

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ŽMAVC

**DOLOČANJE AKTIVNOSTI PANKREATINA TER *IN*
VITRO LIPOLIZE NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV S
PH-STAT METODO**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ŽMAVC

DOLOČANJE AKTIVNOSTI PANKREATINA TER *IN VITRO* LIPOLIZE NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV S PH-STAT METODO

THE DETERMINATION OF THE PANCREATIN ACTIVITY AND *IN VITRO* LIPOLYSIS OF THE LIPID-BASED SYSTEMS WITH THE PH-STAT METHOD

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar, mag. farm.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorici doc. dr. Alenki Zvonar, mag. farm. za strokovno vodstvo, številne uporabne nasvete, potrpežljivost in temeljit pregled diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Katarini Bolko, mag. farm. za usmerjanje in pomoč pri eksperimentalnem delu, prav tako gre zahvala strokovnima sodelavkama na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. PREBAVA LIPIDOV V GASTROINTESTINALNEM TRAKTU	1
1.1.1. Usta.....	2
1.1.2. Želodec.....	2
1.1.3. Tanko črevo	3
1.1.4. Debelo črevo.....	5
1.2. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI.....	5
1.2.1. Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov	6
1.2.2. Samo-mikroemugirajoči sistemi	7
1.3. MODELI ZA <i>IN VITRO</i> LIPOLIZO.....	9
1.4. pH-STAT METODA	10
1.4.1. Lipaza	12
1.4.2. Sestava prebavnega medija.....	14
1.4.3. Izbira titranta in obravnava vzorcev po končani lipolizi	16
1.5. DOLOČANJE AKTIVNOSTI LIPAZE	17
2. NAMEN DELA	20
3. MATERIALI IN METODE	21
3.1. MATERIALI	21
3.1.1. Snovi, uporabljene pri delu:.....	21
3.1.2. Aparature:.....	23
3.2. METODE	23
3.2.1. Priprava pufrov	23
3.2.2. Priprava raztopine pankreatina	24
3.2.3. Priprava SMES brez/z zdravilno učinkovino.....	25

3.2.4.	Določanje aktivnosti pankreatina	25
3.2.5.	Določanje obsega lipolize	27
3.2.6.	Merjenje velikosti delcev/kapljič	28
3.2.7.	HPLC analiza.....	29
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1.	AKTIVNOST PANKREATINA	30
4.1.1.	Določanje aktivnosti pankreatina z maleatnim pufrom pH 7,5.....	30
4.1.1.1.	Vpliv razmerja med encimom in substratom na izračunano aktivnost.....	31
4.1.1.2.	Vpliv dovoljenega največjega odstopanja od nastavljene pH vrednosti na izračunano aktivnost	34
4.1.1.3.	Vpliv koncentracije titranta (NaOH) na izračunano aktivnost.....	36
4.1.2.	Določanje aktivnosti pankreatina z maleatnim pufrom pH 7,5 z Na-deoksiholatom..	37
4.2.	DOLOČANJE OBSEGA LIPOLIZE	39
4.2.1.	Lipoliza posameznih komponent	40
4.2.2.	Lipoliza SMES	43
4.2.3.	Odvisnost lipolize od nastavljene največje hitrosti dodajanja titranta	44
4.2.4.	Obseg lipolize posameznih komponent in SMES.....	47
4.2.5.	Lipoliza SMES z vgrajenim resveratrolom.....	49
4.3.	VELIKOST DELCEV	50
4.4.	VPLIV DISPERGIRANJA TER <i>IN VITRO</i> LIPOLIZE FORMULACIJE NA OBARJANJE VGRAJENE UČINKOVINE	52
5.	SKLEPI	54
6.	LITERATURA	56

POVZETEK

Zaradi naprednejših laboratorijskih metod kombinatorne kemije narašča število novih slabo vodotopnih spojin, ki po peroralnem vnosu izkazujejo slabo biološko uporabnost. Uspešna uporaba takšnih učinkovin v vlogi zdravil temelji na razvoju različnih pristopov, ki omogočajo izboljšanje njihovih biofarmaceutskih lastnosti. Med tehnološke pristope za rešitev omenjenega problema uvrščamo tudi formulacije z lipidi, kjer je učinkovina dispergirana v eni lipidni komponenti ali pa v sistemu različnih lipidov in površinsko aktivnih snovi. Uspešno vrednotenje omenjenih formulacij temelji na razvoju učinkovitih sistemov, ki bodo v *in vitro* pogojih posnemali čim več mehanizmov prebave. V diplomski nalogi smo za testiranje *in vitro* lipolize izbranih sistemov uporabili pH-stat metodo. Vzorec sistema z lipidi tako najprej dispergiramo v prebavnem mediju, ki vsebuje ustrezne koncentracije najpomembnejših prebavnih komponent v tankem črevesu. Reakcijo lipolize sprožimo z dodatkom raztopine zmesi encimov, pod vplivom katere poteče hidroliza estrskih vezi v gliceridih. Sproščene proste maščobne kisline nevtraliziramo z dodajanjem baze znane koncentracije. Titriranje reakcijske zmesi z NaOH vzdržuje konstanten pH na nastavljeni vrednosti med celotno reakcijo lipolize. Iz končne porabe NaOH nato izračunamo obseg lipolize za testirani vzorec.

V prvem delu naloge smo z uporabo tributirina kot substrata določili aktivnost pankreatina. Proučevali smo vpliv različnih parametrov metode na rezultat aktivnosti encima; spreminjali smo količino encima in substrata ter njuno razmerje, amplitudo nihanja pH od nastavitvene pH vrednosti ter koncentracijo uporabljenega NaOH. Najboljše rezultate smo dobili pri dodatku 3 ml tributirina in 5 ml pankreatina/1 ml ustreznega pufru ter dovoljenem odstopanju pH od nastavitvene vrednosti za 0,01 enote. V nadaljevanju smo se osredotočili na določanje obsega lipolize izbranih lipidnih komponent ter iz njih izdelanega samo-mikroemugirajočega sistema, brez ter z vgrajeno učinkovino. Meritve smo izvajali z uporabo dveh različnih koncentracij NaOH, z ustrezno izbiro največje hitrosti dovajanja titranta pa smo zagotovili natančnejše vzdrževanje pH vrednosti reakcijske zmesi. Za izračun obsega lipolize smo uporabili podatke meritev pri nastavitvah: 0,2 M NaOH, dovoljenem odstopanju pH od nastavitvene vrednosti za 0,01 enote ter 1 ml/min največje hitrosti dodajana titranta. Na izbranem sistemu smo ovrednotili tudi vpliv procesa lipolize na obseg solubilizacije vgrajene učinkovine, ki je odvisen tudi od koloidnih struktur prisotnih v vodni fazi reakcijske zmesi.

ABSTRACT

Due to the advanced laboratory methods of combinatorial chemistry, the number of new water-insoluble substances that exhibit poor bioavailability is increasing. One of the possibilities for the successful use of such substances as active pharmaceutical ingredients is the development of an advanced drug delivery systems that improve their biopharmaceutical properties. The examples of such formulations are the lipid-based drug delivery systems, where the drug component is dissolved or dispersed in a blend of lipids and surfactants. In order to efficiently test the characteristics of those formulations it is necessary to develop an effective *in vitro* model that would accurately simulate *in vivo* lipid digestion. In this thesis the pH-stat method has been applied for the characterization of the lipids digestion under the simulated small intestinal conditions. The lipid sample has been placed in a reaction chamber containing simulated small intestinal fluid with the appropriate concentration of the main digestive components. The lipolysis reaction was initiated by the addition of the pancreatin solution which resulted in the release of free fatty acids from triglycerides. The neutralization of the released free fatty acids was carried out by the continuous addition of NaOH, which maintains pH of the reaction mixture at the initial pre-set value. The extent of the sample's lipolysis has been calculated from the final consumption of NaOH.

In the first part of the thesis we focused on the pancreatin activity determination by using tributyrin as a substrate, and setting the optimal parameters for the implementation of the pH-stat method. An appropriate enzyme - substrate ratio was selected, and the best pH control band was set. The pancreatin activity was determined by titrating free fatty acids with NaOH of different concentrations. Best results were obtained when we used 3 ml of tributyrin, 5 mg of pancreatin/1 ml of buffer and 0,01 pH control band. In the second part of the research work the extent of the lipolysis of the selected lipid samples was measured. The analyses were performed with 0.2 and 0.5 M NaOH, and the most appropriate dosing rate of the titrant was determined for more accurate maintenance of pH during the reaction. The extent of lipolysis was calculated for the experiments performed at pre-determined optimal conditions: 0.2 M NaOH, 0.01 pH control band and 1 ml/min maximum dosing rate of titrant. The aqueous phase formed during *in vitro* lipolysis process was further analysed for the concentration of the active ingredient preserved in a solubilised state, and the particle size of the colloidal structures formed.

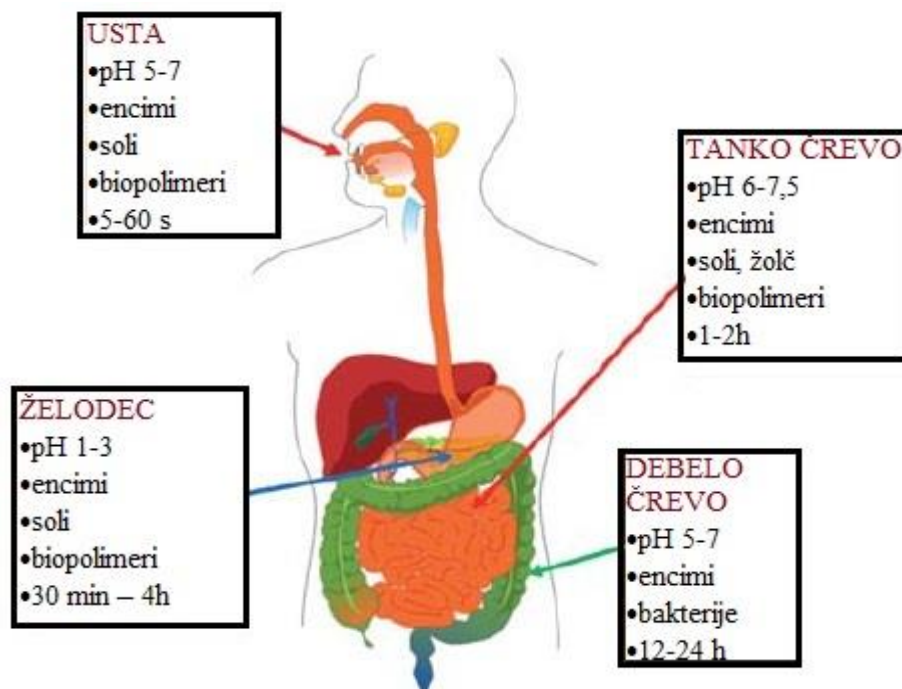
SEZNAM OKRAJŠAV

BKS	biofarmaceutski klasifikacijski sistem
c.b.	odstopanje (control band)
GIT	gastrointestinalni trakt
GRAS	status varne snovi (generally recognized as safe)
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
IU	mednarodne enote (international units)
MK	maščobne kisline
O/V	emulzija olje v vodi
PAS	površinsko aktivne snovi
PC	fosfatidilholin
RSV	resveratrol
SES	samo-emulgirajoči sistem
SMES	samo-mikroemulgirajoči sistem
TBU	tributirinske enote (tributyrim units)
USP	ameriška farmakopeja
ZU	zdravilna učinkovina
ŽS	žolčne soli

1. UVOD

1.1. PREBAVA LIPIDOV V GASTROINTESTINALNEM TRAKTU

Za razvoj učinkovitega *in vitro* modela, ki uspešno posnema prebavo lipidov v organizmu, je potrebno dobro razumevanje osnovnih fizikalno-kemijskih ter fizioloških procesov, katerim so podvrženi lipidi ob prehodu skozi gastrointestinalni trakt (GIT). Na njihovo prebavo in absorpcijo vplivajo mnoge fizikalne in kemijske spremembe, do katerih pride v ustih, želodcu ter tankem in debelem črevesju, za katere so značilni točno določeni fiziološki pogoji (Slika 1). V človeški prehrani so lipidi prisotni predvsem v obliki trigliceridov, ki niso topni v vodi, zato po vnosu v organizem pride do nastanka emulzije O/V, kjer se lipidi v obliki maščobnih kapljic porazdelijo v vodnem prebavnem mediju. Nastanek emulzije omogoči mehansko gibanje želodca in prebavnega trakta ter prisotnost ekso- in endogenih površinsko aktivnih snovi v prebavnem traktu. Tekom različnih prebavnih procesov, ki sledijo procesu dispergiranja, se lipidi pretvarjajo v bolj polarne derivate, kar izboljša njihov stik z vodno fazo. Končni produkti lipolize (monogliceridi in ionizirane maščobne kisline) se skupaj s fosfolipidi ali žolčnimi solmi vgradijo v strukture, kot so različni vezikli in miceli, ki se nato absorbirajo v enterocite (1,2).



Slika 1: Shema prikazuje fiziološke pogoje v različnih delih GIT, kot so pH, čas prehoda skozi določen odsek ter prisotne snovi, ki vplivajo na prebavo lipidov (1).

1.1.1. Usta

Kljub temu, da se hrana v ustih zadržuje le kratek čas, se prebava lipidov začne že takoj po zaužitju. Glavna naloga v tem delu je priprava hrane za požiranje, poleg tega pa poteka še mnogo drugih procesov. Med žvečenjem se hrana razdeli na manjše dele ter zmeša s slino, spremenijo se pH, ionska moč in temperatura. Hrana je v ustih izpostavljena vplivu različnih prebavnih encimov (amilaze, proteaze), potekajo pa lahko tudi interakcije hrane s površino jezika in ust ter reakcije z biopolimeri (npr. mucin), ki so prisotni v slini. Velikost lipidnih kapljic v hrani, ki zapusti usta, je tako odvisna od tega, v kakšni obliki se slednje nahajajo v hrani, od količine in intenzivnosti žvečenja ter fizioloških lastnosti posameznika.

Pomembna komponenta, ki močno vpliva na prebavo lipidov v ustni votlini, je slina. Njen pH v praznih ustih je običajno med 5,5 in 6,1, po vnosu hrane pa lahko ta vrednost naraste na 7-8. Žleze, iz katerih se izloča slina, se nahajajo na različnih mestih v ustni votlini, hitrost izločanja pa je povezana z dražljaji iz okolice in se giblje od 0,1 do 4 ml/min. Glavna komponenta sline je voda, poleg tega pa vsebuje še < 1 % mineralov in 0,1-0,2 % proteinov, med katerimi so prisotni encimi, imunoglobulini, antibakterijski proteini, proteini bogati s prolinom ter glikozilirani proteini, med katere spada tudi mucin. Zaradi velikih razlik v količini in sestavi sline tako pri posameznikih v različnih časovnih obdobjih kot tudi med različnimi osebami, je postavitve *in vitro* sistema za testiranje lipolize v ustih precej težavna (1,3,4).

1.1.2. Želodec

Po zaužitju hrana iz ust hitro preide v želodec, kjer je zaradi gibanja želodca podvržena mehanskemu mešanju. Pri tem pride v stik s kislimi prebavnimi sokovi, v katerih so prisotni želodčni encimi, minerali in različne endogene površinsko aktivne snovi. Običajna vrednost pH v praznem želodcu je 1-3, po vnosu hrane pa le-ta precej naraste. Med procesom prebave nato pH v želodcu postopoma pada, dokler ponovno ne doseže vrednost 2. Močno kislo okolje namreč omogoča aktivacijo encimov, ki so odgovorni za kemijsko prebavo sestavin hrane in preprečuje razrast mikroorganizmov. Čas zadrževanja hrane v želodcu je odvisen od količine hrane, oblike, velikosti in strukture ter lahko traja od nekaj minut do nekaj ur. Tekoče komponente hrane želodec zapustijo hitreje kot trdne, skozi pilorus pa lahko prehajajo delci z velikostjo 1-2 mm. Večji delci trdne

hrane zato ostanejo v želodcu, dokler ne razpadejo na ustrezno velikost. Količina hrane v želodcu se običajno zmanjša za polovico po 30-90 minutah prebave.

Najpomembnejši encim za prebavo lipidov v tem delu GIT je želodčna lipaza, ki spada med glikozilirane globularne proteine. V strukturi ima štiri mesta, kjer lahko poteče glikozilacija, njena molska masa pa znaša 50 kDa. Encim je stabilen in aktiven v širokem pH območju od 2,0 do 7,0 z idealnim delovanjem med pH vrednostjo 3,0 in 5,0. Izoelektrična točka želodčne lipaze je med 6,6 in 7,9, zato je v kislem okolju pozitivno nabita, njena koncentracija pa je navadno 0,5-1 μM . Ob vezavi encima na površino lipidnih kapljic se začne proces hidrolize trigliceridov do digliceridov, monogliceridov in prostih maščobnih kislin, pri čemer najprej poteče hidroliza estrske vezi na mestu 3 ter nato še odcepitev proste maščobne kisline na mestu 1. V želodcu poteka hidroliza kratko in srednje dolgo-verižnih maščobnih kislin, medtem ko se pod vplivom želodčne lipaze ne prebavljajo trigliceridi z dolgo-verižnimi maščobnimi kislinami. Prebava lipidov v želodcu se zaključí, ko se iz trigliceridov sprosti 10-30 % maščobnih kislin.

Začetna lipoliza maščob v želodcu ima pri zdravih ljudeh pomembno vlogo, saj spodbuja nadaljnji proces lipolize v dvanajstniku in tankem črevesu (lipoliza je avtokatalitičen proces). Slednje je posledica zmanjšanja velikosti lipidnih kapljic v želodcu pod vplivom mehanskega mešanja in amfifilnih spojin, ki se sproščajo v procesu lipolize (mono in digliceridi). Prisotnost prebavnih produktov lipolize v želodcu lahko spodbudi sproščanje hormonov, ki stimulirajo izločanje žolča in prebavnih sokov trebušne slinavke, poveča pa lahko tudi vezavo kolipaze in aktivnost pankreasne lipaze v tankem črevesju (1,2,3).

1.1.3. Tanko črevo

Delno prebavljena hrana (imenovana tudi himus) nato iz želodca preide v tanko črevo, kjer poteka glaven proces prebave in absorpcije lipidov. Ob vstopu v duodenum delno prebavljena tekoča lipidna masa sproži sproščanje prebavnih sokov iz trebušne slinavke. Mešanje z natrijevim hidrogenkarbonatom, žolčem in encimi trebušne slinavke nato povzroči dvig kislega pH hrane v tankem črevesju do skoraj nevtralne vrednosti 5,8-6,5. Lipidi so v tekoči vsebini na začetku tankega črevesja prisotni v obliki maščobnih kapljic, katerih jedro iz tri- in digliceridov obdaja ena ali več plasti polarnih lipidov, fosfolipidov, maščobnih kislin in holesterola. Na površino emulgiranih kapljic se v tem

delu vežejo tudi žolčne soli, ki še dodatno stabilizirajo emulzijo z znižanjem medfazne napetosti med lipofilnim lipidnim jedrom in hidrofilnimi prebavnimi sokovi.

Sinteza žolčnih kislin iz holesterola poteka v hepatocitih. Njihov osnovni skelet, holna kislina, je konjugirana s tavinom ali z glicinom, kar poveča njihovo topnost v vodi ter zmanjša celično toksičnost. Molekule žolčnih kislin so velike planarne strukture in spadajo med površinsko aktivne snovi, saj imajo hidrofoben del, ki vstopa v interakcije z drugimi žolčnimi kislinami in površino lipidnih delcev, ter hidrofilen del, s katerim interagirajo z vodnim okoljem. V emulziji se zato razporedijo na medfazi med dispergiranimi lipidnimi kapljicami in prebavnimi sokovi ter s tem preprečujejo njihovo agregacijo in koalescenco. Z odstranjevanjem produktov lipolize, ki poteka na površini lipidnih kapljic, v okoliški medij hkrati tudi omogočajo delovanje lipaze. Njihova koncentracija v duodenumu na tešče je 4,3-6,4 mM in po vnosu hrane naraste na 5-15 mM (1,2).

Glavni dejavnik v procesu prebave lipidov je pankreasna lipaza, ki se v duodenum izloča iz trebušne slinavke, za njeno optimalno delovanje pa je potreben pH 8,5. Veliko aktivnost izkazuje tudi še pri pH 6,5, v kislem okolju pa pride do ireverzibilne inaktivacije. Hidroliza estrskih vezi trigliceridov poteka na mestu 1 in 3, ni pa odvisna od dolžine verige ali od vrste pripete maščobne kisline. Specifično delovanje tega encima na emulgiranje lipidnih kapljic, ki predstavljajo substrat, se začne z vezavo na medfazo med oljno oz. lipidno in vodno fazo. Vezava lipaze na lipidne kapljice je odvisna od sestave in lastnosti njihove površine ob vstopu v tanko črevo ter prisotnosti drugih površinsko aktivnih snovi v okolici, saj lahko pride do tekmovanja za vezavna mesta z žolčnimi solmi, fosfolipidi in nekaterimi produkti prebave. Aktivnost in delovanje lipaze sta omogočena s prisotnostjo kolipaze, saj le-ta tvori kompleks z encimom in mu s tem omogoča dostop do substrata ter olajša njegovo pritrditev na medfazo. Kolipaza je polipeptid z molekulska masa 10 kDa, ki se s hidrofobno stranjo veže na medfazo med oljno kapljico in vodnim medijem, z hidrofilno stranjo pa vstopa v interakcijo z lipazo. Omenjeni encim se v obliki pro-kolipaze izloča iz trebušne slinavke ter se pod vplivom tripsina pretvori v aktivno obliko. Ob aktivaciji se odcepi peptid enterostatin, ki uravnava občutek sitosti, zmanjšuje absorpcijo maščob iz črevesja in inhibira izločanje sokov trebušne slinavke (1,2).

Končni produkti lipolize (proste maščobne kisline in monogliceridi) se v črevesju skupaj z drugimi lipidi (holesterol, fosfolipidi, maščobotopni vitamini) vgradijo v micele in vezikle, od koder se absorbirajo v enterocite. Dolgo-verižne proste maščobne kisline se

nato v epiteljskih celicah ponovno preestrijo v trigliceride, ki se vgradijo v hilomikrone. Vezani v omenjene lipoproteine se nato absorbirajo v limfatični sistem, s katerim se transportirajo v ostala tkiva. V krvni obtok vstopijo skozi prsno mezgovnico, brez predhodnega prehoda skozi jetra. Kratko in srednje dolgo-verižne maščobne kisline se iz enterocitov absorbirajo neposredno v portalno veno ter po prehodu skozi jetra ponovno vstopijo v sistemski krvni obtok (1,2).

1.1.4. Debelo črevo

V debelo črevo vstopajo snovi, ki se v tankem črevesju niso absorbirale, njegove glavne naloge pa so absorpcija vode in elektrolitov, fermentacija polisaharidov in proteinov, reabsorpcija žolčnih soli ter priprava in shranjevanje preostale vsebine za izločanje. Prebava in absorpcija večine lipidov iz zaužite hrane poteče že v želodcu in tankem črevesju, vendar pa nekatere oblike emulzij vseeno lahko dosežejo debelo črevo. V teh sistemih so lipidni delci lahko obdani s težje prebavljivimi snovmi, kot so vlaknine, ali pa te snovi tvorijo ogrodje, v katero se vgradijo maščobne komponente. Sproščanje tovrstnih lipidov zato lahko poteče šele v debelem črevesju, kjer je prisotnih več vrst anaerobnih bakterij, ki so s pomočjo fermentacije sposobne prebavljati tudi vlaknine, proteine in peptide (1).

1.2. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Zaradi naraščajočega števila slabo vodotopnih zdravilnih učinkovin je nujen razvoj novih dostavnih sistemov, s pomočjo katerih bi lahko izboljšali biološko uporabnost teh spojin. Večino tovrstnih ZU po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BKS) uvrščamo v razred II (slaba topnost, dobro prehajanje skozi biološke membrane) ali razred IV (slaba topnost, slabo prehajanje skozi biološke membrane), v obeh primerih pa je za povečanje biološke uporabnosti potrebno izboljšati raztapljanje učinkovine v prebavnem mediju skozi celotno področje GIT, kjer poteka absorpcija učinkovin. To lahko dosežemo z izdelavo na lipidih osnovanih sistemov za peroralno uporabo, v katerih je učinkovina raztopljena bodisi v lipidih bodisi v homogeni zmesi lipidnih komponent in površinsko aktivnih snovi (5,6).

1.2.1. Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov

Po klasifikacijskem sistemu na lipidih osnovanih sistemov lahko, glede na njihovo sestavo in hidro-lipofilnost, omenjene dostavne sisteme razdelimo v štiri razrede. V razred I spadajo enostavne oljne raztopine, kjer je učinkovina raztopljena v olju; le-ta so običajno klasična rastlinska olja, ki so dobro prebavljiva in imajo status GRAS (angl: generally recognised as safe). Tovrstne formulacije navadno vsebujejo trigliceride ali mešane gliceride, ki se hitro prebavljajo do prostih maščobnih kislin in 2-monogliceridov, najpogosteje pa se uporabljajo za aplikacijo v maščobi topnih vitaminov A in D. Sistemi razreda II poleg lipidov vsebujejo še lipofilne PAS, kar v vodnem mediju že ob rahlem mešanju omogoča nastanek emulzije, zato jih imenujemo tudi samo-emulgirajoči sistemi. Razred III delimo na dva podrazreda- IIIA z večjim deležem hidrofobnih komponent in razred IIIB, kjer sistemi vsebujejo večji delež hidrofilnih komponent. V podrazred IIIA tako uvrščamo samo-emulgirajoče sisteme, ki za razliko od sistemov razreda II, vsebujejo hidrofilne PAS, v podrazred IIIB pa samo-mikroemulgirajoče sisteme, ki poleg oljne komponente in hidrofilnih PAS lahko vsebujejo še hidrofilna sotpila, kot so etanol, propilen glikol in polietilen glikol. Medtem ko sistemi podrazreda IIIA ob stiku z vodo tvorijo disperzije v velikostjo delcev <300 nm, je za samo-mikroemulgirajoče sisteme podrazreda IIIB značilen nastanek mikroemulzije z velikostjo kapljic pod 100 oz. 50 nm, ki so po izgledu bistre ali rahlo opalescentne. Zaradi večjega deleža hidrofilnih sotopil je značilno, da pri sistemih tipa IIIB dispergiranje poteka hitreje kot pri tipu IIIA, hkrati pa je tudi večja nevarnost obarjanja vgrajene učinkovine. V razred IV se uvrščajo najbolj hidrofilni lipidni sistemi, v katerih so prisotne le vodotopne PAS in sotpila. V stiku z vodo tvorijo koloidne raztopine micelov, kar povzroči hitro sproščanje ter absorpcijo vgrajene zdravilne učinkovine, v kolikor se le-ta med procesom dispergiranja ne obori (5,7).

Preglednica I: Sestava, lastnosti in velikost kapljic, ki nastanejo po dispergiranju sistemov iz posameznih razredov klasifikacijskega sistema na lipidih osnovanih sistemov v vodni fazi (7,8).

	Sestava	Lastnosti	Velikost delcev
Razred I	Gliceridi-MG, DG, TG (100%)	sistem se ne dispergira	>500 nm
Razred II	Gliceridi-MG, DG, TG (40 - 80%) PAS s HLB<12 (20 - 60%)	nastanek SES brez hidrofilnih PAS	100 - 250 nm
Razred IIIA	Gliceridi-MG, DG, TG (40 - 80%) PAS s HLB>11 (20 - 40%) hidrofilna sotpila (0-40%)	nastanek SES s hidrofilnimi PAS	100 - 250 nm
Razred IIIB	Gliceridi-MG, DG, TG (>20%) PAS s HLB>11 (20 - 50%) hidrofilna sotpila (20 - 50%)	nastanek SMES s hidrofilnimi PAS	50 - 100 nm
Razred IV	PAS s HLB<12 (0-20 %) PAS s HLB>12 (20-80 %) hidrofilna sotpila (0-80 %)	sistem tvori koloidno raztopino micelov	<50 nm

1.2.2. Samo-mikroemugirajoči sistemi

Samo-mikroemulgirajoči sistemi (SMES) so izotropne zmesi, ki vsebujejo učinkovino, lipide, hidrofilne površinsko aktivne snovi in sotpila. Ob stiku s prebavnim medijem že ob rahlem mešanju hitro tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi, z velikostjo kapljic pod 100 nm in ozko porazdelitvijo velikosti. V nasprotju z običajnimi emulzijami, za tvorbo katerih je potrebna homogenizacija, mikroemulzije nastanejo spontano in so zaradi majhne velikosti delcev transparentne oziroma rahlo opalescentne. Mehanizem nastanka termodinamsko stabilnih mikroemulzij temelji na zelo nizki medfazni napetosti med oljem in vodo ter prekinitvi medfaze zaradi prehajanja vode v SMES ali difuzije sotpil iz le-tega v okoliški vodni medij (6,9).

Glavna komponenta na lipidih osnovanih sistemov so olja oz. lipidi, v katerih je raztopljena slabo vodotopna zdravilna učinkovina. V formulaciji je lahko prisotna ena ali več različnih lipidnih komponent, najpogosteje pa se uporabljajo različno nasičeni dolgo-

in srednje dolgo-verižni trigliceridi, digliceridi in monogliceridi. Pogosto se uporabljajo dolgo-verižni trigliceridi, ki so pri sobni temperaturi v trdnem ali poltrdnem agregatnem stanju in jih pridobivajo iz rastlinskih olj, kot so sezamovo, sojino, olivno in arašidovo. Zaželeni so tudi tekoči srednje dolgo-verižni trigliceridi iz kokosovega olja, ki so zaradi večje polarnosti boljše topila za hidrofobne učinkovine (slednje niso nujno lipofilne) kot dolgo-verižni trigliceridi. Druga komponenta SMES so površinsko aktivne snovi oz. emulgatorji, katerih bistvene naloge so zagotavljanje ustrezne solubilizacijske kapacitete za hidrofobne učinkovine, zniževanje medfazne napetosti med oljno in vodno fazo ter omogočanje gibljivosti emulgatorskega filma na medfazni površini. Slednje olajša proces disperzije ter omogoča nastanek prožnega filma, ki obda lipidne kapljice, kar vodi v spontan nastanek mikroemulzije. Za izdelavo učinkovitega SMES je potrebno v formulacijo dodati med 30 – 60 % PAS, zato se najpogosteje uporabljajo neionski emulgatorji z visoko HLB vrednostjo, kot so glikozilirani etoksilirani gliceridi in polisorbati, ki so manj toksični kot ionski emulgatorji. Za izboljšanje topnosti zdravilne učinkovine v lipidnem sistemu se v SMES dodajajo tudi hidrofilna sotopila, med katerimi so najpogostejši polietilen glikoli, etanol, propilen glikol in glicerol. Ker lahko pri visokih deležih sotopil pride do obarjanja ZU po dispergiranju sistema v vodi, je potrebno le-te dodajati v nizkih koncentracijah, najbolje pa je izbrati sotopilo, ki se zadržuje na površini emulgiranih kapljic in ne prehaja v vodno fazo. Načrtovanje in razvoj SMES načeloma temelji na konstruiranju (psevdo)trikomponentnega diagrama, iz katerega so razvidne optimalne koncentracije osnovnih sestavin sistema, pri katerih poteče proces samomikroemulgiranja (5,6,10).

Vgrajevanje hidrofobnih zdravilnih učinkovin v SMES je torej namenjeno izboljšanju njihove biološke uporabnosti. V želodcu in lumnu tankega črevesja poteče dispergiranje sistema v hidrofilnem prebavnem soku, učinkovina pa ostane raztopljena v lipidnih kapljicah. S tem se izognemo počasnemu raztapljanju ZU v prebavnem mediju, ki je omejujoč dejavnik v procesu absorpcije. Zaradi tekočega agregatnega stanja se SMES najpogosteje polnijo v mehke želatinske kapsule, uspešno pa so bile vgrajene tudi v pelete, mikrokapsule s takojšnjim sproščanjem in tablete z nadzorovanim sproščanjem (5,6,7,9,10).

1.3. MODELI ZA *IN VITRO* LIPOLIZO

Na lipidih osnovani sistemi so po peroralnem vnosu podvrženi številnim kompleksnim fiziološkim procesom, ki potekajo na različnih mestih v GIT. Preprosti testi raztapljanja in dispergiranja zato za takšne sisteme niso primerni, saj ne upoštevajo hidrolize estrskih vezi gliceridov pod vplivom lipaze, ki poteka v zgornjem delu prebavnega trakta ter metabolizma ostalih komponent (fosfolipidi, holesterolni estri). Prebava lipidnih komponent ter nekaterih površinsko aktivnih snovi (ki imajo v svoji strukturi estrsko vez) lahko močno vpliva na solubilizacijsko kapaciteto dispergirane sistema za vgrajeno učinkovino. Slednja se lahko v procesu prebave poveča, lahko pa tudi bistveno pade, kar lahko vodi v obarjanje učinkovine. Za nadaljnji razvoj na lipidih osnovanih sistemov je zato nujen model za testiranje teh formulacij, ki bi upošteval čim več mehanizmov prebave. Študije, ki dajejo najbolj natančne rezultate, zato izvajajo *in vivo* na živalih. Pri testnih živalih, ki so zaužile testirani lipidni sistem, se navadno spremlja spremembe na celotni živali (telesna masa, obnašanje) ali na določenih notranjih organih (jetra, ledvice, trebušna slinavka,...). Tovrstne študije so običajno invazivne in zahtevajo žrtvovanje živali, povezane so tudi z visokimi stroški in dolgotrajnimi testiranjmi, zato se pri preučevanju biološke uporabnosti na lipidih osnovanih sistemov daje velik poudarek na razvoju ustreznih *in vitro* metod, ki bi bile sposobne čim bolj napovedovati usodo teh formulacij *in vivo* (1,12).

In vitro sistemi so zasnovani tako, da posnemajo pogoje v enem ali več organih GIT, največkrat pa je to tanko črevo. Vzorci so med analizo izpostavljeni različnim tekočim medijem, ki posnemajo prebavne sokove v lumnu prebavil in običajno vsebujejo žolčne kisline, fosfolipide, encime, koencime ter druge komponente, ki so natančneje opisane v nadaljevanju. Med lipolizo tako prihaja do hidrolize estrskih vezi gliceridov pod vplivom encimov (pankreasna lipaza in kolipaza), pri čemer se sproščajo proste maščobne kisline. Na osnovi količine le-teh se določa obseg lipolize *in vitro* in sicer ob določenih časovnih točkah med samo reakcijo ali pa po zaključku analize. Glede na del prebavnega trakta, katerega delovanje posnema testiranje, lahko *in vitro* modele za lipolizo razdelimo na:

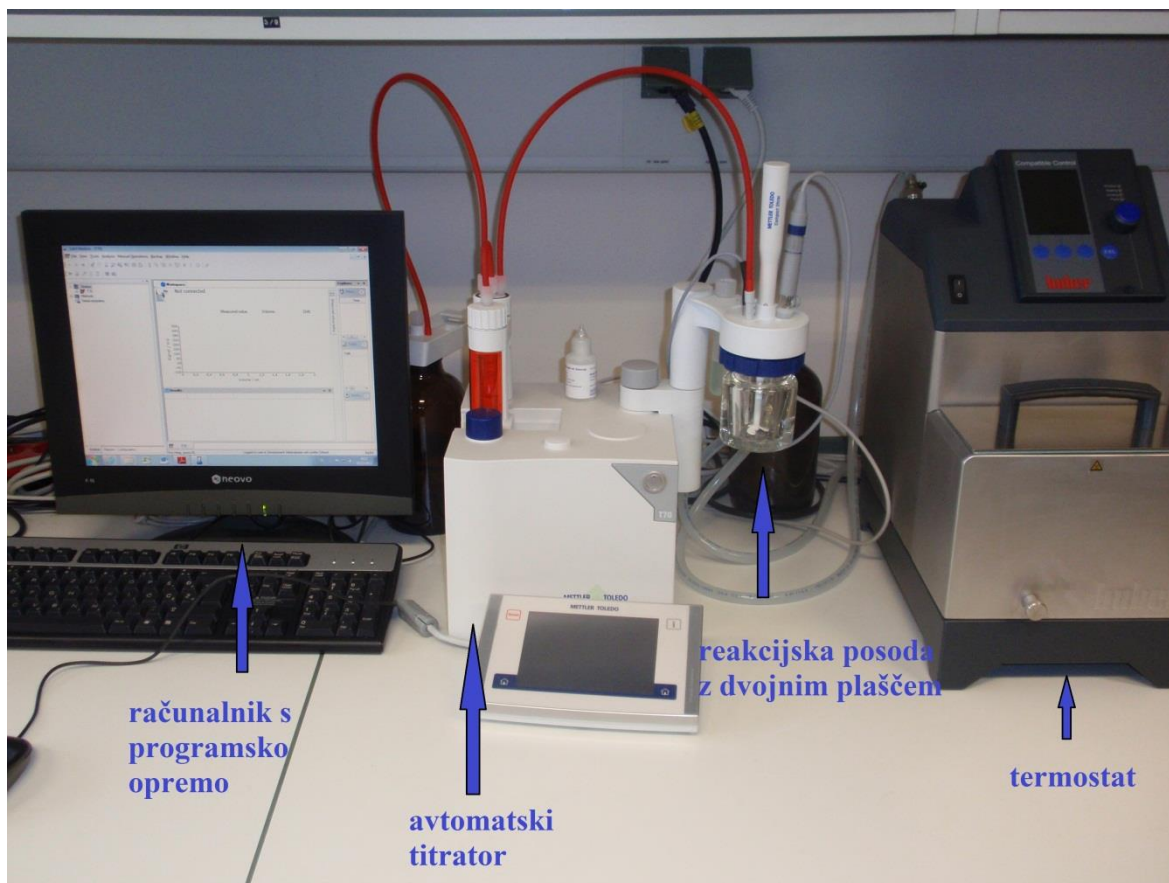
- **enostopenjske** modele, ki simulirajo pogoje v enem delu GIT (usta, želodec, tanko črevo ali debelo črevo). Med takšne modele spada enostavna pH-stat metoda, ki posnema prebavo bodisi v želodcu bodisi v tankem črevesju.

- **večstopenjske** modele, pri katerih so vzorci lipidnih sistemov zaporedno izpostavljeni dvema ali večim različnim tekočim medijem, ki posnemajo pogoje v različnih delih prebavnega trakta.

Za testiranje *in vitro* lipolize je razvitih že nekaj različnih pristopov, vendar pa je zaradi kompleksnosti procesov v človeškem prebavnem traktu le-te težko natančno posnemati v laboratorijih (1,11,12).

1.4. pH-STAT METODA

Med do sedaj razvite modele za določanje *in vitro* lipolize na lipidih osnovanih sistemov spada tudi tako imenovana pH-stat metoda. Princip delovanja temelji na merjenju prostih maščobnih kislin, ki se med reakcijo lipolize v nevtralnem pH sproščajo iz trigliceridov. Reakcijo sprožimo z dodatkom lipaze v termostatirano reakcijsko posodo (37°C). V le-tej predhodno pripravimo disperzijo vzorca lipida, ki ga analiziramo, v biorelevantnem pufri, ki poleg lipaze (in kolipaze), ki jo dodamo zadnjo, vsebuje še ustrezne koncentracije glavnih prebavnih komponent v tankem črevesju, kot so žolčne soli, fosfolipidi in različni ioni. Dodatek lipaze torej sproži hidrolizo trigliceridov, pri kateri se iz ene molekule triglicerida sprostijo 2-monoglicerid ter dve prosti maščobni kislini. Količino le-teh določimo z reakcijo nevtralizacije, kjer sproščene proste maščobne kisline nevtraliziramo s titriranjem vsebine procesne posode z močno bazo (NaOH) znane koncentracije. Na ta način se vzdržuje pH reakcijske zmesi na izbrani konstantni vrednosti, ki jo nastavimo na začetku poskusa. Računalnik zazna količino in hitrost porabe baze in na osnovi teh podatkov se izračuna obseg lipolize. Izvedba pH-stat metode je enostavna in hitra ter omogoča testiranje različnih emulzijskih sistemov pod enakimi eksperimentalnimi pogoji, uporablja pa se lahko tudi za preučevanje vpliva različnih fizikalno-kemijskih dejavnikov na proces prebave lipidov. Posamezni deli aparature za izvedbo *in vitro* lipolize so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Aparatura za izvedbo pH-stat metode: avtomatski titrator Mettler Toledo (v sredini) s pH elektrodo (za vzdrževanje konstantnega pH v reakcijski posodi z dvojnimi plaščem), termostat za vodo (desno), ki s kroženjem segrete vode skozi dvojni plašč reakcijske posode vzdržuje konstantno temperaturo v le-tej in računalnik s programsko opremo, ki nadzoruje proces titracije (levo).

S pH-stat metodo določen odstotek sproščenih maščobnih kislin (Φ) v odvisnosti od časa lahko izračunamo z naslednjo enačbo:

$$\Phi = \phi_{max} \left(1 - \left(1 + \frac{3kMt}{2d_0\rho_0} \right)^{-2} \right)$$

ϕ_{max} - obseg lipolize oziroma maksimalen odstotek sproščenih maščobnih kislin ob koncu reakcije

k – hitrost lipolize oz. mmol sproščenih maščobnih kislin iz površine maščobne kapljice na časovno enoto [mmol/min]

d_0 – začetni premer maščobnih kapljic [nm]

ρ_0 – gostota oljnih kapljic [g/cm^3]

M – molska masa lipida [g/mol]

Ker tako zasnovana metoda posnema samo prebavo v tankem črevesju, je potrebno za bolj temeljito testiranje vzorce predhodno izpostaviti še sistemom, ki posnemajo prebavo lipidov v ustih in želodcu (12,13).

1.4.1. Lipaza

Lipaze so vodotopni encimi, ki jih najdemo pri večini organizmov bakterijskega, rastlinskega in živalskega sveta ter igrajo ključno vlogo pri metabolizmu in prebavi maščob. Spadajo v skupino encimov, ki katalizirajo reakcije hidrolize, estrenja in preestrenja vodotopnih estrov, njihova uporaba pa je široko razširjena v prehranski, farmacevtski, usnjarski, tekstilni, kozmetični in papirni industriji. Z ozirom na to, kje na trigliceridih pod vplivom lipaz poteče reakcija, jih delimo na nespecifične in 1,3 specifične; med slednje spada tudi pankreasna lipaza. Ne glede na mesto cepitve estrske vezi v trigliceridu je za lipaze značilna posebna lastnost, da je njihova aktivnost dokaj nizka v prisotnosti nižjih koncentracij kratko-verižnih trigliceridov, ki so raztopljeni v disperznem mediju. Ko koncentracija trigliceridov naraste in začno nastajati miceli, pa se aktivnost lipaz močno poveča. Lipaze torej izkazujejo najvišjo stopnjo aktivnosti na medfazni površini med oljno in vodno fazo (14).

Za izvedbo pH-stat metode se najpogosteje uporablja pankreasna lipaza oziroma pankreatin prašičjega izvora. Slednji zaradi naravnega izvora vsebuje vse encime trebušne slinavke, kar je pomembno za izvedbo *in vitro* lipolize, saj lahko na lipidih osnovani sistemi vsebujejo več različnih potencialnih substratov. Med najpomembnejše encime, ki so prisotni v pankreatinu, spadajo:

- **Pankreasna triacilglicerid-lipaza** hidrolizira trigliceride na mestu 1 in 3. 2-monoglicerid, ki pri tem nastane, se lahko spontano premesti v 1- ali 3-monoglicerid, ki je ponovno substrat za lipazo. Najvišjo aktivnost encim izkazuje za srednje dolgo-verižne trigliceride in nekoliko manj za dolgo-verižne, v človeškem organizmu pa se med prebavo izloča v visokih koncentracijah, zato v normalnih pogojih poteče skoraj popolna prebava in nato absorpcija lipidov. Encim se aktivira z vezavo na medfazo olje-voda, kjer tudi poteka proces lipolize. Poleg prisotnosti žolčnih soli in fosfolipidov za boljše delovanje potrebuje tudi encim kolipazo, ki olajša njegovo vezavo na površino lipidnih kapljic. Za delovanje pankreasne lipaze je pomembna tudi prisotnost kalcija, ki *in vivo* z lipazo tvori aktivirane komplekse, v *in vitro*

pogojih pa odstranjujejo proste maščobne kisline, s katerimi tvori v vodi netopne soli. Optimalen pH za delovanje pankreasne lipaze je med 6,5 in 8,0.

- **Fosfolipaza A₂** se v tanko črevo izloča v obliki proencima ter se aktivira z hidrolizo na N-terminalnem delu verige. Njena aktivna oblika katalizira hidrolizo različnih fosfolipidov na 2. mestu, pri čemer nastane lizofosfolipid in prosta maščobna kislina. Za aktivno delovanje encima je potrebna tudi prisotnost kalcijevih ionov. Predvidevajo, da hidroliza fosfolipidov s fosfolipazo A₂ pankreasni lipazi omogoča hitrejšo hidrolizo trigliceridov v prebavnem traktu.
- **Holesterol-esterazo** lahko v literaturi najdemo tudi pod imeni, kot so »karboksil ester lipaza« (angl: carboxyl ester lipase), karboksilesteraza (angl: carboxyl esterase), nespecifična lipaza ali z žolčnimi solmi stimulirana lipaza. Encim izkazuje delovanje za širok spekter substratov, kjer katalizira hidrolizo vodotopnih karboksilnih estrov, medtem ko je za njegovo aktivnost pri netopnih karboksilnih estrih potrebna prisotnost žolčnih kislin (11).

Aktivnost lipaze je odvisna od njenega izvora, predvsem pa tudi od pogojev, katerim je izpostavljena med shranjevanjem in uporabo. Njena katalitična aktivnost se močno zmanjša med dolgotrajnim shranjevanjem ali zaradi izpostavljenosti visokim temperaturam, zato je pri uporabi v raziskovalne namene priporočljivo uporabljati sveže pripravljene raztopine lipaze, ki se lahko za krajši čas shranjujejo pri nizkih temperaturah. Ker na delovanje lipaze vlivajo tudi pogoji v prebavnem mediju, kot so temperatura, pH, ionska moč in potencialna prisotnost denaturantov, je potrebno standardizirati pogoje *in vitro* testiranja, pri katerih se nato določa aktivnost encima. Ena najpogosteje uporabljenih metod za določanje aktivnosti lipaze temelji na določanju količine maščobnih kislin, ki se sprostijo iz predpisanega volumna substrata pri standardiziranih pogojih, kot substrat pa se uporablja triolein ali tributirin.

V organizmu je prisotnost pankreasne lipaze v tankem črevesju odvisna od posameznikovega zdravstvenega stanja in starosti, dela dneva ter količine in vrste zaužite hrane. Za *in vitro* testiranja je torej težko določiti točno količino dodanega encima, ki bi vedno ustrezala pogojem *in vivo*, ker pa je količina lipaze v GIT običajno v prebitku, je priporočljivo uporabiti raztopine z visokimi koncentracijami encima (1,15).

1.4.2. Sestava prebavnega medija

Sestava prebavnega medija, v katerem poteka reakcija lipolize in ki posnema pogoje v tankem črevesju, je eden od najpomembnejših dejavnikov pri izvajanju pH-stat metode. Tako kot koncentracija lipaze je tudi sestava prebavnega medija različna tekom dneva pri določenem človeku, kot tudi med posamezniki. Za določitev ustrezne sestave medija, ki bi se kar najbolj približala rezultatom *in vivo* študij, je bilo izvedenih že nekaj raziskav z različnimi koncentracijami kalcija, vrstami in koncentracijami žolčnih soli ter drugimi parametri.

Žolčne soli in endogeni fosfolipidi se iz žolčnika izločajo v lumen dvanajstnika, kjer tvorijo mešane micle, in predstavljajo pomembno komponento v prebavi lipidov. Fosfolipidi so v nasprotju z žolčnimi kislinami prisotni tudi v zaužiti hrani (t.i. eksogeni fosfolipidi), zato se razmerje med v dvanajstniku prisotnimi fosfolipidi lahko precej spreminja. Pri izvedbi pH-stat metode je razmerje med dodanimi žolčnimi solmi in fosfolipidom 4:1. Če želimo posnemati pogoje v GIT na tešče, je tako koncentracija žolčnih soli v mediju običajno 5 mM, koncentracija fosfolipida fosfatidilholina pa 1,25 mM. Pri testiranju lipolize, ki posnema pogoje po obroku, pa je koncentracija žolčnih soli 20 mM, koncentracija fosfatidilholina pa 4 mM. V organizmu so v žolču prisotne štiri vrste žolčnih soli, in sicer holna, deoksiholna, henodeoksiholna in tavroholna kislina. Za pripravo prebavnega medija se lahko uporabi posamezne žolčne kisline, kar olajša pripravo medija in interpretacijo rezultatov, vendar se moramo zavedati, da uporaba le ene od žolčnih kislin ne doseže kompleksne sestave žolča. Natančnejše meritve se zato izvaja z uporabo zmesi posameznih žolčnih kislin ali pa z uporabo žolčnega ekstrakta prašičjega ali govejega izvora, ki vsebuje različne vrste v GIT prisotnih spojin, kot so žolčne soli, fosfolipidi in minerali. Zaradi naravnega izvora ekstrakta lahko pride med serijami do razlik v sestavi, možna pa je tudi prisotnost netopnih snovi, ki bi lahko vplivale na analizo, zato je potrebno pripravljeno raztopino pred uporabo prefiltrirati. V študijah, ki so jih izvedli z različnimi koncentracijami žolčnih kislin v prebavnem mediju, so ugotovili, da v visokih koncentracijah zavirajo lipolizo, saj z zasedanjem mest na medfazni površini med oljno in vodno fazo preprečujejo vezavo pankreasne lipaze na lipidne kapljice in s tem stik s substratom. Z žolčnimi solmi povezanemu zmanjšanju aktivnosti lipaze se lahko izognemo z dodatkom kolipaze v prebavni medij (1,11,17).

Kalcij je naravno prisoten v človeških prebavnih sokovih in preko številnih fizikalno-kemijskih mehanizmov vpliva na prebavo lipidov, zato je pomembna

komponenta prebavnega medija za izvedbo pH-stat metode. V organizmu se produkti lipolize odstranjujejo iz lumna prebavnega trakta z absorpcijo skozi črevesno steno in tako ne vplivajo na nadaljnji potek prebave. Med *in vitro* testiranjih pa proste maščobne kisline ostanejo v reakcijski posodi in lahko v večjih koncentracijah zavirajo delovanje lipaze, saj preprečujejo stik encima s površino lipidnih kapljic. Kalcij deluje kot kofaktor, ki omogoča pravilno delovanje pankreasne lipaze. Hkrati s prostimi maščobnimi kislinami tvori netopna kalcijeva mila in s tem posnema proces prehajanja maščobnih kislin skozi steno prebavnega trakta ter vpliva na povečanje obsega lipolize. Vendar lahko prisotnost kalcija prebavo lipidov tudi zavira. Visoke koncentracije kalcijevih ionov namreč povzročijo flokulacijo emulgiranih lipidnih kapljic. Posledica združevanja kapljic v večje skupke, v katerih so posamezne kapljice sicer še vedno ločene s plastjo površinsko aktivnih snovi, je nerazpoložljivost površin kapljic v notranjosti skupkov za vezavo encima. V testiranih formulacijah so lahko prisotni tudi biopolimeri, kot sta alginat in pektin, ki v prisotnosti kalcija tvorijo hidrogel. Lipidne kapljice, ujete v rešetko hidrogela, so težje dostopne za lipazo. Koncentracija kalcija v tankem črevesju se pri ljudeh giblje med 5 in 30 mM, v prebavnih medijih pH-stat metode pa najpogosteje uporabljajo 5 mM koncentracijo (1,11,15).

V prebavnih sokovih so prisotni tudi nekateri **drugi ioni mineralov**, kot na primer natrij, kalij, sulfati, fosfati in bikarbonati, ki imajo pomembno vlogo v procesu prebave. Pod njihovim vplivom lahko pride do sprememb v fizikalno-kemijskih lastnostih, topnosti in agregatnem stanju nekaterih komponent v sistemu. V sestavi prebavnega medija je zato navadno prisotna monovalentna sol (NaCl ali KCl), ki vzdržuje ustrezno ionsko moč raztopine (1).

Za ustrezno izvedbo pH-stat metode je potrebno pripravljene prebavni medij umeriti na **pH** vrednost, ki posnema fiziološke pogoje v tankem črevesju in hkrati omogoča optimalno delovanje reagentov. Po hidrolizi estrskih vezi, v vodni fazi poteka titracija sproščenih prostih maščobnih kislin z NaOH, za prehod iz lipidne v vodno fazo pa morajo biti maščobne kisline v ionizirani obliki. Dolgo-verižne proste maščobne kisline imajo pK_a vrednost 8, ki pa se v prisotnosti žolčnih soli in kalcija zniža na približno 6,5. Za reakcijo *in vitro* lipolize se zato najpogosteje uporabljajo prebavni mediji s pH vrednostjo med 6,5 in 8,5, ki jo je potrebno vzdrževati med celotno reakcijo. Raztopine prebavnega medija so navadno pufri z nizko pufno kapaciteto, ki se hitro odzivajo na spremembo pH, do katere prihaja ob sproščanju prostih maščobnih kislin in njihovi titraciji z bazo (1,11,15,16,17).

1.4.3. Izbira titranta in obravnava vzorcev po končani lipolizi

Med reakcijo lipolize je pomembno konstantno mešanje reakcijske zmesi, s čimer zagotovimo enakomeren potek reakcije in titracije sproščenih maščobnih kislin v reakcijski zmesi. Poleg tega pa nam mešanje omogoča, da lahko ob različnih časovnih točkah odvzamemo iz reakcijske posode homogene vzorce, s pomočjo katerih spremljamo obseg lipolize in sproščanje učinkovine iz sistema že med samo reakcijo. Vsakemu odvzetemu vzorcu je potrebno nemudoma dodati reagent za inhibicijo lipaze, s čimer se prekine nadaljnja hidroliza. Vzorce nato ultracentrifugiramo in s tem zagotovimo ločitev reakcijske zmesi na posamezne faze in sicer oljno fazo, vodno fazo ter sediment. Katere faze bodo v reakcijski zmesi prisotne je odvisno od testiranega lipidnega sistema in časovne točke odvzema, razmerje med njimi pa se med lipolizo spreminja. Oljna faza, ki je prisotna na začetku, zaradi hidrolize lipidov v končnih vzorcih praktično ni več opazna, povečuje pa se količina prisotnega sedimenta, v katerem se nabirajo netopna kalcijeva mila z maščobnimi kislinami in učinkovina, ki se je oborila med dispergiranjem in prebavo lipidnega sistema.

Pri načrtovanju metode je potrebno upoštevati tudi količino substrata in razmerje med njim in lipazo ter koncentracijo titranta. Ob uporabi NaOH v nizkih koncentracijah je lahko dodani volumen tako velik, da pride do razredčitve reakcijskega medija. Nižje koncentracije žolčnih kislin in ostalih sestavin prebavnega medija posledično lahko vplivajo na potek in rezultate lipolize. Prav tako ni ugodna uporaba zelo koncentriranega NaOH, ki že v majhnih količinah močno vpliva na spremembo pH, zaradi nizke porabe pa se povečuje tudi eksperimentalna napaka. V preglednici II so navedeni pogoji za nekaj različnih izvedb pH-stat metode (11).

Preglednica II: Nekaj primerov pogojev izvedbe pH-stat metode (1,18,19,20,21).

	McClements and Li (2010)	Dahan and Hoffman (2007)	Christensen et al. (2004), Zangenberg et al. (2001)	Sek et al. (2001)
pH (pufer)	7	6,8 (tris maleat 50 mM)	6,5 (Trizma-maleat 2 mM)	7,5 (Tris-maleat 50 mM)
temperatura	37°C	37°C	37°C	37°C
NaOH	0,1 M	ni podatka	1,0 M	0,2; 0,6 M
količina lipida	300 mg	1 g	30 mM	250 mg
ŽS	20 mg/ml	5 mM	20 mM	20 mM
PC	ni podatka	1,25 mM	4 mM	5 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM
CaCl ₂	10 mM	5 mM	kontinuirano dodajanje 0,105 mmol/min	5 mM
pankreatin	2,4 mg/ml (100-400 enot/mg)	3,5 ml (1000 IU/ml)	800 USP/ml	1 ml (10000 TBU)
začetni volumen	37,5 ml	40 ml	300 ml	10 ml

IU - mednarodne enote (international units)

TBU – tributirinske enote

USP – ameriška farmakopeja

ŽS – žolčne soli

PC - fosfatidilholin

1.5. DOLOČANJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Lipaze so encimi s širokim območjem uporabe, tako v industriji in prehrani, kot tudi v raziskovalnih laboratorijih in diagnostiki, zato se za identifikacijo in karakterizacijo encima uporabljajo različne analize metode. V kliničnih laboratorijih so potrebne specifične, občutljive, hitre in ponovljive avtomatizirane metode, medtem ko se v raziskovalne namene uporabljajo prilagodljivi postopki, ki omogočajo enostavno spreminjanje analiznih pogojev. Pri načrtovanju metode za določanje aktivnosti je

pomembna pravilna izbira substrata. Pod vplivom lipaze poteče hidroliza večine trigliceridov, aktivnost lipaze pa se najpogosteje določa na substratu trioleinu, ki spada med dolgoveržne trigliceride in je pri sobni temperaturi v tekočem stanju. Pogosto se kot substrat uporablja tudi tributirin, prednost katerega je, da se ob mešanju dispergira v vodni fazi brez dodatka emulgatorjev, kar omogoča hitrejšo hidrolizo, saj je delovanje lipaze omejeno na medfazno površino med vodo in oljnimi kapljicami. Na aktivnost lipaze lahko vplivajo tudi druge komponente, ki so prisotne v reakcijski zmesi (npr. natrijev klorid, kalcijev klorid, žolčne soli, emulgatorji in proteini) (22,23).

Za določanje aktivnosti lipaze se uporablja veliko različnih postopkov. Večina temelji na specifičnem ali nespecifičnem merjenju sproščenih maščobnih kislin, z uporabo kromogenih substratov pa je mogoče tudi spektrofotometrično spremljanje reakcije hidrolize. Najpogosteje uporabljene metode so:

- **Titrimetrična metoda.** Je najbolj uporabna in preprosta metoda, ki temelji na nespecifičnem merjenju maščobnih kislin. Po prekinitvi reakcije z dodatkom etanola, kvantitativno določanje rahlo kisljih maščobnih kislin poteka s titracijo do končne točke pri pH 9,3 – 10,5. Dodatek fosfatnega pufra s pH 8,0 ustvarja optimalne pogoje za delovanje lipaz in pomaga vzdrževati pH reakcijske zmesi med reakcijo. Kot substrat se pri titrimetričnih metodah lahko uporablja katerikoli triglicerid, ki je pri sobni temperaturi v tekoči obliki, zato se titrimetrija pogosto uporablja za določanje substratne selektivnosti posameznih lipaz. K tovrstnim metodam spada tudi pH-stat metoda, kjer titracija poteka že med reakcijo (23).
- **Kolorimetrična metoda.** Tudi ta metoda temelji na določanju sproščenih maščobnih kislin, vendar je bolj specifična. Vzorcem reakcijske zmesi se po prekinitvi reakcije doda dvofazno mešanico bakrovega acetata, piridina in benzena, kar povzroči nastanek bakrovih soli s prostimi maščobnimi kislinami. Modro obarvane soli nato preidejo v benzen, kjer poteka detekcija z merjenjem absorbance pri 715 nm. Prisotnost piridina preprečuje združevanje bakrovih soli z maščobnimi kislinami v večje agregate, ki ne morejo prehajati v benzen, ter hkrati povečuje topnost soli v organski fazi. V primerjavi s titrimetrično metodo daje kolorimetrična metoda za 40% nižje rezultate, najbolj primerna pa je za substrate, ki vsebujejo maščobne kisline z 12 – 20 ogljikovimi atomi (23).
- **Spektrofotometrična metoda.** Za izvedbo te metode se kot analogi substrata uporabljajo p-nitrofenil acilni estri. Ker lipaze izkazujejo splošno hidrolitično

aktivnost za karboksilne estre, poteče reakcija do prostih maščobnih kislin in p-nitrofenola, ki je kromofor, in ga v bazičnem okolju lahko detektiramo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 400 – 410 nm. Slabost metode je, da lahko hidroliza p-nitrofenil acilnih estrov poteče tudi pod vplivom drugih nespecifičnih esteraz; s to metodo pridobljene rezultate je zato potrebno potrditi še z drugimi metodami. Manj pogosto uporabljeni substrati so še β -naftilacilni estri in na resorufin vezani acilgliceroli. Spektrofotometrična metoda je direktna in hitra ter omogoča kontinuirano merjenje aktivnosti lipaze med celotno reakcijo. Meritve so možne tudi pri zelo nizkih volumnih (1 ml), zato se lahko uporablja za spremljanje čiščenja in za uporabo na mikrotiterskih ploščah (22,23).

Med titrimetrične metode, kjer določanje sproščenih maščobnih kislin poteka s titracijo le-teh z bazo, spadajo nekateri najpogosteje uporabljeni testi za določanje aktivnosti lipaze. Pri **tributirinskem testu** (natančneje je opisan v poglavju Metode in materiali) se kot substrat uporablja ester glicerola in maslene kisline – tributirin. Spremljanje reakcije poteka 30 minut, za titracijo sproščenih maščobnih kislin in vzdrževanje pH na vrednosti 7,5 pa se uporablja 0,1 M NaOH (32). Za določanje aktivnosti pa se pogosto uporabljata tudi predpisa iz **Evropske** ali **Ameriške farmakopeje**, ki sta si med seboj zelo podobna. Kot substrat je v obeh primerih predpisana dobro homogenizirana emulzija olivnega olja v vodi, z dodatkom arabskega gumija kot emulgatorja. Puferna raztopina se pripravi z raztapljanjem tris(hidroksimetil)aminometana in natrijevega klorida v vodi, za pripravo raztopine žolčnih soli pa je predpisana uporaba natrijevega tavroholata v Evropski oz. referenčni standard žolčnih soli (USP Bile Salts RS) po Ameriški farmakopeji. Reakcijsko zmes, ki v začetku vsebuje emulzijo substrata, pufer ter raztopino žolčnih soli, je potrebno dobro premešati ter umeriti na pH 9,2. Po dodatku raztopine encima se pH reakcijske zmesi vzdržuje na 9,0 z 0,1 N NaOH, porabo baze pa se odčitava na vsako minuto do 5 minut (24,25).

2. NAMEN DELA

Razvoj na lipidih osnovanih sistemov za peroralno uporabo se je začel z namenom izboljšanja biološke uporabnosti vedno večjega števila slabo vodotopnih učinkovin. Skupaj z razvojem novega dostavnega sistema, pa je potrebno razviti tudi učinkovit *in vitro* sistem za testiranje lipolize, ki uspešno posnema prebavo lipidov v organizmu.

V diplomski nalogi bomo postavili temelje za izvedbo pH-stat metode, ki temelji na titraciji iz lipida sproščenih maščobnih kislin z bazo, s čimer se vzdržuje konstanten pH v reakcijski posodi. V začetnem delu bomo s tributirinsko metodo določali aktivnost pankreatina z dvema različnima pufroma, ter s spreminjanjem parametrov metode poskušali določiti optimalne pogoje za ta proces. V drugem delu se bomo osredotočili na določanje obsega lipolize za posamezne komponente in za izbrani na lipidih osnovani sistem brez in z zdravilno učinkovino. S prilagajanjem različnih parametrov bomo tudi za merjenje obsega lipolize določili nastavitve pH-stat metode, pri katerih se bo najbolj konstantno vzdrževala pH vrednost in bo dajala najbolj natančne rezultate. Količino sproščenih maščobnih kislin med reakcijo bomo določili iz baze porabljene za titracijo. Na koncu bomo vzorcem SMES z resveratrolom (RSV) po končani lipolizi določili še velikost delcev na aparaturi Zetasizer Nano ter s HPLC analizo vodne faze izmerili koncentracijo učinkovine, ki se je sprostila iz sistema.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Snovi, uporabljene pri delu:

- bidestilirana voda
- Capmul® MCM, Abitec, Janesville, ZDA
- Cremophor® EL, BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija
- Cremophor® RH 40, BASF SE, Ludwigshafen, Nemčija
- kalcijev klorid dihidrat, p. a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Lipoid S 100, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Nemčija
- metanol (HPLC – gradient grade), Panreac Quimica S. L. U., Barcelona, Španija
- natrijev deoksiholat, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- natrijev klorid, p. a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- pankreatin (prašičjega izvora), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- prečiščena voda
- Resveratrol, ChromaDex, Irvine, ZDA
- ricinusovo olje, deviško, Lex d.o.o., Koper, Slovenija
- tributirin $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Trizma® maleat, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA

Capmul® MCM

Capmul spada med srednje dolgo-verižne molekule in je zmes mono in digliceridov s kaprilno (C8) in kaprinsko (C10) kislino. Lipofilna, rahlo rumena, bistra, viskozna snov, ki je netopna v vodi, se v tehnologiji uporablja za izdelavo emulzij ter za uravnavanje viskoznosti. Pogosto se uporablja kot sestavina peroralnih, na lipidih osnovanih sistemov z namenom povečanja biološke uporabnosti lipofilnih zdravilnih učinkovin (26).

Cremophor® EL

Cremophor® EL oz. polioksil-35 ricinovo olje spada med derivate polioksietiliranega ricinovega olja in vsebuje približno 83 % hidrofobnih komponent. Glavno komponento predstavlja glicerol polietilen glikol ricinooleat, poleg le-tega so prisotni še estri maščobnih kislin s polietilenglikolom ter samo ricinusovo olje. Prosti polietilen glikol in glicerol etoksilat sta hidrofilni komponenti in predstavljata 17 % zmesi.

Rahlo rumena oljna tekočina se pridobiva z reakcijo 1 mola ricinusovega olja z 35 moli etilen oksida in je dobro topna v kloroformu, etanolu, maščobnih kislinah, maščobnih alkoholih, olivnem olju ter vodi. Uporablja se kot emulgator in topilo v tekočih vodnih pripravkih z lipofilnimi ZU ter različnih na lipidih osnovanih sistemih (27,28).

Cremophor® RH 40

Med derivate polioksietiliranega ricinovega olja spada tudi Cremophor® RH 40 oz. polioksil-40 hidrogenirano ricinovo olje, katerega glavna komponenta je glicerol polietilen glikol oksistearat, ki skupaj z estri maščobnih kislin z glicerol poliglikolom predstavlja hidrofobne komponente. Hidrofilni del te komponente vsebuje polietilen glikol in glicerol etoksilat. Cremophor® RH 40 pridobivajo z reakcijo 1 mola hidrogeniranega ricinusovega olja s 40 -45 moli etilen oksida, pri čemer nastaja precej viskozna tekočina ali bela gosta poltrdna snov, ki je topna v kloroformu, etanolu, maščobnih kislinah, maščobnih alkoholih, olivnem olju ter vodi. Uporablja se kot emulgator in topilo za lipofilne ZU ter je pogosta sestavina na lipidih osnovanih sistemov (27,29).

Ricinusovo olje

Ricinusovo olje je dolgo-verižni triglicerid, ki vsebuje ricinoleinsko, oleinsko, linolno, palmitinsko in stearinsko kislino ter dihidroksistearinsko kislino v sledovih. S hladnim stiskanjem semen ricinusa (*Ricinus Communis*) pridobivajo bistro, rahlo rumeno viskozno snov blagega vonja in okusa. Uporaba ricinusovega olja je zelo razširjena, saj se uporablja tako v farmacevtski industriji kot tudi v kozmetiki in prehrani. V tehnologiji se uporablja pri izdelavi dermalnih krem in mazil, tablet, kapsul, kapljic za oči ter kot topilo v intramuskularnih injekcijah (27).

Resveratrol

Molekula s kemijskim imenom 3,4',5 – trihidroksistilben spada med stilbenoide in je fitoaleksin. Fitoaleksini so protimikrobne snovi, ki se sintetizirajo v rastlini ob napadu patogena in se kopičijo na prizadetem mestu. Resveratrol zato najdemo v grozdju, borovnicah in v japonskem dresniku. Zaradi mnogih možnih pozitivnih učinkov na organizem je postal predmet številnih raziskav, saj kot antioksidant ščiti pred oksidativnimi poškodbami, pomaga pri vzdrževanju ravni krvnega sladkorja, ima ugodne učinke na srce ter pomaga pri vzdrževanju telesne mase (30,31).

3.1.2. Aparature:

- analitska tehtnica AG285, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- analitska tehtnica XS205 DualRange, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- elektronska pipeta 100-5000 μ l, Biohit, Helsinki, Finska
- elektronska pipeta 50-1000 μ l, Biohit, Helsinki, Finska
- HPLC 1100, Agilent, Waldbronn, Nemčija
- pH meter S47 SevenMulti, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- plastične centrifugirke 1,5 ml
- plastične centrifugirke 2 ml
- stresalnik Vibromix 10, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- titrator T70, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- toplotna kopel Ministat 125, Huber, Offenburg, Nemčija
- ultracentrifuga WX 100, Thermo scientific, Waltham, ZDA
- večmestno magnetno mešalo RO 15, Ika, Staufen, Nemčija
- Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK

3.2. METODE

3.2.1. Priprava pufrov

- Maleatni pufer (pH=7,5) za določanje aktivnosti pankreasne lipaze

V 200 ml bučko smo točno zatehtali 1,753 g natrijevega klorida, 0,147 g kalcijevega klorida dihidrata ter 2,372 g Trizma maleata in jih raztopili v nekaj prečiščene vode ter dopolnili do oznake. Raztopino smo nato z 1M NaOH umerili na pH=7,5 (20).

- Maleatni pufer z Na-deoksiholatom (pH=7,5) za določanje aktivnosti pankreasne lipaze

V 200 ml bučko smo točno natehtali 1,753 g natrijevega klorida, 0,147 g kalcijevega klorida dihidrata ter 2,372 g Trizma maleata in jih raztopili v nekaj prečiščene vode. Nato smo dodali še 0,3317 g Na-deoksiholata ter bučko dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Pripravljeni raztopini smo z 1M NaOH umerili pH na 7,5.

➤ Prebavni pufer (medij) za lipolizo

V 200 ml bučko smo natehtali 1,753 g natrijevega klorida, 0,147 g kalcijevega klorida dihidrata ter 2,372 g Trizma maleata in jih raztopili v nekaj prečiščene vode. Nato smo dodali še 0,405 g natrijevega deoksiholata in 0,201 g Lipoida S100. Bučko smo dopolnili do oznake s prečiščeno vodo in pufer mešali na magnetnem mešalu 12 ur. Na koncu smo raztopino umerili na $\text{pH} = 7,5$ z 1M NaOH. Vse tri vrste uporabljenih pufrov so prikazane ne Sliki 3.



Slika 3: A – maleatni pufer za določanje aktivnosti encima; B – maleatni pufer za določanje aktivnosti encima z Na-deoksiholatom; C – prebavni pufer za lipolizo

3.2.2. Priprava raztopine pankreatina

Raztopino za določanje aktivnosti pankreatina smo pripravili tako, da smo v centrifugirke natehtali točno količino pankreatina in z elektronsko pipeto dodali maleatni pufer za določanje aktivnosti oziroma maleatni pufer z Na-deoksiholatom. Količino in razmerje med pankreatinom in pufrom smo v začetku spreminjali, dokler nismo določili najprimernejše sestave za izvedbo metode (sestava je navedena v Preglednici V). Centrifugirke smo nato 15 minut mešali na stresalniku Vibromix. Po mešanju smo zmes centrifugirali 15 minut na $1600 \times g$ in 5°C ter supernatant shranili na ledu (porabimo še isti dan) (20).

Raztopino pankreatina za vrednotenje lipolize SMES smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 3 g pankreatina, dodali 15 ml pufra za določanje aktivnosti in na magnetnem mešalu mešali 15 minut. Zmes smo nato razdelili v 12 centrifugirk z volumnom 2 ml in centrifugirali 15 minut na 3000 x g in 5°C. Supernatantu smo z 1M NaOH umerili pH na 7,5 in ga do uporabe shranili na ledu (porabimo še isti dan).

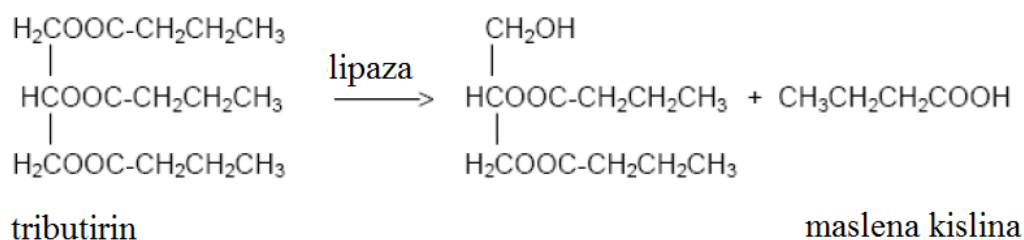
3.2.3. Priprava SMES brez/z zdravilno učinkovino

Za pripravo 10 g SMES smo v čašo natehtali 2 g ricinusovega olja, 2 g Capmul-a MCM, 3 g Cremophor-a EL in 3 g Cremophor-a RH40. Sistem smo na magnetnem mešalu mešali preko noči.

Za pripravo SMES z ZU smo v čašo natehtali 200 mg resveratrola (RSV), kar predstavlja 10% zmesi, in dodali SMES do 2 g celokupne mase. Sistem smo zaščitili pred svetlobo ter mešali toliko časa, da se je učinkovina popolnoma raztopila.

3.2.4. Določanje aktivnosti pankreatina

Pri določanju aktivnosti encima merimo količino porabljenega substrata ali nastalega produkta v določeni časovni enoti. Enota za podajanje aktivnosti je običajno *katal*; 1 *katal* predstavlja 1 mol substrata pretvorjenega v produkt v 1s. Pri našem delu smo za določanje aktivnosti pankreatina uporabljali tributirinski test. Kot substrat smo uporabljali tributirin, ki je ester glicerola in maslene kisline (butanojska kislina). Pod vplivom pankreatina poteka hidroliza tributirina, pri kateri se sproščajo proste maslene kisline, kot je prikazano na Sliki 4 (32).



Slika 4: Reakcija delne hidrolize tributirina pod vplivom lipaze.

Test smo izvajali na avtomatskem titratorju T70 z uporabo pH-stat metode; pH smo ves čas reakcije vzdrževali na konstantni vrednosti pH = 7,5 (s pomočjo nastavitve v programu za pH-stat metodo). V reakcijsko posodo z dvojim plaščem, s pomočjo katerega

smo vzdrževali v posodi temperaturo 37°C, smo odpipetirali izbrani volumen tributirina (2,5 ml, 3,0 ml, 6,0 ml ali 9,0 ml) in dodali 20 ml pufru za določanje aktivnosti ter zmes 60 s mešali pri 100 % moči mešala. Nato smo dodali pripravljeno raztopino pankreatina in aktivirali ustrezno metodo. Posamezne nastavitve spremenljivk metode za določanje aktivnosti pankreatina so predstavljene v Preglednici III.

Preglednica III: Začetne nastavitve spremenljivk metode na titratorju za določanje aktivnosti pankreatina.

Vzorec (Sample)	
↳ Določen volumen (Fixed volume):	5 ml
	1,0 g/ml
	1,0 korekcijski faktor (correction factor)
	25°C
Vzdrževanje pH (Stating)	
↳ Titrant:	NaOH
	1 mol/l
↳ Senzor (Sensor):	pH
↳ Mešanje (Stir):	40%
↳ Predhodna titracija (Pretitration):	Ne
↳ Predhodni dodatek titranta (Predispense):	Ne
↳ Nadzor (Control):	pH = 7.5
	Odstopanje (Control band) = 0,2
	Nagnjenost (Tendency) = pozitivna
	Pretok (max) = 60 ml/min (Dosing rate)
	Pretok (min) = 5 µl/min (Dosing rate)
↳ Spremljanje (Monitoring):	Ne
↳ Prekinitev (Termination):	V (max) = 70 ml
	t (max) = 30 min
	dV = 0,01 ml/dt
	dt = 5 min
↳ Interval shranjevanja	Interval = 10 s

(Measured value storage):	
Izračun R1 (Calculation R1):	Vsebnost (Content)
Izračun R2 (Calculation R2):	Povprečna poraba (Mean consumption)
Izračun R3 (Calculation R3):	Korelacijski koeficient (Correlation coefficient)
Izračun R4 (Calculation R4):	% porabe po 2 minutah (% turnover after 2 minutes)
Izračun R5 (Calculation R5):	Čas do porabe 50 % titranta (Time to 50% titrant conversion)

3.2.5. Določanje obsega lipolize

Obseg lipolize smo določali za izbrani samo-mikroemulgirajoči sistem brez ali z vgrajeno učinkovino ter za posamezne komponente tega sistema. Analizo smo izvedli s pH-stat metodo, z nastavitvijo pH reakcijske zmesi na 7,5.

V čašo smo točno zatehtali približno 200 mg posamezne komponente ali SMES, dodali 32,75 ml prebavnega pufra in na magnetnem mešalu mešali 15 minut. Tako pripravljeno zmes smo nato prenesli v termostatirano (37°C) reakcijsko posodo in ji z 1 M NaOH uravnali pH na 7,5. Ustrezno metodo smo aktivirali takoj po dodatku 7,25 ml predhodno pripravljene raztopine pankreatina, kar ustreza aktivnosti encima 1000 TBU/ml končne reakcijske zmesi. Posamezne nastavitve spremenljivk metode za določanje obsega lipolize so predstavljene v Preglednici IV.

Preglednica IV: Začetne nastavitve spremenljivk metode na titratorju za določanje obsega lipolize.

Vzorec (Sample)	
↳ Določen volumen (Fixed volume):	5 ml
	1,0 g/ml
	1,0 korekcijski faktor (correction factor)
	25°C
Vzdrževanje pH (Stating)	
↳ Titrant:	NaOH
	0,5 mol/l
↳ Senzor (Sensor):	pH
↳ Mešanje (Stir):	40%

↳ Predhodna titracija (Pretitration):	Ne
↳ Predhodni dodatek titranta (Predispense):	Ne
↳ Nazdor (Control):	pH = 7.5
	Odstopanje (Control band) = 0,01
	Nagnjenost (Tendency) = positive
	Pretok (max) = 60 ml/min (Dosing rate)
	Pretok (min) = 5 µl/min (Dosing rate)
↳ Spremljanje (Monitoring):	Ne
↳ Prekinitev (Termination):	V (max) = 70 ml
	t (max) = 60 min
↳ Interval shranjevanja (Measured value storage):	Interval = 10 s
Izračun R1 (Calculation R1):	Vsebnost (Content)
Izračun R2 (Calculation R2):	Povprečna poraba (Mean consumption)
Izračun R3 (Calculation R3):	Korelacijski koeficient (Correlation coefficient)
Izračun R4 (Calculation R4):	% porabe po 2 minutah (% turnover after 2 minutes)
Izračun R5 (Calculation R5):	Čas do porabe 50 % titranta (Time to 50 % titrant conversion)

3.2.6. Merjenje velikosti delcev/kapljič

Po končani lipolizi vzorca SMES z resveratrolom smo izmerili velikost delcev v reakcijski zmesi. Meritve smo izvajali na aparaturi Zetasizer Nano ZS z dinamičnim sipanjem laserske svetlobe (angl.: Photone correlation spectroscopy-PCS), ki temelji na detekciji hitrosti Brownovega gibanja delcev. Kot rezultat smo dobili povprečno velikost delcev in polidisperzni indeks, ki predstavlja merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. Meritve smo izvajali takoj po končani lipolizi in po ultracentrifugiranju vzorcev (30.000 rpm, 45 minut, 20°C) (33).

3.2.7. HPLC analiza

S pomočjo tekočinske kromatografije visoke zmogljivosti smo določili koncentracijo RSV v vodni fazi reakcijske zmesi po končani lipolizi. Po ultracentrifugiranju vzorcev (30.000 rpm, 45 minut, 20°C) smo vodno fazo redčili v razmerju 1/10 s 50 % (v/v) raztopino metanola v bidestilirani vodi. Analizo smo izvedli na koloni YMC-Pack ODS-AM (5µm, 250*4.6 mm) pri temperaturi kolone 25°C. Pretok mobilne faze (0,5 % očetna kislina v raztopini metanol:bidestilirana voda = 50:50 (v/v)) smo nastavili na 1 ml/min ter na kolono injicirali 5µl vzorca. Retencijski čas RSV pri teh pogojih je 6,6 minut. RSV smo detektirali z UV detektorjem pri valovni dolžini 303 nm. Koncentracijo RSV v analiziranih vzorcih smo izračunali z uporabo umeritvene premice. Za izdelavo slednje smo pripravili 100 ml standardne raztopine RSV z znano koncentracijo 0,1285 mg/ml, ki smo jo nato redčili v razmerjih 1/10, 1/20, 1/50 ter 1/100 s 50 % (v/v) raztopino metanola v bidestilirani vodi. Iz izmerjenih površin pod vrhovi vzorcev z znanimi koncentracijami RSV smo nato narisali umeritveno krivuljo in izračunali enačbo linearne premice.

Enačba premice:

$$A = 29.176,8990 * c - 4,0350$$

A – površina pod krivuljo;

c – koncentracija v mg/ml

Na koncu smo iz mase dodanega vzorca izračunali teoretično koncentracijo RSV v reakcijski zmesi, ki bi jo dosegli, če se med dispergiranjem formulacije ne bi oborilo nič učinkovine, ter določili odstotek resveratrola, ki je ostal solubiliziran v vodni fazi disperzije. Opisane parametre smo izračunali za vzorec SMES dispergiran v prebavnem pufri (mešanje 2 uri) in vzorec SMES po lipolizi.

Primer izračuna teoretične vsebnosti:

$$✓ c_{\text{teoretična}} = (m_{\text{vzorca}} * 0,1) / V_{\text{reakcijske zmesi}}$$

$$✓ c_{\text{teoretična}} = (207,4 \text{ mg} * 0,1) / 40 \text{ ml} = 0,5185 \text{ mg/ml}$$

Primer izračuna % solubiliziranega RSV:

$$✓ \% = (\text{izmerjena konc. RSV} / \text{teoretična vsebnost RSV}) * 100$$

$$✓ \% = (0,3537 \text{ mg/ml} / 0,5185 \text{ mg/ml}) * 100 = 68,2$$

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. AKTIVNOST PANKREATINA

4.1.1. Določanje aktivnosti pankreatina z maleatnim pufrom pH 7,5

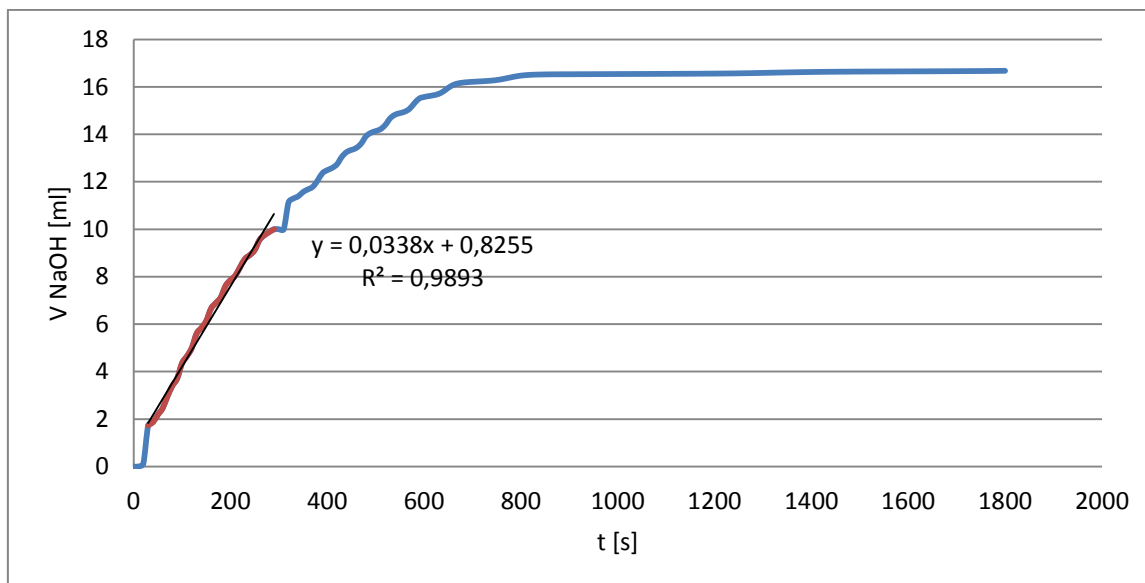
V literaturnih podatkih za določanje obsega lipolize je količina dodanega encima pogosto izražena kot število IU/ml reakcijske zmesi, zato smo raziskovalno delo pričeli z določanjem aktivnosti pankreatina, pri čemer smo kot substrat uporabili tributirin. Tributirin je triglicerid, iz katerega pod vplivom pankreatina nastane diglicerid ter ena prosta maščobna kislina. Reakcijo lipolize smo spremljali 30 minut. Količino in hitrost sproščanja prostih maščobnih kislin iz tributirina smo vrednotili s spremljanjem porabe NaOH, ki je nevtraliziral sproščene maščobne kisline. Povprečno porabo titranta smo izračunali iz krivulje porabe NaOH v odvisnosti od časa. Ker prisotnost diglicerida lahko močno vpliva na potek nadaljnje reakcije, smo za določanje povprečne porabe upoštevali začetni linearni del krivulje (od 1 – 5 minut), kot je prikazano na Sliki 5. Aktivnost pankreatina smo nato izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{aktivnos}[TBU/g] = \frac{\text{ml NaOH} / \text{min} * C(\text{NaOH}) * 1000}{m(\text{pankreatin})[g]}$$

Kjer je $\text{ml NaOH} / \text{min}$ poraba titranta, ki jo določimo iz premice, C predstavlja koncentracijo uporabljenega titranta, m pa je točna masa pankreatina, ki smo ga dodali v reakcijsko zmes. 1 TBU enota predstavlja 1 μmol maščobnih kislin sproščenih v minuti.

Primer izračuna:

- ✓ enačba premice: $y = 0,0338x + 0,8255$
- ✓ povprečna poraba = $0,0338 \text{ ml/s} = 2,028 \text{ ml/min}$
- ✓ $\text{aktivnost } [TBU/g] = \frac{2,028 \text{ ml} / \text{min} * 1 \text{ mol} / \text{l} * 1000}{1 \text{ g}} = 2028 \text{ TBU/g}$



Slika 5: Primer porabe NaOH (v ml) v odvisnosti od časa poteka reakcije (s) pri določanju aktivnosti pankreatina. Za izračun povprečne porabe baze smo uporabili meritve med 30 – 290 s, ki so označene z rdečo barvo.

4.1.1.1. Vpliv razmerja med encimom in substratom na izračunano aktivnost

V začetni fazi raziskav smo vrednotili vpliv razmerja med pankreatinom (encim) in tributirinom (substrat) na rezultat aktivnosti encima. V ta namen smo v reakcijsko posodo dodali raztopino encima (ustrezen alikvot disperzije z vsebnostjo 1 g pankreatina / 5 ml pufru za določanje aktivnosti (20)) in različne količine tributirina (Preglednica V). Kot je razvidno iz preglednice, je z večanjem razmerja v korist substrata naraščala tudi izračunana aktivnost encima kar kaže na to, da substrat še ni prisoten v prebitku. Velik prebitek tributirina je pri tovrstnih reakcijah pomemben, saj je le pri takšnih pogojih aktiven ves prisoten encim in lahko določimo njegovo aktivnost. Pri zadnji meritvi (5.) smo v primerjavi s 4. meritvijo količino substrata in encima zmanjšali za polovico, vendar pa smo ohranili razmerje med njima. Izračunani aktivnosti za oba primera sta zato primerljivi.

Preglednica V: Vpliv izbranih parametrov in reagentov na izračun aktivnosti pankreatina pri posameznem poskusu. Označena vrstica prikazuje spremembe v razmerju med encimom in substratom. Številke 1. – 5. predstavljajo zaporedno številko opravljenega poizkusa.

	1.	2.	3.	4.	5.
substrat (tributirin) [ml]	2,5	2,5	6,0	6,0	3,0
puffer [ml]	20	20	20	20	20
pankreatin [g/ml pufra]*	1/5	0,2/1	0,2/1	1/5	0,5/2,5
razmerje substrat:encim [v:v]	1:2	1:0,4	1:0,17	1:0,83	1:0,83
odstopanje (control band)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
koncentracija NaOH [mol/l]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
povprečna poraba [ml/min]	2,028	1,170	1,746	3,414	1,746
aktivnost [TBU/g encima]	2028	5850	8730	3414	3492

* Vrstica prikazuje maso natehtanega suhega pankreatina ter volumen maleatnega pufra v katerem je pankreatin raztopljen.

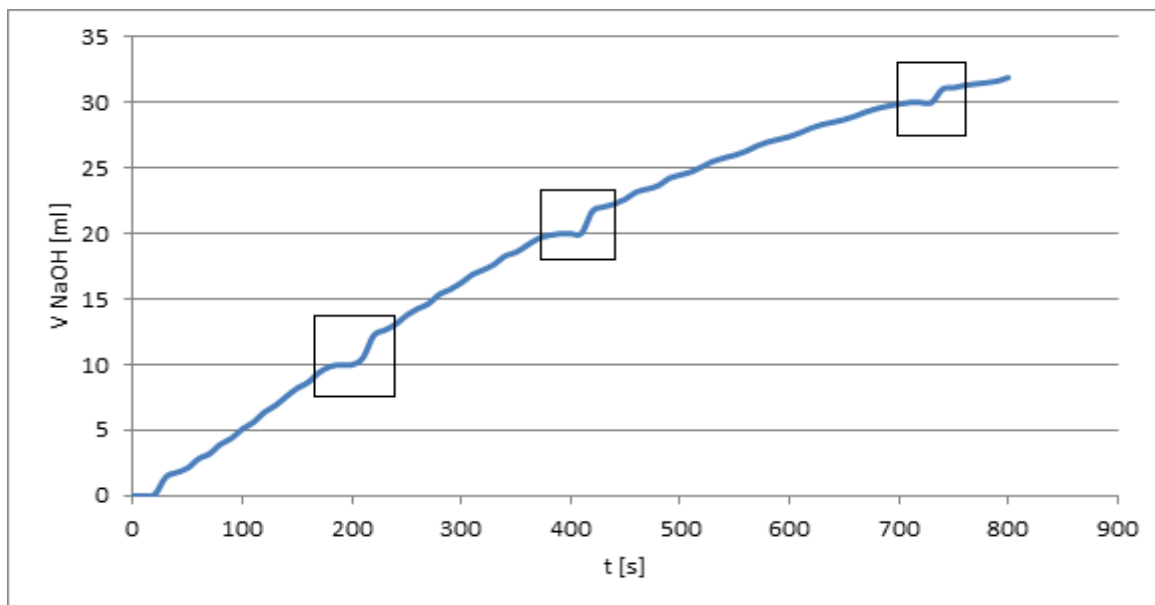
V nadaljnjih poskusih smo s povečevanjem količine tributirina in zmanjševanjem dodanega pankreatina višali razmerje med substratom in encimom, da bi dosegli območje s prebitkom tributirina (Preglednica VI). Kot je razvidno iz preglednice je izračunana aktivnost pankreatina naraščala do 10. meritve, pri kateri smo v reakcijsko zmes dodali 3,0 ml tributirina ter 10 mg pankreatina/1 ml maleatnega pufra za določanje aktivnosti. Pri 11. meritvi smo z dodatnim zmanjšanjem količine pankreatina zaznali tudi znižanje izračunane aktivnosti pankreatina. Na osnovi le-tega sklepamo, da smo v tem primeru prišli v območje prebitka substrata, v katerem je začetna hitrost hidrolize triglicerida odvisna od količine dodanega encima.

Preglednica VI: Vpliv razmerja med dodanim substratom in encimom na izračun aktivnosti pri posameznih primerih. Številke 6. – 11. predstavljajo zaporedno številko opravljenega poizkusa.

	6.	7.	8.	9.	10.	11.
substrat (tributirin) [ml]	3,0	6,0	6,0	9,0	3,0	3,0
puffer [ml]	20	20	20	20	20	20
pankreatin [g/ml pufra]*	0,1/1	0,1/1	0,05/1	0,05/1	0,01/1	0,005/1
odstopanje (control band)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
koncentracija NaOH [mol/l]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
povprečna poraba [ml/min]	0,966	1,242	0,768	0,798	0,204	0,090
aktivnost [TBU/g encima]	9660	12420	15360	15960	20400	18000

* Vrstica prikazuje maso natehtanega suhega pankreatina ter volumen maleatnega pufra v katerem je pankreatin raztopljen.

Med izvajanjem začetnih analiz smo opazili tudi prvo omejitvev same aparature. Titrant se iz večjega vsebnika (temna steklenica) najprej prečrpa v merilno bireto z volumnom 10 ml, iz katere se nato med samo titracijo natančno odmerja v reakcijsko posodo. Ko poraba NaOH v le-tej preseže 10 ml, se mora bireta med analizo ponovno napolniti iz večjega vsebnika. V tem času titracija prostih maščobnih kislin z NaOH ne poteka, zato je polnjenje birete razvidno tudi na krivulji, ki prikazuje odvisnost porabe NaOH od časa titracije (Slika 6). Če je poraba velika in do ponovne polnitve birete pride že kmalu po začetku analize, lahko to bistveno vpliva na končno določitev aktivnosti encima. Da bi se izognili omenjenim težavam, smo pri 10. in 11. meritvi zmanjšali tako količino dodanega tributirina, kot tudi maso pankreatina in s tem končno porabo NaOH znižali pod 10 ml. Znižanje volumna porabe titranta pod 10 ml je smiselno tudi zato, ker dodatek večjega volumna baze povzroči razredčitev prebavnega medija. Slednje ima za posledico tudi znižanje koncentracije žolčnih soli, ki smo jih v nadaljevanju raziskav dodajali v medij, kar lahko vpliva na hitrost reakcije lipolize ter izračun aktivnosti pankreatina.



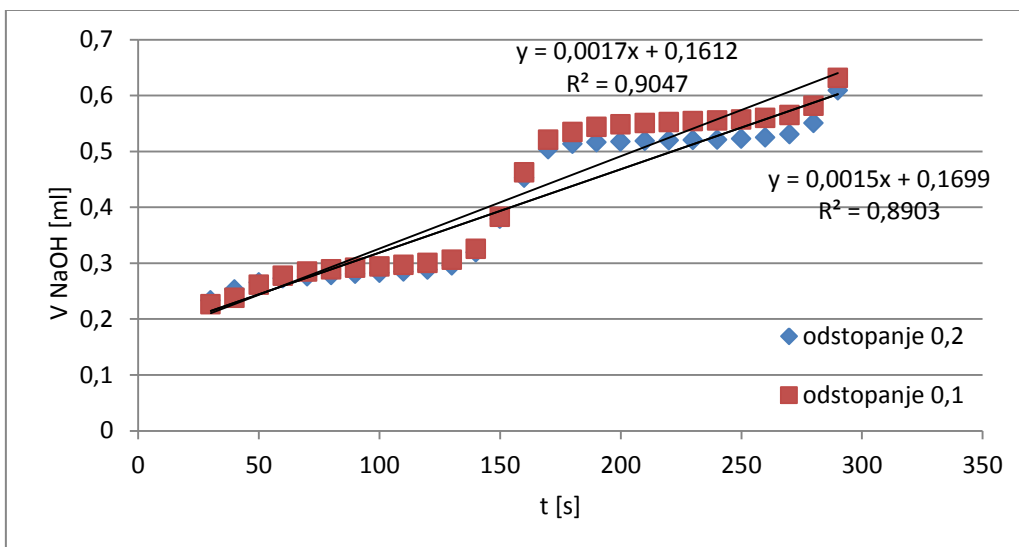
Slika 6: Profil porabe NaOH za 4. meritev. V okvirčkih so označene spremembe na krivulji, do katerih pride zaradi ponovne polnitve birete na vsakih 10 ml.

4.1.1.2. Vpliv dovoljenega največjega odstopanja od nastavljene pH vrednosti na izračunano aktivnost

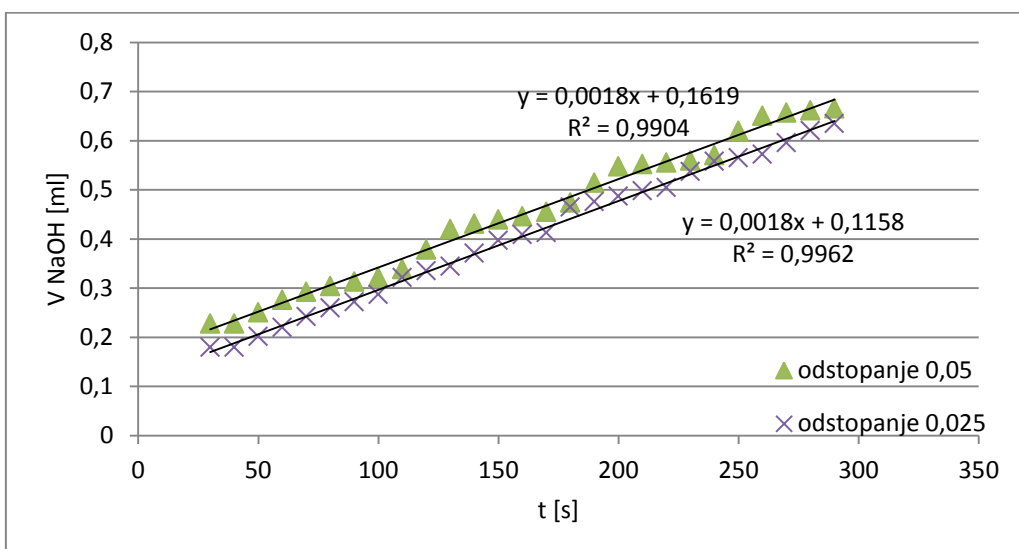
Programska oprema titratorja omogoča spreminjanje večih parametrov za posamezne metode titracije. Pri izvajanju pH-stat metode, pri kateri ves čas analize vzdržujemo konstanten pH v reakcijski posodi, lahko v zavihku *nadzor* (angl.: control) nastavimo želeni pH in dovoljeno največje odstopanje od te vrednosti (angl.: control band). Med potekom reakcije torej vrednost pH ni absolutno konstantna, temveč znotraj določenega intervala niha nad in pod nastavljeno vrednostjo pH. To se odraža tudi na krivulji porabe titranta.

V začetnih preliminarnih poskusih smo v nastavitvah metode opisano največje dovoljeno odstopanje pH nastavili na 0,2 enote. Pri meritvah (10., 11.), kjer smo količine encima in substrata močno zmanjšali, je bil začetni del krivulj odvisnosti porabe NaOH od časa titracije stopničast. Posamezne točke so precej odstopale od linearne premice, ki naj bi ji po pričakovanjih sledile v tem začetnem delu krivulje; koeficient determinacije oz. R^2 je padel pod 0,9. Predvidevali smo, da je slednje povezano z nastavitvijo previsoke vrednosti največjega dovoljenega odstopanja pH od nastavitvene pH vrednosti. S ciljem boljšega ujemanja točk s premico smo zato v nadaljevanju postopoma ožili interval največjega odstopanja pH od nastavitvene vrednosti. Vpliv intervala dovoljenega odstopanja pH od nastavitvene vrednosti smo proučevali na primeru 11 (Preglednica VI). Iz slik (Slike 7-9)

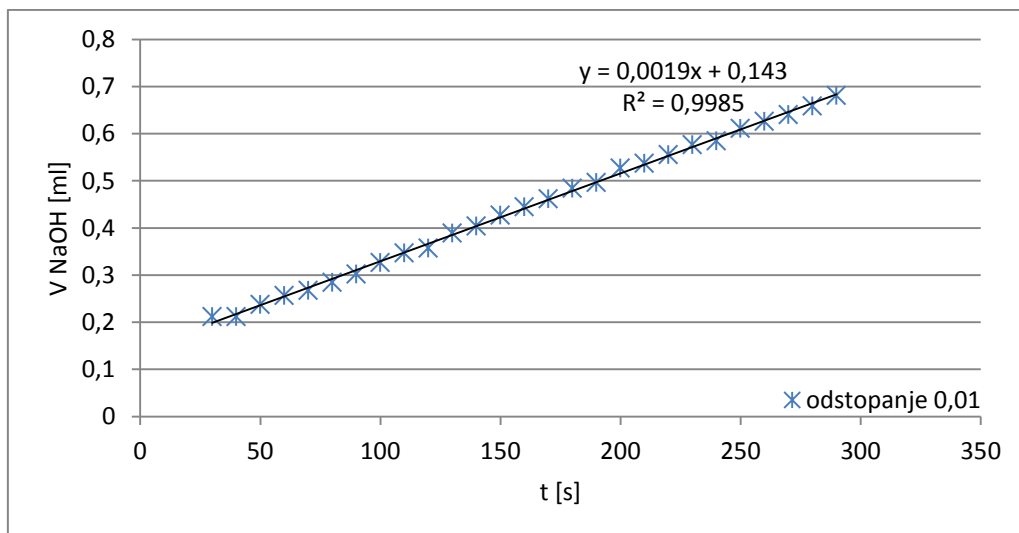
je razvidno, da smo z oženjem omenjenega intervala izboljšali ujemanje točk začetnega dela krivulje z linearno premico. Pri nastavitvi intervala odstopanja na 0,01 je R^2 znašal že 0,9985, kar je statistično dober rezultat, zato smo vse nadaljnje analize izvajali pri tej nastavitvi. Rahla nihanja, ki jih je bilo kljub temu še mogoče opaziti, so najbrž posledica rahle pretitracije ter nekoliko daljšega časa odziva elektrode.



Slika 7: Krivulji porabe NaOH v odvisnosti od časa titracije (s pripadajočima enačbama linearnih premic v časovnem intervalu med 30 in 290 s) za meritev 11 pri različnih nastavitvah največjega dovoljenega odstopanja pH od nastavitvene pH vrednosti (0,2 oz. 0,1 pH enote).



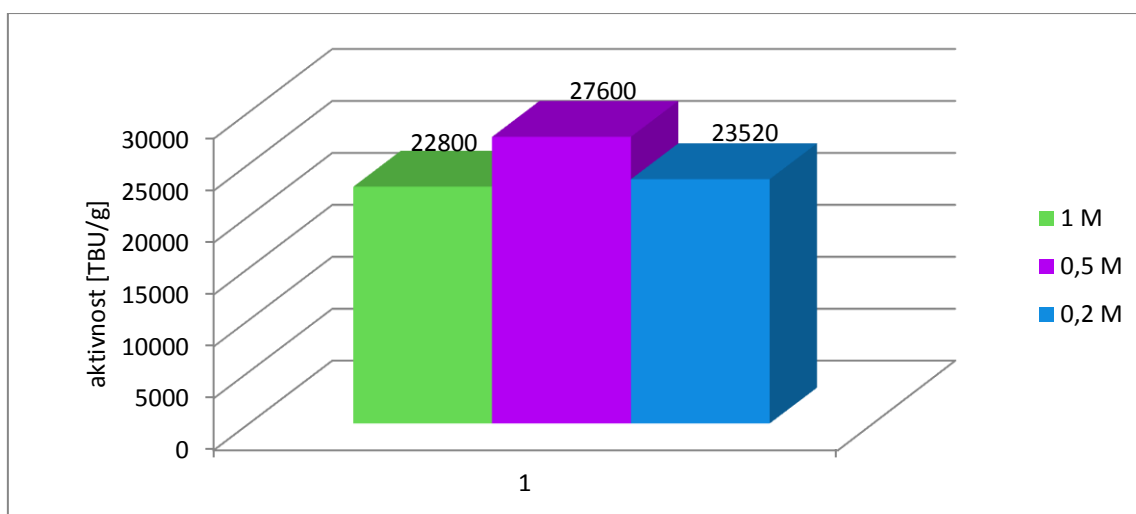
Slika 8: Krivulja porabe NaOH v odvisnosti od časa titracije (s pripadajočima enačbama linearnih premic v časovnem intervalu med 30 in 290 s) za meritev 11. Največje dovoljeno odstopanje pH od nastavitvene pH vrednosti je bilo 0,05 oziroma 0,025 pH enote.



Slika 9: Krivulja porabe NaOH v odvisnosti od časa titracije (s pripadajočima enačbama linearnih premic v časovnem intervalu med 30 in 290 s) za meritev 11. Najbolj linearne meritve z najvišjim koeficientom R^2 smo dobili pri nastavljenem dovoljenem odstopanju 0,01 pH enote, kar je najnižja vrednost, ki jo dovoljuje programska oprema.

4.1.1.3. Vpliv koncentracije titranta (NaOH) na izračunano aktivnost

Za določanje obsega lipolize smo v literaturi zasledili uporabo različnih koncentracij NaOH (16,18,20). V nadaljevanju smo zato testirali vpliv treh različnih koncentracij NaOH na porabo le-tega in posledično na izračun aktivnosti encima (Slika 10). Iz slike je razvidno, da se izračunane aktivnosti med seboj rahlo razlikujejo, zato je priporočljivo za določanje aktivnosti uporabiti enako koncentracijo tiranta kot za določanje obsega lipolize.



Slika 10: Vpliv koncentracije NaOH na aktivnost pankreatina; aktivnosti so bile določene za vzorec 11, pri dovoljenem odstopanju pH 0,01.

4.1.2. Določanje aktivnosti pankreatina z maleatnim pufrom pH 7,5 z Na-deoksiholatom

Po literaturnih podatkih aktivnost lipaz določajo v pufrih z ali brez dodatka žolčnih soli. Zanimalo nas je, kako dodatek le-teh vpliva na določitev aktivnosti lipaze. V ta namen, smo poleg predhodno uporabljenih komponent v pufrno raztopino dodali Na-deoksiholat, ki spada v skupino žolčnih soli. Začetno meritev smo izvedli pod pogoji, ki smo jih kot optimalne določili s pufrom brez dodatka žolčnih soli, nato pa smo razmerje med substratom in encimom še dodatno povečali v prid substrata z dodatkom manjšega volumna raztopine pankreatina. V reakcijsko posodo smo torej dodali 3,0 ml tributirina, 20 ml puфра z Na-deoksiholatom in različne volumnne raztopine encima, kot titrant pa smo uporabili 1 M NaOH (Preglednica VII).

Preglednica VII: Vpliv izbranih parametrov in reagentov na izračun aktivnosti pankreatina pri posameznem poskusu. Označena vrstica prikazuje spremembe v volumnu dodane raztopine encima. S številkami I – IV so predstavljeni zaporedni poizkusi določanja aktivnosti.

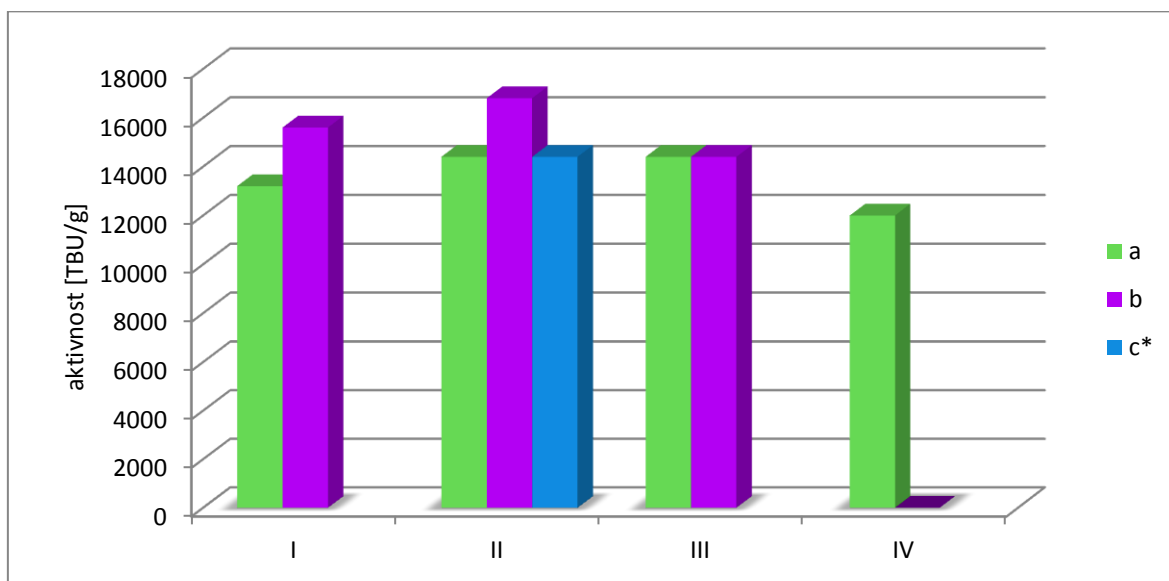
	I	II	III	IV
substrat (tributirin) [ml]	3,0	3,0	3,0	3,0
pufer [ml]	20	20	20	20
pankreatin * [g/ml puфра]	0,005/1 (1000 μ l)	0,005/1 (500 μ l)	0,005/1 (250 μ l)	0,005/1 (100 μ l)
odstopanje (control band)	0,01	0,01	0,01	0,01

* Vrstica prikazuje maso natehtanega suhega pankreatina ter volumen maleatnega puфра v katerem je pankreatin raztopljen. V oklepaju so predstavljeni volumni raztopine pankreatina, ki smo jih dodali v reakcijsko zmes.

Meritev z vsakim volumnom encima smo izvedli v dveh paralelkah. Iz Slike 11 je razvidno, da dodatek različnih volumnov raztopine pankreatina ni bistveno vplival na izračunane aktivnosti tega encima. To potrjuje, da smo v območju z velikim prebitkom substrata, kjer je v začetku reakcije aktiven ves prisoten encim. V primerjavi z predhodnimi meritvami, kjer smo uporabili pufer brez Na-deoksiholata (Preglednica VI), smo izmerili nekoliko nižjo porabo titranta in posledično aktivnost encima. Takšni rezultati potrjujejo dejstvo, da žolčne soli v visokih koncentracijah preprečujejo vezavo pankreatina na substrat in s tem inhibirajo njegovo aktivnost (22).

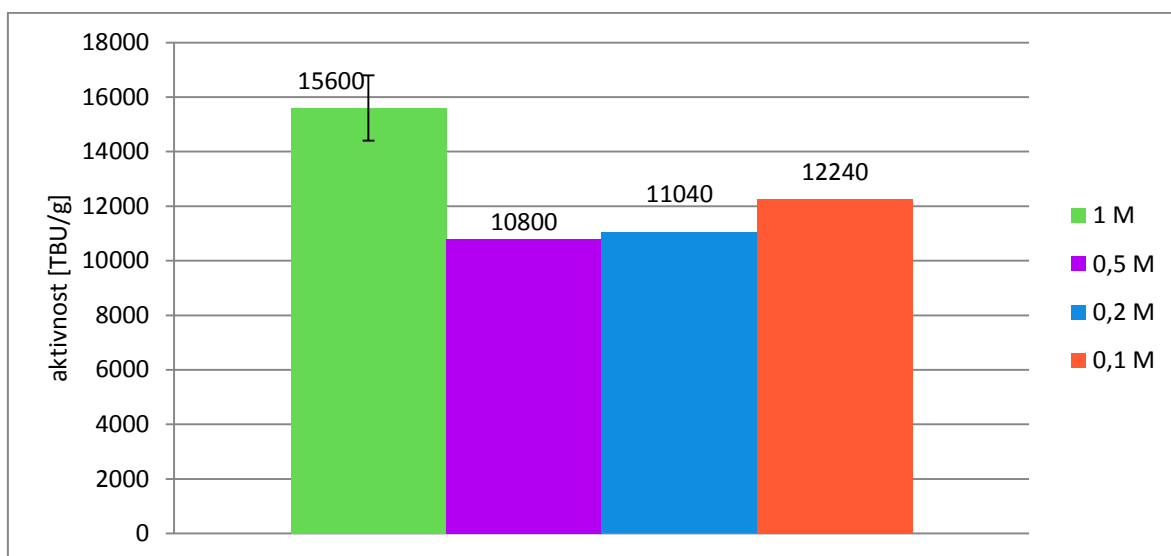
Na-deoksiholat v raztopini tvori micele, kar ima za posledico motno-belkast videz pufra. Med centrifugiranjem pripravljene raztopine pankreatina v puftru netopni delci niso dobro sedimentirali, zato je bil tudi supernatant nekoliko moten. V primeru vzorca IIc* smo zato raztopino encima centrifugirali 15 minut pri 5°C, obrate pa smo povečali na 9300 x g. Iz primerjave meritev IIa (moten supernatant po centrifugiranju) in IIc* (bister supernatant po centrifugiranju) na sliki 11 je razvidno, da se rezultata ne razlikujeta, zato sklepamo, da prisotnost žolčnih kislin v raztopini encima ne vpliva na aktivnost le-tega.

Pri vzorcu IV smo v reakcijsko posodo dodali najmanjšo količino encima, kar pomeni, da se je med reakcijo sprostilo malo maščobnih kislin. Že nizek volumen dodatka 1M NaOH je zato pH v reakcijski posodi zvišal precej nad nastavitveno pH vrednost. Zaradi malo sproščenih maščobnih kislin je pH vrednost v tako pretitriranem mediju nato padala zelo počasi. Ker dolgo časa ni prišlo do spremembe v volumnu porabe NaOH, se je metoda samodejno prekinila po 300 s. Do konca je potekla samo prva paralelka. Tako majhni volumni encima torej niso primerni za analizo oz. bi bilo za uspešno izvedbo poskusa potrebno prirediti tudi količino oz. koncentracijo drugih reagentov in nastavitve metode.



Slika 11: Primerjava izračunane aktivnosti za meritve I - IV. Vsako meritev smo izvedli v dveh paralelkah, modri stolpec pri meritvi II pa predstavlja rezultat, kjer smo raztopino pankreatina centrifugirali pri višjih obratih. Pri vzorcu IV se je, zaradi majhne količine dodanega encima, v drugi paralelki metoda samodejno ustavila.

V zadnjem delu vrednotenja aktivnosti pankreatina smo na vzorcu II (Preglednica VII) proučevali vpliv koncentracije NaOH na izračunano aktivnost encima. V ta namen smo izbrali koncentracije NaOH (0,5 mol/l, 0,2 mol/l ter 0,1 mol/l), ki se po literaturnih podatkih najpogosteje uporabljajo za določanje aktivnosti lipaz ter obsega lipolize (16,18,20). Aktivnosti so bile nekoliko nižje, kot pri meritvi z 1M NaOH, med seboj pa so se le malo razlikovale (Slika 12). Sprememba koncentracije titranta tudi ni vplivala na začetno linearnost krivulje porabe NaOH v odvisnosti od časa, ki je pomembna za določitev povprečne porabe titranta in izračun aktivnosti encima.



Slika 12: Aktivnost pankreatina določena na vzorcu II z uporabo NaOH različnih koncentracij.

4.2. DOLOČANJE OBSEGA LIPOLIZE

Pri izvedbi metode za določanje *in vitro* lipolize smo želeli čim bolj posnemati metode, ki so opisane v strokovni literaturi (uporaba enakih oz. podobnih reagentov in postopkov izvedbe poskusa). V prebavni medij smo tako dodali žolčne soli (4 mM) in fosfatidilholin (1 mM) v razmerju 4:1, kar posnema pogoje v prebavnem traktu na tešče. V tako pripravljenem mediju smo nato dispergirali približno 200 mg vzorca posameznega lipida ali SMES ter reakcijo lipolize sprožili z dodatkom točno določene količine raztopine pankreatina (slednjo smo izračunali na podlagi rezultatov določanja aktivnosti encima). Končni volumen reakcijske zmesi je znašal 40 ml. Za predpripravo raztopine pankreatina, ki smo jo nato centrifugirali po ustaljenem postopku, smo uporabili maleatni pufer pH 7,5 za določanje aktivnosti encima. Za posamezne pogoje metode smo izvedli tudi slepi

poskus (brez dodatka lipidov v reakcijsko posodo). Pri izračunu količine dodanega pankreatina smo upoštevali aktivnost le-tega, ki smo jo izmerili pri enakih pogojih, kot smo jih uporabili za test *in vitro* lipolize.

Primer izračuna volumna pankreatina:

- ✓ aktivnost = 27600 TBU/g pankreatina (določena pri: 0,5 M NaOH, 0,01 interval odstopanja za vzorec 11)
- ✓ potrebna aktivnost v reakcijski zmesi = 1000 IU/ml reakcijske zmesi = 40000 IU/ 40 ml
- ✓ Izračun zatehte encima:

1 g	27600 TBU
x g	40000 TBU
x =	1,45 g suhega pankreatina	
- ✓ Izračun potrebnega volumna raztopine pankreatina:

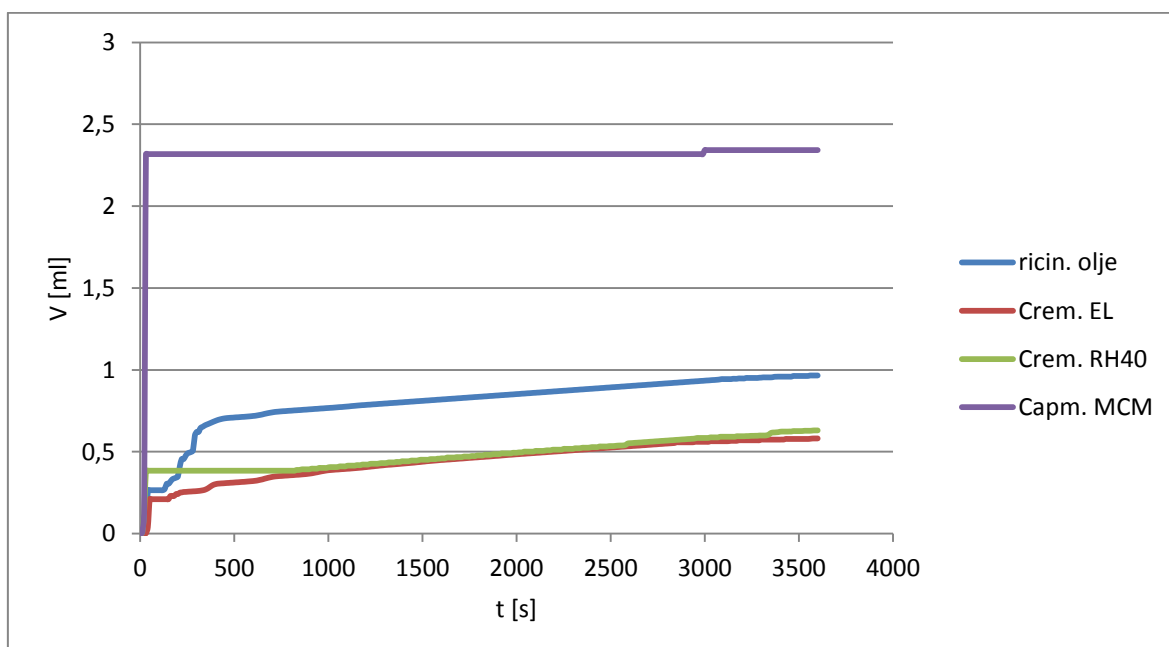
pripravljena raztopina encima: 1 g suhega pankreatina	5 ml pufra
	1,45 g
	y =	7,25 ml pufra
- ✓ za eno meritev smo torej potrebovali 1,45 g pankreatina, ki smo ga raztopili v 7,25 ml maleatnega pufra pH 7,5 (brez dodatka Na-deoksiholata).

Na začetku ter ob vsaki spremembi pogojev smo naredili tudi slepo meritev. Pri slepi meritvi smo v reakcijski posodi zmešali prebavni medij in raztopino pankreatina (brez dodatka lipidov) ter izvedli test *in vitro* lipolize. Porabo NaOH pri slepi meritvi smo nato odšteli od porabe NaOH pri meritvah vzorcev. S tem smo se izognili napaki, do katere pride zaradi morebitnega padca vrednosti pH v reakcijski zmesi, ki je lahko posledica adsorpcije ogljikovega dioksida iz atmosfere in lipolize lecitina iz pufra. (35)

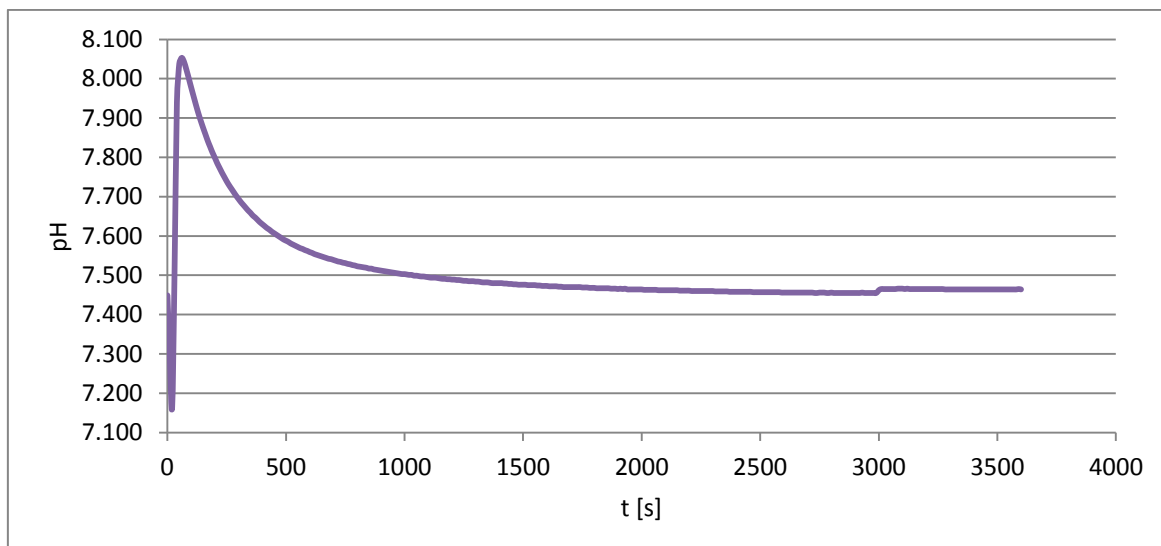
4.2.1. Lipoliza posameznih komponent

Reakcijo lipolize za vsako posamezno komponento smo pustili potekati 60 minut, za vzdrževanje nastavljenih vrednosti pH 7,5 pa smo uporabili 0,5 M NaOH (nastavitve metode so opisane v Preglednici IV). Obseg lipolize za posamezno komponento smo nato izračunali iz množine porabljene NaOH, ki je enaka množini sproščenih maščobnih kislin med lipolizo. Na Sliki 13 so prikazane krivulje porabe titranta za vse štiri komponente. V skladu s pričakovanji, smo največjo porabo NaOH izmerili pri Capmul-u MCM, ki spada

med srednje-dolgoverižne trigliceride in je zelo hitro prebavljiv. Pri lipolizi Capmul-a MCM krivulja porabe NaOH najprej hitro narašča in hitro doseže plato. Slednje je posledica velike pretitracije v začetnem delu poskusa, v katerem se je večina maščobnih kislin hitro sprostila, kar je povzročilo (pre)hitro dodajanje NaOH in dvig pH vrednosti precej nad nastavitveno vrednost. V nadaljevanju reakcije je pH počasi padal, vendar je nastavljeno vrednost dosegel šele v zadnjih 10 minutah reakcije, ko se maščobne kisline skoraj niso več sproščale, zato je bil dodatek baze v tem delu poskusa le minimalen (Slika 13). Spreminjanje pH vrednosti reakcijske zmesi s Capmul-om MCM je prikazano na Sliki 14. Tudi ricinusovo olje spada med trigliceride, ki se hitro prebavljajo, je pa za razliko od Capmul-a MCM sestavljeni iz dolgoverižnih maščobnih kislin. Na krivulji porabe NaOH lahko v tem primeru vidimo začetni strmi del, kjer se je sprostila večina maščobnih kislin, nato je poraba le še rahlo naraščala. Tudi pri ricinusovem olju je v začetku prišlo do rahle pretitracije, ki pa ni bila tako visoka kot pri Capmul-u MCM. Polioksietilirana derivata ricinovega olja Cremophor EL in Cremophor RH 40 sta slabše prebavljiva, kar je potrdila tudi nizka poraba NaOH med reakcijo. Vendar pa je nižja poraba lahko tudi posledica manjšega števila, v vzorcu prisotnih, maščobnih kislin, kot pri enaki masi čistega ricinusovega olja.

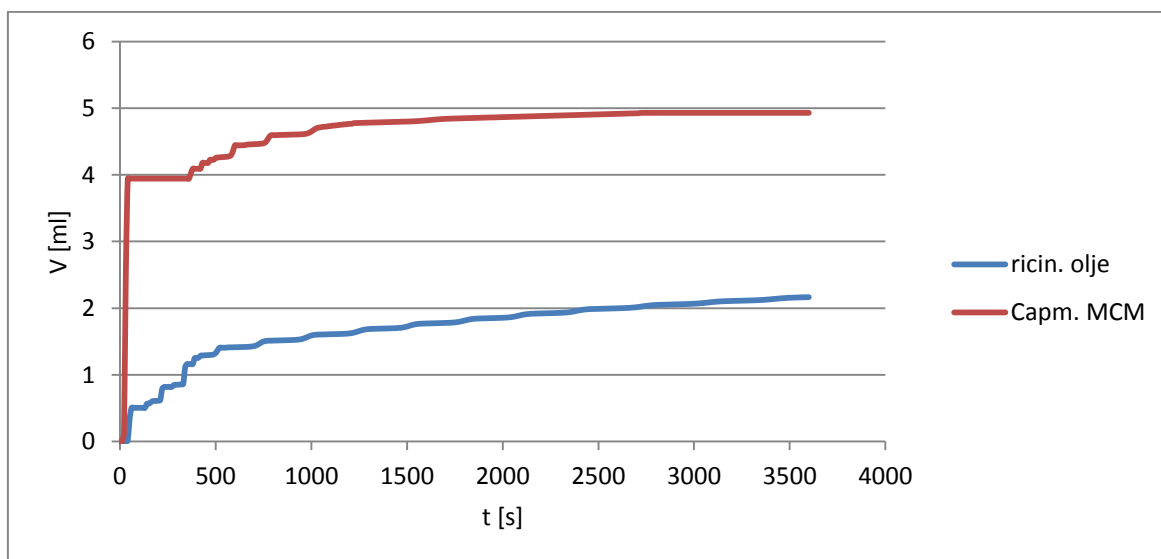


Slika 13: Krivulja porabe 0,5M NaOH v odvisnosti od časa za vsako posamezno komponento lipidnega sistema.



Slika 14: Spreminjanje vrednosti pH med celotno reakcijo lipolize za Capmul MCM.

Za oba triglicerida, pri lipolizi katerih se večina maščobnih kislin sprosti v zelo kratkem času, smo analizo izvedli še z 0,2 M NaOH (Slika 15). S tem smo se poskušali izogniti začetni pretitraciji medija, ki smo jo opazili pri uporabi višje koncentracije titranta. Poraba NaOH pri lipolizi Capmul-a MCM je v začetku ponovno močno narasla, v nadaljevanju (med 40s in 360s poskusa) je bila konstanta, nato pa je poraba počasi narašča do približno 45. minute poskusa. Iz opisanega sklepamo, da je pri Capmul-u MCM tudi tokrat prišlo do manjše pretitracije v začetni fazi poskusa, ki pa je bila bistveno manj izražena kot pri titraciji z 0,5M NaOH. Pri ricinusovem olju pretitracije skorajda nismo opazili, saj krivulja v začetnem delu ne narašča linearno.



Slika 15: Krivulja porabe 0,2m NaOH v odvisnosti od časa lipolize ricinusovega olja in Capmul-a MCM.

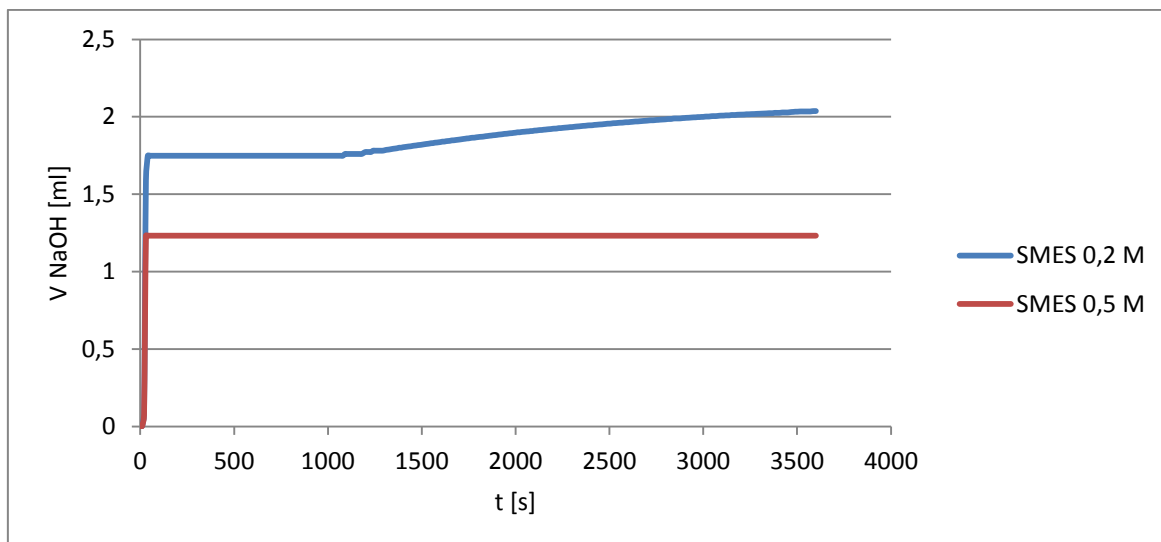
4.2.2. Lipoliza SMES

Test *in vitro* lipolize smo izvedli tudi za na lipidih osnovan sistem iz razreda IIIb (SMES), ki smo ga pripravili iz vseh štirih predhodno testiranih komponent. Za prvo analizo smo kot titrant uporabili bolj koncentrirano 0,5 M NaOH (Slika 16). Krivulja porabe NaOH je bila zelo podobna krivulji porabe za Capmul MCM, saj je po začetnem hitrem dvigu volumen porabe NaOH ostal konstanten do konca reakcije. Tudi tu je v začetni fazi reakcije prišlo do pretitracije, kjer se je vrednost pH močno dvignila, količina nadalje sproščenih maščobnih kislin pa do konca analize ni zadostovala za znižanje pH na nastavljeno pH vrednost 7,5. Tudi v primeru titracije reakcijske zmesi z 0,2 M NaOH je poraba slednjega v začetni fazi poskusa zelo visoka in pride do pretitracije, vendar začne poraba NaOH po 17. minuti poskusa ponovno počasi naraščati (Slika 16). Uporaba baze z nižjo koncentracijo je torej primernejša za analizo izdelanega SMES, saj je titrator v tem primeru lažje vzdrževal nastavljeno pH vrednost. Zavedati pa se moramo, da rezultati še vedno niso idealni.

Iz porabe NaOH smo izračunali tudi količino sproščenih maščobnih kislin.

- ✓ $n(\text{NaOH}) = n(\text{MK})$
- ✓ $n(\text{MK}) = C(\text{NaOH}) * (V(\text{NaOH}) - V_{\text{sl.}}) = 0,5 \text{ mol/l} * (1,233 \text{ ml} - 0,206 \text{ ml})$
- $n(\text{MK}) = 5,13 * 10^{-4} \text{ mol} = 513 \text{ } \mu\text{mol}$

V preglednici VIII je prikazana povprečna količina sproščenih maščobnih kislin za obe koncentraciji NaOH. Glede na to, da naj bi se iz SMES v obeh primerih sprostila enaka količina prostih maščobnih kislin, smo pričakovali podobne rezultate porabe NaOH. V našem primeru je razlika med rezultatoma velika, kar je verjetno posledica napake zaradi pretitracije. Dodatek titranta je bil pri višji koncentraciji prevelik, zato smo pri izračunu sproščenih maščobnih kislin dobili previsoko vrednost.



Slika 16: Krivulja porabe 0,2M in 0,5M NaOH v odvisnosti od časa za SMES brez RSV.

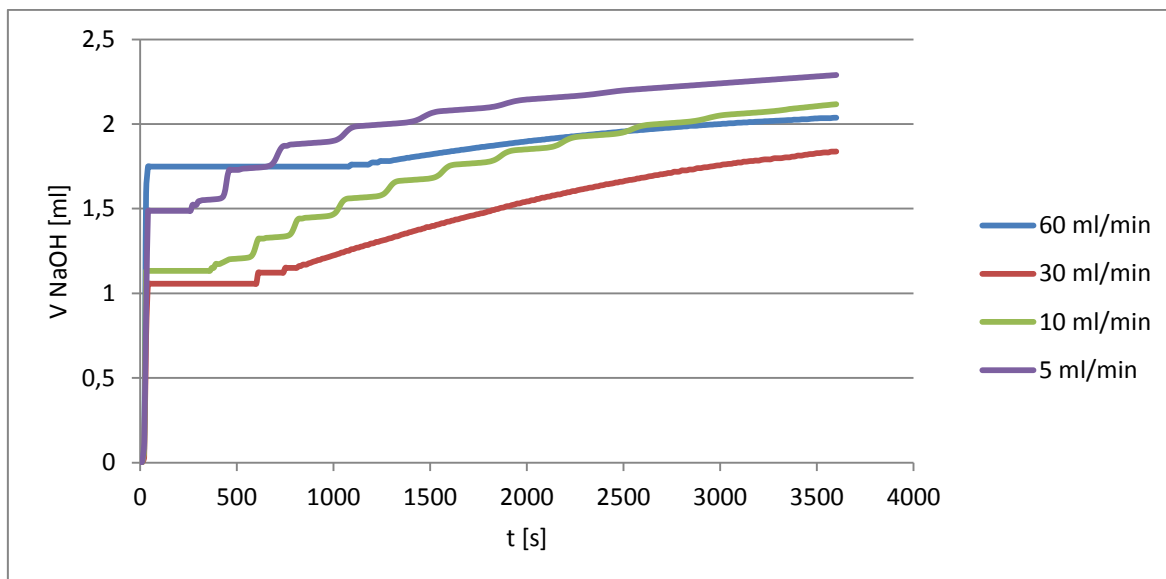
Preglednica VIII: Tabela prikazuje izračunane količine sproščenih maščobnih kislin (μmol) iz SMES pri titraciji reakcijske zmesi z 0,2M oziroma 0,5M NaOH po 60 minutah lipolize. Prikazani so izračuni za dve meritvi ter povprečna vrednost za posamezno koncentracijo titranta.

	0,5 M NaOH	0,2 M NaOH
1. meritev [μmol]	463	338
2. meritev [μmol]	563	109
povprečje sproščenih MK [μmol]	513	224

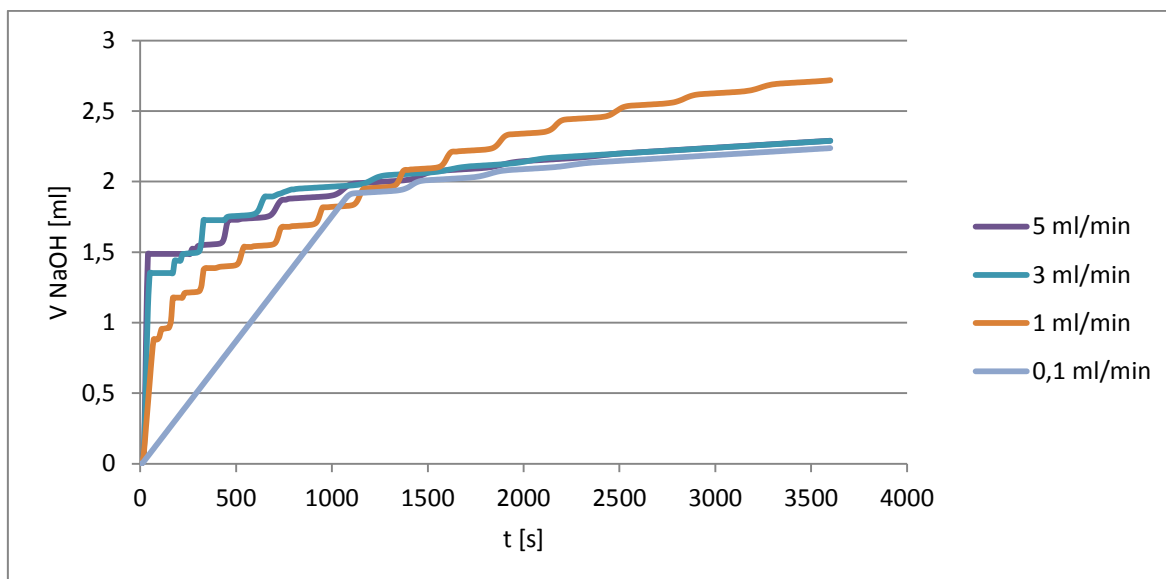
4.2.3. Odvisnost lipolize od nastavljene največje hitrosti dodajanja titranta

Med parametri v programu za pH-stat metodo, ki jih lahko spreminjamo, najdemo tudi minimalni ter maksimalni pretok za dodajanje titranta v reakcijsko posodo. Ker se tudi z uporabo nižje koncentracije titranta nismo mogli popolnoma izogniti prevelikemu dvigu pH vrednosti reakcijske zmesi, smo v nadaljevanju postopoma zmanjševali največjo hitrost dodajanja NaOH med titracijo. V vseh predhodnih meritvah je bila največja hitrost dodajanja titranta nastavljena na 60 ml/min, kar je najvišji pretok, ki ga program še dopušča. S ciljem čim nižje pretitracije smo poskus izvajali z 0,2 M NaOH, kot lipidni vzorec pa smo uporabili SMES brez vgrajene ZU. Ostale nastavitve so ostale enake kot pri prejšnjih testiranjih lipolize (60 min, odstopanje od nastavitvene pH vrednosti za 0,01 enote). Iz krivulj porabe NaOH v odvisnosti od časa (slika 17) je razvidno, da je nižanje

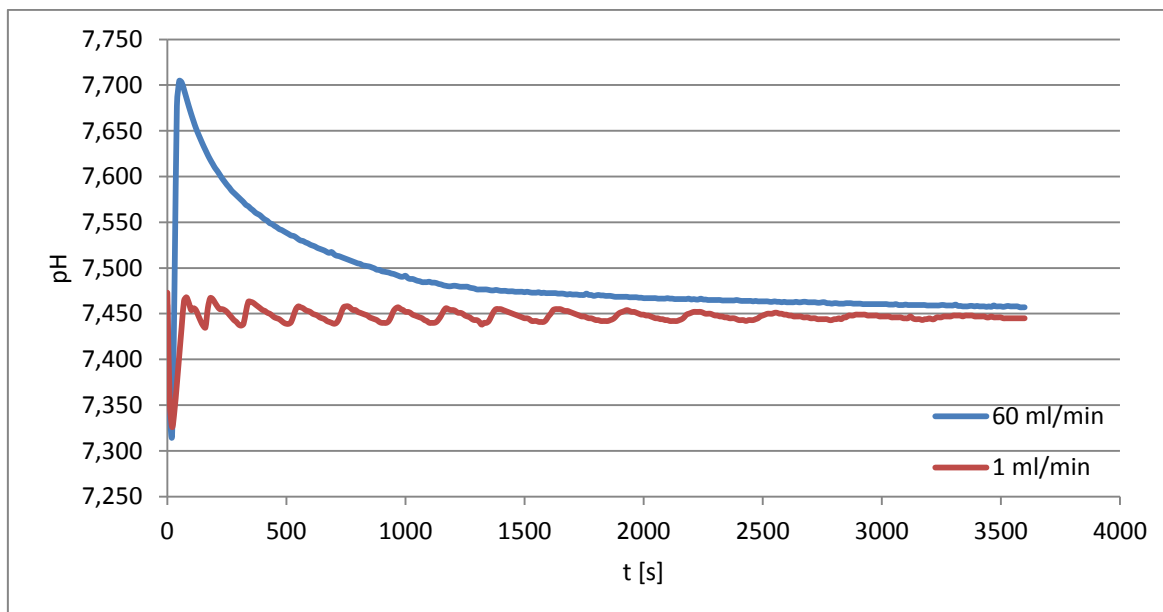
pretoka titranta od 60 ml/min do 5 ml/min vplivalo na naraščanje celokupne porabe le-tega, medtem ko je bila začetna pretitracija (začetni dvig pH vrednosti nad 7,5) pri nižjih hitrostih dovajanja titranta manj izrazit. Podobni rezultati so razvidni tudi iz slike 18, na kateri je prikazana poraba NaOH v odvisnosti od časa lipolize, pri titraciji z največjo hitrostjo dovajanja NaOH od 5 ml/min do 0,1 ml/min. Odstopajo rezultati, ki smo jih pridobili s titracijo zmesi z najnižjo hitrostjo dovajanja NaOH (0,1 ml/min). V tem primerju je poraba NaOH v začetku strmo linearno naraščala, kar pomeni, da so proste maščobne kisline nastajale hitreje od dodajanja NaOH. Ustrezen pH (tj. nastavitveno pH vrednost – 7,5) smo dosegli šele po 17 minutah; v tej časovni točki se je hitrost dodajanja baze nato postopoma zmanjšala. Celokupni volumen dodane NaOH je v tem primeru sicer primerljiv s titracijo zmesi z največjo hitrostjo dodajanja titranta 3 ml/min ter 5 ml/min, vendar tako nizka hitrost dovajanja NaOH očitno ni primerna, saj v začetnem delu lipolize ne uspe vzdrževati ustrezne vrednosti pH. V prvih minutah reakcije je namreč potreba po NaOH najvišja, saj se takrat sprosti največ prostih maščobnih kislin. Najbolj natančno vzdrževanje nastavljenih pH vrednosti v reakcijski zmesi smo dosegli s titracijo z maksimalno hitrostjo dovajanja NaOH 1 ml/min; v tem primeru je bil dodatek NaOH v začetku dovolj hiter, vendar pa klub temu ni prišlo do pretitracije (Slika 18) in dviga pH vrednosti nad 7,5. V vseh nadaljnjih meritvah smo zato nastavili maksimalni pretok NaOH na 1 ml/min. Na Sliki 19 je prikazano spreminjanje pH vrednosti reakcijske zmesi med reakcijo, pri kateri je prišlo do pretitracije (max. pretok 60 ml/min), in reakcijo, pri kateri se je pH vzdrževal na nastavitveni vrednosti 7,5 (max. pretok 1 ml/min).



Slika 17: Krivulje porabe 0,2M NaOH v odvisnosti od časa titracije reakcijske zmesi z največjo hitrostjo dovajanja titranta 60, 30, 10 oz. 5 ml/min za vzorec SMES.



Slika 18: Krivulje porabe 0,2M NaOH v odvisnosti od časa titracije reakcijske zmesi z največjo hitrostjo dodajanja titranta 5, 3, 1 oz. 0,1 ml/min za vzorec SMES.

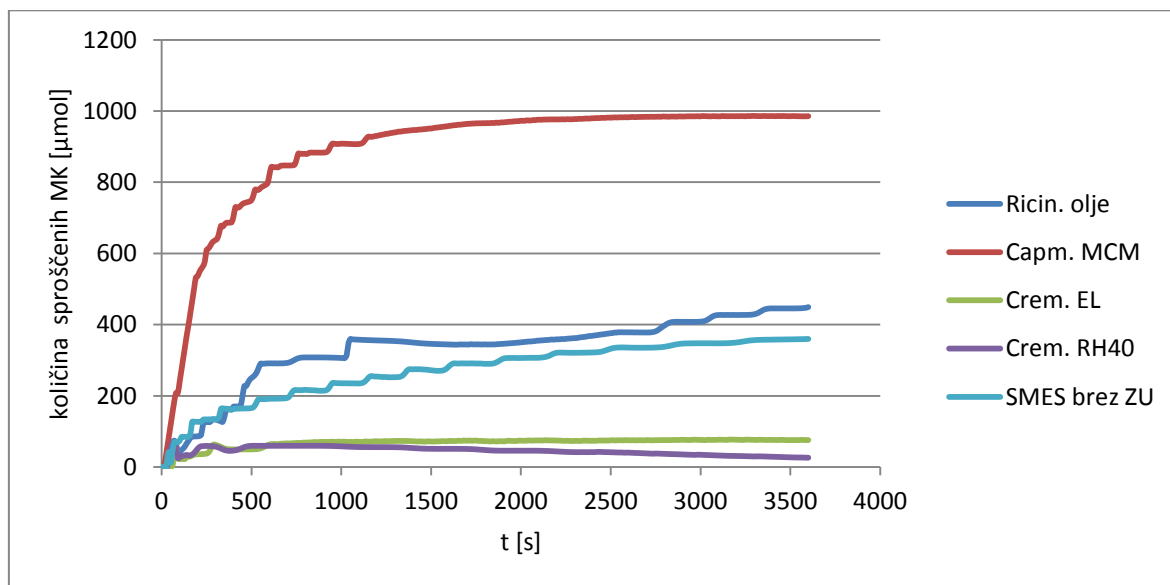


Slika 19: Spreminjanje pH vrednosti reakcijske zmesi med procesom lipolize. Prikazana je razlika med pretitracijo, ki je potekla pri nevtraliziranju prostih maščobnih kislin z NaOH pri dovajanju slednjega z največjo hitrostjo 60 ml/min, ter optimalno titracijo zmesi z največjo hitrostjo dovajanja NaOH 1 ml/min, kjer se pH ni dvignil nad 7,5. Kot vzorec smo uporabili samo-mikroemulgirajoči sistem.

4.2.4. Obseg lipolize posameznih komponent in SMES

V nadaljevanju smo z nastavitvijo optimalnih parametrov metode izvedli test *in vitro* lipolize za štiri komponente in iz njih pripravljen SMES. Reakcijo smo tako izvajali 60 minut, kot titrant smo uporabili 0,2 M NaOH, dovoljeno odstopanje od pH je bilo 0,01 pH enote, največja hitrost dovajanja titranta pa 1 ml/min. Pod istimi pogoji smo določili tudi porabo baze za slepi vzorec, ki smo jo nato odšteli od porabe za posamezne komponente. Na Sliki 20, ki prikazuje količino sproščenih maščobnih kislin med reakcijo lipolize, lahko vidimo, da je lipoliza najhitreje potekala pri mešanem srednjedolgoverižnem gliceridu Capmul-u MCM, saj ima krivulja na začetku najbolj strm naklon. Najmanj maščobnih kislin se je sprostil iz obeh amfifilnih derivatov ricinusovega olja (Cremophor EL ter RH 40), kar je tudi v skladu z literaturnimi podatki (34). Krivulji porabe NaOH sta sprva rahlo naraščali, nato pa že v kratkem času dosegli plato. Količina sproščenih maščobnih kislin je na Sliki 20 prikazana tudi za lipidni sistem, ki je zmes navedenih štirih komponent. Lipoliza slednjega v primerjavi s posameznimi komponentami poteka nekoliko počasneje; krivulja sproščanja prostih maščobnih kislin v

odvisnosti od časa se postopoma izravna šele proti koncu analize, vendar v 60 minutah ne doseže platoja.



Slika 20: Količina sproščenih maščobnih kislin (μmol) v odvisnosti od časa lipolize vzorcev posameznih komponent in iz njih pripravljene na lipidih osnovanega sistema - SMES.

Teoretično količino prostih maščobnih kislin, ki bi se lahko sprostile iz lipidnih vzorcev, smo izračunali s pomočjo molske mase komponent in mase natehtanega vzorca. Pri izračunu smo se zgledovali po podatkih iz doktorske disertacije (Song L., 2011), kjer so upoštevali, da se iz 1 mola vzorca povprečno sprostita 2 mola maščobnih kislin (17).

Primer izračuna teoretičnih sproščenih MK: (17)

$$\checkmark \quad n \text{ MK} = \frac{m(\text{vzorca})}{M(\text{vzorca})} * 2 = \frac{0,205 \text{ g}}{932 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 2$$

$$n \text{ MK} = 0,00044 \text{ mol} = 440 \mu\text{mol}$$

Kot je razvidno iz Preglednice VIII, smo najvišjo stopnjo hidrolize dosegli pri dolgoverižnih trigliceridih v ricinusovem olju, kjer je izračunani obseg lipolize dosegel skoraj 100 %. Ricinusovo olje torej skupaj s Capmul-om MCM, pri katerem se je sprostito približno 70 % maščobnih kislin, predstavlja hitro prebavljiv del lipidnega sistema. Pri obeh polioksietilenskih derivatih ricinovega olja je bil obseg hidrolize precej manjši in se je posledično sprostito manj prostih maščobnih kislin, kar smo lahko razbrali že iz nizke porabe NaOH. Iz Cremophor-a EL se je v 60 minutah reakcije tako sprostil nekaj manj kot polovica teoretično izračunanih maščobnih kislin, medtem ko je pri Cremophor-u RH40 hidroliza dosegla le dobrih 17 %. Podobne rezultate lahko zasledimo tudi literaturi (Arnold

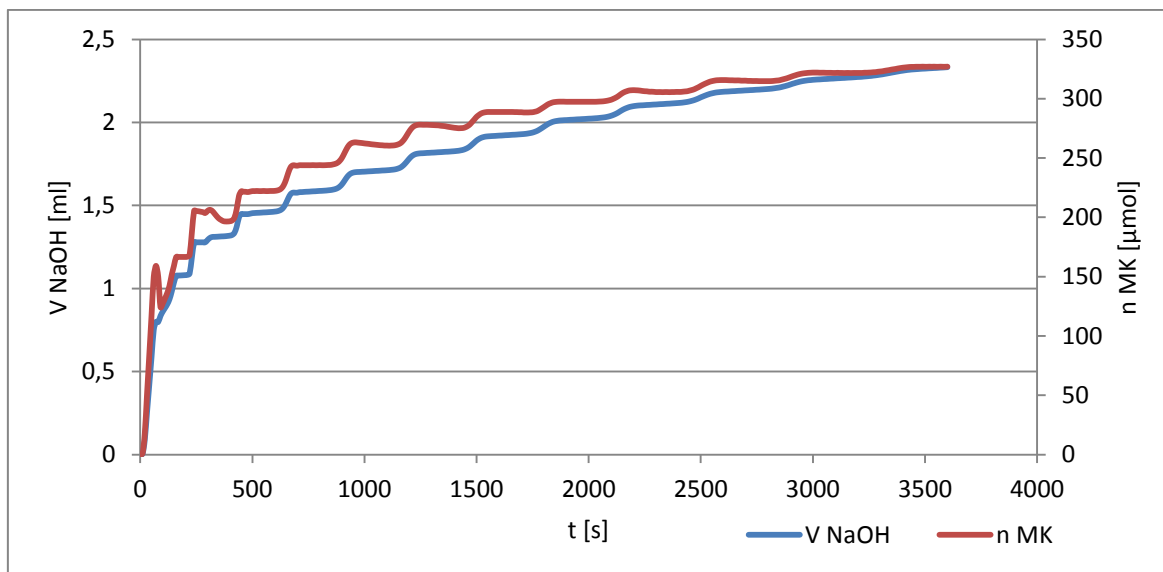
et al.), kjer so med drugimi testirali tudi nekatere od naših lipidnih komponent (36). Do razlik v obsegu lipolize med preučevanimi lipidnimi komponentami lahko pride zaradi različno dostopnih estrski vezi ter rahle inhibicije encima pod vplivom nekaterih komponent ali produktov lipolize (17). Pri analizi lipidnega sistema (SMES), izdelanega iz omenjenih komponent, smo dobili dokaj visok odstotek obsega lipolize, iz česar lahko sklepamo, da se naš sistem pod vplivom prebavnih encimov dobro prebavlja. Pridobljeni rezultat potrjujejo naša pričakovanja, saj SMES vsebuje velik delež trigliceridnih komponent.

Preglednica IX: Primerjava izračunanih (teoretičnih) količin sproščenih maščobnih kislin iz izbranih vzorcev (posamezne komponente in iz njih pripravljen SMES) in izmerjenih rezultatov, pridobljenih s testom *in vitro* lipolize. Teoretične vrednosti smo izračunali s pomočjo znane mase vzorca in povprečne molske mase komponent.

	Ricinusovo olje	Capmul MCM	Cremophor EL	Cremophor RH 40	SMES
m vzorca [g]	0,210	0,214	0,205	0,201	0,206
M [g/mol]	932	302	2473	2699	
teoretične sproščene MK [μ mol]	451	1417	166	149	457
dejanske sproščene MK (60 min)[μ mol]	449	986	76	26	360
obseg lipolize [%]	99,6	69,6	45,8	17,4	78,8

4.2.5. Lipoliza SMES z vgrajenim resveratrolom

V zadnji stopnji smo z razvito metodo *in vitro* lipolize ovrednotili še SMES, v katerega smo kot modelno zdravilno učinkovino dodali na svetlobo občutljiv stilbenoid resveratrol. Tudi v tem primeru smo analizo izvajali 60 minut in uporabili vse reagente ter parametre, ki so med predhodnim eksperimentalnim delom dajali najboljše rezultate. Iz slike 21 je razvidno, da je potek krivulj, tako za porabljeni volumen NaOH, kot tudi za količino sproščenih prostih maščobnih kislin, primerljiv z analizo SMES brez resveratrola. Obe krivulji namreč po začetnem hitrem dvigu postopoma naraščata, vendar v času spremljanja reakcije ne dosežeta platoja. Izračunali smo tudi obseg lipolize, ki je znašal 79 %, kar se zelo dobro ujema z lipolizo SMES brez učinkovine (78,8 %).



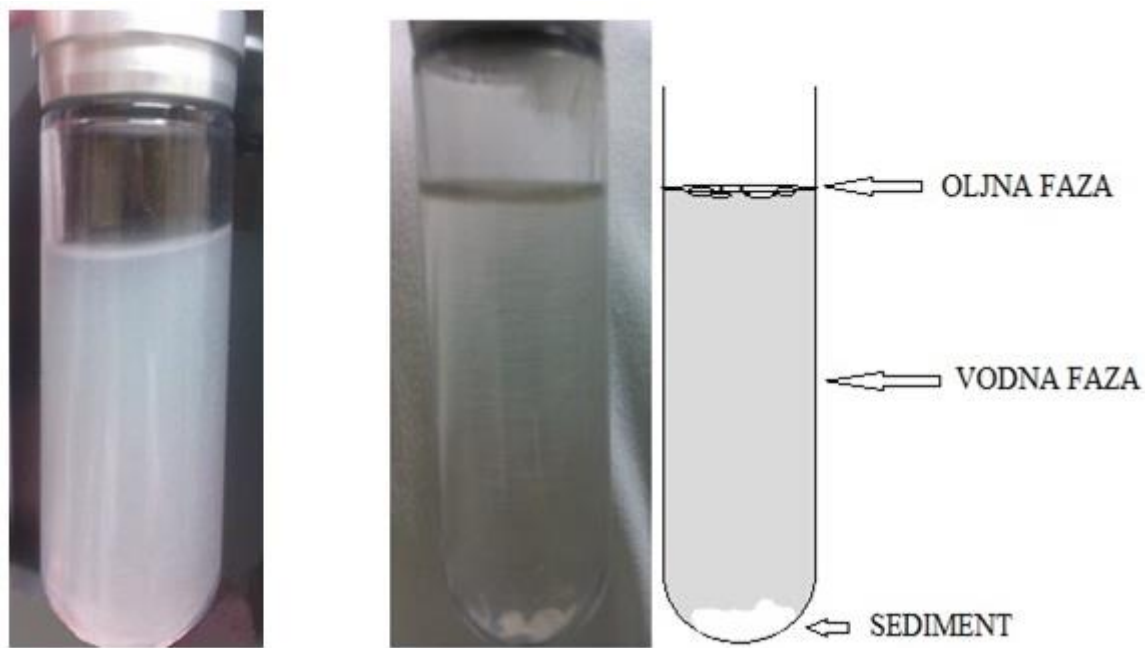
Slika 21: Modra krivulja prikazuje porabo 0,2M NaOH v odvisnosti od časa lipolize, rdeča pa količino sproščenih maščobnih kislin med reakcijo lipolize SMES z RSV.

4.3. VELIKOST DELCEV

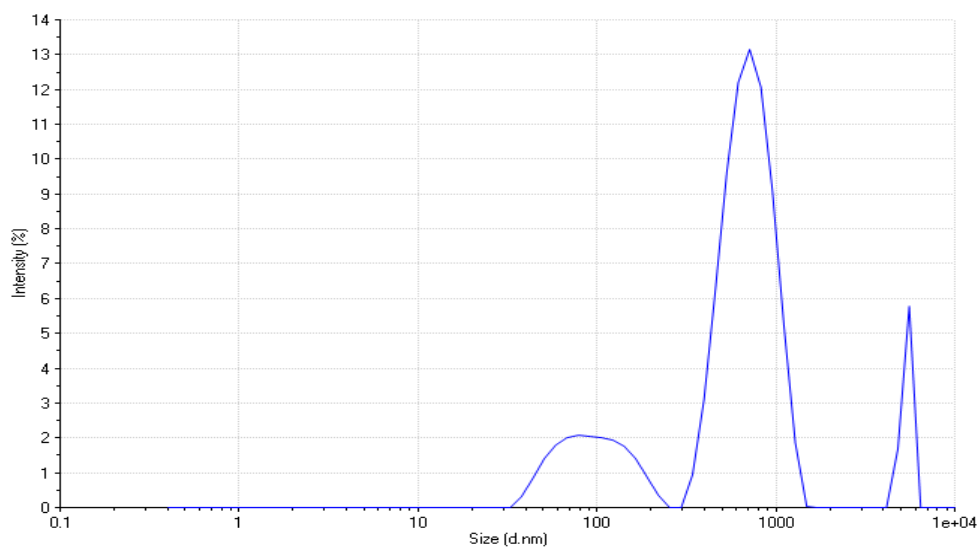
Po literaturnih podatkih lahko reakcijska zmes po končani reakciji lipolize vsebuje različne strukture (oborjene trdne delce učinkovine in drugih komponent, nezreagirane oljne kapljice, različne koloidne strukture) (11). Vzorce SMES z dodanim resveratrolom smo zato ultracentrifugirali 45 minut pri 30.000 rpm ter 20°C. Pri tem so se v centrifugirki ločile tri faze (Slika 22). V volumsko najboljšežnejši vodni fazi so prisotne koloidne strukture, kot so miceli, mešani miceli in vezikli, ki vsebujejo žolčne soli, fosfatidilholin in v lipidih raztopljeno učinkovino, ki je v takšni obliki na voljo za absorpcijo skozi črevesno steno. Sestava vodne faze reakcijske zmesi je zato ključnega pomena za vrednotenje lipolize samo-mikroemulgirajočih sistemov ter za določanje biološke uporabnosti zdravilne učinkovine. Oljna faza, v kateri so prisotni nezreagirani di- in trigliceridi, je zaradi majhne količine dodanih lipidov prisotna le v obliki nekaj maščobnih kapljic, na dnu centrifugirke pa se v obliki sedimenta naberejo kalcijeve soli maščobnih kislin ter oborjena zdravilna učinkovina (11).

Vzorcu SMES z resveratrolom smo po končani reakciji lipolize na aparaturi Zetasizer izmerili velikost delcev pred in po centrifugiranju. Pri motnem vzorcu reakcijske zmesi pred ultracentrifugiranjem so bili delci porazdeljeni okoli treh vrhov pri 5387 nm, 725 nm in 100 nm, povprečna velikost delcev pa je bila precej visoka, in sicer 552 nm (Slika 23). Po ultracentrifugiranju smo velikost delcev določili v vodni fazi in tokrat dobili

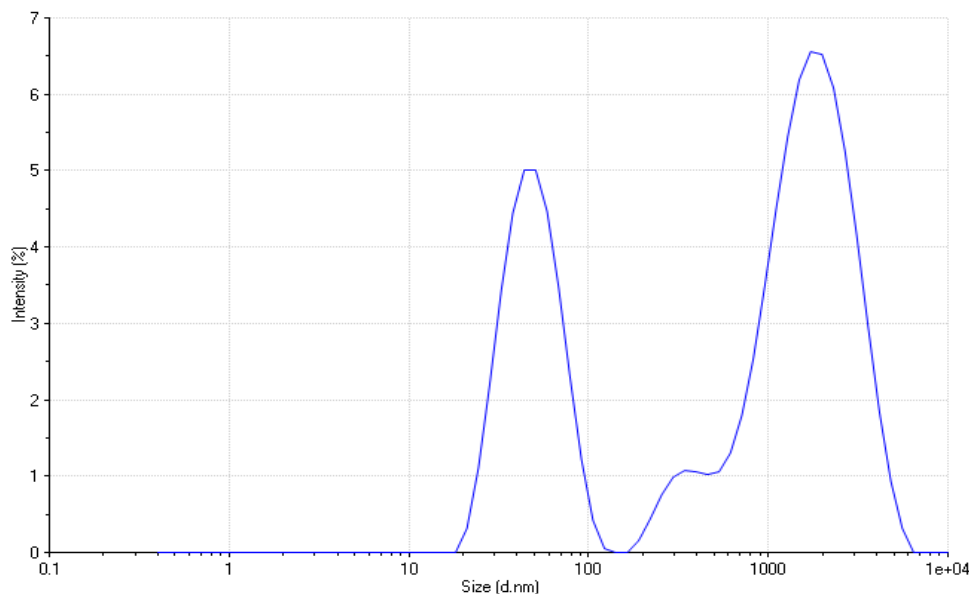
tri vrhove pri precej nižjih vrednostih: 1926 nm, 339 nm ter 51 nm (Slika 24). Povprečna velikost delcev je padla na 135 nm, kar smo tudi pričakovali, saj smo z ultracentrifugiranjem iz vzorca odstranili večje maščobne kapljice in neraztopljene trdne delce. Polidisperzni indeks je bil v obeh primerih nad 0,9, kar pomeni, da imamo zelo heterogen sistem in so v vzorcu prisotni delci zelo različnih velikosti.



Slika 22: Na levi sliki je prikazan moten vzorec v centrifugirki takoj po lipolizi, na desni pa vzorec po ultracentrifugiranju ter shematski prikaz treh faz, na katere se vzorec loči med le-tem.



Slika 23: Porazdelitev in velikost delcev v vzorcu SMES z RSV po procesu lipolize (pred ultracentrifugiranjem vzorca).



Slika 24: Porazdelitev in velikost delcev v vodni fazi vzorca SMES z RSV po procesu lipolize (po ultracentrifugiranju vzorca).

4.4. VPLIV DISPERGIRANJA TER *IN VITRO* LIPOLIZE FORMULACIJE NA OBARJANJE VGRAJENE UČINKOVINE

Za absorpcijo preko stene v prebavnem traktu je najpomembnejša vodna faza, saj vsebuje solubilizirano učinkovino. Po končani lipolizi in ultracentrifugiranju vzorcev smo zato s HPLC analizo določili koncentracijo resveratrola v vodni fazi. V preglednici X je prikazan vpliv procesa dispergiranja in prebave formulacije na obseg obarjanja učinkovine iz SMES. Med procesom dispergiranja formulacije v vodnem mediju poteče redčenje sistema, kar ima za posledico zmanjšanje solubilizacijske kapacitete za vgrajeno učinkovino. Slednja se lahko spremeni (zniža ali poveča) tudi med procesom prebave, saj lahko hidroliza lipidov in površinsko aktivnih snovi iz formulacije vpliva na lastnosti le-teh in posledično na sposobnost iz njih nastalih struktur za solubilizacijo učinkovine. Iz preglednice X je razvidno, da je teoretična vsebnost solubiliziranega RSV višja od izmerjenih vrednosti, kar je posledica obarjanja učinkovine med dispergiranjem lipidne formulacije v vodnem mediju ter lipolize komponent sistema. Obarjanje učinkovine je pogosto prisotno pri lipidnih sistemih razreda IIIb in IV, ki vsebujejo velik delež v vodi topnih površinsko aktivnih snovi in hidrofilnih sotopil, zato se pri redčenju z vodno fazo zmanjšuje njihova solubilizacijska kapaciteta za vgrajeno zdravilno učinkovino (37).

Preglednica X: Vpliv procesov dispergiranja in prebave SMES z vgrajenim RSV na obseg solubilizacije slednjega v vodni fazi disperzije. V prvi vrstici preglednice je predstavljena teoretična koncentracija resveratrola (RSV) v reakcijski zmesi, izračunana iz mase SMES z vgrajeno učinkovino, ki smo jo dodali v reakcijsko zmes; teoretično koncentracijo RSV v mediju bi dosegli, če se med dispergiranjem formulacije ne bi oborilo nič učinkovine. V drugi vrstici je prikazana s HPLC analizo izmerjena koncentracija RSV v vodni fazi disperzije po ultracentrifugiranju le-te. V tretji vrstici je prikazan odstotek RSV, ki je ostal solubiliziran v vodni fazi disperzije po redčenju in prebavi testiranega SMES.

	dispergirani vzorec	dispergirani in prebavljeni vzorec
Teoretična vsebnost RSV v reakcijski zmesi [mg/ml]	0,5735	0,5078 - 0,5185
Izmerjena koncentracija RSV v vodni fazi zmesi [mg/ml]	0,3153	0,1909 - 0,3537
% solubiliziranega RSV v vodni fazi zmesi	55,0	37,6 - 68,2

5. SKLEPI

V diplomski nalogi smo s pH-stat metodo določali aktivnost pankreatina in obseg lipolize izbranih lipidnih komponent ter na lipidih osnovanega sistema. Med razvojem metode določanja aktivnosti encima ter metode *in vitro* lipolize smo spreminjali sestavo disperznega medija, razmerje med encimom in substratom (vzorec lipida), koncentracijo titranta (NaOH), s katerim nevtraliziramo med reakcijo lipolize sproščene maščobne kisline, ter parametre metode, kot so dovoljeno odstopanje od nastavitvene pH vrednosti in maksimalni pretok titranta. Pri tem smo prišli do naslednjih rezultatov:

- Količino in koncentracijo reagentov je priporočljivo prirediti tako, da poraba NaOH ne presega 10 ml (tj. maksimalen volumen polnilne birete). V kolikor je med samo reakcijo potrebna ponovna polnitev birete to vpliva na rezultat, saj v času polnjenja birete ne poteka titracija maščobnih kislin, ki se sproščajo med procesom lipolize lipidov.
- Pri izračunu aktivnosti pankreatina je najbolj priporočljivo upoštevati povprečno porabo NaOH, ki se v začetnem delu reakcije porabi za nevtralizacijo iz substrata sproščenih maščobnih kislin. V tej fazi reakcije je krivulja porabe titranta najbolj linearna, saj je v tem območju aktiven ves prisoten encim, na reakcijo pa še ne vplivajo produkti hidrolize.
- Pri določanju aktivnosti pankreatina smo kot disperzni medij uporabili maleatni pufer (pH = 7,5) brez ali z dodatkom žolčnih soli (Na-deoksiholat). V prisotnosti slednjih so bile izračunane aktivnosti pankreatina nekoliko nižje, saj žolčne soli inhibirajo delovanje encimov v pankreatinu.
- Pri določanju aktivnosti pankreatina smo v reakcijsko posodo najprej odmerili 20 ml maleatnega pufra (pH = 7,5), v katerem smo nato dispergirali različne količine encima in substrata. Pri reakciji sproščene proste maščobne kisline smo titrirali z NaOH. Najboljše rezultate smo dobili pri dodatku 3,0 ml substrata (tributirin) ter raztopine encima z vsebnostjo 5 mg pankreatina/1 ml pufra. Takšno razmerje omenjenih reagentov smo zato uporabili za vse nadaljnje poskuse, v katerih smo proučevali vpliv največjega dovoljenega odstopanja pH vrednosti reakcijske zmesi od nastavitvene pH vrednosti na titratorju. Točke začetnega dela krivulje porabe NaOH v odvisnosti od časa titracije so se najboljše ujemale z linearno premico pri nastavljenem odstopanju pH od nastavitvene vrednosti za največ 0,01 enote. Uporaba

različnih koncentracij titranta (0,1 – 1 M NaOH) je le rahlo vplivala na določeno aktivnost encima.

- Pri določanju aktivnosti encima smo analizo izvajali 30 minut, saj reakcija s tributirinom kot substratom poteče hitro in v tem času že doseže plato. Pri lipolizi komponent in SMES hidroliza poteka počasneje, zato smo v tem primeru čas spremljanja porabe NaOH podaljšali na 60 minut.
- Obseg lipolize izbranih vzorcev smo določali tako, da smo v reakcijski posodi približno 200 mg lipidnega vzorca dispergirali v prebavnem pufru ter reakcijo sprožili z dodatkom raztopine pankreatina. S podatki o porabi NaOH med reakcijo lipolize smo potrdili, da sta glicerida ricinusovo olje in Capmul MCM hitro prebavljivi komponenti, medtem ko se površinsko aktivni snovi Crempohor RH 40 ter Crempohor EL prebavljata počasneje ter v manjšem obsegu, kar se odraža v nižji porabi titranta.
- Za določanje obsega lipolize SMES brez ter z zdravilno učinkovino smo za titracijo sproščenih maščobnih kislin uporabili 0,5 M oz. 0,2 M bazo. V prvih meritvah je prišlo do velike pretitracije reakcijske zmesi tako pri 0,5 M, kot tudi pri uporabi 0,2 M NaOH. Boljše ujemanje pH z nastavljenimi vrednostmi smo nato poskušali doseči z zmanjševanjem največje hitrosti dodajanja titranta. Najbolj natančno vzdrževanje pH smo dosegli pri maksimalnem pretoku NaOH 1ml/min.
- Izračunani obsegi lipolize za posamezne komponente se skladajo s podatki, ki jih lahko zasledimo v literaturi. Na osnovi tega sklepamo, da parametri metode določanja aktivnosti pankreatina in metode vrednotenja *in vitro* lipolize, ki smo jih določili v diplomskem delu, dajejo pravilne rezultate.

6. LITERATURA

1. McClements D.J., Li Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function* 2010; 1: 32-59.
2. Bauer E., Jakob S., Mosenthin R. Principles of Physiology of Lipid Digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2005; 18(2): 282-295.
3. McClements D.J., Decker E.A., Park Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2008; 49(1): 48-67.
4. Despopoulos A., Silbernagl S. Color atlas of physiology, 5th edition, Thieme, New York, 2003: 226-265.
5. 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.
6. Cannon J.B., Long M.A. Emulsions, microemulsions, and lipid-based drug delivery systems for drug solubilisation and delivery – Part II: Oral applications. V: Water-insoluble drug formulation (Ur.: Liu R.), second edition, Taylor & Francis group, LLC., 2008: 227-254.
7. Pouton C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 11 Suppl. 2: S93-S98.
8. Pouton C.W., Porter C.J.H., Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 625-637.
9. Pouton C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 47-58.
10. Zvonar A., Gašperlin M., Kristl J. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59(5): 263-268.
11. Larsen A.T., 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.

12. McClements D.J., Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 2010; 159: 213-228.
13. 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.
14. Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R. Lipases as interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 2009; 147-148: 237-250.
15. Li Y., Hu M., McClements D.J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using *n vitro* digestion model: Proposal for a standardized pH-stat method. *Food Chemistry* 2011; 126: 498-505.
16. MacGregor K.J., Embleton J.K., Lacy J.E., Perry E.A., Solomon L.J., Seager H., Pouton C.W. Influence of lipolysis on drug absorption from gastro-intestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 33-46.
17. Song L. Studies of solubilisation of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of a model lipid-based drug delivery system and in mixed micelles. 2011, Theses and Dissertations-Pharmacy.
18. Christensen J.Ø., Schultz K., Mollgaard B., Kritensen H.G., Müllertz A. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 23: 287-296.
19. Dahan A., Hoffman A. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 67: 96-105.
20. Sek L., Porter C.J.H., Charman W.N. Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerids and their *in vitro* digestion products, by HPTLC coupled with *in situ* densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 25: 651-661.
21. Zangenberg N.H., Müllertz A., Kristensen H.G., Hovgaard L. A dynamic *in vitro* lipolysis model II: Evaluation of the model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14: 237-244.

22. Lowe M.E. Assays for pancreatic triglyceride lipase and colipase. V: Metohd in molecular biology, Vol 109 Lipase and phospholipase protocols (Ur.: Doolittle M., Reue K.), Humana Press Inc., 1999: 59-70.
23. Pinsiroadom P., Parkin K.L. Lipase Assays. V: Current Protocols in Food Analytical Chemistry 2001:C3.1.1-C3.1.13.
24. European Pharmacopoeia, 7th edition, Council Of Europe, Strasbourg, 2010.
25. The United States Pharmacopoeia, USP 35, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2011.
26. Prajapati H.N, Dalrymple D.M, Serajuddin A.T.M. 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 2011; DOI 10.1007/s11095-011-0541-3.
27. Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E. Handbook of pharmaceutical excipients, 6th edition, Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association, London, 2009: 126-129, 542-549.
28. Elektronski vir:
http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/Pharma/doc4/BASF/PRD/30035152/Material%20Safety%20Data%20Sheet-US-EN.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8800bc452.pdf
Dostop: 18.10.2012
29. Elektronski vir:
http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~es_MX/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30035134/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=CA&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af88014cb01.pdf
Dostop: 18.10.2012
30. Obreza A. et al. Farmacevtski terminološki slovar, založba ZRC, Zbirka Slovarji, Ljubljana 2011
31. Elektronski vir:
https://www.chromadex.com/wpresources/Upload/Article/pTeroPure_Resveratrol_Brochure.pdf
Dostop: 19.10.2012

32. Elektronski vir:
http://www.chiralvision.com/pdf/lipase_TBU_activity_assay.pdf
Dostop: 22.10.2012
33. Elektronski vir:
http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
Dostop: 16.10.2012
34. Cui n  J.F., McEvoy C.L., Charman W.N., Pouton C.W., Edwards G.A., Benameur H., Porter C.J.H. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *Journal of pharmaceutical sciences* 2008; 97 (2): 995 – 1012.
35. Dahan A., Hoffman A. Use of a dynamic *in vitro* lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: Correlation with *in vivo* data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. *Pharmaceutical Research* 2006; 23(9): 2165-2174.
36. Arnold Y.E., Imanidis G., Kuentz M. *In vitro* digestion kinetics of excipients for lipid-based drug delivery and introduction of a relative lipolysis half life. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2011: 1-8.
37. Porter C.J.H., Pouton C.W., Cui n  J.F., Charman W.N. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 2008; 60: 673 – 691.