

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



ZALA ŠETINA

***IN VITRO* VREDNOTENJE SPROŠČANJA RESVERATROLA IZ TRDNIH
SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMOV**

***IN VITRO* EVALUATION OF RESVERATROL RELEASE FROM SOLID
SELMICROEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS**

Ljubljana, 2013

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

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in delovni mentorici Katarini Bolko, mag. farm. za številne strokovne nasvete, potrpežljivost in dostopnost pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se doc. dr. Alenki Zvonar za pomoč pri DSC analizi ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnem delu. Hvala tudi asist. Janji Trček, mag. farm. za pomoč pri statistični interpretaciji rezultatov.

Hvala vsem kolegicam, ki so mi polepšale študijska leta.

Iskrena hvala staršem, ki so mi omogočili študij, me podpirali in v teh letih niso obupali nad mano. Hvala ti Blaž za podporo, razumevanje in da si vedno ob meni.

IZJAVA

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

Ljubljana, 2013

Zala Šetina

Diplomska komisija:

Predsednik: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

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

Članica: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI.....	1
1.2 SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI	3
1.3 TRDNI SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI.....	4
1.4 RESVERATROL.....	9
1.4.1 Učinki resveratrola	10
2 NAMEN DELA	13
3 EKSPERIMENTALNO DELO	14
3.1 MATERIALI	14
3.2 NAPRAVE.....	19
3.3 METODE.....	20
3.2.1 Izdelava (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama	20
3.2.2 Priprava samomikroemulgirajočega sistema	20
3.2.3 Pretvorba tekočega samomikroemulgirajočega sistema v trdno obliko	21
3.2.4 Tabletiranje.....	22
3.2.5 Merjenje velikosti kapljic disperzij	23
3.2.6 <i>In vitro</i> sproščanje resveratrola	24
3.2.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	26

3.2.8	Obdelava podatkov in statistična analiza.....	28
3.2.9	Ugotavljanje kinetike sproščanja resveratrola.....	29
3.2.10	Diferenčna dinamična kalorimetrija	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	(PSEVDO)TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM.....	32
4.2	VREDNOTENJE SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH LASTNOSTI.....	33
4.3	REZULTATI <i>IN VITRO</i> SPROŠČANJA RESVERATROLA	37
4.3.1	Sproščanje RSV iz SMES praškov	37
4.3.2	Sproščanje RSV iz SMES tablet.....	39
4.4	STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV SPROŠČANJ.....	41
4.4.1	Testiranje razlik med rezultati sproščanj praškov in tablet	42
4.4.2	Testiranje razlik med rezultati sproščanj v različnih pufrih	43
4.4.3	Testiranje razlik rezultatov sproščanj med vzorci nosilcev.....	43
4.5	KINETIKA SPROŠČANJA RESVERATROLA.....	46
4.6	DIFERENČNA DINAMIČNA ANALIZA (DSC).....	49
5	SKLEPI.....	53
6	LITERATURA	55

POVZETEK

Najpogostejši ter najbolj zaželen vnos zdravilnih učinkovin (ZU) je peroralna aplikacija. Ta pa je problematična predvsem za slabo vodotopne učinkovine, saj izkazujejo nizko biološko uporabnost. Eden izmed tehnoloških pristopov za izboljšanje raztapljanja ZU je vgradnja v samomikroemulgirajoči sistem (SMES). Ti so po definiciji brezvodne izotropne zmesi lipidov, emulgatorjev, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in ZU, ki v stiku z vodnim medijem *in vivo* ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi. Ker je večina sestavin SMES pri sobni temperaturi v tekočem ali poltrdnem agregatnem stanju, jih najpogosteje polnijo v želatinaste kapsule. Takšne farmacevtske oblike imajo mnoge slabosti. Problematici so predvsem visoki proizvodni stroški, nizka stabilnost ter nekompatibilnost SMES-a z ovojnico kapsul. Zato so zadnja leta številne raziskave usmerjene v razvoj trdnih SMES formulacij. Tako združimo prednosti lipidnih dostavnih sistemov, predvsem povečano topnost in biološko uporabnost, s prednostmi trdnih farmacevtskih oblik, kot so nizki proizvodni stroški, enostavnejša izdelava, večja stabilnost in ponovljivost ter predvsem boljša komplanca pacientov.

V diplomskem delu smo slabo vodotopno učinkovino resveratrol (RSV) vgradili v tekoči SMES. Z adsorpcijo na trdne porozne nosilce, smo z mešanjem v pateni dobili SMES praške. Pri delu smo uporabili različne nosilce, ki so se med seboj razlikovali po sestavi ter obliki delcev, velikosti por in sposobnosti adsorpcije olj: porozni magnezijev aluminometasilikat (Neusilin[®] US2) in dve obliki poroznega amorfnega silicijevega dioksida (Syloid[®] 244FP in Sylysia[®] 350). SMES praškom smo dodali pomožne snovi za tabletiranje: suhi vezivi (Avicel[®] PH102 in Kollidon[®] VA64), razgrajevalo (Ac-Di-Sol[®]) in drsilo (magnezijev stearat) ter z metodo direktnega tabletiranja stisnili tablete.

Tako izdelanim trdnim formulacijam smo preverili sposobnost ohranjanja samomikroemulgiranja z merjenjem velikosti kapljic nastalih disperzij v HCl pufri s pH 1,2 in fosfatnem pufri s pH 6,8, ki simulirata fiziološke pogoje. Vse trdne SMES formulacije so po dispergiranju vsebovale večje kapljice kot disperzija tekočega SMES-a, a so še vedno bile manjše od 100 nm, kar je po definiciji zahteva za mikroemulzije.

S preskusom sproščanja RSV iz trdnih formulacij smo ugotavljali, ali adsorpcija na trdne nosilce vpliva na količino sproščene učinkovine. Preskus smo izvajali v dveh medijih

(pufri s pH 1,2 in pufri pH 6,8). Rezultati dokazujejo, da se po adsorpciji na nosilce ne sprosti celotna količina RSV, ki je bila vgrajena v SMES. Med testiranimi trdnimi SMES-i smo največjo količino sproščenega RSV dosegli s formulacijami, ki so kot nosilec vsebovale Neusilin[®] US2. S statističnim ovrednotenjem smo preverili signifikantnost razlik med rezultati sproščanj ZU iz različnih formulacij. Statistične razlike med sproščanjem iz praškov in tablet smo opazili pri vzorcih Neusilin-R in Syloid-R (v obeh medijih) ter Neusilin-T (pri pH 6,8). S primerjavo razlik med serijami tablet smo signifikantne razlike opazili pri vseh serijah tablet, z izjemo Neusilin-T in Neusilin-R v pufri s pH 6,8. Nato smo preverjali ujemanje rezultatov sproščanj z modeli, ki opisujejo različne kinetike sproščanj (0. red, 1. red, Hixson-Crowell, Higuchi, Korsmeyer-Peppas) in ugotovili, da je mehanizem sproščanja RSV iz SMES praškov in tablet difuzijsko pogojen. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo posneli termograme učinkovine ter tekočih in trdnih formulacij z in brez RSV. V termogramih trdnih in tekočih formulacij nismo opazili endogenega vrha, ki predstavlja ponovno kristalizacijo RSV, zato lahko predpostavimo, da ne pride do rekristalizacije učinkovine po adsorpciji na trdne nosilce ter nadaljnjem tabletiranju.

Rezultati diplomskega dela potrjujejo, da pretvorba SMES-a v trdno obliko zmanjša količino sproščene učinkovine. Na nepopolno desorpcijo RSV vplivajo lastnosti nosilcev, predvsem afiniteta do vezave površinsko aktivnih snovi (PAS). Slednja vpliva na manjši delež sproščenih PAS v disperziji in posledično na večjo velikost kapljic v njej. Ker je RSV bolj topen v PAS kot v oljni fazi, tako ostane nekaj učinkovine vezane na nosilcu. Med preizkušenimi nosilci se je za najbolj primerne izkazal Neusilin[®] US2, saj ima najmanjši vpliv na sproščanje učinkovine iz trdnih formulacij.

Ključne besede: resveratrol, samomikroemulgirajoči sistem, samomikroemulgirajoči praški, samomikroemulgirajoče tablete, sproščanje resveratrola.

ABSTRACT

The most common and the most desirable route of administration for the drug substance is oral application. This, however, poses a problem for poorly water-soluble substances, since they have low bioavailability for the oral mode of application. One technological approach for improving solubility is the use of selfmicroemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). These are, by definition, anhydrous isotropic mixtures of lipids, surfactants, one or more hydrophilic solvents or co-emulsifiers and the drug substance that quickly and spontaneously form an oil-in-water microemulsion when they come into contact with an aqueous medium and are stirred gently. Since at room temperature most of the components are in a liquid or semi-solid aggregate state, they are most frequently filled into gelatin capsules. There are many disadvantages to such dosage forms. The main problems are high production costs, low stability and incompatibility of SMEDDS with capsule shells. Therefore, in recent years a number of studies have focused on developing solid SMEDDS formulations. Thus, we combine the advantages of lipid delivery systems, especially increased solubility and bioavailability, with the advantages of solid pharmaceutical forms, that is, low production costs, simpler production, greater stability and reproducibility, and, primarily, better patient compliance.

For this diploma thesis we incorporated the poorly water-soluble active ingredient resveratrol (RSV) with the liquid SMEDDS. Through adsorption onto solid porous carriers, we produced SMEDDS powders by means of a pestle and mortar. We used various carriers, which differed from each other in terms of the composition and form of particles, pore size, and the oil adsorption capacity: porous magnesium aluminometasilicate (Neusilin[®] US2) and two types of porous amorphous silicon dioxide (Syloid[®] 244FP and Sylysia[®] 350). We added excipients to the SMEDDS powders: dry binders (Avicel[®] PH102 and Kollidon[®] VA64), disintegrator (Ac-Di-Sol[®]) and the lubricant (magnesium stearate), and made tablets by the direct compression method.

We tested the solid formulations for the capacity to maintain self-microemulsifying by measuring the droplet size of the resulting dispersions in pH 1.2 buffer and in pH 6.8 phosphate buffer. After dispersion, all solid SMEDDS formulations contained larger droplets than the dispersion of the liquid SMEDDS did, though they were still smaller than 100 nm.

Through the dissolution test of RSV from solid formulations we determined whether adsorption onto solid carriers affects substance release. We carried out the test in two media (a 1.2 pH buffer and a 6.8 buffer). The results showed that after adsorption onto the carriers the entire amount of RSV was not released from the solid SMEDDS. Among the tested solid SMEDDS, we achieved the maximum amount of released RSV with formulations that contained Neusilin[®] US2 as a carrier. By means of statistical evaluation we tested the significant difference between the results of drug substance released from various formulations. We then tested the correlation of release results with models that describe various release kinetics (Zero Order, First Order, Hixson-Crowell, Higuchi, Korsmeyer-Peppas) and determined that the procession of diffusion most affects the release of RSV from SMEDDS powders and tablets. We recorded by Differential Scanning Calorimetry the thermograms of the substance as well as of the liquid and solid formulations with and without RSV. In the thermograms for the solid and liquid formulations we did not observe endogenous peak, which represents the recrystallization of RSV. We can therefore assume that there is no recrystallization of substance after adsorption onto the solid carriers and after the subsequent tableting.

The results of this diploma thesis confirm that converting SMEDDS formulations into a solid form decrease the amount of substance released. The incomplete desorption of RSV is affected by the properties of the carriers, particularly by the surfactants binding affinity. The latter affects a small proportion of released surfactants in dispersion and, consequently, the greater the size of droplets in it. Since RSV is more soluble in PAS than it is in the oil phase, some substance remains bound to the carrier. Among the carriers tested, Neusilin[®] US2 proved to be the most reliable, since it had the least impact on the release of the substance from solid formulations.

Key words: resveratrol, selfmicroemulsifying drug delivery systems, SMEDDS powders, SMEDDS tablets, resveratrol release.

SEZNAM OKRAJŠAV

DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. <i>Differential scanning calorimetry</i>)
dv-TG	dolgoverižni trigliceridi
FO	farmacevtska oblika
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje (ang. <i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High performance liquid cromatography</i>)
LMWH	heparin z nizko molekulsko maso (ang. <i>Low molecular weight heparin</i>)
m/m	masni odstotek
o/v	olje v vodi
PAS	površinsko aktivna/(e) snov/(i)
PDI	polidisperzni indeks (angl. <i>Polydispersity Index</i>)
P-gp	P-glikoprotein
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja (lat. <i>Europhean Pharmacopoeia</i>)
ROS	reaktivni kisikovi radikali (ang. <i>Reactive oxygen species</i>)
RSV	resveratrol
SD	standardni odklon
sdv-TG	srednjedolgoverižni trigliceridi
SES	samoemulgirajoči sistem
SMES+RSV	samomikroemulgirajoči sistem z vgrajenim resveratrolom
SMES	samomikroemulgirajoči sistem
USP	Ameriška farmakopeja (angl. <i>The United States Pharmacopoeia</i>)
v/o	voda v olju
ZU	zdravilna učinkovina

1 UVOD

V zadnjem času se povečuje število slabo vodotopnih učinkovin, ki imajo posledično nizko biološko uporabnost po peroralnem vnosu. Ker je peroralna aplikacija še vedno najbolj zaželeno dostavna pot za zdravljenje kroničnih obolenj, je razvoj peroralnih farmacevtskih oblik pomemben za uspeh novih zdravilnih učinkovin (ZU) (1).

Slabo vodotopne in dobro permeabilne ZU po biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo med učinkovine razreda II (2). Absorpcija takih ZU je nadzorovana predvsem z raztapljanjem v prebavnem traktu. Izboljšanje topnosti lahko tako pomembno poveča njihovo biološko uporabnost. S pravilnim razvojem formulacije lahko vplivamo na proces raztapljanja in tako izboljšamo biološko uporabnost ZU. V ta namen lahko uporabimo različne pristope, kot so na primer zmanjševanje velikosti delcev, izdelava nanodelcev, nanosuspenzij, mikrokapsul in trdnih disperzij ter podobno (3–5). Omenjeni pristopi niso vedno učinkoviti, zato se v zadnjih letih veliko pozornosti namenja tudi formulacijam, ki so osnovane na lipidih.

1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Na lipidih osnovani sistemi so lahko raztopine enostavnih oljnih faz ali različne kompleksnejše sestave različnih olj z emulgatorji, koemulgatorji in sotopili (2). Zdravilna učinkovina, raztopljena v na lipidih osnovanih sistemih, ostane v raztopljenem stanju celoten čas prehoda skozi prebavni trakt. S tem se izognemo procesu raztapljanja, ki je omejujoči dejavnik pri absorpciji slabo vodotopnih ZU. Po dispergiranju lipidnih formulacij v prebavnih sokovih nastane emulzija, poveča se medfazna površina, na kateri se učinkovina porazdeljuje med oljnimi kapljicami in vodno fazo, iz katere poteka absorpcija (2). Rezultat je višja, enakomernejša in bolj ponovljiva biološka uporabnost. Poleg tega lahko na lipidih osnovani sistemi vplivajo na obseg absorpcije učinkovine tudi z inhibicijo enterocitnega sekretornega prenašalca P-glikoproteina (P-gp) ter inhibicijo predsistemskega metabolizma v steni prebavnega trakta (inhibicija encima citokroma P450). Lipidi lahko povečajo tudi obseg absorpcije ZU v limfni obtok, s čimer se le-ta izogne metabolizmu prvega prehoda skozi jetra. Prav tako prisotnost lipidov vpliva na podaljšanje časa prehoda učinkovine skozi gastrointestinalni trakt in stabilnost slednje v letem, saj lahko lipidne kapljice vgrajeno učinkovino zaščitijo pred razgradnjo (6).

Peroralni na lipidih osnovani sistemi za dostavo ZU so lahko sestavljeni iz različnih oljnih raztopin, površinsko aktivnih snovi (PAS) in sotopil. Raznolikost sestave lipidnih sistemov otežuje primerjavo na lipidih osnovanih formulacij med seboj ter z ostalimi dostavnimi sistemi. Pouton je zato leta 2000 razvil in objavil klasifikacijski sistem za razlikovanje med različnimi sestavami na lipidih osnovanih sistemov. Originalna klasifikacija je definirala tri razrede, četrti je bil dodan leta 2006 (6,7). Razredi so predstavljeni v preglednici I.

Preglednica I: Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov; sestava in značilnosti posameznih sistemov; HLB (hidrofilno-lipofilno ravnotežje), SES (samoemulgirajoči sistem), SMES (samomikroemulgirajoči sistem). Povzeto po (2,7).

	Razred I	Razred II	Razred IIIA	Razred IIIB	Razred IV
Sestava (%)					
Lipidi	100	40 - 80	40 - 80	< 20	/
Hidrofobni emulgatorji (HLB<12)	/	20 - 60	/	/	0 - 20
Hidrofilni emulgatorji (HLB>12)	/	/	20 - 40	20 - 50	30 - 80
Hidrofilna sotopila	/	/	0 - 40	50 - 100	0 - 50
Velikost kapljic disperzij (nm)	Grobe emulzije	100 - 250	100 - 250	50 – 100	> 50
Lastnosti vodne disperzije	Ni spontanega dispergiranja	SES brez vodotopnih komponent	SES z vodotopnimi komponentami	SMES z vodotopnimi komponentami	Po dispergiranju tvorba raztopine micelov
Splošne lastnosti	Za dispergiranje je potrebna prebava glicerida	V vodnem mediju spontano tvorijo emulzijo o/v	V vodnem mediju tvorijo rahlo motno disperzijo	V vodnem mediju tvorijo opalescentno disperzijo	Velika solubilizacijska kapaciteta za mnoge ZU

1.2 SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI

Samomikroemulgirajoče sisteme (SMES) v klasifikacijskem sistemu uvrščamo v skupino IIIB. V zadnjem času so med najbolj raziskanimi področji na lipidih osnovanih sistemov. SMES-i so po definiciji brezvodne izotropne zmesi lipidov, emulgatorjev, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo mikroemulzijo tipa olje v vodi (o/v) (1). Mikroemulzije so definirane kot optično transparentne in termodinamsko stabilne disperzije vodne in oljne faze, stabilizirane z medfaznim filmom emulgatorja. Velikost kapljic, ki nastanejo pri dispergiranju SMES-a je manjša od 100 oz 50 nm (1,2).

Mehanizem samomikroemulgiranja še ni natančno poznan. Zelo verjetno je proces spontan, kadar je sprememba entropije zaradi dispergiranja večja od energije, ki je potrebna za povečanje površine ob dispergiranju. Prosta energija sistema je takrat negativna ali zelo nizko pozitivna, zato proces samomikroemulgiranja poteče spontano oziroma že ob rahlem mešanju (1). SMES po vnosu hitro zapustijo želodec in se v obliki drobnih kapljic porazdelijo po prebavnem traktu. Zaradi peristaltičnega gibanja gastrointestinalnega trakta pride do mešanja disperzije, medtem ko stalno prisotne prebavne tekočine predstavljajo medij za spontano samoemulgiranje. Učinkovina je ves čas znotraj kapljic nastalih mikroemulzij, zato ostane raztopljena celoten čas prehoda prebavnega trakta (1,2).

Olje je eden najpomembnejših pomožnih snovi v formulaciji SMES-a. Ne samo zato, ker se lahko v njem raztoplja določena količina lipofilne ZU ali olajša samoemulgiranje, ampak tudi in predvsem zato, ker lahko poveča del lipofilne ZU, ki se absorbira v limfatični sistem (8). Za pripravo lipidnih formulacij se uporabljajo predvsem dolgoverižni trigliceridi (dv - TG; več kot 12 ogljikovih atomov) in srednje dolgoverižni trigliceridi (sdv - TG; 6 – 12 ogljikovih atomov). Slednji imajo boljšo sposobnost samomikroemulgiranja, odsotnost dvojnih vezi pa omogoča boljšo stabilnost SMES-a (1). Uporabljajo se tudi (delno) hidrolizirana rastlinska olja (mono- in digliceridi) in njihovi derivati. Slednji izkazujejo večjo sposobnost raztapljanja ZU ter so manj dovzetni za oksidacijo, ki povzroči nasičenje dvojnih vezi (8).

PAS lahko na več načinov izboljšajo biološko uporabnost učinkovin. Vplivajo na povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja vgrajenih učinkovin iz SMES-a, kar je povezano

z amfifilno naravo emulgatorjev. S tem, ko se porazdelijo v lipidni dvosloj celične membrane epiteljskih celic, porušijo strukturo lipidnega dvosloja in s tem omogočajo povečano prehajanje učinkovin. Zaradi svojih lastnosti vplivajo tudi na tesne stike med enterociti (1).

Z dodatkom organskih topil izboljšamo raztapljanje hidrofilnih PAS ali ZU v lipidni podlagi, s tem pa zmanjšamo količino potrebnih PAS za učinkovit SMES. Sotopila, ki se uporabljajo v ta namen, so na primer etanol, glicerol in polietilenglikol. Vendar moramo sotopila uporabljati v omejenih količinah, saj po redčitvi z vodo hitro izgubijo svojo solubilizacijsko kapaciteto in lahko povzročijo obarjanje ZU v prebavnem traktu (2).

1.3 TRDNI SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI

SMES-i so večinoma omejeni na tekoče farmacevtske oblike, saj je večina komponent pri sobni temperaturi v tekočem ali poltrdnem agregatnem stanju. Tekoče SMES se zato običajno polni v mehke ali trdne želatinske kapsule, kar pa ima kar nekaj slabosti in omejitev. Problematični so predvsem visoki proizvodni stroški, nizka stabilnost ter nekompatibilnost sistemov z ovojnico kapsul (9).

Zadnja leta je zato veliko raziskav usmerjenih v iskanje trdnih SMES formulacij. S pretvorbo v trdno obliko združimo prednosti tekočih lipidnih dostavnih sistemov, predvsem povečano topnost in biološko uporabnost, s prednostmi trdnih farmacevtskih oblik, kot so nizki proizvodni stroški, lažja procesna kontrola, večja stabilnost in ponovljivost ter predvsem boljša complianca pacientov. Trenutno so od trdnih farmacevtskih oblik na tržišču le trde in mehke želatinaste kapsule (10,11), medtem ko je iskanje novih trdnih farmacevtskih oblik v velikem zagonu. Za pretvorbo v trdne SMES se lahko poslužujemo različnih tehnoloških pristopom; sušenju z razprševanjem, adsorpcijo na trdne nosilce, granuliranjem talin, iztiskanjem oz. krogličanjem talin, z mikrokapsuliranjem in s tehnologijami s superkritičnimi fluidi (12). Tako dobimo trdne SMES, ki jih nadaljnje oblikujemo v formulacije glede na želen način aplikacije. Primeri so predstavljeni v nadaljevanju poglavja.

Suhe emulzije

Suhe emulzije so praški, ki v stiku z vodo spontano tvorijo emulzije. Lahko jih polnimo v kapsule ali so predstopnja za stiskanje tablet. Pripravljene so iz emulzije olje/voda, kjer vodo odparimo s rotacijsko evaporacijo, liofilizacijo ali s sušenjem z razprševanjem, sistemu pa so dodani v vodi topni trdni nosilci (laktoza, maltodekstrin,...).

Med novejšje trdne SMES spada gastroresistentno obložena suha emulzija, pridobljena s liofilizacijo, ki se lahko uporablja za peroralno dostavo peptidov in proteinskih ZU. Formulacija je sestavljena iz PAS, rastlinskih olj in ob pH odvisnega polimera in kot ZU vsebuje inzulin. ZU so z dodatkom PAS vgradili v oljno suspenzijo in nato sistem dispergirali v vodni fazi hidroksipropilmetil celuloznega ftalata. Po homogenizaciji disperzije in nadaljnji liofilizaciji so dobili trdne delce, ki so jih polnili v kapsule. Ugotovljeno je bilo, da je sproščanje inzulina iz takšnih kapsul odvisno od pH medija in prisotnosti lipaze v simuliranih gastrointestinalnih pogojih (13).

Samo(mikro)emulgirajoče kapsule

Samoemulgirajoče kapsule so bile prva trdna samoemulgirajoča farmacevtska oblika. Tekoče SES se polni v želatinaste kapsule, ki so lahko trdne ali mehke. Pri tem lahko pride do težav, bodisi z nekompatibilnostjo vsebine kapsule z ovojnico ali same ločitve faz znotraj kapsule. Topila lahko raztopijo ovojnico kapsule oz. iz nje nenadzorovano kapljajo. Gao in sodelavci so z dodatkom polimera hidroksipropilmetil celuloze povečali viskoznost SES. Tako so povečali stabilnost SES, preprečili razslojevanje in obarjanje paklitaksela ter izboljšali biološko uporabnost le-te (14).

Poleg polnjenja tekočih S(M)ES lahko v kapsule polnimo tudi trdne S(M)ES, ki jih dobimo s predhodnim dodatkom trdnih nosilcev (adsorbentov, polimerov, idr). Yukako in sodelavci so heparin z nizko molekulsko maso (LMWH), ki se ga uporablja za zdravljenje venske tromboembolije, vgradili v SMES in nato zmes pretvoriti v prašek s pomočjo treh vrst adsorbentov. Te SMES praške so polnili v trde kapsule. Rezultati *in vivo* testa so pokazali, da so trdni SMES dosegli učinkovito terapevtsko koncentracijo ZU v plazmi, kar bi lahko v prihodnosti nadomestilo paranteralno pot vnosa heparina (15).

Trdne farmacevtske oblike, v katerih so tekoči S(M)ES polnjeni v trdne in mehke želatinaste kapsule in prisotni na trgu, so predstavljeni v preglednici II.

Preglednica II: Seznam trdnih samo(mikro)emulgirajočih oblik, ki so na tržišču; Povzeto po (10,11).

IME ZDRAVILA	UČINKOVINA	FARMACEVTSKA OBLIKA	PROIZVAJALEC	INDIKACIJA
Agenerase®	Amprenavir	Mehka želatinska kapsula	Glaxo SmithKline	Antivirusno zdravilo (HIV)
Convulex®	Valprojska kislina	Mehka želatinska kapsula	Pharmacia	Antiepileptik
Forovase®	Sakvinavir	Mehka želatinska kapsula	Roche	Antivirusno zdravilo (HIV)
Gengraf®	Ciklosporin A/III	Trda želatinasta kapsula	Abbot	Imunosupresiv
Liprex®	Fenofibrat	Trda želatinasta kapsula	Sanofi-Aventis	Antihiperlipidemik
Norvir®	Ritonavir	Mehka želatinska kapsula	Abbot Laboratories	Antivirusno zdravilo (HIV)
Rocaltrol®	Kalcitriol	Mehka želatinska kapsula	Roche	Regulator kalcija
Sandimmune®	Ciklosporin A/II	Mehka želatinska kapsula	Novartis	Imunosupresiv
Sandimmune-Neoral®	Ciklosporin A/I	Mehka želatinska kapsula	Novartis	Imunosupresiv
Targretin®	Beksaroten	Mehka želatinska kapsula	Novartis	Antineoplastik

Samoemulgirajoče tablete z nadzorovanim sproščanjem

Kombinacija lipidov in PAS ter pretvorba v trdno obliko se je izkazala kot velik potencial za pripravo samoemulgirajočih tablet. Najnovejši napredek na področju raziskav je samoemulgirajoča tableta, ki deluje kot osmotska črpalka. Tekočo formulacijo samonanoemulgirajočega sistema so adsorbirali na zmes pomožnih snovi, ki tvorijo jedro tablete. Nastalo pasto so stisnili v granule, jih posušili in tabletirali. Tablete so obložili ter jim naredili odprtino, skozi katero se je učinkovina nadzorovano sproščala s pomočjo osmoze. Sistem je po dispergiranju ohranil samonanoemulgirajoče lastnosti, kar so preverili z merjenjem velikosti kapljic disperzije v deionizirani vodi. Rezultati *in vivo* študij so pokazali, da se je učinkovina iz samonanoemulgirajočih tablet sproščala enakomerno, hitrost eliminacije učinkovine pa je bila počasnejša v primerjavi s tekočimi samonanoemulgirajočimi sistemi polnjenimi v kapsule. Samonanoemulgirajoče tablete z osmotsko črpalko lahko vzdržujejo konstantno koncentracijo ciklosporina A v krvi, kar pripomore k boljši učinkovitosti in k zmanjšanju neželenih učinkov ZU (16).

Samoemulgirajoče mikrokapsule

Mikrokapsuliranje je proces, pri katerem zelo drobne kapljice, zračne mehurčke ali trdne delce obdamo s slojem polimera, lipida ali z drugimi ustreznimi snovmi. Izkoriščamo ga za zaščito vgrajene učinkovine pred vplivi iz okolja, za spremembo agregatnega stanja snovi ter za omogočanje prirejenega sproščanja vgrajene učinkovine (17).

Mikrokapsule s samoemulgirajočimi lastnostmi so razvili Zvonar s sodelavci. Z metodo vibrirajoče šobe so pripravili mikrokapsule s Ca-pektinatom, ki so vsebovali samomikroemulgirajoče jedro s furosemidom. SMES je bil sestavljen iz 12% (m/m) oljne faze (Mygliol 812) in 88% (m/m) PAS (emulgator Labrasol in koemulgator Plurol Oleique), v kateri je omogočeno raztapljanje furosemida v visokih koncentracijah (86 mg / ml SMES). Tako pripravljenim SMES jedrom so dodali beli vosek oz. koloidni silikagel, da so povečali viskoznost. Ta SMES jedra so nato obložili s hitosanom in jih posušili. Dokazali so, da se z vgradnjo furosemida v SMES poveča njegova permeabilnost in biološka uporabnost (18).

Samomikroemulgirajoče pelete z nadzorovanim sproščanjem

Pelete so večnotna farmacevtska oblika, ki imajo številne prednosti pred konvencionalnimi trdnimi enoenotnimi farmacevtskimi oblikami, kot so fleksibilnost proizvodnje, zmanjševanje variabilnosti plazemskih profilov in zmanjšanje draženja gastrointestinalnega trakta, brez znižanja biološke uporabnosti ZU. Zhang in sodelavci so naredili pelete s podaljšanim sproščanjem z učinkovino puerarin. SMES pelete so poleg ZU vsebovale ricinusovo olje, etoksilirano ricinusovo olje, 1,2-propandiol, hidroksipropilmetil celulozo in mikrokristalno celulozo. Pelete so izdelali z iztiskanjem in krogličanjem. SMES pelete s podaljšanim sproščanjem so bistveno izboljšale biološko uporabnost puerarina po peroralnem vnosu v primerjavi s tekočimi SMES-i ter tabletami s puerarinom (19).

Samoemulgirajoči nanodelci

Nanodelci so trdni koloidni delci velikosti 1-100 nm (4). Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, v katerem je učinkovina raztopljena, dispergirana, nanj adsorbirana oz. kovalentno vezana.

Tovrstni dostavni sistemi se odlikujejo po veliki zmogljivosti vgradnje učinkovine, omogočajo nadzorovano sproščanje učinkovine kot tudi zaščito pred razgradnjo (20).

Trickler in sodelavci so razvili SES nanodelce, sestavljene iz hitosana in gliceril monooleata za dostavo citostatika paklitaksela. Ti nanodelci z bioadhezivnimi lastnosti so bili pripravljani iz multiple emulzije tipa olje/voda/olje z odparevanjem topila. S SES nanodelci so izboljšali topnost paklitaksela ter dosegli 100% izkoristek sproščene učinkovine, medtem ko je zaradi hitosana prišlo do podaljšanega sproščanja. Te prednosti omogočajo uporabo nižjih odmerkov ZU za doseg terapijskega učinka, kar zmanjšuje neželene učinke povezane s kemoterapevtiki kot je paklitaksel (12).

Samoemulgirajoče mikrosfere

You in sodelavci so pripravili SES mikrosfere s prirejenim sproščanjem, ki kot oljno fazo vsebujejo zedoary kurkuma olje (učinkovina se uporablja v tradicionalni kitajski medicini). Nato so s tehniko sferične kristalizacije pripravili mikrosfere. Prirejeno sproščanje so dosegli z različnim razmerjem hidroksipropil-acetat-sukcinata v primerjavi z Aerosil-a 200. S pripravo samoemulgirajočih mikrosfer so izboljšali biološko uporabnost ZU glede na tekoče SES, prav tako je bilo doseženo željeno nadzorovano sproščanje le-te (12).

Samoemulgirajoči vsadki

Chae in sodelavci so citostatik karmustin, ki se uporablja za zdravljenje malignih možganskih tumorjev, vgradili v samoemulgirajoče vsadke. Ker je učinkovitost karmustina omejena zaradi kratkega razpolovnega časa, so stabilnost povečali s pretvorbo v SES. Ta je bil sestavljen iz triglicerida tributirina, polioksil hidrogeniranega ricinusovega olja in poliglikoliziranega glicerida. Karmustin so najprej raztalili v oljni fazi, ki so ji kasneje dodali emulgator in koemulgator ter s iztiskanjem izdelali implantate manjše velikosti. Rezultate so primerjali s karmustinom vgrajenim v PLGA (kopolimer mlečne in glikolne kisline) implantate. *In vitro* test je pokazal, da se je razpolovni čas karmustina povečala iz 45 min na 130 min, sproščanje je bilo počasneje in enakomernejše. Po dodatku SES v PLGA implantate se je učinkovina sprostila hitreje in dosegla boljši citotoksični učinek. Takšni implantati so imeli večjo protitumorsko aktivnost in so bili manj občutljivi na hidrolizo od tistih, ki niso imeli dodanega SES (21).

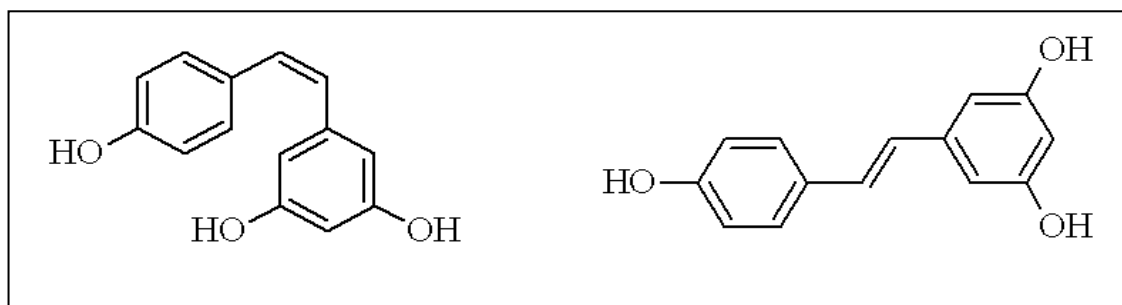
Samoemulgirajoče svečke in vaginalne globule

Kim in sodelavci so dokazal, da lahko trdni SES povečajo ne samo GI absorpcijo, ampak tudi rektalno oz. vaginalno adsorpcijo. Glicirizin, ki po peroralni poti komaj dosega terapevtske plazemske koncentracije, lahko z vaginalno ali rektalno aplikacijo s samoemulgirajočimi svečkami doseže terapevtske vrednosti za zdravljenje kronične bolezni jeter. Formulacija je vsebovala poleg glicirizina še zmesi estrov glicerola in makrogola z C6 - C18 maščobnimi kislinami. Raziskovalci so ugotovili, da bi tak način aplikacije lahko nadomestil intravensko aplikacijo ZU (12).

1.4 RESVERATROL

Resveratrol (RSV) je bel ali blede rumen prašek. Kemijsko je 3,5,4'-trihidroksi stilben, polifenolna učinkovina z molekulsko formulo $C_{14}H_{12}O_3$, molekulsko maso 228,25 g/mol in temperaturo tališča med 253 in 255°C. Po biofarmaceutski klasifikaciji (BSC) jo uvrščamo v razred II, je v maščobah topna substanca, dobro topna tudi v etanolu (50 mg/ml) in slabo topna v vodi (0,03 mg/ml), a dobro permeabilna skozi membrane prebavil (22).

Zaradi strukture RSV je lahko v naravi prisoten v *trans*- (E-) ali *cis*- (Z-) obliki (Slika 1). Reakcija izomerizacije *trans*- v *cis*- obliko poteka ob izpostavljenosti ultravijoličnim žarkom in poteka do vzpostavitve ravnotežja med izomeroma. *Trans*-izomer je biološko bolj aktiven kot *cis*-izomer, predvsem zaradi neplanarne konformacije. *Cis*-RSV je tudi manj stabilen in posledično komercialno nedostopen, zelo malo je tudi dokazov o farmakološki aktivnosti le-tega. Lahko pa služi kot rezervoar za pretvorbo v *trans*-RSV, saj vedno obstaja ravnotežje med *trans* in *cis* oblikama RSV.



Slika 1: Struktura *cis*-RSV levo in *trans*-RSV desno.

RSV je polifenolna učinkovina, prisotna v številnih rastlinskih vrstah in je sestavina človeške prehrane. Polifenoli nastajajo v rastlinah kot odgovor na zunanje stresne dejavnike, kot so poškodbe, glivične okužbe, izpostavljenost ozonu in ultravijoličnem sevanju. Spojina je bila prvič izolirana leta 1940 iz korenine belega teloha (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), leta 1963 pa iz korenine japonskega dresnika (*Polygonum Cuspidatum*), ki se v tradicionalni kitajski in japonski medicini uporablja za zdravljenje številnih bolezni kot so dermatitis, gonoreja in hiperlipidemija (23).

Odkritih je bilo že več kot sedemdeset vrst rastlin in njihovih plodov, ki vsebujejo RSV, kot so rdeče grozdje, arašidi, borovnice, evkaliptus, jelka, lilija, idr. Največja vsebnost RSV je bila najdena v rdečem grozdju (*Vitis vinifera*), zlasti v semenih in lupinici grozdnih jagod. Te vsebujejo 50 do 100 µg RSV na gram lupinic jagod, kar ustreza 5 - 10% celotne mase, posledično v grozdnem soku in rdečem vinu najdemo veliko RSV. Vsebnost RSV v grozdju je še posebej visoka, ko je vinska trta okužena z glivo *Botrytis cinerea* (24,25). Fernander-Mar in sodelavci so naredili raziskavo o količini RSV v različnih vinih. Ugotovili so, da je količina RSV v vinu odvisna ne samo od sorte grozdnih jagod, ampak tudi od geografskih, agronomskih ter klimatskih pogojev in podvrženosti stresnim dejavnikom (glivične okužbe, izpostavljenost UV žarkom, idr.) (26).

1.4.1 Učinki resveratrola

Znanstvene raziskave že več let poročajo, da ima RSV širok nabor zaželenih bioloških in terapevtskih učinkov, kot so antioksidativno delovanje, protitumorno delovanje, protivnetni učinek, idr (27). Terapevtska uporaba RSV je zelo omejena zaradi njegovega kratkega razpolovnega časa (~8-14 min) in hitrega metabolizma (23). Rezultati farmakokinetičnih študij kažejo, da je biološka uporabnost RSV skoraj nič, zato se intenzivno išče nove farmacevtske oblike, ki bi jo povečale (27).

Antioksidanti so spojine endogenega ali eksogenega izvora, ki večinoma že v nizkih koncentracijah lahko upočasnijo, prekinejo ali preprečijo verižne radikalske reakcije (28). Normalno celični metabolizem ustvari reaktivne kisikove intermediate (ROS), kot so superoksid, vodikov peroksid in hidroksilni radikal, ki se jih telo ubrani z znotrajceličnimi encimi, kot so glutation, superoksid dismutaza in katalaza. Kopičenje ROS v organizmu imenujemo oksidativni stres. Gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi povečane tvorbe

radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Povečano količino radikalov lahko sprožijo številni zunanji dejavniki kot npr. različne vrste sevanja, nekatere kemikalije, kot so pesticidi ali določena zdravila ter virusi in bakterije. Med notranje dejavnike lahko štejemo povečano stopnjo celične presnove, ki nastane pri določenih boleznih (debelost, sladkorna bolezen, rak,...) in zaradi intenzivne telesne obremenitve pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov. Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje ter za vrsto pomembnih bolezni, kot so ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena, nekatere vrste raka in druge (28).

Lipidna peroksidacija poteka v treh stopnjah. Prva stopnja je iniciacija, kjer reaktivni radikal reagira z vodikom iz lipida in pri tem nastane lipidni radikal. V drugi stopnji, propagaciji, lipidni radikal reagira z molekulo tripletnega kisika in nastane lipidni peroksilni radikal. Ta nato odtegne vodik iz druge molekule lipida, pri čemer nastane lipidni radikal, ki znova reagira s tripletnim kisikom. Verižna reakcija se ponavlja, dokler ne zmanjka kisika ali lipida. Zadnja stopnja je terminacija, kjer radikali reagirajo med seboj ter tvorijo neaktivne produkte.

RSV zaradi strukture spada v skupino fenolnih antioksidantov, ki reaktivne in nestabilne radikale onemogočijo tako, da jim oddajo elektron in jih tako spremenijo v stabilne molekule. RSV reagira z lipidnim peroksilnim radikalom ali lipidnim radikalom, sam postane fenolni radikal, ki je stabilnejši od lipidnih radikalov. S tem se prepreči nadaljnji razvoj verižne reakcije nastajanja radikalov, ki lahko povzročijo lipidno peroksidacijo in poškodbe DNK (23).

Ugotovljeno je bilo, da RSV v zelo nizki koncentraciji (~ 1 μm) zavira apoptotsko celično smrt, s čimer zagotavlja zaščito pred različnimi boleznimi, vključno z miokardialno ishemično reperfuzijsko poškodbo, aterosklerozo in ventrikularnimi aritmijami. Pri višjih koncentracijah (~ 100 μm) pa omogoča apoptotsko celično smrt in predstavlja alternativo za kemopreventivo (23).

Učinek RSV se kaže tudi v protitumornem delovanju, saj zavira karcinogenezo (iniciacijo, promocijo in progresijo), angiogenezo in metastaziranje. Delovanje lahko pripišemo zaviranju encimov ciklooksigenaze 1 in 2, lahko pa je tudi posledica sprožitve apoptoze, kar so dokazali na celicah raka debelega črevesa, raka prostate in raka dojke. RSV vpliva

tudi na regulacijo izražanja genov odvisnih od hormonov, kot so onkosupresorski gen BRCA1 v celicah dojk, predvsem zaradi podobne strukture z dietilstilbestrolom (24).

RSV zaradi slabe topnosti izkazuje nizko biološko uporabnost. Po vgraditvi v SMES je RSV raztopljen ves čas prehoda skozi gastrointestinalni trakt, ni faze raztapljanja učinkovine v mediju, kar pa lahko poveča biološko uporabnost učinkovine. Pretekle raziskave na so pokazale, da adsorpcija tekočih SMES-ov na nosilce povzroči nepopolno sproščanje učinkovine, ki je vgrajena v tekočo formulacijo(29). Slednje bomo poskušali v diplomskem delo vrednotiti in ugotoviti možne vzroke, ki le-to povzročijo. Z *in vitro* sproščanjem bomo spremljali delež sproščene učinkovine v dveh medijih (pH 1,2 in pH 6,8) in v 10 paralelah lahko statistično predpostavili razlike med sproščanji.

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je vrednotenje sproščanja RSV iz trdnih FO, ki vsebujejo SMES za povečanje topnosti in biološke uporabnosti RSV. Trdne FO bomo pripravili z adsorpcijo tekočega SMES-a na trdne porozne nosilce. Tako bomo izdelali SMES praške, ki jih bomo nadalje še tabletirali.

Z izdelavo (psevdo)trikomponentnega diagrama bomo določili sestavo SMES-a, ki tvori mikroemulzije v celotnem območju dodajanja vode in kjer ne pride do nastanka gela, ki lahko zakasni sproščanje RSV. Tekoč SMES bomo adsorbirali na različne trdne nosilce (Neusilin[®] US2, Syloid[®] 244FP, Sylsya[®] 350) ter preverjali vpliv pretvorbe v SMES praške na količino sproščenega RSV. Za pripravo tablet bomo SMES praškom dodali pomožne snovi za tabletiranje; suhi vezivi (Avicel[®] PH102 in Kollidon[®] VA64), razgrajevalo (Ac-Di-Sol[®]) in drsilo (magnezijev stearat) ter z metodo direktnega tabletiranja stisnili tablete.

Da bi preverili, ali se ohrani samomikroemulgirajoči učinek po adsorpciji na nosilce ter po tabletiranju, bomo pripravljene trdne formulacije dispergirali v HCl pufri s pH 1,2 ter v fosfatnem pufri s pH 6,8. Po odstranitvi netopnih komponent formulacij bomo s fotonsko korelacijsko spektrometrijo izmerili velikosti kapljic nastalih disperzij.

Za preskus sproščanja RSV iz SMES praškov in tablet bomo uporabili napravo z vesli (naprava 2 po Ph. Eur. 7th Ed. in naprava 2 po USP). V pufrih s pH 1,2 ter pH 6,8 bomo 8 ur spremljali količino sproščenega RSV iz SMES praškov in tablet, delež sproščene učinkovine bomo določili s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC). Rezultate sproščanj bomo statistično ovrednotili. Primerjali bomo profile sproščanja učinkovine iz praškov in tablet ter poizkušali ovrednotiti ujemanje z različnimi matematičnimi modeli (0. red, 1. red, Hixson-Crowell, Higuchi, Korsmeyer-Peppas).

Lastnosti izdelanih tekočih in trdnih formulacij z RSV ter brez RSV bomo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Tako bomo spremljali temperaturne spremembe učinkovine (taljenje, kristalizacija, steklasti prehod) v tekočih SMES-ih, SMES-ih adsorbiranih na nosilec ter po tabletiranju.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

UČINKOVINA:

Resveratrol (ChromaDex Inc., Irvine, Amerika).

SESTAVINE SAMOMIKROEMULGIRAJOČEGA SISTEMA:

Capmul[®] MCM EP (Abitec Corporation, ZDA) je zmes mono- in digliceridov srednjedolgoveržnih maščobnih kislin, pretežno kaprilne in kapronske kisline. Vsebuje predvsem monoacilglicerole ter diacetilglicerole. Je brezbarvna ali rahlo rumeno obarvana poltrdna ali tekoča snov z blagim vonjem po maščobah. Njegova HLB vrednost je 5-6. V farmacevtskih izdelkih ima lahko vlogo vehikla, solubilizatorja, emulgatorja ali koemulgatorja. Poveča lahko biološko uporabnost ZU ter izboljša dermalno absorpcijo ZU (30).

Kolliphor[®] EL (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je etoksilirano ricinusovo olje z nenasičenimi alkilnimi verigami (polioksil-35-ricinusovo olje). Hidrofoben del molekule je sestavljen iz glicerol polietilenglikol ricinoleata in estrov maščobnih kislin polietilenglikola. Majhen hidrofilen del predstavlja polietilenglikol ter etoksiliran glicerol. Je blede rumena oljnata tekočina, bistra pri temperaturi nad 16 °C z blagim a značilnim vonjem in okusom. Njegova HLB vrednost je med 12 in 14. V farmacevtskih izdelkih ima največkrat vlogo neionskega emulgatorja ali topila. Primeren je za izdelavo peroralnih in dermalnih FO. V SMES-ih se uporablja z namenom izboljšanja biološke uporabnosti ZU (9,31).

Kolliphor[®] RH40 (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je etoksilirano ricinusovo olje z nasičenimi alkilnimi verigami (polioksil-40-hidrogenirano ricinusovo olje), drugo ime zanj je makrogolglicerol hidrosistearat. Hidrofoben del molekule predstavljata glicerol polietilenglikol hidrosistearat in estri maščobnih kislin glicerol poliglikola. Hidrofilen del molekule je enak kot pri Kolliphor[®] EL. Je bela ali blede rumena poltrdna snov z značilnim rahlim vonjem, ki je skoraj brez okusa v vodnih raztopinah. Njegova HLB

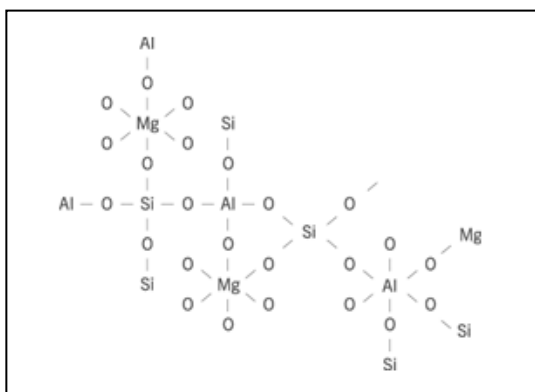
vrednost je med 14 in 16. V farmaciji se uporablja kot solubilizator za hidrofobne snovi ter za izboljšanje biološke uporabnosti ZU za peroralno ter dermalno uporabo (32).

Ricinusovo olje (Lex, Slovenija) je triglicerid maščobnih kislin: ricinolne kisline (87%), oleinske kisline (7%), linolne kisline (3%), linolenske kisline (1%), palmitinske kisline (1%), stearinske kisline (1%) in dihidroksistearinske kisline v sledovih. Je blede rumeno obarvano, bistro viskozno olje z značilnim vonjem. Ricinusovo olje pridobivajo iz semen rastline kloščevca (lat.: *Ricinus Comminis Linné*). Pogosto se uporablja v kozmetičnih in prehrabnenih izdelkih. V farmacevtskih pripravkih se največkrat uporablja v kremah in mazilih ter v paranteralnih FO, kjer ima vlogo oljnega vehikla ali topila (9).

TRDNI POROZNI NOSILCI ZA TEKOČI SAMOMIKROEMUGIRAJOČI SISTEM:

Neusilin[®] US2 (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) je magnezijev aluminometasilikat. Je amorfna snov, bele barve s porozno strukturo, odporen na visoke temperature. Kemijsko je zmes tetraedičnih ali oktaedričnih aluminijevih ionov, oktaedričnih magnezijevih ionov in tetraedičnih silicijevih ionov, ki so naključno povezani v tridimenzionalno strukturo (slika 2). 5% suspenzija Neusilina[®] US2 ima pH 7,4. Porazdelitev velikosti granul se giblje med 60 in 120 μm , povprečni volumen por je 1,5 mg/ml , specifična površina znaša 300 m^2/g , sposobnost absorpcije olja je 3,2 ml/g , specifična površina pa 300 m^2/g (33,34).

Uporablja se za adsorpcijo tekočin, predvsem olj. Kot pomožna snov se največkrat uporablja pri tabletiranju, saj izboljša pretočne lastnosti prahov, preprečuje zlepljenje higroskopskih praškov in omogoča enako trdnost tablet pri nižji uporabljeni sili stiskanja (33).



Slika 2: Strukturna formula Neusilin[®] US2; Povzeto po (34).

Syloid® 244FP EU (Grace Davison, ZDA) je hidrofilni metaporozni mikroniziran amorfni silicijev dioksid. Sposobnost adsorpcija olja je 3,0 ml/g, povprečna velikost delcev 2,5-3,7 μm , specifična površina pa 300 m^2/g .

Zaradi dobrih absorptivnih lastnosti se uporablja kot trdni nosilec za pretvorbo tekočih SMES-ov v trdno agregatno stanje ter kot pomožna snov, ki izboljša pretočne lastnosti prahov in poveča trdnost tablet pri nižji sili stiskanja (35).

Sylsilia® 350 (Fuji Chemical Industry Co. TD, Japonska) je ime za sintetični hidrofilni amorfni silicijev dioksid. Ima sposobnost adsorpcije olja 3,2 mL/g, povprečna velikost delcev je 4,0 μm , specifična površina 300 m^2/g , 5% suspenzija ima pH 7,5, povprečni volumen por je 1,6 ml/g.

Uporablja se kot pomožna snov za izboljšanje pretočnih lastnosti prahov in zaščito občutljivih substanc pred vlago. Lahko pa je uporabljen tudi kot nosilec za slabo topne učinkovine, predvsem pri izdelavi trdnih disperzij (36).

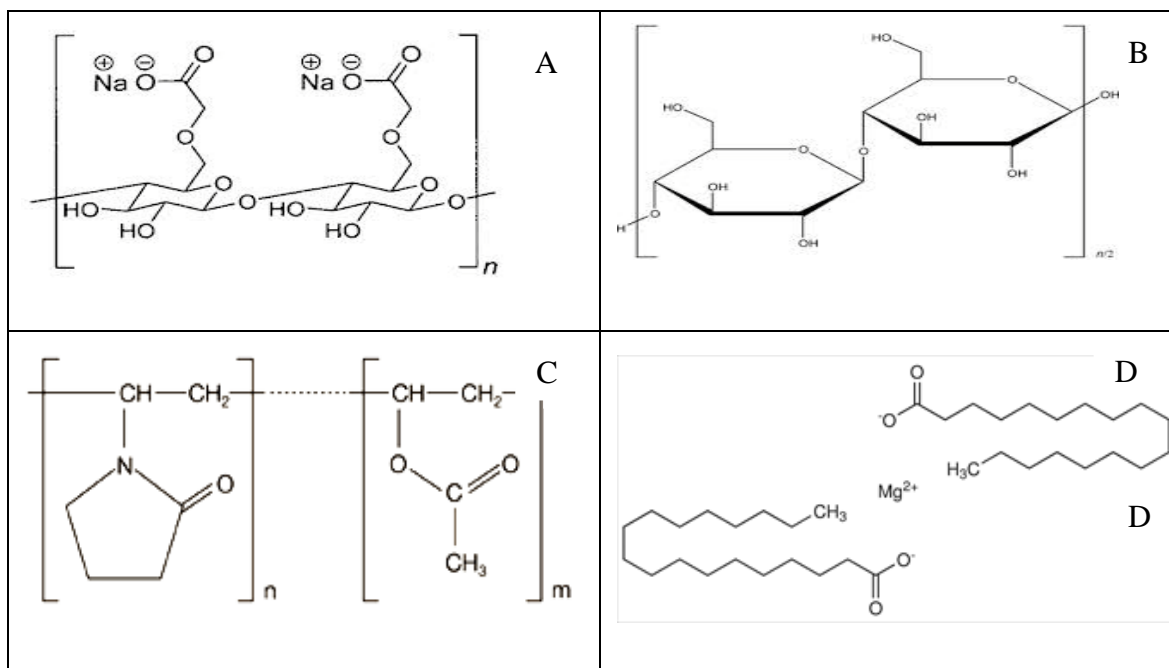
OSTALE POMOŽNE SNOVI ZA TABLETIRANJE:

Ac-Di-Sol® (FMC Biopolymers, ZDA) je premrežen polimer natrijeve karboksimetil celuloze (slika 3A). Uporablja se v peroralnih FO (kapsule, tablete, zrnca), kjer ima vlogo razgrajevala. Pri izdelavi tablet se lahko uporablja v procesih tabletiranja. Običajna koncentracija Ac-Di-Sol® kot razgrajevala v tabletah znaša 0,5-5%. Je v vodi netopna snov, ob stiku z vodo pa hitro nabrekne za 4-8 krat prvotne prostornine razgrajevala. V količinah, ki se uporabljajo v farmacevtski industriji, velja za nedražečo in netoksično snov (9).

Avicel® PH102 (FMC Biopolymers, ZDA) je mikrokristalna celuloza, bel, kristaliničen prašek, brez vonja in okusa (slika 3B). Povprečna velikost poroznih delcev je 100 μm , specifična površina pa znaša 1,21-1,30 m^2/g . V farmacevtski industriji se uporablja kot pomožna snov pri izdelavi peroralnih FO in sicer v vlogi adsorbenta, antiadheziva, razgrajevala, veziva ali polnila, odvisno od deleža mikrokristalne celuloze v formulaciji. Uporablja se tudi v uporabi v prehrabeni industriji. Velja za popolnoma varno, netoksično in nedražečo snov (9).

Kollidon® VA64 (BASF, Nemčija) je kopovidon, kopolimer 1-vinil-2-pirolidona in vinilacetata v masnem razmerju 3:2 (slika 3C). Je bel do blede rumen amorfni prašek, z rahlim značilnim vonjem in komaj zaznavnim okusom. Pri izdelavi tablet vlogo suhega veziva pri direktnem tabletiranju in vlažnem granuliranju, tvori oblogo pri filmskem oblaganju tablet, lahko je del matriksa pri tabletah s prirejenim sproščanjem. Običajna koncentracija kopovidona kot veziva v tabletah je 2-5%. Je netoksična in nedražeča snov (9).

Magnezijev stearat (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) je bel, fino mlet prašek z nizko gostoto ter značilnim rahlim vonjem po stearinski kislini (slika 3D). Prašek je masten na otip, se lepi na kožo, je netopen v vodi in brezvodnem etanolu. Magnezijev stearat je zmes magnezijevih soli višjih maščobnih kislin, predvsem magnezijevi soli stearinske kisline in palmitinske kisline v različnih razmerjih. V farmaciji se uporablja kot pomožna snov pri izdelavi tablet in praškov v koncentracijah med 0,25% in 5%, kjer ima vlogo maziva, drsila ali antiadheziva (9).



Slika 3: Strukturne formule pomožnih snovi (A) Ac-Di-Sol® (B) Avicel® PH102 (C) Kollidon® VA64 (D) Magnezijev stearat.

OSTALI MATERIALI:

Klorovodikova kislina (HCl) Titrisol[®] za 1000ml 1mol/l HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;

Kalijev klorid (KCl), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;

Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;

Natrijev hidroksid (NaOH), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;

Ocetna kislina (CH₃COOH), Merck KGaA, Nemčija;

Metanol za HPLC, Panreac Quimica S.A.U., Španija;

Dvakrat prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Slovenija;

Prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo, Slovenija;

3.2 NAPRAVE

Med potekom eksperimentalnega dela smo uporabljali naslednje naprave, ki so našteve v preglednici III.

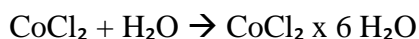
Preglednica III: Naprave, ki smo jih uporabljali pri delu.

NAPRAVA	PROIZVAJALEC
Analitska tehtnica	Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;
Analitska tehtnica	Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica;
Analitska tehtnica	Sartorius, Nemčija
Centrifuga Centric 322A	Tehtnica, Železniki, Slovenija;
Instrumentirana tabletirka na udarec SP300,	Killian, Nemčija
Magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija;
Membranski filter 0,45 μ m RC, Minisart RC 25	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija
Dissolution Testing Station, VanKel VK 7000	New Jersey, ZDA
pH meter Seven Multi	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
Pretočni filter 10 μ m, Full flow filt	Agilent Technologies, Nemčija
Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti, Agilent Series	Agilent Technologies, Nemčija;
Kolona za HPLC	YMC-Pack-ODS-AM (5 μ m, 250x4,6mm)
Ultrazvočna kadička Sonis 4	Iskra, Kranj, Slovenija
Viale za HPLC	Agilent Technologies, Nemčija
Zeta Sizer Nano series	Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija
Diferenčni dinamični kalorimeter; (DSC)	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švica;
Vodna kopel z magnetnim mešalom	Julabo Labortechnik GmbH, Nemčija

3.3 METODE

3.2.1 Izdelava (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama

Z vodno titracijsko metodo smo izdelali (psevdo)trikomponentni fazni diagram. Najprej smo pripravili zmesi PAS (Kolliphor EL : Kolliphor RH40 = 1:1) ter lipidno fazo (Capmul MCM : Ricinusovo olje = 1:1). Nato smo iz teh dveh osnovnih zmesi pripravili različne kombinacije PAS ter oljne faze (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10). Pripravljene zmesi olj in PAS smo segrevali v vodni kopeli na $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Nato smo tem zmesem dodajali segreto prečiščeno vodo ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) v vnaprej izračunanih količinah (po 5% m/m) in dobili razredčitveno premico. Devet takih premic nam v celoti opiše (psevdo)trikomponentni fazni diagram. Po vsakem dodatku vode smo nastali disperziji vizualno ocenili organoleptične lastnosti, kot so transparentnost ali motnost, homogenost oz. ločitev faz in prisotnost gela. Istočasno smo s kobaltovim papirčkom ugotavljali tip dobljene emulzije (slika 4). Na diagramu smo z različnimi točkami označili, pri katerih razmerjih nastane emulzija oz. mikroemulzija in tip dobljene disperzije.



Slika 4: Reakcija kobaltovega papirja, prvotni CoCl_2 je modre barve, ob stiku z vodo pride do spremembe barve papirja iz modre v rožnato zaradi nastanka heksahidrata.

3.2.2 Priprava samomikroemulgirajočega sistema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili SMES, ki je bil predhodno razvit na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, sestava le-tega je navedena v preglednici IV.

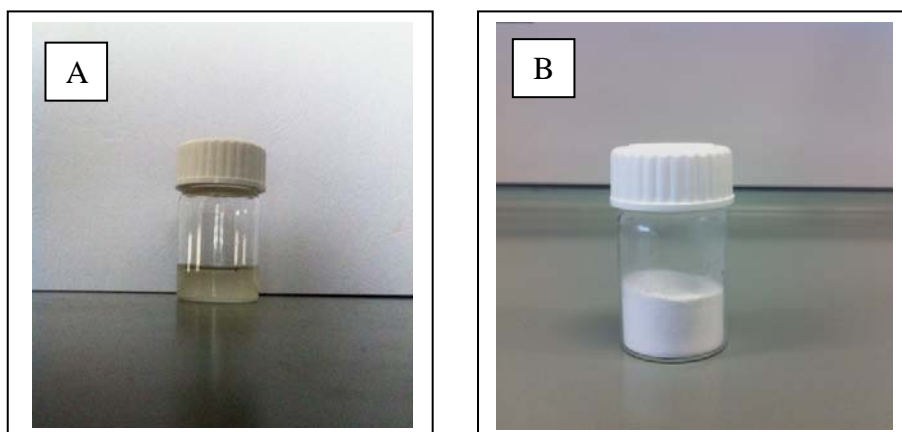
Preglednica IV: Posamezne sestavine samomikroemulgirajočega sistema, vloga posameznih sestavin in količinska sestava uporabljenega samomikroemulgirajočega sistema.

Sestavina	Vloga sestavine	Količina (m/m%)
Crempophor[®] EL	emulgator	30
Crempophor[®] EL	emulgator	30
Capmul[®] MCM	oljna faza	20
Ricinusovo olje	oljna faza	20

Tekoči SMES smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico natehtali vse sestavine, dodali magnet ter mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi. Nato smo SMES-u dodali RSV v določeni količini (10mg/100mg zmesi), kar predstavlja približno 80% nasičene topnosti RSV v SMES-u. Tako pripravljen SMES+RSV smo na magnetnem mešalu mešali 8 ur oz. dokler se ves RSV ni popolnoma raztopil. Ves čas smo pazili, da smo delali v zatemnjenem prostoru in v z aluminijasto folijo zaviti steklovini, da smo se izognili izpostavitvi UV žarkov, ki bi lahko vplivali na pretvorbo *trans*-RSV v *cis*-RSV.

3.2.3 Pretvorba tekočega samomikroemulgirajočega sistema v trdno obliko

Pretvorbo v trdno obliko smo izvedli z adsorpcijo SMES+RSV na posamezne trdne nosilce. Tekoč SMES+RSV (slika 5A) smo natehtali v pateno in mu postopoma dodajali enako količino izbranega trdnega nosilca. S pestilom smo mešali, dokler ni nastala homogena praškasta zmes, ki se ni več oprijemala patene (slika 5B). Sestava praškov je predstavljena v preglednici V.



Slika 5: Levo tekoči SMES+RSV pred adsorpcijo na trdni nosilec (A), desno SMES prašek (B).

Preglednica V: Samomikroemulgirajoči praški, ki smo jih uporabljali pri delu. Oznake posameznih praškov ter njihova sestava.

Oznaka praškov	Sestava	Razmerje
Neusilin-PRA	Neusilin [®] US2 SMES+RSV	1:1
Syloid-PRA	Syloid [®] 244FP SMES+RSV	1:1
Sylysia-PRA	Sylysia [®] 350 SMES+RSV	1:1

3.2.4 Tabletiranje

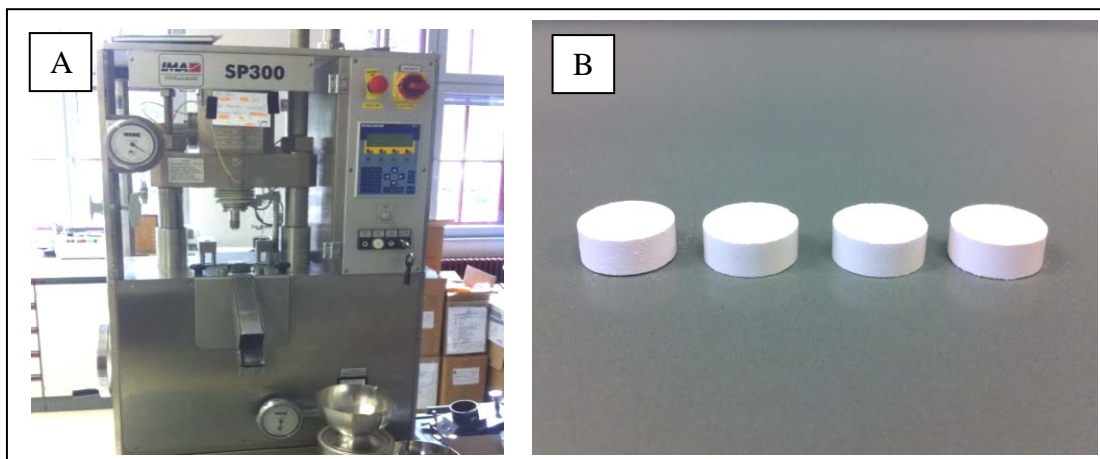
Receptura za tablete je bila prehodno razvita na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Najprej smo pripravili SME praške po prej opisanem postopku. Nato smo tem praškom dodali pomožne snovi in z mešanjem dobili zmes za tabletiranje. Serije tablet so imele enako sestavo, razlikovale so se le v izbranem trdnem nosilcu tekočega SMES-a. Sestava zmesi je napisana v preglednici VI.

Preglednica VI: Sestavine samomikroemulgirajoče tablete, vloga sestavin ter delež sestavin v eni tableti.

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

Tablete smo izdelali z metodo direktnega tabletiranja prahov. Uporabili smo instrumentirano tabletirko na udarec, Killian SP300 (slika 6A). Najprej smo ročno natehtali zmes za vsako posamezno tableto in jo stresli v matrično vdolbino tabletirke. Tablete smo stiskali na dva načina, ročno in taktno. Z ročnim načinom tabletiranja smo stisnili vse različice nosilcev, medtem ko je bilo taktno stiskanje možno le pri tabletah, ki kot nosilec vsebujejo Neusilin[®] US2.

Pečate smo nastavili glede na izbran nosilec. Nastavitve tabletirke so predstavljene v preglednici VII. Uporabljali smo okrogle pečate z ravnimi površinami premera 12,0 mm. Tako smo izdelali štiri serije tablet, ki so se med seboj razlikovale po načinu tabletiranja ter v trdnem nosilcu (slika 6B).



Slika 6: Tabletirka na udarec Killian SP300 s katero smo naredili tablete (A), tablete različnih serij(B).
Po vrsti iz leve: Neusilin-TBL-T, Neusilin-TBL-R, Syloid-TBL-R, Sylysia-TBL-R.

Preglednica VII: Način tabletiranja ter nastavitve pečatov tabletirke.

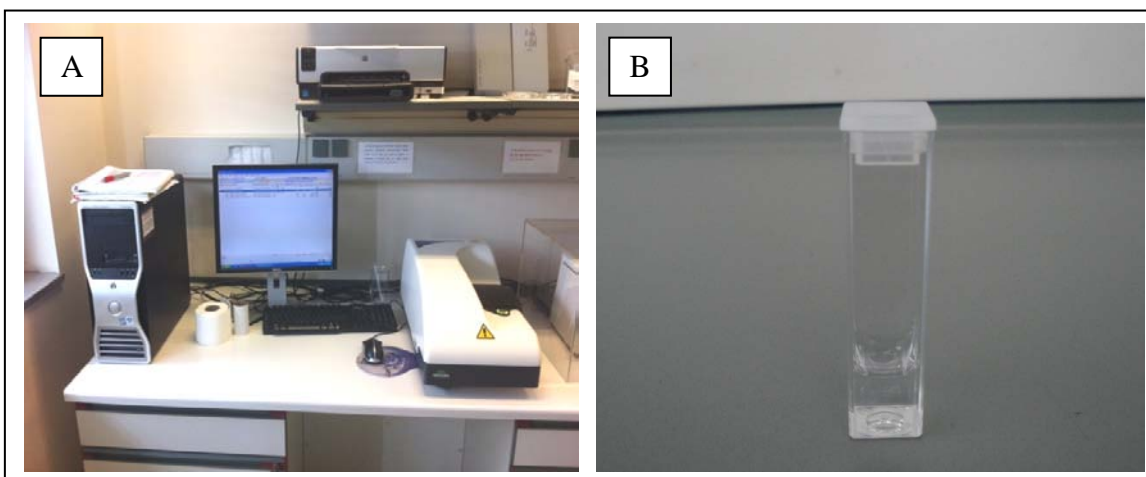
Oznaka serije tablet	Trdni nosilec	Način tabletiranja	Nastavitve pečatov (mm)	
			Zgornji pečat	Spodnji pečat
Neusilin-TBL-T	Neusilin [®] US2	Taktno	15,9	20,0
Neusilin-TBL-R	Neusilin [®] US2	Ročno	15,9	20,0
Syloid-TBL-R	Syloid [®] 244FP	Ročno	16,3	20,0
Sylysia-TBL-R	Sylysia [®] 350	Ročno	16,2	20,0

3.2.5 Merjenje velikosti kapljic disperzij

Velikost kapljic in vrednost polidisperznega indeksa (angl. »polydispersity index – PDI«) je merilo za homogenost disperzij. Meritve le teh smo izvedli s pomočjo fotonske korelacijske spektroskopije (angl. »photon correlation spectroscopy – PCS«) na aparaturi Zetasizer Nano (slika 7A).

Pripravili smo vzorce SMES-a, SMES+RSV ter posamezne SMES praške in tablete. Vzorce smo prenesli v 250 ml pufru pH 1,2 ter pH 6,8, jih postavili na magnetno mešalo in mešali 60 min da so tablete v celoti razpadle. Nato smo disperzije pustili stati, da so se na dno čaše posedle netopne pomožne snovi ter trdni porozni nosilci. Pred analizo smo vzorce centrifugirali 5 min pri hitrosti 4000 obratov/min, supernatant nato filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 μ m. Tako smo odstranili še preostale netopne nosilce. Meritve smo

izvajali pri 25 °C v polistirenski kiveti (slika 7B). V čisto in suho kiveto smo s kapalko previdno odmerili ustrezno količino vzorca in pazili, da v kiveti ni bilo zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili meritev. Kiveto z vzorcem smo nato vstavili v aparaturo in izvedli meritev. Rezultate meritev smo podali kot povprečje velikosti kapljic, vrednosti PDI ter standardni odklon treh meritev.



Slika 7: Levo je aparaturo Zetasizer Nano, na kateri smo merili velikost kapljic(A); desno polistirenska kiveta napolnjena z vzorcem disperzije(B).

3.2.6 *In vitro* sproščanje resveratrola

Za preskus sproščanja RSV iz trdnih SMES-ov smo uporabili napravo z vesli VK 7000-VanKel (naprava 2 po Ph. Eur. 7th Ed. in naprava 2 po USP), ki je bil opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom (slika 8). Sproščanje smo izvajali v dveh medijih, pufru s pH 1,2 ter pufru pH 6,8. Pogoji testa sproščanja so bili ves čas konstantni, začetni volumen medija je bil 900 ml, temperatura vodne kopeli $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in hitrost vrtenja vesel 50 obr./min. Sproščanje učinkovine iz praškov in tablet smo spremljali 8 ur. Ob posameznih časovnih intervalih (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) smo vzorčili 5 ml vzorca in ga filtrirali skozi filter z velikostjo por $45\ \mu\text{m}$. Koncentracijo RSV v določenem vzorcu smo določili s pomočjo HPLC. Za vsako serijo tablet in praškov smo izvedli preskus sproščanja v desetih paralelah.



Slika 8: Levo je naprava za preskus sproščanja RSV, VanKel-7000, desno avtomatski vzorčevalnik.

PRIPRAVA MEDIJEV ZA PRESKUS SPROŠČANJA

Raztopina HCl - pufer s pH 1,2

Pufer s pH 1,2 smo pripravili iz 0,2 M raztopine KCl in 0,2 M raztopine HCl.

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

0,2 M raztopina HCl: v 1000 ml merilno bučko smo natočili nekaj prečiščene vode in vanjo prenesli HCl Titrisol[®] (standard za 1000 ml 1 mol/l HCl) in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Nato smo v 2000 ml merilno bučko prenesli 400 ml pripravljene 1 M raztopine HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in dobro premešali.

Pufer s pH 1,2 smo pripravili tako, da smo v 5000 ml merilni bučki zmešali 1250 ml 0,2 M raztopine KCl in 2125 ml 0,2 M raztopine HCl ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Pripravljeno raztopino smo na magnetnem mešalu dobro premešali ter s pH lističem preverili pH vrednost raztopine. Z dodajanjem standardnih raztopin 0,2 M HCl in 0,2 M KOH smo uravnali ustreznost pH medija.

Fosfatna puferska raztopina - pufer s pH 6,8

Pufer s pH 6,8 smo pripravili iz 0,2 M raztopine NaOH in 0,2 M raztopine KH_2PO_4 .

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.

0,2 M raztopina KH_2PO_4 : v 2000 ml merilno bučko smo natehtali 54,4 KH_2PO_4 , in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake ter na magnetnem mešalu mešali, dokler ni bil KH_2PO_4 v celoti raztopljen.

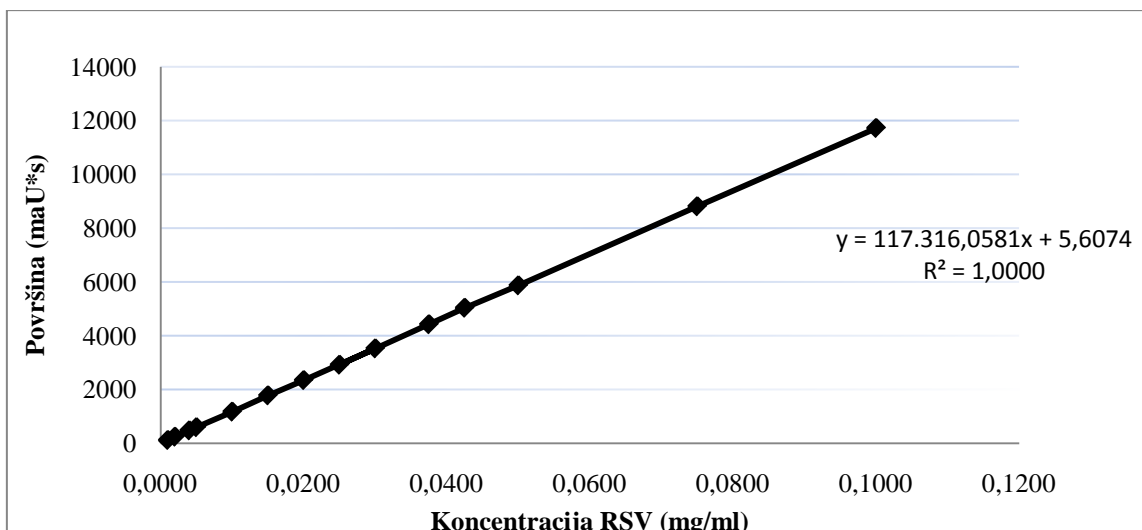
Pufer s pH 6,8 smo pripravili tako, da smo v 5000 ml merilni bučki zmešali 1250 ml 0,2 M raztopine KH_2PO_4 , in 560 ml 0,2 M raztopine NaOH ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Pripravljeno raztopino smo mešali na magnetnem mešalu ter z dodajanjem standardnih raztopin 0,2 M HCl in 0,2 M NaOH uravnali pH na 0,05 enote natančno.

3.2.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Koncentracijo sproščenega RSV smo določili s HPLC analizo (slika 9). Iz površine pod krivuljo smo s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije sproščenega RSV v vsaki časovni točki. 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 0,0010 mg/ml do 0,100 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 10).



Slika 9: HPLC Agilent Series, na kateri smo preverjali vsebnost sproščene učinkovine.



Slika 10: Umeritvena premica sproščenega RSV in enačba premice.

PARAMETRI HPLC ANALIZE (37):

- ✦ Mobilna faza: 0,5% očetne 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 μ m (YMC-Pack ODS-AM, 5 μ m, 250 x 4,6 mm).
- ✦ UV detekcija pri valovni dolžini 303 nm.
- ✦ Hitrost pretoka mobilne faze 1ml/min.
- ✦ Volumen injiciranja 20 μ l.

Za izračun sproščenega RSV smo upoštevali zmanjšanje volumna medija zaradi odvzema vzorcev (Enačba 1).

Enačba 1: Dejanski volumen medija

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

V_n - dejanski volumen medija po vzorčenju (ml)

V_o - začetni volumen medija (900 ml)

n - število odvzetih vzorcev

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

S pomočjo enačbe umeritvene premice smo izračunali koncentracijo RSV v času vzorčenja. 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 2*).

Enačba 2: Masa sproščenega RSV v dejanskem volumnu medija

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

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 mase sproščenega RSV in teoretične mase RSV v prašku oz. tableti (*Enačba 3*).

Enačba 3: Delež sproščenega RSV

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

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

m_o - teoretična masa RSV (mg)

3.2.8 Obdelava podatkov in statistična analiza

Podatke meritev smo zbrali in obdelali s pomočjo programa Microsoft Excel 2007. Prav tako smo ta program uporabili za izdelavo grafičnega prikaza podatkov. Podatke smo predstavili kot povprečja z vrednostjo standardnega odklona meritev (SD). Statistično analizo smo opravili s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 20.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA).

Za primerjavo rezultatov sproščanj enakih vzorcev smo uporabili test opisne statistike (ang. »Descriptive statistics«). Rezultate smo podali kot povprečno vrednost, standardni odklon ter interval zaupanja ob 95% tveganju. Standardni odklon je ena izmed mer razpršenosti oz. variabilnosti. Definiran je kot kvadratni koren iz variance, ki je prav tako ena izmed mer razpršenosti (38). Varianco analitično izračunamo s pomočjo enačbe 4:

Enačba 4: Izračun variance, katere kvadratni koren nam poda vrednost standardnega odklona

$$var(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Interval zaupanja, ki ga določata njegova spodnja in njegova zgornja meja, je interval, v katerem se z dano verjetnostjo nahaja ocenjevani parameter (39).

Analitična formula za izračun intervala zaupanja za aritmetično sredino je podana v enačbi 5:

Enačba 5: Izračun intervala zaupanja pri 5% tveganju

$$\bar{x} - \frac{1,96 \cdot se}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{1,96 \cdot se}{\sqrt{n}}$$

Pri formuli smo upoštevali 95 odstotno gotovost, oziroma 5 odstotno stopnjo tveganja ($\alpha=0,05$).

Nato smo s t-testom dveh neodvisnih vzorcev preverjali razlike med rezultati sproščanj praškov in tablet (ang. »Independent samples t-test«). Test je namenjen primerjavi aritmetičnih sredin dveh populacij (dveh skupin) in je sestavljen iz Levenovega testa enakosti dveh varianc (ang. »Levene's test of equality of variances«) in t-testa domneve o enakosti dveh aritmetičnih sredin za neodvisna vzorca (40). Za primerjavo rezultatov sproščanj RSV iz različnih nosilcev med seboj smo uporabili test analize varianc. Test je sestavljen Levenovega testa iz homogenosti varianc in testov ANOVA oz. Welch ANOVA. S slednjima smo izračunali domneve o enakosti aritmetičnih sredin večih populacij ter post hoc testi, ki so izračuni kazalcev posteriorne analize, dobili konkreten rezultat med katerimi vzorci obstajajo razlike.

3.2.9 Ugotavljanje kinetike sproščanja resveratrola

Z namenom določitve kinetike sproščanja smo izračunali ujemanje rezultatov testa sproščanja z naslednjimi matematičnimi modeli: kinetiko 0. reda (enačba 6), kinetiko 1. reda (enačba 7), Higucijevo kinetiko (enačba 8), kinetiko po Korsmejer-Peppasu (enačba 9) ter Hixon-Crowellovo kinetiko (enačba 10).

Enačba 6: Kinetika 0. reda

$$F = k_0 \times t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t, k_0 hitrostno konstanto 0.reda, t pa čas.

Enačba 7: Kinetika 1. reda

$$\ln(1 - F) = -k_1 \times t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t, k_1 hitrostno konstanto 1.reda, t pa čas.

Enačba 8: Higuchijeva kinetika

$$F = k_H \times t^{1/2}$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t, k_H Higucijevo konstanto, t pa čas.

Enačba 9: Kinetika po Korsmeyer-Peppasu

$$F = k_{KP} \times t^n$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t, k_{KP} Korsmeyer-Peppasovo konstanto, n Korsmeyer-Peppasov difuzijski eksponent, t pa čas.

Enačba 10: Hixon-Crowellova kinetika

$$(1 - F)^{1/3} = 1 - k_{HC} \times t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine v času 0 in t, k_{HC} pa Hixon-Crowellovo hitrostno konstanto sproščanja, t pa čas.

Podatke smo obdelali v programu MS Office Exel 2007 ter izračunali Pearsonove koeficiente korelacije. Rezultate smo podali kot konstanto sproščanja ter vrednost kvadrata Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

3.2.10 Diferenčna dinamična kalorimetrija

S pomočjo termične analize lahko proučujemo notranjo zgradbo trdnih in tekočih FO ter interakcije med zdravilno učinkovino in pomožnimi snovmi. Najpogosteje uporabljena metoda termične analize je diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. »Differential scanning calorimetry – DSC«) (slika 11). Osnova te metode je meritev temperaturne razlike med vzorcem in referenco pri segrevanju ali ohlajanju pri konstantni temperaturi. DSC nam omogoča ugotavljanje in merjenje temperature, toplotne kapacitete in entalpije oz. njihovih sprememb. Z njo lahko spremljamo polimorfizem, kinetiko reakcij ali razpadov ter steklasti prehod. Na podlagi tega lahko preverimo čistoto in kompatibilnost sestavin farmacevtskih oblik.



Slika 11: Diferenčni dinamični kalorimeter (DSC) s katerim smo izvedli termično analizo vzorcev.

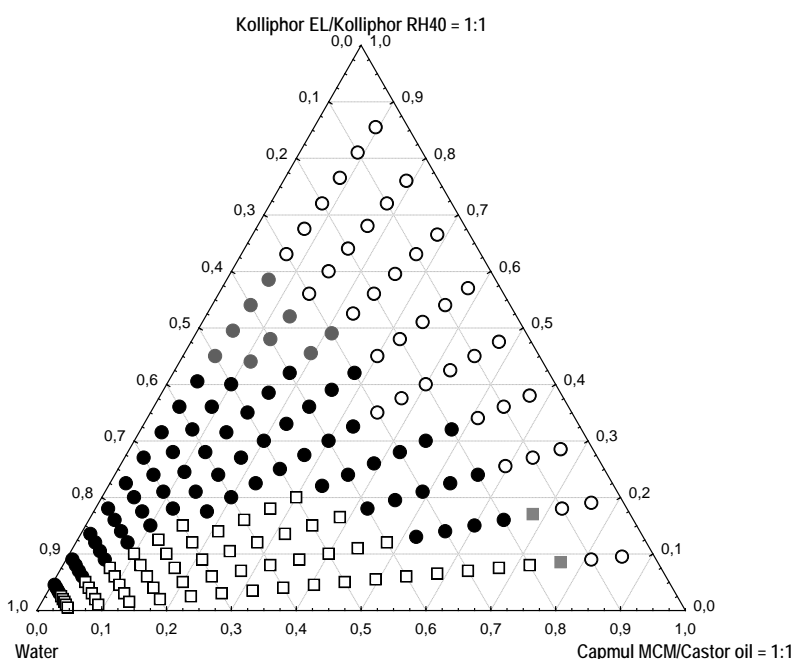
S termično analizo smo opazovali interakcije med sestavinami trdnih samomikroemulgirajočih sistemov. V ta namen smo v aluminijaste lončke natehtali 5 - 10 mg vzorca. Nato smo jih segrevali od 25 do 350°C s hitrostjo 20 K/min ob hitrosti prepihanja z dušikom 50 mL/min. Za referenco smo uporabili prazne aluminijaste lončke.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 (PSEVDO)TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM

Iz izbranih oljnih faz (Capmul MCM : Ricinusovo olje = 1:1) in emulgatorjev (Kolliphor EL : Kolliphor RH40 = 1:1) smo izdelali zmesi PAS in oljnih faz z različnimi deleži posameznih sestavin. Tem sistemom smo dodajali prečiščeno vodo v razmerju 5% m/m. PAS lahko povzročijo draženje sluznice prebavil, zato je bil naš cilj določiti in pripraviti zmes s čim manjšo koncentracijo PAS, ki pa bi bila ob dodatku vode še vedno sposobna tvoriti mikroemulzije po celotni razredčitveni premici (1).

S pomočjo računalniškega programa Statistica 7.0 smo dobili (psevdo)trikomponentni fazni diagram, ki je prikazan na sliki 12. Bele pike v diagramu prikazujejo mikroemulzije v/o, ki so v vseh vzorcih nastale po prvih dodatkih vode. Z večanjem deleža vode pride do zamenjave notranje in zunanje faze disperzije, nastanejo emulzije (beli kvadrati) oz. mikroemulzije o/v (črne pike). V določenih primerih smo opazili nastanek gela, ki je prikazan s sivimi pikami.



Slika 12: (Psevdo)trikomponentni fazni diagram. Točke (○) predstavljajo mikroemulzije v/o, točke (●) predstavljajo mikroemulzije tipa o/v, točke (◻) predstavljajo emulzije o/v, točke (◼) predstavljajo emulzijo v/o in točke (◼) področje nastanka gela.

Po vsakemu dodatku vode, smo dobljeni disperziji s kobaltovim papirjem določili tip emulzije. Vse disperzije so po začetnem dodatku vode mikroemulzije tipa v/o, potem pa sčasoma postanejo emulzije o/v. Iz slike 12 je razvidno, da je naš sistem tvoril mikroemulzije v/o vzdolž razredčitvenih premic, kjer je v vzorcu delež PAS vsaj 60% in delež dodane vode manj kot 20%. Ti vzorci po nadaljnem dodajanju vode postanejo mikroemulzije o/v.

V primerih, ko smo imeli več kot 70% PAS ter po dodatku približno 30% do 50% vode, smo opazili nastanek gela. Ta nastane pri dodajanju vode na prehodu disperzije tipa v/o v disperzijo tipa o/v. Bolko in sodelavci so pri izdelavi (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov opazili nastanek gela v primerih, kjer oljno fazo predstavlja ricinusovo olje. Slednji je sestavljen iz dolgoverižnih trigliceridov maščobnih kislin, ki omogočijo premreženje in nastanek gela. Capmul MCM je zmes srednjedolgoverižnih trigliceridov maščobnih kislin, ki se porazdelijo med dolgoverižne trigliceride in zato gel težje nastane. V primerih, kjer pride do nastanka gela, so opazili zakasnjeno sproščanje učinkovine (37). Na podlagi rezultatov raziskave lahko za naš primer predpostavimo, da gel nastane v primerih, kjer imamo manj oljne faze, predvsem Capmula MCM, ki onemogoči nastanek gela.

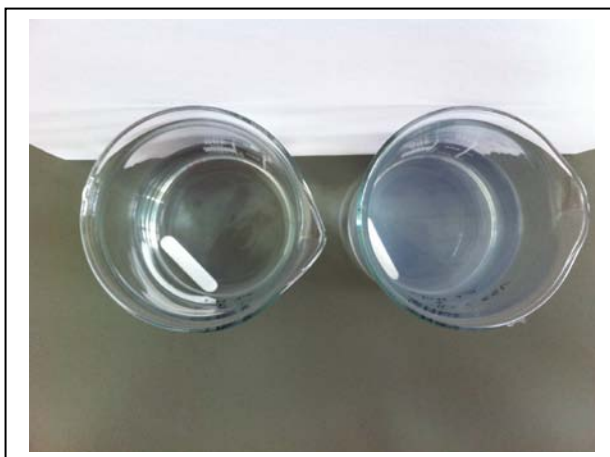
Glede na rezultate, prikazane v faznem diagramu, je najbolj primeren SMES s 40% oljne faze ter 60% PAS. Takšna količina PAS je sposobna tvoriti mikroemulzijo po celotni razredčitveni premici in v najmanjši meri vpliva na draženje sluznice prebavi. Prav tako ni nastanka gela, ki lahko zakasni sproščanje učinkovine (37).

4.2 VREDNOTENJE SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH LASTNOSTI

Trdni SMES mora ohraniti sposobnost samomikroemulgiranja in tvorbe majhnih kapljic, saj se tako izboljša adsorpcija in biološka uporabnost ZU. Samomikroemulgirajoče lastnosti smo vrednotili na podlagi merjenja velikosti kapljic pripravljenih disperzij. Mikroemulzije so po definiciji disperzije, pri katerih so velikosti kapljic notranje faze manjše do 50 oz. 100 nm(1,2).

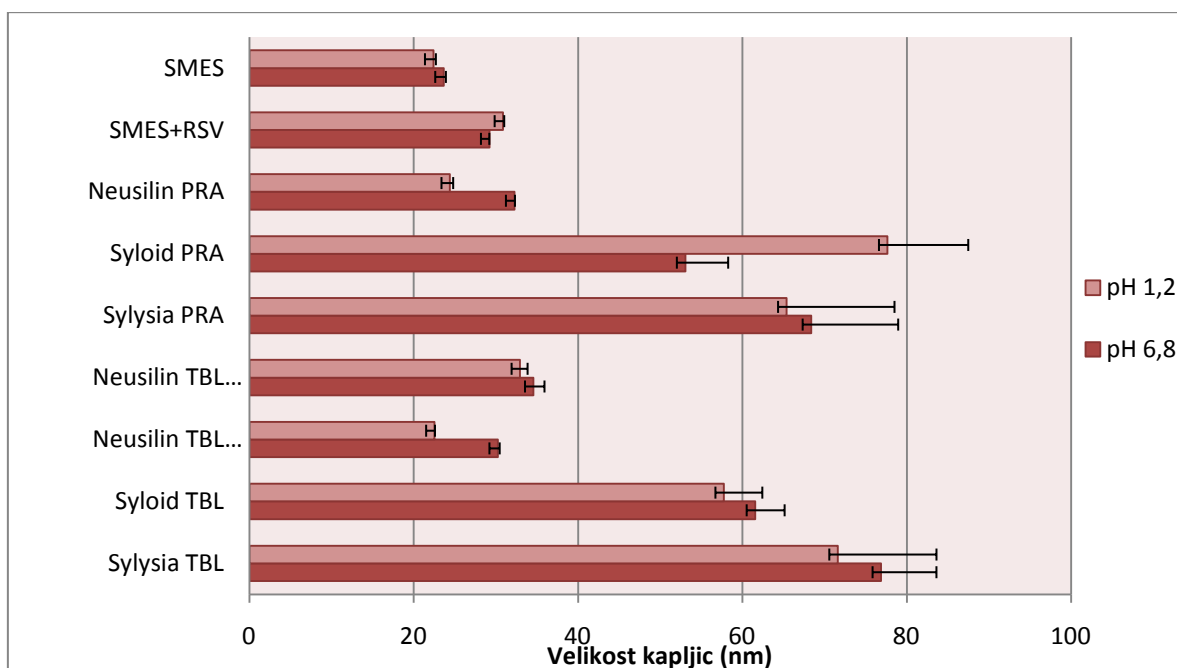
Tekoče SMES smo z adsorpcijo na različne trdne nosilce (Neusilin[®] US2, Syloid[®] 244FP, Sylysia[®] 350) pretvorili v trdne SMES praške, ki smo jih z dodatkom pomožnih snovi za

tabletiranje stisnili v SMES tablete. Pripravljene trdne formulacije smo dispergirali v dveh različnih medijih, v pufru s pH 1,2 ter v fosfatnem pufru pH 6,8. Nastale disperzije so bile bistre oz. rahlo opalescentne (slika 13). Dobljene rezultate smo primerjali z velikostjo kapljic po dispergiranju tekočega SMES-a ter SMES+RSV.



Slika 13: Disperzija tekoče formulacije SMES levo (bistra) ter SMES+RSV desno (rahlo opalescentna).

Slika 14 prikazuje velikosti kapljic disperzij v obeh medijih s standardnimi odkloni. Kapljice so bile manjše kot 100 nm, kar pomeni, da so nastale mikroemulzije. Najmanjše velikosti so bile kapljice dispergiranega tekočega SMES-a, 22 nm v pufru pH 1,2 ter 24 nm v pufru pH 6,8.



Slika 14: Povprečna velikost kapljic izmerjenih disperzijam v pufrih s pH 1,2 oz. pH 6,8 ter standardni odklon treh merite.

Že vgradnja RSV v SMES povzroči povečanje kapljice na 31 nm pri pH 1,2 ter 29 nm pri pH 6,8. Razlog je lahko v sestavi SMES+RSV, kjer imamo zaradi dodanega RSV (10 mg/100g zmesi) manj PAS, ki vplivajo na velikost kapljic nastale disperzije.

Po dispergiranju praškov in tablet smo dobili večje kapljice, ki pa so se razlikovale glede na nosilec. Najmanjšo velikost kapljic smo izmerili v disperzijah praškov in tablet, ki kot nosilec vsebujeta Neusilin[®] US2. Dispergirani praški z Neusilin-PRA v mediju s pH 1,2 so vsebovali kapljice velikosti 24 nm, pri pH 6,8 pa 32 nm. Tudi pri tabletah smo najmanjšo velikost kapljic disperzij opazili pri Neusilin-TBL. Disperzije tablet, ki smo jih naredili z ročnim tabletiranjem, so vsebovale kapljice velikosti 23 nm v mediju s pH 1,2 ter 30 nm v mediju s pH 6,8. Disperzije taktno stisnjenih tablet so vsebovale kapljice velikosti 33 nm v pufri s pH 1,2 oz. 35 nm v pufri s pH 6,8.. Disperzije praškov in tablet, ki vsebujejo Syloid[®] 244FP ter Sylysio[®] 350, so v primerjavi s vzorci z Neusilinom vsebovali večje kapljice, a še vedno so bile le-te manjše od 100 nm. Velikosti kapljic dispergiranih praškov in tablet z enakim nosilcem so se razlikovale v nekaj nm. Tako lahko predpostavimo, da proces tabletiranja ne vpliva na velikost kapljic dispergiranih tablet. Prav tako način tabletiranja nima vpliva na velikost kapljic dispergiranih tablet, saj so bile razlike med taktno in ročno stisnjenimi tabletami le nekaj nm.

Če primerjamo rezultate meritev velikosti kapljic disperzij v obeh medijih, so bile razlike nekaj nm (med 1,25 in 7,84). Izjema je le Syloid-PRA, kjer so razlike v velikosti kapljic disperzije med različnima pufroma večje.

Da bi preverili razpršenost porazdelitve velikosti kapljic, smo disperzijam določili še polidisperzni indeks (PDI). Bližje je PDI vrednost 0, bolj je porazdelitev homogena. Če pa se približa številu 1, je disperzija heterogena. V preglednici VIII so predstavljeni rezultati meritev razpršenosti velikosti kapljic disperzij (PDI) in standardni odkloni treh meritev.

Preglednica VIII: Rezultati PDI vrednosti velikosti kapljic in odkloni treh meritev glede na pH medija.

	PDI			
	pH 1,2	SD	pH 6,8	SD
SMES	0,0713	0,0294	0,1230	0,0151
SMES+RSV	0,1313	0,0105	0,0877	0,0142
Neusilin PRA	0,1570	0,0141	0,1757	0,0085
Syloid PRA	0,3170	0,0547	0,5810	0,0835
Sylysia PRA	0,3860	0,1155	0,5670	0,1691
Neusilin TBL-T	0,3467	0,0025	0,2623	0,0135
Neusilin TBL-R	0,0887	0,0071	0,1150	0,0115
Syloid TBL-R	0,4560	0,0594	0,4670	0,0180
Sylysia TBL-R	0,3910	0,1539	0,5303	0,1310

Vrednosti PDI so bile v obeh preskušanih medijih najnižje pri disperzijah tekočega SMES-a. V mediju s pH 1,2 je bila vrednost PDI 0,07, po vgraditvi RSV v tekoč SMES se je PDI vrednost povečala na 0,13. Najbolj homogene velikosti kapljic v pufru s pH 1,2 so bile disperzije Neusilin-TBL-R (0,09) in Neusilin-PRA (0,16), najvišjo vrednost PDI pa so imele disperzije Syloid-TBL (0,46). V mediju s pH 6,8 se je po vgraditvi RSV v tekoč SMES PDI vrednost znižala iz 0,12 na 0,09. Tudi v pufru s pH 6,8 so bile najbolj homogene disperzije Neusilin-TBL-R (0,12) in Neusilin-PRA (0,18), najmanj pa Syloid-PRA (0,58). Glede na rezultate meritev velikosti kapljic smo ugotovili, da na sposobnost samomikroemulgiranja najmanj vpliva Neusilin[®] US2. Po adsorpciji tekočega SMES-a na Neusilin[®] US2 se samomikroemulgirajoči učinek ohrani, velikosti kapljic pa se najmanj razlikujejo od kapljic dispergiranega tekočega SMES-a.

Večja velikost kapljic dispergiranih trdnih formulacij glede na disperzije tekočih SMES je lahko v afiniteti nosilca do PAS. Po dispergiranju v mediju ostane del PAS adsorbiran na netopnem nosilcu, ki ga po centrifugiranju odstranimo. V supernatantu je zato več oljne faze glede na PAS in posledično nastanejo večje kapljice. To so opazili tudi Speybroeck in sodelavci. Ti so ugotovili, da pride do adsorpcije Kolliphorja EL na nosilec Neusilin US2, ki povzroči višje razmerje med oljem in PAS. To ima vpliv na povečanje velikosti kapljic disperzij trdnih formulacij in posledično na vrednosti PDI (29). Kar smo opazili tudi pri

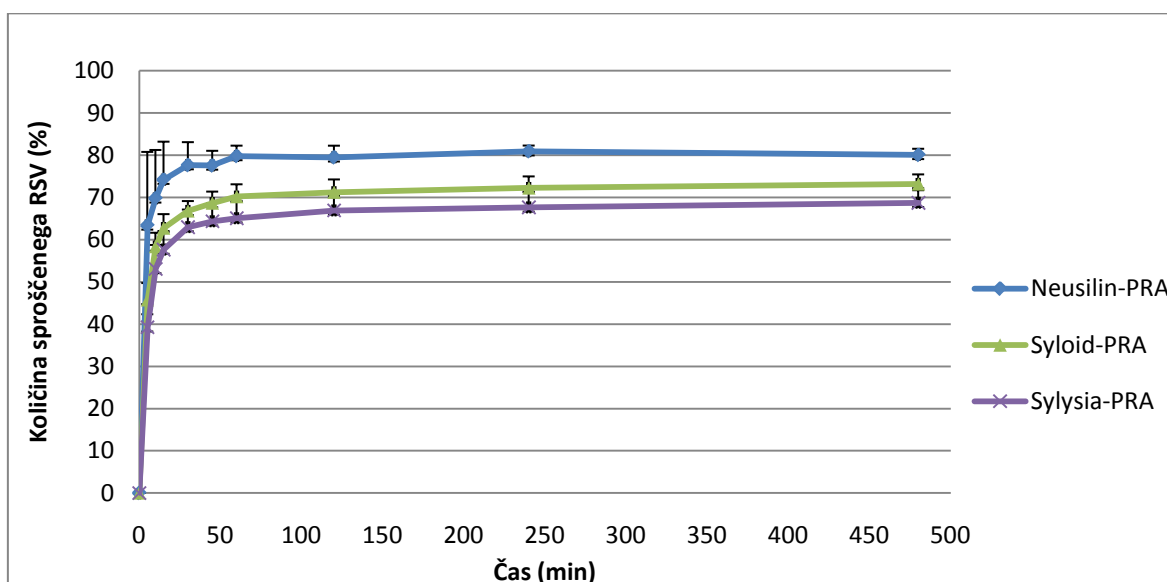
izdelavi (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, manjši kot je bil delež prisotnih PAS, večje so kapljice v disperziji.

4.3 REZULTATI *IN VITRO* SPROŠČANJA RESVERATROLA

Pri razvoju in izdelavi novih farmacevtskih oblik je profil sproščanja vanje vgrajene učinkovine zelo pomemben. Sproščanje RSV iz samomikroemulgirajočih praškov in tablet smo izvedli v pufru HCl s pH = 1,2 ter fosfatnem pufru s pH = 6,8.

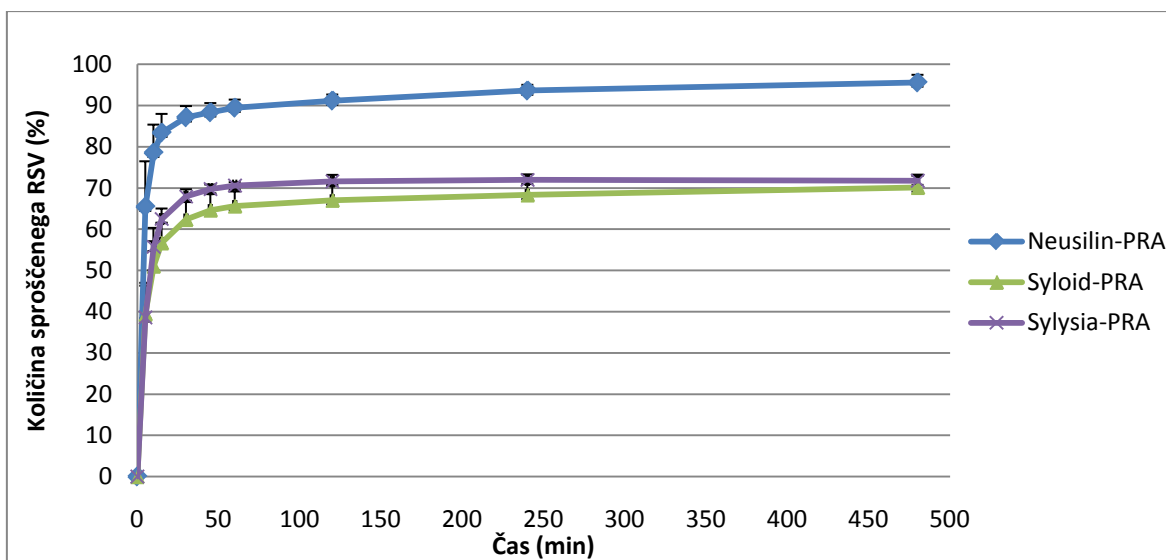
4.3.1 Sproščanje RSV iz SMES praškov

Na sliki 15 vidimo, da se je po 60 min sproščanja v pufru HCl s pH 1,2 največ RSV sprostilo iz praška Neusilin-PRA (~ 80%). Naslednjih 7 ur preskusa se količina RSV v mediju ni spremenila. V prvi uri sproščanja Syloid-PRA se je sprostilo pribl. 70% celotnega RSV, ki je bil prvotno v prašku. Po osmih urah sproščanja je bila količina sproščenega RSV iz Syloid-PRA manjša (~ 73%). v primerjavi s Neusilin-PRA Pri Sylysia-PRA se je največ RSV sprostilo v prvi uri sproščanja (~ 65%), po osmih urah sproščanja je bil delež sproščenega RSV ~ 68%.



Slika 15: Profili sproščanja RSV iz različnih SMES praškov v mediju s pH 1,2.

Nato smo naredili isti preskus še pri fosfatnem pufru s pH 6,8. Rezultati sproščanj so prikazani na sliki 16. Tudi pri tem pufru se je največ RSV sprostil iz Neusilin-PRA. V 8 urah min se je sprostil ~ 96% RSV, medtem ko se je iz Syloid-PRA in Sylysia-PRA sprostil manj RSV (~ 70%). Kot pri rezultatih sproščanja RSV v pufru s pH 1,2 smo tudi v pufru s pH 6,8 opazili, da se v vseh primerih največ učinkovine sprosti v prvih 60 minutah sproščanja, nato pa koncentracija RSV v vzorcu zelo počasi narašča.



Slika 16: Količina sproščenega RSV iz SMES praškov v fosfatnem pufru s pH 6,8.

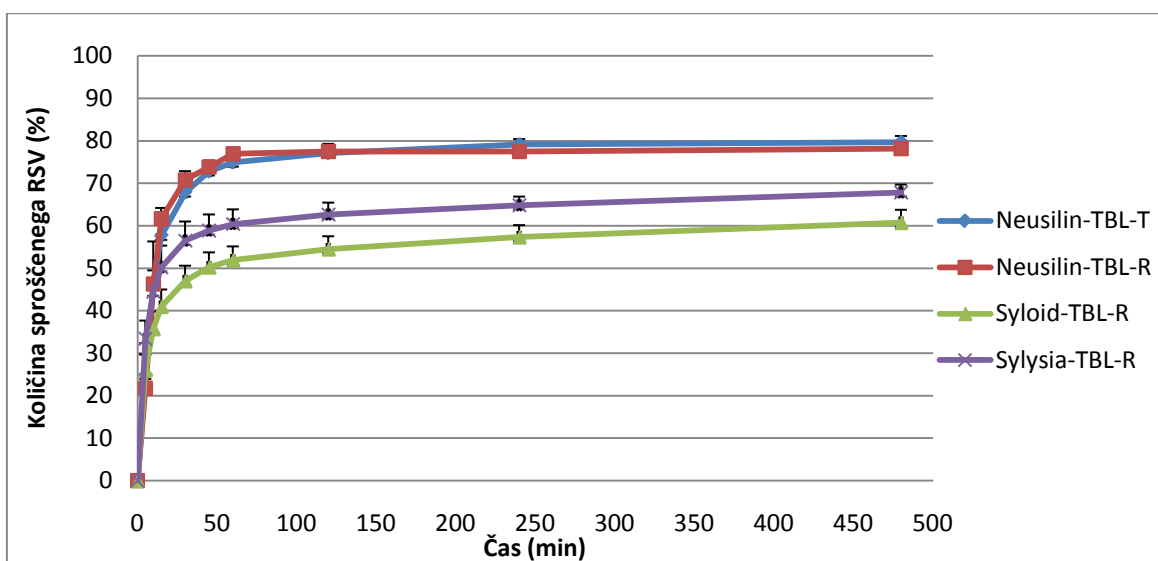
V obeh preskušanih medijih se največ RSV sprosti iz praškov, ki kot nosilec vsebujejo Neusilin® US2. Opazili smo, da se v pufru s pH sprosti 80% RSV, medtem ko v mediju s pH 6,8 sprosti kar 96% vgrajenega RSV. Razlog tega je lahko topnost RSV, saj je kot šibka kislina RSV bolje topen v pufru s pH 6,8. Syloid® 244FP in Sylysia® 350 imata podobno kemijsko strukturo, zato smo pričakovali podobno obnašanje v medijih, kar naši rezultati sproščanja tudi podpirajo. Iz nobenega SMES praška se ni sprostil ves vgrajen RSV. Če primerjamo sproščanje RSV iz tekočega SMES, kjer se sprosti celotna količina RSV, pridemo do ugotovitve, da adsorpcija na trdne nosilce zmanjša količino sproščene učinkovine. Nepopolno desorpcijo iz praškov so ugotovili tudi Speybroek in sodelavci, ki so primerjali sproščanje učinkovine danazol iz tekočega SES-a in iz SES-a adsorbiranega na Neusilin® US2. Opazili so ~ 35% manj sproščenega danazola iz praškov, ki so kot nosilec vsebovale Neusilin® US2. Kot najverjetnejši razlog so navedli nepopolno desorpcijo emulgatorjev in vanj vgrajene učinkovine. Ugotovili so, da se po adsorpciji SES-a na nosilec Neusilin® US2 in kasnejšem dispergiranju zmanjša solubilizacijska

kapaciteta za danazol v primerjavi z dispergiranim tekočim SES-om (29). V naši raziskavi smo pri sproščanju opazili ~ 20% (v pufru s pH 1,2) oz. ~ 5% (v pufru s pH 6,8) manj sproščenega RSV primerjavi s sproščanjem RSV iz tekočih formulacij, kar je manjša razlika kot so jo opazili Speybroek in sodelavci.

4.3.2 Sproščanje RSV iz SMES tablet

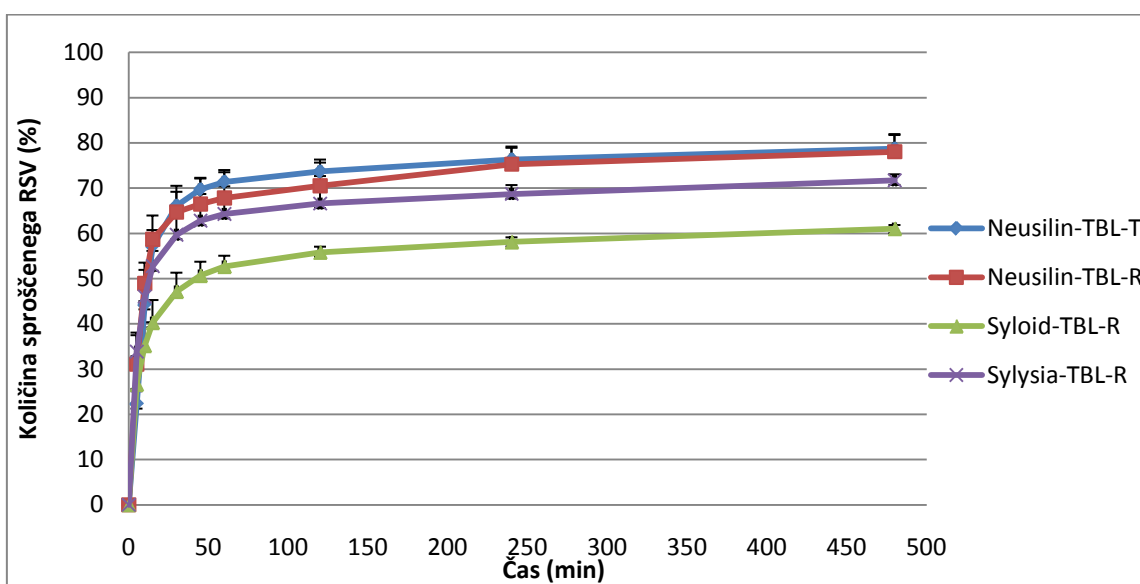
Nato smo SMES praškom dodali pomožne snovi za tabletiranje in stisnili tablete. Sproščanja smo izvajali v enakih pogojih kot praške. S testom smo želeli preveriti, če se razlike v sproščanju praškov z različnimi nosilci odražajo tudi pri tabletah. Prav tako nas je zanimalo, ali dodatek pomožnih snovi za tabletiranje in sam proces tabletiranja vplivata na količino sproščenega RSV.

Najprej smo izvedli test v pufru s pH 1,2, rezultate prikazuje slika 17. Največ RSV se je sprostil iz Neusilin-TBL-T (~80%), iz Neusilin-TBL-R pa nekoliko manj (~ 78%). Iz Syloid-TBL in Sylysia-TBL je se v 8 urah sprostil ~ 61% oz. ~ 68% celotne količine RSV. Profil sproščanja in količina sproščenega RSV se med ročno in taktno stisnjenimi tabletami z Neusilinom ni razlikovala. Če primerjamo rezultate sproščanj RSV iz SMES praškov in tablet pri pufru pH 1,2 opazimo, da se je količina sproščenega RSV najbolj zmanjšala pri serijah tablet, ki so vsebovale nosilec Syloid[®] 244FP (iz ~ 70% na ~ 60%). Pri nosilcih Neusilin[®] US2 in Sylysia[®] 350 ni bilo opaziti tako velikih razlik, količina sproščenega RSV se zmanjša le za približno 4%.



Slika 17: Sproščanje RSV iz serij SMES tablet v HCl pufru s pH 1,2.

Po 8 urah se je v fosfatnem pufru največ RSV sprostito iz serij Neusilin-TBL-T in Neusilin-TBL-R (~ 78%) (slika 18). Ker je bila količina sproščenega RSV pri obeh serijah tablet z Neusilinom enaka, lahko predpostavimo, da način tabletiranja ne vpliva na sproščanje RSV. Iz tablet Sylysia-TBL-R se je v 8 urah sprostito ~ 73% učinkovine, medtem ko se je iz Syloid-TBL-R sprostito le ~ 60% RSV. V primerjavi s SMES praški se količina sproščenega RSV najbolj zniža pri tabletah, ki kot nosilec vsebujejo Neusilin® US2. Iz dobljenih rezultatov je razvidno tudi, da se RSV iz tablet sprosti počasneje kot pri praških.



Slika 18: Delež sproščenega RSV serij SMES tablet v mediju s pH 6,8.

Sander in sodelavci so v svoji raziskavi preverjali vpliv vgradnje SMES v tablete. Tekoči sistem so adsorbirali na nosilec Neusilin US2 ter ga z dodatkom razgrajevala ter magnezijevega stearata tabletirali. Ugotovili so, da adsorpcija tekočega SMES-a na Neusilin® US2 zmanjša učinkovitost sproščanja ciklosporina A za 15%, medtem ko se je z izdelavo tablet količina sproščene učinkovine zmanjšala za 40% (41). V primerjavi z našimi rezultati, kjer smo dobili ~ 20% manj sproščenega RSV iz Neusilin-TBL, lahko sklepamo, da na delež sproščene učinkovine poleg nosilca vpliva proces tabletiranja. Bolko in sodelavci so preverili topnost RSV v različnih PAS ter oljnih komponentah. Ugotovili so, da je topnost RSV v emulgatorju Kolliphor RH40 20,5 mg/100 mg zmesi ter v Kolliphor EL 17,5 mg/100mg zmesi. Medtem ko je topnost v ricinusovem olju in Capmul MCM topnost le ~ 1mg/100mg zmesi (37).

Glede na rezultate merjenj velikosti kapljic disperzij in sproščanja RSV iz trdnih formulacij nam lahko sklepamo, da je afiniteta nosilcev do PAS vzrok nastanka večjih kapljic disperzij. Hkrati pa je boljša topnost RSV v PAS lahko vzrok nepopolnega sproščanja RSV iz SME praškov in tablet. PAS tako ostanejo adsorbirane na nosilcu, prav tako pa v PAS raztopljen RSV.

4.4 STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV SPROŠČANJ

S statistično analizo rezultatov lahko preverimo, če so razlike med vzorci statistično različne. S pomočjo programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) smo analizirali ter statistično preverili rezultate sproščanj RSV iz SMES praškov in tablet.

Najprej smo naredili test opisne statistike vzorcev. Izvedli smo 10 poskusov sproščanj vsake farmacevtske oblike v obeh medijih. Iz rezultatov sproščanj smo izračunali povprečen delež RSV, ki se je sprostil po 8 urah, standardni odklon ter interval zaupanj pri 5% tveganju.

V preglednici IX so rezultati sproščanj v mediju s pH 1,2. Vse točke so bile znotraj izračunanega 95% intervala zaupanja, izjema je le en vzorec pri Neusilin-PRA.

Preglednica IX: Rezultati testa opisne analize vzorcev v pufru s pH 1,2, povprečne vrednosti sproščenega RSV, standardni odklon ter interval zaupanja pri 5% tveganju.

VZOREC	Povprečna vrednost [%]	Standardni odklon	Interval zaupanja ($\alpha=0,05$)	
			Spodnja meja	Zgornja meja
Neusilin-PRA	80,06	1,4449	79,0336	81,1009
Syloid-PRA	73,18	2,2587	71,1874	74,8031
Sylysia-PRA	68,72	2,9746	66,5980	70,8538
Neusilin-TBL-T	79,67	1,4613	78,8592	80,5297
Neusilin-TBL-R	78,16	0,4995	77,8083	78,5230
Syloid-TBL-R	60,75	2,9999	58,6093	62,9014
Sylysia-TBL-R	67,85	1,8416	66,5333	69,1682

Pri mediju s pH 6,8 se vsi rezultati nahajajo znotraj pričakovanega 95% intervala zaupanja, rezultati so predstavljeni v preglednici X.

Preglednica X: Rezultati statistične analize v pufru s pH 6,8, povprečne vrednosti sproščenega RSV, standardni odklon ter interval zaupanja pri 5% tveganju.

VZOREC	Povprečna vrednost [%]	Standardni odklon	Interval zaupanja ($\alpha=0,05$)	
			Spodnja meja	Zgornja meja
Neusilin-PRA	95,5855	1,8793	94,2411	96,9299
Syloid-PRA	70,1365	2,8051	68,1299	72,1432
Sylisia-PRA	71,7710	1,4796	70,7126	72,8294
Neusilin-TBL-T	78,7434	3,2062	76,4499	81,0370
Neusilin-TBL-R	78,0453	3,7014	75,3975	80,6931
Syloid-TBL-R	61,0621	0,7914	60,4960	61,6283
Sylisia-TBL-R	71,7162	1,3434	70,7552	72,6772

4.4.1 Testiranje razlik med rezultati sproščanj praškov in tablet

Nato smo s t-testom dveh neodvisnih vzorcev (ang. »Independent samples t-test«) preverjali razlike med sproščanji praškov in tablet (preglednica XI). Pogoj t-testa je rezultat homogenosti oz. nehomogenosti varianc, ki ga dobimo s Levenovim testom.

Preglednica XI: Analiza rezultatov homogenosti varianc s Levenovim testom ter razlike v sproščanju med praški in tabletami s t-testom dveh neodvisnih vzorcev.

Vzorec	pH medija	Levenov test homogenosti varianc		T-test dveh neodvisnih vzorcev		
		F	Sig. (p)	t	Df	Sig (p)
Neusilin-T	pH 1,2	0,318	0,580	0,602	18	0,555
Neusilin-R	pH 1,2	3,115	0,095	3,933	18	0,001
Syloid	pH 1,2	1,069	0,315	10,469	18	0,0001
Sylisia	pH 1,2	2,237	0,152	0,719	18	0,439
Neusilin-R	pH 6,8	5,820	0,027	13,362	13,351	0,0001
Neusilin-T	pH 6,8	1,654	0,215	14,331	18	0,0001
Syloid	pH 6,8	16,059	0,001	9,846	10,424	0,0001
Sylisia	pH 6,8	0,260	0,616	0,087	18	0,932

Glede na Levenov test homogenosti varianc so predpostavljene variance homogene ($p < 0,05$) v primeru Neusilin-R ($p = 0,027$) ter Syloid ($p = 0,001$). Iz t-testa dobimo rezultat

o signifikantnih razlikah med sproščanji praškov in tablet pri določenem pH mediju. Pri pH 1,2 so bile razlike statistično signifikantne ($p < 0,05$) v primerih Neusilin-R ($p = 0,001$) in Syloid ($p = 0,0001$). Med rezultati sproščanj v mediju s pH 6,8 pa pri vzorcih Neusilin-T ($p = 0,0001$), Neusilin-R ($p = 0,0001$) in Syloid ($p = 0,0001$). Razlike v sproščanju RSV iz ostalih vzorcev niso statistično signifikantne.

4.4.2 Testiranje razlik med rezultati sproščanj v različnih pufrih

Prav tako smo s t-testom dveh neodvisnih vzorcev primerjali rezultate sproščanj med pufroma pH 1,2 ter pH 6,8. V preglednici XII so navedeni rezultati analize. Variance so homogene ($p < 0,05$) v primerih Neusilin-TBL-R ($p = 0,0001$) ter Syloid-TBL ($p = 0,003$). Razlike so bile signifikantne ($p < 0,05$) v primerih sproščanj RSV iz vzorcev Neusilin-PRA ($p = 0,0001$), Syloid-PRA ($p = 0,015$), Sylysia-PRA ($p = 0,010$) ter Sylysia-TBL ($p = 0,0001$).

Preglednica XII: Rezultati Levenovega testa homogenosti varianc in analize s t-testom neodvisnih vzorcev za preverjanje vpliva pufru na količino sproščenega RSV iz praškov in tablet.

Vzorec	Levenov test homogenosti varianc		T-test dveh neodvisnih vzorcev		
	F	Sig. (p)	t	df	Sig (p)
Neusilin-PRA	1,591	0,223	-2,701	18	0,0001
Syloid-PRA	1,101	0,308	2,679	18	0,015
Sylysia-PRA	3,526	0,077	-2,898	18	0,010
Neusilin-TBL-T	3,414	0,081	0,837	18	0,413
Neusilin-TBL-R	21,996	0,0001	0,102	9,328	0,921
Syloid-TBL-R	11,764	0,003	-0,313	10,247	0,761
Sylysia-TBL-R	0,375	0,548	5,362	18	0,0001

4.4.3 Testiranje razlik rezultatov sproščanj med vzorci nosilcev

S testoma ANOVA ter Welch ANOVA smo preizkušali domnevo o aritmetični sredini več vzorcev. Preverjali smo statistične razlike v količini sproščenega RSV med različnimi nosilci. Predpogoj testa je rezultat homogenosti oz. nehomogenosti varianc. V primeru homogenih varianc smo za testiranje razlik med vzorci uporabili test ANOVA ter za testiranje razlik dveh vzorcev Post hoc test Bonferroni. Če so bile variance nehomogene, smo testiranje opravili po testu ANOVA Welch ter s Post hoc testom Games-Howell.

PRAŠKI

Za preverjanje razlik med praški smo najprej preverili homogenost varianc z Levenovim testom, saj nam rezultat le-tega pove, katere teste je potrebno uporabiti za nadaljnjo analizo. Dovolj je, da za statistično obravnavo upoštevamo vrednost p (Sig.), saj je izračunana iz ostalih vrednosti, ki so predstavljene v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Rezultati Levenovega testa homogenosti varianc rezultatov sproščanj praškov in rezultati testa ANOVA, ki nam podajo razlike v količini sproščenega RSV med preskušeni SME praški.

	Levenov test homogenosti varianc				ANOVA			
	Statistic	df 1	df 2	Sig.(p)	Sum square	df	F	Sig.(p)
pH 1,2	2,496	2	27	0,101	797,214	29	61,064	0,0001
pH 6,8	3,327	2	27	0,051	4180,460	29	447,939	0,0001

Rezultati Levenovega testa dokazujejo, da so variance nehomogene ($p > 0,05$). Zato smo za iskanje razlik med posameznimi praški uporabili test ANOVA ter Post hoc test Bonferroni (preglednica XIV).

Preglednica XIV: Rezultati Bonferroni testa primerjave posameznih sproščanj RSV iz različnih nosilcev SME praškov.

BONFERRONI TEST		Sig. (p)
pH 1,2	Neusilin - Syloid	0,0001
pH 1,2	Neusilin - Sylaysia	0,0001
pH 1,2	Syloid - Sylaysia	0,001
pH 6,8	Neusilin - Syloid	0,0001
pH 6,8	Neusilin - Sylaysia	0,0001
pH 6,8	Syloid - Sylaysia	0,292

Post hoc testi (Bonferroni) so pokazali, da so statistično signifikantne razlike ($p < 0,05$) med vsemi kombinacijami nosilcev pri sproščanju v mediju s pH 1,2 ($p = 0,001$ oz. $p = 0,0001$); v mediju s pH 6,8 pa so statistično signifikantne razlike pri sproščanju Neusilin-PRA in Syloid-PRA ($p = 0,0001$) ter Neusilin-PRA in Sylaysia-PRA ($p = 0,0001$), medtem ko med Syloid-PRA in Sylaysia-PRA ni signifikantnih razlik v sproščanju ($p = 0,292$).

TABLETE

Za iskanje razlike med sproščanji serij tablet smo najprej preverili s homogenost varianc z Levenovim testom. V preglednici XV vidimo, da so bile variance homogene ($p < 0,05$) v obeh preizkušeni medijih ($p = 0,001$). Zato smo za nadaljnjo testiranje razlik med sproščanji uporabili Welch ANOVA test ter Post hoc test Games-Howell.

Preglednica XV: Rezultati Levenovega testa homogenosti varianc rezultatov sproščanj tablet ter rezultati testa Welch ANOVA, ki nam podajo razlike v količini sproščenega RSV med preskušeni SME tabletami

	Levenov test homogenosti varianc				ANOVA Welch			
	Statistic	df 1	df 2	Sig.(p)	Statistic	df 1	df 2	Sig.(p)
pH 1,2	6,432	3	36	0,001	218,970	3	16,728	0,0001
pH 6,8	6,622	3	36	0,001	249,655	3	17,766	0,0001

V preglednici XVI so prikazani rezultati testa Games-Howell, s katerim preverimo razlike med posameznimi serijami tablet. Razlike so statistično signifikantne, če je $p < 0,05$. Rezultati testa so pokazali, da so v primeru sproščanja tablet v mediju s pH 1,2 statistične razlike med vsemi serijami tablet ($p = 0,0001$). V mediju s pH 6,8 so razlike med vsemi serijami tablet ($p = 0,002$ oz. $p = 0,0001$) z izjemo Neusilin-T in Neusilin-R, kjer ni statistično signifikantne razlike v sproščanju ($p = 0,969$).

Preglednica XVI: Rezultati Games-Howell testa primerjave posameznih sproščanj RSV iz serij SME tablet v medijih s pH 1,2 in pH 6,8.

GAMES-HOWELL TEST		Sig. (p)
pH 1,2	Neusilin T – Neusilin R	0,0001
pH 1,2	Neusilin T – Syloid	0,0001
pH 1,2	Neusilin T - Sylysia	0,0001
pH 1,2	Neusilin R - Syloid	0,0001
pH 1,2	Neusilin R – Sylysia	0,0001
pH 1,2	Sylysia - Syloid	0,0001
pH 6,8	Neusilin T – Neusilin R	0,969
pH 6,8	Neusilin T – Syloid	0,0001
pH 6,8	Neusilin T - Sylysia	0,0001
pH 6,8	Neusilin R - Syloid	0,0001
pH 6,8	Neusilin R – Sylysia	0,002
pH 6,8	Sylysia - Syloid	0,0001

4.5 KINETIKA SPROŠČANJA RESVERATROLA

Da bi mehanizme, ki vplivajo na sproščanje RSV iz preučevanih formulacij še podrobneje razložili, smo izračunali ujemanje eksperimentalnih rezultatov testa raztapljanja z enačbami, ki opisujejo različne kinetike sproščanj: 0. Red (enačba 6), 1. Red (enačba 7), Higucijeva kinetika, ki opisuje sproščanje po difuziji (enačba 8), kinetika po Korsmeyer-Peppasu (enačba 9), ki upošteva več vplivov ter kinetika po Hixon-Crowellu (enačba 10), ki upošteva zmanjšanje površine formulacij med sproščanjem.

Vrednost eksponenta n (naklon) v Korsmeyer-Peppasovi enačbi predpostavlja različne mehanizme sproščanja. V primeru sproščanja odvisnega od difuzije (t. i. Fickovega sproščanja) je n za cilindrične oz. sferične oblike $\leq 0,43$. Če je vrednost n med 0,43 ter 0,85, govorimo o ne-Fickovi kinetiki sproščanja, ki je odvisna tako od difuzije kot tudi od relaksacije matriksa. Pri sproščanju, ki je odvisno od relaksacije matriksa (ang. »Case II transport«), ima eksponent n vrednost 0,85 za sfere. Vrednosti $n > 0,85$ za formulacije povezujemo s posebnim primerom kinetike, kjer na mehanizem sproščanja vpliva povečana plastičnost viskozne bariere - t.j. polimernega gela, ki se relaksira (ang. »Super Case II transport«) (42).

Za izračun ujemanja smo uporabili eksperimentalne podatke iz testa sproščanja v medijih s pH 1,2 ter pH 6,8. Rezultati so prikazani v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Pearsonovi koeficienti korelacije ter konstante sproščanja RSV iz SE praškov in tablet v pufri HCl s pH 1,2 za različne preizkušane enačbe kinetik sproščanja.

Formulacija	0.RED		1.RED		HIXSON-CROWELL		HIGUCHI		KORSMEYER-PEPPAS	
	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²
Neusilin-PRA	1,9568	0,4861	-0,0127	0,7335	-0,0483	0,5722	14,208	0,7976	0,1153	0,9672
Syloid-PRA	1,7994	0,5761	-0,0137	0,6877	-0,0401	0,6491	12,519	0,868	0,2098	0,8998
Sylisia-PRA	1,7460	0,6271	-0,0177	0,624	-0,0377	0,6975	11,859	0,9005	0,2609	0,9078
Neusilin-TBL-T	2,1269	0,8100	-0,0162	0,9072	-0,0473	0,8773	13,151	0,9639	0,5586	0,9064
Neusilin-TBL-R	2,2931	0,8214	-0,0181	0,9085	-0,0522	0,8821	13,959	0,9474	0,6625	0,8850
Syloid-TBL-R	1,3501	0,7107	-0,0082	0,785	-0,0261	0,7604	8,8332	0,9468	0,3301	0,9579
Sylisia-TBL-R	1,5944	0,6761	-0,0107	0,773	-0,0328	0,7407	10,596	0,9294	0,2942	0,9528

Rezultati testa sproščanja v mediju s pH 1,2 Neusilin-PRA so se najboljše ujemali ($R^2 = 0,97$) s kinetiko sproščanja po modelu Korsmeyer-Peppas. Vrednost eksponenta n je znašala 0,12, kar nakazuje na difuzijsko nadzorovano sproščanje. Tudi ostale preizkušane formulacije praškov Syloid-PRA in Sylysia-PRA so se najboljše ujemale s kinetiko sproščanja po Korsmeyer-Peppasu (0,90 ter 0,91), kjer sta eksponenta n (0,21 in 0,26) nakazovala na difuzijsko nadzorovano sproščanje. Rezultate potrjuje tudi dejstvo, da smo v vseh praških opazili dobro ujemanje s Higuchijevim modelom kinetike sproščanja (R^2 od 0,80 do 0,90), kjer na mehanizem prav tako vpliva difuzija.

Podobno kot pri praških lahko tudi pri SMES tabletah predpostavimo, da je difuzija glavni mehanizem, ki nadzira sproščanje. Pri vzorcih Neusilin-TBL-T ter Neusilin-TBL-R so se vrednosti R^2 najbolj približale modelu kinetike po Higuchiju (0,96 oz 0,95). Pri rezultatih kinetike v pufru s pH 1,2 kot tudi v pufru s pH 6,8 so se Syloid-TBL-R in Sylysia-TBL-R najboljše ujemale s kinetiko Korsmeyer-Peppas (0,96 in 0,95). Vrednost eksponenta n je 0,33 oz. 0,29, tako da lahko tudi tu predpostavimo difuzijsko nadzorovano sproščanje.

V preglednici XVIII so navedeni podatki za sproščanje v mediju s pH 6,8.

Preglednica XVIII: Konstante sproščanja ZU iz SE praškov in tablet v fosfatnem pufru s pH 6,8 ter Pearsonovi koeficienti korelacije za različne preizkušane enačbe kinetik sproščanja.

Formulacija	0.RED		1.RED		HIXSON-CROWELL		HIGUCHI		KORSMEYER-PEPPAS	
	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²	naklon	r ²
Neusilin-PRA	2,2708	0,524	-0,0261	0,7296	-0,0646	0,6544	16,201	0,8301	0,1592	0,8986
Syloid-PRA	1,7253	0,6355	-0,0124	0,7465	-0,0371	0,7089	11,679	0,9064	0,2559	0,9435
Sylysia-PRA	1,9403	0,6626	-0,015	0,7795	-0,0437	0,7408	12,952	0,9189	0,3136	0,8920
Neusilin-TBL-T	2,1076	0,8158	-0,0156	0,9001	-0,0462	0,8742	12,933	0,9561	0,6085	0,8956
Neusilin-TBL-R	1,9338	0,7300	-0,0143	0,8294	-0,0423	0,7976	12,481	0,9465	0,4105	0,8999
Syloid-TBL-R	1,3453	0,7168	-0,0082	0,795	-0,026	0,7691	8,7821	0,9506	0,3199	0,9791
Sylysia-TBL-R	1,7056	0,6965	-0,0119	0,8019	-0,0359	0,7671	11,23	0,9398	0,3175	0,9528

Rezultati testa sproščanja Neusilin-PRA ($R^2 = 0,90$), Syloid-PRA ($R^2 = 0,94$), Syloid-TBL ($R^2 = 0,98$) in Sylysia-TBL ($R^2 = 0,95$) so se najboljše ujemali s kinetiko modela Korsmeyer-Peppas. Pri Sylysia-PRA ($R^2 = 0,92$) ter Neusilin-TBL ($R^2 = 0,96$) pa se kinetika sproščanja

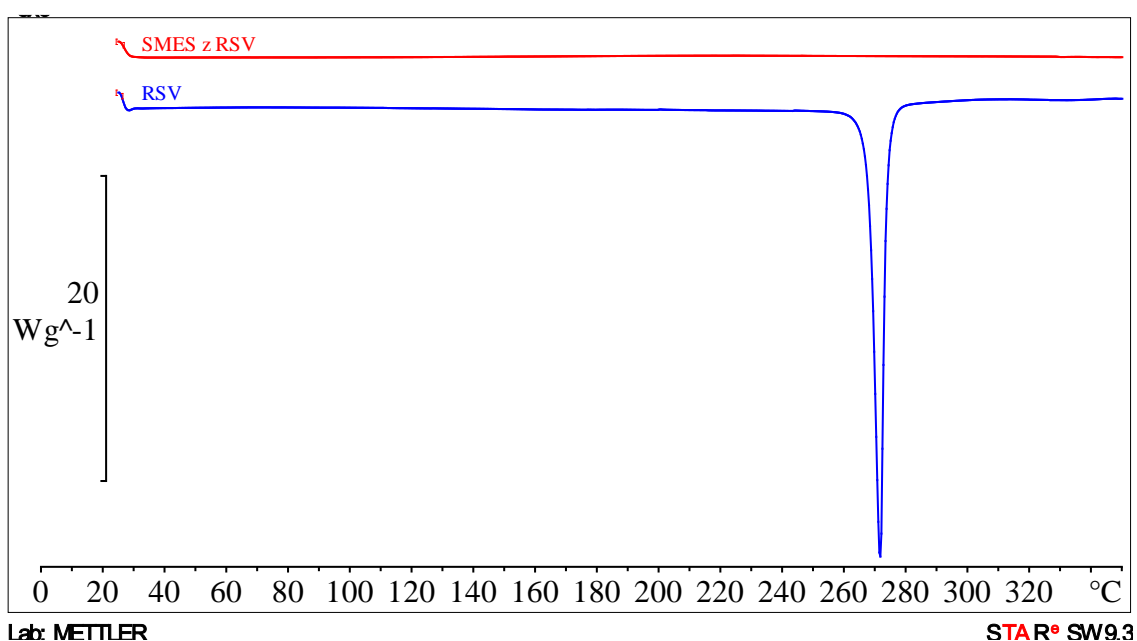
najbolj približa modelu po Higuchiju. Visoke vrednosti Pearsonovega koeficienta pri obeh modelih, Higuchi ter Korsmejer-Peppas ter vrednost eksponenta $n < 0,43$ pri modelu Korsmejer-Peppas, nakazujejo na difuzijsko nadzorovano sproščanje.

Ugotavljanje kinetike sproščanja RSV so ugotavljali Bolko in sodelavci. Pripravili so SMES iz različnih kombinacij Kolliphorja[®] RH40, Kolliphorja[®] RH60, Kolliphorja[®] EL, Capmula[®] MCM in ricinusovega olja. V pripravljene sisteme so vgradili RSV ter spremljali sproščanje učinkovine iz tekočih formulacij, polnjenih v trdne želatinaste kapsule. Pri preverjanju kinetike so sistemi najboljše korelirali s kinetiko Higuchi (R^2 med 0,90 in 0,97). Glede na to, da so ti sistemi vsebovali enake oz. podobne sestavine kot naš SMES, lahko predpostavimo, da z adsorpcijo tekočih sistemov na trdne nosilce nismo vplivali na mehanizem sproščanja RSV (37).

4.6 DIFERENČNA DINAMIČNA ANALIZA (DSC)

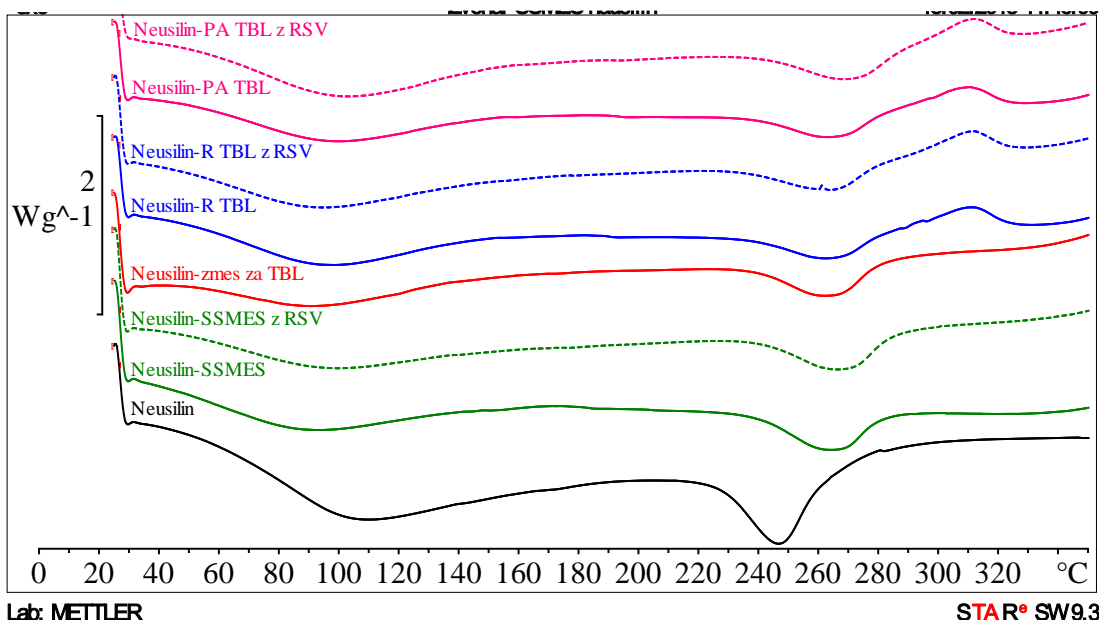
Posneli smo DSC termograme čistega RSV v prahu, SMES z RSV, trdnih poroznih nosilcev in SMES praškov in tablet.

Na DSC termogramu RSV na sliki 19 vidimo oster endotermni vrh pri okoli 270 °C, ki ustreza taljenju kristalinične strukture pri 267 °C. Isailovič in sodelavci so prav tako ugotovili ozek endotermni vrh RSV pri enakih pogojih (43). Pri analizi SMES z vgrajenim RSV nismo določili omenjenega endotermnega vrha kar potrjuje, da je bila učinkovina popolnoma raztopljena v SMES-u.



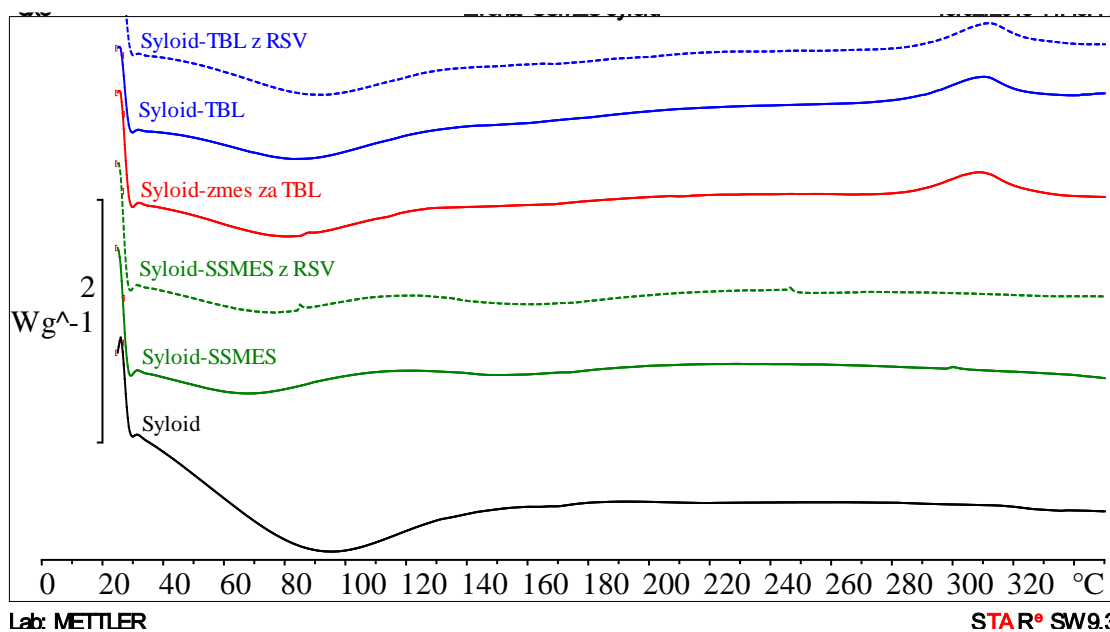
Slika 19: Termogrami RSV in tekoče formulacije SMES s vgrajenim RSV.

Na sliki 20 so prikazani rezultati termične analize Neusilina US2 ter različnih formulacij s tem nosilcem. Pri termogramu Neusilina vidimo prvi endotermni vrh pri 100 °C, kjer pride do odparevanja vode (44) ter še en endotermni vrh pri približno 250 °C. Pri termogramih različnih vzorcev s Neusilinom prav tako vidimo samo dva endogena vrha. Krupa in sodelavci so v svoji raziskavi posneli DSC spekter Neusilina, ter dobili podoben termogram; endogena vrhova pri pribl. 100 °C ter pri 260 °C (45). Endogeni vrh pri pribl. 250 °C opazimo tako na termogramu vzorcev brez in z RSV, zato sklepamo, da ta vrh ni vzrok prisotnosti RSV v vzorcu.

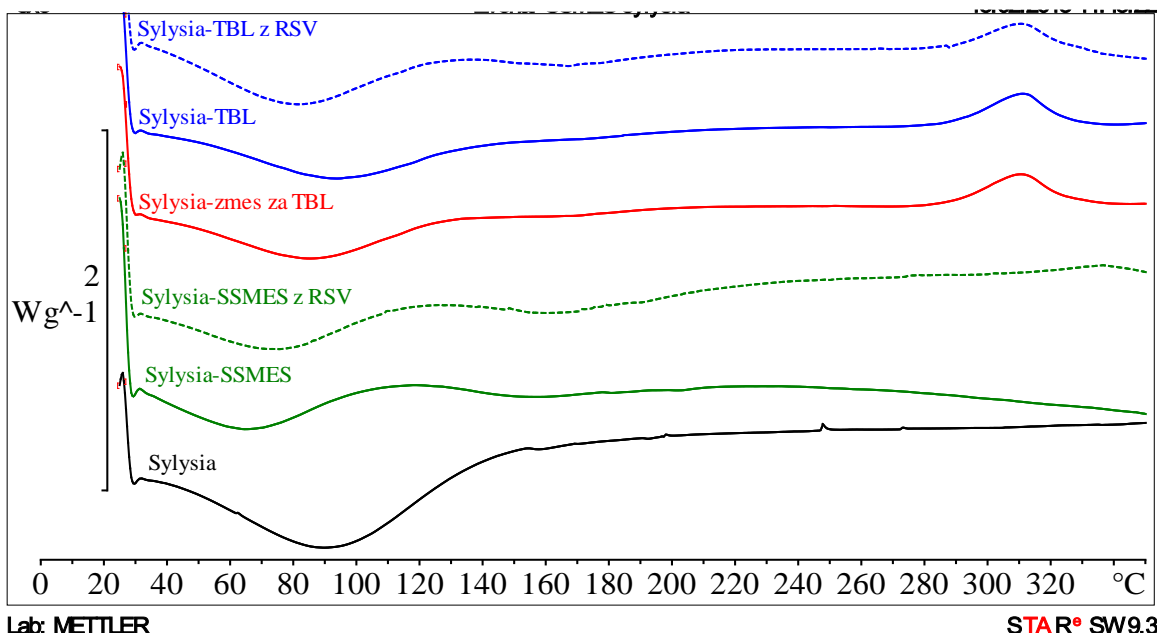


Slika 20: Termogrami analize DSC: Neusilin® US2 ter trdne SMES formulacije Neusilina z vgrajenim RSV oz. brez RSV.

V DSC termogramih na sliki 21 in sliki 22 so rezultati analize nosilcev Syloid® 244FP in Sylysie® 350, ter ostalih vzorcev z omenjenima nosilcema. Tudi v teh primerih vidimo le en endogeni vrh pri 100 °C, ki predstavlja odparevanje vode (44).



Slika 21: Rezultati termične analize Syloid® 244FP ter trdne SMES formulacije Syloida z vgrajenim RSV ali brez.



Slika 22: Termogrami analize za Sylysia® 350 ter trdne SMES formulacije s tem nosilcem z vgrajenim RSV ali brez.

Pri termogramih tablet s Syloidom in Sylysio smo opazili eksotermni vrh pri 300 °C, ki pa je prisoten v vseh vzorcih tablet. Opazili smo ga pri vzorcih z in brez RSV ter tudi termogramu zmesi za tabletiranje, zato lahko sklepamo, da ni vzrok prisotnosti RSV v vzorcu.

Rezultati termične analize RSV ter preučevanih trdnih farmacevtskih oblik so nakazali, da ostane učinkovina ves čas raztopljena v SMES-u. Pretvorba v trdno obliko z adsorpcijo na porozne nosilce ter nadaljnje tabletiranje ne povzroči ponovne kristalizacije RSV, saj v termogramih praškov in tablet nismo opazili endotermnega vrha, ki je značilen za RSV. Prav tako pri vseh nosilcih opazimo prisotnost vlage že v sami izhodni snovi, saj so porozni nosilci sposobni adsorpcije tekočin, tudi vlage iz ozračja.

DCS termično analizo trdnih SMES so opravili tudi Milović in sodelavci. Učinkovino karvediol so vgradili v SMES ter tekočo formulacijo adsorbirali na različne nosilce. Termogrami so pokazali, da ni endogenega vrha, ki bi ustrezal temperaturi tališča učinkovine, zato so predpostavili, da ne pride do rekristalizacije učinkovine po adsorpciji na trdne nosilce (46). To se sklada z našimi rezultati termične analize, zato lahko predpostavimo da vgradnja učinkovine v SMES, adsorpcija na trdne nosilce ter kasnejše

tabletiranje ne vpliva na raztopljen RSV, ker rekristalizacije RSV na termogramih nismo opazili.

5 SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil vrednotenje sproščanja RSV iz trdnih samomikroemulgirajočih sistemov. Učinkovino smo vgradili v SMES, ki smo ga adsorbirali na trdne porozne nosilce ter tabletirali. Tako pripravljene trdne farmacevtske oblike smo sproščali v dveh medijih, ki simulirata okolje gastrointestinalnega trakta; v pufru s pH 1,2, ki posnema okolje želodca, ter v pufru s pH 6,8, ki posnema okolje tankega črevesa. Rezultate sproščanja smo statistično ovrednotili ter ugotavljali ujemanje eksperimentalnih rezultatov z različnimi kinetičnimi modeli sproščanja, da bi ugotovili možen mehanizem sproščanja učinkovine iz formulacij.

- Sestavo samomikroemulgirajočega sistema smo določili na osnovi izdelanega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama. Vse disperzije so po prvih dodatkih vode mikroemulzije v/o, z večanjem deleža vode pa nastanejo (mikro)emulzije o/v. Med prehodom v mikroemulzije o/v smo pri vzorcih z večjo količino PAS opazili nastanek gela, ki v našem sistemu ni zaželen, saj lahko zakasni sproščanje učinkovine. Izbrali smo kombinacijo 60% emulgatorjev (Kolliphor EL in Kolliphor RH40 v razmerju 1:1) in 40% oljne faze (Campmul MCM in Ricinusovo olje v razmerju 1:1).
- Ugotovili smo da se s pretvorbo tekočega SMES-a v SMES praške in tablete se samomikroemulgirajoči učinek ohrani. Velikost kapljic disperzij SME praškov in tablet se je sicer povečala v primerjavi z velikostjo kapljic disperzij tekoče oblike SMES-a, vendar je ostala pod mejo 100 nm, kar je meja za nastanek mikroemulzij.
- Ugotovitve testiranja sproščanja RSV so naslednje:
Po opravljenih analizah sproščanja RSV v različnih medijih smo ugotovili, da se je največ RSV sprosil iz SMES praška, ki je kot trdni nosilec vseboval Neusilin[®] US2 (~ 80 oz 96%). Adsorpcija RSV+SMES na trdne nosilce je zmanjšala količino sproščenega RSV. Prav tako smo ugotovili statistično signifikantne razlike med sproščanjem vseh posameznih praškov v pufru s pH 1,2, v mediju s pH 6,8 pa so razlike signifikantne le med Neusilin-PRA in Syloid-PRA ter Neusilin-PRA in Sylysia-PRA.

S primerjavo profilov sproščanja RSV iz različnih serij SMES tablet smo ugotovili, da se je v obeh medijih največ RSV sprostil iz tablet, ki so kot trdni nosilec vsebovale Neusilin[®] US2 (~ 80%), dodatek pomožnih snovi za tabletiranje ter proces tabletiranja pa je zmanjšal količino sproščenega RSV. Statistične razlike med sproščanjem iz praškov in tablet smo opazili pri vzorcih Neusilin-R in Syloid-R (v obeh medijih) ter Neusilin-T (pri pH 6,8). S primerjavo razlik med serijami tablet smo signifikantne razlike opazili pri vseh serijah tablet, z izjemo Neusilin-T in Neusilin-R v pufru s pH 6,8.

- Z ugotavljanjem ujemanja eksperimentalnih rezultatov sproščanja z različnimi matematičnimi modeli smo ugotovili, da se mehanizem sproščanja najbolj približa modelu Higuchi oz. Korsmeyer-Peppas. Na sproščanje RSV iz trdnih SMES formulacij najbolj vpliva proces difuzije.
- S termično analizo smo ugotovili, da po adsorpciji tekočega SMES-a na trdne nosilce in nadaljnjim tabletiranjem ne pride do ponovne kristalizacije RSV. To lahko predpostavimo iz termogramov vzorcev z vgrajenim RSV, iz kjer nismo opazili značilnega steklastega prehoda RSV.

Med izbranimi trdnimi poroznimi nosilci se je za adsorpcijo SMES-a in nadaljnjo izdelavo samomikroemulgirajočih tablet za najprimernejšega izkazal porozni magnezijev aluminometasilikat (Neusilin[®] US2). Slednji omogoča največjo količino sproščenega RSV in se glede na sposobnosti samomikroemulgiranja po dispergiranju v mediju najbolj približa tekočim SMES-om. V prihodnje bi bilo potrebno narediti še *in vivo* študije, da bi lahko potrdili izboljšanje biološke uporabnosti.

6 LITERATURA

1. Zvonar A, Kristl J. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm. Vest.* 2008;59:263–8.
2. Pouton CW, Porter CJH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv. Drug Del. Rev.* 2008;60(6):625–37.
3. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2006;312(1-2):179–86.
4. Dolenc A, Govedarica B, Dreu R, Kocbek P, Srcic S, Kristl J. Nanosized particles of orlistat with enhanced in vitro dissolution rate and lipase inhibition. *Int. J. Pharm.* 2010;396(1-2):149–55.
5. Zvonar A, Bolko K, Gašperlin M. Microencapsulation of self-microemulsifying systems: optimization of shell-formation phase and hardening process. *Int. J. Pharm.* 2012;437(1-2):294–302.
6. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.* 2008;60(6):673–91.
7. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000;11 Suppl 2:S93–8.
8. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* 2004;58(3):173–82.
9. Rowe RC, Sheskey PJ QM. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th. Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association. London. 2009:
10. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Disc. today.* 2010;15(21-22):958–65.
11. Soumya S, Doney AB, Sabitha M. Current trends in lipid based delivery systems and its applications in drug delivery. *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* 2012;5(3):4–9.
12. Tang B, Cheng G, Gu J-C, Xu C-H. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Disc. Today.* 2008;13(13-14):606–12.

13. Toorisaka E, Hashida M, Kamiya N, Ono H, Kokazu Y, Goto M. An enteric-coated dry emulsion formulation for oral insulin delivery. *J. Control. Rel.* 2005;107(1):91–6.
14. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, et al. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J. Pharm. Sci.* 2003;92(12):2386–98.
15. Ito Y, Kusawake T, Prasad YVR, Sugioka N, Shibata N, Takada K. Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 2006;317(2):114–9.
16. Zhang X, Yi Y, Qi J, Lu Y, Tian Z, Xie Y, et al. Controlled release of cyclosporine A self-nanoemulsifying systems from osmotic pump tablets: near zero-order release and pharmacokinetics in dogs. *Int. J. Pharm.* 2013;
17. Zvonar A, Gašperlin M. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabotnik. *Farm. Vest.* 2011;(62):131–8.
18. Zvonar a, Berginc K, Kristl A, Gasperlin M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide. *Int. J. Pharm.* 2010;388(1-2):151–8.
19. Zhang Y, Wang R, Wu J, Shen Q. Characterization and evaluation of self-microemulsifying sustained-release pellet formulation of puerarin for oral delivery. *Int. J. Pharm.* 2012;427(2):337–44.
20. Zvonar A, Kristl J, Kerc J, Grabnar PA. High celecoxib-loaded nanoparticles prepared by a vibrating nozzle device. *J. Microenc.* 2009;26(8):748–59.
21. Chae GS, Lee JS, Kim SH, Seo KS, Kim MS, Lee HB, et al. Enhancement of the stability of BCNU using self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) and in vitro antitumor activity of self-emulsified BCNU-loaded PLGA wafer. *Int. J. Pharm.* 2005;301(1-2):6–14.
22. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Control. Rel.* 2012;158(2):182–93.
23. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer , coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mut. Res.* 2008;658(1-2):68–94.
24. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of Resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci.* 2006;5.
25. Bisht K, Wagner K-H, Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology.* 2010;278(1):88–100.

26. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 2012;130(4):797–813.
27. Deng G, Xu X, Li S, Li F, Xia E, Li H. Natural Sources and Bioactivities of Resveratrol. *Int. J. Bio. Med.* 2012;1(1):1–20.
28. Osredkar J. Oksidativni stres. *Zdrav. vestn.* 2012;81:393–406.
29. Van Speybroeck M, Williams HD, Nguyen T-H, Anby MU, Porter CJH, Augustijns P. Incomplete desorption of liquid excipients reduces the in vitro and in vivo performance of self-emulsifying drug delivery systems solidified by adsorption onto an inorganic mesoporous carrier. *Mol. pharmaceutics.* 2012;9(9):2750–60.
30. Elektronski vir: <http://www.abiteccorp.com/product-lines/capmul> [dostop 27.4.2013].
31. Elektronski vir: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_111139e_Kolliphor%20EL.pdf [dostop 27.4.2013].
32. Elektronski vir: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_111141e_Kolliphor%20RH%2040.pdf [dostop 27.4.2013].
33. Elektronski vir: http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusilin.pdf [dostop 27.4.2013].
34. Elektronski vir: <http://www.neusilin.com/product/> [dostop 27.4.2013].
35. Elektronski vir: http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M317_Syloid244FP.pdf [dostop 27.4.2013].
36. Elektronski vir: <http://www.aquachem.co.kr/product/Sylysia.htm> [dostop 27.4.2013].
37. Bolko K, Zvonar A, Gašperlin M. Mixed lipid phase SMEDDS as an innovative approach to enhance resveratrol solubility. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 2013;9045:1–8.
38. Elektronski vir: http://sl.wikipedia.org/wiki/Standardni_odklon [dostop 27.4.2013].
39. Elektronski vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Confidence_interval [dostop 27.4.2013].
40. Rovan J, Turk T. Analiza podatkov s SPSS za Windows. 3rd. Univerza v Ljubljani, Ekonomska fakulteta. Ljubljana. 2012:

41. Sander C, Holm P. Porous magnesium aluminometasilicate tablets as carrier of a cyclosporine self-emulsifying formulation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2009;10(4):1388–95.
42. Suvakamta D, Padala Narasimha M, Nath L, Prasanta C. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Polanic Pharm. Drug Res.* 2010;67(3):217–23.
43. Isailović BD, Kostić IT, Zvonar A, Đorđević VB, Gašperlin M, Nedović V a., et al. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innov. Food Sci. Emerg Tech.* 2013;
44. Haines PJ. Principles of thermal analysis and calorimetry. XIII th. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2002: 220.
45. Krupa A, Majda D, Jachowicz R, Mozgawa W. Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin US2. *Thermochimica Acta.* 2010;509(1-2):12–7.
46. Milović M, Djuriš J, Djekić L, Vasiljević D, Ibrić S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int. J. Pharm.* 2012;436(1-2):58–65.