

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



SANDRA KOS

**VREDNOTENJE VPLIVA DELEŽA VODNE FAZE IN VGRADNJE
ASKORBILPALMITATA NA STRUKTURO TEKOČIH KRISTALOV
ZA DERMALNO DOSTAVO UČINKOVIN**

**CHARACTERISATION OF THE INFLUENCE OF WATER PHASE
AND INCORPORATED ASCORBYL PALMITATE ON THE
STRUCTURE OF
LIQUID CRYSTALS AS DERMAL DELIVERY SYSTEMS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za Farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Zvonar, mag. farm. Analizo ozkokotnega rentgenskega sipanja so pod vodstvom prof. dr. Marije Bešter Rogač opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag.farm. in somentorici asist. dr. Alenki Zvonar, mag. farm. za vsestransko pomoč in neprecenljive napotke med delom, ter prof. dr. Mariji Bešter Rogač za realizacijo rezultatov SAXS metode. Predvsem bi se želela zahvaliti tudi fantu Benotu za nesebično pomoč in potrpežljivost tekom celotnega študija ter vzpodbudne besede, ki so bile vedno dobrodošle. Zahvaljujem se tudi domačim in prijateljem, ki so mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Zvonar, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Uroš Urleb

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj

Ljubljana, november 2011

VSEBINA

VSEBINA.....	3
1. POVZETEK.....	4
2. ABSTRACT.....	6
3. SEZNAM OKRAJŠAV	8
4. UVOD.....	9
4.1. STARANJE KOŽE IN VPLIV PROSTIH RADIKALOV	9
4.2. ANTIOKSIDANTI (AO) KOT ZAŠČITA PRED STARANJEM KOŽE	10
4.2.1 Askorbinska kislina (vitamin C).....	11
4.2.2 Askorbilpalmitat (AP).....	13
4.3. TEKOČI KRISTALI (TK) KOT NOSILNI SISTEMI ZA DERMALNO DOSTAVO UČINKOVIN	15
4.3.1 Lastnosti TK in njihova urejenost.....	15
4.3.2 Delitev TK.....	15
4.3.3 Liotropni TK	16
4.4. METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TK	19
4.4.1 Polarizacijska mikroskopija	19
4.4.2 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)	19
4.4.3 Rentgensko sipanje	20
4.4.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)	21
4.4.5 Reologija.....	21
4.4.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	22
4.5. TEKOČI KRISTALI ZA DERMALNO APLIKACIJO	24
4.6. LECITIN KOT SESTAVINA TK.....	25
4.6.1 Vloga lecitina v organizmu in njegova uporaba v farmaciji	25
4.6.2 Kemijska sestava lecitina.....	25
4.6.3 Fizikalne lastnosti lecitina in sposobnost samo-asociiranja	26
5. NAMEN DELA	29
6. MATERIALI IN METODE.....	30
6.1. MATERIALI ZA IZDELAVO VZORCEV	30
6.2. PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV.....	31
6.3. METODE ZA VREDNOTENJE TK	32
6.3.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	32
6.3.2 Ozkokotno rentgensko sipanje (SAXS).....	32
7. REZULTATI IN RAZPRAVA	34
7.1. DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	34
7.1.1 DSC analiza posameznih komponent TK.....	34
7.1.2 DSC analiza binarnih in ternarnih komponent TK.....	36
7.1.3 DSC analiza TK.....	40
7.1.4 DSC analiza TK z AP.....	48
7.2. OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE	54
7.2.1 Vrednotenje difraktogramov TK brez vgrajenega AP (TKI-8):	55
7.2.2 Vrednotenje difraktogramov TK z vgrajenim AP (API-8).....	58
7.2.3 Razdalje med lamelami.....	60
8. SKLEP	61
9. VIRI IN LITERATURA.....	63
10. PRILOGA:.....	66

1. POVZETEK

Liotropni tekoči kristali z lamelarno strukturo predstavljajo ustrezne dermalne dostavne sisteme za dostavo vgrajenih učinkovin. Prednost uporabe omenjenih sistemov je njihova visoka viskoznost in strukturna podobnost z medceličnimi lipidi v povrhnjici kože. Slednja omogoča povečano mobilnost, sproščanje in permeacijo učinkovin, pri čemer ne prihaja do ireverzibilnih sprememb kože. Lamelarna struktura tekočih kristalov omogoča vključitev vode v hidrofilna področja dvoslojev, kar posledično zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacijo kože.

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv naraščajočega deleža vodne faze ter vgradnje 1 % modelne zdravilne učinkovine askorbilpalmitata na strukturo tekočih kristalov. Proučevani tekoči kristali so kot emulgatorja vsebovali Tween 80[®] in lecitin (v razmerju 1:1), kot lipofilno fazo izopropilmiristat ter bidestilirano vodo kot hidrofilno fazo. Notranjo strukturo tekočih kristalov smo proučevali posredno, s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije. Pripravljene vzorce smo izpostavili nadzorovanim temperaturnim programom. Najprej smo jih ohlajali na -60 °C, nato jih 15 minut vzdrževali pri konstantni temperaturi (-60 °C), temu pa je sledilo segrevanje na 60 °C. Enak temperaturni program smo uporabili pri treh različnih hitrostih procesa (5, 2 in 10 K/min). Potrdili smo prisotnost različno vezanih oblik vode v vzorcih, katerih pojavnost je bila odvisna od deleža vodne faze v vzorcih ter prisotnosti amfifilnega askorbilpalmitata. Različne oblike vode so se odražale v različnem obsegu in temperaturi kristalizacije vode med procesom ohlajanja vzorcev oz. v različni poziciji in površini talilnega vrha na DSC krivulji segrevanja vzorcev.

Kot dodatno metodo vrednotenja tekočih kristalov smo uporabili ozkokotno rentgensko sipanje. Analizo smo izvedli pri treh temperaturah: 25 °C (sobna temperatura), 32 °C (temperatura na površini kože) in 37 °C (telesna temperatura). Na podlagi pozicije vrhov q_1 in q_2 v razmerju 1:2 ter oblike dotičnih vrhov smo potrdili lamelarno strukturo v večini vzorcev. Razdalje med lamelami so se povečevale s povišanjem deleža vode v vzorcih tako v vzorcih brez kot tudi z vgrajenim askorbilpalmitatom. V določenih vzorcih so bile prisotne še dodatne faze, predvidoma miceli. Potrdili smo vpliv askorbilpalmitata na strukturo tekočih kristalov, saj je pri dveh vzorcih, predvidoma amfifilni značaj askorbilpalmitat povzročil porušenje lamelarne strukture. Temperatura merjenja

očitnejšega vpliva na strukturo tekočih kristalov ni imela, zato lahko sklepamo na ohranjanje strukture tudi pri pogojih aplikacije na kožo.

Na podlagi rezultatov našega diplomskega dela je razvidno, da uporabljeni metodi omogočata določen vpogled v notranjo strukturo vzorcev tekočih kristalov. Poznavanje slednje je pomembno, saj je od nje odvisno tudi sproščanje vgrajene učinkovine na mestu aplikacije.

2. ABSTRACT

Liotropic liquid crystals with lamellar structure represent suitable dermal delivery vehicle for incorporated active ingredients. Their advantages are high viscosity and structural similarity with intercellular lipids present within the epidermis, which enable an augmented mobility, release and permeation of active substances without irreversible skin changes. Lamellar structure of liquid crystals also enables incorporation of water into hydrophilic areas of interlayers, which reduces water evaporation and for that increases hydration of the skin.

The aim of our work was to study the dependence of liquid crystals internal structure on water content and incorporation of 1 % ascorbyl palmitate as active ingredient. Prepared liquid crystals were composed of Tween 80[®] and lecithin as emulsifying agents (at ratio 1:1), isopropyl myristate as an oily phase and bidistilled water as a hydrophilic phase.

The internal structure of liquid crystals was studied indirectly, by using differential scanning calorimetry. Our samples were exposed to controlled temperature programs. Firstly, they were cooled down to -60 °C. After 15 min isothermal step at this temperature the systems were heated up to 60 °C. The same temperature program was performed at three different cooling and heating rates (5, 2 and 10 K/min). Various types of bounded water were identified in the samples, depending water content in the samples and incorporated amphiphilic ascorbyl palmitate. Different types of water were determined by temperature and extend of water crystallization during cooling process, and by position of melting peaks on DSC heating curves.

Small angle X-ray scattering was used as supplementary method. The analyses were conducted at three different temperatures: 25 °C (room temperature), 32 °C (temperature of the skin surface) and 37 °C (body temperature). Lamellar structure was confirmed in majority of samples by presence and shape of peaks q_1 and q_2 at 1:2 ratio in their position. Distances between lamellas increased with higher water content in liquid crystal samples with or without ascorbyl palmitate incorporated. In some samples the additional structures were identified, probably micelles were formed. The influence of ascorbyl palmitate on the structure of liquid crystals was also confirmed. Upon incorporating ascorbyl palmitate lamellar structure was disrupted in two samples, which could be explained by amphiphilic nature of ascorbyl palmitate. According to SAXS analysis the structure of liquid crystals is

temperature independent, therefore no temperature related structural changes of liquid crystals are expected after dermal application.

Based on our results we can conclude, that both methods used at our work offer specific insight into the structure of liquid crystals. This information is important, since structure of liquid crystals influences releasing of incorporated active ingredient at dermal application.

3. SEZNAM OKRAJŠAV

- AO** - antioksidant(i)
- AP** - askorbilpalmitat
- BZ** - binarna zmes
- DSC** - diferenčna dinamična kalorimetrija (*ang. Differential Scanning Calometry*)
- IPM** - izopropilmiristat
- NMR** - jedrska magnetna resonanca
- O/V** - olje v vodi
- PAS** - površinsko aktivna snov
- ROS** - reaktivne kisikove spojine (*ang. Reactive Oxygen Species - ROS*)
- SAXS** - ozkokotno rentgensko sipanje (*ang. Small Angle X-Ray Scattering*)
- TEM** - transmisijska elektronska mikroskopija
- TK** - tekoči kristali (*ang. Liquid Crystals - LC*)
- TZ** - ternarna zmes
- V/O** - voda v olju
- WAXS** - širokokotno rentgensko sipanje (*ang. Wide Angle X-Ray Scattering*)
- ZU** - zdravilna učinkovina

4. UVOD

4.1. Staranje kože in vpliv prostih radikalov

Koža je največji človeški organ in kot zunanja mejna površina organizma ves čas v neposrednem stiku z zunanjim okoljem in njegovimi različnimi vplivi na procese v koži (1). V nadaljevanju se bomo omejili na enega najpomembnejših vplivov iz okolja, ki v veliki meri doprinese k nastanku reaktivnih radikalov v koži, to je UV sevanju, in z njim povezanimi posledicami.

Proces staranja kože je odvisen od genetskih in zunanjih faktorjev, pomembno pa nanj vplivajo tudi hormoni. Posledice le-tega se kažejo v zmanjšani celični aktivnosti, koža se prične tanjšati, poveča se število, globina in površina gub. Koža postane ohlapna, izgubi svoj sijaj, gladkost in elastičnost. Lahko se pojavijo tudi pigmentirani in depigmentirani madeži. Različni faktorji, kot so izguba elastičnosti in napetosti kože zaradi izgube vode, tanjšanje rožene plasti (*stratum corneum*), atrofije epidermisa in sprememb v količini in kvaliteti kolagenskih in elastinskih vlaken vodijo v nastanek kožnih gub (2).

Znaki staranja kože so odvisni od naravnih (intrinzičnih) kot tudi od patoloških (ekstrinzičnih) vplivov. Posledica slednjih je t.i. fotostaranje, ki ga povzročijo UV-žarki. Pojav je rezultat dolgoročnega škodljivega vpliva sončne svetlobe na kožo. Še posebej nevarne in za organizem obremenjujoče so večkratne in ponavljajoče se sončne opekline. Na celičnih kulturah človeških keratinocitov so z različnimi študijami potrdili, da je posledica tako genetsko kot tudi s svetlobo pogojenega staranja kože spremenjena ekspresija določenih genov, ki prizadane rast, diferenciacijo in imunomodulacijo v koži. Postarane celice kože postajajo vse bolj neodzivne na zunanje dražljaje, kar končno vodi v celično smrt. V koži, poškodovani zaradi UV-svetlobe, pride do kopičenja nenormalnega elastotičnega materiala v zgornjem in srednjem delu usnjice (*dermis*). Ta material izhaja iz elastinskih vlaken, ki maskirajo proteolitično razgrajen kolagen. Fotostaranje se zato kaže kot odebelitev in nastanek atrofične kože, možen pa je tudi pojav malignih transformacij. Odvisno je od stila življenja (prehrana, strupi iz okolja, alkohol, stresno življenje, premalo spanja), časa izpostavljanja soncu in vrste zaščitne kozmetike (1, 2, 3).

Pomemben vpliv na proces staranja ima prisotnost in delovanje radikalov. To so molekule, ki so zaradi nesparjenega elektrona zelo reaktivne in s tem posledično nestabilne.

Reagirajo lahko s številnimi molekulami in makromolekulami v organizmu, kjer povzročajo oksidativne spremembe lipidov, proteinov in DNA. Radikalske reakcije so problematične zaradi njihove neselektivnosti, nespecifičnosti in nenadzorovanosti. Najpomembnejši vir radikalov je kisik. Ta sicer omogoča celično dihanje in s tem izgorevanje hranilnih snovi, kar zagotavlja energijo za delovanje organizma. Vendar pri tem kot stranski produkt nastajajo tudi radikali. Pod vplivom visokoenergetskih UV-žarkov, ki so sestavni del sončne svetlobe, nastajajo po osnovni radikalski reakciji ($A-B + hv \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$) zaradi cepitve kovalentnih vezi, predvsem reaktivne kisikove spojine (ROS). Najpomembnejša med njimi sta superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) in hidroksilni radikal (OH^{\bullet}). V skupino ROS uvrščamo še ozon, vodikov peroksid, singletni kisik in organske perokside, ki predstavljajo kisikove reaktivne derivate. V reakcijah radikalov nastajajo vedno novi radikali (razen, kjer reagirata dva radikala v neradikalno spojino), ki neposredno zmanjšajo koncentracijo normalno prisotnih antioksidantov ter s tem oslabijo prvo obrambno linijo kože pred delovanjem radikalov. Nadalje zmanjšajo aktivnost encimov (katalaza in glutation reduktaza), ki imajo v koži obrambno funkcijo pred radikali. Zaradi oslABLJENE naravne obrambe so v koži izzvani procesi lipidne peroksidacije, ki povzročajo odmiranje celic, vodijo pa lahko tudi v poškodbe DNA (1, 2).

4.2. Antioksidanti (AO) kot zaščita pred staranjem kože

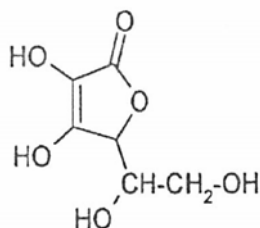
AO so snovi, ki v zelo nizkih koncentracijah preprečijo, odložijo ali zavirajo oksidacijo drugih snovi. Lahko učinkujejo na različnih stopnjah oksidacijskega procesa in z različnimi mehanizmi. Ena od skupin so t.i. "žrtveni" AO, ki reagirajo z radikali, še preden bi ti lahko reagirali z drugimi molekulami. AO se pri tem oksidira v stabilen, nereaktiven radikal, ki se lahko nadalje regenerira ali izloči iz organizma. Tak primer AO je vitamin C (4, 5).

Organizem se proti presežnim radikalom neprestano bori. Endogeni obrambni sistem vključuje številne nizko-molekularne AO (askorbat, glutation, α -tokoferol, ubikvinol in β -karoten), med pomembnejšimi encimi z antioksidativnim učinkom pa so poznani superoksidna dismutaza (SOD), katalaza in glutation peroksidaza. Vendar z leti kapaciteta obrambnih mehanizmov upada. Organizem je tako vse pogosteje podvržen delovanju presežnih radikalov. Neravnovesje med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici izzove nastanek oksidativnega stresa, ki dokazano igra pomembno vlogo pri staranju kože ter patogenezi mnogih kožnih bolezni (2, 5, 6).

Dokazane varovalne učinke na kožo imajo številne spojine naravnega in sinteznega izvora, ki kožo vlažijo (hialuronska kislina), krepijo njeno barierno funkcijo (ceramidi) in ji dovajajo nujno potrebne vitamine, ki ščitijo kožne lipide pred oksidacijo, DNK pa pred poškodbami zaradi radikalov (vitamin C, vitamin E, koencim Q10). Mnoge od teh spojin so normalno prisotne v zdravi koži. Preparati za dermalno uporabo pogosto vsebujejo tudi UV-filtre in UV-blokatorje (2).

Namen uvajanja antioksidativnih spojin v kozmetične izdelke oziroma pripravke za dermalno uporabo je dvojen. Lahko jih vgradimo za zaščito oksidativno občutljivih spojin v izdelku ali pa pred oksidacijskimi procesi želimo zaščititi kožo. Za antioksidativen učinek na koži in s tem varovanje pred poškodbami je nujen pogoj, da imajo AO sposobnost prehajati oz. penetrirati sicer učinkovito kožno bariero. Za doseg želenih rezultatov, torej zaščite izdelka in kože, moramo uporabiti zelo učinkovite AO, ki pa so zaradi velike reaktivnosti nestabilni (2, 7).

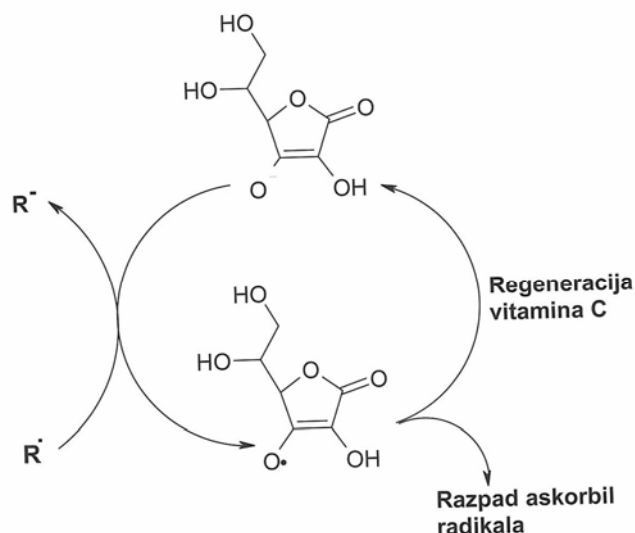
4.2.1 Askorbinska kislina (vitamin C)



Slika 1: Kemijska formula askorbinske kisline

L-askorbinska kislina oz. vitamin C (slika 1) je eden najpomembnejših AO v koži. Je vodotopen vitamin, ki ga moramo v telo vnašati s hrano, saj ga organizem ni sposoben sam sintetizirati (8).

Pri fiziološkem pH je v obliki monoaniona – askorbata, ki je dober reducent. Kot reducent ima sposobnost uničiti agresivne oksidativne spojine in radikale. V radikalske reakcije se vključi tako, da radikalu ponudi vodikov atom iz hidroksilne skupine laktonskega obroča. Nastane manj nevaren, stabilnejši askorbilni radikal, ki se v celicah kože lahko nadalje regenerira ali pa se pretvori v produkte, ki se izločijo iz organizma (slika 2) (1, 8).



Slika 2: Potek avtooksidacije askorbata (1)

Poleg omenjenega antioksidativnega delovanja podpira tudi delovanje α -tokoferola (vitamin E), saj sodeluje pri regeneraciji α -tokoferilnega radikala. Zaradi velike sposobnosti reduciranja pa askorbat lahko deluje tudi kot pro-oksidant. Način delovanja je odvisen od razmer v okolju, predvsem od prisotnosti kovinskih ionov ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ in $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$), ki jih reducira. Slednji v nižji valenčni stopnji (Fe^{2+} in Cu^+) katalizirajo nastajanje radikalov. Če je koncentracija askorbata manjša v primerjavi s koncentracijo kovinskih ionov (Fe^{3+}), bo deloval kot prooksidant, če pa je koncentracija večja, bo učinkoval kot AO (6, 9).

Zaradi mnogih ugodnih učinkov v koži ga pogosto vgrajujejo v kozmetične in dermatološke pripravke. Askorbinska kislina služi kot esencialni ko-faktor encima lizil hidroksilaze (križno poveže kolagen v trdno strukturo) in prolil hidroksilaze (stabilizira molekulo kolagena), ki sta udeležena v post-translacijske pretvorbe pri sintezi kolagena tipa I in III. S stimulacijo teh biosinteznih poti poveča tvorbo kolagena, kar pripomore k večji trdnosti kože, s tem pa vodi v zmanjšan nastanek gubic. Nedavne raziskave so pokazale, da vitamin C direktno reagira z DNA, s čimer se poveča stopnja transkripcije. Stabilizira pro-kolagensko mRNA, s čimer regulira in vzdržuje intracelularno količino kolagena. Poleg kolagena pa poveča tudi tvorbo elastina (10).

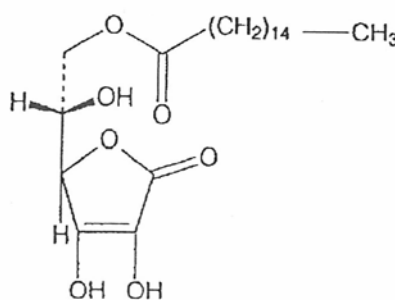
Vitamin C ima sposobnost, da zavre tvorbo melanina in s tem pigmentacijo kože, zato se v kozmetiki uporablja za posvetlitev le-te (kot belilno sredstvo pri hiperpigmentaciji),

dokazani pa so tudi protivnetni učinki vitamina C v primeru eritema oz. rdečine po obsevanju z UV-žarki (2, 8, 10).

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) so ugotovili, da vitamin C kljub izraziti hidrofilnosti hitro prodira skozi kožo. Glavno oviro za absorpcijo predstavlja rožena plast kože (*stratum corneum*), zato je pomembna izdelava dermalnega pripravka, v katerem je vitamin C stabilen in ki zagotavlja dostavo zadostne količine učinkovine na mestu delovanja (3).

Zaradi kemijske nestabilnosti askorbinske kisline v heterogenih sistemih je njena uporaba omejena. V aerobnih pogojih in pod vplivom svetlobe se reverzibilno oksidira v L-dehidroaskorbinsko kislino, ta pa se nadalje ireverzibilno pretvori v oksalno kislino. Za rešitev problema stabilnosti so razvili derivate z enakim oz. podobnim delovanjem, a izboljšano kemijsko stabilnostjo. Eden izmed lipofilnih derivatov, pogosto uporabljenih v kozmetičnih pripravkih, je askorbilpalmitat, med hidrofilnimi derivati pa soli askorbilfosfata. Zaradi razlik v hidro-lipofilnih lastnostih derivatov vitamina C, lipofilni askorbilpalmitat lažje prehaja v kožo kot hidrofilni askorbilfosfat. Slednji se nahaja v obliki predzdravila, saj za pretvorbo v aktivno obliko nujno potrebuje encimsko aktivnost (8, 11).

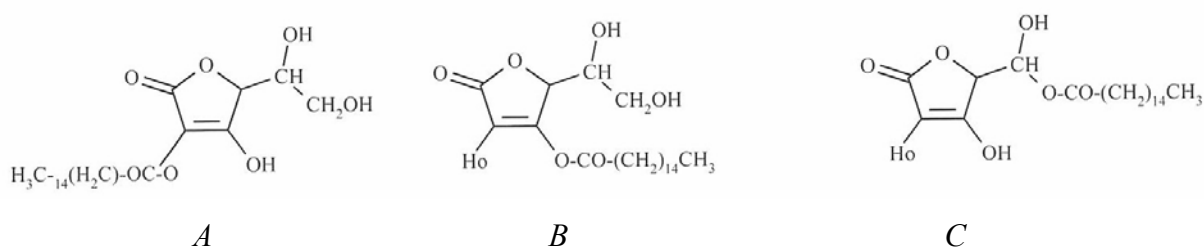
4.2.2 Askorbilpalmitat (AP)



Slika 3: Kemijska formula AP

AP (slika 3) je sintezna snov, pridobljena z zaestrenjem L-askorbinske kisline s palmitinsko kislino. Čeprav je esterifikacija možna na mestih 2, 3, in 6 (slika 4), je za ohranitev reducentskih lastnosti pomembna le tvorba estra na mestu 6. Esterifikacija na mestih 2 in 3 namreč le preprečuje oksidacijo obroča, derivata pa nimata zahtevanih

reducentnih lastnosti. Znano pa je, da v reakcije z radikali vstopa le 3-hidroksilna skupina laktonskega obroča (3, 6, 8).



Slika 4: Možna mesta tvorbe estrov askorbinske kisline s palmitinsko kislino: 2(A), 3(B) in 6(C) (8)

Tvorba estra zmanjša hidrolizo askorbinske kisline, tako da je stabilnost AP nekoliko večja v primerjavi z askorbinsko kislino, vendar v končnih izdelkih še vedno nezadovoljiva. Za doseg primerne stabilnosti AP v preparatih je zato zelo pomembna izbira optimalnega nosilnega sistema (8).

P. Špiclin in sodelavci so ugotovili, da so za vgradnjo AP zelo primerne mikroemulzije. Te so, podobno kot v nadaljevanju raziskovani TK, sestavljene iz oljne in vodne faze ter emulgatorja in koemulgatorja. Pripravili so mikroemulzije tipa V/O in O/V in potrdili večjo stabilnost AP v mikroemulzijah tipa V/O. V teh sistemih se molekula AP zaradi kemijske strukture in amfifilnega značaja na medfazi V/O z lipofilnim delom (nepolarni rep palmitinske kisline) orientira proti oljni fazi, s hidrofilnim delom (ostanek laktonskega obroča), občutljivim na oksidacijo, pa proti vodni fazi. Medfaza mikroemulzij V/O namreč predstavlja bariero za prehajanje kisika in na ta način ščiti občutljivi del molekule (6, 8).

Z vidika ustreznosti dermalne uporabe je AP zaradi nevtralnega pH zelo ugoden, saj kože ne draži, zaradi lipofilnega značaja pa lahko prehaja roženo plast. AP se v kozmetične izdelke vgrajuje, odvisno od koncentracije, iz dveh razlogov. V nižjih koncentracijah (0,05 - 0,1 %) ima vlogo zaščite lipofilnih sestavin pripravka in na ta način ščiti izdelek. V višjih koncentracijah (1 - 2%) pa se vgrajuje kot aktivna sestavina za zaščito kože. V starejših študijah, ki so jih izvajali na živalskih modelih in na človeški koži pridobljeni po avtopsiji, so z metodo HPLC namreč ugotovili, da so nivoji L-askorbata po dermalni aplikaciji AP ali askorbinske kisline v koži višji, kot če je bila koža vezana na oskrbo z vitaminom C iz hrane ali dodatkov prehrani (3, 8).

4.3. Tekoči kristali (TK) kot nosilni sistemi za dermalno dostavo učinkovin

4.3.1 Lastnosti TK in njihova urejenost

TK predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim, saj združujejo lastnosti trdnih kristaliničnih snovi, kot so anizotropnost, dvolomnost, urejenost in mehanska stabilnost ter pretočne lastnosti tekočin (12, 13).

Za kristalinične snovi je značilno, da izkazujejo pozicijsko (urejenost molekul v mrežo) in orientacijsko (orientacija molekul) urejenost na kratke razdalje, to je nekaj velikosti molekul, kot tudi na dolge razdalje, torej celotnega področja. Tekočine, ki so sicer v osnovi neurejene, lahko izkazujejo urejenost na kratke razdalje glede na orientacijsko in/ali pozicijsko urejenost molekul. TK ne izkazujejo pozicijske urejenosti na dolge razdalje, izkazujejo pa orientacijsko urejenost na dolge, lahko tudi na kratke razdalje. Za opis orientacijske urejenosti sta pomembna dva podatka: ureditveni parameter S , ki nam pove stopnjo urejenosti molekul in ureditveni normalni vektor n , ki odraža smer, v katero so v povprečju orientirane molekule v sistemu. Nasprotno usmerjena vektorja n in $-n$ sta enakovredna. V trdnem kristalu je vrednost S blizu 1, kar pomeni skoraj popolno urejenost. TK pa imajo vrednost parametra S običajno med 0,3 in 0,9. Tudi smer ureditvenega vektorja ni enaka za celoten kristal, so pa TK bolj stabilni, kadar imajo vse molekule smer vektorja n (kot je enak 0).

Za TK so značilne različne strukture oziroma faze, med katerimi lahko prehajajo v specifičnem zaporedju in pod določenimi pogoji. Te faze imenujemo *mezofaze*, molekule, ki tvorijo TK pa *mezogeni* (12).

4.3.2 Delitev TK

V grobem poznamo *smektično* in *nematično* skupino TK. Pri obeh skupinah lahko molekule rotirajo le okrog svoje osi, razlika je le v gibljivosti molekul - pri prvi so molekule gibljive v dveh smereh, v nematični fazi pa v treh smereh. Obstaja še tretja skupina, to so *holesterični* TK, ki jih ponekod obravnavajo tudi kot posebno skupino nematičnih TK. V farmaciji je najobičajnejša smektična skupina, ki se tvori v ternarnih ali še kompleksnejših sistemih, sestavljenih iz PAS, vode in šibkih amfifilnih ali nepolarnih spojin (13).

Glede na nastanek TK delimo na *termotropne* in *liotropne*. Prvi nastanejo s segrevanjem trdnih snovi, značilno sestavljenih iz podolgovatih molekul ali molekul v obliki diska, s togim osrednjim delom in gibljivimi stranskimi verigami. Liotropni TK pa nastanejo z

dodajanjem topila trdni snovi, ki ima značilno strukturo podolgovatih amfifilnih molekul (12).

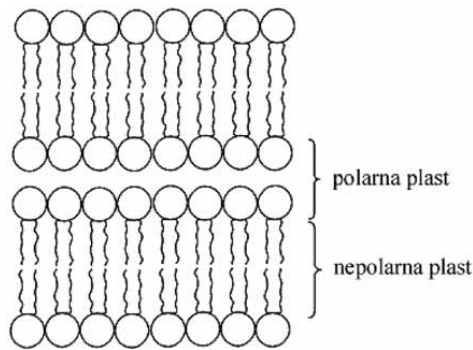
4.3.3 Liotropni TK

Liotropni TK se tvorijo z dodajanjem topila trdni snovi. Običajno jih tvorijo površinsko aktivne snovi (PAS) oziroma njihovi hidrati ali solvati v prisotnosti vodne in/ali oljne faze. V hidrofilni fazi se PAS raztapljajo in se pri točno določeni koncentraciji, ki jo imenujemo kritična micelarna koncentracija (KMK), spontano urejajo v asociate koloidnih velikosti oz. micle. Pri tem se s hidrofilnimi deli molekul obrnejo navzven proti prosti vodi, s hidrofobnimi deli pa navznoter. Obratno velja za reverzne micle. Ti nastajajo v oljni fazi v odsotnosti vode.

Z naraščanjem koncentracije PAS nastajajo specifične strukture z značilno trodimenzionalno urejenostjo. Pri tem se izotropna micelarna raztopina spremeni v anizotropno, viskoznost se poveča in v določenem koncentracijskem in temperaturnem območju nastanejo TK. V primerjavi s termotropnimi imajo liotropni TK dodatne prostostne stopnje, ki jih predstavljajo koncentracije posameznih komponent v sistemu. To jim omogoča urejanje v specifične strukture: lamelarne, heksagonalne in kubične. Katera struktura se bo tvorila, je odvisno od oblike hidratiranih molekul PAS. Hidrati ali solvati PAS, ki predstavljajo gradnike liotropnih TK, so v obliki stožca ali valja. Molekule v obliki valja se urejajo v lamelarne plasti, stožčaste molekule tvorijo heksagonalne faze, obrnjeni stožci pa inverzne heksagonalne faze. Agregati sferičnih in paličastih oblik tvorijo kubične mezofaze (12).

Fazni prehodi liotropnih TK

Molekule, ki so v obliki valja, se z izmenjavanjem polarnih in nepolarnih skupin urejajo v plasti in tvorijo lamelarne faze (slika 5). Voda in vodne raztopine se vežejo na polarne glave PAS in se vključujejo med nastale plasti, s čimer se poveča debelina lamelarnih faz, medtem ko se nepolarne molekule vključujejo med lipofilne repe PAS.

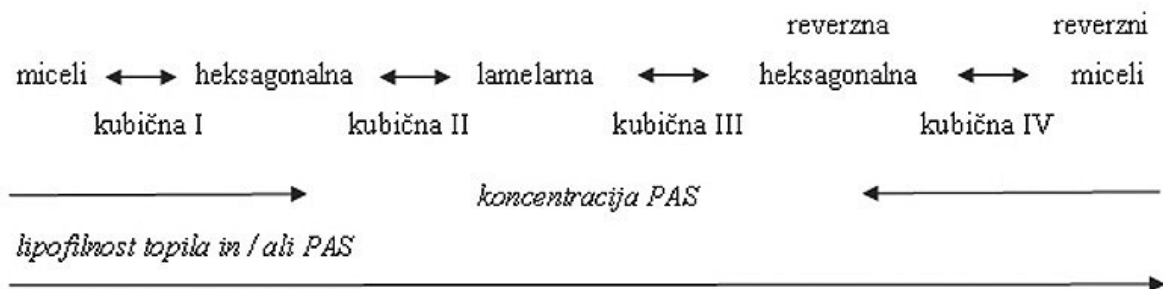


Slika 5: Osnovna struktura lamelarnih faz (12)

Pri povečanju količine topila in posledično povečanju debeline lamelarnih faz se lahko molekule topila začnejo vključevati tudi med posamezne molekule PAS. S tem pride do spremembe njihove oblike iz valjaste v stožčasto, kadar je topilo voda, oz. v obrnjen stožec v primeru lipofilnega topila. Posledično pride do sprememb asociacijskih struktur iz lamelarnih v heksagonalne oz. reverzne heksagonalne strukture. Za heksagonalne faze je značilno, da lahko sprejmejo le omejeno količino topila. Z nadaljnjim dodajanjem topila se tvorijo kubične faze tipa I ali obrnjene kubične faze tipa IV, ki jih sestavljajo sferični oz. inverzni miceli. Kadar je topilo polarno pa lahko med lamelarnimi in heksagonalnimi fazami nastane še kubična faza tipa II oz. kubična faza tipa III v primeru nepolarnega topila (slika 6). Nastanejo lahko tudi nematične, holesterične in še nekatere druge vmesne faze.

Lahko pride do nastanka različnih tipov liotropnih mezofaz, odvisno od koncentracije mezogena, lipofilnih oz. hidrofilnih lastnosti topila ter od lastnosti same molekule PAS. Vendar pa naštetni tipi mezofaz ne nastanejo vedno.

S spreminjanjem temperature lahko pride tudi do termotropnih faznih prehodov, s tem pa poleg liotropnih mezofaz hkrati lahko nastanejo tudi različne faze termotropnih TK (12).



Slika 6: Fazni prehodi liotropnih TK pri različni koncentraciji PAS in vplivu lipofilnosti topila in/ali PAS (12)

A. Heksagonalne faze

Heksagonalne faze (slika 7) se tvorijo v širokem temperaturnem območju, ko koncentracija PAS znaša 30-50%. Sestavljajo jih tesno zloženi paličasti agregati heksagonalnih oblik, gibljejo pa se lahko le vzdolž svoje dolžine. Zaradi njihove dvodimenzionalne ureditve se viskoznost sistema z nastankom heksagonalnih struktur močno poveča.

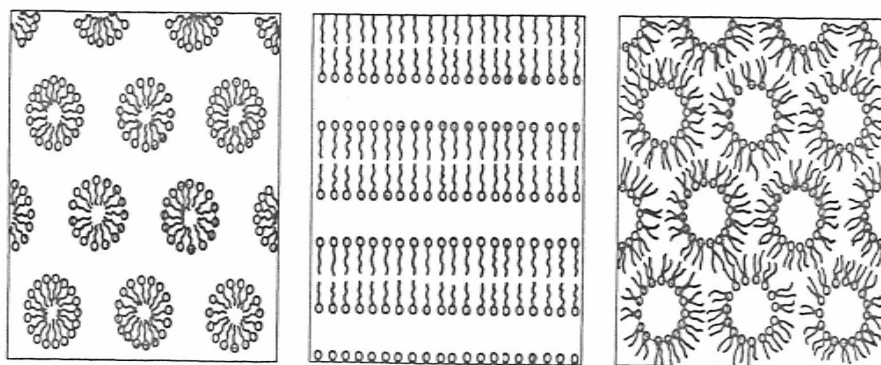
Poleg osnovnih pa se lahko tvorijo tudi reverzne heksagonalne faze (slika 7). Pri teh so polarne glave molekul PAS usmerjene v notranjost heksagonalnih struktur, poleg tega pa pride tudi do tesnejšega urejanja, saj je vmesni prostor med sosednjimi cilindri zapolnjen s hidrofobnimi verigami. Posledično je tudi koncentracijsko območje nastanka reverznih heksagonalnih faz v primerjavi z normalnimi heksagonalnimi fazami manjše (12).

B. Lamelarne faze

V primerjavi s heksagonalnimi fazami nastanejo lamelarne (slika 7) pri višjih koncentracijah PAS. Njihov nastanek se kaže kot izrazit padec viskoznosti sistema. Običajno nastanejo v najširšem koncentracijskem in temperaturnem območju, sestavljene pa so iz dvoplasti PAS, ki niso lateralno omejene. Plasti lahko drsijo druga ob drugi, njihovo gibanje pa je omejeno le z ravnino plasti, zaradi česar je tudi viskoznost sistema nižja (12).

C. Kubične faze

Za kubične faze je značilno, da so izotropne, zato edine ne izkazujejo dvolomnosti. Med TK jih uvrščamo le zaradi njihove značilne visoke viskoznosti, ki je posledica tridimenzionalne ureditve agregatov. Nimajo orientacijske urejenosti (12).



Heksagonalna faza

Lamelarna faza

Reverzna heksagonalna faza

Slika 7: Tipične strukture TK (14)

4.4. Metode za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti TK

Tipične strukture TK lahko določamo z uporabo različnih metod, ki skupaj dajejo komplementarne rezultate. Bistvene informacije o sami strukturi lahko pridobimo z direktnimi metodami, kot so polarizacijska in transmisijska elektronska mikroskopija, rentgensko sipanje, mikroskopija na atomsko silo in jedrska magnetna resonanca. Kot posredne metode pa lahko uporabimo reologijo in diferenčno dinamično kalorimetrijo. Z omenjenimi metodami lahko dobimo tudi informacije o vplivu vgrajene zdravilne učinkovine na strukturo sistema (12, 15).

4.4.1 Polarizacijska mikroskopija

TK (izjema so le kubične faze) so podobno kot običajni kristali optično anizotropni, kar pomeni, da se svetloba pri prehodu skozi v različnih smereh tudi različno obnaša. Izkazujejo dvolomnost, saj se žarek pri prehodu skozi snov TK razdeli na dva žarka. Pojav optične anizotropije opazujemo pod polarizacijskim mikroskopom, ki je sestavljen iz dveh polarizatorjev, pravokotnih drug na drugega, med katera vstavimo preiskovani vzorec. S prvim polarizatorjem svetlobo polariziramo, drug pa služi kot analizator.

Če polarizirana svetloba potuje skozi optično izotropni vzorec, se njena polarizacija ne spremeni in skozi analizator, ki je pravokoten na to polarizacijo, ne pride nič svetlobe, zato vidimo le črno polje. V primeru, da vzorec izkazuje dvolomnost, vidimo svetlo polje, saj se polarizacija obrne tako, da ni več pravokotna na analizator, le-ta pa jo zato prepusti.

V vzorcih TK lahko z omenjeno metodo določujemo strukture TK, saj naprava zazna določene defekte, ki jih povezujemo s faznimi prehodi TK (12, 16).

4.4.2 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Metoda se uporablja za preučevanje mikroteksture TK. Pri vzorcih, ki vsebujejo vodo, pride v visokem vakuumu elektronskega mikroskopa do izgube le-te in s tem do sprememb v mikroteksturi. Bistveno vlogo pri tej metodi igra posebna tehnika priprave vzorcev - tehnika zamrzovalnega lomljenja. Pri tem naredijo repliko vzorca, tako da ohranijo njegovo mikrostrukturo, ki jo potem opazujejo pod elektronskim mikroskopom. Na ta način se lahko natančno ugotavljajo prehodi med različnimi fazami liotropnih TK, opazuje se notranja struktura sistema in morebitna prisotnost defektov (12).

4.4.3 Rentgensko sipanje

Različne metode sipanja svetlobe so ene najpogosteje uporabljenih komplementarnih metod za raziskave koloidnih sistemov. Za pojav sipanja svetlobe so odgovorni delci oz. specifične strukture omenjenih sistemov. Tipične valovne dolžine rentgenske svetlobe znašajo približno 0,1 nm. V sistemih TK tako opazimo t.i. Braggovo sipanje le, če je valovna dolžina svetlobe primerljiva velikosti molekul oziroma razdalji med plastmi.

Pri rentgenskem sipanju merimo kotno odvisnost intenzitete sipane svetlobe, kjer urejena mikrostruktura TK daje značilne interference. Tipični interferenčni vzorec nastane zaradi značilnih ponovitev razdalj med plastmi d , ki se izračuna po Braggovi enačbi (*Enačba 1*):

$$d = n\lambda / 2\sin\theta$$

Enačba 1

d razdalja med plastmi

n red interference (celo število)

λ valovna dolžina rentgenskih žarkov

θ kot uklona rentgenskih žarkov, kjer se pojavi interferenca

Iz *Enačbe 1* je razvidno, da je razdalja med plastmi obratno sorazmerna $\sin\theta$. To pomeni, da večja kot je razdalja, manjši je kot, pri katerem se pojavi interferenca.

S tehniko SAXS (ozkokotno rentgensko sipanje) zaznamo večje razdalje med plastmi z ozirom na urejenost na dolge razdalje, z metodo WAXS (širokokotno rentgensko sipanje) pa manjše razdalje med plastmi glede na urejenost na kratke razdalje (med sosednjimi molekulami). SAXS metodo uporabljamo za natančno določanje razdalj med plastmi d v TK. Tako običajno razdalja med posameznimi plastmi pri lamelarnih liotropnih TK znaša 3-4 nm, širina vrinjenih plasti vode pa 2 nm, kar je odvisno od temperature in koncentracije v mejnih področjih lamelarnih plasti. Konfiguracija molekul PAS oz. verig in nagnjenost molekul znotraj plasti pa vplivata na odklon od določene vrednosti.

Poleg zaznavanja interreferenc, iz katerih izračunamo razdalje med plastmi, metoda SAXS iz zaporedja interferenc omogoča tudi določanje tipov TK. Za lamelarne TK je tako značilno zaporedje interferenc 1:1/2:1/3:1/4...; za heksagonalne 1:1/√3:1/√4:1/√7...; za kubične TK pa 1:1/√2:1/√3:1/√4... ali 1:1/√4:1/√5:1/√6... (12, 17).

Kot rezultat merjenja sipanja svetlobe z metodo SAXS, dobimo difraktogram, pri katerem se na abscisni osi nahaja velikost sipalnega vektorja (q):

$$q = 4\pi \sin\theta/\lambda$$

Velikost sipalnega vektorja predstavlja ti. recipročni prostor, ki je obratno sorazmeren realnemu prostoru. Velja recipročna odvisnost med razdaljo d in velikostjo sipalnega vektorja q . Informacije o velikih dimenzijah so tako izražene pri majhnih sipalnih kotih in obratno. Sipalna krivulja za večji delec je potisnjena k manjšim sipalnim kotom oziroma k manjšim vrednostim sipalnega vektorja q . Porazdelitev intenzitete sipanja je v recipročnem prostoru določena z obliko, velikostjo in notranjo strukturo sipajočih delcev realnega prostora (17).

4.4.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Metoda podaja najbolj natančne informacije za določitev ureditvenega parametra S . Z njo lahko jasno ločijo med različnimi molekularnimi segmenti. Običajno so v uporabi tehnike ^1H NMR, ^2H NMR ter ^{13}C NMR. Izbira ustrezne tehnike je odvisna od značilnosti sistema. Najbolj zanesljive podatke o orientacijski ureditvi in faznih prehodih, kjer sta ustrezni tudi ločljivost in razmerje signal/šum, podaja tehnika ^{13}C NMR. Za opazovanje faznih ravnotežij ter določanje posameznih faz je zelo uporabna tehnika ^2H NMR (devterijeva jedrska magnetna resonanca). Njena prednost je določitev posameznih faz znotraj večfaznega sistema, glavni pomanjkljivosti pa sta občutljivost in sposobnost natančne določitve faz. Medtem ko ^1H NMR za proučevanje TK ni najbolj primerna, saj so spektri TK široki, s slabo ločljivostjo, saj pride do prekrivanja posameznih vrhov. Pogosto pa se uporablja pri študijah manjših molekul, ki so vgrajene v TK (12).

4.4.5 Reologija

TK zaradi različne notranje strukture izkazujejo različne reološke lastnosti. Njihova viskoznost se povečuje z večanjem urejenosti mikrostrukture TK. Koeficient dinamične viskoznosti η , ki pri Newtonskih sistemih (sistemi, katerih viskoznost je neodvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja) ponazarja viskoznost, je pri heksagonalnih in kubičnih mezofazah opazno večji v primerjavi z η pri lamelarnih. Viskoznost kubičnih in heksagonalnih mezofaz je velika zaradi dvodimenzionalne in tridimenzionalne urejenosti, lamelarne mezofaze pa imajo zaradi enodimenzionalne urejenosti na dolge razdalje manjšo viskoznost. Glede pretočnih lastnosti pa ti sistemi izkazujejo take lastnosti, ki niso

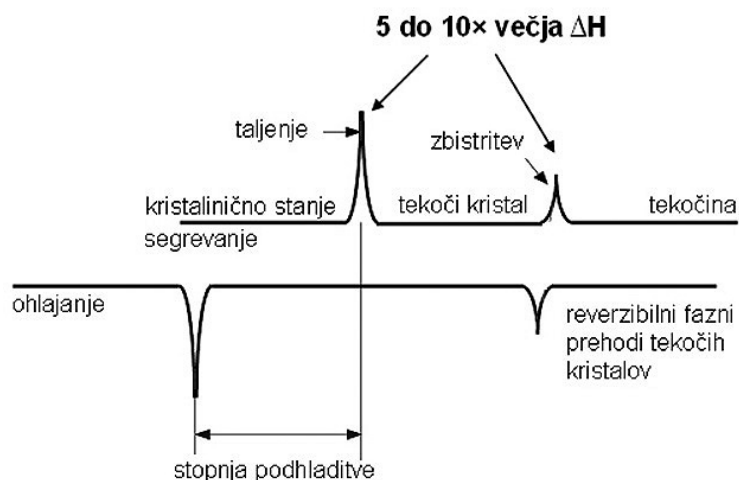
Newtonske. Pri kubičnih in heksagonalnih fazah so te lastnosti plastične, pri lamelarnih pa psevdoplastične.

Pri merjenju viskoznosti TK so se za najbolj primerne izkazali oscilacijski viskozimetri. Omogočajo določitev viskoelastičnih lastnosti TK brez sprememb v mrežni mikrostrukturi, ki se običajno zgodijo pri določanju reoloških lastnosti z mehanično deformacijo (18).

4.4.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija je v farmaciji ena najpogosteje uporabljenih termičnih analitskih metod. Uporablja se predvsem v predformulacijski fazi razvoja zdravil, v kontroli proizvodnje in v nadzoru njihove kakovosti. Predstavlja dopolnilno tehniko mnogim drugim analiznim metodam, kot so spektroskopija, kromatografija in klasične metode določanja vsebnosti. Odlikujejo jo velika hitrost, enostavna uporaba in dostopnost (15, 19).

Metoda obsega nadzorovano segrevanje, hlajenje vzorca ali vzdrževanje konstantne temperature. Pri tem se opazuje fizikalno-kemijske spremembe (slika 8), ki medtem potekajo, npr. fazne prehode, ki jih spremlja sprememba v prosti energiji in so posledica spremembe v entalpiji (H) ali entropiji (S) sistema. Spremembe v entalpiji se kažejo kot endotermni ali eksotermni signali, glede na to ali se v procesu energija porablja ali sprošča. Prehod iz kristaliničnega v amorfno stanje zahteva veliko energije, medtem ko prehod iz kristalinične oblike v obliko TK ali iz oblike TK v amorfno stanje porabi majhne količine energije. Zato je pomembno, da ima merilna naprava primerno občutljivost in dovolj nizko mejo detekcije (12, 15).



Slika 8: DSC krivulja TK (12)

Izvedba DSC eksperimenta:

Tipičen DSC eksperiment se prične s tehtanjem praznih lončkov, ki so običajno sestavljeni iz aluminija, zlata, nerjavečega jekla ali stekla. Pogosto se uporabljajo taki lončki, ki se lahko hermetično zaprejo. Majhne količine natančno natehtanega vzorca se nanesejo v lonček, tako da se tvori enakomerna, čim tanjša plast vzorčne snovi, lonček pa se nato hermetično zapre in ponovno stehta. Ko sta vzorec in referenca (prazen lonček) pravilno vstavljena v celico, se meritev začne. Merimo razliko v temperaturi med lončkom z vzorcem in referenčnim lončkom. Do slednje pride, ker lahko vzorec energijo absorbira, pri čemer gre za endotermno reakcijo ali jo sprošča, kjer gre za eksotermno reakcijo. Toplota, ki jo dovaja grelec, je sorazmerna dovedenemu električnemu delu [Watt]. Rezultat merjenja je krivulja odvisnosti toplotnega toka (dH/dt) od temperature (T) ali časa (t), ki jo imenujemo DSC krivulja. Z vrhovi oz. "piki" označujemo spremembe entalpije in območje temperature, v katerem je prišlo do spremembe. Položaj vrha, ki ga določata temperatura in čas ter površina pod njim kvantificirata konkretno termično spremembo (15, 19).

Termične spremembe

V praktičnem delu diplomske naloge smo na DSC krivulji proučevali taljenje in kristalizacijo, zato bomo omenjena procesa tudi natančneje opisali.

Taljenje je proces razpada kristalov in ga označujemo s temperaturo in entalpijo taljenja. Je prehod prvega reda, ker se v procesu porablja nevidna oz. latentna toplota (toplota, ki se porablja za taljenje in nič za dvig temperature). Pri taljenju pa pride tudi do spremembe toplotne kapacitete snovi. Do taljenja temperatura vzorca narašča s stalno hitrostjo, ki je programirana. Ko pa dosežemo tališče, ostane temperatura konstantna, čeprav še naprej dovajamo toploto. Temperatura ostane konstantna, dokler se ne stali ves vzorec ali pa se zaključi fazni prehod.

V DSC krivulji določimo temperaturo tališča $T_{tal} = T_{onset}$ na začetku odklona krivulje, v točki, kjer smo opazili začetek taljenja. Točka predstavlja presečišče bazne krivulje in ekstrapoliranega prvega dela krivulje taljenja snovi. Ta temperatura ni odvisna od mase vzorca, medtem ko se temperatura maksimuma talilnega vrha, T_{max} , s spreminjanjem mase vzorca spreminja.

Površina pod talilnim vrhom je sorazmerna entalpiji taljenja, ostrina talilnega vrha pa je odvisna od čistote vzorca, oblike kristalov (delcev) in od toplotne prevodnosti vzorca.

Manjši in nepravilno oblikovani kristali imajo višjo prosto entalpijo površine in se talijo pri nižji temperaturi kot večji.

Kristalizacija na DSC krivulji opazimo kot eksotermni vrh. Pri popolni kristalizaciji je površina kristalizacijskega vrha identična površini talilnega vrha. Vendar pa mnoge snovi lahko podhladimo (tekočo fazo ohladimo pri nižji temperaturi, kot je ravnotežna temperatura kristalizacije snovi), zato je lahko hitrost kristalizacije pod temperaturo tališča mnogo večja od hitrosti taljenja. Kristalizacijski vrh je v tem primeru višji od talilnega vrha. Mnogo snovi pa pri ohlajanju le delno kristalizira, zato je delež kristaliničnosti pri takih spojinah odvisen od hitrosti ohlajanja topila (15).

4.5. Tekoči kristali za dermalno aplikacijo

Danes se TK uporabljajo kot novejši nosilni sistemi dostavo učinkovin v različnih oblikah aplikacije. Poleg dermalne so pomembni tudi za peroralno, nazalno, rektalno in parenteralno aplikacijo. Prednost njihove uporabe pred klasičnimi dostavnimi sistemi so v veliki sposobnosti solubilizacije lipofilnih in hidrofilnih zdravilnih učinkovin, povečanju kemijske stabilnosti končnega pripravka ter omogočanju nadzorovanega sproščanja vgrajenih učinkovin.

Za dermalno uporabo so primerni predvsem liotropni TK z lamelarno strukturo, saj imajo veliko sposobnost solubilizacije, so termodinamsko stabilni in jih brez težav izdelamo. Poleg tega je njihova struktura podobna urejenosti medceličnih lipidov v povrhnjici kože, zaradi česar je povečano sproščanje, dermalna absorpcija učinkovin pa poteka brez iritacije kože. Lamelarna struktura TK pa omogoča vključitev vode v hidrofilna področja dvoslojev le-teh, s čimer se v primerjavi s hidrofilnimi emulzijami zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacija kože. Ravno zaradi teh lastnosti so pogosta sestava dermalnih in kozmetičnih izdelkov z vlažilnim delovanjem, saj imajo ugodno konsistenco, na koži pa puščajo prijeten občutek. Poleg tega predstavljajo tudi ugodne sisteme za vgradnjo občutljivih snovi, kot so vitamini, antioksidanti in olja.

TK so pomembni za stabilizacijo hidrofilnih krem in emulzij, saj zaradi presežka PAS, okrog kapljic notranje faze nastanejo področja TK, kar poveča viskoznost in ovira gibanje kapljic, s tem pa se poveča fizikalna stabilnost sistema.

Bistvenega pomena pri načrtovanju TK kot nosilnih sistemov je pravilna izbira in razmerje komponent, ki omogočajo nastanek TK z želenimi reološkimi lastnostmi, stabilnostjo, sposobnostjo solubilizacije in ostalimi specifičnimi lastnostmi (12, 17, 20).

4.6. Lecitin kot sestavina TK

4.6.1 Vloga lecitina v organizmu in njegova uporaba v farmaciji

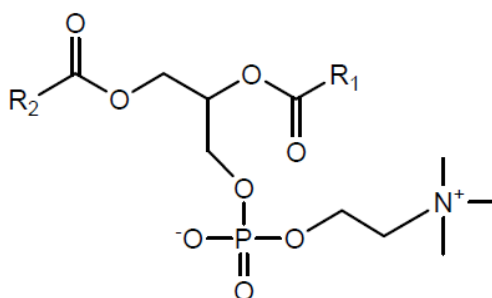
Lecitin je osnovna strukturna komponenta lipidnega matriksa bioloških membran in njenih organelov. Ima tudi zaščitno vlogo, saj organizem ščiti pred alkoholno cirozo jeter in znižuje stopnjo holesterola v serumu. Vpliva tudi na boljše psihično in fizično počutje. Uvrščamo ga v skupino fosfolipidov (lipidi z vsebujočo fosforjevo (V) kislino) in poleg fosfatidilholina, ki je njegova najpomembnejša komponenta, vsebuje še manjši delež fosfatidiletanolamina in fosfatidilinozitola ter trigliceride, maščobne kisline in sterole. Njihova vsebnost se razlikuje med posameznimi vrstami lecitina, odvisna pa je tudi od stopnje čistote (21, 22).

Lecitin se v vodi dobro dispergira in ima dobre emulgatorske lastnosti. Ker je tudi biokompatibilen in popolnoma razgradljiv, je njegova uporaba razširjena tako na področju prehrambene industrije in biotehnologije kot tudi v kozmetiki in farmaciji. Primeren je za dermalno uporabo, saj na koži ne povzroča iritacij, poleg tega pa deluje emolientno in tako poveča hidratiranost kože. Njegovo netoksičnost so dokazali v peroralnih in subkroničnih dermalnih študijah na živalih ter v raziskavah mutagenosti in reproduktivne toksičnosti (22, 23).

4.6.2 Kemijska sestava lecitina

Glavna sestavina lecitina je fosfatidilholin, zato je v praksi izraz lecitin sinonim za fosfatidilholin. Fosfatidilholin je amfifilna molekula, sestavljena iz "zwitterionske" glave in dveh nepolarnih verig pripadajočih maščobnih kislin (22, 23).

Kemijsko je ester glicerola, z dvema hidroksilnima skupinama, ki sta na mestu 1 in 2 zaestreni z višjimi maščobnimi kislinami. Tretja hidroksilna skupina je zaestrena s fosforno kislino, na katero je pripet holinski ostanek (slika 9) (22).



Slika 9: Kemijska formula lecitina; R_1 in R_2 predstavljajo nenasičene ali nasičene maščobne kisline (17)

4.6.3 Fizikalne lastnosti lecitina in sposobnost samo-asociiranja

Lecitin v vodnih medijih tvori različne samo-asociacijske strukture, ki pod ustreznimi pogoji lahko celo prehajajo ena v drugo. Lahko tvori enomolekularne sloje, bimolekularne plasti, liposome in vezikle, emulzije in mikroemulzije ter organogeje. Značilno fazno obnašanje zaradi specifičnih lastnosti, kot so zelo izražen lipofilni značaj (dve hidrofobni verigi), istočasno izražen polarni značaj ("zwitterionska" glava, ki je močno hidratirana), ravnotežje med hidrofilnimi in lipofilnimi področji (rahlo pomaknjeno proti lipofilnemu značaju) ter močna težnja po tvorbi lamelarnih TK, je predmet številnih raziskav, v katerih proučujejo fosfolipide in druge PAS (22, 23).

Obnašanje lecitina v vodnih raztopinah

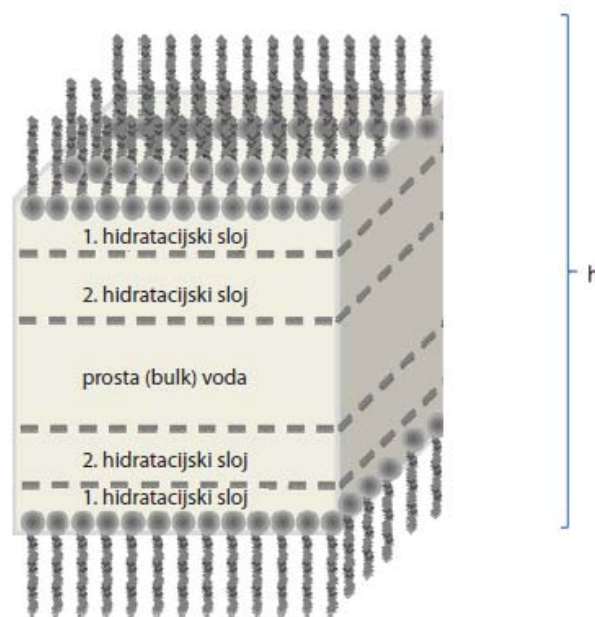
Lecitin je v vodnih raztopinah sicer netopen, vendar v njih nabreka. V odvisnosti od razmerja voda/lecitin lahko pride do tvorbe različnih struktur TK. Za to lastnost se uporablja poimenovanje *liotropni mezomorfizem*. Ugotovili so, da se v zmesi voda/lecitin najpogosteje tvorijo lamelarni tekoči kristali. Tvorijo se z urejanjem številnih vzporednih lamel v bimolekularne plasti, v katerih so polarne skupine molekul fosfolipida usmerjene navzven (proti vodni fazi), nepolarne repi pa proti notranjosti dvosloja (22).

Sposobnost samo-asociiranja lecitina termodinamsko razložimo s tvorbo reverzних micelov. Ti nastanejo tako, da se lipofilni deli PAS obrnejo proti oljni fazi, znotraj asociata pa se tvori hidrofilni del. Lecitin je tako sposoben tvoriti reverzne micelle v različnih lipofilnih fazah, običajnih micelov pa ne. V vodnih medijih se fosfolipidi lahko dispergirajo le tako, da tvorijo liposome. Vgrajevanje učinkovine pa je možno tako v običajne micelle kot tudi v reverzne, le s to izjemo, da solubilizacija učinkovine v običajne micelle izboljša biološko uporabnost slabo topne učinkovine, vgradnja v reverzne micelle pa omogoča nadzorovano sproščanje (18, 22).

Pomembno je opisati tudi urejanje vode v lecitinu. Vodne molekule okrog polarnih skupin lecitina tvorijo hidratacijski plašč, med posameznimi lamelami pa se voda nahaja v prosti obliki.

V obravnavanem sistemu voda - PAS se za molekule vode, ki se nahajajo v območjih med polarnimi glavami sosednjih lipidnih molekul (v notranjem dvosloju), smatra, da se

obnašajo kot "nezmrljiva" voda. Razlog za tako obnašanje je, da so zaradi tvorbe vodikovih vezi s karbonilnimi skupinami estrov lipida, vodne molekule tudi v tekočem stanju omejene znotraj ozkega notranjega dvosloja. Poleg tega se kot "nezmrljiva" voda obnašajo tudi tiste vodne molekule, ki so tako tesno vezane na polarne glave lipidov v dvosloju, da ne morejo tvoriti vodikovih vezi s sosednjimi molekulami vode. Če imajo te vodne molekule možnost tvorbe voda - voda vodikovih vezi, so lahko v obliki "zmrljive" ali pa "nezmrljive" vode, odvisno od moči nastalih vodikovih vezi. V primeru, da so vodikove vezi šibke, je energija, potrebna za njihov razpad, tako majhna, da jo DSC aparaturna ne zazna. Tako vodo obravnavamo kot "nezmrljivo" vodo (25). *Benedini L. s sodelavci* so v bikomponentnem sistemu PAS - voda slikovno predstavili hidratacijske sloje vode, ki se tvorijo med dvema monoslojema surfaktanta (npr. AP), ki sta s polarnima deloma obrnjena drug proti drugemu (slika 10) (24).



Slika 10: Hidratacijski sloji vode v dvosloju surfaktanta; h predstavlja debelino celotnega dvosloja (24)

Kot "zmrljiva" voda pa se lahko obnaša tista voda, ki se nahaja med lamelami in jo zato imenujemo "zmrljiva interlamelarna" voda ter prosta voda, imenovana tudi "bulk" voda. Zmrljiva interlamelarna voda se nahaja med lamelami, vendar ohranja stopnjo prostosti, ki je potrebna, da so molekule vsaj minimalno mobilne, tako da lahko tvorijo vodikove vezi, kakršne se tvorijo pri ledu. Drugi tip zmrljive vode se nahaja na zunanji strani dvosloja in jo obravnavamo kot "bulk" vodo. Struktura ledu zmrljive interlamelarne vode se močno razlikuje od strukture ledu "bulk" vode. Slednja je namreč zelo podobna strukturi

ledu čiste vode. Tako strukturne razlike v ledu odražajo tudi različno talilno obnašanje; led, ki ga tvori zmrzljiva interlamelarna voda, se prične taliti pri temperaturah okrog -45 °C do -35 °C ter se tali do približno 0 °C . Širok temperaturni interval taljenja pod 0 °C kaže, da se način tvorbe vodikovih vezi, ki se tvorijo v ledu zmrzljive interlamelarne vode, neprestano spreminja v takšni meri, da se približuje heksagonalni strukturi ledu (slednjo tvorijo molekule vode), ki so bolj oddaljene od površine dvoplasti. Led, ki ga tvori "bulk" voda, se tako kot led čiste vode (heksagonalna struktura ledu) tali v ozkem temperaturnem intervalu pri približno 0 °C (25).

5. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je proučevanje vpliva različnega deleža vodne faze ter vgrajenega askorbilpalmitata na strukturo tekočih kristalov, ki predstavljajo novejšje sisteme za dermalno dostavo askorbilpalmitata kot antioksidativne učinkovine za zaščito kože.

V ta namen bomo pripravili osem vzorcev tekočih kristalov, ki bodo vsebovali emulgatorja lecitin in Tween 80[®] v razmerju 1:1, izopropilmiristat kot oljno fazo in bidestilirano vodo kot hidrofilno fazo. V primeru proučevanja sistemov z vgrajenim askorbilpalmitatom bomo v izbrane vzorce vgradili 1 % (m/m) omenjenega antioksidanta.

S komplementarnima tehnikama, in sicer diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in ozkokotnim rentgenskim sipanjem (SAXS) bomo ovrednotili strukturo tekočih kristalov v odvisnosti od deleža vodne faze ter vgradnje askorbilpalmitata.

V okviru DSC analize vzorcev bomo slednje izpostavili nadzorovanemu temperaturnemu programu ohlajanja in segrevanja pri treh različnih hitrostih procesa, in sicer 2 K/min, 5 K/min in 10 K/min. Temperaturni program bo obsegal ohlajanje posameznih vzorcev od 25 °C do temperature -60 °C s sledečim 15 minutnim izotermnim korakom (-60 °C), nato pa segrevanje do 60 °C. Na tako pridobljenih DSC krivuljah bomo proučevali pojavljanje termičnih dogodkov. Osredotočili se bomo predvsem na položaj in površino talilnih in kristalizacijskih vrhov vode, ki po literaturnih podatkih dajejo določen vpogled v notranjo strukturo proučevanih sistemov.

Dodatne informacije o notranji strukturi proučevanih vzorcev bomo pridobili z metodo SAXS. S slednjo želimo potrditi, da izdelani tekoči kristali izkazujejo lamelarno strukturo. Ovrednotili bomo tudi vpliv vgradnje askorbilpalmitata na notranjo strukturo tekočih kristalov ter proučili vpliv naraščajočega deleža vodne faze v vzorcih na razdaljo med posameznimi lamelami (dvoplastni) le-teh. Difraktograme bomo posneli pri treh različnih temperaturah, in sicer 25 °C (temperatura shranjevanja vzorcev), 32 °C (temperatura na površini kože) ter 37 °C (telesna temperatura). Na ta način bomo pridobili dodatne podatke o morebitnem vplivu temperature na notranjo strukturo tekočih kristalov brez in z vgrajenim askorbilpalmitatom.

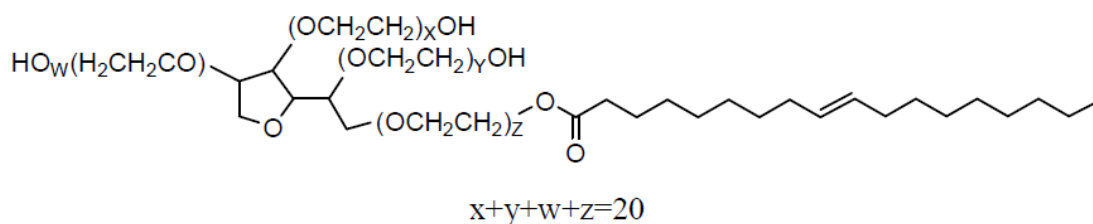
6. MATERIALI IN METODE

6.1. MATERIALI ZA IZDELAVO VZORCEV

Sestavine tekočih kristalov:

EMULGATOR: Tween[®]80 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Tween[®]80 (polysorbate 80) je viskozna in higroskopna tekočina rumene barve, ki je topna v vodi, etanolu in toluenu, netopna pa v maščobnem olju in tekočem parafinu. Kemijsko je polioksietilen (1) sorbitan monooleat (slika 11). Je hidrofilni, neionski emulgator, ki se zaradi netoksičnosti in dobrega prenašanja na koži pogosto uporablja kot solubilizator in močljivec v dermalnih farmacevtskih pripravkih in kozmetiki, pogost pa je tudi v parenteralnih farmacevtskih oblikah ter prehrabeni industriji (21, 26).



Slika 11: Kemijska struktura Tweena[®]80 (17)

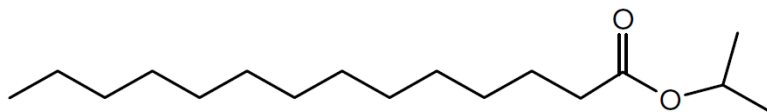
KOEMULGATOR: Lipoid S-100[®] (Lipoid GmbH, Nemčija)

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 in vodo. Je rumenkasta snov voskaste konsistence, značilnega vonja ter dobro topna v etru in maščobnem olju. V vodi tvori koloidno raztopino (17, 21).

LIPOFILNA FAZA: Izopropilmiristat – C₁₇H₃₄O₂ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Kemijsko je ester izopropilnega alkohola in miristinske kisline (slika 12). Meša se z alkoholom, maščobnimi olji, tekočim parafinom, acetonom, kloroformom, ne meša pa se z vodo in glicerolom. Organoleptično je bistra, oljnata tekočina z nizko viskoznostjo, brez barve in vonja. V farmaciji in kozmetiki se zelo pogosto uporablja kot komponenta poltrdnih oblik pa tudi kot topilo za številne dermalne pripravke, saj na koži deluje

emolientno, ne povzroča iritacij in je netoksičen. Dobro prodira v kožo, zato se uporablja tudi kot pospeševalec absorpcije v transdermalnih pripravkih (17, 21).



Slika 12: Kemijska formula izopropilmiristata (17)

HIDROFILNA FAZA: Bidestilirana voda

Bidestilirana voda je pridobljena s postopkom dvojne destilacije na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo.

UČINKOVINA: Askorbilpalmitat (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

Spojina se nahaja v obliki rahlega, belega do rumenkasto belega prahu, lahko tudi kristalov, z značilnim vonjem in mastnega otipa. Lahko topen je v etanolu in metanolu, skoraj netopen pa v vodi, kloroformu, etru, metilenkloridu in maščobnih oljih.

AP je v raztopinah izjemno občutljiv na oksidacijo in hidrolizo, zato ga shranjujemo v dobro zaprtih vsebnikih, v suhem prostoru, pri temperaturi od 8 °C do 15 °C, zaščitene pred svetlobo (3, 17).

6.2. PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV

V erlenmajerico smo na analitski tehtnici (AG245, Mettler Toledo, Švica) najprej natančno natehtali lecitin, Tween 80[®] in IPM. Zmes smo na magnetnem mešalu mešali približno 24 ur do nastanka bistre rumene viskozne tekočine. Nato smo dodali bidestilirano vodo in ponovno (2-3 dni) mešali do nastanka TK (zelo viskozna transparentna snov blede rumene do belo mlečnate barve). V serijo vzorcev z AP smo le-tega dodali v homogeno zmes emulgatorjev in lipofilne faze, ki smo jo po dodatku AP mešali še dodatnih 24 ur. Nato smo dodali bidestilirano vodo in mešali do nastanka TK. Vzorce smo za lažje homogeniziranje segrevali na električnem grelcu (prilagojena vodna kopel – večja steklena posoda) do približno 60 °C, pri vzorcih z AP pa zaradi temperaturne nestabilnosti slednjega nismo presegli 40 °C. Pripravili smo osem vzorcev TK brez AP ter osem vzorcev TK z 1% (m/m) AP. Masno razmerje Tweena 80[®] in lecitina je v obeh serijah vzorcev (brez in z AP) znašalo 1:1. Sestava izdelanih TK brez AP je prikazana v preglednici I.

Preglednica I: Sestava vzorcev TK brez AP

Vzorec	Lecitin (% (m/m))	Tween80® (% (m/m))	IPM (% (m/m))	bidestilirana voda (% (m/m))
1	27,955	27,955	24,36	19,97
2	26,2	26,2	22,83	25
3	24,46	24,46	21,31	29,98
4	22,715	22,715	19,97	34,98
5	20,96	20,96	18,26	40
6	19,21	19,21	16,74	45
7	17,465	17,465	15,22	50
8	15,715	15,715	13,7	55,01

6.3. METODE ZA VREDNOTENJE TK

6.3.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Metoda se pogosto uporablja v raziskavah načina povezave vodnih molekul z organskimi in anorganskimi molekulami. Njena posebnost je jasna sposobnost razlikovanja med t.i. "zmrzljivo" vodo, pri kateri je opazno taljenje pri segrevanju (med ohlajanjem) nastalega ledu, in "nezmrzljivo medlamelarno" vodo, ki ne zmrzne niti pri temperaturah, ki so dovolj nizke za tvorbo ledu (25).

Izvedba DSC meritev

DSC analizo (DSC aparatura Mettler Toledo, Švica) smo izvedli tako, da smo v aluminijaste lončke za DSC natehtali približno 12 mg vzorca – TK brez in z AP. Kot referenco smo uporabili prazen aluminijast lonček. Vzorce in referenco smo analizirali s pomočjo naslednjih temperaturnih programov: ohlajanje iz 25 °C na -60 °C, 15 minutni izotermični del ter segrevanje iz -60 °C na 60 °C, pri treh različnih hitrostih procesa, in sicer 2 K/min, 5 K/min in 10 K/min.

Na posnetih DSC krivuljah smo kvantitativno ovrednotili temperature tališča oz. kristalizacije (T_{onset}).

6.3.2 Ozkokotno rentgensko sipanje (SAXS)

Ozkokotno rentgensko sipanje je metoda, pri kateri beležimo kotno odvisnost intenzitete sipane svetlobe, ki je posledica sipanja zelo intenzivnega, točno definirane primarnega rentgenskega žarka na koloidnih delcih raziskovalnega vzorca. Zelo uporabna je za strukturne raziskave koloidnih sistemov, kjer dobimo informacije o velikosti in obliki sipalnih delcev (27).

Za merjenje sipalne intenzitete delcev v naših vzorcih smo uporabili Kratkyjevo kompaktno kamero (Anton Paar, Gradec, Avstrija) z blokvnim kolimacijskim sistemom, ki je bila pritrjena na konvencionalni generator rentgenskih žarkov (Bruker AXS, Karlsruhe, Nemčija). Generator je bil opremljen z rentgensko cevjo z bakrovo anodo (z nikljevimi filtrom), ki izseva rentgensko svetlobo CuK_α črte z valovno dolžino 0,154 nm, deloval pa je pri 35 kV in 35 mA.

V standardne kapilare iz kvarčnega stekla smo prenesli vzorce, jih postavili v termostatiran nosilec za kapilaro in umestili v središče primarnega rentgenskega žarka. Z linearnim pozicijsko občutljivim detektorjem (PSD 50m, M. Braun, Garsching, Nemčija) smo simultano po celotnem območju detektirali sipalno intenziteto delcev v vzorcih. Meritve smo izvedli pri treh temperaturah, in sicer 25 °C, 32 °C in 37 °C. Za ustrezno statistično vrednotenje rezultatov smo za vsak vzorec posneli 5 SAXS krivulj, čas posamezne meritve pa je znašal 15000 sekund.

7. REZULTATI IN RAZPRAVA

Notranjo strukturo TK, izdelanih iz lecitina, Tweena 80[®], IPM in vode smo proučevali z uporabo komplementarnih tehnik, kot sta DSC in SAXS.

7.1. DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMetriJA

Z DSC analizo smo proučevali termično obnašanje tekočih kristalov z različnim deležem vodne faze. Osredotočili smo se predvsem na obnašanje slednje, in sicer smo spremljali kristalizacijo vode med procesom nadzorovanega ohlajanja vzorcev oz. taljenje vode med procesom segrevanja. Zanimalo nas je, kako so vodne molekule v večlamelarnih disperzijah TK urejene, oziroma, v kakšnih oblikah se voda pojavlja glede na različen delež le-te v vzorcih.

7.1.1 DSC analiza posameznih komponent TK

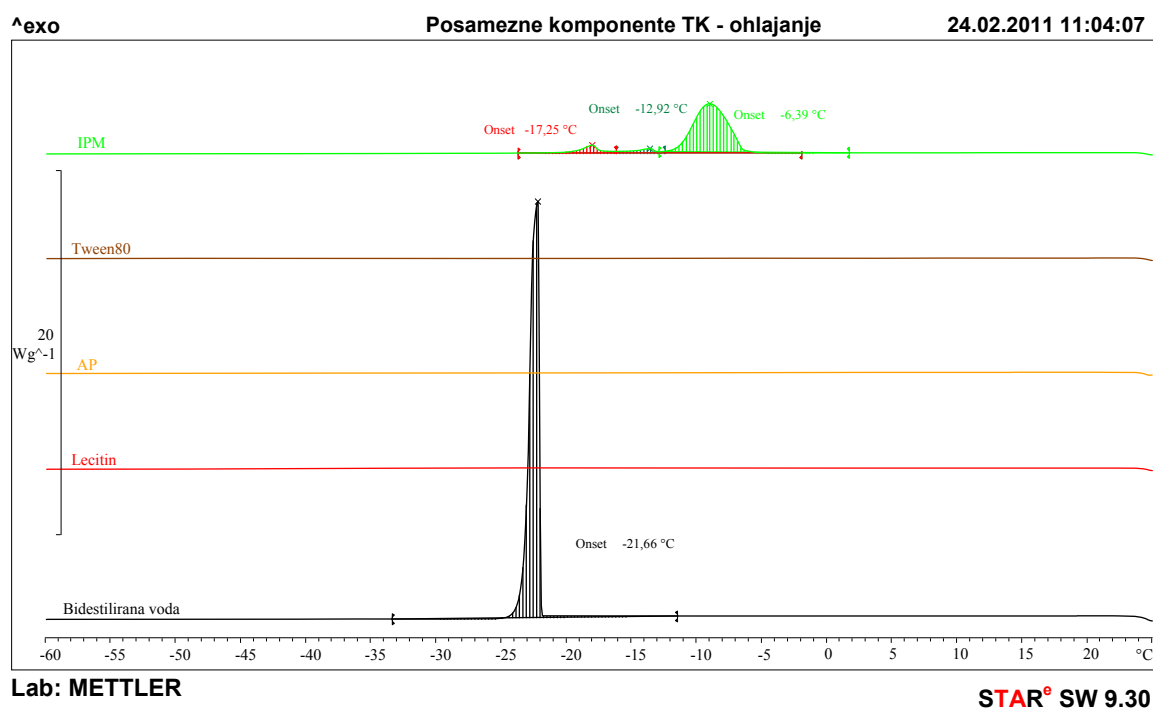
DSC termogrami za posamezne komponente TK so prikazani na sliki 13 (krivulja ohlajanja: od 25 °C do -60 °C) in sliki 14 (krivulja segrevanja: od -60 °C do 60 °C). Hitrost procesa je znašala 5 K/min.

Na krivulji ohlajanja prečiščene vode lahko opazimo oster eksotermni vrh pri -21,66 °C, ki odraža zmrzovanje vode v podhlajenem stanju. Na tem mestu je potrebno opisati pojav podhlajene vode. V ravnotežnih pogojih je zmrzišče vode 0 °C in led, ki nastane, je pod temperaturo zmrzišča v stabilnem, tj. heksagonalnem stanju. Nasprotno pa je podhlajena voda pri temperaturah pod 0 °C še vedno v tekočem stanju. Stopnja podhlajenosti vode je odvisna od različnih faktorjev: volumna vode, njene čistote in od hitrosti ohlajanja. Ko voda v tem podhlajenem, nestabilnem stanju, pri dovolj nizki temperaturi zamrzne, nastalega ledu neposredno s segrevanjem ni moč ponovno povrniti v stanje podhlajene vode; nastali led prvotno podhlajene vode se mora najprej staliti pri temperaturi 0 °C. Zmrzovanje podhlajenja vode je odvisno tudi od hitrosti ohlajanja. In sicer velja, da počasnejša kot je hitrost ohlajanja, manjša je količina vode, ki je sposobna zmrzniti (25).

Tako nam bo vrh, ki smo ga določili na DSC krivulji ohlajanja bidestilirane vode (slika 13), v nadaljevanju predstavljal referenco za zmrzovanje proste vode.

Pri ohlajanju lecitina, Tweena 80[®] in AP nismo na DSC krivuljah zaznali nobenega termičnega procesa.

Na krivulji ohlajanja spojine IPM je razviden trojni eksotermni vrh v temperaturnem intervalu od $-6,37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-17,25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki ustreza kristalizaciji IPM. Podobno so ugotovili tudi *Podlogar in sodelavci* pri proučevanju mikroemulzij s sestavo voda-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-IPM. Zelo šibek eksotermni vrh pri temperaturi približno $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ so pripisali strjevanju majhne količine nečistot, prisotnih v IPM, saj je deklarirana čistota uporabljenega IPM znašala najmanj 95 % (28). V skladu z literaturnimi podatki lahko torej smatramo, da prvi vrh, ki se pojavi pri ohlajanju IPM, pri temperaturi $-6,37\text{ }^{\circ}\text{C}$, označuje kristalizacijo čistega IPM. Manj intenzivna vrhova, ki se pojavita pri nižjih temperaturah in sta tudi značilna za to spojino, pa lahko označujeta v IPM prisotne nečistote ali pa odražata določene strukturne prehode ali spremembe urejenosti strukture IPM, do katerih lahko pride med kristalizacijo le-tega. Njihova pojavnost je namreč zelo ponovljiva.

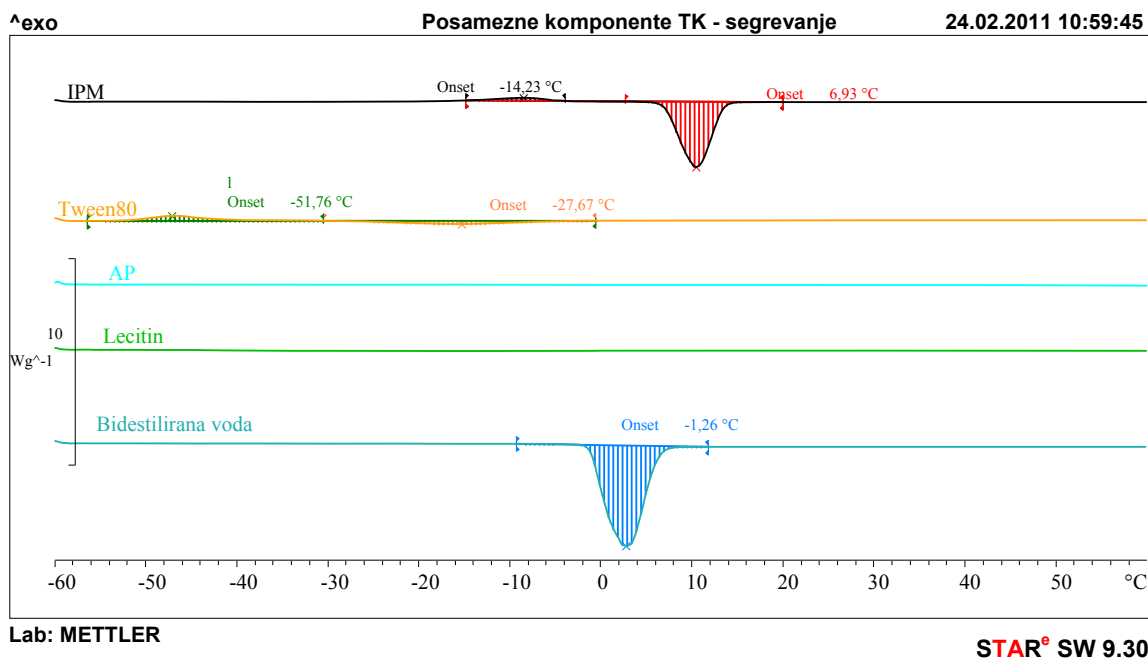


Slika 13: DSC krivulje ohlajanja posameznih komponent TK (od $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5 K/min)

Na krivulji segrevanja spojine IPM se pojavi šibek eksotermni vrh pri temperaturi $-14,23\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki mu sledi intenziven endotermni vrh pri temperaturi $6,93\text{ }^{\circ}\text{C}$. Slednji predstavlja taljenje IPM. V skladu s predvidevanji, da lahko pri ohlajanju pride do nastanka določenih strukturnih sprememb IPM, je tudi ugotovitev, da se tudi na krivulji segrevanja najprej pojavi eksotermni vrh, nato pa enojni (in ne trojni) talilni vrh.

V nasprotju s pričakovanji lahko na krivulji segrevanja spojine Tween 80[®] opazimo šibek eksotermni vrh pri približno -52 °C, ki mu sledi ekvivalenten endotermni vrh pri -27,67 °C. Omenjena vrhova verjetno odražata kristalizacijo Tweena 80[®], ki ji sledi taljenje pri nadaljnjem segrevanju. Pojav je nekoliko v nasprotju z rezultati ohlajanja, kjer nismo detektirali nobenega termičnega dogodka. Možna razlaga je, da je med ohlajanjem prišlo do podhladitve te visoko viskozne snovi, ki je nato vendarle kristalizirala (po 15 minutnem izotermnem koraku pri temperaturi -60 °C).

Krivulja segrevanja bidestilirane vode prikazuje značilen endotermni vrh pri temperaturi -1,26 °C, ki nam bo, podobno kot pri postopku ohlajanja, služil kot referenca za taljenje ledu heksagonalne strukture, ki ga tvori prosta (bulk) voda. Krivulji segrevanja lecitina in AP v proučevanem temperaturnem intervalu ne kažeta nobenih termičnih dogodkov.



Slika 14: DSC krivulje segrevanja posameznih komponent TK (od -60 °C do 60 °C; 5 K/min)

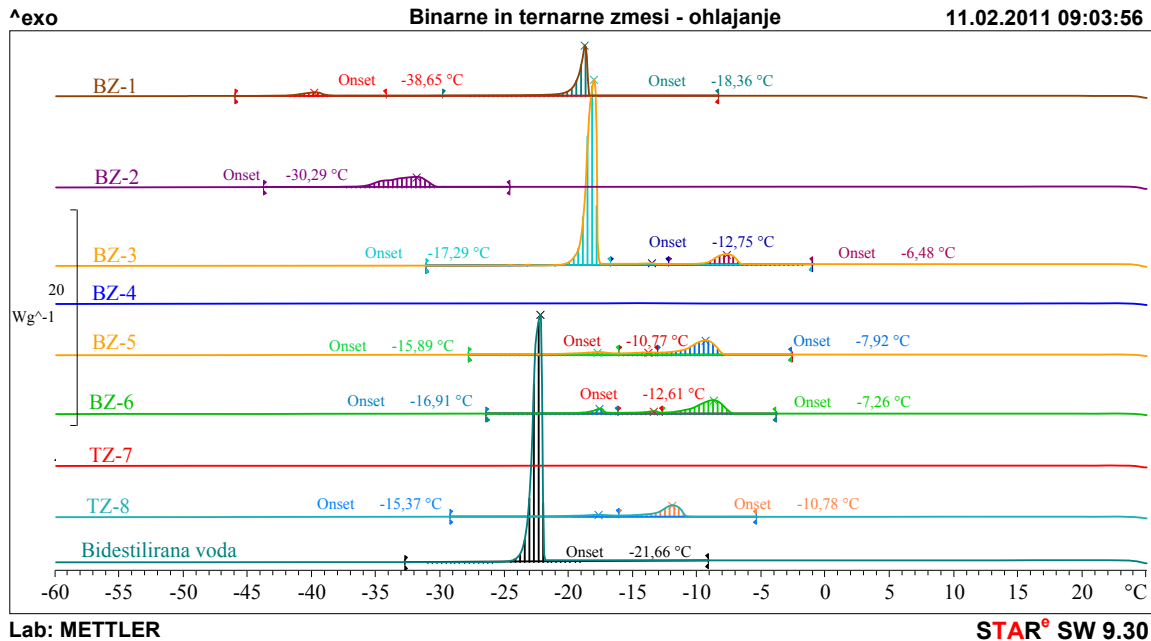
7.1.2 DSC analiza binarnih in ternarnih komponent TK

Proučevali smo tudi prisotnost interakcij med posameznimi komponentami, ki smo jih uporabili za pripravo TK. V ta namen smo pripravili binarne in ternarne zmesi (preglednica II), ki smo jih izpostavili procesu ohlajanja (od 25 °C do -60 °C) (slika 15) in segrevanja (od -60 °C do 60 °C) (slika 16) s hitrostjo 5 K/min, torej enako hitrostjo kot v primeru proučevanja posameznih komponent.

Preglednica II: Sestava binarnih in ternarnih zmesi

Vzorec	Sestava	Razmerje sestavin
BZ-1	lecitin : bidest. voda	1 : 1
BZ-2	Tween 80 : bidest. voda	1 : 1
BZ-3	IPM : bidest. voda	1 : 1
BZ-4	lecitin : Tween 80	1 : 1
BZ-5	IPM : lecitin	1 : 1
BZ-6	IPM : Tween 80	1 : 1
TZ-7	Tween 80 : lecitin : bidest. voda	1 : 1 : 1
TZ-8	Tween 80 : lecitin : IPM	1 : 1 : 1

Iz DSC krivulje ohlajanja BZ-1 (lecitin : voda = 1 : 1) opazimo dva eksotermna dogodka. Prvi, pri temperaturi $-18,36\text{ }^{\circ}\text{C}$, najverjetneje pripada kristalizaciji "proste" podhlajene vode, ki ni vezana na polarne glave lecitina. Drugi eksotermni vrh pri $-38,65\text{ }^{\circ}\text{C}$ je v primerjavi s prvim manj izrazit in ga lahko pripišemo kristalizaciji podhlajene vode, ki je vezana na polarne glave molekul lecitina. Literatura namreč navaja, da v vodnih suspenzijah dipalmitolfosfatidilholina procesu kristalizacije najprej zapade "prosta" oblika podhlajene vode, to je tista, ki ni vezana na fosfolipid. Pri nadzorovanem ohlajanju takšne vode so na DSC krivulji razvidni eksotermni vrhovi, ki predstavljajo kristalizacijo vode v temperaturnem območju od -20 do $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preostala podhlajena voda je podvržena procesu difuzije skozi fosfolipidni dvosloj do območij, ki vsebujejo kristale ledu ali pa se tvori led med dvosloji fosfolipida. Kot taka, torej vezana voda, lahko zapade procesu zmrzovanja šele pri še nižjih temperaturah, kar se na DSC krivulji odraža kot eksotermni vrh v temperaturnem območju od -45 do $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (25).



Slika 15: DSC krivulje ohlajanja binarnih in ternarnih komponent TK (od 25 °C do -60 °C; 5 K/min)

Eksotermni vrh, ki se pojavlja na DSC krivulji BZ-2 (Tween 80[®] : voda = 1 : 1) pri temperaturi -30,29 °C prav tako najverjetneje ponazarja kristalizacijo vode, ki je delno vezana na polarne glave molekul Tweena 80[®] in zato zmrzne pri nižji temperaturi kot "prosta" voda v podhlajenem stanju. Tudi *Podlogar in sodelavci* so z DSC metodo proučevali stanje vode v sistemu mikroemulzij (voda-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-IPM; z vgrajenim ketoprofenom), ki je bilo na DSC krivulji ohlajanja opredeljeno z velikostjo in položajem kristalizacijskega vrha vode, ki predstavlja delež zmrzljive, torej proste vode. Ugotovili so, da vodne molekule, ki tvorijo močne interakcije oziroma se močno vežejo s PAS, zmrzujejo pri nižjih temperaturah, kot prosta voda oziroma šibkeje vezana voda. Po njihovem mnenju voda v mešanici večje količine PAS tako močno interagira z le-temi, kar zniža temperaturo kristalizacije vode do tako nizke temperature, da je ni bilo možno detektirati; tudi entalpija zamrzovanja je bila izjemno nizka, verjetno pod limbo detekcije. Predvidevanja so potrdili z referenčnimi merjenji dvojno destilirane vode, pri kateri se je pojavil podoben eksotermni vrh pri temperaturi približno -19 °C, ki odraža kristalizacijo podhlajene proste vode v odsotnosti kakršnih koli interakcij z drugimi molekulami (28, 29).

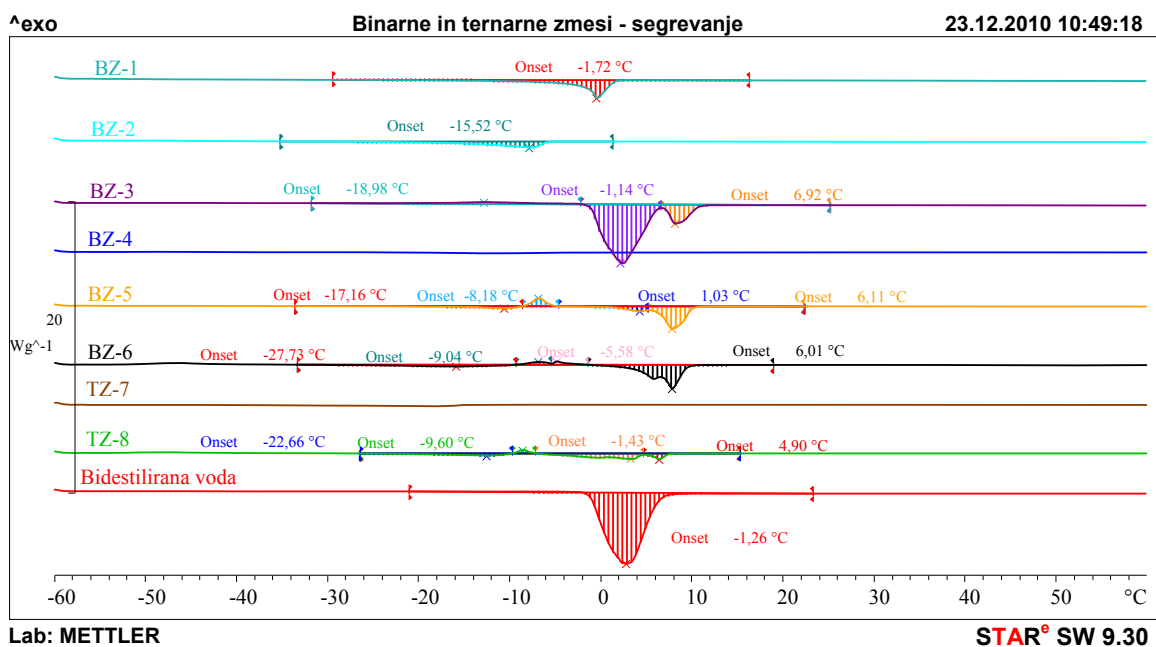
Značilna in v skladu z našimi pričakovanji je tudi DSC krivulja BZ-3 (IPM : voda = 1 : 1). Intenziven eksotermni vrh pri temperaturi -17,29 °C odraža kristalizacijo podhlajene proste

vode. Na krivulji sta razvidna še dva eksotermna vrhova IPM pri temperaturah $-6,48\text{ °C}$ in $-12,75\text{ °C}$, ki odražata kristalizacijo le-tega.

Po pričakovanjih na DSC krivuljah ohlajanja BZ-4 (lecitin : Tween 80[®] = 1 : 1) in ternarne zmesi BZ-7 (Tween 80[®] : lecitin : voda = 1 : 1 : 1) ni razvidnih nobenih termičnih dogodkov. Na osnovi tega lahko zaključimo, da je voda močno vezana na polarne glave lecitina in Tweena 80[®], zato ne kristalizira. Prav tako v proučevanem temperaturnem intervalu ne kristalizirata proučevana emulgatoja.

Na krivuljah ohlajanja BZ-5 (IPM : lecitin = 1 : 1), BZ-6 (IPM : Tween 80[®] = 1 : 1) ter ternarne zmesi BZ-8 (Tween 80[®] : lecitin : IPM = 1 : 1 : 1) so opazni značilni eksotermni vrhovi, ki nakazujejo kristalizacijo IPM. V primerjavi z DSC krivuljo ohlajanja čistega IPM (slika 13) so eksotermni vrhovi v zmesih pomaknjeni proti nižjim temperaturam. Pri vzorcu BZ-8 so vsi termični dogodki še močnejše zamaknjeni proti nižjim temperaturam, vrhovi pa so manj intenzivni. Pojav kaže na določene interakcije med IPM in lipofilnimi repi lecitina in Tweena 80[®]. Slednja imata v naših vzorcih vlogo emulgatorja in koemulgatorja, zato je interakcija povsem razumljiva.

DSC krivulja segrevanja binarnih in ternarnih komponent TK je prikazana na sliki 16. Analizo smo izvajali v temperaturnem območju od -60 °C do 60 °C s hitrostjo 5 K/min .



Slika 16: DSC krivulje segrevanja binarnih in ternarnih komponent TK (od -60 °C do 60 °C ; 5 K/min)

Iz prikazanih DSC krivulj (slika 16) je jasno razvidno taljenje "zmrzljive" vode; na krivulji segrevanja BZ-1 (lecitin : voda = 1 : 1) je talilni endotermni vrh pri $-1,72\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri BZ-2 (Tween 80[®] : voda = 1 : 1) pa se širok in razpotegnjen endotermni vrh pojavi pri približno $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Razlika v temperaturi taljenja vode v zmesi z lecitinom in Tweenom 80[®] potrjuje rezultate predhodne diplomske naloge (17), v kateri so ugotovili, da voda močnejše interagira s Tweenom 80[®] kot z lecitinom. Iz krivulje segrevanja BZ-3 (IPM : voda = 1 : 1) je razvidno, da se intenziven vrh taljenja vode pojavi pri $-1,14\text{ }^{\circ}\text{C}$, medtem ko na DSC krivulji segrevanja BZ-4 (lecitin : Tween 80[®] = 1 : 1) in ternarne zmesi komponent BZ-7 (Tween 80[®] : lecitin : voda = 1 : 1 : 1) ni izraženega nobenega termičnega dogodka. Ti rezultati so v skladu s krivuljami ohlajanja. Iz DSC krivulj segrevanja BZ-5 (IPM : lecitin = 1 : 1) in BZ-6 (IPM : Tween 80[®] = 1 : 1), so razvidni tako eksotermni kot tudi endotermni dogodki. Pri približno $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ se, podobno kot pri čistem IPM, pojavi eksotermni vrh, ki mu med približno $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ sledi dvojni endotermni vrh (taljenje IPM). Dvojni talilni vrh IPM (in ne enojni, kot pri čistem IPM) je verjetno posledica določenih interakcij lipofilnega IPM z lecitinom oz. Tweenom 80[®], ki oba izkazujeta emulgatorske lastnosti. Termični dogodki, ki so razvidni iz krivulje segrevanja BZ-8 (Tween 80[®] : lecitin : IPM = 1 : 1 : 1) nakazujejo večje interakcije omenjenih komponent, saj so vrhovi zelo neizraziti in razširjeni.

7.1.3 DSC analiza TK

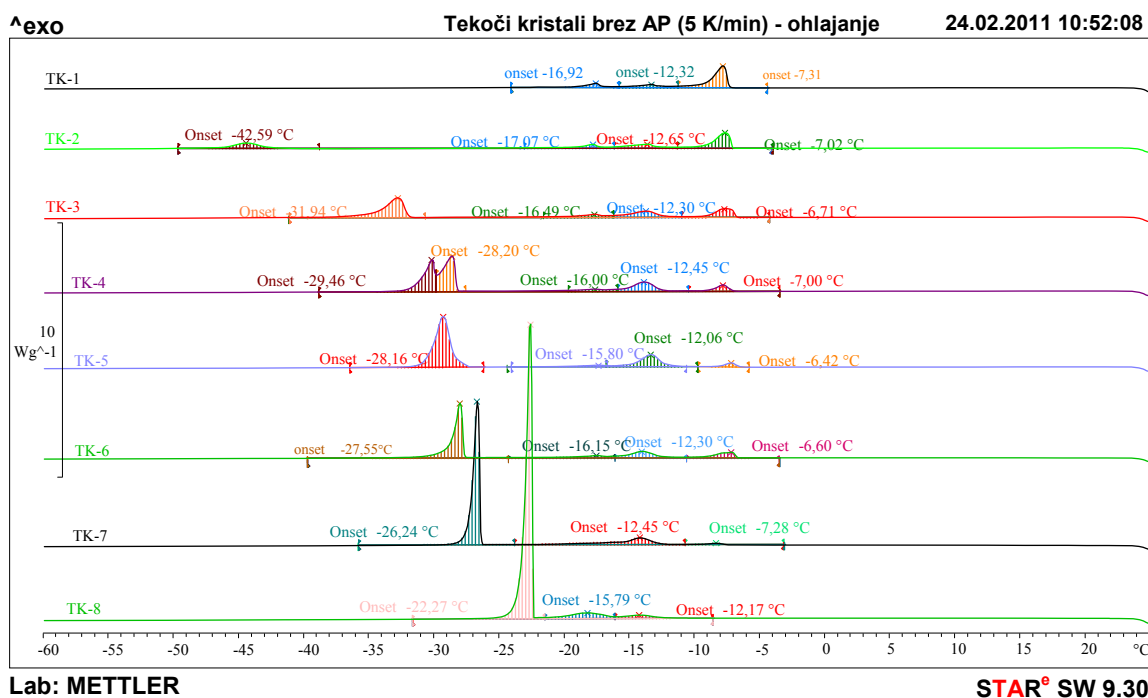
Po podatkih avtorja *Garti* raziskovalci v dvokomponentnem sistemu lipid - voda različno pojmujejo oblike vode v sistemu. Eno preprostejših delitev oblik vode so podali *Senatra in sodelavci*, ki so na podlagi temperature taljenja / zmrzovanja poleg "proste" vode, ki se tali /zmrzuje pri $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, ločili še "medfazno" vodo, s tališčem / zmrziščem okrog $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter "vezano" vodo, ki se tali / zmrzuje pri temperaturah, nižjih od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (25).

Razlikovanje med "medfazno" in "vezano" vodo temelji na empiričnih raziskavah, nanašajočih se na specifični sistem voda-PAS. S spreminjanjem deleža vode v teh sistemih, se s tem spreminjajo tudi temperature tališča le-teh. Tališča teh dveh oblik vode se razlikujeta in sta odvisna od same sestave sistema. Tako tudi navajajo, da se v kvarternih sistemih (voda, alkohol, olje in PAS) v primerjavi z binarnim sistemom (voda in PAS), tališče "medfazne" vode premakne proti višji temperaturi, torej se ta voda začne kasneje taliti. Potrebno je pojasniti tudi, da v primeru "vezane" vode vezi, ki se vzpostavijo med molekulami vode in PAS, niso kovalentne, pač pa gre za dipol-dipol interakcije v

primeru neionskih sistemov oziroma dipol-ion interakcije, če uporabimo ionske surfaktante (25).

Vzorci TK smo izpostavili trem hitrostim nadzorovanega ohlajanja in segrevanja. Najprej smo uporabili hitrost 5 K/min, sledila je hitrost 2 K/min, nazadnje pa še 10 K/min. Čimbolj podobno maso vzorcev, približno 12 mg, smo vsakič posebej natehtali v DSC lončke. Ugotavljali smo *vpliv deleža vodne faze v TK in vgradnje askorbilpalmitata na kristalizacijo oz. taljenje vode in ostalih komponent TK.*

Vpliv deleža vodne faze v TK na kristalizacijo oz. taljenje vode smo najprej proučevali z večkratno DSC analizo vzorcev z nadzorovanim ohlajanjem oz. segrevanjem s hitrostjo 5 K/min. Rezultati meritev so prikazani na sliki 17 in sliki 18.



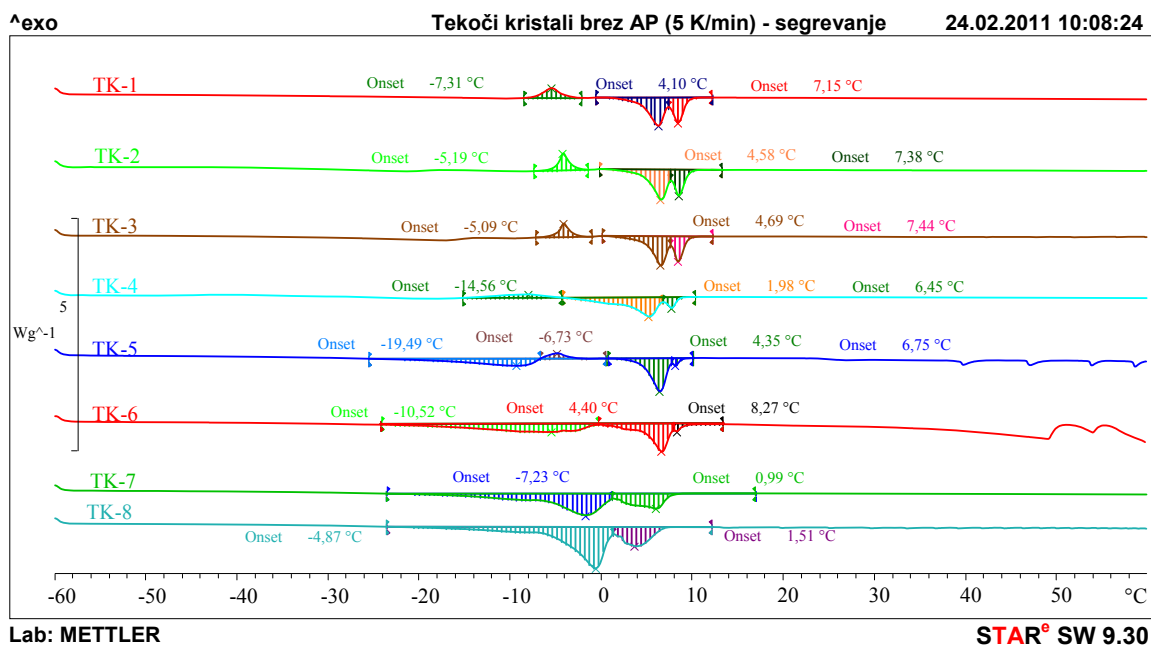
Slika 17: DSC krivulje ohlajanja TK s hitrostjo 5 K/min

Iz DSC krivulj ohlajanja TK (slika 17) je razvidno, da delež zmrzljive vode v TK narašča od TK-1, ki vsebuje najmanj vode, proti TK-8, z največjim deležem vodne faze. Na DSC krivulji TK-1, ki vsebuje približno 20 % vodne faze, eksotermni vrh kristalizacije vode ni prisoten. Voda je v tem vzorcu očitno tako močno vezana na polarne glave PAS, da med ohlajanjem ne kristalizira. Na krivulji ohlajanja TK-2 je kristalizacijski vrh vode razviden

pri približno $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz rezultatov je razvidno, da s povečanjem vodne faze v TK narašča delež vode, ki se nahaja v zmrzljivem sloju, temperatura njenega tališča pa se pomika proti višjim temperaturam (bližje $0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pri vzorcu TK-3 se eksotermni vrh kristalizacije vode tako pojavi med $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri vzorcu TK-4 med $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$, na DSC krivulji vzorca TK-5 pa med $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$ (odvisno od ponovitve meritve). Pri vzorcu TK-6 je dotični vrh razviden pri $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri vzorcu TK-7 pri približno $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri vzorcu TK-8, ki vsebuje najvišji delež vode (55 %), pa pri približno $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na DSC krivuljah ohlajanja vseh vzorcev so jasno vidni tudi trojni eksotermni vrhovi kristalizacije IPM, z najnižjim vrhom pri približno $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz slike 17 je tudi razvidno, da se pri TK-3 do TK-8 spremeni oblika trojnega kristalizacijskega vrha IPM, ki se pri vzorcu TK-8 tudi pomakne proti nižjim temperaturam.

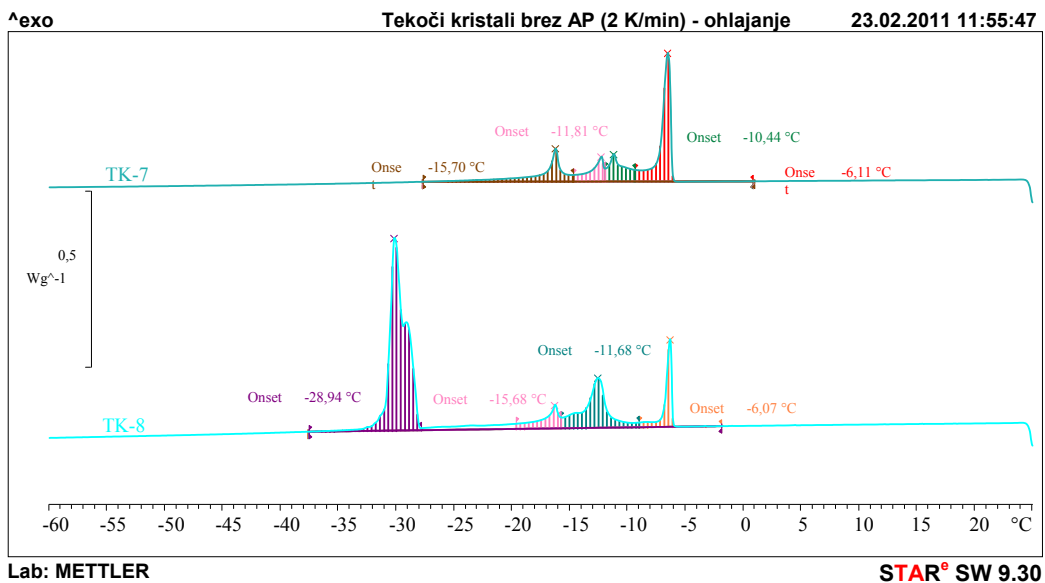
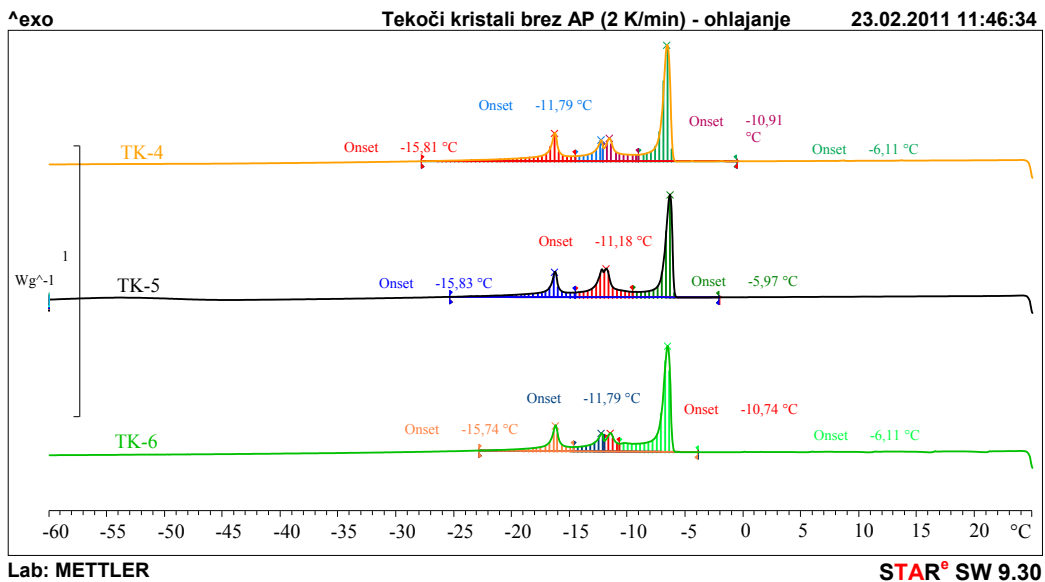
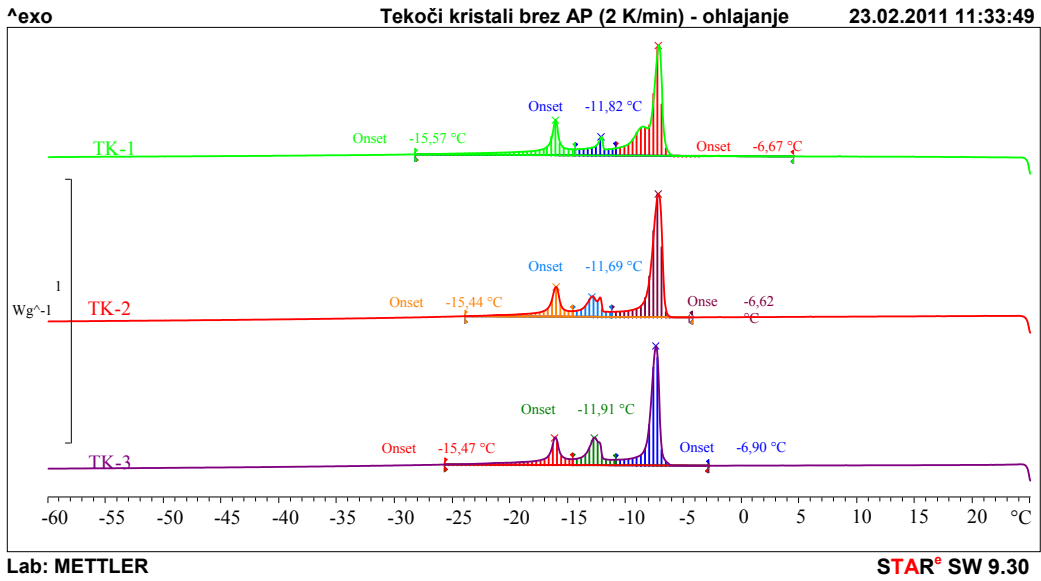
V skladu z rezultati ohlajanja vzorcev tudi krivulje segrevanja le-teh kažejo na prisotnost različnih tipov vode. Z naraščanjem deleža vode v vzorcih (slika 18) se tudi temperatura taljenja pomika proti višjim temperaturam (bližje $0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Endotermni vrhovi so zelo široki in neintenzivni, kar je v skladu z literaturnimi podatki povezano s taljenjem različnih tipov vode. Na DSC krivuljah segrevanja vzorca TK-1 omenjeni vrh ni razviden, medtem ko je pri TK-2 in TK-3 precej neizrazit. To je v skladu s krivuljami ohlajanja vzorcev, kjer smo dobili podobne rezultate. Sicer so si omenjene krivulje zelo podobne. Pri približno $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ sta ponovno razvidna dva endotermna vrhova; prvi bi lahko pripadal taljenju interlamelarne oz. proste vode, drugi pa odraža taljenje IPM. Z nadaljnjim povečanjem vodne faze v TK (TK-4 do TK-8) se endotermni vrh, ki ponazarja taljenje "zmrzljive" vode vse bolj pomika proti višji temperaturi in postaja bolj intenziven. Pri vzorcu TK-8 tako poteče taljenje vode pri $-4,87\text{ }^{\circ}\text{C}$, taljenje IPM pa pri približno $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 18: DSC krivulje segrevanja TK s hitrostjo 5 K/min

Ker se posamezni vrhovi prekrivajo, zlasti taljenje proste vode in IPM, smo celoten sklop meritev ponovili z nižjo hitrostjo ohlajanja/segrevanja (2 K/min), saj se tako poveča selektivnost metode. DSC krivulje ohlajanja vzorcev z 2 K/min so prikazane na sliki 19 (a,b in c), krivulje segrevanja pa na sliki 20 (a, b in c).

Pri ohlajanju vzorcev TK s hitrostjo 2 K/min se eksotermni vrh, ki pripada kristalizaciji vode, pojavi le pri vzorcu TK-8, torej pri vzorcu z najvišjim deležem vode (slika 19c). Kristalizacija se začne pri približno $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$, torej pri nižji temperaturi, kot v primeru ohlajanja TK-8 s hitrostjo 5K/min ($-19\text{ }^{\circ}\text{C}$). To je v skladu s pričakovanji, saj je znano, da z nižjo hitrostjo ohlajanja narašča podhlajenost vode. To se odraža tudi na zmrzovanju podhlajene vode, ki posledično zmrzuje pri nižjih temperaturah in v manjšem obsegu (25). Oblika kristalizacijskega vrha vode v TK-8 (dvojni vrh) nadalje nakazuje, da ne gre za enostavno kristalizacijo enega tipa vode, ampak za prekrivanje kristalizacijskih vrhov vsaj dveh tipov vode. Slednje pri višji hitrosti ohlajanja vzorcev zaradi slabše selektivnosti metode ni bilo razvidno.



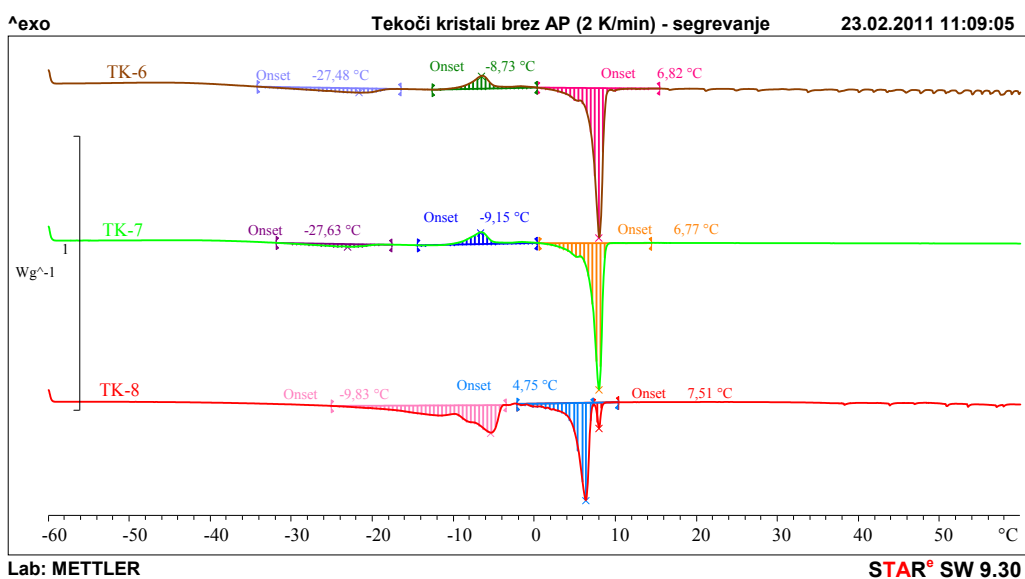
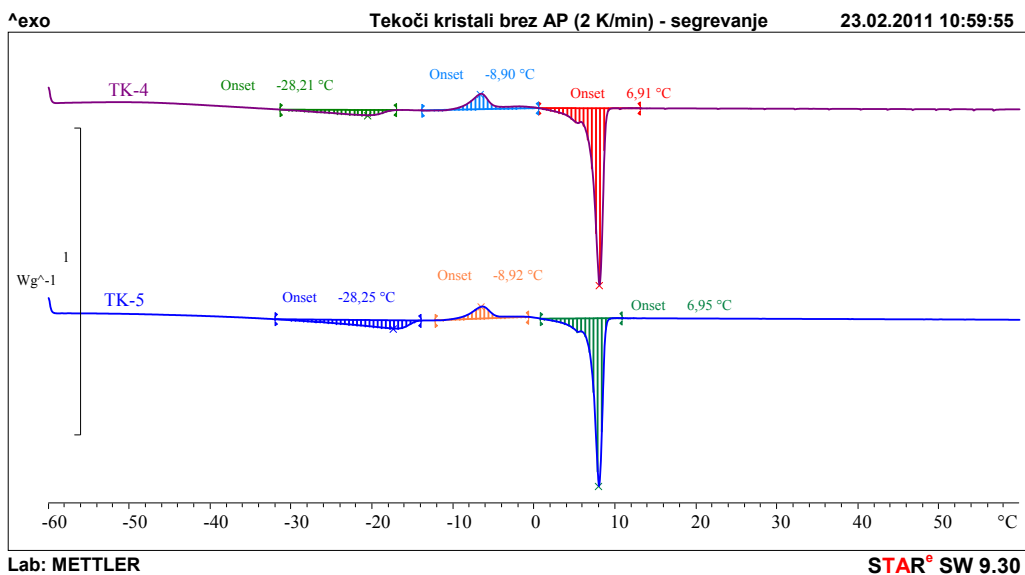
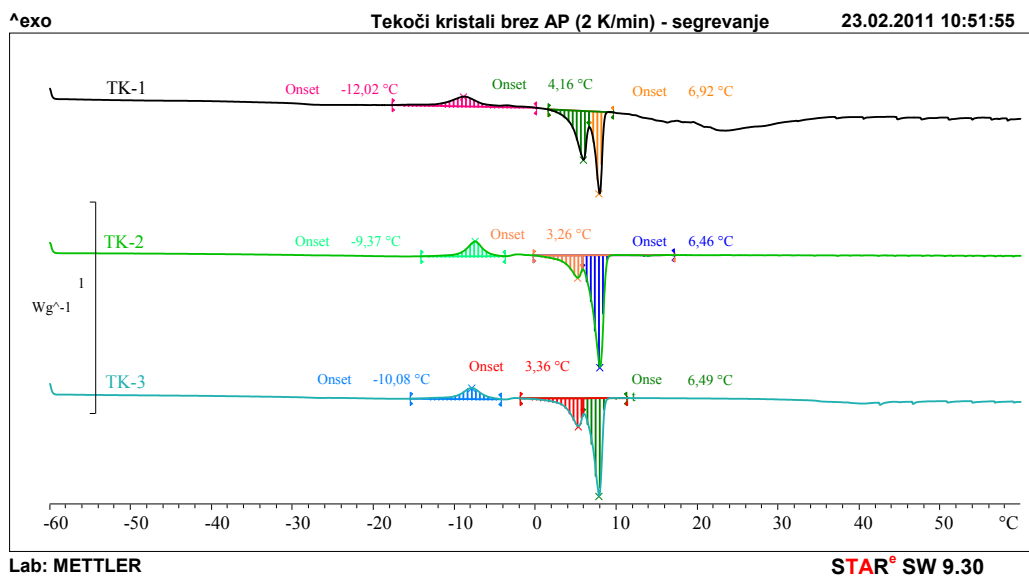
Slika 19 (a, b in c): DSC krivulje ohlajanja TK s hitrostjo 2 K/min

Kristalizacijski vrhovi IPM so v vseh zelo podobni. Prvi eksotermni vrh, ki označuje kristalizacijo čistega IPM, se pojavi pri približno $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ in je najintenzivnejši. Sledita mu drugi in tretji eksotermni vrh. Predvsem oblika drugega vrha, ki se pojavlja pri približno $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$, se nekoliko spreminja, vendar ni opazne direktne povezave s samo sestavo. Tretji eksotermni vrh se pojavi pri približno $-15,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, njegov položaj pa je podoben kot v primeru ohlajanja vzorcev s hitrostjo 5K/min .

DSC krivulje segrevanja vzorcev s hitrostjo 2 K/min so prikazane na sliki 20 (a-c). Na krivuljah TK-1, TK-2 in TK-3 talilni vrhovi vode niso razvidni, kar je deloma povezano tudi z nižjo občutljivostjo metode kot posledico nižje hitrosti segrevanja (pri segrevanju s hitrostjo 5 K/min so pri TK-2 in TK-3 namreč razvidni endotermni vrhovi). Pri ostalih vzorcih so endotermni talilni vrhovi vode v temperaturnem intervalu od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ zelo razširjeni in dokaj neizraziti, z izjemo vzorca TK-8. Na vseh krivuljah (z izjemo TK8) so pri približno $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ razvidni tudi intenzivni eksotermni vrhovi, približno $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eksotermni vrh je razviden tudi na krivuljah ohlajanja vzorcev s hitrostjo 5 K/min pri $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sklepamo, da gre za isti vrh, kot smo ga opazili na DSC krivulji segrevanja čistega IPM. Na krivulji TK-8 ta eksotermni vrh ni razviden, saj ga prekriva endotermni vrh, ki pripada taljenju "vezane" vode.

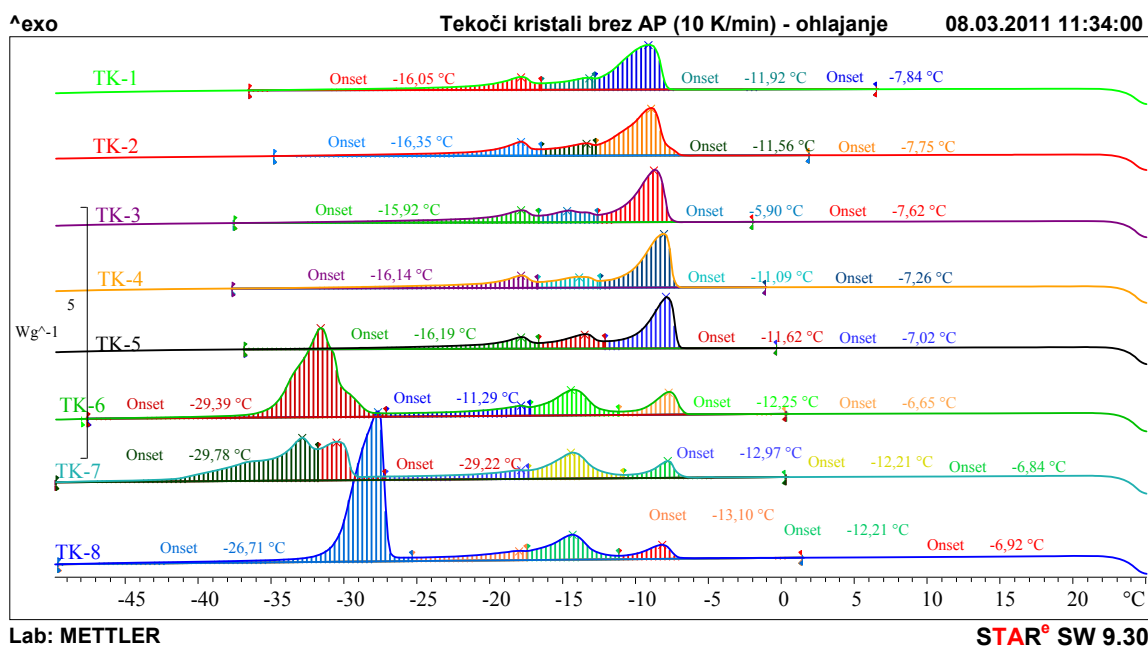
V temperaturnem območju med $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ in približno $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nadalje pojavita 1-2 intenzivna endotermna vrhova. Pri vzorcih TK-1 do TK-3 sta omenjena vrhova še jasno ločena, pri ostalih vzorcih (z višjo vsebnostjo vode) pa se omenjena vrhova prekrivata in združita v en sam vrh. V tem temperaturnem intervalu poteka taljenje IPM in "proste" vode. Vrha se ponovno ločita pri TK-8, kjer je jasno izražen vrh taljenja proste vode pri približno $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sledi pa mu vrh taljenja IPM pri $7,51\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po lastnostih odstopa tudi vzorec TK-1, pri katerem je razviden še dodaten širok dvojni endotermni vrh v temperaturnem območju med približno 10 in $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 20 (a, b in c): DSC krivulje segrevanja TK s hitrostjo 2 K/min

Ker je poleg selektivnosti tudi občutljivost metode povezana s hitrostjo segrevanja, smo meritve vseh vzorcev izvedli še pri hitrosti ohlajanja oz. segrevanja 10 K/min. Pri nižjih hitrostih segrevanja so vrhovi, ki odražajo proces taljenja različnih tipov vezane vode, zelo razširjeni in neizraziti. Večjo občutljivost metode z večjo hitrostjo ohlajanja oz. segrevanja smo zato želeli izkoristiti predvsem za boljši vpogled v ta proces. DSC krivulje ohlajanja vzorcev s hitrostjo 10 K/min so prikazane na sliki 21, DSC krivulje segrevanja pa na sliki 22.

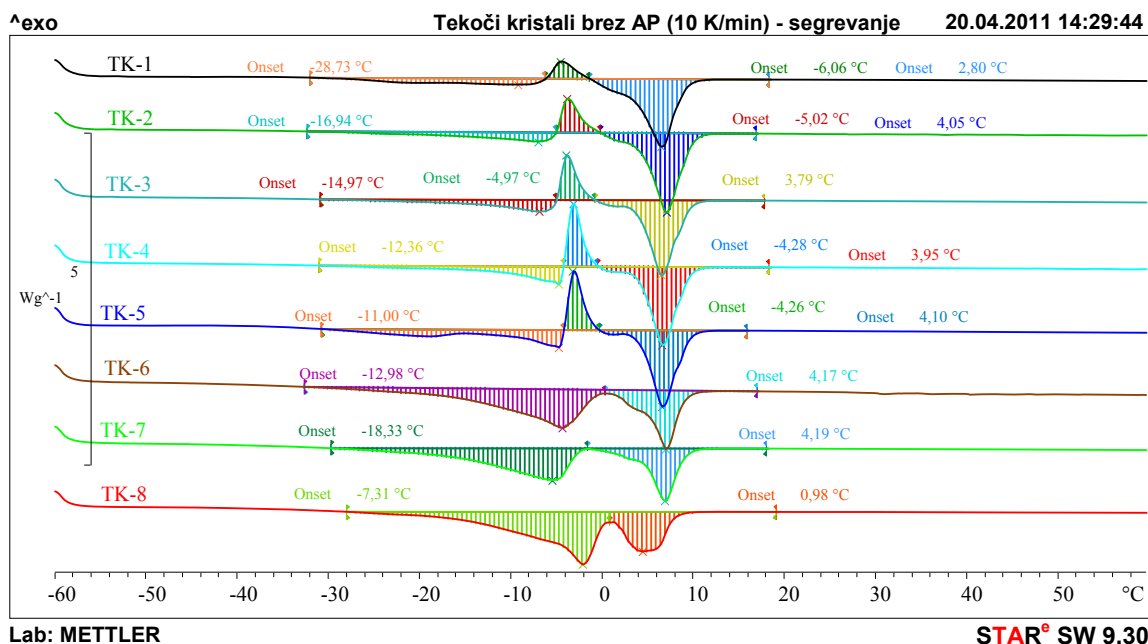


Slika 21: Krivulja ohlajanja TK s hitrostjo 10 K/min

Iz slike 21 je razvidno, da pri ohlajanju vzorcev s hitrostjo 10 K/min na DSC krivuljah TK-1 do vključno TK-5 ni izražen eksotermni dogodek, ki bi odražal kristalizacijo vode. Predvidevamo, da slednja ne zamrzne zaradi podhladitve sistemov. Kristalizacija vode je vidna šele na DSC krivulji vzorca TK-6, in sicer kot intenziven in širok eksotermni vrh pri temperaturi približno -29 °C. Na krivulji vzorca TK-7 kristalizacijo vode odraža dvojni eksotermni vrh, v temperaturnem intervalu med -30 °C in -45 °C, kar kaže na zmrzovanje različnih tipov vode. Pri vzorcu TK-8 je ta vrh razviden pri -27 °C. Na krivuljah vseh vzorcev so razvidni tudi eksotermni vrhovi kristalizacije IPM v temperaturnem intervalu med 6 in -30 °C. Ker je tretji vrh zelo razširjen in sega tja do -30 °C je možno, da deloma prekrije kristalizacijo vode v vzorcih z nižjo vsebnostjo vodne faze. Trojni talilni vrh IPM

se pri vzorcih TK-6, TK-7 in TK-8 po obliki bistveno razlikujejo od ostalih vzorcev, kar morda lahko pripišemo drugačni notranji strukturi teh vzorcev.

V skladu s pričakovanji je višja hitrost nadzorovanega segrevanja vzorcev izboljšala občutljivost metode, zato je taljenje vode razvidno tudi na DSC krivulji segrevanja prvega vzorca (slika 22). Z naraščanjem deleža vode naraščajo tudi talilni vrhovi "zmrzljive" vode. Kot pri ostalih hitrostih segrevanja so tudi tu pri vzorcih TK-1 do TK-5 pri približno $-4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dobro razvidni eksotermni vrhovi, ki najverjetneje odražajo določene strukturne spremembe, do katerih pride med taljenjem IPM. V temperaturnem območju med 0 in $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ je razviden tudi intenziven endotermni vrh, ki najverjetneje pripada taljenju v vzorcih prisotne "proste" vode in IPM-ja. Zaradi slabše selektivnosti metode, ki je posledica večje hitrosti segrevanja, se omenjena vrhova prekrivata.

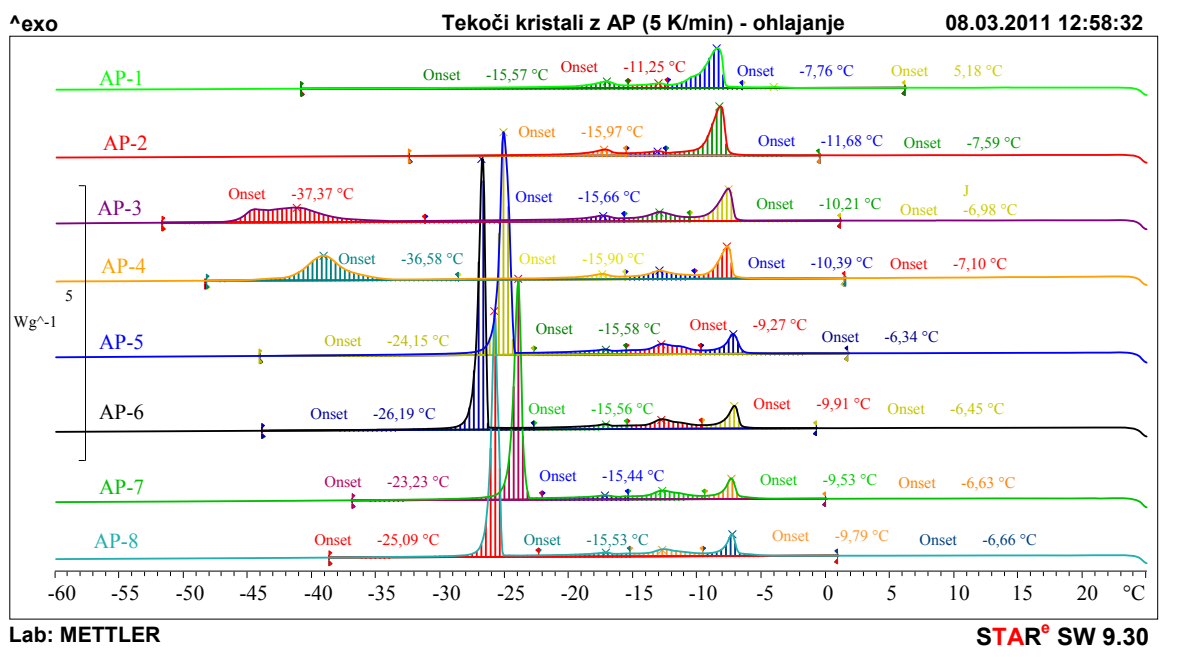


Slika 22: Krivulja segrevanja TK s hitrostjo 10 K/min

7.1.4 DSC analiza TK z AP

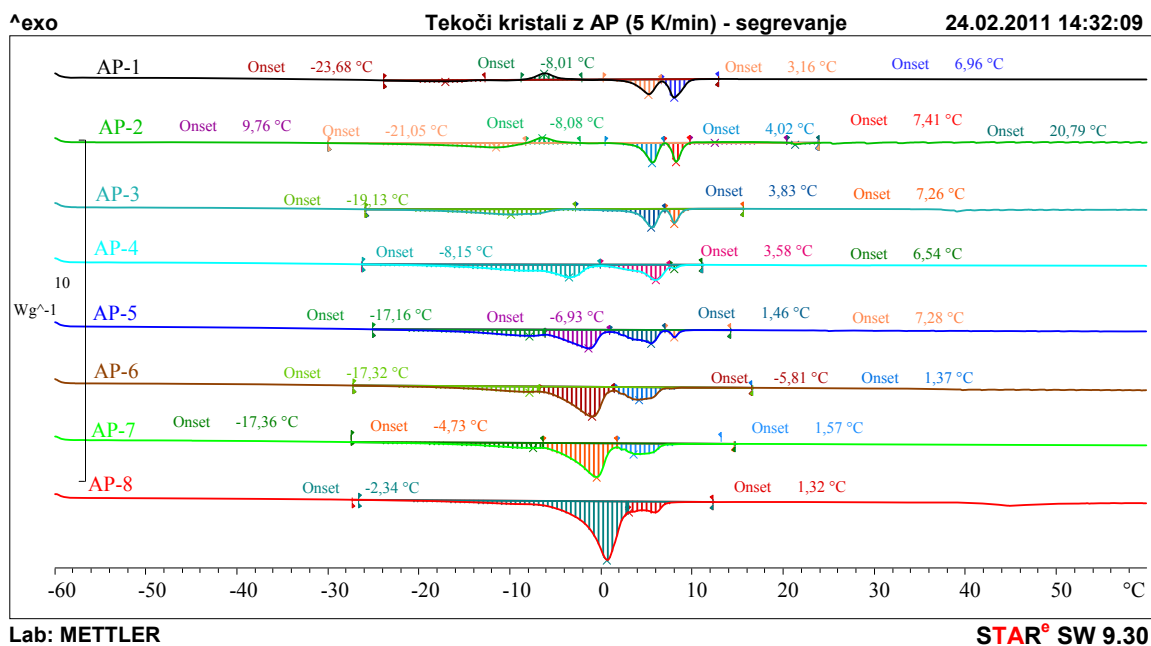
V nadaljevanju smo se osredotočili na proučevanje vpliva vgrajene učinkovine AP na strukturo TK. Opazovali smo vpliv vgradnje AP na obliko DSC krivulj, in sicer smo bili pozorni zlasti na spremenjeno obliko ali položaj kristalizacijskih oz. talilnih vrhov. Pri DSC analizi čistega AP nismo na DSC krivulji ohlajanja oz. segrevanja v proučevanem temperaturnem intervalu opazili nikakršnih dogodkov.

DSC krivulje ohlajanja vzorcev TK z vgrajenim AP s hitrostjo 5 K/min so prikazane na sliki 23, krivulje segrevanja pa na sliki 24.



Slika 23: DSC krivulja ohlajanja TK z AP pri hitrosti 5 K/min

Na DSC krivulji ohlajanja (slika 23) TK vzorcev AP-1 in AP-2 je opazen le trojni eksotermni vrh, ki odraža kristalizacijo IPM. Vrhovi so zelo primerljivi z vrhovi ohlajanja TK-1 in TK-2 (vzorca brez vgrajenega AP) pri tej hitrosti procesa. Vrhovi, ki odražajo kristalizacijo IPM so med posameznimi paralelkami bolj ponovljivi kot v vzorcih brez AP. Na krivulji AP-3 je poleg že omenjenih kristalizacijskih vrhov IPM opazen širok eksotermni vrh v temperaturnem območju med približno -35 in -48 °C, ki odraža kristalizacijo različnih oblik "zmrzljive" vode. Z naraščanjem vsebnosti vode v vzorcih se ta vrh pomika proti višjim temperaturam (bližje k 0 °C) in postaja vse bolj ozek in intenziven, podobno kot v vzorcih brez AP. Bistvena razlika v primerjavi z vzorci brez vgrajenega AP je vidna v vzorcu AP-2, kjer voda v proučevanem temperaturnem intervalu ne zmrzne. Pojav razlagamo tako, da AP zaradi amfifilne strukture še dodatno veže molekule vode in s tem onemogoči kristalizacijo le-te. V skladu s to predpostavko so eksotermni kristalizacijski vrhovi vode na sliki 23 pri vzorcih z nižjo vsebnostjo vode zamaknjeni proti nižjim temperaturam v primerjavi s TK brez AP (slika 17), saj je voda v prvih močneje vezana na polarne glave PAS in AP, ki prav tako izkazuje amfifilne lastnosti.

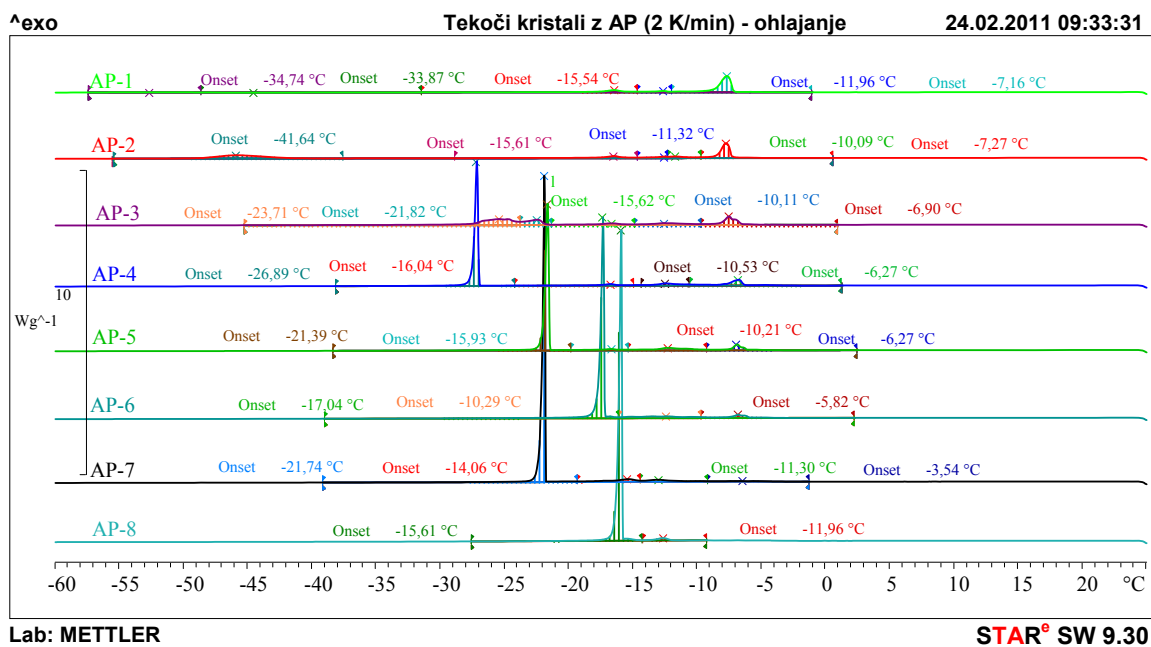


Slika 24: DSC krivulja segrevanja TK z AP pri hitrosti 5 K/min

Vzorca AP-1 in AP-2 sta si glede na krivulji segrevanja zelo podobna (slika 24). Pri obeh je razviden širok in neizrazit endotermni vrh v temperaturnem intervalu med -24 in -8 °C, ki glede na temperaturo procesa pripada taljenju "zmrzljive interlamelarne" vode. Sledijo mu eksotermni vrh pri približno -8 °C ter dva endotermna vrhova, ki najverjetneje ponazarjata taljenje v vzorcih prisotne proste vode (~2 °C) in IPM (~7 °C). Tudi na krivuljah segrevanja AP-3 in AP-4 se pojavi širok endotermni vrh taljenja "zmrzljive" vode (pri približno -19 °C), ki mu sledijo šibek eksotermni vrh pri približno -8 °C ter endotermna vrhova (kristalizacija proste vode in IPM). Nekoliko drugačno, a medsebojno primerljivo obnašanje izkazujejo vzorci AP-5 do AP-8; pri vseh je razviden širok talilni vrh različnih oblik zmrzljive interlamelarne vode v intervalu od -28 °C do 2 °C. Pri okoli 1 °C pa se prične taliti še prosta voda, ki ji sledi taljenje IPM.

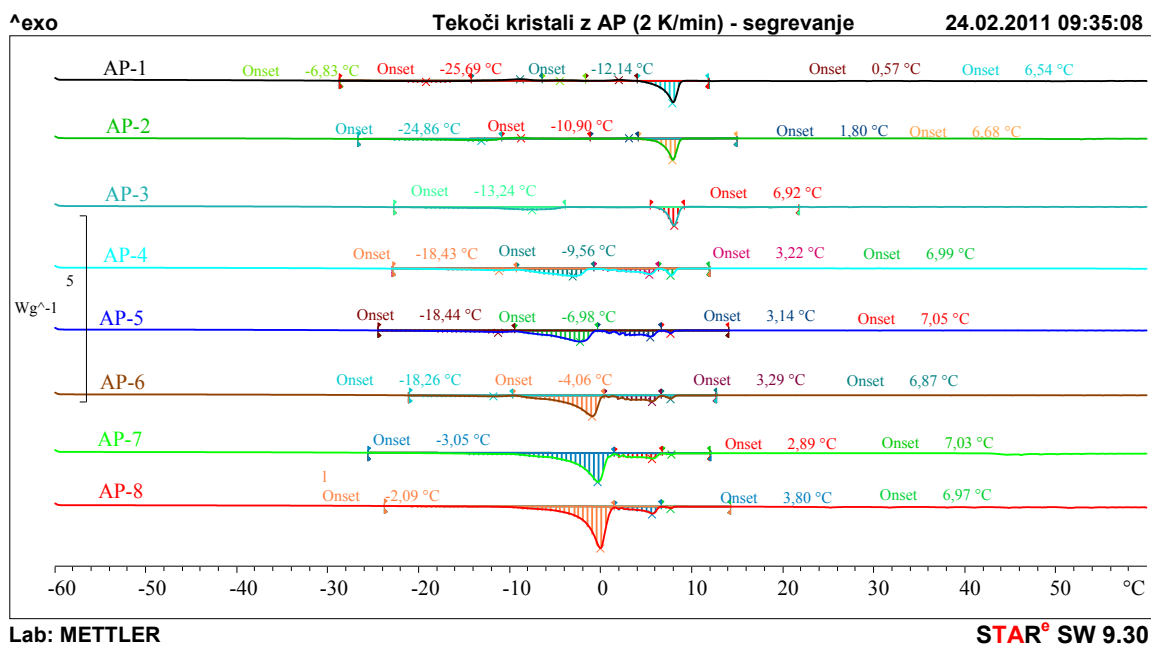
Pri ohlajanju vzorca AP-1 s hitrostjo 2 K/min (slika 25), opazimo eksotermne vrhove kristalizacije IPM pri podobni temperaturi, kot pri vzorcu brez AP. Očitna razlika se kaže v ohlajanju preostalih vzorcev, saj je na DSC krivuljah razviden eksotermni vrh, ki odraža kristalizacijo zmrzljive vode. Ta vrh s povišanjem vsebnosti vode postaja vedno bolj intenziven in oster in se pomika proti višjim temperaturam. Pojav je razumljiv, saj je s povišanjem deleža vode v TK vedno več le-te v interlaminarnem področju TK; ta voda lahko zapade procesu kristalizacije. Glede na to, da je AP PAS, ki je kot taka sposobna še

dodatno vezati vodo, so dobljeni rezultati v nasprotju z našimi pričakovanji, saj primerljivega vrha pri isti hitrosti ohlajanja vzorcev TK-1 do TK-7 (brez AP) nismo zaznali.



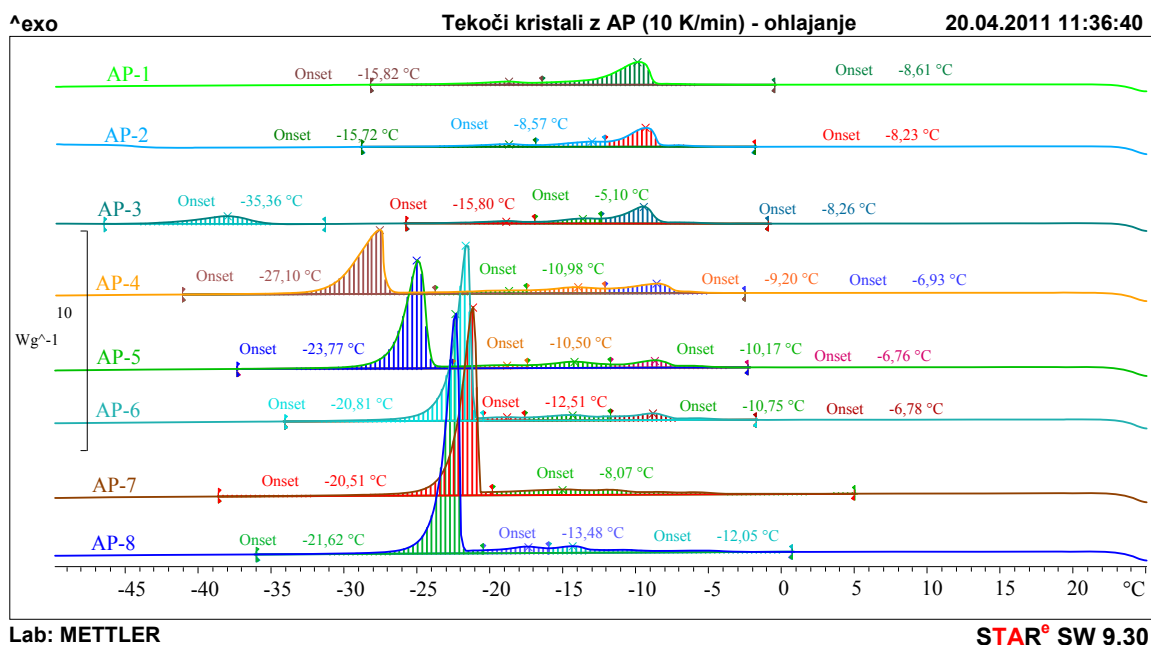
Slika 25: DSC krivulja ohlajanja TK z AP pri hitrosti 2 K/min

Na DSC krivuljah segrevanja vzorcev AP-1 do AP-8 s hitrostjo 2 K/min so razvidni široki endotermni vrhovi taljenja vode, ki s povišanjem deleža vodne faze postajajo vse bolj izraziti in se pomikajo proti višjim temperaturam taljenja. Glede na temperaturo taljenja sklepamo, da odražajo taljenje različnih tipov interlamelarne vode. Nadalje so razvidni šibki kristalizacijski vrhovi, ki glede na temperaturo tudi v tem primeru pripadajo IPM. Glede na bistveno slabšo izraženost talilnih vrhov IPM ter eksotermnega vrha med -9 in -6 °C sklepamo na določene interakcije med IPM in AP.



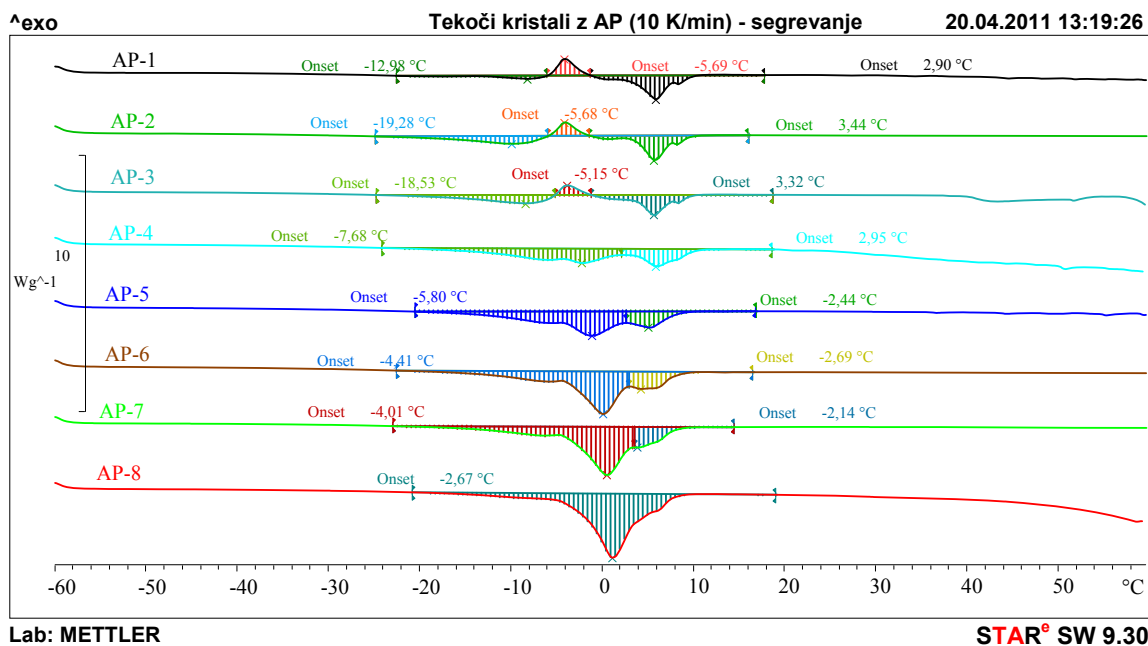
Slika 26: DSC krivulja segrevanja vzorcev z AP pri hitrosti 2 K/min

DSC analizo vseh vzorcev z AP smo izvedli tudi pri višji hitrosti ohlajanja oz. segrevanja (10 K/min), ki zagotavlja boljšo občutljivost metode. DSC krivulje so prikazane na slikah 27 in 28.



Slika 27: DSC krivulja ohlajanja TK z AP pri hitrosti 10 K/min

Pri hitrosti ohlajanja vzorcev z 10 K/min se kristalizacijski vrh "zmrzljive" vode prvič pojavi pri AP-3 in se proti AP-8 vse bolj pomika proti višjim temperaturam ter pridobiva na intenziteti (slika 27). Kristalizacijski vrhovi IPM ne spremenijo svojega položaja, vendar proti AP-8 vzorcu postajajo vse šibkejši in neizraziti. Tudi v tem primeru bi lahko sklepali na možne interakcije AP z IPM, kar se kaže v zamaknjenosti endotermnih vrhov IPM, predvsem v vzorcih z nižjim deležem IPM, npr. AP-7 in AP-8.



Slika 28: DSC krivulja segrevanja TK z AP pri hitrosti 10 K/min

Na krivuljah segrevanja (slika 28) je endotermni vrh taljenja vode razviden na krivuljah vseh vzorcev in postaja vse intenzivnejši z naraščanjem vsebnosti vodne faze proti osmemu vzorcu. Eksotermni vrhovi, povezani z IPM, so prisotni le pri vzorcih AP-1 do AP-3, za razliko od vzorcev brez AP, kjer so le-ti prisotni pri prvih petih vzorcih. Endotermni vrhovi taljenja IPM se pojavijo pri nekoliko nižji temperaturi, kot pri vzorcih brez AP. Dejstvo je, da je pri večji hitrosti segrevanja večja občutljivost metode in manjša selektivnost le-te. Posledično pride do prekrivanja oz. združevanja vrhov, predvsem tistih, ki si tesno sledijo.

7.2. Ozkokotno rentgensko sipanje

Iz položajev posameznih vrhov v difraktogramih smo ugotavljali prisotnost lamelarnih faz TK. Le-ti se kažejo s prisotnostjo ozkih in intenzivnih vrhov, katerih razmerje intenzitet $q_1:q_2$ znaša 1:2.

V preglednici III so zbrani podatki za položaje vrhov (q) in razdalje med plastmi (d) v vzorcih prisotnih lamel.

Preglednica III: Položaji vrhov (q [nm^{-1}]) pri ozkokotnem rentgenskem sipanju in razdalje med plastmi (d [nm]).

25°C	q	q_1 [nm^{-1}]	q_2 [nm^{-1}]	q_3 [nm^{-1}]	q_4 [nm^{-1}]	q_5 [nm^{-1}]	q_M [nm^{-1}]	d_1 [nm]
TK1	0,585	0,849	1,165	1,670				7,403
AP1		0,717	0,865	1,235	1,427	1,726		8,762
TK2	0,408	0,809	1,632					7,762
AP2	0,506	0,812	1,628					7,738
TK3		0,768	1,544				1,165	8,185
AP3	0,365	0,760	1,523					8,269
TK4		0,656	1,309					9,579
AP4		0,708	1,430					8,872
TK5		0,652	1,306					9,636
AP5		0,637	1,274					9,866
TK6		0,655	1,308					9,593
AP6		0,572	1,150					10,986
TK7	0,236	0,603	1,196					10,414
AP7		0,559	1,130					11,237
TK8	0,233	0,589	1,179					10,666
AP8		/	/					/

32°C	q	q_1 [nm^{-1}]	q_2 [nm^{-1}]	q_3 [nm^{-1}]	q_4 [nm^{-1}]	q_5 [nm^{-1}]	q_M [nm^{-1}]	d_1 [nm]
TK1	0,599	0,851	1,154	1,711				7,381
AP1		0,727	0,868	1,257	1,450	1,737		8,639
TK2	0,447	0,803	1,617					7,829
AP2	0,545	0,811	1,626					7,748
TK3		0,752	1,509				1,146	8,357
AP3	0,415	0,753	1,512					8,340
TK4		0,647	1,299					9,710
AP4		0,701	1,416					8,960
TK5		0,643	1,288					9,769
AP5		0,622	1,222					10,101
TK6		0,641	1,278					9,806
AP6		0,564	1,153					11,131
TK7	0,217	0,586	1,174					10,729
AP7		0,524	1,129					11,999
TK8	0,22	0,573	1,155					10,959
AP8		/	/					/

37°C	q	q ₁ [nm ⁻¹]	q ₂ [nm ⁻¹]	q ₃ [nm ⁻¹]	q ₄ [nm ⁻¹]	q ₅ [nm ⁻¹]	q _M [nm ⁻¹]	d ₁ [nm]
TK1	0,668	0,856	1,143	1,722				7,343
AP1		0,732	0,873	1,267	1,463	1,751		8,581
TK2	0,504	0,803	1,618				1,147	7,824
AP2	0,564	0,810	1,626					7,758
TK3		0,738	1,489				1,185	8,518
AP3	0,448	0,759	1,512					8,281
TK4		0,639	1,275					9,837
AP4		0,696	1,404					9,024
TK5		0,636	1,276				0,963	9,882
AP5		0,615	1,219					10,222
TK6		0,633	1,264				0,963	9,921
AP6		0,540	1,125					11,627
TK7		0,560	1,151					11,229
AP7		0,503	1,026					12,504
TK8	0,21	0,558	1,135					11,268
AP8	0,342	/	/					/

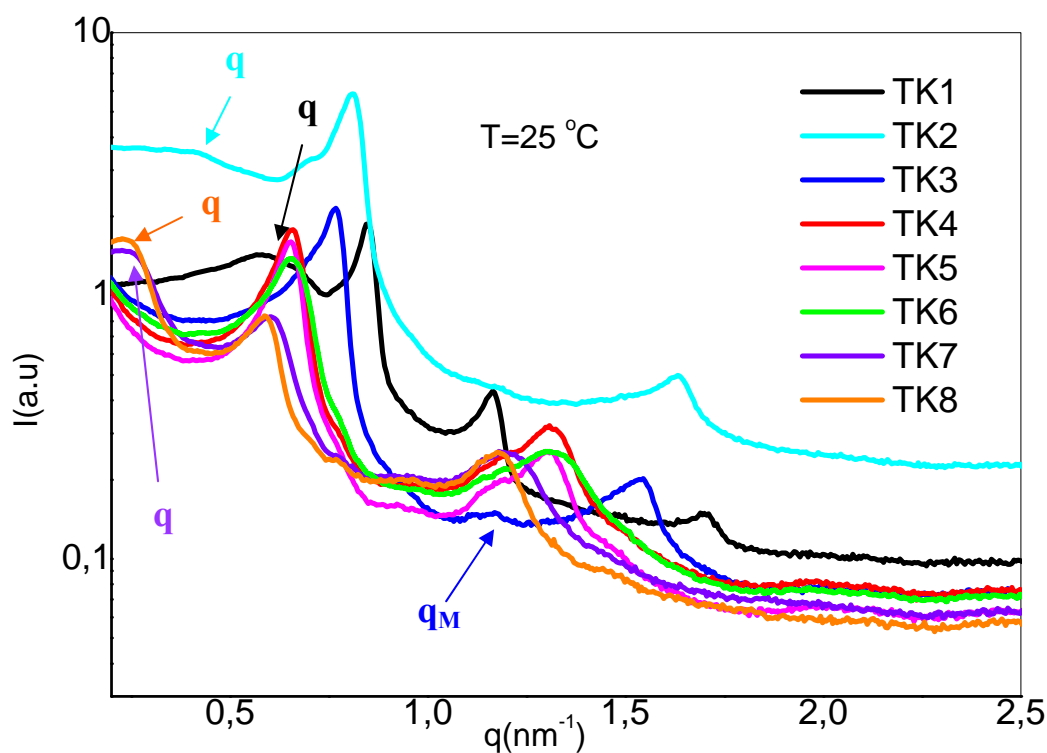
7.2.1 Vrednotenje difraktogramov TK brez vgrajenega AP (TK1-8):

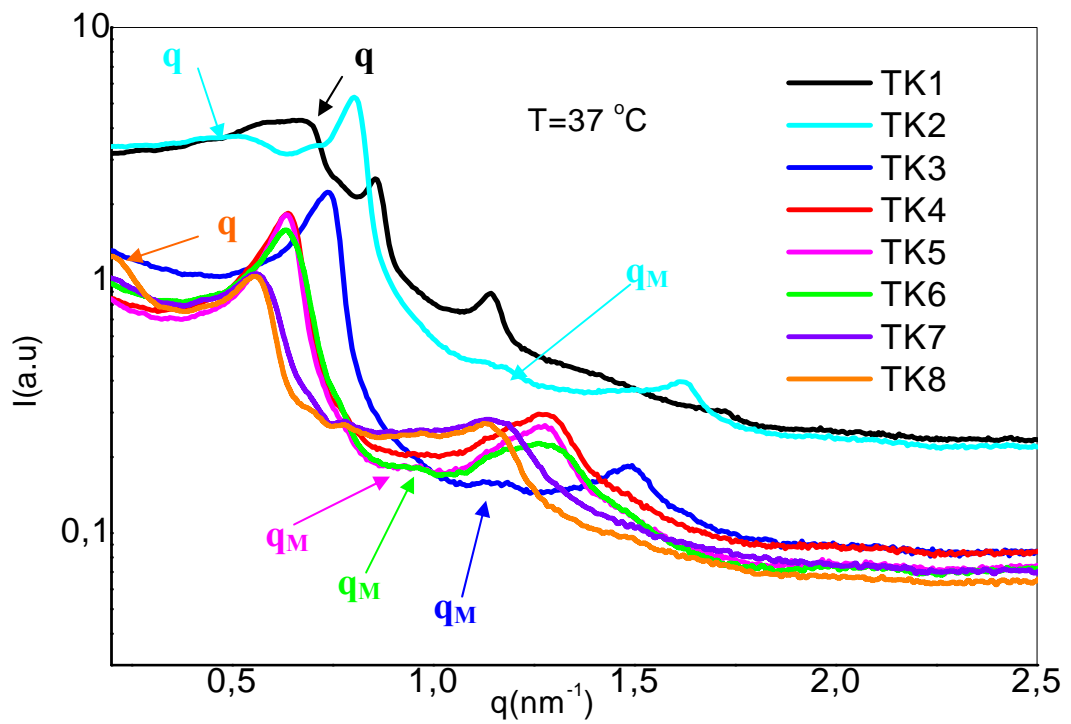
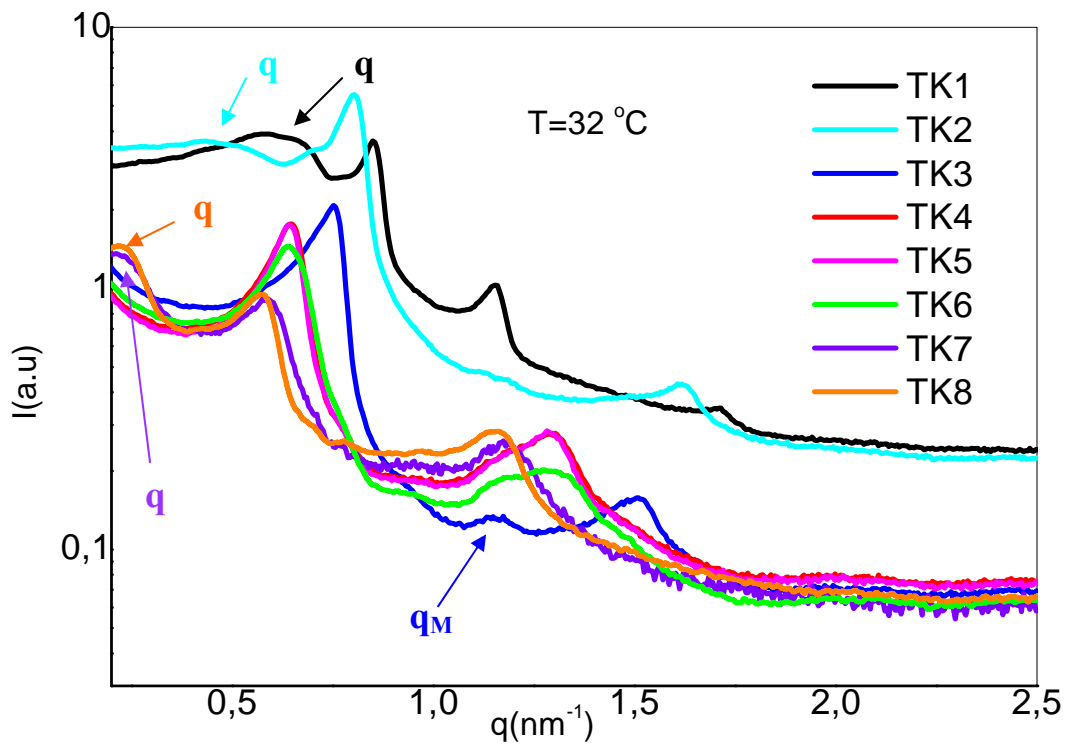
Na difraktogramih vzorcev TK1-8, posnetih pri temperaturi 25 °C (slika 29a), sta pri večini vzorcev prisotna dva intenzivna in ostra vrhova, označena s q₁ in q₂, ki nakazujeta prisotnost lamelarnih faz, saj je razmerje med pozicijami vrhov 1:2, kot je tudi značilno za lamelarne faze. Glede pojavljanja značilnih vrhov, ki bi nakazovali prisotnost lamelarnih faz v vzorcih TK1-8, je izjema le vzorec TK1, kjer so prisotni trije ostri vrhovi (q₁, q₂ in q₃), ki lahko nakazujejo prisotnost ali kubične faze, saj se razmerje v vzorcu približa razmerju interferenc kubičnih faz, ki sicer znaša 1:1/√2:1/√3:1/√4 ali heksagonalne faze, kar kažejo reološke študije predhodnih raziskav (30). Na krivuljah vzorcev TK1, TK2, TK7 in TK8 se tik pred prvim intenzivnim vrhom pojavi tudi neintenziven greben, označen s q, ki bi po literarnih podatkih lahko kazal na prisotnost micelov.

Po literarnih podatkih *Harms-a s sodelavci*, ki so proučevali ternarni sistem lecitin/IPM/voda, so liotropni TK v difraktogramu izraženi kot jasno definirani ostri vrhovi, katerih intenziteta pada s povišanjem temperature. Grebene, ki so značilno prisotni pred prvim intenzivnim vrhom, ki definira lamelarne faze, pa so pripisali prisotnosti termotropnih TK. Tudi raziskovalci *Zhuang in sodelavci* so v raziskavah ternarnega sistema Brij30/voda/soli 1-butyl-3-metilimidazola prisotnost lamelarnih faz interpretirali na osnovi prisotnosti intenzivnih ozkih vrhov. Nastanek grebenov so razlagali s prisotnostjo micelarnih agregatov oz. psevdo-heksagonalne faze (31, 32).

Na krivulji vzorca TK3 je prisoten manjši, neizrazit vrh, označen s q_M , ki ga prav tako lahko pripišemo prisotnosti micelarnih agregatov (31). Podobne vrhove opazimo tudi pri vzorcih TK2, TK5 in TK6 pri temperaturi merjenja 37 °C. Sicer pa so si difraktogrami vzorcev TK, posnetih pri temperaturah 25 °C, 32 °C in 37 °C, po obliki zelo podobni. Izrazito izstopa le krivulja vzorca TK1, saj se pri temperaturah 32 °C in 37 °C pojavlja pri višji intenziteti rentgenske svetlobe (ordinata) glede na njen položaj pri 25 °C.

Razmerje pozicij ostrih vrhov $q_1:q_2$ je pri vseh treh temperaturah merjenja znašalo 1:2, kar je značilno za lamelarne faze TK. Lamelarna struktura se pri temperaturi na površini kože (32 °C) in pri fiziološki temperaturi (37 °C) ohrani, kar je za dermalno aplikacijo lamelarnih TK kot dermalnih nosilnih sistemov velikega pomena.



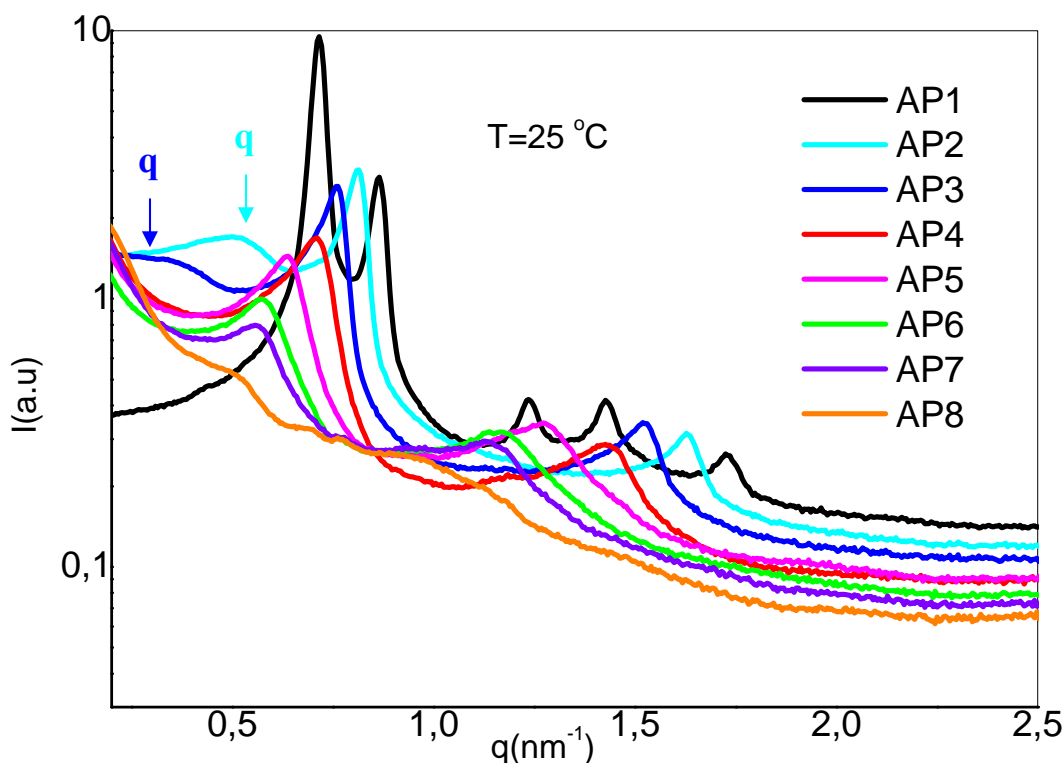


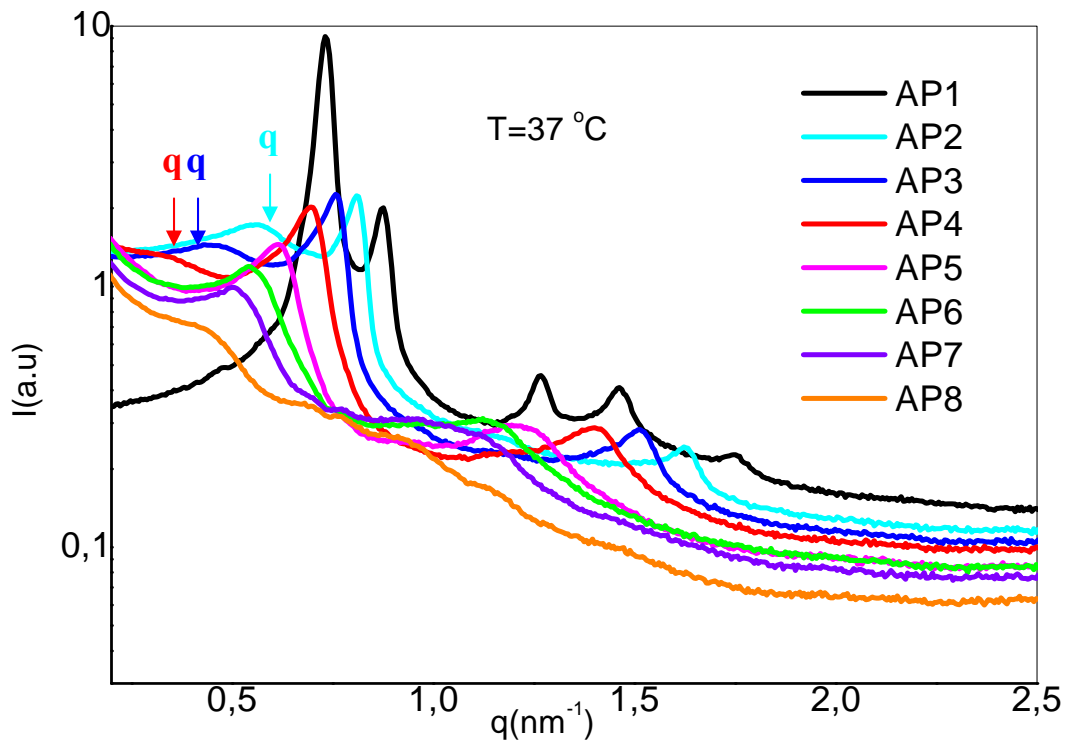
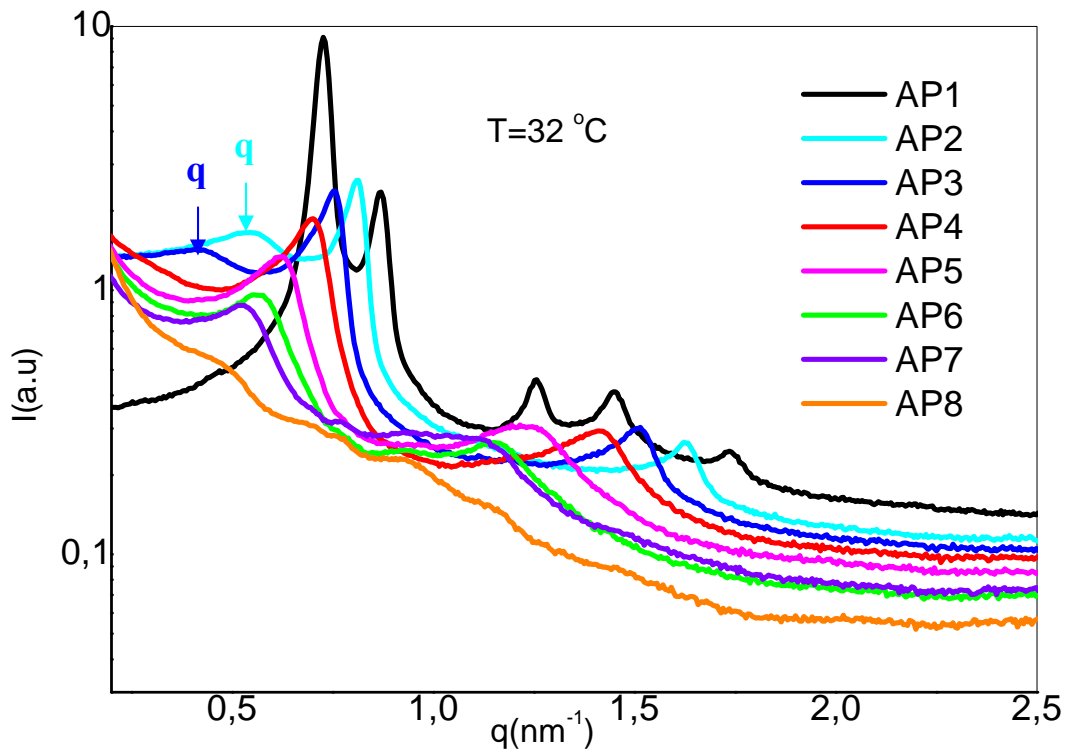
Slika 29 (a, b in c): Difraktogrami vzorcev TK1 do TK8 (brez AP) pri temperaturah 25, 32 in 37 °C

7.2.2 Vrednotenje difraktogramov TK z vgrajenim AP (AP1-8)

Po vgradnji AP v TK (slika 30) lahko ohranitev lamelarne strukture glede na pojav ostrih in intenzivnih vrhov potrdimo pri vseh vzorcih, razen v vzorcu AP1 in AP8. Vzorec z najnižjim deležem vodne faze (AP1) tudi v odsotnosti AP ne izkazuje lamelarne strukture. Po vgradnji AP je na difraktogramu tega vzorca razvidnih pet vrhov, z zaporedjem interferenc, ki niso značilne za lamelarne TK. Izjema je tudi vzorec AP8, kjer so vrhovi zelo neizraziti oz. jih ni, kar kaže na porušenje notranje strukture tega sistema v prisotnosti AP.

Na krivuljah ostalih vzorcev se pojavita le dva ostra in izrazita vrhova ($q_1:q_2 = 1:2$), kar nakazuje na prisotnost lamelarnih faz.. Dodatni vrhovi, predvsem izraziti grebeni (q) ob prvem ostrem vrhu vzorcev AP2 in AP3 (ter AP4 pri 37 °C), poleg ureditve komponent v lamelarne faze nakazujejo tudi na prisotnost dodatnih struktur (psevdo-heksagonalnih faz ali micelov). Vpliv temperature je zanemarljiv, saj so si difraktogrami pri vseh treh temperaturah merjenja izjemno podobni.





Slika 30 (a, b in c): Difraktogrami vzorcev TK1 do TK8 brez AP pri temperaturah 25, 32 in 37 °C

7.2.3 Razdalje med lamelami

Razdalje med lamelami (d) posameznih lamelarnih TK smo izračunali iz položajev vrhov v difraktogramu s pomočjo enačbe $d = 2\pi/q$, njihove vrednosti pa so navedene v preglednici III.

V vzorcih brez vgrajenega AP (TK1-8) razdalje med lamelami zelo očitno naraščajo z večanjem deleža vode v vzorcih. Velikost razdalj tako znaša od približno 7nm (pri TK1), do približno 11nm (pri TK8). Iz slednjega je razvidno, da se z naraščanjem deleža vode v vzorcih vedno več vode razporedi v lamele (t.i. interlamelarna voda), ki posledično postajajo vse debelejše, razdalje med njimi pa vse večje, kar potrjujejo tudi rezultati DSC analize. Vpliv temperature merjenja na razdalje med lamelami ni opazen, saj so le-te dokaj konstantne pri vseh treh temperaturah. Je pa na d opazen vpliv vgrajenega AP; v teh vzorcih so razdalje nekoliko večje, ponovno pa nanje ne vpliva temperatura merjenja.

8. SKLEP

V diplomskem delu smo vrednotili strukturo TK, sestavljenih iz lecitina in Tweena 80[®] kot PAS, IPM kot oljne faze ter bidestilirane vode.

Z DSC metodo smo proučevali predvsem prisotnost različnih oblik vode, ki se pojavljajo v strukturah TK in ugotovili:

- Različne oblike vode, prisotne v vzorcih, se kažejo predvsem v različnih temperaturah in obsegu kristalizacije med ohlajanjem oz. obsegu talilnih vrhov med segrevanjem; v sistemu TK je voda lahko prisotna v "nezmrzljivi" in "zmrzljivi" obliki, nadalje pa se zmrzljiva voda lahko nahaja v obliki "zmrzljive interlamelarne" ter proste (bulk) vode.
- Prisotnost različnih oblik vode je odvisna od deleža vodne faze v vzorcih ter prisotnosti amfifilnih spojin, kot je v našem primeru AP. Tako je več "zmrzljive" vode, torej tiste, ki pri ohlajanju lahko zamrzne, prisotne v vzorcih, ki vsebujejo večji delež vode.
- Nižja hitrost nadzorovanega ohlajanja vzorcev (2 K/min) je vplivala predvsem na delež podhlajene vode. To se je odražalo tudi na zmrzovanju le-te, saj je voda zamrznila pri nižji temperaturi in v manjšem obsegu, kot pri ohlajanju vzorcev s hitrostjo 5 K/min.
- Višja hitrost segrevanja vzorcev (10 K/min) je v skladu s pričakovanji izboljšala občutljivost metode, in sicer so boljše razvidni talilni vrhovi vode na DSC krivulji segrevanja vzorcev. V nasprotju s pričakovanji pa so na krivulji ohlajanja eksotermni vrhovi kristalizacije vode opazni šele v vzorcih z višjim deležem vode, kar je verjetno posledica podhladitve sistema, zaradi česar voda v vzorcih TK1-TK5 ni zamrznila.
- DSC analiza vzorcev je razkrila tudi določen vpliv vgrajenega AP na strukturo TK. Vpliv se je kazal predvsem na temperaturi kristalizacije vode. Slednja je bila zaradi amfifilnih lastnosti AP v sistem še bolj vezana, zato je bila za njeno kristalizacijo potrebna nižja temperatura.
- Vgrajen AP pa je vplival tudi na termične procese IPM; tako pri ohlajanju kot tudi pri segrevanju vzorcev s hitrostjo 2K/min so vrhovi IPM bistveno slabše izraženi v primerjavi z vrhovi IPM pri segrevanju vzorcev s hitrostjo 5 K/min. Podoben pojav

(šibkejši in neizraziti vrhovi IPM) pa opazimo tudi pri povečani hitrosti (10 K/min). Sklepamo lahko torej na možne interakcije AP z IPM.

Z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja (SAXS) smo natančneje proučili strukturo TK. Iz dobljenih rezultatov smo zaključili:

- V vzorcih TK brez AP smo potrdili prisotnost lamelarnih faz TK pri vseh vzorcih, z izjemo TK1, ki je vseboval najnižji delež vode. Prisotnost lamelarnih faz v omenjenih vzorcih smo potrdili na podlagi pozicije vrhov q_1 in q_2 , ki so, značilno za lamelarne faze, v razmerju 1 : 2. Struktura lamelarnih TK se je ohranila pri vseh treh temperaturah merjenja, kar pomeni, da vzorec ohrani strukturo tudi pri pogojih aplikacije na kožo.
- V prvem vzorcu (TK1) so na difraktogramu razvidni trije intenzivnejši vrhovi, katerih zaporedje intenzitet nakazuje na prisotnost kubičnih ali heksagonalnih TK. Poleg lamelarnih faz so na difraktogramih TK1-3 jasni tudi grebeni, ki predvidoma kažejo na prisotnost micelarnih agregatov.
- V vzorcih z vgrajenim AP (AP1-8) je na podlagi difraktogramov zelo jasno vidna prisotnost lamelarnih faz, z izjemo AP1 ter AP8. Predvidevamo lahko, da gre pri obeh vzorcih za vpliv vgrajenega AP. Amfifilni značaj AP lahko vodi v porušenje lamelarne strukture. To je dobro razvidno iz primerjave vzorca TK8 z vzorcem AP8; v prvem sta ostra vrhova lamelarnih faz še prisotna, v drugem (vzorec AP8) pa nista razvidna, kar kaže na spremembo oz. porušenje notranje strukture vzorca v prisotnosti AP. Notranja struktura vzorcev ni bila odvisna od temperature, saj so vzorci tudi pri 32 in 37 °C ohranili svojo strukturo.
- Razdalje med lamelami so se povečevale s povišanjem deleža vode v vzorcih, in sicer tako v TK brez in z vgrajenim AP. To potrjuje, da je pri vzorcih z večjim deležem vodne faze več le-te vgrajene v interlamelarno področje. Povečanje tipa vode, ki lahko kristalizira med procesom ohlajanja vzorcev, so potrdili tudi rezultati DSC analize.

9. VIRI IN LITERATURA

1. Pečar S; Koža in prosti radikali; Koža-Sonce-Zdravje-Lepota; Podiplomsko strokovno izobraževanje; Ljubljana 2004; 23-34
2. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov; Farm Vestn 1999; 50: 443-453
3. Čahuk Vaupotič V, Krbavčič A: Askorbilpalmitat - Analitična monografija. Farm Vest 2000; 51; 133-140
4. Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije; 9. izdaja; 34,35
5. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine; Farm vestn 2006; 57; 24-29
6. Jurkovič P, Šentjure M, Gašperlin M, Kristl J; Pečar S; Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions; Eur Journ of Pharm and Biopharm 56 (2003); 59-66
7. Rozman B, Gasperlin M et al: Simultaneous absorption of vitamin C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model, Eur Journ of Pharm and Biopharm 72 (2009); 69-75
8. Gašperlin M; Aktivna nega kože; Koža-Sonce-Zdravje-Lepota; Podiplomsko strokovno izobraževanje; Ljubljana 2004; 35-51
9. Austria R, Semenzato A, Bettero A; Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations; Jour of Pharm and Biomed Analysis 15 (1997); 795-801
10. Draelos Z, Thaman L: Cosmetic formulation of skin care products; Informa Healthcare USA (2010); 174, 193, 378
11. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions: Int. Jour. of Pharm. 222; 2001; 271-279
12. Gosenca M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje. Farm Vest 2011; 62: 15-25.
13. Sinko Patrick J: Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences, 6th ed. Lippicott Williams & Wilkins; Baltimore 2011; 36-40
14. Mitsui T; New Cosmetic Science; Elsevier; 1997; 171
15. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. Farm Vestn 2001; 52: 173-185
16. URL: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Dvolomnost> (dostop 10.7.2011)

17. Tavčar T: Vrednotenje strukture in citotoksičnosti tekočih kristalov za dermalno uporabo. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
18. Goymann-Müller CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration; *Eur J Pharm and Biopharm* 2004; 58; 343-356
19. Skoog, Holler, Crouch; *Principles of Instrumental Analysis*, 6th Ed.; Thomson Brook/Cole; 2007; 900, 903
20. Nesseem D: Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system; *Jour. of Pharm. and Biomed. Analysis*; 26; 2001; 387-399
21. Čerpnjak K: Vrednotenje koloidnih sistemov z lecitinom za dermalno aplikacijo askorbilpalmitata. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010
22. Shchipunov A Yu: Self-organising structures of lecithin; *Russian Chemical Reviews* 66 (4); 1997; 301-322
23. Kralj L: Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009
24. Benedini L et al: The ascorbyl palmitate-water system: Phase diagram and state of water; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 375 (2011) 178–185
25. Nissim Garti: Thermal behavior of dispersed systems; *Vol 93*; 2001; 59-90, 247-258
26. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80 (dostop 16.3.2011)
27. URL: <http://www.fkkt.uni-lj.si/si/?866> (dostop: 3.8.2011)
28. Podlogar F, Gašperlin M, Tomšič M, Jamnik A, Bešter Rogač M: Structural characterisation of water-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods; *IJP* 276; 2004; 115-128
29. Podlogar F, Bešter Rogač M, Gašperlin M: The effect of internal structure of selected water-Tween 40[®]-Imwitor 308[®]-IPM microemulsions on ketoprofene release; *IJP* 302; 2005; 68-77
30. Caf N: Vrednotenje reoloških lastnosti liotropnih tekočih kristalov na osnovi lecitina. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
31. Zhuang W, Chen X, Cai J: Characterization of lamellar phases fabricated from Brij-30/water/1-butyl-3-methylimidazolium salts ternary system by small-angle X-ray scattering; *Colloids and surfaces A; Physicochem Eng Aspects* 2008; 318; 175-183

32. Harms M, Mackeben S, Muller-Goymann CC: Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/isopropyl myristate/Water; Coll. And Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects; 2005; 259; 81-87

10. PRILOGA:

Priložena je tabela z rezultati T_{onset} in ΔH pri ohlajanju in segrevanju vzorcev z DSC metodo.

Posamezne sestavine	OHLAJANJE		SEGREVANJE		
	ΔH [J/g]	T_{ONSET} [°C]	ΔH [J/g]	T_{ONSET} [°C]	
IPM	vrh ₁	101,67	-6,37	9,77	-14,23
	vrh ₂	5,99	-12,92	-151,32	6,93
	vrh ₃	9,16	-17,25		
tween 80	vrh ₁			23,74	-51,76
	vrh ₂			-25,28	-27,67
AP					
lecitin					
bidest. voda		243,04	-21,66	-278,93	-1,26

Binarne in ternarne zmesi	OHLAJANJE		SEGREVANJE		
	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	
BZ ₁	vrh ₁	47,82	-18,36	-53,10	-1,72
	vrh ₂	8,66	-38,65		
BZ ₂	vrh ₁	41,29	-30,29	-39,77	-15,52
BZ ₃	vrh ₁	19,16 ± 4,77	-6,46 ± 0,02	10,56 ± 5,75	-18,78 ± 0,20
	vrh ₂	7,44 ± 2,16	-14,86 ± 2,11	-214,69 ± 2,21	-1,23 ± 0,09
	vrh ₃	189,19 ± 2,65	-19,36 ± 2,07	-35,15 ± 6,16	6,79 ± 0,13
BZ ₄					
BZ ₅	vrh ₁	38,67 ± 0,83	-7,91 ± 0,02	-9,15 ± 2,33	-16,51 ± 0,65
	vrh ₂	6,35 ± 0,14	-10,6 ± 0,17	-14,69 ± 1,16	-8,14 ± 0,05
	vrh ₃	9,88 ± 0,26	-15,88 ± 0,01	-14,69 ± 1,16	1,22 ± 0,19
	vrh ₄			-45,97 ± 3,43	6,08 ± 0,04
BZ ₆	vrh ₁	37,24 ± 0,55	-7,36 ± 0,10	-13,04 ± 3,26	-26,39 ± 1,34
	vrh ₂	5,24 ± 0,06	-12,62 ± 0,03	5,72 ± 0,13	-9,26 ± 0,22
	vrh ₃	7,63 ± 0,74	-16,92 ± 0,01	5,16 ± 0,48	-5,51 ± 0,08
	vrh ₄			-26,89	3,46
	vrh ₅			-35,85	6,11
BZ ₇					
BZ ₈	vrh ₁	26,40 ± 0,34	-10,64 ± 0,14	-11,48 ± 2,00	-22,91 ± 0,25
	vrh ₂	8,44 ± 0,33	-15,63 ± 0,26	3,73 ± 0,14	-9,72 ± 0,12
	vrh ₃			-28,97 ± 1,27	-0,9 ± 0,53
	vrh ₄			-7,03 ± 0,20	5,05 ± 0,15

(5 K/min) Tekoči kristali brez AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
TK ₁	vrh ₁	14,92 ± 0,69	-7,21 ± 0,20	-13,06	-24,51
	vrh ₂	4,19 ± 0,85	-12,05 ± 0,19	5,81 ± 0,40	-6,61 ± 0,51
	vrh ₃	4,32 ± 0,81	-16,73 ± 0,46	-17,38 ± 1,22	3,78 ± 0,30
	vrh ₄			-8,19 ± 0,88	6,70 ± 0,38
TK ₂	vrh ₁	12,30 ± 1,35	-6,89 ± 0,35	-19,03	-30,34
	vrh ₂	5,54 ± 1,38	-12,43 ± 0,52	5,72 ± 0,92	-5,65 ± 0,40
	vrh ₃	4,20 ± 0,69	-16,89 ± 0,44	-16,11 ± ,57	4,19 ± 0,39
	vrh ₄	6,40	-42,59	-7,51 ± 1,62	6,96 ± 0,33
TK ₃	vrh ₁	9,24 ± 1,76	-6,64 ± 0,31	-12,53 ± 1,28	-22,55 ± 4,14
	vrh ₂	6,46 ± 1,17	-12,18 ± 0,37	3,93 ± 1,57	-5,80 ± 0,64
	vrh ₃	4,05 ± 0,49	-16,61 ± 0,30	-16,62 ± 2,47	4,13 ± 0,46
	vrh ₄	14,02 ± 4,97	-44,65 ± 2,06	-6,33 ± 1,56	6,83 ± 0,61
TK ₄	vrh ₁	8,40 ± 4,66	-6,99 ± 0,47	-21,00	-21,50
	vrh ₂	8,26 ± 3,62	-11,9 ± 0,43	3,53	-7,53
	vrh ₃	5,48 ± 2,04	-15,97 ± 0,13	-19,49 ± 1,14	3,50 ± 1,09
	vrh ₄	37,44	-29,46	-2,94 ± 0,33	6,70 ± 0,24
TK ₅	vrh ₁	3,16 ± 1,81	-6,74 ± 0,72	-15,62	-19,49
	vrh ₂	11,69 ± 2,01	-12,00 ± 0,21	3,10	-6,73
	vrh ₃	3,86 ± 1,65	-15,64 ± 0,44	-19,79	4,35
	vrh ₄	37,67 ± 14,14	-29,43 ± 7,50	-1,52	6,75
TK ₆	vrh ₁	4,82 ± 0,16	-6,31 ± 0,29	-23,73	-10,52
	vrh ₂	9,66 ± 3,07	-11,59 ± 0,81	-19,00	4,40
	vrh ₃	4,06 ± 1,61	-15,44 ± 0,98	-1,55	8,27
	vrh ₄	27,15 ± 1,70	-26,60 ± 0,95		
TK ₇	vrh ₁	5,29 ± 4,01	-7,16 ± 0,72	-38,47 ± 3,03	-6,97 ± 0,27
	vrh ₂	8,31 ± 4,78	-11,72 ± 0,58	-16,35 ± 0,76	0,98 ± 0,02
	vrh ₃	4,39 ± 0,35	-15,01 ± 0,45		
	vrh ₄	45,25 ± 1,53	-25,78 ± 0,47		
TK ₈	vrh ₁	7,49 ± 2,47	-11,25 ± 1,00	54,75	-4,87
	vrh ₂	6,14 ± 2,03	-12,91 ± 3,30	-17,69	1,51
	vrh ₃	73,98 ± 12,79	-20,65 ± 1,63		

(5 K/min) Tekoči kristali z AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
AP ₁	vrh ₁	16,53 ± 0,26	-7,54 ± 0,26	-1,28 ± 0,17	-17,95 ± 1,07
	vrh ₂	2,72 ± 0,31	-11,59 ± 0,39	-5,12 ± 0,94	-8,56 ± 0,70
	vrh ₃	4,84 ± 1,23	-16,02 ± 0,40	-13,61 ± 2,25	2,81 ± 0,48
	vrh ₄			-9,90 ± 1,19	6,89 ± 0,13
AP ₂	vrh ₁	14,43 ± 1,48	-7,52 ± 0,21	-11,70 ± 1,98	-20,60 ± 0,45
	vrh ₂	4,35 ± 1,41	-10,87 ± 0,54	4,61 ± 0,15	-8,09 ± 0,47
	vrh ₃	4,70 ± 0,50	-16,09 ± 0,22	-12,42 ± 0,61	3,54 ± 0,31
	vrh ₄	15,44 ± 0,21	-42,36 ± 0,57	-8,71 ± 1,38	7,22 ± 0,16
AP ₃	vrh ₁	11,56 ± 1,81	-7,23 ± 0,23	-18,10 ± 1,08	-19,34 ± 0,26
	vrh ₂	5,23 ± 1,88	-10,71 ± 0,46	-13,84 ± 1,45	3,70 ± 0,42
	vrh ₃	4,71 ± 1,55	-15,93 ± 0,24	-6,55 ± 1,76	7,26 ± 0,23
	vrh ₄	24,24 ± 1,70	-34,18 ± 2,49		
AP ₄	vrh ₁	8,59 ± 1,34	-6,83 ± 0,19	-26,21 ± 6,62	-12,17 ± 4,35
	vrh ₂	6,88 ± 0,87	-10,71 ± 0,32	-15,82 ± 1,71	3,87 ± 0,33
	vrh ₃	4,80 ± 0,23	-15,96 ± 0,25	-3,03 ± 1,84	7,16 ± 0,42
	vrh ₄	36,90 ± 0,90	-26,39 ± 0,34		
AP ₅	vrh ₁	6,60 ± 0,49	-6,64 ± 0,30	-44,48 ± 3,71	-6,62 ± 0,26
	vrh ₂	7,89 ± 0,13	-9,57 ± 0,42	-17,50 ± 1,17	1,14 ± 0,24
	vrh ₃	4,81 ± 0,27	-15,90 ± 0,42		
	vrh ₄	48,30 ± 0,58	-24,15 ± 0,00		
AP ₆	vrh ₁	6,08 ± 0,97	-6,63 ± 0,35	-49,41 ± 9,26	-5,90 ± 0,46
	vrh ₂	7,21 ± 0,26	-10,01 ± 0,47	-17,26 ± 0,28	1,21 ± 0,09
	vrh ₃	5,15 ± 0,64	-15,65 ± 0,35		
	vrh ₄	43,17 ± 0,47	-26,19 ± 0,00		
AP ₇	vrh ₁	4,25 ± 1,71	-6,31 ± 0,46	-48,21 ± 11,75	-5,63 ± 1,20
	vrh ₂	6,88 ± 0,48	-9,29 ± 0,35	-14,79 ± 0,59	1,34 ± 0,21
	vrh ₃	4,17 ± 0,47	-14,66 ± 0,96		
	vrh ₄	50,46 ± 10,47	-21,87 ± 1,36		
AP ₈	vrh ₁	4,00 ± 1,93	-5,97 ± 0,70	-37,03 ± 0,18	-5,95 ± 0,00
	vrh ₂	5,92 ± 0,44	-9,65 ± 0,16	-13,55 ± 0,46	1,35 ± 0,09
	vrh ₃	3,94 ± 0,60	-15,31 ± 0,44		
	vrh ₄	39,61 ± 0,07	-25,09 ± 0,00		

(2 K/min) Tekoči kristali brez AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
TK ₁	vrh ₁	16,01	-6,67	9,82	-12,34
	vrh ₂	3,29	-11,82	-12,01	4,15
	vrh ₃	6,32	-15,57	-11,84	6,91
	vrh ₄			-33,15	11,42
TK ₂	vrh ₁	16,33	-6,62	2,82	-9,15
	vrh ₂	4,19	-11,69	-7,25	3,20
	vrh ₃	5,03	-15,44	-24,27	6,46
TK ₃	vrh ₁	13,49	-6,90	3,74	-9,92
	vrh ₂	5,15	-11,91	-7,50	3,41
	vrh ₃	5,25	-15,47	-17,61	6,51
TK ₄	vrh ₁	11,25	-6,11	-3,88	-28,21
	vrh ₂	3,63	-10,91	4,62	-8,90
	vrh ₃	2,53	-11,79	-25,37	6,91
	vrh ₄	5,19	-15,81		
TK ₅	vrh ₁	9,56	-5,97	-6,87	-28,25
	vrh ₂	6,08	-11,18	3,49	-8,92
	vrh ₃	4,26	-15,83	-22,73	6,95
TK ₆	vrh ₁	11,97	-6,11	-4,25	-27,48
	vrh ₂	1,89	-10,74	4,42	-8,73
	vrh ₃	2,44	-11,79	-24,51	6,82
	vrh ₄	3,73	-15,74		
TK ₇	vrh ₁	10,13	-6,11	-2,09	-27,63
	vrh ₂	3,71	-10,44	3,72	-9,15
	vrh ₃	2,84	-11,81	-23,70	6,77
	vrh ₄	5,06	-15,70		
TK ₈	vrh ₁	4,76	-6,07	-19,47	-9,83
	vrh ₂	9,73	-11,68	-18,76	4,75
	vrh ₃	3,30	-15,68	-1,44	7,51
	vrh ₄	27,09	-28,94		

(2 K/min) Tekoči kristali z AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
AP ₁	vrh ₁	19,76	-7,16	-3,02	-25,69
	vrh ₂	2,22	-11,96	4,59	-12,14
	vrh ₃	5,68	-15,54	1,38	-6,83
	vrh ₄	-1,71	-33,87	1,74	0,57
	vrh ₅	0,83	-34,74	-27,82	6,54
AP ₂	vrh ₁	13,77	-7,27	-8,50	-24,86
	vrh ₂	3,05	-10,09	2,19	-10,90
	vrh ₃	2,35	-11,32	0,39	1,80
	vrh ₄	6,65	-15,61	-24,35	6,68
	vrh ₅	14,86	-41,64		
AP ₃	vrh ₁	10,45	-6,90	-15,53	-13,24
	vrh ₂	5,81	-10,11	-17,52	6,92
	vrh ₃	4,56	-15,62		
	vrh ₄	7,80	-21,82		
	vrh ₅	20,04	-23,71		
AP ₄	vrh ₁	9,91	-6,27	-9,01	-18,43
	vrh ₂	5,78	-10,53	-28,99	-9,56
	vrh ₃	5,43	-16,04	-14,49	3,22
	vrh ₄	43,50	-26,89	-5,15	6,99
AP ₅	vrh ₁	6,94	-6,27	-8,58	-18,44
	vrh ₂	8,24	-10,21	-40,20	-6,98
	vrh ₃	3,69	-15,93	-17,48	3,14
	vrh ₄	54,76	-21,39	-1,74	7,05
AP ₆	vrh ₁	6,42	-5,82	-4,73	-18,26
	vrh ₂	9,08	-10,29	-56,84	-4,06
	vrh ₃	71,29	-17,04	-16,82	3,29
	vrh ₄			-2,53	6,87
AP ₇	vrh ₁	3,25	-3,54	-84,55	-3,05
	vrh ₂	6,28	-11,30	-14,72	2,89
	vrh ₃	7,12	-14,06	-0,93	7,03
	vrh ₄	84,77	-21,74		
AP ₈	vrh ₁	2,74	-11,96	-94,02	-2,09
	vrh ₂	93,59	-15,61	-14,34	3,80
	vrh ₃			-1,23	6,97

(10 K/min) Tekoči kristali brez AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
TK ₁	vrh ₁	16,95	-7,84	-8,73	-28,73
	vrh ₂	4,42	-11,92	3,97	-6,06
	vrh ₃	7,11	-16,05	-26,74	2,80
TK ₂	vrh ₁	16,96	-7,75	-8,75	-16,94
	vrh ₂	4,36	-11,56	6,86	-5,02
	vrh ₃	6,97	-16,35	-27,90	4,05
TK ₃	vrh ₁	15,26	-7,62	-8,97	-14,97
	vrh ₂	4,75	-5,90	7,59	-4,97
	vrh ₃	7,16	-15,92	-25,14	3,79
TK ₄	vrh ₁	15,67	-7,26	-10,87	-12,36
	vrh ₂	4,70	-11,09	9,71	-4,28
	vrh ₃	6,66	-16,14	-25,50	3,95
TK ₅	vrh ₁	13,82	-7,02	-14,04	-11,00
	vrh ₂	5,36	-11,62	9,35	-4,26
	vrh ₃	6,40	-16,19	-23,90	4,10
TK ₆	vrh ₁	5,95	-6,65	-36,43	-12,98
	vrh ₂	10,40	-12,25	-19,91	4,17
	vrh ₃	6,43	-11,29		
	vrh ₄	37,02	-29,39		
TK ₇	vrh ₁	4,03	-6,84	-29,25	-18,33
	vrh ₂	10,98	-12,21	-17,16	4,19
	vrh ₃	5,90	-12,97		
	vrh ₄	11,39	-29,22		
	vrh ₅	23,16	-29,78		
TK ₈	vrh ₁	4,18	-6,92	-39,93	-7,31
	vrh ₂	10,39	-12,21	-17,64	0,98
	vrh ₃	5,64	-13,10		
	vrh ₄	45,12	-26,71		

(10 K/min) Tekoči kristali z AP		OHLAJANJE		SEGREVANJE	
		$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]	$\Delta H \pm \sigma$ [J/g]	T_{ONSET} [°C]
AP ₁	vrh ₁	20,27	-8,61	-4,72	-12,98
	vrh ₂	4,09	-15,82	8,66	-5,69
	vrh ₃			-21,87	2,90
AP ₂	vrh ₁	13,06	-8,23	-16,17	-19,28
	vrh ₂	5,05	-8,57	6,80	-5,68
	vrh ₃	3,71	-15,72	-20,75	3,44
AP ₃	vrh ₁	12,31	-8,26	-17,19	-18,53
	vrh ₂	4,82	-5,10	4,83	-5,15
	vrh ₃	2,72	-15,80	-18,41	3,32
	vrh ₄	9,01	-35,36		
AP ₄	vrh ₁	10,05	-6,93	-37,20	-7,68
	vrh ₂	7,57	-9,20	-18,75	2,95
	vrh ₃	4,60	-10,98		
	vrh ₄	42,41	-27,10		
AP ₅	vrh ₁	7,37	-6,76	-48,50	-5,80
	vrh ₂	7,41	-10,17	-15,28	-2,44
	vrh ₃	3,89	-10,50		
	vrh ₄	53,67	-23,77		
AP ₆	vrh ₁	7,30	-6,78	-63,40	-4,41
	vrh ₂	7,12	-10,75	-17,00	-2,69
	vrh ₃	2,74	-12,51		
	vrh ₄	66,76	-20,81		
AP ₇	vrh ₁	16,20	-8,07	-72,15	-4,01
	vrh ₂	74,44	-20,51	-14,58	-2,14
AP ₈	vrh ₁	9,74	-12,05	-95,84	-2,67
	vrh ₂	6,36	-13,48		
	vrh ₃	82,57	-21,62		