

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



BOJANA ŠTAVAR

**NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI ZA DERMALNO DOSTAVO VITAMINOV E,
C IN ASKORBILPALMITATA: VREDNOTENJE STABILNOSTI IN
ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI**

**LIPID-BASED SYSTEMS FOR DERMAL DELIVERY OF α -TOCOPHEROL,
ASCORBIC ACID AND ASCORBYL PALMITATE: THE ASSESSMENT OF
STABILITY AND ANTIOXIDANT EFFECTIVENESS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom asist. dr. Alenke Zvonar.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin za vzpodbudo pri delu, asist. dr. Alenki Zvonar za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge, asist. Mirjam Gosenca, za dosegljivost in pomoč pri interpretaciji dobljenih rezultatov pri vrednotenju citotoksičnosti z MTS testom in ne nazadnje tudi zahvala mojim bližnjim za razumevanje in podporo pri doseganju tega cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Alenke Zvonar.

Bojana Štavar

Ljubljana, junij 2011

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član diplomske komisije: asist. dr. Janez Mravljak

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	V
1. SEZNAM OKRAJŠAV	VII
2. UVOD	1
2.1. ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA KOŽE.....	1
2.1.1 Koža kot mesto dermalne aplikacije	1
2.1.2 Antioksidanti v koži.....	3
2.1.3 Antioksidanti v dermalnih pripravkih	5
2.2. NOSILNI SISTEMI V DERMALNIH PRIPRAVKIH.....	13
2.2.1 Samomikroemulgirajoči sistemi.....	14
2.2.2 Mikroemulzije	15
2.2.3 Tekoči kristali	17
2.2.4 Emulzije	18
2.3. METODE ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDANTOV	18
3. NAMEN DELA	22
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. MATERIALI	23
4.1.1 Sestava sistemov	23
4.1.2 Celična kultura in reagenti.....	26
4.1.3 Ostale snovi	27
4.2. METODE	27
4.2.1 Priprava vzorcev.....	27
4.2.2 Spremljanje stabilnosti vitaminov v nosilnih sistemih	30
4.2.3 Statistična analiza rezultatov.....	33
4.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti vitaminov z difenilpikrilhidrazilno metodo	34
4.2.5 Merjenje viskoznosti	35
4.2.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija	35
4.2.7 Metode za vrednotenje citotoksičnosti.....	37
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	40
5.1. VREDNOTENJE STABILNOSTI VITAMINOV	40
5.1.1 Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost vitamina C vgrajenega skupaj z vitaminom E42	
5.1.2 Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost askorbilpalmitata vgrajenega skupaj z	
vitaminom E.....	44

5.1.3	<i>Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost vitamina E vgrajenega skupaj z vitaminom C oz. z AP</i>	46
5.2.	UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI VITAMINOV Z DPPH METODO	47
5.3.	VREDNOTENJE VISKOZNOSTI.....	55
5.3.1	<i>Odvisnost viskoznosti od strukture sistemov</i>	55
5.3.2	<i>Vpliv vgrajevanja vitaminov na viskoznost sistemov</i>	57
5.4.	DCS ANALIZA	60
5.4.1	<i>Ohlajanje vzorcev</i>	60
5.5.	UGOTAVLJANJE PREŽIVETJA CELIC Z MTS TESTOM	63
6.	SKLEPI	67
7.	VIRI IN LITERATURA	69

POVZETEK

Novejši koloidni nosilni sistemi kot so samomikroemulgirajoči sistemi, mikroemulzije, tekoči kristali, nanosistemi imajo veliko prednosti pred tradicionalnimi dermalnimi farmacevtskimi oblikami (kreme, geli, emulzije, raztopine), saj izboljšajo dermalno absorpcijo. Omenjeni sistemi lahko vplivajo na mobilnost, sproščanje in permeacijo učinkovin skozi kožo brez ireverzibilnih sprememb le-te. Samomikroemulgirajoči sistemi povečajo topnost in hitrost raztapljanja slabo topnih učinkovin in na takšen način izboljšajo biološko uporabnost le-teh. Mikroemulzije odlikuje termodinamska stabilnost, spontan nastanek in velika sposobnost solubilizacije učinkovine, medtem ko strukturna podobnost tekočih kristalov z intercelularnimi lipidi v epidermisu omogoča povečano sproščanje in permeacijo učinkovine brez ireverzibilnih sprememb kože. Zaradi omenjenih prednosti, smo jih izbrali kot nosilne sisteme za sočasen vnos antioksidantnih vitaminov; hidrofilnega vitamina C, askorbilpalmitata (lipofilni derivat vitamina C) ter lipofilnega vitamina E v kožo.

Namen diplomskega dela je bil vrednotenje stabilnosti in antioksidativne učinkovitosti vitamina C, askorbilpalmitata in vitamina E v izbranih na lipidih osnovanih nosilnih sistemih. Izbrane sisteme brez in z vgrajenimi vitamini smo tudi reološko ovrednotili ter preverili potencialno toksičnost sistemov »*in vitro*«.

Izbrali smo strukturno različne nosilne sisteme; samomikroemulgirajoči sistemi, mikroemulzije tipa voda-v-olju, tekoči kristali, mikroemulzije tipa olja-v-vodi in klasične emulzije, ki so sestavljeni iz istih komponent, razlikujejo pa se v kvantitativni sestavi. Ovrednotili smo vpliv izbranih nosilnih sistemov na stabilnost simultano vgrajenih vitaminov C in E oz. askorbilpalmitata in vitamina E, tako da smo spremljali vsebnost posameznih nerazgrajenih vitaminov v odvisnosti od časa hranjenja vzorcev pri sobni temperaturi. Ugotovili smo, da so najboljši nosilni sistemi za vgradnjo vitamina C, vgrajenega skupaj z vitaminom E tekoči kristali, medtem ko pri vitaminskem paru askorbilpalmitat in vitamin E med preskušanimi sistemi nismo ugotovili statistično pomembnih razlik.

Antioksidativno učinkovitost vitaminov, vgrajenih v izbrane nosilne sisteme, smo ovrednotili z difenilpikrilhidrazilno metodo. Obseg redukcije DPPH radikala je odvisen od faktorja redčenja nosilnih sistemov z vgrajenimi vitamini in s tem od koncentracije

vitaminskega para v testiranem vzorcu; višja kot je koncentracija vitaminskega para v vzorcu, močnejše je antioksidativno delovanje oz. več molekul DPPH radikala se reducira. Primerjali smo tudi antioksidativno učinkovitost posameznih vitaminov v metanolnih raztopinah in ugotovili, da je najbolj učinkovit askorbilpalmitat.

Izbrane nosilne sisteme smo tudi reološko ovrednotili. Sistemom brez in z vgrajenimi vitamini smo izmerili viskoznost v temperaturnem razponu od 20°C do 40°C. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da se viskoznost preiskovanih praznih nosilnih sistemov povečuje z višanjem deleža površinsko aktivnih snovi in vode. Bistveno višja viskoznost tekočih kristalov v primerjavi z ostalimi sistemi je posledica tvorbe vodikovih vezi med vodo in hidrofilnimi polarnimi glavami fosfatidilholina. Vgradnja vitaminov v izbrane nosilne sisteme pa bistveno vpliva na viskoznost le pri tekočih kristalih (le-ta se močno zniža) in mikroemulzijah tipa olja-v-vodi. Pri slednjih se z vgradnjo vitaminskega para askorbilpalmitata in vitamin E viskoznost povečuje do 26°C, nato pada in od 30°C spet raste. Vpliv vgradnje vitaminov na notranjo strukturo izbranih sistemov smo spremljali tudi s termično analizo (ohlajanje vzorcev pri temperaturi od 25°C do -70°C). Ugotovili smo, da z vgradnjo vitaminov v samomikroemulgirajoče sisteme in v mikroemulzije obeh tipov opazimo le rahle premike ustrezno izraženih vrhov k nižjim oz. višjim temperaturnim vrednostim. Po vgradnji vitaminov v tekoče kristale pa pride do izginotja prej dobro opaženega eksotermnega vrha vezane vode.

Preverili smo tudi potencialno toksičnost nosilnih sistemov z »*in vitro*« testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze. Citotoksičnost nosilnih sistemov brez vgrajenih vitaminov smo določali na celični liniji keratinocitov. Največje preživetje celic po izpostavitvi posameznim nosilnim sistemom smo ugotovili pri sistemu tekočih kristalov, kar pripisujemo odsotnosti butanola v teh sistemih.

Na osnovi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da predstavlja kombinacija vgrajenega vitaminskega para C-E v preskušane novejšje koloidne nosilne sisteme boljše izbiro kot kombinacija vgrajenega vitaminskega para AP-vitamin E. Med preskušanimi sistemi so se tekoči kristali izkazali najboljši za dermalno dostavo.

ABSTRACT

The novel developed colloidal carrier systems, such as self micro-emulsifying systems, microemulsions, liquid crystals and nanosystems have many advantages over traditional dermal pharmaceutical products (creams, gels, emulsions, solutions), because they improve dermal absorption. The aforementioned systems can enable an augmented mobility, release and permeation of active substance without irreversible skin changes. The biological usability is improved because self micro-emulsifying systems increase solubility and the speed of solution of poorly soluble substance. Microemulsions are distinguished for their thermodynamic stability, spontaneous existence and high solubilizing power of active substances, while structure similarity of liquid crystals to intercellular lipids within the epidermis enable an augmented mobility, release and permeation of active substance without irreversible skin changes. Due to these advantages they were selected carrier systems for synchronous incorporation of antioxidant vitamins; hydrophilic ascorbic acid, ascorbyl palmitate (lipophilic derivative of ascorbic acid) and lipophilic α -tocopherol into skin.

The degree deals with the evaluation of stability and antioxidant effectiveness of ascorbic acid, ascorbyl palmitate and α -tocopherol of selected lipid-based carrier systems. The selected systems, with and without incorporated vitamins, were also rheologically evaluated and the potential toxicity in vitro was assessed.

Structurally different carrier systems were selected; self micro-emulsifying systems, water-in-oil microemulsions, liquid crystals, oil-in-water microemulsions and classical emulsions. They consist of the same components, but differ in quantitative structure. The effect of selected carrier systems on the stability of synchronously incorporated ascorbic acids and α -tocopherols or ascorbyl palmitate and α -tocopherol were assessed by observing the content of individual undecomposed vitamins dependent on room temperature storage time. The results show that liquid crystals are the best carrier systems for incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol, while the two-vitamin combination ascorbyl palmitate and α -tocopherol did not show any statistically significant difference.

The antioxidant activity of vitamins, incorporated into selected carrier systems, was assessed with DPPH method. The scope of reduction of DPPH radical depends on the dilution factor of carrier systems with incorporated vitamins and, because of that, on

concentration of two-vitamin combination in test sample; the higher concentration of two-vitamin combination in the sample, the stronger antioxidant activity or more molecules of DPPH radical reduced. A comparison of antioxidant activity of individual vitamins in methanol solutions showed the best effectiveness of ascorbyl palmitate.

Selected carrier systems were also rheologically evaluated. The viscosity of systems, with and without incorporated vitamins, within the temperature range from 20°C do 40°C, was measured. The results show that the viscosity of investigated empty carrier systems increases with the rise of surface active matter and water share. An essentially higher viscosity of liquid crystals compared to other systems is a consequence of the formation of hydrogen ties between water and the hydrophilic head of the phosphatidylcholine. The incorporation of vitamins into selected carrier systems essentially influences the viscosity of liquid crystals (it decreases) and oil-in-water microemulsions. With incorporation of two-vitamin combination ascorbyl palmitate and α -tocopherol to oil-in-water microemulsions, the viscosity increases to 26°C, then decreases, and from 30°C increases again. The influence of incorporated vitamins on the inner structure of systems was observed with thermal analysis also (freezing of samples within the temperature range from 25°C to -70°C). The results show that with the incorporation of vitamins into self micro-emulsifying systems and into microemulsions of both types, only slight shifts of appropriate expressed peaks towards lower or higher temperature value appeared. After the incorporation of vitamins into liquid crystals, the before well noticed exotherm peak of bound water disappears.

The potential toxicity of carrier systems was assessed with in vitro mitochondrial dehydrogenase activity assay. The cytotoxicity of carrier systems without incorporated vitamins was assessed on keratinocyte cell line. After the exposure to the individual carrier system, the highest cell survival rate was detected by liquid crystal system and is attributed to absence of butane within these systems.

On the basis of experimental results of this degree we may conclude that the combination of ascorbic acid and α -tocopherol incorporated into observed novel developed colloidal carrier systems represents better choice than combination of ascorbyl palmitate and α -tocopherol. The liquid crystals turned out to be the best dermal delivery among the systems tested.

1. SEZNAM OKRAJŠAV

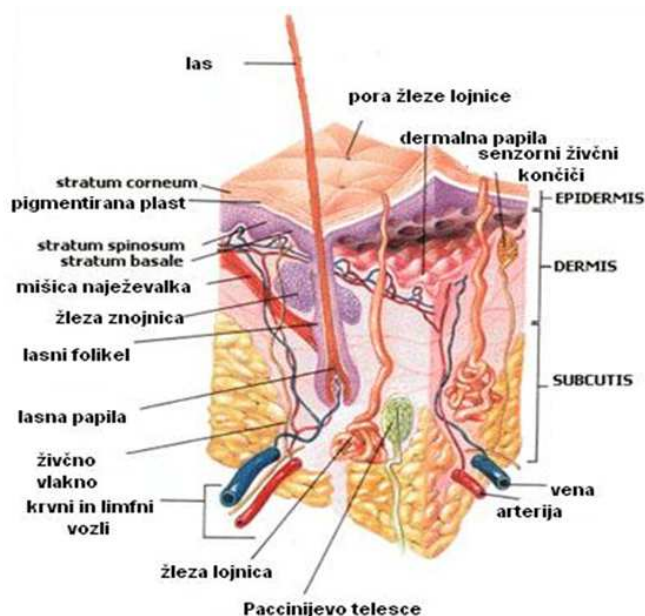
ABTS ^{•+}	radikal kation 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
AO	antioksidanti
AP	askorbilpalmitat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (<i>ang.: Differential Scanning Calorimetry</i>)
GRAS status	status varne snovi (<i>ang.: Generally Recognised As Safe</i>)
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>ang.: High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPM	izporopilmiristat
ME	mikroemulzija
MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze
O/V E	emulzija tipa olje-v-vodi, hidrofilna emulzija
O/V ME	mikroemulzije tipa olje-v-vodi, hidrofilne mikroemulzije
PAS	površinsko aktivna snov
SMES	samomikroemulgirajoči sistem
SOD	superoksid dismutaza
TK	tekoči kristali
UV	ultravijolično
V/O ME	mikroemulzije tipa voda-v-olju, lipofilne mikroemulzije

2. UVOD

2.1. ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA KOŽE

2.1.1 Koža kot mesto dermalne aplikacije

Koža je največji organ človeškega telesa. Sestavljajo jo tri plasti: zunanja plast, imenovana povrhnjica ali epidermis, srednja plast-usnjica ali dermis, ki je podporno tkivo in spodnja plast podkožje ali subcutis, ki se pretežno nahaja nad spodaj ležečimi mišicami. H koži prištevamo še kožne adneксе, kot so lasje in dlake, nohti, žleze lojnice in znojnice (1). Samo sestavo kože lepo predstavlja slika 1.



Slika 1: Zgradba človeške kože.

Epidermis je nenehno obnavljajoč se, luščiči večplasten epitelij iz najštevilčnejših keratinocitov (80%), med katerimi so še melanociti (13%), Langerhansove celice (2-4%), Merkleve celice in druga tipalna telesa. Povrhnjico delimo na štiri plasti. Od notranjosti proti zunanosti si sledijo v naslednjem vrstnem redu: stratum bazale ali bazalna plast, stratum spinosum ali trnasta plast, stratum granulosum ali zrnata plast in stratum corneum ali rožena plast. Vsaka od teh plasti predstavlja različno stopnjo razvoja v procesu diferenciacije keratinocitov. Ta proces imenujemo keratogeneza ali epidermalna keratinizacija in vodi do programirane celične smrti. Keratinizacija je vertikalno potovanje

celice po delitvi navzgor in njihovo hkratno diferenciranje. Celice kontinuirano nastajajo v bazalni plasti, migrirajo proti zunanosti in se v spinozni plasti diferencirajo. Spinozno plast sestavljajo keratinociti z jedrom, ki proizvajajo keratin, celična delitev pa v tej plasti ne poteka več. Celice v granularni plasti so precej ploščate z razpoznavnim jedrom in proizvajajo keratin, polisaharide, glikoproteine in lipide, ki povezujejo celice epidermisa med seboj. V zunanji roženi plasti celice nimajo več jedra in niso metabolično aktivne. To plast sestavljajo korneociti. To so terminalno diferencirani keratinociti, ki so napolnjeni s keratinom in so obdani z medceličnimi lipidi. Za zdravo roženo plast je značilna njena prožnost, barierna funkcija in pomembna vloga pri preprečevanju transepidermalne izgube vode iz telesa (1, 2).

Koža je v neposrednem stiku z zunanjim okoljem in ima več življenjsko pomembnih funkcij, ki se jih v vsakdanjem življenju le poredko v celoti zavedamo. Znano je, da koža ščiti organizem pred škodljivimi okoljskimi vplivi (fizikalnimi, kemičnimi in mikrobiološkimi) ter pred sončnimi žarki, vlago in izsušitvijo. Preprečuje pa tudi izhlapevanje vode, izmenjuje vodo in elektrolite, je odličen toplotni regulator, pomembno čutilo in izloča del telesu nepotrebnih snovi. Sodeluje pri imunskem odzivu in je aktivna »biotovarna« za sintezo, procesiranje in metabolizem strukturnih proteinov, glikanov, lipidov in signalnih molekul.

Ker je koža živ organ, se stalno bori proti škodljivim vplivom, katerim je izpostavljena. Tako je človeško telo tekom evolucije razvilo številne obrambne, varovalne mehanizme in se stalno ter aktivno brani tudi pred učinki radikalov, ki v koži neprestano nastajajo (predvsem v epidermisu in dermisu) po različnih poteh. Poznamo endogene in eksogene poti nastanka radikalov v koži. Pod endogeno produkcijo radikalov prištevamo oksidacijske reakcije v mitohondrijih, intenzivno fagocitozo (delovanje imunskega sistema), aktivacijo metabolizma arahidonske kisline, aktivirane nevtrofilce v celicah, različne encime (lahko posredno proizvajajo reaktivne kisikove spojine) in bolezni (vnetja, rak, luskavica). Pod eksogeno produkcijo radikalov (zaradi zunanjih vplivov) pa prištevamo ultravijolično (v nadaljevanju UV) svetlobo, onesnaženost zraka in vpliv življenjskega sloga (stres, kajenje, uživanje alkohola). Ti radikali povzročajo prezgodnje staranje (fotostaranje), izgubo elastičnosti in prožnosti kože, pojav gub, lis in pigmentacije ter maligne transformacije. Obramba pred radikali je sklopljen večstopenjski proces, organiziran na molekulski (antioksidanti, lovilci radikalov), encimski in metabolični ravni.

Pomembna je stalna in ustrezna prisotnost antioksidantov, aktivnih encimov (superoksid dismutaza (v nadaljevanju SOD), katalaza, glutathion peroksidaza) in zagotavljanje metabolične energije. Tako se koža pred vsakdanjimi negativnimi učinki UV žarkov brani s pigmentacijo in odebelitvijo poroženele plasti, z reparacijskimi mehanizmi poškodovane deoksiribonukleinske kisline (v nadaljevanju DNA), s tvorbo kože lastnih filtrskih snovi (urokaninska kislina) in z aktivacijo telesu lastnih antioksidantov, kot so vitamin E, koencim Q₁₀, glutathion (v nadaljevanju GSH), vitamin C (1, 2).

2.1.2 Antioksidanti v koži

Antioksidant je vsaka snov, ki v manjši koncentraciji v primerjavi s koncentracijo tarčne snovi oksidanta, prepreči, odloži ali zavira oksidacijo tarčne snovi. Antioksidanti (v nadaljevanju AO) lahko učinkujejo na različnih stopnjah oksidacijskega procesa. Lahko preprečijo iniciacijo lipidne peroksidacije, razgradijo perokside v neradikalne produkte ali odstranjujejo intermediarne radikale in tako prekinejo verižno reakcijo.

Poznamo tri mehanizme delovanja antioksidantov:

1. *Preventivni antioksidanti*; preprečijo nastanek nevarnih hidroksilnih radikalov, tako da nase vežejo ione kovin prehoda (najpogostejša sta železo in baker) in tako preprečijo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom. V to skupino uvrščamo protein transferin (železo-vezajoči protein) in proteine, ki vežejo baker (ceruloplazmin in albumin).
2. *Encimski antioksidanti*; katalizirajo pretvorbo radikalov ter reaktivne kisikove in dušikove spojine v manj reaktivne produkte. Ti, v celicah nahajajoči AO, so SOD, katalaza in glutathion peroksidaza.
3. *Žrtveni antioksidanti*; so donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden le-ti reagirajo z drugimi molekulami. To so vitamin C in E, ubikinol, različni β karoteni, bilirubin, organske kisline, flavoni, polifenoli, itd. Ti se oksidirajo v relativno stabilen in nereaktiven radikal, ki se bodisi regenerira ali pa izloči iz organizma (3).

Endogeni antioksidanti

V koži so normalno prisotni, a s staranjem se njihova aktivnost in količina zmanjšuje. V splošnem jih lahko delimo na encimske in neencimske.

Encimski endogeni AO:

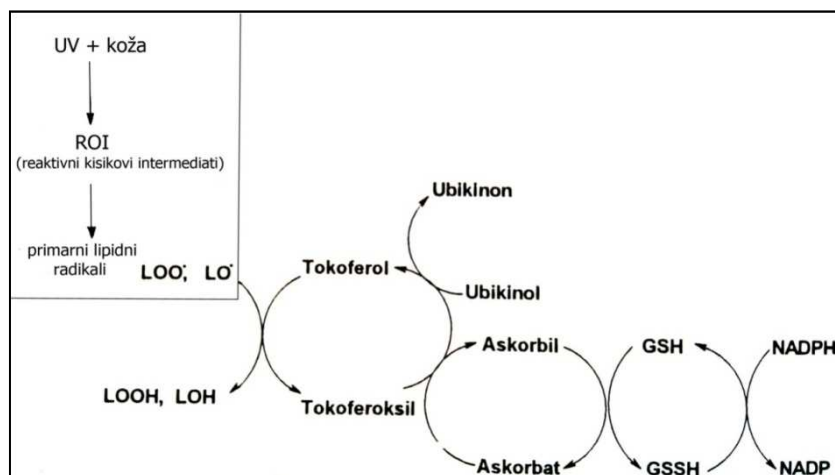
- SOD, ki katalizira pretvorbo superoksidnega radikala v vodikov peroksid.
$$2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
- Katalaza, ki odstranjuje vodikov peroksid iz celice, če je ta prisoten v velikih koncentracijah.
$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$
- Glutation peroksidaza, ki katalizira redukcijo vodikovega peroksida in prostih organskih peroksidov, pri čemer se GSH oksidira v glutacion disulfid (v nadaljevanju GSSG).
$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

$$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$
- Glutation reduktaza, ki reducira nastali GSSG do GSH.
$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Neencimske AO pa delimo na endogene (sintetizirajo se v organizmu; GSH, sečna kislina, ubikinon in bilirubin) in eksogene AO (v telo jih vnesemo s hrano; vitamin E, vitamin C, β -karoten). Le-ti AO imajo sposobnost regeneracije.

Vse več dejstev dokazuje, da je delovanje AO sinergistično. Vitamin C potencira antioksidativno učinkovitost vitamina E preko regeneracije tokoferilnega radikala v aktivno obliko vitamina E. Antioksidativni obrambni mehanizmi so torej medsebojno prepleteni, zato je ravnovesje med posameznimi AO v koži zelo pomembno. Ker oksidiran vitamin E za svoje obnavljanje troši druge antioksidante, je priporočljivo kombinirano dajanje vitamina E z AO, ki sodeluje pri njegovi obnovi, npr. vitaminom C, GSH ali karotenoidi (4).

Naša koža, kjer nastajajo radikali v normalnih reakcijah metabolizma, je obremenjena še z dodatnim nastajanjem radikalov zaradi UV-sevanja. K tej obremenitvi seveda prispevajo še drugi vplivi iz okolja (ksenobiotiki, zdravila, druga sevanja) in sam način našega življenja (stres, kajenje, neustrezna prehrana). Pri samem obsevanju kože z UV svetlobo nastajajo primarni lipidni radikali, za deaktivacijo katerih se troši metabolična energija ali natančneje za regeneracijo radikalov tokoferola, askorbata in GSSG celice kože neprestano trošijo svojo metabolično energijo (1). Spodnja slika (slika 2) prikazuje to povezanost in regeneracijo antioksidantov pri deaktivaciji lipidnih radikalov.



Slika 2: Deaktivacija lipidnih radikalov s povezanostjo in regeneracijo AO z viri metabolične energije. (LOO[·] = peroksilni radikal, LOOH = lipidni hidroperoksid, LO[·] = alkoksilni radikal, LOH = lipidni hidroalkoksid, NADPH = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana oblika) in NADP = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana oblika).) (1)

2.1.3 Antioksidanti v dermalnih pripravkih

Dokazano je, da lahko AO zaščitijo celice in tkiva pred spremembami, ki jih povzročijo dejavniki okolja (predvsem UV sevanja) in tistimi, ki so posledica fizioloških procesov v telesu (staranje). Posledica tega je vedno večje število dermalnih pripravkov z vgrajenimi AO oz. lovilci radikalov. Do nedavnega je bilo vgrajevanje AO rezervirano za področje dermalnih pripravkov, dandanes pa se širi tudi v področje kozmetičnih izdelkov. Z uporabo antioksidativnih spojin v kozmetičnih izdelkih želimo doseči dvoje: zaščititi oksidativno občutljive spojine v izdelku (nenasičene maščobne kisline, ki so sestavina rastlinskih olj, različna barvila, oksidacijsko občutljive kozmetično učinkovite spojine tiste komponente, ki so potrebne antioksidativne zaščite) in zaščititi kožo pred oksidativnimi procesi. Za doseganje zelenih rezultatov pa moramo uporabiti zelo učinkovite AO. Ti pa so zaradi velike reaktivnosti nestabilni, tako da je resnično uporabnih AO manj, kot se zdi na prvi pogled. Sama izbira AO pa je odvisna od spojine, ki jo želimo zaščititi, vrste izdelka, stabilnosti AO v izbranem sistemu, ostalih prisotnih AO in sprejemljivosti izbranega AO na koži.

V kozmetične izdelke lahko AO vgradimo kot pomožne snovi, katerih funkcija je zaščita sestavin izdelka pred oksidativnimi procesi in s tem podaljšanje roka uporabe izdelka.

Lahko jih vgradimo tudi kot kozmetično aktivne sestavine, ki podpirajo lastno obrambo kože pred poškodbami, ki jih izzovejo UV-svetloba, radikali, stres, onesnažen zrak. Takšne izdelke uvrščamo med dermatike in kozmetične izdelke, za katere se je uveljavil termin *kozmecevtiki* (ang.: Cosmeceuticals). V Sloveniji se za tovrstne izdelke pojavljajo različni izrazi, kot so funkcionalna kozmetika, aktivna kozmetika, kozmetično aktivni izdelki in podobno. Kozmecevtiki se od običajnih kozmetičnih izdelkov razlikujejo po tem, da z vsebujočimi aktivnimi sestavinami podpirajo lastno obrambo kože pred različnimi poškodbami. Mednje prištevamo izdelke z vitamini, z alfa hidroksi kislinami, z AO, s sečnino, z učinkovinami za nego aknaste kože in za preprečevanje telesnega vonja, izdelke z učinkom na pigmentacijo kože idr (5).

Vermeer in Gilchrest sta opredelila izraz »cosmeceuticals« kot izdelke, ki preprečujejo, blažijo ali odpravljajo bolezen in/ali vplivajo na strukturo ali delovanje telesa. Po njuni opredelitvi so ti proizvodi namenjeni uporabi tako v veterinarski kot humani terapiji (6). Pri nas enotnega slovenskega prevoda nimamo. Za tovrstne izdelke se uporabljajo že prej omenjeni izrazi.

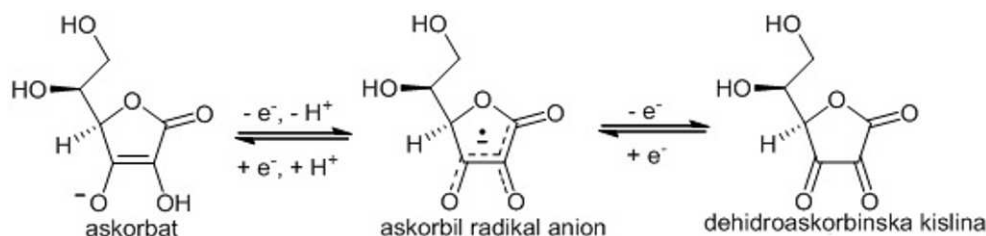
K. Burke je izdelke z vgrajenima vitamina C in E poimenovala s terminom »better cosmeceuticals«. Sklicevala se je, da njuna kombinacija v kozmetičnih formulacijah deluje sinergistično, saj vitamin C regenerira oksidirano obliko vitamina E. Čeprav mnogi kozmecevtiki vsebujejo vitamin C in/ali vitamin E jih je dejansko le malo učinkovitih za lokalno uporabo. Vzroke najdemo v slabi stabilnosti vitaminov po odprtju proizvoda in s tem izpostavitvi zraku in svetlobi ter v slabi absorpciji in metabolizmu molekul (estra ali zmesi izomerov) skozi kožo. Kadar je formulacija stabilna in zagotavlja visoko koncentracijo optimalnega izomera vitamina C in E, le-ta dejansko zavira akutne UV poškodbe, kot so eritem, sončne opekline kot tudi kronično fotostaranje in kožnega raka. Tako njuna kombinacija deluje sinergistično, čeprav se nahajata v različnem področju kože (vitamin E v lipidnem področju kože medtem ko vitamin C v hidrofilnem področju) (7).

Najpogosteje uporabljeni AO:

VITAMIN C IN DERIVATI

Vitamin C ali askorbinska kislina je vodotopen vitamin in je eden izmed najbolj raziskanih antioksidantov. Zaradi svojih elektron donorskih lastnosti askorbat deluje kot lovilec radikalov. Naš organizem ga ne sintetizira, zato ga moramo v telo vnašati s hrano kot so

citrusi in zelenjava. S hrano vnesena L-askorbinska kislina (biološka aktivna oblika vitamina C) se v telesu pretvori v L-dehidroaskorbinsko kislino, ki ima vitaminsko aktivnost, preko askorbilnega radikala. Reverzibilna redoks reakcija med obema oblikama je pomembna zaradi antioksidativne aktivnosti vitamina C, tako se le-ta regenerira in ponovno vstopa v oksidacijske reakcije (slika 3).



Slika 3: Oksidacija askorbata.

Vitamin C je pomemben za ohranjanje zdrave kože in:

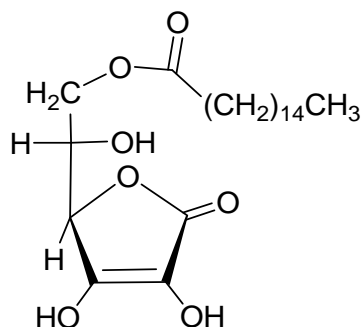
- spodbuja nastanek bariernih lipidov v roženi plasti.
- Regenerira α -tokoferilni radikal v α -tokoferol na medfazi voda/lipidna membrana. Tako askorbat posredno ščiti lipidne membrane pred reaktivnimi kisikovimi zvrsti z redukcijo α -tokoferilnega radikala.
- Kovinske ione vzdržuje v reducirani obliki, ki so potrebni za delovanje encimov in zaradi te svoje funkcije je pomemben v biosintezi kolagena, karnitina, noradrenalina in aktivaciji peptidnih hormonov. Ta učinek je viden kot direktna stimulacija sinteze kolagena v fibroblastih in kot antioksidativna zaščita že nastalih kolagenskih struktur pred škodljivimi učinki radikalov.
- Deluje antioksidativno, kar sodi med njegove najpomembnejše učinke (reagira z mnogimi radikali intracelularno).
- Uporablja se tudi kot AO v kombinaciji z UV filtri, saj ščiti pred UV poškodbami. Sam po sebi se ne uporablja za zaščito pred soncem, ker ne absorbira svetlobe v UV spektru, vendar kot AO deaktivira UV inducirane radikale in zmanjšuje UVB eritem.
- Vpleta pa se tudi v melanogenezo. Sama sinteza melanina je pod njegovim vplivom inhibirana preko mehanizma direktne inhibicije tirozinaze (ključnega encima v sintezi). Melanin tako ne more nastati, dokler ni oksidirana vsa askorbinska kislina. Hkrati pa lahko vitamin C reducira že sintetiziran melanin in tako posvetli polt (izdelki za posvetlitev kože in beljenje sončnih peg).

- Je kofaktor encima za sintezo kolagena, saj sodeluje v hidroksilaciji prokolagena. Študije kažejo, da lahko stimulira sintezo kolagena direktno preko aktivacije transkripcije in stabilizacije informacijske ribonukleinske kisline za prokolagen.

Sama askorbinska kislina je za vgrajevanje v kozmetične izdelke neprimerna, ker se zlahka oksidira, še posebej v aerobnih pogojih in pod vplivom svetlobe, pri čemer se ireverzibilno razgradi do biološko neaktivnih produktov. Zaradi tega teži kozmetična industrija k uporabi derivatov vitamina C, ki bi bili stabilni in sposobni prehajati skozi kožo. Pogosto vgrajeni v dermalne izdelke so estri vitamina C z maščobnimi kislinami in fosfatni estri in etri le-teh z glukozo. Tako imajo derivati večjo kemično stabilnost, razlikujejo pa se v hidrofilnih lipofilnih lastnostih, ki določajo sposobnost prehajanja kože (1, 8).

Askorbilpalmitat (lipofilni derivat vitamina C)

Askorbilpalmitat (v nadaljevanju AP) je ester askorbinske kisline s palmitinsko kislino (slika 4), ki je pripeta na mestu 6, z enakim fiziološkim in farmakološkim delovanjem, kot ga ima vitamin C. Esterifikacija na mestu 2 in 3 preprečuje oksidacijo obroča. Ti derivati nimajo reducirajočih lastnosti, so neke vrste predzdravilo; pod vplivom esteraz se estrska vez cepi in nastane aktivna oblika. Z esterifikacijo na mestu 6 pa ohranimo te lastnosti. Esterska oblika nima izraženih kislih lastnosti in ne povzroča iritacije kože, saj ima nevtralen pH. Zaradi lipofilnega značaja AP zlahka prehaja roženo plast, zato je smiselna uporaba tega derivata. Esterifikacija s palmitinsko kislino sicer zmanjša hidrolizo askorbinske kisline, vendar kljub temu ne zagotovi zadovoljive stabilnosti spojine v končnih izdelkih. Zato je ključna izbira optimalnega nosilnega sistema z veliko solubilizacijsko kapaciteto, ki pa mora obenem zagotoviti tudi stabilnost same učinkovine. V kozmetičnih izdelkih se AP veliko uporablja kot AO za zaščito lipofilnih sestavin (v koncentracijah od 0,05 do 0,1%) ali kot kozmetično aktivna snov z učinki v koži (v koncentracijah 1 do 2%), saj se s hidrolizo pretvori v aktivno askorbinsko kislino (1).



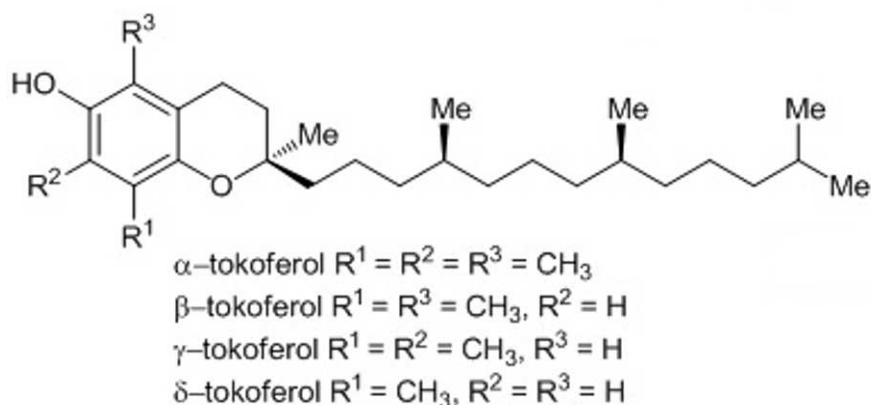
Slika 4: Strukturna formula AP.

P. Jurkovič s sodelavci je proučevala antioksidativno delovanje AP, vgrajenega v mikroemulzije kot dostavne sisteme, na koži. Ugotovila je, da sta tako sproščanje učinkovine kot sama penetracija skozi stratum corneum močno odvisna od tipa mikroemulzije. Iz mikroemulzije tipa voda-v-olju se sprosti več AP kot iz mikroemulzije tipa olje-v-vodi, le-ta pa je zagotavljala večjo učinkovitost AP. Kot možen vzrok so navedli hidratacijo kože z zunanjo vodno fazo mikroemulzije tipa olje-v-vodi in s tem olajšan prehod spojine skozi stratum corneum. Tako AP ne prehaja samo zaradi koncentracijskega, temveč tudi zaradi osmotskega gradienta. AP se zaradi svoje kemijske strukture in amfifilnega značaja, v mikroemulzije vključi v emulgatorski film na medfazi olje/voda. Z lipofilnim delom (palmitinsko verigo) se orientira v oljno fazo, s hidrofilnim delom molekule (laktonski obroč), ki je občutljiv na oksidacijo, pa se orientira v hidrofilno fazo dostavnega sistema. Pomen takšne porazdelitve je v večji stabilnosti same učinkovine (9).

R. Austria in sodelavci so proučevali stabilnost derivatov vitamina C (AP, magnezijev askorbilfosfat) v raztopini in različnih dermalnih farmacevtskih sistemih. Primerjali so stabilnost AP in magnezijevega askorbilfosfata v primerjavi z askorbinsko kislino in dokazali so, da sta oba derivata bolj stabilna. Esterifikacija s palmitinsko kislino na mestu 6 sicer ni preprečila hidrolize molekule, ne v raztopini niti v emulziji. Izkazalo pa se je, da je stabilnost AP odvisna od strukturnih lastnosti nosilnega sistema. Emulzije tipa olje-v-vodi so manj primerne za vgradnjo AP kot kremni geli z večjo viskoznostjo (10).

VITAMIN E

Vitamin E je lipofilni endogeni AO oz. v maščobah topen tokoferol. Znanih je osem tokoferolov naravnega izvora, ki delujejo kot vitamin E. Med seboj se razlikujejo v številu in razporeditvi metilnih skupin na kromanskem obroču (slika 5). V sesalskih tkivih so našli čist RRR- α -tokoferol (ali D- α -tokoferol), ki ima daleč največjo biološko aktivnost. Druge naravne oblike so β , γ in δ , ki vsebujejo samo eno ali dve metilni skupini na kromanskem obroču. Glede na α obliko β , γ in δ RRR-tokoferol dajejo le 42%, 72% in 40% zaščito pred UV edemom (11).



Slika 5: Strukturna formula tokoferolov.

Vitamin E se nahaja v rastlinskih oljih z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin (olivno, sojino olje), v človeškem organizmu pa je njegova koncentracija odvisna predvsem od vnosa s hrano. Vitamin E je v roženi plasti kože porazdeljen tako, da so najvišje koncentracije v globljih plasteh in najnižje v plasteh, ki so bližje površju kože in so najbolj izpostavljene vplivu oksidativnega stresa sončne svetlobe in onesnaženega zraka (12).

Delovanja in vloge vitamina E:

- sodeluje pri oksidacijsko redukcijskih procesih.
- Preprečuje tvorbo peroksidov iz nenasičenih maščobnih kislin membranskih lipidov in oksidacijo drugih fizioloških spojin. V teh reakcijah se tvori stabilen tokoferilni radikal, ki ga običajno regenerirajo askorbat, GSH in ubikinon.
- Učinkovit pri preprečevanju lipidne peroksidacije zaradi UV sevanja in tvorbe tumorjev kože.

- Membrano varuje pred produkti hidrolize fosfolipidov in ureja fluidnost lipidnega dvosloja.
- Posredno deluje kot vlažilec kože in izboljša njeno elastičnost (varuje lipide in lipoproteine celičnih membran, obenem pa ohranja njihovo sposobnost vezanja vlage).
- Zmanjša nastajanje gub, ki jih povzročijo UVB žarki ali vsaj upočasnijo njihov nastanek.
- Ohranja visoko aktivnost SOD, ki se močno zmanjša po obremenitvi z UV sevanjem.
- Pripisujemo mu tudi protivnetno delovanje na koži, ker inhibira produkcijo vnetnih mediatorjev (histamin). Deluje na eikozanoide in zmanjša sintezo prostaglandina E2, kar stabilizira membrane lizosomov in zveča sintezo interleukina-2. Tako povzroči imunostimulacijo in protivnetni učinek (13).

Vitamin E na svetlobi ni stabilen, zato razpade in pri tem se tvorijo tokoferilni radikali, ki se regenerirajo s pomočjo vitamina C in GSH. V presežku pa lahko celo povzročijo lipidno peroksidacijo. Temu problemu se izognemo z uporabo derivatov vitamina E (α -tokoferol acetat, α -tokoferol linoleat), kateri izkazujejo boljše stabilnost. Ti estri tokoferola prehajajo epidermis pri dermalni aplikaciji, vendar je potrebna transformacija v biološko aktivno obliko (hidroliza estra). To je reakcija, ki omejuje biološko aktivnost estrov tokoferola (14). Izdelki z vitaminom E se uporabljajo pri suhi koži, aknah, ishemični koži, za nego kože v zrelih letih, v kozmetičnih izdelkih pa ima tudi vlogo stabilizatorja formulacije (15).

Sočasna uporaba vitamina C in E

Zanimiva strategija za zaščito kože pred pretiranim izpostavljanjem radikalom je podpora kože z endogenimi antioksidanti, ki so v medsebojnem ravnotežju. Zaželena je kombinirana terapija z uporabo najmanj dveh antioksidantov. Veliko študij je bilo narejenih na različnih izbranih nosilnih sistemih za dermalno dostavo vitaminov C in E. Ta kombinacija se je izkazala za zelo ugodno in stabilno antioksidativno terapijo (11).

B. Rozman in M. Gašperlin sta spremljali stabilnost vitaminov C in E v mikroemulzijah za kombinirano antioksidativno lokalno terapijo. Mikroemulzije so obetavni sistemi za sočasno aplikacijo večih AO (npr. vitaminov C in E) na kožo zaradi njihove sposobnosti

vkjučitve hidrofilnih in lipofilnih molekul v istem sistemu. Poleg tega zagotavljajo zaščito pred (foto)oksidacijo obeh vitaminov, izboljšajo raztapljanje vitamina E in s tem povečajo njegovo biorazpoložljivost. V izvedeni študiji sta ugotovili, da je mikroemulzijski gel najboljši zaščitni sistem za oba vitamina, kateremu sledijo mikroemulzije tipa olje-v-vodi in mikroemulzije tipa voda-v-olju. Dokazali sta, da mikroemulzije tipa voda-v-olju bolje ščitijo vitamin E pred UV svetlobo kot sama oljna faza. Vzrok je v večjem deležu površinsko aktivnih snovi (v nadaljevanju PAS) v mikroemulziji (4).

UBIKINON

Ubikinon ali koencim Q₁₀ je endogeni AO in vitaminom podobna snov, vendar ga ne uvrščamo med vitamine, ker ga človeško telo lahko sintetizira. Kemijsko je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil benzokinon. Človeški ubikinon je spojina z desetimi izoprenilnimi enotami v stranski verigi. Tako je zaradi lipofilne stranske verige topen v lipofilnih medijih. Je pomožni substrat v dihalni verigi. Ubikinon v dveh zaporednih stopnjah sprejme elektron in preide v ubinol; reducirana oblika ubikinona deluje kot AO. Z oksidacijo se povrne nazaj v prvotno obliko. Deluje lahko preko direktne reakcije z radikali ali preko regeneracije α -tokoferola in askorbata. Kot lovilec radikalov ima nižji redukcijski potencial kot vitamina C in E. Po dajanju ubikinona na kožo pride do zmanjšanja oksidacijskih procesov v človeškem epidermisu, zmanjšanja kožnih gub, povečanja sinteze DNA in hialuronske kisline v človeških kožnih fibroblastih. Pri uporabljanju ubikinona v kozmetičnih izdelkih se obračamo na njegove dobre lastnosti; ne iritira, je relativno termostabilen, fotostabilen in ni citotoksičen (14, 15).

GLUTATION

Glutation (GSH) je endogeni, vodotopni tripeptid (γ -L-glutamil-L-cisteinil-L-glicin) s prosto sulfhidrilno skupino, ki ima najpomembnejšo vlogo pri obrambi celic pred oksidacijskimi poškodbami v vseh tkivih. V celici ima pomembno vlogo pri sintezi proteinov ter DNA, transportu aminokislin in na splošno pri detoksifikaciji celice. Sposoben je reducirati disulfidne skupine v encimih, ki so nastale zaradi delovanja radikalov in tako ponovno vzpostaviti njihovo aktivnost. Neposredno deluje kot lovilec radikalov in tudi kot proton donor za številne druge endogene AO. Tako je za delovanje antioksidativnega sistema kože nujna zadostna količina GSH. Zdravljenje z dermalnimi

pripravki z GSH ni uspešno. Vzrok je v velikosti in naboju same molekule, kar povzroči slabo prehajanje v keratinocite. Z uporabo estrov GSH (metilni, etilni, izopropilni estri GSH) pa se prehod v celico močno poveča (14, 15).

RASTLINSKI ANTIOKSIDANTI

Rastlinske antioksidante najpogosteje najdemo v zelenjavi, sadju in zeliščih. Lahko jih razdelimo v štiri večje skupine spojin:

- *vitamini*; definirani kot organske spojine in v zelo majhnih količinah nujno potrebni za normalno delovanje človeškega organizma. Delujejo kot koencimi ali prekursorji za koencime.
- *Karotenoidi*, ki so velika skupina naravnih pigmentov, znanih kot prekursorji vitamina A. Najpomembnejši predstavnik karotenoidnih AO je β -karoten, ki ščiti rastlinske celice pred fotooksidacijskimi poškodbami. Interagira predvsem s singletnim kisikom ter zmanjša njegovo reaktivnost.
- *Fenolne spojine* so zelo raznolike spojine. Mednje prištevamo fenolkarboksilne kisline, čreslovine in flavonoide. Poleg neposrednega učinka (lovljenja radikalov) najverjetneje delujejo tudi posredno, tako da vzpodbudijo prepisovanje genov za endogene AO in razstrupljevalne obrambne mehanizme (14).
- *Encimi*, med katere prištevamo tudi ubikinone.

AO iz rastlin predstavljajo veliko skupino aditivov in so sestavni del tako dermalnih kot kozmetičnih izdelkov. V posamezni rastlini se pogosto nahaja več različnih AO s sinergističnim delovanjem, zato iz teh rastlin pripravljamo izvlečke, katere enostavno vgrajujemo v izdelke (14, 15).

2.2. NOSILNI SISTEMI V DERMALNIH PRIPRAVKIH

Da dosežemo učinkovitost dermalnega izdelka, moramo doseči harmonijo med kožo, aktivno spojino in nosilnim sistemom. Osnovna zahteva za uspešno aplikacijo na kožo je ugodna porazdelitvena lastnost sistema, da lahko dospe do vseh predelov na koži, ki ni gladka, ampak ima reliefno strukturo. Pojem nosilni sistemi predstavlja sisteme, ki aktivno spojino sprejmejo, jo ščitijo in dostavijo na mesto delovanja ter jo tam v nekem

optimalnem času tudi nadzorovano sproščajo. Za nosilne sisteme se zahteva, da morajo biti biokompatibilni, biološko razgradljivi in fizikalno-kemično stabilni v prisotnosti samega biološkega sistema in aktivne spojine. Najpogostejši tradicionalni nosilni sistemi za dermalno dostavo so emulzije, geli, kreme. Novejši koloidni nosilni sistemi (samomikroemulgirajoči sistemi, mikroemulzije, tekoči kristali, nanosistemi) izkazujejo veliko prednosti pred omenjenimi tradicionalnimi dermalnimi farmacevtskimi oblikami. Odlikuje jih povečana mobilnost, sproščanje in permeacija učinkovin brez ireverzibilnih sprememb kože. S sodobnimi nosilnimi sistemi pa je povezana tudi tehnologija nadzorovanega sproščanja. To področje je bilo do nedavnega rezervirano za zdravila, dandanes pa se širi ne samo na dermalne temveč tudi na kozmetične izdelke. Namen je predvsem zagotavljanje stabilnosti in podaljšane prisotnosti aktivnih sestavin na koži in tako zagotavljati dalj časa trajajoč učinek. Novejše nosilne sisteme odlikujejo še ostale ugodne lastnosti, kot so: premagovanje inkompatibilnosti med sestavinami, zaščita aktivnih snovi pred oksidacijo ali razgradnjo, izboljšanje organoleptičnih lastnosti končnega izdelka (zaščita pred oksidacijo preprečuje obarvanje izdelka) in zmanjšanje iritacije aktivnih spojin (kapsuliranje alfa hidroksi kisline) (16).

2.2.1 Samomikroemulgirajoči sistemi

Samomikroemulgirajoči sistemi (v nadaljevanju SMES) so definirani kot transparentne in izotropne zmesi lipidov, PAS, enega ali več hidrofilnih sopolimerov ali koemulgatorjev, ki v prisotnosti vodne faze spontano tvorijo bistro mikroemulzije. Velikost kapljic iz njih nastalih mikroemulzij je pod 140 nm, porazdelitev njihove velikosti pa je ozka. Ti sistemi povečajo topnost in hitrost raztapljanja slabo topnih učinkovin in na takšen način izboljšajo biološko uporabnost. Tako so se izkazali kot primerni nosilni sistemi za lipofilne učinkovine. Na njihovo zapostavljenost v praktičnem življenju pa pomembno vpliva visoka vsebnost PAS in dejstvo, da po redčenju z vodo nastanejo stabilne mikroemulzije le pri določenem deležu vode.

Tako z dodatkom vodne faze v SMES lahko pripravimo sisteme z različno notranjo strukturo, kot so mikroemulzije, tekoči kristali in emulzije tipa olje-v-vodi (17, 18).

2.2.2 Mikroemulzije

Mikroemulzije (v nadaljevanju ME) so termodinamsko stabilne, bistre disperzije vodne in oljne faze razvite z namenom nadzorovane dostave vgrajenih učinkovin. Stabilizirane so z medfaznim filmom molekul PAS (emulgatorjev). Z ustrezno izbiro emulgatorja in koemulgatorja, z ustreznimi hidro-lipofilnimi lastnosti, znižamo medfazno napetost med oljno in vodno fazo in tvorimo gibljiv film okrog kapljic. Velikost kapljic notranje faze je manjša od 140 nm, kar jim daje prozoren oziroma opalescenten videz, saj šibko sipljejo svetlobo in jih hkrati uvršča v koloidne nosilne sisteme. V preglednici I so prikazane glavne razlike med ME in klasičnimi emulzijami.

Preglednica I: Primerjava mikroemulzij in klasičnih emulzij.

Lastnost	Mikroemulzije	Emulzije
Nastanek	spontan	potrebno je vložiti delo
Termodinamična stabilnost	stabilne	nestabilne
Videz	Prozoren do opalescenten	Moten, mlečen
Velikost kapljic dispergirane faze	Manj kot 0.2 μm	Od 0,2 do 10 μm
Koncentracija PAS	Več kot 10%	Od 1 do 20%
Uporaba koemulgatorja	Da	Ne
Viskoznost	Nižja	Višja

Glede na zunanjo fazo ME ločimo dva osnovna tipa:

- **Hidrofilne ME** (ME tipa olje-v-vodi; v nadaljevanju O/V ME), ki vsebujejo oljna področja, obdana z emulgatorskim filmom, v kontinuirani vodni fazi.
- **Lipofilne ME** (ME tipa voda-v-olju; v nadaljevanju V/O ME), kjer se področja vodne faze nahajajo v kontinuirani oljni fazi.

ME nastanejo spontano in so termodinamsko stabilne. Optična transparentnost in nizka viskoznost jim zagotavljata ustrezen izgled in uporabo. Njihov največji potencial pa je visoka stopnja penetracije skozi roženo plast kože in velika sposobnost solubilizacije lipofilnih, hidrofilnih ter amfifilnih snovi. Lipofilne komponente in emulgatorji v ME delujejo kot pospeševalci penetracije, saj spremenijo fluidnost lipidnih dvoslojev.

Hidrofilne komponente ME pa hidratirajo zgornjo plast kože in tako povečajo prehod hidrofilnih molekul. Za ME pa je tudi značilno, da vsebujejo precejšen delež PAS, kar omejuje njihovo terapevtsko uporabo. PAS so znane kot potencialno toksične snovi, ki povečujejo permeabilnost celic, tako da rušijo strukturo celične membrane. Te lastnosti lahko pri nizkih koncentracijah izkoriščamo za povečanje absorpcije polarnih učinkovin skozi membrane. Do poškodb membrane in posledično do apoptoze celic pa lahko pride pri visokih koncentracijah PAS. Sama stopnja toksičnosti posameznega emulgatorja je odvisna od *in vivo* koncentracije in njegove kemijske strukture (16, 19). Njihova slabost je tudi občutljivost na zunanje dejavnike, to so temperatura, pH in kisik. Zaradi njih lahko pride do porušitve strukture ME, spremembe topnosti vgrajenih učinkovin in oksidacije sestavin sistema (19).

Velika solubilizacijska sposobnost ME je posledica njihove specifične strukture, ki omogoča relativno velik delež vodne oziroma oljne faze. Bistvenega pomena pri načrtovanju sistemov za dermalno aplikacijo je zagotavljanje ustrezne solubilizacije, ker zgolj raztopljena učinkovina prehaja iz nosilnega sistema v kožo. Za učinkovito dermalno dostavo učinkovine pa je tudi bistvenega pomena mobilnost same učinkovine v ME. Le-ta je zelo velika zaradi dinamičnosti nosilnega sistema. Posledica je hitrejša difuzija učinkovine na površino kože in povečan transdermalni tok (20).

Sama specifična zgradba ME omogoča vgradnjo hidrofilnih, lipofilnih in amfifilnih učinkovin. To ne omogoča samo nadzorovanega sproščanja učinkovin, zaščite labilnih učinkovin, zakrivanja neprijetnega okusa in vonja temveč tudi hkratno dostavljanje dveh različno polarnih učinkovin. Učinek podaljšanega sproščanja učinkovine dosežemo z vgradnjo učinkovine v notranjo fazo ME. Lipofilno spojino vgradimo v notranjo oljno fazo O/V ME, hidrofilno spojino pa v notranjo vodno fazo V/O ME. Istočasno na ta način dosežemo tudi večjo zaščito učinkovine pred zunanjimi vplivi (19).

ME so po definiciji tekoči sistemi in kot take niso optimalen sistem za nanos. V ta namen jim običajno dodajamo zgoščevala, s katerimi povečamo viskoznost, kar omogoča lažji nanos na kožo in daljše zadrževanje na mestu nanosa. *B. Rozman* s sodelavci je raziskovala vpliv koloidnega silicijevega dioksida (zgoščevala) na absorpcijo vitaminov C in E v izolirani koži prašičjega ušesa. Z dodatkom zgoščevala je prišlo do povečanja porazdelitvenega koeficienta vitaminov C in E. Opazila pa je tudi povečano topnost vitaminov, v obeh tipih ME, z njihovo vključitvijo v notranjo fazo sistema. Domnevala je,

da je vzrok za to mogoče iskati v večji afiniteti vitaminov do notranje faze kot posledica delcev koloidnega silicijevega dioksida z veliko površino (21).

2.2.3 Tekoči kristali

Tekoči kristali (v nadaljevanju TK) so vmesno stanje med trdnim in tekočim, s tem izkazujejo lastnosti trdne snovi (anizotropnost, dvojni uklon svetlobe, urejenost, mehanska stabilnost) in lastnosti tekočin (površinska napetost, fluidnost, pretok). Sestavljajo jih koherentni dvosloji PAS laminarne ali heksagonalne anizotropne strukture. Glede na nastanek jih delimo na termotropne, ki nastanejo s segrevanjem trdne snovi in liotropne, ki nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi in jih navadno tvorijo amfifilne snovi. Liotropne TK delimo na lamelarne, heksagonalne ter kubične. Razširjeni so v naravi (npr. v celičnih membranah), pogosta oblika pa so tudi v farmacevtskih formulacijah. Termotropni TK pa so predvsem sinteznega izvora.

Ugodni so kot dostavni sistemi za dermalne izdelke, saj izkazujejo večjo stabilnost in večjo viskoznost (ni potrebno dodajati večje količine zgoščeval) v primerjavi z ostalimi dostavnimi sistemi. Omogočajo tudi nadzorovano sproščanje in dajajo prijeten občutek na koži.

Njihova lamelarna struktura izkazuje podobnost z intercelularnimi lipidi v epidermisu. Tako so bili tudi TK vključeni v veliko raziskav z namenom razvoja novih dermalnih farmacevtskih oblik. Izkazujejo dobre penetracijske lastnosti zaradi nizke medfazne napetosti na medfazni meji, ki je dosežena z uporabo neionskih emulgatorjev. Tako je omogočena postopna difuzija učinkovin v kožo. Ne povzročajo ireverzibilnih iritacij kože. Imajo veliko solubilizacijsko kapaciteto, kar jim omogoča, da povečajo topnost učinkovin, ki so slabo vodotopne. Raziskave so tudi pokazale, da sama lamelarna struktura TK omogoča vključitev strukturne vode v hidrofilna področja sistema. Tako se (v primerjavi z emulzijami tipa olje-v-vodi) zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacija kože. Tako nudijo ugoden občutek na koži po dermalni uporabi, odlikuje jih pa tudi ugodna konsistenca in atraktiven videz (16, 22).

2.2.4 Emulzije

Klasične emulzije (v nadaljevanju E) so heterogeni pripravki, sestavljeni iz dveh nemešajočih se tekočin (vodna in oljna faza), od katerih je ena (kot notranja faza) enakomerno dispergirana v obliki majhnih kapljic (velikosti $0,1 \mu\text{m} - 50,0 \mu\text{m}$) po celotnem volumnu druge tekočine, ki predstavlja zunanjo fazo. Za stabilizacijo takšnega sistema, ki je termodinamsko nestabilen, je potreben dodatek tretje komponente, to so PAS, imenovane emulgatorji. Ti tvorijo medfazni film okoli emulgiranih kapljic in s tem znižajo medfazno napetost med oljem in vodo, kar sistem stabilizira. Poznamo dve vrsti klasičnih emulzij:

- **Emulzije tipa olje-v-vodi** (v nadaljevanju O/V E); olje je notranja, dispergirana faza, voda pa zunanja faza oz. disperzni medij
- **Emulzije tipa voda-v-olju** (v nadaljevanju V/O E); voda je notranja, dispergirana faza, olje pa zunanja faza.

Emulzije sodijo med najbolj široko uporabljene sisteme tudi v kozmetiki. Na tržišču so najpogosteje v tekoči obliki (mleka ali losjoni za telo) ali kot poltrdne emulzije (kreme). Poltrdne emulzije sestavlja trdno ogrodje (tvorijo ga sestavine v trdnem agregatnem stanju), na katerega so s šibkimi vezmi adsorbirane tekoče komponente. Omenjena tekoča in trdna faza imata različen značaj, ena je lipofilna, druga pa hidrofilna. Zaradi same lipofilne in hidrofilne faze, ki sestavljata emulzijo, pa lahko vanje dispergiramo različne kozmetično učinkovite spojine (16).

2.3. METODE ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDANTOV

Radikali nastajajo v organizmu v normalnih fizioloških procesih (npr. celično dihanje), zato je človeško telo razvilo številne obrambne mehanizme. Le-ti bodisi popravljajo poškodovano DNA bodisi celice varujejo pred radikali. Radikale lovijo in jih onesposablajo različni AO. Če pride do porušanja ravnotežja med nastajanjem radikalov in antioksidativno obrambo ter prevladuje nastanek prvih, lahko pride do poškodb organizma (npr. oksidativne poškodbe celic). Da bi lahko ugotovili učinke radikalov na celice, je slednje treba znati pravilno določiti.

Za »*in vitro*« določanje antioksidativne učinkovitosti so na voljo različne metode, ki temeljijo na različnih principih; od relativno enostavnih spektroskopskih metod, s katerimi določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali, do metod, s katerimi določamo vpliv AO na stabilnost realnih vzorcev, kot so proteini ali lipidi. Kompleksna sestava snovi in zapletenost oksidacijskih procesov, ki potekajo v različnih sistemih, zahtevajo uporabo različnih metod. Na podlagi ene same metode dobljenih rezultatov ne moremo natančno interpretirati in jih dokončno potrditi, zato večjo zanesljivost dosežemo z uporabo različnih analitičnih metod (23, 24).

Izraz »aktivnost« antioksidantov, ki se uporablja v literaturi, ima lahko različne pomene in se lahko navezuje tako na lovljenje radikalov, katalitično razgradnjo, pro-oksidativno zaviranje, koncentracijsko učinkovitost kot tudi na sinergistično učinkovitost z ostalimi antioksidanti. Ne glede na pomen izraza pa je bistveno da je aktivnost antioksidantov ustrezno izmerjena in potrjena z eno ali večimi metodami za določanje antioksidativne aktivnosti (24).

M. Antolovich in sodelavci so preučevali različne metode, ki vključujejo različne mehanizme za merjenje antioksidativne aktivnosti. Le-te kažejo izredno raznolikost. Učinkovitosti AO ni mogoče neposredno izmeriti, ampak jo običajno merimo posredno s pomočjo spremljanja učinkov AO pri nadzoru obsega reakcije oksidacije (24).

Antioksidativno aktivnost lahko merimo preko;

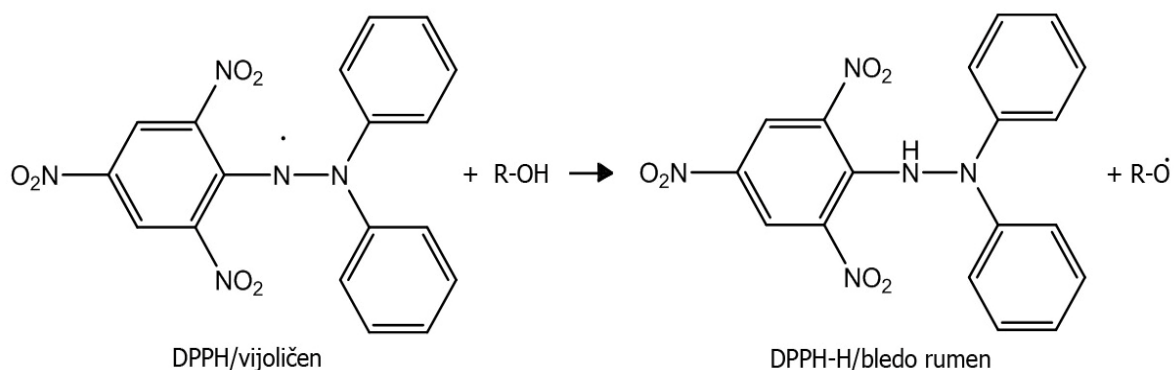
- določanja antioksidativne moči redukcije železa (iz feri iona v fero obliko z ang.: Ferric Reducing Antioxidant Power assay),
- učinkovitosti lovljenja kisikovih radikalov (z ang.: Oxygen Radical Absorbance Capacity in Total Radical-trapping Antioxidant Parameter assay),
- lovljenja hidroksilnih radikalov z deoksiribozno metodo,
- lovljenja radikalov z difenilpikrilhidrazilno metodo (v nadaljevanju DPPH) in 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsko kislino) (v nadaljevanju ABTS metodo).

Primer določanja aktivnosti antioksidantov je uporaba obarvanih radikalov, kot sta npr. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (v nadaljevanju DPPH radikal) in radikal kation 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (v nadaljevanju ABTS^{•+}), kjer ne določamo antioksidativne

učinkovitosti direktno, marveč določimo sposobnost antioksidanta, da odda vodikov atom, čeprav sta ti dve lastnosti včasih neposredno povezani (25, 26).

DPPH METODA

Molekula DPPH ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z lastnim maksimumom, kar pomeni, da lahko njeno koncentracijo določamo spektrofotometrično. Intenzivnost signala molekule DPPH je v obratnem sorazmerju s koncentracijo analiziranega antioksidanta in reakcijskim časom. Molekula DPPH je stabilen radikal, ki ima nesparjen elektron delokaliziran po celotni molekuli. Ta prosti elektron omogoča stabilnost molekule, saj tako le-ta ne dimerizira, kot se zgodi pri večini ostalih radikalov. Delokalizacija je vzrok intenzivne vijolične barve raztopine, katere absorpcijski maksimum je pri valovni dolžini okoli 515 nm. Na sliki 6 je prikazana reakcija DPPH radikala z antioksidantom; DPPH se reducira do 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina, iz molekule AO pa nastane nov radikal, ki v naslednji stopnji reakcije reagira z novo molekulo DPPH. Tako pri dodatku donorja vodikovega atoma, kot je AO, pride do padca absorbance, kar je tudi opazno z razbarvanjem vijolične raztopine do belo rumene barve.



Slika 6: Reakcija DPPH radikala (levo) z AO.

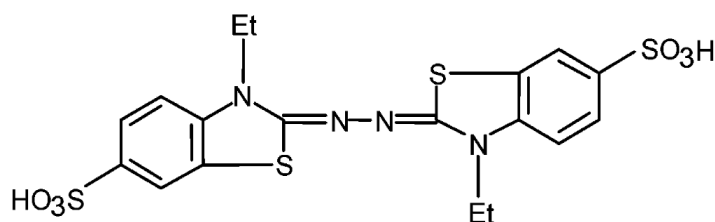
Stehiometrija reakcije je odvisna od števila vodikovih atomov, ki jih lahko donira AO. Če molekula DPPH reagira samo z 1 molekulo AO, kot pri reakciji s cisteinom, je potem stehiometrija reakcije 1:1. V primeru, da ima molekula, ki reagira z radikalom DPPH, dve vezalni mesti (npr. askorbinska kislina) je teoretično razmerje med DPPH in AO 2:1. Kar pomeni, da ena molekula AO reducira dve molekuli DPPH.

Za DPPH metodo je značilno, da se nanaša na celokupno antioksidativno sposobnost vzorca. Lahko se jo uporablja tako za trdne kot tekoče vzorce. Sama metoda je hitra,

enostavna in cenovno ugodna. Široko se uporablja za vrednotenje antioksidativne učinkovitosti AO, ki so donorji vodikovih atomov (27-29).

ABTS METODA

2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (slika 7) je stabilna v sistemih, ki ne izkazujejo antioksidativnega delovanja. Ob dodatku amonijevega persulfata pa se pretvori v $ABTS^{\bullet+}$. Nastali radikal je modre barve in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini med 600 in 750 nm. Z radikalom reagirajo donorji vodikovega atoma, pri čemer pride do nastanka reducirane oblike molekule in tako pride do razbarvanja raztopine. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance. Sama tvorba $ABTS^{\bullet+}$ pred dodatkom AO zmanjša možnost vpliva ostalih spojin na nastanek radikalov. Prednost metode je njena preprosta uporaba in možnost za rutinsko uporabo v vsakem laboratoriju. Slabost metode pa je, da dejansko podaja sposobnost spojin za reakcijo z $ABTS^{\bullet+}$ in ne antioksidativne učinkovitosti (23, 29).



Slika 7: 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)

3. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je vrednotenje stabilnosti in antioksidativne učinkovitosti vitamina C ali njegovega lipofilnega derivat-AP in vitamina E v izbranih na lipidih osnovanih nosilnih sistemih. Vitamine bomo vgrajevali v strukturno različne nosilne sisteme (SMES, V/O ME, TK, O/V ME in O/V E), ki so sestavljeni iz enakih komponent v različnem razmerju.

Vpliv izbranih nosilnih sistemov na stabilnost simultano vgrajenih vitaminov C in E oz. AP in vitamina E bomo določali s spremljanjem vsebnosti posameznih nerazgrajenih vitaminov v odvisnosti od časa hranjenja vzorcev.

Antioksidativno učinkovitost vitaminov, vgrajenih v izbrane nosilne sisteme, bomo ovrednotili z DPPH metodo, s katero bomo merili vpliv testiranih vzorcev na absorbanco DPPH radikala pri 515 nm.

Izbrane nosilne sisteme bomo tudi reološko ovrednotili. Viskoznost sistemov z in brez vgrajenih vitaminov bomo določili z Vibro Viskometrom SV-10 v odvisnosti od temperature v razponu od 20°C do 40°C. Morebitni vpliv vgradnje vitaminov na notranjo strukturo izbranih sistemov bomo preučevali tudi z diferenčno dinamično kalorimetrijo. Termično analizo vzorcev z in brez vgrajenih vitaminov bomo izvedli v temperaturnem intervalu od 25°C do -70°C.

V okviru diplomske naloge bomo preverili tudi potencialno toksičnost nosilnih sistemov z »*in vitro*« testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze. Uporabili bomo celično linijo keratinocitov, ker so le-ti prve celice, ki pridejo v stik z nosilnim sistemom po nanosu na kožo. Na podlagi dobljenih rezultatov preživetja celic bomo pridobili poglobljene informacije o delovanju nosilnih sistemov na keratinocite.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

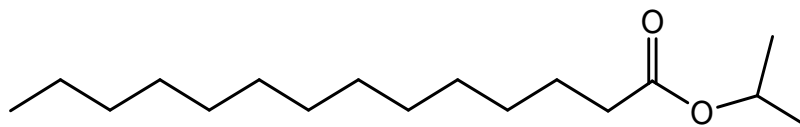
4.1. MATERIALI

4.1.1 Sestava sistemov

LIPOFILNA FAZA

- **Izopropilmiristat** – $C_{17}H_{34}O_2$ (Fluka, Nemčija)

Izopropilmiristat (v nadaljevanju IPM) je nizkoviskozna oljnata tekočina, brez vonja in barve. Kemijsko je IPM ester izopropilnega alkohola in miristinske kisline (slika 8). Meša se z alkoholom, maščobnimi olji, tekočim parafinom, acetonom, kloroformom. Z vodo in glicerolom pa se ne meša. Je dokaj stabilen, saj je odporen na oksidacijo in hidrolizo. Je netoksičen in ne povzroča iritacij. Pogosto se uporablja kot pospeševalec absorbcije v transdermalnih pripravkih, saj dobro prodira v kožo (30).

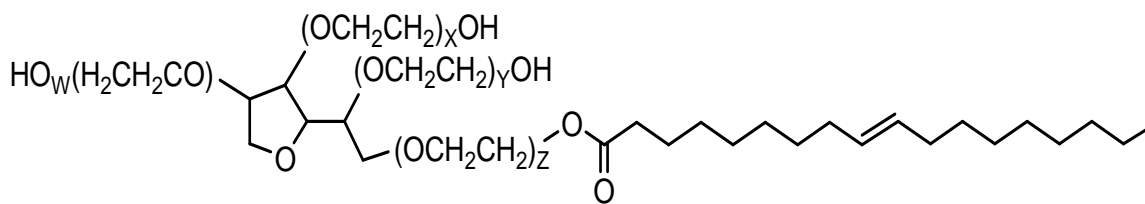


Slika 8: Kemijska struktura IPM.

EMULGATORSKA ZMES (sestavljena iz enakih masnih delov Tween[®]-a 80 in Lipoida S-100[®])

- **Tween[®] 80** (Fluka, Nemčija)

Je rumena, viskozna tekočina, ki se meša z vodo, etanolom, etilacetatom, metanolom in toluenom, z maščobnimi olji ter tekočim parafinom pa se ne meša. Kemijsko je polioksietilen (20) sorbitan monooleat (slika 9) s statusom GRAS. Je hidrofilni, neionski emulgator s hidrofilno lipofilno ravnotežno vrednostjo 15. Ker ne povzroča iritacij, velja za netoksično snov (30).

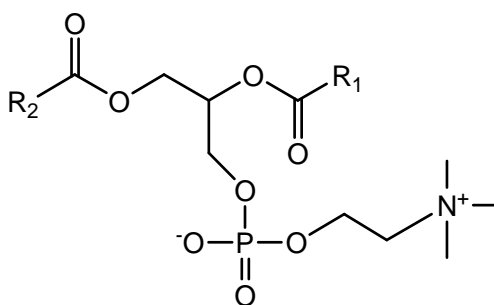


$$x + y + z + w = 20$$

Slika 9: Kemijska struktura Tweena 80.

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

Lecitin je predstavnik fosfolipidov in je kompleksna zmes večih komponent: fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in fosfatidilinozitola, v kombinaciji z različnimi količinami trigliceridov, maščobnih kislin in ogljikovih hidratov. Najpomembnejša komponenta lecitina je fosfatidilholin (slika 10), ki ga v posameznih vrstah lecitina najdemo v različnih koncentracijah, v odvisnosti od vrste lecitina in njegove čistote. Lipoid S-100[®] ne vsebuje manj kot 94% fosfatidilholina, v manjših količinah pa vsebuje še fosfatidiletanolamin, lizofosfatidilholin, trigliceride, D1- α -tokoferol ter vodo. Je prečiščena vrsta sojinega lecitina in je po izgledu rumeno voskaste konsistence z značilnim vonjem. Dobro topen je v etru in maščobnem olju. Lecitin je komponenta celičnih membran, je biokompatibilen in popolnoma biorazgradljiv. Zaradi svojega amfifilnega značaja, netoksičnosti in biokompatibilnosti se pogosto uporablja kot emulgator in stabilizator v farmaciji in kozmetiki. Opredeljen je kot varna snov z GRAS statusom (30, 31).



Slika 10: Kemijska formula fosfatidilholina, ki je amfifilna molekula. Sestavljena je iz »zwitterionske« glave in dveh nepolarnih verig pripadajočih maščobnih kislin; R₁ in R₂ sta maščobni kislini, ki sta lahko enaki ali različni. V samem lecitinu, pridobljenem iz soje, prevladuje linolenska kislina.

KOEMULGATOR

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

Butanol je prozorna in nevtralna tekočina značilnega vonja. Dobro se meša z drugimi alkoholi, ketoni, etri, glikoli ter drugimi aromatskimi in alifatskimi ogljikovodiki, z vodo pa se zmerno meša. V farmacevtski in kozmetični industriji se uporablja kot koemulgator, ki se uredi v medfazni film in s tem dodatno zmanjša medfazno napetost (32).

HIDROFILNA FAZA

- **Bidestilirana voda**

Pridobljena je s postopkom dvojne destilacije prečiščene vode na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

UČINKOVINE

- **L-askorbinska kislina** (Aldrich Chemie, Nemčija)

Monografijo za Acidum ascorbicum najdemo v Ph.Eur.5th Ed. Na videz je bel oziroma skoraj bel kristaliničen prašek, brez vonja in kislega okusa. Je nehigroskopna snov in občutljiva na svetlobo. Topna je v alkoholu, dobro topna v vodi, praktično netopna pa je v etru. Temperatura tališča je približno 190°C in se pri tem razgradi. Pojavlja se v dveh izomernih oblikah; v raztopljeni obliki ima dve ionizirajoči skupini z vrednostima pKa 4,75 in 11,8 (30).

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

Je belorumenkast prašek značilnega vonja in mastnega otipa. Kemijsko je ester askorbinske kisline in palmitinske kisline. Je skoraj netopen v vodi, kloroformu, etru, metilenkloridu in maščobnih oljih. Lahko topen pa je v etanolu in metanolu. AP ima kisle in redukativne lastnosti. Zaradi svojega nevtralnega pH ne povzroča iritacije kože. Zaradi svoje lipofilnosti pa zlahka prehaja roženo plast kože (33).

- **Vitamin E**, 97% (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Je prozorna, brezbarvna ali rumeno-rjava viskozna, oljnata tekočina. Meša se z acetonom, etanolom, etrom, diklormetanom in maščobnimi olji, z vodo pa se ne meša. Shranjevati ga je potrebno zaščitene pred svetlobo in zrakom (30).

4.1.2 Celična kultura in reagenti

- Celična kultura: Keratinociti (NCTC2544), ICLC, Univerza v Genovi, Italija.
- Medij za gojenje keratinocitov: MEM (minimum essential medium) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) z dodatki:
 - 10% (v/v) fetalni goveji serum (Gibco[®] - Invittogen, ZDA),
 - 1% (v/v) neesencialne aminokisliline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - 1% 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - 1% antibiotik (penicilin in streptomycin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).
- Pufer: fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS). Priprava: natehtali smo 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄·12H₂O in 0,24 g KH₂PO₄. Soli smo raztopili v 800 mL bidestilirane vode in s HCl uravnali pH na 7,4. Nato smo z bidestilirano vodo dopolnili do 1 L in razdelili na alikvote ter sterilizirali v avtoklavu (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija) 20 minut pri 121°C.
- Tripsin (0,25%) x EDTA (Promega Corporation, ZDA).
- MTS reagent: CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (Promega Corporation, ZDA).
- 4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).

Uporabljena laboratorijska oprema za določanje citotoksičnosti:

- inkubator (Sorvall[®] Heraeus, Kendro Laboratory Products, Nemčija),
- invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska),
- hemocitometer (Neubauer 0,0025 mm², BRAND, Nemčija),
- komora z laminarnim pretokom zraka (LAF) (Iskra PIO, tip M 12 (pretok zraka 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220x610x69 mm, zagotavlja čiste pogoje dela razreda 4 po ISO 14644-1),
- mikrotitrski čitalec (Safire2[™] Tecan, Švica),
- centrifuga CENTRIC 322A (Slovenija),
- mikrotitrne plošče s 96-imi vdolbinicami (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),

- polistirenske plošče za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm² (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica).

4.1.3 Ostale snovi

- Metanol (CH₃OH), (Merck KGaA, Nemčija); uporaba pri pripravi mobilne faze in redčenje vzorcev pred injiciranjem.
- Natrijev tiosulfat pentahidrat (Na₂S₂O₃×5H₂O), (Merck KGaA, Germany); uporaba pri pripravi metanolne raztopine za redčenje vzorcev pred injiciranjem.
- Acetonitril (CH₃CN), (Merck KGaA, Germany); uporaba pri pripravi mobilne faze.
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), (Merck KGaA, Germany); uporaba pri pripravi fosfatnega pufra (0,01 M, pH = 3,5).
- Orto-fosforjeva(V) kislina 85% (H₃PO₄), (Merck KGaA, Germany); uporaba pri pripravi fosfatnega pufra (0,01 M, pH = 3,5).
- Fosfatni pufer (0,01 M, pH = 3,5); uporaba pri pripravi mobilne faze.

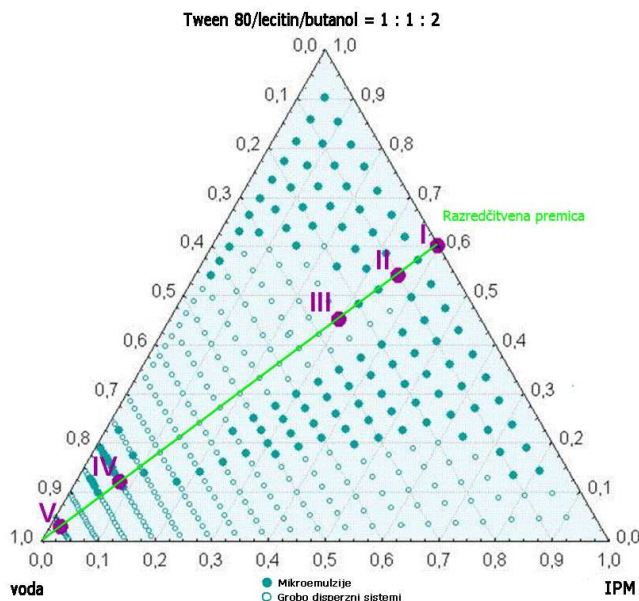
4.2. METODE

4.2.1 Priprava vzorcev

Za vgradnjo vitamina C, AP in vitamina E smo izbrali nosilne sisteme z različno notranjo strukturo, ki so bili razviti v okviru predhodnega raziskovalnega dela na katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani (34). Nosilni sistemi so sestavljeni iz lecitina in Tweena[®] 80 kot emulgatorjev, butanola kot koemulgatorja, IPM kot oljne faze ter bidestilirane vode kot hidrofilne faze. Te komponente so pogosto uporabljene v dermalnih izdelkih, saj sta IPM in Tween[®] 80 netoksična in ne povzročata iritacij. Tudi lecitin je netoksičen in neiritabilen, poleg tega pa tudi biokompatibilen in biorazgradljiv in izkazuje emolientno delovanje na koži. Sam butanol kot koemulgator pa zaradi interakcij z lecitinom poveča področja nastanka ME.

Za nadaljnjo delo smo izbrali pet različnih na lipidih osnovanih sistemov, ki ležijo na isti razredčitveni premici psevdo-trikomponentnega faznega diagrama in imajo isto razmerje med lipofilno fazo in emulgatorji (slika 11). Prvi sistem, ki vsebuje le oljno fazo in

emulgatorsko zmes v razmerju 40/60, je SMES. S postopnim redčenjem SMES z vodno fazo pa smo pripravili sisteme II (V/O ME), IV (O/V ME) in V (O/V E). Sistem III (TK), ki leži na isti razredčitveni premici, smo pripravili po enakem postopku, le da v tem primeru v emulgatorsko zmes nismo dodali butanola.



*Sistem I (SMES) ne vsebuje vodne faze in sistem III (TK) ne vsebuje butanola.

Slika 11: Psevdo-trikomponentni fazni diagram za sistem izopropilmiristat/ lecitin/ Tween[®] 80/ butanol/ voda. Na razredčitveni premici so označena področja nastanka SMES (vzorec I), V/O ME (vzorec II), TK (vzorec III), O/V ME (vzorec IV) in O/V E (vzorec V) (34).

Vsi sistemi imajo torej enako razmerje med emulgatorko zmesjo in IPM, in se razlikujejo le po deležu dodane vodne faze. Kot že rečeno, so izjema le TK, ki ne vsebujejo butanola. Receptura pripravljenih nosilnih sistemov je prikazana v preglednici II.

Preglednica II: Receptura nosilnih sistemov (m/m%)

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

*Masa posameznega vzorca je 20 gramov.

- Nosilne sisteme s simultano vgrajenima vitaminoma C in E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,4% vitamina C + 1% vitamina E) smo pripravili po naslednjem postopku: hidrofilen vitamin C smo natehtali v vodno fazo, lipofilen vitamin E pa v IPM.

SMES smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico najprej natehtali IPM, emulgatorsko zmes in lipofilen vitamin E ter mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi. Nato smo dodali hidrofilen vitamin C in ponovno mešali na magnetnem mešalu do homogene zmesi oziroma do nastanka SMES.

V/O ME smo pripravili s postopnim redčenjem SMES z vitaminom E z vodno fazo (bidestilirana voda z raztopljenim vitaminom C).

TK smo pripravili po enakem postopku kot V/O ME, le da v emulgatorsko zmes nismo dodali butanola.

Vitamina C in E nismo uspeli vgraditi v O/V ME in O/V E. Po združitvi vodne faze z raztopljenim vitaminom C z SMES z vitaminom E se je O/V ME razplastila, pri O/V E pa je prišlo do obarjanja. Receptura uspešno pripravljenih nosilnih sistemov z vgrajenima vitaminoma C in E v molarnem razmerju 1:1 je prikazana v preglednici III.

Preglednica III: Sistemi SMES, V/O ME in TK z vgrajenima vitaminoma C in E v molarnem razmerju 1:1.

Sestavine	SMES	V/O ME	TK
<i>Lecitin</i>	15%	13,49%	22,5%
<i>Tween[®] 80</i>	15%	13,83%	22,5%
<i>Izopropilmiristat</i>	40%	35,87%	30%
<i>Butanol</i>	30%	26,81%	0%
<i>Bidestilirana voda</i>	0%	10%	25%
<i>Vitamin C</i>	0,4%	0,4%	0,4%
<i>Vitamin E</i>	1%	1%	1%

*Masa posameznega vzorca je 20 gramov.

- Nosilne sisteme s simultano vgradnjo AP in vitamina E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,687% AP + 0,713% vitamina E).

SMES smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico natehtali IPM in PAS ter oba lipofilna vitamina in na magnetnem mešalu mešali do nastanka homogene zmesi.

S postopnim redčenjem SMES z vodno fazo smo pripravili V/O ME in O/V ME. V O/V ME smo lahko uspešno vgradili le 0,7% m/m vitamina E in AP (vitamin E 0,3536% m/m koncentracije, AP 0,3435% m/m koncentracije, v molarnem razmerju 1:1). Amfifilna struktura AP je pripomogla k nastanku stabilne hidrofilne ME z vgrajenim vitaminskim parom.

TK, ki ležijo na isti razredčitveni premici kot ostali sistemi, smo pripravili po enakem postopku, le da v emulgatorsko zmes nismo dodali butanola.

Vgradnja izbranih vitaminov v klasične E (O/V E) ni bila možna, saj je prišlo do obarjanja. Receptura SMES, V/O ME in TK z vgrajenim 1,4% m/m AP in vitaminom E ter O/V ME z vgrajenim 0,7% m/m AP in vitaminom E je prikazana v preglednici IV.

Preglednica IV: Sistemi SMES, V/O ME, TK in O/V ME z vgrajenim AP in vitaminom E v molarnem razmerju 1:1.

Sestavine	SMES	V/O ME	TK	O/V ME
<i>Lecitin</i>	15%	13,49%	22,5%	3,0%
<i>Tween[®] 80</i>	15%	13,83%	22,5%	3,07%
<i>Izopropilmiristat</i>	40%	35,87%	30%	7,97%
<i>Butanol</i>	30%	26,81%	0%	5,96%
<i>Bidestilirana voda</i>	0%	10%	25%	80%
<i>Askorbilpalmitat</i>	0,687%	0,687%	0,687%	0,3435%
<i>Vitamin E</i>	0,713%	0,713%	0,713%	0,3565%

*Masa posameznega vzorca je 20 gramov. SMES, V/O ME in TK z vgrajenim 1,4% m/m AP in vitaminom E ter O/V ME z vgrajenim 0,7% m/m AP in vitaminom E.

4.2.2 Spremljanje stabilnosti vitaminov v nosilnih sistemih

Za vrednotenje vpliva nosilnega sistema na kemijsko stabilnost vgrajenih vitaminov E, C in AP smo sisteme z vitamini hranili v tesno zaprtih steklenih ampulah v temnem prostoru

pri sobni temperaturi. Takoj po izdelavi ter ob vnaprej določenih časovnih intervalih ($t = 1$ teden, 2 teden, 3 teden, 4 teden, 6 teden, 7 teden in 8 teden) smo vzorcem določali vsebnost vitaminov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (v nadaljevanju HPLC). Na sliki 12 so prikazani starani vzorci z vgrajenima vitaminoma C in E oziroma AP in vitaminom E. Z leve proti desni si sledijo SMES, V/O ME in TK z vgrajenima 1,4% (m/m) vitaminoma C in E ter SMES, V/O ME in TK z 1,4% (m/m) AP in vitaminom E in O/V ME z 0,7% (m/m) AP in vitaminom E.



Slika 12: Na lipidih osnovani sistemi z vgrajenimi vitamini E, C in AP.

Določanje vsebnosti vitaminov v nosilnih sistemih s HPLC metodo: za HPLC metodo je značilno, da se komponente vzorca ločijo na osnovi različne hitrosti potovanja skozi kolono, kjer iz mobilne faze stopajo v interakcije s stacionarno fazo. Uporabna je za identifikacijo in kvantitativno določevanje spojin v zmesi.

Sestava HPLC aparature je prikazana na sliki 13:

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



Slika 13: HPLC aparatura

Kromatografski pogoji:

Za vitamin C smo analizo izvajali pri naslednjih pogojih:

- kolona: Nucleosil C18-NH₂ , 5 μ m, 250x4,0 mm,
- mobilna faza: metanol : acetonitril : fosfatni pufer (0,01 M, pH = 3,5) = 20 : 30 :50,
- pretok: 1,0 ml/min,
- valovna dolžina detekcije: λ = 243 nm,
- volumen injiciranja: 50 μ l.

Za AP smo analizo izvajali pri naslednjih pogojih:

- kolona: Nucleosil 120 C18 5_N, 120x4,0 mm,
- mobilna faza: metanol : acetonitril : fosfatni pufer (0,01 M, pH = 3,5) = 75 : 10 :15,
- pretok: 1,5 ml/min,
- valovna dolžina detekcije: λ = 254 nm,
- volumen injiciranja: 50 μ l.

Za vitamin E smo analizo izvajali pri naslednjih pogojih:

- kolona: Nucleosil 120 C18 5_N, 120x4,0 mm,
- mobilna faza: metanol : acetonitril = 70 : 30,
- pretok: 1,5 ml/min,
- valovna dolžina detekcije: λ = 291 nm,
- volumen injiciranja: 50 μ l.

Priprava raztopin za HPLC meritve:

Priprava standardnih raztopin; pripravili smo raztopino standarda za posamezen vitamin s koncentracijo približno 0,2 mg/ml. Točno smo zatehtali približno 10 mg vitamina in ga raztopili v 50 ml ustreznega topila (za vitamina C in E je to metanol, za AP pa 0,01 M raztopina Na₂S₂O₃ v metanolu). Standardne raztopine smo redčili v razmerju 1/50, 1/25, 1/20, 2/25, 1/10, 4/20 in naredili umeritveno krivuljo.

Priprava raztopin vzorca; v bučko ustrezne velikosti smo natehtali toliko vzorca, da je bil odziv detektorja po injiciranju raztopine vzorca v območju linearnosti, ki smo jo predhodno določili. Vzorce smo raztopili v ustreznem topilu in jih injicirali takoj po pripravi.

Ponovljivost/natančnost sistema: ustreznost kromatografskega sistema smo preverili s trikratnim zaporednim injiciranjem raztopine standarda v HPLC sistem ter izračunali povprečje in relativno standardno deviacijo, ki je bila vedno manjša od 3%. Ponovljivost injiciranja pri HPLC analizi je ustrezna, če je relativna standardna deviacija manjša od 3%.

Izračun vsebnosti vitaminov v preiskovanem staranem vzorcu: vsebnost nerazgrajenega vitamina smo podali kot mg nerazgrajenega vitamina na 100 g vzorca. Rezultate vsebnosti ob določenih časovnih intervalih pa smo izračunali s pomočjo *enačbe 1* in jih podali kot % nerazgrajenega vitamina ob času $t = x$ glede na vsebnost vitamina ob času $t = 0$.

$$\% \text{ nerazgrajenega vit. ob času } t = x = \frac{\text{vsebnost nerazgrajenega vit. ob času } t=x \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}}\right)}{\text{vsebnost nerazgrajenega vit. ob času } t=0 \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}}\right)} \quad \text{Enačba 1}$$

4.2.3 Statistična analiza rezultatov

Da bi ugotovili, če imajo proučevani nosilni sistemi z različno notranjo strukturo statistično značilen vpliv na stabilnost vgrajenih vitaminov, smo rezultate vsebnosti učinkovine statistično analizirali. S testom normalnosti več kot dveh vzorcev smo opredelili nenormalno razporeditev podatkov in izvedli Kruskal-Wallis-ov test neodvisnih vzorcev. Eksperimentalno dobljene vrednosti vitaminov v sistemih različne sestave smo primerjali s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$.

4.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti vitaminov z difenilpikrilhidrazilno metodo

Antioksidativno učinkovitost vitaminov C in E ter AP smo spremljali z DPPH metodo. Natančen mehanizem metode je že opisan v uvodu same naloge.

Koncentracijo DPPH radikala smo spremljali z merjenjem absorbance z UV spektrofotometrom Hewlett Packard 8453, Nemčija. Kot topilo smo izbrali metanol, saj ne vpliva na sam potek reakcije. Antioksidativni učinek smo izračunali s pomočjo *enačbe 2* in ga podali kot delež DPPH radikala v ravnotežnem stanju (27-29).

$$\% \text{ DPPH radikala} = (A_f/A_0) \times 100 \qquad \text{Enačba 2}$$

A_0 - absorbanca radikala brez dodanega vzorca pri 515 nm

A_f - absorbanca radikala ob dodatku antioksidanta pri določenem časovnem intervalu

Najprej smo pripravili 0,063 mM metanolno raztopino DPPH radikala, tako da smo točno zatehtali približno 10 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila in ga raztopili v 20 mL metanola. Nato smo odpipetirali 1 mL te raztopine v 20 mL metanola. Tako pripravljeno metanolno raztopino DPPH radikala smo prenesli v kiveto in ji izmerili absorbanco A_0 . Absorbanco smo nato spremljali 15 min. Le-ta je ostala nespremenjena skozi ves čas merjenja in tako smo potrdili, da je raztopina DPPH radikala ustrezno stabilna za izvedbo poskusa.

Antioksidativni učinek izbranih vzorcev smo določali tako, da smo k 2 mL metanolne raztopine DPPH radikala dodali 1 mL metanolne raztopine testiranih vzorcev (v kiveto) in merili spremembo absorbance DPPH radikala vnaprej določenih časovnih intervalih (ob času $t = 0$ minut, 1 min., 2 min., 3 min., 4 min., 5 min., 6 min., 7 min., 8 min., 9 min., 10 min. in $t = 15$ minut).

V ta namen smo preiskovane vzorce (SMES, V/O ME in TK) z 1,4% (m/m) vsebnostjo vitaminov ustrezno redčili z metanolom in tako pripravili vzorce s koncentracijo vitaminov 0,11, 0,048 in 0,0048 mM. O/V ME z 0,7% (m/m) vsebnostjo AP in vitamina E smo redčili tako, da smo pripravili vzorce s koncentracijo vitaminov 0,055, 0,024 in 0,0024 mM.

4.2.5 Merjenje viskoznosti

Sistemom brez in z vgrajenimi vitamini smo izmerili viskoznost z aparaturo Vibro Viscometer, SV-10, A&D Company, Japan (slika 14) v temperaturnem intervalu od 20°C do 40°C. Vzorce smo termostatirali s pomočjo vodne kopeli s pretokom tople vode s hitrostjo 150 mL/min.



Slika 14: Vibro Viscometer SV-10

Viskozimeter SV-10 sestavlja dve tanki senzorični ploščici, ki ju poganja elektromagnetna sila, ki vzdržuje stalno amplitudo valovanja. Ti ploščici sinusno nihata v resonanci v nasprotnih smereh. Viskozimeter izmeri viskoznost tako, da zazna električni tok, ki je potreben, da ploščici nihata pri stalni frekvenci 30Hz in amplitudi manjši od 1 mm. Viskozimeter SV-10 omogoča merjenje viskoznosti s sočasnim spreminjanjem temperature. Tako lahko merimo viskoznost vzorca v njegovem naravnem stanju, ne da bi ga pri tem poškodovali ali vplivali na njegovo temperaturo. Rezultat meritve viskozimetra je produkt viskoznosti in specifične teže (teža določenega volumna preiskovane tekočine v primerjavi z enakim volumenom vode pri 4°C) (35).

4.2.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Diferenčna dinamična kalorimetrija (v nadaljevanju DSC) se uporablja za merjenje toplotnega toka v ali iz vzorca kot funkcije temperature in časa, kar nam omogoča opazovanje termičnih, fizikalnih in kemijskih sprememb v vzorcu. Le-te potekajo pod nadzorovanim segrevanjem oz. ohlajanjem vzorca ali med vzdrževanjem konstantne temperature. DSC je najbolj uveljavljena metoda termične analize in z njo najpogosteje

merimo asociativne termodinamske lastnosti, kot sta toplotna kapaciteta in entalpija (oz. merimo njihove spremembe, ki so značilne za skoraj vse farmacevtsko pomembne procese). Metoda je še posebno primerna za ugotavljanje polimorfizma, merjenje kinetike reakcij ali razpadov, ocenitev kompatibilnosti sestavin farmacevtskih oblik, preverjanje čistosti in preiskave steklastega prehoda. Je zelo primerna metoda zaradi svoje enostavnosti in cene izvedbe.

Za izvedbo analize je potrebno namestiti v grelno celico DSC-ja lonček z znano zatehto vzorca; kot referenčni vzorec se uporablja prazen lonček iz enakega materiala. Sam vzorec lahko energijo porablja ali sprošča in tako lahko potekajo:

- Endotermni procesi, ki znižajo temperaturo vzorca glede na referenco, s tem pa je potrebno vzorec bolj segrevati, da se ohrani enaka temperatura kot pri referenci.
- Eksotermni procesi (obraten proces)

Rezultat meritve je DSC-krivulja, ki prikazuje odvisnost toplotnega toka od temperature ali časa (36).

Priprava vzorcev: v aluminijaste lončke smo točno zatehtali približno od 1 do 3 mg posameznih komponent in sisteme (z in brez vgrajenimi vitamini) ter jih hermetično zaprli.

Pogoji meritve: meritve smo izvajali z DSC1 aparaturo Mettler Toledo, Švica (sliki 15 in 16). Ohlajanje vzorcev smo izvedli v temperaturnem območju od 25°C do -70°C s hitrostjo ohlajanja 5 K/min.



Slika 15: DSC aparatura



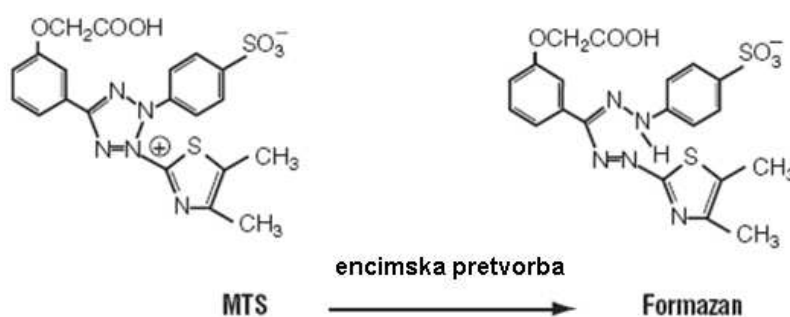
Slika 16: Aluminijasta lončka

4.2.7 Metode za vrednotenje citotoksičnosti

4.2.7.1 Ugotavljanje preživetja celic z »in vitro« testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze

Test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze (v nadaljevanju MTS test) temelji na kolorimetričnem določanju števila živih celic. Merimo absorbanco, ki je premosorazmerna številu živih celic v kulturi in njihovi metabolni aktivnosti. S testom smo želeli določiti »in vitro« citotoksičnost in s tem potencialno iritabilnost nosilnih sistemov.

Žive celice reducirajo MTS reagent v rdeče obarvan formazan, ob prisotnosti dehidrogenaznih encimov nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana oblika) ali nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika) v metabolno aktivnih celicah (slika 17). Postopek izvedemo z dodatkom reagenta v celično kulturo, nato celice z reagentom inkubiramo 1 – 4 ure, nakar izmerimo absorbanco pri 490 nm.



Slika 17: Pretvorba MTS reagenta do formazana, ki nastane v metabolno aktivnih celicah.

Ker je količina tvorjenega formazana neposredno sorazmerna s številom živih celic v kulturi, je intenzivnost obarvanega produkta indikacija za preživetje celic. Znižanje intenzitete barve torej kaže na celično smrt v kulturi (37).

Preživetje celic smo izračunali po enačbi 3:

$$\text{preživetje celic} = \frac{(A_S - A_{S_0})}{(A_C - A_{C_0})} \quad \text{Enačba 3}$$

A_S - absorbanca celic po dodatku vzorca

A_{S_0} - absorbanca medija po dodatku vzorca

A_C - absorbanca kontrolnih celic

A_{C_0} - absorbanca medija

4.2.7.2 Gojenje in presajanje celic

Pri delu s celicami moramo zagotoviti ustrezne aseptične pogoje prostorov in površin. Tako je delo potekalo v LAF komori, ki je postavljena v prostoru s posebnim režimom čistoče in zagotavlja aseptične pogoje. Površine komore ter vse stvari, ki smo jih potrebovali za delo, smo pred začetkom dela očistili s 70% etanolom.

Pri 37°C in 5% CO₂ smo keratinocite inkubirali v mediju za gojenje keratinocitov v polistirenski plošči s površino 75 cm² in ko so zasedli približno 80-90% razpoložljive površine, smo jih presadili (dvakrat tedensko). S celične kulture keratinocitov, ki je rasla pritrjena na podlago, smo odlili medij. Površino smo dvakrat sprali z 2 mL fosfatnega pufra s pH 7,4 in nato dodali 1 mL tripsina. Le-ta je porušil medcelične povezave in ločil celice od podlage (inkubacija približno 1 min). Ta proces smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Z dodatkom 4 mL medija smo inaktivirali tripsin. Nato smo celice s pipetiranjem sprali s podlage in jih kvantitativno prenesli v 15 mL centrifugirko. S pomočjo hemocitometra pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo celice prešteli in tako izračunali koncentracijo celic (število celic/mL). Disperzijo celic smo centrifugirali 5 min pri 1300 obratov/min, nato odpipetirali supernatant, celice redispergirali v 1,5 mL medija ter jih nasadili ali v novo polistirensko ploščo za gojenje celic ali v vdolbinice ustreznih plošč za poskuse. S pomočjo mikroskopa pa smo preverili, ali smo prenesli dovolj celic. Glede na predhodno določeno koncentracijo celic smo izračunali ustrezno število celic na površino.

4.2.7.3 Priprava raztopin nosilnih sistemov za poskuse na celicah

Vzorci za poskuse na celicah smo pripravili tako, da smo nosilne sisteme, ki niso vsebovali vitaminov redčili z medijem za gojenje keratinocitov. Vsakemu izmed sistemov smo dodali toliko vode, da so vsi sistemi med seboj imeli enako razmerje lipofilne faze. Nato smo od vsakega sistema vzeli 0,02 µL lipofilne faze in ga 10x redčili z medijem za gojenje keratinocitov. Le te vzorce smo dodajali celicam.

V mikrotitrsko ploščo, s 96-imi vdolbinicami, smo za vsak vzorec brez AO nasadili 3 vdolbinice s $0,5 \times 10^4$ celicami v 50 µL medija; isto koncentracijo smo nasadili v 6 vdolbinic za določitev absorbance kontrolnih celic, za absorbanco posameznega vzorca in medija smo v 3 vdolbinice odpipetirali 50 µL medija (brez celic). Celotno ploščo smo inkubirali 24 h pri 37°C in 5% CO₂, da so se celic pritrdile na podlago. Nato smo v vse

vdolbinice (tiste s celicami ali brez) dodali po 50 μ L raztopine vzorca oziroma medija in po eni uri v vsako vdolbinico 10 μ L MTS reagenta. Po 4 h od dodatka vzorcev smo z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm. Rezultate preživetja celic smo podali relativno glede na kontrolo t.j. celice, ki jih nismo izpostavili testiranim sistemom.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo želeli ovrednotiti primernost na lipidih osnovanih nosilnih sistemih za sočasno dostavo vitamina C oziroma njegovega lipofilnega derivata AP in vitamina E. Nosilne sisteme z različno notranjo strukturo (SMES, V/O ME, TK in O/V ME) smo ovrednotili z vidika njihovega vpliva na stabilnost in antioksidativno učinkovitost vgrajenih vitaminov. Izbrane sisteme smo tudi reološko ovrednotili ter preverili potencialno toksičnost sistemov »*in vitro*«.

Vpliv posameznih parametrov smo testirali na sledečih sistemih:

- Prazni nosilni sistemi SMES, V/O ME, TK, O/V ME in O/V E (brez vgrajenih vitaminov),
- nosilni sistemi SMES, V/O ME, TK s simultano vgrajenima vitaminoma C in E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,4% vitamina C + 1% vitamina E) oz.
- nosilni sistemi SMES, V/O ME, TK s simultano vgrajenim AP in vitaminom E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,687% AP + 0,713% vitamina E) in sistem O/V ME s simultano vgrajenim AP in vitaminom E v molarnem razmerju 1:1 (0,7% m/m; 0,3435% AP + 0,3536% vitamin E).

Vse meritve smo opravili v dveh paralelkah.

5.1. Vrednotenje stabilnosti vitaminov

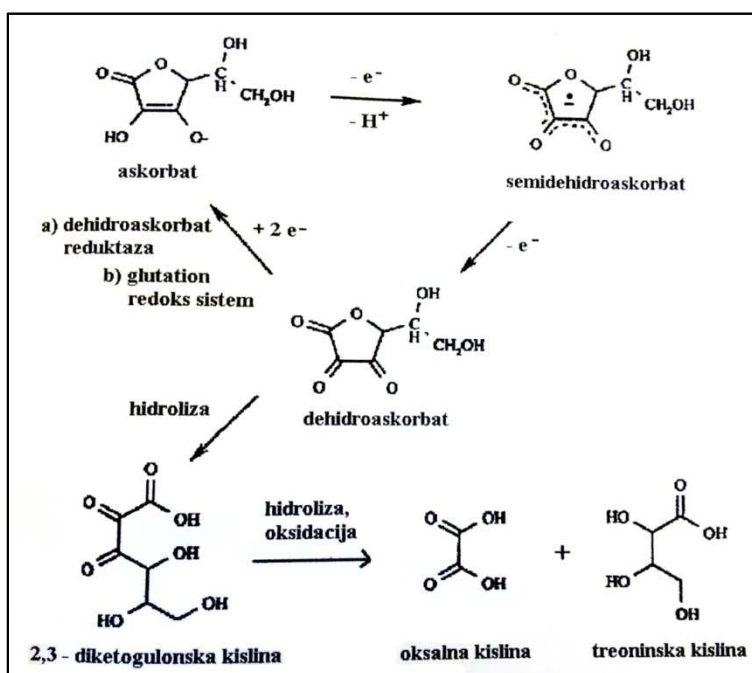
V okviru diplomske naloge smo želeli preveriti, ali je stabilnost AP v kombinaciji z vitaminom E res boljša kot je stabilnost vitamina C, sočasno vgrajenega z vitaminom E. Preverili smo tudi, kakšen vpliv izkazujejo sistemi z različno notranjo strukturo na stabilnost vgrajenih vitaminskih parov in izbrali nosilni sistem, ki bi vgrajenim vitaminom nudil najboljšo zaščito.

S HPLC analizo smo spremljali spreminjanje vsebnosti posameznih vitaminov v odvisnosti od časa v naslednjih nosilnih sistemih:

- *vitamin C* v SMES, V/O ME in TK
- *AP* v SMES, V/O ME, TK in O/V ME

Dodatno smo določili tudi stabilnost *vitamina E* sočasno vgrajenega z vitaminom C oz. z AP v SMES, V/O ME, TK in O/V ME. Rezultati stabilnostnih testov so podani kot delež nerazgrajenega posamičnega vitamina v staranih sistemih pri določenih časovnih intervalih in pri sobni temperaturi.

Vitamin C je relativno stabilen na zraku, problematičen pa je v raztopinah. V aerobnih razmerah je nestabilen in se z lahkoto oksidira, pri čemer se ireverzibilno razgradi do biološko neaktivne oblike (slika 18). Pri reakciji oksidacije je podvržen dvema zaporednima enoelektronskima oksidacijama. Ko vitamin C odda en elektron in proton, se pretvori v semidehidroaskorbat. Le-ta ima nesparjen elektron delokaliziran v π -elektronskem sistemu, kar mu daje relativno stabilnost. V naslednji stopnji se semidehidroaskorbat oksidira do dehidroaskorbata, ta pa se lahko ponovno reducira do askorbata z dehidroaskorbat reduktazo ali po neencimski poti z glutacion redoks sistemom. Če pa pride do ireverzibilnega odprtja laktonskega obroča, iz dehidroaskorbata nastane 2,3-diketogulonska kislina, ki v seriji reakcij razpade na oksalno in treoninsko kislino (38).



Slika 18: Oksidacije vitamina C in razpad dehidroaskorbata.

Oksidacijo vitamina C pospešijo prisotnost kisika, povišana temperatura, izpostavljenost svetlobi, prisotnost kovinskih ionov (baker, železo) in izpostavljenost višjim pH-jem. Zaradi hitre oksidacije v raztopinah in zaradi slabe penetracije skozi kožo je učinkovitost

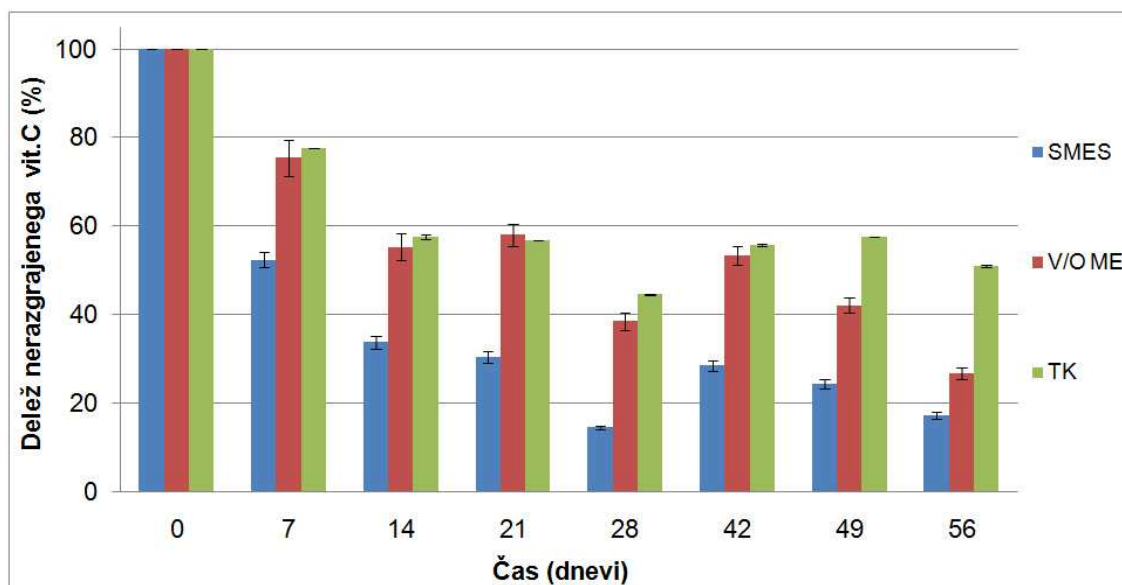
dermalnih pripravkov z vitaminom C omejena. Rešitev je v razvoju njegovih derivatov (38).

AP je glede na literaturne podatke deklariran kot stabilnejši derivat vitamina C. Ima močno izražene lipofilne lastnosti in zato zlahka prehaja roženo plast. Vendar eserifikacija vitamina C, čeprav zmanjša njegovo hidrolizo, ne zagotovi zadovoljive stabilnosti spojine v končnih izdelkih. Stabilnost AP je tako močno odvisna od začetne vgrajene koncentracije, njegove lokacije v sistemu, količine raztopljenega kisika in pogojev shranjevanja. Tudi s pravo izbiro nosilnega sistema lahko izboljšamo stabilnost spojine (38, 39).

Vitamin E je stabilen AO. Problem je le njegova fotostabilnost. Znano je, da svetloba močno vpliva na razpad tokoferola. Vzrok za to je njegovo obnašanje; vitamin E je lovilec singletnega kisika med fotooksidacijo (11, 13).

5.1.1 Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost vitamina C vgrajenega skupaj z vitaminom E

Delež nerazgrajenega vitamina C sočasno vgrajenega z vitaminom E v različnih sistemih je prikazan na sliki 19. Iz nje je razvidno, da je v TK vsebnost vitamina C po 56-ih dneh hranjenja večja kot v V/O ME in SMES-u, kar pripisujemo strukturi TK. Viskoznost TK predstavlja omejitveni faktor za vdor kisika v sistem in posledično je oksidativna razgradnja vitamina C manjša (s povečanjem viskoznosti je dostop kisika omejen in vitamin C počasneje razpada) (34). Do 42. dne hranjenja sistema je vsebnost nerazgrajenega vitamina C v TK in V/O ME približno enaka (približno 55%), nakar se vsebnost nerazgrajenega vitamina C v V/O ME bistveno zniža glede na TK. Stabilnost vitamina C v SMES je bila vseh 8 tednov bistveno nižja, kot v ostalih sistemih, kar lahko razložimo z odsotnostjo vodne faze in posledično tudi z odsotnostjo medfaznega filma.



Slika 19: Delež nerazgrajenega vitamina C vgrajenega skupaj z vitaminom E v SMES, V/O ME in TK v odvisnosti od časa.

Naredili smo tudi statistično analizo. Sprva smo izvedli test normalnosti (preglednica V), kjer smo normalno porazdeljevanje naših rezultatov preizkušali z ničelno hipotezo:

- Rezultati se normalno porazdeljujejo.

Preglednica V: Rezultati preizkusa hipoteze o normalnem porazdeljevanju rezultatov za vitamin C, vgrajenega skupaj z vitaminom E v SMES, V/O ME in TK.

Nosilni sistem	P
SMES	0,028
V/O ME	0,200
TK	0,003

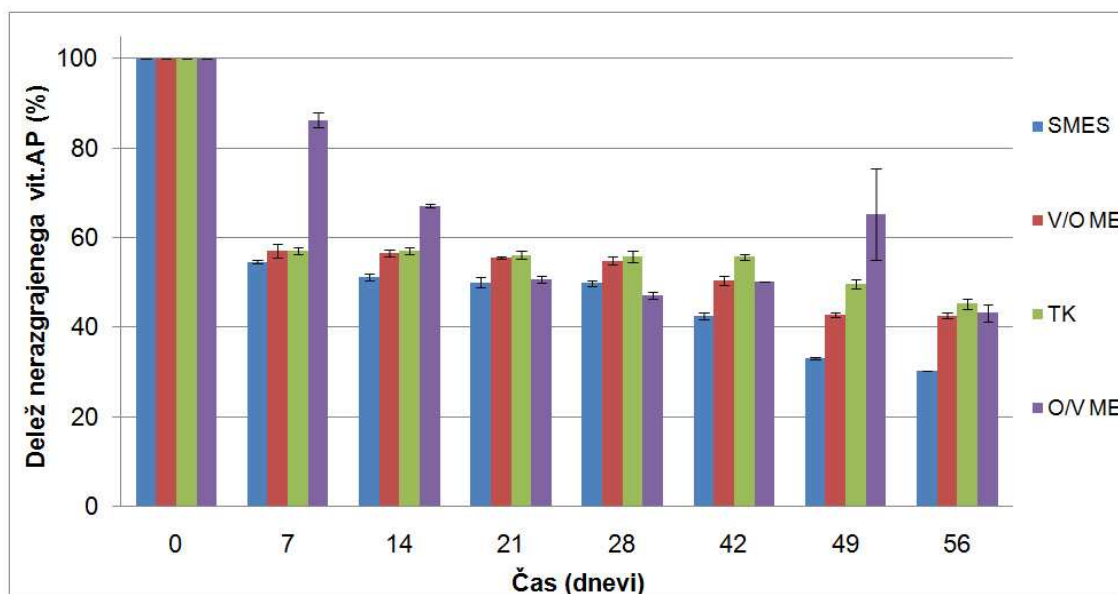
Ker se rezultati za vsaj en nosilni sistem nenormalno porazdeljujejo, lahko ovržemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da se vsi rezultati nenormalno porazdeljujejo. V nadaljevanju smo izvedli Kruskal-Wallis-ov test neodvisnih vzorcev, da bi ugotovili, če imajo proučevani nosilni sistemi z različno notranjo strukturo statistično značilen vpliv na stabilnost vitamina C, vgrajenega skupaj z vitaminom E. Signifikantnost vpliva tipa nosilnega sistema na stabilnost vgrajenega vitamina C smo preizkušali z ničelno hipotezo:

- Ni razlik med nosilnimi sistemi (SMES, V/O ME in TK) pri njihovem vplivu na stabilnost vitamina C, vgrajenega skupaj z vitaminom E.

Rezultati testa ($p = 0,032$) kažejo, da so razlike med nosilnimi sistemi pri njihovem vplivu na stabilnost vitamina C in tako ovržemo ničelno hipotezo. Iz slike 19, ki prikazuje delež nerazgrajenega vitamina C, vgrajenega skupaj z vitaminom E, v SMES, V/O ME in TK v odvisnosti od časa, pa je razvidno, da so najboljši nosilni sistem za vgradnjo vitamina C, vgrajenega skupaj z vitaminom E, TK. Le-ti izkazuje največji delež nerazgrajenega vitamina C (približno 51%), vgrajenega skupaj z vitaminom E, po 56 dneh shranjevanja.

5.1.2 Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost askorbilpalmitata vgrajenega skupaj z vitaminom E

Pri spremljanju deleža nerazgrajenega AP, ki smo ga sočasno z vitaminom E vgradili v SMES, V/O ME, TK in O/V ME v odvisnosti od časa, smo ugotovili, da je AP v vseh nosilnih sistemih relativno nestabilen (razvidno s slike 20). Vsebnost nerazgrajenega AP se je po enem mesecu shranjevanja zmanjšala za približno 50%, po približno dveh mesecih shranjevanja pa za približno 60%. Po 56 dneh shranjevanja je bila tako vsebnost nerazgrajenega AP največja v TK, t.j. okoli 45%, ki mu takoj sledita O/V ME in V/O ME.



Slika 20: Delež nerazgrajenega AP vgrajenega skupaj z vitaminom E v SMES, V/O ME, TK in O/V ME v odvisnosti od časa.

Primerjajoč kvantitativno sestavo nosilnih sistemov smo ugotovili, da so za stabilnost AP najugodnejši tisti, ki vsebujejo velik delež lipofilne faze. Večja stabilnost AP v sistemih z večjim deležem lipofilne faze je posledica različne porazdelitve AP v sistemu. Zaradi svoje

kemijske strukture se AP vključi v emulgatorski film na medfazi olje/voda. Z lipofilnim delom (palmitinsko verigo), se orientira v oljno fazo, s hidrofilnim delom molekule (laktonski obroč), ki je občutljiv na oksidacijo, pa se orientira v hidrofilno fazo. Struktura V/O ME omogoča, da je na oksidacijo občutljiv laktonski obroč AP v notranji fazi sistema in tako zaščiten pred vplivom kisika. Sama medfaza V/O deluje kot bariera pred dodatnim vdorom kisika v sistem. V mikroemulzijah nasprotnega tipa (O/V ME) pa je laktonski obroč obrnjen v zunanjo fazo in je tako bolj izpostavljen vplivu kisika, ki se lahko še dodatno nadomešča iz okolice. Posledično so oksidacijski procesi v sistemih z večjim deležem vodne faze občutno večji.

Omejitveni faktor za vdor kisika v sistem predstavlja tudi viskoznost nosilnega sistema. Višja viskoznost sistemov (najvišja je pri TK) vpliva na zmanjšanje van der Waalsovih interakcij med AP in kisikom, zaradi česar je oksidativna razgradnja AP v TK omejena (34). Ker je delež nerazgrajene učinkovine po 56-ih dneh največji pri TK, sklepamo, da je to posledica lamelarne strukture. Slednja deluje kot zaščitni faktor, ki omejuje difuzijo kisika v sistem in s tem zaščiti AP pred oksidativno razgradnjo (38-40).

Rezultate smo tudi statistično obdelali. Sprva smo izvedli test normalnosti (preglednici VI), kjer smo normalno porazdeljevanje rezultatov preizkušali z ničelno hipotezo:

- Rezultati se normalno porazdeljujejo.

Preglednica VI: Rezultati preizkusa hipoteze o normalnem porazdeljevanju rezultatov za AP, vgrajenega skupaj z vitaminom E v SMES, V/O ME, TK in O/V ME.

Nosilni sistem	P
SMES	0,177
V/O ME	0,001
TK	<0,001
O/V ME	0,198

Ker se rezultati vsaj enega od nosilnega sistema nenormalno porazdeljujejo, lahko ovržemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da se vsi rezultati nenormalno porazdeljujejo. V nadaljevanju smo izvedeli Kruskal-Wallis-ov test neodvisnih vzorcev, da bi ugotovili, če imajo proučevani nosilni sistemi z različno notranjo strukturo statistično značilen vpliv na stabilnost AP, vgrajenega skupaj z vitaminom E.

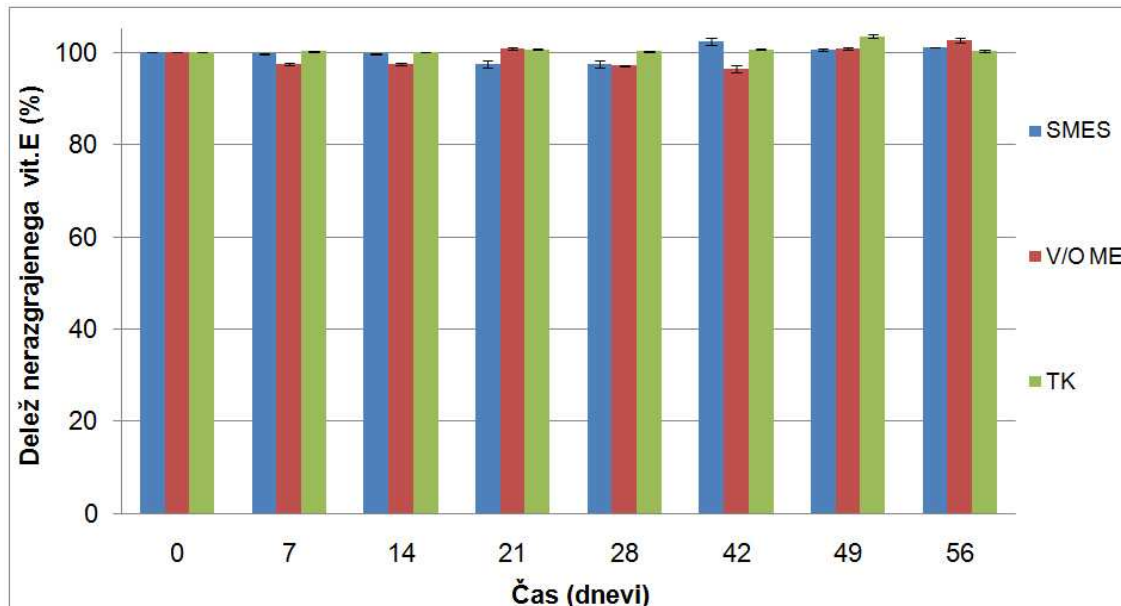
Signifikantnost vpliva tipa nosilnega sistema na stabilnost vgrajenega AP smo preizkušali z ničelno hipotezo:

- Ni razlik med nosilnimi sistemi (SMES, V/O ME, TK in O/V ME) pri njihovem vplivu na stabilnost AP, vgrajenega skupaj z vitaminom E.

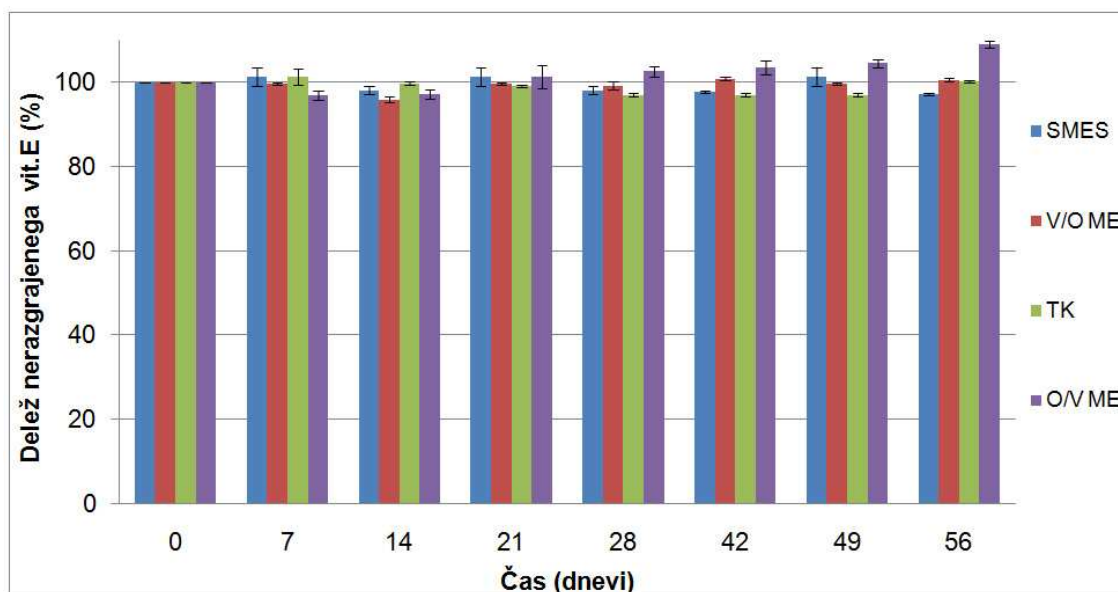
Rezultati testa ($p = 0,523$) kažejo, da različni nosilni sistemi ne izkazujejo statistično značilnega vpliva na stabilnost vgrajenega vitamina, zato sprejmemo ničelno hipotezo. Na osnovi dobljenih rezultatov torej ne moremo potrditi, da so TK res najprimernejši sistem za sočasno dostavo AP in vitamina E, saj razlike med sistemi niso statistično zanesljive.

5.1.3 Vpliv strukture nosilnih sistemov na stabilnost vitamina E vgrajenega skupaj z vitaminom C oz. z AP

Delež nerazgrajenega vitamina E vgrajenega skupaj z vitaminom C v SMES, V/O ME in TK je prikazan na sliki 21. Na sliki 22 pa je prikazan delež nerazgrajenega vitamina E sočasno vgrajenega z AP v SMES, V/O ME, TK in O/V ME. Iz obeh slik je razvidno, da je vitamin E, vgrajen sočasno z vitaminom C oz. z AP, v vseh sistemih stabilen ves čas shranjevanja vzorcev.



Slika 21: Delež nerazgrajenega vitamina E vgrajenega skupaj z vitaminom C v SMES, V/O ME in TK v odvisnosti od časa.



Slika 22: Delež nerazgrajenega vitamina E vgrajenega skupaj z AP v SMES, V/O ME, TK in O/V ME v odvisnosti od časa.

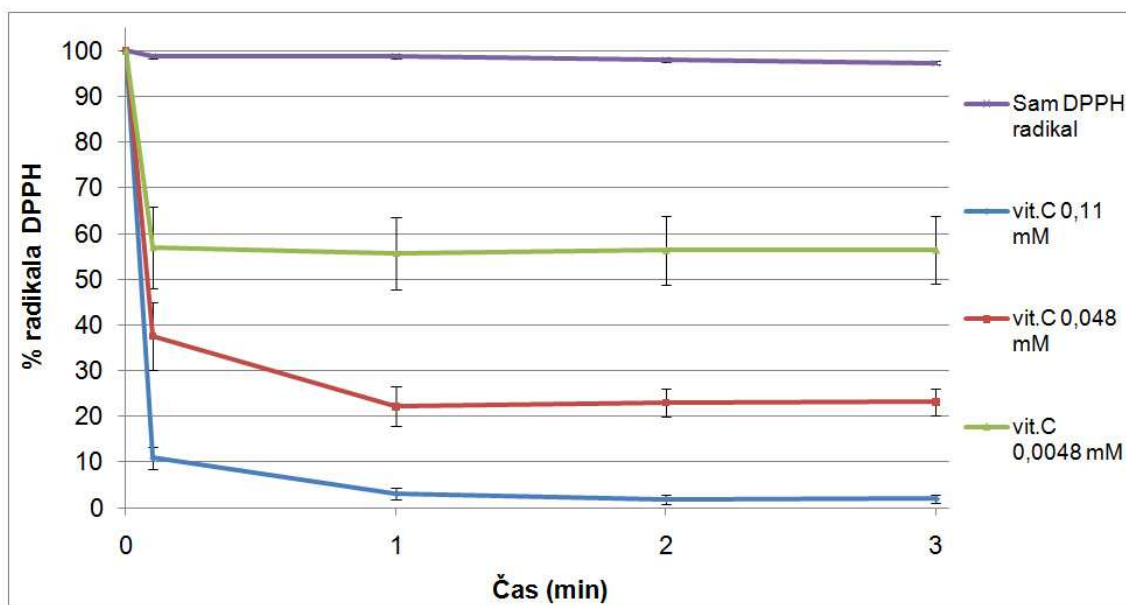
5.2. Ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti vitaminov z DPPH metodo

Z DPPH metodo določamo antioksidativno učinkovitost donorjev vodikovega atoma, kot so AO. Z njo lahko potrdimo, da testirani AO delujejo res kot AO, to je, da lovijo radikale. V prisotnosti dodanega AO se zmanjša absorbanca DPPH radikala sorazmerno s koncentracijo in antioksidativno aktivnostjo dodanega AO. Višja kot je koncentracije slednjega, močnejše je antioksidativno delovanje oz. več molekul DPPH radikala se reducira.

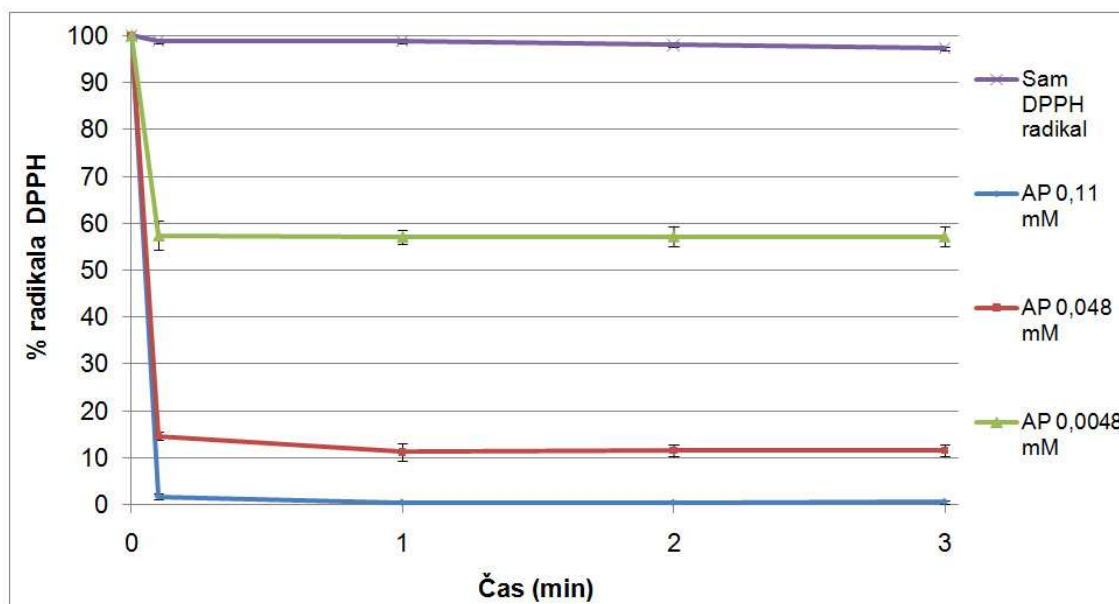
Poudariti je potrebno, da padec absorbance v prvih sekundah testa (ki je razviden iz slik od 23 do 32) ne odraža antioksidativnega učinka vitaminov, temveč je posledica razredčitve osnovne raztopine DPPH radikala zaradi dodatka 1 mL vzorca z vitamini k 2 mL raztopine DPPH radikala. Absorbance smo nato spremljali še določen časovni interval, ki smo ga določili vnaprej. Ob enakih časovnih intervalih smo pomerili tudi absorbance raztopine DPPH radikala brez dodanih vitaminov. S tem smo potrdili, da je znižanje absorbance v prisotnosti testiranih vzorcev res posledica antioksidativne učinkovitosti vitaminov in ne morebitne nestabilnosti raztopine DPPH radikala.

Najprej smo primerjali učinkovitost vseh vitaminov (vitamina C, E in AP) v metanolnih raztopinah. V ta namen smo pripravili raztopine vitaminov s tremi različnimi koncentracijami (0,11, 0,048 in 0,0048 mM) in spremljali padec absorbance pri 515nm.

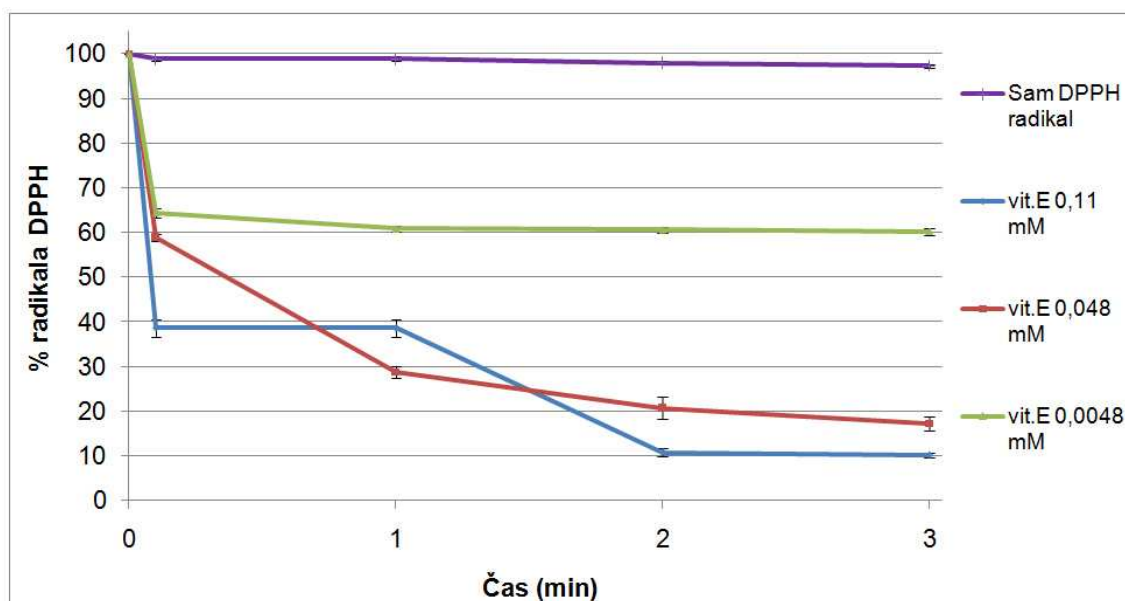
Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala od časa spremljanja absorbance po dodatku raztopin vitaminov v različnih koncentracijah je prikazano na slikah 23, 24 in 25. Iz njih je razvidno, da ni bistvenih razlik med vitamini sploh pri najnižji preskušani koncentraciji. Opazna je le manjša razlika pri 0,11 in 0,048 mM koncentraciji vitaminov v raztopinah, če vzamemo čas kot kriterij za antioksidativno učinkovitost vitaminov. Vsebnost DPPH radikala najhitreje pade po dodatku raztopine AP pri omenjenih koncentracijah; po 1 minuto smo že v področju stacionarnega stanja. Tako lahko sklepamo, da je AP najbolj učinkovit izmed omenjenih vitaminov.



Slika 23: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku raztopine vitamina C v različnih koncentracijah.



Slika 24: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku raztopine AP v različnih koncentracijah.

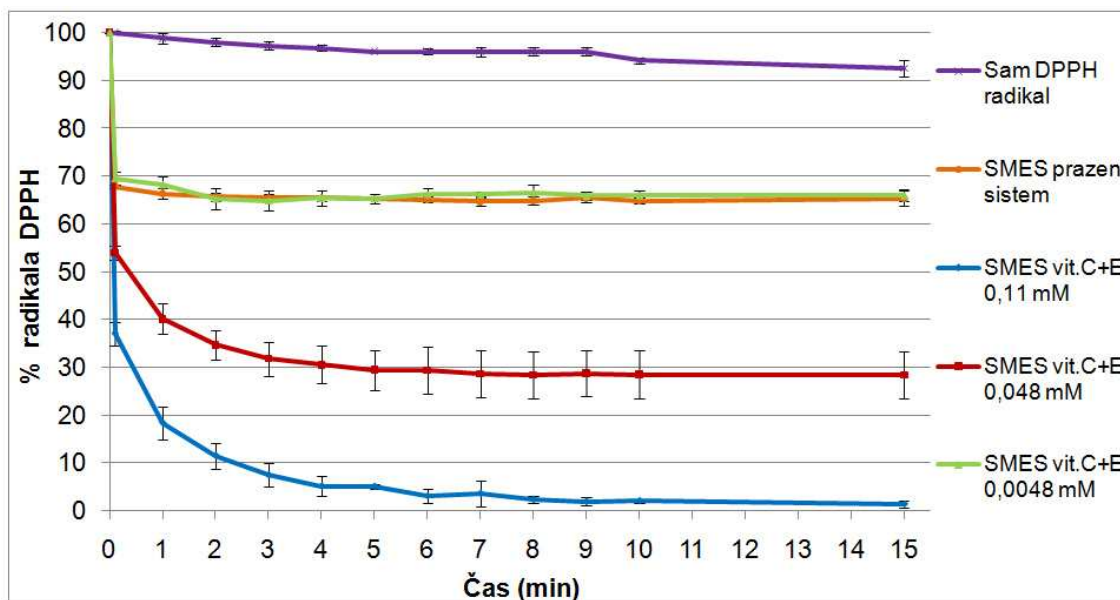


Slika 25: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku raztopine vitamina E v različnih koncentracijah.

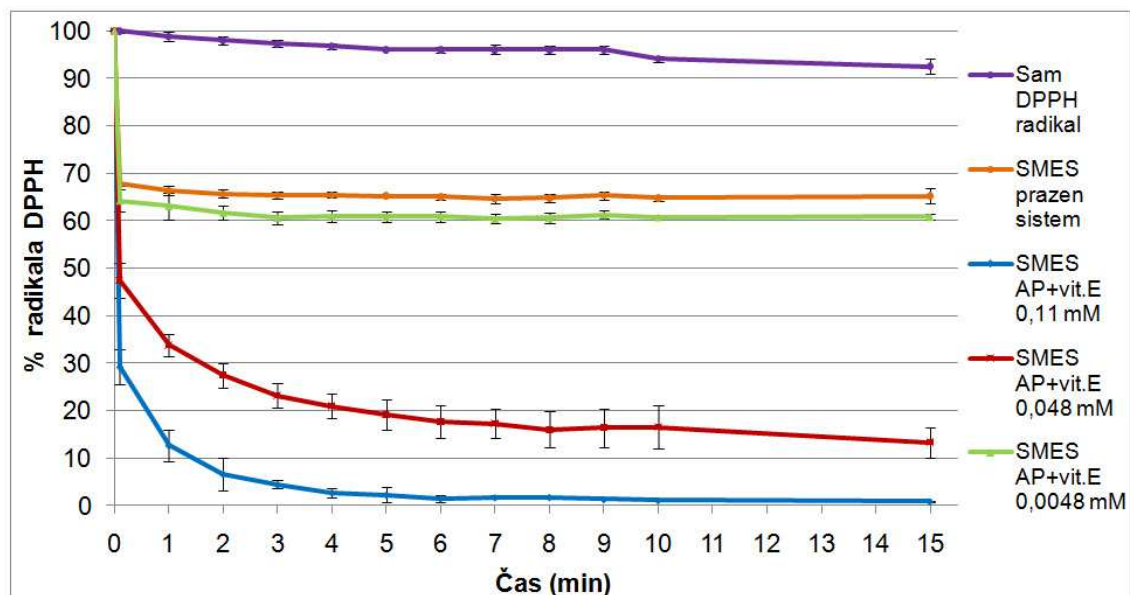
V nadaljevanju smo preučevali vpliv izbranih nosilnih sistemov na antioksidativno učinkovitost vgrajenih vitaminov. Proučevali smo le sisteme, ki so po vgradnji vitaminskih parov vitamin C-vitamin E oz. AP-vitamin E ohranili svojo strukturo. V SMES, V/O ME

in TK smo uspešno vgradili oba para vitaminov, medtem ko v O/V ME le 0,7% (m/m) vitaminskega para AP-vitamin E.

Najprej smo vrednotili vpliv SMES na učinkovitost zgoraj omenjenih vgrajenih vitaminskih parov. V ta namen smo SMES z 1,4% (m/m) vsebnostjo vitaminov ustrezno redčili z metanolom in tako pripravili vzorce s koncentracijami vitaminov 0,11, 0,048 in 0,0048 mM. Obseg redukcije DPPH radikala po dodatku SMES brez in z vgrajenimi vitamini C in E oz. AP in vitamin E je prikazan na slikah 26 in 27. Iz grafov je razvidno, da je obseg redukcije DPPH radikala v odvisnosti od časa večji po dodatku SMES z vgrajenim vitaminskim parom AP-vitamin E. Bistvena razlika je vidna pri 0,048 mM koncentraciji, kjer se je obseg redukcije DPPH radikala po 15 minutah znižal na približno 13%, medtem ko se je pri drugem vitaminskem paru znižal le na približno 28%.

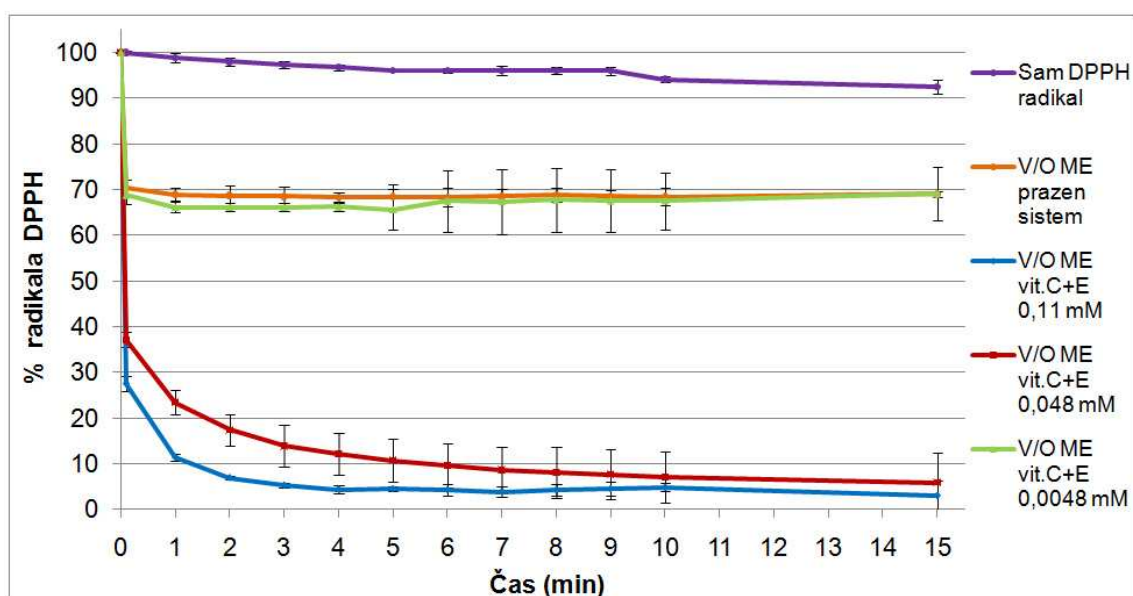


Slika 26: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku SMES brez in z vgrajenima vitaminoma C in E.

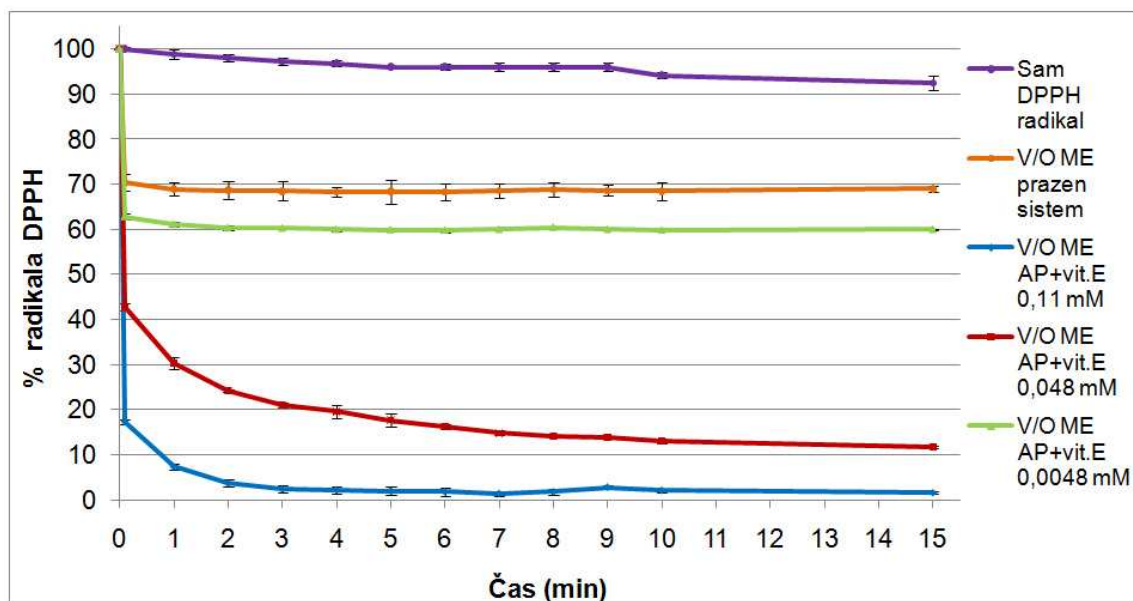


Slika 27: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku SMES brez in z vgrajenim AP in vitaminom E.

V/O ME z vgrajenimi vitamini smo redčili z metanolom in pripravili vzorce vitaminov pri istih koncentracijah kot pri prejšnjem sistemu. Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala od časa spremljanja absorbance po dodatku V/O ME brez in z vitaminskima paroma je prikazana na slikah 28 in 29. V/O ME z vitaminskim parom AP-vitamin E pri 0,11 in 0,0048 mM koncentraciji izkazuje boljšo antioksidativno učinkovitost po 15 minutah merjenja v primerjavi z drugim vitaminskim parom.

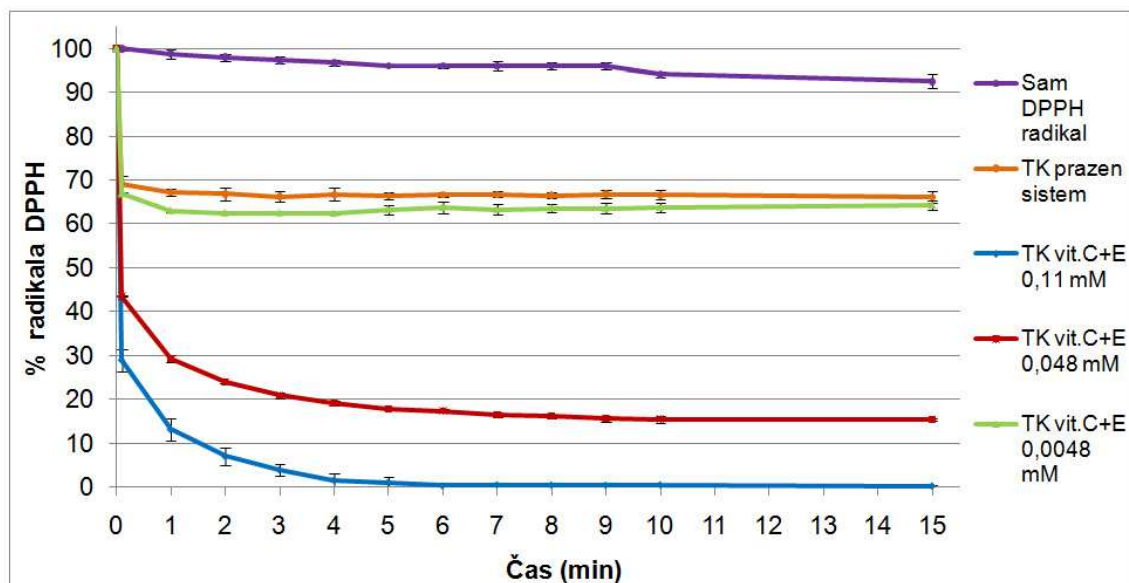


Slika 28: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku V/O ME brez in z vgrajenima vitaminoma C in E (v različnih koncentracijah).

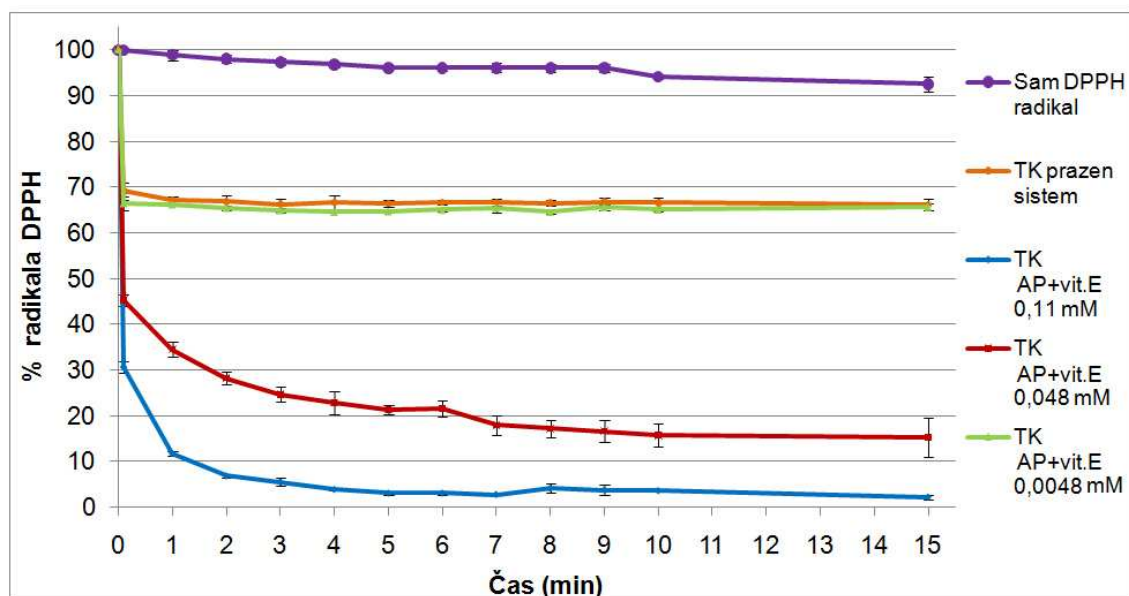


Slika 29: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku V/O ME brez in z vgrajenim AP in vitaminom E (v različnih koncentracijah).

Sposobnost lovljenja radikalov smo preučevali tudi v sistemu TK z vgrajenima obema paroma vitaminov. Sisteme smo redčili po enakem postopku z metanolom in pripravili vzorce z isto koncentracijo vitaminov kot pri prejšnjih sistemih. Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala od časa spremljanja absorbance po dodatku TK brez in z vgrajenima vitaminskima paroma je prikazana na slikah 30 in 31. Ugotovili smo, da med preskušanimi vitaminskima paroma, vgrajenima v TK, skoraj ni razlik v antioksidativni učinkovitosti.



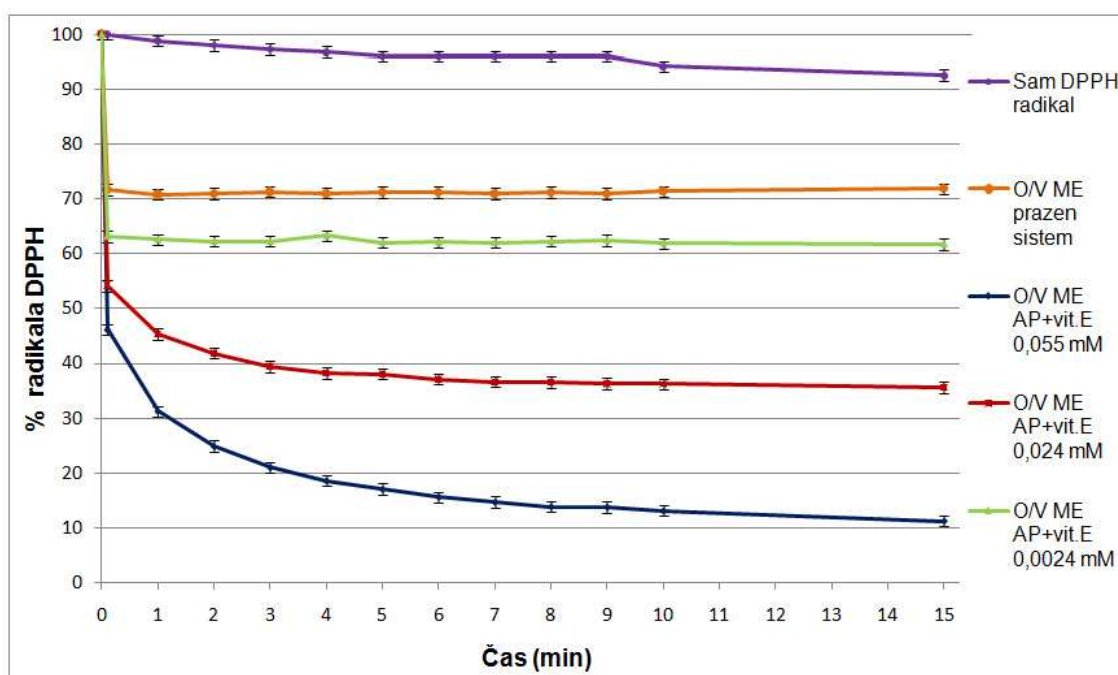
Slika 30: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku TK brez in z vgrajenima vitaminoma C in E (v različnih koncentracijah).



Slika 31: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku TK brez in z vgrajenim AP in vitaminom E (v različnih koncentracijah).

Nadalje smo primerjali še vpliv O/V ME na antioksidativno sposobnost vgrajenega vitaminskega para AP-vitamin E (v molskem razmerju 1:1). Tega sistema pa ne moremo primerjati z istim sistemom z vitaminskim parom vitamin C-vitamin E, ker ju nismo uspeli raztopiti. Zato smo pripravili sisteme z maksimalno možno koncentracijo, kjer sta se oba vitamina še raztopila, to je 0,7% m/m. Najprej smo postopali enako kot pri prejšnjih

vzorcih: redčenje z metanolom in priprava vzorcev s koncentracijo vitaminov 0,055, 0,024 in 0,0024 mM. Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala od časa spremljanja absorbance po dodatku O/V ME brez in z vitaminoma je prikazana na sliki 32. Pri tem nosilnem sistemu je antioksidativna učinkovitost vitaminskega para AP-vitamin E odvisna od faktorja redčenja sistema in s tem od koncentracije vitaminskega para v testiranem sistemu; višja kot je koncentracija, močnejše je antioksidativno delovanje oz. več molekul DPPH radikala se reducira. Ker smo pripravili vzorce z manjšimi koncentracijami, je pričakovano manjši tudi obseg redukcije DPPH radikala v primerjavi z vzorci SMES, V/O ME in TK z višjo koncentracijo. Vzrok je v manjšem deležu vgrajenega AP in vitamina E v O/V ME, ki znaša 0,7%.



Slika 32: Odvisnost obsega redukcije DPPH radikala (v %) od časa spremljanja absorbance po dodatku O/V ME brez in z vgrajenim AP in vitaminom E.

Na osnovi rezultatov DPPH testa lahko povzamemo, da nosilni sistem vpliva na sposobnost vgrajenih vitaminskih parov za lovljenje radikalov. Slednja je odvisna tudi od faktorja redčenja nosilnih sistemov z vgrajenimi vitamini in od koncentracije vitaminskega para v testiranem vzorcu; višja kot je koncentracija, pričakovano močnejše je antioksidativno delovanje oz. več molekul DPPH radikala se reducira.

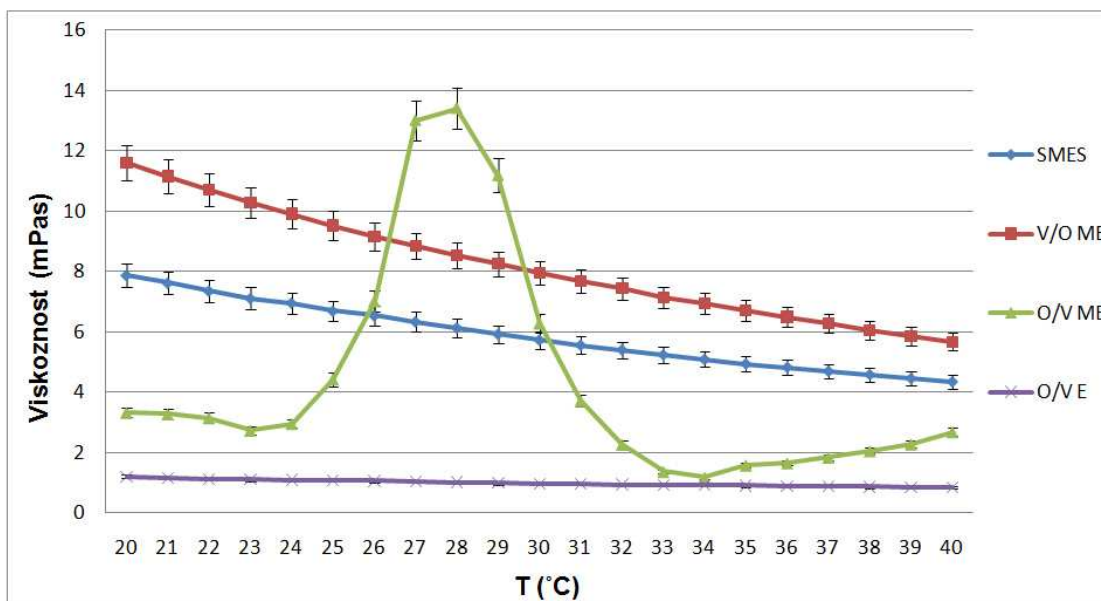
5.3. Vrednotenje viskoznosti

Z namenom proučevanja vpliva notranje strukture in vgradnje vitaminov na reološko obnašanje nosilnih sistemov smo izbranim sistemom z Vibro viskometrom SV-10 določali viskoznost v odvisnosti od temperature, v temperaturnem razponu od 20°C do 40°C. Izbrani temperaturni interval zajema sobno temperaturo (20-25°C), temperaturo na površini kože (32°C) in telesno temperaturo (37°C).

5.3.1 Odvisnost viskoznosti od strukture sistemov

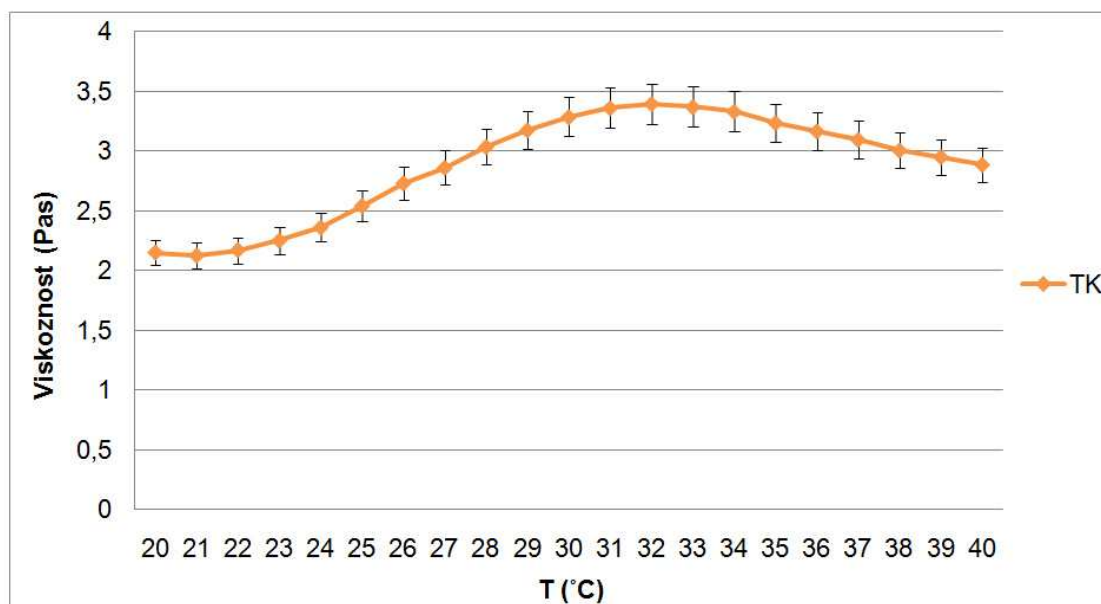
Najprej smo izmerili viskoznost praznih nosilnih sistemov, ki niso imeli vgrajenih vitaminov. Rezultati meritev za SMES, V/O ME, O/V ME in O/V E so prikazani na sliki 33, rezultati za TK pa na sliki 34; slednje smo predstavili ločeno, ker imajo v primerjavi z ostalimi nosilnimi sistemi bistveno večjo viskoznost (za faktor 1000).

Slika 33 prikazuje sisteme SMES, V/O ME in O/V E. Za vse je značilno, da se viskoznost enako spreminja s temperaturo in sicer linearno upada. Pri O/V ME pa krivulja, ki prikazuje odvisnost viskoznosti od temperature, izkazuje obliko parabole in po obliki spominja na krivuljo pri TK, le da ti imajo najvišjo viskoznost. Ugotovili smo, da na viskoznost nosilnih sistemov vpliva vsebnost PAS in vode (do približno 80%). In sicer z naraščanjem deleža le-teh komponent viskoznost sistemov narašča. Predpostavljamo, da voda vpliva preko interakcij s polarnimi glavami molekul lecitina in Tweena[®] 80, ki sta komponenti emulgatorske zmesi. Večja viskoznost sistemov z višjo vsebnostjo PAS pa je povezana tudi z nabrekanjem le-teh, kar vpliva na zgostitev sistemov. Tako imajo lipofilne ME večjo viskoznost v primerjavi s SMES-i, zaradi prisotne vode. Pri sistemih, ki vsebujejo več kot 80% vodne faze (to sta hidrofilna ME in klasična emulzija) pa ta korelacija viskoznosti ne drži več.



Slika 33: Spreminjanje viskoznosti SMES-ov, V/O ME, O/V ME in O/V E s temperaturo.

Spreminjanje viskoznosti TK s temperaturo prikazuje slika 34. Viskoznost v temperaturnem območju od 20°C do 32°C narašča, z nadaljnjim segrevanjem se pa zniža.



Slika 34: Spreminjanje viskoznosti TK s temperaturo.

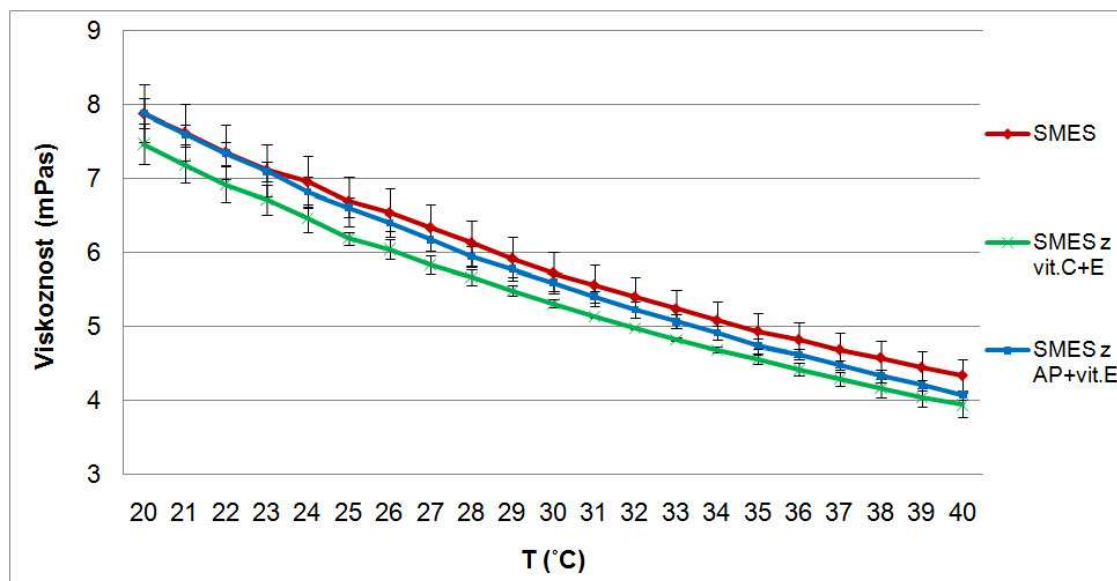
Bistveno višjo viskoznost TK si razlagamo s tvorbo vodikovih vezi med vodo in hidrofilnimi polarnimi glavami fosfatidilholina; le-ta začne nabrekati in konsistenca sistema se poveča. Zmanjšanje viskoznosti TK z naraščanjem temperature pa lahko razložimo na dva načina. Možno je, da je zmanjšanje viskoznosti posledica faznega

prehoda gel–tekoče kristalno stanje. Značilnost amfifilnih fosfolipidov kot je lecitin je, da pri specifični temperaturi, t.j. temperaturi faznega prehoda, prehajajo iz gel faze v tekoče kristalinično fazo. Pod temperaturo faznega prehoda je urejenost verig maščobnih kislin v fosfatidilholinu, ki predstavlja najmanj 94% uporabljenega lecitina, velika, gibljivost pa majhna, zato je to fazo imenujemo gel. Nad to temperaturo pa je kinetična energija molekul in s tem njihova gibljivost večja, njihova urejenost pa manjša. To stanje imenujemo tekoče kristalno stanje (41). Temperatura faznega prehoda za Lipoid S-100[®] znaša 65°C in se spreminja v odvisnosti od pH okolja, prisotnosti kovinskih ionov, stopnjo urejenosti molekule ter z masnim razmerjem med komponentami sistema (41, 42).

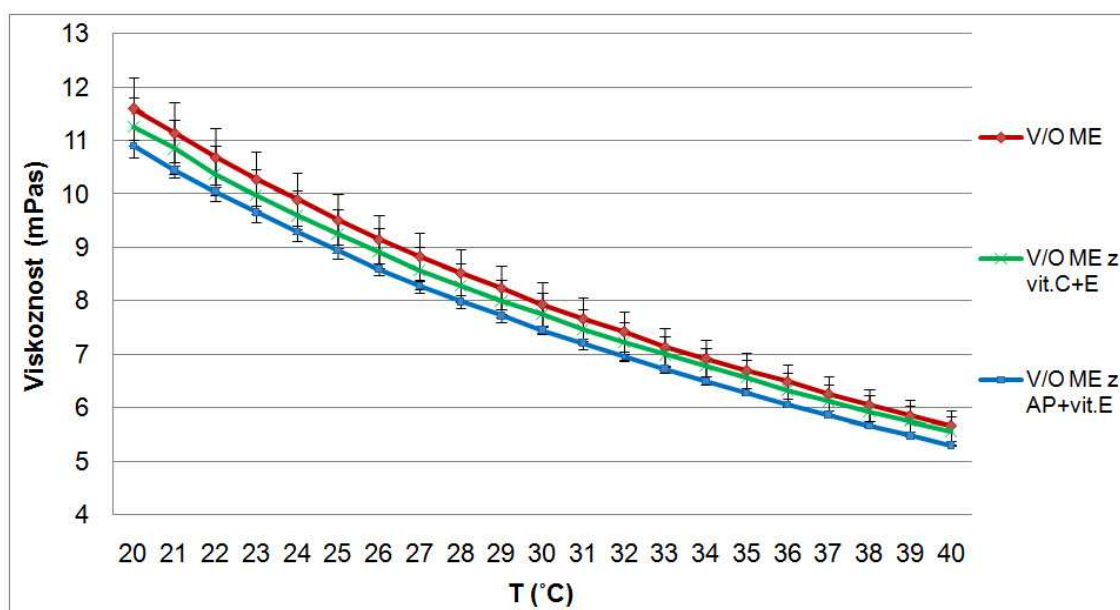
Sklepamo, da je slednji dejavnik ključnega pomena za znižanje temperature faznega prehoda s 65°C na 32°C. Masno razmerje med lecitinom in vodo v TK je 1 : 1,1. Upoštevati je potrebno tudi, da z višanjem temperature pride do izhlapevanja vode in tako do posledičnega zmanjšanja interakcij med lecitinom in vodo, kar vodi v preureditev lamelarne strukture TK ter manjšega nabrekanja le-te, kar vpliva na znižanje viskoznosti sistema. Podoben pojav smo opazili tudi pri O/V ME. Čeprav gre za 1000 krat manjše vrednosti, je opazno podobno izkazovanje oblike krivulje. Pri slednji se viskoznost povečuje do 28°C, nato pada in od 34°C spet raste. Spremembo notranje strukture O/V ME možno tudi vizualno detektirati; pri 28°C (pri kateri smo izmerili najvišjo vrednost sistema) je opalescentna ME prešla v moten sistem.

5.3.2 Vpliv vgrajevanja vitaminov na viskoznost sistemov

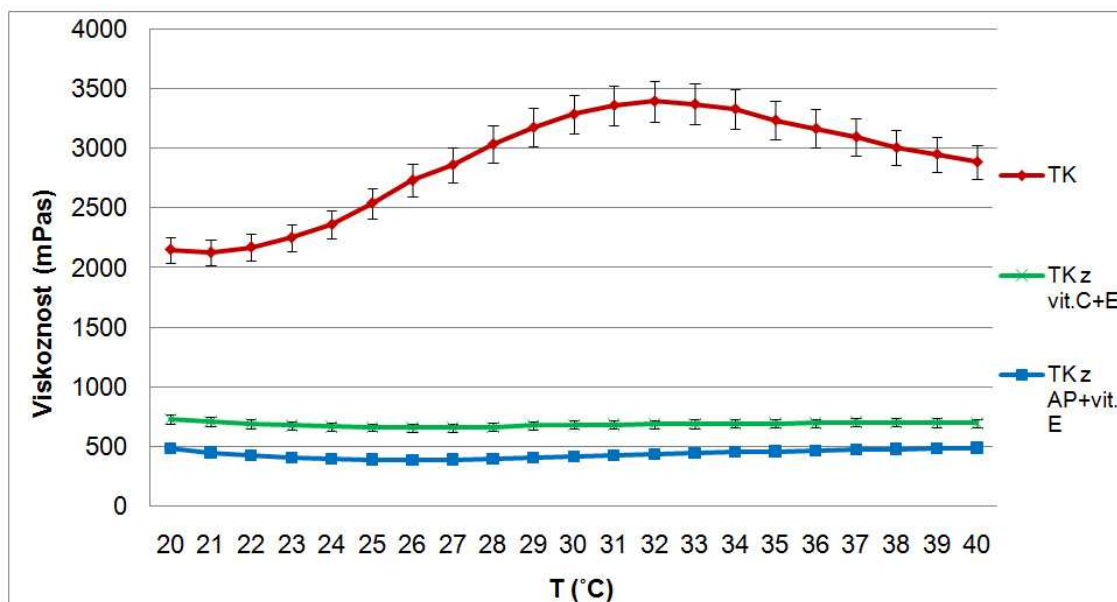
V nadaljevanju smo proučevali vpliv vgrajenih vitaminov na viskoznost preučevanih sistemov. V nosilne sisteme smo simultano vgrajevali vitamina C in E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,4% vitamina C + 1% vitamina E) oz. AP in vitamin E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,687% AP + 0,713% vitamina E). Ker je vgradnja vitaminov porušila notranjo strukturo nekaterih sistemov (hidrofilnih mikroemulzij in klasičnih emulzij), smo v nadaljevanju proučevali le sisteme, ki so po vgradnji vitaminskih parov ohranili svojo stabilnost. V SMES, V/O ME in TK smo uspešno vgradili oba para vitaminov, medtem ko smo v O/V ME lahko uspešno vgradili le vitaminski par AP-vitamin E, v molarnem razmerju 1:1 (0,7% m/m; 0,3435% AP + 0,3536% vitamin E). Vpliv vgrajenih vitaminov na viskoznost nosilnih sistemov je predstavljen na slikah 35, 36, 37 in 38.



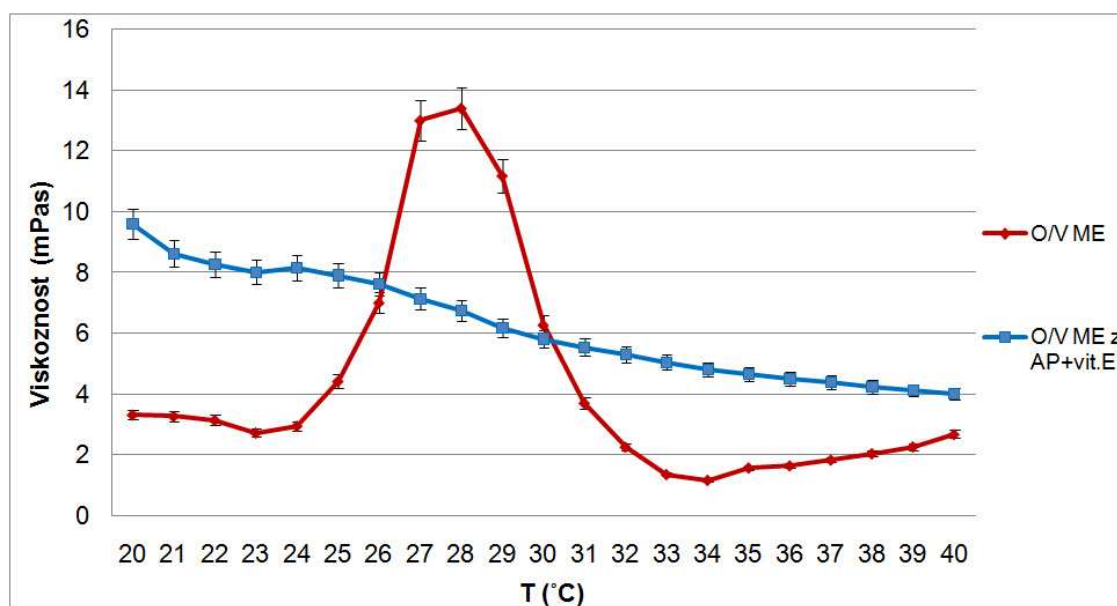
Slika 35: Odvisnost viskoznosti SMES z in brez vgrajenih vitaminskih parov od temperature.



Slika 36: Odvisnost viskoznosti V/O ME z in brez vgrajenih vitaminskih parov od temperature.



Slika 37: Odvisnost viskoznosti TK z in brez vgrajenih vitaminskih parov od temperature.



*O/V ME z vgrajenim vitaminom C in E ni bilo možno izdelati.

Slika 38: Odvisnost viskoznosti O/V ME z in brez vgrajenih vitaminskih parov od temperature.

Iz slik 35 in 36 je razvidno, da 1,4 m/m % vsebnost vitaminov C in E oz. AP in vitamina E v SMES-u in V/O ME ne vpliva bistveno na viskoznost teh sistemov, čeprav se ta po vgradnji vitaminov zmanjša. Opazen pa je drugačen trend znižanja viskoznosti pri

omenjenih sistemih. Sočasna vgradnja vitaminov C in E v SMES je nekoliko bolj znižala viskoznost tega sistema kot vgradnja AP in vitamina E, medtem ko pri V/O ME je opazen obraten vrstni red. Vendar te razlike niso statistično zanesljive.

Iz slik 37 in 38 je razvidno, da je vpliv vgrajenih vitaminskih parov na notranjo strukturo TK in O/V ME bistveno večji. Vgradnja vitaminov v TK močno zniža viskoznost le-teh, prav tako se spremeni tudi oblika krivulje; odvisnost postane linearna (slika 37). Sklepamo, da je sprememba viskoznosti in s tem notranje strukture TK posledica zmanjšanja interakcij med lecitinom in vodo, ki so odgovorne za višjo viskoznost TK. Amfifilen AP se zaradi svoje strukture porazdeli med molekulami lecitina in tako zmanjša interakcije med vodo in lecitinom (34).

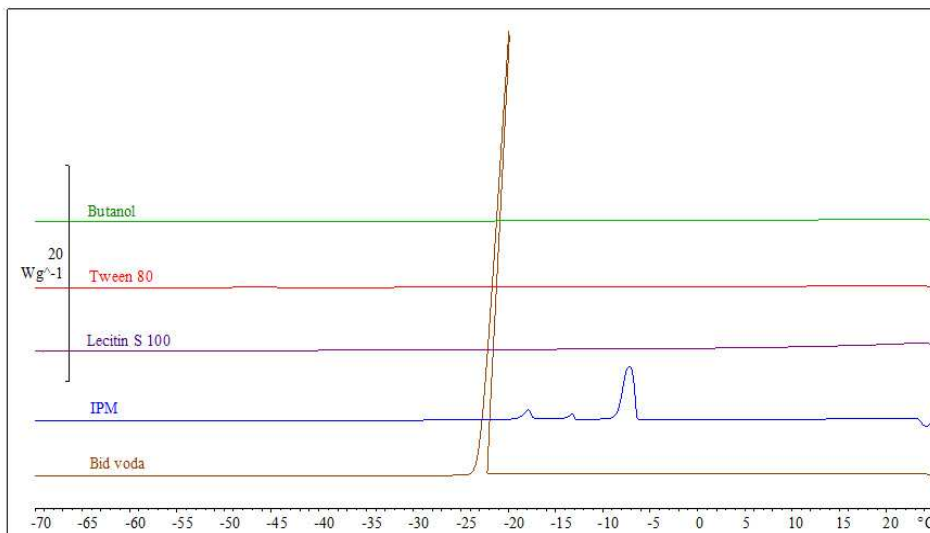
Ravno obratno delovanje AP pa opazimo pri O/V ME na sliki 38. Vgradnja AP in vitamina E v O/V ME poveča viskoznost tega sistema v temperaturnem območju od 20°C do 26°C ter od 31°C do 40°C, medtem ko ga v območju od 27°C do 30°C zniža.

5.4. DCS analiza

Z DSC analizo smo želeli ovrednotiti strukturo nosilnih sistemov pri termičnih spremembah in oceniti vpliv vgradnje vitaminov na samo strukturo sistemov. Spremembe v vzorcih smo spremljali med ohlajanjem vzorcev iz 25°C na -70°C.

5.4.1 Ohlajanje vzorcev

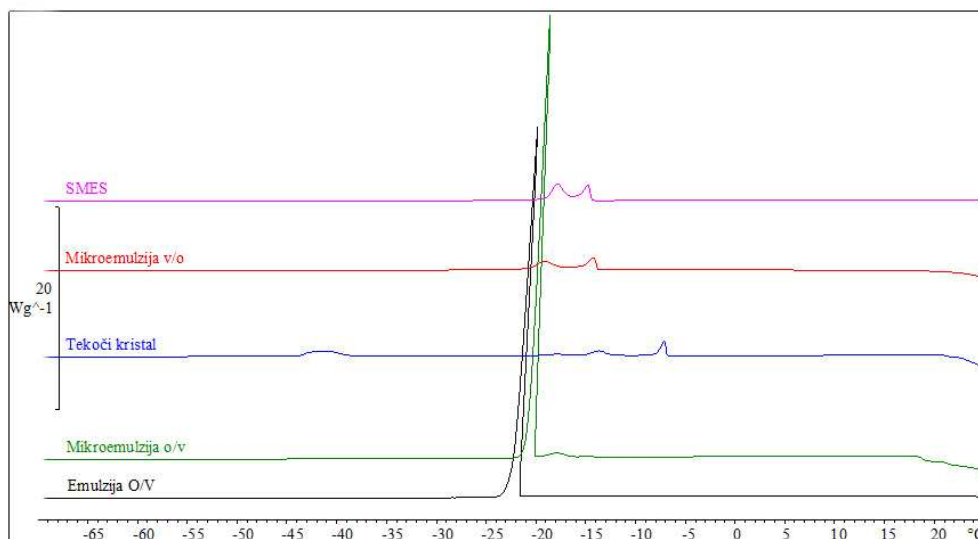
Na sliki 39 so prikazani DSC-termogrami izhodnih komponent nosilnih sistemov. Pri ohlajanju vzorcev sta razvidna eksotermna vrhova pri vodi in IPM. Pri vodi se eksotermni vrh pojavi pri približno -23°C, kar kaže na to, da pride pri tej temperaturi do zamrzovanja vode, ki je v podhlajenem stanju (43). Pri ohlajanju IPM pa so razvidni trije eksotermni vrhovi v temperaturnem intervalu med približno -6°C in -20°C, ki ustrezajo kristalizaciji IPM.



*eksotermni vrhovi so na sliki obrnjeni navzgor

Slika 39: DSC krivulje ohlajanja izhodnih snovi v temperaturnem intervalu od 25°C do -70°C.

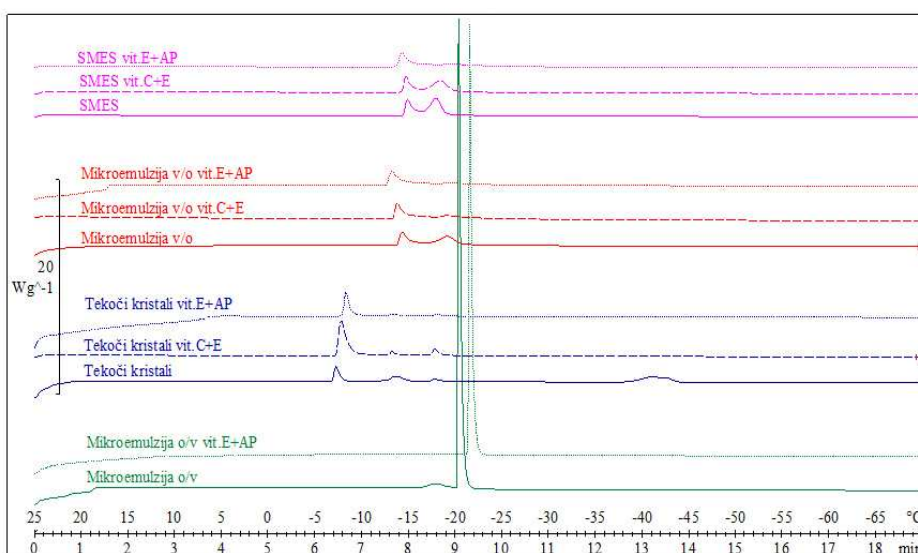
Na sliki 40 so prikazani DSC-termogrami nosilnih sistemov brez vgrajenih vitaminov. Pri TK je na krivulji ohlajanja izražen trojni eksotermni vrh v temperaturnem intervalu med -7°C in -20°C, ki ustreza kristalizaciji IPM. Razviden pa je še eksotermni vrh pri nižjih T (med približno -40°C in -44°C), ki ustreza kristalizaciji vodne faze. Voda se v disperznih sistemih lahko nahaja v dveh oblikah; kot prosta voda ali kot vezana voda. Slednja močno interagira s polarnimi glavami PAS, zato zamrzne pri nižji T kot prosta voda ali šibkeje vezana voda (44). Zaradi omenjenih interakcij t.i. vezana voda v TK zamrzne pri nižji T kot prosta voda, ki je zmrznila pri -24°C. Na krivuljah ohlajanja SMES in V/O ME je izražen dvojni eksotermni vrh v temperaturnem intervalu med -13°C in -20°C, ki ustreza kristalizaciji IPM. Iz termograma je tudi razvidno, da vodna faza v V/O ME ne zmrzne, kar nakazuje, da je voda zelo močno vezana na polarne glave PAS. Na krivuljah ohlajanja O/V ME in O/V E sta razvidna eksotermna vrhova med približno -22°C in -24°C, ki ustrezata kristalizaciji vodne faze, slednja zmrzne pri približno enaki temperaturi kot prosta voda, kar kaže, da je v omenjenih sistemih voda zelo šibko vezana.



*eksotermni vrhovi so na sliki obrnjeni navzgor

Slika 40: DSC krivulje ohlajanja nosilnih sistemov v temperaturnem intervalu od 25°C do -70°C.

V nadaljevanju smo proučevali vpliv vgrajenih vitaminskih parov na proces ohlajanja nosilnih sistemov (rezultate prikazuje slika 41). Proučevali smo le sisteme, ki so po vgradnji vitaminskih parov vitamin C-vitamin E oz. AP-vitamin E ohranili svojo strukturo. V SMES, V/O ME in TK smo uspešno vgradili oba para vitaminov, medtem ko v O/V ME le AP-vitamin E. Tako dobljene termograme smo primerjali s termogrami odgovarjajočih nosilnih sistemov brez vgrajenih vitaminov.



*eksotermni vrhovi so na sliki obrnjeni navzgor

Slika 41: DSC krivulje ohlajanja vzorcev z vgrajenima vitaminoma E in AP (drobno prekinjena črta), z vgrajenima vitaminoma C in E (prekinjena črta) in brez vgrajenih vitaminov (neprekinjena črta) v temperaturnem intervalu od 25°C do -70°C.

Na krivuljah ohlajanja SMES in V/O ME sistema brez vgrajenih vitaminov je izražen dvojni eksotermni vrh (v temperaturnem intervalu med -14°C in -21°C), ki ustreza kristalizaciji IPM. Z vgradnjo vitaminov v ta sistema ni prišlo do bistvenih sprememb. Ob vgradnji vitaminskega para vitamin C-vitamin E v omenjena sistema se nekoliko slabše izrazi dvojni eksotermni vrh, ki ustreza kristalizaciji IPM. Pri vgradnji AP in vitamina E pa je opazen rahel premik k nižjim temperaturnim vrednostim. Na DSC-termogramu TK brez vgrajenih vitaminov je izražen trojni eksotermni vrh (v temperaturnem intervalu med -7°C in -20°C), ki ustreza kristalizaciji IPM ter eksotermni vrh pri nižjih T (med približno -40°C in -44°C), ki ustreza kristalizaciji vodne faze. Slednji izgine pri dodatku vitaminov v sam sistem. Na krivulji ohlajanja O/V ME pa se je po vgradnji AP in vitamina E izražen eksotermni vrh kristalizacije vodne premaknil k rahlo nižjim temperaturnim vrednostim.

5.5. Ugotavljanje preživetja celic z MTS testom

Vsako substanco in pripravke, ki so namenjeni uporabi na koži, je potrebno opredeliti z vidika iritacije kože. S tem zagotavljamo varnost izdelkov za dermalno uporabo. Mehanizem iritacije kože, ki ga povzročajo PAS in drugi iritanti (katerakoli snov, ki lahko poškoduje celice kože, če je v stiku z njimi dovolj dolgo in v zadostni koncentraciji), je odvisen od narave vključenih iritantov, od celovitosti rožene plasti in sposobnosti ohranjanja njene barijerne funkcije (45).

Še pred prepovedjo testiranja na živalih so razvili alternativne metode za določanje iritantov, tako »*in vitro*« kot tudi »*in vivo*« na ljudeh. Najboljši sistem za vrednotenje varnosti in učinkovitosti dermalnih pripravkov je človeška koža »*in vivo*«. Zaradi etičnih razlogov pa se želimo izogniti »*in vivo*« testiranju. Posledično je bilo v zadnjih desetletjih veliko truda vloženega v razvoj »*in vitro*« modelov. Pri določanju iritacije »*in vitro*« so se pri razvoju metod osredotočili na keratinocite zaradi njihove pomembne vloge pri iniciaciji, modulaciji in regulaciji iritacije kože. Razvili so tridimenzionalne celične kulture

(kot so rekonstruirani kožni modeli: EpiSkin™, SkinEthic™ in EpiDerm™) in monokulture človeških keratinocitov (46).

Vsako substanco in pripravke za dermalno uporabo je potrebno opredeliti z vidika iritacije kože. Z »*in vitro*« MTS testom, ki temelji na kolorimetričnem določanju števila živih celic (keratinocitov), smo določiti »*in vitro*« citotoksičnost in s tem potencialno iritabilnost nosilnih sistemov.

Preživetje celic smo določali po izpostavitvi celic posameznim nosilnim sistemom (SMES, V/O ME, TK, O/V ME in O/V E) brez vgrajenih vitaminov. Sistemov z vitamini nismo testirali, saj slednji interagirajo z reagenti MTS testa in dajejo napačne rezultate. Testirani sistemi se razlikujejo glede na delež posamezne komponente (sestava je podana v preglednici VII), zato je bil naš namen ovrednotiti vpliv sistemov na preživetje celic v odvisnosti od deleža posamezne komponente.

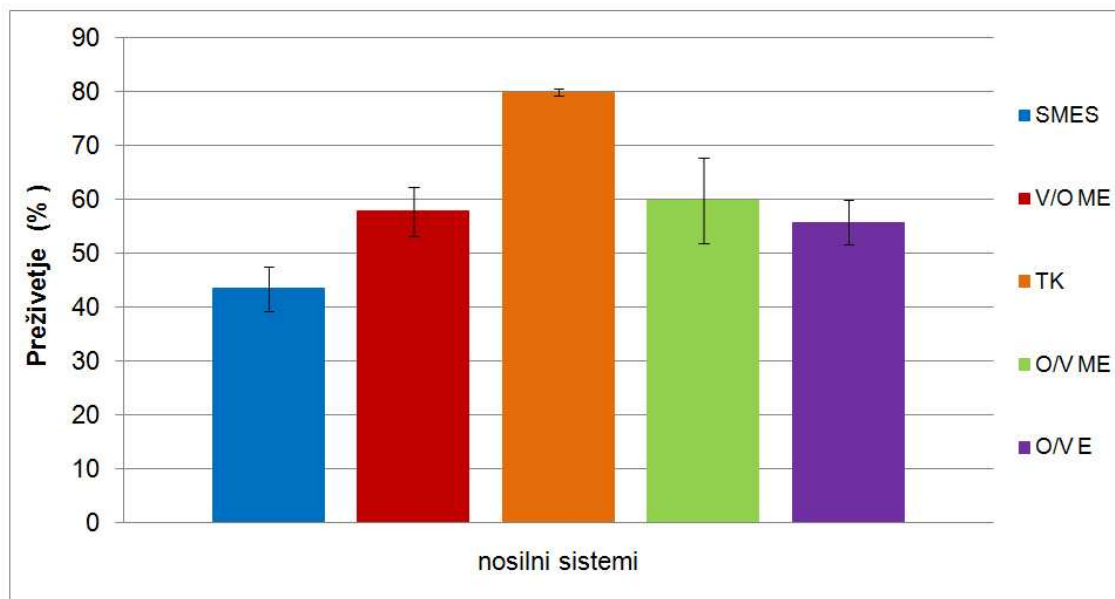
Preglednica VII: Receptura nosilnih sistemov (m/m%)

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

Sistemi so sestavljeni iz IPM kot lipofilne faze, Tweena[®] 80 in lecitina kot emulgatorske zmesi in butanola kot koemulgatorja (razen v primeru TK) ter vode kot hidrofilne faze. Z vidika sprejemljivosti za kožo so med lipofilnimi komponentami najbolj primerni estri maščobnih kislin, med njimi tudi IPM; so namreč biokompatibilni in biorazgradljivi. Prav tako je zelo pomembna izbira PAS, saj lahko slednja zaradi svoje specifične zgradbe izzovejo iritacijo kože po različnih mehanizmih. Potencial iritacije pa je odvisen od kemijske strukture (PAS) (30). Lecitin je predstavnik zwitterionskih PAS, naravni fosfolipid in sestavni del bioloških membran. Splošno je priznan kot varna snov (GRAS), je biokompatibilen in biorazgradljiv. Tween[®] 80 je predstavnik neionskih PAS, ki dokazano izkazujejo najmanjšo stopnjo iritacije v primerjavi z anionskimi in kationskimi PAS in se posledično najpogosteje uporabljajo v farmacevtskih pripravkih (47, 48).

Butanol kot koemulgator omogoči nastanek mikroemulzij, hkrati pa lahko butanol kakor tudi ostali kratkoveržni alkoholi sproži iriacijo kože, saj poškoduje celične membrane in povzroči dezorganizacijo lipidnih dvojnih plasti v koži (49-51).

Testirane sisteme smo predhodno ustrezno redčili, tako da je bila skupna koncentracija vseh komponent, z izjemo vode, za vse sisteme enaka. Na sliki 42 so predstavljeni rezultati MTS testa, to je procent preživelih celic (povprečje treh paralel) za posamezne nosilne sisteme.



Slika 42: Delež preživetja keratinocitov po izpostavitvi nosilnim sistemom (SMES, V/O ME, TK, O/V ME in O/V E).

Iz rezultatov MTS testa je razvidno, da imajo TK najnižjo citotoksičnost, saj je preživetje keratinocitov približno 80%. Ta rezultat je bil pričakovan glede na sestavo sistema, kar pripisujemo predvsem odsotnosti alkohola, t.j. butanola. Hkrati rezultati potrjujejo rezultate *Morena*, ki je v svoji raziskavi prav tako potrdil, da Tween[®] 80 ni odgovoren za iritacijo kože (47). TK namreč vsebuje največji delež Tween[®] 80 v primerjavi z ostalimi sistemi, in sicer 22,5%. Drugi največji delež preživetja celic smo določili po izpostavitvi celic O/V ME-približno 60%. Delež emulgatorske zmesi in lipofilne faze je pri O/V ME sicer manjši v primerjavi s TK, vendar O/V ME vsebujejo butanol. Sklepamo, da je ravno dodatek butanola povzročil padec preživetja celic za okoli 20% v primerjavi s preživetjem celic pri TK. Pri V/O ME je bil procent preživetja celic 58%, pri O/V E je znašal okoli 56%. Razlika ni signifikantna v primerjavi z O/V ME, kljub razlikam v deležu posameznih

komponent oz. če upoštevamo, da je delež butanola pri V/O ME bistveno večji v primerjavi z O/V ME ali O/V E. V skladu s pričakovanji je bila nanjižja stopnja preživetja pri SMES; le-ta je znašala 43%. Sistem namreč vsebuje največji delež lipofilne faze (40%) in koemulgatorske komponente (30%) v primerjavi z ostalimi sistemi. Zaključimo lahko, da je najbolj citotoksična komponenta butanol, saj je preživetje keratinocitov največje pri TK, ki ga ne vsebujejo.

Z vrednotenjem citotoksičnosti z MTS testom smo pridobili osnovne informacije o citotoksičnosti izbranih nosilnih sistemov za dermalno uporabo, seveda pa so potrebne obširne nadaljne študije. Dejstvo ostaja, da lahko z ustreznim predhodnim izborom komponent bistveno vplivamo na sprejemljivost končnih sistemov. Glede na rezultate bi bil smotrni nadaljnji razvoj sistema za dermalno aplikacijo AO usmeriti na področje TK. V kolikor bi se ME ali SMES izkazali kot primerni sistemi za dostavo AO (omogočali ustrezno stabilnost le-teh) bi bilo potrebno najti zamenjavo za butanol. Ustrezna alternativa kratkoveržnim alkoholom namreč predstavljajo različni polimeri (polietilen glikoli), ki prav tako omogočajo večjo ukrivljenost emulgatorskega filma, kar je pomembno za nastanek mikroemulzij. *J. S. Yuan* s sodelavci je dokazala, da uporaba polimerov omogoča nastanek manj toksičnih mikroemulzij, hkrati pa imajo formulacije večjo viskoznost kar hkrati predstavlja prednost za dermalno aplikacijo (51).

6.SKLEPI

Za izdelavo dermalnih koloidnih sistemov smo uporabili IPM kot lipofilno fazo, Tween[®]80 in lecitin kot emulgatorja, butanol kot koemulgator in bidestilirano vodo kot vodno fazo. Osredotočili smo se na strukturno različne sisteme s stalnim razmerjem med emulgatorsko in lipofilno fazo; SMES, V/O ME, TK, O/V ME in O/V E, v katere smo simultano vgrajevali vitamina C in E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,4% vitamina C + 1% vitamina E) oz. AP in vitamin E v molarnem razmerju 1:1 (1,4% m/m; 0,687% AP + 0,713% vitamina E). V SMES, V/O ME in TK smo uspešno vgradili oba para vitaminov, medtem ko smo v O/V ME vgradili le vitaminski par AP-vitamin E, v molarnem razmerju 1:1 (0,7% m/m; 0,3435% AP + 0,3536% vitamin E). Vitaminskih parov pa nismo mogli uspešno vgraditi v O/V E; prišlo je do obarjanja.

V študijah stabilnosti smo s HPLC analizo spremljali spreminjanje vsebnosti posameznih vitaminov v nosilnih sistemih v odvisnosti od časa (2 meseca). Ugotovili smo, da je stabilnost vitamina C sočasno vgrajenega z vitaminom E največje v TK. V primeru AP sočasno vgrajenega z vitaminom E pa smo ugotovili, da med preiskovanimi nosilnimi sistemi ni statistično značilnega vpliva na stabilnost AP. Kot pričakovano pa smo potrdili, da je vitamin E z vidika stabilnosti pri sobnih pogojih shranjevanja stabilna substanca. Iz dobljenih rezultatov diplomskega dela lahko tudi sklepamo, da predstavlja sočasna vgradnja vitaminskega para vitamina C in E v novejši koloidne sisteme za dermalno uporabo boljše izbiro kot vitaminski par AP in vitamin E.

Antioksidativno učinkovitost vitaminov smo preizkušali z DPPH metodo, ki se je izkazala za primerno in ugotovili, da nosilni sistemi z različno notranjo strukturo vplivajo na sposobnost vgrajenih vitaminskih parov za lovljenje radikalov. Slednja je odvisna od faktorja redčenja nosilnih sistemov z vgrajenimi vitamini in s tem od koncentracije vitaminskega para v testiranem vzorcu; višja kot je koncentracija, močnejše je antioksidativno delovanje.

Z Vibro Viskometrom SV-10 smo v temperaturnem razponu od 20°C do 40°C nosilne sisteme reološko ovrednotili in potrdili, da so TK najbolj viskozni in s tem najbolj primerni za dermalen nanos na kožo. Viskoznost se po vgradnji vitaminov v sisteme sicer zmanjša, vendar so razlike minimalne. Bistveno spremembo opazimo le pri vgradnji vitaminskega

para AP-vitamin E v O/V ME in vitaminov v TK. Krivulja viskoznosti O/V ME se povečuje do 26°C, nato pada in od 31°C spet raste. Po vgradnji vitaminskega para pa pride do zmanjšanja viskoznosti sistema z naraščanjem temperature. Vgradnja vitaminov v TK pa močno zniža viskoznost sistema in prav tako je opazna tudi sprememba oblike krivulje iz parabolične v linearno obliko. Vendar je viskoznost TK tudi po vgradnji vitaminov še vedno bistveno večja.

Z DSC analizo smo z ohlajanjem iz 25°C na -70°C določili pike zamrzovanja posameznih komponent ter tako posredno raziskovali strukturo. Potrdili smo, da se voda v TK nahaja v obliki vezane vode in po vgradnji vitaminov pik zamrznitve izgine.

Z MTS testom na celičnih kulturah keratinocitov smo ugotovili, da je preživetje celic po izpostavitvi TK večja kot pri ostalih nosilnih sistemih kar pripisujemo dejstvu, da ne vsebujejo butanola.

Rezultati diplomskega dela potrjujejo, da so na lipidih osnovani koloidni sistemi; SMES-i, ME in TK s sestavo lecitin/ Tween[®] 80/IPM/butanol/voda primerni za sočasno dermalno aplikacijo vitaminov E in C ali AP. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da so TK najbolj primerni za dermalno uporabo in samo vgradnjo vitaminskih parov. Seveda pa bi bilo potrebno nadaljnjo raziskovalno delo z natančnim ovrednotenjem TK kot sistem za dostavo vitaminov.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Kristl J. (urednica): Koža, sonce, zdravje, lepota: podiplomsko strokovno izobraževanje (izbrana poglavja); Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; 2004.
2. Kristl J. Sodoben pogled na kožo in dogajanja v njej. Izbrane vsebine iz kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2009.
3. Perdih A, Pečar S. Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Farm Vestn 2006; 57: 24 – 29.
4. Rozman B, Gasperlin M. Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. Drug Deliv, 2007; 14:235–45.
5. Gašperlin M. »Cosmeceuticals«-mejna skupina med kozmetičnimi izdelki in dermatiki. Izbrane vsebine iz kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2009.
6. Vermeer BJ, Gilchrest BA. Cosmeceuticals. A proposal for rational definition, evaluation and regulation. Arch Dermatol 1996; 132(3): 337-340
7. Burke KE. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. Dermatol. Ther. 2007; 20(5): 314-321.
8. Chiu A, Kimball AB. Topical vitamins, Minerals and Botanical Ingredients As Modulators of Environmental and Cronological Skin Damage. Br J Dermal 2003 149(4):681-691.
9. Jurkovič P, Šentjurc M, Gašperlin M, Kritl J, Pečar S. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. Eur J Pharm and Biopharm 2003; 56(1): 59-66.
10. Austria R, Semenzato A, Bettero A: Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1997; 15: 795-801.
11. Rozman B. Topical microemulsions containing vitamine C and E: from formulation optimisation to evaluation using reconstructed human epidermis. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
12. Thiele J.J. Oxidative targets in the stratum corneum: a new basis for antioxidative strategies. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2001: 14: 87–91.

13. Ekanayake-Mudiyanselage, Tavakkol A, Polefka TG. Vitamin E delivery to human skin by a risde-off product: penetration of alpha-tokopherol versus wash-out effects of skin surface lipids. *Skin Pharmacol Physiol* 2005 Jan-Feb; 18(1):20-6.
14. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J. Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Med Razgl* 2006; 45: 141-153.
15. Trojak A, Kristl J. Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farm Vestn* 1999; 50: 443-453.
16. Gašperlin M, Kristl J. Inovativni pristopi k oblikovanju kozmetičnih negovalnih izdelkov, *Farm Vestn* 2000; 51: 269-276.
17. Timpe C. Drug solubilization strategies: Applying solid dispersion and nanoparticulate formulation approadres in srug development. Predavanje: 3th Annual Congress Strategies to enhance Solubility and Drug Absorption.
18. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 173-182.
19. Jurkovič P, Gašperlin M. Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin. *Farm Vestn* 2004; 55: 565-571
20. Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Controll rel* 2004; 98: 427-436.
21. Rozman B, Gosenca M, Gasperlin M, Padois K, Falson F. Dual influence of colloidal silica on skin deposition of vitamins C and E simultaneously incorporated in topical microemulsions. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2010; 36(7): 852–860.
22. Makai M, Csányi E, Németh Zs, Pálinkás J, Erős I: Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 256: 95-107.
23. Roginsky V, Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 2005; 92, 2: 235-254
24. Antolovich M. Prenzler P.D. Patsalides E. McDonald S. Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002,127: 183-198.

25. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* 2009; 2:41–60.
26. Prior R.L, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290-4302.
27. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004: 26(2); 212-219
28. Villaño D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Trosoco AM, Garcia-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007: 71; 230-235.
29. Sanchez-Moreno C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology*, 8:121 - 137.
30. Rowe C, Sheskey PJ, Weller JP: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th ed., Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association 2003: 123-131, 479-483, 340-341.
31. Kralj L: Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2009.
32. Elektronski vir: <http://www2.basf.us/oxoproducts/pdfs/n-but.pdf>
33. Vaupotič Č. V, Krbavčič A: Askorbilpalmitat. *Farm Vestn* 2000; 51: 133-140.
34. Čerpnjak K: Vrednotenje koloidnih sistemov z lecitinom za dermalno aplikacijo askorbilpalmitata. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2010.
35. Vibro Viscometer SV-10: navodila za uporabo
36. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm Vest* 2001; 52: 173-185
37. Promega Technical Bulletin: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instruction for use of products G3580, G3581 and G3582, ZDA, 2009.

38. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 222: 271-279.
39. Gallarate M, Carlotti M.E, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 188, 233–241.
40. Kristl J, Volk B, Gašperlin M, Šentjurs M, Jurkovič P. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 19 2003; 181-189.
41. Harms M, Mackeben S, Müller-Goymann C.C. Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/isopropyl myristate/water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2005; 259: 81–87.
42. Elektronski vir: http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/1999report/part2/contrib/73/1295.pdf
43. 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. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 276: 115-128.
44. Garti N, Aserin A, Tiunova I, Fanun M: A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 2000; 170: 1-18.
45. Welss T, Basketter DA, Schröder KR: In vitro skin irritation: facts and future. State of art review of mechanisms and models, *Toxicol Vitro* 18: 231-243
46. Macfarlane M, Jones P, Goebel C, Dufour E, Rowland J, Araki D, Costabel-Farkas M, Hewitt N. J, Hibatallah J, Kirst A, Mcnamee P, Schellauf F. and Scheel J. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 54, 188-196
47. Moreno J. J. Arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis as irritant index of surfactants in 3T6 fibroblast cultures. *Toxicology* 2000; 143, 275-282.
48. Malmsten M. *Surfactants and Polymers in drug delivery*. Marcel Dekker, Inc., New York 2002.

49. Huang Y. B, Lin Y. H, Lu T. M, Wang R. J, Tsai Y. H. & Wu P. C. Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 349, 206-211.
50. Zhu W, Guo C, Yu A, Gao Y, Cao F. & Zhai G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 378, 152-158.
51. Yuan J. S, Ansari M, Samaan M. & Acosta E. J. Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 349, 130-143.