

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LAURA BREZOVAR

**IZDELAVA IN STABILNOST TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV S  
KOENCIMOM Q<sub>10</sub>**

**PREPARATION AND STABILITY OF COENZYME Q<sub>10</sub> LOADED SOLID LIPID  
NANOPARTICLES**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm. Vsi poskusi in HPLC meritve so bili opravljeni na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm. in somentorju izr. prof. Robertu Roškarju, mag. farm. za vso podporo, strokovne nasvete in pomoč. Pri opravljanju eksperimentalnega dela in pisanju diplomske naloge sta se izkazala kot odlična mentorja, ki sta me na tej poti usmerjala in sta mi bila v vsakem trenutku pripravljena pomagati, za kar sem iz srca hvaležna in bom to izkušnjo ohranila v najlepšem spominu. Iskrena hvala tudi tehničnim sodelavkam Mojci Keržan, ing. kem. teh. in Tatjani Hrovatič, ing. kem. teh. za praktične nasvete pri delu v laboratoriju. Hvala kolegom in kolegicam diplomantom, ki ste poleg mene opravljali delo v laboratoriju in z menoj delili svoje izkušnje in znanje. Navsezadnje pa se zahvaljujem vsem svojim bližnjim, ki ste mi v vseh letih študija nudili oporo, me spodbujali in verjeli vame, da mi je uspelo priti do zelenega cilja.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. in somentorja izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Laura Brezovar

Ljubljana, avgust 2014

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

## VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Trdni lipidni nanodelci.....	1
1.1.1 Stabilnost vgrajenih KAS.....	1
1.1.2 Sproščanje KAS iz SLN .....	2
1.1.3 Fizikalna stabilnost SLN .....	2
1.1.4 Biokompatibilnost SLN .....	2
1.1.5 Adhezija SLN, okluzija in hidracija kože .....	2
1.1.6 Senzorične lastnosti SLN .....	3
1.1.7 Vizualne lastnosti SLN.....	4
1.1.8 Vgrajevanje KAS .....	4
1.1.9 Sestava SLN .....	4
1.1.10 Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev .....	6
1.1.11 Kristalizacija lipidov in nastanek SLN.....	7
1.1.12 Vgrajevanje SLN v kozmetične izdelke.....	7
1.1.13 Metode vrednotenja SLN .....	8
1.2 Koencim Q <sub>10</sub> .....	9
1.2.1 Izvor in lastnosti koencima Q <sub>10</sub> .....	9
1.2.2 Biološka vloga koencima Q <sub>10</sub> .....	9
1.2.3 Redoks stanja koencima Q <sub>10</sub> .....	10
1.2.4 Stabilnost koencima Q <sub>10</sub> .....	10
1.2.5 Vpliv koencima Q <sub>10</sub> na kožo in njegova uporaba v kozmetiki .....	11
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>12</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>13</b>
3.1 MATERIALI .....	13
3.1.1 Sestavine.....	13
3.1.2 Naprave in pribor .....	14
3.2 METODE .....	15

3.2.1 Priprava raztopin stabilizatorjev.....	15
3.2.2 Izdelava praznih SLN.....	15
3.2.3 Vrednotenje SLN.....	16
3.2.4 Redukcija koencima Q <sub>10</sub> v prisotnosti askorbilpalmitata/askorbinske kisline...	17
3.2.5 Izdelava SLN s koencimom Q <sub>10</sub> .....	18
3.2.5.1 Izdelava SLN z oksidirano obliko koencima Q <sub>10</sub> .....	18
3.2.5.2 Izdelava SLN z reducirano obliko koencima Q <sub>10</sub> .....	19
3.2.6 Določanje celokupne vsebnosti koencima Q <sub>10</sub> v disperziji SLN.....	19
3.2.7 Spremljanje stabilnosti koencima Q <sub>10</sub> v formulaciji SLN pri različnih pogojih.	20
3.2.8 Učinkovitost vgrajevanja koencima Q <sub>10</sub> v SLN .....	20
3.2.9 Določanje koencima Q <sub>10</sub> s HPLC metodo .....	21
3.2.9.1 PRIPRAVA MOBILNE FAZE, STANDARDNIH RAZTOPIN IN UMERITVENE PREMICE KOENCIMA Q <sub>10</sub> .....	22
3.2.9.2 VREDNOTENJE HPLC METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q <sub>10</sub> .....	23
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>25</b>
4.1 Izdelava praznih SLN .....	25
4.1.1 Izdelava SLN s spreminjanjem časa soniciranja.....	25
4.1.2 Izdelava SLN s spreminjanjem količine lipida v disperziji .....	26
4.1.3 Izdelava SLN s spreminjanjem sestave in koncentracije stabilizatorjev.....	27
4.2 Izdelava SLN s koencimom Q <sub>10</sub> .....	29
4.2.1 Izdelava SLN z 10 % koencima Q <sub>10</sub> .....	29
4.2.2 Izdelava SLN z reducirano obliko koencima Q <sub>10</sub> .....	29
4.3 Določanje vsebnosti koencima Q <sub>10</sub> v disperziji SLN.....	30
4.4 Določanje učinkovitosti vgrajevanja koencima Q <sub>10</sub> v SLN .....	34
4.5 Priprava reducirane oblike koencima Q <sub>10</sub> .....	35
4.6 Spremljanje fizikalne stabilnosti SLN s koencimom Q <sub>10</sub> in njegove kemične stabilnosti v formulaciji SLN pri različnih pogojih .....	38
<b>5 ZAKLJUČEK .....</b>	<b>43</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

## POVZETEK

Trdni lipidni nanodelci (SLN) spadajo med novejšje koloidne dostavne sisteme, saj združujejo prednosti klasičnih dostavnih sistemov, kot so biorazgradljivost, enostavna izdelava in fiziološka kompatibilnost, z edinstvenimi lastnostmi SLN. Omogočajo visoko učinkovitost vgrajevanja lipofilnih kozmetično aktivnih sestavin. V diplomski nalogi smo izdelali SLN z metodo emulgiranja taline lipidov v vodno raztopino stabilizatorja, pri čemer smo ugotavljali vpliv časa soniciranja, količine lipida ter vrste in koncentracije stabilizatorja na fizikalne lastnosti SLN. Izdelane formulacije SLN smo vrednotili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, pri čemer smo spremljali njihovo fizikalno stabilnost tekom shranjevanja pri 4 °C. Povprečni premer (136,3 nm) in polidisperzni indeks (0,188) delcev se s časom nista bistveno spreminjala, kar kaže na fizikalno stabilnost izdelanega koloidnega sistema. V naslednjem delu naloge smo v nanodelce vgrajevali kozmetično aktivno sestavino ubidekarenon (5 oz. 10 %, m/m), ki je bolj poznan pod imenom koencim Q<sub>10</sub> in je pogosta sestavina kozmetičnih izdelkov za aktivno nego kože. Povprečni hidrodinamski premer in zeta potencial SLN z vgrajenim koencimom Q<sub>10</sub> sta se le malo razlikovala od praznih SLN. Tudi SLN s koencimom Q<sub>10</sub> so ohranili fizikalno stabilnost več tednov. S HPLC metodo smo spremljali vsebnost koencima Q<sub>10</sub> ter razlikovali med reducirano in oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub> v izdelanih formulacijah. Z ultracentrifugiranjem disperzije SLN, ki mu je sledila HPLC analiza supernatanta smo posredno določili, da je učinkovitost vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN 99,05 %. Z redukcijo ubikinona v etanolni raztopini askorbilpalmitata pri 60 °C smo uspeli po 11 dneh pripraviti 84,9 % ubikinola. Reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>, ki deluje kot antioksidant, smo nato vgradili v SLN. Rezultati analize stabilnosti koencima Q<sub>10</sub> v formulaciji SLN so pokazali, da se je reducirana oblika najdlje obdržala v vzorcu, ki smo ga shranjevali pri 4 °C, in sicer vse do 28. dne, medtem ko se je reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub> v SLN pri sobni temperaturi po 14 dneh, pri 40 °C pa že po 7 dneh v celoti pretvorila v oksidirano obliko. Zaključimo lahko, da smo uspeli izdelati fizikalno stabilno formulacijo SLN s koencimom Q<sub>10</sub>. Sama kozmetično aktivna sestavina v reducirani obliki pa v izdelani formulaciji dolgoročno ni stabilna.

Ključne besede: trdni lipidni nanodelci, koencim Q<sub>10</sub>, HPLC metoda, stabilnost

## ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles (SLN) belong among the novel colloidal delivery systems, as they combine the advantages of classical delivery systems such as biodegradability, simple manufacture and physiological compatibility with unique properties of SLN. They enable high efficiency of incorporation of lipophilic cosmetically active substances. In the scope of diploma thesis, we prepared SLN through emulsification melted lipids into a aqueous solution of stabilizer. The effect of sonification time, lipid quantity and the type and concentration of stabilisers on the physical properties of SLN has been investigated. The SLN formulations were evaluated using photon correlation spectroscopy to determine their physical stability during storage at 4 °C. The average diameter (136,3 nm) and polydispersity index (0,188) of particles did not change significantly with time, indicating physical stability of prepared colloidal delivery system. In the next part of the research, we incorporated in nanoparticles a cosmetically active ingredient ubiquinone (5 or 10 %, w/w), better known as coenzyme Q<sub>10</sub>. It is a common ingredient of cosmetic products for active skin care. The average hydrodynamic diameter and zeta potential of SLN with coenzyme Q<sub>10</sub> did not differ much from empty SLN. SLN loaded with coenzyme Q<sub>10</sub> also preserved their physical stability for several weeks. HPLC method was used for determination of the content of the coenzyme Q<sub>10</sub> and to distinguish between the reduced and oxidised form of the coenzyme Q<sub>10</sub> in prepared formulations. Ultracentrifugation of SLN dispersion followed by HPLC analysis of the supernatant was used to indirectly determine the efficiency of coenzyme Q<sub>10</sub> loading into SLN, which was 99.05%. Reduction of ubiquinone in an ethanol solution of ascorbipalmytate at 60 °C after 11 days resulted in 84.9% of ubiquinol. The reduced form of coenzyme Q<sub>10</sub> which has antioxidant activity was then incorporated into SLN. The results of the analysis of the stability of coenzyme Q<sub>10</sub> in the SLN formulations have shown, that the reduced form was preserved for the longest time in the sample, stored at 4 °C. The reduced form of coenzyme Q<sub>10</sub> was detectable till 28th day, while in the SLN formulation stored at room temperature coenzyme Q<sub>10</sub> was completely oxidized already after 14 days and at 40° C after 7 days. It can be concluded, that we managed to prepare a physically stable formulation of SLN loaded with coenzyme Q<sub>10</sub>, however, the cosmetically active ingredient in reduced form was not long-term stable in the formulation.

Key words: solid lipid nanoparticles, coenzyme Q<sub>10</sub>, HPLC analysis, stability

## SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	Mikroskopija na atomsko silo
AK	Askorbinska kislina
AsP	Askorbilpalmitat
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DSC	Diferenčna dinamična kalorimetrija
HMG - CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
ICH	Mednarodna komisija o harmonizaciji
KAS	Kozmetično aktivna učinkovina
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NLC	Nanostrukturirani lipidni nosilci
NMR	Jedrna magnetna resonanca
O/V	Olje v vodi
PAS	Površinsko aktivna snov
PCS	Fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	Polidisperzni indeks
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
RSD	Relativna standardna deviacija
SD	Standardna deviacija
SLN	Trdni lipidni nanodelci
UV	Ultravijolični spekter
ZP	Zeta potencial



# **1 UVOD**

## **1.1 Trdni lipidni nanodelci**

Trdni lipidni nanodelci (angl. solid lipid nanoparticles - SLN) spadajo med novejšje koloidne dostavne sisteme z velikostjo delcev med 40 in 1000 nm. Med koloidno dostavne sisteme sodijo tudi npr. polimerni nanodelci, nanoemulzije, liposomi, nanosuspenzije, miceli. SLN so razvili okrog leta 1990 kot alternativni dostavni sistem emulzijam, liposomom in polimernim nanodelcem. Sestavljeni so iz trdnega lipidnega ogrodja, v katerega lahko vgradimo kozmetično aktivne sestavine (KAS), obdaja pa jih plašč iz molekul stabilizatorjev. Njihov razvoj temelji na klasičnih emulzijah tipa O/V, kjer so zamenjali tekoče lipide notranje faze emulzije z lipidi ali mešanico lipidov, ki so pri sobni in telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Namen razvoja SLN je bil združiti prednosti klasičnih dostavnih sistemov, kot so biorazgradljivost, fiziološka kompatibilnost in enostavnost izdelave s prednostmi SLN, ki bodo predstavljene v nadaljevanju. Prvi generaciji SLN je sledila druga generacija, ki predstavlja lipidne nanodelce, sestavljene iz kombinacije trdnih in tekočih lipidov, to so nanostrukturirani lipidni nosilci (angl. nanostructured lipid carriers - NLC) (1, 2).

Obe generaciji lipidnih nanodelcev odlikuje vrsta edinstvenih lastnosti, ki jih izkoriščamo v farmacevtski industriji za parenteralno, peroralno in dermalno dajanje in v kozmetični industriji za pripravo kozmetičnih izdelkov.

### **1.1.1 Stabilnost vgrajenih KAS**

Trdno lipidno ogrodje SLN zagotavlja boljšo fizikalno in kemijsko stabilnost vgrajenih KAS v primerjavi s klasičnimi emulzijami tipa O/V. Trdno ogrodje lahko stabilizira kemijsko občutljive KAS in jih ščiti pred razgradnjo zaradi drugih prisotnih snovi, kot sta npr. voda in kisik. Za razliko od liposomov in emulzij, kjer prihaja do porazdeljevanja vgrajene KAS med vodno in lipidno fazo, se pri SLN ta proces zelo omeji zaradi trdnega agregatnega stanja lipida pri sobni in telesni temperaturi (1, 3).

### **1.1.2 Sproščanje KAS iz SLN**

KAS so v trdnem lipidnem ogrodju imobilizirane, kar omogoča njihovo nadzorovano sproščanje, s čimer se lahko izognemo tudi morebitni sistemski absorpciji, ki v primeru kozmetičnih izdelkov ni zaželena. Mobilnost vgrajene KAS je v primeru trdnega lipidnega ogrodja manjša kot pa, če je le-ta vgrajena v tekočo lipidno fazo emulzij. Da lahko KAS na/v koži učinkuje, pa je nujno, da se sprostijo iz lipidnega ogrodja. Na sproščanje KAS vpliva metoda izdelave SLN, sestava formulacije, sposobnost stabilizatorja, da KAS solubilizira in porazdelitveni koeficient KAS (4).

### **1.1.3 Fizikalna stabilnost SLN**

Prednost SLN pred liposomi je njihova fizikalna stabilnost, če jih dispergiramo npr. v emulzijskem sistemu. V primeru liposomov lahko pride do medsebojnega združevanja lipidov lipidnega dvosloja liposomov in emulzijskih kapljic, kar je lahko posledica razpada veziklov zaradi delovanja emulgatorja na lipidni dvosloj in vodi do upada števila veziklov tekom roka trajanja kozmetičnega izdelka. SLN se znotraj emulzij ne spreminjajo in ohranijo svojo fizikalno stabilnost (1, 3). Ključni dejavniki, ki vplivajo na stabilnost delcev, so povprečni premer, zeta potencial, delež kristaliničnosti lipidov, prisotnost različnih kristalnih modifikacij lipidov, prisotnost drugih koloidnih struktur, kot so npr. miceli, liposomi in nanometrski delci učinkovine (5).

### **1.1.4 Biokompatibilnost SLN**

SLN običajno izdelujemo iz fiziološko sprejemljivih in biorazgradljivih lipidov, kar zmanjša tveganje za pojav akutne in kronične toksičnosti. Pri njihovi izdelavi se lahko izognemo tudi uporabi organskih topil. Lipidi, iz katerih so zgrajeni, so podobni lipidom kožne bariere, zaradi česar jih koža dobro prenaša (5). Prednost disperzij SLN je tudi ta, da jih lahko pripravimo v mediju z optimalnim pH za uporabo na koži (1, 4).

### **1.1.5 Adhezija SLN, okluzija in hidratacija kože**

Za nanodelce je značilna izrazita adhezivnost ob stiku s površinami, ki se povečuje z zmanjševanjem velikosti delcev. Majhna velikost delcev omogoča tesen stik nanodelcev z roženo plastjo kože, kar lahko poveča penetracijo KAS v kožo. SLN ustvarijo na koži

tanek okluziven film, saj so v primerjavi z delci mikrometrskih velikosti bolj tesno naloženi na površini kože in posledično izkazujejo do petnajstkrat večji okluzivni učinek na koži. Razlog so manjše pore med delci nanometrskih velikosti v primerjavi z večjimi delci (slika 1) (1, 3).

Posledica nastanka filma iz SLN je zmanjšano izhlapevanje vode iz kože, kar se kaže v zmanjšani transepidermalni izgubi vode in v povečani hidraciji kože. Le-ta pa spodbuja perkutano absorpcijo KAS, ki je do neke mere potrebna za doseganje učinka KAS. Perkutana absorpcija vključuje dva procesa: penetracijo KAS v kožo in absorpcijo KAS v krvni obtok. Sestavine, ki jih vgrajujemo v SLN, večinoma niso namenjene globlji penetraciji v kožo in absorpciji, temveč delovanju na površini kože. V primeru poškodovane kožne bariere pa SLN lahko prehajajo med korneociti in podpirajo obnovo kožne bariere (1, 4).



Slika 1: Okluzivni učinek nanodelcev na kožo. Z zmanjševanjem velikosti nanodelcev dobimo večje število delcev, ki lahko tvorijo gostejši, tesno zgrajen film, zaradi česar je okluzija večja (levo), ali pa okluzijo povečamo tako, da povečamo koncentracijo delcev v kozmetičnem izdelku, kar vodi po nanosu kozmetičnega izdelka do povečanega števila delcev na enoto površine (desno) (1).

### 1.1.6 Senzorične lastnosti SLN

Nanos kozmetičnega izdelka s SLN na kožo pušča gladek občutek, saj lahko SLN zapolnijo izvodila lasnih mešičkov in majhne kožne gube, koža pa je posledično na otip bolj gladka. SLN kroglastih oblik imajo tudi lubrikacijske lastnosti, ki jih lahko izkoristimo v kozmetiki, ki se nanaša na anatomska mesta, kjer se koža pregiba in stika. Mehanska bariera, ki jo tvorijo SLN na koži, in lubrikacijsko delovanje SLN ščiti kožo, ki je podvržena draženju ali alergijskim reakcijam. Tako se lahko zmanjša srbečica in posledične potencialne poškodbe kožne bariere (4).

### **1.1.7 Vizualne lastnosti SLN**

Pri vizualnih lastnostih disperzij lipidnih nanodelcev velja omeniti, da njihov dodatek pobeli končni izdelek, kar je v primeru kozmetičnih izdelkov zelo zaželeno, saj lahko zmanjšamo spremembo barve formulacije zaradi dodatka obarvanih KAS, kot so npr. vitamini, koencim Q<sub>10</sub>, ali spremembe barve izdelka tekom roka uporabe. Nanodelci odbijajo svetlobo, zaradi svoje majhnosti tudi UV svetlobo, zato delujejo na koži tudi kot fizikalni UV filtri (1, 4).

### **1.1.8 Vgrajevanje KAS**

V SLN lahko vgrajujemo lipofilne KAS, tudi takšne, ki so občutljive na svetlobo, oksidacijo in hidrolizo in so pogosto sestavine kozmetičnih izdelkov, kot so npr. koencim Q<sub>10</sub>, askorbilpalmitat, retinol, vitamin E in druge. Kapaciteta vgrajevanja KAS v SLN je odvisna od mešanja KAS z lipidi v formulaciji in se lahko giblje od 4 % do 50 % in več v primeru lipofilnih KAS, kot sta npr. koencim Q<sub>10</sub> in tokoferol (1, 4, 6).

### **1.1.9 Sestava SLN**

Osnovne sestavine disperzij SLN so lipidi, ki so pri telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, stabilizatorji in voda. Najpogostejši predstavniki so prikazani v preglednici I.

Preglednica I: Lipidi in stabilizatorji, ki se pogosto uporabljajo za izdelavo SLN (5, 7).

Lipidi	Stabilizatorji
<b>Trigliceridi</b>	Fosfolipidi
Trikaprin	Sojin lecitin (Lipoid® S 75, Lipoid® S 100)
Trilaurin	Jajčni lecitin (Lipoid® E 80)
Trimiristin	Fosfatidilholin (Epikuron® 170, Epikuron 200)
Tripalmitin	
Tristearin	Kopolimeri
Hydrogenirani glicerol kokoat (Softisan® 142)	Poloksamer 188
Witepsol® W 35, H 35, H 42, E 85	Poloksamer 182
<b>Monogliceridi</b>	Poloksamer 407
Glicerol monostearat (Imwitor®900)	Poloksamin 908
Glicerol behenat (Compritol® 888 ATO)	Polisorbat 20
<b>Digliceridi</b>	Polisorbat 60
Glicerol palmitostearat (Precirol® ATO 5)	Polisorbat 80
<b>Voski</b>	
Cetil palmitat	Brij 78
<b>Maščobne kisline</b>	
Stearinska kislina	Soli žolčnih kislin
Palmitinska kislina	Natrijev holat
Dekanojska kislina	Natrijev glikoholat
Behenojska kislina	
Acidan N12	

### Lipidi

SLN lahko izdelamo iz različnih mono-, di- in trigliceridov, maščobnih kislin, sterolov ali voskov, ki so pri telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju (preglednica I). Delci, izdelani iz visoko prečiščenih lipidov, kot je tripalmitin ali tristearin, izkazujejo visoko stopnjo kristalizacije, obenem pa tudi okluzivno in emolientno delovanje na koži. Višje tališče lipidov povzroči nastanek večjih delcev, kar lahko pojasnimo z večjo viskoznostjo taline dispergirane faze med izdelavo disperzije SLN (5). Delež lipidov v disperziji SLN se običajno giblje med 0,1 % in 30 % (m/m) (4).

### Stabilizatorji

SLN obdaja sloj stabilizatorjev, ki so fiziološko kompatibilni, kot npr. fosfolipidi in soli žolčnih kislin (2). Kombinacija različnih stabilizatorjev bolj učinkovito stabilizira delce pred agregiranjem in/ali aglomeriranjem kot en sam stabilizator (5). SLN so dispergirani v vodni raztopini stabilizatorjev, katerih masni delež je običajno med 0,5 % in 5 %. Presežek površinsko aktivnih snovi (PAS) se v disperziji nahaja v obliki posameznih molekul ali v obliki micelov in liposomov, ki spontano nastanejo. Večje kot so molekule stabilizatorjev,

dlje časa traja, da se razporedijo po novonastali medfazni površini (npr. lecitin, poloksamer), medtem ko je slabost manjših molekul PAS njihova potencialna toksičnost (npr. natrijev lavrilsulfat) (5).

Disperzije SLN običajno vsebujejo 70 - 99,9 % (m/m) vode, kar je lahko, zaradi majhnega deleža SLN, problematično pri vgrajevanju le-teh v končne kozmetične formulacije (1).

#### **1.1.10 Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev**

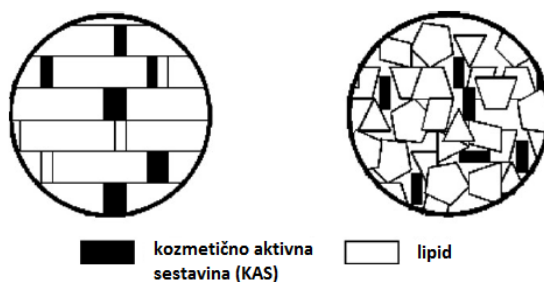
Metode izdelave SLN lahko v grobem razdelimo na metode dispergiranja lipidov v vodno raztopino stabilizatorja, kjer gre za vnašanje velike količine energije v sistem (homogeniziranje pod visokim tlakom, ultrazvočno soniciranje, homogeniziranje z rotor-stator homogenizatorjem) in metode obarjanja lipidov iz homogenih sistemov (npr. razredčevanje vroče mikroemulzije) (2).

Pri prvem načinu izdelave trdne lipide segrejemo 5-10 °C nad temperaturo njihovega tališča, v talino dodamo KAS, nato pa sledi dispergiranje v segreti raztopini stabilizatorjev z rotor-stator ali visokotlačnim homogenizatorjem ali z uporabo ultrazvočne sonde. Pri tem nastane vroča nanoemulzija tipa O/V, ki jo v zadnji fazi ohladimo pod temperaturo kristalizacije lipidov, da kapljice lipidov kristalizirajo in nastanejo SLN (2, 3).

Prednosti homogeniziranja pod visokim tlakom pred drugimi metodami izdelave SLN so kratek čas izdelave in odsotnost organskih topil. Pri vročem homogeniziranju pod visokim tlakom KAS dispergiramo ali raztopimo v talini lipidov, nato pa talino s KAS dodamo k na enako temperaturo segreti raztopini stabilizatorjev. Dobljeno emulzijo tipa O/V izpostavimo homogeniziranju, pri čemer kavitacija in strižne sile povzročijo zmanjšanje velikosti lipidnih kapljic. Na koncu vročo nanoemulzijo ohladimo, da nastanejo SLN. Pri hladnem homogeniziranju pa talino lipidov s KAS ohladimo in zdrobimo do delcev mikrometrskih velikosti. Le-te dispergiramo v hladni raztopini stabilizatorjev. Nastalo suspenzijo homogeniziramo pod visokim tlakom pri kontrolirani temperaturi, da dobimo nanodelce (1).

### 1.1.11 Kristalizacija lipidov in nastanek SLN

SLN so sestavljeni iz trdnih lipidov, ki se takoj po izdelavi nahajajo večinoma v kristalni obliki  $\alpha$  ali  $\beta'$  z visoko energijo. Sčasoma pa te kristalne oblike z visoko energijo prehajajo v kristalno obliko  $\beta$  z nizko energijo, ki je za sistem ugodnejša in pri kateri je struktura gradnikov bistveno bolj urejena. Zaradi težnje po urejenosti kristalne strukture, le-ta vsebuje vedno manj nepravilnosti. Ta proces vodi v izrivanje vgrajene KAS iz lipidnega ogrodja in njeno sproščanje iz SLN. Razlika med SLN in NLC je v vsebnosti tekočih lipidov, ki jih NLC vsebujejo SLN pa ne, kar vodi v večjo učinkovitost vgrajevanja KAS v NLC in njeno zadrževanje v delcih tekom roka trajanja kozmetičnega izdelka. Po izdelavi SLN, posebno takšnih iz lipidov z visoko stopnjo čistote, se sčasoma znotraj delcev oblikuje pravilna kristalna rešetka lipidov, ki dopušča malo prostora KAS za vgrajevanje med kristale lipidov (slika 2) (1, 3).



Slika 2: Shematska zgradba SLN (levo) z gradniki, ki spominjajo na opeke. Med njimi je malo prostora za vgrajevanje KAS. V primeru NLC (desno) je zgradba neurejena, kar zagotavlja KAS več prostora za vgrajevanje (1).

### 1.1.12 Vgrajevanje SLN v kozmetične izdelke

Pripravljeno disperzijo SLN lahko vmešamo že v izdelano podlago kozmetičnega izdelka ali pa izdelani disperziji SLN povečamo viskoznost z dodatkom zgoščeval in tako pripravimo hidrogel s SLN. Disperzijo SLN vključimo v kozmetični izdelek tako, da nadomestimo del vodne faze emulzije ali losjona s koncentrirano disperzijo SLN in tako v na približno 30 °C ohlajeno emulzijo previdno vmešamo disperzijo SLN. To predstavlja nov način za izboljšanje kakovosti kozmetičnih izdelkov, ki že sami izkazujejo ugodne učinke na koži, uporaba nanotehnologije pri izdelavi kozmetičnega izdelka pa jih še obogati in izboljša njihovo učinkovitost (1, 3).

### 1.1.13 Metode vrednotenja SLN

Hidrodinamsko velikost in polidisperzni indeks (PDI) delcev, ki sta ključna parametra SLN, lahko določimo z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (angl. photon correlation spectroscopy, PCS), ki omogoča merjenje delcev z velikostjo od nekaj nanometrov do 3  $\mu\text{m}$ . Metoda PCS temelji na zaznavanju svetlobe, ki se siplje na delcih, ki se v vzorcu Brownovo gibljejo. To je naključno gibanje dispergiranih delcev in makromolekul, do katerega pride zaradi trkov z molekulami disperznega medija. Med merjenjem naprava vzorec osvetli z lasersko svetlobo, tako da lahko izmeri fluktuacijo intenzitete sipanja svetlobe, ki ga povzroči gibanje koloidnih struktur v vzorcu. Manjši delci se gibljejo z večjo hitrostjo in večji kot so, manjša je njihova hitrost. S pomočjo Stokes-Einsteinove enačbe nam naprava izračuna povprečni premer delcev in širino porazdelitve velikosti delcev, ki jo poda kot PDI. Vrednost PDI se giblje v intervalu med 0 in 1. Bolj kot se približuje PDI vrednosti 0, bolj so delci enakomernih velikosti in zanesljivejša je meritev. Na meritev vplivata tudi viskoznost in temperatura medija, zato je potrebno poznati tudi ta dva parametra. Zeta potencial (ZP) je prav tako pomembna lastnost nanodelcev. Le-ta definira fizikalno stabilnost elektrostatsko stabiliziranega koloidnega sistema, na katerega pa močno vpliva pH medija in prisotnost ionov. Kadar je ZP izredno nizek (manj kot - 30 mV) ali zelo visok (več kot +30 mV), pomeni, da je sistem stabilen, saj v sistemu prevladujejo odbojne sile med delci in preprečujejo agregiranje delcev. Kadar se v sistemu ZP giblje okrog ničle pomeni, da med delci ni elektrostatskih odbojnih sil, kar povzroči agregiranje in nestabilnost nanodelcev (5, 7, 8).

Za določanje kristalnosti lipidnega ogrodja in polimorfnih modifikacij lipidov uporabljamo metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC), s katero lahko spremljamo tudi prehode med kristalnimi modifikacijami lipidov tekom shranjevanja. Lokalizacijo KAS, ki je lahko vgrajena v lipidno ogrodje SLN ali pa le adsorbirana na površini SLN, lahko določamo z jedrsko magnetno resonanco (NMR). Morfološke lastnosti SLN in prisotnost drugih koloidnih struktur (zaradi presežka stabilizatorja) v disperziji lahko spremljamo s presevno elektronsko mikroskopijo ali mikroskopijo na atomsko silo (AFM) (7).



## 1.2 Koencim Q<sub>10</sub>

### 1.2.1 Izvor in lastnosti koencima Q<sub>10</sub>

Koencim Q<sub>10</sub>, poimenovan tudi ubidekarenon, je edini endogeni lipofilni antioksidant, ki ga sintetizirajo tako rastline kot sesalci. Izolirali so ga leta 1957 pri raziskovanju transportnega sistema v mitohondrijih. Splošno poimenovanje ubikinon izhaja iz besede *ubi*, ki pomeni povsod prisoten, ter besede *kinon*, ki opisuje njegovo kemijsko strukturo.

V naravi je prisotnih 10 različnih oblik koencima Q, medtem ko v telesu z biosintezo nastaja le ena oblika. Koencim Q<sub>10</sub> je rumena snov z molekulsko maso 863 in se pri sobni temperaturi nahaja v kristalni obliki. Tališče koencima Q<sub>10</sub> je okrog 50 °C. Dolga stranska veriga daje koencimu Q<sub>10</sub> močan lipofilen značaj, zato je netopen v vodi in ima omejeno topnost tudi v lipidih (9, 10).

### 1.2.2 Biološka vloga koencima Q<sub>10</sub>

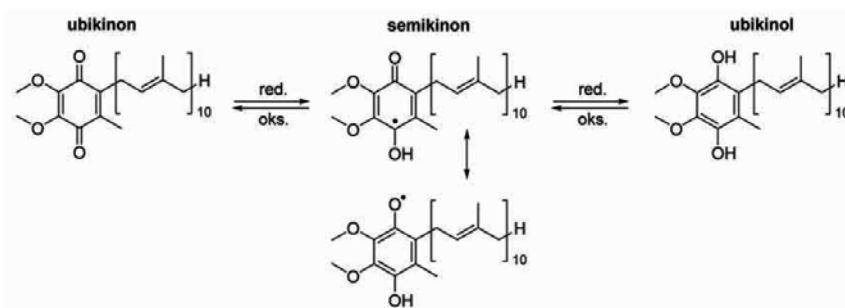
Pomembno vlogo pri raziskovanju vloge koencima Q<sub>10</sub> v celičnih procesih ima Peter D. Mitchell, ki je leta 1978 za to delo prejel Nobelovo nagrado. Pri večini evkariontskih celic najdemo koencim Q<sub>10</sub> v mitohondrijih, kjer je nenadomestljiva komponenta pri prenosu elektronov v elektronski transportni verigi, ki poteka na notranji membrani mitohondrijev. Mitohondrijsko dihalno verigo sestavlja več kompleksov, med katerimi s pomočjo koencima Q<sub>10</sub> prehajajo elektroni. Je koencim različnim membranskim encimom, kot so NADH-CoQ<sub>10</sub> reduktaza, sukcinat-CoQ<sub>10</sub> reduktaza in ubikinol-citokrom c reduktaza. Sodeluje pri nastajanju adenzintrifosfata v procesu celičnega dihanja, v reducirani obliki pa ščiti membrane pred lipidno peroksidacijo, zato je pomemben za kemijsko stabilnost celičnih membran (11).

Vloga antioksidanta je izrednega pomena, saj v procesu oksidativne fosforilacije v mitohondrijih nastaja veliko reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki lahko ireverzibilno poškodujejo različne biološke molekule. Koencim Q<sub>10</sub> skrbi tudi za transport protonov preko membrane lizosomov in za nastanek protonskega gradienta, s čimer pomaga pri vzdrževanju optimalnega pH v celicah. V lizosomih se nahajajo encimi, ki za svoje delovanje potrebujejo optimalen pH (11).

Največ koencima Q<sub>10</sub> se v telesu nahaja v tkivih, ki potrebujejo za delovanje veliko energije, kot so npr. srce, jetra, trebušna slinavka in ledvica. Antioksidativno delovanje koencima Q<sub>10</sub> ščiti telo pred radikali, ki lahko poškodujejo celične lipide, ki sestavljajo membrane, proteine in deoksiribonukleinske kisline (DNA) (9, 10).

### 1.2.3 Redoks stanja koencima Q<sub>10</sub>

Koencim Q<sub>10</sub> v telesu spontano prehaja med oksidirano obliko, to je ubikinon, preko semikinonske do reducirane oblike, to je ubikinol (slika 3). Zaradi lipofilnosti se obe obliki slabo absorbirata iz prebavnega trakta. Veliko pozornosti je zato namenjeno razvoju dostavnih sistemov za povečanje sistemske biološke uporabnosti koencima Q<sub>10</sub> po peroralnem vnosu npr. razvoj oljnih suspenzij ubikinona v obliki mehkih kapsul (11). Najvišjo učinkovitost absorpcije dosežemo po zaužitju vodotopnih oblik koencima Q<sub>10</sub>, med absorpcijo pa v enterocitih prihaja do njegove redukcije, zaradi česar se v krvi pojavi predvsem v obliki ubikinola. Zaužita oblika koencima Q<sub>10</sub> zato nima vpliva na njegove funkcije v telesu, temveč so te odvisne le od redoks ravnotežja med reducirano in oksidirano obliko (11).



Slika 3: Redoks stanja koencima Q<sub>10</sub> (11)

### 1.2.4 Stabilnost koencima Q<sub>10</sub>

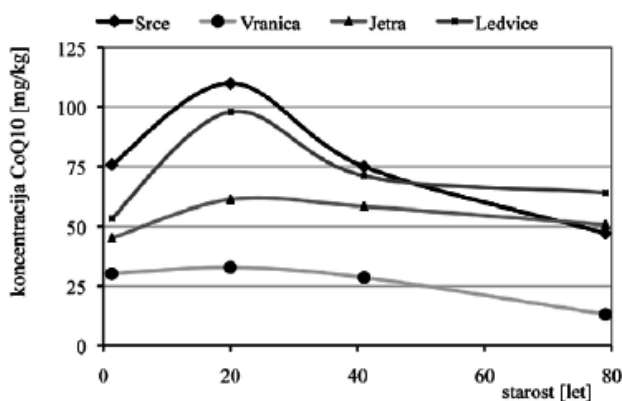
Reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub> se v stiku s kisikom hitro oksidira, pri tem pa se pretvori v ubidekarenon (oksidirana oblika) (12). Zato ga shranjujemo v zrakotesno zaprtem vsebniku, zaščitenem pred svetlobo in pri temperaturi, ki ne presega 25 °C. Visoka temperatura lahko povzroči njegovo razgradnjo, prav tako pa koencim Q<sub>10</sub> ni stabilen v stiku z močnimi bazami (13). Ko so preučevali termično stabilnost ubikinola so ugotovili, da je le-ta stabilen pri 37 °C, medtem ko so njegovo kemično pretvorbo zaznali že pri

temperaturah 45-55 °C, pospešeno pretvorbo pa nad 70 °C (14, 15). Izpostavitve UV svetlobi izzove kemijske spremembe koencima Q<sub>10</sub>, ki se odražajo v spremembi barve iz oranžne v temno rumeno, kar kaže na potencialno fotoreaktivnost koencima Q<sub>10</sub>. Pri tem močno absorbira UV in vidno svetlobo, kar lahko povzroči njegovo razgradnjo. Pri izpostavitvi raztopine koencima Q<sub>10</sub> sončni svetlobi so dokazali nastajanje ROS, kot sta superoksid in singletni kisik, medtem ko pri vzorcih v temi do tvorbe ROS ni prišlo (16).

### 1.2.5 Vpliv koencima Q<sub>10</sub> na kožo in njegova uporaba v kozmetiki

Z leti koncentracija koencima Q<sub>10</sub> v najbolj aktivnih organih telesa in tudi v koži upada (slika 4). Zelo velik vpliv pa ima tudi izpostavljenost organizma UV sevanju. Po tem, ko celice v koži absorbirajo UV žarke, ti v koži povzročijo nastajanje ROS, ki lahko poškodujejo lipide, proteine in DNA celic. Koža se pred oksidativnim stresom brani z encimskim sistemom, ki ga predstavljajo encimi superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, in neencimskim sistemom, v katerega uvrščamo antioksidante, kot je koencim Q<sub>10</sub> (17). Epidermis je najbolj zunanja plast kože in je posledično najbolj izpostavljen UV sevanju, zato vsebuje približno desetkrat večjo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> kot globlje ležeči dermis.

Koencim Q<sub>10</sub> je pogosta sestavina kozmetičnih izdelkov proti gubam, losjonov za oziroma po sončenju, vlažilnih kozmetičnih izdelkov in izdelkov za nego kože okrog oči (18).



Slika 4: S starostjo povezane spremembe koncentracije koencima Q<sub>10</sub> v različnih človeških organih (11).

## 2 NAMEN DELA

Nanodelci, sestavljeni iz lipidov, ki so pri telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, so kot dostavni sistem v kozmetiki predmet raziskav že več kot 20 let. Za njihovo izdelavo je na voljo široka paleta materialov, ki lahko sestavljajo ogrodje SLN, kot so mono-, di-, trigliceridi, različne maščobne kisline in voski. SLN v disperziji stabilizira zaščitni plašč iz stabilizatorjev, ki ima pomembno vlogo pri zagotavljanju in ohranjanju stabilnosti nanodelcev v vodnem mediju. Pestra paleta materialov, različnih metod izdelave SLN in uporaba le-teh kot sodobnih dostavnih sistemov za KAS je odprla nove možnosti za razvoj sodobnih kozmetičnih izdelkov z uporabo nanotehnologije.

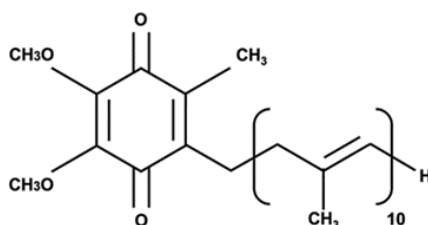
Namen našega raziskovalnega dela bo izdelati stabilno formulacijo SLN, v katero bomo vgradili koencim  $Q_{10}$ , ki je pogosto sestavina novejših kozmetičnih izdelkov za aktivno nego kože, ki kaže znake staranja. Reducirano obliko koencima  $Q_{10}$ , ki jo želimo vgraditi v SLN, bomo pripravili z redukcijo oksidirane oblike z askorbilpalmitatom ali askorbinsko kislino pod ustreznimi pogoji. Za izdelavo SLN bomo uporabili metodo soniciranja taline lipida v vodno raztopino stabilizatorja. Proučevali bomo vpliv sestave formulacije in parametrov izdelave, kot so čas soniciranja, količina lipida in sestava in koncentracija stabilizatorjev v disperziji na hidrodinamski premer in PDI izdelanih delcev. Spremljali bomo fizikalno stabilnost SLN in kemično stabilnost vgrajene KAS. Za vrednotenje velikosti izdelanih SLN bomo uporabili PCS, za vrednotenje njihovega ZP pa lasersko Dopplerjevo anemometrijo. Za določanje koencima  $Q_{10}$  bomo uporabili HPLC metodo, ki bo omogočala sočasno določanje oksidirane in reducirane oblike koencima  $Q_{10}$ . S HPLC analizo bomo določili celokupno vsebnost koencima  $Q_{10}$  v formulacijah in učinkovitost vgrajevanja KAS v SLN ter spremljali, kako temperatura vpliva na prehajanje oksidirane v reducirano obliko koencima  $Q_{10}$  in na stabilnost reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  v formulaciji SLN tekom njenega shranjevanja pri različnih pogojih (4 °C, sobna temperatura, 40 °C).

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Sestavine

- Gliceril dibehenat (Compritol 888 ATO; Gattefossé, Francija)  
SLN smo izdelovali z lipidom Compritolom 888, ki je glicerol behenat. Je v obliki belega, fino uprašenega praška, ki je izredno inerten in kompatibilen z drugimi sestavinami. Compritol 888 ima visoko tališče, zato je primeren za izdelavo dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem v trdnih peroralnih farmacevtskih oblikah in kozmetičnih izdelkih (19).
- Polisorbat 80, polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat (Tween 80; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Poloksamer 188 (Lutrol<sup>®</sup>F 68; Basf, Nemčija)
- 6-O-palmitoil-L-askorbinska kislina, C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>, M<sub>r</sub> 414,53 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- L-askorbinska kislina, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Koencim Q<sub>10</sub> (Kaneka Corporation, Japonska) (slika 5)



Slika 5: Kemijska struktura koencima Q<sub>10</sub> (20)

- Acetonitril, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N; Chromasolv, for HPLC, gradient grade; M<sub>r</sub> 41,05 g/mol; (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- n-heksan; 95 %, PA-ACS, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, M<sub>r</sub> 86,18 g/mol (Panreac Quimica, Španija )
- Metanol, Cromasolv for HPLC > 99,9 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija )
- Brezvodni etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; puriss p.a., Reag. Ph Eur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija )
- MilliQ voda, H<sub>2</sub>O (Fakulteta za farmacijo)

- Tetrahidrofuran, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O; Chromasolv, for HPLC M<sub>r</sub> 72,1 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

### 3.1.2 Naprave in pribor

- Naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS (PCS naprava) (Malvern, Velika Britanija)
- Polistirenske kivete (Sarstedt AG & Co, Nemčija)
- Kivete za merjenje ZP, DTS 1061 (Malvern, Velika Britanija)
- Ultracentrifuga Thermo Scientific WX Ultra 100 (Waltham, Massachusetts, ZDA)
- Ultrazvočna sonda (Ultrasonic processor Cole Parmer, Velika Britanija)
- Centrifuga, Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Avtomatske pipete 100-1000 ul, 10-100 ul (Biohit, Finska; Eppendorf, Nemčija)
- Precizna tehtnica (Mettler toledo, Švica)
- Precizna tehtnica (Mettler toledo AG245, Švica)
- Vorteks Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Vodna kopel (Gorenje, Slovenija)
- Kuhalnik (Končar, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonis (Iskra Pio, Slovenija)
- Digestorij (Waldner Electronics GmbH, Nemčija)
- Parafilm (Parafilm<sup>®</sup>, ZDA)
- Aluminijasta folija
- HPLC sistem 1100 series (Agilent Technologies, ZDA):
  - kvarтерна črpalka
  - avtomatski vzorčevalnik
  - termostat za kolono
  - UV-VIS detektor
  - programska oprema ChemStation
  - kolona: Synergi Hydro C18, 5 μm, 250 x 4,0 mm (Phenomenex, ZDA)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava raztopin stabilizatorjev

Raztopine stabilizatorjev smo izdelali iz kombinacije poloksamera 188 in polisorbata 80 v različnih masnih razmerjih, saj koncentracija in masno razmerje stabilizatorjev v raztopini vplivata na fizikalne lastnosti izdelanih nanodelcev. V tehtič smo natančno natehtali 1200,0 mg poloksamera 188 in 600,0 mg polisorbata 80, ki smo ju nato prenesli v 100 mL merilno bučko in raztopili v prečiščeni vodi (21). Bučko smo zatesnili s pokrovčkom in stresali, da sta se stabilizatorja povsem raztopila in je nastala bistra raztopina. Koncentracija poloksamera 188 v tako pripravljene raztopini je znašala 12 mg/mL, koncentracija polisorbata 80 pa 6 mg/mL. Po enakem postopku smo pripravili še naslednje raztopine poloksamera 188 in polisorbata 80, katerih sestava je prikazana v preglednici II.

Preglednica II: Sestava vodnih raztopin stabilizatorjev z različnimi koncentracijami poloksamera 188 in polisorbata 80.

Raztopina	Poloksamer 188 [mg/mL]	Polisorbat 80 [mg/mL]
1	12	6
2	6	3
3	3	1
4	6	0
5	0	3

### 3.2.2 Izdelava praznih SLN

SLN smo pripravili z metodo homogeniziranja taline lipidov v vodno fazo stabilizatorja z uporabo ultrazvočne sonde. Neposredno v centrifugirko smo natančno natehtali približno 24,0 mg lipida (Compritol 888) in ga raztalili v vodni kopeli s temperaturo 85-90 °C. Na isto temperaturo smo v vodni kopeli segreti tudi raztopino stabilizatorjev, ki smo jo ločeno dali v centrifugirko in zatesnili, da ni izhlapevala. Pred soniciranjem smo konico sonde segreti tako, da smo jo za nekaj sekund potopili v čašo z vročo vodo, saj bi hladna konica sonde lahko povzročila ohlajanje vzorca in strjevanje lipidov na konici sonde. Neposredno pred soniciranjem smo k talini lipida odpipetirali 2 mL segrete raztopine stabilizatorjev, konico sonde (~1 cm) potopili v zmes in takoj začeli s soniciranjem. Sonicirali smo 30 s,

amplituda pa je bila konstantno nastavljena na 30 %. Takoj po prenehanju soniciranja smo vročo emulzijo taline lipidov v raztopini stabilizatorjev (emulzija tipa O/V) v centrifugirki zatesnili s pokrovčkom in jo postavili v kadičko z ledom, kjer smo jo pustili približno 5 min, da so se lipidi strdili in da je nastala disperzija SLN.

Tekom raziskovalnega dela smo spreminjali sestavo formulacije in parametre izdelave SLN. Proučevali smo vpliv časa soniciranja (60 s, 75 s, 90 s), vpliv vsebnosti lipidov v formulaciji (24 mg/mL, 30 mg/mL, 36 mg/mL, 48 mg/mL disperzije) in vpliv sestave in koncentracije vodne raztopine stabilizatorjev. Cilj razvoja je bila fizikalno stabilna disperzija lipidnih nanodelcev s karseda homogeno porazdelitvijo velikosti delcev.

### 3.2.3 Vrednotenje SLN

Nanodelcem, ki smo jih pripravili, smo z napravo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni hidrodinamski premer, PDI in ZP.

Vzorec SLN za merjenje povprečne velikosti delcev smo pripravili tako, da smo v kiveto odpipetirali približno 1 mL raztopine stabilizatorja, ki je služil kot disperzni medij za SLN in 3 kapljice disperzije SLN. Tako pripravljen vzorec smo v kiveti dobro premešali. Po končani meritvi velikosti smo vzorec iz kivete za merjenje velikosti napolnili v 2 mL brizgo in ga prenesli v kiveto za merjenje ZP.

Velikost SLN smo izmerili takoj po izdelavi posamezne formulacije in nato vsakih 7 dni v obdobju štirih tednov. Tako smo spremljali, ali so disperzije SLN fizikalno stabilne. Tekom staranja smo vzorce SLN shranjevali v hladilniku pri 4 °C v 2 mL mikrocentrifugirkah.

Pogoji meritev (povprečni premer, PDI):

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,8872$  mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«):  $\lambda = 633$  nm
- kot merjenja: 173°
- kiveta: DTS0012
- število meritev: 1



#### Pogoji meritev (ZP):

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,8872$  mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- dielektrična konstanta disperznega medija:  $\varepsilon = 78,5$  (voda)
- model: Smoluchowski
- celica: DTS 1061, kapilarna celica
- število meritev: 3

### **3.2.4 Redukcija koencima Q<sub>10</sub> v prisotnosti askorbilpalmitata/askorbinske kisline**

#### Ugotavljanje optimalnih pogojev za redukcijo koencima Q<sub>10</sub>

Za vgrajevanje koencima Q<sub>10</sub> v SLN smo želeli pripraviti raztopino reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub>, zato smo proučili vpliv eksperimentalnih pogojev na potek redukcije. V ta namen smo pripravili raztopine koencima Q<sub>10</sub> in askorbilpalmitata oziroma askorbinske kisline v različnih masnih razmerjih, pri čemer smo uporabili različna topila, kot sta absolutni etanol in metanol. Pripravljene raztopine smo izpostavili različnim temperaturnim pogojem za 14 dni. Želeli smo oceniti, kakšen je vpliv razmerja med koencimom Q<sub>10</sub> in reducentom, vpliv temperature in vpliv topila na nastajanje reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> in kako se pri tem delež oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> spreminja. Delež reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> smo izračunali kot delež glede na celokupno vrednost reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub>, pri čemer smo vrednost reducirane oblike v izračunu pomnožili s faktorjem 3,29. Za lažji pregled je sestava raztopin koencima Q<sub>10</sub>, ki smo jih pripravili, podana v preglednici III.

Preglednica III: Sestava raztopin s koencimom Q<sub>10</sub> in pogoji, pri katerih je potekala redukcija.

Koencim Q <sub>10</sub> [mg/mL]	Askorbilpalmitat [mg/mL]	Askorbinska kislina [mg/mL]	Vrsta topila	Temperatura [° C]
1	1	-	Absolutni etanol	60
1	1	-	Metanol	60
1	5	-	Absolutni etanol	60
1	0,1	-	Absolutni etanol	60
1	-	1	Absolutni etanol	60
0,2	0,2	-	Absolutni etanol	25
0,2	0,2	-	Absolutni etanol	40
0,2	0,2	-	Absolutni etanol	60
0,2	0,2	-	Absolutni etanol	80

Za izdelavo SLN smo pripravili raztopino reduciranega koencima Q<sub>10</sub> po naslednjem postopku: V 2 mL bučki smo pripravili raztopino koencima Q<sub>10</sub> in askorbilpalmitata, tako da smo v tehtalni čolniček natančno natehtali približno 24,0 mg koencima Q<sub>10</sub> in 24,0 mg askorbilpalmitata. Kvantitativno smo ju prenesli v merilno bučko in dopolnili z absolutnim etanolom do oznake. Bučko smo zaprli s pokrovčkom in za nekaj trenutkov postavili v ultrazvočno kadičko, da je nastala bistra raztopina s koncentracijo 12 mg/mL koencima Q<sub>10</sub> in 12 mg/mL askorbilpalmitata. Bučko smo nato zatesnili s parafilmom in jo postavili v vodno kopel s temperaturo 60 °C ter vzorec inkubirali 11 dni. Po 11 dneh smo določili vsebnost reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v raztopini tako, da smo v vialo odpipetirali 5 µL raztopine in dodali 595 µL absolutnega etanola. Tako smo pripravili raztopino s celokupno koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> 100 µg/mL, ki smo jo analizirali s HPLC.

### 3.2.5 Izdelava SLN s koencimom Q<sub>10</sub>

#### 3.2.5.1 Izdelava SLN z oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub>

Izdelali smo tri serije SLN, ki so vsebovale 10 % (m/m) koencima Q<sub>10</sub>. Najprej smo si pripravili raztopino koencima Q<sub>10</sub> v absolutnem etanolu, tako da smo v 2 mL merilno bučko natančno natehtali približno 48,0 mg koencima Q<sub>10</sub> in do oznake dopolnili z

absolutnim etanolom. Bučko smo zatesnili in za nekaj trenutkov postavili v ultrazvočno kadičko, da je nastala bistra raztopina.

SLN s koencimom Q<sub>10</sub> smo izdelali tako, da smo v centrifugirko natehtali 43,2 mg lipida in ga raztalili na vodni kopeli s temperaturo 85-90 °C. V talino lipida smo odpipetirali 200 µL pripravljene raztopine koencima Q<sub>10</sub>. Nato smo dodali 2 mL raztopine poloksamera 188 (6 mg/mL) in polisorbata 80 (3 mg/mL), ki smo jo predhodno na vodni kopeli segreti na isto temperaturo. Emulzijo smo sonicirali 75 s. Po soniciranju smo vročo nanoemulzijo postavili v kadičko z ledom za približno 5 min, da so se lipidi strdili in so nastali SLN. Tako smo pripravili disperzijo SLN z znano koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> (2,4 mg/mL). Takoj po izdelavi smo delcem izmerili povprečni premer, PDI in ZP. Omenjene parametre smo izmerili še po 7 in 14 dneh, medtem pa smo vzorce SLN shranjevali v hladilniku pri 4 °C.

### 3.2.5.2 Izdelava SLN z reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>

Tri serije SLN s 5 % (m/m) koencima Q<sub>10</sub> smo pripravili z raztopino koencima Q<sub>10</sub>, ki smo ga najprej reducirali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.4. Nanodelce smo izdelali po enakem postopku kot nanodelce z oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub>, le da smo v tem primeru uporabili raztopino, ki smo jo dobili po 11 dneh inkubiranja koencima Q<sub>10</sub> v prisotnosti askorbilpalmitata. Tako smo pripravili disperzijo SLN z znano koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> (1,2 mg/mL).

### 3.2.6 Določanje celokupne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN

Disperzijam SLN smo določali celokupno vsebnost koencima Q<sub>10</sub>, tako da smo v 2 mL merilno bučko odpipetirali 100 µL disperzije SLN in do oznake volumna dopolnili z mobilno fazo, ki smo jo uporabili za HPLC (poglavje 3.2.9.1). Bučko smo zatesnili in jo 1 min segrevali v vodni kopeli s temperaturo ~70 °C, da smo dobili bistro raztopino. Zatem smo raztopino hitro ohladili v kadički z ledom, kjer smo vzorec pustili ~5 min. Vzorce smo nato pri sobni temperaturi dopolnili z mobilno fazo do oznake, da smo nadomestili topilo, ki je zaradi segrevanja vzorcev izhlapelo. Vsebine bučke smo pretresli in prelili v 2 mL mikrocentrifugirke. Vzorce smo centrifugirali 15 min pri 15.000 obratih/min in 20 °C. Po

centrifugiranju smo v vialo odpipetirali 600  $\mu$ L supernatanta in ga analizirali s HPLC. Celokupno vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN smo določali v treh paralelkah.

Vsebnost reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN smo določili na podlagi podatka o vsebnosti reducirane in oksidirane oblike v raztopini koencima Q<sub>10</sub> in askorbilpalmitata, ki smo jo uporabili v postopku izdelave SLN (poglavje 3.2.5.2). Takoj po izdelavi SLN in v vnaprej določenih časovnih točkah (7, 14, 21, 28 dni) smo s HPLC analizo določili vsebnost reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih disperzij SLN. Na podlagi rezultatov HPLC analize smo izračunali, kolikšen delež reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> glede na začetno količino je prisoten v posameznem vzorcu SLN.

### 3.2.7 Spremljanje stabilnosti koencima Q<sub>10</sub> v formulaciji SLN pri različnih pogojih

Takoj po izdelavi SLN, ki smo jih pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5.2 smo vse tri paralelke SLN združili, pomešali in razdelili na tri alikvote po 1,5 mL. Alikvote smo zaprli v 2 mL mikrocentrifugirke, ki smo jih dodatno zatesnili še s parafilmom, ter jih shranili pri treh različnih pogojih shranjevanja: 40 °C, 4 °C in sobna temperatura. Vsakih 7 dni v obdobju 28 dni smo izmerili povprečni premer, PDI in ZP nanodelcev ter vsebnost oksidirane in reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu.

### 3.2.8 Učinkovitost vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN

Učinkovitost vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN smo določili posredno na podlagi določanja količine nevgrajenega koencima Q<sub>10</sub>. V dve mikrocentrifugirki smo odpipetirali 1,5 mL disperzije SLN z 10 % koencima Q<sub>10</sub> in 5 h centrifugirali pri 50.000 obratih/min in 4 °C. Dobili smo bister supernatant in oborino, kar pomeni, da so se SLN učinkovito ločili od disperznega medija. S pipeto smo odvzeli s treh različnih globin 120  $\mu$ L supernatanta in ga odpipetirali v inserte in dali v vialo ter koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> določili s HPLC analizo. Učinkovitost vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN smo izračunali po enačbi 1.

Enačba 1:

$$\text{učinkovitost vgrajevanja [\%]} = \frac{m(\text{celotnega koencima Q}_{10}) - m(\text{nevgrajenega koencima Q}_{10})}{m(\text{celotnega koencima Q}_{10})} \times 100\%$$

Preverili smo tudi, kakšen je izkoristek ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz SLN v topilo tako, da smo v 2 mL merilo bučko odpipetirali 150 µL disperzije praznih SLN, katerim smo dodali 100 µl raztopine koencima Q<sub>10</sub> v heksanu s koncentracijo 1,8 mg/mL in dopolnili do oznake volumna z mobilno fazo za HPLC (poglavje 3.2.9.1). Vsebino bučke smo pretresli in segrevali ~ 1 min v vodni kopeli s temperaturo ~ 70 °C, da so se lipidi raztopili, nato pa vsebino bučke takoj ohladili v kadički z ledom. Vzorce smo nato pri sobni temperaturi dopolnili z mobilno fazo do oznake, da smo nadomestili topilo, ki je zaradi segrevanja vzorcev izhlapelo. Vsebino bučk smo prelili v 2 mL mikrocentrifugirke in centrifugirali 15 min pri 15.000 obratih/min in 20 °C. Odpipetirali smo 600 µL supernatanta in koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> določili s HPLC analizo. Oborino na dnu mikrocentrifugirke smo resuspendirali v mobilni fazi in jo prenesli nazaj v isto bučko, kjer je bil zaostanek oborjenih lipidov. Po enakem postopku, kot je opisan zgoraj, smo ponovno pripravili vzorec, ki smo ga centrifugirali in po centrifugiranju dobili drugi supernatant, ki smo ga prav tako analizirali s HPLC. Tako smo ugotovili, kakšen delež koencima Q<sub>10</sub> zaostane po prvem centrifugiranju v lipidni fazi.

### 3.2.9 Določanje koencima Q<sub>10</sub> s HPLC metodo

Za določanje koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih SLN smo uporabili HPLC metodo z naslednjimi parametri:

kolona: Synergi Hydro, C18, 5 µm, 250 x 4,0 mm

temperatura kolone: 25 °C

mobilna faza: acetonitril/tetrahidrofuran/voda (55/40/5; v/v/v)

pretok mobilne faze: 1,5 mL/min

volumen injiciranja: 15 µL

valovna dolžina detekcije: 280 nm

čas analize: 12 min

retencijski čas ( $t_R$ ): cca. 9,4 min (reduciran koencim Q<sub>10</sub>), 10,4 min (oksidiran koencim Q<sub>10</sub>)

### *3.2.9.1 PRIPRAVA MOBILNE FAZE, STANDARDNIH RAZTOPIN IN UMERITVENE PREMICE KOENCIMA Q<sub>10</sub>*

#### Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, tetrahidrofurana in vode v razmerju 55/40/5 (v/v/v). Pred uporabo smo steklenico z mobilno fazo za približno 5 min postavili v ultrazvočno kadičko, da smo jo razplinili.

#### Priprava standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> (ubidekarenona)

Natančno smo natehtali približno 1,0 mg referenčnega standarda ubidekarenona in ga raztopili v absolutnem etanolu. Tako smo pripravili raztopino s koncentracijo 1,0 mg/mL, ki smo jo nadalje razredčili z brezvodnim etanolom, tako da je bila koncentracija nove raztopine približno 50 µg/mL.

Za izdelavo umeritvene premice smo pripravili sedem raztopin različnih koncentracij koencima Q<sub>10</sub>. Prva raztopina s koncentracijo 50 µg/mL, ki smo jo pripravili v začetku, je bila osnovna raztopina, ki smo jo nadalje redčili. Vzeli smo alikvote po 600, 700, 750, 800, 850 in 900 µL osnovne raztopine ter jih v 1 mL bučkah z metanolom redčili do oznake. Na ta način smo pripravili serijo raztopin standarda s koncentracijo 30, 35, 37,5, 40, 42,5 in 45 µg/mL. 600 µL tako pripravljenih raztopin smo odpipetirali v vialo in analizirali s HPLC. Vsak vzorec smo analizirali trikrat.

#### Priprava standardne raztopine askorbilpalmitata

Natančno smo natehtali približno 1,0 mg askorbilpalmitata in ga raztopili v metanolu. Tako smo pripravili raztopino z znano koncentracijo 1,0 mg/mL, ki smo jo nadalje razredčili z metanolom tako, da je bila koncentracija nove raztopine približno 50 µg/mL.

### 3.2.9.2 VREDNOTENJE HPLC METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q<sub>10</sub>

V diplomski nalogi HPLC metode za analizo koencima Q<sub>10</sub> nismo razvijali sami, temveč smo uporabljali že predhodno razvito metodo. V okviru validacije metode priprave vzorca smo preverjali nekatere validacijske parametre, kot so selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost.

#### **Selektivnost**

ICH selektivnost definira kot sposobnost oceniti oziroma razlikovati med analitom, ki je v prisotnosti drugih komponent, kot so npr. nečistote, razpadni produkti in pomožne snovi (22). Naš namen je bil, da razlikujemo in kvantificiramo odziv koencima Q<sub>10</sub> od drugih komponent, ki so bile prisotne v vzorcu. Za preverjanje selektivnosti HPLC metode smo pripravili 2 vzorca. V dve 1 mL mikrocentrifugirki smo odpipetirali 150 µL acetonitrila in 150 µL tetrahidrofurana in 60 µL disperzije praznih SLN. V prvo mikrocentrifugirko smo odpipetirali še 20 µL standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> v metanolu s koncentracijo 1 mg/mL in 20 µL standardne raztopine askorbilpalmitata v metanolu s koncentracijo 1 mg/mL. V drugo mikrocentrifugirko, ki je služila kot slepi vzorec, pa smo odpipetirali 40 µL metanola, ki je bil topilo v obeh standardnih raztopinah. Obe mikrocentrifugirki smo zatesnili in segrevali na vodni kopeli s temperaturo približno 70 °C, da so se SLN raztopili. Nato smo ju postavili v kadičko z ledom za ~5 min. Ko sta se disperziji ohladili, so se lipidi oborili in vzorca smo centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in 20 °C. Po centrifugiranju smo iz mikrocentrifugirk v viali odpipetirali po 600 µL supernatanta za HPLC analizo. Primerjali smo dobljena kromatograma obeh vzorcev SLN, pri čemer je eden služil kot slepi vzorec, drugi pa je vseboval dva analita (koencim Q<sub>10</sub> in askorbilpalmitat).

#### **Linearnost**

Linearnost analizne metode je sposobnost, da znotraj določenega intervala daje rezultate, ki so premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu (22). V ta namen smo v 2 mL merilnih bučkah pripravili tri različne vzorce SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub> tako, da smo v bučke odpipetirali 50 µL, 100 µL in 150 µL disperzije SLN in do oznake volumna dopolnili s pripravljeno mobilno fazo za HPLC. Bučke smo zatesnili in postavili na vodno

kopel s temperaturo  $\sim 70$  °C, da so se lipidi raztopili, nato pa smo vzorce postavili v kadičko z ledom, da so se lipidi oborili. Topilo, ki je izhlapelo med segrevanjem, smo nadomestili z mobilno fazo, tako da smo vzorce dopolnili do oznake volumna. Nato smo jih prelili iz bučk v 2 mL mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 15 min pri 15.000 obratih/min in 20 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali v vialo in ga analizirali s HPLC. Iz odzivov, ki so bili premosorazmerni s koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> v supernatantu, smo izdelali umeritveno premico z enačbo:  $A = k * c$  (koencima Q<sub>10</sub>) + n. Korelacijo med odzivom in koncentracijo smo ocenili na podlagi Pearsonovega koeficienta (r).

### **Natančnost**

Natančnost je definirana kot stopnja skladanja med paralelnimi serijami meritev istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Ponovljivost pa je natančnost pri enakih delovnih pogojih v krajšem časovnem intervalu (22, 23). Merilo za natančnost je standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD).

Določali smo ponovljivost priprave vzorcev SLN s koencimom Q<sub>10</sub> v 3 paralelkah. V 2 mL merilne bučke smo odpipetirali 150 µL oziroma 200 µL disperzije SLN s 5 % koencimom Q<sub>10</sub> in jih dopolnili do oznake volumna z mobilno fazo za HPLC. Vzorce smo pripravili po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.2.6. S HPLC analizo supernatantov smo dobili odzive pikov koencima Q<sub>10</sub> treh paralel in iz povprečne vrednosti treh odzivov izračunali SD in RSD. Kot mejo sprejemljivosti smo določili  $RSD \leq 10$  %.

### **Točnost**

Pri vrednotenju točnosti določamo odstopanje povprečja dobljenih rezultatov od dejanske vrednosti (22). Izražamo jo kot odstotek ujemanja med izračunanimi in dejanskimi vrednostmi. Točnost smo podali na osnovi meritev linearnosti, pri čemer smo izračunali odstotek ujemanja dobljenih koncentracij koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN z izračunanimi koncentracijami koencima Q<sub>10</sub>.



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Izdelava praznih SLN

S spreminjanjem sestave formulacije in pogojev izdelave praznih SLN smo želeli izdelati fizikalno stabilno disperzijo SLN s čim manjšimi delci in karseda monodisperzno porazdelitvijo njihovih velikosti.

#### 4.1.1 Izdelava SLN s spreminjanjem časa soniciranja

Eksperimentalno delo smo pričeli z izdelavo SLN z lipidom Compritolom 888 in začetno koncentracijo stabilizatorjev (12 mg/mL poloksamera 188 in 6 mg/mL polisorbata 80), pri čemer smo spreminjali čas soniciranja emulzije. Ugotovili smo, da čas soniciranja vpliva na povprečni premer izdelanih delcev in na porazdelitev velikosti delcev v vzorcu (preglednica IV). Pri času soniciranja 30 s so bili delci največji, njihova porazdelitev velikosti pa polidisperzna. S podaljševanjem časa soniciranja smo v sistem vnašali vedno več energije, zato sta se povprečni premer delcev in PDI najprej zmanjševala, nato pa je prišlo zaradi prevelikega vnosa energije do povečevanja povprečne velikosti delcev in njihove polidisperznosti. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da je optimalen čas soniciranja 75 s.

Preglednica IV: Vpliv časa soniciranja na povprečni premer in PDI SLN takoj po izdelavi.

Čas soniciranja [s]	d [nm]	PDI
30	125,6	0,515
45	118,4	0,504
60	83,3	0,453
75	60,5	0,349
90	65,1	0,280
105	82,1	0,436

Fizikalno stabilnost vzorcev SLN, ki smo jih pripravili z različnimi časi soniciranja emulzij, smo spremljali z merjenjem povprečne velikosti in PDI vsak teden v obdobju 4 tednov (preglednica V). Opazovana parametra se tekom shranjevanja vzorcev nista bistveno spreminjala, kar kaže na fizikalno stabilnost izdelanih disperzij. Razlog za stabilnost je razmeroma visoka koncentracija stabilizatorjev (uporabili smo 24 mg

poloksamera 188 in 12 mg polisorbata 80 ter 24 mg lipida), ki smo jo uporabili za izdelavo SLN in ki ima ključen vpliv na povprečni premer izdelanih SLN in na fizikalno stabilnost koloidnega sistema.

Preglednica V: Spreminjanje povprečnega premera in PDI SLN v formulacijah z različnim časom soniciranja tekom shranjevanja pri 4 °C .

Čas soniciranja [s]	7 dni		14 dni		21 dni		28 dni	
	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI
30	115,5	0,754	129,8	0,561	127,2	0,792	135,4	0,912
45	120,0	0,521	115,3	0,779	113,3	0,778	128,4	0,845
60	87,8	0,445	84,5	0,64	83,9	0,661	82,2	0,609
75	60,4	0,354	62,2	0,342	63,8	0,379	60,6	0,426
90	66,1	0,299	68,3	0,436	66,7	0,364	69,3	0,392

#### 4.1.2 Izdelava SLN s spreminjanjem količine lipida v disperziji

V tem delu diplomske naloge smo želeli povečati koncentracijo SLN v disperziji, zato smo proučili, kako povečevanje količine lipida vpliva na povprečni premer in polidisperznost SLN, ki smo jih izdelali s 75 s soniciranja emulzije. V ta namen smo pripravili disperzije SLN, ki so se razlikovale le glede na količino lipida v vzorcu. Rezultati meritev kažejo, da se s povečevanjem količine lipida povprečni premer delcev povečuje, medtem ko se PDI skoraj ne spreminja (preglednica VI). Za kasnejšo izdelavo SLN s koencimom Q<sub>10</sub> smo izbrali formulacijo z vsebnostjo lipida v disperziji 24 mg/mL, kjer je bila velikost SLN majhna in je imela disperzija SLN dvakrat večjo koncentracijo lipida kot pri najnižji proučevani koncentraciji.

Preglednica VI: Spreminjanje povprečnega premera in PDI SLN z naraščanjem količine lipida v disperziji.

c(Compritol 888) [mg/mL]	d [nm]	PDI
12	60,5	0,349
24	96,0	0,255
30	125,0	0,247
36	162,5	0,286
48	207,0	0,252

Formulacijam SLN, ki smo jih pripravili s spreminjanjem količine lipida, smo vsak teden v obdobju 4 tednov pomerili povprečni premer delcev in PDI (preglednica VII). Rezultati meritev kažejo, da tekom shranjevanja formulacije SLN z različnimi količinami lipida ostajajo stabilne, saj se povprečni premer delcev in PDI v 4 tednih nista bistveno spremenila. Tekom shranjevanja vzorcev smo zaznali le minimalno povečanje povprečnega premera in PDI delcev.

Preglednica VII: Spreminjanje povprečnega premera in PDI SLN v formulacijah z različno količino lipida tekom shranjevanja pri 4 °C.

c (Compritol 888) [mg/mL]	7 dni		14 dni		21 dni		28 dni	
	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI	d [nm]	PDI
12	60,4	0,354	62,2	0,342	63,8	0,379	60,6	0,426
24	97,6	0,260	98,3	0,256	98,5	0,265	100,5	0,277
30	128,4	0,256	131,1	0,252	135,4	0,260	139,7	0,265
36	184,2	0,308	201,7	0,281	208,9	0,282	224,8	0,308
48	209,5	0,313	216,0	0,333	217,6	0,285	216,4	0,274

#### 4.1.3 Izdelava SLN s spreminjanjem sestave in koncentracije stabilizatorjev

V tem delu diplomske naloge smo želeli preučiti vpliv koncentracije in sestave raztopine stabilizatorjev na povprečni premer in PDI izdelanih nanodelcev. SLN smo pripravili po recepturi, ki je vsebovala 24 mg/mL lipida, pri čemer smo emulzijo sonicirali 75 s, spreminjali pa smo količino in sestavo raztopine stabilizatorjev poloksamera 188 in polisorbata 80. Rezultati kažejo, da večja količina stabilizatorja vodi v manjšo povprečno velikost delcev in PDI (preglednica VIII), kar pomeni, da večja kot je koncentracija stabilizatorja v disperziji, prej in učinkoviteje lahko molekule stabilizatorjev zasedejo vse novonastale površine delcev. Ko smo koncentracijo stabilizatorjev v disperzijah SLN zmanjšali, se je povprečna velikost delcev povečala, kar dokazuje, da je koncentracija stabilizatorja bistveni parameter, ki vpliva na povprečno velikost SLN. Za izdelavo formulacije SLN s koencimom Q<sub>10</sub> smo izbrali tisto z najmanjšo količino stabilizatorjev poloksamera 188 (6 mg/mL) in polisorbata 80 (3 mg/mL), s katero smo pri izbranih eksperimentalnih pogojih izdelali najmanjše nanodelce z ozko porazdelitvijo velikosti

delcev. Želeli smo formulacijo s čim nižjo vsebnostjo stabilizatorjev, saj so te sestavine pogosto vzrok za pojav draženja in alergijskih reakcij pri uporabi kozmetičnih izdelkov.

Preglednica VIII: Vpliv sestave in koncentracije stabilizatorjev na povprečni premer in PDI SLN.

<b>c</b> (poloksamer 188) [mg/mL]	<b>c</b> (polisorbat 80) [mg/mL]	<b>d</b> [nm]	<b>PDI</b>
12	6	96,0	0,255
6	3	136,3	0,188
3	1,5	288,2	0,252
6	0	247,8	0,214
0	3	339,4	0,253

Formulacijam SLN, ki smo jih pripravili z različno sestavo in koncentracijo stabilizatorjev, smo vsakih 7 dni v obdobju 4 tednov izmerili povprečni premer delcev in PDI (preglednica IX). Rezultati meritev kažejo minimalne spremembe v velikosti delcev in PDI v obdobju shranjevanja, kar dokazuje, da so bile izdelane disperzije SLN fizikalno stabilne. Spremembe v povprečnem premeru in PDI tekom shranjevanja so bile najizrazitejše pri uporabi stabilizatorja polisorbata 80, kjer je bila tudi koncentracija stabilizatorja najnižja. Videz tega vzorca se je razlikoval od ostalih disperzij SLN, saj je bila disperzija mlečnega videza v nasprotju z ostalimi disperzijami, ki so bile opalescentne. Mlečen videz je bil posledica večje velikosti delcev v vzorcu.

Preglednica IX: Spreminjanje povprečne velikosti in PDI SLN v formulacijah z različno sestavo in koncentracijo stabilizatorjev tekom shranjevanja pri 4 °C.

<b>c</b> (poloksamer 188) [mg/mL]	<b>c</b> (polisorbat 80) [mg/mL]	<b>7 dni</b>		<b>14 dni</b>		<b>21 dni</b>		<b>28 dni</b>	
		<b>d</b> [nm]	<b>PDI</b>	<b>d</b> [nm]	<b>PDI</b>	<b>d</b> [nm]	<b>PDI</b>	<b>d</b> [nm]	<b>PDI</b>
<b>6</b>	<b>3</b>	141,6	0,207	143,4	0,226	139,0	0,201	160,2	0,262
<b>3</b>	<b>1,5</b>	300,0	0,284	295,3	0,352	299,8	0,359	321,7	0,287
<b>6</b>	<b>0</b>	259,8	0,200	260,0	0,221	270,8	0,214	269,2	0,199
<b>0</b>	<b>3</b>	380,0	0,301	403,2	0,395	384,6	0,315	418,9	0,456

## 4.2 Izdelava SLN s koencimom Q<sub>10</sub>

### 4.2.1 Izdelava SLN z 10 % koencima Q<sub>10</sub>

Povprečna velikost, PDI in ZP SLN, ki smo jih izdelali z 10 % koencima Q<sub>10</sub>, so prikazani v preglednici X.

Preglednica X: Spreminjanje povprečnega premera, PDI in ZP SLN z 10 % koencima Q<sub>10</sub> s časom.

t [dnevi]	d [nm]	PDI	ZP [mV]
0	193,5	0,302	-15,8
7	211,7	0,327	-14,1
14	204,1	0,347	-16,4

Posledica vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v delce je majhen porast povprečnega premera delcev v primerjavi s praznimi delci (iz 136,3 nm na 193,5 nm). Izdelani SLN s koencimom Q<sub>10</sub> so bili fizikalno stabilni, saj se je njihova velikost tekom shranjevanja disperzije SLN v hladilniku minimalno spreminjala. ZP delcev se tekom shranjevanja ni bistveno spreminjal, kar v povezavi s povprečno velikostjo delcev nakazuje na stabilnost koloidne disperzije. ZP praznih SLN, ki smo jih pripravili po enakem postopku, je bil -21,1 mV, medtem ko so imeli SLN ob vgrajevanju koencima Q<sub>10</sub> nekoliko manj negativen ZP, in sicer -15,8 mV. Kljub temu, da je prišlo do rahle spremembe vrednosti ZP, je bila disperzija SLN kljub temu stabilna vsaj 4 tedne.

### 4.2.2 Izdelava SLN z reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>

Izdelali smo SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub>, ki smo ga pred izdelavo nanodelcev reducirali v prisotnosti askorbilpalmitata. Redukcija koencima Q<sub>10</sub> v prisotnosti reducenta askorbilpalmitata je potekla pri inkubiranju raztopine na 60 °C po približno tednu dni. Pred vgrajevanjem smo s HPLC analizo določili delež reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v raztopini in ta je znašal 84,9 %. Po izdelavi SLN s koencimom Q<sub>10</sub> smo izmerili povprečni premer, PDI in ZP nanodelcev (preglednica XI).

Preglednica XI: Povprečnega premer, PDI in ZP SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub>

	d [nm]	PDI	ZP [mV]
SLN s 5 % koencima Q <sub>10</sub>	155,4	0,246	-14,9

SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub> so imeli malce manjši povprečni premer delcev (155,4 nm) kot pa SLN z 10 % koencima Q<sub>10</sub> (193,5 nm). Tudi ZP je bil v primeru SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub> le malo manj negativen.

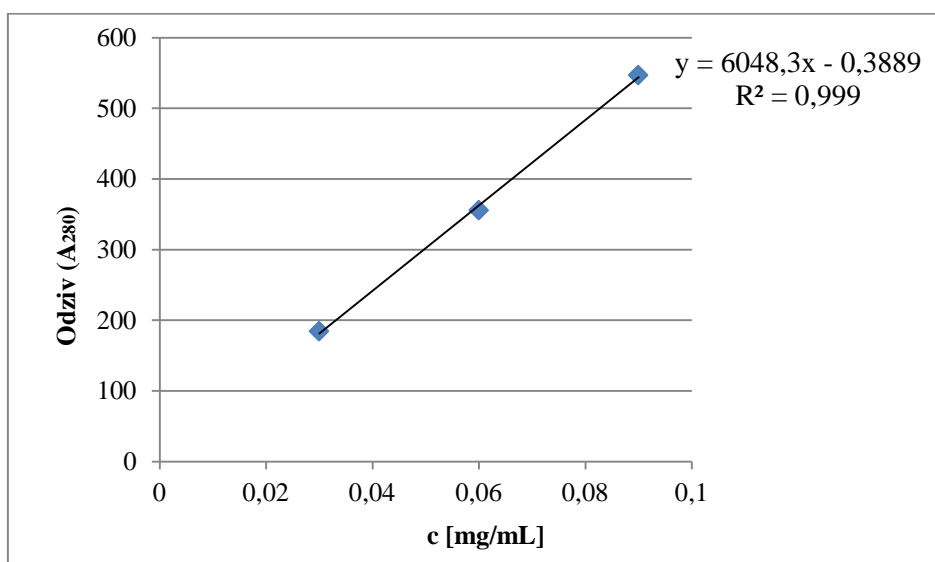
### 4.3 Določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN

Pred določanjem vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu SLN smo želeli preveriti, ali je izbrana HPLC metoda priprave vzorca za naše vzorce ustrezna, da bomo dobili zanesljive rezultate.

Vrednotenje HPLC metode je zaključen postopek v razvoju analizne metode, ki potrdi ustreznost in zanesljivost metode za analitsko rabo. Z ovrednotenjem torej potrdimo, da je analitska metoda primerna za analizo izbrane substance v preiskovanem vzorcu in da nam poda zanesljive rezultate. Ne glede na to, ali smo analizno metodo razvili sami ali pa jo izvajamo po navodilih tujih institucij, jo je potrebno ovrednotiti. Napotke za vrednotenje najdemo v farmakopejah in v smernicah Mednarodne konference o harmonizaciji (International Conference on Harmonisation, ICH) za validacijo analiznih metod. V primeru spremembe analizne metode je potrebno vrednotenje opraviti ponovno, in sicer delno ali v celoti. ICH smernice obsegajo različne parametre validacije (23):

- selektivnost /specifičnost (specificity)
- natančnost (precision)
- točnost (accuracy)
- linearnost (linearity)
- območje (range)
- meja zaznavnosti (limit of detection)
- meja določitve (limit of quantification)
- robustnost (robustness)
- preizkus ustreznosti sistema

V diplomski nalogi smo uporabljali že predhodno razvito HPLC metodo za določanje koencima Q<sub>10</sub> v pripravkih, ki smo jo prilagodili glede na to, da določamo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v SLN. V ta namen smo preverjali nekatere validacijske parametre. Pred določanjem vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN smo preverili, ali vsebnost lipidov v vzorcu vpliva na rezultat določanja koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu. Tako smo pripravili tri vzorce z različnimi količinami disperzije SLN s 5 % koencima Q<sub>10</sub>, ki smo jim dodali mobilno fazo za HPLC. Po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.6 smo pripravili vzorce, ki smo jih analizirali s HPLC. Ugotovili smo, da je odziv koencima Q<sub>10</sub> pri HPLC analizi sorazmeren s količino koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu in da količina SLN v vzorcu ne vpliva na rezultat analize (slika 6). Na podlagi Pearsonovega koeficienta, ki je znašal 0,999, smo ugotovili, da je odvisnost med površino pika pri HPLC analizi koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu in koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN linearna in s tem potrdili, da je izbrana HPLC metoda priprave vzorca primerna za določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN.



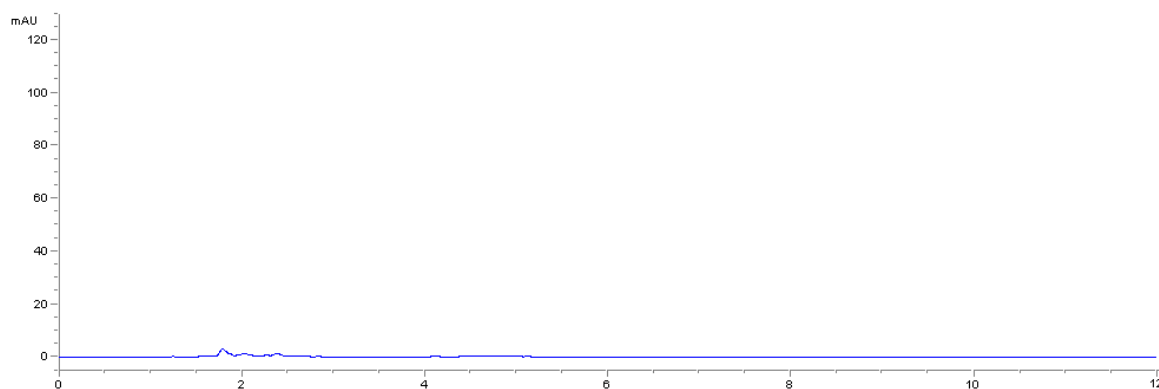
Slika 6: Korelacija med površino pika pri HPLC analizi koencima Q<sub>10</sub> in koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> disperziji SLN.

Pri vrednotenju točnosti smo izračunali odstotek odstopanja dobljene koncentracije koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN od deklarirane vrednosti, pri čemer so vse koncentracije znotraj umeritvene premice odstopale od deklarirane vrednosti do približno 2 % (preglednica XII). Kot mejo sprejemljivosti smo določili 10 %, kar pomeni, da so vse koncentracije koencima Q<sub>10</sub> znotraj intervala 10 % in lahko zaključimo, da je analizna metoda točna.

Preglednica XII: Odstotek ujemanja med izračunano in deklarirano koncentracijo koencima Q<sub>10</sub>

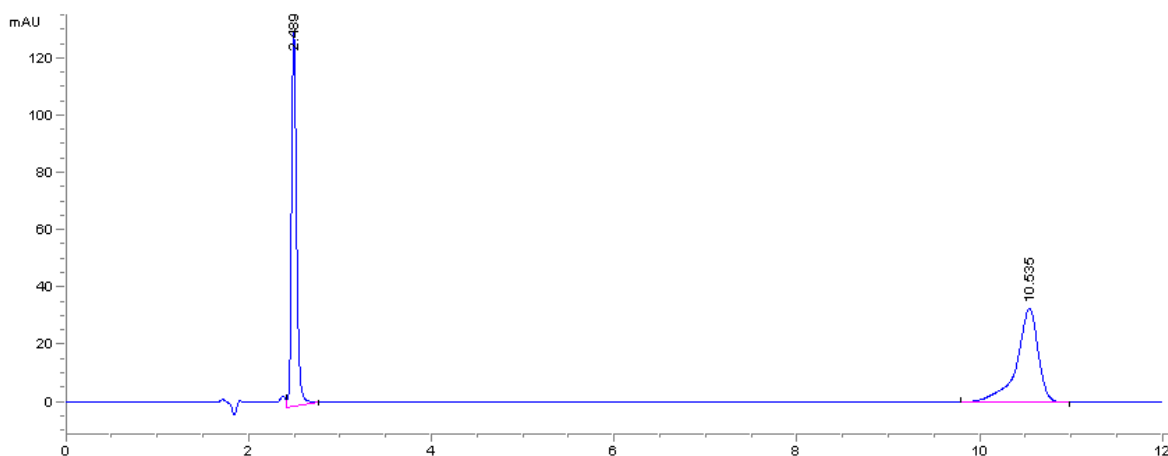
Deklarirana koncentracija [mg/mL]	Odziv	Izračunana koncentracija [mg/mL]	Točnost (%)
0,03	184,4	0,0306	101,84
0,06	355,8	0,0589	98,16
0,09	547,3	0,0906	100,61

Pri vrednotenju selektivnosti analizne metode smo primerjali kromatogram vzorca SLN brez analitov (slika 7) s kromatogramom vzorca SLN, ki smo mu dodali analita koencim Q<sub>10</sub> in askorbilpalmitat (slika 8). Pri slednjem kromatogramu sta jasno vidna pika askorbilpalmitata z retencijskim časom 2,489 min in koencima Q<sub>10</sub> z retencijskim časom 10,635 min, medtem ko jih na prvem kromatogramu vzorca SLN, ki je služil kot slepi vzorec in ni vseboval analitov, ni bilo. Kromatogram vzorca SLN s koencimom Q<sub>10</sub> na sliki 8 nam je služil za razlikovanje med ubikinolom in ubikinonom, ko smo v SLN vgrajevali reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub> (slika 9).



Slika 7: Kromatogram vzorca praznih SLN tj. brez analitov





Slika 8: Kromatogram vzorca SLN z dodanima analitoma. Kromatografski vrh pri 2,498 min predstavlja askorbilpalmitat, vrh pri 10,635 min pa oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub>.

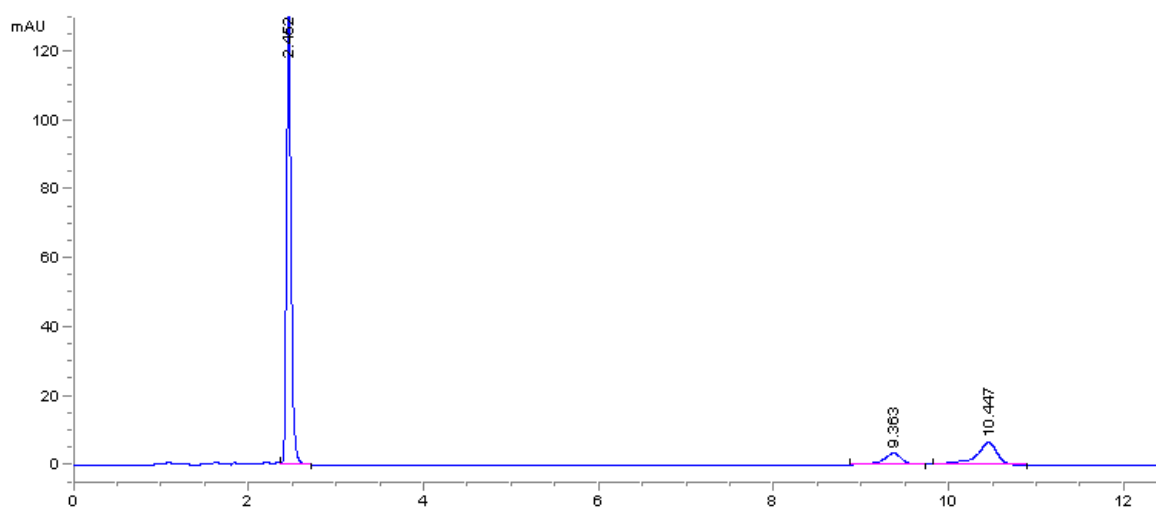
Vrednotili smo tudi ponovljivosti priprave vzorcev SLN s koencimom Q<sub>10</sub>, ki smo jih pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.6, pri čemer smo vrednotili več različnih vzorcev SLN s koencimom Q<sub>10</sub> v 3 paralelah. Preko računanja povprečne vrednosti treh paralelnih odzivov in SD posameznega vzorca smo izračunali RSD in dobili vrednosti 5,0 %, 2,9 %, 3,9 % (preglednica XIII). Glede na to, da smo za mejo sprejemljivosti določili vrednost RSD ≤ 10 %, lahko iz dobljenih rezultatov RSD zaključimo, da smo vzorce SLN s koencimom Q<sub>10</sub> po predpisanem postopku pripravili z ustrežno ponovljivostjo.

Preglednica XIII: Pregled SD in RSD vzorcev SLN z različnimi koncentracijami koencima Q<sub>10</sub>

Koncentracija koencima Q <sub>10</sub> [mg/mL]	Povprečje odzivov	SD	RSD [%]
0,09	547,3	27,5	5,0
0,06	332,5	9,6	2,9
0,06	309,1	12,0	3,9

Takoj po izdelavi smo določali tudi vsebnost oksidirane in reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v disperziji SLN, ki smo jih pripravili z reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>. Glede na začetno vsebnost reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v raztopini z askorbilpalmitatom, ki smo jo

uporabili v postopku izdelave SLN (poglavje 3.2.5.2) smo izračunali, da je disperzija SLN vsebovala 87,7 % začetne reducirane oblike (slika 9). Glede na začetno vsebnost oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v raztopini z askorbilpalmitatom pa smo v disperziji SLN zaznali 72,5 % začetne oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub>. Na sliki 9 je prikazan kromatogram vzorca SLN, v katere smo vgradili raztopino reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub>, v kateri je askorbilpalmitat, katerega pik je razviden na kromatogramu. Vrhova reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> sta jasno ločena, kar nam je omogočilo, da smo tekom testiranja stabilnosti reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v SLN spremljali njegovo količino in pretvarjanje med oblikama.



Slika 9: Kromatogram vzorca SLN z vgrajeno reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>. Kromatografski vrh pri 2,452 min predstavlja askorbilpalmitat, vrh pri 9,363 min predstavlja reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>, vrh pri 10,447 min pa oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub>.

#### 4.4 Določanje učinkovitosti vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN

Učinkovitost vgrajevanja koencima Q<sub>10</sub> v SLN smo ugotavljali na vzorcu SLN z 10 % koencima Q<sub>10</sub>. Delež vgrajene količine koencima Q<sub>10</sub> smo posredno določili in ugotovili, da je bila učinkovitost vgrajevanja 99,05 %. Ker smo v postopku določanja učinkovitosti vgrajevanja disperzijo SLN centrifugirali, se je poleg SLN lahko posedla tudi sama oborjena KAS, če je bila prisotna v disperziji. Ker ta KAS ni vgrajena v SLN, ampak sama tvori nanometrične delce (nanosuspenzijo koencima Q<sub>10</sub>), je lahko učinkovitost

vgrajevanja, ki smo jo določili, lažno višja, kar pa bi morali preveriti z nadaljnjimi raziskavami.

Pri sami metodi določanja učinkovitosti vgrajevanja, ko smo lipide obarjali, bi se lahko oboril tudi del KAS, zato smo preverjali, kakšna je učinkovitost ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz vzorca v mobilno fazo. Izkoristek ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz formulacij SLN smo določali preko dvojnega obarjanja lipidov iz vzorca s koencimom Q<sub>10</sub> v mobilni fazi. Vsota odzivov dobljenih supernatantov po HPLC analizi je predstavljala celokupni izkoristek ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu. Izkoristek prve ekstrakcije je bil 91,59 %, izkoristek druge ekstrakcije je bil 7,40 % in celokupni izkoristek koencima Q<sub>10</sub> je znašal 98,99%. Rezultat kaže, da smo izbrali ustrezen postopek za določanje celokupne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v formulacijah, saj smo že po enkratni ekstrakciji uspeli določiti 91,59 % koencima Q<sub>10</sub>.

#### **4.5 Priprava reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub>**

V okviru diplomske naloge smo poleg izdelave SLN z oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub> želeli pripraviti tudi SLN z reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>. Ker le-ta ni komercialno dostopna, smo jo pripravili sami, tako da smo ubikinon v raztopini reducirali z askorbilpalmitatom oziroma askorbinsko kislino. Kot reductent smo uporabili askorbinsko kislino, saj je eden najpomembnejših fizioloških antioksidantov, ki lahko v reducirani obliki učinkovito odstranjuje ROS in radikale, poleg tega pa lahko reducira tudi nekatere ione. Njena uporaba je zaradi nizke stabilnosti v heterogenih sistemih omejena, zaradi česar smo uporabili tudi amfifilni derivat askorbinske kisline t.j. askorbilpalmitat, ki izkazuje boljšo stabilnost in sposobnost penetracije v globlje plasti kože (24). S spreminjanjem razmerij koencima Q<sub>10</sub> in reductenta, vrste topila in temperaturnih pogojev smo želeli ugotoviti, v kakšnih pogojih bo redukcija koencima Q<sub>10</sub> v obliko ubikinola v največji meri potekla. V SLN smo želeli vgraditi reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>, saj le-ta učinkuje kot endogeni antioksidant le v reducirani obliki, v kateri je zmožen preprečevati in zaustavljati verižne reakcije oksidacije in tako zmanjševati nastajanje ROS, ki povzročijo lipidno peroksidacijo celičnih membran (24).

Rezultati meritev so prikazani v preglednici XIV.

V raztopinah z večjo koncentracijo reducenta in pri povišani temperaturi je s časom prišlo do prehoda iz oksidirane v reducirano obliko koencima  $Q_{10}$ . Pri temperaturah 60 °C in 80 °C je nastajala reducirana oblika koencima  $Q_{10}$ , medtem ko pri 25 °C in 40 °C do prehoda ubikinona v ubikinol ni prišlo. Pri raztopinah, ki so vsebovale manjšo koncentracijo koencima  $Q_{10}$  in askorbilpalmitata, in sicer 0,2 mg/mL, do prehoda ubikinona v ubikinol ni prišlo, razen v primeru, ko smo raztopino inkubirali pri temperaturi 80 °C. Tudi pri raztopini, kjer je bila koncentracija askorbilpalmitata manjša kot koncentracija koencima  $Q_{10}$ , do prehoda ubikinona v ubikinol ni prišlo. V raztopini, ki je kot reducent vsebovala askorbinsko kislino, je potekla redukcija ubikinona v ubikinol v večji meri prej kot v raztopini z askorbilpalmitatom, vendar je bil delež reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  po 14 dneh manjši, kot pa v raztopini, kjer je bil reducent askorbilpalmitat. Iz tega lahko sklepamo, da je stabilnost askorbinske kisline pri povišani temperaturi slabša v primerjavi z askorbilpalmitatom. V aerobnih pogojih se askorbinska kislina reverzibilno pretvarja v L-dehidro-askorbinsko kislino, ta pa lahko ireverzibilno preide v oksalno kislino (25).

Največ reducirane oblike je po 14 dneh vsebovala raztopina, v kateri je bila začetna količina askorbilpalmitata petkrat večja od količine koencima  $Q_{10}$ . Velja pa omeniti tudi vpliv temperature na potek redukcije ubikinona. Pri 80 °C je po 7 dneh redukcija v raztopini v veliki meri potekla, medtem ko smo po 14 dneh v istem vzorcu določili veliko manjšo vsebnost reducirane oblike koencima  $Q_{10}$ . Glede na rezultate lahko sklepamo, da ima temperatura dvojno vlogo pri nastajanju in razpadu ubikinola. Reakcija redukcije ubikinona v ubikinol je ravnotežna in poteče, ko sistem premaga energijsko bariero. Po določenem času se reducirana oblika lahko spet spremeni v oksidirano obliko koencima  $Q_{10}$ .

Preglednica XIV: Spreminjanje deleža reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>) v raztopinah z askorbilpalmitatom (AsP) in askorbinsko kislino (AK) s časom pri različnih temperaturnih pogojih. Delež reducirane oblike je podan kot odstotek reducirane oblike, glede na skupno količino reducirane in oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub> (enačba 2).

Razmerje koncentracij [mg/mL]	Vrsta topila	Temperatura [° C]	Delež reducirane oblike koencima Q <sub>10</sub> [%]		
			1 dan	7 dni	14 dni
Q <sub>10</sub> :AsP, 1:1	Etanol	60	11,09	38,42	25,86
Q <sub>10</sub> :AsP, 1:1	Metanol	60	11,81	68,19	64,44
Q <sub>10</sub> :AsP, 1:5	Etanol	60	43,19	80,40	70,99
Q <sub>10</sub> :AsP, 1:0,1	Etanol	60	0	0	0
Q <sub>10</sub> :AK, 1:1	Etanol	60	21,46	49,25	12,03
Q <sub>10</sub> :AsP, 0,2:0,2	Etanol	25	0	0	0
Q <sub>10</sub> :AsP, 0,2:0,2	Etanol	40	0	0	0
Q <sub>10</sub> :AsP, 0,2:0,2	Etanol	60	0	0	0
Q <sub>10</sub> :AsP, 0,2:0,2	Etanol	80	18,58	80,65	11,08

Pri poteku pretvorbe iz oksidirane oblike v reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub> smo s HPLC analizo spremljali spremembo odzivov reducirane in oksidirane oblike. Pri tem smo opazili, da se tekom nastajanja reducirane oblike oksidirana oblika koencima Q<sub>10</sub> ni zmanjšala za enako enoto, kot se je povečal signal reducirane oblike. Analiza odzivov oksidirane in reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> je pokazala, da poteka pretvorba v povprečju s faktorjem 3,29, kar pomeni, da se pri pretvorbi iz oksidirane v reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub> reducirana oblika poveča za eno enoto, medtem ko se oksidirana oblika zmanjša v povprečju za 3,29 enot. Delež reducirane oblike v raztopini smo izračunali iz enačbe 2, kjer smo upoštevali dejstvo, da se celokupna količina koencima Q<sub>10</sub> v raztopini ne spreminja, in faktor pretvorbe med oksidirano in reducirano obliko tj. 3,29.

Enačba 2:

$$\% \text{ Reducirane oblike} = \frac{\text{odziv reducirane oblike} \times 3,29}{(\text{odziv reducirane oblike} \times 3,29) + \text{odziv oksidirane oblike}} \times 100\%$$

#### 4.6 Spremljanje fizikalne stabilnosti SLN s koencimom Q<sub>10</sub> in njegove kemične stabilnosti v formulaciji SLN pri različnih pogojih

SLN, ki smo jih pripravili z reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub>, smo izpostavili različnim temperaturnim pogojem ter spremljali njihovo fizikalno stabilnost z merjenjem povprečnega premera, PDI in ZP nanodelcev. S HPLC analizo smo vrednotili stabilnost koencima Q<sub>10</sub> v formulaciji. Povprečni premer in PDI nanodelcev, ki smo jih shranjevali pri 4 °C (preglednica XV), se nista bistveno spremenila. V primerjavi s SLN, ki smo jih shranjevali pri 40 °C (preglednica XVI) in sobni temperaturi (preglednica XVII), so nanodelci pri 4 °C ohranili najmanjši povprečni premer. ZP SLN, shranjevanih pri 4 °C, je s časom postajal še bolj negativen (-18,3 mV), glede na vrednost ZP delcev takoj po izdelavi (-14,9 mV). Po 28 dneh je bila vrednost ZP tega vzorca SLN, v primerjavi z vzorcema na 40 °C in sobni temperaturi, najmanjša. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da je fizikalna stabilnost disperzije SLN najboljša, če disperzijo shranjujemo pri 4 °C.

Preglednica XV: Spreminjanje povprečnega premera, PDI in ZP SLN tekom shranjevanja pri 4 °C.

	<b>d [nm]</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP [mV]</b>
<b>0 dni</b>	155,4	0,246	-14,9
<b>7 dni</b>	155,3	0,293	-24,3
<b>14 dni</b>	163,5	0,250	-20,2
<b>21 dni</b>	181,7	0,402	-22,3
<b>28 dni</b>	166,0	0,288	-18,3

Največje povečanje povprečnega premera delcev smo opazili pri vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali pri 40 °C, prav tako se je pri slednjih absolutna vrednost ZP tekom shranjevanja najbolj zmanjšala, kar nakazuje, da bi dolgoročno shranjevanje SLN pri povišani temperaturi sčasoma verjetno pripeljalo do fizikalne nestabilnosti tega koloidnega sistema. Takšne spremembe ZP, čigar absolutna vrednost se zmanjšuje in približuje vrednosti 0, kažejo na nestabilnost sistema, ki nastopi, ko med koloidnimi delci prevladajo privlačne sile nad odbojnimi, kar vodi v agregiranje in/ali aglomeriranje delcev.

Preglednica XVI: Spreminjanje povprečnega premera, PDI in ZP SLN tekom shranjevanja pri 40 °C.

	<b>d [nm]</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP [mV]</b>
<b>0 dni</b>	155,4	0,246	-14,9
<b>7 dni</b>	173,6	0,408	-18,6
<b>14 dni</b>	177,2	0,350	-15,0
<b>21 dni</b>	187,2	0,373	-15,4
<b>28 dni</b>	212,3	0,371	-14,9

Meritve povprečnega premera, PDI in ZP vzorca SLN, ki smo ga shranjevali pri sobni temperaturi so pokazale, da se proučevani parametri v roku 28 dni niso bistveno spreminjali; opaziti je le minimalne spremembe ZP nanodelcev (preglednica XVII). Pričakujemo lahko, da bi bile spremembe proučevanih parametrov zaradi vpliva temperature večje, če bi vzorce SLN izpostavili povišani temperaturi skozi daljši čas. S spremljanjem fizikalne stabilnosti formulacij praznih SLN smo pred izdelavo SLN s koencimom Q<sub>10</sub> potrdili, da so le-te stabilne več tednov pri temperaturi 4 °C.

Preglednica XVII: Spreminjanje povprečnega premera, PDI in ZP SLN tekom shranjevanja pri sobni temperaturi.

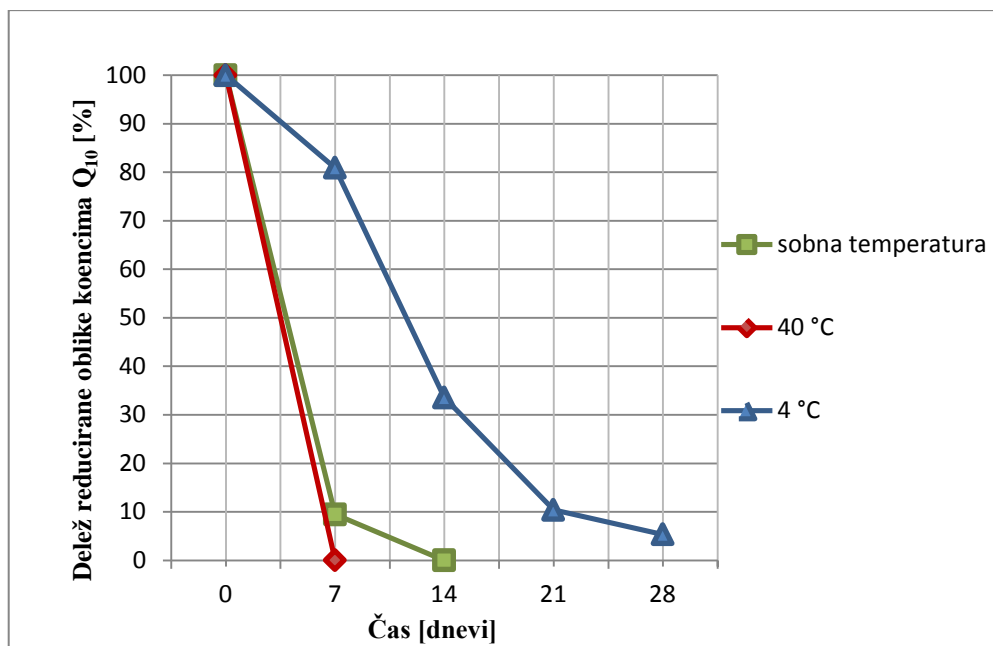
	<b>d [nm]</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP [mV]</b>
<b>0 dni</b>	155,4	0,246	-14,9
7 dni	152,6	0,371	-20,7
14 dni	161,4	0,258	-16,0
21 dni	159,4	0,277	-18,4
28 dni	162,1	0,283	-15,5

S HPLC analizo smo spremljali kemijsko stabilnost koencima Q<sub>10</sub> v formulaciji SLN pri različnih pogojih shranjevanja. Delež reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v posamezni časovni točki smo izračunali glede na odziv reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> pri HPLC analizi vzorca SLN takoj po izdelavi tj. ob času 0. Reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih SLN se je tekom spremljanja stabilnosti, ki smo jo izvajali 28 dni, glede na pogoje shranjevanja razmeroma hitro, a v različnem obsegu, pretvarjala v oksidirano obliko koencima Q<sub>10</sub> (slika 10). SLN z vgrajeno reducirano obliko koencima Q<sub>10</sub> naj bi ob nanosu na kožo omogočali tesnejši stik in daljše zadrževanje na koži in s tem dostavo

vgrajene KAS v globlje plasti kože. Kljub učinkovitemu ogrodnemu sistemu SLN, pa je na stabilnost reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  vplivalo veliko dejavnikov. Razlogi za slabo obstojnost reducirane oblike v SLN tekom shranjevanja so lahko prisotnost drugih komponent, kot so lipidi in stabilizatorji, reducirana oblika koencima  $Q_{10}$  je bila lahko v lipidnem ogrodju preblizu površini, ki je pri nanodelcih zelo velika v primerjavi z volumnom in navsezadnje tudi povišana temperatura, ki ima glede na analizo rezultatov zelo močan vpliv.

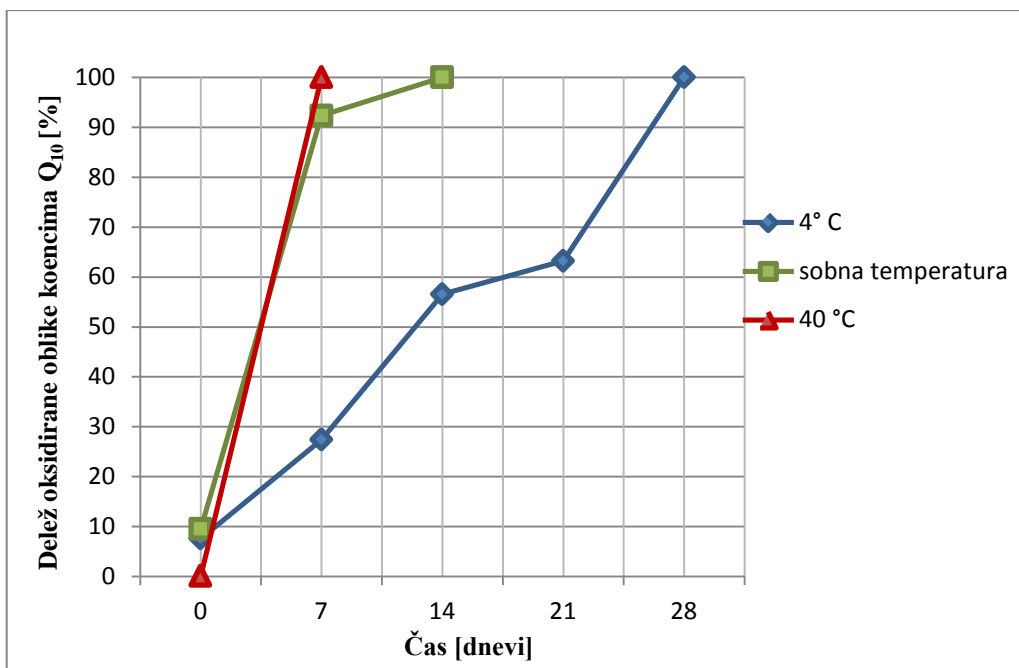
V vseh vzorcih SLN smo tekom shranjevanja pri različnih temperaturah zaznali zmanjšanje vsebnosti reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  in povečevanje vsebnosti oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$  (sliki 10 in 11). Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da ima temperatura velik vpliv na stabilnost koencima  $Q_{10}$  v formulacijah. V vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali pri 4 °C, se je majhen delež reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  ohranil tudi po 28 dneh. Pri 40 °C se je ves reduciran koencim  $Q_{10}$  pretvoril v oksidirano obliko že v 7 dneh, kar kaže, da KAS pri povišani temperaturi v izdelani formulaciji ni stabilna. V vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali pri sobni temperaturi, se je reducirana oblika koencima  $Q_{10}$  v celoti pretvorila v oksidirano obliko v 14 dneh. V vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali pri 4 °C, smo po 28 dneh določili 5,3 % reducirane oblike koencima  $Q_{10}$ , glede na vsebnost reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  v vzorcu SLN takoj po izdelavi. Reducirana oblika koencima  $Q_{10}$  je v formulaciji SLN glede na rezultate najbolj stabilna, če disperzijo shranjujemo pri nižani temperaturi.





Slika 10: Spreminjanje deleža reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  v disperziji SLN s časom pri shranjevanju vzorca SLN pri sobni temperaturi, 40 °C in 4 °C.

S HPLC analizo smo spremljali tudi vsebnost oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$  v formulaciji SLN. V vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali pri 4 °C, se je vsebnost oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$  tekom shranjevanja vzorca SLN povečevala. Trend naraščanja deleža oksidirane oblike zaradi sočasnega upadanja deleža reducirane oblike koencima  $Q_{10}$  smo grafično prikazali tako, da smo predpostavili, da je po 28 dneh v vzorcu nastalo 100 % oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$ . S pomočjo tega smo nato izračunali, kakšen delež oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$  je nastal po 7, 14, 21 in 28 dneh shranjevanja vzorca SLN. Pri vzorcu SLN, ki smo ga shranjevali na 40 °C, je do popolne pretvorbe ubikinola v ubikinon prišlo že po 7 dneh, pri vzorcu SLN na sobni temperaturi pa po 14 dneh (slika 11). Krivulja, ki prikazuje delež oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$ , tekom shranjevanja vzorca pri 4 °C narašča, iz česar lahko sklepamo, da bi ob nadaljnjem shranjevanju vzorca prišlo do popolne pretvorbe reducirane v oksidirano obliko koencima  $Q_{10}$ .



Slika 11: Spreminjanje deleža oksidirane oblike koencima  $Q_{10}$  v disperziji SLN s časom pri shranjevanju vzorca SLN pri 4 °C, 40 °C in sobni temperaturi.

## 5 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo ugotovili, da na fizikalne lastnosti SLN, ki smo jih izdelali z metodo homogeniziranja emulzije z ultrazvočno sondo, vplivajo čas soniciranja, količina lipida, vrsta in koncentracija stabilizatorja in količina KAS v disperziji. Pri vrednotenju fizikalne stabilnosti izdelanih SLN s fotonsko korelacijsko spektroskopijo smo ugotovili, da so izdelani prazni SLN ohranili fizikalno stabilnost več tednov in da so primerni za vgrajevanje KAS. V SLN smo vgradili ubidekarenon z visoko učinkovitostjo vgrajevanja (99,05 %). S HPLC metodo pa smo ugotovili, da lahko s primernimi pogoji, kot so povišana temperatura, dodatek ustreznega reducenta in topila, dosežemo redukcijo oksidirane oblike koencima Q<sub>10</sub>. Reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub>, ki smo jo vgradili v SLN, se je znotraj formulacije tekom shranjevanja pri različnih pogojih v manjšem obsegu ohranila le v vzorcu, ki smo ga shranjevali pri 4 °C. V okviru diplomskega dela smo torej ugotovili, da ima povišana temperatura zelo velik vpliv na stabilnost reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub>, hkrati pa moramo biti pozorni tudi na druge prisotne komponente v formulaciji in lokalizacijo vgrajene KAS v lipidnem ogrodju. V okviru nadaljnjih raziskav bi lahko preučili, kako poleg temperaturnih pogojev na stabilnost reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v formulaciji SLN vpliva tudi sestava formulacije SLN, čistota komponent in lokalizacija koencima Q<sub>10</sub> znotraj lipidnega ogrodja.

## 6 LITERATURA

- 1.) Pardeike J, Hommoss A, Müller R. H: Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366: 170–184
- 2.) Bunjes H: Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2011; 16: 405–411
- 3.) Müller R.H, Petersen R.D, Hommoss A, Pardeike J: Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 522–530
- 4.) Souto E. B, Müller R. H: Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *International Journal of Cosmetic Science* 2008; 30: 157–165
- 5.) Mehnert W, Mäder K: Solid lipid nanoparticles, Production, Characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 83-101
- 6.) Kovačević A. B, Müller R. H, Savić S.D, Vuleta G.M, Keck C.M: Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014; 444: 15– 25
- 7.) Torchilin V, Amiji M, *Handbook of Materials for Nanomedicine*, Pan Stanford Publishing, Singapur, 2010, 537-539
- 8.) Nasta Mele: Izdelava in fizikalno-kemijsko ter biološko vrednotenje nanodelcev iz hitosana in fosfolipida s proteinsko učinkovino (Diplomska naloga, 2010)
- 9.) Gokce E. H, Korkmaz E, Tuncay-Tanriverdi S, Delleria E, Sandri G, Bonferoni M. C, Ozer O: A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7: 5109–5117
- 10.) Rus P, Rus R: Koencim Q10. *Zdrav Var* 2008; 47: 89-98
- 11.) Žmitek J, Žmitek K: Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Farmaceutski vestnik* 2009; 60: 150-164
- 12.) <https://www.tga.gov.au/pdf/cm-cg-ubiquinol-10.pdf>. Dostopano: julij 2014
- 13.) [http://www.quetzalquimica.com/images/fin\\_\(1\)\\_coenzaim28-09-2007.pdf](http://www.quetzalquimica.com/images/fin_(1)_coenzaim28-09-2007.pdf). Dostopano: julij 2014

- 14.) Milivojević Fir M, Milivojević L, Prošek M, Šmidovnik A: Property Studies of Coenzyme Q10–Cyclodextrins complexes. *Acta Chim. Slov.* 2009; 56: 885–891
- 15.) Franke A et al: Coenzyme Q10 in human blood: Native levels and determinants of oxidation during processing and storage. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48: 1610–1617
- 16.) Onoue S et al: Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q10 with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 46: 492–499
- 17.) Korkmaz E, Gokce E.H, Ozer O: Development and evaluation of coenzyme Q10 loaded solid lipid nanoparticle hydrogel for enhanced dermal delivery. *Acta Pharm.* 2013; 63: 517-529
- 18.) [www.makingcosmetics.com](http://www.makingcosmetics.com). Dostopano: julij 2014
- 19.) <http://www.gattefosse.com/en/applications/compritol-888-ato.html>. Dostopano: julij 2014
- 20.) <http://newhealthcorp.com/content/co-q10-energizes-heart-and-brain>. Dostopano: julij 2014
- 21.) Gokce E. H, Korkmaz E, Dellera E, Sandri G, Bonferoni M, Ozer O: Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7: 1841-1850
- 22.) <https://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>. Dostopano: julij 2014
- 23.) Simona Razpotnik: Določanje vsebnosti ubidekarenona v mehkih kapsulah z metodo HPLC (Diplomska naloga, 2011)
- 24.) Jurkovič P, Šentjerc M, Gašperlin M, Kristl J, Pečar S: Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2003; 56: 59–66
- 25.) Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 222: 271–279

