

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANA STIPANIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**VREDNOTENJE SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH
SISTEMOV Z METODO *IN VITRO* LIPOLIZE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANA STIPANIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**VREDNOTENJE SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH
SISTEMOV Z METODO *IN VITRO* LIPOLIZE
EVALUATION OF SELF-MICROEMULSIFYING
SYSTEMS EMPLOYING *IN VITRO* LIPOLYSIS
METHOD**

Ljubljana, 2013

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

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in delovni mentorici Katarini Bolko, mag. farm. za pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. dr. Alenki Zvonar, mag. farm. ter strokovnima sodelavkama na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan za vse nasvete in pomoč v laboratoriju.

Posebna zahvala pa velja za vse bližnje in prijatelje, ki so me tekom študija podpirali, spodbujali in verjeli vame.

Izjava

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

Ana Stipanič

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1 UVOD.....	1
1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI.....	1
1.1.1 Samomikroemulgirajoči sistemi	4
1.2 <i>IN VIVO</i> LIPOLIZA	5
1.3 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA	10
1.3.1 pH-stat metoda.....	10
1.3.2 Izbira koncentracije titranta	12
1.3.3 Pankreasna lipaza in določanje njene aktivnosti	12
1.3.4 Sestava prebavnega medija.....	14
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN NAPRAVE	18
3.1 MATERIALI	18
3.2 NAPRAVE.....	21
4 METODE	22
4.1 pH-STAT METODA	22
4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI PANKREASNE LIPAZE	23
4.3 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA	25
4.3.1 Priprava SMES	25
4.3.2 Nasičena topnost RSV v prebavnem pufru	25
4.3.3 Topnost SMES-RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru.....	26
4.3.4 Topnost samomikroemulgirajočih praškov z RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru.....	26
4.3.5 Priprava prebavnih pufrov za <i>in vitro</i> lipolizo.....	26
4.4 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SMES.....	27
4.5 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SMES-RSV.....	29
4.6 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH PRAŠKOV Z RSV .	30
4.7 DOLOČANJE RSV Z METODO HPLC	30
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	32
5.1 DOLOČANJE AKTIVNOST PANKREASNE LIPAZE.....	32

5.1.1	Titracija maslene kisline z 0,2 M NaOH	34
5.1.2	Titracija maslene kisline z 0,6 M NaOH	36
5.2	<i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SMES	37
5.2.1	Titracija MK z 0,2 M NaOH	38
5.2.2	Titracija MK z 0,6 M NaOH	40
5.2.3	Izračun sproščenih MK in obsega <i>in vitro</i> lipolize.....	42
5.2.4	Uporaba žolčnega ekstrakta.....	43
5.3	NASIČENA TOPNOST RSV	45
5.4	<i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SMES-RSV.....	45
5.5	<i>IN VITRO</i> LIPOLIZA SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH PRAŠKOV Z RSV.	48
5.5.1	Vpliv RSV na množino sproščenih MK in obsega <i>in vitro</i> lipolize	50
6	ZAKLJUČEK	52
7	LITERATURA	55

POVZETEK

Z vgrajevanjem slabo vodotopnih učinkovin v na lipidih osnovane sisteme lahko bistveno izboljšamo njihovo raztapljanje, absorpcijo in s tem njihovo biološko uporabnost po peroralni aplikaciji. Pogost pristop izboljšanja biološke uporabnosti slabo vodotopnih učinkovin je njihova vgradnja v samomikroemulgirajoče sisteme, ki so po definiciji izotropne zmesi lipidov, površinsko aktivnih snovi, sotopil in koemulgatorjev. Ti sistemi v stiku s fiziološkim medijem in ob motiliteti gastrointestinalnega trakta tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi.

V diplomski nalogi smo pripravili deset tekočih samomikroemulgirajočih sistemov z različnimi razmerji ricinusovega olja, Capmula[®] MCM, Kolliphorja[®] EL in Kolliphorja[®] RH40, ter trdne samomikroemulgirajoče praške. Ker se ti dostavni sistemi v gastrointestinalnem traktu vključujejo v proces prebave lipidov, je pomembno razviti enostaven *in vitro* model, s katerim lahko napovemo obnašanje *in vivo*. Za vrednotenje *in vitro* lipolize samomikroemulgirajočih sistemov smo uporabili pH-stat metodo, pri kateri je avtomatski titrator s titracijo iz lipidov sproščenih maščobnih kislin vzdrževal konstanten pH. Reakcijo hidrolize lipidov smo sprožili z dodatkom pankreasne lipaze v medij s prebavnim pufrom in vzorcem, kot titrant pa smo uporabili NaOH. Pankreasni lipazi smo določili aktivnost s tributirinskim testom, pri katerem smo uporabili različne koncentracije in pretoke NaOH. Izračunane aktivnosti smo v nadaljevanju uporabili pri izvedbi *in vitro* lipolize tekočih samomikroemulgirajočih sistemov, kjer smo želeli določiti optimalno koncentracijo in pretok NaOH. Pri izbiri koncentracije in pretoka NaOH smo upoštevali, kako avtomatski titrator uravnava pH tekom *in vitro* lipolize kot tudi obseg *in vitro* lipolize. Izbrana parametra smo nato uporabili pri *in vitro* lipolizi tekočih samomikroemulgirajočih sistemov z vgrajeno slabo vodotopno učinkovino resveratrol. Med *in vitro* lipolizo omenjenih sistemov se je oborilo več kot 40 % resveratrola. Najmanjše obarjanje smo določili pri sistemih, ki so kot oljno fazo vsebovali samo ricinusovo olje iz dolgoverižnih trigliceridov (45 %), medtem ko se je pri sistemih z oljno fazo iz Capmula[®] MCM s srednjeverižnimi mono- in digliceridi oborilo največ resveratrola (65 %). Z adsorpcijo samomikroemulgirajočega sistema z resveratrolom na trdne porozne nosilce Neusilin[®] US2, Sylysia[®] 350 in Syloid[®] 244FP smo pripravili samomikroemulgirajoče praške. Po *in vitro* lipolizi omenjenih praškov smo v supernatantu določili 60 % manj resveratrola, saj se ga je nekaj med *in vitro* lipolizo oborilo, nekaj pa ga

je verjetno ostalo vezanega na nosilec zaradi nepopolne desorpcije Kolliphorja® EL in Kolliphorja® RH40.

KLJUČNE BESEDE: Samomikroemulgirajoči sistemi, *in vitro* lipoliza, pH-stat metoda, resveratrol.

KEY WORDS: Selfmicroemulsifying systems, *in vitro* lipolysis, pH-stat method, resveratrol.

SEZNAM OKRAJŠAV

DG - diglicerid

FL - fosfolipid

GIT - gastrointestinalni trakt

HLB - hidrofilno-lipofilno ravnotežje (ang. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*)

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)

MG - monoglicerid

MK - maščobna kislina

PAS - površinsko aktivna snov

RSV - resveratrol

SES - samoemulgirajoči sistem

SMES - samomikroemulgirajoči sistem

SMES-RSV - samomikroemulgirajoči sistem z vgrajenim resveratrolom

TBU - tributirinska enota (ang. *Tributirin Unit*)

TG - triglicerid

ZU - zdravilna učinkovina

ŽK - žolčna kislina

1 UVOD

Farmacevtska industrija se v zadnjem času sooča s problemom slabe vodotopnosti pri kar 40 % na novo odkritih zdravilnih učinkovin. Omejitveni dejavnik pri absorpciji slabo vodotopnih učinkovin je njeno slabo raztapljanje v vodnem mediju in posledično majhna biološka uporabnost. Brez uporabe inovativnih metod izboljšanja vodotopnosti, so te učinkovine obsojane na izločitev iz nadaljnjega razvoja farmacevtskih oblik z vgrajeno učinkovino (1).

Po biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu lahko učinkovine razdelimo glede na njihovo vodotopnost in permeabilnost skozi epitelij v gastrointestinalnem traktu (GIT) v 4 razrede (preglednica I). Učinkovine s slabo vodotopnostjo in dobro permeabilnostjo uvrščamo v razred II, kjer lahko z izboljšanjem raztapljanja učinkovin močno povečamo njihovo biološko uporabnost (2).

Preglednica I. Biofarmacevtski klasifikacijski sistem

	Visoka vodotopnost	Nizka vodotopnost
Visoka permeabilnost	Razred I	Razred II
Nizka permeabilnost	Razred III	Razred IV

Pogosti pristopi za izboljšanje raztapljanja slabo vodotopnih učinkovin so pretvorba spojine v sol, hidrat, lahko zmanjšamo velikost delcev, tvorimo trdne disperzije, nanodelce, za izboljšanje topnosti lahko uporabimo tudi ciklodekstrine (3 - 8). V zadnjem času je velik poudarek na vgradnji slabo vodotopnih učinkovin v na lipidih osnovane sisteme, s katerimi lahko bistveno izboljšamo raztapljanje, absorpcijo in s tem biološko uporabnost slabo vodotopne učinkovine po peroralni aplikaciji (8).

1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Med na lipidih osnovane sisteme uvrščamo številne dostavne sisteme, kot so oljne raztopine, emulzije, samoemulgirajoče sisteme in samomikroemulgirajoče sisteme (SMES) (9). Sestavljeni so iz lipidov in/ali površinsko aktivnih snovi (PAS), vsebujejo lahko tudi sotopilo.

Ugotovili so, da lahko lipidi povečajo absorpcijo in biološko uporabnost slabo vodotopnih učinkovin predvsem s stimulacijo izločanja žolčnih kislin (ŽK) in fosfolipidov (FL) v GIT,

ki s tvorbo koloidnih struktur povečajo solubilizacijo lipidov, njihovih prebavnih produktov in lipofilnih spojin (10, 11). Lipidi tudi zaščitijo učinkovino pred kemijsko in encimsko razgradnjo ter sodelujejo pri tvorbi lipoproteinov, ki pospešujejo limfatični transport lipofilnih učinkovin. PAS povečajo topnost slabo vodotopnih učinkovin, permeabilnost skozi epitelij prebavnega trakta, lahko vplivajo na tesne celične stike ali zavirajo P- glikoprotein (1).

Pouton je glede na sestavo razdelil na lipidih osnovane sisteme v štiri razrede (preglednica II). V razred I uvrščamo enostavne oljne raztopine, sestavljene predvsem iz prebavljivih rastlinskih olj in mešanih gliceridov, ki so splošno priznani kot varne pomožne snovi (GRAS, ang. *Generally Regarded as Safe*). Ker ti sistemi ne vsebujejo PAS, je za dispergiranje lipidov in vgrajene lipofilne učinkovine v GIT pomembna lipoliza trigliceridov (TG) in digliceridov (DG) na monogliceride (MG) in proste maščobne kisline (MK), ki tvorijo z ŽK in FL koloidne strukture. Sistemi razreda II so sestavljeni iz gliceridov in lipofilnih PAS s hidrofilnim-lipofilnim ravnotežjem (HLB) manjšim od 12, ki v vodnem mediju in ob rahlem mešanju tvorijo samoemulgirajoče sisteme (SES). V razred III uvrščamo sisteme sestavljene iz gliceridov, hidrofilnih PAS (HLB>12) in/ali hidrofilnih sotopil kot so etanol, propilenglikol, polietilenglikol in glicerol. Delimo jih na dva podrazreda IIIa in IIIb, ki se razlikujeta v hidrofilnosti. V podrazred IIIa uvrščamo samoemulgirajoče sisteme, ki ob stiku z vodnim medijem tvorijo opalescentno emulzijo z velikostjo kapljic 100-250 nm. V sisteme podrazreda IIIa uvrščamo SMES, ki ob stiku z vodnim medijem tvorijo bistro ali rahlo opalescentno mikroemulzijo z velikostjo kapljic 50-100 nm. Razred IV predstavlja najbolj hidrofilne na lipidih osnovane sisteme, ki ne vsebujejo lipidov, ampak so lahko sestavljeni iz hidrofilnih in lipofilnih PAS ter hidrofilnih sotopil (12, 13, 14).

Obstoječa klasifikacija na lipidih osnovanih sistemov ni popolna, saj ne vključuje vseh sistemov, ki so na tržišču ali omenjeni v raziskovalnih člankih. V razred I so po Poutonovi razdelitvi vključeni sistemi sestavljeni iz gliceridov, ki se morajo pred absorpcijo prebaviti, kar ne velja za MG, ki se lahko absorbirajo že brez omenjenega procesa. Pomanjkljivost razreda II je v tem, da niso vsi sistemi, sestavljeni iz gliceridov in hidrofobnih PAS, sposobni samoemulgiranja, kar predpostavlja Pouton. Prav tako je potrebno bolj definirati vrednost HLB v sistemih razreda II in III, saj se pogosto v obeh primerih uporabljajo PAS s HLB ~ 11 in tako na podlagi HLB težko uvrstimo sisteme v določen razred (9).

Preglednica II. Razvrstitev na lipidih osnovanih sistemov glede na sestavo.

Uvrstitev sistema	Sestava sistema	Velikost kapljic (nm)	Lastnosti sistema
Razred I	MG, DG, TG (100%)	> 250	Sistem se dispergira po prebavi.
Razred II	MG, DG, TG (40-80%); PAS s HLB < 12 (20-60%)	100-250	SES brez vodotopnih PAS.
Razred IIIa	MG, DG, TG (40-80%); PAS s HLB > 11 (20-40%); hidrofilna sotpila (0-40%)	100-250	SES z vodotopnimi PAS.
Razred IIIb	MG, DG, TG (< 20%); PAS s HLB > 11 (20-50%); hidrofilna sotpila (20-50%)	50-100	SMES z vodotopnimi PAS.
Razred IV	PAS s HLB < 12 (0-20%); PAS s HLB > 12 (30-80%), hidrofilna sotpila (0-50%)	< 50	Po dispergiranju sistem tvori koloidno raztopino micelov.

Müllertz je s sodelavci za izboljšanje klasifikacije na lipidih osnovanih sistemov predlagala novo razdelitev sistemov, v kateri bi se upoštevalo Smallove razdelitev lipidov na nepolarne (npr. alkani, tekoči parafin, holesterolni estri, voski) in polarne lipide (npr. TG, DG, MG, FL, holesterol) ter HLB vrednosti posameznih komponent. Polarni lipidi so nadalje razdeljeni na razred I, ki vključuje samo polarne lipide kot so npr. TG, DG, holesterol, protonirane dolgoverižne MK, na razred II, ki vsebujejo MG in FL, na razred IIIa s polarnimi lipidi in PAS z nižjim HLB ter na razred IIIb s sotpili in PAS z višjim HLB (9). Tudi ta predlog razdelitve še vedno ne zajema vseh na lipidih osnovanih sistemov, ki so npr. sestavljeni iz polarnih lipidov in PAS z visokim HLB (15).

Pri formulaciji na lipidih osnovanih sistemov je pomembno poudariti, da z višanjem deleža hidrofilnih komponent ob stiku z vodnim medijem GIT narašča možnost obarjanja vgrajene slabo vodotopne učinkovine zaradi zmanjšanja solubilizacijske kapacitete. Do zmanjšanja solubilizacijske kapacitete lahko pride tudi ob prebavi lipidov ali nekaterih PAS (npr. Labrasol[®], Gelucire[®] 44/14, Labrafil[®], Kolliphor[®] EL), ki sestavljajo na lipidih osnovan sistem. Pri obarjanju igrajo pomembno vlogo tako lastnosti slabo vodotopne učinkovine kot tudi kinetika obarjanja, saj so v nekaterih primerih ugotovili, da lahko učinkovina ostane po dispergiranju tudi do 24 ur v supernasičenem stanju in se v tem času tudi uspešno absorbira (12, 16, 17).

1.1.1 Samomikroemulgirajoči sistemi

SMES so izotropne zmesi naravnih ali sinteznih lipidov, PAS, enega ali več hidrofilnih sotopil in koemulgatorjev, ki pod vplivom fizioloških medijev in motilitete GIT spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi z velikostjo kapljic med 50 nm in 100 nm (12). V SMES lahko vgradimo slabo vodotopno učinkovino, ki se raztopi v lipidih in/ali PAS (9).

Pri formulaciji SMES moramo za zadovoljiv samomikroemulgirajoči učinek izbrati ustrezno naravo, razmerje lipidov in PAS, ustrezno koncentracijo PAS ter temperaturo, pri kateri spontano nastane mikroemulzija. Razmerje posameznih komponent lahko določimo z izdelavo (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, iz katerega lahko vidimo območje nastanka mikroemulzije. Pri izbiri komponent moramo upoštevati tudi regulatorne zahteve glede dražljivosti in toksičnosti sestavin, solubilizacijsko kapaciteto, prebavljivost komponent, kompatibilnost z ovojnico kapsul, čistost, kemijsko čistost in ceno materiala (1, 8, 13).

Najpomembnejša komponenta SMES so lipidi, saj solubilizirajo lipofilno učinkovino in povečajo delež absorbirane učinkovine v GIT. Sestavljeni so lahko iz dolgoverižnih TG ali srednjeverižnih TG z različno stopnjo nasičenosti kot tudi iz mešanih dolgoverižnih in srednjeverižnih gliceridov. Slednji imajo zelo visoko solubilizacijsko kapaciteto in so manj podvrženi oksidaciji. V formulacijah se lahko uporabijo tudi estri propilenglikola ter estri MK in maščobnih alkoholov (13).

V SMES se najpogosteje uporabljajo neionske PAS z visokim HLB v koncentracijah od 30-60 %, ki omogočajo nastanek mikroemulzije v vodnem mediju. PAS so amfifilne molekule, ki lahko solubilizirajo relativno velike koncentracije lipofilne učinkovine. Pomembno je, da PAS niso toksične in da pri uporabljeni koncentraciji ne dražijo GIT. Uporaba PAS naravnega izvora velja za bolj varno od sinteznih PAS, vendar imajo manjšo sposobnost samoemulgiranja (npr. lecitin). Prav tako veljajo neionske PAS za manj toksične od ionskih, vendar lahko tudi te reverzibilno vplivajo na spremembe v permeabilnosti epitelija v GIT kot npr. Labrasol[®], Kolliphor[®] EL ali Tween[®] 80. Kot PAS v formulacijah SMES se pogosto uporabljajo etoksilirani derivati ricinusovega olja (npr. Kolliphor[®] EL in Kolliphor[®] RH40) in polioksietilen 20 oleati (npr. Tween[®] 80) (8, 18).

Sotopila, kot so etanol, propilenglikol, polietilenglikol in glicerol, omogočijo raztapljanje hidrofilnih PAS ali lipofilne učinkovine v formulaciji. Za povečanje raztapljanja lipofilne

učinkovine mora biti koncentracija sotopila precej visoka, kar lahko povzroči obarjanje učinkovine po dispergiranju formulacije v vodnem mediju zaradi nenadnega zmanjšanja solubilizacijske kapacitete. Slabost sotopila, kot je etanol, je tudi v tem, da lahko ta izhlapi iz formulacije, ki je polnjena v trde ali mehke želatinske kapsule, kar povzroči obarjanje učinkovine. Sotopila lahko povzročijo tudi krhkost ali zmečanje želatinske kapsule. Majhne molekule etanola in propilenglikola lahko preidejo v ovojnico kapsule in porušijo strukturo želatine, kar povzroči njeno zmečanje. Drugače je pri polietilenglikolu, ki zaradi higroskopsnosti veže iz želatine kemijsko adsorbirano vodo, kar jo naredi bolj krhko (8, 13, 19).

Za preprečevanje oksidacije nenasičenih MK ali učinkovine lahko v SMES dodamo tudi različne lipofilne antioksidante, kot so α -tokoferol, β -karoten, butilhidroksi toluen in druge (13).

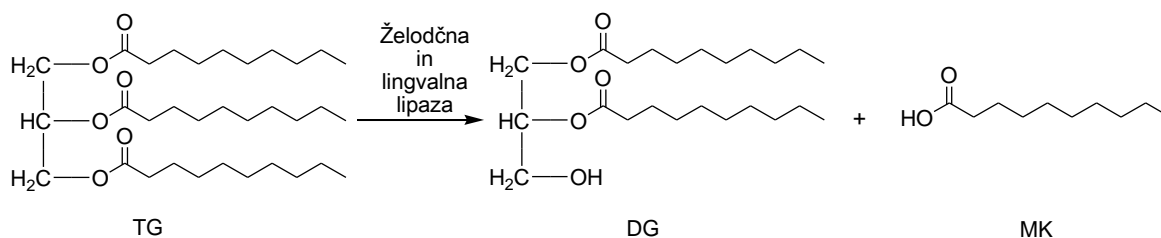
SMES so v tekočem ali poltrdnem stanju in jih kot take lahko polnimo v mehke in trde želatinske kapsule. Ena izmed pomanjkljivosti polnjenja tekočih SMES v želatinske kapsule so visoki stroški proizvodnje, zato je velik poudarek na pripravi trdnih SMES. Tekoče SMES lahko vgradimo v mikrokapsule ali pa z adsorpcijo na trdne porozne nosilce pripravimo praške, granule, pelete, ki jih nato polnimo v kapsule, vrečke ali stisnemo v tablete. Trdne SMES lahko pripravimo z metodami razprševanja s strjevanjem, sušenja z razprševanjem, adsorpcijo na trdne nosilce, tehnologije s talinami, iztiskanja in krogličanja (1, 18, 20, 21).

Kot je že omenjeno v definiciji SMES, se ti po peroralni aplikaciji v prebavnem mediju GIT spontano dispergirajo in tvorijo mikroemulzije. Omenjeni dostavni sistemi se vključijo v proces prebave lipidov, kjer produkti prebave skupaj s slabo vodotopno učinkovino tvorijo različne koloidne strukture, ki se v nadaljevanju lahko absorbirajo (17).

1.2 IN VIVO LIPOLIZA

Hidroliza lipidov ali lipoliza je proces encimske razgradnje TG na eno ali dve prosti MK in na DG ali MG. V lipolizo so vključeni trije encimi: lingvalna, želodčna in pankreasna lipaza. Lingvalna in želodčna lipaza v želodcu sodelujeta v prvi stopnji lipolize, medtem ko druga najobsežnejša stopnja lipolize poteka v dvanajstniku ob prisotnosti pankreasne lipaze (22).

S peroralno aplikacijo SMES z vgrajeno slabo vodotopno učinkovino pride v želodcu ob kontrakcijah spodnjega dela želodca (antrum) ter pomešanjem s kislim prebavnim medijem, minerali, PAS in ostalimi biološkimi sestavinami, do spontanega nastanka mikroemulzije in delne lipolize TG (7). Del prebavnega medija predstavlja želodčna lipaza, ki jo izločajo žlezne celice v osrednjem delu želodca (fundus). Želodčna lipaza z lingvalno lipazo sodeluje v hidrolizi TG, kjer prednostno hidrolizira MK na 3. mestu TG do DG in ene MK (22, 23) (slika 1), čeprav nekateri navajajo, da želodčna lipaza prednostno hidrolizira tudi MK na 1. mestu TG (24). Za delovanje ne potrebujeta nobenega kofaktorja, zato je njuno delovanje odvisno zgolj od lastne sposobnosti adsorpcije na površino lipida, kar poteka po še neznanem mehanizmu. Obe lipazi hidrolizirata samo do 25 % oz. 30 % zaužitih lipidov (7, 14, 22, 25). Razlog zaustavitve lipolize je lahko v tem, da površino lipidnih kapljic prekrijejo produkti lipolize (MK in DG), ki so bolj polarni lipidi od TG, zato se akumulirajo na površino lipida v obliki trdne ali kristalinične faze in preprečijo lipazi dostop. Produkti lipolize bi se lahko odstranili s površine lipida samo ob prisotnosti bolj močnih PAS, ki pa jih SMES vsebujejo, zato pričakujemo, da bi bil v tem primeru delež hidrolize lipidov odvisen predvsem od časa zadrževanja formulacije v želodcu (22).

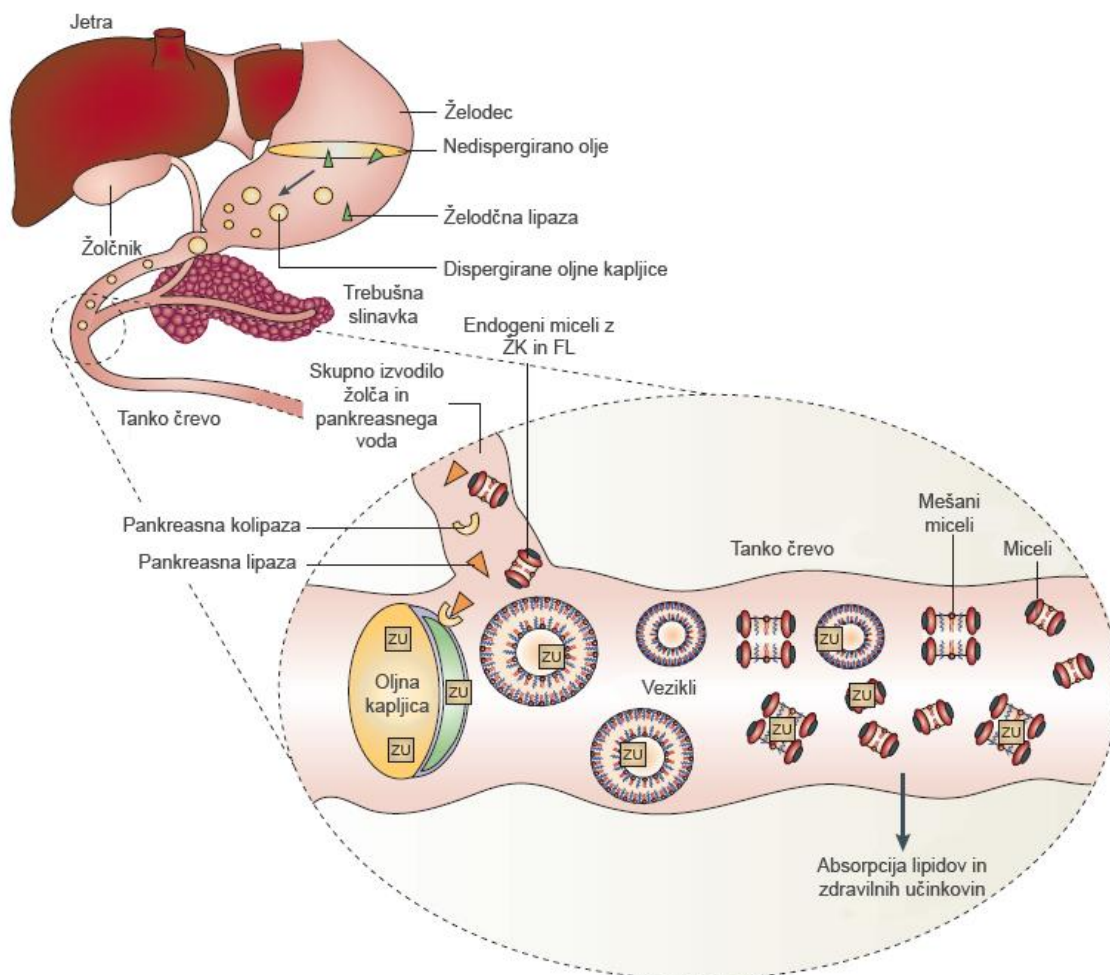


Slika 1. Hidroliza TG z želodčno in lingvalno lipazo.

Hitrost praznjenja želodca ne sme presežati sposobnosti različnih mehanizmov prebave v dvanajstniku, zato praznjenje vsebine iz želodca regulirajo in koordinirajo hormoni, parakrini agonisti in nevroni, tako da zmanjšajo intenziteto kontrakcij antruma in stimulirajo kontrakcijo pilorusa. V sluznici dvanajstnika in jejunuma se nahajajo receptorji, ki zaznavajo različne lastnosti vsebine v dvanajstniku: kislost, osmotski tlak, količino lipidov in produktov lipolize ter količino peptidov in aminokislin. Hitrost praznjenja vsebine iz želodca v dvanajstnik upočasnijo močno hipertonična vsebina v dvanajstniku; pH vsebine pod 3,5, ki povzroči sproščanje hormona sekretin v dvanajstniku; prisotnost peptidov in aminokislin, ki povzročijo sproščanje gastrina iz G-celic v želodcu in

dvanajstniku; ter prisotnost MK in MG, ki stimulirajo sproščanje hormona holecistokinina in gastrointestinalnega inhibitornega peptida (26).

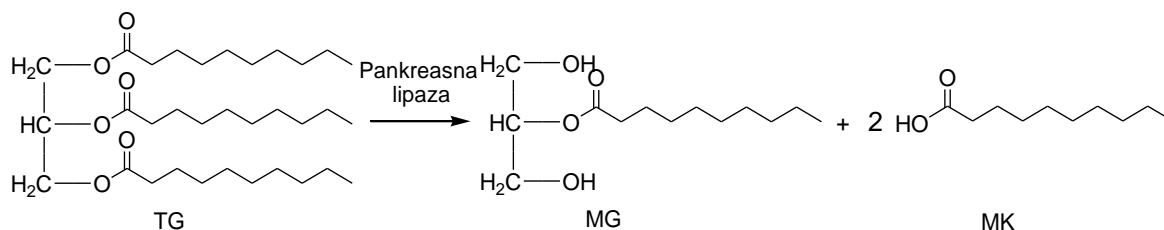
Ko se kislina vsebina iz želodca sprosti v dvanajstnik, se zvrstijo številni dogodki, ki so pomembni pri hidrolizi lipidov. Pri tem aktivno sodelujejo trebušna slinavka, jetra in žolčnik (slika 2).



Slika 2. Prebava lipidov in raztapljanje zdravilne učinkovine (ZU) v tankem črevesu (7).

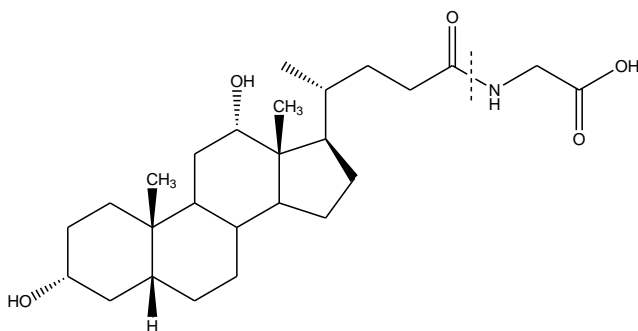
Trebušna slinavka izloča prebavni sok. Ta vsebuje natrijev hidrogenkarbonat, ki nevtralizira kislino vsebino iz želodca na pH 6 do 8, in encime, med katerimi sta pri lipolizi najpomembnejša pankreasna lipaza in njen kofaktor kolipaza (25). Pankreasna lipaza je sestavljena iz globularne N-terminalne domene, ki vsebuje katalitično mesto, in C-terminalne domene v obliki beta-sendviča, kamor se veže kolipaza. Njeno delovanje je opisano kot sistem encima s pokrovom, ki leži nad aktivnim mestom. V prisotnosti kolipaze in ŽK se ta pokrov odpre, razkrije se hidrofobni del encima, kamor se veže TG, in

nato poteče reakcija hidrolize (27). Hidroliza TG prednostno poteka na mestu 1 in 3, pri čemer nastanejo 2-MG in dve MK (slika 3). V nadaljevanju se lahko 2-MG počasi izomerizira v 1-MG, katerega pankreasna lipaza hidrolizira in odcepi še tretjo MK, da nastane glicerol. Ta korak je manj verjeten in v *in vivo* pogojih redek (11, 14, 22, 23, 25).



Slika 3. Hidroliza TG s pankreasno lipazo.

Pri lipolizi TG ima pomembno vlogo tudi koncentriran žolč, ki se iz jeter preko žolčnika izteka v dvanajstnik. Žolč vsebuje ŽK, holesterol, FL in žolčne pigmente. ŽK emulgirajo lipide, posledično povečajo njihovo specifično površino ter odstranjujejo produkte lipolize s površine medfaze olje-voda, da pankreasna lipaza lahko dostopi do TG (26). Najpomembnejše ŽK so iz holesterola sintetizirane holna kislina, deoksiholna kislina in henodeoksiholna kislina. Omenjene ŽK so pogosto konjugirane s peptidno vezjo z glicinom in taurinom, kar poveča njihovo vodotopnost in amfifilnost (25) (spojina **1**).



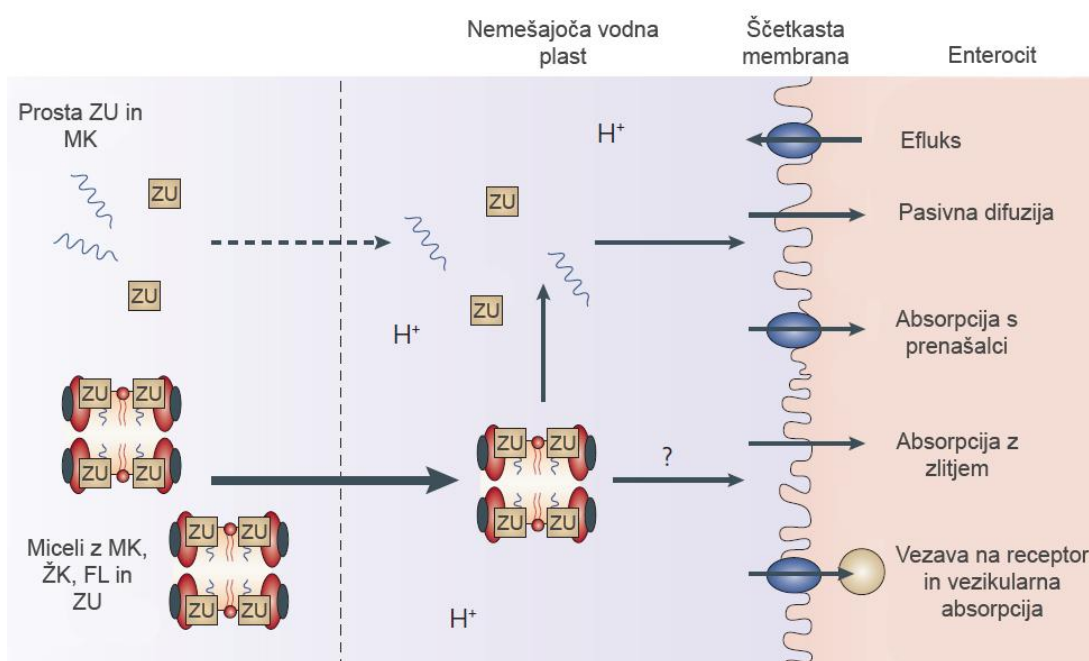
Spojina **1**. Deoksiholna kislina konjugirana z glicinom.

Konjugirane ŽK so najpogosteje prisotne v obliki soli z različnimi kationi (najpogosteje z natrijevimi). ŽK imajo planarno strukturo, sestavljeno iz hidrofobnega steroida in hidrofilnih skupin. Zaradi takšne strukture so ŽK amfifilne in lahko tvorijo nad kritično micelarno koncentracijo z MG in MK različne koloidne strukture (multilamelarni in unilamelarni vezikli, miceli in mešani miceli), kjer se hidrofobni del ŽK obrne v notranjost strukture (tam je tudi slabo vodotopna učinkovina), zunanji del pa predstavlja hidrofilne

skupine. K tvorbi koloidnih struktur prispevata tudi z žolčem izločeni holesterol in FL (7, 26).

Produkti lipolize in lipofilne molekule se absorbirajo v dvanajstniku in jejunumu, kjer morajo najprej preiti nemešajočo vodno plast ob enterocitih, ščetkasto membrano ter se nato iz enterocita absorbirati v limfni in/ali krvni obtok. Mikrovili tvorijo na apikalni strani enterocitov ščetkasti obrobek, ki močno poveča notranjo površino tankega črevesa in omogoči lažjo absorpcijo prebavnih produktov. Ob mikrovilih je prisotna približno 500 μm debela nemešajoča vodna plast, ki ločuje tekočino v tankem črevesu in ščetkasto membrano enterocita ter predstavlja največjo oviro pri difuziji lipidov in lipofilnih molekul. Kljub počasnejšemu prehodu koloidnih struktur z MK, MG in lipofilnimi molekulami skozi to plast, je delež prispelih molekul veliko večji, kot če se te nahajajo v prosti obliki (7, 26).

Po prehodu skozi nemešajočo vodno plast se lahko MG, MK in lipofilne molekule absorbirajo skozi ščetkasto membrano s pomočjo pasivne difuzije ali prenašalcev, medtem ko se mešani miceli najverjetneje zlijejo s ščetkasto membrano enterocita ali pa poteče vezikularna absorpcija z vezavo na membranski protein. Pri disociaciji MK iz micela vpliva tudi nekoliko bolj kislo okolje ob ščetkastki membrani, saj so neionizirane MK bolj lipofilne od ioniziranih. Nekateri membranski proteini (P-glikoproteini) sodelujejo tudi v efluksu pravkar absorbiranih molekul nazaj v lumen tankega črevesa (7) (slika 4).



Slika 4. Možni načini prenosa MK in ZU čez ščetkasto membrano (7).

Po absorpciji v enterocit se lahko produkti lipolize in lipofilne molekule z difuzijo preko celice absorbirajo v portalno veno in preko jeter vstopijo v sistemski krvni obtok, ali pa se ti produkti v celičnih organelih resintetizirajo in vključijo v limfni sistem (26).

1.3 IN VITRO LIPOLIZA

Enostavni testi raztapljanja in dispergiranja ne napovejo najboljše obnašanja na lipidih osnovanih sistemov *in vivo*, ker ne zajemajo z lipazo katalizirane hidrolize komponent in vplivov ostalih fizioloških faktorjev pri prebavi, kot so prisotnost ŽK, FL in različnih ionov (17, 28).

Z modeli *in vitro* lipolize lahko posnemamo pogoje v ustni votlini, želodcu, tankem črevesu ali debelem črevesu. Najenostavnejše so enostopenjske metode, ki posnemajo eno omenjeno regijo GIT, medtem ko večstopenjske metode posnemajo dve ali več regij GIT. Ker je *in vivo* lipoliza proces, ki združuje številne med seboj prepletene in odvisne mehanizme prebave, je priporočljivo, da model *in vitro* lipolize čim bolj poenostavimo in uporabimo ključne komponente in lastnosti GIT. Na ta način se izognemo kompleksnosti modela, ovrednotimo lahko več vzorcev ter privarčujemo na času in stroških uporabe modela (23).

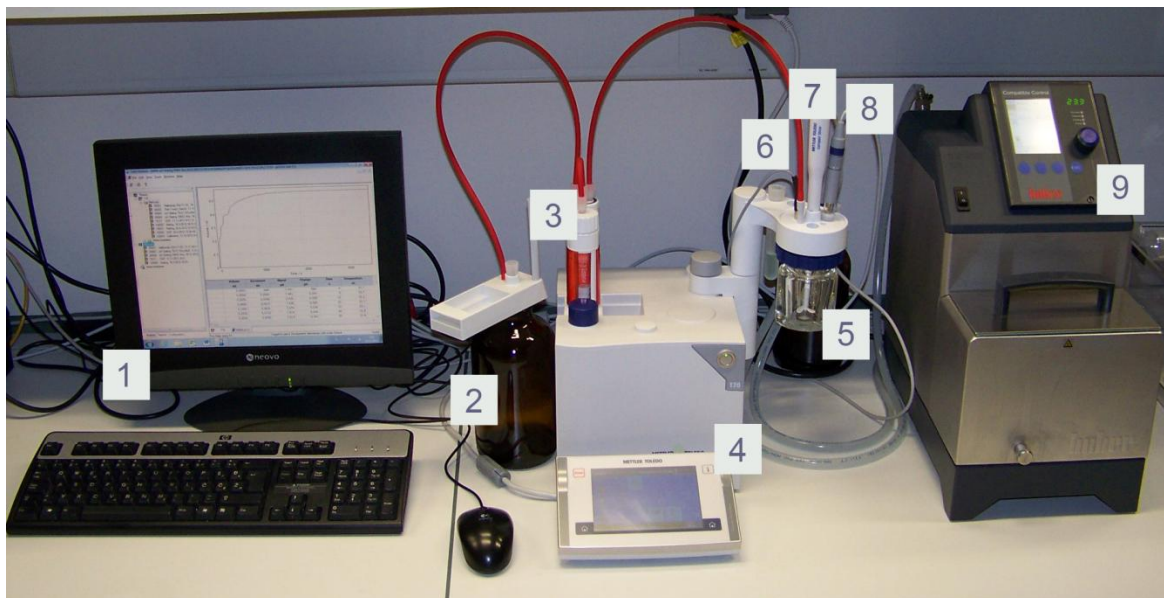
Najpogosteje se razvija in uporablja modele, ki simulirajo pogoje v tankem črevesu, saj je v tem delu GIT prebava lipidov najbolj obsežna. Nekateri avtorji navajajo tudi velik pomen lipolize v želodcu ter razvijanje sestavljenih *in vitro* modelov, v katere vključimo še pogoje iz želodca (17, 23).

1.3.1 pH-stat metoda

Primer enostopenjskega modela *in vitro* lipolize v tankem črevesu je t.i. pH-stat metoda. Pri tem sistem ob konstantnem mešanju prebavnega medija in vzorca z dodatkom baze titrira z encimsko hidrolizo sproščene MK ter uravnava pH na predhodno nastavljeno vrednost. S pomočjo pH-stat metode lahko pod enakimi pogoji kvantitativno primerjamo različne na lipidih osnovane sisteme, ovrednotimo vpliv lipolize na izbrane sisteme in določimo profil MK, vrsto lipidov, porazdelitev velikosti delcev itd. (29).

In vitro lipoliza poteka v na 37 °C termostahirani reakcijski posodi s prebavnim pufrom, kjer je mešalo, ki meša medij z določeno hitrostjo, in steklena elektroda, ki meri pH medija. V prebavnem pufru dispergiramo določeno količino na lipidih osnovanega sistema

in z dodatkom sveže pripravljene pankreasne lipaze s kolipazo, sprožimo hidrolizo TG, kjer zaradi nastanka prostih MK, pH medija pade. Ob padcu pH titrator doda toliko baze (najpogosteje NaOH), da pH naraste na nastavljeno vrednost (23, 25). Na sliki 5 so prikazani posamezni deli aparatur za izvedbo *in vitro* lipolize.



Slika 5. 1 - računalnik z računalniškim programom LabX Pro, s katerim nastavljamo parametre metode in spremljamo proces titracije; 2 - steklenica z določeno koncentracijo NaOH; 3 - 10 ml bireta z NaOH, ki je preko dozirnika povezana z reakcijsko posodo; 4 - titrator T70 s prikazovalnikom; 5 - termostatisirana reakcijska posoda z dvojnim plaščem, ki je preko cevi, v kateri je segreta voda, povezana s termostatom; 6 - termometer in dozirnik NaOH; 7 - mešalo; 8 - kombinirana steklena elektroda; 9 - termostaat.

Računalniški program lahko v predhodno določenih časovnih točkah sproti beleži izmerjen pH medija, dodan volumen baze, temperaturo v reakcijski posodi in ostale parametre, preko katerih lahko spremljamo in ovrednotimo potek *in vitro* lipolize na lipidih osnovanih sistemov.

Titracija MK z NaOH je indirektnen in nespecifičen prikaz lipolize TG, saj lahko na padec pH vplivajo tudi z mešanjem v medij vnesen CO₂, hidroliza FL in MK, ki izvirajo iz razgrajenih proteinov ali hidroliza nečistot, ki so del pankreatina ali žolčnega ekstrakta. Da izločimo omenjene dejavnike, ki lahko vplivajo na *in vitro* lipolizo, je priporočljivo izvesti slepo meritev brez prisotnega vzorca (25).

1.3.2 Izbira koncentracije titranta

Kot titrant se pri *in vitro* lipolizi najpogosteje uporablja NaOH s koncentracijo, ki ne sme biti prenizka ali previsoka. Titracija z nizko koncentracijo NaOH lahko povzroči razredčitev medija in predstavlja problem, če zmanjšanje koncentracije komponent prebavnega pufra in pankreasne lipaze, na katerikoli način vpliva na raztapljanje slabo vodotopne učinkovine vgrajene v na lipidih osnovan sistem. Visoka koncentracija NaOH uporabljena pri titraciji tudi ni primerna, saj je v tem primeru volumen dodanega titranta zelo majhen, kar povečuje eksperimentalno napako, med drugim pa je možna tudi pretitracija sistema že z manjšim dodatkom visoko koncentriranega NaOH (17, 25).

1.3.3 Pankreasna lipaza in določanje njene aktivnosti

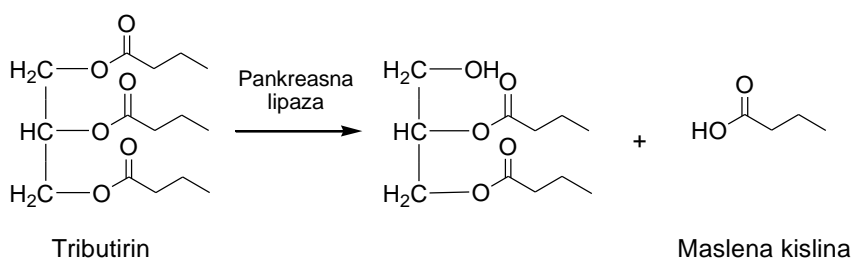
Pankreasna lipaza in kolipaza sta ključni za izvedbo *in vitro* lipolize s pH-stat metodo, saj omogočata hidrolizo TG na MK, ki jih nato sistem nevtralizira. Koncentracija pankreasne lipaze v dvanajstniku je različna in odvisna od posameznika, dneva in zaužite hrane. Pri modelih *in vitro* lipolize se ponavadi uporabljajo visoke koncentracije pankreasne lipaze, saj se z višanjem njene koncentracije poveča tudi količina sproščenih MK, medtem ko mora pankreasna lipaza pri nizkih koncentracijah tekmovati za medfazno površino olje-voda še z ostalimi prisotnimi PAS, kot so na primer ŽK (29).

Kot vir pankreasne lipaze lahko uporabimo pankreatin, čisto obliko pankreasne lipaze in lipazo izolirano iz drugih virov. Pankreatin je kompleksna mešanica prebavnih encimov (npr. lipaza, proteaza, amilaza) in ostalih bioloških sestavin (npr. kolipaza). Najpogosteje je izoliran iz trebušne slinavke prašiča ali krave. Zaradi razlik v biološkem izvoru, izolaciji in čiščenju izolata pankreatina obstajajo med serijami razlike v aktivnosti encimov in kemijski sestavi. Slednje ne velja za pankreasno lipazo izolirane v čisti obliki iz živalske trebušne slinavke, saj je kemijska sestava med serijami bolj enotna, vendar velja poudariti, da je ob uporabi čiste oblike pankreasne lipaze potrebno za učinkovito *in vitro* lipolizo mediju dodati tudi izolirano kolipazo. Najbolj čisto in ponovljivo obliko lipaze lahko pridobimo z izolacijo iz gliv *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus niveus* in plesni *Mucor Miehei*, vendar te ne posnemajo prebave lipidov tako učinkovito kot pankreasna lipaza (23).

Pri načrtovanju in izvedbi pH-stat metode je potrebno določiti pankreasni lipazi njeno aktivnost, saj se aktivnosti razlikujejo glede na njen izvor, način izolacije in čiščenja ter

pogojev shranjevanja in uporabe. Lipazo vedno shranjujemo na hladnem v zamrzovalniku, med različnimi analizami tekom dneva pa sveže pripravljeno lipazo shranjujemo na ledu. Na aktivnost lipaze vplivajo tudi temperatura, pri kateri se izvaja *in vitro* lipoliza, pH in ionska moč medija ter prisotnost različnih možnih denaturantov (23).

Aktivnost pankreasne lipaze najpogosteje določamo s tributirinskim testom, kjer kot substrat za pankreasno lipazo uporabimo tributirin, ki je ester glicerola in maslene kisline (11, 17, 30) (slika 6). Ker se tributirin v vodnem mediju ob hitrem mešanju lepo dispergira tudi brez dodanih PAS, je primeren substrat za določanje aktivnosti pankreasne lipaze, vendar pa ni najbolj specifičen, saj ga lahko hidrolizirajo tudi ostale esteraze, ki niso lipaza. V tem primeru je morda bolje uporabiti bolj specifični triolein. Tributirinski test izvajamo s pH-stat metodo, kjer ob padcu pH zaradi sproščene maslene kisline avtomatski titrator doda toliko NaOH, da se vzdržuje konstanten pH. Aktivnost pankreasne lipaze izrazimo v TBU enotah, kjer 1 TBU enota predstavlja 1 μ mol maslene kisline sproščene v 1 minuti na gram encima (31).



Slika 6. Reakcija delne hidrolize tributirina pod vplivom lipaze.

Določanje aktivnosti lipaze predpisujeta tudi Evropska farmakopeja (monografija ang. *Pancreas powder*) in Ameriška farmakopeja (monografija ang. *Pancrelipase*), kjer se v obeh primerih kot substrat uporabi z arabskim gumijem dispergirano olivno olje v pufru s tris-(hidroksimetil)-aminometanom. Po Evropski farmakopeji je predpisana uporaba natrijevega tauroholata, medtem ko se po Ameriški farmakopeji uporabi standard žolčnih soli. Po obeh postopkih se titrira sproščene MK z 0,1 M NaOH in ohranja konstanten pH 9,0. Kot referenca se po obeh postopkih določi še aktivnost encima s standardom pankreasne lipaze, kar naredi metodo še bolj robustno in rezultate primerljive z ostalimi laboratoriji (17, 32, 33).

1.3.4 Sestava prebavnega medija

Pri simulaciji pogojev v tankem črevesu je pomembno upoštevati spremembo pH iz kislega v alkalnega, aktivnost encimov (predvsem pankreasne lipaze), prisotnost bioloških PAS, ki se izločijo z žolčem (npr. ŽK in FL), in ionsko sestavo prebavnega medija (npr. Ca^{2+}). Enostaven prebavni medij z nevtralnim pH je lahko sestavljen zgolj iz pankreasne lipaze ali pankreatina in ŽK ali ekstrakta žolča. Prebavni medij, ki poleg pankreasne lipaze vsebuje tudi ŽK, soli, majhne organske molekule, proteine, koencime, FL in ima še lastnosti pufra, lahko še bolj učinkovito posnema *in vivo* pogoje v tankem črevesu (23).

- pH

Na tešče je fiziološki pH v tankem črevesu 6 do 7,5, po jedi se ta zniža na pH vrednost okoli 5 do 6,6. Te vrednosti predstavljajo tudi območje najbolj optimalnega delovanja pankreasne lipaze in kolipaze, ki je okoli pH 6,5 do 8,5, zato je priporočljivo v tem območju izbrati tudi pH medija pri *in vitro* lipolizi. Za uspešno titracijo MK sproščenih z encimsko hidrolizo, morajo te biti v ionizirani obliki. pKa dolgoveržnih MK v vodnem mediju je višji od 8, medtem ko se lahko ta v prisotnosti ŽK in Ca^{2+} zniža na 6,5. Ker ne moremo zanesljivo vedeti, kakšen pKa imajo v sistemu prisotne proste MK, lahko po končani *in vitro* lipolizi in nekaj minutni inkubaciji encima izvedemo z avtomatskim titratorjem hiter dvig pH na vrednost okoli 9, s čimer titriramo vse sproščene MK. Za izračun vseh sproščenih MK, je potrebno izvesti tudi slepo meritev v prebavnem pufru z vzorcem, vendar brez dodatka encima, da izločimo dodatek NaOH na račun sproščenih MK. V literaturi poimenujejo to metodo »back titration«, čeprav pri tej ne gre za klasično povratno titracijo, ampak zgolj za hiter dvig pH (17, 34).

- ŽK in FL

Iz jeter se z žolčem izločajo v dvanajstnik ŽK in nekaj FL, ki kot PAS tvorijo z lipidi, produkti lipolize in lipofilnimi molekulami koloidne strukture ter sodelujejo s pankreasno lipazo pri procesu hidrolize TG. V literaturi lahko zasledimo, da je koncentracija ŽK *in vivo* v dvanajstniku na tešče 2 do 5 mM, ki po zaužitem obroku naraste na 8 do 15 mM, medtem ko je koncentracija FL na tešče 0,1 do 0,6 mM, po obroku pa ta naraste na 4,8 mM tudi na račun s hrano vnesenih eksogenih FL. Pri *in vitro* lipolizi se najpogosteje uporabljajo koncentracije ŽK v območju 5 do 30 mM z upoštevanjem, da je razmerje med ŽK in FL 4:1. Pri tem nižje vrednosti predstavljajo koncentracijo ŽK in FL na tešče, višje vrednosti pa koncentracije po obroku. Pomembno je poudariti, da se lahko z višanjem

koncentracije ŽK v mediju od 0 do 20 mM aktivnost lipaze zmanjša, saj ŽK tekmuje z lipazo za dostop do medfazne površine olje-voda (17, 29).

Kot vir ŽK se lahko uporabijo ekstrakt žolča, ki ga izolirajo iz prašiča, ali čiste ŽK. Ekstrakt žolča zaradi kompleksne sestave veliko bolje posnema pogoje v tankem črevesu, kot ena ŽK ali mešanica različnih čistih ŽK. Slabost uporabe ekstrakta žolča je neponovljivost rezultatov *in vitro* lipolize zaradi razlik med serijami ekstrakta žolča, ki so odvisne tako od izvora kot izolacije. S kombinacijo različnih čistih ŽK, kot so taurodeoksiholna kislina, tauroholna kislina, deoksiholna kislina, henodeoksiholna kislina in z dodatkom FL, se lahko približamo sestavi žolča, vseeno pa je z namenom poenostavitve modela pogosta uporaba zgolj ene ŽK (17, 23).

- Kalcij

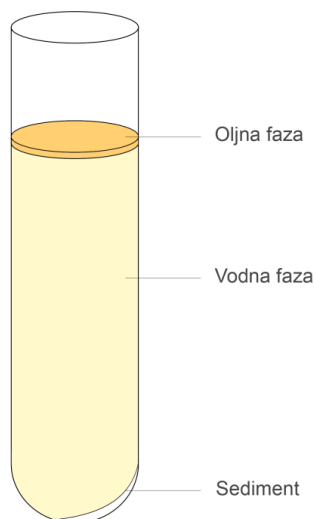
Ker pri *in vitro* lipolizi nastajajo MK, ki lahko zmanjšajo aktivnost pankreasne lipaze z akumulacijo na površini lipidnih kapljic, jih je potrebno iz sistema odstraniti. To storimo z dodatkom Ca^{2+} , saj z vezavo MK nastane slabo topno kalcijevo milo, ki se obori. Tako posnemamo *in vivo* pogoje, kjer se MK odstranjujejo iz GIT z absorpcijo v enterocite in ne vplivajo na nadaljnji potek lipolize. Ca^{2+} so med drugim tudi pomemben kofaktor za delovanje pankreasne lipaze. Na tešče je koncentracija Ca^{2+} v dvanajstniku 0,5 do 3 mM. Z zaužitjem obroka lahko njihova koncentracija naraste ali pade zaradi vezave z različnimi komponentami hrane, kot so EDTA, proteini, polisaharidi itd (23, 35).

Določeno količino Ca^{2+} (najpogosteje 5 mM) lahko dodamo v medij že pred *in vitro* lipolizo, s čimer dosežemo lipolizo večine TG v prvih 10 min izvajanja metode. Na drugi način, pa pri t.i. dinamični *in vitro* lipolizi črpalka različno hitro dodaja določeno koncentracijo Ca^{2+} (npr. 0,072 do 0,181 mmol/min) tekom celotne analize in tako omogoči bolj nadzorovano hitrost in obseg *in vitro* lipolize (17, 35).

- Ostali minerali

V *in vivo* pogojih so v mediju prisotni še številni drugi ioni, kot so natrijevi, kalijeви, sulfatni, fosfatni in hidrogenkarbonatni, ki lahko z elektrostatskimi interakcijami pomembno vplivajo na fizikalno kemijske lastnosti, topnost in agregacijo številnih komponent v sistemu in s tem na njihovo prebavo. Najpogosteje se za posnemanje *in vivo* pogojev pri *in vitro* modelih uporablja monovalentni natrijev klorid v koncentracijah okoli 150 mM (23).

Po *in vitro* lipolizi na lipidih osnovanega sistema z vgrajeno slabo vodotopno učinkovino najpogosteje medij centrifugiramo ali ultracentrifugiramo, kjer se lahko vzorec loči na oljno fazo, vodno fazo in sediment (slika 7). Ločitev na tri faze najpogosteje opazimo pri *in vitro* lipolizi sistema, ki je sestavljen samo iz gliceridov, medtem ko se ostali sistemi (npr. SMES) zaradi dobrega dispergiranja in lipolize TG ločijo najpogosteje na zgolj vodno fazo in sediment (25).



Slika 7. Ločitev medija po ultracentrifugiranju na tri faze: oljna faza, vodna faza in sediment.

V vodni fazi je prisotna slabo vodotopna učinkovina solubilizirana v mešanih micelih in veziklih, ki so sestavljeni iz ŽK, FL, PAS in produktov *in vitro* lipolize. Učinkovina lahko tako s pomočjo koloidnih struktur difundira do ščetkaste membrane v tankem črevesu in se absorbira. Sediment je sestavljen predvsem iz kalcijevega mila in oborjene slabo vodotopne učinkovine. Obarjanje slabo vodotopne učinkovine je neželen proces, saj ta ni na voljo za absorpcijo. Da ocenimo vpliv *in vitro* lipolize na solubilizacijo slabo vodotopne učinkovine vgrajene v na lipidih osnovan sistem, je smiselno določiti v vodni fazi njeno koncentracijo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) (17).

Za spremljanje topnosti slabo vodotopne učinkovine vgrajene v na lipidih osnovan sistem, lahko že med samo *in vitro* lipolizo v določenih točkah odvzemamo vzorce iz medija. Pri tem moramo odvzetemu vzorcu pred ultracentrifugiranjem dodati zaviralec aktivnosti pankreasne lipaze, da v hipu zaustavimo nadaljnjo hidrolizo TG (25). Najpogosteje se v ta namen uporablja 4-bromobenzen-boronska kislina (36, 37, 38).

2 NAMEN DELA

Biološka uporabnost slabo vodotopnih učinkovin je po peroralni aplikaciji nizka zaradi počasnega in nepopolnega raztapljanja v vodnem mediju GIT. Z vgradnjo slabo vodotopne učinkovine v SMES lahko delež absorbirane učinkovine povečamo, saj sistem po samoemulgiranju v vodnem mediju zadrži slabo vodotopno učinkovino raztopljeno v micelih. Ker SMES vsebuje lipide, se v GIT vključijo v proces prebave lipidov.

Namen diplomske naloge je z enostavnim modelom *in vitro* lipolize posnemati *in vivo* pogoje v tankem črevesu (pH-stat metoda), kjer se izvrši najbolj obsežen del prebave lipidov. Z *in vitro* lipolizo želimo ovrednotiti vpliv različne sestave SMES na solubilizacijo slabo vodotopne učinkovine in vpliv adsorpcije SMES z učinkovino na trdne porozne nosilce. Kot modelno slabo vodotopno učinkovino bomo uporabili naraven polifenol resveratrol (RSV), ki učinkuje kot antioksidant.

V prvem delu diplomske naloge bomo s tributirinskim testom pri različnih koncentracijah in pretokih NaOH določili aktivnost pankreasne lipaze. Izračunane aktivnosti pankreasne lipaze bomo nato uporabili pri izvedbi *in vitro* lipolize tekočih SMES v treh različnih prebavnih pufrih, kjer bomo iz končnega dodanega volumna NaOH izračunali množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize. Pogoje, kjer se sprosti največ MK oz. je obseg *in vitro* lipolize največji, bomo uporabili pri *in vitro* lipolizi desetih različnih tekočih SMES z vgrajenim RSV (SMES-RSV) in pri *in vitro* lipolizi samomikroemulgirajočih praškov, ki jih bomo pripravili z adsorpcijo SMES-RSV na tri trdne porozne nosilce Neusilin[®] US2, Sylsya[®] 350 in Syloid[®] 244FP. Po *in vitro* lipolizi omenjenih sistemov bomo medij ultracentrifugirali in z metodo HPLC v supernatantu določili koncentracijo RSV.

3 MATERIALI IN NAPRAVE

3.1 MATERIALI

- Ricinusovo olje (deviško, Lex, Slovenija) je bistro, brezbarvno do svetlo rumeno viskozno olje z rahlim vonjem in okusom. Pridobivajo ga s hladnim stiskanjem semen rastline kloščevca (*Ricinus communis* Linné). Je triglicerid maščobnih kislin, kot so ricinolna kislina (87 %), oleinska kislina (7 %), linolenska kislina (3 %), palmitinska kislina (2%), stearinska kislina (1 %) in v sledovih dihidrostearinska kislina. Uporablja se v kozmetični, prehrabeni in farmacevtski industriji. V farmacevtskih formulacijah ima vlogo emolienta, topila in oljnega vehikla in se lahko uporablja v kremah, mazilih, tabletah, kapsulah in kot topilo v intramuskularnih injekcijah. Molska masa ricinusovega olja je po literaturnih podatkih ~ 927 g/mol (39, 40).

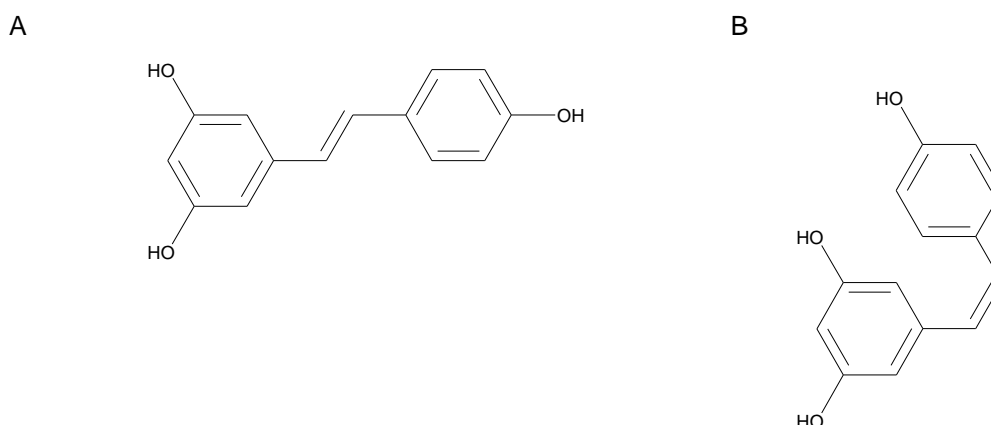
- Capmul[®] MCM EP (glicerol monokaprilokaprat (tip I), Abitec Corporation, ZDA) je srednjeveržni mono in diglicerid kaprilne in kapronske kisline z molsko maso ~ 277 g/mol. Je lipofilen in slabo topen v vodi. Uporablja se kot nosilec in topilo za slabo topne ZU (41, 42).

- Kolliphor[®] EL (polietoksilirano ricinusovo olje, Basf Chem Trade GmbH, Nemčija) je derivat ricinusovega olja in etilenoksida z nenasičenimi alkilnimi verigami, s HLB od 12 do 14 in molsko maso ~ 2467 g/mol. Staro zaščiteno ime za Kolliphor[®] EL je Cremophor[®] EL, v Evropski farmakopeji ima svojo monografijo pod imenom makrogolglicerol ricinoleat 35, v Ameriški farmakopeji pa polioksil-35 ricinusovo olje. Je blede rumena oljna tekočina, ki je bistra pri temperaturah nad 26 °C. Uporablja se kot PAS in solubilizator v tekočih farmacevtskih oblikah, ki vsebujejo v maščobah topne vitamine (A, D, E in K), eterična olja in ostale lipofilne sestavine v peroralnih in dermalnih pripravkih. V SMES se uporabljajo tudi zaradi povečanja biološke uporabnosti po peroralni aplikaciji (39, 43, 44).

- Kolliphor[®] RH40 (polietoksilirano ricinusovo olje, Sigma-Aldrich, Nemčija) je derivat hidrogeniranega ricinusovega olja in etilenoksida z nasičenimi alkilnimi verigami, s HLB od 14 do 16 in molsko maso ~ 2677 g/mol. Staro zaščiteno ime za Kolliphor[®] RH40 je Cremophor[®] RH40, v Evropski farmakopeji ga najdemo v monografiji makrogolglicerol hidroksistearat, medtem ko ga Ameriška farmakopeja uvršča v monografijo polioksil 40

hidrogenirano ricinusovo olje. Uporablja se kot neionski solubilizator za v maščobah topne vitamine (A, D, E in K), eterična olja in ostale lipofilne sestavine v peroralnih, dermalnih in parenteralnih pripravkih. Pri 20 °C je v obliki belo do svetlo rumene paste, ki se utekočini pri 30 °C. Ima nežen vonj in je brez okusa (39, 43, 45).

- Resveratrol (ChromaDex, Irvine, ZDA) ali 3,5,4'-trihidroksistilben je umazano bel prašek, ki je dobro topen v lipidih in etanolu (50 mg/ml). V vodi je slabo topen (3 mg/100 ml), a dobro permeabilen, zato je po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščen v II. razred učinkovin. Je naraven polifenol, ki je prisoten predvsem v listih grozdja (50-400 µg/g svežih listov) in v lupini grozdnih jagod (50-100 µg/g lupine). V rastlinah se sintetizira kot odgovor na zunanje stresne dejavnike, kot so poškodba rastline, glivične in bakterijske okužbe, izpostavljanje UV sevanju in ozonu. Študije so pokazale, da resveratrol deluje antioksidativno, protitumorno in protivnetno. Resveratrol se v naravi nahaja v *cis*- (Z) in *trans*- (E) obliki, kjer je *trans*- izomer biološko bolj aktiven in stabilen (spojina 2). *Trans*- izomer se pod vplivom svetlobe pretvarja v neaktiven *cis*- izomer (46, 47) .



Spojina 2. Resveratrol. A: *trans*- resveratrol, B: *cis*- resveratrol

- Neusilin[®] US2 (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) je sintetičen in amorfen magnezijev aluminometasilikat v obliki zelo lahkih belih granul. Kemijsko je zmes aluminijevega oksida, magnezijevega oksida in silicijevega dioksida (kemijska formula: $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1,7 \text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$). Zaradi velike površine in poroznosti lahko adsorbira velike količine olja (320 ml/100 g) ali vode, zato je primeren nosilec za izdelavo praškov, tablet, mazil in krem (39, 48, 49).

- Syloid[®] 244FP (Grace Division, ZDA) in Sylsilia[®] 350 (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) sta sintetična amorfnata silicijeva dioksida v obliki belega praška. Med sabo

se razlikujeta v povprečni velikosti delcev (5,5 μm oz. 1,8 μm), volumnu por (1,5 g/cm^3 oz. 1,6 g/cm^3), kapaciteti za adsorpcijo olja (300 $\text{g}/100 \text{ g}$ oz. 310 $\text{g}/100 \text{ g}$) in v pH 5% vodne raztopine (7,0 oz. 7,5). Zaradi svoje poroznosti lahko adsorbirata veliko količino olja, uporabljata se kot drsili za povečanje pretočnih lastnosti praška, pomožni snovi za tabletiranje, nosilca ZU, zgoščevali, zaščitni na vlago občutljivih zdravilnih učinkovin, omogočata enakomerno sproščanje zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik itd (50, 51, 52).

- Lipoid[®] S100 (Lipoid GmbH, Nemčija) je prečiščena vrsta sojinega lecitina, ki vsebuje več kot 94 % fosfatidilholina. Vsebuje lahko tudi nekaj fosfatidiletanolamina, lizofosfatidilholina, trigliceridov, D1- α -tokoferola in vode. Je voskaste konsistence in svetlo rumene barve. Lecitin je kompleksna zmes v acetonu netopnih fosfolipidov (fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol) trigliceridov in maščobnih kislin. Vir lecitina in način predelave določa sestavo lecitina. Lecitin pridobljen iz jajčnega rumenjaka vsebuje približno 69 % fosfatidilholina in 24 % fosfatidiletanolamina, medtem ko vsebuje lecitin pridobljen iz sojinih zrn 21 % fosfatidilholina, 22 % fosfatidiletanolamina, 19 % fosfatidilinozitola in ostalih sestavin. Najpogosteje se uporablja v farmacevtskih oblikah kot emolient, emulgator in stabilizator v intramuskularnih in intravenskih injekcijah, parenteralni prehrani, kremah in mazilih (39, 53).

- pankreatin iz svinjske trebušne slinavke, Sigma-Aldrich, ZDA.
- Tributirin, gliceril tributirat, 1,2,3-tributirilglicerol, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Švica
- Trizma[®] maleat, tris-(hidroksimetil)-aminometan maleat, Sigma-Aldrich, ZDA
- kalcijev klorid dihidrat, MERCK, Nemčija
- natrijev deoksiholat, Sigma-Aldrich, Nemčija
- ekstrakt žolča iz prašiča (ang. *Bile extract porcine*), Sigma-Aldrich, ZDA
- natrijev klorid, MERCK, Nemčija
- natrijev hidroksid, MERCK, Nemčija
- metanol za analizo in metanol za tekočinsko kromatografijo, MERCK, Nemčija
- ocetna kislina 100%, brezvodna oblika za analizo, MERCK, Nemčija

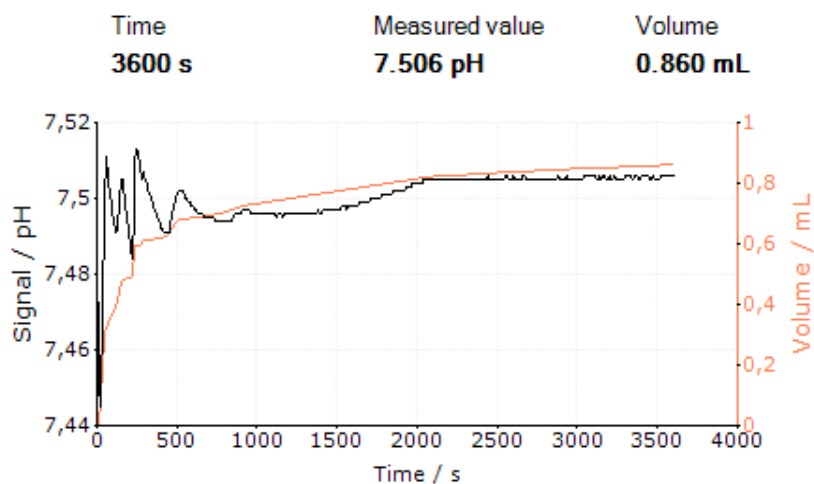
3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo, AG245, Švica
- analitska tehtnica, Mettler Toledo, XS205, Švica
- elektronska pipeta, BIOHIT, eLINE[®] 50-500 µl, Finska
- elektronska pipeta, BIOHIT, eLINE[®] 100-5000 µl, Finska
- Vortex lab dancer, IKA[®], Nemčija
- magnetno mešalo, Tehtnica Železniki, Rotamix 550 MMH, Slovenija
- centrifuga, Eppendorf, Microcentrifuge 5415R, Nemčija
- pH meter, Mettler Toledo, SevenCompact[™] pH/Ion S 220, Švica
- kombinirana steklena elektroda, Mettler Toledo, InLab[®] Expert Pro ISM, Švica
- titrator, Mettler Toledo, T70 Titrator, Švica
- termostat, Huber, Ministat 125-cc-NR, Nemčija
- mešalo za titrator, Mettler Toledo, Compact Stirrer, Švica
- kombinirana steklena elektroda za titrator, Mettler Toledo, DGi111-SC, Švica
- ultracentrifuga, Thermo Scientific[®], Sorvall WX ULTRA Series Centrifuge, ZDA
- rotor, Thermo Scientific, T-1250 Fixed-Angle Rotor, ZDA
- rotor, Thermo Scientific, Fiberlite F50L-24x1,5 Rotor, ZDA
- HPLC, Agilent Technologies, Agilent 1100 Series, Nemčija
- kolona za HPLC, YMC Separation Technologies, YMC-Pack ODS-AM, Nemčija
- membranski filter 0,45 µm RC, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Ministart[®] RC25, Nemčija

4 METODE

4.1 pH-STAT METODA

pH-stat metodo smo izvajali na titratorju T70 ob podpori programske opreme LabX Pro, v katerem smo za vsako analizo nastavili ustrezne parametre (preglednica III). Z dodatkom raztopine pankreatina v termostatisirano reakcijsko posodo (37 °C) z medijem in vzorcem smo sprožili hidrolizo TG na MK. Pri tem smo s kombinirano stekleno elektrodo merili padec pH, titrator pa je s pomočjo dozirnika ob določenem pretoku in koncentraciji NaOH titriral MK v reakcijski posodi. Padec pH in dodatek NaOH smo lahko spremljali v programu LabX Pro in iz rezultatov ovrednotili hidrolizo posameznih substratov (slika 8). Z omenjeno metodo smo določali aktivnost pankreasne lipaze pri različnih koncentracijah in pretokih titranta NaOH ter izvajali *in vitro* lipolizo SMES.



Slika 8. Primer *in vitro* lipolize SMES v programu LabX Pro.

Preglednica III. Parametri pH-stat metode za določanje aktivnosti pankreasne lipaze (a) in *in vitro* lipolizo SMES (b) (54).

Vzorec	Določen volumen (ang. <i>Fixed volume</i>) (ml)	1
	Gostota (g/ml)	1
	Korekcijski faktor	1,0
	Temperatura (°C)	25,0
Vzdrževanje pH	Titrant	NaOH
	Koncentracija (mol/l)	0,2; 0,6
	Senzor	pH
	Mešanje (%) (0-100)	40
	Predhodna titracija (ang. <i>Pretitration</i>)	Ne
	Predhodni dodatek titranta (ang. <i>Predispense</i>)	Ne
	Nastavljen pH (ang. <i>Set potencial</i>)	7,5
	Odstopanje od nastavljenega pH (ang. <i>Control band</i>) (0,01-100)	0,01
	Nagnjenost odstopa od nastavljenega pH (ang. <i>Tendency</i>)	Pozitivna
	Največji pretok titranta (ang. <i>Dosing rate max.</i>) (ml/min) (0,001-60)	0,5; 1; 5; 10; 15; 30; 60
	Najmanjši pretok titranta (ang. <i>Dosing rate min.</i>) (µl/min) (1-10 ⁴)	5
Prekinitvev metode	V (max.) (ml) (0,01-1000)	70
	t (max) (min) (1-10 ⁶)	30 ^a ; 60 ^b
	dV (ml/min) (0,0001-10)	0,01
	dt (min) (1-10 ⁶)	30 ^a ; 60 ^b
	Interval shranjevanja rezultatov (s) (0,1-10 ⁶)	10

4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI PANKREASNE LIPAZE

Aktivnost pankreasne lipaze smo določali s tributirinskim testom, kjer smo kot substrat za pankreasno lipazo uporabili ester med glicerolom in masleno kislino tributirin. Z dodatkom pankreasne lipaze v medij s tributirinom poteče reakcija hidrolize in nastanek maslene kisline, ki jo sistem nevtralizira z dodatkom NaOH.

V čisto in osušeno reakcijsko posodo titratorja smo dodali 20 ml maleatnega pufra in 3 ml substrata tributirina ter namestili reakcijsko posodo na titrator. Puffer in substrat smo mešali

2 min na 40 % moči mešala in nato med mešanjem na isti hitrosti mešala umerili pH na 7,5 z 1 M ali 0,1 M NaOH. V programu LabX Pro smo nastavili in shranili parametre pH-stat metode (preglednica III), nato smo skozi odprtino nad reakcijsko posodo istočasno dodali 500 µl pripravljenega encima in aktivirali metodo, ki je trajala 30 min (55). Aktivnost pankreasne lipaze smo ovrednotili pri dveh koncentracijah (0,2 M in 0,6 M) in različnih pretokih NaOH (60; 30; 15; 5; 1; 0,5 ml/min).

Spremljali smo volumen dodanega NaOH v odvisnosti od časa. V začetnem časovnem intervalu, kjer je premica najbolj linearna, smo iz naklona premice določili povprečni volumen dodanega NaOH in izračunali aktivnost pankreasne lipaze (enačba 1). Aktivnost pankreasne lipaze smo izrazili v TBU enotah, kjer 1 TBU enota predstavlja 1 µmol maslene kisline sproščene v minuti na gram encima.

Enačba 1

$$\text{Aktivnost pankreasne lipaze (TBU/g)} = \frac{\bar{V}(\text{NaOH}) \times c(\text{NaOH}) \times 1000}{m(\text{pankreatin})}$$

$\bar{V}(\text{NaOH})$... povprečni volumen dodanega NaOH (ml/min)

$c(\text{NaOH})$... koncentracija NaOH (mol/l)

$m(\text{pankreatin})$... masa natehtanega pankreatina (g)

- priprava maleatnega pufra

Maleatni pufer s sestavo: 50 mM Trizma[®] maleat, 150 mM NaCl in 5 mM CaCl₂·2H₂O, smo pripravili tako, da smo natehtane sestavine prenesli v merilno bučko in jih raztopili v nekaj prečiščene vode. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo umerili pufer z 0,1M in 1 M NaOH na pH 7,5 ter dopolnili pufer s prečiščeno vodo do oznake merilne bučke (11, 56).

- priprava raztopine pankreatina za določanje aktivnosti pankreasne lipaze v pankreatinu

Pripravili smo 5 mg pankreatina na 1 ml maleatnega pufra. V 2 ml epice smo natehtali 10 mg pankreatina in z električno pipeto dodali 2 ml maleatnega pufra. Epice z encimom smo mešali 15 min na Vortexu in jih nato centrifugirali 15 min na 5 °C pri 3000 rcf. Po centrifugiranju smo encim ves čas shranjevali na ledu in ga porabili še isti dan (55).

4.3 IN VITRO LIPOLIZA

4.3.1 Priprava SMES

- priprava SMES

SMES smo pripravili iz različnih deležev ricinusovega olja, Capmula[®] MCM, Kolliphorja[®] EL in Kolliphorja[®] RH40 (preglednica IV). Vse sestavine smo natehtali v erlenmajerico z obrusom in mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene bistre zmesi.

Preglednica IV. SMES z različnimi deleži ricinusovega olja, Capmula[®] MCM, Kolliphorja[®] EL in Kolliphorja[®] RH40.

Sestava SMES	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Ricinusovo olje (%)	30	30	30	/	/	15	15	10	15	20
Capmul [®] MCM (%)	/	/	/	30	30	15	15	10	15	20
Kolliphor [®] EL (%)	70	/	35	/	35	70	/	40	35	30
Kolliphor [®] RH40 (%)	/	70	35	70	35	/	70	40	35	30

- priprava SMES-RSV

SMES-RSV smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali RSV (10 mg RSV/100 mg SMES-RSV), dodali pripravljen SMES in zaščiteno pred svetlobo mešali na magnetnem mešalu 12 h do popolnega raztapljanja RSV.

- priprava samomikroemulgirajočih praškov z RSV

SMES-RSV smo adsorbirali na nosilce Neusilin[®] US2, Sylysia[®] 350 in Syloid[®] 244FP v masnem razmerju 1:1. V pateno smo natehtali SMES-RSV in nato postopoma med mešanjem s pestilom dodajali na čolniček natehtan nosilec. Prašek smo mešali toliko časa, da se ni več lepil na steno patene (21).

Ker se RSV pod vplivom UV svetlobe iz *trans*- oblike pretvarja v biološko manj aktiven in stabilen *cis*- izomer, je potrebno pri rokovanju z RSV ves čas delati v zatemnjenem prostoru ali z alu folijo zaščititi steklovino, v kateri je RSV.

4.3.2 Nasičena topnost RSV v prebavnem pufri

Nasičeno topnost RSV v prebavnem pufri I smo določili tako, da smo v erlenmajerico z obrusom natehtali prebitno količino RSV in dodali 25 ml prebavnega pufra I. Suspenzijo

smo mešali na magnetnem mešalu 48 h zaščiteno pred svetlobo. Nato smo prenesli 1,5 ml suspenzije v 1,5 ml centrifugirke in ultracentrifugirali 45 min na 20 °C pri 40000 rcf. Supernatant smo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45 µm in izmerili koncentracijo RSV z metodo HPLC.

4.3.3 Topnost SMES-RSV v prečiščeni vodi in prebavnem puftru

Določali smo topnost RSV vgrajenega v SMES po dispergiranju v prečiščeni vodi in prebavnem puftru. V erlenmajerico z obrusom smo natehtali 100 mg SMES-RSV (10 mg RSV/100 mg zmesi) in dodali 20 ml prečiščene vode oz. prebavnega pufra I. Mikroemulzijo smo mešali na magnetnem mešalu 1 h zaščiteno pred svetlobo. 1 ml mikroemulzije smo nato redčili na 10 ml v temni bučki z raztopino metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1. Razredčeno mikroemulzijo smo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45 µm in določili koncentracijo RSV z metodo HPLC.

4.3.4 Topnost samomikroemulgirajočih praškov z RSV v prečiščeni vodi in prebavnem puftru

200 mg pripravljenega samomikroemulgirajočega praška smo raztopili v 20 ml prečiščene vode oz. prebavnega pufra I (10 mg RSV/200 mg praška) in mešali na magnetnem mešalu 2 h zaščiteno pred svetlobo. Nato smo počakali toliko časa, da se je prašek posedel in 1 ml mikroemulzije redčili na 10 ml z raztopino metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1. Razredčeno mikroemulzijo smo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45 µm in določili koncentracijo RSV z metodo HPLC.

4.3.5 Priprava prebavnih pufrov za *in vitro* lipolizo

- priprava prebavnega pufra I

Prebavni pufer I s sestavo: 50 mM Trizma[®] maleat, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂·2H₂O, 4,89 mM natrijev deoksiholat in 1,22 mM Lipoid[®] S100, smo pripravili tako, da smo v merilno bučko najprej natehtali natrijev deoksiholat in ga raztopili v nekaj prečiščene vode. Nato smo v merilni bučki raztopili natehtana NaCl in CaCl₂·2H₂O, dodali Lipoid[®] S100 in dobro premešali. Na koncu smo dodali še Trizma[®] maleat. Medij smo mešali 12 ur in mu nato med mešanjem na magnetnem mešalu umerili pH na 7,5 z 0,1 M ali 1 M NaOH ter

dopolnili pufer s prečiščeno vodo do oznake merilne bučke. Pufer smo porabili v roku dveh dni in ga shranjevali v hladilniku.

- priprava prebavnih pufrov II in III

Prebavna pufera II in III smo pripravili na enak način kot prebavni pufer I, s to razliko, da smo namesto natrijevega deoksiholata uporabili žolčni ekstrakt iz prašiča v masnem razmerju 1:1. Za pripravo prebavnega pufera II smo enako masno razmerje (1:1) uporabili tudi pri natehti Lipoida[®] S100, medtem ko Lipoida[®] S100 nismo dodali v prebavni pufer III, ki je tako vseboval samo Trizma[®] maleat, NaCl, CaCl₂·2H₂O in žolčni ekstrakt.

4.4 IN VITRO LIPOLIZA SMES

V stekleno čašo smo natehtali približno 200 mg SMES in dodali toliko prebavnega pufera I, da skupaj z dodano raztopino pankreatina predstavlja 40 ml skupnega medija (primer izračuna 1). SMES smo mešali 15 min na magnetnem mešalu. V reakcijsko posodo titratorja smo prelili vzorec s prebavnim pufrom I in umerili pH na 7,5 z 0,1 M ali 1 M NaOH. Nato smo v programu LabX Pro nastavili parametre pH-stat metode (preglednica III) ter hkrati z aktivacijo metode dodali v reakcijsko posodo iz aktivnosti pankreasne lipaze preračunano količino raztopine pankreatina (primer izračuna 1). Na enak način smo izvedli tudi slepo meritev brez SMES. Sproščene MK smo titrirali z 0,2 M in 0,6 M NaOH pri pretokih 60, 30, 15, 5, 1 in 0,5 ml/min. Pri *in vitro* lipolizi SMES, ki je potekala v prebavnem pufri II in III, smo sproščene MK titrirali samo z 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min.

Pri *in vitro* lipolizi SMES smo spremljali volumen porabe NaOH in iz končnega volumna dodanega NaOH izračunali množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize (enačba 2 in 4). Pri izračunu teoretične množine sproščenih MK smo v enačbi 3 upoštevali faktor 2, ki predpostavlja, da se s hidrolizo TG sprostita v medij dve MK.

Enačba 2

$$n(MK) = n(NaOH) = c(NaOH) \times (V(NaOH) - V(slepa))$$

$n(MK)$... množina sproščenih MK (mol)

$n(NaOH)$... množina NaOH (mol)

$c(NaOH)$... koncentracija NaOH (mol/l)

$V(NaOH)$... volumen dodanega NaOH med *in vitro* lipolizo (ml)

$V(slepa)$... volumen slepe analize (ml)

Enačba 3

$$n_t = 2 \times \sum \left(\frac{m_x}{M_x} \right)$$

n_t ... teoretična množina MK, ki se sprosti med iz 200 mg S10 (μmol)

m_x ... masa posamezne komponente v 200 mg S10 (g)

M_x ... molska masa posamezne komponente S10 (g/mol) (poglavje 4.1.)

Enačba 4

$$\text{Obseg in vitro lipolize (\%)} = \frac{\bar{n}}{n_t} \times 100$$

\bar{n} ... povprečna množina sproščenih MK (μmol)

- priprava raztopine pankreatina za *in vitro* lipolizo

Iz aktivnosti pankreasne lipaze pri določeni koncentraciji in pretoku NaOH smo preračunali, koliko ml encima s koncentracijo 1 g pankreatina/5 ml maleatnega pufra potrebujemo za *in vitro* lipolizo enega SMES, da je aktivnost pankreasne lipaze v reakcijskem mediju 1000 TBU/ml medija (primer izračuna 1). Preračunano maso pankreatina smo natehtali v čašo in dodali ustrezen volumen maleatnega pufra. Suspenzijo smo mešali 15 min na magnetnem mešalu in odpipetirali 2 ml suspenzije v 2 ml epice. Epice z encimom smo centrifugirali 15 min na 5 °C pri 3000 rcf. Supernatant smo nato združili in mu z 0,1 M ali 1 M NaOH umerili pH na 7,5. Encim smo ves čas shranjevali na ledu in ga porabili še isti dan (11).

Primer izračuna 1.

Izračunana povprečna aktivnost pankreasne lipaze: 29458 TBU/g

Priporočena aktivnost pankreasne lipaze v 40 ml medija: 40000 TBU

29458 TBU ... 1 g pankreatina 40000 TBU ... x x = 1,3578 g pankreatina	→	1 g pankreatina ... 5,0 ml maleatnega pufra 1,3578 g pankreatina ... x x = 6,7893 ml ~ 6,790 ml raztopine pankreatina
--	---	--

In vitro lipoliza treh vzorcev: 6,790 ml × 3 = 20,368 ml ~ 21,0 ml raztopine pankreatina	→	m pankreatina: 1 g pankreatina ... 5,0 ml maleatnega pufra x ... 21,0 ml maleatnega pufra x = 4,2 g pankreatina
--	---	--

Za in vitro lipolizo enega vzorca moramo dodati v reakcijsko posodo 6,790 ml raztopine pankreatina in 33,21 ml prebavnega pufra (skupni volumen je 40 ml), da bo aktivnost pankreasne lipaze v končnem volumnu 40 ml 1000 TBU/ml medija.

Za tri paralele in vitro lipolize moramo natehtati 4,2 g pankreatina in dodati 21,0 ml maleatnega pufra.

4.5 IN VITRO LIPOLIZA SMES-RSV

In vitro lipolizo SMES-RSV smo izvajali v prebavnem pufri I po postopku opisanem v poglavju 4.4. Kot titrant smo uporabili 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min.

Po končani in vitro lipolizi smo prenesli medij v dve 20 ml centrifugirki z gumijastim zamaškom in aluminijastim pokrovčkom, umerili skupno maso medija in centrifugirk, ter centrifugirali na ultracentrifugi 45 min na 20 °C pri 30000 rcf. Medij se je ločil na dve fazi: supernatant in sediment. V zatemnjenem prostoru in zatemnjeni bučki smo nato redčili 1 ml supernatanta na 10 ml z raztopino metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1. Razredčeno raztopino supernatanta smo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µmol, ji z metodo HPLC določili površino pod krivuljo in iz umeritvene premice izračunali koncentracijo RSV.

4.6 *IN VITRO* LIPOLIZA SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH PRAŠKOV Z RSV

V plastičen čolniček smo natehtali približno 400 mg praška in ga prenesli v reakcijsko posodo. Dodali smo toliko prebavnega pufra I, da skupaj z dodano pankreasno lipazo predstavlja 40 ml skupnega medija (primer izračuna 1). Prašek smo mešali na titratorju 1 h pri 40 % moči mešala in nato umerili pH na 7,5 z 0,1 M ali 1 M NaOH. Pred aktivacijo metode, smo nastavili parametre analize ter hkrati z aktivacijo metode, dodali v reakcijsko posodo iz aktivnosti pankreasne lipaze preračunano količino encima (preglednica III). Reakcijsko posodo smo med lipolizo imeli zaščiteno pred svetlobo.

Po končani *in vitro* lipolizi smo prenesli medij v dve 20 ml centrifugirki z gumijastim zamaškom in aluminijastim pokrovčkom, umerili skupno maso medija in centrifugirk, ter centrifugirali na ultracentrifugi 45 min na 20 °C pri 30000 rcf, kjer se je medij ločil na dve fazi: supernatant in sediment. V zatemnjenem prostoru smo nato redčili 1 ml supernatanta na 10 ml z raztopino metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1. Razredčeno raztopino supernatanta smo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µmol, ji z metodo HPLC določili površino pod krivuljo in iz umeritvene premice izračunali koncentracijo RSV.

4.7 DOLOČANJE RSV Z METODO HPLC

Koncentracijo raztopljenega RSV smo določali z metodo HPLC. Uporabili smo reverznofazno C18 kolono YMC-Pack ODS-AM, 4,6 x 250 mm², 5 µm. Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,5 % očetne kisline v raztopini metanola za HPLC in bidestilirane vode v volumskem razmerju 1:1. Temperatura kolone je bila nastavljena na 25 °C s pretokom mobilne faze 1 ml/min in volumnom injeciranja 20 µl. Valovna dolžina UV detektorja je bila 303 nm. Retencijski čas RSV je znašal približno 7,5 min.

Za izračun koncentracij raztopljenega RSV iz površin pod krivuljo smo izdelali umeritveno premico. V zatemnjeno bučko smo natehtali približno 10 mg RSV in ga nato redčili z raztopino metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1, da smo dobili koncentracije od 0,001 mg/ml do 0,1 mg/ml. S HPLC smo vzorcem določili površino pod krivuljo in z metodo linearne regresije določili enačbo umeritvene premice in kvadrat koeficienta korelacije (R^2) (enačba 5) (slika 9).

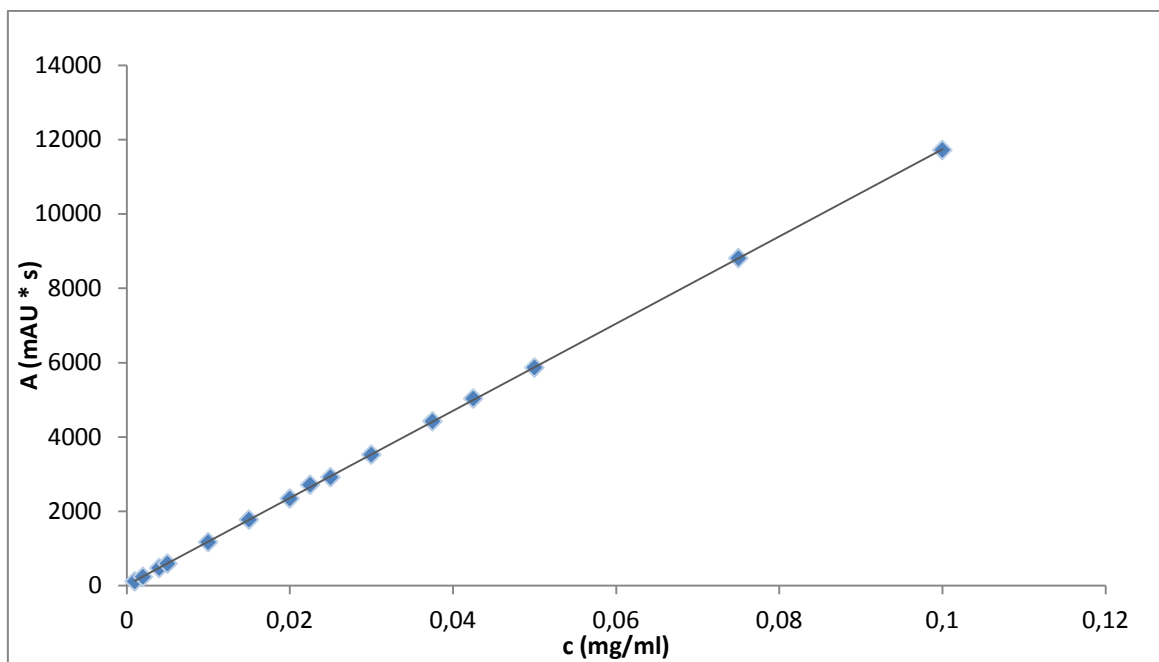
Enačba 5.

$$A = 117274,3 \times c + 11,4$$

$$R^2 = 0,99995$$

A ... površina pod krivuljo (mAU × s)

c ... koncentracija RSV (mg/ml)



Slika 9. Umeritvena premica za RSV.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 DOLOČANJE AKTIVNOST PANKREASNE LIPAZE

Pred *in vitro* lipolizo SMES s pH-stat metodo smo najprej določili aktivnost pankreasne lipaze pri dveh različnih koncentracijah in pretokih NaOH. Iz aktivnosti pankreasne lipaze smo nato določili količino pankreatina, ki ga je potrebno dodati prebavnem pufru, da znaša aktivnost pankreasne lipaze v končnem volumnu prebavnega medija 1000 TBU/ ml (17). Ker obstajajo med serijami vzorcev pankreatina razlike, je potrebno pred *in vitro* lipolizo SMES določiti vsaki seriji aktivnost pankreasne lipaze pri določenih pogojih. V naši diplomski nalogi smo uporabljali dve seriji, kar smo na slikah označili z eno (*) oz. dvema (***) zvezdicama.

Za titracijo MK, ki nastanejo z encimsko hidrolizo TG, najdemo v literaturi uporabo različnih vrednosti NaOH, ki so v območju 0,1 M do 1 M (34, 57). Izbrali smo dve koncentraciji: 0,2 M in 0,6 M NaOH. Uporabo 0,2 M NaOH v literaturi zasledimo pri prebavi dolgoveržnih TG, pri prebavi srednjeveržnih lipidov pa 0,6 M NaOH (11, 56, 58).

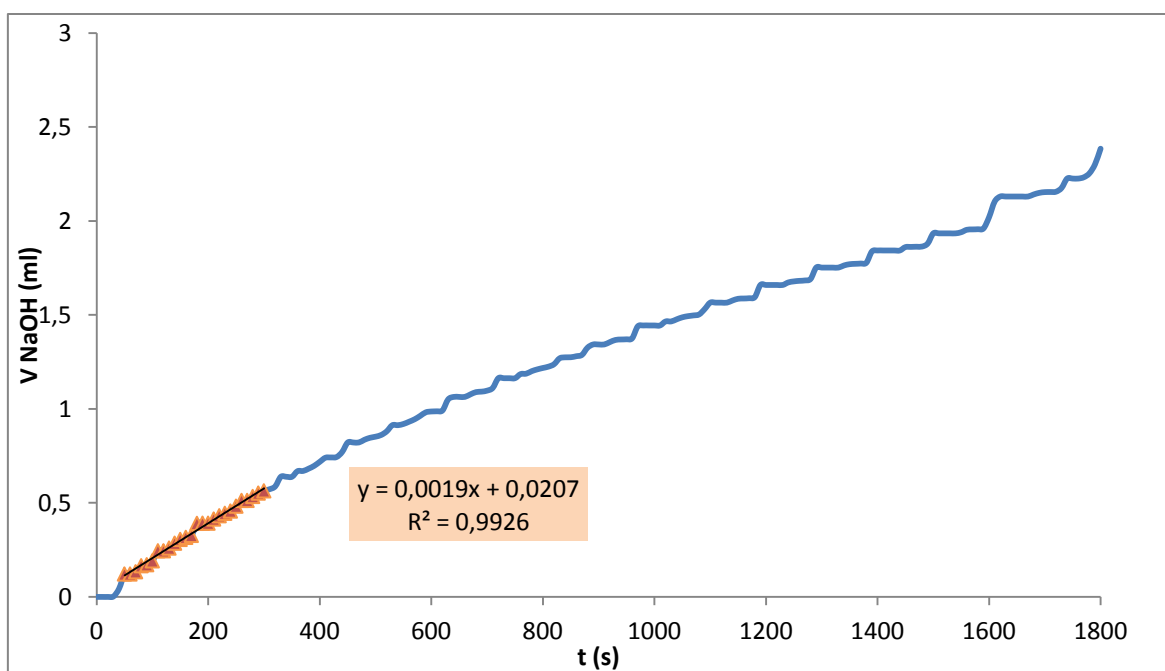
Aktivnost pankreasne lipaze v pankreatinu smo določali s tributirinskim testom. V termostatarano reakcijsko posodo smo dodali 3 ml substrata tributirin in 20 ml maleatnega pufru s pH 7,5, ki vsebuje Trizma[®] maleat, natrijeve in kalcijeve ione. Trizma[®] maleat daje raztopini lastnosti pufru z majhno pufersko kapaciteto, saj pH pufru lahko pade že ob prisotnosti manjše količine kisline (57). Hidrolizo tributirina smo sprožili z dodatkom 500 µl predhodno centrifugirane raztopine pankreatina, ki vsebuje pankreasno lipazo in kolipazo. S tako majhno količino dodanega encima glede na prebiten tributirin smo dosegli, da je v mediju aktiven ves encim, kateremu lahko nato določimo aktivnost (55).

S padcem pH zaradi sproščene maslene kisline titrator iz birete doda toliko NaOH, da se pH ponovno dvigne na 7,5. V programu LabX Pro lahko nastavimo dovoljeno največje odstopanje od nastavljenega pH na 0,01 do 100 enote. To pomeni, da bo zunaj nastavljenega odstopa od nastavljenega pH sistem titriral z največjim nastavljenim pretokom NaOH. Pri tem velja, da manjši kot je nastavljen odstop, hitreje se bo sistem odzval na odmik od nastavljenega pH. Ko meritve dosežejo območje odstopa, titrator zmanjša hitrost dodanega NaOH na najmanjši pretok titranta (v našem primeru 5 µl/min), da doseže nastavljen pH. Z nastavitvijo najmanjšega dovoljenega odstopanja od

nastavljenega pH na 0,01 smo dosegli veliko manjša nihanja v dodanem NaOH in večjo linearnost meritev (54, 55).

Aktivnost pankreasne lipaze smo določili s titracijo maslene kisline z 0,2 M in 0,6 M NaOH pri različnih pretokih NaOH 60 ml/min, 30 ml/min, 15 ml/min, 5 ml/min, 1 ml/min in 0,5 ml/min.

Spremljali smo volumen dodanega NaOH v odvisnosti od časa. Interval shranjevanja meritev je bil nastavljen na 10 s, da smo dobili čim več točk, iz katerih smo lahko določili aktivnost. Aktivnost pankreasne lipaze smo izračunali po enačbi 1 iz povprečnega dodanega volumna (\bar{V} (NaOH) v ml/s), ki je enak naklonu premice določene z linearno regresijo začetnih točk krivulje (primer izračuna 2). Časovni interval, ki je primeren za določanje aktivnosti pankreasne lipaze iz naklona je različen za vsako analizo, zato je potrebno pri vsakem profilu titracije individualno oceniti primeren časovni interval (30). Največja aktivnost in najbolj linearni del krivulje je najpogosteje bil v območju 1 do 5 min (slika 10).



Slika 10. Primer določanja aktivnosti pankreasne lipaze s tributirinskim testom in titracijo sproščenih MK z 0,6 M NaOH in s pretokom 0,5 ml/min, kjer merimo dodatek NaOH v odvisnosti od časa. Krivulja je najbolj linearna (R^2 je 0,9926) v časovnem intervalu 50 do 300 s s povprečnim dodanim volumnom NaOH 0,0019 ml/s.

Primer izračuna 2.

$$Naklon = \bar{V} (NaOH) = 0,0019 \text{ ml/s} = 0,114 \text{ ml/min}$$

$$m (\text{pankreatina}) = 2,58 \times 10^{-3} \text{ g}$$

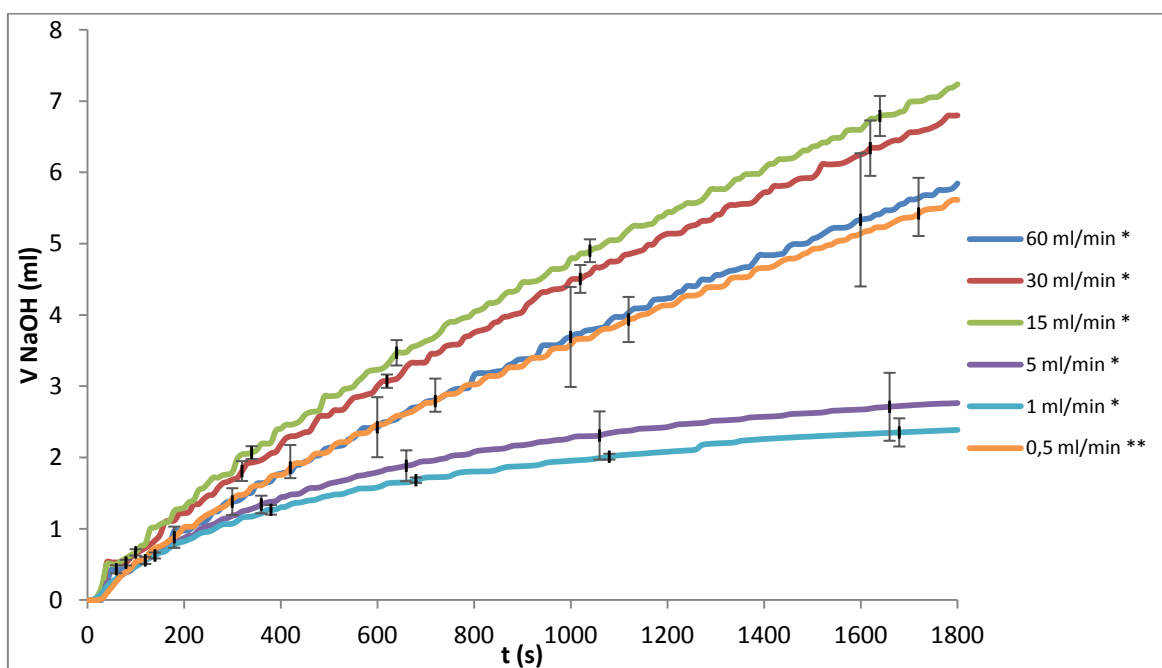
$$c (NaOH) = 0,6 \text{ M}$$

$$\text{Aktivnost pankreasne lipaze} = \frac{\bar{V} (NaOH) \times c (NaOH) \times 1000}{m (\text{pankreatin})} =$$

$$= \frac{0,114 \frac{\text{ml}}{\text{min}} \times 0,6 \text{ M} \times 1000}{2,58 \times 10^{-3} \text{ g}} = 26563 \frac{\text{TBU}}{\text{g}}$$

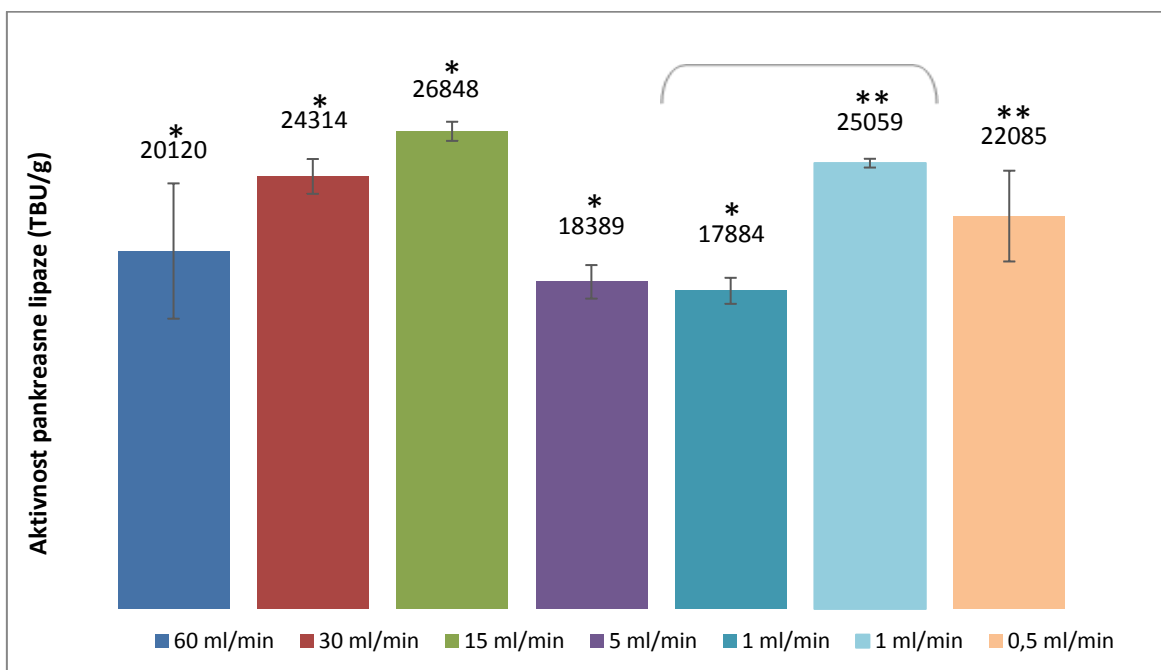
5.1.1 Titracija maslene kisline z 0,2 M NaOH

Slika 11 prikazuje volumne dodanega 0,2 M NaOH z različnimi pretoki v odvisnosti od časa. Največji naklon je pri pretoku 15 ml/min (0,0058 ml/s), medtem ko je najnižji pri pretoku 1 ml/min (0,0037 ml/s), kjer opazimo tudi manjše dodatke 0,2 M NaOH v odvisnosti od časa in posledično bolj položno krivuljo. Pri vseh pretokih 0,2 M NaOH je standardna deviacija na začetku titracije najnižja (~ 0,04 ml), ki pa se z nadaljnjo titracijo sproščene maslene kisline veča.



Slika 11. Volumen dodanega 0,2 M NaOH z različnimi pretoki v odvisnosti od časa pri merjenju aktivnosti pankreasne lipaze. Z eno zvezdico (*) oz. dvema zvezdicama (**) so označene meritve, kjer smo določali aktivnost pankreasne lipaze 1. seriji oz. 2. seriji pankreatina. Na sliki so v izbranih časovnih točkah s standardnim odklonom označena tudi sipanja meritev.

V časovnem intervalu 1 do 5 min smo z linearno regresijo določili aktivnost pankreasne lipaze za vsako meritev in izračunali njeno povprečno vrednost. Rezultate aktivnosti pankreasne lipaze pri različnih pretokih 0,2 M NaOH prikazuje slika 12. Največjo aktivnost pankreasne lipaze smo določili pri pretoku 15 ml/min (26848 TBU/g), najnižjo pa pri pretoku 1 ml/min (17884 TBU/g). Aktivnost določena pri pretoku 5 ml/min (18389 TBU/g) se razlikuje samo za 500 TBU/g od aktivnosti izmerjene pri pretoku 1 ml/min.



Slika 12. Povprečna aktivnost pankreasne lipaze pri titraciji MK z različnimi pretoki 0,2 M NaOH. Z eno zvezdico (*) oz. dvema zvezdicama (**) so označene meritve, kjer smo določali aktivnost pankreasne lipaze 1. seriji oz. 2. seriji pankreatina. Z vodoravnim oklepajem sta označena stolpca za primerjavo aktivnosti encima med serijama pri pretoku 1 ml/min. Na sliki so prikazani tudi standardni odkloni.

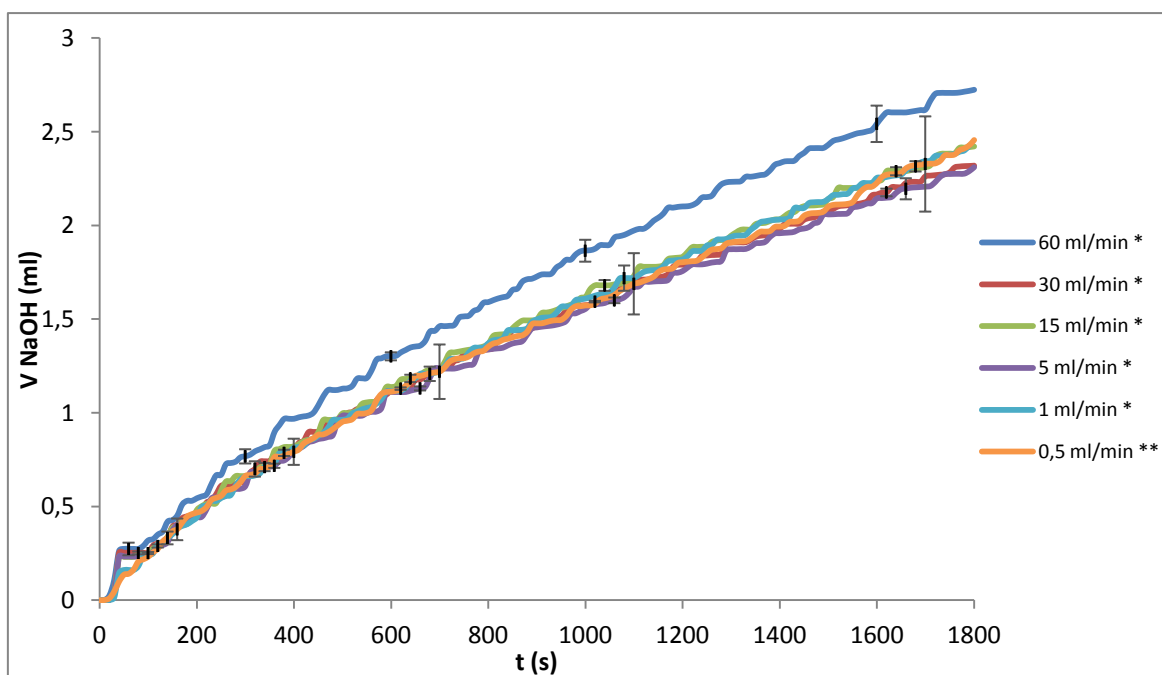
Na sliki 12 smo z zvezdico (*) nad stolpci označili, pri katerih meritvah smo uporabili 1. serijo (*) in 2. serijo (**) pankreatina. Če primerjamo rezultate aktivnosti pankreasne lipaze pri pretoku 1 ml/min 1. serije pankreatina z 2. serijo (na sliki 12 označeno z vodoravnim oklepajem), ugotovimo, da je razlika v aktivnosti encima med serijama kar 7175 TBU/g. Pri uporabi druge serije pankreatina je tako potrebno pred *in vitro* lipolizo vzorca najprej določiti aktivnost pankreasne lipaze pri pogojih, ki bi jih uporabili tudi pri izvedbi *in vitro* lipolize.

Pri merjenju aktivnosti pankreasne lipaze 2. serije pankreatina pri pretoku 1 ml/min in 0,5 ml/min 0,2 M NaOH smo določili, da je aktivnost pri pretoku 1 ml/min večja (25059 TBU/g) od aktivnosti določene pri pretoku 0,5 ml/min (22085 TBU/g).

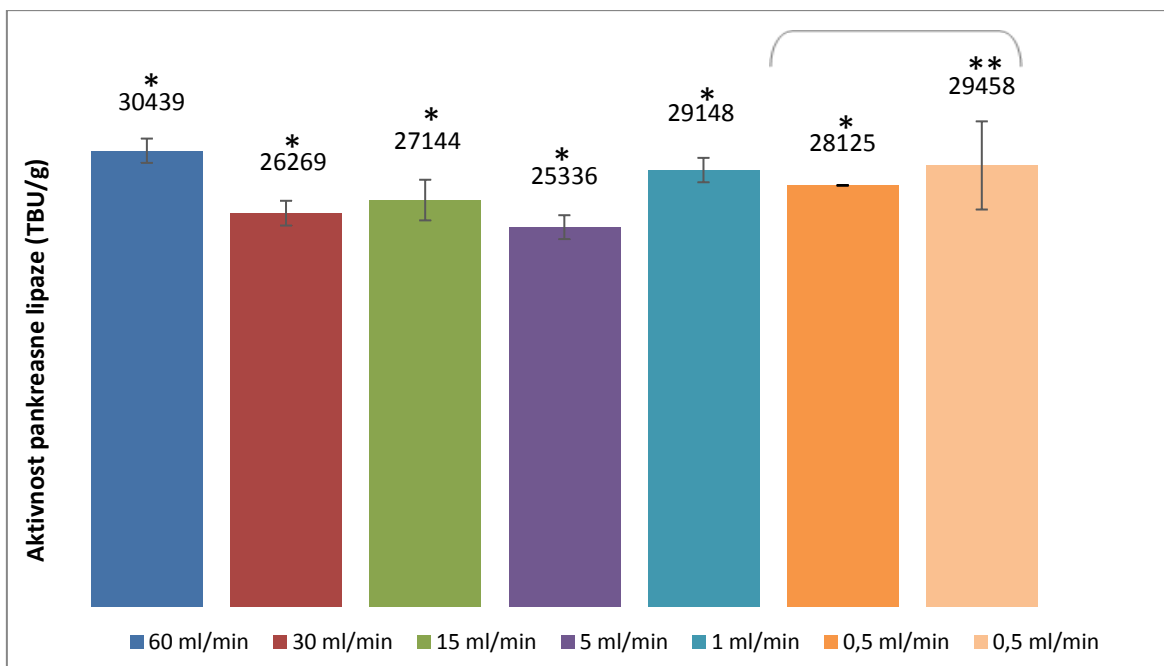
5.1.2 Titracija maslene kisline z 0,6 M NaOH

Rezultati merjenja aktivnosti pankreasne lipaze s pH-stat metodo, kjer smo sproščeno masleno kislino titrirali z 0,6 M NaOH, so prikazani na sliki 13. Nakloni dodanega 0,6 M NaOH v odvisnosti od časa, so pri vseh pretokih v začetnem časovnem intervalu od 0,0018 do 0,0022 ml/s, zato so tudi razlike med izračunanimi aktivnostmi pankreasne lipaje majhne (25336 - 30439 TBU/g) (slika 14).

Tudi v tem primeru smo pri določanju aktivnosti pankreasne lipaze uporabili dve seriji pankreatina, kar smo na sliki 14 označili z eno oz. dvema zvezdicama (*). Zanimivo je, da je razlika med aktivnostjo določene v 1. seriji in 2. seriji pankreatina pri pretoku 0,5 ml/min 0,6 M NaOH (na sliki 14 označeno z vodoravnim oklepajem) majhna (1333 TBU/g), medtem ko je bila razlika med aktivnostjo v obeh serijah pri pretoku 1 ml/min 0,2 M NaOH 7175 ml/min (slika 12).



Slika 13. Volumen dodanega 0,6 M NaOH z različnimi pretoki v odvisnosti od časa pri merjenju aktivnosti pankreasne lipaze. Z eno zvezdico (*) oz. dvema zvezdicama (**) so označene meritve, kjer smo določali aktivnost pankreasne lipaze 1. seriji oz. 2. seriji pankreatina. Na sliki so v izbranih časovnih točkah s standardnim odklonom označena tudi sipanja meritev.



Slika 14. Povprečna aktivnost pankreasne lipaze pri titraciji MK z različnimi pretoki 0,6 M NaOH. Z eno zvezdico (*) oz. dvema zvezdicama (**) so označene meritve, kjer smo določali aktivnost pankreasne lipaze 1. seriji oz. 2. seriji pankreatina. Z vodoravnim oklepajem sta označena stolpca za primerjavo aktivnosti encima med serijama pri pretoku 0,5 ml/min. Na sliki so prikazani tudi standardni odkloni.

5.2 IN VITRO LIPOLIZA SMES

Z *in vitro* lipolizo SMES smo želeli določiti najprimernejšo koncentracijo in pretok NaOH, da dosežemo čim večji obseg *in vitro* lipolize TG. V ta namen smo uporabili SMES S10 s sestavo: 20 % ricinusovega olja, 20 % Capmula[®] MCM, 30 % Kolliphorja[®] EL in 30 % Kolliphorja[®] RH40. Pomožne snovi so bile izbrane na podlagi najboljše topnosti RSV v posameznih sestavinah, medtem ko so bili deleži posameznih sestavin določeni z izdelavo (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov, kjer se je določalo območje nastanka mikroemulzij po redčenju SMES z vodo. Ker lahko PAS tudi dražijo GIT, je bila izbrana SMES formulacija s čim manjšo koncentracijo PAS, ki pa ob dodatku vode še vedno tvori mikroemulzijo tekom celotne razredčitvene linije (15, 59).

V čašo smo natehtali 200 mg S10 in ga dispergirali v prebavnem pufru I s pH 7,5. Prebavni pufer I vsebuje poleg Trizma[®] maleata, natrijevih in kalcijevih ionov tudi žolčno sol natrijev deoksiholat in fosfatidilholin Lipoid[®] S100 v razmerju 4:1. S takšno sestavo in pH prebavnega pufru smo želeli čim bolj posnemati *in vivo* pogoje v tankem črevesu na tešče. Nastalo mikroemulzijo smo prenesli v termostatirano reakcijsko posodo in sprožili *in vitro*

lipolizo z dodatkom raztopine pankreatina, ki smo jo pripravili po postopku opisanem v poglavju 4.4. Količino raztopine pankreatina smo izračunali iz aktivnosti pankreasne lipaze določene serije pankreatina, ki smo jo izmerili pri enakih pogojih, kot smo jih v nadaljevanju uporabili za *in vitro* lipolizo vzorcev (primer izračuna 1).

Takoj po dodatku raztopine pankreatina v reakcijsko posodo je pH medija padel iz umerjenih 7,5 na okoli 7,37 zaradi hidrolize sestavin S10 na MK. Sproščene MK je nato avtomatski titrator nevtraliziral z 0,2 M oz. 0,6 M NaOH z namenom vzdrževanja pH okoli 7,5. Tekom lipolize titrator ni vedno uspešno vzdrževal pH na absolutni vrednosti 7,5, ampak je ta pogosto bila pod nastavljenim pH 7,5.

Sproščene MK se vežejo s Ca^{2+} iz prebavnega pufra in se zaradi tvorbe kalcijevega mila oborijo. Z obarjanjem sproščenih MK posnemamo *in vivo* pogoje, saj se MK v tankem črevesu absorbirajo in tako odstranijo iz sistema, ter tako preprečimo zaviranje aktivnosti pankreasne lipaze z akumulacijo MK na medfazno površino olje-voda, kar onemogoči encimu dostop do TG.

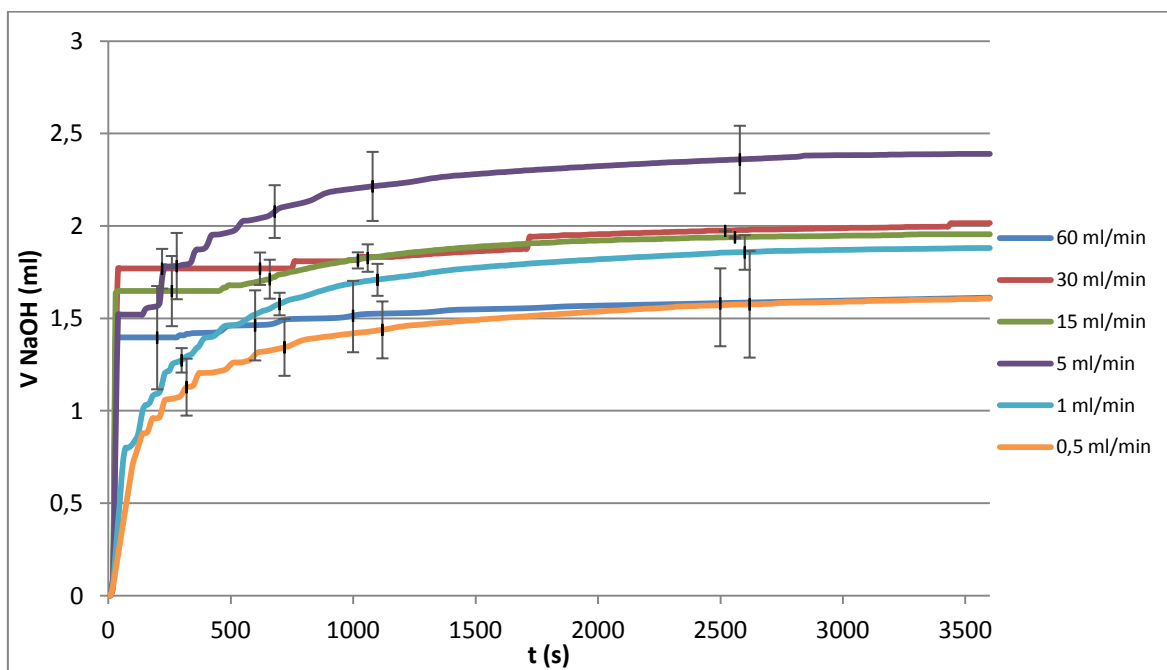
Titracija oz. dodajanje NaOH poteka toliko časa, dokler poteka hidroliza TG na MK. V programu lahko nastavimo parameter, da se metoda samodejno ustavi, ko je v določenemu časovnem intervalu (dt) volumen dodanega NaOH konstanten (dV), vendar se je v našem primeru izkazalo, da je bolje, če nastavimo dt na daljši interval (npr. več kot 20 min), da se metoda ob pretitraciji medija pri višjih pretokih ne zaustavi takoj na začetku. Vse *in vitro* lipolize so tako potekale 60 minut, čeprav je iz slike 15 in slike 17 razvidno, da ne poteka več hidroliza TG.

Pred vsako spremembo pogojev *in vitro* lipolize smo naredili še slepo meritev prebavnega pufra I in raztopine pankreatina, brez dodanega S10. Tako smo izločili padec pH zaradi absorbiranega ogljikovega dioksida med mešanjem medija in lipolize Lipoida[®] S100, ki poleg fosfatidilholina vsebuje tudi nekaj TG, DG in MK. Na padec pH lahko vpliva tudi hidroliza fosfatidilholina na lizo-fosfatidilholin s pomočjo fosflipaze A₂, ki je prisotna v pankreatinu, zato s slepo meritvijo izločimo tudi ta dejavnik (11, 57).

5.2.1 Titracija MK z 0,2 M NaOH

In vitro lipoliza S10 pri različnih pretokih 0,2 M NaOH je prikazana na sliki 15. Takoj na začetku lipolize je pri višjih pretokih 60 ml/min, 30 ml/min in 15 ml/min razviden velik dodatek 0,2 M NaOH zaradi naglega padca pH, ki je posledica hitre hidrolize TG na MK. V vseh treh primerih se je pH znižal na približno 7,36, zato je titrator dodal NaOH, da bi se

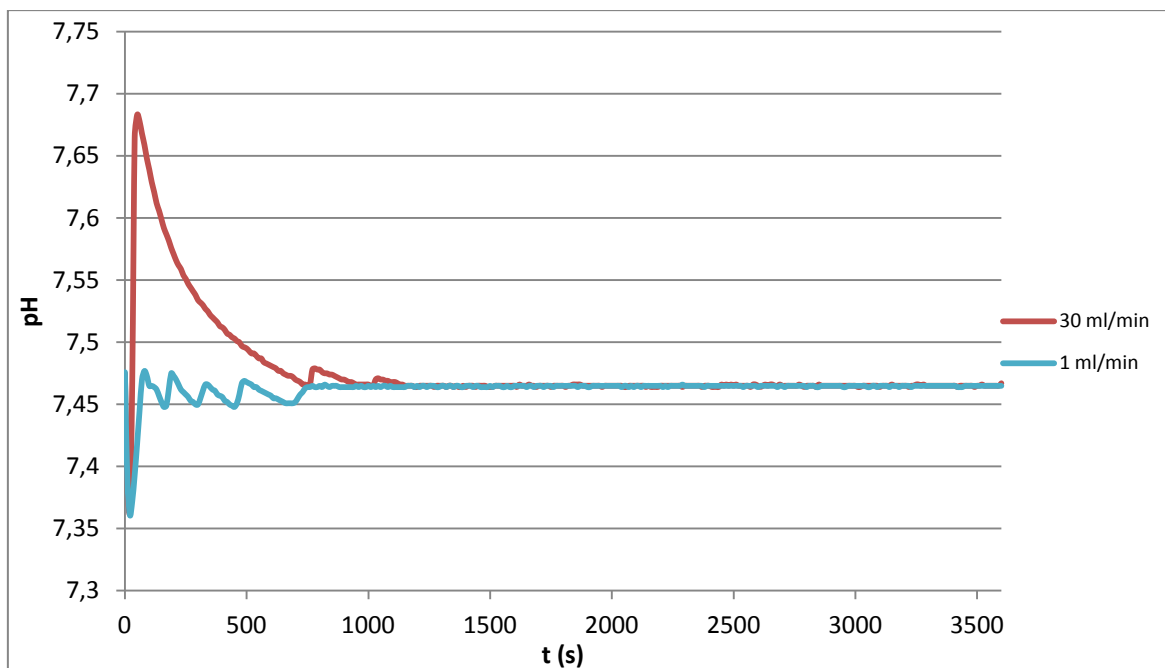
ta dvignil na pH 7,5. Ker so bili omenjeni pretoki NaOH previsoki in je bila dodana prevelika količina 0,2 M NaOH (1,4 do 1,7 ml), se je pH dvignil na $\sim 7,68$. Titracija MK se je nadaljevala šele po 10 min, ko se je pH medija spustil pod 7,5. Do nekoliko manjše pretitracije je prišlo pri pretoku 5 ml/min, saj se je pH dvignil le na $\sim 7,58$, medtem ko je pri pretoku 1 ml/min in 0,5 ml/min potekala titracija MK najbolj nadzorovano brez pretitracije, saj se pH ni dvignil na več kot 7,5.



Slika 15. *In vitro* lipoliza S10, kjer smo titrali proste MK pri različnih pretokih 0,2 M NaOH. Na sliki so prikazane tudi standardne napake. Na sliki so v izbranih časovnih točkah s standardnim odklonom označena tudi sipanja meritev.

Kot primer uravnavanja in vzdrževanja konstantnega pH pri titraciji z 0,2 M NaOH, je na sliki 16 predstavljena odvisnost pH od časa pri pretoku 30 ml/min in 1 ml/min, kjer vidimo v primeru višjega pretoka omenjeno pretitracijo sistema in počasno padanje pH, oz. pri pretoku 1 ml/min bolj nadzorovano uravnavanje pH. S slike 16 je razvidno tudi, da ni nujno, da sistem vzdrži ves čas absoluten pH 7,5, ampak se ta pogosto giblje pod to vrednostjo (npr. 7,47).

Hidroliza TG v S10 se je zaključila po 15 min. To vidimo iz slike 15 po prenehanju dodajanja 0,2 M NaOH ter iz slike 16 po vzpostavitvi in uravnavanju konstantnega pH.

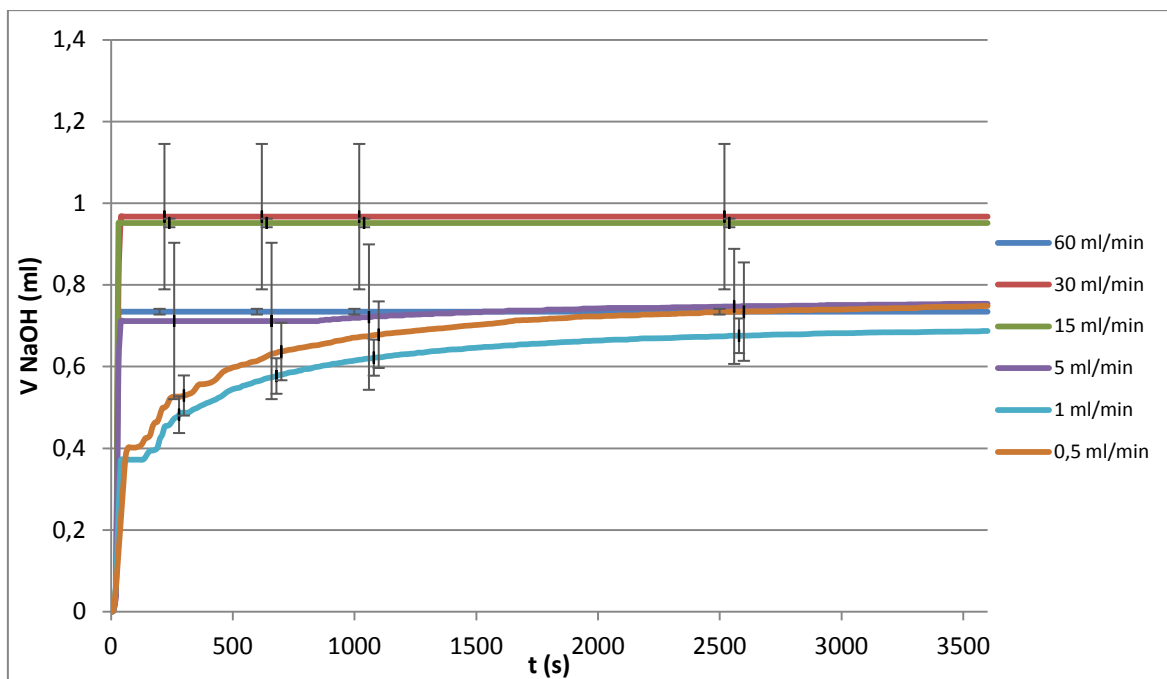


Slika 16. Primer uravnavanja pH med *in vitro* lipolizo S10 z 0,2 M NaOH pri pretoku 30 ml/min in 1 ml/min.

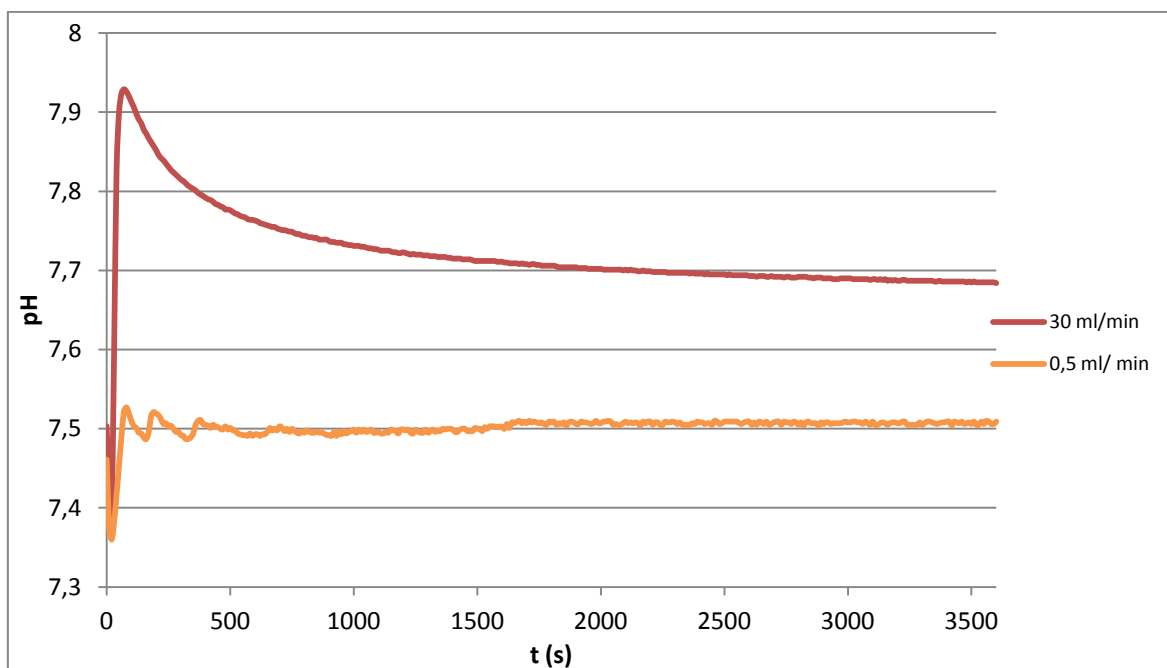
5.2.2 Titracija MK z 0,6 M NaOH

In vitro lipoliza S10 pri različnih pretokih 0,6 M NaOH je prikazana na sliki 17. Pri pretokih 60 ml/min, 30 ml/min, 15 ml/min in 5 ml/min je avtomatski titrator v prvih 30 s dodal ~ 0,7 ml oz. 1 ml 0,6 M NaOH. pH medija je tako, ob začetnem padcu pH na ~ 7,37 zaradi dodane raztopine pankreatina, narastel na več kot 7,7. Ker se s hidrolizo TG na MK pH ni spustil pod 7,5, titrator tekom 60 min *in vitro* lipolize ni dodajal več 0,6 M NaOH. Na sliki 18 je prikazan primer pretitracije pri pretoku 30 ml/min, kjer se je pH dvignil na več kot 7,9 in se v 60 min spustil zgolj na 7,68.

Sistem je med *in vitro* lipolizo S10 najboljše uravnaval pH s pretokoma 1 ml/min in 0,5 ml/min 0,6 M NaOH. Na sliki 18 je prikazan primer uravnavanja pH z 0,6 M NaOH pri pretoku 0,5 ml/min. Ob enakem začetnem padcu pH na ~ 7,37, je sistem v prvih 30 s dodal manj kot 0,4 ml 0,6 M NaOH, kar je dvignilo pH na ~ 7,52. V nadaljevanju je zaradi hidrolize MK pH stalno padal, vendar je avtomatski titrator zaradi počasnejšega dodajanja 0,6 M NaOH veliko bolj kontrolirano uravnaval konstanten pH 7,5.



Slika 17. *In vitro* lipoliza S10, kjer smo titrali proste MK pri različnih pretokih 0,6 M NaOH. Na sliki so v izbranih časovnih točkah s standardnim odklonom označena tudi sipanja meritev.



Slika 18. Primer uravnavanja pH med *in vitro* lipolizo S10 z 0,6 M NaOH pri pretoku 30 ml/min in 0,5 ml/min.

Za titracijo MK, ki se sprostijo pri *in vitro* lipolizi S10, sta pri obeh koncentracijah NaOH (0,2 M in 0,6 M) najbolj primerna pretoka 1 ml/min in 0,5 ml/min, saj ob odmiku pH od nastavljenega pH za več kot 0,01 enote najbolj nadzorovano uravnavata nastavljen pH 7,5.

5.2.3 Izračun sproščenih MK in obsega *in vitro* lipolize

Po *in vitro* lipolizi S10, kjer smo MK titrirali z 0,2 M in 0,6 M NaOH, smo iz končnega dodanega volumna NaOH izračunali množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize (preglednica IV). Pri izračunu smo upoštevali samo rezultate, ki smo jih dobili pri pretokih 1 ml/min in 0,5 ml/min, ker se sistem ni pretitriral in je titracija MK z 0,2 M in 0,6 M NaOH potekala najbolj nadzorovano (primer izračuna 3).

V izračunu množine sproščenih MK smo upoštevali rezultate slepih meritev, kjer smo določali dodatek 0,2 M in 0,6 M NaOH na račun padca pH zaradi absorpcije CO₂ ter lipolize gliceridov in fosfatidilholina, ki so prisotni v Lipoidu[®] S100. Ugotovili smo, da je končni volumen dodanega 0,2 M NaOH pri slepi meritvi neodvisen od pretokov. Enako velja za slepo meritev, kjer smo uporabili 0,6 M NaOH. Za obe koncentraciji smo tako izračunali povprečni volumen slepe meritve (\bar{V} (slepa)), ki je pri 0,2 M NaOH znašal $0,3997 \pm 0,0416$ ml, pri 0,6 M NaOH pa $0,1511 \pm 0,0089$ ml.

Primer izračuna 3.

$$c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ M}$$

$$\text{pretok} = 1 \text{ ml/min}$$

$$V(\text{NaOH}) = 1,9049 \text{ ml}$$

$$\bar{V}(\text{slepa}) = 0,3997 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} n(\text{MK}) &= n(\text{NaOH}) = c(\text{NaOH}) \times (V(\text{NaOH}) - V(\text{slepa})) = \\ &= 0,2 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \times (1,9049 \times 10^{-3} \text{ l} - 0,3997 \times 10^{-3} \text{ l}) = 3,010 \times 10^{-4} \text{ mol} = \\ &= 301,0 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

Obseg *in vitro* lipolize smo izračunali tako, da smo povprečno množino MK delili s teoretično množino sproščenih MK iz 200 mg S10 (sestavljeno iz 40 mg ricinusovega olja (20 %), 40 mg Capmula[®] MCM (20 %), 60 mg Kolliphorja[®] EL (30 %) in 60 mg Kolliphorja[®] RH40 (30%)) (primer izračuna 4 in 5). Rezultati so prikazani v preglednici V.

Primer izračuna 4.

$$n_t = 2 \times \sum \left(\frac{m_x}{M_x} \right) = 2 \times \left(\frac{0,040g}{927 \frac{g}{mol}} + \frac{0,040g}{277 \frac{g}{mol}} + \frac{0,060g}{2473 \frac{g}{mol}} + \frac{0,060g}{2699 \frac{g}{mol}} \right) =$$

$$= 4,681 \times 10^{-4} mol = 468,1 \mu mol$$

Primer izračuna 5.

$$\text{Obseg in vitro lipolize (\%)} = \frac{\bar{n}}{n_t} \times 100 = \frac{308,8 \mu mol}{468,1 \mu mol} \times 100 = 65,9 \%$$

Pri titraciji sproščenih MK z 0,2 M NaOH smo z *in vitro* lipolizo določili največjo množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize pri pretoku 1 ml/min (65,9 %), medtem ko smo pri pretoku 0,5 ml/min izračunali ~ 15 % manj MK. S titracijo z 0,6 M NaOH smo v primerjavi z 0,2 M NaOH izračunali nekoliko več MK, saj je pri pretoku 1 ml/min obseg *in vitro* lipolize znašal 70,3 %, pri pretoku 0,5 ml/min pa 76,5 %. Skupno gledano smo določili največji obseg *in vitro* lipolize v prebavnem pufri I pri titraciji MK s pretokom 0,5 ml/min 0,6 M NaOH (preglednica V).

Preglednica V. Izračuni sproščenih MK in obsega *in vitro* lipolize pri 0,2 M in 0,6 M NaOH, pri pretokih 1 ml/min in 0,5 ml/min.

	0,2 M NaOH		0,6 M NaOH	
	1 ml/min	0,5 ml/min	1 ml/min	0,5 ml/min
\bar{n} (MK) (μmol)	308,8 ± 7,0	241,4 ± 64,1	324,3 ± 24,5	358,2 ± 79,4
obseg <i>in vitro</i> lipolize (%)	65,9	54,4	70,3	76,5

5.2.4 Uporaba žolčnega ekstrakta

Namesto ene žolčne soli, v našem primeru natrijevega deoksiholata, lahko uporabimo za pripravo prebavnega pufra tudi ekstrakt žolča, s katerim lahko boljše posnemamo *in vivo* pogoje v tankem črevesu. Ekstrakt žolča vsebuje v največji meri različne ŽK (glikohenodeoksiholna kislina, glikoholna kislina, taurohenodeoksiholno kislino, henodeoskiholno kislino...), nekaj fosfatidilholina, natrijevih in kalcijevih ionov (37). Ker ne poznamo točne sestave našega ekstrakta žolča in ne vemo, koliko je prisotnih različnih ŽK in fosfatidilholina, smo se odločili, da za pripravo novega prebavnega pufra (prebavni

puffer II), natehtamo enako količino ekstrakta žolča in fosfatidilholina, kot smo natehtali natrijevega deoksiholata in Lipoida[®] S100 pri pripravi prvega prebavnega pufra I. Na enak način smo pripravili še tretji prebavni puffer III brez dodatka Lipoida[®] S100 (prebavni puffer III) (poglavje 4.3.5).

Z obema prebavnima pufroma smo izvedli *in vitro* lipolizo S10 z 0,6 M NaOH pri pretoku 0,5 ml/min ter določili množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize (preglednica VI). Pri izračunu smo upoštevali volumen dodanega NaOH pri slepi meritvi, ki smo jo izvedli z uporabo obeh pufrov in brez dodatka S10 v medij. Povprečni volumen slepe meritve v prebavnem puftru II (0,2470 ml) je najverjetneje višji od povprečnega volumna slepe meritve v prebavnem puftru III (0,1605 ml) zaradi lipolize TG in DG prisotnih v dodanemu Lipoidu[®] S100.

Preglednica VI. Povprečna množina sproščenih MK z *in vitro* lipolizo S10 v prebavnem puftru (0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min), ki vsebuje natrijev deoksiholat in v pufrih z ekstraktom žolča (prebavni puffer III) in še dodanim fosfatidilholinom (prebavni puffer II).

	\bar{V} (slepa) (ml)	\bar{n} (MK) (μmol)	obseg <i>in vitro</i> lipolize (%)
prebavni puffer I	0,1511	358,2 \pm 79,4	76,5
prebavni puffer II	0,2470	240,7 \pm 37,2	51,4
prebavni puffer III	0,1605	314,6 \pm 56,4	67,2

Pri *in vitro* lipolizi S10 v prebavnem puftru II, kjer smo dodali Lipoid[®] S100, smo določili nižjo množino sproščenih MK, kot pri *in vitro* lipolizi S10 v prebavnem puftru III, kjer nismo dodali Lipoida[®] S100. Do razlike verjetno pride zaradi prisotne velike količine fosfatidilholina (vir iz ekstrakta žolča in še dodanega Lipoida[®] S100), kar lahko zmanjša aktivnost pankreasne lipaze z vezavo fosfatidilholina na medfazo olje-voda in tako izrine encim iz substrata TG. Slednje lahko prepreči v pankreatinu prisotna fosfolipaza A₂, saj lahko hidrolizira fosfatidilholin v lizo-fosfatidilholin, ki pa ne zavira aktivnosti pankreasne lipaze po zgoraj opisanem načinu (17). Tudi drugače smo pri *in vitro* lipolizi v obeh prebavnih pufrih II in III dobili nižjo vrednost sproščenih MK (240,7 \pm 37,2 μmol oz. 314,6 \pm 56,4 μmol) kot pri uporabi natrijevega deoksiholata (358,2 \pm 79,4 μmol), kar lahko pripišemo že samemu nepoznavanju sestave ekstrakta žolča in posledične neprimerljive natehte ekstrakta žolča in Lipoida[®] S100.

Odločili smo se, da bomo v nadaljevanju izvajali *in vitro* lipolizo SMES-RSV v prebavnem pufru I, ki vsebuje natrijev deoksiholat in za titracijo sproščenih MK uporabili 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min. V tem prebavnem pufru in pri omenjenih parametrih smo dosegli najbolj nadzorovano titracijo MK, saj je titrator s pretokom 0,5 ml/min tekom *in vitro* lipolize S10 najbolj enakomerno uravnaval pH 7,5. Pri teh pogojih smo določili tudi največji obseg *in vitro* lipolize S10 (76,5 %).

5.3 NASIČENA TOPNOST RSV

Nasičena topnost RSV v vodi je po literaturnih podatkih ~ 3 mg/100 ml (46). Zanimalo nas je, če prisotnost PAS vpliva na topnost RSV, zato smo določili nasičeno topnost RSV v prebavnem pufru, ki kot PAS vsebuje natrijev deoksiholat in fosfatidilholin. Nasičeno topnost RSV v omenjenem mediju smo določili po postopku opisanem v poglavju 4.3.2. Izmerili smo, da je nasičena topnost RSV v prebavnem pufru 3,2 mg/100 ml, iz česar lahko sklepamo, da natrijev deoksiholat in fosfatidilholin iz prebavnega pufra ne povečata raztapljanja RSV v vodnem mediju.

5.4 IN VITRO LIPOLIZA SMES-RSV

Zanimalo nas je, kako vpliva različna sestava SMES na solubilizacijo RSV med *in vitro* lipolizo, zato smo poleg S10 formulirali nove SMES z različnimi deleži ricinusovega olja, Capmula[®] MCM, Kolliphorja[®] EL in Kolliphorja[®] RH40.

Formulirali smo SMES, ki vsebujejo samo dolgoverižne TG (S1, S2, S3) ali samo srednjeverižne MG in DG (S4, S5) ter kombinacijo dolgoverižnih in srednjeverižnih MG in DG (S6, S7, S8, S9). Spremenili smo tudi deleže obeh emulgatorjev in sestavili SMES z enim (S1, S2, S4, S6, S7) ali obema emulgatorjema (S3, S5, S8, S9) (preglednica IV). Vanje smo vgradili 10 % (m/m) RSV in določili topnost RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru po postopku opisanem v poglavju 4.3.3. Po dispergiranju vseh SMES-RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru I smo z metodo HPLC izmerili, da je ves RSV ostal v solubilizirani obliki (topnost ~ 100 %) in pokazali, da se v SMES vgrajen RSV ne obori pri redčenju z vodnim medijem (preglednica VII).

Preglednica VII. Topnost SMES-RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru (n = 2).

SMES	Topnost SMES-RSV v prečiščeni vodi (%)	Topnost SMES-RSV v prebavnem pufru (%)
S1	97,5 ± 0,6	96,0 ± 4,8
S2	98,7 ± 1,9	97,0 ± 0,8
S3	98,5 ± 0,9	97,2 ± 3,7
S4	100,6 ± 0,5	95,1 ± 9,2
S5	98,6 ± 1,9	92,6 ± 3,2
S6	100,8 ± 0,1	101,0 ± 1,0
S7	97,8 ± 1,6	100,7 ± 0,6
S8	99,6 ± 2,2	98,8 ± 0,4
S9	97,4 ± 2,7	98,8 ± 1,6
S10	101,6 ± 0,2	101,0 ± 3,4

V nadaljevanju smo v prebavnem pufru I izvedli *in vitro* lipolizo vseh SMES-RSV, kjer smo uporabili 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min, ki smo ju kot optimalne nastavitve predhodno določili z *in vitro* lipolizo S10 (poglavje 5.2). Po končani *in vitro* lipolizi smo medij ultracentrifugirali in supernatantu z metodo HPLC določili površino pod krivuljo. Iz umeritvene premice smo nato izračunali koncentracijo in delež raztopljenega RSV, kjer smo upoštevali redčenje v razmerju 1/10, končni volumen dodanega 0,6 M NaOH ($V(\text{NaOH})$) in količino RSV (10 % m/m) v natehti SMES-RSV (primer izračuna 6).

Primer izračuna 6.

$$A = 3023,1$$

$$V(\text{medija}) = 40 \text{ ml}$$

$$V(\text{NaOH}) = 0,3505 \text{ ml}$$

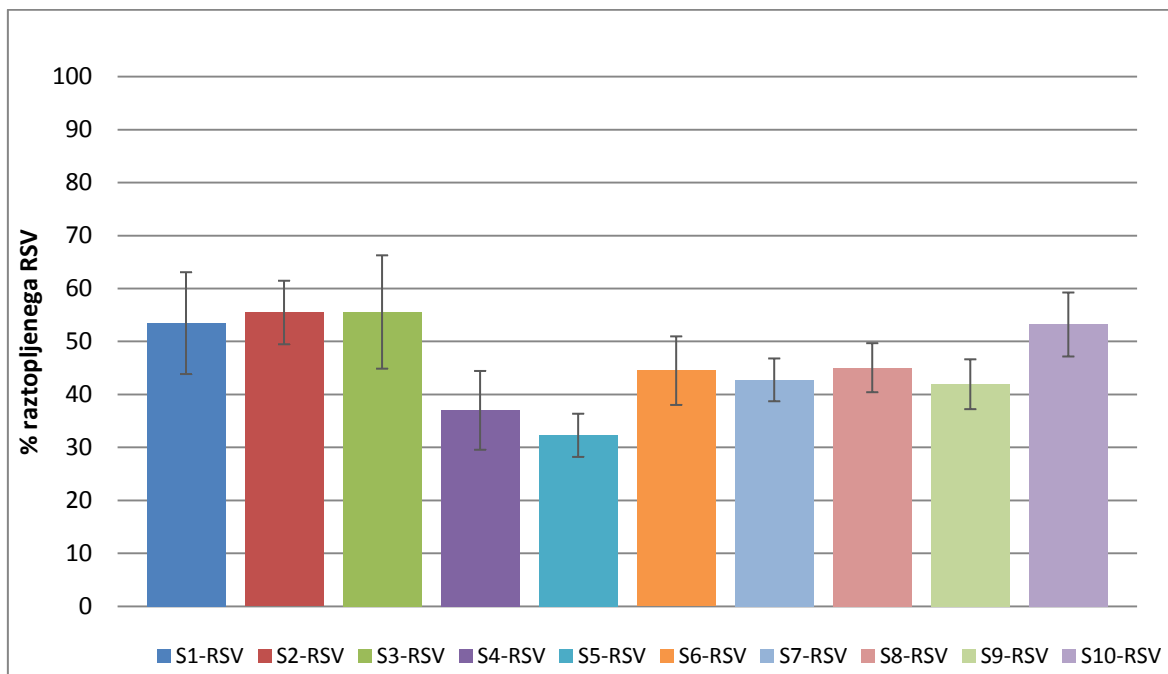
$$m(rS1) = 201,65 \text{ mg}$$

$$c_1 = \frac{A - 11,4}{117274 \frac{\text{ml}}{\text{mg}}} \times 10 = \frac{3023,1 - 11,4}{117274 \frac{\text{ml}}{\text{mg}}} \times 10 = 0,2568 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$m_1(\text{RSV}) = c_1 \times (V(\text{medija}) + V_1(\text{NaOH})) = 0,2568 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times (40 \text{ ml} + 0,3505 \text{ ml}) = 10,36 \text{ mg}$$

$$\% \text{ RSV} = \frac{m_1(\text{RSV})}{m(rS1)} = \frac{10,36 \text{ mg}}{201,65 \text{ mg} \times 0,1} \times 100 \% = 51,4 \%$$

Rezultati deleža raztopljenega RSV določenega po *in vitro* lipolizi ($t = 60$ min) so prikazani na sliki 19, iz katere je razvidno, da se je med *in vitro* lipolizo vseh SMES-RSV oborilo več kot 40 % v SMES vgrajenega RSV.



Slika 19. Delež raztopljenega RSV po *in vitro* lipolizi SMES-RSV. Na sliki so prikazani tudi standardni odkloni.

Formulacije S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV vsebujejo kot oljno fazo 30 % ricinusovega olja z dolgoverižnimi TG. S1-RSV in S2-RSV vsebujeta vsak po 70 % Kolliphorja[®] EL in 70 % Kolliphorja[®] RH40, medtem ko S3-RSV vsebuje kombinacijo obeh. Delež oborjenega RSV po *in vitro* lipolizi je v vseh treh primerih podoben: 46,5 %, 44,6 % oz. 44,4 %.

Največje obarjanje RSV zasledimo pri formulacijah S4-RSV in S5-RSV, kjer oljno fazo predstavlja 30 % srednjeverižnih MG in DG v obliki Capmula[®] MCM. Pri *in vitro* lipolizi S4-RSV in S5-RSV se je tako izoborilo ~ 65 % RSV, kar je ~ 20 % več v primerjavi s sistemi S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV.

Razlog ~ 20 % manjšega obarjanja RSV med *in vitro* lipolizo S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV je verjetno v tem, da se dolgoverižni gliceridi počasneje hidrolizirajo v primerjavi s srednjeverižnimi gliceridi in zato dalj časa zadržijo solubilizacijsko kapaciteto (28). Večje obarjanje RSV iz formulacije, ki vsebujejo srednjeverižne gliceride, je določil tudi Speybroeck s sodelavci, saj se je med *in vitro* lipolizo SMES s srednjeverižnimi gliceridi oborilo ~ 10 % več RSV kot med *in vitro* lipolizo SMES z dolgoverižnimi gliceridi (58).

Na manjše obarjanje lahko vpliva tudi tvorba gela, ki nastane po dodatku vode v SMES z ricinusovim oljem in visoko vsebnostjo PAS, v katerem se lahko zadrži slabo vodotopna učinkovina (15, 60). Nastanek gela ni nujno zaželen proces, ker lahko podaljša sproščanje slabo vodotopne učinkovine, medtem ko želimo z vgradnjo slabo vodotopne učinkovine v SMES po peroralni aplikaciji povečati hitrost raztapljanja.

Po *in vitro* lipolizi S6-RSV in S7-RSV, kjer smo kot oljno fazo uporabili tako ricinusovo olje kot tudi Capmul[®] MCM (predstavljata 30 % celotne mase SMES v masnem razmerju 1:1), smo izmerili ~ 56 % oborjenega RSV. S kombinacijo dolgoverižnih in srednjeverižnih gliceridov smo dosegli manjše obarjanje RSV v primerjavi s sistemoma S4-RSV in S5-RSV, ki vsebujeta Capmul[®] MCM. Vseeno pa se je oborilo ~ 10 % več RSV kot pri *in vitro* lipolizi SMES z ricinusovim oljem. Razlog je verjetno v tem, da je tudi območje nastanka gela pri sestavi S6-RSV in S7-RSV manjše od območja v primeru S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV, s čimer RSV ne ostane ujet v gelski strukturi (15).

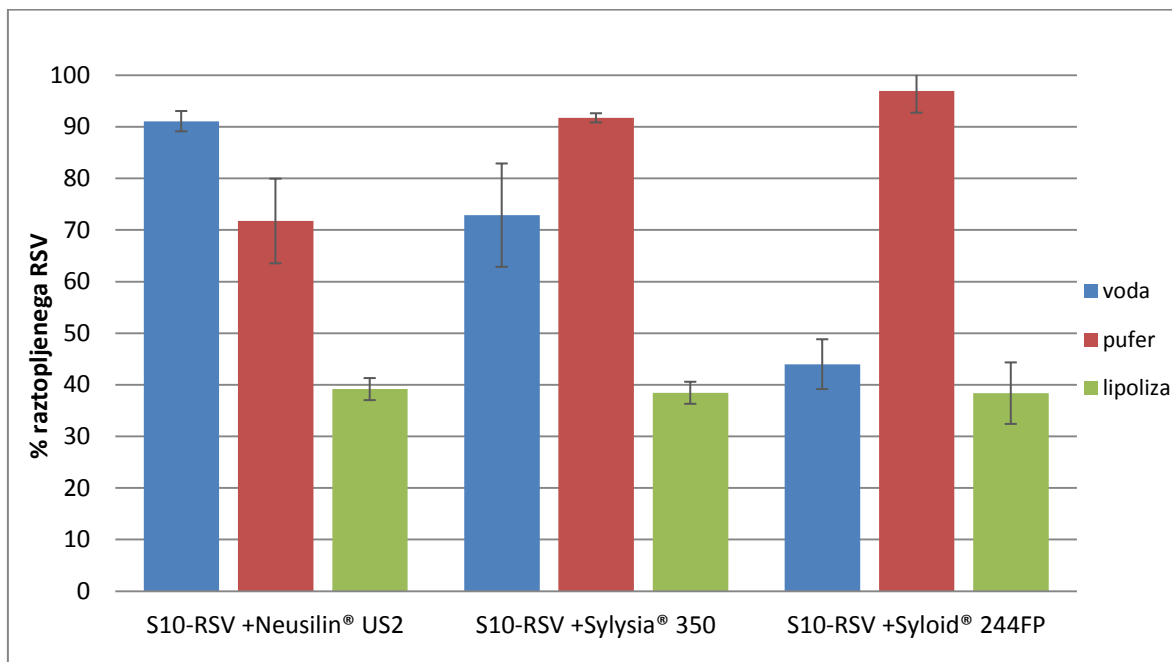
V sistemih S8-RSV, S9-RSV in S10-RSV smo uporabili vse štiri sestavine SMES v različnih masnih razmerjih oljne in emulgatorske faze (20 : 80, 30 : 70 oz. 40 : 60). Po *in vitro* lipolizi S8-RSV in S9-RSV smo izmerili, tako kot pri sistemih S6-RSV in S7-RSV, ~ 57 % obarjanje RSV, medtem ko smo manjše obarjanje RSV določili po *in vitro* lipolizi S10-RSV (46,8 %). Delež oborjene učinkovine je pri zadnjem tako podoben kot pri *in vitro* lipolizi S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV.

Zanimivo je, da uporaba posameznega Kolliphorja[®] EL, Kolliphorja[®] RH40 ali njune kombinacije v SMES ne vpliva na obarjanje RSV med *in vitro* lipolizo (S1-RSV, S2-RSV, S3-RSV; S4-RSV in S5-RSV; S6-RSV in S7-RSV). Pričakovali smo, da se bo največ RSV oborilo pri *in vitro* lipolizi sistemov, ki vsebujejo samo Kolliphor[®] EL, saj je ta v primerjavi s Kolliphorjem[®] RH40 veliko bolj podvržen encimski hidrolizi, kar povzroči zmanjšanje solubilizacijske kapacitete in obarjanje učinkovine (14).

5.5 IN VITRO LIPOLIZA SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH PRAŠKOV Z RSV

Z adsorpcijo S10-RSV na tri različne trdne nosilce Neusilin[®] US2, Sylysia[®] 350 in Syloid[®] 244FP smo pripravili samomikroemulgirajoče praške (masno razmerje 1:1) po postopku opisanem v poglavju 4.3.1.

Praškom smo določili topnost RSV v prečiščeni vodi in prebavnem pufru. Rezultati so prikazani na sliki 20.



Slika 20. Topnost S10-RSV vgrajenega v tri nosilce Neusilin® US2, Sylysia® 350 in Syloid® 244 FP, v prečiščeni vodi in prebavnem pufru. Zeleni stolpec predstavlja delež raztopljenega RSV po *in vitro* lipolizi samomikroemulgirajočih praškov. Na sliki so prikazani tudi standardni odkloni.

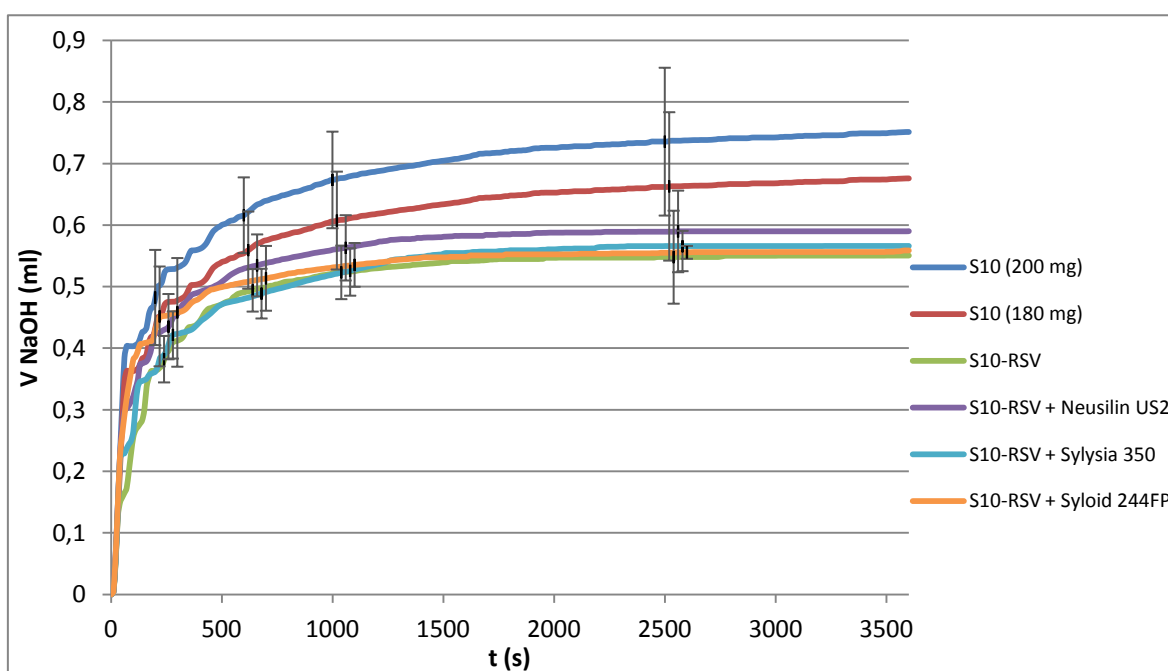
Topnost S10-RSV + Neusilin® US2 v prečiščeni vodi je 91,1 % in višja od topnosti v prebavnem pufru (71,7 %). Nasprotno je pri obeh nosilcih iz silicijevega dioksida (Sylysia® 350 in Syloid® 244FP). Topnost RSV po dispergiranju S10-RSV + Sylysia® 350 v prečiščeni vodi (72,9 %) je manjša od topnosti v prebavnem pufru (91,7 %). Topnost RSV iz praška s Syloidom® 244FP v prečiščeni vodi je najnižja, saj ta znaša le 44,0 % in je bistveno nižja od topnosti v prebavnem pufru (96,9 %).

Nižje deleže raztopljenega RSV smo določili tudi po *in vitro* lipolizi praškov, kjer smo v vseh primerih v supernatantu določili ~ 39 % raztopljenega RSV (slika 20). V primerjavi z *in vitro* lipolizo tekočega S10-RSV, smo z *in vitro* lipolizo posameznih praškov tako v supernatantu izmerili še ~ 15 % manj RSV. Razlog je lahko v tem, da se Kolliphor® EL in Kolliphor® RH40 vežeta na porozni nosilec in se po dispergiranju v vodnem mediju iz nosilca nepopolno desorbirata. Ker se največ RSV raztopi ravno v omenjenih PAS (~ 18 mg oz. 20 mg RSV na 100 mg PAS), tako skupaj z njima ostane vezan na nosilec. Nepopolna desorpcija PAS lahko tudi poveča razmerje med oljno in emulgatorsko fazo v

disperziji, kar vodi v zmanjšano solubilizacijsko kapaciteto in obarjanje slabo vodotopne učinkovine (58, 59).

5.5.1 Vpliv RSV na množino sproščenih MK in obsega *in vitro* lipolize

S primerjavo volumnov dodanega 0,6 M NaOH v odvisnosti od časa pri *in vitro* lipolizo S10, S10-RSV in samomikroemulgirajočih praškov smo ugotovili, da so končni volumni dodanega NaOH v primerjavi s praznim S10 nižji (slika 21). Za sisteme z vgrajenim RSV smo zato izračunali še povprečno množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize (preglednica VIII).



Slika 21. *In vitro* lipoliza praznega S10, S10-RSV, S10-RSV + Neusilin[®] US2, S10-RSV + Sylysia[®] 350, S10-RSV + Syloid[®] 244FP. Na sliki je prikazana *in vitro* lipoliza 200 mg S10. Ker sistemi z vgrajenim RSV vsebujejo 180 mg S10 in 20 mg RSV, smo za lažjo primerjavo volumen dodanega 0,6 M NaOH preračunali na 180 mg S10. Na sliki so v izbranih časovnih točkah s standardnim odklonom označena tudi sipanja meritev.

Iz preglednice VIII je razvidno, da je obseg *in vitro* lipolize sistemov z RSV manjši za ~ 15 - 20 % od obsega *in vitro* lipolize, ki smo ga določili pri *in vitro* lipolizi praznega S10. Na zmanjšanje obsega *in vitro* lipolize SMES-RSV verjetno vpliva viskoznost sistema, saj se ta po vgradnji RSV v SMES zviša. Z dodatkom RSV v SMES in formulacijo samomikroemulgirajočih praškov se povečajo tudi velikosti kapljic mikroemulzije v primerjavi z mikroemulzijo, ki nastane iz praznega SMES. Povečanje velikosti kapljic

lahko vpliva na zmanjšanje obsega *in vitro* lipolize, saj se specifična površina, ki je na voljo za vezavo pankreasne lipaze, zmanjša (15, 59, 61).

Preglednica VIII. Povprečna množina sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize pri *in vitro* lipolizi praznega S10, S10 z RSV in samomikroemulgirajočih praškov. Pri izračunu obeh vrednosti je potrebno upoštevati, da je bila dejanska količina S10 med *in vitro* lipolizo S10-RSV in praškov 180 mg.

	\bar{n} (MK) (μmol)	obseg <i>in vitro</i> lipolize (%)
S10 (200 mg)	$358,2 \pm 79,4$	76,5
S10 (180 mg)	$322,4 \pm 79,4$	76,5
S10-RSV	$239,5 \pm 47,5$	56,8
S10-RSV + Neusilin [®] US2	$263,3 \pm 39,9$	62,5
S10-RSV + Sylysia [®] 350	$248,8 \pm 15,2$	59,0
S10-RSV + Syloid [®] 244FP	$244,6 \pm 3,5$	58,1

6 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo z *in vitro* lipolizo ovrednotili deset tekočih SMES z različnimi razmerji ricinusovega olja, Capmula® MCM, Kolliphorja® EL in Kollophorja® RH40, v katere smo vgradili slabo vodotopno učinkovino RSV. Z *in vitro* lipolizo smo določili tudi vpliv adsorpcije S10-RSV na trdne porozne nosilce Neusilin® US2, Sylysia® 350 in Syloid® 244FP. Za vrednotenje tekočih in trdnih SMES smo uporabili pH-stat metodo, ki posnema *in vivo* pogoje v tankem črevesu. Med *in vitro* lipolizo so se s hidrolizo TG v medij sproščale MK, ki jih je avtomatski titrator nevtraliziral z NaOH.

Najprej smo s pH-stat metodo in tributirinskim testom določili aktivnost pankreasne lipaze v dveh različnih serijah pankreatina. Za titracijo MK smo uporabili različne pretoke 0,2 M in 0,6 M NaOH.

Izračunane aktivnosti pankreasne lipaze smo uporabili pri izvedbi *in vitro* lipolize S10 v prebavnem pufri I. Ugotovili smo, da za titracijo MK z 0,2 M in 0,6 M NaOH niso primerni visoki pretoki (60 ml/min, 30 ml/min, 15 ml/min in 5 ml/min), saj se sistem pretitrira. Za titracijo sta najbolj primerna pretoka 1 ml/min in 0,5 ml/min, saj z njima avtomatski titrator tekom *in vitro* lipolize S10 najbolj učinkovito uravnava pH 7,5. Iz končnega volumna dodanega NaOH smo največjo povprečno množino sproščenih MK in obseg *in vitro* lipolize izračunali pri *in vitro* lipolizi, kjer smo za titracijo MK uporabili 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min (76,5 %).

In vitro lipolizo S10 smo izvedli tudi v prebavnih pufrih II in III. Oba pufra sta namesto natrijevega deoksiholata vsebovala ekstrakt žolča iz prašiča, s tem da v prebavni pufer III nismo dodali fosfatidilholina. Določili smo, da je obseg *in vitro* lipolize pri pretoku 0,5 ml/min 0,6 M NaOH v pufrih II in III manjši (51,4 % oz. 67,2 %) od obsega *in vitro* lipolize v prebavnem pufri I (76,5 %).

Odločili smo se, da bomo *in vitro* lipolizo desetih tekočih SMES-RSV izvajali v prebavnem pufri I in za titracijo sproščenih MK uporabili 0,6 M NaOH s pretokom 0,5 ml/min. SMES-RSV smo najprej določili topnost v prečiščeni vodi in prebavnem pufri I. Ugotovili smo, da ostane po dispergiranju v solubiliziranemu stanju ves RSV (topnost ~ 100 %).

Med *in vitro* lipolizo vseh SMES-RSV smo izmerili, da se obori več kot 40 % RSV. Najmanjše obarjanje (~ 45 %) smo določili pri sistemih, ki kot oljno fazo vsebujejo samo

ricinusovo olje (S1-RSV, S2-RSV, S3-RSV), največje obarjanje (~ 65 %) pa pri sistemih s srednjeveržnimi MG in DG (S4-RSV, S5-RSV). Na zmanjšano obarjanje RSV iz sistemov z ricinusovim oljem najverjetneje vpliva počasnejša hidroliza dolgoveržnih gliceridov in nastanek gelov, ki zadržijo RSV v gelski strukturi.

S kombinacijo dolgoveržnih in srednjeveržnih gliceridov (S6-RSV, S7-RSV, S8-RSV, S9-RSV) smo določili ~ 56 % oborjenega RSV, medtem ko se je med *in vitro* lipolizo S10-RSV oborilo ~ 47 % RSV, tako kot pri *in vitro* lipolizi S1-RSV, S2-RSV in S3-RSV (~ 45 %).

Z adsorpcijo S10-RSV na tri trdne porozne nosilce Neusilin® US2, Syllysia® 350 in Syloid® 244FP smo v masnem razmerju 1:1 pripravili samomikroemulgirajoče praške. Omenjenim praškom smo določili topnost v prečiščeni vodi in prebavnem pufru I. Najmanjšo koncentracijo RSV smo izmerili po dispergiranju S10-RSV + Syloid® 244FP v prečiščeni vodi (44 %), medtem ko smo po dispergiranju enakega praška v prebavnem mediju I določili kar 97 % RSV.

Po *in vitro* lipolizi samomikroemulgirajočih praškov in ultracentrifugiranju smo v supernatantu izmerili 39 % raztopljenega RSV. V primerjavi z *in vitro* lipolizo tekočega S10-RSV, smo z *in vitro* lipolizo posameznih praškov tako v supernatantu določili še ~ 15 % manj RSV. Razlog je verjetno v tem, da se Kolliphor® EL in Kolliphor® RH40 vežeta na porozni nosilec in se po dispergiranju v vodnem mediju iz nosilca nepopolno desorbirata. Tako skupaj z obema PAS ostane na nosilcu ujet tudi RSV. Z nepopolno desorpcijo PAS z nosilca v medij se lahko zaradi zmanjšane koncentracije PAS tudi zniža solubilizacijska kapaciteta, kar vodi v obarjanje slabo vodotopne učinkovine.

Iz zgoraj navedenih ugotovitev lahko sklepamo, da *in vitro* lipoliza SMES z vgrajeno slabo vodotopno učinkovino pomembno vpliva na solubilizacijsko kapaciteto učinkovine. Kako dobro tak model posnema *in vivo* pogoje, ne moremo vedeti brez *in vivo* študij in izdelanih *in vitro-in vivo* korelacij, saj je zaradi kompleksnosti *in vivo* lipolize in raznolikosti uporabljenih materialov problematična tako izvedba kot primerjava študij. Vseeno lahko trdimo, da z modelom *in vitro* lipolize pridobimo pomembne informacije, ki nam koristijo pri nadaljnjem razvoju SMES z vgrajeno slabo vodotopno učinkovino. Pomembno je še poudariti, da z metodo *in vitro* lipolize ne moremo napovedati, koliko dispergirane učinkovine bo dejansko prešlo skozi ščetkasto membrano tankega črevesa v enterocit in se nato z efluksom vrnilo v lumen tankega črevesa. Za takšne permeabilnostne teste bi lahko

uporabili monosloj Caco-2 celic, ki so morfološko in biokemijsko podobne epiteliju tankega črevesa.

7 LITERATURA

1. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi- alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 263-268.
2. Wu CY, Benet LZ: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/ Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research* 2005; 22(1): 11-23.
3. Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F: Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 406: 41-48.
4. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J: Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 312:179-186.
5. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinšek O: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 376: 204-212.
6. Ambrus R, Kocbek P, Kristl J, Šibanc R, Rajkó, Szabó-Révész P: Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of water-soluble meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 381: 153-159.
7. Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN: Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews, Drug discovery* 2007; 6: 231-248.
8. Gursoy RN, Benita S: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173-182.
9. Müllertz A, Ogbonna A, Ren S, Rades T: New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 62: 1622-1636.
10. Winstanley PA, Orme MLE: The effects of food on drug bioavailability. *British Journal of Clinical Pharmacy* 1989; 28: 621-628.
11. Sek L, Porter CJH, Kaukonen AM, Charman WN: Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2002; 54: 29-41.

12. Pouton CW: Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 11(2): 93-98.
13. Pouton CW, Porter CJH: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 625-637.
14. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN: Enhancing intestinal drug solubilization using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 637-691.
15. Bolko K, Zvonar A, Gašperlin M: Mixed lipid phase SMEDDS as an innovative approach to enhance resveratrol solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2013; 1-8.
16. Sassene PJ, Knopp MM, Hesselkilde JZ, Koradia V, Larsen A, Rades T, Müllertz A: Precipitation of a Poorly Soluble Model Drug during In Vitro Lipolysis: Characterization and Dissolution of the Precipitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(12): 4982-4990.
17. Larsen AT, Sassene P, Müllertz A: *In vitro* lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 417: 245-255.
18. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D: Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 734-746.
19. Mei X, Etzler FM, Wang Z: Use of texture analysis to study hydrophilic solvent effects on mechanical properties of hard gelatin capsules. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 324: 128-135.
20. Zvonar A, Berginc K, Kristl A, Gašperlin M: Microencapsulation of self-microemulsifying system: Improving solubility and permeability of furosemide. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 388: 151-158.
21. Bizjak E: Problematika stiskanja tekočih samo(mikro)emulgirajočih sistemov v tablete. *Diplomska naloga* 2013. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
22. Wilde PJ, Chu BS: Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science* 2011; 165: 14-22.
23. McClements DJ, Li Y: Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function* 2010; 1: 32-59.
24. Embleton JK, Pouton CW: Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 15-32.

25. Thomas N, Holm R, Rades T, Müllertz A: Characterising Lipid Lipolysis and Its Implication in Lipid-Based Formulation Development. *The AAPS Journal* 2012; 14(4): 860-871.
26. Berbe RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA, *PHYSIOLOGY*, 5th ed., Mosby, London, 2004: 540, 554-556, 586-588, 615-618.
27. Lowe ME: The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research* 2002; 43: 2007-2016.
28. Dahan A, Hoffman A: Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an *in vitro* dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release* 2009; 129: 1-10.
29. Li Y, Hu M, McClements DJ: Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry* 2011; 126: 498-505.
30. Brogård M, Troedsson E, Thuresson K, Ljusberg-Wahren H: A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science* 2007; 308: 500-507.
31. Lowe ME: Assays for Pancreatic Triglyceride Lipase and Colipase. *Methods in Molecular Biology* 1998; 109: 59-70.
32. *European Pharmacopoeia*, 7th ed., Volume 2, Council Of Europe, Strasbourg, 2011; 2661-2663.
33. *The United States Pharmacopeia and The National Formulary, USP35-NF25*, Volume 3, The United States Pharmacopeial Convention, ZDA, 2012; 4204-4206.
34. Fernandez S, Rodier JD, Ritter N, Mahler B, Demarne F, Carrière F, Jannin V: Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1781: 367-375.
35. Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L: A dynamic *in vitro* lipolysis model I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14: 115-122.
36. Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L: A dynamic *in vitro* lipolysis model II: Evaluation of the model. *European Journal of Pharmaceutical Science* 2001; 14: 237-244.

37. Christensen JØ, Schultz K, Mollgaard B, Kristensen HG, Müllertz A: Solubilisation of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *European Journal of Pharmaceutical Science* 2004; 23: 287-296.
38. Fatouros DG, Bergenstahl B, Müllertz A: Morphological observation on a lipid-based drug delivery system during *in vitro* digestion. *European Journal of Pharmaceutical Science* 2007; 31: 85-94.
39. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: *Handbook of Pharmaceutica Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Chicago, 2009: 126-127, 385-387, 393-396, 499-502, 542-548.
40. Elektronski vir:
<http://www.aidic.it/icheap10/webpapers/470DaSilva.pdf>
(dostop: 28.3.2013)
41. Elektronski vir:
<http://www.abiteccorp.com/product-lines/capmul>
(dostop: 26.3.2013)
42. Kaukonen AM, Boyd BJ, Porter CJH, Charman WN: Drug Solubilization Behavior During *in Vitro* Digestion of Simple Triglyceride Lipid Solution Formulations. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(2): 245-253.
43. Song L: Studies of solubilization of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of a model lipid-based drug delivery system and in mixed micelles. *Theses and Dissertations-Pharmacy* 2011. University of Kentucky, College of Pharmacy.
44. Elektronski vir:
<http://www.pharma-ingredients.basf.com/Products.aspx?PRD=30554032>
(dostop: 2.6.2013)
45. Elektronski vir:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/07076?lang=en®ion=SI> (dostop: 25.3.2013)
46. Amri A, Chaumeil JC, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release* 2012; 158: 182-193.
47. de la Lastra CA, Villegas I: Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005; 49: 405-430.
48. Elektronski vir:

- http://www.neusilin.com/multicms/neusilin/pdf/news/29/2_neusilin_newsletter_nov07.pdf
(dostop: 28.3.2013)
49. Elektronski vir:
<http://www.neusilin.com/product/index.php>
(dostop: 28.3.2013)
50. Elektronski vir:
http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M309_Syloid_Tech_Note_USver_LR.pdf
(dostop: 28.3.2013)
51. Elektronski vir:
http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M317_Syloid2_44FP.pdf
(dostop: 28.3.2013)
52. Elektronski vir:
<http://www.aquachem.co.kr/product/Sylysia.htm>
(dostop: 28.2.2013)
53. Lipoid specifikacija, Lipoid Nemčija.
54. Operating Instructions, Titration Excellence Terminal, Mettler Toledo, Švica, 2011; 93-96.
55. Žmavc A: Določanje aktivnosti pankreatina ter *in vitro* lipolize na lipidih osnovanih sistemov s pH-stat metodo. Diplomska naloga 2013. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
56. Sek L, Porter CJH, Charman WN: Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their *in vitro* digestion products, by HPLTC coupled with *in situ* densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 2001; 25: 651-661.
57. MacGregor KJ, Embleton JK, Lacy JE, Perry EA, Solomon LJ, Seager H, Pouton CW: Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 33-46.
58. Speybroeck MV, Williams HD, Nguyen TH, 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. *Molecular Pharmaceutics* 2012; 9: 2750-2760.

59. Kastelic N: Razvoj samomikroemulgirajočih sistemov z resveratrolom. Magistrska naloga 2011; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
60. Prajapati HN, Dalrymple DM, Serajuddin ATM: A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid/Surfactant/Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development. *Pharmaceutical Research* 2012; 29: 285-305.
61. Trujillo LS, Qian C, Belloso OM, McClements DJ: Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry* 2013; 141: 1472-1480.