-standard, rumeni stolpec –tretja serija z ORL-standard)

Glavni razlog za razlike med odstotki inhibicije lipaze pri različnih koncentracijah ORL je posledica nečistosti lipaze in neizogibnega tekmovanja nespecifičnih esteraz za

substrat. ORL je prav tako inhibitor holesterol esteraze in drugih karboksiesteraz, ki so prisotne v neprečiščenem prašičjem pankreasu lipaze, kar je tudi lahko vzrok za razlike v odstotku inhibicije (13). Najmanjša razlika v inhibiciji lipaze je pri  $IC_{50}$ , kar dokazuje, da lahko s tem parametrom ocenimo podobnosti med vzorci ORL različnih proizvajalcev. Določili smo tudi navidezno konstanto inhibicije -  $K_{i(app)}$  (preglednica 2).

**Preglednica 2:** Navidezna konstanta inhibicije za ORL Biocon<sup>®</sup>, Ranbaxy<sup>®</sup> in Standard

Inhibitor	Enačba	Koeficient determinacije	$K_{i(app)}$
Orlistat-Biocon <sup>®</sup>	$y=0,233x-0,3719$	$R^2=0,989$	4,30
Orlistat-Ranbaxy <sup>®</sup>	$y=0,1712x-0,0445$	$R^2=0,979$	5,84
Orlistat-Standard	$y=0,127x+0,214$	$R^2=0,987$	7,87

Glavni razlog za razlike med  $K_{i(app)}$  je lahko nečistost encima in tekmovanja različnih encimov za substrat (40). Po drugi strani pa rezultati pridobljeni z ANOVO potrjujejo, da ni značilnih razlik v  $K_{i(app)}$  ORL Ranbaxy<sup>®</sup> in ORL Biocon<sup>®</sup> v primerjavi s standardom.

Sklepamo lahko, da podatki za  $IC_{50}$  in  $K_{i(app)}$  potrjujejo podobnost med vzorci Ranbaxy<sup>®</sup> in Biocon<sup>®</sup>.

### Validacija analizne metode

**Preglednica 3:** Parametri linearnosti za ORL Ranbaxy<sup>®</sup>

Koncentracija inhibitorja [μM]	I		II		III	
	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R
10	0,9853	0,9926	0,9815	0,9907	0,9976	0,9988
6	0,9856	0,9928	0,9813	0,9906	0,9983	0,9991
5	0,9907	0,9953	0,9857	0,9928	0,9979	0,9990
4	0,9953	0,9907	0,9910	0,9955	0,9986	0,9993
3	0,9895	0,9948	0,9864	0,9932	0,9989	0,9995
2	0,9951	0,9903	0,9897	0,9948	0,9990	0,9995
1	0,9934	0,9967	0,9883	0,9941	0,9984	0,9992
0,1	0,9972	0,9943	0,9939	0,9969	0,9982	0,9991

**Preglednica 4:** Parametri linearnosti za ORL Biocon®

Koncentracija inhibitorja [μM]	I		II		III	
	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R
<b>10</b>	0,9963	0,9981	0,9853	0,9876	0,9890	0,9945
<b>6</b>	0,9946	0,9973	0,9882	0,9941	0,9909	0,9954
<b>5</b>	0,9947	0,9974	0,9905	0,9952	0,9946	0,9973
<b>4</b>	0,9954	0,9977	0,9920	0,9960	0,9948	0,9974
<b>3</b>	0,9961	0,9980	0,9900	0,9950	0,9971	0,9985
<b>2</b>	0,9990	0,9995	0,9914	0,9957	0,9980	0,9990
<b>1</b>	0,9984	0,9992	0,9922	0,9961	0,9988	0,9994
<b>0,1</b>	0,9997	0,9998	0,9905	0,9961	0,9985	0,9992

**Preglednica 5:** Parametri linearnosti za ORL standard

Koncentracija inhibitorja [μM]	I		II		III	
	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R
<b>10</b>	0,9854	0,9927	0,9854	0,9927	0,9863	0,9931
<b>6</b>	0,9965	0,9983	0,9961	0,9980	0,9896	0,9948
<b>5</b>	0,9945	0,9972	0,9951	0,9975	0,9914	0,9957
<b>4</b>	0,9947	0,9974	0,9953	0,9976	0,9884	0,9942
<b>3</b>	0,9953	0,9976	0,9947	0,9974	0,9910	0,9955
<b>2</b>	0,9949	0,9974	0,9945	0,9972	0,9889	0,9944
<b>1</b>	0,9951	0,9975	0,9965	0,9983	0,9927	0,9964
<b>0,1</b>	0,9961	0,9980	0,9963	0,9981	0,9927	0,9963

Rezultati v preglednici 3, 4 in 5 potrjujejo linearnost analiznega postopka pri koncentracijah ORL od 0,1 do 10 μM ( $R^2 > 0,98$ ,  $r > 0,98$ ). Linearnost encimske metode, ki temelji na sprostitvi *p*-NP za določitev aktivnosti lipaze, so prav tako potrdili drugi raziskovalci (41).

**Preglednica 6:** RSD-ji uporabljene metode pri določanju inhibitorne aktivnosti za ORL- Biocon®

Koncentracija inhibitorja [µM]	RSD-Inhibicije I	RSD-Inhibicije II	RSD-Inhibicije III
<b>10</b>	2,716	2,175	4,110
<b>6</b>	3,484	6,217	2,560
<b>5</b>	10,211	8,799	4,294
<b>4</b>	5,519	7,548	2,608
<b>3</b>	6,828	3,629	3,633
<b>2</b>	2,101	7,792	2,524
<b>1</b>	1,329	7,666	3,368
<b>0.1</b>	1,706	7,163	2,023

**Preglednica 7:** RSD-ji uporabljene metode pri določanju inhibitorne aktivnosti za ORL-Ranbaxy®

Koncentracija inhibitorja[µM]	RSD-Inhibicije I	RSD-Inhibicije II	RSD-Inhibicije III
<b>10</b>	2,694	3,354	7,908
<b>6</b>	3,876	1,252	7,433
<b>5</b>	4,696	2,041	7,416
<b>4</b>	3,232	0,692	6,513
<b>3</b>	1,818	2,356	6,240
<b>2</b>	1,909	1,416	2,487
<b>1</b>	2,009	4,935	1,915
<b>0.1</b>	1,304	1,326	2,047

**Preglednica 8:** RSD-ji uporabljene metode pri določanju inhibitorne aktivnosti za ORL standard

Koncentracija inhibitorja [µM]	RSD-Inhibicije I	RSD-Inhibicije II	RSD-Inhibicije III
<b>10</b>	6,411	6,193	9,694
<b>6</b>	7,046	3,024	8,416
<b>5</b>	4,016	2,370	4,138
<b>4</b>	5,777	4,959	4,864
<b>3</b>	3,700	7,987	4,610
<b>2</b>	4,381	2,974	6,182
<b>1</b>	3,301	1,080	6,589
<b>0,1</b>	3,570	6,003	12,984

**Preglednica 9:** Prikaz Horratovih vrednosti za ORL-Biocon®

Koncentracija inhibitorja [µM]	RSD <sub>R</sub> Horwitz(predvideno)	Horrat vrednosti		
		I	II	III
<b>10</b>	11,31	0,566	0,547	0,857
<b>6</b>	12,21	0,577	0,248	0,689
<b>5</b>	12,55	0,814	0,701	0,342
<b>4</b>	12,90	0,482	0,585	0,202
<b>3</b>	13,54	0,504	0,268	0,268
<b>2</b>	14,32	0,147	0,544	0,176
<b>1</b>	16,00	0,083	0,478	0,211
<b>0,1</b>	22,63	0,075	0,316	0,089

**Preglednica 10:** Prikaz Horratovih vrednosti za ORL-Ranbaxy®

Konzentracija inhibitorja [μM]	RSD <sub>R</sub> Horwitz (predvideno)	Horrat vrednosti		
		I	II	III
10	11,31	0,238	0,296	0,699
6	12,21	0,317	0,102	0,608
5	12,55	0,374	0,162	0,591
4	12,90	0,251	0,060	0,505
3	13,54	0,134	0,174	0,461
2	14,32	0,133	0,099	0,174
1	16,00	0,126	0,308	0,119
0,1	22,63	0,058	0,060	0,090

**Preglednica 11:** Prikaz Horratovih vrednosti za ORL-Standard

Konzentracija inhibitorja [μM]	RSD <sub>R</sub> Horwitz (predvideno)	Horrat vrednosti		
		I	II	III
10	11,31	0,567	0,548	0,857
6	12,21	0,577	0,248	0,689
5	12,55	0,320	0,189	0,330
4	12,90	0,448	0,384	0,377
3	13,54	0,273	0,590	0,340
2	14,32	0,306	0,208	0,432
1	16,00	0,206	0,067	0,412
0,1	22,63	0,158	0,265	0,574

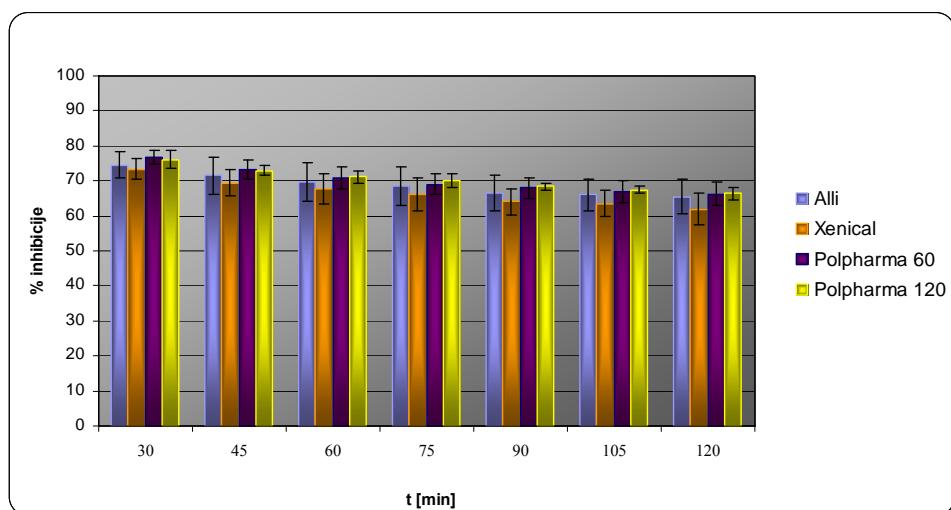
Glede na rezultate prikazane v preglednici 6, 7, 8 so bile vse eksperimentalne vrednosti RSD nižje od RSD izračunanih s Horwitzovo formulo. V nadaljevanju so bile Horrat vrednosti (preglednica 9, 10, 11) za vsako ponovitev manjše od 1. Horratova vrednost 1 kaže na zadovoljivo natančnost znotraj laboratorija. Po drugi strani pa vrednost 2 kaže, da je pridobljena variacija večja od pričakovane in posledično nezadovoljiva natančnost (42).

Naši rezultati kažejo na zadovoljivo natančnost znotraj laboratorija.

#### **4.3 IN VITRO TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA**

Namen študij je bilo raziskovanje *in vitro* podobnosti med različnimi kapsulami ORL. Za razapljanje ORL kapsul smo uporabili 200 ml puferske raztopine pH 4,5, kar simulira pH v želodcu po zaužitju obroka. Volumen 200 ml smo izbrali glede na podatke v literaturi za pogoje v želodcu na tešče. Po 30 minutni inkubaciji v pH 4,5, smo pH medija zvišali na 7,2, kar je podobno pH-ju simulirane intestinalne tekočine (Simulated Intestinal Fluid-SIF) in pH-ju v jejunumu. V sestavi gastrointestinalnih tekočin so prisotne tudi različne soli žolčnih kislin, zaradi česar smo v raztopino dodali NaTDC in NaDC (43).

Pankreasno lipazo, glavni encim, ki je odgovoren za prebavo lipidov, smo uporabili v koncentraciji 10 mg/ml. Na koncu smo dodali substrat (*p*-NPP) z namenom simulacije reakcije med lipazo in triglyceridi.



**Slika 15:** Procenti inhibicije lipaze z različnimi kapsulami ORL (Alli® 60 mg, Xenical® 120 mg, Polpharma® 60 mg in Polpharma® 120 mg) v odvisnosti od časa encimske reakcije

Merili smo odstotek inhibicije lipaze z ORL v določenem časovnem obdobju. Na sliki 15 so prikazani odstotki inhibicije lipaze v odvisnosti od časa encimske reakcije za različne kapsule ORL. Rezultati so prikazani kot povprečje treh ponovitev za vsako od

uporabljenih formulacij. Že iz slike je jasno razvidno, da ni razlik med preizkušenimi kapsulami. Vrednosti inhibicije lipaze z ORL za vsako časovno točko smo tudi statistično analizirali z enosmernim ANOVA LSD post hoc testom. Glede na rezultate pridobljene z ANOVO ni bilo značilnih razlik v inhibiciji lipaze med preizkušenimi kapsulami. Takšen rezultat lahko razložimo s hitrim nastankom nasičene koncentracije inhibitorja, ki je posledica izjemno nizke topnosti ORL v uporabljenem pufru.

### **Validacija analizne metode**

**Preglednica 12:** *Parametri linearnosti za ORL kapsule*

Formulacija	I		II		III	
	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R	R Square	Multiple R
Alli®	0,95	0,97	0,89	0,95	0,91	0,95
Xenical®	0,97	0,99	0,95	0,98	0,95	0,97
Polpharma 60 mg	0,97	0,98	0,92	0,96	0,96	0,98
Polpharma 120 mg	0,98	0,99	0,95	0,98	0,95	0,97

**Preglednica 13:** *Parametri natančnosti različnih ORL kapsul*

čas[min]	Alli®	Xenical®	Polpharma 60 mg	Polpharma 120 mg
	RSD	RSD	RSD	RSD
30	4,937	4,078	2,540	3,251
45	7,293	5,153	3,833	2,122
60	7,867	6,322	4,245	2,355
75	8,158	7,005	4,468	2,882
90	7,781	5,948	4,374	1,463
105	6,781	5,723	4,925	1,579
120	7,424	7,167	5,060	2,707

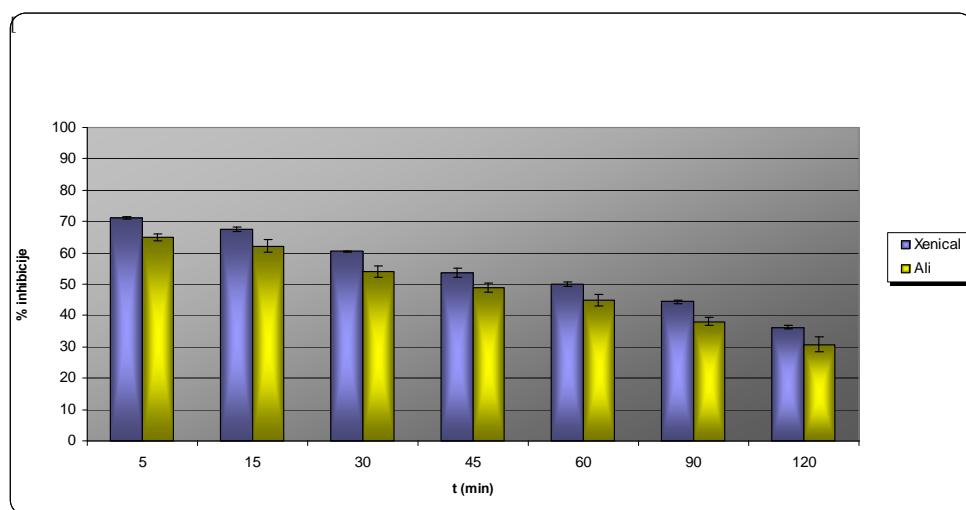
Glede na naše rezultate (Preglednica 12) smo linearnost analiznega postopka ocenili z  $R^2 \geq 0,90$ ;  $r \geq 0,93$ .

Natančnost analiznega postopka (Preglednica 13) smo ocenili z RSD manjšim od 8,2.

#### **4.4 MODIFICIRAN *IN VITRO* TEST INHIBICIJE LIPAZE ZA PRIMERJAVO RAZLIČNIH KAPSUL ORLISTATA**

Želeli smo razviti bolj diskriminatoren test za *in vitro* raziskovanje koncentracijsko odvisnega učinka ORL kapsul. Opisani postopek je izboljšava metode pod točko 3.2.3. Za simulacijo raztpljanja kapsul v želodcu smo uporabili različne čase raztpljanja kapsul.

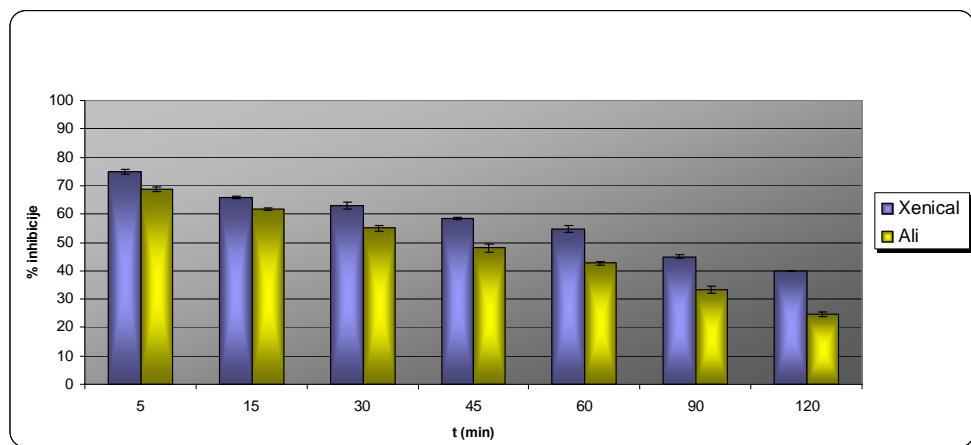
Glavni namen metode je bila pridobitev različnih koncentracij ORL v pufru, ki naj bi inhibirale lipazo v različnih odstotkih. Slike 16, 17, 18, 19 in 20 prikazujejo odstotke inhibicije lipaze za kapsule Xenical® in Alli® po različnih časih raztpljanja kapsule v pufru pH 4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije. Rezultati so prikazani kot povprečje treh ponovitev za vsako od uporabljenih formulacij. Vrednosti inhibicije lipaze v 120 minutah smo statistično analizirali z uporabo Student t-testa (Data Analysis, Excel). Razlike med vrednostmi so značilne, ko je  $t_{\text{Stat}} > t_{\text{Critical two tail}}$  (interval zaupanja).



**Slika 16:** Odstotki inhibicije za ORL kapsule (Xenical® in Alli®) po 5 minutah raztpljanja kapsule v pufru pH=4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije

Glede na rezultate (slika 16) izkazuje Xenical® močnejše inhibitorno delovanje v primerjavi z Alli®. Rezultati po 5 minutah raztpljanja kapsule kažejo pri petih,

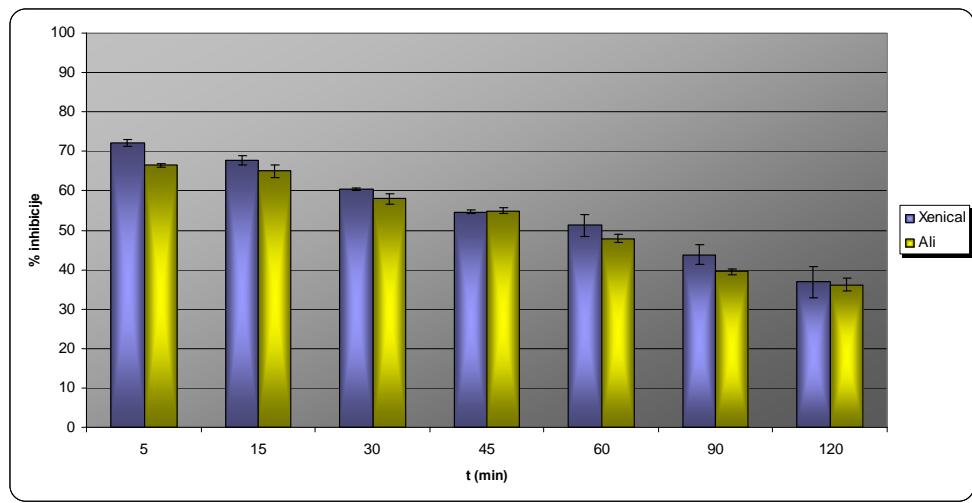
petnajstih, tridesetih, petinštiridesetih, šestdesetih in devetdesetih minutah encimske reakcije statistične razlike v odstotkih inhibicije med Xenical® in Alli®.



**Slika 17:** Odstotki inhibicije za ORL kapsule (Xenical® in Alli®) po 10 minutah raztopljanja kapsule v pufru pH=4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije

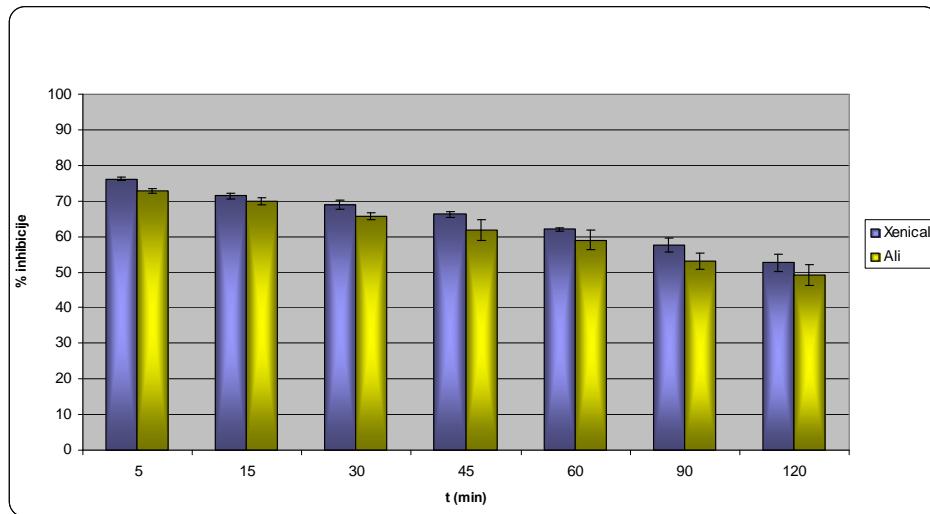
Rezultati po 10 minutah raztopljanja kapsul (slika 17) kažejo na statistično značilne razlike v odstotkih inhibicije lipaze med Xenical® in Alli® skozi ves čas spremljanja encimske reakcije.

Razlike med odstotki inhibicije lipaze so večje med analiziranimi kapsulami po 10 minutah raztopljanja kapsule v primerjavi z rezultati po 5 minutah raztopljanja kapsule, ki smo jih potrdili s Student t-testom.



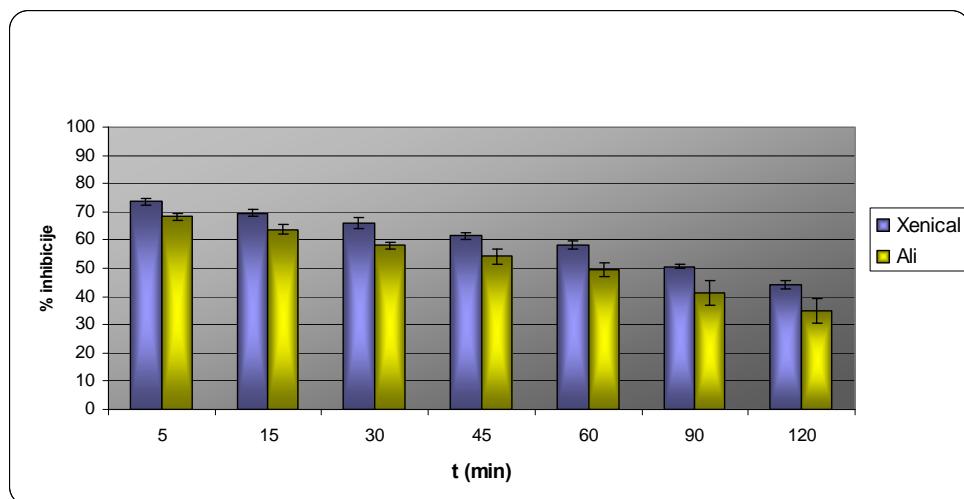
**Slika 18:** Odstotki inhibicije za ORL kapsule (Xenical<sup>®</sup> in Alli<sup>®</sup>) po 15 minutah raztopljanja kapsule v pufru pH=4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije

Statistično značilne razlike so vidne pri petih, tridesetih in devetdesetih minutah encimske reakcije po 15 minutah raztopljanja kapsul (slika 18).



**Slika 19:** Odstotki inhibicije za ORL kapsule (Xenical<sup>®</sup> in Alli<sup>®</sup>) po 20 minutah raztopljanja kapsule v pufru pH=4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije

Statistična analiza za eksperiment z 20 minutami raztplavljanja kapsule kaže statistično značilne razlike v odstotkih inhibicije lipaze med analiziranimi kapsulami le po petih in tridesetih minutah encimske reakcije (slika 19).



**Slika 20:** Odstotki inhibicije za ORL kapsule (Xenical<sup>®</sup> in Alli<sup>®</sup>) po 30 minutah raztplavljanja kapsule v pufru pH=4,5 v odvisnosti od časa encimske reakcije

Odstotek inhibicije lipaze se pri uporabljenih formulacijah statistično razlikuje pri poskusu, kjer smo kapsule raztplljali 30 minut (slika 20).

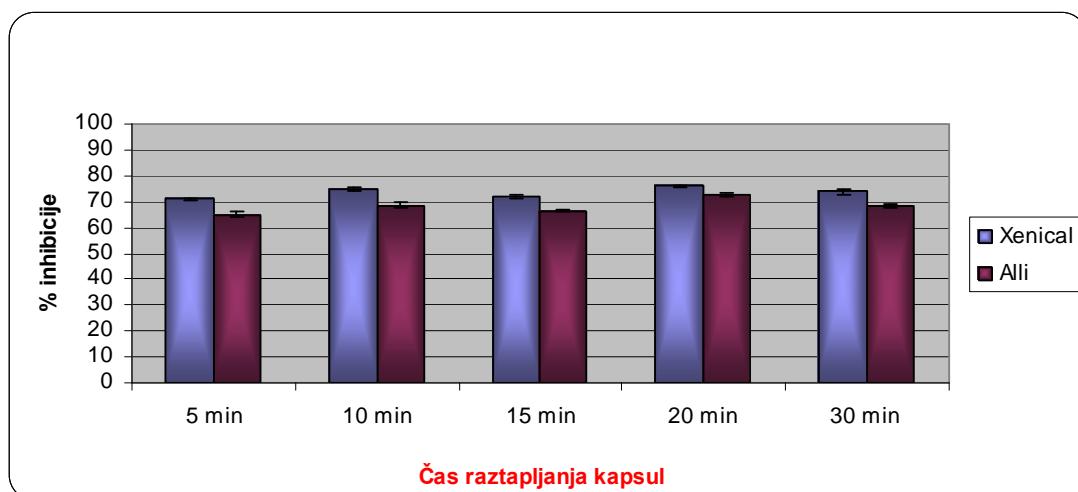
Inhibicija lipaze z ORL je ireverzibilnega tipa, v novejših študijah pa so dokazali delno reverzibilnost v prisotnosti emulzije kratkih in dolgoverižnih triacilglicerolov (30, 31).

Odstotki inhibicije lipaze padajo skozi 120 minut encimske reakcije pri vseh izvedenih eksperimentih. Vzrok za to je disociacija kompleksa med ORL in lipazo, kar lahko razložimo z različnimi teorijami. Med odprtim  $\beta$ -laktonskim obročem ORL in OH skupino katalitičnega serina pankreasne lipaze se tvori dolgoživeči acil-encimski kompleks (31). Reaktivacijo lipaze naj bi spremljala kemijska pretvorba ORL v njegovo hidrolizirano obliko (odprta oblika laktona) (44).

Ena teorija temelji na hipotezi, da kovalentna vezava ORL in lipaze obstaja v dveh različnih konfiguracijah. Prva frakcija lipaznih molekul naj bi tvorila z ORL kovalentni kompleks (manj stabilna oblika) v vodni fazi, druga frakcija pa bolj stabilen kovalentni kompleks.

Zaradi disociiranja manj stabilne oblike naraste hitrost hidrolize. Disociacija manj stabilnega kompleksa se poveča v prisotnosti žolčnih soli, verjetno zaradi tvorbe

mešanih ORL/žolčne soli kompleksov. Reaktivacija pankreasne lipaze ne doseže 100 % na koncu encimske reakcije, kar si lahko razlagamo z obstojem bolj stabilne oblike encima, ki je bolj močno inhibirana z ORL. Nastanek dveh različnih kompleksov pankreasne lipaze in ORL je lahko posledica različnih orientacij molekul inhibitorja v katalitičnem mestu lipaze (19, 31).



**Slika 21:** Primerjava učinkov Xenical in Alli v testu inhibicije lipaze po 5 minutah encimske reakcije in različnih časih raztopljanja kapsule (5, 10, 15, 20, 30 minut)

Da bi ocenili odstotek inhibicije lipaze med dvema različnima odmerkoma ORL, se je časovna točka po 5 minutah encimske reakcije izkazala kot najbolj diskriminatorna (slika 21). Slika 21 prikazuje odstotke inhibicije lipaze Xenical® in Alli® po petih minutah encimske reakcije in različnih časih raztopljanja kapsul. Nepričakovane razlike v odstotkih inhibicije lipaze med encimsko reakcijo so lahko posledica različnih hidrolitičnih hitrosti in vpliva prisotnosti finih delcev v centrifugirani raztopini na merjenje absorbance.

Iz slike 21 je razvidno, da kapsule Xenical® po 5, 10, 15, 20 in 30 minutah raztopljanja v pufru, po 5 minutah encimske reakcije, bolj inhibirajo lipazo v primerjavi z Alli®. Absolutne vrednosti odstotka inhibicije lipaze ne varirajo dosti s časom raztopljanja kapsule za obe formulaciji. Iz tega lahko sklepamo, da pride že po 5 minutah raztopljanja kapsul do izraženega inhibitornega učinka ORL.

*GlaxoSmithKline*<sup>®</sup> in *Rugters University* sta razvila metodo (45) za ocenitev učinkovitosti posameznih formulacij ORL (120 in 60 mg), pri kateri so uporabili test raztpljanja in modificirano *Lee et al.* metodo za določanje aktivnosti lipaze s *p*-NPP (17).

USP II test raztpljanja, ki uporablja 3 % Natrijev lavrilsulfat v NaCl, pH=6.0 dokazuje statistično značilne razlike v odstotku sproščenega ORL po 5 in 10 minutah raztpljanja med raziskovanimi formulacijami, kar je bilo v dobi povezavi z odstotki inhibicije lipaze. Navsezadnje so vzorci uporabljenih formulacij kazali isti učinek po 15 minutah raztpljanja kapsule.

Glede na literaturne podatke je ORL praktično netopen v vodi (1 g substance je topno v več kot 10 l vode). Hoffman-La Roche<sup>®</sup> je poročal, da je topnost ORL v vodi pri temperaturi 23°C manjša kot 10 mg/l (20 µmol/l). Zaradi tega je nasičena koncentracija ORL v prisotnosti Natrijevega lavrilsulfata dosežena zelo hitro. Rezultat tega je bila podobnost v odstotkih inhibicije lipaze med preiskovanimi kapsulami po 15 minutah raztpljanja kapsul.

Najbolj pomembna značilnost ORL je njegov močen učinek, kar je vidno iz zelo nizke koncentracije pri kateri je dosežena 50 odstotna inhibicija lipaze (34).  $IC_{50}$  je karakteristika inhibitorjev, odvisna pa je tudi od narave substrata in encima, koncentracije lipaze, substrata in temperature. Pridobljene vrednosti  $IC_{50}$  iz laboratorijev *GlaxoSmithKline*<sup>®</sup> in *Rugters University* so ključni dokaz učinkovitosti ORL.

Tudi v naših poskusih dosežemo po 15 minutah raztpljanja kapsule nasičeno koncentracijo ORL, kar je značilno za obe formulaciji.

Glavne prednosti modificirane metode so:

- ❖ Bolj primeren medij (biorelevanten medij)
- ❖ Oponašanje pogojev v gastrointestinalnem traktu (prisotnost žolčnih soli, dvig pH do 7,2)
- ❖ Izogibanje prisotnosti organskih topil (10 % izopropanol) v reakcijski zmesi

Slabost uporabljene *in vitro* metode je hiter doseg nasičene koncentracije, kar se izraža kot plato v odstotku inhibicije lipaze.

Xenical® je izražal večje odstotke v inhibiciji lipaze tudi v območju platoja, kar je lahko posledica drugih faktorjev kot je, npr. večja reakcijska površina, ki je posledica večje mase praška v kapsuli, boljšega močenja pelet, hitrejšega razpada pelet do finih delcev z večjo površino v primerjavi z Alli®.

### Validacija analizne metode

Linearnost analiznega postopka smo ocenili z  $R^2 \geq 0,94$ ;  $r \geq 0,96$  za Xenical® kapsule in  $R^2 \geq 0,95$ ;  $r \geq 0,97$  za Alli® kapsule (Preglednica 14).

**Preglednica 14:** Parametri linearnosti za Xenical® in Alli®

	I		II		III	
Formulacija	R square	Multiple R	R square	Multiple R	R square	Multiple R
Xenical®	0,9875	0,9937	0,9605	0,9801	0,9484	0,9739
Alli®	0,9829	0,9914	0,9589	0,9792	0,9561	0,9778

**Preglednica 15:** Vrednosti RSD za Xenical® pri različnih časih raztapljanja kapsule

Formulacija	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	
Xenical®	Čas	RSD				
	5	0,3980	1,2493	1,0554	0,5627	1,6456
	15	1,0947	0,4472	1,6404	1,1935	1,5490
	30	0,4535	2,1967	0,4229	1,7971	2,9590
	45	2,6415	0,7326	1,0161	1,3647	1,9189
	60	1,2708	2,2882	5,3581	0,8020	2,3563
	90	0,9458	1,3937	5,7009	3,4364	1,7426
	120	1,8103	0,3189	10,5265	4,7190	3,2380

**Preglednica 16:** Vrednosti RSD za Alli® pri različnih časih raztavljanja kapsule

Formulacija		5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
@ Alli®	čas	RSD				
	5	1,5332	1,1528	0,6228	1,0396	1,4005
	15	2,9778	0,7222	2,6230	1,3384	1,6183
	30	3,1396	1,9912	2,4394	1,6651	1,1036
	45	2,9928	2,8154	1,2934	4,6237	2,7927
	60	3,8872	1,5739	1,8805	4,5269	2,2749
	90	3,3810	3,6680	1,7287	4,2449	4,3842
	120	7,6144	2,9296	4,3512	5,8441	4,3463

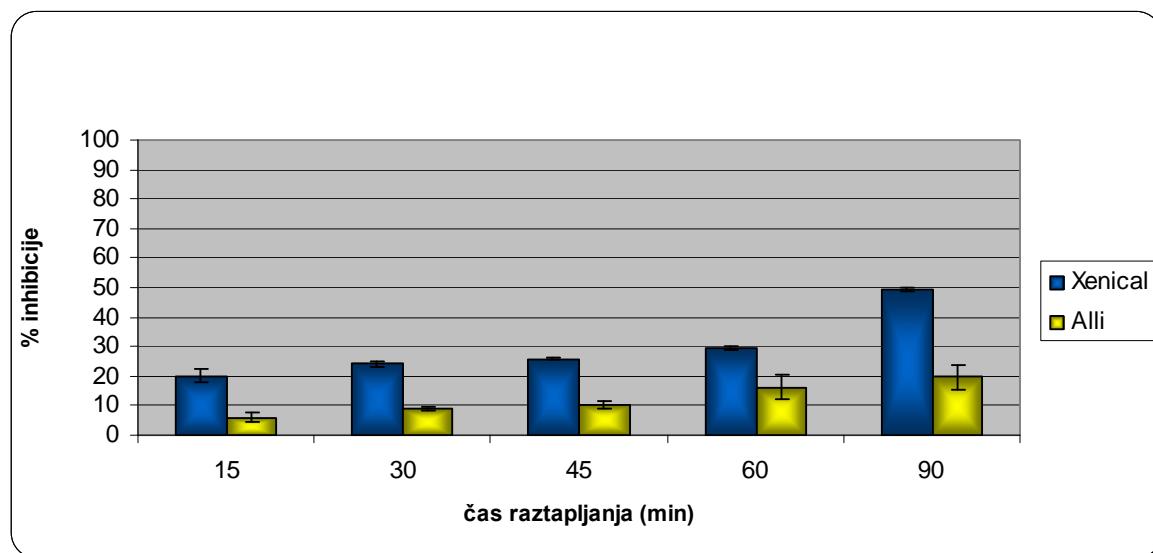
Rezultati, ki so prikazani v preglednici 15 prikazujejo natančnost analiznega postopka za Xenical®, ki je ocenjena z RSD manjšim od 10,53.

RSD vrednosti za Alli® so manjše od 7,61, kar dokazuje, da je natančnost analiznega postopka ustrezna.

#### 4.5 OCENITEV KONCENTRACIJSKO ODVISNIH UČINKOV KAPSUL ORLISTATA S TESTOM SPROŠČANJA IN *IN VITRO* TESTOM INHIBICIJE LIPAZE

Teste sproščanja kapsul ORL smo izvajali v puferski raztopini pH 4,5, pri čemer smo vzorce po 5, 15, 30, 45, 60 in 90 minutah raztopljanja uporabili za analizo inhibicije lipaze. V primerjavi z metodo, ki so jo izvajali v laboratorijih *GlaxoSmithKline*® in *Rugters University* (45), je prednost naše metode uporaba pufra pH 4,5 kot medija za raztpljanje, izognili smo se velikim količinam površinsko aktivnih snovi, kot je natrijev lavrilsulfat, vključen za izboljšanje topnosti in močljivosti ORL, ter izogibanje koncentracijam ORL, ki naj bi povzročile plato v odstotku inhibicije lipaze.

Prednost uporabljeni metode v primerjavi z modifirano metodo, ki je opisana pod točko 3.2.4, je izognitev nasičeni koncentraciji ORL.



**Slika 22:** Povprečje odstotkov inhibicije lipaze Xenical® in Alli® z uporabo vzorcev testa sproščanja v pufru pH=4,5 in 75 rpm, glede na dve ponovitvi

Slika 22 prikazuje povprečje odstotkov inhibicije lipaze dveh ponovitev v odvisnosti od časa raztpljanja kapsul. Na osnovi rezultatov je razvidno, da Xenical® v značilno

večjem odstotku inhibira lipazo v primerjavi s kapsulami Alli® . Odstotki inhibicije lipaze naraščajo s časom raztpljanja kapsule, ki je posledica večje koncentracije raztopljenega ORL v pufru. Z raztpljanjem kapsul orlistata v pufru pH 4,5 dosežemo 50 odstotno inhibicijo Xenical®-a, ki nam po drugi strani tudi ne potrdi koncentracijsko odvisen učinek ORL, potrjen v in vivo študijah. Z daljšim raztpljanjem kapsule bi dosegli plato v odstotku inhibicije, ki zopet potrjuje močen inhibitorni učinek v zelo majhnih koncentracijah.

Na takšen rezultat lahko vpliva tudi čas razpada kapsul Alli® in Xenical® in sicer, oba izdelka sta v obliki kapsul, ki vsebujejo pelete z aktivno substanco, podobnih sestav, časa razpada pelet pa sta različna. Suspenzija, ki nastane z raztpljanjem kapsul Xenical®-a je homogenega videza, kar tudi vpliva na manjšo variabilnost v odstotkih inhibicije med ponovitvami. Alli® kapsule z raztpljanjem tvorijo nehomogeno suspenzijo, z določenim deležem pelet, ki so ohranile svojo integriteto tudi po devetdesetih minutah raztpljanja. To lahko vpliva na manjši odstotek inhibicije lipaze ter večje STD med ponovitvami.

## 5. SKLEP

Glede na rezultate *in vitro* testa inhibicije lipaze, imajo vzorci orlistata proizvajalcev Ranbaxy<sup>®</sup>, Biocon<sup>®</sup> in standard isti  $IC_{50}$ , ki znaša 6  $\mu\text{M}$ . Statistično ni značilnih razlik v  $K_{i(app)}$ . Uporabljen *in vitro* test za določanje aktivnosti lipaze v prisotnosti orlistata smo potrdili kot specifičen, natančen in linearen v območju koncentracij inhibitorja med 0,1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$ .

Z uporabo *in vitro* testa inhibicije lipaze nismo potrdili razlik v inhibiciji med preizkušenimi kapsulami. Glavni razlog za tak rezultat je hiter nastanek nasičene koncentracije inhibitorja in posledično platoja v odstotkih inhibicije lipaze. Pri kombinaciji testa sproščanja za pripravo vzorcev in testa inhibicije lipaze so vidne razlike v odstotkih inhibicije lipaze v odvisnosti od odmerka orlistata. Po drugi strani pa z uporabljeno metodo nismo dokazali koncentračjsko odvisnega učinka, ki je potrjen v *in vivo* študijah. Narejeni *in vitro* poskusi dokazujo močen inhibitorni učinek, kar je razvidno predvsem na osnovi zelo nizkih koncentracij orlistata, ki zagotavljajo 50 % inhibicijo aktivnosti pankreasne lipaze.

Ostali dejavniki kot so sestava hrane, čas zadrževanja v želodcu, prisotnost žolčnih soli v tankemu črevesu in motiliteta črevesja, so izjemno pomembni dejavniki, ki v *in vivo* študijah gotovo značilno vplivajo na zagotovitev inhibitornega učinka odvisnega od odmerka orlistata.

## 6. LITERATURA

1. M. E. Aulton: Pharmaceutics, The design and manufacture of medicines, Churchill Livingstone, 2007; 336-360.
2. [http://www.farmadrustvo.si/gradivo\\_p/Industrijska%20farmacija/PREDAVANJA/Pre dformulacije.pdf](http://www.farmadrustvo.si/gradivo_p/Industrijska%20farmacija/PREDAVANJA/Pre dformulacije.pdf), 02 2010.
3. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji, Farm.Vestn. 2001; 52: 173-185.
4. <http://www-f9.ijs.si/~krizan/sola/sempod/0405/uplaznik.pdf>, 02 2010.
5. Gilham D, Lehner R: Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*, Methods 2005; 36: 139-147.
6. Lowe M. E: The triglycerid lipases of the pancreas, J. Lipid Res. 2002; 43: 2007-2010.
7. Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser M. E, Miller R: Lipases at interfaces: A review, Adv. Colloid Interface Sci. 2009; 147-148: 237-250.
8. Lima V. M. G, Krieger N, Mitchell D. A, Fontana J. D: Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents, Biochem. Eng. J. 2004; 18: 65-71.
9. Yang J, Koga Y, Nakano H, Yamane T: Modifying the chain lenght selectivity of the lipase from Burkholderia cepacia KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site, Protein Eng. 2002; 15: 147-152.
10. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R: Methods for lipase detection and assay: a critical review, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2000; 133-153.
11. Harp J. B : An assessment of the efficacy and safety of orlistat for the long-term management of obesity, J. Nutr. Biochem. 1998; 9: 516-521.
12. Bauer C, Gamse T, Marr R: Quality improvement of crude porcine pancreatic lipase preparations by treatment with humid supercritical carbon dioxide, Biochem. Eng. J. 2001; 9: 119-123.
13. Birner-Grunberger R, Scholze H, Faber K, Hermetter A: Identification of various lipolytic enzymes in crude porcine pancreatic lipase preparations using covalent fluorescent inhibitors, Biotechnol. Bioeng. 2004; 85: 147-154.
14. [http://www.thesgc.org/structures/structure\\_description/2PPL/](http://www.thesgc.org/structures/structure_description/2PPL/), 30.4. 2007

15. Teng Y, Xu Y: A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent, *Anal. Biochem.* 2007; 363: 297-299.
16. Singh Kanwar S, Kumar Kaushal R, Jawed A, Gupta R, Singh Chimni S: Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study, *Indian J. Biochem. Biophys.* 2005; 42: 233-237.
17. Lee Y.P, Chung G.H, Rhee J.S: Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1169: 156-164.
18. Persson E: Drug dissolution under Physiologically relevant conditions *in vitro* and *in vivo*, Uppsala Universitet 2006.
19. Tiss A, Miled N, Verger R, Gargouri Y, Abusalham A: Digestive lipases inhibition: an *in vitro* study, *Lipases and phospholipases in drug development: Biochem. Molec. Pharm.* 2004; 155-193.
20. Ballinger A, Peikin R. S: Orlistat: Its current status as an anti-obesity drug, *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 440: 109-117.
21. Y Imaz Enc et al: Orlistat accelerates gastric emptying and attenuates GIP release in healthy subjects, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 296: G482-G489.
22. <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/alli/H-854-s11.pdf>, 02 2010.
23. P.H Wilding J: Intestinal lipase inhibitors, *Pharmacotherapy of obesity*, 2008 Switzerland, 47-57
24. Padwal S. R, Majumdar R. S : Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine and rimonabant, *Lancet* 2007; 369: 71-77.
25. [http://www.tradeeasy.com/photo/seller/606743/graphics/1231147994425\\_Orlistat.jpg](http://www.tradeeasy.com/photo/seller/606743/graphics/1231147994425_Orlistat.jpg), 2007.
26. <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Xenical/106698en6.pdf>, 02 2010.
27. Tiss A, Ransac S, Lengsfeld H, Hadvàry P, Cagna A, Verger R: Surface behaviour of bile salts and tetrahidrolipstatin at air/water and oil/water interfaces, *Chem. Phys. Lipids* 2001; 111: 73-85.
28. <http://www.stetoskop.info/images/stories/content2/xenical.jpg>, 02 2010.
29. [http://ecx.images-amazon.com/images/I/41J-KBzCZDL.\\_SL160\\_.jpg](http://ecx.images-amazon.com/images/I/41J-KBzCZDL._SL160_.jpg), 02 2010.
30. Ko J, Small M. D: Behavior of tetrahidrolipstatin in biological model membranes and emulsions, *J. Lipid Res.* 1997; 38: 1544-1552.

31. Tiss A, Lengsfeld H, Carriere F, Verger R: Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2008; article in press
32. Carriere F, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, De Caro A, Laugier R, Verger R: The specific activities of Human Digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals, *Gastroent.* 2000; 119: 949-960.
33. Zhi J, Melia A.T, Guerchiolini R, Chung J, Kinberg J, Hauptman J. B, Patel J. H, P: Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers, *College Clin. Pharmacol.* 1994; 56: 82-85.
34. Sternby B, Hartmann D, Borgstrom B, Nilsson Å: Degree of *in vivo* inhibition of human gastric and pancreatic lipases by orlistat in the stomach and small intestine, *Clin. Nutr.* 2002 ; 21 (5):395-402.
35. Porsgaard T, Straarup E. M, Mu H, Hoy C.-E: Effect of orlistat on fat absorption in rats: a comparison of normal rats and rats with diverted bile and pancreatic juice, *Lipids.* 2003; 38: 1039-1043.
36. [http://www.columbiapharma.com/reg\\_updates/international/ich/Q2B.pdf](http://www.columbiapharma.com/reg_updates/international/ich/Q2B.pdf), 02 2010.
37. European Pharmacopeia, 6<sup>th</sup> Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
38. United States Pharmacopeia, 31<sup>th</sup> Edition, National Formulary 25<sup>th</sup> ed., United States Pharmacopeia Convection, Rockville, MD, USA, 2008.
39. [http://bio.ijs.si/~brigita/encimmatika/Enzyme%20Kinetics\\_Baici.pdf](http://bio.ijs.si/~brigita/encimmatika/Enzyme%20Kinetics_Baici.pdf), 05.06.2009.
40. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/kinetics/ek4t6.html#p63>, 06.06.2009.
41. Bendicho S, Trigueros M.C, Hernandez T, Martin O: Validation and Comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk, *J. Dairy Sci.* 2001; 84:1590-1596.
42. P. J. Linsiger T, D. Joseph R: Limitation of the application of the Horwitz equation, *Trends Analyt. Chem.* 2006; 25: 1125-1130.
43. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman J: Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update, *Pharm. Res.* 2008; 25: 1663-1675.
44. Stalder H, Oesterhelt G: Tetrahydrolipstatin: Degradation products produced by human carboxy-ester lipase, *Helv. Chim. Acta* 1992; 75: 1593-1603.

45. D. Lewis and D. Liu, "A novel *in vitro* assay capable of monitoring the inhibitory effect of orlistat dosages, 2009.

**1**

**2**