

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA HAFNER

**VGRAJEVANJE KOENCIMA Q₁₀ V LIPIDNE NANODELCE
IN RAZVOJ METODE ZA NJEGOVO DOLOČANJE V
FORMULACIJI**

**INCORPORATION OF COENZYME Q₁₀ INTO LIPID
NANOPARTICLES AND DEVELOPMENT OF A METHOD
FOR ITS DETERMINATION IN FORMULATION**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

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.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem za svoj čas in pomoč svoji mentorici doc. dr. Petri Kocbek in somentorju izr. prof. Robertu Roškarju, saj sta bila potrpežljiva in vedno pripravljena pomagati.

Poleg tega se zahvaljujem tudi svojim staršem, ki so mi tekom študija ves čas stali ob strani.

Izjava

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

Špela Hafner

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1 NLC	2
1.1.1 Učinek SLN in NLC na kožo	2
1.1.2 Izdelava	3
1.1.3 Sestava.....	4
1.2 KOENCIM Q ₁₀	6
1.2.1 Delovanje	8
1.2.2 Viri in uporaba	8
1.2.3 Pomanjkanje koencima Q ₁₀	11
2. NAMEN DELA	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Sestavine.....	13
3.1.2 Naprave in pribor	13
3.2 METODE	14
3.2.1 Priprava reducirane oblike CoQ ₁₀	14
3.2.2 Izdelava NLC	14
3.2.3 Fizikalno vrednotenje NLC	17
3.2.4 Spremljanje fizikalne stabilnosti NLC	18
3.2.5 Vsebnost CoQ ₁₀ v formulaciji NLC.....	18
3.2.6 Določanje zaostanka CoQ ₁₀ v sedimentu.....	18
3.2.7 Učinkovitost vgrajevanja CoQ ₁₀ v NLC	19
3.2.8 Razvoj HPLC metode za določanje koencima Q ₁₀	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1 OPTIMIZACIJA SESTAVE IN IZDELAVE NLC	23
4.1.1 Proučevanje vpliva časa soniciranja.....	23
4.1.2 Proučevanje vpliva celokupne količine lipidov v formulaciji.....	24
4.1.3 Proučevanje vpliva deleža tekočega lipida v NLC.....	25

4.1.4 Proučevanje vpliva količine in sestave stabilizatorjev	25
4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE KOENCIMA Q ₁₀	27
4.3 VSEBNOST REDUCIRANE OBLIKE KOENCIMA Q ₁₀ V DISPERZIJI NLC	27
4.4 VREDNOTENJE NLC Z VGRAJENIM CoQ ₁₀	27
4.4.1 Učinkovitost vgrajevanja CoQ ₁₀ v NLC	28
4.5 FIZIKALNA STABILNOSTI NLC SKOZI ČAS	29
4.5.1 Stabilnost praznih NLC	29
4.5.2 Stabilnost NLC z vgrajeno reducirano obliko CoQ ₁₀	31
4.6 VALIDACIJA POSTOPKA PRIPRAVE VZORCA	32
4.6.1 Linearnost in območje	32
4.6.2 Ponovljivost	33
4.6.3 Selektivnost	34
4.6.4 Točnost	35
4.7 STABILNOST REDUCIRANE OBLIKE CoQ ₁₀ V DISPERZIJI NLC	35
5. SKLEP	38
6. VIRI	39

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil razviti postopek priprave koloidnega dostavnega sistema, v katerega smo kasneje vgradili koencim Q_{10} . Izbrani koloidni dostavni sistem so bili lipidni nanodelci, zgrajeni iz zmesi trdnih in tekočih lipidov tj. nanostrukturirani lipidni nosilci (NLC), ki v kozmetiki predstavljajo sodoben dostavni sistem predvsem za lipofilne kozmetično aktivne sestavine. Spadajo v drugo generacijo lipidnih nanodelcev v nasprotju s trdnimi lipidnimi nanodelci (SLN). Zaradi svojih pozitivnih lastnosti so bili v zadnjih nekaj letih že precej raziskovani. Pri pripravi vzorca smo spreminjali številne parametre, kot je količina in razmerje lipidov ter stabilizatorjev in čas soniciranja. Cilj je bil najti najbolj optimalno kombinacijo sestavin in primerne pogoje izdelave za izdelavo NLC z ustreznimi fizikalnimi lastnostmi za vgrajevanje koencima Q_{10} .

Koencim Q_{10} je nam dobro poznana v maščobi topna snov, ki deluje na več različnih načinov. Sodeluje v dihalni verigi v mitohondrijih, vendar je dermalno najpomembnejše antioksidativno delovanje, saj se ga dandanes v ta namen vedno več uporablja v kozmetični industriji, predvsem v kozmetiki proti staranju.

V sklopu diplomske naloge smo razvili in validirali tudi HPLC metodo za določanje koencima Q_{10} v disperziji lipidnih nanodelcev, ki je omogočila razlikovanje med njegovo oksidirano in reducirano obliko. V lipidne nanodelce smo vgrajevali tudi koencim Q_{10} v reducirani obliki in s HPLC analizo preverili stabilnost reducirane oblike v formulaciji pri različnih pogojih (sobna temperatura, 40 °C in 4 °C). Na podlagi rezultatov sklepamo, da CoQ_{10} v reducirani obliki ni obstojen, zato je za vgradnjo v formulacijo NLC primeren le v oksidirani obliki. Poleg tega smo ugotovili, da reducirana in oksidirana oblika ne dajeta enakega odziva pri HPLC analizi, zato smo v ta namen izračunali faktor pretvorbe med obema oblikama.

Ključne besede: koloidni dostavni sistemi, lipidni nanodelci, koencim Q_{10} , HPLC metoda

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a procedure for the preparation of colloidal delivery system in which we later incorporated coenzyme Q₁₀. Selected colloidal delivery system were the lipid nanoparticles, which are prepared from a mixture of solid and liquid lipids. They are known as nanostructured lipid carriers (NLC). NLC are modern delivery system in cosmetics, in particular for lipophilic cosmetic active ingredients. They belong, contrary to solid lipid nanoparticles (SLN), to the second generation of lipid nanoparticles. Due to their positive characteristics, they have been considerably investigated in the last few years. During their preparation we varied numerous parameters such as the amount and the ratio of lipids and stabilizers as well as the time of sonification. The aim was to find the most optimal combination of ingredients and manufacturing conditions suitable for the production of NLC with appropriate physical properties for the incorporation of coenzyme Q₁₀.

Coenzyme Q₁₀ is well-known lipid-soluble compound, which acts in a number of different ways. It plays an important role in the mitochondrial respiratory chain, but the most important for dermal application is its antioxidant activity. For this purpose it has been increasingly used in the cosmetic industry, especially in anti-aging cosmetics.

As a part of the thesis we have developed and validated the HPLC method for the determination of coenzyme Q₁₀ in the dispersion of lipid nanoparticles, which enabled also to distinguish between its oxidized and reduced form. We have also incorporated coenzyme Q₁₀ in the lipid nanoparticles in its reduced form. By HPLC we investigated the stability of reduced form in the formulation at different conditions (ambient temperature, 40 °C and 4 °C). On the basis of the results we conclude that the reduced form of coenzyme Q₁₀ is not stable and, therefore, only oxidized form is suitable for incorporation in NLC formulation. In addition, we have found out that the reduced and oxidized form does not give the same response in HPLC analysis, so we calculated the conversion factor between these two forms.

Key words: colloidal delivery systems, lipid nanoparticles, coenzyme Q₁₀, HPLC method

SEZNAM OKRAJŠAV

CoQ₁₀ – koencim Q₁₀

KAS – kozmetično aktivna sestavina

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

NLC – nanostrukturirani lipidni nosilci (ang. *nanostructured lipid carriers*)

PAS – površinsko aktivna snov

PI – polidisperzni indeks

RI – lomni količnik (refrakcijski indeks)

RSD – relativna standardna deviacija

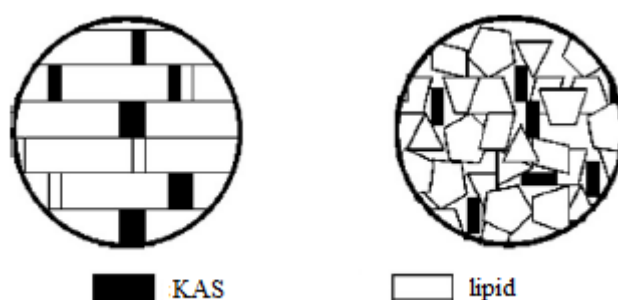
SD – standardna deviacija

SLN – trdni lipidni nanodelci (ang. *solid lipid nanoparticles*)

ZP – zeta potencial

1. UVOD

Koloidni dostavni sistemi, kot so miceli, liposomi, tekoči kristali in nanodelci, so strukture s premerom 10 - 1000 nm. Pri razvoju formulacij s takšnimi dostavnimi sistemi je cilj doseči želen profil sproščanja vgrajenih kozmetično aktivnih sestavin (KAS), varnost samega dostavnega sistema ter termodinamsko ali dolgoročno kinetično stabilnost (1, 2, 3). V namen izboljšanja lastnosti že obstoječih koloidnih dostavnih sistemov (npr. nanoemulzij, liposomov, polimernih nanodelcev) so v začetku devetdesetih let dvajsetega stoletja razvili trdne lipidne nanodelce (SLN) (3, 4). Pri izdelavi SLN se nadomesti tekoči lipid O/V emulzije s trdnim lipidom ali zmesjo lipidov, ki so trdni tako pri sobni kot pri telesni temperaturi (3). Prednosti SLN v primerjavi z drugimi koloidnimi dostavnimi sistemi so biokompatibilnost, dobra fizikalna stabilnost, možnost nadzorovanega sproščanja vgrajene KAS, odsotnost organskih topil pri izdelavi, enostavna izdelava in poceni surovine (2, 5). Vendar pa imajo tudi SLN nekatere pomanjkljivosti. Ker so sestavljeni iz trdnih lipidov (zlasti, če so visoko čisti), le-ti kristalizirajo v obliki relativno idealnih kristalnih rešetk, zato je prostor za vključevanje KAS v takšne delce omejen (slika 1). Hkrati je učinkovitost vgrajevanja KAS v SLN odvisna tudi od topnosti KAS v trdnem lipidu (5, 6). Da bi se temu izognili, so kot drugo generacijo lipidnih nanodelcev razvili nanostrukturirane lipidne nosilce (NLC) tj. lipidne nanodelce iz zmesi trdnih in tekočih lipidov (6).



Slika 1: Shema zgradbe SLN (levo) in NLC (desno). Zgradba SLN je podobna zidu iz opek tj. skoraj popolna kristalna rešetka, zato je možnost za vključevanje KAS v strukturo delca manjša. V strukturi NLC so številne »nepravilnosti« (defekti v strukturi), kar omogoča večjo učinkovitost vgrajevanja KAS (3).

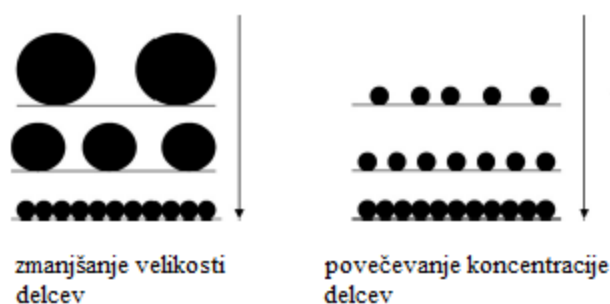
1.1 NLC

NLC uvrščamo med koloidne dostavne sisteme, kjer delce tvorijo delno kristalni lipidni delci nanometrskih velikosti dispergirani v vodni raztopini stabilizatorja (2). Uporabljamo jih lahko za dostavo predvsem lipofilnih KAS (7). Velikost delcev in fizikalna stabilnost lipidne faze sta dva izmed glavnih dejavnikov, ki vplivajo na stabilnost takšne lipidne disperzije (2).

Proces kristalizacije lipidov zmanjšuje topnost učinkovin v lipidnem ogrodju delcev, kar vodi do njihovega izrivanja iz delcev, še posebno kadar je delež le-teh v zmesi z lipidi visok. NLC imajo poleg trdnih lipidov v svojo strukturo vključene tudi tekoče lipide, kar vodi do večje učinkovitosti vgrajevanja učinkovin, saj se le-te v njih raztopijo in tako sočasno vgradijo v ogrodje, ki ga tvorijo trdni lipidi (2).

1.1.1 Učinek SLN in NLC na kožo

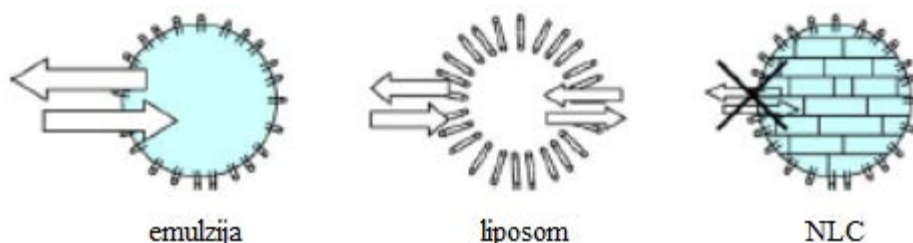
Majhna velikost omogoča nanodelcem tesen stik z roženo plastjo kože (3). Adhezija lipidnih nanodelcev na površino kože vodi v nastanek filma, ki zaradi hidrofobne narave izkazuje okluziven učinek (slika 2) (8). Najboljše okluzivno delovanje dosežemo z uporabo majhnih delcev (< 400 nm) iz lipidov z nizkim tališčem, ki se v delcih nahajajo v kristalni obliki. Pri uporabi NLC se okluzija zmanjšuje s povečevanjem deleža tekočega lipida v delcih. Z upoštevanjem zgoraj omenjenih lastnosti se po nanosu na kožo zmanjša transepidermalna izguba vode, posledično pa se hidratacija kože poveča (3). V nasprotju z uporabo nanodelcev okluzija, ki jo dosežemo z mazili s hidrofobno podlago, ne zagotavlja hitre hidratacije kože; še posebej, če je rožena plast zelo suha (8).



Slika 2: Vpliv zmanjševanja velikosti lipidnih delcev (levo) in povečevanja njihove koncentracije (desno) na okluzijski učinek. Pri enaki lipidni sestavi delcev z zmanjšanjem velikosti (nastanek večjega števila manjših delcev) ali povečevanjem števila delcev na enoto površine, s povečanjem koncentracije delcev v formulaciji, nastane gostejši film, okluzijski učinek pa je večji (3).

Ker okluzija poveča hidratacijo kože, se poveča tudi penetracija snovi v kožo (6). KAS imajo lahko le lokalni učinek, nezaželena pa je njihova absorpcija v krvni obtok. Profil sproščanja KAS iz lipidnih nanodelcev je odvisen od načina priprave nanodelcev in njihove lipidne sestave, solubilizirajočega učinka prisotnih površinsko aktivnih snovi (PAS) ter topnosti in koncentracije KAS v lipidnem ogrodju. Ti dejavniki vplivajo na notranjo strukturo delcev in s tem na hitrost sproščanja KAS (8).

Poleg tega lahko z vgrajevanjem KAS v NLC izboljšamo njeno kemijsko stabilnost in nadzorujemo njeno sproščanje, saj jo z vključitvijo v trdno lipidno ogrodje imobiliziramo. Tako ogrodje lipidnega delca deluje kot fizična pregrada, ki zavira porazdeljevanje KAS med trdno (lipidno) in vodno fazo (disperznim medijem) ter zaščiti KAS pred prezgodnjo razgradnjo (slika 3) (2, 6).



Slika 3: Shematski prikaz porazdeljevanja KAS med lipofilno in vodno fazo emulzije (levo), med lipidnim dvoslojem in vodno sredico liposoma ter disperznim medijem (sredina) ter med NLC in disperznim medijem (desno). V primeru NLC porazdeljevanja KAS med delcem in disperznim medijem praktično ni ali je izrazito upočasnjeno, kar omogoča večjo stabilnost in kasnejšo razgradnjo vgrajene KAS (6).

Zaradi sferične oblike imajo NLC dobro mazljivost in po nanosu na kožo tvorijo učinkovito mehanska pregrado, ki ščiti kožo pred vplivi iz okolja, zato so primerni za uporabo v primeru razdražene kože in alergijskih reakcij (6).

1.1.2 Izdelava

Izdelava NLC je relativno preprosta. Običajno jih izdelujemo tako, da zmes lipidov raztalimo in v talini raztopimo ali dispergiramo KAS. Dobljeno lipidno zmes s KAS nato z mešanjem pri visoki hitrosti dispergiramo v vroči raztopini stabilizatorjev. Tako dobljeno predemulzijo homogeniziramo pri povišani temperaturi in dobimo vročo nanoemulzijo tipa O/V, ki jo ohladimo. Pri ohlajanju kapljice taline lipidov kristalizirajo in tvorijo lipidno ogrodje delcev (6).

1.1.3 Sestava

Sestavine vsake disperzije NLC so lipidi, stabilizatorji in voda. NLC so razvili na podlagi klasičnih emulzij tipa O/V, kjer so večji del tekoče lipofilne faze nadomestili z lipidom, ki je pri telesni temperaturi trden in omogoča tvorbo trdnega lipidnega ogrodja nanodelcev (2).

Lipidi

Izbira ustrezne zmesi lipidov je ključnega pomena pri izdelavi NLC z želenimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi. Izbira lipidov lahko vpliva tudi na kemično in fizikalno stabilnost vgrajene KAS. Pri izbiri lipidov je potrebno upoštevati nekatere zahteve:

- Topnost KAS v lipidnem ogrodju je bistvenega pomena, saj vpliva na učinkovitost vgrajevanja in kasnejšo uporabnost NLC.
- Molekule tekočih in trdnih lipidov morajo biti čim bolj prostorsko »nezdružjive«. To pomeni, da se trdni lipid ne raztoplja v tekočem in da se tekoči lipid ne vključuje v kristalno rešetko, ki jo tvori trden lipid.
- Lipidna faza mora biti kemično stabilna (npr. odsotnost oksidacije, hidrolize lipidov).
- Lipidi morajo biti biorazgradljivi in sposobni tvoriti delce nanometrijske velikosti.
- Lipidi morajo imeti sprejemljiv toksikološki profil. Med izdelavo in razgradnjo NLC pa ne smejo nastajati strupeni stranski produkti.

Lipidi, ki se uporabljajo v pripravi delcev NLC, so običajno mono-, di- in trigliceridi, maščobne kisline in voski (preglednica I) (2).

Stabilizatorji

Glavne vrste stabilizatorjev, ki se uporabljajo pri izdelavi NLC, so PAS, fosfolipidi, polimeri, proteini in polisaharidi. Prednost proteinov in polisaharidov je, da so sestavine naravnega izvora, zato se pogosto štejejo za okolju prijazne. Vendar pa je večina disperzij NLC stabilizirana s PAS ali kombinacijo PAS in biopolimerov; zelo redko pa le z uporabo biopolimerov. Razlog je v sposobnosti PAS, da v dvofaznem sistemu omogočajo spontan nastanek nanoemulzije, saj se hitro adsorbirajo na površino kapljic in zmanjšajo medfazno napetost. Pri pripravi NLC se najpogosteje uporablja zmes vodotopnih in v olju topnih PAS (preglednica I)

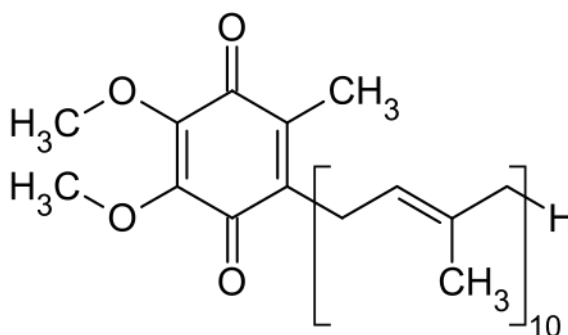
Poleg zgoraj naštetih sestavin se v disperzijo NLC lahko dodajo tudi konzervansi, antioksidanti, koemulgatorji, sotopila (npr. glicerol) in solubilizatorji, ki izboljšajo učinkovitost vgrajevanja KAS v lipidno ogrodje (2).

Preglednica I: Sestavine, ki se najpogosteje uporabljajo pri izdelavi NLC (2).

	TEKOČI LIPIDI	TRDNI LIPIDI	STABILIZATORJI
PREDSTAVNIKI	srednje verižni trigliceridi	gliceril behenat	Tween® 80
	oleinska kislina	glicerilpalmitostearat	lecitin
	naravna jedilna olja (koruzno, sojino, sončnično)	glicerilmonostearat	poloksamer 188
	vitamin E	cetilpalmitat	natrijev lavrilsulfat
	skvalen	stearinska kislina	Tween® 20
			tristearin
		propilenglikol monostearat	poligliceril-3-metilglukoza distearat
		glicerol monokaprat	

1.2 KOENCIM Q₁₀

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), znan tudi kot ubidekarenon, je edini v maščobah topen endogeni antioksidant, njegovo delovanje pa je podobno delovanju vitaminov (9, 10). Kemijsko spada med kinone, natančneje je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliizoprenil-1,4-benzokinon, ki ga poimenujemo glede na dolžino poliizoprenske verige (slika 4). CoQ₁₀, ki ima v stranski verigi deset izoprenskih enot, je pri človeku in večini sesalcev najpogostejša oblika koencima Q (11).



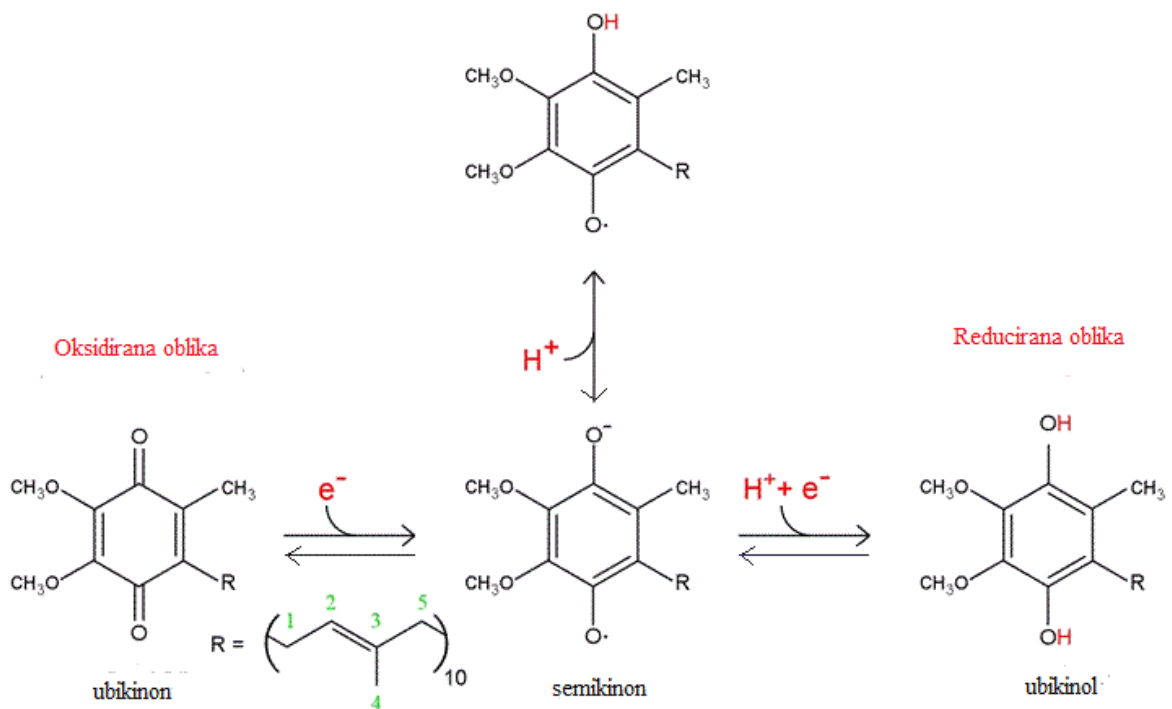
Slika 4: Kemijska struktura koencima Q₁₀ (12)

CoQ₁₀ ima relativno veliko molekulsko maso ($M_r = 863$) in tališče okoli 50 °C. Je rumeno-oranžen prašek težko topen v vodi (slika 5). Njegova topnost je omejena tudi v lipidih. Posledično se slabo absorbira iz gastrointestinalnega trakta (11). Endogeno nastaja v večini človeških tkiv, nekaj pa ga zaužijemo tudi s hrano (10). V najvišjih koncentracijah ga najdemo v tkivih, kjer je potreba po energiji velika, kot so srce, jetra, ledvice in trebušna slinavka (9, 10). V manjših koncentracijah pa je prisoten v pljučih in debelem črevesu (13). Najpogosteje je prisoten v membranah mitohondrijev, medtem ko je v citosolu le okoli 10 % celokupne količine CoQ₁₀ (11).



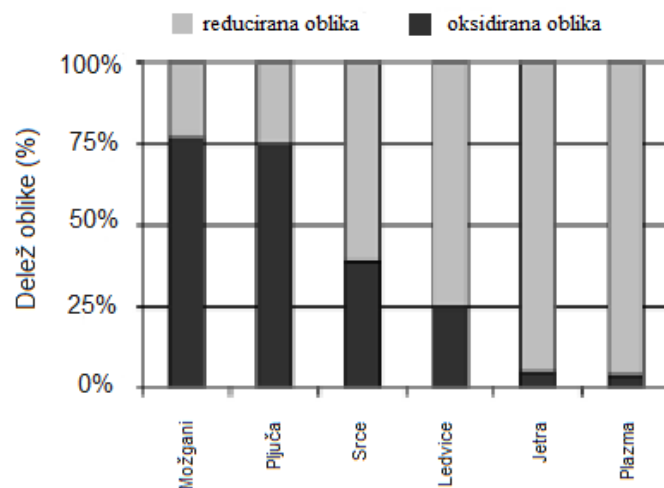
Slika 5: Prašek koencima Q₁₀ (20)

CoQ₁₀ je amfifilna molekula in ima zaradi dolge nepolarne stranske verige močan lipofilni značaj. Posledično se v telesu pojavlja v treh oblikah, in sicer (i) vgrajen v lipidnih membranah, (ii) vezan na proteine ali (iii) vključen v micelle. Njegova biološka vloga temelji na redoks ravnotežju med ubikinonsko (oksidirano), semikinonsko in ubikinolno (reducirano) obliko, ki neprestano prehajajo ena v drugo, zato nobene izmed oblik ni mogoče obravnavati prednostno (slika 6) (11).



Slika 6: Redoks stanja koencima Q₁₀ (14)

Položaj redoks ravnotežja ni v vseh tkivih enak. Na primer v ledvicah in v plazmi je ravnotežje pomaknjeno proti ubikinolu, medtem ko je v možganih in v pljučih prisotna predvsem oksidirana oblika (slika 7). Oblika CoQ₁₀, ki jo zaužijemo, ne vpliva na njegovo učinkovitost v telesu, saj takoj po njegovi absorpciji pride do spontane redukcije oksidirane oblike, zato se v krvni plazmi pojavlja predvsem reducirana oblika (11).



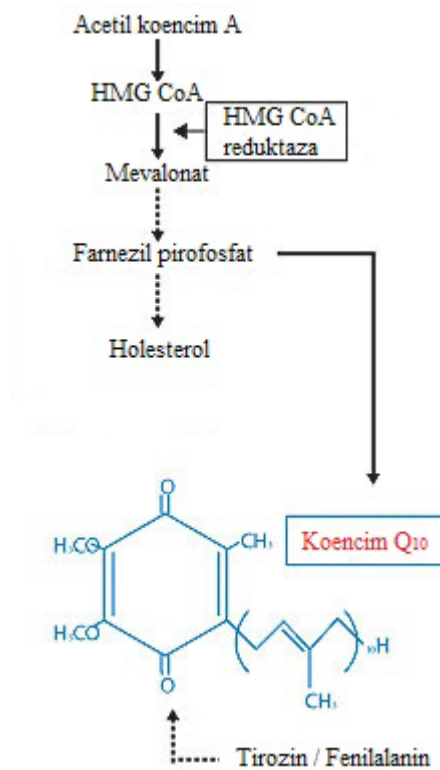
Slika 7: Razmerje med oksidirano in reducirano obliko CoQ₁₀ v različnih organih in plazmi (11)

1.2.1 Delovanje

Koencim Q₁₀ je pomemben člen v mitohondrijski dihalni verigi, kjer ima med procesom oksidativne fosforilacije vlogo prenašalca elektronov od kompleksa I (*NADH-ubikinon reduktaza*) in II (*sukcinat-ubikinon reduktaza*) do kompleksa III (*ubikinol-citokrom c reduktaza*). Tako sodeluje pri nastajanju adenzin trifosfata, ki je glavni vir energije v celicah (9, 13, 15). Poleg tega je močan antioksidant, ki ščiti celične komponente pred radikali neposredno in posredno preko regeneracije drugih antioksidantov kot sta α -tokoferol in vitamin C (9). Kot lovilec reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) ubikinol preprečuje oksidativne poškodbe lipidov, proteinov in DNA. V tej oksidativni reakciji nastaja semikinonski anion, ki se hitro pretvori v ubikinon. Le-ta pa se pretvori nazaj v ubikinol v mitohondrijski dihalni verigi (15). Nepogrešljiv je tudi pri ohranjanju optimalne pH vrednosti znotrajceličnega mikrookolja, saj ima pomembno vlogo pri prenosu elektronov preko membrane lizosomov. Hkrati deluje tudi kot stabilizator celičnih membran (10).

1.2.2 Viri in uporaba

Pri biosintezi CoQ₁₀ ima pomembno vlogo encim hidrosimetilglutaril koencim A (HMG-CoA) reduktaza, ki je pomemben encim tudi pri endogeni sintezi holesterola. Proces nastanka CoQ₁₀ je večstopenjski. Sinteza benzokinona poteka iz aminokislina fenilalanina ali tirozina, medtem ko poteka sinteza izoprenske stranske verige iz acil koencima A preko mevalonatne poti. V zadnji stopnji sinteze poteče kondenzacija benzokinona in izoprenske verige (slika 8) (10).



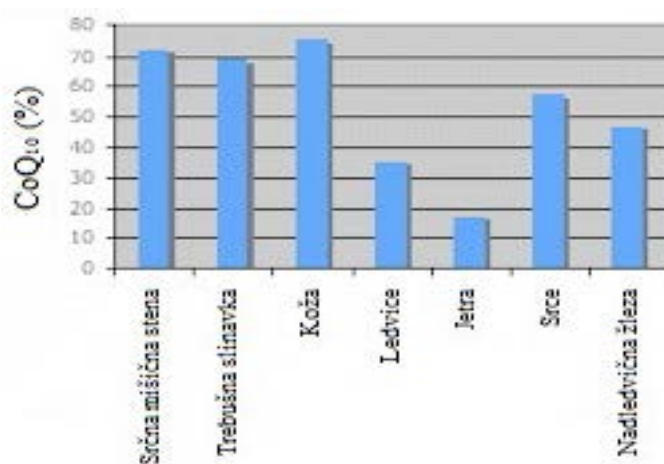
Slika 8: Biosinteza koencima Q₁₀ (16)

CoQ₁₀ je splošno priznan kot varna spojina (status GRAS, ang. *generally recognized as safe*) in se pogosto uporablja v prehranskih dopolnilih in kozmetičnih izdelkih (15).

Ker z leti endogena sinteza CoQ₁₀ upada, je zato pomembnejši eksogeni vnos, največkrat s hrano (11). Človek v povprečju na dan s hrano zaužije od 3 do 5 mg CoQ₁₀. Največ ga vsebuje meso, predvsem perutnina, govedina, drobovina in ribe (sardele), prav tako ga kar nekaj najdemo v arašidih, soji in drugih oreščkih. V manjših količinah se pojavlja tudi v mlečnih izdelkih, jajcih, zelenjavi in sadju. Velja, da ga je največ moč najti v živilih, ki vsebujejo veliko maščob (10). Raziskave kažejo, da je takšen vnos zaradi nizke naravne vsebnosti CoQ₁₀ v živilih dokaj majhen; še posebej, če prehranjevanje temelji na hrani z nizko vsebnostjo maščob. Na tržišču so se zato pojavila številna prehranska dopolnila s CoQ₁₀, ki jih je smotrno jemati pri stanjih, (i) kjer je bilo dokazano pomanjkanje CoQ₁₀, (ii) kot preventivo zaradi njegovega antioksidativnega delovanja, in (iii) v primeru, kjer ima dokazan pozitiven učinek na potek bolezni. Poleg tega se njegova koncentracija v telesu, po prenehanju jemanja, v nekaj dnevih povrne na prvotno stanje tj. na koncentracijo pred začetkom jemanja prehranskega dopolnila s CoQ₁₀. Na tržišču se prehranska

dopolnila najpogosteje pojavljajo v obliki mehkih kapsul z oljnimi suspenzijami ubikinona. Korak naprej v razvoju pa predstavlja vodotopna oblika CoQ₁₀, katero lahko enostavno dodajamo v živila z nizko vsebnostjo maščob (npr. mleko ali kefir) in kozmetične izdelke na vodni osnovi (11, 17).

S starostjo se sinteza CoQ₁₀ v organizmu zmanjša, njegova koncentracija v tkivih in plazmi je nižja, posledično pa je slabša tudi njegova učinkovitost, ki je eden izmed dejavnikov staranja kože (slika 9) (15). V mladosti je koncentracija CoQ₁₀ v koži relativno nizka, svoj maksimum doseže med 20. in 30. letom starosti, nato pa s staranjem le še pada (18). Ta podatek dobro izkorišča kozmetična industrija, saj se v zadnjem času na tržišču pojavlja vedno več izdelkov proti staranju kože, ki v svoji sestavi vsebujejo CoQ₁₀ (5). V takšne izdelke ga vključujejo predvsem zaradi njegovih antioksidativnih lastnosti, saj je učinkovit pri zaščiti keratinocitov pred oksidativnim stresom, ki ga povzroča UV sevanje (18). Znano je, da je antioksidativni učinek CoQ₁₀ v epidermisu 10-krat višji kakor v dermisu (19). Poleg tega tudi preprečuje poškodbe kolagena in elastina, kar še dodatno zavira nastanek gub (20).



Slika 9: Zmanjšanje količine CoQ₁₀ (%) v različnih tkivih pri ljudeh do 80. leta starosti (21)

Ker je CoQ₁₀ relativno draga sestavina, jo je v večini kozmetičnih izdelkov moč najti v nizkih koncentracijah. O količini dodanega CoQ₁₀ v kozmetičnem izdelku lahko sklepamo na podlagi njegove barve, saj večji dodatek le-tega obarva izdelek bolj rumeno (6). Trenutno ga na tržišču najdemo vgrajenega v liposome; novejša raziskava pa so že pokazale pozitivne lastnosti formulacij s CoQ₁₀ v SLN in NLC (6, 20).

1.2.3 Pomanjkanje koencima Q₁₀

Vzroki za pomanjkanje CoQ₁₀ so številni. Njegova količina v telesu se lahko zmanjša pri različnih boleznih, prav tako upada s starostjo, predvsem zaradi zmanjšanja lastne endogene sinteze. Nižja vsebnost CoQ₁₀ v telesu je lahko tudi posledica njegovega zmanjšanega vnosa s hrano, prevelike porabe v organizmu (velik napor, povečan metabolizem) ali motenj v biosintezi (npr. zdravljenje z inhibitorji HMG-CoA reduktaze - statini) (10). Vendar do danes še ni dokazov, da bi povečan vnos CoQ₁₀ v telo upočasnili staranje.

Uporaba CoQ₁₀ se priporoča pri zdravljenju in preprečevanju nastanka številnih bolezni. Veliko raziskav so že izvedli na področju uporabe CoQ₁₀ za zdravljenja srčno-žilnih bolezni, Parkinsonove bolezni, migrene, astme, rakavih obolenj, Alzheimerjeve bolezni, diabetesa in drugih (10).

2. NAMEN DELA

NLC, kot druga generacija lipidnih nanodelcev, so dandanes eden najperspektivnejših dostavnih sistemov za uporabo v kozmetiki. Zato smo v sklopu diplomskega dela izbrali ta koloidni dostavni sistem za vgrajevanje CoQ₁₀, ki je edini endogeni v maščobah topen antioksidant.

Naše diplomsko delo bo razdeljeno na dva segmenta. V prvem delu bomo optimirali formulacijo in pogoje izdelave NLC. Spreminjali bomo čas soniciranja, količino in razmerja lipidov ter stabilizatorjev in poskušali najti fizikalno stabilen sistem z ustreznimi lastnostmi. Izmerili bomo povprečne velikosti in polidisperzni indeks praznih NLC; NLC z vgrajenim CoQ₁₀ pa bomo poleg tega izmerili tudi ZP in jih na ta način fizikalno ovrednotili.

Poskušali bomo izvesti tudi redukcijo koencima Q₁₀ z askorbilpalmitatom ter spremljati njegovo stabilnost v formulaciji NLC pri različnih pogojih skozi čas (sobna temperatura, 4 °C in 40 °C).

V drugem delu diplomske naloge bomo razvili in validirali HPLC metodo, ki bo omogočala sočasno določanje oksidirane in reducirane oblike koencima Q₁₀ v formulacijah NLC.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sestavine

- Glicerildibehenat (Compritol 888 ATO (Gattefossé, Francija)
- Miglyol 812, zmes kaprilnih in kaprinskih trigliceridov (Sasol, Nemčija)
- Polisorbat 80, polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat (Tween 80, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Poloksamer 188 (Lutrol[®]F 68, Basf, Nemčija)
- 6-O-palmitoil-L-askorbinska kislina, $C_{22}H_{38}O_7$, $M_r = 414,53$ g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- L-askorbinska kislina, $C_6H_8O_6$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Koencim Q₁₀ (Kaneka Corporation, Japonska)
- Acetonitril, C_2H_3N ; Chromasolv, for HPLC, gradient grade, $M_r = 41,05$ g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- n-heksan, 95 %, C_6H_{14} , PA-ACS, $M_r = 86,18$ g/mol (Panreac, Španija)
- Metanol; Chromasolv for HPLC, >99,9% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Tetrahidrofuran, C_4H_8O ; Chromasolv, for HPLC, $M_r = 72,1$ g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- MilliQ voda, H_2O (Fakulteta za farmacijo)
- Brezvodni etanol, C_2H_5OH ; puriss p.a., Reag. Ph Eur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)

3.1.2 Naprave in pribor

- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- Polistirenske kivete za merjenje velikosti delcev (Sarstedt AG & Co, Nemčija)
- Celice za merjenje zeta potenciala: DTS 1061 (Malvern, Velika Britanija)
- Ultrazvočna sonda; Ultrasonic processor (Cole Parmer, ZDA)
- Ultracentrifuga Thermo Scientific WX Ultra 100 (Sigma, Nemčija)
- Centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf, Nemčija)
- Mehanske pipete 100-1000 μ l, 10-100 μ l (Biohit, Eppendorf, Nemčija)
- Precizna tehtnica (Mettler Toledo AG245, ZDA)

- Vibracijsko mešalo (vorteks) Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Vodna kopel (Gorenje, Slovenija)
- Kuhalnik (Končar, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonis (Iskra Pio, Slovenija)
- Digestorij (Waldner Electronics, Nemčija)
- Filtri Minisart RC 4; 0,20 μm , nesterilni (Sartorius stedim Biotech GmbH, Nemčija)

- HPLC sistem 1100 series (Agilent Technologies)
 - Kvarterna črpalka
 - Avtomatski vzorčevalnik
 - Termostat za kolono
 - UV-VIS detektor
 - Programska oprema ChemStation
 - Kolona: Synergi Hydro, C18, 5 μm , 250 x 4,0 mm

3.2 METODE

3.2.1 Priprava reducirane oblike CoQ₁₀

Za pripravo NLC z vgrajeno reducirano obliko CoQ₁₀ smo le-to pripravili z redukcijo oksidirane oblike CoQ₁₀ z askorbilpalmitatom. Natehtali smo 24 mg CoQ₁₀ in 24 mg askorbilpalmitata v 2 ml bučko, ki smo jo do oznake dopolnili z absolutnim etanolom. Dobljeno raztopino smo za 11 dni postavili v kopel s temperaturo 60 °C.

3.2.2 Izdelava NLC

3.2.2.1 Priprava raztopin stabilizatorjev

Pred vsako izdelavo nanodelcev smo najprej pripravili raztopino stabilizatorjev. Uporabili smo stabilizatorja poloksamer 188 in polisorbitat 80 v različnih masnih razmerjih (preglednica II).

Preglednica II: Sestava raztopin stabilizatorjev za pripravo NLC

	C_(poloksamer 188) (mg/ml)	C_(polisorbat 80) (mg/ml)
Raztopina 1	12	6
Raztopina 2	6	3
Raztopina 3	3	1,5
Raztopina 4	6	-
Raztopina 5	-	3

V 100 ml merilni bučki smo pripravili raztopino tako, da smo v bučko natehtali poloksamer 188 in/ali polisorbat 80 ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake volumna. Nato smo bučko zatesnili s pokrovčkom in jo stresali, dokler se stabilizatorja nista povsem raztopila.

Pri pripravi nanodelcev s CoQ₁₀ smo vedno uporabili raztopino 2 iz preglednice II, saj smo tekom optimizacije sestave formulacije ugotovili, da je to najboljša kombinacija obeh stabilizatorjev.

3.2.2.2 Izdelava praznih NLC

NLC smo pripravili z metodo homogeniziranja taline lipidov v vodno fazo stabilizatorja s soniciranjem. Neposredno v 15 ml centrifugirko smo natehtali trdni lipid (Compritol 888) in tekoči lipid (Miglyol 812) v različnih masnih razmerjih. Lipide smo na vodni kopeli segreli na ~85 °C, da se je trden lipid raztalil. Sočasno smo na enako temperaturo segreli tudi predhodno pripravljeno vodno raztopino stabilizatorjev. K talini lipidov smo dodali 2 ml segrete raztopine stabilizatorjev in z uporabo ultrazvočne sonde (amplituda 30 %) kontinuirano sonicirali. Konico ultrazvočne sonde smo pred soniciranjem segreli v vroči vodni kopeli, da smo preprečili morebitno strjevanje trdnega lipida ob stiku s konico sonde. Dobljeno nanoemulzijo tipa O/V smo takoj po končanem soniciranju ohladili na ledu (~5 min). Med ohlajanjem so se emulzijske kapljice strdile in nastala je disperzija NLC.

Tekom razvoja formulacije NLC smo spreminjali naslednje parametre in ugotavljali vpliv na povprečno velikost dobljenih nanodelcev in njihovo polidisperznost:

- čas soniciranja (30, 45, 60 ali 75 s),
- masa lipidov v disperziji (24, 48, 72 ali 96 mg) in
- masni delež tekočega lipida (20, 30, 40 ali 50 %).

Na podlagi rezultatov smo se odločili za najbolj optimalno formulacijo in parametre izdelave, ki smo jih uporabili v postopku priprave NLC s CoQ₁₀.

3.2.2.3 Izdelava NLC s CoQ₁₀

Z optimizacijo izdelave praznih NLC smo določili najprimernejšo kombinacijo trdnega in tekočega lipida in sestave raztopine stabilizatorjev ter se hkrati odločili za čas soniciranja, ki daje najbolj optimalne povprečne velikosti in polidisperzni indeks (PI) nanodelcev. Te parametre smo upoštevali pri izdelavi NLC s KAS - CoQ₁₀ (preglednica III).

Preglednica III: Sestava formulacij NLC s CoQ₁₀

Delež (m/m) lipidov nadomeščenih s CoQ₁₀	5 %	10 %
c_(CoQ₁₀) v disperziji nanodelcev	1,2 mg/ml	2,4 mg/ml
čas soniciranja	75 s	75 s
c_(poloksamer 188)	6 mg/ml	6 mg/ml
c_(polisorbat 80)	3 mg/ml	3 mg/ml
c_(Compritol 888) - trdni lipid	18,24 mg/ml	17,28 mg/ml
c_(Miglyol 812) - tekoči lipid	4,56 mg/ml	4,32 mg/ml
Delež (m/m) tekočega lipida	20 %	20 %

Izdelava NLC s CoQ₁₀ je bila zelo podobna pripravi praznih NLC. V centrifugirko smo najprej natehtali zmes lipidov (trdni in tekoči lipid), katero smo segreli na vodni kopeli (~85 °C), da se je trden lipid raztalil, in ji dodali 200 µl predhodno pripravljene etanolne raztopine CoQ₁₀ v absolutnem etanolu s koncentracijo 12 mg/ml oz. 24 mg/ml. Nato smo dodali 2 ml na enako temperaturo segrete raztopine stabilizatorjev (*raztopina 2*, preglednica II) in s pomočjo ultrazvočne sonde s predhodno segreto konico kontinuirano sonicirali 75 s (amplituda 30 %). Po končanem soniciranju smo disperzijo NLC takoj ohladili na ledu (~5 min).

3.2.3 Fizikalno vrednotenje NLC

Povprečni premer delcev, PI in zeta potencial (ZP) smo NLC izmerili z napravo Zetasizer Nano ZS. Ker so delci NLC manjši od 1 μm , je fotonska korelacijska spektroskopija, ki smo jo uporabili, primerna metoda za določanje hidrodinamskega premera in porazdelitve velikosti delcev (PI) v disperziji. Ta metoda temelji na sipanju svetlobe na koloidnih delcih, ki se v disperziji Brownovo gibajo. Za določitev ZP pa smo uporabili metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze, ki temelji na merjenju hitrosti gibanja nabitih delcev v električnem polju.

V kiveto za merjenje velikosti delcev smo odmerili ~ 1 ml raztopine stabilizatorjev z enako sestavo, kot jo je imel disperzni medij NLC. V raztopino smo dodali tri kapljice disperzije NLC, previdno premešali, pokrili kiveto s pokrovčkom in izvedli meritev.

Po končani meritvi povprečne velikosti delcev smo vzorec iz kivete posrkali v 2 ml brizgo in ga previdno napolnili v kapilarno celico za merjenje ZP ter izvedli meritev.

Pogoji meritev (povprečni premer delcev, PI):

- 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: $\epsilon = 78,5$ (voda)
- model: Smoluchowski
- celica: DTS 1061, kapilarna celica
- število meritev: 3

3.2.4 Spremljanje fizikalne stabilnosti NLC

Spremljali smo spreminjanje velikosti in PI praznih NLC v odvisnosti od časa. Vzorce smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C, meritve pa izvajali vsakih 7 dni v obdobju enega meseca. Na enak način smo spremljali tudi fizikalno stabilnost NLC s CoQ₁₀, le da smo vzorce NLC s CoQ₁₀ shranjevali pri 4 °C, sobni temperaturi in 40 °C. Tem vzorcem smo izmerili tudi ZP.

3.2.5 Vsebnost CoQ₁₀ v formulaciji NLC

Za določanje vsebnosti CoQ₁₀ v formulaciji NLC smo analizirali po tri paralele istega vzorca disperzije NLC. Najprej smo odpipetirali 100 µl disperzije NLC v tri 2 ml bučke, katere smo do oznake dopolnili z mobilno fazo, ki smo jo uporabljali pri HPLC analizi. Bučke smo postavili v vodno kopel segreto na ~70 °C in vzorce segrevali dokler se lipidi niso raztopili ter jih nato dali na led (~5 min). Če je med segrevanjem kaj topila izhlapelo, smo ga ponovno dopolnili do oznake. Vzorce smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in temperaturi, 25 °C. Dobljeni supernatant smo analizirali s HPLC.

3.2.6 Določanje zaostanka CoQ₁₀ v sedimentu

Poleg učinkovitosti vgrajevanja smo določali tudi koliko CoQ₁₀ ostane v sedimentu po centrifugiranju. Najprej smo pripravili tri paralele vzorcev tako, da smo v 2 ml merilne bučke odpipetirali 150 µl disperzije praznih NLC, s sestavo, ki smo jo z optimizacijo določili, da je najboljša. Nato smo v bučke dodali 100 µl raztopine CoQ₁₀ v heksanu s koncentracijo 1,8 mg/ml ter dopolnili z mobilno fazo do oznake. Dobljene vzorce smo segrevali 1 min na vodni kopeli s temperaturo ~70 °C, ter jih nato (~5 min) ohlajali na ledu, da so se lipidi oborili. Če je med pripravo izhlapelo kaj topila (mobilna faza), smo ga dopolnili do oznake. Vzorce smo nato prenesli v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in temperaturi 25 °C. Po končanem centrifugiranju smo razplatenim vzorcem odvzeli supernatant, sediment pa ponovno resuspendirali v mobilni fazi, ga prenesli nazaj v merilno bučko, dopolnili z mobilno fazo do oznake in ponovili postopek kot je zgoraj navedeno tj. segrevanje, ohlajanje in centrifugiranje. CoQ₁₀ v supernatantu po prvem in drugem centrifugiranju smo določili s HPLC.

Izkoristek ekstrakcije smo določali neposredno preko odzivov prve in druge serije priprave vzorca glede na odziv standarda, katerega smo uporabili.

3.2.7 Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC

Učinkovitost vgrajevanja smo določali na formulaciji NLC z 10 % CoQ₁₀ tako, da smo 1,5 ml disperzije NLC odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 h pri 50.000 obratih/min pri temperaturi 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo previdno odvzeli vzorca supernatanta (iz različnih višin v mikrocentrifugirki) in ju prefiltrirali skozi 0,2 µm filter neposredno v viali. Količino CoQ₁₀ v supernatantu smo določili s HPLC. Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC smo določali posredno preko deleža nevgrajene KAS, ki je bila prisotna v supernatantu in celotne količine CoQ₁₀ v disperziji. Iz razlike med celokupno količino CoQ₁₀ v vzorcu in količino nevgrajenega CoQ₁₀ smo izračunali delež CoQ₁₀, ki se je vgradilo v NLC (enačba 1).

$$\eta = \frac{c(\text{celotna CoQ}_{10}) - c(\text{nevgrajena CoQ}_{10})}{c(\text{celotna CoQ}_{10})} \times 100 \% \quad \text{Enačba 1}$$

3.2.8 Razvoj HPLC metode za določanje koencima Q₁₀

V okviru diplomske naloge je bil CoQ₁₀ KAS, ki smo jo vgrajevali v NLC. Za njegovo analizo v izdelanih formulacijah smo morali najprej razviti ustrezno analizno metodo, ki sočasno omogoča določanje CoQ₁₀ v reducirani in oksidirani obliki. V ta namen 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 oksidirane oblike CoQ₁₀ (t_R): cca 9,5 min

retencijski čas reducirane oblike CoQ₁₀ (t_R): cca 9 min

3.2.8.2 Priprava mobilne faze in standardnih raztopin

Mobilna faza

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, tetrahidrofurana in prečiščene vode v razmerju 55:40:5 (v/v/v). Pred uporabo smo mobilno fazo razplinili s pomočjo ultrazvočne kadičke, v katero smo postavili steklenico s pripravljeno mobilno fazo za največ 5 min, saj bi pri daljšem času lahko prišlo do znatnega izhlapevanja, predvsem tetrahidrofurana.

Priprava standardne raztopine koencima Q₁₀

Natančno smo natehtali 1,0 mg standarda CoQ₁₀ in ga raztopili v 1 ml brezvodnega etanola. Tako smo dobili raztopino z znano koncentracijo 1 mg/ml, ki smo jo nadalje redčili z brezvodnim etanolom tako, da smo dobili raztopino s koncentracijo CoQ₁₀ 50 µg/ml, ki smo jo analizirali s HPLC analizo.

3.2.8.3 Validacija analizne metode določanja CoQ₁₀

Z validacijo analizne metode potrdimo, da je le-ta primerna za analizo vzorcev in daje zanesljive rezultate; torej je zaključek razvoja metode, s katerim potrdimo njeno ustreznost za analizo določene substance v vzorcu, v našem primeru CoQ₁₀.

Linearnost in območje

Linearnost je sposobnost metode, da v določenem območju oziroma intervalu zagotavlja odzive, ki so premo sorazmerni s koncentracijo analizirane spojine v vzorcu. Kot rezultat dobimo umeritveno premico z enačbo: odziv = koncentracija × k + n in korelacijski koeficient (r^2). Koeficient korelacije ima pri popolni linearnosti vrednost 1.

V naši raziskavi smo kot sprejemljivo vrednost določili $r^2 \geq 0,99$.

Za določitev območja linearnosti smo pripravili 3 vzorce z različno vsebnostjo NLC s 5 % CoQ₁₀. Vse vzorce pa smo pripravili v treh paralelah. Najprej smo odpipetirali 50 µl disperzije NLC s 5 % CoQ₁₀ v tri 2 ml merilne bučke in do oznake dopolnili z mobilno fazo. Bučke smo nato dali na 70 °C segreto vodno kopel za približno 1 min, z namenom da so se lipidi raztopili. Nato smo bučke z vzorci postavili za ~5 min na led. Če je med segrevanjem kaj topila izhlapelo, smo ga ponovno natančno dopolnili z mobilno fazo.

Dobljene vzorce smo napolnili v mikrocentrifugirke in centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in temperaturi 25 °C. Po končanem centrifugiranju smo vzorcem odvzeli supernatant in ga analizirali s HPLC. Ostale vzorce smo pripravili po enakem postopku, le da smo v bučke odpipetirali 100 oz. 150 µl disperzije NLC s 5 % CoQ₁₀.

Ponovljivost

Ponovljivost nam pove, koliko se rezultati meritev analizirane spojine med seboj razlikujejo. Merilo ponovljivosti se običajno izračuna kot standardni deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD). V ta namen smo uporabili iste vzorce, kot smo jih pri izdelavi umeritvene premice in ugotavljali med meritvami istega analiziranega vzorca, koliko se med seboj rezultati skladajo.

Kot mejo sprejemljivosti smo določili $RSD \leq 10 \%$.

Selektivnost

Selektivnost je sposobnost metode, da lahko pravilno kvantitativno določimo koncentracijo določene spojine v vzorcu, ki jo analiziramo. Ugotavljali smo jo tako, da smo primerjali kromatogram formulacije praznih NLC (blank) in kromatogram formulacije praznih NLC, kateri je bila dodana znana količina CoQ₁₀. Vzorca smo pripravili po naslednjem postopku:

Prvi vzorec: K 20 µl raztopine askorbilpalmitata s koncentracijo 1 mg/ml v metanolu smo dodali 20 µl raztopine CoQ₁₀ s koncentracijo 1 mg/ml v metanolu, 60 µl disperzije praznih NLC in 300 µl acetonitrila.

Drugi vzorec (blank): K 60 µl disperzije praznih NLC smo dodali 40 µl metanola in 300 µl acetonitrila.

Oba vzorca smo pripravili v mikrocentrifugirkah, v katere smo sestavine dodajali v vrstnem redu, kot je navedeno zgoraj. Nato smo mikrocentrifugirki z vzorcema postavili na vodno kopel s temperaturo ~75 °C, da so se lipidi raztopili ter ju nato dali na led (~5 min). Vzorca smo nato centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in temperaturi 25 °C. Po končanem centrifugiranju smo odvzeli supernatant in ga dali analizirati s HPLC.

Točnost

Točnost nam pove, kako dobro se naši rezultati skladajo z deklarirano vrednostjo.

Iz enačbe umeritvene premice smo glede na odziv izračunali koncentracijo CoQ₁₀. Točnost smo izrazili kot odstotek ujemanja med izračunanimi in dejanskimi koncentracijami CoQ₁₀.

Kot mejo sprejemljivosti smo določili $100 \pm 10 \%$.

Meja določljivosti

Mejo določljivosti je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko z metodo kvantitativno določimo. V naši diplomski nalogi smo jo opredelili kot najnižjo točko umeritvene premice.

3.2.8.4 Stabilnost reducirane oblike CoQ₁₀ v NLC

Vsebnost oksidirane in reducirane oblike CoQ₁₀ v formulaciji NLC, ki smo jo shranjevali pri različnih pogojih (4 °C, sobni temperaturi in 40 °C) smo analizirali s HPLC vsakih 7 dni v obdobju enega meseca z namenom, da preverimo prisotnost oz. stabilnost reducirane oblike CoQ₁₀ v formulaciji NLC. V 2 ml merilno bučko smo odpipetirali 100 µl disperzije nanodelcev s 5 % CoQ₁₀ in dopolnili do oznake volumna z mobilno fazo, ki smo jo uporabljali pri HPLC analizi. Ob dodatku mobilne faze so se pojavili kosmiči lipidov, zato smo vzorec postavili na vodno kopel (~70 °C) za ~1 min, dokler se lipidi v mobilni fazi niso raztopili. Mobilno fazo, ki je med segrevanjem izhlapela, smo z mobilno fazo ponovno do dopolnili oznake. Vzorce smo nato centrifugirali 15 min pri 15.000 obratov/min in 25 °C. Po končanem centrifugiranju smo previdno odpipetirali 600 µl supernatanta neposredno v vialo in ga analizirali s HPLC. Vzorce smo pripravili v treh paralelah.

Vrednotenje stabilnosti reducirane oblike CoQ₁₀ v formulaciji je zelo pomembno, saj ima le ta oblika antioksidativno delovanje. Etanolno raztopino, ki je vsebovala 12 mg/ml CoQ₁₀ in 12 mg/ml askorbilpalmitata, smo za 11 dni postavili v kopel s temperaturo 60 °C. Dodatek askorbilpalmitata je omogočil pretvorbo oksidirane oblike CoQ₁₀ v reducirano, vendar ne popolnoma, zato sta bili v vzorcu prisotni obe obliki. Koencim Q₁₀ v takšni obliki smo vgradili v NLC. Lipidne nanodelce smo takoj po izdelavi razdelili na alikvote v

mikrocentrifugirke, jih zatesnili in shranili pod različnimi pogoji, in sicer en alikvot pri sobni temperaturi, drug alikvot v hladilniku pri 4 °C in tretji alikvot pri 40 °C. Stabilnost reducirane oblike v formulaciji NLC smo ugotavljali v določenih časovnih točkah: takoj po izdelavi, čez 1, 2, 3 in 4 tedne.

V sklopu diplomske naloge smo prav tako ugotovili, da reducirana in oksidirana oblika ne dajeta ekvivalentnih odzivov. Zato smo v ta namen izračunali faktor pretvorbe. V prvem delu izračuna smo določili delež reducirane oblike, ki je ostala v vzorcu glede na odziv istega vzorca pred tednom dni. Faktor smo nato izračunali tako, da smo razliko med odzivi oksidirane oblike med staranim in začetnim vzorcem, delili z odstotki oksidirane oblike (100 % - odstotek preostale reducirane oblike v staranem vzorcu). Povprečni faktor smo izračunali kot povprečje štirih izračunanih faktorjev posameznih vzorcev, pri katerih je bila prisotna reducirana oblika (enačba 2).

$$F = \frac{A_{280}(\text{oksidirana oblika, staran vzorec}) - A_{280}(\text{oksidirana oblika})}{100\% - \text{delež ostale reducirane oblike v staranem vzorcu}} \quad \text{Enačba 2}$$

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA SESTAVE IN IZDELAVE NLC

Naš namen je bil izdelati koloidni sistem, ki je fizikalno stabilen in v katerega bi lahko vgradili zadostno količino CoQ₁₀, zato smo v začetnem delu diplomske naloge optimizirali sestavo formulacije NLC in pogoje izdelave NLC.

4.1.1 Proučevanje vpliva časa soniciranja

Za proučevanje vpliva časa soniciranja na velikost in PI NLC smo izbrali formulacijo stabilizirano s poloksamerom 188 s koncentracijo 12 mg/ml in polisorbatom 80 s koncentracijo 6 mg/ml. Skupna količina lipidov je bila 12 mg/ml disperzije, od tega je bilo 20 % tekočega lipida. Na podlagi literaturnih podatkov (22) smo predvidevali, da lahko z izbrano sestavo izdelamo fizikalno stabilno disperzijo koloidnih delcev.

Preglednica IV: Vpliv časa soniciranja na povprečni premer in polidisperzni indeks NLC

Čas soniciranja (s)	Povprečni premer delcev (nm)	PI
30	102,9	0,328
45	100,1	0,429
60	84,5	0,267
75	78,4	0,270

Ugotovili smo, da daljši čas soniciranja omogoča izdelavo manjših in glede na velikost bolj poenotnih delcev (preglednica IV). Kot začetni čas soniciranja smo izbrali 30 s, kjer nam je uspelo izdelati delce nanometrskih velikosti, vendar je bila njihova porazdelitev velikosti še vedno polidisperzna, zato smo se odločili podaljšati čas soniciranja. S 75 s soniciranja smo uspeli pripraviti NLC z najmanjšo povprečno velikostjo in bolj homogeno porazdelitvijo velikosti delcev. Časa soniciranja nadalje nismo podaljševali, saj bi lahko dosegli ravno obraten učinek tj. zaradi prevelikega vnosa energije v sistem bi lahko povzročili ponovno združevanje kapljic in nastanek večjih delcev.

4.1.2 Proučevanje vpliva celokupne količine lipidov v formulaciji

Na lastnosti nanodelcev vpliva, poleg drugih parametrov, tudi zmes lipidov, ki jo uporabimo za izdelavo NLC. Zato smo proučevali, kako vpliva celokupna količina lipidov v disperziji na povprečno velikost in polidisperznost izdelanih NLC. Izbrali smo formulacijo z 20 % tekočega lipida, ki smo jo sonicirali 75 s.

Preglednica V: Vpliv celokupne vsebnosti lipidov v disperziji na povprečni premer in polidisperzni indeks NLC

Povečana količina lipidov (mg/ml)	Odstotek tekočega lipida (%)	Povprečni premer delcev (nm)	PI
12	20	78,36	0,270
24	20	118,0	0,248
36	20	190,0	0,238
48	20	227,2	0,274

Rezultati prikazani v preglednici V kažejo, da se s povečevanjem celokupne koncentracije lipidov v disperziji povečuje tudi povprečni premer delcev, medtem ko se PI le malo spreminja. Cilj izdelave NLC je izdelati karseda koncentrirano disperzijo NLC, ki jo v

nadaljevanju vgradimo v kozmetični izdelek. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo za pripravo NLC s CoQ₁₀ uporabili formulacijo s celokupno koncentracijo lipidov 24 mg/ml.

4.1.3 Proučevanje vpliva deleža tekočega lipida v NLC

Ugotavljali smo tudi, kako delež tekočega lipida v formulaciji vpliva na fizikalne lastnosti NLC. Doslej smo za disperzijo NLC uporabili 20% tekočega lipida. Za tokratno pripravo serij NLC smo uporabili lipide s koncentracijo 24 mg/ml, kjer smo spreminjali odstotek dodanega tekočega lipida. Vsi ostali parametri so ostali enaki, kot v prejšnjih poskusih.

Preglednica VI: Vpliv deleža tekočega lipida v NLC na povprečni premer in polidisperzni indeks NLC

Celokupna koncentracija lipidov (mg/ml)	Delež tekočega lipida (%)	Povprečni premer delcev (nm)	PI
24	20	118,0	0,248
24	30	135,4	0,218
24	40	175,5	0,219
24	50	167,0	0,211

Na podlagi rezultatov, ki so prikazani v preglednici VI, lahko zaključimo, da se z večanjem deleža tekočega lipida v NLC povprečna velikost delcev rahlo povečuje, medtem ko se PI večinoma ne spreminja. Najmanjši delež (20 %) tekočega lipida v NLC nam je omogočil izdelavo delcev z najmanjšo povprečno velikostjo med vzorci z enako celokupno koncentracijo lipidov. Prav iz tega razloga smo se odločili izdelati NLC s CoQ₁₀ iz zmesi lipidov z 20 % tekočega lipida.

4.1.4 Proučevanje vpliva količine in sestave stabilizatorjev

V zadnji fazi optimizacije formulacije NLC smo preverjali, kako vpliva koncentracija in sestava raztopine stabilizatorjev na povprečni premer in polidisperznost NLC. Pri izdelavi smo želeli uporabiti čim manjšo količino stabilizatorjev, pri kateri so delci še vedno dovolj majhni in fizikalno stabilni. Vpliv stabilizatorjev smo proučevali na formulaciji NLC, ki

smo jo pripravili s celokupno količino lipidov s koncentracijo 24 mg/ml (od tega 20 % tekočega lipida). Pri izdelavi smo emulzijo sonicirali 75 s ter spreminjali sestavo in koncentracijo stabilizatorjev v disperziji.

Preglednica VII: Vpliv sestave in koncentracije stabilizatorjev na povprečni premer in polidisperzni indeks NLC

Koncentracija poloksamera 188 v razt. stabilizatorjev (mg/ml)	Koncentracija polisorbata 80 v razt. stabilizatorjev (mg/ml)	Povprečni premer delcev (nm)	Polidisperzni indeks
12	6	118,0	0,248
6	3	164,8	0,243
3	1,5	313,8	0,261
6	-	292,2	0,200
-	3	350,8	0,286

Površino NLC prekriva sloj molekul stabilizatorja, ki izboljša fizikalno stabilnost delcev tako, da prepreči njihovo združevanje. Poleg tega je cilj pri pripravi nanodelcev uporabiti čim nižjo koncentracijo le-teh, saj lahko potencialno dražijo kožo. Glede na rezultate, ki so prikazani v preglednici VII, je pri nižjih koncentracijah in pri uporabi le enega stabilizatorja povprečni premer delcev večji, kot v primeru kombinacije in višje koncentracije stabilizatorjev. Želeli smo izdelati NLC z velikostjo < 200 nm, zato smo se odločili, da bomo izbrali kompromis med najmanjšo velikostjo in koncentracijo stabilizatorja v disperziji NLC in pri izdelavi NLC s CoQ₁₀ uporabili raztopino obeh proučevanih stabilizatorjev s koncentracijo poloksamera 188 6 mg/ml in polisorbata 80 3 mg/ml.

Če povzamemo ugotovitve optimizacije sestave formulacije praznih NLC, lahko zaključimo, da le-ta vsebuje celokupno 24 mg/ml lipidov, od tega je 20 % tekočega lipida, in je pripravljena v disperznem mediju s 6 mg/ml poloksamera 188 in 3 mg/ml polisorbata 80. Pri izdelavi je optimalni čas soniciranja 75 s.

4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE KOENCIMA Q₁₀

Na podlagi rezultatov zbranih v preglednici VIII lahko sklepamo, da ekstrakcija CoQ₁₀ iz NLC ni popolna, saj se med centrifugiranjem nekaj CoQ₁₀ obori skupaj z lipidi. Delež CoQ₁₀, ki smo ga določili po drugem centrifugiranju kaže na to, da izgube niso velike, kar pomeni, da ne vplivajo bistveno na naše nadaljnje rezultate.

Preglednica VIII: Delež celokupne količine CoQ₁₀ iz NLC

	Prvi supernatant	Drugi supernatant
Delež CoQ ₁₀	93,6 %	6,2 %

4.3 VSEBNOST REDUCIRANE OBLIKE KOENCIMA Q₁₀ V DISPERZIJI NLC

Vsebnost reducirane oblike CoQ₁₀ v disperziji NLC smo določali neposredno preko odzivov pridobljenih s HPLC analizo pred in po vgrajevanju. Pri izdelavi nanodelcev smo uporabili raztopino reducirane oblike CoQ₁₀, ki pa je že v začetku vsebovala tudi nekaj oksidirane oblike. Pred vgrajevanjem je bilo v vzorcu prisotne 85,68 % reducirane oblike in 14,32 % oksidirane oblike. S pomočjo HPLC in upoštevanjem faktorja pretvorbe med oblikama smo določili, da je po vgrajevanju v nanodelcih prisotne 86,56 % reducirane oblike. Iz rezultatov lahko sklepamo, da med izdelavo nanodelcev ni prišlo do značilnih pretvorb med obema oblikama.

4.4 VREDNOTENJE NLC Z VGRAJENIM CoQ₁₀

NLC s CoQ₁₀ smo poleg povprečne velikosti in PI izmerili tudi ZP, ki vpliva na fizikalno stabilnost koloidnih disperzij. Višja absolutna vrednost ZP elektrostatsko stabiliziranih koloidnih disperzij pomeni boljšo fizikalno stabilnost, če pa se vrednost ZP približuje 0, so delci manj stabilni, saj težijo k agregiranju.

Preglednica IX: Povprečni premer, PI in ZP praznih NLC in NLC s CoQ₁₀ takoj po izdelavi

	d (nm)	PI	ZP (mV)
Prazni NLC	164,8	0,243	-16,3 ± 0,2
NLC s 5 % CoQ₁₀	209,1	0,234	-18,8 ± 0,5
NLC z 10 % CoQ₁₀	200,0	0,270	-15,5 ± 0,7
NLC z red. obl. CoQ₁₀	167,0	0,216	-16,8 ± 0,3

Glede na rezultate v preglednici IX je bila najmanjša povprečna velikost NLC v formulaciji z reducirano obliko CoQ₁₀. Ta velikost je bila primerljiva z velikostjo praznih NLC z enako sestavo (164,8 nm). Na podlagi rezultatov lahko predvidevamo, da vgrajevanje oksidirane oblike CoQ₁₀ bolj vpliva na povprečno velikost NLC kot vgrajevanje reducirane oblike CoQ₁₀. Oblika CoQ₁₀, ki smo jo vgrajevali v NLC, pa ni vplivala na ZP, saj je bila vrednost le-tega pri vseh formulacijah primerljiva. Sklepamo lahko, da je izmerjen ZP dovolj visok za fizikalno stabilnost disperzije NLC, saj je bil v formulaciji prisoten tudi sterični stabilizator (poloksamer 188), ki je še dodatno stabiliziral nastale koloidne delce.

4.4.1 Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC

Eden najpomembnejših dejavnikov, ki določajo uspešnost izdelave dostavnega sistema, je učinkovitost vgrajevanja KAS. Učinkovitost vgrajevanja smo določali posredno z metodo ultracentrifugiranja disperzije NLC in analize supernatanta z uporabo HPLC za določitev koncentracije nevgrajenega CoQ₁₀. Učinkovitost vgrajevanja smo določevali pri formulaciji NLC z 10 % CoQ₁₀. Pri centrifugiranju so se dispergirani koloidni delci učinkovito ločili od disperznega medija, saj je bil supernatant bister, zato lahko zaključimo, da je postopek ultracentrifugiranja, ki smo ga uporabili, primeren za ločevanje NLC od disperznega medija.

Preglednica X: Koncentracija CoQ₁₀ in učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC

	Celokupna koncentracija CoQ₁₀ (mg/ml)	Koncentracija nevgrajenega CoQ₁₀ (mg/ml)	Koncentracija vgrajenega CoQ₁₀ (mg/ml)	Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC (%)	Povprečna učinkovitost vgrajevanja (%)
Vzorec 1	2,4	0,00396	2,396	99,84	99,89
Vzorec 2	2,4	0,00174	2,398	99,93	

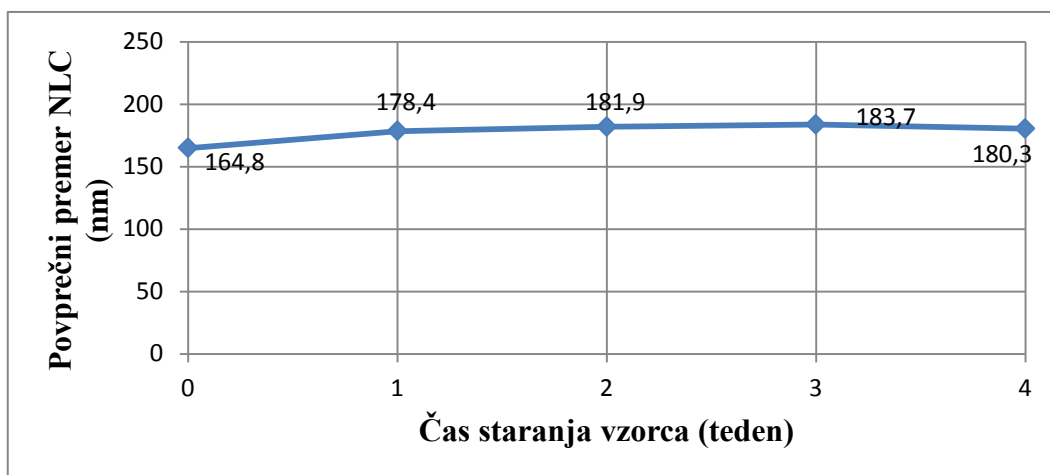
Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC je bila zelo visoka, saj je znašala skoraj 100 %. Izgube med samo pripravo delcev smo pri izračunu učinkovitosti vgrajevanja zanemarili. Visoko učinkovitost vgrajevanja smo pričakovali, saj je CoQ₁₀ težko vodotopna KAS, zato v disperznem mediju ostane le malo raztopljenega KAS. Na podlagi rezultatov, pa ne moremo vedeti, ali se je med izdelavo NLC slučajno del KAS oboril v obliki nanometrskih delcev (nanosuspenzija). Tudi ti delci so se med centrifugiranju posedli in smo jih zajeli kot vgrajeno KAS, čeprav se ni vgradila. Torej je lahko dobljen rezultat vgrajevanja lažno višji, a tega brez dodatnih raziskav ne moremo vedeti.

4.5 FIZIKALNA STABILNOSTI NLC SKOZI ČAS

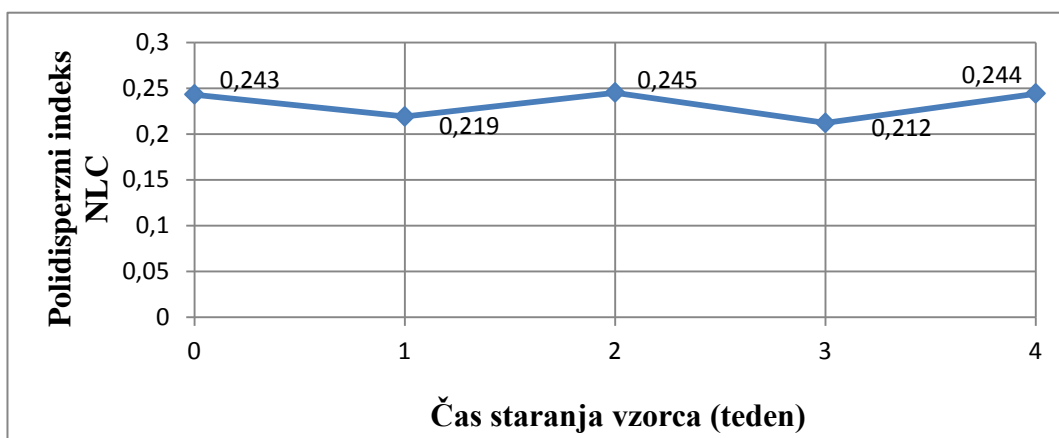
Praznim NLC in prav tako NLC s CoQ₁₀ smo določevali tudi fizikalno stabilnost skozi čas tako, da smo spremljali njihovo povprečno velikost in polidisperznost. Zaželena je čim manjša razlika med rezultati meritev takoj po izdelavi in tekom staranja vzorcev.

4.5.1 Stabilnost praznih NLC

Preverjali smo stabilnost disperzije praznih delcev, ki so imeli enako sestavo kot NLC s CoQ₁₀. Celokupna koncentracija lipidov v disperziji je bila 24 mg/ml, od tega 20 % tekočega lipida. Izdelali smo jih v disperznem mediju s koncentracijo poloksamera 188 6 mg/ml in polisorbata 80 3 mg/ml. Soniciranje je potekalo 75 s. Vzorce smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C.



Slika 10: Spreminjanje povprečnega premera NLC s časom

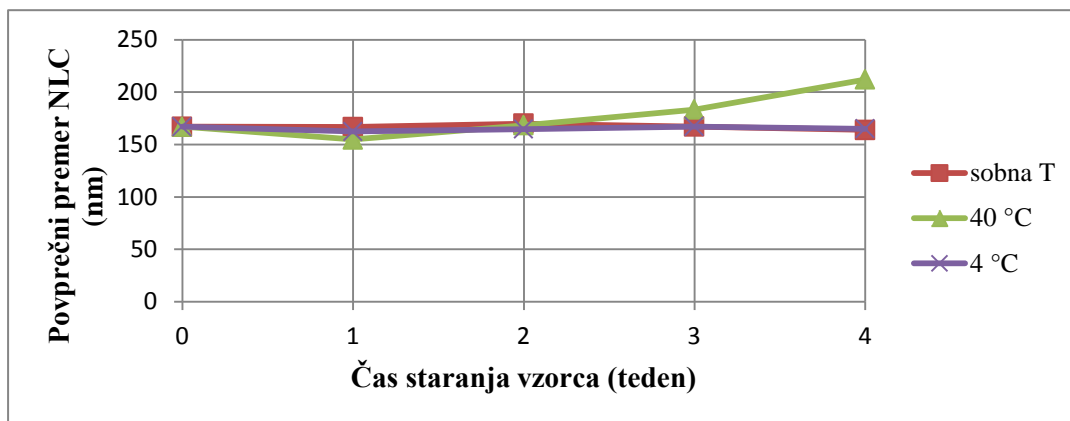


Slika 11: Spreminjanje polidisperznega indeksa NLC s časom

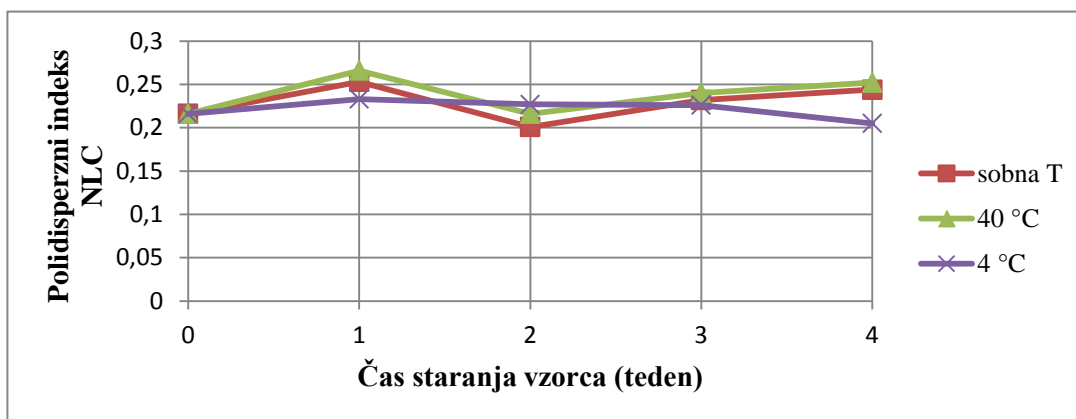
Skozi čas sta se povprečna velikost in polidisperzni indeks delcev le minimalno spreminjali, vizualno se vzorci niso spreminjali in ni bilo opaziti ločevanja faz ali sedimenta. Zato lahko sklepamo, da je takšna disperzija NLC (sliki 10 in 11) dolgoročno stabilna.

4.5.2 Stabilnost NLC z vgrajeno reducirano obliko CoQ₁₀

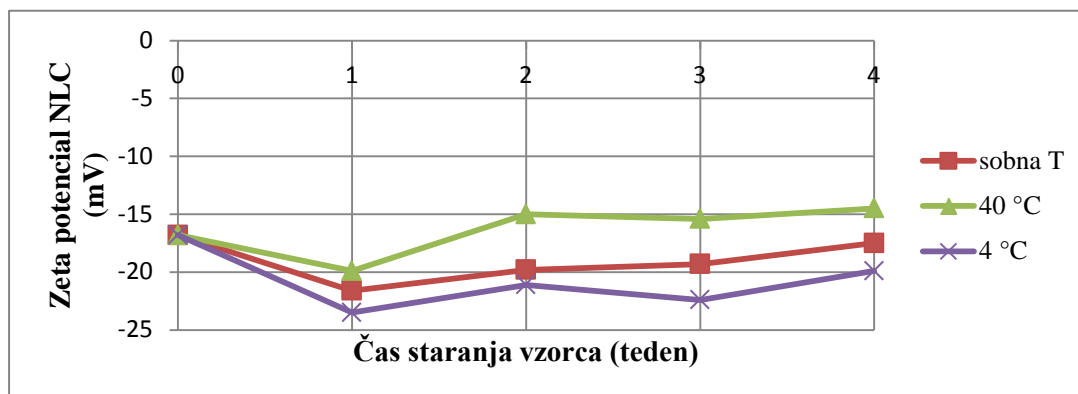
NLC s CoQ₁₀ smo tako kot praznim NLC merili povprečni premer delcev (slika 12) in njihovo porazdelitev velikosti (PI) (slika 13) skozi čas. Poleg teh meritev smo spremljali tudi spreminjanje ZP NLC s CoQ₁₀ (slika 14).



Slika 12: Povprečni premer NLC s CoQ₁₀ v odvisnosti od časa pri različnih pogojih shranjevanja vzorcev



Slika 13: Spreminjanje polidisperznega indeksa NLC s časom



Slika 14: Zeta potencial NLC s CoQ₁₀ v odvisnosti od časa pri različnih pogojih shranjevanja vzorcev

Na podlagi rezultatov na slikah 12, 13 in 14 lahko predpostavimo, da so NLC s CoQ₁₀ stabilni tudi po enem mesecu shranjevanja, razen, če jih shranjujemo pri povišani temperaturi (40 °C), saj se je povprečna velikost NLC v tem vzorcu povečala. Ker lahko na podlagi shranjevanja vzorca pri povišani temperaturi sklepamo na dolgoročno stabilnost vzorca pri normalnih pogojih shranjevanja, rezultat kaže, da formulacija dolgoročno verjetno ne bo stabilna in bi morali njeno sestavo za doseganje dolgoročne stabilnosti še nadalje optimizirati. Vizualno se vzorci v proučevanem časovnem obdobju niso spreminjali.

4.6 VALIDACIJA POSTOPKA PRIPRAVE VZORCA

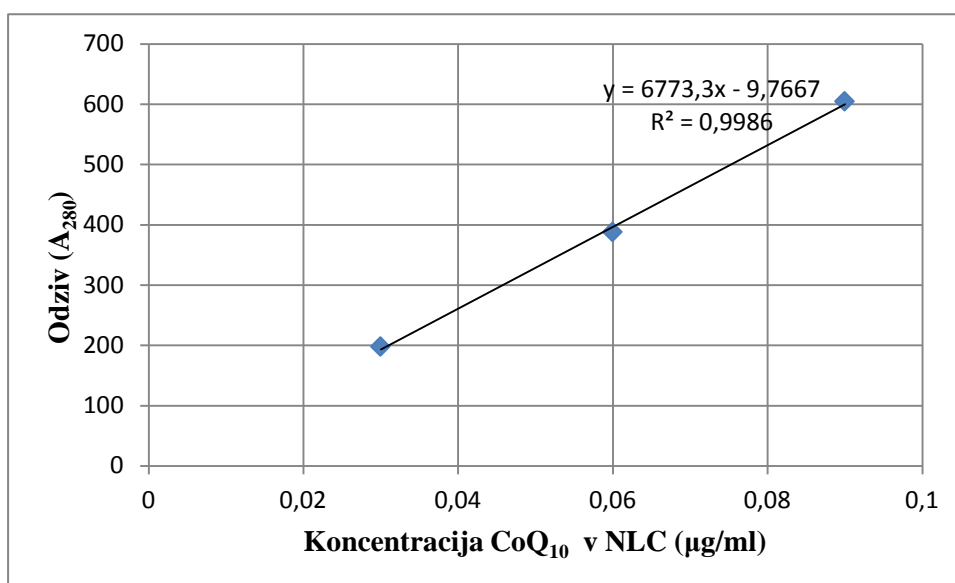
Kromatografsko metodo za vrednotenje CoQ₁₀ smo povzeli po analizni metodi za določanje CoQ₁₀ v pripravkih (23). Za vrednotenje CoQ₁₀ v NLC smo metodo priprave vzorca na novo razvili in ovrednotili. Kromatografskih pogojev pa glede na prejšnjo metodo ni bilo potrebno modificirati.

4.6.1 Linearost in območje

S pripravo umeritvene premice (slika 15) smo dokazali linearost metode, saj je korelacijski koeficient znašal 0,9986, kar ustreza zahtevi $r^2 \geq 0,99$.

Preglednica XI: Odziv v odvisnosti od koncentracije koencima Q₁₀ v disperziji NLC

Koncentracija CoQ ₁₀ v disperziji NLC (µg/ml)	Odziv (A ₂₈₀)
0,03	197,8
0,06	387,9
0,09	604,2



Slika 15: Umeritvena premica za koencim Q₁₀ v vzorcu z NLC

4.6.2 Ponovljivost

Rezultati vrednotenja natančnosti med paralelami vzorcev so navedeni v preglednici XII.

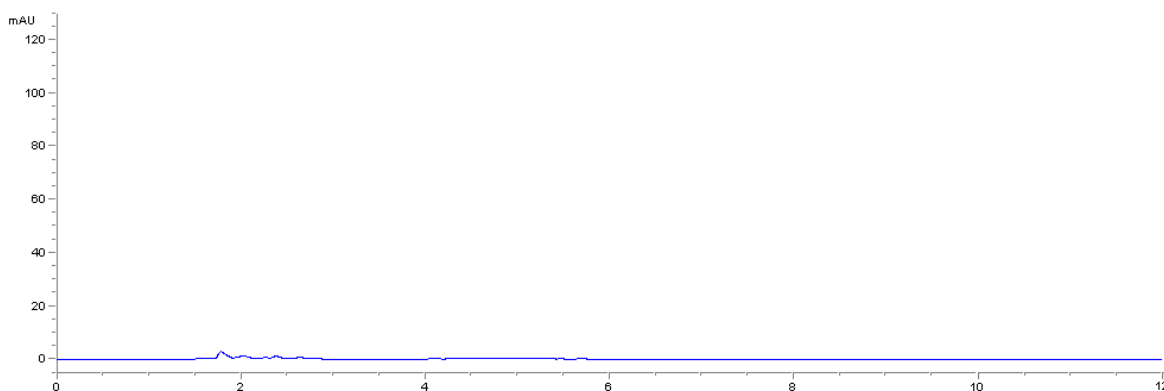
Preglednica XII: SD in RSD med paralelami vzorcev z različno koncentracijo CoQ₁₀

Koncentracija CoQ ₁₀ (mg/ml)	Povprečje odzivov	SD	RSD (%)
0,03	197,3	5,9	3,0
0,06	388,0	22,2	5,7
0,09	604,1	42,9	7,1

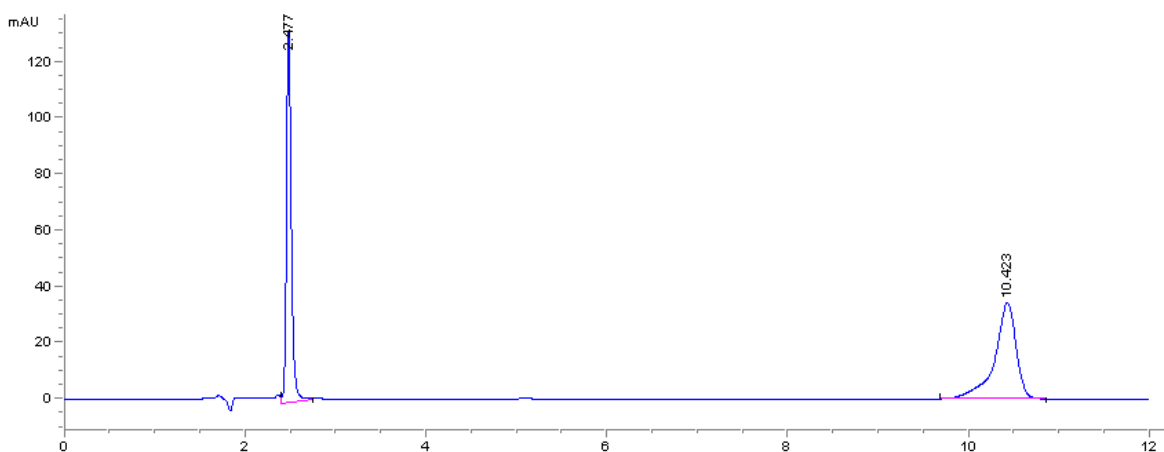
Na podlagi zbranih rezultatov v preglednici XII lahko sklepamo, da je naša metoda ponovljiva, saj se RSD vzorcev gibljejo znotraj meje sprejemljivosti (RSD ≤ 10 %).

4.6.3 Selektivnost

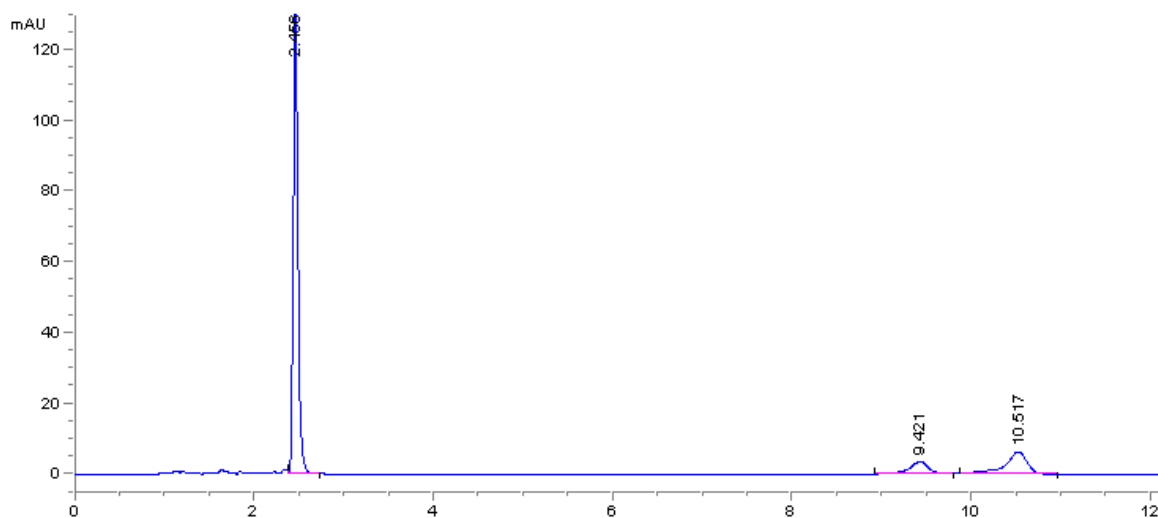
Rezultati so bili pridobljeni v skladu s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.6.3 Validacija analize metode določanja CoQ₁₀. Na kromatogramu praznih NLC (blank) ni vidnega odziva (slika 16), medtem ko na kromatogramu vzorca praznih NLC z dodanim CoQ₁₀ vidimo vrh pri retencijskem času 10,423 min (slika 17). Na sliki 18, kjer je prikazan kromatogram vzorca NLC, ki vsebuje oksidirano in reducirano obliko CoQ₁₀, se vidi, da se obe obliki zadovoljivo ločita med sabo. S temi rezultati smo potrdili, da lahko v vzorcu NLC selektivno določimo CoQ₁₀, kar pomeni, da je metoda selektivna in primerna za sočasno določevanje reducirane in oksidirane oblike CoQ₁₀.



Slika 16: Kromatogram praznih NLC (blank)



Slika 17: Kromatogram NLC z vgrajenim CoQ₁₀. Kromatografski vrh pri 2,477 min pripada askorbilpalmitatu, vrh pri 10,423 min pa oksidirani obliki CoQ₁₀.



Slika 18: Kromatogram NLC z vgrajenim CoQ₁₀. Kromatografski vrh pri 2,456 min pripada askorbilpalmitatu, vrh pri 9,421 min pripada reducirani obliki in vrh pri 10,517 min oksidirani obliki CoQ₁₀.

4.6.4 Točnost

Rezultati zbrani v preglednici XIII so znotraj meje sprejemljivosti ($100 \pm 10 \%$), zato lahko potrdimo, da je metoda točna.

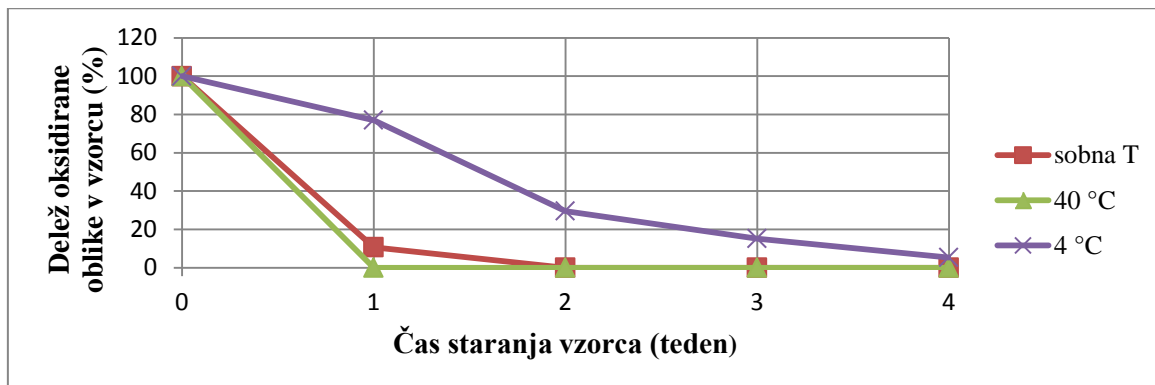
Preglednica XIII: Ujemanje med deklarirano in izračunano koncentracijo CoQ₁₀

Deklarirana koncentracija (mg/ml)	Izračunana koncentracija (mg/ml)	Točnost (%)
0,03	0,0306	102,1
0,06	0,0587	97,9
0,09	0,0906	100,7

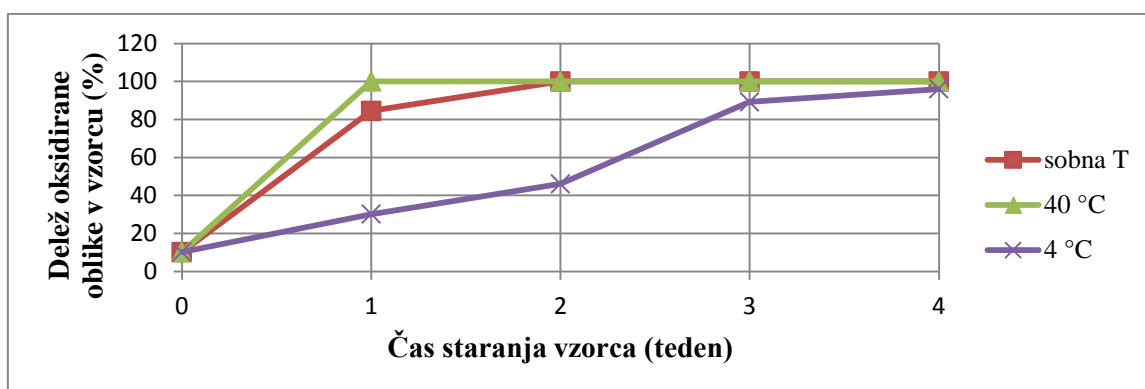
4.7 STABILNOST REDUCIRANE OBLIKE CoQ₁₀ V DISPERZIJI NLC

Poleg fizikalne stabilnosti nanodelcev z vgrajenim CoQ₁₀ smo želeli spremljati tudi kemijsko stabilnost reducirane oblike CoQ₁₀, ki smo jo vgradili v NLC. Delce smo pripravili po enakem postopku, kot smo NLC z oksidirano obliko CoQ₁₀, le da smo uporabili raztopino CoQ₁₀, ki smo jo pripravili z redukcijo oksidirane oblike v prisotnosti askorbilpalmitata. NLC, ki smo jih takoj po izdelavi razdelili na alikvote, smo shranjevali

pri različnih pogojih (sobna temperatura, 4 °C in 40 °C) in spremljali vsebnost reducirane in oksidirane oblike CoQ₁₀ v vzorcih.



Slika 19: Delež reducirane oblike CoQ₁₀ v odvisnosti od časa in pogojev shranjevanja vzorca.



Slika 20: Delež oksidirane oblike CoQ₁₀ v odvisnosti od časa in pogojev shranjevanja vzorca.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je reducirana oblika v disperziji NLC precej neobstojna, kar velja zlasti za NLC, ki smo jih shranjevali pri sobni temperaturi in pri 40 °C (sliki 19 in 20). Pri obeh vzorcih že po dveh tednih ni bilo več moč zaznati prisotnosti reducirane oblike CoQ₁₀. Razlogi za nestabilnost reducirane oblike CoQ₁₀ v izdelani formulaciji NLC so lahko različni. Možno je, da je ena od sestavin formulacije pospešila pretvorbo reducirane v oksidirano obliko CoQ₁₀, poleg tega je medfazna površina NLC velika, kar pospeši kemijske pretvorbe. CoQ₁₀ se je lahko nahajal na ali blizu površine NLC in posledično ni oz. je bil manj zaščiten pred oksidacijo. Na podlagi raziskav v okviru našega diplomskega dela razloga za nestabilnost reducirane oblike nismo nedvoumno potrdili.

Na podlagi spremljanja poteka redukcije oksidirane oblike CoQ₁₀ v reducirano pa lahko zagotovo trdimo, da je pretvorba ravnotežna in pogojena s temperaturo, ki verjetno vpliva

na potek obeh reakcij tj. oksidacije in redukcije. Iz tega rezultata lahko sklepamo, da pri takšni kinetiki pretvorbe najverjetneje ni mogoče pripraviti popolnoma reducirane oblike CoQ₁₀, ampak je vedno prisoten še določen delež oksidirane oblike.

Poleg tega smo ugotovili, da HPLC odziva reducirane in oksidirane oblike CoQ₁₀ nista v linearni odvisnosti, kar pomeni, da pretvorba 1 enote reducirane oblike ne povzroči povečanja signala oksidirane oblike za 1 enoto. Ugotovili smo, da je faktor pretvorbe med odzivoma reducirane in oksidirane oblike CoQ₁₀ približno 3,5.

5. SKLEP

Razvoj nanotehnologije je tudi na področju kozmetike v razmahu in tako lahko pričakujemo v prihodnje še veliko novih spoznanj. NLC smo, zaradi številnih pozitivnih lastnosti, izbrali kot ustrezen koloidni dostavni sistem za vgrajevanje izbrane KAS – CoQ₁₀. Izdelali smo jih z metodo homogeniziranja taline lipidov v raztopino stabilizatorjev z uporabo ultrazvočne sonde in spremljali njihove lastnosti glede na uporabljene sestavine in pogoje izdelave. Ugotovili smo, da na velikost delcev in PI vplivata izbor in količina stabilizatorjev ter koncentracija uporabljenih lipidov za izdelavo NLC. Hkrati imata v manjši meri na velikost in PI NLC vpliv tudi čas soniciranja in odstotek tekočega lipida v strukturi NLC. Na podlagi rezultatov pridobljenih z optimizacijo izdelave smo pripravili fizikalno stabilne nanodelce, v katere smo vgradili CoQ₁₀. Učinkovitost vgrajevanja CoQ₁₀ v NLC je bila skoraj 100 %, iz česar lahko sklepamo, da je takšen način priprave ustrezen.

V sklopu diplomske naloge smo razvili tudi HPLC metodo za določanje CoQ₁₀ v disperziji NLC, ki je omogočala tudi razlikovanje med njegovo oksidirano in reducirano obliko. Na podlagi rezultatov validacije naše metode lahko sklepamo, da je selektivna, linearna, ponovljiva in točna.

Poleg tega smo izvedli tudi redukcijo CoQ₁₀ z askorbilpalmitatom in spremljali njegovo stabilnost v formulaciji NLC. Ugotovili smo, da je ta oblika v izdelani formulaciji NLC neobstoja, saj je bila po enem mesecu staranja v manjši meri prisotna le še v vzorcu, ki smo ga shranjevali pri 4 °C, medtem ko je v vzorcih, ki smo jih shranjevali na sobni temperaturi in pri 40 °C, že po dveh tednih ni bilo več moč zaznati. Hkrati smo prišli do ugotovitve, da sprememba odzivov zaradi pretvorbe iz reducirane oblike CoQ₁₀ v oksidirano ni linearna, zato smo iz dobljenih rezultatov izračunali tudi faktor pretvorbe.

Na podlagi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da je formulacija NLC, ki smo jo pripravili, primerna za vgrajevanje CoQ₁₀, vendar le v oksidirani obliki, saj v reducirani obliki v formulaciji ni obstojen.

6. VIRI

1. Müller-Goymann CC: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 58: 343-356.
2. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A: Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2013; 19: 29-43.
3. 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.
4. Junyaprasert VB, Teeranachaideekul V, Souto EB, Boonme P, Müller RH: Q₁₀-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 377: 207-214.
5. Bruge F, Damiani E, Puglia C, Offerta A, Armeni T, Littaru G P, Tiano L: Nanostructured lipid carriers loaded with CoQ₁₀: Effect on human dermal fibroblasts under normal and UVA-mediated oxidative conditions. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 455: 348-356.
6. Müller RH, Peterson RD, Hommoss A, Pardeike J: Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 522-530.
7. Obeidat WM, Schwabe K, Müller RH, Keck CM: Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010; 76: 56-67.
8. Souto EB, Müller RH: Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). *International Journal of Cosmetic Science* 2008; 30: 157-165.
9. Sattarinezhad E, Shafaroodi H, Sheikhnouri K, Mousavi Z, Moezi L: The effects of coenzyme Q₁₀ on seizures in mice: The involvement of nitric oxide. *Epilepsy & Behavior* 2014; 37: 36-42.
10. Rus P, Rus R R: Koencim Q 10. *Zdrav. Var.* 2008; 47: 89-98.
11. Žmitek J, Žmitek K: Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Farm. Vestn.* 2009; 60: 150-157.

12. <http://www.labmuffin.com/2012/06/what-is-coenzyme-q10-and-why-is-it-in.html>, dostopano: julij 2014
13. Hargreaves I P: Coenzyme Q₁₀ as a therapy for mitochondrial disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014; 49: 105-111.
14. <http://www.tutorhelpdesk.com/homeworkhelp/Biology-/Components-Of-Respiratory-Chain-Assignment-Help.html>, dostopano: julij 2014
15. Schwarz J C, Baisaeng N, Hoppel M, Löw M, Keck C M, Valenta C: Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q₁₀. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 447: 213-217.
16. http://www.lef.org/magazine/mag2008/feb2008_Alleviating-Congestive-Heart-Failure-With-Coenzyme-Q10_01.htm, dostopano: julij 2014
17. <http://www.ki.si/novice/single-prikaz/novice/novica/kemijski-institut-in-valens-int-sirita-sodelovanje-pri-trzenju-posebne-oblike-vodotopnega-koenci/>, dostopano: julij 2014
18. Stocker R: Possible Health Benefits of Coenzyme Q₁₀. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w02/coenzymeq10.html>, dostopano: julij 2014
19. Pardeike J, Schwabe K, Müller R H: Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q₁₀ cream and the in vivo skin hydration effect. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 396: 166-173.
20. <http://www.makingcosmetics.com/articles/34-coenzyme-q10-in-cosmetics.pdf>, dostopano: julij 2014
21. <https://secure.eznettools.net/D305742/X367201/science/supplements/CoQ10.html>, dostopano: avgust 2014
22. Gokce E H, Korkmaz E, Dellera E, Sandri G, Bonferoni M C, 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.
23. Razpotnik S: Določanje vsebnosti ubidekarena v mehkih kapsulah z metodo HPLC. *Diplomska naloga*, Ljubljana, 2011.