

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



EVA BIZJAK

**PROBLEMATIKA STISKANJA TEKOČIH  
SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČIH SISTEMOV V TABLETE**

**CHALLENGES OF COMPRESSING LIQUID  
SELF(MICRO)EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS INTO  
TABLET DOSAGE FORM**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.

## **ZAHVALA**

*Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in delovni mentorici Katarini Bolko, mag. farm. za strokovno pomoč, potrpežljivost, dosegljivost in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala gre asist. dr. Iliji Ilić, mag. farm in dr. Matevžu Luštriku, mag.farm. za pomoč in koristne nasvete pri tabletiranju ter doc.dr. Petri Kocbek, mag. farm. za izvedbo posnetkov SEM vseh vzorcev praškov.*

*Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomske naloge, še posebej Tatjani Horvatič, ing. kem. teh. in Mojci Keržan, ing. kem. teh.*

*Nenazadnje pa se zahvaljujem tudi svojim najbližjim, ki so vedno verjeli vame in me spodbujali na vsakem koraku.*

## **IZJAVA**

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

Ljubljana, 2013

Eva Bizjak

## **Diplomska komisija:**

Predsednik: prof. dr. Janja Marc, mag. farm, spec. med. biokem.

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag.farm.

Član: asist. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                               |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>KAZALO VSEBINE</b> .....                                                                   | I    |
| <b>KAZALO SLIK</b> .....                                                                      | III  |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....                                                                | V    |
| <b>POVZETEK</b> .....                                                                         | VI   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                         | VIII |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....                                                                  | X    |
| <b>1 UVOD</b> .....                                                                           | 1    |
| 1.1 RESVERATROL .....                                                                         | 2    |
| 1.1.1 Učinki resveratrola .....                                                               | 3    |
| 1.2 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI .....                                                         | 5    |
| 1.3 SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI .....                                                     | 6    |
| 1.4 TEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA IZDELAVO TRDNIH SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČIH FARMACEVTSKIH OBLIK ..... | 9    |
| 1.4.1 Adsorpcija na trdne nosilce/površine .....                                              | 9    |
| 1.4.2 Sušenje z razprševanjem .....                                                           | 12   |
| 1.4.3 Iztiskanje in krogličenje .....                                                         | 13   |
| 1.4.4 Tehnologije s talinami .....                                                            | 13   |
| 1.4.5 Mikrokapsuliranje .....                                                                 | 14   |
| 1.4.6 Tabletiranje .....                                                                      | 15   |
| 1.5 SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČE TABLETE .....                                                     | 15   |
| <b>2 NAMEN DELA</b> .....                                                                     | 18   |
| <b>3 EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....                                                           | 19   |
| 3.1 MATERIALI .....                                                                           | 19   |
| 3.2 NAPRAVE .....                                                                             | 22   |
| 3.3 METODE .....                                                                              | 23   |
| 3.3.1 Priprava SMES-a .....                                                                   | 23   |
| 3.3.2 Adsorpcija SMES-a na trdne nosilce .....                                                | 23   |
| 3.3.3 Tabletiranje .....                                                                      | 24   |
| 3.3.4 Vrednotenje tablet .....                                                                | 25   |
| 3.3.5 Merjenje velikosti kapljic .....                                                        | 26   |

|          |                                                                                     |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.6    | Vrstična elektronska mikroskopija .....                                             | 27        |
| 3.3.7    | Preskus sproščanja .....                                                            | 27        |
| 3.3.8    | HPLC analiza sproščenega resveratrola .....                                         | 29        |
| <b>4</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....                                                  | <b>32</b> |
| 4.1      | Vrednotenje in izbira primernih trdnih nosilcev .....                               | 32        |
| 4.2      | Razvoj samomikroemulgirajočih praškov in tablet .....                               | 33        |
| 4.3      | Vrednotenje farmacevtsko-tehnoloških parametrov samomikroemulgirajočih tablet ..... | 37        |
| 4.4      | Vrednotenje samomikroemulgirajočih lastnosti .....                                  | 41        |
| 4.5      | Morfološke lastnosti samomikroemulgirajočih praškov .....                           | 44        |
| 4.6      | Rezultati preskusa sproščanja .....                                                 | 48        |
| 4.6.1    | Sproščanje RSV iz SMES-a polnjenega v trde/mehke želatinske kapsule ....            | 48        |
| 4.6.2    | Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih praškov .....                              | 51        |
| 4.6.3    | Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih tablet .....                               | 53        |
| <b>5</b> | <b>SKLEP</b> .....                                                                  | <b>56</b> |
| <b>6</b> | <b>LITERATURA</b> .....                                                             | <b>59</b> |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Prikaz posameznih razredov BCS. ....                                                                                                 | 1  |
| <b>Slika 2:</b> Strukturni formuli cis-resveratrola (levo) in trans-resveratrola (desno). ....                                                       | 3  |
| <b>Slika 3:</b> Shema poteka lipidne peroksidacije. ....                                                                                             | 4  |
| <b>Slika 4:</b> Mehanizem delovanja polifenolnih antioksidantov. ....                                                                                | 4  |
| <b>Slika 5:</b> Ilustracija pojava kapic (levo) in laminacije (desno) pri izdelavi tablet. ....                                                      | 16 |
| <b>Slika 6:</b> Instrumentirana tabletirka na udarec (Killian SP300) s pomočjo katere smo izdelali tablete. ....                                     | 24 |
| <b>Slika 7:</b> Naprava Zeta sizer Nano, na kateri smo izmerili velikost kapljic nastalih disperzij (levo) in kiveta z vzorcem (desno). ....         | 27 |
| <b>Slika 8:</b> Naprava za preskus sproščanja VK 7000 - VanKel (levo) in ERWEKA DT6 (desno). ....                                                    | 28 |
| <b>Slika 9:</b> Umeritvena premica in enačba premice. ....                                                                                           | 30 |
| <b>Slika 10:</b> Primerjava različnih trdnih nosilcev glede na sposobnost adsorpcije RSV-SMES. ....                                                  | 32 |
| <b>Slika 11:</b> Slika izdelanih tablet (po ena tableta iz vsake serije). ....                                                                       | 37 |
| <b>Slika 12:</b> Velikost kapljic disperzij, ki so nastale po dispergiranju SMES, RSV-SMES, posameznih praškov in tablet v prečiščeni vodi. ....     | 42 |
| <b>Slika 13:</b> Različne povečave površine poroznega magnezijevega aluminometasilikata (Neusilin® US2) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. .... | 45 |
| <b>Slika 14:</b> Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Neu-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. ....                        | 45 |
| <b>Slika 15:</b> Različne povečave površine poroznega silicijevega dioksida (Syloid® 244FP) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. ....             | 46 |
| <b>Slika 16:</b> Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Syloid-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. ....                     | 46 |
| <b>Slika 17:</b> Različne povečave površine poroznega silicijevega dioksida (Sylysia® 350) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. ....              | 47 |
| <b>Slika 18:</b> Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Sylysia-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. ....                    | 47 |
| <b>Slika 19:</b> Mehka želatinska kapsula (levo) in trda želatinska kapsula (desno). ....                                                            | 48 |

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 20:</b> Primerjava profilov sproščanja RSV iz SMES-a polnjenega v mehke in trde želatinske kapsule. Medij za sproščanje: pufer s pH 1,2.....          | 49 |
| <b>Slika 21:</b> Primerjava profilov sproščanja RSV iz SMES-a polnjenega v mehke in trde želatinske kapsule. Medij za sproščanje: fosfatni pufer s pH 6,8..... | 50 |
| <b>Slika 22:</b> Profili sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov v pufru s pH 1,2... 51                                                               |    |
| <b>Slika 23:</b> Profili sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov v fosfatnem pufru s pH 6,8. ....                                                     | 52 |
| <b>Slika 24:</b> Profili sproščanja RSV iz različnih serij samomikroemulgirajočih tablet. Medij za sproščanje: pufer s pH 1,2. ....                            | 54 |
| <b>Slika 25:</b> Profili sproščanja RSV iz različnih serij samomikroemulgirajočih tablet. Medij za sproščanje: fosfatni pufer s pH 6,8. ....                   | 55 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Preglednica I:</b> <i>Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov: sestava in značilnosti posameznih sistemov; Povzeto po: Pouton 2006(24).</i>                                                                                                                | 6  |
| <b>Preglednica II:</b> <i>Različne oblike poroznega amorfnega silicijevega dioksida in vrednosti parametrov po katerih se razlikujejo (44,68,69).</i>                                                                                                                      | 20 |
| <b>Preglednica III:</b> <i>Posamezne sestavine, vloga sestavin in količinska sestava SMES-a.</i>                                                                                                                                                                           | 23 |
| <b>Preglednica IV:</b> <i>Oznake izdelanih praškov.</i>                                                                                                                                                                                                                    | 34 |
| <b>Preglednica V:</b> <i>Posamezne sestavine, vloga sestavin in količinska sestava zmesi za tabletiranje.</i>                                                                                                                                                              | 35 |
| <b>Preglednica VI:</b> <i>Oznake izdelanih serij tablet.</i>                                                                                                                                                                                                               | 36 |
| <b>Preglednica VII:</b> <i>Sila stiskanja ter nastavitvev pečatov za izdelavo posamezne serije tablet.</i>                                                                                                                                                                 | 36 |
| <b>Preglednica VIII:</b> <i>Rezultati preskusa enakomernosti mase enoodmernih FO za posamezno serijo tablet (n=20). Podana je najmanjša, največja in povprečna masa tablet ter izračunani vrednosti standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD).</i> | 38 |
| <b>Preglednica IX:</b> <i>Trdnost izdelanih serij tablet (n=10). Podana je najmanjša, največja, povprečna trdnost, SD in RSD.</i>                                                                                                                                          | 38 |
| <b>Preglednica X:</b> <i>Čas razpadnosti posameznih serij tablet (n=6) v prečiščeni vodi, pri temperaturi 37±0,5 °C. Podan je najmanjši, največji in povprečni čas razpadnosti, SD in RSD.</i>                                                                             | 39 |
| <b>Preglednica XI:</b> <i>Premjer izdelanih serij tablet (n=10). Podan je najmanjši, največji, povprečni premer tablet ter SD in RSD.</i>                                                                                                                                  | 40 |
| <b>Preglednica XII:</b> <i>Debelina posameznih serij tablet takoj po tabletiranju (t=0). Podana je najmanjša, največja, povprečna debelina tablet ter SD in RSD (n=10).</i>                                                                                                | 40 |
| <b>Preglednica XIII:</b> <i>Debelina posameznih serij tablet 24 ur po tabletiranju (t=24h). Podana je najmanjša, največja, povprečna debelina tablet, izračunane vrednosti SD, RSD in indeks elastične relaksacije (ER) (n=10).</i>                                        | 41 |
| <b>Preglednica XIV:</b> <i>Vrednost PDI disperzij, ki so nastale po dispergiranju SMES, RSV-SMES, praškov in tablet v prečiščeni vodi in izračunane vrednosti SD dobljenih meritev.</i>                                                                                    | 43 |

## POVZETEK

V zadnjih letih se farmacevtska industrija sooča z odkritjem novih pretežno slabo vodotopnih in/ali permeabilnih zdravilnih učinkovin. Slaba vodotopnost zdravilnih učinkovin predstavlja velik izziv pri razvoju farmacevtskih oblik za peroralno dajanje, ki še vedno velja za enega najbolj sprejemljivih načinov jemanja zdravil. Eden izmed novejših tehnoloških pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti slabo vodotopnih zdravilnih učinkovin so na lipidih osnovani sistemi, med katere spadajo tudi samo(mikro)emulgirajoči sistemi (S(M)ES). Slednji so po definiciji brezvodne izotropne zmesi lipidov, površinsko aktivnih snovi, enega ali več hidrofilnih sotopil ali koemulgatorjev ter učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju tvorijo (mikro)emulzije tipa olje v vodi. S(M)ES-i so običajno v obliki tekočih farmacevtskih oblik ali pa jih polnijo v želatinske kapsule. Trdne farmacevtske oblike so tako s strani uporabnika kot farmacevtske industrije bolj zaželeno in nudijo v primerjavi s tekočimi farmacevtskimi oblikami številne prednosti. Zato so novejše raziskave usmerjene v razvoj trdnih samo(mikro)emulgirajočih farmacevtskih oblik, ki bi nadomestile želatinske kapsule, napolnjene s tekočimi S(M)ES-i, saj imajo slednje določene slabosti kot so visoki stroški proizvodnje in nekompatibilnost nekaterih sestavin S(M)ES-ov z ovojnico kapsul.

V diplomski nalogi smo razvili nove praške in tablete z vgrajenim samomikroemulgirajočim sistemom (SMES), ki je vseboval slabo topno, a dobro permeabilno modelno učinkovino resveratrol (RSV). Kot tehniko pretvorbe SMES-a v samomikroemulgirajoči prašek smo izbrali adsorpcijo na trdni nosilec, ki smo jo izvedli z mešanjem v pateni. Za nadaljnjo izdelavo tablet smo izbrali samomikroemulgirajoče praške s trdnimi nosilci, ki so izkazovali najboljše sposobnosti za adsorpcijo SMES-a - porozni magnezijev aluminometasilikat (Neusilin<sup>®</sup> US2) in dve obliki poroznega amorfnega silicijevega dioksida (Sylsia<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244FP).

Izbranim samomikroemulgirajočim praškom smo dodali ostale pomožne snovi: suhi vezivi (Avicel<sup>®</sup> PH102 - mikrokristalna celuloza in Kollidon<sup>®</sup> VA64 - kopovidon), razgrajevalo (Ac-Di-Sol<sup>®</sup> - premrežena natrijeva karboksimetilceluloza) in drsilo (Mg-stearat). Tablete smo nato izdelali z metodo direktnega tabletiranja tako pripravljenih praškov.

Samomikroemulgirajoče praške in tablete smo dispergirali v prečiščeni vodi in z merjenjem velikosti kapljic nastalih disperzij preučevali ohranjanje samomikroemulgirajočega učinka. V vseh primerih se je velikost kapljic povečala glede na velikost kapljic nastalih po dispergiranju tekočega SMES-a. Pojav je bil še najmanj opazen pri uporabi Neusilina® US2 kot trdnega nosilca. Pod vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali površine trdnih nosilcev in vpliv adsorpcije SMES-a na njihovo morfologijo.

Preskus sproščanja smo izvedli tako za samomikroemulgirajoče praške kot za samomikroemulgirajoče tablete. Rezultati sproščanja v dveh različnih medijih (pufni raztopini s pH 1,2 in pH 6,8) so pokazali, da adsorpcija SMES-a na izbrane trdne nosilce zmanjša količino sproščenega RSV. Poleg tega stiskanje samomikroemulgirajočih praškov v tablete lahko še dodatno zmanjša količino sproščenega RSV. Kljub temu pa smo z vgradnjo RSV v samomikroemulgirajoči prašek/tablete izboljšali njegovo sproščanje v primerjavi s sproščanjem čistega RSV v prahu. Med testiranimi trdnimi farmacevtskimi oblikami smo največji obseg sproščene učinkovine dosegli s samomikroemulgirajočim praškom in tabletami z Neusilinom® US2 kot trdnim nosilcem.

Z rezultati diplomske naloge smo dokazali, da s trdnimi poroznimi nosilci lahko izdelamo samomikroemulgirajoče praške in tablete, ki ohranijo samomikroemulgirajoče učinke tekočega SMES-a. Med preskušanimi trdnimi poroznimi nosilci se je, za formulacijo samomikroemulgirajočih praškov in tablet z RSV, za najbolj primerne izkazal Neusilin® US2. V prihodnosti bi bila potrebna še nadaljnja optimizacija samomikroemulgirajočih praškov/tablet, da bi te farmacevtske oblike v prihodnosti na tržišču nadomestile tekoče SMES-e polnjene v želatinske kapsule.

## ABSTRACT

In recent years pharmaceutical industry is confronted with the discovery of new drug compounds with predominantly low water solubility and/or poor permeability. Poor water solubility of drug compounds presents a major challenge in the development of dosage forms for oral application, which persists as the preferred route of drug delivery. One of the emerging technological approaches to improve the bioavailability of poorly water soluble drugs are lipid based drug delivery systems, including self-(micro)emulsifying drug delivery systems (S(M)EDDS). S(M)EDDS are defined as anhydrous, isotropic mixtures of lipids, surfactants, one or more hydrophilic co-solvents/co-surfactants and drug, forming oil-in-water (micro)emulsions spontaneously, when exposed to aqueous media under gentle agitation. S(M)EDDS are usually prepared as liquid dosage forms or filled in gelatin capsules. Solid dosage forms offer in comparison to liquid dosage forms many advantages and are therefore considered to be the preferred dosage forms for the patient and pharmaceutical industry as well. Recently, researches are focused on the development of solid self-(micro)emulsifying dosage forms to replace gelatin capsules filled with liquid S(M)EDDS, exhibiting some disadvantages such as high production costs and incompatibility problem of some ingredients of S(M)EDDS with the shells of gelatin capsules.

In our thesis we developed novel powders and tablets with incorporated self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS), containing poorly water soluble and highly permeable model drug resveratrol (RSV). As a SMEDDS solidification technique we chose adsorption on solid carriers, carried out by mixing in a mortar. For the subsequent preparation of tablets we chose self-microemulsifying powders made of solid carriers exhibiting best properties for SMEDDS adsorption - porous magnesium aluminometasilicate (Neusilin<sup>®</sup> US2) and two different forms of porous amorphous silicon dioxide (Sylsia<sup>®</sup> 350 and Syloid<sup>®</sup> 244FP).

To selected self-microemulsifying powders other excipients were added: dry binders (Avicel<sup>®</sup> PH102 - microcrystalline cellulose and Kollidon<sup>®</sup> VA64 - copovidone), disintegrator (Ac-Di-Sol<sup>®</sup> - crosslinked carboxymethylcellulose sodium) and lubricant

(magnesium stearate). The direct compression method was applied to produce tablets from resulting powder mixtures.

Self-microemulsifying powders and tablets were dispersed in purified water and the droplet size was measured to research the preservation of self-microemulsifying properties. In all cases the droplet size of dispersions increased, compared to the droplet size of liquid SMEDDS, dispersed in purified water. This was the least evident when using Neusilin<sup>®</sup> US2 as a solid carrier. Surfaces of solid carriers and the impact on their morphology after SMEDDS adsorption was observed under the scanning electron microscope.

Dissolution testing was performed for self-microemulsifying powders and tablets. Dissolution test results, in two different dissolution media (buffer solutions pH 1,2 and pH 6,8), have shown that SMEDDS adsorption on solid carriers reduces the amount of released RSV. Additionally, compression of self-microemulsifying powders to tablet dosage form can further reduce the amount of released RSV. However, incorporation of RSV into self-microemulsifying powders/tablets has shown, in comparison to pure RSV powder, an improvement of its drug release rate. Among tested solid dosage forms the highest drug release rate overall was achieved with self-microemulsifying powders and tablets containing Neusilin<sup>®</sup> US2 as a solid carrier.

Our results provided proof, that solid porous carriers can be formulated into self-microemulsifying powders and tablets preserving self-microemulsifying properties of liquid SMEDDS. Based on solid porous carriers investigated, Neusilin<sup>®</sup> US2 was found to be the most effective solid carrier for preparation of self-microemulsifying powders and tablets with RSV. However, further optimization of self-microemulsifying powders/tablets is required in the future to replace liquid SMEDDS filled in gelatin capsules on the market.

## SEZNAM OKRAJŠAV

**BCS** – biofarmacevtski klasifikacijski sistem (angl.: *Biopharmaceutical Classification System*)

**DG** – digliceridi

**dv-TG** – dolgo-verižni trigliceridi

**ER** – indeks elastične relaksacije

**FO** – farmacevtska oblika

**GIT** – gastrointestinalni trakt

**HLB** – hidrofilno-lipofilno ravnotežje (angl.: *Hydrophilic-Lipophilic Balance*)

**HPLC** – tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (angl.: *High Performance Liquid Chromatography*)

**MG** – monogliceridi

**NF- $\kappa$ B** – jedrni faktor kappa B

**O/V** – olje v vodi

**PAS** – površinsko aktivna snov

**PDI** – polidisperzni indeks

**Ph. Eur.** – Evropska farmakopeja (*Pharmacopoeia Europea*)

**RSD** – relativna standardna deviacija

**RSV** – resveratrol

**RSV-SMES** – samomikroemulgirajoči sistem z resveratrolom

**SD** – standardna deviacija

**sdv-TG** – srednje dolgo-verižni trigliceridi

**SEM** – vrstična elektronska mikroskopija (angl.: *Scanning Electron Microscopy*)

**SES** – samoemulgirajoči sistem

**SMES** – samomikroemulgirajoči sistem

**S(M)ES** – samo(mikro)emulgirajoči sistem

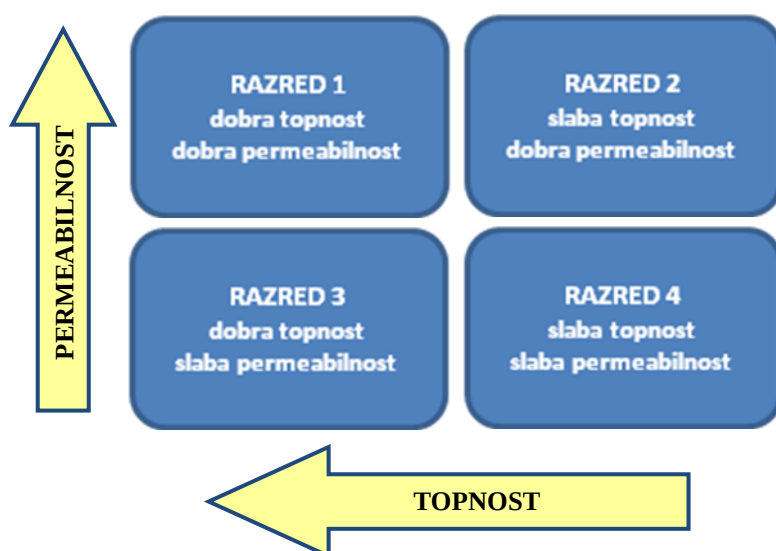
**TG** – trigliceridi

**ZU** – zdravilna učinkovina

# 1 UVOD

Sodobna farmacevtska industrija teži k razvoju farmacevtskih oblik (FO) za peroralno uporabo, saj je peroralna aplikacija za paciente najbolj enostaven in sprejemljiv način jemanja zdravil (1,2). Farmacevtska industrija se v zadnjih letih sooča z odkritjem novih zdravilnih učinkovin (ZU) s slabo vodotopnostjo in/ali permeabilnostjo (3,4). Peroralna aplikacija le-teh je problematična, zato je razumevanje fizikalno-kemijskih in biofarmacevtskih lastnosti ZU temeljnega pomena pri razvoju novih zdravil (4,1).

Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS), ki ga je predlagal Amidon, razdeli ZU glede na njihovo vodotopnost in permeabilnost skozi epitelij gastrointestinalnega trakta (GIT) v štiri razrede (slika 1). Razdelitev ZU nam omogoča lažjo razlago in napoved dejavnikov, ki vplivajo na hitrost in obseg absorpcije. Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (angl.: *Food and Drug Administration - FDA*) je postavil meje, ki opredeljujejo dobro topnost in permeabilnost ZU. Dobro topna ZU je tista, katere največji terapevtski odmerek se popolnoma raztopi v 250 ml vodnega medija ali manj, pri pH 1-7,5 in temperaturi 37°C. Dobro permeabilna pa je tista ZU, katere absorpcija po peroralni aplikaciji je večja od 90 %, glede na masno bilanco oz. v primerjavi z intravensko aplikacijo referenčnega odmerka (absolutna biološka uporabnost) (5).



Slika 1: Prikaz posameznih razredov BCS.

V razred 1 uvrščamo ZU, ki so dobro topne in permeabilne (npr. metoprolol, propranolol, teofilin). Razvoj ustrezne formulacije zdravil za ZU, ki spadajo v ta razred, ne predstavlja večjih problemov, saj se le-te hitro raztopijo v prebavnih sokovih in s pasivno difuzijo brez težav preidejo steno GIT. V razred 2 sodijo ZU, ki so slabo topne, vendar dobro permeabilne (npr. ciklosporin, griseofulvin, itakonazol). Biološka uporabnost teh ZU je omejena predvsem z raztapljanjem. Že manjše povečanje topnosti lahko močno poveča njihovo biološko uporabnost. V razred 3 uvrščamo ZU, ki so dobro topne in slabo permeabilne (npr. atenolol, cimetidin, metformin), v razred 4 pa sodijo slabo topne in slabo permeabilne ZU. Metode za povečanje topnosti ZU razreda 2 in 4, ki se v zadnjem času uporabljajo, so kristalna modifikacija, zmanjšanje velikosti delcev (mikronizacija, nanokristali), vgradnja v na lipidih osnovane sisteme, pH modifikacija, vgradnja v ciklodekstrine in pretvorba kristalinične snovi v amorfno obliko (4).

V zadnjih letih se je močno povečal predvsem delež slabo vodotopnih ZU. Po zadnjih ocenah je med na novo odkritimi potencialnimi ZU kar 60-70% takšnih, ki so slabo vodotopne in jih po BCS uvrščamo v razreda 2 ali 4 (6).

## 1.1 RESVERATROL

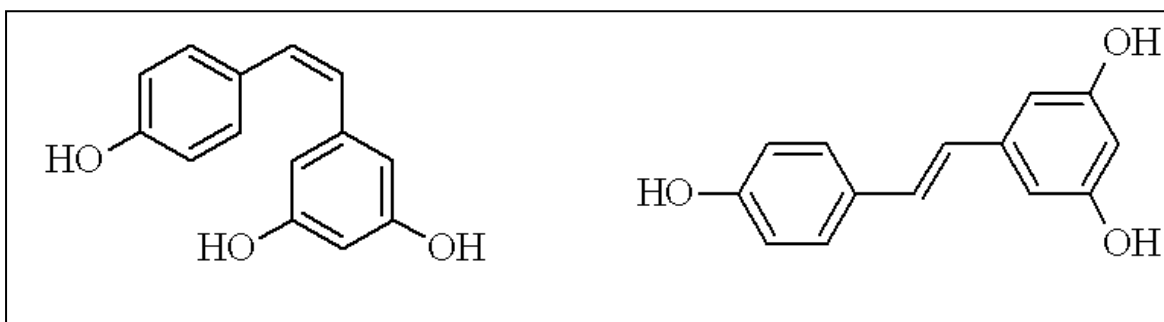
Resveratrol (RSV) oz. 3,5,4'-trihidroksi stilben je naravna polifenolna učinkovina, ki je prisotna v številnih rastlinskih vrstah in jo po BCS uvrščamo v razred 2 (7,8). Je prašek, umazano bele barve, z molekulsko formulo  $C_{14}H_{12}O_3$  in molekulsko maso 228.25 g/mol. Temperatura tališča se giblje med 253 in 255 °C. RSV je v maščobah topna substanca, dobro topna tudi v etanolu (~ 50mg/ml) in slabo topna v vodi (0,03 mg/ml) (8).

RSV uvrščamo med fitoaleksine, protimikrobne snovi, ki jih rastline sintetizirajo kot odgovor na bakterijske, glivične ali virusne okužbe ter tudi na nekatere druge stresne dejavnike iz okolja, kot je izpostavljenost ozonu in ultravijoličnemu sevanju (9,10). Prvič je bil izoliran iz korenine belega teloha (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) leta 1940, kasneje, leta 1963 pa iz korenine japonskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*). Slednja se je uporabljala v tradicionalni kitajski in japonski medicini za zdravljenje različnih bolezni, kot so glivične okužbe, kožna vnetja, kardiovaskularne in jetrne bolezni (11,12).

Do danes je bila odkrita prisotnost RSV že v več kot sedemdesetih rastlinskih vrstah (npr. jelka, evkaliptus, lilija) in plodovih (npr. arašidi, borovnice, murve) (13,14). Relativno

velika vsebnost RSV je bila najdena v rdečem grozdju, zlasti v semenih in lupinici grozdnih jagod. Sveže lupinice grozdnih jagod vsebujejo 50-100 µg RSV na gram mokre mase, kar pojasni visoko vsebnost v grozdnem soku in rdečem vinu (15). Vsebnost RSV v grozdju je še posebej visoka, ko je vinska trta okužena z glivo *Botrytis cinerea* (13).

V naravi je RSV lahko prisoten tako v *trans*- (*E*-) kot *cis*- (*Z*-) obliki (slika 2). Reakcija izomerizacije *trans*- v *cis*- obliko poteka ob izpostavljenosti ultravijoličnim žarkom. *Trans*-izomer je biološko bolj aktiven kot *cis*-izomer, ki je tudi manj stabilen in posledično komercialno nedostopen (8). *Trans*-resveratrolu pripisujejo številne farmakološke učinke, medtem ko je dokazov o farmakološki aktivnosti *cis*-resveratrola zelo malo (10).



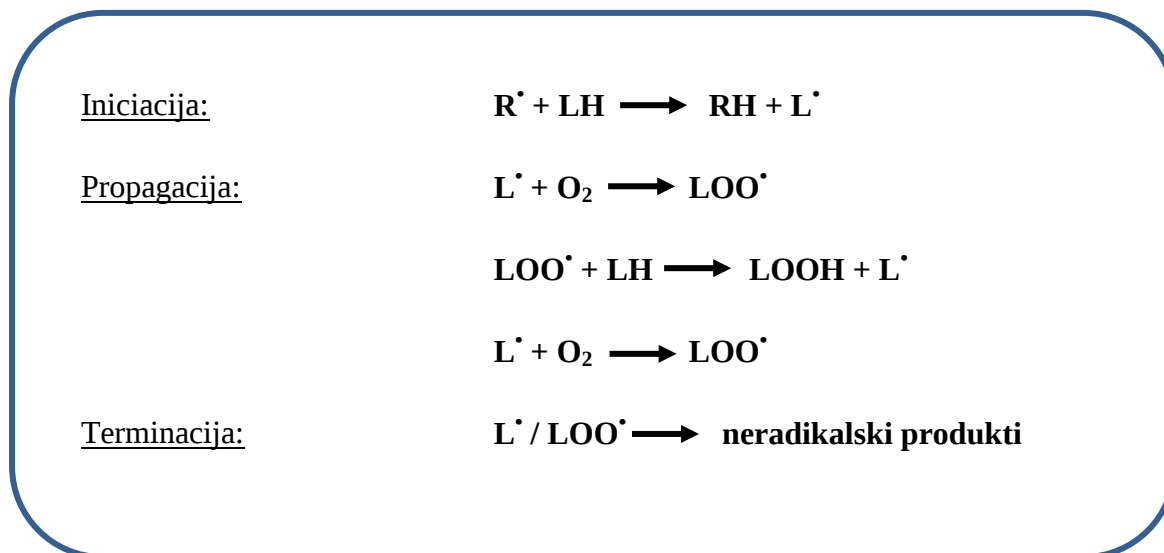
**Slika 2:** Strukturni formuli *cis*-resveratrola (levo) in *trans*-resveratrola (desno).

### 1.1.1 Učinki resveratrola

RSV zaradi širokega spektra terapevtskih učinkov, ki mu jih pripisujejo, velja za enega izmed najbolj intenzivno proučevanih polifenolov v zadnjem desetletju (16). Učinki RSV, ki so v največji meri raziskani so: antioksidativno, protitumorno in protivnetno delovanje.

Polifenole (ArOH), med katere spada RSV, uvrščamo med t.i. "žrtvene" (angl.: *sacrificial*) antioksidante. Ti visoko reaktivne, nestabilne radikale onemogočijo tako, da jih spremenijo v stabilne molekule in s tem preprečijo razvoj verižne reakcije nastajanja radikalov. Na ta način se ustavijo radikalske reakcije, ki vodijo v poškodbe jedrne DNA, maščob v celični membrani in beljakovin v notranjosti celice. Polifenoli antioksidativno delujejo tudi v plazmi, kjer zavirajo oksidacijo plazemskih beljakovin in lipoproteinov nizke gostote (LDL) (17,18). Radikali, ki v telesu nastajajo med encimskimi reakcijami, obsevanjem z

UV svetlobo ali ionizirajočim sevanjem, lahko sprožijo verižno reakcijo, imenovano lipidna peroksidacija (peroksidacija polinenasičenih maščobnih kislin v lipidih) (slika 3).



**Slika 3:** Shema poteka lipidne peroksidacije.

Znano je, da lipidna peroksidacija predstavlja enega izmed osnovnih mehanizmov poškodbe celic in tkiv, ki se kot posledica kažejo v obliki različnih bolezni kot so vnetje, ateroskleroza in rak. Različni antioksidanti lahko povzročijo inhibicijo lipidne peroksidacije na različnih nivojih. Polifenoli (npr. RSV) proces lipidne peroksidacije inhibirajo na ta način, da reagirajo z radikali, kot je peroksilni radikal ( $LOO^{\bullet}$ ). Pri tem nastanejo manj reaktivni radikali ( $ArO^{\bullet}$ ) z daljšo življenjsko dobo (slika 4) (19).



**Slika 4:** Mehanizem delovanja polifenolnih antioksidantov.

Protitumorno delovanje RSV je v močni povezavi z njegovim antioksidativnim delovanjem. Poleg neposrednega učinka (lovljenja radikalov) pa polifenoli preko aktivacije endogenih obrambnih sistemov proti raku najverjetneje delujejo tudi posredno. RSV je tako preko različnih mehanizmov sposoben zavirati vse tri stopnje karcinogeneze (iniciacijo, promocijo in progresijo), angiogenezo in metastaziranje (15,20,21). Eden izmed

mehanizmov delovanja, po katerem RSV preprečuje hiperplazijo rakavih celic, je zaviranje aktivacije jedrnega faktorja kappa B (NF- $\kappa$ B), ki ščiti celice pred apoptozo in spodbuja delitve malignih celic (21). Tudi protivnetno delovanje RSV je v največji meri posledica inhibicije aktivacije NF- $\kappa$ B, ki ga pogosto aktivirajo vnetni dejavniki. Posledično se zaustavi izražanje genov odvisnih od aktivacije NF- $\kappa$ B. Pomembnejša produkta teh utišanih genov sta tumor nekrotizirajoči faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in interleukin 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ), ki jima pripisujejo veliko odgovornost pri vzdrževanju vnetja (22). RSV zavira tudi lipooksigenazo in ciklooksigenazo (COX) ter posledično nastanek nekaterih mediatorjev vnetja. Preko tega mehanizma RSV prav tako deluje protivnetno (23).

Zaradi njegovih številnih učinkov RSV tako pripisujejo pomembno vlogo pri zdravljenju ali preprečevanju nastanka raka, kardiovaskularnih obolenj, starostno pogojenih nevrodegenerativnih bolezni (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen), sladkorne bolezni tipa 2, upočasnjevanju staranja in podaljševanju življenjske dobe.

Kljub številnim terapevtskim učinkom pa je uporaba RSV omejena z njegovo biološko uporabnostjo. Lastnosti, kot so nestabilnost, oksidacija ob izpostavljenosti visokim temperaturam in svetlobi, slaba topnost v vodi, kratka biološka razpolovna doba ter hiter metabolizem in izločanje omejujejo njegovo uporabo kot ZU. Analiza novejših študij kaže na vedno večji interes za razvoj novih FO in dostavnih sistemov, kot so na primer nanodelci, mikrokapsule, kompleksi s ciklodekstrini, trdni lipidni nanodelci in liposomi, ki bi izboljšali biološko uporabnost RSV (8,16).

## 1.2 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Ena izmed možnosti izboljšanja vodotopnosti ZU in posledično biološke uporabnosti je vgradnja v na lipidih osnovane sisteme. Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov, ki ga je uvedel Pouton, na lipidih osnovane sisteme glede na njihovo sestavo razdeli v štiri razrede. Glede na fizikalno-kemijske značilnosti ZU s pomočjo klasifikacijskega sistema lažje izberemo primerno formulacijo za specifično učinkovino (24). Sestava in značilnosti posameznih sistemov so predstavljene v preglednici I.

**Preglednica I:** Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov: sestava in značilnosti posameznih sistemov; Povzeto po: Pouton 2006(24).

| UVRSTITEV SISTEMA         | SESTAVA SISTEMA                                                                    | ZNAČILNOSTI                                                               |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Razred I</u></b>    | Gliceridi (MG, DG, TG) (100%)                                                      | Ni spontanega dispergiranja; za absorpcijo je potrebna prebava glicerida. |
| <b><u>Razred II</u></b>   | Gliceridi (MG, DG, TG) (40-80%), PAS s HLB<12 (20-60%)                             | SES brez vodotopnih PAS.                                                  |
| <b><u>Razred IIIA</u></b> | Gliceridi (MG, DG, TG) (40-80%), PAS s HLB>12 (20-40%), hidrofilna sotpila (0-40%) | SES z vodotopnimi PAS.                                                    |
| <b><u>Razred IIIB</u></b> | Gliceridi (MG, DG, TG) (<20%), PAS s HLB>12 (20-50%), hidrofilna sotpila (20-50%)  | SMES z vodotopnimi PAS.                                                   |
| <b><u>Razred IV</u></b>   | PAS s HLB<12 (0-20%), PAS s HLB>12 (20-80%), hidrofilna sotpila (0-80%)            | Formulacija, ki po dispergiranju tvori raztopino micelov.                 |

*Okrajšave: monogliceridi (MG), digliceridi (DG), trigliceridi (TG), hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB), samoemulgirajoči sistem (SES), samomikroemulgirajoči sistem (SMES).*

Znano je, da na lipidih osnovani sistemi povečajo obseg absorpcije lipofilnih učinkovin. Z vgradnjo učinkovin v na lipidih osnovane sisteme se izognemo procesu raztapljanja, ki je omejujoč dejavnik pri absorpciji slabo topnih ZU, saj je ta v lipidnem sistemu že raztopljena (25). Po komercialnem uspehu nekaterih zdravil, kot so Fortovase<sup>®</sup> (sakvinavir), Norvir<sup>®</sup> (ritonavir) in Neoral<sup>®</sup> (ciklosporin A), se je zanimanje za na lipidih osnovane sisteme še povečalo. V zadnjem času je veliko pozornosti namenjeno predvsem SES-om in SMES-om, ki jih po lipidnem klasifikacijskem sistemu uvrščamo v razred IIIA in IIIB (3,24).

### 1.3 SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI

S(M)ES-i so po definiciji brezvodne izotropne zmesi naravnih ali sinteznih lipidov, površinsko aktivnih snovi (PAS), enega ali več hidrofilnih sotpil ali koemulgatorjev ter učinkovine, ki pod vplivom peristaltičnega gibanja želodca in črevesja v prisotnosti vodnega medija spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa olje v vodi (O/V) (26,27). Učinkovina, vgrajena v S(M)ES, je pri prehodu skozi GIT ves čas raztopljena v drobnih

oljnih kapljicah in se hitro porazdeli (25). Samoemulgirajoči sistemi (SES) se od samomikroemulgirajočih sistemov (SMES) razlikujejo po sestavi in predvsem velikosti kapljic nastalih emulzij. Po redčenju SMES-a nastanejo transparentne mikroemulzije z velikostjo kapljic manjšo od 50 oz. 100 nm, medtem ko pri redčenju SES-a nastanejo emulzije z velikostjo kapljic med 100 in 300 nm (6,25). Mehanizem samo(mikro)emulgiranja še ni popolnoma poznan, vendar obstaja razlaga, po kateri samo(mikro)emulgiranje poteče, kadar je sprememba entropije zaradi dispergiranja večja od energije, ki je potrebna za povečanje površine ob dispergiranju. V tem primeru je prosta energija negativna oz. nizko pozitivna, zato (mikro)emulzija nastane spontano že ob rahlem mešanju (25).

Samo(mikro)emulgiranje je zelo specifičen proces, saj le določene kombinacije osnovnih sestavin, ki jih vsebuje S(M)ES, dajejo zadovoljiv samo(mikro)emulgirajoči učinek. Pomembna je narava para olje/emulgator ter razmerje med njima, koncentracija emulgatorja, temperatura, pri kateri pride do samo(mikro)emulgiranja ter sprejemljivost in varnost posameznih sestavin. Pri formuliranju S(M)ES-a, ki vsebuje večje število sestavin, je potrebna ocena relativne topnosti in afinitete učinkovine v vsaki posamezni sestavini, izredno pomembna pa je topnost učinkovine v končni formulaciji. Z izbiro ustreznih sestavin želimo doseči maksimalno kapaciteto vgraditve učinkovine, najmanjši možni čas za doseg samo(mikro)emulgirajočega učinka, najmanjšo možno velikost kapljic nastale (mikro)emulzije, zmanjšanje razlik v velikosti kapljic v odvisnosti od pH vodnega medija ter preprečiti oz. zmanjšati razgradnjo/metabolizem v fiziološkem mediju (27,28).

Najpomembnejšo sestavino S(M)ES-ov predstavljajo lipidi, saj olajšajo samo(mikro)emulgiranje, omogočajo raztapljanje in povečajo absorpcijo lipofilnih učinkovin iz GIT predvsem skozi limfni sistem. Za izdelavo S(M)ES-ov so primerni različno nasičeni trigliceridi z dolgimi verigami (dv-TG) in srednje dolgimi verigami (sdv-TG) (27). Po literaturnih podatkih so sdv-TG bolj primerni za pripravo S(M)ES-ov kot dv-TG, saj imajo boljšo sposobnost samo(mikro)emulgiranja in raztapljanja. Vendar pa na izbor lipida pomembno vpliva tudi želena pot absorpcije ZU, vgrajene v SMES (v limfni oz. portalni krvni obtok). Pot absorpcije iz prebavnega trakta je namreč odvisna od dolžine verig maščobnih kislin, ki sestavljajo trigliceride. Če želimo doseči večjo absorpcijo ZU skozi limfni sistem, so bolj primerna izbira dv-TG (25). V zadnjem času se za izdelavo S(M)ES-ov v največji meri uporabljajo novi polsintezni derivati sdv-TG (npr.

poliglikozilirani gliceridi). Le-ti so definirani kot amfifilne substance, ki izkazujejo dobre sposobnosti samo(mikro)emulgiranja, zato v formulaciji S(M)ES-a v nekaterih primerih igrajo tako vlogo PAS kot oljne faze (25,28).

PAS ali emulgatorji so po definiciji amfifilne snovi, ki se porazdelijo na mejno površino med lipofilno in hidrofilno fazo, s čimer se zmanjša medfazna napetost (29). Za izdelavo S(M)ES-ov mora izbrana PAS močno znižati medfazno napetost, omogočati gibljivost emulgatorskega filma na medfazni površini in imeti ustrezno HLB vrednost (25,27). Koncentracija PAS, ki je potrebna za izdelavo S(M)ES-ov, je običajno 30 do 60 odstotkov (m/m), pri čemer je potrebno poudariti, da večje količine PAS lahko povzročijo draženje GIT. V največji meri se za izdelavo S(M)ES-ov uporabljajo hidrofilni emulgatorji z visoko HLB vrednostjo ( $>12$ ), ki se pri koncentraciji, višji od kritične micelarne koncentracije, v vodi raztopijo in tvorijo micle. Visoka HLB vrednost emulgatorja je nujna za hiter nastanek (mikro)emulzije tipa o/v in hitro porazdelitev le-te po GIT (28).

Organska topila primerna za peroralno uporabo (etanol, propilen glikol, polietilen glikol,...) se dodajajo S(M)ES-om kot sotopila z namenom povečanja topnosti ZU. Včasih lahko dodana sotopila v mikroemulzijskih sistemih igrajo tudi vlogo koemulgatorja (30).

Uporaba S(M)ES-ov kot dostavnih sistemov za slabo topne ZU prinaša številne prednosti, kot so:

- Povečanje biološke uporabnosti učinkovine po peroralni aplikaciji. Ne le, da je ZU v S(M)ES-u že raztopljen, tudi sam nastanek (mikro)emulzije in s tem povečanje specifične površine olajša absorpcijo ZU v GIT;
- Enostavna izdelava in prenos tehnologije iz raziskovalnega nivoja v proizvodnjo (*angl: scale-up*) je ena pomembnejših prednosti S(M)ES-ov v primerjavi z ostalimi dostavnimi sistemi (npr. trdne disperzije, liposomi, nanodelci), ko govorimo o izboljšanju biološke uporabnosti učinkovine;
- Zmanjšanje inter- in intraindividualne spremenljivosti, predvsem vpliva hrane, ki je velja za enega izmed glavnih dejavnikov pri zmanjšanju terapevtske učinkovitosti zdravila v telesu. Različne študije kažejo na to, da je učinkovitost S(M)ES-ov neodvisna od hrane;

- Zmožnost dostave makromolekul kot so peptidi, hormoni, substrati in inhibitorji encimov ter sposobnost zaščite le-teh pred encimsko hidrolizo v prebavnem traktu;
- Ciljana dostava ZU glede na specifično absorpcijsko okno v GIT;
- Zaščita občutljivih ZU;
- Velika kapaciteta vgraditve ZU (6,27).

Slaba stran S(M)ES-ov je ta, da je večina sestavin S(M)ES-ov pri sobni temperaturi v tekočem ali poltrdnem agregatnem stanju, zato so le-ti običajno v obliki tekočih FO ali pa jih polnijo v trde/mehke želatinske kapsule. To prinaša določene slabosti kot so visoki stroški proizvodnje, nizka stabilnost, težja prenosljivost in manjša izbira primernih FO. Problem lahko predstavlja tudi obarjanje ZU ali pomožnih snovi ter draženje GIT zaradi PAS, zlasti če so te prisotne v večjih količinah. Polnjenje S(M)ES-ov v želatinske kapsule prinaša še dodatno omejitev, to je nezdružljivost nekaterih sestavin S(M)ES-a s sestavinami ovojnice kapsul. Ker so v farmacevtski industriji bolj zaželeno trdne FO, sočasno z zanimanjem za S(M)ES-e, narašča tudi potreba po novih pristopih za pretvorbo tekočih S(M)ES-ov v trdno agregatno stanje. Novejše raziskave so tako usmerjene v pretvorbo S(M)ES-ov v trdno agregatno stanje in izdelavo trdnih samomikroemulgirajočih FO (31,32).

## **1.4 TEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA IZDELAVO TRDNIH SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČIH FARMACEVTSKIH OBLIK**

### **1.4.1 Adsorpcija na trdne nosilce/površine**

Adsorpcija je definirana kot pojav, ko se snov (plin, tekočina ali trdna snov) veže na površino druge snovi. Snov, ki na svoji površini fizikalno ali kemijsko veže druge snovi ali delce imenujemo adsorbent, adsorbirajočo se snov pa adsorbat (29,33).

Proces adsorpcije S(M)ES-a na trdne nosilce (angl.: *Adsorption on solid carriers*) je zelo preprost in poceni, saj vključuje zgolj dodajanje tekočega S(M)ES-a trdnemu nosilcu med mešanjem v mešalniku ali pateni. Na ustrezen trdni nosilec lahko adsorbiramo tudi do 70 odstotkov (m/m) S(M)ES-a, pri čemer se dobre pretočne lastnosti ohranijo. Prašek, ki pri tem nastane, lahko neposredno polnimo v kapsule ali pa ga v kombinaciji z ustreznimi

pomožnimi snovmi stisnemo v tablete. Največja prednost te tehnike je, da zagotavlja boljšo enakomernost vsebnosti, slabost pa je v manjši količini učinkovine, ki jo lahko vsebuje končna FO (34,35).

V zadnjih letih se kot trdni nosilci za S(M)ES-e največkrat uporabljajo porozne snovi nizke gostote z veliko specifično površino in sicer predvsem porozni silicijev dioksid in magnezijev aluminometasilikat (36). Izbira ustreznega nosilca je odvisna od njegove sposobnosti za adsorpcijo S(M)ES-a ter pretočnih lastnosti nastale zmesi (37).

Adsorpcija S(M)ES-a na trdne nosilce je pogosto uporabljena metoda v raziskavah, verjetno predvsem zaradi preproste in poceni izvedbe samega procesa.

### **Magnezijev aluminometasilikat (Neusilin®)**

Neusilin® je sintetični magnezijev aluminometasilikat, ki je lahko v obliki amorfnega praška ali granulata, je bele barve in ima porozno strukturo. Kemijsko je zmes aluminijevega oksida, magnezijevega oksida in silicijevega dioksida (kemijska formula:  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1.7\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) (38). Zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti velja Neusilin® za izjemno uporabno pomožno snov v farmacevtski industriji. Ker ima veliko specifično površino se lahko uporablja za adsorpcijo olj, primeren je za direktno tabletiranje, izboljša pretočne lastnosti prahov, preprečuje zlepljenje higroskopskih praškov, deluje kot stabilizator in antacid (1,38). Uporaba Neusilina® kot pomožne snovi pri tabletiranju omogoča enako trdnost tablet pri nižji uporabljeni sili stiskanja. Pozitivna lastnost Neusilina® pa je tudi odpornost na visoke temperature in dolg rok uporabe. Komercialno je dostopen v različnih oblikah, ki se med seboj razlikujejo po velikosti delcev, pH-ju, vsebnosti vode in nasipni gostoti (38).

Nekatere oblike Neusilina® se pogosto uporabljajo kot trdni nosilec za tekoče/poltrdne S(M)ES-e in trdne disperzije (39). Za adsorpcijo S(M)ES-ov se v študijah kot trdni nosilec pogosto uporablja Neusilin® US2. Prašek, ki nastane po adsorpciji S(M)ES-a na Neusilin® US2, omogoča izdelavo trdnih FO (npr. samo(mikro)emulgirajočih tablet). Z uporabo Neusilina® US2 kot trdnega nosilca za adsorpcijo S(M)ES-ov se izboljšajo procesni parametri (npr. pretočne lastnosti in stisljivost) pri tabletiranju samo(mikro)emulgirajočih tablet. Mura je s sodelavci raziskoval primernost različnih adsorbentov za adsorpcijo S(M)ES-a. Neusilin® US2 se je med izbranimi nosilci izkazal za najbolj primerne in učinkovitega glede na pretočne lastnosti in stisljivost praška, specifično površino in

mezoporoznost. Izdelane tablete so ohranile lastnosti/prednosti samega SMES-a, hkrati pa so na ta način izboljšali tudi kemijsko stabilnost ZU v lipidni formulaciji (39,40).

Sander in Holm sta proučevala uporabo Neusilina<sup>®</sup> US2 pri izdelavi t.i. "liquid loadable" tablet, ki so vsebovale SMES s ciklosporinom. Tablete so bile najprej izdelane z direktnim tabletiranjem trdnega nosilca, Neusilina<sup>®</sup> US2. Po tabletiranju poroznega nosilca so z enostavno absorpcijsko metodo v tableto vgradili SMES. Tablete, izdelane na ta način, so bile po kapaciteti za vgraditev ZU primerljive z mehкими ali trdnimi želatinskimi kapsulami polnjenimi s SMES-om (41).

V nekaterih študijah so Neusilin<sup>®</sup> US2 uporabili tudi kot nosilec za trdne disperzije, ki so sestavljene iz ZU in vodotopnih polimerov. Uporaba Neusilina<sup>®</sup> US2 je v teh primerih izboljšala stisljivost in pretočne lastnosti ter s tem olajšala proces tabletiranja (1).

### **Porozni silicijev dioksid (Sylysia<sup>®</sup> in Syloid<sup>®</sup> FP)**

Silicijev dioksid obstaja v več različnih oblikah, ki se med seboj razlikujejo v strukturi por, velikosti delcev ter hidrofilnosti in jih kot pomožne snovi uporabljamo v farmaciji. Sylysia<sup>®</sup> in Syloid<sup>®</sup> FP sta hidrofilni porozni obliki silicijevega dioksida. Med neporozne oblike silicijevega dioksida pa spadata hidrofilni Aerosil<sup>®</sup> 200 in hidrofobni Aerosil<sup>®</sup> R972 (1).

Sylysia<sup>®</sup> je suh, bel, mikroniziran prašek, izdelan iz kemijsko inertnega amorfne silicijevega dioksida visoke čistote (99,7 % silicijevega dioksida). Velja za varno snov za peroralno uporabo, z veliko specifično površino in visoko poroznostjo. Kot pomožna snov se uporablja v farmacevtski, kozmetični in prehrabeni industriji. V farmaciji se uporablja kot pomožna snov za preprečevanje aglomeracije prahov, zaščito občutljivih substanc pred vlago in izboljšanje pretočnih lastnosti snovi. Prav tako velja za pomemben dodatek pri tabletiranju, ker zmanjša lepljenje na pečate, izboljša stisljivost in pretočne lastnosti zmesi za tabletiranje, kar nam omogoča doseganje bolj točnih odmerkov (1,42,43). V raziskavah se uporablja tudi kot nosilec za slabo topne učinkovine, predvsem pri izdelavi trdnih disperzij (42). Različne oblike Sylysie<sup>®</sup>, ki so komercialno dostopne, se med seboj razlikujejo po volumnu por, specifični površini, pH-ju ter njihovi sposobnosti za adsorpcijo olj (44).

Syloid<sup>®</sup> FP je mezoporozni, mikroniziran, amorfni silicijev dioksid, ki je zaradi svojih morfoloških lastnosti široko uporabna pomožna snov v farmacevtski industriji. Lastnosti Syloida<sup>®</sup> FP, kot so dobra adsorpcijska kapaciteta, poroznost, velikost delcev ter velika specifična površina, omogočajo zmanjšanje števila dodanih pomožnih snovi, pospešijo proizvodnjo in izboljšajo učinkovitost končne FO. Pri izdelavi tablet z uporabo Syloida<sup>®</sup> FP kot pomožne snovi, dosežemo boljšo homogenost in pretočne lastnosti prahov, večjo trdnost tablet pri nižji sili stiskanja ter manjšo možnost laminacije tablet in pojavljanja kapic (angl. "capping"). Zaradi dobrih sposobnosti za adsorpcijo olj se Syloid<sup>®</sup> FP v farmaciji uporablja tudi kot trdni nosilec/adsorbent za pretvorbo tekočih S(M)ES-ov v trdno agregatno stanje. Na tržišču obstaja več različnih oblik Syloida<sup>®</sup> FP, ki pa se po kapaciteti za adsorpcijo olj razlikujejo (45,46,47).

#### 1.4.2 Sušenje z razprševanjem

Sušenje z razprševanjem (angl. *Spray drying*) je proces, pri katerem je tekočina (raztopina, emulzija) v obliki drobnih kapljic razpršena v komoro z vročim suhim zrakom, s čimer dosežemo izparevanje organskega topila oz. vode (37). Pred sušenjem je potrebno zmešati S(M)ES z ZU in trdne nosilce ter jih raztopiti v izbranem topilu (34). Tako pripravljena tekočina se nato skozi šobo razpršuje v sušilno komoro, pri čemer nastane veliko število drobnih kapljic. Drobne kapljice imajo veliko specifično površino, zato proces izparevanja topila s površine posameznih kapljic poteče zelo hitro, v nekaj sekundah. Ker so posamezne kapljice izpostavljene visokim temperaturam le kratek čas, je sušenje z razprševanjem primeren način sušenja tudi za termolabilne snovi, poleg tega pa je temperatura, ki jo delci lahko dosežejo, zaradi hladilnega učinka izhlapevanja topila, 15-20°C nižja od temperature vhodnega zraka (48,49). Pomembna je izbira ustreznih pogojev (temperatura, pretok zraka, velikost šobe...), ki so odvisni od sestave formulacije, topila in želenih lastnosti končnega produkta (35,37).

Produkt, ki ga pri tem dobimo, so trdni sferični delci mikrometrskih velikosti, ki so polni ali votli, okroglih oblik in enakomernih velikosti. Zaradi delcev pravilnih okroglih oblik ti prahovi izkazujejo dobre pretočne lastnosti, zato je sušenje z razprševanjem pogosto uporabljena metoda pri izdelavi tablet. Sušenje z razprševanjem se široko uporablja tudi za povečanje hitrosti raztapljanja, ki ni le posledica zmanjšanja velikosti delcev ali tvorbe

trdne disperzije s hidrofilno pomožno snovjo, temveč je običajno posledica pretvorbe ZU iz kristalne v amorfno obliko (48,49,50).

Po pretvorbi tekočega S(M)ES-a v prašek se samo(mikro)emulgirajoči učinek ohrani. Dokazano je bilo tudi, da tak samo(mikro)emulgirajoči prašek lahko ohrani učinek povečane absorpcije *in vivo*, ki ga dosežemo z vgraditvijo ZU v S(M)ES (51).

### 1.4.3 Iztiskanje in krogličenje

Proces iztiskanja in krogličjenja (angl.: *Extrusion spheronization*) se v farmacevtski industriji pogosto uporablja za izdelavo pelet enakomernih velikosti (52). Ta večstopenjski proces sestavljajo: suho mešanje prahov v običajnem mešalniku, vlažno granuliranje (dodajanje vode in veziv, pri čemer dobimo plastično maso), iztiskanje (potiskanje plastične mase skozi luknjičasto matrico, pri čemer dobimo ekstrudat ali iztiskanec), krogličenje (v napravi za krogličenje se iztiskanec ob stiku z vrtečo ploščo razlomi v kratke cilindre, ki se zaradi kroženja in trkov oblikujejo v kroglice (sfere, pelete), sušenje in sejanje (35). Pri izdelavi samo(mikro)emulgirajočih pelet se S(M)ES najprej zmeša z mešanico praškastih snovi. Sledi dodajanje veziv in vode do nastanka plastične zmesi, ki je primerna za iztiskanje (53). Na splošno velja, da več vode kot vsebuje plastična masa za iztiskanje, daljši bo čas razpadnosti na ta način izdelanih samo(mikro)emulgirajočih pelet. Možno je napovedati kako dobro se bo plastična masa s S(M)ES-om iztiskala in krogličila, vendar so za to potrebne meritve več različnih reoloških parametrov (35).

Z uporabo tehnologije iztiskanja in krogličjenja so že bile izdelane pelete s S(M)ES-i, ki so kot učinkovino vsebovali diazepam, progesteron in nitrendipin. V več študijah se je ta tehnika izkazala kot uspešna za pretvorbo tekočih S(M)ES-ov v trdno agregatno stanje (52,53,54).

### 1.4.4 Tehnologije s talinami

Tehnologije s talinami predstavljajo alternativo klasičnim farmacevtskim tehnološkim postopkom. V primerjavi z njimi imajo namreč številne prednosti, med katerimi je največja prednost odsotnost topil. Odsotnost topil omogoča vgrajevanje ZU, ki so občutljive na vlago, poleg tega se izognemo problemom z zaostankom topila in fazi sušenja. Celoten

postopek izdelave je relativno enostaven in hiter, poleg tega je večino postopkov s talinami možno izvesti na eni aparaturi, kar predstavlja dodatno prednost. Slabost tehnologij s talinami je povišana temperatura procesa, ki lahko povzroči razpad oz. oksidacijo ZU in/ali uporabljenih pomožnih snovi. Poznamo različne tehnologije s talinami, ki jih danes uporabljajo in razvijajo v farmacevtski industriji (55). Za pretvorbo SMES-ov v trdno agregatno stanje v literaturi navajajo dve potencialni tehnologiji, in sicer iztiskanje talin ter granulacija s talinami, vendar pa je konkretnih študij o uporabi le-teh v ta namen zelo malo.

Iztiskanje talin (angl.: *Melt extrusion*) je proces, ki se je izkazal za primerne za izdelavo zrn, pelet, tablet s prirejenim sproščanjem in transdermalnih terapevtskih sistemov. Najpomembnejši del opreme je naprava za iztiskanje (ekstrudor), katere osnovni namen je potiskanje začetne zmesi iz širšega premera skozi zožitev na iztisni matrici. Produkt, ki ga dobimo so delci enakomernih oblik in gostote (34,55). Pri iztiskanju talin prihaja do intenzivnega mešanja med samim procesom, kar povzroči deagregacijo delcev ZU in pripomore k enakomernejši porazdelitvi (55). Tehnologija iztiskanja talin omogoča visoko kapaciteto vgraditve učinkovine (približno 60%) (34).

Pri procesu granulacije s talinami (angl.: *Melt granulation*) za izdelavo zrn kot vezivo uporabimo talino. Gre za enostopenjski postopek, ki ima številne prednosti v primerjavi s klasičnim vlažnim granuliranjem, saj ni dodajanja tekočine, zato se posledično izognemo tudi fazi sušenja. Najpogosteje se postopek izvaja s pomočjo hitrovrtečega mešalnika (angl. *high-shear mixer*), lahko pa uporabimo tudi druge vrste mešalnikov ter različne aparature na principu zvrtničenih plasti (55). Granulacija s talinami se lahko uporablja tudi za adsorpcijo SMES-ov na nevtralne trdne nosilce (npr. silicijev dioksid in magnezijev aluminometasilikat) (35).

#### **1.4.5 Mikrokapsuliranje**

Mikrokapsuliranje je proces, s katerim zelo drobne kapljice ali trdne delce obdamo s kontinuiranim filmom iz ustreznega materiala z namenom zaščite kapsuliranega jedra ali spremembe njegovih lastnosti (56). Pri mikrokapsuliranju je ZU navadno vgrajena v jedro, ki ga zaščitimo s polimerno ovojnico (57). Poznamo več različnih metod za izdelavo mikrokapsul. Metoda z vibrirajočo membrano se je izkazala kot primerna za

mikrokapsuliranje S(M)ES-ov. Zvonar in sodelavci so izdelali mikrokapsule s samomikroemulgirajočim jedrom z uporabo enkapsulatorja z vibrirajočo membrano. Kot zunanjo fazo (polimerno ovojnico) so uporabili vodno raztopino pektina in alginata, kot notranjo fazo pa SMES s furosemidom kot ZU (26). Pri metodi z vibrirajočo membrano tlačilka oz. kompresor na stisnjen zrak potiskata obe tekočini (zunanjo in notranjo fazo) v smeri šobe. Fazi pri tem tvorita laminaren curek tekočine, ki se pod vplivom nihanja membrane (nahaja se nad šobo enkapsulatorja) razbije v enakomerno velike kapljice. Le-te nato potujejo skozi električno polje, pri čemer se njihova površina nabije. Odbojne sile med kapljicami/mikrokapsulami, ki pri tem nastanejo preprečijo zlepljenje med padanjem v raztopino premreževala. Metoda z vibrirajočo membrano omogoča mile pogoje izdelave mikrokapsul ter relativno enostaven prenos proizvodnje v industrijsko merilo. Prednost te tehnologije je nastanek mikrokapsul z ozko porazdelitvijo velikosti in možnost izdelave v aseptičnih pogojih. Slaba stran te metode pa je, da smo omejeni z viskoznostjo tekočine, ki ne sme biti previsoka, ker lahko pride do mašenja šob (56,58).

#### **1.4.6 Tabletiranje**

Tablete še vedno veljajo za najbolj zaželeno FO, tako s strani farmacevtske industrije kot tudi s strani zdravnikov in pacientov (59). V zadnjih letih zato raziskovalci več pozornosti posvečajo tudi razvoju samo(mikro)emulgirajočih tablet. Za izdelavo samo(mikro)emulgirajočih tablet je pred tabletiranjem tekoči S(M)ES potrebno pretvoriti v trdno agregatno stanje (npr. prašek, zrnca). Najenostavnejša metoda pretvorbe tekočega S(M)ES-a v samo(mikro)emulgirajoči prašek je adsorpcija na trdne nosilce/površine. Kljub enostavnosti metode pa razvoj samo(mikro)emulgirajočih tablet zahteva natančno načrtovanje, podrobneje opisano v naslednjem poglavju (60).

### **1.5 SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČE TABLETE**

Tablete so po definiciji trdne stisnjene FO za peroralno uporabo, ki vsebujejo enkratni odmerek ene ali več ZU. Kot FO tablete omogočajo priročen način dostave ZU z odlično fizikalno-kemijsko stabilnostjo v primerjavi z ostalimi FO (61,62).

Ph. Eur. razlikuje več vrst tablet za peroralno uporabo: neobložene tablete, obložene tablete, šumeče tablete, tablete za peroralne raztopine, disperzabilne tablete,

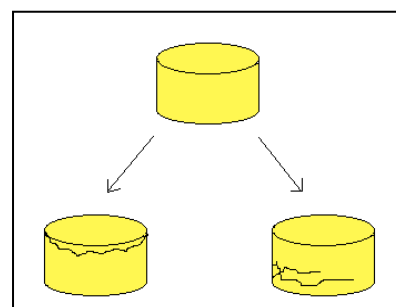
orodisperzabilne tablete, gastrozistentne tablete, tablete s prirejenim sproščanjem, tablete z uporabo v ustih in peroralne liofilizate.

Običajno so tablete v obliki pravilnih, okroglih, trdnih valjev, katerih spodnja in zgornja površina je ravna ali izbočena. Lahko imajo črte/razdelilne zareze, simbol ali katere druge oznake. Tablete izdelamo s stiskanjem enovitih prostornin delcev ali agregatov delcev pripravljenih z granuliranjem. Zmes za tabletiranje je sestavljena iz ene ali več ZU s pomožnimi snovmi, na primer za redčenje, vezanje, drsenje, razpadanje ali brez njih; iz dovoljenih barvil in korigensov vonja in okusa ter snovi, ki spreminjajo obnašanje izdelka v prebavnem traktu (61).

Proizvodnja tablet je precej zapleten, večstopenjski proces. Tablete v osnovi lahko izdelamo na dva načina: s procesom granulacije (suho ali vlažno granuliranje), ki mu sledi tabletiranje granulata ali s procesom direktnega tabletiranja prahov (62). Direktno tabletiranje je proces stiskanja praškastih pomožnih snovi in učinkovin brez predhodne obdelave in predstavlja najbolj želeno metodo izdelave tablet. Prednosti te metode so: enostavnost procesa in kratek čas izdelave tablet, nizka cena, majhna vsebnost vlage in visoka stabilnost učinkovin v takih tabletah. Zmes za tabletiranje mora izkazovati določene ugodne lastnosti, predvsem dobre pretočne lastnosti in stisljivost. Za direktno stiskanje tablet so primerne le določene učinkovine in pomožne snovi, sam postopek pa običajno zahteva visok delež suhih veziv (63).

Najpogostejši problemi s katerimi se srečujemo pri tabletiranju so:

- neenakomernost mase tablet;
- neenakomernost vsebnosti učinkovine v tabletah;
- nizka trdnost izdelanih tablet;
- pojavljanje kopic (angl. "capping") in laminacija/razslojevanje tablet (slika 5);
- oprijemanje ali lepljenje prahov na pečate (49).



**Slika 5:** Ilustracija pojava kopic (levo) in laminacije (desno) pri izdelavi tablet.

Najenostavnejši način izdelave samo(mikro)emulgirajočih tablet je s stiskanjem samo(mikro)emulgirajočega praška, pripravljenega z adsorpcijo tekočega S(M)ES-a na

trdne nosilce. Metoda adsorpcije S(M)ES na trdne nosilce je lahko izvedena z mešanjem v pateni ali pa z mešalnikom. Sicer tehnološko enostavni razvoj samo(mikro)emulgirajočih tablet po tem postopku zahteva poglobljene raziskave ključnih parametrov, kot so: reševanje različnih trdnih nosilcev za vrednotenje njihove maksimalne kapacitete za adsorpcijo S(M)ES-a, ugotavljanje maksimalnega deleža trdnega nosilca in njegov vpliv na stiskanje tablet ter vpliv adsorpcije S(M)ES-a na pretočne lastnosti prahu (60). Za izdelavo samo(mikro)emulgirajočih tablet je običajno potrebno samo(mikro)emulgirajočemu prašku, ki nastane po adsorpciji S(M)ES-a na trdni nosilec, dodati še ostale pomožne snovi, potrebne za tabletiranje (npr. drsilo, razgrajevalo, vezivo), da dobimo prašek z ustreznimi lastnostmi za tabletiranje. Samo(mikro)emulgirajoče tablete se bile do sedaj največkrat izdelane s enostavnim procesom direktnega tabletiranja izdelanih praškov. Za ovrednotenje samo(mikro)emulgirajočih tablet se pogosto uporabljajo naslednje metode:

- preskus raztapljanja/sproščanja (primerjava profilov sproščanja čiste učinkovine, tekočega S(M)ES-a in tablet z vgrajenim S(M)ES-om), preskus razpadnosti, preskus enakomernosti mase, preskus enakomernosti vsebnosti in merjenje trdnosti tablet;
- določanje velikosti kapljic nastale (mikro)emulzije po dispergiranju v vodnem mediju z namenom potrditve ohranitve samo(mikro)emulgirajočega učinka;
- preverjanje stabilnosti učinkovine v izdelanih samo(mikro)emulgirajočih tabletah;
- preučevanje morfologije delcev samomikroemulgirajočih praškov z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (SEM);
- primerjava absorpcijskih profilov ZU po aplikaciji samo(mikro)emulgirajočih tablet in tekočega S(M)ES-a polnjenega v trde/mehke želatinske kapsule (*in vivo* študije na živalih) (35,40,44,60).

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela bo pretvorba tekočega SMES-a v samomikroemulgirajoče praške z metodo adsorpcije na porozne trdne nosilce in tabletiranje omenjenih prahov v samomikroemulgirajoče tablete. Pri delu bomo uporabili SMES kot dostavni sistem za modelno učinkovino RSV, slabo vodotopen in dobro permeabilen polifenol naravnega izvora.

Najprej bomo izbrali primerne trdne nosilce za adsorpcijo samomikroemulgirajočega sistema z resveratrolom (RSV-SMES). Adsorpcijo na posamezne trdne nosilce bomo izvedli z mešanjem v pateni. Med poroznimi trdnimi nosilci bomo izbrali tiste, ki bodo izkazovali najboljše sposobnosti za adsorpcijo RSV-SMES.

Iz izdelanih samomikroemulgirajočih praškov z izbranimi trdnimi nosilci bomo z metodo direktnega tabletiranja prahov skušali izdelati samomikroemulgirajoče tablete. S poizkušanjem tabletiranja različnih formulacij zmesi za tabletiranje in merjenjem trdnosti tablet, bomo izbrali ostale pomožne snovi, potrebne za izdelavo tablet, ter določili ustrezne parametre za tabletiranje (nastavitve pečatov tabletirke, sila stiskanja). Izdelanim tabletam bomo izmerili debelino in premer ter jih ovrednotili s preskusi enakomernosti mase, trdnosti, razpadnosti in sproščanja.

Z dispergiranjem samomikroemulgirajočih praškov in tablet v prečiščeni vodi bomo preverili, ali se samomikroemulgirajoči učinek ohrani tudi po adsorpciji RSV-SMES na trdne nosilce in po stiskanju v tablete. Razlike v površini izbranih trdnih nosilcev, ki bi lahko nastale kot posledica adsorpcije RSV-SMES na trdne nosilce, bomo opazovali in preučevali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).

Preskuse sproščanja RSV iz izdelanih samomikroemulgirajočih praškov in tablet bomo izvajali na napravi 2 po USP v dveh različnih medijih: raztopini HCl (pufer s pH 1,2) in fosfatni pufni raztopini (pufer s pH 6,8). Delež sproščene učinkovine RSV bomo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke zmogljivosti (HPLC). Rezultate sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov in tablet bomo primerjali s sproščanjem RSV iz tekočega SMES-a polnjenega v želatinske kapsule.

### 3 EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1 MATERIALI

UČINKOVINA:

- Resveratrol (ChromaDex Inc., Irvine, Amerika).

SESTAVINE SMES-a:

- Capmul<sup>®</sup> MCM EP (Abitec Corporation, ZDA) je zmes srednjedolgoverižnih mono- in digliceridov kaprilne in kapronske kisline (glicerilmonokaprilokaprat). Je rahlo belo obarvana trdna, poltrdna ali tekoča snov z blagim vonjem po maščobah. Njegova HLB vrednost je 5-6. V farmacevtskih izdelkih ima lahko vlogo vehikla, topila za raztapljanje, emulgatorja ali koemulgatorja. Poveča lahko tudi biološko uporabnost in izboljša dermalno absorpcijo ZU (64,65,66)
- Cremophor<sup>®</sup> EL (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je ime za etoksilirano ricinusovo olje z nenasičenimi alkilnimi verigami (polioksil-35- ricinusovo olje). Je blede rumena oljnata tekočina, bistra pri temperaturi nižji od 26°C, z značilnim vonjem. Njegova HLB vrednost je 12-14. V farmacevtskih izdelkih ima največkrat vlogo topila ali neionskega emulgatorja. Primeren je za izdelavo peroralnih, parenteralnih in dermalnih FO. V S(M)ES-ih se uporablja z namenom povečanja biološke uporabnosti ZU (67).
- Cremophor<sup>®</sup> RH40 (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je ime za etoksilirano ricinusovo olje z nasičenimi alkilnimi verigami (polioksil-40-hidrogenirano ricinusovo olje). Je bela ali blede rumena poltrdna snov z značilnim rahlim vonjem. V vodnih raztopinah je skoraj brez okusa. Njegova HLB vrednost je 14-16. V farmaciji se uporablja kot solubilizator za eterična olja, lipofilne vitamine in druge hidrofobne snovi (67).
- Ricinusovo olje (Lex, Slovenija) je triglicerid maščobnih kislin: ricinolne kisline (87%), oleinske kisline (7%), linolenske kisline (3%), palmitinske kisline (2%), stearinske kisline (1%) in sledovi dihidroksistearinske kisline. Je brezbarvno ali blede rumeno obarvano, bistro viskozno olje. Ricinusovo olje se pridobiva iz semen rastline kloščevca (lat.: *Ricinus Communis Linné*). Uporablja se v prehranbeni, kozmetični in farmacevtski industriji. V farmacevtskih izdelkih ima lahko vlogo emolienta, oljnega vehikla ali topila, uporablja se za izdelavo peroralnih in dermalnih FO (67).

## TRDNI NOSILCI ZA SMES:

- Neusilin<sup>®</sup> US2 (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) - magnezijev aluminometasilikat. Neusilin<sup>®</sup> US2 je granulirani tip magnezijevega aluminometasilikata. 4% suspenzija Neusilina<sup>®</sup> US2 ima pH med 6 in 8. Porazdelitev velikosti granul se giblje med 44 in 177  $\mu\text{m}$ , povprečna velikost por je 15 nm, specifična površina pa znaša 300  $\text{m}^2/\text{g}$ . Neusilin<sup>®</sup> US2 ima, poleg Neusilina<sup>®</sup> ULF2, v primerjavi z ostalimi oblikami magnezijevega aluminometasilikata največjo kapaciteto za adsorpcijo olja (2,7-3,4 ml/g) ter največjo specifično površino (1,38).
- Syloid<sup>®</sup> FP (Grace Davison, ZDA) in Sylsia<sup>®</sup> (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) - porozni amorfni silicijev dioksid. Pri našem delu smo uporabili različne oblike poroznega amorfne silicijevega dioksida, ki se med seboj razlikujejo v povprečni velikosti delcev, volumnu por, specifični površini, pH-ju 5% vodne raztopine in kapaciteti za adsorpcijo olja. Vrednosti teh parametrov so prikazane v preglednici II.

**Preglednica II:** Različne oblike poroznega amorfne silicijevega dioksida in vrednosti parametrov po katerih se razlikujejo (44,68,69).

| Zaščiteno ime                                 | Syloid <sup>®</sup><br>244FP EU | Syloid <sup>®</sup><br>AL-1FP | Sylsia <sup>®</sup><br>290N | Sylsia <sup>®</sup><br>350 | Sylsia <sup>®</sup><br>470 | Sylsia <sup>®</sup><br>580 |
|-----------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Velikost delcev ( $\mu\text{m}$ )             | 2,5-3,7                         | 6,5-8,1                       | 9,0                         | 4,0                        | 14,0                       | 8,0                        |
| Volumen por (ml/g)                            | 1,6                             | 0,4                           | 1,8                         | 1,6                        | 1,2                        | 0,8                        |
| Specifična površina ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) | /                               | /                             | 300                         | 300                        | 600                        | 800                        |
| pH                                            | 4,0-7,0                         | 4,0-6,0                       | 7,0                         | 7,0                        | 7,0                        | 7,0                        |
| Sposobnost adsorpcije olj                     | 300g/100g                       | 80g/100g                      | 300ml/100g                  | 320ml/100g                 | 234ml/100g                 | 160ml/100g                 |

## OSTALE POMOŽNE SNOVI ZA TABLETIRANJE:

- Ac-Di-Sol<sup>®</sup> (FMC Biopolymers, ZDA) - premrežena natrijeva karboksimetil celuloza, ki se kot pomožna snov uporablja v peroralnih FO (tablete, kapsule, zrnca) in ima vlogo razgrajevala. Pri izdelavi tablet se lahko uporablja tako pri procesu direktnega tabletiranja kot pri vlažnem granuliranju. Običajna koncentracija v tabletah znaša 0,5-5%. Ac-Di-Sol<sup>®</sup> je v vodi netopna snov. V ustreznih količinah splošno velja za netoksično in nedražečo snov, večje količine pa lahko povzročijo laksativni učinek (67).
- Avicel<sup>®</sup> PH102 (FMC Biopolymers, ZDA) - mikrokristalna celuloza, je bel, kristaliničen prašek, brez vonja in okusa. Povprečna velikost poroznih delcev je 100  $\mu\text{m}$ , specifična površina pa znaša 1,21-1,30  $\text{m}^2/\text{g}$ . V farmacevtski industriji se uporablja kot pomožna snov in ima lahko vlogo adsorbenta, antiadheziva, veziva ali polnila. Mikrokristalna celuloza je pogosto uporabljena snov pri izdelavi peroralnih FO, kot so kapsule in tablete in tudi v prehrabeni industriji. Velja za popolnoma varno, netoksično in nedražečo snov (67).
- Kollidon<sup>®</sup> VA64 (BASF, Nemčija) - kopovidon, je kopolimer 1-vinil-2-pirolidona in vinilacetata v masnem razmerju 3:2. Pri izdelavi tablet ima kot pomožna snov vlogo suhega veziva pri direktnem tabletiranju, veziva pri vlažnem granuliranju in pri filmskih oblogah tablet. Je bel ali blede rumen amorfni prašek, brez okusa in z rahlim značilnim vonjem (67).
- Magnezijev stearat (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) je bel, lahek, fino mlet prašek z nizko gostoto in značilnim vonjem po stearinski kislini. Prašek je masten na otip, netopen v vodi in brezvodnem etanolu. Magnezijev stearat je zmes magnezijevih soli višjih maščobnih kislin, katere glavnino tvorita magnezijevi soli stearinske kisline in palmitinske kisline v različnih razmerjih. Uporablja se v prehrabeni, kozmetični in farmacevtski industriji. V farmaciji se uporablja kot pomožna snov pri izdelavi tablet in kapsul v koncentracijah med 0,25% in 5% kot drsljivec oz. lubrikant (mazivo), pravo drsilo (glidant) ter antiadheziv (67).

## OSTALI MATERIALI:

- Klorovodikova kislina (HCl) Titrisol<sup>®</sup> za 1000ml 1mol/l HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Kalijev klorid (KCl), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Natrijev hidroksid (NaOH), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Ocetna kislina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Merck KGaA, Nemčija;

- Metanol za HPLC, Panreac Quimica S.A.U., Španija;
- Dvakrat prečiščena voda, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Slovenija;
- Prečiščena voda;
- Mehke želatinske kapsule;
- Trde želatinske kapsule, velikost 0, Farmalabor, Portugalska.

### 3.2 NAPRAVE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje naprave:

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica;
- Analitska tehtnica Sartorius, Nemčija;
- Centrifuga Centric 322A, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- Instrumentirana tabletirka na udarec, SP300, Killian (IMA), Nemčija;
- Kljunasto merilo;
- Magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- Membranski filter 0,45µm RC, Minisart RC 25, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija;
- Naprava za določanje razpadnosti tablet Erweka ZT 4, Erweka, Nemčija;
- Naprava za merjenje trdnosti tablet, Vanderkap<sup>®</sup>, VK 200 Tablet hardness tester, Varian, ZDA;
- Naprava z vesli za spremljanje sproščanja (naprava 2 po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed): VK 7000 Dissolution Testing Station, VanKel, New Jersey, ZDA;
- Naprava z vesli za spremljanje sproščanja (naprava 2 po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed): ERWEKA DT6, Švica;
- pH meter, Seven Multi, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica;
- Pretočni filter 10µm, Full flow filt, Agilent Technologies, Nemčija;
- Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC), Agilent Series, Agilent Technologies, Nemčija; kolona YMC-Pack-ODS-AM (5µm, 250x4,6mm);
- Ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- Viale za HPLC, Agilent Technologies, Nemčija;
- Zeta Sizer Nano series, Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija.

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Priprava SMES-a

Pri našem delu smo uporabili SMES, ki je bil predhodno razvit na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Sestava SMES-a je predstavljena v preglednici III.

**Preglednica III:** Posamezne sestavine, vloga sestavin in količinska sestava SMES-a.

| Sestavina                   | Vloga sestavine | Količina (% (m/m)) |
|-----------------------------|-----------------|--------------------|
| Cremophor <sup>®</sup> EL   | emulgator       | 20                 |
| Cremophor <sup>®</sup> RH40 | emulgator       | 20                 |
| Capmul <sup>®</sup> MCM     | oljna faza      | 30                 |
| Ricinusovo olje             | oljna faza      | 30                 |

V erlenmajerico z obrušom smo natehtali sestavine SMES-a in mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi. V SMES smo dodali učinkovino resveratrol (10 mg RSV/100 mg zmesi) in zaščiteno pred svetlobo mešali na magnetnem mešalu 24 h oz. do popolnega raztapljanja RSV. Koncentracija ustreza približno 80 % nasičene topnosti RSV v SMES-u (nasičena topnost:  $12,25 \pm 0,30$  mg RSV/100 mg zmesi).

#### 3.3.2 Adsorpcija SMES-a na trdne nosilce

Adsorpcijo SMES-a z vgrajenim RSV (RSV-SMES) na posamezne trdne nosilce smo izvedli z enostavnim mešanjem v pateni. V pateno smo natehtali 1g RSV-SMES, ki smo mu postopoma dodajali trdni nosilec. Ob mešanju smo trdni nosilec dodajali toliko časa, dokler ni nastala praškasta zmes. Pozorni smo bili na to, da v zmesi ni bilo vidnih večjih delcev in se prašek ni več oprijemal patene. Adsorpcijo na vsak testiran trdni nosilec smo izvedli v treh paralelkah (n=3). Izračunali smo povprečno maso posameznega nosilca, ki je potrebna, da 1g RSV-SMES pretvorimo v praškasto zmes.

### 3.3.3 Tabletiranje

Zmes za tabletiranje smo pripravili tako, da smo samomikroemulgirajoči prašek, ki je nastal po adsorpciji RSV-SMES na posamezni trdni nosilec, prenesli v lonček iz temnega stekla in mu dodali ostale pomožne snovi. Lonček smo pretresli, da so se vse sestavine dobro premešale. Nazadnje smo dodali drsilo in zopet premešali. S tem smo želeli doseči, da ostane na površini delcev. Vse serije tablet so imele enako sestavo, razlikovale so se zgolj v izbranem trdnem nosilcu.

Tablete smo izdelali z metodo direktnega tabletiranja prahov na instrumentirani tabletirki na udarec (Killian SP300) (slika 6). Zmes za tabletiranje smo natehtali ročno in sicer približno 600 mg za posamezno tableto. Vsebino smo stresli v matrično vdolbino ter stisnili v tableto. Pri stiskanju tablet smo uporabljali okrogel pečat z ravnimi površinami in premerom 12,0 mm. Primerno trdnost in izgled tablet smo skušali doseči z uravnavanjem položaja zgornjega pečata. Uravnavanje mase tablet s položajem spodnjega pečata v našem primeru ni bilo potrebno, saj smo prašek za izdelavo tablet natehtali ročno.



**Slika 6:** Instrumentirana tabletirka na udarec (Killian SP300) s pomočjo katere smo izdelali tablete.

Izdelali smo štiri serije tablet, ki so se med seboj razlikovale v trdnem nosilcu za adsorpcijo RSV-SMES in načinu tabletiranja (ročno ali polavtomatsko).

### 3.3.4 Vrednotenje tablet

#### ***Enakomernost mase***

Preskus enakomernosti mase tablet smo izvedli po predpisu za preskus enakomernosti mase enodoznih FO, navedenem v Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. (poglavje 2.9.5. Uniformity of mass of single-dose preparations). Posamično smo stehali 20 tablet vsake serije. Za tablete z maso nad 250 mg Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. predpisuje, da lahko največ 2 masi tablet odstopata od povprečne mase za več kot 5 %, nobena pa ne sme odstopati za več kot 10 %. Za vsako serijo tablet smo izračunali povprečno maso, standardno deviacijo, relativno standardno deviacijo ter podali največjo in najmanjšo maso tablet.

#### ***Trdnost tablet***

Trdnost tablet smo določili po predpisu, navedenem v Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. (poglavje 2.9.8. Resistance to crushing of tablets). Preskus smo izvedli na 10 tabletah iz vsake serije. Posamezno tableto smo z ravno ploskvijo položili med mirujoči in gibljivi del naprave za merjenje trdnosti (Vanderkamp, VK200, ZDA). Pri merjenju trdnosti tablete gibljivi del naprave potiska tableto ob mirujoči del, dokler tableta ne počí. Izmerili smo najmanjšo silo, izraženo v Newton-ih (N), ki je potrebna, da tableta počí oz. se poškoduje. Kot rezultat smo za posamezno serijo tablet podali največjo in najmanjšo trdnost ter izračunali povprečno trdnost, standardno deviacijo in relativno standardno deviacijo.

#### ***Razpadnost tablet***

Preskus razpadnosti tablet smo izvedli po predpisu za razpadnost tablet in kapsul, navedenem v Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. (poglavje 2.9.1. Disintegration of tablets and capsules). Pri določanju razpadnosti tablet smo uporabili napravo za merjenje razpadnosti (Erweka ZT4), ki je sestavljena iz košarice s šestimi cilindri. Vodno kopel smo segreli na  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Čašo za določanje razpadnosti smo napolnili z 800 ml prečiščene vode, ki smo jo predhodno segreli na  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . V cilindre, ki sestavljajo košarico smo prenesli tablete ter jih pokrili z diski. Košarico smo nato potopili v čašo s prečiščeno vodo ter vključili dvigovanje ter spuščanje košarice. Razpadnost je bila dosežena, ko je posamezna tableta dokončno razpadla in ni bilo vidnih večjih delcev. Čas razpadnosti smo določili za 6 tablet iz vsake serije. Kot rezultat smo za posamezno serijo tablet podali povprečni, največji in najmanjši čas razpadnosti ter standardno deviacijo in relativno standardno deviacijo.

**Velikost tablet**

Debelino in premer tablet smo izmerili s kljunastim merilom. Za vsako serijo tablet smo določili debelino in premer 10 tabletam takoj po tabletiranju. Debelino tablet smo izmerili tudi po 24 urah in iz povprečne debeline posamezne serije tablet ter podatka o razmiku med spodnjim in zgornjim pečatom med stiskanjem tablete s pomočjo enačbe izračunali indeks elastične relaksacije tablet (ER) (enačba 1). Indeks elastične relaksacije nam pove, za koliko se bo debelina tablete spremenila (povečala) po določenem času mirovanja zaradi elastične relaksacije materiala.

$$ER (\%) = [H_1 - H_0 / H_0] \times 100$$

*/enačba 1/*

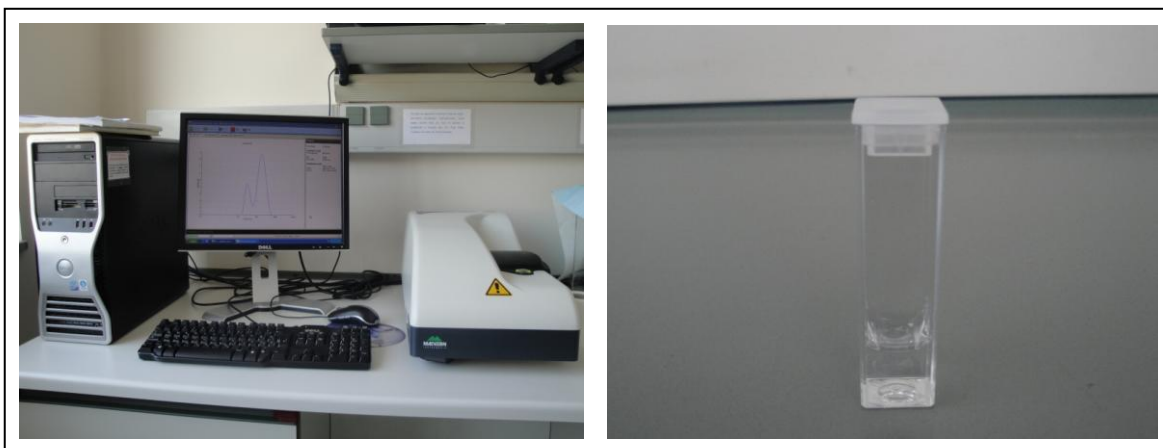
*ER* - indeks elastične relaksacije

*H*<sub>1</sub> - povprečna debelina tablet 24 ur po tabletiranju

*H*<sub>0</sub> - razmik med zgornjim in spodnjim pečatom med stiskanjem oz. minimalna debelina tablet posamezne serije

**3.3.5 Merjenje velikosti kapljic**

V 250 ml prečiščene vode smo dispergirali posamezne tablete, ustrezno količino posameznih praškov, SMES-a ter RSV-SMES. Čaše smo postavili na magnetno mešalo in mešali 1 h, da so tablete popolnoma razpadle. Nastale disperzije smo pokrili in pustili stati 24 h. V tem času so se netopne pomožne snovi in trdni nosilci posedli na dno čaše. Pred merjenjem velikosti kapljic smo posamezni vzorec še centrifugirali 5 min pri 4000 obr./min. Velikost kapljic v supernatantu smo izmerili na napravi Zeta sizer Nano (slika 7). Ustrezno količino posamezne disperzije smo prenesli v kiveto ter z metodo fotonske korelacijske spektroskopije izmerili povprečno velikost kapljic (nm) pri temperaturi 25°C. Merilo za širino porazdelitve velikosti kapljic izraža polidisperzni indeks (PDI), ki se lahko giblje med 0 in 1. Vrednost PDI blizu 0 pomeni, da je porazdelitev velikosti kapljic homogena. Nasprotno PDI bližje številu 1 pomeni, da je porazdelitev velikosti kapljic bolj heterogena. Kot rezultat smo podali povprečno velikost kapljic, PDI ter standardno deviacijo za posamezne disperzije.



**Slika 7:** Naprava Zeta sizer Nano, na kateri smo izmerili velikost kapljic nastalih disperzij (levo) in kiveta z vzorcem (desno).

### 3.3.6 Vrstična elektronska mikroskopija

Vrstična elektronska mikroskopija oz. SEM (angl.: *Scanning Electron Microscopy*) je danes visoko uveljavljena metoda, ki omogoča opazovanje topografije in strukture površine vzorcev in jo uporabljamo za preiskave raznovrstnih materialov (kovine, zlitine, keramični materiali, stekla, nekateri polimerni in organski materiali,...), vzorci pa so lahko različnih oblik: masivni, praškasti, vlakna,... V vrstičnem elektronskem mikroskopu curek elektronov hitro potuje po površini vzorca, pri čemer dobimo sliko na ta način, da detektiramo bodisi primarne povratno sipane elektrone ali pa sekundarne elektrone iz vzorca. Poleg tega da nam omogoča analizo različnih vrst materialov in različnih oblik vzorcev, so prednosti te metode tudi velik razpon povečav za slikanje vzorcev (20-krat do 300 000-krat), zelo dobra ločljivost in izredna globinska ostrina (70).

Z metodo SEM smo pri različnih povečavah (500 x, 2000 x, 5000 x, 10 000 x in 50 000 x) posneli slike posameznih trdnih nosilcev in izdelanih samomikroemulgirajočih praškov.

### 3.3.7 Preskus sproščanja

Za določanje sproščanja RSV smo uporabili napravo z veslastim mešalom (naprava 2 po USP). Preskus sproščanja smo izvajali 8 ur v dveh različni medijih: raztopina HCl (pufer s pH 1,2) in fosfatna puferna raztopina (pufer s pH 6,8). Volumen medija za sproščanje je bil

vedno 900 ml. Temperatura ( $37 \pm 0,5$  °C) in hitrost vrtenja vesel (50 obr./min) sta bila ves čas izvajanja preskusa konstantna.

Preskus sproščanja smo izvajali na dveh napravah sočasno in sicer VK 7000 (VanKel) in ERWEKA DT6 (slika 8). Pri prvi napravi smo za vzorčenje uporabili avtomatski vzorčevalnik, v drugem primeru smo vzorčili ročno. V naprej določenih časovnih intervalih smo odvezemali 5 mL vzorce. Volumen celokupnega medija se je z vzorčenjem postopoma zmanjševal, kar smo upoštevali pri izračunu sproščenega RSV. Koncentracijo RSV v vzorcih smo nato določili s pomočjo HPLC analitike.



**Slika 8:** Naprava za preskus sproščanja VK 7000 - VanKel (levo) in ERWEKA DT6 (desno).

## PRIPRAVA MEDIJEV ZA PRESKUS SPROŠČANJA

### **Raztopina HCl - pufer s pH 1,2**

Za pufer s pH 1,2 smo najprej pripravili 0,2 M raztopino HCl in 0,2 M raztopino KCl.

0,2 M raztopina HCl: 1000 ml merilno bučko smo s prečiščeno vodo napolnili približno do tretjine, vanjo prenesli HCl Titrisol<sup>®</sup> (standard za 1000 ml 1mol/l HCl) in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1000 ml. 400 ml tako pripravljene 1 M raztopine HCl smo nato prenesli v 2000 ml merilno bučko, s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in dobro premešali.

0,2 M raztopina KCl: v 2000 ml merilno bučko smo natehtali 29,84 g KCl, s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in mešali na magnetnem mešalu dokler KCl ni bil popolnoma raztopljen.

Pufer s pH 1,2 smo pripravili tako, da smo v 5000 ml merilni bučki zmešali 1250 ml 0,2 M raztopine KCl, 2125 ml 0,2 M raztopine HCl in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Tako pripravljeno raztopino smo dobro premešali na magnetnem mešalu ter preverili pH s pH lističem.

### **Fosfatna puferska raztopina - pufer s pH 6,8**

Za pufer s pH 6,8 smo najprej pripravili 0,2 M raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 0,2 M raztopino NaOH.

0,2 M raztopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : v 2000 ml merilno bučko smo natehtali 54,4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , s prečiščeno vodo dopolnili do oznake ter na magnetnem mešalu mešali dokler ni bil ves  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  raztopljen.

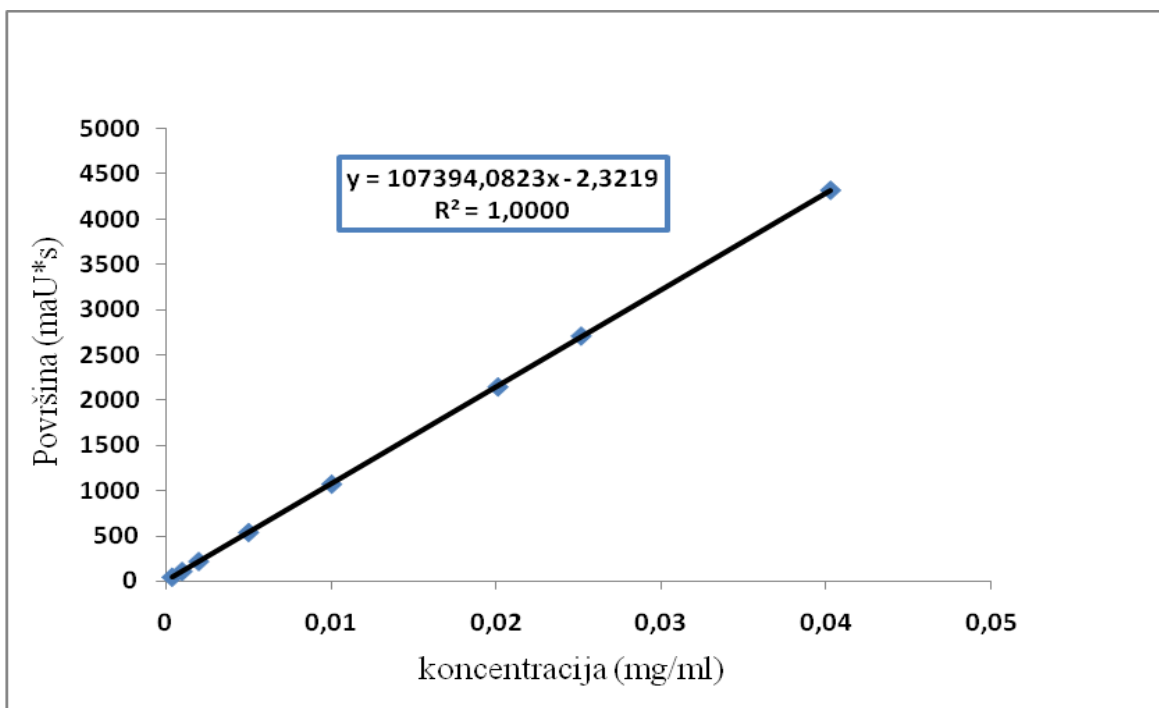
0,2 M raztopina NaOH: v 1000 ml merilno bučko smo natehtali 8,0 g NaOH, dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in mešali na magnetnem mešalu, dokler se NaOH ni popolnoma raztopil.

Fosfatni pufer s pH 6,8 smo pripravili tako, da smo v 5000 ml merilni bučki zmešali 1250 ml 0,2 M raztopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 560 ml 0,2 M raztopine NaOH in dopolnili s prečiščeno vodo do 5000 ml. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo izmerili pH pripravljene raztopine in ga z dodajanjem standardnih raztopin 0,2 M HCl in 0,2 M NaOH uravnali na 0,05 enote natančno.

### **3.3.8 HPLC analiza sproščenega resveratrola**

Koncentracijo sproščenega RSV smo določili s HPLC analizo. Iz površine pod krivuljo smo s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije sproščenega RSV v vsaki časovni točki (slika 9). Osnovno raztopino RSV s koncentracijo 0,10 mg/ml smo pripravili tako, da smo natančno natehtali 10 mg RSV, ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko iz temnega stekla ter dopolnili do oznake z ustreznim medijem. Za medij smo uporabili mešanico metanola za HPLC in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1. Bučko smo

nato za nekaj minut postavili v ultrazvočno kadičko, da se je ves RSV raztopil. Iz osnovne raztopine smo nato z ustreznim redčenjem pripravili nove raztopine s koncentracijami analita od približno 0.00040 mg/ml do 0,040 mg/ml. Z metodo HPLC smo tem raztopinam določili površino pod krivuljo in s pomočjo linearne regresije izračunali umeritveno premico ter kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije ( $R^2$ ).



Slika 9: Umeritvena premica in enačba premice.

#### PARAMETRI HPLC ANALIZE:

- Mobilna faza: 0,5% ocetne kisline v raztopini MeOH za HPLC in bidestilirana voda v volumskem razmerju 1:1;
- Kolona: reverznofazna C18 kolona, dolžina = 25 cm, notranji premer = 4,6 mm, velikost delcev = 5  $\mu$ m (YMC-Pack ODS-AM, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm);
- UV detekcija pri valovni dolžini 303nm;
- Hitrost pretoka mobilne faze 1ml/min;
- Volumen injiciranja 20  $\mu$ l.

Pri izračunu sproščenega RSV smo upoštevali zmanjšanje volumna medija zaradi odvzema vzorcev (enačba 2);

$$V_n = V_0 - (n \times V_{vz})$$

/enačba 2/

$V_n$  - dejanski volumen medija po vzorčenju (ml)

$V_0$  - začetni volumen medija (900 ml)

$n$  - število odvzetih vzorcev

$V_{vz}$  - volumen odvzetega vzorca (5 ml)

S pomočjo umeritvene premice smo izračunali koncentracijo RSV ob določenem času. Z upoštevanjem dejanskega volumna medija po vzorčenju ter koncentracije sproščenega RSV smo izračunali maso sproščene učinkovine. Tej masi smo prišteli maso RSV, ki je bila odvzeta v predhodnih časih vzorčenja (enačba 3).

$$m_n = c_n \times V_n + \sum (c_n \times V_{vz})$$

/enačba 3/

$m_n$  - masa sproščenega RSV v dejanskem volumnu medija ob  $n$ -tem vzorcu (mg)

$c_n$  - koncentracija RSV ob  $n$ -tem vzorcu (mg/ml)

Delež sproščenega RSV smo nato izračunali iz dejanske mase sproščenega RSV in teoretične mase RSV v tableti/prašku/kapsuli (enačba 4);

$$X_n = (m_n / m_0) \times 100$$

/enačba 4/

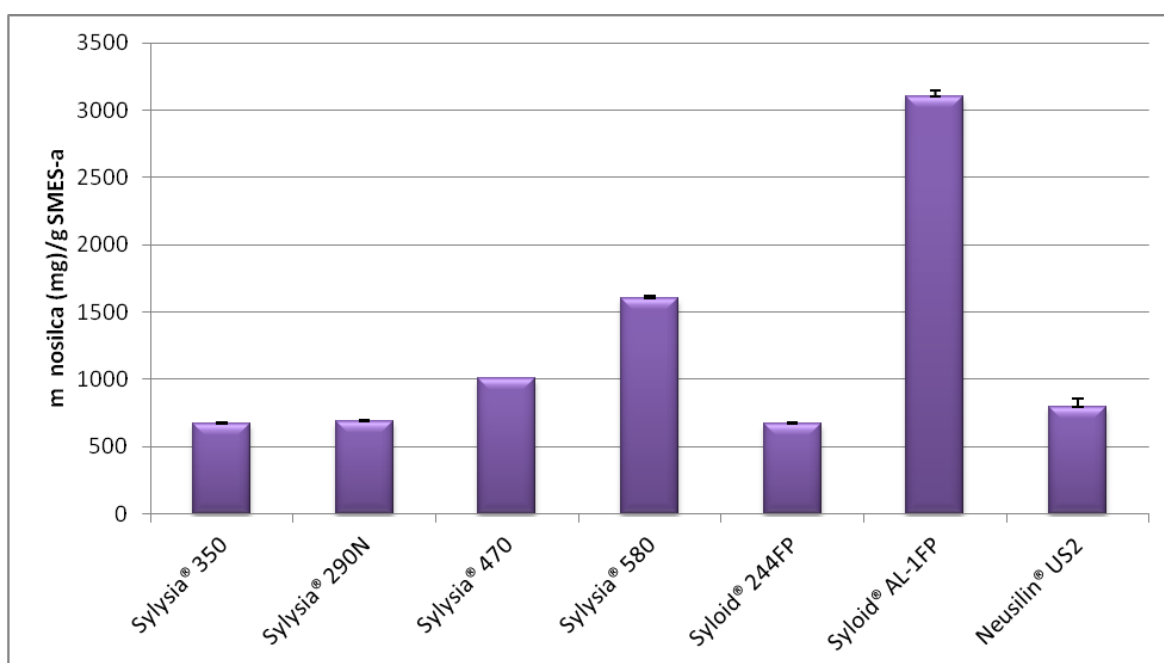
$X_n$  - delež sproščenega RSV ob  $n$ -tem jemanju vzorca (%)

$m_0$  - teoretična masa RSV (mg)

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Vrednotenje in izbira primernih trdnih nosilcev

Z namenom priprave samomikroemulgirajočega praška smo vrednotili različne trdne nosilce glede na njihovo sposobnost adsorpcije tekočega SMES-a. Slika 10 prikazuje količino posameznega trdnega nosilca, ki je bila potrebna za adsorpcijo 1 g RSV-SMES, da smo dobili praškasto zmes.



**Slika 10:** Primerjava različnih trdnih nosilcev glede na sposobnost adsorpcije RSV-SMES.

Z dodatkom čim manjše količine trdnega nosilca smo želeli doseči čim večjo vsebnost RSV v samomikroemulgirajočem prašku. Boljša kapaciteta za adsorpcijo SMES-a pomeni, da je za nastanek samomikroemulgirajočega praška potrebna manjša količina trdnega nosilca. Iz rezultatov je razvidno, da imajo najboljše sposobnosti za adsorpcijo SMES-a Sylysia® 350 (~675 mg/g SMES-a), Sylysia® 290N (~688 mg/g SMES-a), Syloid® 244FP (~675 mg/g SMES-a) in Neusilin® US2 (~797 mg/g SMES-a). Rezultati se skladajo z literaturnimi podatki, po katerih imajo le-ti večjo kapaciteto za adsorpcijo olj v primerjavi z ostalimi testiranimi nosilci (glej poglavje 3.1). Za najmanj primerna nosilca za adsorpcijo

SMES-a sta se izkazala Sylysia® 580 (~1605 mg/g SMES-a) in Syloid® AL-1FP (~3102 mg/g SMES-a), kjer je bila za nastanek praška potrebna večja količina trdnega nosilca.

#### 4.2 Razvoj samomikroemulgirajočih praškov in tablet

Za nadaljnjo izdelavo samomikroemulgirajočih tablet smo izbirali med nosilci, ki imajo najboljše sposobnosti za adsorpcijo SMES-a. Izmed različnih testiranih poroznih amorfnih silicijevih dioksidov smo izbrali Sylysio® 350 in Syloid® 244FP, ki se razlikujeta po velikosti delcev in sta produkt različnih proizvajalcev, a sta se pri vrednotenju sposobnosti za adsorpcijo SMES-a izkazala za primerljiva. Poleg Sylysio® 350 in Syloida® 244FP smo kot trdni nosilec za SMES in nadaljnjo izdelavo tablet izbrali še porozni magnezijev aluminometasilikat Neusilin® US2, ki ima prav tako dobre sposobnosti za adsorpcijo SMES-a, a se od njiju razlikuje tako kemijsko kot po nekaterih drugih lastnostih (npr. velikost delcev, kapaciteta za adsorpcijo olj) (38).

Tablete smo skušali izdelati z metodo direktnega tabletiranja prahov. Ta postopek velja za najenostavnejši proces izdelave tablet (63). S preizkušanjem različnih formulacij smo določili ustrezno sestavo zmesi za tabletiranje. Zmes za tabletiranje smo izdelali iz izbranih samomikroemulgirajočih praškov, ki smo jim dodali še druge pomožne snovi: mikrokristalno celulozo (Avicel® PH102), premreženo natrijevo karboksimetil celulozo (Ac-Di-Sol®), kopovidon (Kollidon® VA64) in magnezijev stearat. Avicel® PH102 smo izbrali kot suho vezivo zato, ker ima tudi dobre antiadhezivne lastnosti in tako pripomore k zmanjšanju lepljenja na pečate. Poleg tega ima mikrokristalna celuloza na splošno dobre adsorptivne lastnosti in je bila v študijah že uporabljena tudi kot trdni nosilec za S(M)ES (71). Proces direktnega tabletiranja običajno zahteva visoko vsebnost suhih veziv, saj s tem izboljšamo stisljivost zmesi za tabletiranje in trdnost tablet. Kot suho vezivo smo zato izbrali še Kollidon® VA64. Ac-Di-Sol® ima v zmesi za tabletiranje vlogo razgrajevala in je bil v študijah razvoja samo(mikro)emulgirajočih tablet v ta namen tudi že uporabljen (40). Za izboljšanje pretočnih lastnosti in preprečevanje lepljenja smo dodali še magnezijev stearat kot drsilo. Z ozirom na priporočene količine za posamezne pomožne snovi iz literature smo s preizkušanjem tabletiranja različnih formulacij določili ustrezno količino teh pomožnih snovi v zmesi za tabletiranje.

Kljub temu da smo pri vrednotenju adsorpcije SMES-a na trdne nosilce (Sylsia® 350, Syloid® 244FP in Neusilin® US2) dokazali, da je za nastanek samomikroemulgirajočega praška potrebno precej manj kot 50 odstotkov (m/m) trdnega nosilca, je bila praškasta zmes z dodanimi ostalimi pomožnimi snovmi še vedno preveč lepljiva za tabletiranje, izdelane tablete pa premehke. V primeru vseh treh izbranih nosilcev smo se zato odločili, da za izdelavo samomikroemulgirajočih praškov uporabimo trdni nosilec in RSV-SMES v razmerju 1:1. Enako razmerje so za izdelavo samomikroemulgirajočih praškov že uporabili Milovič in sodelavci, ki so v študiji proučevali vpliv adsorpcije SMES-a na različne trdne nosilce na lastnosti SMES-a (36). Oznake izdelanih samomikroemulgirajočih praškov, ki smo jih tudi vrednotili, so prikazane v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Oznake izdelanih praškov.

| Oznaka praškov | Sestava                                  |
|----------------|------------------------------------------|
| Neu-P          | Neusilin® US2 in RSV-SMES (razmerje 1:1) |
| Syloid-P       | Syloid® 244FP in RSV-SMES (razmerje 1:1) |
| Sylsia-P       | Sylsia® 350 in RSV-SMES (razmerje 1:1)   |

Izdelali smo 600 mg tablete, ki so vsebovale ~250 mg SMES-a oz. 25 mg RSV. RSV je na tržišču na voljo kot prehransko dopolnilo, odmerki v posameznih FO (kapsulah, tabletah) pa so zelo različni (15-600 mg v kapsuli ali tableti) (16). Odmerek 25 mg RSV je bil že uporabljen v kliničnih študijah, poleg tega so na tržišču na voljo tudi prehranska dopolnila s takim odmerkom RSV (v neraztopljeni obliki) (72). Za izdelavo tablet smo v primeru vseh treh izbranih trdnih nosilcev uporabili enako količinsko sestavo pomožnih snovi, ki je prikazana v preglednici V. Zmesi za tabletiranje so se tako razlikovale zgolj v trdnem nosilcu za adsorpcijo RSV-SMES.

**Preglednica V:** Posamezne sestavine, vloga sestavin in količinska sestava zmesi za tabletiranje.

| Sestavina                                                                          | Vloga sestavine                      | Masa (mg) | % (m/m) |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|---------|
| RSV-SMES                                                                           | lipidni dostavni sistem z učinkovino | 250,5     | 41,75   |
| NEUSILIN <sup>®</sup> US2<br>SYLYSIA <sup>®</sup> 350<br>SYLOID <sup>®</sup> 244FP | trdni nosilec (adsorbent)            | 250,5     | 41,75   |
| Avicel <sup>®</sup> PH102                                                          | suho vezivo                          | 60        | 10,00   |
| Ac-Di-Sol <sup>®</sup>                                                             | razgrajevalo                         | 30        | 5,00    |
| Kollidon <sup>®</sup> VA64                                                         | suho vezivo                          | 6         | 1,00    |
| Mg-stearat                                                                         | drsilo                               | 3         | 0,50    |
| Skupno                                                                             | /                                    | 600       | 100     |

Posameznim zmesem za tabletiranje smo z merjenjem pretočnega časa in nasipnega kota skušali izmeriti pretočne lastnosti, pri čemer smo uporabili lij z odprtino 10 mm. Pretočne lastnosti izdelanih zmesi so bile slabe in jih nismo mogli izmeriti, ker je prašek ostal v liju. Slabe pretočne lastnosti smo pričakovali, saj so zmesi za tabletiranje vsebovale precejšnjo količino tekočega RSV-SMES (41,75% (m/m)). Ker je bila naša prioriteta izdelati tablete s čim večjo vsebnostjo RSV-SMES, sestave zmesi nismo spreminjali, ampak smo se odločili za ročno polnjenje matrične vdolbine na tabletirki.

Izdelali smo štiri serije tablet. Zmes za tabletiranje smo tehtali ročno (600 mg za posamezno tableto), saj avtomatsko polnjenje matrične vdolbine z uporabo polnilnega čolnika zaradi prej omenjenih slabih pretočnih lastnosti prahov ni bilo možno. Da bi dosegli zadovoljivo trdnost in videz tablet, smo z ročnim vrtenjem kolesa določili nastavitve zgornjega pečata za posamezno serijo. Pri neustreznih nastavitvah tabletirke je v večini primerov prišlo do t.i. pojavljanja kapic tablet ali do razslojevanja (slika 5).

Tri serije tablet z različnimi trdnimi nosilci smo stisnili z ročnim vrtenjem kolesa. Eno serijo tablet, ki so kot trdni nosilec vsebovale Neusilin<sup>®</sup> US2, pa nam je uspelo stisniti tudi polavtomatsko. Prednost polavtomatskega stiskanja v primerjavi z ročnim vrtenjem kolesa je bolj enakomerna hitrost in sila stiskanja. Polavtomatsko stisnjene tablete, ki so kot trdni nosilec vsebovale Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244FP niso bile ustrezne, saj so imele nizko

trdnost, opazili pa smo tudi t.i. pojav kopic in/ali razslojevanje tablet. Vzrok za to je bila v teh dveh primerih hitrost stiskanja v tablete, ki je pri polavtomatskem stiskanju veliko večja kot pri ročnem vrtenju kolesa. Oznake izdelanih serij samomikroemulgirajočih tablet so prikazane v preglednici VI.

**Preglednica VI:** Oznake izdelanih serij tablet.

| Oznaka serije tablet | Trdni nosilec              | Način tabletiranja |
|----------------------|----------------------------|--------------------|
| Neu-T-PA             | Neusilin <sup>®</sup> US 2 | Polavtomatsko      |
| Neu-T-R              | Neusilin <sup>®</sup> US 2 | Ročno              |
| Syloid-T-R           | Syloid <sup>®</sup> 244FP  | Ročno              |
| Sylysia-T-R          | Sylysia <sup>®</sup> 350   | Ročno              |

Končne nastavitve pečatov in sile stiskanja, ki smo jih uporabili za izdelavo posameznih serij tablet so prikazane v preglednici VII.

**Preglednica VII:** Sila stiskanja ter nastavitvev pečatov za izdelavo posamezne serije tablet.

| Serija tablet | Sila stiskanja (kN) | Nastavitev na zgornjem pečatu (mm) | Nastavitev na spodnjem pečatu (mm) | Razdalja med pečatoma (mm) |
|---------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Neu-T-PA      | 5,4                 | 15,9                               | 20,0                               | 4,1                        |
| Neu-T-R       | 4,5                 | 15,9                               | 20,0                               | 4,1                        |
| Syloid-T-R    | 8,3                 | 16,3                               | 20,0                               | 3,7                        |
| Sylysia-T-R   | 8,0                 | 16,2                               | 20,0                               | 3,8                        |

Izdelane serije tablet, ki se na videz niso razlikovale (slika 11), smo nato z različnimi preskusi ovrednotili.



**Slika 11:** Slika izdelanih tablet (po ena tableta iz vsake serije).

#### **4.3 Vrednotenje farmacevtsko-tehnoloških parametrov samomikroemulgirajočih tablet**

Izdelane serije tablet smo ovrednotili glede na enakomernost mase, trdnost, čas razpadnosti in velikost.

##### ***Enakomernost mase***

Za vsako serijo tablet smo izvedli preskus enakomernosti mase enoodmernih FO po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. in rezultate predstavili v preglednici VIII.

Vse serije samomikroemulgirajočih tablet so ustrezale testu enakomernosti mase, saj nobena tableta ni odstopala od povprečne mase za več kot dovoljuje evropska farmakopeja (največ dve tableti lahko odstopata od povprečne mase za 5 %, nobena tableta ne sme odstopati za več kot 10 %). Rezultati so bili pričakovani, saj smo zmes za tabletiranje tehtali ročno in zaradi slabih pretočnih lastnosti nismo uporabili polnilnega čolnička.

**Preglednica VIII:** Rezultati preskusa enakomernosti mase enoodmernih FO za posamezno serijo tablet ( $n=20$ ). Podana je najmanjša, največja in povprečna masa tablet ter izračunani vrednosti standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD).

| Serija tablet | MASA (mg) |          |           | SD (mg) | RSD (%) |
|---------------|-----------|----------|-----------|---------|---------|
|               | Najmanjša | Največja | Povprečna |         |         |
| Neu-T-PA      | 594,4     | 597,9    | 596,3     | 0,90    | 0,15    |
| Neu-T-R       | 596,0     | 600,4    | 598,8     | 1,08    | 0,18    |
| Syloid-T-R    | 588,2     | 600,4    | 598,0     | 2,73    | 0,46    |
| Sylaysia-T-R  | 591,2     | 597,8    | 596,0     | 1,78    | 0,30    |

### **Trdnost tablet**

Pri tabletiranju si želimo takšne trdnosti, da so tablete odporne proti krušenju med rokovanjem, pakiranjem in morebitnem oblaganjem. Prevelika trdnost pa lahko negativno vpliva na razpadnost tablete in posledično neustrezno sproščanje ZU. Vsaki seriji samomikroemulgirajočih tablet smo izmerili trdnost po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. in rezultate prikazali v preglednici IX.

**Preglednica IX:** Trdnost izdelanih serij tablet ( $n=10$ ). Podana je najmanjša, največja, povprečna trdnost, SD in RSD.

| Serija tablet | TRDNOST (N) |          |           | SD (N) | RSD (%) |
|---------------|-------------|----------|-----------|--------|---------|
|               | Najmanjša   | Največja | Povprečna |        |         |
| Neu-T-PA      | 40,2        | 55,4     | 47,7      | 5,15   | 10,80   |
| Neu-T-R       | 86,1        | 104,8    | 95,3      | 5,48   | 5,75    |
| Syloid-T-R    | 41,1        | 65,0     | 50,1      | 7,12   | 14,21   |
| Sylaysia-T-R  | 52,3        | 73,2     | 63,9      | 7,35   | 11,52   |

Največjo trdnost (~95 N) so imele tablete, ki smo jih stiskali ročno in so kot trdni nosilec vsebovale Neusilin® US2 (Neu-T-R). Te tablete so bile na pogled gladke, z neodkrušenimi robovi in na otip nelepljive. Tablete Neu-T-PA, ki smo jih stiskali polavtomatsko so imele

sicer skoraj pol manjšo trdnost, a jih na pogled nismo mogli ločiti od tablet z Neusilinom<sup>®</sup> US2, ki smo jih stiskali z ročnim načinom (Neu-T-R). To se sklada s podatki iz literature, kjer so opisane samomikroemulgirajoče tablete z Neusilinom<sup>®</sup> US2 z zelo različno trdnostjo (od 50 do 110 N) (40,41). Izmed serij samomikroemulgirajočih tablet, ki smo jih stiskali ročno, so imele tablete Syloid-T-R, najnižjo trdnost in so bile tudi bolj lepljive na otip. Marchaud in sodelavci so izdelali samomikroemulgirajoče tablete s poroznim silicijevim dioksidom, ki so imele večjo trdnost (80 N), vendar pa so le-te vsebovale manjšo količino tekočega SMES-a (30%) (60).

Pri večjih tabletah Syloid-T-R smo opazili odkrušen zgornji rob, ki je bil posledica samega tabletiranja in lepljenja na zgornji pečat. Kljub temu da tablete Syloid-T-R po izgledu niso ustrezale, smo prav tako izvedli ostale preskuse.

### **Razpadnost tablet**

Čas razpadnosti tablet smo določili po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. in rezultate predstavili v preglednici X.

**Preglednica X:** Čas razpadnosti posameznih serij tablet ( $n=6$ ) v prečiščeni vodi, pri temperaturi  $37\pm 0,5$  °C. Podan je najmanjši, največji in povprečni čas razpadnosti, SD in RSD.

| Serija tablet | Čas razpadnosti (min) |          |           | SD<br>(min) | RSD<br>(%) |
|---------------|-----------------------|----------|-----------|-------------|------------|
|               | Najmanjši             | Največji | Povprečni |             |            |
| Neu-T-PA      | 3,12                  | 3,93     | 3,52      | 0,35        | 9,87       |
| Neu-T-R       | 8,47                  | 9,02     | 8,68      | 0,25        | 2,92       |
| Syloid-T-R    | 0,87                  | 1,53     | 1,27      | 0,26        | 20,77      |
| Sylysia-T-R   | 2,30                  | 2,77     | 2,53      | 0,20        | 7,81       |

Vse serije samomikroemulgirajočih tablet so ustrezale testu razpadnosti neobloženih tablet po Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed., saj vse razpadejo hitreje kot v 15 min. Med izdelanimi serijami samomikroemulgirajočih tablet so najdaljši čas razpadnosti izkazovale tablete Neu-T-R, kar pripisujemo večji trdnosti v primerjavi z ostalimi serijami. Tablete iz ostalih treh serij so razpadle v zelo kratkem času ( $< 4$  min). Vse testirane samomikroemulgirajoče tablete so razpadale od zunanje površine proti notranjosti tablete, enakomerno z obeh strani.

**Velikost tablet**

Izdelanim tabletam smo s kljunastim merilom izmerili debelino in premer takoj po tabletiranju. Rezultati so prikazani v preglednicah XI in XII. Debelino tablet smo izmerili tudi 24 ur po tabletiranju in s pomočjo dobljenih rezultatov izračunali indeks elastične relaksacije (preglednica XIII).

**Preglednica XI:** *Premer izdelanih serij tablet (n=10). Podan je najmanjši, največji, povprečni premer tablet ter SD in RSD.*

| Serija tablet | PREMER (mm) |          |           | SD<br>(mm) | RSD<br>(%) |
|---------------|-------------|----------|-----------|------------|------------|
|               | Najmanjši   | Največji | Povprečni |            |            |
| Neu-T-PA      | 12,08       | 12,11    | 12,09     | 0,010      | 0,09       |
| Neu-T-R       | 12,09       | 12,12    | 12,10     | 0,010      | 0,08       |
| Syloid-T-R    | 12,16       | 12,22    | 12,19     | 0,020      | 0,17       |
| Sylsya-T-R    | 12,17       | 12,21    | 12,19     | 0,015      | 0,13       |

**Preglednica XII:** *Debelina posameznih serij tablet takoj po tabletiranju (t=0). Podana je najmanjša, največja, povprečna debelina tablet ter SD in RSD (n=10).*

| Serija tablet | DEBELINA [mm] (t=0) |          |           | SD<br>(mm) | RSD<br>(%) |
|---------------|---------------------|----------|-----------|------------|------------|
|               | Najmanjša           | Največja | Povprečna |            |            |
| Neu-T-PA      | 4,89                | 4,96     | 4,93      | 0,021      | 0,44       |
| Neu-T-R       | 4,69                | 4,75     | 4,73      | 0,018      | 0,39       |
| Syloid-T-R    | 4,75                | 4,88     | 4,83      | 0,050      | 1,04       |
| Sylsya-T-R    | 4,83                | 4,87     | 4,85      | 0,012      | 0,24       |

**Preglednica XIII:** Debelina posameznih serij tablet 24 ur po tabletiranju ( $t=24h$ ). Podana je najmanjša, največja, povprečna debelina tablet, izračunane vrednosti SD, RSD in indeks elastične relaksacije (ER) ( $n=10$ ).

| Serija tablet | DEBELINA [mm] ( $t=24h$ ) |          |           | SD<br>(mm) | RSD<br>(%) | ER<br>(%) |
|---------------|---------------------------|----------|-----------|------------|------------|-----------|
|               | Najmanjša                 | Največja | Povprečna |            |            |           |
| Neu-T-PA      | 4,91                      | 4,98     | 4,94      | 0,025      | 0,50       | 20,5      |
| Neu-T-R       | 4,71                      | 4,76     | 4,74      | 0,017      | 0,36       | 15,6      |
| Syloid-T-R    | 4,77                      | 4,95     | 4,85      | 0,064      | 1,33       | 31,1      |
| Sylsya-T-R    | 4,87                      | 4,92     | 4,89      | 0,014      | 0,29       | 28,7      |

Povprečna debelina posameznih serij tablet, izmerjena po 24 urah, se ni bistveno razlikovala od debeline tablet izmerjene takoj po tabletiranju. Kot merilo elastičnosti zmesi za tabletiranje smo iz povprečne debeline posameznih serij tablet (izmerjene 24 ur po tabletiranju) izračunali ER. Zaradi elastične relaksacije pride do pretrganja vezi med delci in posledično do zmanjšanja trdnosti tablet (73).

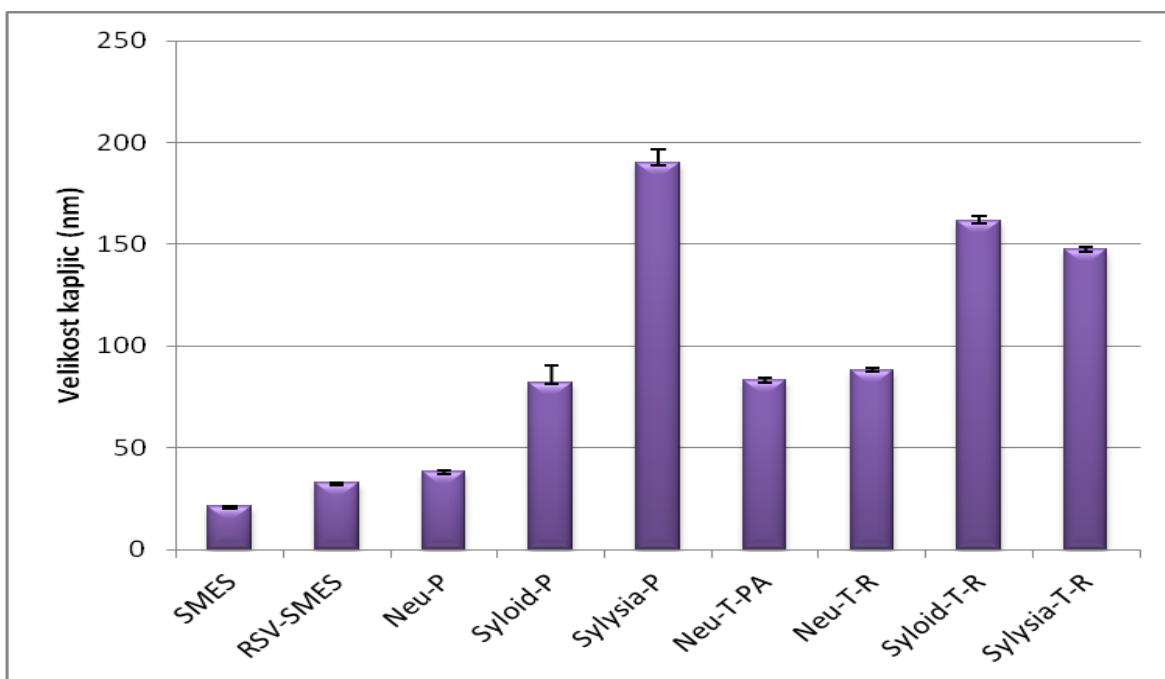
ER različnih serij tablet lahko med seboj primerjamo le, če so tablete stisnjene pri enaki sili. V našem primeru je bil osnovni kriterij zagotoviti ustrezno trdnost in izgled tablet, zato smo silo stiskanja morali prilagajati. Med seboj lahko primerjamo seriji Neu-T-PA in Neu-T-R, ki so bile stisnjene pri podobnih silah stiskanja in pri enakih razmikih med pečatoma. Tablete, ki smo jih stiskali polavtomatsko, imajo višji ER. Večja hitrost tabletiranja prispeva k izrazitejši elastični relaksaciji, katere posledica pa je tudi manjša trdnost Neu-T-PA. Pri podobnih silah stiskanja in razmikih med pečatoma sta bili stisnjeni tudi seriji Syloid-T-R in Sylsya-T-R. Tablete, ki so kot trdni nosilec vsebovale Syloid<sup>®</sup> 244FP imajo višji ER, kar pomeni slabše kompaktilne lastnosti zmesi za tabletiranje in pojasni manjšo trdnost le-teh v primerjavi s serijo Sylsya-T-R.

#### 4.4 Vrednotenje samomikroemulgirajočih lastnosti

Po dispergiranju SMES-a v vodnem mediju po definiciji nastanejo mikroemulzije z velikostjo kapljic manjšo od 50 oz. 100 nm (25). Disperzijam, ki so nastale po dispergiranju posameznih samomikroemulgirajočih praškov in tablet v prečiščeni vodi,

smo izmerili velikost kapljic notranje faze. Vse nastale disperzije so bile bistre oz. transparentne.

Povprečne velikosti kapljic nastalih disperzij so prikazane na sliki 12. Rezultate smo primerjali z velikostjo kapljic nastalih po dispergiranju SMES-a in RSV-SMES.



**Slika 12:** Velikost kapljic disperzij, ki so nastale po dispergiranju SMES, RSV-SMES, posameznih praškov in tablet v prečiščeni vodi.

Iz rezultatov je razvidno, da po dispergiranju SMES-a v prečiščeni vodi nastanejo mikroemulzije z zelo majhno velikostjo kapljic (21 nm). Vgradnja RSV v SMES poveča velikost kapljic, a so te še vedno zelo majhne (32 nm). Adsorpcija RSV-SMES na trdne nosilce je še dodatno povečala velikost kapljic. Tako pri dispergiranju posameznih samomikroemulgirajočih praškov kot tablet v prečiščeni vodi smo najmanjšo velikost kapljic izmerili, v primeru, ko smo kot trdni nosilec uporabili Neusilin® US2. Po dispergiranju praška Neu-P je povprečna velikost kapljic mikroemulzije znašala ~ 38 nm, po dispergiranju tablet Neu-T-PA in Neu-T-R pa približno 85 nm. Ustrezno velikost kapljic mikroemulzije pod 100 nm smo izmerili še po dispergiranju praška Syloid-P. Pri vseh ostalih vzorcih (Sylysia-P, Syloid-T-R in Sylysia-T-R) pa smo izmerili velikost kapljic disperzije 150 nm in več, kar kaže na nastanek emulzij. Vendar je za emulzije

značilno, da so na pogled mlečne in netransparentne, testirane disperzije pa so bile transparentne. Večja izmerjena velikost kapljic je lahko tudi posledica zaostalih delcev netopnih pomožnih snovi v supernatantu, ki se tudi po centrifugiranju niso v celoti posedli na dno in tako vplivajo na rezultat.

Nastalim disperzijam smo določili tudi polidisperzni indeks, ki izraža merilo širine porazdelitve velikosti kapljic. Vrednost PDI blizu 0 pomeni, da je porazdelitev velikosti kapljic homogena. Nasprotno PDI bližje številu 1 pomeni, da je porazdelitev velikosti kapljic bolj heterogena. Vrednosti PDI za posamezne mikroemulzije so prikazane v preglednici XIV.

**Preglednica XIV:** Vrednost PDI disperzij, ki so nastale po dispergiranju SMES, RSV-SMES, praškov in tablet v prečiščeni vodi in izračunane vrednosti SD dobljenih meritev.

| VZOREC      | PDI   | SD    |
|-------------|-------|-------|
| SMES        | 0,078 | 0,006 |
| RSV-SMES    | 0,291 | 0,027 |
| Neu-P       | 0,347 | 0,011 |
| Syloid-P    | 0,745 | 0,197 |
| Sylysia-P   | 0,441 | 0,014 |
| Neu-T-PA    | 0,508 | 0,036 |
| Neu-T-R     | 0,512 | 0,028 |
| Syloid-T-R  | 0,300 | 0,006 |
| Sylysia-T-R | 0,360 | 0,021 |

Tako kot velikost kapljic se z vgradnjo RSV v SMES poveča tudi širina porazdelitve velikosti kapljic (večji PDI). Po dispergiranju praškov in tablet v prečiščeni vodi smo dobili zelo različne rezultate. PDI so bili v vseh primerih precej višji od PDI, ki smo ga dobili po dispergiranju samega SMES-a, kar pomeni bolj heterogeno porazdelitev velikosti kapljic. Prav tako kot na velikost kapljic, bi tudi na širino porazdelitve velikosti delcev lahko vplivala prisotnost netopnih trdnih nosilcev in pomožnih snovi v primeru, da je del le-teh tudi po centrifugiranju ostal v supernatantu.

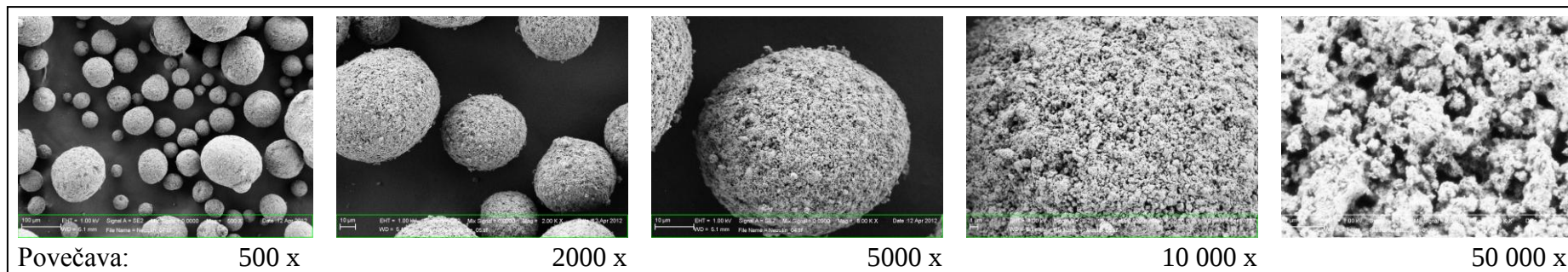
Glede na izmerjene samomikroemulgirajoče lastnosti lahko sklepamo, da je najprimernejši trdni nosilec za RSV-SMES Neusilin<sup>®</sup> US2, kjer smo tako po dispergiranju praška in tablet v vodnem mediju izmerili najmanjšo velikost kapljic ter tako najbolj ohranili samomikroemulgirajoči učinek prvotne tekoče formulacije.

#### 4.5 Morfološke lastnosti samomikroemulgirajočih praškov

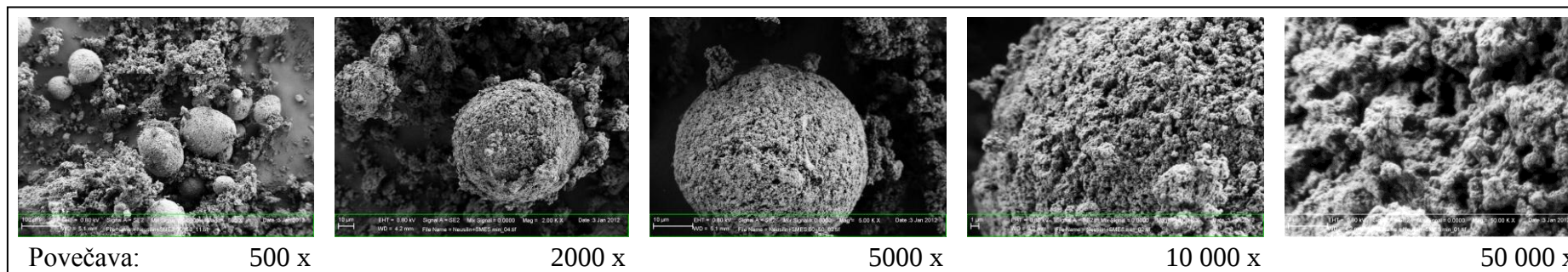
Pod vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali površine uporabljenih trdnih nosilcev (Neusilin<sup>®</sup> US2, Sylysia<sup>®</sup> 350, Syloid<sup>®</sup> 244FP) ter površine izdelanih samomikroemulgirajočih praškov (Neu-P, Sylysia-P, Syloid-P). Pri tem smo se osredotočili na morfološke spremembe prahov (trdnih nosilcev), ki nastanejo po adsorpciji SMES-a.

Slika 13 prikazuje površino magnezijevega aluminometasilikata (Neusilin US2) posneto pri različnih povečavah. Iz slik posnetih pri 500, 2000 in 5000-kratni povečavi je lepo razvidna granularna struktura Neusilina<sup>®</sup> US2 (38). Slika 14 prikazuje površino samomikroemulgirajočega praška Neu-P. Na posameznih granulah opazimo adsorbirane skupke delcev, za katere predvidevamo, da predstavljajo RSV-SMES s posameznimi praškastimi delci. Ti najverjetneje nastanejo po mehanski obremenitvi (mešanju v pateni) granul Neusilina US2 in se zlepijo z RSV-SMES. Tudi pri večjih povečavah (10 000 in 50 000-kratna povečava) opazimo spremembe na površini posameznih granul Neusilina US2. Površina je po adsorpciji RSV-SMES veliko bolj razgibana.

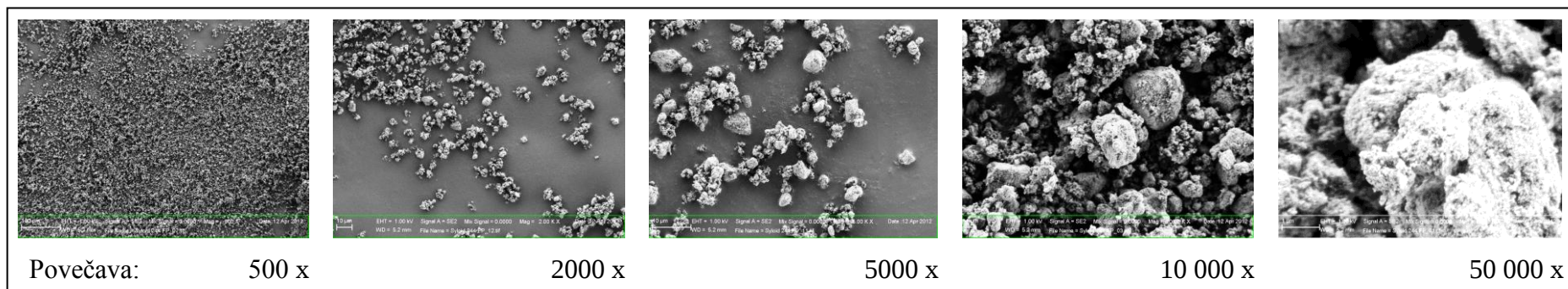
Na slikah 15 in 17 sta prikazani površini poroznih amorfnih silicijevih dioksidov, Syloida<sup>®</sup> 244FP in Sylysie<sup>®</sup> 350. V primerjavi z Neusilinom<sup>®</sup> US2 je razvidno, da je velikost posameznih delcev veliko manjša. Razlike v površini trdnega nosilca (Syloid<sup>®</sup> 244FP, Sylysia<sup>®</sup> 350) (slika 15 in slika 17) in iz njega izdelanega samomikroemulgirajočega praška (Syloid-P, Sylysia-P) (slika 16 in slika 18) so manj očitne kot pri Neusilinu<sup>®</sup> US2. Opazimo lahko le to, da se po adsorpciji RSV-SMES posamezni delci poroznega amorfnega silicijevega dioksida sprimejo med seboj v nekoliko večje skupke, kar se pod vrstičnim elektronskim mikroskopom najbolje vidi pri 500-kratni povečavi. Pri večjih povečavah v teh dveh primerih nismo opazili bistvenih razlik v morfologiji trdnih nosilcev in izdelanih samomikroemulgirajočih praškov.

**Neusilin® US2**

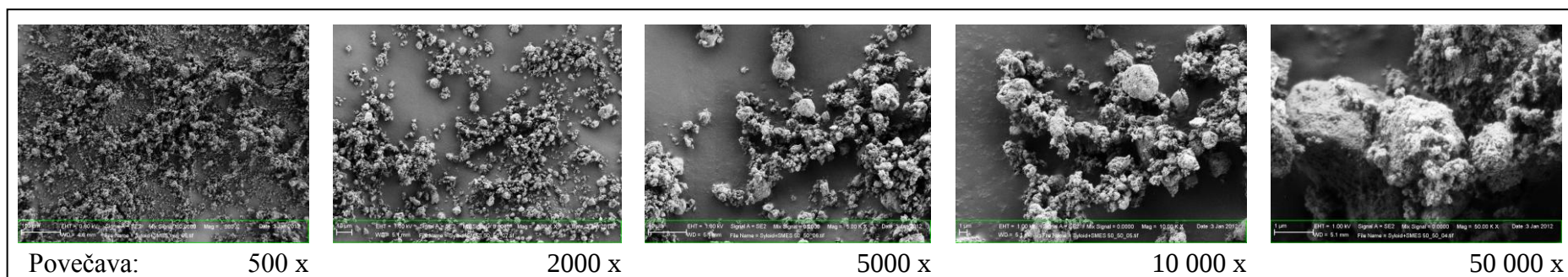
**Slika 13:** Različne povečave površine poroznega magnezijevega aluminometasilikata (Neusilin® US2) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Neu-P**

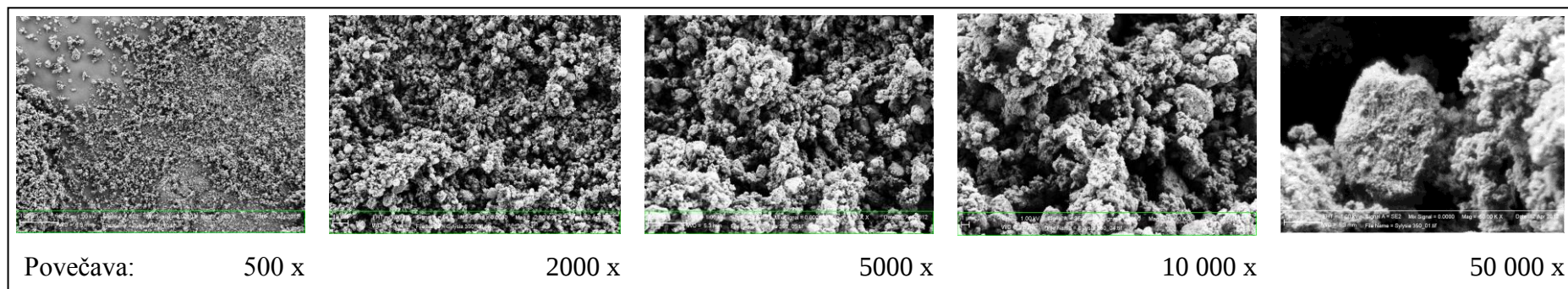
**Slika 14:** Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Neu-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Syloid® 244FP**

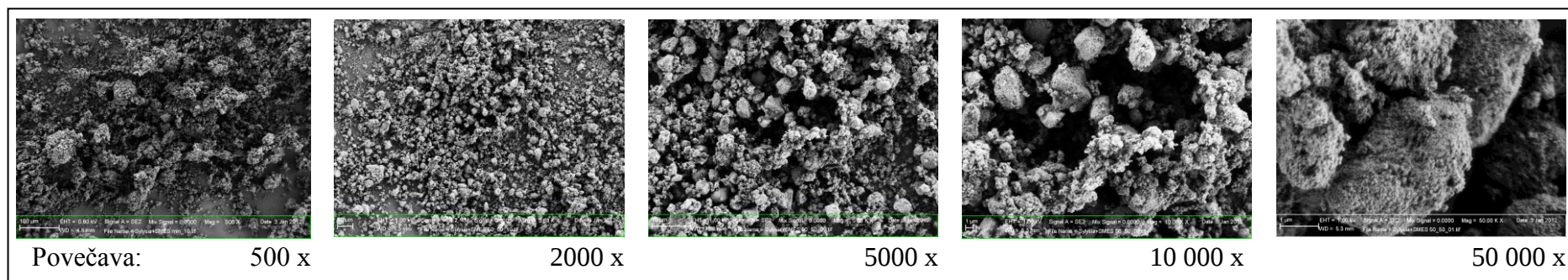
**Slika 15:** Različne povečave površine poroznega silicijevega dioksida (Syloid® 244FP) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Syloid-P**

**Slika 16:** Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Syloid-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Sylsia® 350**

**Slika 17:** Različne povečave površine poroznega silicijevega dioksida (Sylsia® 350) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Sylsia-P**

**Slika 18:** Različne povečave površine samomikroemulgirajočega praška Sylsia-P pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

## 4.6 Rezultati preskusa sproščanja

### 4.6.1 Sproščanje RSV iz SMES-a polnjenega v trde/mehke želatinske kapsule

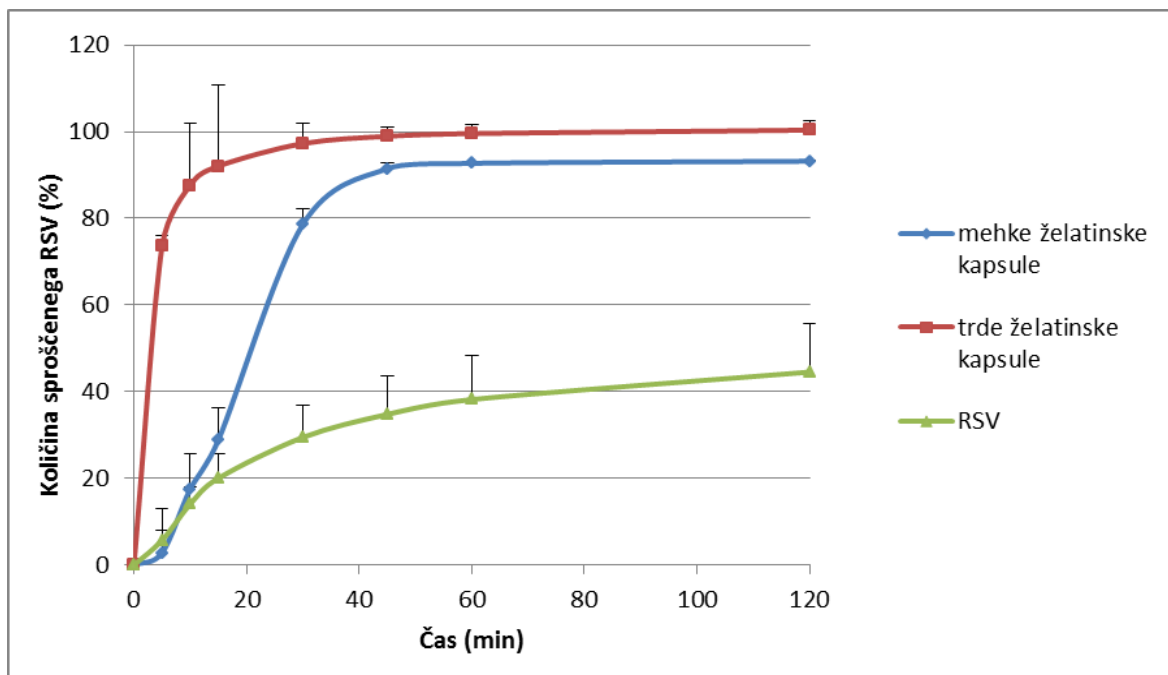
V mehke in trde želatinske kapsule (slika 19) smo polnili količino tekočega RSV-SMES, ki je ustrezala vsebnosti RSV-SMES v eni tableti (250,5 mg). Tako smo lahko primerjali količino sproščenega RSV iz samomikroemulgirajočih tablet s količino sproščenega RSV iz tekočega SMES-a.



**Slika 19:** Mehka želatinska kapsula (levo) in trda želatinska kapsula (desno).

Pri mehkih želatinskih kapsulah smo že med samim izvajanjem preskusa opazili, da ne razpadajo ustrezno. Še po dveh urah sproščanja smo v obeh medijih opazili plavajoče ostanke kapsul. Preskus sproščanja smo ponovili še z uporabo trdih želatinskih kapsul, ki so popolnoma razpadle kmalu (<15 min) po izpostavitvi mediju za raztapljanje. Rezultati sproščanja RSV iz SMES-a, polnjenega v mehke in trde želatinske kapsule, v pufru s pH 1,2, so prikazani na sliki 20. Le-te smo primerjali z raztapljanjem čistega RSV v prahu.

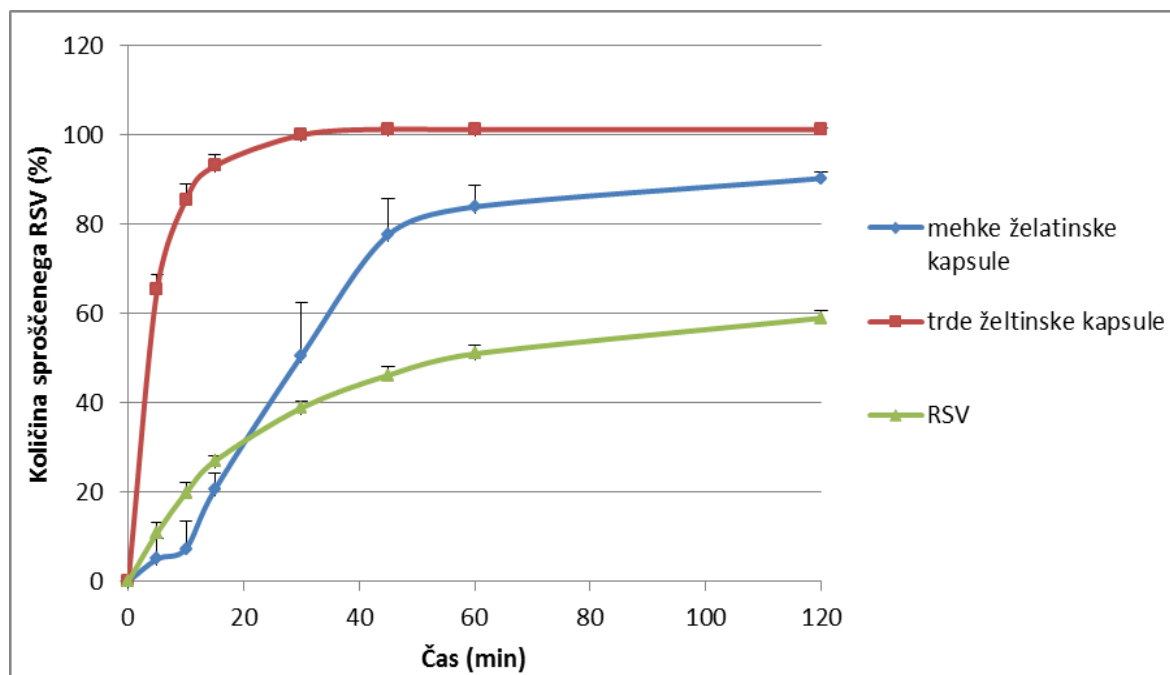
V kislem mediju se je ves RSV iz SMES-a polnjenega v trde želatinske kapsule sprostil že prej kot v eni uri. Nasprotno se je iz SMES-a polnjenega v mehke želatinske kapsule v eni uri sprostilo le ~90% RSV. Čisti RSV v prahu se v pufru s pH 1,2 raztaplja veliko počasneje, po dveh urah se je raztopilo le ~44%.



**Slika 20:** Primerjava profilov sproščanja RSV iz SMES-a polnjenega v mehke in trde želatinske kapsule. Medij za sproščanje: pufer s pH 1,2.

Preskus sproščanja RSV iz SMES-a v mehkih in trdih želatinskih kapsulah smo izvedli tudi v fosfatnem pufru s pH 6,8 (slika 21). Iz SMES-a, ki smo ga polnili v trde želatinske kapsule, se ves RSV sprosti že po 30 minutah. Iz SMES-a v mehkih želatinskih kapsulah pa se prav tako kot v kislem mediju (pH 1,2) v dveh urah sprosti manj RSV (~90%). Čisti RSV v prahu se v fosfatnem pufru raztaplja nekoliko hitreje kot v pufru s pH 1,2. Po dveh urah se raztopi okoli 60% RSV.

Lee in sodelavci so v svoji raziskavi dobili podoben rezultat sproščanja čistega RSV (v prahu) v pufru s pH 1,2. V dveh urah se je raztopilo približno 40% RSV. Rezultati so tudi pokazali, da se čisti RSV raztaplja hitreje v pufru s pH 4,5, kjer se je po dveh urah raztopilo ~55% RSV (74). Ugotovitve se skladajo z našimi rezultati, ki prav tako kažejo, da se čisti RSV v mediju z višjim pH bolje raztaplja.

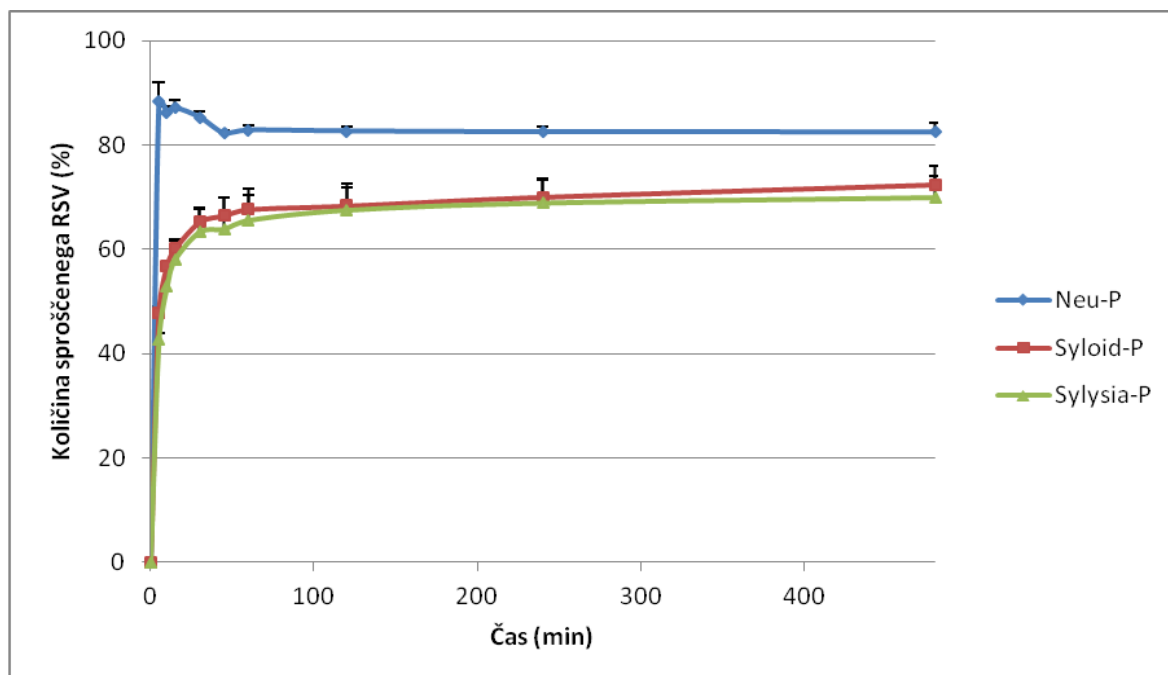


**Slika 21:** Primerjava profilov sproščanja RSV iz SMES-a polnjenega v mehke in trde želatinske kapsule. Medij za sproščanje: fosfatni pufer s pH 6,8.

Glede na to, da se iz SMES-a v trdih želatinskih kapsulah relativno hitro sprosti ves vanj vgrajen RSV, je bil razlog za manjšo količino sproščenega RSV iz SMES-a, v mehkih želatinskih kapsulah, najverjetneje v neustreznosti samih kapsul. Problemi raztapljanja mehkih želatinskih kapsul (ovojnice) lahko nastopijo zaradi staranja in so posledica navzkrižnega povezovanja želatine. Navzkrižno povezovanje želatine vodi v nastanek gumijastega, v vodi netopnega materiala. Tudi nepravilno shranjevanje kapsul lahko vodi v spremembo kvalitete ovojnice mehkih želatinskih kapsul. Kapsule, ki so izpostavljene vlagi lahko postanejo lepljive, mehke ali napihnjene (75,76). Glede na naše rezultate sklepamo, da mehke želatinske kapsule, ki smo jih uporabili, z vidika shranjevanja niso bile ustrezne. Profile sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov/tablet smo zato primerjali s profilom sproščanja RSV iz tekočega SMES-a, polnjenega v trde želatinske kapsule.

#### 4.6.2 Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih praškov

Tako v primeru samomikroemulgirajočih praškov kot tablet smo želeli v čim krajšem času doseči čim večjo količino sproščenega RSV. S preskusom sproščanja RSV iz izdelanih samomikroemulgirajočih praškov smo želeli ugotoviti, v kakšni meri adsorpcija na posamezni trdni nosilec vpliva na sproščanje RSV iz SMES-a.



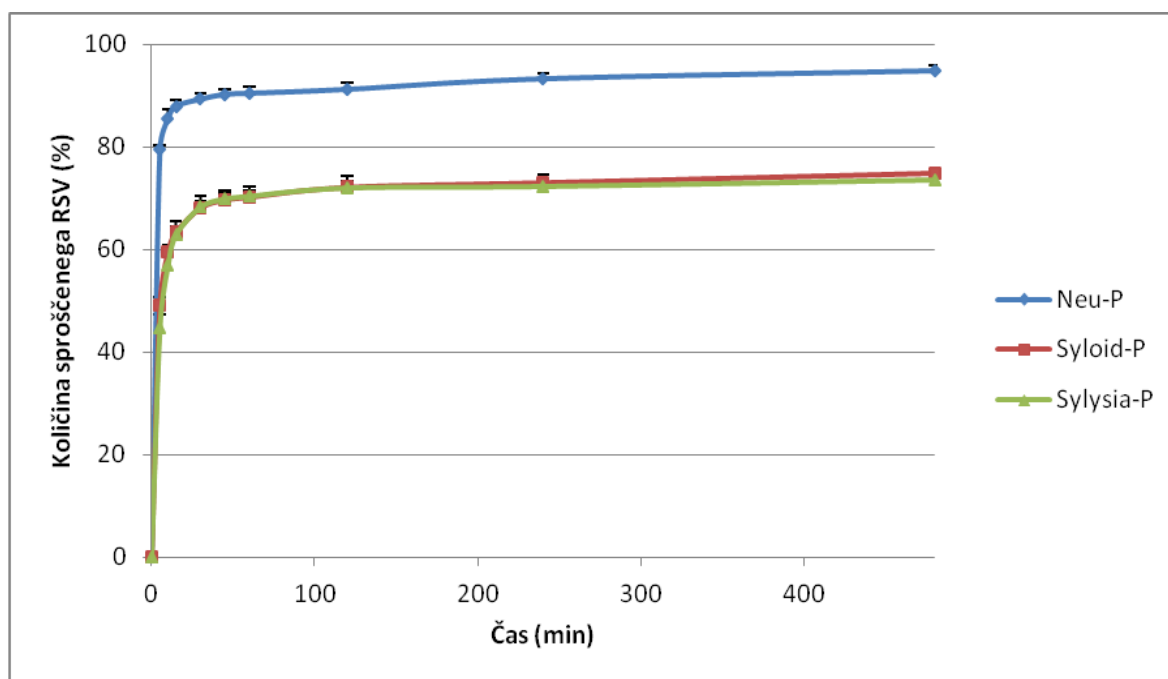
Slika 22: Profili sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov v pufru s pH 1,2.

Največ RSV se je v pufru s pH 1,2 sprostilo iz praška Neu-P. Že po prvih petih minutah sproščanja se je sprostilo več kot 80% RSV (slika 22). Iz praškov Syloid-P in Sylysia-P se je po eni uri sprostila približno enaka količina RSV (~70%). V vseh primerih se je količina sproščenega RSV z adsorpcijo na trdne nosilce zmanjšala v primerjavi s količino sproščenega RSV iz SMES-a polnjenega v trde želatinske kapsule. Tudi Raval in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili, da adsorpcija SES-a na trdni nosilec upočasni in zmanjša sproščanje ZU v kislem mediju. Kot trdni nosilec za adsorpcijo SES so uporabili Neusilin® US2 (77).

Opazili smo, da je bila količina sproščenega RSV iz Neu-P po prvih 15 minutah višja (~87%) kot po osmih urah sproščanja (~82%). Podobnega pojava v literaturi nismo

zasledili, rezultat pa bi bil lahko posledica adsorpcije emulgatorjev nazaj na nosilec in s tem izguba solubilizacijske kapacitete za RSV.

Pri preskusu sproščanja v fosfatnem pufru s pH 6,8 je bila količina sproščenega RSV iz Neu-P že po eni uri višja od 90% (slika 23). Iz praškov Syloid-P in Sylysia-P se je prav tako kot v pufru s pH 1,2 sprostilo manj RSV (~70%) kot iz SMES-a polnjenega v trde želatinske kapsule. Samomikroemulgirajoča praška Syloid-P in Sylysia-P sta oba vsebovala porozni amorfni silicijev dioksid, zato je bilo pričakovati primerljive rezultate sproščanja.



**Slika 23:** Profili sproščanja RSV iz samomikroemulgirajočih praškov v fosfatnem pufru s pH 6,8.

Adsorpcija RSV-SMES na trdne nosilce vpliva na sproščanje RSV, saj je bila v vseh primerih količina sproščenega RSV manjša od 100%. Kljub temu smo z adsorpcijo RSV-SMES na trdne nosilce v vseh primerih dosegli večjo količino sproščenega RSV kot pri raztapljanju čistega RSV v prahu.

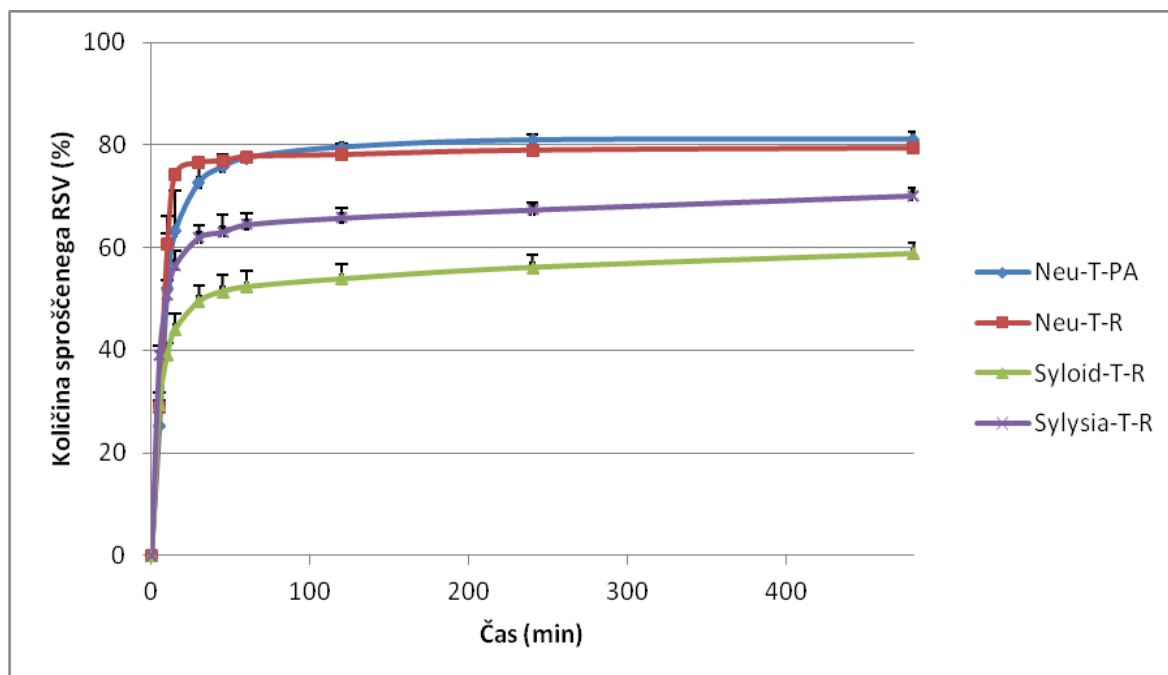
Največ RSV se je v obeh medijih sprostilo iz samomikroemulgirajočega praška, ki je kot trdni nosilec vseboval porozni magnezijev aluminometasilikat (Neu-P). Milovič in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili nasprotno, saj so hitrejše sproščanje ZU dosegli z

adsorpcijo SMES-a na porozni silicijev dioksid (Sylaysia<sup>®</sup>), medtem ko se je porozni magnezijev aluminometasilikat (Neusilin<sup>®</sup>) izkazal za slabši trdni nosilec (36). Sklepamo lahko, da tudi formulacija SMES-a in ZU pomembno vplivata na izbiro primerne trdnega nosilca za izdelavo samomikroemulgirajočega praška.

#### **4.6.3 Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih tablet**

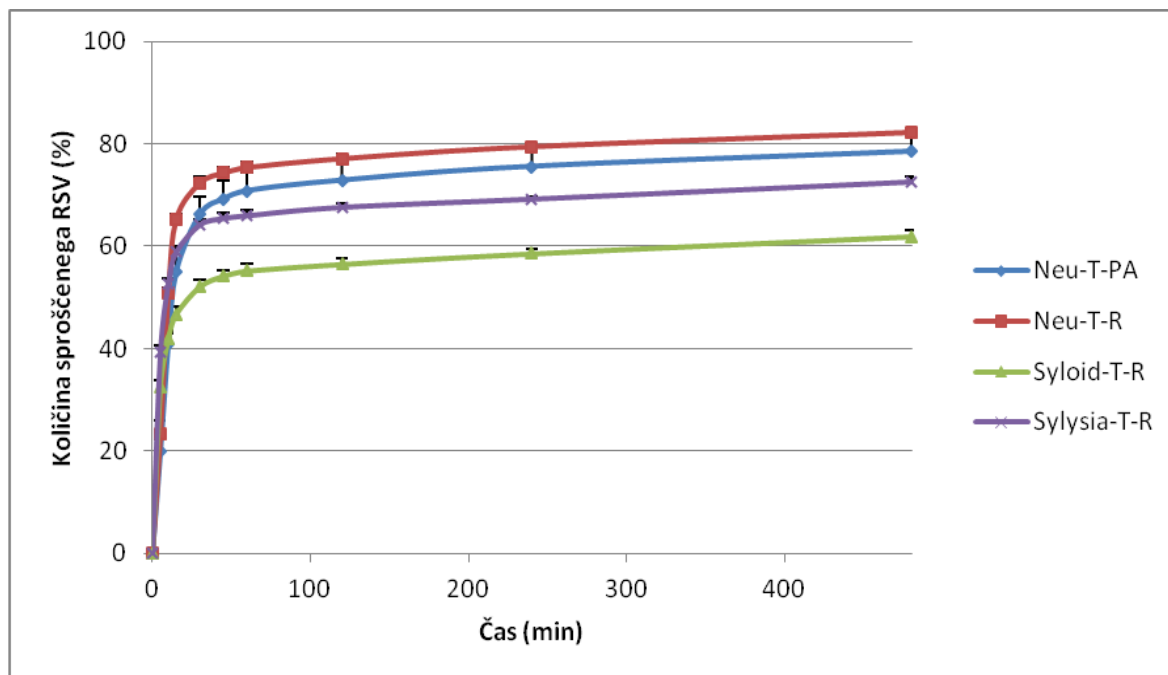
Preskus sproščanja smo izvedli za vse serije izdelanih samomikroemulgirajočih tablet. Preučili smo, v kolikšni meri stiskanje samomikroemulgirajočih prahov v tablete in dodatek pomožnih snovi za tabletiranje vpliva na sproščanje RSV. Ugotavljali smo tudi razlike v sproščanju RSV med posameznimi serijami izdelanih samomikroemulgirajočih tablet.

V pufru s pH 1,2 se je v osmih urah največ RSV sprostilo iz serij tablet Neu-T-PA in Neu-T-R (slika 24). Že po dveh urah se je sprostilo okoli 80% RSV. Iz tablet Sylaysia-T-R se je v osmih urah sprostilo okoli 70% RSV, medtem ko se je iz tablet Syloid-T-R sprostilo manj RSV, le 59%. V primerjavi s samomikroemulgirajočimi praški smo največjo razliko v sproščanju RSV opazili v primeru, ko smo kot trdni nosilec uporabili Syloid<sup>®</sup> 244FP. V tem primeru se je količina sproščenega RSV zmanjšala za nekaj več kot 10%, kar pomeni, da proces tabletiranja in/ali dodatek ostalih pomožnih snovi vpliva na sproščanje RSV. Pri ostalih serijah so bile razlike med sproščanjem RSV iz samomikroemulgirajočih praškov in tablet zanemarljive (1-2%).



**Slika 24:** Profili sproščanja RSV iz različnih serij samomikroemulgirajočih tablet. Medij za sproščanje: pufer s pH 1,2.

V fosfatnem pufru s pH 6,8 se je prav tako že po dveh urah največ RSV sprostil iz serij Neu-T-PA in Neu-T-R (~78%) (slika 25). Podobno kot v kislem mediju se je iz serije tablet Sylysia-T-R sprostil okoli 70 % RSV, iz tablet, ki so kot trdni nosilec vsebovale Syloid® 244FP (Syloid-T-R) pa manj, ~61% RSV. Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih tablet s posameznim trdnim nosilcem se v obeh medijih ni bistveno razlikovalo. V primerjavi s sproščanjem RSV iz samomikroemulgirajočih praškov v fosfatnem pufru s pH 6,8, se je količina sproščenega RSV zmanjšala pri serijah Neu-T-PA, Neu-T-R in Syloid-T-R. Proces tabletiranja in/ali dodatek ostalih pomožnih snovi v teh treh primerih vpliva na sproščanje RSV v fosfatnem pufru, saj se je količina sproščenega RSV zmanjšala za približno 10%. Sander in sodelavci so v svoji študiji prav tako ugotovili, da se z vgradnjo SMES-a v tablete zmanjša sproščanje ZU. Pri izdelavi samomikroemulgirajočih tablet so kot trdni nosilec uporabili Neusilin® US2. V primerjavi s sproščanjem ZU iz samomikroemulgirajočega praška pa se je z izdelavo tablet količina sproščene ZU zmanjšala za kar 25% (41).



**Slika 25:** Profili sproščanja RSV iz različnih serij samomikroemulgirajočih tablet. Medij za sproščanje: fosfatni pufer s pH 6,8.

Neusilin<sup>®</sup> US2 se je med testiranimi poroznimi nosilci, glede na naše rezultate sproščanja, izkazal za najprimernejši trdni nosilec za izdelavo samomikroemulgirajočih praškov in tablet z RSV.

## 5 SKLEP

Namen diplomskega dela je bila pretvorba tekočega SMES-a v samomikroemulgirajoči prašek in izdelava samomikroemulgirajočih tablet. Izmed različnih poroznih trdnih nosilcev smo glede na sposobnost adsorpcije SMES-a izbrali najučinkovitejše nosilce za nastanek praškaste zmesi. Z dodajanjem različnih pomožnih snovi, potrebnih za izdelavo tablet s samomikroemulgirajočim praškom, smo ugotavljali primerno formulacijo zmesi za tabletiranje. Z direktnim tabletiranjem omenjenih zmesi smo izdelali samomikroemulgirajoče tablete, ki smo jih nato še ovrednotili.

Pri svojem delu smo ugotovili sledeče:

- Porozni silicijev dioksid Syloid<sup>®</sup> 244FP in Sylysia<sup>®</sup> 350 sta imela najboljše sposobnosti za adsorpcijo RSV-SMES. Ugotovili smo, da je bila v primerjavi z ostalimi preizkušenimi trdnimi nosilci za nastanek samomikroemulgirajočega praška potrebna manjša količina izbranih trdnih nosilcev (~675 mg/g SMES-a). Nasprotno se je Syloid<sup>®</sup> AL-1FP izkazal kot najmanj učinkovit trdni nosilec za adsorpcijo RSV-SMES, saj je bila za nastanek samomikroemulgirajočega praška potrebna veliko večja količina trdnega nosilca (> 3000 mg/g SMES-a). Za nadaljnjo izdelavo tablet smo izbrali dva izmed poroznih amorfnih silicijevih dioksidov (Sylysia<sup>®</sup> 350 in Sylod<sup>®</sup> 244FP) in porozni magnezijev aluminometasilikat Neusilin<sup>®</sup> US2.
- Razmerje posameznega trdnega nosilca glede na SMES smo povečali, ker smo pri preizkušanju različnih formulacij zmesi za tabletiranje ugotovili, da je le-ta kljub dodatku ostalih pomožnih snovi še vedno preveč lepljiva. Izdelane tablete pa so bile premehke. Pri uporabi zmesi izbranega trdnega nosilca in RSV-SMES v razmerju 1:1 smo v vseh treh primerih lahko izdelali tablete.
- Z ročnim vrtenjem kolesa smo izdelali samomikroemulgirajoče tablete iz vseh treh izbranih formulacij zmesi za tabletiranje. S polavtomatskim stiskanjem nam je uspelo izdelati tablete le s formulacijo zmesi za tabletiranje, kjer smo kot trdni nosilec uporabili Neusilin<sup>®</sup> US2. Zmesi za tabletiranje s poroznim silicijevim

dioksidom (Sylysia® 350 in Syloid® 244 FP) nista primerni za polavtomatsko stiskanje v tablete, saj so se le-te razslojevale oz. je prišlo do t.i. pojava kopic.

- Največjo trdnost so imele tablete z Neusilinom® US2 kot trdnim nosilcem, ki smo jih stiskali z ročnim vrtenjem kolesa (~95N). Večja trdnost tablet Neu-T-R je vplivala na njihovo razpadnost, saj je bil čas razpadnosti najdaljši v primerjavi z ostalimi serijami, a še vedno ustrezen, glede na farmakopejski predpis za neobložene tablete (< 15 min). Tablete iz ostalih treh serij, ki so imele tudi nižjo trdnost so razpadle v zelo kratkem času (< 4 min).
- Z vgradnjo tekočega SMES-a v samomikroemulgirajoče praške in tablete ohranimo samomikroemulgirajoči učinek. Velikost kapljic disperzij nastalih iz samomikroemulgirajočih praškov in tablet, pa se poveča v primerjavi z velikostjo kapljic disperzij nastalih iz tekočega SMES-a.
- Pri opazovanju morfoloških lastnosti izdelanih samomikroemulgirajočih praškov pod vrstičnim elektronskim mikroskopom smo največje razlike ugotovili v površini trdnega nosilca po adsorpciji RSV-SMES na Neusilin® US2. Na posameznih granulah smo opazili adsorbirane skupke delcev, za katere predvidevamo, da predstavljajo RSV-SMES s posameznimi praškastimi delci.
- Pri testiranju sproščanja RSV smo ugotovili naslednje:
  - Iz RSV-SMES polnjenih v trde želatinske kapsule se že prej kot v eni uri v obeh medijih sprosti ves RSV;
  - V obeh medijih se največ RSV sprosti iz samomikroemulgirajočega praška, ki je kot trdni nosilec vseboval Neusilin® US2. Že po prvih 10 min sproščanja se sprosti več kot 85% RSV. Adsorpcija RSV-SMES na trdne nosilce zmanjša količino sproščenega RSV iz SMES-a, ki pa je v primerjavi z raztapljanjem čistega RSV še vedno znatno večja.
  - Po stiskanju samomikroemulgirajočih praškov v tablete se zmanjša količina sproščenega RSV in hitrost sproščanja RSV se upočasni.
  - S primerjavo profilov sproščanja RSV iz različnih serij tablet smo ugotovili, da se v obeh medijih največ RSV sprosti iz tablet, ki so kot trdni nosilec vsebovale

Neusilin<sup>®</sup> US2 (Neu-T-R in Neu-T-PA) in sicer ~80%. Način stiskanja (ročno ali polavtomatsko) v teh dveh primerih bistveno ne vpliva na sproščanje RSV iz tablet.

Med izbranimi trdnimi poroznimi nosilci se je za adsorpcijo SMES-a in nadaljnjo izdelavo samomikroemulgirajočih tablet, glede na zmožnost tabletiranja (tudi polavtomatsko), trdnost in izgled tablet, velikost kapljic disperzij, sproščanje RSV iz praškov in tablet, za najbolj primerne izkazal porozni magnezijev aluminometasilikat–Neusilin<sup>®</sup> US2. V nadaljnjih raziskavah bi bila potrebna še nadaljnja optimizacija samomikroemulgirajočih praškov/tablet, da bi te FO v prihodnosti na tržišču nadomestile tekoče SMES-e polnjene v želatinske kapsule.

## 6 LITERATURA

1. Kovačič B: Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011: 28-33
2. Mersny RJ: Oral drug delivery research in Europe. *J Control Release* 2012; 161(2): 247-253
3. Dahan A, Hoffman A: Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an *in vitro* dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J Control Release* 2008; 129: 1-10
4. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S: Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int J Pharm* 2011; 420: 1-10
5. Wu CY, Benet LZ: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System. *Pharm Res* 2005; 22 (1): 11-23
6. Parmar B, Patel U, Bhimani B, Sanghavi K, Patel G, Daslaniya D: SMEDDS: A Dominant Dosage Form Which Improve Bioavailability. *American J Pharm Tech Res* 2012; 2(4): 54-72
7. Juan ME, Alfaras I, Planas JM: Colorectal cancer chemoprevention by *trans*-resveratrol. *Pharmacol Res* 2012; 65: 584-591
8. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012; 158: 182-193
9. Nakata R, Takahashi S, Inoue H: Recent Advances in the Study on Resveratrol. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(3): 273-279
10. de la Lastra CA, Villegas I: Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49, 405-430
11. Baur JA, Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-506
12. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M: Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res* 2012; 750(1): 60-82
13. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T: Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 2008; 658: 68-94
14. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramović Z, Šentjerc M: Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 73: 253-259

15. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL: Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224(3): 274-283
16. Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ: New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opin Drug Del* 2011; 8(8): 973-990
17. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farm Vestn* 2006; 57: 24-29
18. Lunder M, Žiberna L: Mehanizmi zaščitnega delovanja rdečega vina pri preprečevanju razvoja ateroskleroze. *Med Razgl* 2009; 48: 339-351
19. Stojanović S, Sprinz H, Brede O: Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of *trans*-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. *Arch Biochem Biophys* 2001; 391(1): 79-89
20. Yu W, Fu YC, Wang W: Cellular and Molecular Effects of Resveratrol in Health and Disease. *J Cell Biochem* 2012; 113: 752-759
21. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Med Razgl* 2006; 45: 141-153
22. Teskač Plajnshek K: Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odgovorom. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana 2011: 47-50
23. Perviaz S: Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003; 17: 1975-1985
24. Pouton CW, Porter CJH: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliver Rev* 2008; 60: 625-637
25. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin, *Farm vestn* 2008; 59: 263-268
26. Zvonar A: Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednostenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana 2010: 1-42
27. Kyatanwar AU, Jadhav KR, Kadam VJ: Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): Review. *J Pharm Res* 2010; 3(1): 75-83
28. Rahman MA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Igbal Z: Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDSS/SMEDDS). *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 39(1): 1-19
29. Farmacevtski terminološki slovar. Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU, 2011.

30. Patel PA, Chaulang GM, Akolkotkar A, Mutha SS, Hardikar SR, Bhosale AV: Self Emulsifying Drug Delivery System: A Review. *Res J Pharm Tech* 2008; 1(4): 313-323
31. Mohanrao BM, Sundar PS, Nagsen S: Preparation and characterization of solid self microemulsifying drug delivery system by adsorbent technique to improve dissolution profile of poorly aqueous soluble drug ramipril. *Int Res J Pharm* 2011; 2(6): 85-90
32. Desai PP, Date AA, Patravale VB: Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations - opportunities and limitations. *Drug Discov Today Technol* 2012; 9(2): 87-95
33. Vaje iz fizikalne farmacije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2004
34. Mallikarjun V, Rajesh Babu V: Recent trends in development of solid-self emulsifying drug delivery (S-SEDDS) systems: An overview. *Int Res J Pharm* 2(6); 2011: 18-22
35. Tang B, Cheng G, Gu JC, Xu CH: Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discov Today* 2008; 13: 606-612
36. Milović M, Djuriš J, Djekić L, Vasiljević D, Ibrić S: Characterization and evaluation of solid-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int J Pharm* 2012; 436 (1-2): 58-65
37. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D: Approaches for the developement of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(6):734-746
38. Elektronski vir:  
[http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji\\_Neusilin.pdf](http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusilin.pdf)  
( Dostop: 3.10.2012)
39. Elektronski vir: <http://www.neusilin.com/product/> (Dostop: 3.10.2012)
40. Mura P, Valleri M, Cirri M, Mennini N: New solid self-microemulsifying systems to enhance dissolution rate of poorly water soluble drugs. *Pharm Dev Tech* 2012; 17(3): 277-84
41. Sander C, Holm P: Porous Magnesium Aluminometasilicate Tablets as Carrier of a Cyclosporine Self-Emulsifyin Formulation. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009; 10(4): 1388-1395.
42. Planinšek O, Kovačič B, Vrečar F: Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica, *Int J Pharm* 2011; 406: 41-48
43. Elektronski vir:  
[http://www.fuji-silysia.co.jp/english/product/micronized\\_silica/sylaysia.html](http://www.fuji-silysia.co.jp/english/product/micronized_silica/sylaysia.html)  
(Dostop: 6.9.2012)
44. Elektronski vir: <http://www.alpha-alpen.com/new%20grade%20list.pdf>  
(Dostop: 6.9.2012)

45. Elektronski vir:  
[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/B561\\_SYLOID\\_US\\_ver\\_FINAL.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/B561_SYLOID_US_ver_FINAL.pdf) (Dostop: 28.9.2012)
46. Elektronski vir:  
<http://www.bioresearchonline.com/doc.mvc/syloid-fp-silicas-in-pharmaceutical-film-coatings-0001> (Dostop: 28.9.2012)
47. Elektronski vir:  
[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M405\\_Syloid\\_OilAdsorption\\_AppNote\\_EU\\_Rev03.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M405_Syloid_OilAdsorption_AppNote_EU_Rev03.pdf) (Dostop: 29.9.2012)
48. Ferlan A, Vrečar F: Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin/Methods for amorphization of drugs, *FarmVestn* 2004; 55: 11-21
49. Aulton ME: *Aulton's Pharmaceutics, The design and manufacture of medicines*, 3rd Ed, 2007: 432-482
50. Li Y, Han J, Zhang GG, Grant DJ, Suryanarayanan R: In situ dehydration of carbamazepine dihydrate: a novel technique to prepare amorphous anhydrous carbamazepine. *Pharm Dev Technol* 2000; 5(2): 257-266
51. Yi T, Wan J, Xu H, Yang X: A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 439-444
52. Tuleu C, Newton M, Rose J, Euler D, Saklatvala R, Clarke A, Booth S: Comparative bioavailability study in dogs of a self-emulsifying formulation of progesterone presented in a pellet and liquid form compared with an aqueous suspension of progesterone. *J Pharm Sci* 2004; 93(6): 1495-1502
53. Wang Z, Sun J, Wang Y, Liu X, Liu Y, Fu Q, Meng P, He Z: Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation. *Int J Pharm* 2010; 383: 1-6
54. Abdalla A, Mäder K: Preparation and characterization of self-emulsifying pellet formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66(2): 220-226
55. Homar M, Gašperlin M, Kerč J: Tehnologije s talinami. *Farm Vestn* 2003; 54 : 697-703
56. Zvonar A, Gašperlin M: Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farm Vestn* 2011; 62(3): 131-138
57. Homar M, Šuligoj D, Gašperlin M: Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method. *J Microencapsul* 2007; 24(1): 72-81
58. Zvonar A, Bolko K, Gašperlin M: Microencapsulation of self-microemulsifying systems: Optimization of shell-formation phase and hardening process. *Int J Pharm* 2012; 437: 294-302

59. Rajesh BV, Reddy TK, Srikanth G, Mallikarjun V, Nivethithai P: Lipid based self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly water-soluble drugs: A review. *J Global Pharma Technol* 2010; 2 (3): 47-55
60. Marchoud D, Hughes S: Solid dosage forms from self-emulsifying lipidic formulations, *Pharmaceut Technol Eur* 2008: 46-49
61. *Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Europski farmakopeji 3.0*, Ministrstvo za zdravje, Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke 2011: 142-144
62. Parmar J, Rane M: Tablet Formulation Design And Manufacture: Oral Immediate Release Application. *Pharma Times* 2009; 41 (4): 21-29
63. Izdelava tablet. Interno gradivo za vaje pri predmetu Farmacevtska tehnologija I. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006.
64. Elektronski vir: <http://www.abiteccorp.com/product-lines/capmul> (Dostop: 15.10.2012)
65. Kastelic N: Razvoj samomikroemulgirajočih sistemov z resveratrolom. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
66. Elektronski vir: <http://www.unipex.fr/en/products/pharmaceuticals/excipients/liquides-emulsifiants.php> (Dostop: 15.10.2012)
67. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6<sup>th</sup> ed. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association, London 2009: 126-127, 129-133, 196-198, 206-207, 404-406, 542-549.
68. Elektronski vir:  
[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M318\\_Syloid244FP\\_EU.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M318_Syloid244FP_EU.pdf) (Dostop: 16.10.2012)
69. Elektronski vir:  
[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M316\\_Syloid\\_AL1FP.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M316_Syloid_AL1FP.pdf) (Dostop: 16.10.2012)
70. Samardžija Z: Osnove metod SEM in AFM za preiskave površin. *Vakuumist* 2004; 24(1/2): 4-12
71. Zhao X, Zhou YQ, Potharaju S, Lou H, Sun HM, Brunson E, Almoazen H, Johnson J: Development of a self micro-emulsifying tablet of cyclosporine- a by the liquisolid compact technique. *IJPSR* 2011; 2(9): 2299-2308
72. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003; 36(1): 79-87
73. Šantl M: Vpliv načina aglomeriranja trdnih delcev na proces stiskanja in lastnosti tablet. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 65

- 
74. Lee CW, Yen FL, Huang HW, Wu TH, Ko HH, Tzeng WS, Lin CC: Resveratrol Nanoparticle System Improves Dissolution Properties and Enhances the Hepatoprotective Effect of Resveratrol through Antioxidant and Anti-Inflammatory Pathways. *J Agric Food Chem* 2012; 60(18):4662-4671.
  75. Singh S, Rao KVR, Venugopal K, Manikandan R: Alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin-Containing Formulations. A Review of the Problem, Test Methods, and Solutions. *Pharm Technol* 2002: 36-58
  76. Elektronski vir: <http://www.hnherbs.com/SoftGel.pdf> (Dostop: 3.12.2012)
  77. Raval C, Joshi N, Patel J, Upadhyay UM: Enhanced oral bioavailability of olmesartan by using novel solid self emulsifying drug delivery system. *Int J Adv Pharm* 2012; 2(2): 82-92