

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KUKOVEC (SLIVNIK)

**IZDELAVA SAMO-EMULGIRAJOČIH TRDNIH  
ZMESI Z RESVERATROLOM Z METODO  
SUŠENJA Z RAZPRŠEVANJEM**

FORMULATION OF SOLID SELF-EMULSIFYING  
MIXTURES WITH RESVERATROL BY SPRAY  
DRYING TECHNOLOGY

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2014

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

## **ZAHVALA**

*Najlepša hvala mentorici doc. dr. Alenki Zvonar Pobirk, mag. farm., za vodenje in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.*

*Iskrena hvala staršem in vsem mnogim ostalim, ki ste me podpirali, spodbujali in mi pomagali; zaradi vas je bila pot lažja.*

*Hvala Filipu in Živi, ker sta. Predvsem pa hvala tebi, Andrej, za zaupanje, neizmerno podporo in vse, kar je samo najino.*

## **IZJAVA**

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

Anja Kukovec

## **DIPLOMSKA KOMISIJA**

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>8</b>
<i>1.1. Na lipidih osnovani sistemi</i> .....	9
<i>1.2. Samo-mikroemulgirajoči sistem – SMES</i> .....	10
<i>1.3. Trden samo-mikroemulgirajoči sistem (SSMES)</i> .....	12
1.3.1. Trdni nosilci za SMES.....	13
1.3.2. Metode za pretvorbo tekočega SMES v trdno obliko .....	14
<i>1.4. Sušenje z razprševanjem (angl. spray drying)</i> .....	15
<i>1.5. Resveratrol</i> .....	18
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>21</b>
3.1. MATERIALI .....	21
3.1.1. <i>Materiali za pripravo SMES</i> .....	21
3.1.2. <i>Trdni nosilci za SMES</i> .....	22
3.1.3. <i>Učinkovina</i> .....	23
3.1.4. <i>Ostalo</i> .....	23
3.1.5. <i>Naprave</i> .....	23
3.2. METODE.....	24
3.2.1. <i>PRIPRAVA VZORCEV</i> .....	24
3.2.1.1. Priprava SMES .....	24
3.2.1.2. Ravnanje z RSV in vzorci, ki ga vsebujejo .....	25
3.2.1.3. Priprava SMES z RSV.....	25
3.2.1.4. Priprava disperzije za sušenje z razprševanjem.....	25
3.2.1.5. Merjenje pH disperzije za razprševanje.....	26
3.2.1.6. Izdelava trdnega SMES .....	26
3.2.2. <i>VREDNOTENJE LASTNOSTI SSMES</i> .....	27

3.2.2.1. Merjenje vsebnosti vlage v vzorcih s termogravimetrijo .....	27
3.2.2.2. Merjenje pretočnih lastnosti .....	28
3.2.2.3. Merjenje nasipnega volumna.....	28
3.2.2.4. Merjenje velikosti kapljic .....	28
3.2.2.5. Diferenčna dinamična kalorimetrija – DSC .....	29
3.2.2.6. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC .....	30
3.2.2.7. Določanje vsebnosti učinkovine v vzorcih SSMES z RSV.....	32
3.2.2.8. Sproščanje RSV .....	33
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>37</b>
4.1 <i>Vrednotenje lastnosti disperzije za razprševanje .....</i>	37
4.1.1 Merjenje pH disperzije za razprševanje.....	37
4.2 <i>Vrednotenje lastnosti SSMES .....</i>	38
4.2.1 Uporabni izkoristek sušenja z razprševanjem .....	38
4.2.2 Vrednotene vsebnosti vlage v vzorcih glede na izbran nosilec .....	40
4.2.3 Vrednotenje pretočnih lastnosti SSMES z metodo merjenja nasipnega kota. ....	40
4.2.3 Vpliv izbranega nosilca na nasipni volumen SSMES .....	43
4.2.5 Ocena sposobnosti samo-mikroemulgiranja SSMES.....	43
4.2.6 Termična analiza SSMES.....	46
4.2.7 Učinkovitost vgradnje in vsebnost resveratrola in v SSMES.....	48
4.2.9 Vplivi nosilcev na profil sproščanja resveratrola iz SSMES.....	49
<b>5. SKLEPI .....</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>56</b>

# POVZETEK

Slaba topnost nekaterih zdravilnih učinkovin je omejujoč dejavnik za njihovo vgradnjo v peroralne farmacevtske oblike, saj je zaradi nje zmanjšana absorpcija učinkovine, kar vodi v nizko biološko uporabnost. Tudi resveratrol spada med učinkovine s slabo topnostjo, ima pa dobro permeabilnost, zaradi česar ga razvrščamo v razred II po Biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu (BCS). Je naravni polifenol, ki je zanimiv zaradi širokega spektra delovanja – kardioprotektivnega, nevroprotektivnega, antikancerogenega in protivnetnega delovanja. Eden izmed načinov za izboljšanje topnosti tovrstnih zdravilnih učinkovin je vgradnja v samo-(mikro)emulgirajoče sisteme (S(M)ES). To so zmesi olj, površinsko aktivnih snovi in sotopil, ki po stiku s tekočinami v gastrointestinalnem traktu ob rahlem mešanju spontano tvorijo (mikro)emulzije, pri tem pa slabo topna učinkovina ostane raztopljena v notranji oljni fazi nastale emulzije. Ob vgradnji tekočega S(M)ES v trdne nosilce dobimo trden samo-(mikro)emulgirajoči sistem, ki združuje prednosti tako tekočega S(M)ES kot tudi trdnih farmacevtskih oblik.

V diplomski nalogi smo v tekoči SMES vgradili učinkovino resveratrol, za pretvorbo v trdni S(M)ES pa izbrali metodo sušenja z razprševanjem in tri različne vrste poroznih nosilcev (Neusilin<sup>®</sup> US2, Syloid<sup>®</sup> 244FP, Sylsya<sup>®</sup> 350) z različnimi začetnimi masami. Metoda se je izkazala za učinkovito, saj smo z visokim izkoristkom izdelali trdne S(M)ES v obliki prahov. Tudi učinkovitost vgradnje resveratrola je bila visoka (74,3–91,4 %). V trdni obliki S(M)ES so se ohranile samo-(mikro)emulgirajoče lastnosti sistema, kar smo potrdili z merjenjem velikosti kapljic nastale (mikro)emulzije. S termično analizo smo potrdili, da po pretvorbi v trdno obliko ni potekla rekristalizacija resveratrola. Preizkus sproščanja učinkovine iz različnih nosilcev v raztopinah s pH 1,2 in 6,8 je pokazal, da se je resveratrol najhitreje in v največjem obsegu sprostil iz trdnega S(M)ES z 10 g Neusilina oz. 10 g Syloida; v nasprotju s pričakovanji pa razlika med profili sproščanja iz teh dveh formulacij in profilom raztapljanja kristaliničnega resveratrola v sink pogojih ni bila bistvena. Kljub temu je vgradnja resveratrola v SMES smiselna, saj se poleg povečanja topnosti resveratrola bistveno zmanjša citotoksičnost, ki jo sicer izkazuje raztopina resveratrola (1). Določali smo tudi pretočne lastnosti izdelanih prahov, ki so pomembne za nadaljnjo izdelavo tablet ali polnjenje kapsul. Ker so neustrezne, bi bile v nadaljnjem raziskovalnem delu nujno potrebne izboljšave teh lastnosti.

Glede na rezultate diplomske naloge lahko zaključimo, da je pretvorba tekočega SMES z resveratrolom v trdno obliko z metodo sušenja z razprševanjem uspešna in da sta glede na rezultate za prihodnje raziskave in razvoj najprimernejši formulaciji SS(M)ES z 10 g Neusilina in SS(M)ES 10 g Syloida.

**Ključne besede:** trdni samo-(mikro)emulgirajoči sistem, sušenje z razprševanjem, resveratrol, SMES, SSMES, trdni nosilci

## ABSTRACT

Poor solubility of active pharmaceutical substances (API) is often the limiting factor for their incorporation into oral dosage forms, as the latter cause decreased absorption of the API leading to low bioavailability. Resveratrol is also poorly water soluble drug, however, it has good permeability, so it can be classified into Class 2 of the Biopharmaceutical Classification System (BCS). Resveratrol is naturally occurring polyphenol, interesting for researchers due to its wide spectrum of activity - a cardioprotective, neuroprotective, anticancerous and anti-inflammatory. One of the possibilities to improve its solubility is by incorporating it into the lipid systems such as self-(micro)emulsifying systems (S(M)ES). These are mixtures of oils, surfactants and cosolvents. They spontaneously form (micro)emulsions when in contact with fluids in the gastrointestinal tract after gentle agitation provided by gastrointestinal motility. Incorporated poorly soluble substance remains dissolved in the internal oil phase of the resulting (micro)emulsion and passes through the gastrointestinal tract to the site of absorption. By incorporating the liquid S(M)ES into the solid carriers a solid self-(micro)emulsifying system is obtained, which combines the advantages of both, the liquid S(M)ES as well as solid dosage forms.

In present thesis, the API (resveratrol) was incorporated into the liquid SMES, which was then converted into the solid S(M)ES by spray drying technology. Three different types of porous silica carriers (Neusilin® US2, Syloid® 244FP, Sylsolia® 350) with different input masses were used as solid carriers. The method has proven to be effective, as solid powder with self-microemulsifying properties was obtained with a high recovery ratio. The efficiency of the resveratrol incorporation was also high (74.3–91.4 %). Upon transformation of resveratrol-loaded S(M)ES into solid state it preserved its self-(micro)emulsion ability, which was confirmed by measuring droplet-sized of (micro)emulsions generated from powdered product. By thermal analysis of solid product it was confirmed that no recrystallization of resveratrol occurs during spray drying process. The drug release test performed at pH 1.2 and 6.8 has shown that resveratrol was released most rapidly and in greater extent from the solid SMES with 10 g Neusilin and 10 g Syloid. Contrary to expectations, the difference between the release profiles of the two formulations and the dissolution profile of crystalline resveratrol was not significant under sink conditions. Nonetheless, the incorporation of resveratrol into the SMES is reasonable,

as it leads to its higher water solubility and significant reduction of cytotoxicity reported for resveratrol solution (1). The flow properties of the produced powders, important for the subsequent manufacturing of tablets or for capsule filling, were also determined. Since they have shown to be inadequate, it would be vital to improve these features in future research work.

According to the results obtained in present thesis, it can be concluded that resveratrol-loaded liquid SMES were successfully transformed into a solid state by spray drying technique. According to the presented results solid S(M)ES composed of 10 g of Neusilin or Syloid as solid carrier were shown to be optimal formulations for further development of final solid dosage form.

**Key words:** solid self-(micro)emulsifying system, spray drying, resveratrol, solid carrier



# SEZNAM OKRAJŠAV

AUC – površina pod krivuljo (*angl. Area under the curve*)

BCS – Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (*angl. Biopharmaceutics Classification System*)

BU – biološka uporabnost

COX1, COX2 – encim ciklooksigenaza 1 in 2 (*angl. Cyclooxygenase 1 & 2*)

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (*angl. Differential scanning calorimetry*)

FDA – Ameriški vladni urad za hrano in zdravila (*angl. US Food and Drug Administration*)

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

HLB – hidrofilno-lipofilno ravnovesje (*angl. Hydrophilic-lipophilic balance*)

HPCM – hidroksiopropilmetil celuloza

LFCS – Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov (*angl. Lipid formulation classification system*)

O/V – olje v vodi

PAS – površinsko aktivna snov

PVP – polivinilpirolidon

RSV – resveratrol

SES – samo-emulgirajoči sistem

SMES – samo-mikroemulgirajoči sistem

SNES – samo-nanoemulgirajoči sistem

SS(M)ES – trdni samo-(mikro)emulgirajoči sistem (*angl. solid SMES*)

T – temperatura

ZU – zdravilna učinkovina

# 1. UVOD

Peroralni vnos zdravil je zaradi priročnosti, enostavnosti in večje compliance pacientov v farmaciji še vedno najbolj želena pot uporabe zdravil (2). Zaželena je tudi vgradnja zdravilnih učinkovin (ZU) v trdno farmacevtsko obliko (FO), predvsem zaradi možnosti natančnega odmerjanja, možnosti nadzorovanega sproščanja ZU in večje stabilnosti le-te, pa tudi zaradi možnosti korigiranja okusa in cenejše proizvodnje. Trdne FO so tudi bolj primerne za transport in shranjevanje. Slabost peroralnih farmacevtskih oblik je ta, da njihovo uporabo omejujejo specifične lastnosti ZU, kot so slaba topnost, slaba permeabilnost skozi biološke membrane, nestabilnost, hiter predsistemiški metabolizem in draženje prebavil (3).

Po mnenju nekaterih strokovnjakov smo odkrili že večino ZU z visoko biološko uporabnostjo (BU), ustreznim farmakokinetičnim profilom in ustrezno širokim terapevtskim oknom po peroralni aplikaciji. V nasprotju s slednjimi, novo odkrite ZU pogosto nimajo zelenih lastnosti, vendar jih zaradi razvoja tehnologij in znanj iz raziskav ne izločimo več avtomatsko, ampak iščemo nove načine pretvorbe in vgradnje v peroralne farmacevtske oblike (4).

Eno od učinkovitih orodij v začetnih fazah razvoja ZU ter pri izbiri zanje primernih farmacevtskih oblik je Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (*BCS, angl. Biopharmaceutics Classification System*), ki omogoča razvrstitev ZU v štiri razrede glede na njihovo topnost v vodnem mediju in glede na permeabilnost preko gastrointestinalne membrane (preglednica I); omenjena dejavnika namreč najbolj vplivata na stopnjo in obseg absorpcije ZU. Ameriški vladni urad za hrano in zdravila (*FDA; angl. US Food and Drug Administration*) je postavil meje za uvrstitev v razrede; tako se ZU uvršča med dobro topne, če se njen najvišji terapevtski odmerek raztopi v  $\leq 250$  ml vodnega medija pri pH med 1 in 7,5, in med dobro permeabilne, če je obseg absorpcije pri človeku po peroralni aplikaciji  $\geq 90$  % apliciranega odmerka, primerjano z vrednostmi, doseženimi po intravenski aplikaciji (5, 6).

*Preglednica I: Razredi Biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema s primeri (7)*

	<b>PERMEABILNOST</b>	<b>TOPNOST</b>	<b>PRIMER</b>
Razred I	dobra permeabilnost	dobra topnost	<i>metoprolol</i>
Razred II	dobra permeabilnost	slaba topnost	<i>glibenklamid</i>
Razred III	slaba permeabilnost	dobra topnost	<i>cimetidin</i>
Razred IV	slaba permeabilnost	slaba topnost	<i>hidroklortiazid</i>

Veliko novoodkritih učinkovin spada v razred II po BCS (slaba topnost, dobra permeabilnost). Slaba topnost povzroča slabo sproščanje učinkovine v prebavnem traktu in to vodi v zmanjšano absorpcijo. Posledica ni samo nizka biološka uporabnost, temveč tudi visoka intra- in interindividualna variabilnost absorbiranega odmerka (3). Raztapljanje učinkovine v prebavnem traktu lahko izboljšamo z njeno kemijsko in fizikalno spremembo ali razvojem ustrezne farmacevtske oblike (8). To lahko dosežemo s tvorbo soli, kompleksov ali derivatov, z modifikacijo pH, z modifikacijo kristalne strukture, z zmanjšanjem velikosti delcev, s povečanjem površine delcev, z uporabo posebnih nosilcev, z izdelavo trdnih disperzij, z uporabo površinsko aktivnih snovi (PAS) in sotopil, z vgrajevanjem v lipidne sisteme in z nekaterimi drugimi metodami (9).

## **1.1. Na lipidih osnovani sistemi**

Eden izmed načinov povečanja topnosti slabo topnih učinkovin v vodnem mediju je vgradnja ZU v lipidne sisteme. Prednost peroralnih lipidnih sistemov je, da v njih raztopljena slabo topna učinkovina v optimalnem primeru ostane v obliki raztopine med prehodom skozi ves gastrointestinalni trakt. Tako se izognemo omejujočemu dejavniku slabe topnosti in povečamo obseg absorpcije ter posledično biološko uporabnost učinkovine.

Lipidni sistemi so lahko enostavne ali kompleksne mešanice različnih mono-, di- in trigliceridov, sotopil in hidrofilnih ali hidrofobnih površinsko aktivnih snovi. Lahko so v obliki oljnih raztopin, oljnih suspenzij, emulzij, samo-emulgirajočih sistemov (SES), samo-mikroemulgirajočih sistemov (SMES) ali samo-nanoemulgirajočih sistemov (SNES) (3, 10, 11). Glede na sestavo in njihovo zmožnost preprečevanja obarjanja vgrajene učinkovine med procesom dispergiranja in prebave v gastrointestinalnem traktu (GIT) jih razvrščamo v štiri razrede po Klasifikacijskem sistemu na lipidih osnovanih sistemov (*LFCS, angl. Lipid formulation classification system*) po Poutonu (preglednica II).

Preglednica II: LFCS – Klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov (10)

	SESTAVA	ZNAČILNOSTI
Tip I	olja (mono-, di-, trigliceridi) 100 %	se ne dispergirajo; nujna je prebava
Tip II	olja (mono-, di-, trigliceridi) 40–80 % hidrofobne PAS 20–60 %	SES brez hidrofilnih komponent
Tip IIIa	olja (mono-, di-, trigliceridi) 40–80 % hidrofilne PAS 20–40 % hidrofilna sotpila 0–40 %	SES/SMES s hidrofilnimi komponentami
Tip IIIb	olja (mono-, di-, trigliceridi) < 20 % hidrofilne PAS 20–50 % hidrofilna sotpila 20–50 %	SMES s hidrofilnimi komponentami in nizko vsebnostjo olj
Tip IV	hidrofobne PAS 0–20 % hidrofilne PAS 30–80 % hidrofilna sotpila 0–50 %	formulacije brez olj; po dispergiranju spontano tvorijo micelarno raztopino

*PAS – površinsko aktivne snovi; SES – samo-emulgirajoči sistem;*

*SMES – samo-mikroemulgirajoči sistem*

Sistem predstavlja vodilo, ki nam v kombinaciji z ustreznimi *in vitro* študijami omogoči, da predvidimo usodo ZU *in vivo* glede na vrsto na lipidih osnovanega sistema, v katerega je vgrajena, in nam tako olajša izbiro najprimernejše formulacije za določeno učinkovino glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti (10, 12).

## 1.2. Samo-mikroemulgirajoči sistem – SMES

Idealno je SMES izotropna zmes naravnih ali sintetičnih olj, lipofilnih ali hidrofilnih PAS in sotpil, ki po stiku s tekočinami v GIT ob rahlemu mešanju spontano tvori mikroemulzijo O/V (8, 13). Samo-mikroemulgiranje je odvisno od narave in razmerja med oljno fazo in PAS, od koncentracije PAS in od temperature. Samo zelo specifične kombinacije pomožnih snovi namreč vodijo do nastanka samo-mikroemulgirajočih sistemov (14).

Pred izdelavo SMES je pomembno izbrati primerne komponente, pri tem igra zelo pomembno vlogo zlasti topnost in stabilnost učinkovine v različnih oljih, PAS in sotpilih ter njihova zmožnost samo-emulgiranja, ki jo ocenimo na osnovi izdelanega (psevdo) trikomponentnega diagrama (15).

Oljne komponente za izdelavo SMES so največkrat srednjedolgoverižni/dolgoverižni delno nenasičeni ali nasičeni trigliceridi. Razširjena je uporaba modificiranih oz. hidroliziranih rastlinskih olj; njihova prednost je, da z velikim številom PAS tvorijo sisteme za peroralno

uporabo, ki znatno izboljšajo topnost ZU, pa tudi da razpadejo v produkte, podobne naravnim. Zaradi boljše sposobnosti samo-emulgiranja in raztapljanja se v novejših SMES raje uporabljajo polsintezni derivati srednjedolgoverižnih trigliceridov, ki imajo tudi lastnosti površinsko aktivnih snovi (8, 16).

Površinsko aktivne snovi z močnim znižanjem medfazne napetosti med oljno in vodno fazo omogočajo samo-emulgiranje, kar je osnovna lastnost SMES. Pri izbiri PAS sta glavni vodili varnost (visoke koncentracije povzročajo draženje sluznice GIT) in HLB vrednost. Zato so v SMES največkrat vgrajene neionske PAS z relativno visoko HLB vrednostjo. Visoka HLB vrednost pomeni višjo hidrofilnost, kar pa pomeni sposobnost takojšnje tvorbe majhnih kapljic emulzije O/V in hitro razširitev nastale emulzije po vodnem mediju (prebavnih sokovih GIT) (15). Varnejše so PAS naravnega izvora, izberemo jih kljub temu, da je njihova sposobnost emulgiranja manjša. Izbira neionskih emulgatorjev temelji na manjši toksičnosti in neodvisnosti od pH. Kljub temu da bi morala biti koncentracija PAS v sistemu zaradi fiziološke sprejemljivosti čim nižja, je za izdelavo učinkovitega SMES nujen 30–60 % delež PAS. Največkrat uporabljane PAS so glikozilirani etoksilirani gliceridi in polisorbati (8).

Uporabi sotopil se skušamo izogniti, ker njihova uporaba poveča zahtevnost proizvodnega postopka in povzroča težave zaradi njihove možne vezave z ovojnino. Če nam to ne uspe, so za peroralno uporabo primerna topila etanol, propilen glikol in polietilenglikol (8).

Velikost kapljic je po samo-emulgiranju SES približno 100–300 nm, po samo-emulgiranju SMES pa nastanejo transparentne mikroemulzije z velikostjo kapljic pod 100 nm oz. 50 nm. Porazdelitev velikosti kapljic je pri SMES zelo ozka (17).

V takih sistemih lahko raztopimo hidrofobne, v vodi slabo topne ZU, ki po pretvorbi v (mikro)emulzijo ostanejo raztopljene v oljnih kapljicah. Te se hitro porazdelijo po prebavnem traktu, učinkovina pa v optimalnem primeru ostane raztopljena v njih. Na tak način se vsaj v določenem obsegu izognemo fazi raztapljanja, ki je omejujoč dejavnik absorpcije učinkovine. Pogoj, ki ga mora ZU dosežati, je visoka kemijska stabilnost v raztopljeni obliki (18).

SMES vpliva na povečanje peroralne absorpcije tudi preko drugih mehanizmov.

Lipidi v sistemu lahko vplivajo na sestavo in lastnosti črevesnega miljeja in tako povečajo solubilizacijo ZU, na nivoju enterocitov interagirajo s prenašalnimi in metabolnimi procesi,

kar lahko privede do spremembe privzema ZU, sprememb efluksa ter sprememb nastanka in porazdeljevanja metabolitov. Prav tako izbira lipidov vpliva na pot transporta učinkovine do sistemskega krvnega obtoka – po portalni veni ali po limfnem sistemu. Na končno porazdelitev med krvjo in limfo vpliva dolžina verig maščobnih kislin, stopnja njihove nasičenosti in količina vnesenega lipida. Metabolizmu prvega prehoda skozi jetra se izognemo, če izberemo take lipide, ki stimulirajo nastanek lipoproteinov, ki nato vstopijo v limfni obtok (8).

Površinsko aktivne snovi vplivajo na povečanje BU s povečanjem topnosti in hitrosti raztapljanja ZU, s povečanjem permeabilnosti skozi epitelij prebavil, tako da porušijo urejenost lipidnega dvosloja in olajšajo difuzijo ZU, z reverzibilnim odprtjem tesnih stikov pa tudi z inhibicijo P-glikoproteina in CytP450 (8).

*Preglednica III: Prednosti in slabosti SMES (14, 17, 19)*

PREDNOSTI SMES	SLABOSTI SMES
Izboljšanje peroralne BU omogoča manjši odmerek ZU.	Ni dobrih <i>in vitro</i> modelov za oceno <i>in vivo</i> obnašanja formulacije.
Enostaven prenos tehnologije v industrijsko merilo.	Pogosto slaba stabilnost učinkovine.
Zmanjšanje inter- in intraindividualne variabilnosti in zmanjšanje vpliva hrane.	Nizka stopnja vgradnje učinkovine.
Termodinamsko stabilen sistem, ki se ne razplasti, kot se emulzija.	Omejena izbira farmacevtskih oblik.
Možnost aplikacije v tekoči obliki ali pretvorba v trdni SMES.	Pri visoki vsebnosti PAS je možna iritacija GIT.
Možnost zaščite vgrajenih peptidov, hormonov in podobnih občutljivih molekul pred vplivi prebave.	Prehod hlapnih sotopil iz tekočega SMES v ovoj kapsule in posledično možnost precipitacije učinkovine, možna sprememba stabilnosti trdne kapsule in spremenjenega profila sproščanja.

### 1.3. Trden samo-mikroemulgirajoči sistem (SSMES)

SSMES (*angl. Solid SMES*) je trdna farmacevtska oblika s samo-mikroemulgirajočimi lastnostmi, v kateri so združene prednosti SMES (izboljšana topnost v vodi slabo topnih ZU ter izboljšanje njihove biološke uporabnosti) in trdne farmacevtske oblike (nizki stroški proizvodnje, možnost dobre medprocesne kontrole, visoka stabilnost, možnost natančnega odmerjanja ZU, dobra komplanca pacientov). Z različnimi tehnikami lahko pretvorimo

SMES v trden samo-mikroemulgirajoči sistem in izdelamo prahove, nanodelce, trdne disperzije, mikrosfere ipd. in z njimi napolnimo kapsule ali izdelamo tablete, pelete, svečke ali vsadke (19).

### 1.3.1. Trdni nosilci za SMES

Trdne nosilce za pripravo trdnih SMES delimo na nevodotopne (visokoporozni nosilci na osnovi  $\text{SiO}_2$  – adsorbenti) in vodotopne ogljikohidratne, polimerne ali proteinske nosilce.

Porozni nosilci na osnovi  $\text{SiO}_2$ : Uporabljamo jih lahko kot adsorbente za tekoče lipide ali pa jih dispergiramo v disperzijo lipidnih kapljic, čemur sledi sušenje. Obstaja zelo veliko nosilcev iz amorfnega silicijevega dioksida ali iz silikatov z različnimi velikostmi delcev, velikostmi por in specifičnimi površinami. Priljubljeni so zaradi svoje dobre biokompatibilnosti in kemijske inertnosti. Uporabljajo se za izdelavo mikrodolcev, trdnih SMES in suhih emulzij. Sem sodijo tudi Syloid, Sylysia, ki sta mikronizirana porozna silikagela, Neusilin, ki je kemijsko magnezijev aluminometasilikat, Aerosil in drugi. Izkazalo se je, da so za izdelavo trdnih lipidnih sistemov – praškov z boljšimi pretočnimi lastnostmi in boljšo stisljivostjo – bolj primerni anorganski nosilci z večjimi delci in bolj porozno strukturo, npr. Neusilin US2, kot nosilci z manjšo velikostjo delcev in nosilci iz drugih skupin (slabo porozni nosilci, polimerni nosilci) (20).

Ogljikohidratni nosilci: Ponavadi jih uporabljamo kot pomožne snovi, sladila, obloge, snovi za povečanje viskoznosti, veziva za tablete ipd. V to skupino spadajo manitol, sorbitol, laktoza, maltodekstrini, ciklodekstrini in drugi. Pri načrtovanju farmacevtske oblike je treba vzeti v obzir njihove kristalinične lastnosti, njihovo higroskopnost, težnjo po pretvorbi v amorfno stanje po uporabi nekaterih tehnoloških postopkov (npr. sušenje z razprševanjem, liofilizacija) in možnost rekristalizacije v izdelanih prahovih (20).

Polimerni nosilci: V lipidnih sistemih so učinkoviti kot nosilci, emulgatorji in inhibitorji obarjanja ZU. V to skupino spadajo poloksameri, HPMC – hidroksipropilmetil celuloza, PVP – polivinilpirolidon in drugi. Pri visokih koncentracijah nekaterih polimernih nosilcev (npr. HPMC) nastane visoko viskozna vodna raztopina, kar lahko oteži nadaljnjo formulacijo farmacevtske oblike (npr. pri sušenju z razprševanjem) (20).

Proteinski nosilci: So dobro topni v vodi in izražajo amfifilne lastnosti, zato jih lahko uporabljamo kot emulgatorje in nosilce. Kljub temu se v praksi zelo redko uporabljajo, najverjetneje zaradi slabe stisljivosti. V to skupino spojin spadata želatina in glicin.

Želatina se sicer pogosteje uporablja za izdelavo ovojnice trdih in mehkih kapsul, ki jih lahko polnimo s tekočimi ali poltekočimi lipidi, novejšje študije pa kažejo, da lahko iz nje izdelamo tudi samo-mikroemulgirajoče mikrokapsule (20).

### **1.3.2. Metode za pretvorbo tekočega SMES v trdno obliko**

Polnjenje trdnih ali mehkih kapsul s tekočim ali poltekočim SMES: To je najbolj osnovna metoda pretvorbe SMES iz tekoče/poltekoče v trdno obliko. Najpomembneje pri tem je, da sta SMES in ovoj kapsule kompatibilna. Največje prednosti te metode so enostavnost izdelave, ustreznost farmacevtske oblike za nizko odmerne visoko potentne učinkovine in možen visok odstotek vgrajene učinkovine (19). Polnimo lahko mehke ali trdne kapsule; pri prvih je omejitev drag postopek zaradi nujne uporabe posebnih aparatov, pri trdnih kapsulah pa je postopek zahteven zaradi tekočega oz. poltekočega stanja polnila (SMES).

Razprševanje s strjevanjem (angl. spray cooling): Talino nosilca z vgrajenim SMES z učinkovino razpršimo v hladnem zraku; kapljice se ob stiku s hladnim zrakom strdijo. Najprimernejši trdni nosilci za to metodo so pri sobni temperaturi trdni, temperaturo tališča imajo običajno med 45 °C in 75 °C in so viskozni v talini. Mednje spadajo polioksigliceridi, polietilenglikoli, hidrofobni voski in gliceridi. Z nastalimi delci lahko polnimo kapsule ali iz njih izdelujemo tablete (21, 22).

Adsorpcija na trdne nosilce: Ta postopek je enostaven, saj tekoči SMES dodamo nosilcu, na površino katerega se med mešanjem adsorbira. Nastane prašek, ki ga lahko polnimo v trdne kapsule ali z dodanimi pomožnimi snovmi tabletiramo. Velika prednost te metode je dobra enakomernost vsebnosti in visok odstotek vgrajene učinkovine. Za adsorpcijo so primerne mikroporozne anorganske snovi, anorganski nosilci z visoko specifično površino (npr. porozni nosilci na osnovi SiO<sub>2</sub>), premrežene polimerne snovi (natrijeva karboksimetilceluloza, polimetilmetakrilat) (19, 21).

Granuliranje s talinami: Je enostopenjski proces, pri katerem nastanejo aglomerati praškastih zmesi. Kot vezivo za praškaste delce, ki se že pri nižjih temperaturah zmečča ali stali, lahko uporabimo lipidne sisteme. Glavni parametri, ki vplivajo na uspešnost granuliranja, so hitrost in čas mešanja, velikost delcev veziva in njegova viskoznost. Prednosti te metode so enostavnost procesa, odsotnost topil in možnost doseganja visoke vsebnosti učinkovine (21).



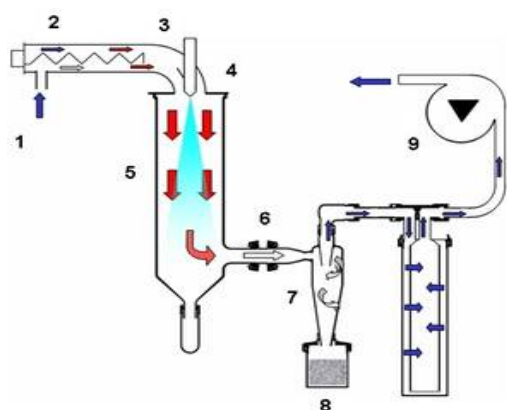
Iztiskanje talin s kroglīčenjem: Pri tem procesu najprej tvorimo talino ogrodnega materiala, v kateri je učinkovina raztopljena ali dispergirana, nato poteče iztiskanje te taline skozi ekstrudor (naprava za iztiskanje) pod nadzorovanimi pogoji (T, hitrost pretoka, tlak). Iztiskance nato razrežemo in prenesemo na sferonizator, kjer nastanejo okrogli delci enakih velikosti. Prednost te metode je odsotnost uporabe topila, enakomernost vsebnosti učinkovine in visok možen odstotek vgradnje (21, 22).

Sušenje z razprševanjem: Pripravljeno tekočo disperzijo SMES, z ali brez ZU, in trdnega nosilca s pomočjo sušilnika z razprševanjem pretvorimo v majhne trdne delce, ki jih lahko uporabimo za polnjenje trdih kapsul ali izdelavo tablet. Proces je podrobneje opisan v naslednjem poglavju.

#### 1.4. Sušenje z razprševanjem (*angl. spray drying*)

Sušenje z razprševanjem je enostopenjski proces, kjer tekočo disperzijo ustrezno nizke viskoznosti razpršimo skozi šobo ali disk v drobne kapljice. Na ta način močno povečamo površino tekoče disperzije in s tem omogočimo hitrejšo in učinkovitejšo izhlapevanje topila iz kapljic, ko te v sušilni komori pridejo v stik s segretim sušilnim plinom. Tako nastanejo majhni trdni delci. Postopek je primeren tudi za delo s termolabilnimi učinkovinami, saj nastali trdni delci zaradi toplote, ki se je v procesu porabila, nikoli ne dosežejo temperature vhodnega zraka (23).

Na sliki 1 je predstavljena shema sušilnika z razprševanjem s sotočno sušilno komoro.



1. vhod zraka
2. grelnik
3. senzor za temperaturo vhodnega zraka
4. dvokanalna šoba
5. sušilna komora
6. senzor za temperaturo izhodnega zraka
7. ciklon
8. zbirna posodica
9. aspirator

Slika 1: Shema sušilnika za razprševanje – Büchi Mini Spray Dryer B-290

Tekoče disperzije dovajamo do šobe za razprševanje s pomočjo *peristaltične črpalke*. Za tekočine z visoko viskoznostjo je uporaba tega procesa omejena, saj obstaja možnost, da se zamaši bodisi črpalka bodisi šoba (23).

Za *razprševanje* tekočin v sušilno komoro lahko uporabimo diskasti razpršilnik (*angl. rotary atomizer*), hidravlične šobe (*angl. hydraulic nozzles*), pnevmatske/večkanalne šobe (*pneumatic/multi-fluid nozzles*) ali nekatere druge vrste šob. Pnevmske oz. večkanalne šobe (v našem primeru dvokanalna šoba) se v farmacevtski industriji uporabljajo najpogosteje. Princip delovanja takih šob je, da se tekoča disperzija razprši v toku stisnjene nosilnega plina, ki teče v isto smer. Ob tem pride do visokih sil trenja na površino tekoče disperzije, kar povzroči razpršitev tekočine v drobne kapljice (23).

Kot *sušilni plin* najpogosteje uporabljamo segret filtriran atmosferski zrak. Redko uporabimo inertne pline, kot je dušik; največkrat v primerih oksidativne nestabilnosti sušene substance. Temperatura vhodnega sušilnega plina ima pomemben učinek na izparevanje topila iz kapljic in mora zato biti natančno uravnavana, tako da dosežemo največjo možno učinkovitost in ob tem ne pride do pregrevanja produkta, ki bi neugodno vplivalo na lastnosti nastalega trdnega delca in učinkovino (23).

*Sušilne komore*, v katerih prihaja do stika tekoče disperzije in sušilnega zraka, se razlikujejo glede na nastavljeno smer tokov zraka in tekočine. Sotočna komora (*angl. co-current*) je najbolj univerzalen in najbolj uporabljen tip sušilne komore, pri katerem sta šoba za tekočo disperzijo in dovod zraka na vrhu sušilne komore. Nastale kapljice pridejo takoj v stik z najbolj vročim zrakom. Nastali delci se po komori premikajo z različnimi turbulentnimi tokovi zraka in se ob tem spuščajo z zračnim tokom proti dnu sušilne komore ter hkrati izgubljajo topilo. Pogost neželen pojav je nastanek prevelikih kapljic, ki se ne zavrtinčijo z zrakom, ampak potujejo do sten sušilne komore, kamor se zaradi prevelike vsebnosti vlage zalepijo. Pri protitočni komori (*angl. counter current*) je dovod tekočine na vrhu komore, dovod zraka pa je nameščen na nasprotni strani. Tako kapljice tekočine najprej pridejo v stik s hladnejšim zrakom in kasneje z bolj vročim. Ta metoda se uporablja zelo redko; nastanejo porozni prahovi z nizko gostoto in večjimi delci, pogosto nastanejo tudi aglomerati delcev. Pri uporabi te komore je zelo pomembno uravnavanje hitrosti in tlaka dovajanega zraka, saj lahko prevelika hitrost pomeni izgubo produkta z zrakom, ki zapušča komoro, premajhna pa nastanek neposušanih delcev. Pri kombinirani komori (*angl. mixed flow – combined*) je dovod zraka na vrhu komore, šoba pa na dnu.

Tukaj lahko prihaja od težav, ker se suh produkt spušča v komori mimo še neposušeni kapljic (23).

Trdni produkt lahko zbiramo neposredno na dnu sušilne komore. Možna rešitev pa je, da trdni delci potujejo s tokom zraka iz spodnjega dela sušilne komore do ciklona ali posebnih filtrov. V ciklonu se delci ločijo od toka zraka zaradi centrifugalnih sil, ki so posledica krožečega zraka, in padejo v zbirno posodo (23)

Z izbiro pogojev lahko izdelamo praške z želenimi fizikalno-kemijskimi in morfološkimi lastnostmi. Parametri, na katere lahko vplivamo oziroma jih nastavimo na aparaturi, so: temperatura vhodnega zraka, hitrost pretoka sušilnega plina, hitrost črpanja tekočega vzorca in hitrost stisnjenega zraka na šobi.

Temperatura vhodnega zraka je njegova temperatura v trenutku kontakta s kapljicami tekočine in vpliva na količino topila, ki izhlapi v časovni enoti (23, 24).

Hitrost pretoka sušilnega plina vpliva na hitrost potovanja produkta in s tem na stopnjo njegovega sušenja. Nižji, kot je pretok, manjša je hitrost potovanja produkta in daljši je čas sušenja. Pretok vpliva tudi na ločevanje trdnih delcev od zraka v ciklonu in to je običajno najuspešnejše, kadar je nastavljen maksimalen pretok dovajanega zraka (23, 24).

Hitrost črpanja tekočega vzorca; pri tej je pomembno, da je konstantna in da čim manj variira, saj je tako zagotovljena stabilnost delovnega procesa (23, 24).

Nastavitev hitrosti stisnjenega zraka na šobi je pomembna, saj večja količina nosilnega plina vodi v nastanek manjših kapljic in posledično manjših trdnih delcev (23, 24).

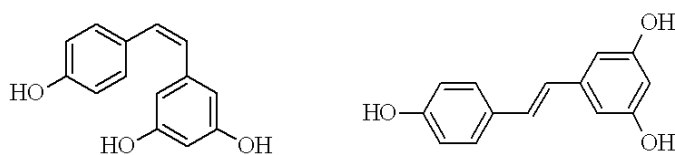
Poleg zgornjih parametrov vpliva na lastnosti končnega produkta tudi vlažnost vhodnega zraka in lastnosti tekoče disperzije (vrsta topila, delež trdnih delcev v tekoči disperziji ipd.) (23, 24).

Med in po sušenju z razprševanjem ocenjujemo izhodne parametre, na katere vplivajo posamezne ali vse zgornje vhodne spremenljivke. To so velikost delcev, fizikalne lastnosti končnega produkta (npr. vsebnost vlage, poroznost ipd.), učinkovitost sušenja (masa končnega produkta) in temperatura izhodnega zraka, ki jo izmerimo pred vstopom sušilnega plina v ciklon in predstavlja maksimalno temperaturo, na katero se segreje vzorec (23, 24).

## 1.5. Resveratrol

Resveratrol (RSV) je naravna spojina, ki spada med fitoaleksine, manjše molekule – sekundarne metabolite, ki jih rastline sintetizirajo kot obrambo po napadu patogenih organizmov oz. po obremenitvi z drugimi stresnimi dejavniki. Najdemo ga v veliko rastlinskih vrstah in njihovih plodovih – v korenini jesenskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*), plodovih borovnice (*Vaccinium myrtillus*), arašidih (*Arachis hypogea*), semenih in lupini rdečega grozdja (*Vitis spp.*) ter drugih (25, 26).

RSV je polifenol iz družine stilbenov z molekulsko formulo  $C_{14}H_{12}O_3$ , molsko maso 228,25 g/mol in kemijskim imenom 1-(3,5-dihidroksifenil)-2-(4-hidroksifenil) etilen. Je bel do umazano rjavo obarvan prah (27, 28) s temperaturo tališča 265–267 °C (28) oz. 253–255 °C (27) in  $\log P = 3,1$ . Topen je v lipidih in etanolu (50 mg/ml) ter skoraj netopen v vodi (3 mg/100 ml) (27). Zaradi dobre permeabilnosti skozi biološke membrane spada v II. razred glede na BCS (slaba topnost, dobra permeabilnost). Je diastereoizomer in obstaja v cis in trans obliki (slika 2). Trans izomera je v naravi več, je relativno stabilen in biološko bolj aktiven kot cis izomer (27).



Slika 2: Strukturni formuli cis RSV (levo) in trans RSV (desno)

Strokovnjaki so se v raziskavah osredotočili predvsem na transresveratrol (trans RSV). Trans RSV je ekstremno fotosenzitiven; 80–90 % se ga po izpostavljenosti svetlobi za 1 uro ali po obsevanju z UV svetlobo pretvori v cis izomer, kar je treba upoštevati pri ravnanju z RSV med poskusi (26).

Pozitivni učinki trans RSV na zdravje so posledica njegovega širokega spektra delovanja. Njegovo *kardioprotektivno* delovanje je posledica antioksidativnih lastnosti, modulacije biosinteze in aktivnosti NO in inhibicije trombocitnega COX-1. *Nevroprotektivni* učinki in tako izboljšanje nekaterih bolezni možganov (Alzheimerjeva bolezen) so prav tako posledica antioksidativne aktivnosti, pa tudi vpliva na signalne poti in sposobnosti povišanja produkcije SIRT v možganih. *Antikancerogeno* delovanje pri določenih tipih

raka je posledica sposobnosti RSV, da inducira apoptozo, modulira signalne poti in zmanjša proliferacijo celic. Ugotovili so tudi, da ga lahko uporabljamo pri boju z *debelostjo* in diabetesom, saj zmanjša sintezo lipidov, poveča lipolizo in zmanjša akumulacijo lipidov. *Protivnetno* delovanje RSV pa je posledica zmožnosti resveratrola, da zmanjša izražanja COX-2 (26, 29).

Pozitivni učinki RSV so tolikšni, da RSV ni več zanimiv le kot prehransko dopolnilo, temveč tudi kot zdravilna učinkovina. Njegovi učinki pa niso v popolnosti izkoriščeni zaradi nizke biološke uporabnosti RSV po peroralni aplikaciji, ki je posledica slabe topnosti v vodi, hitrega metabolizma in hitre eliminacije. Zato so raziskave usmerjene v iskanje farmacevtskih oblik, ki bi omogočile izboljšano biološko uporabnost RSV.

Ena od rešitev je vgrajevanje resveratrola v SMES, tako da po peroralnem vnosu ostane raztopljen v kapljicah emulzije in se porazdeli po GIT, kar omogoča absorpcijo večje količine RSV. Ta lahko zasiti sistem metabolizma prvega prehoda v enterocitih, kar omogoča prehod večji količini RSV do jeter. Posledično lahko v jetrih nastane več farmakološko aktivnih metabolitov RSV, ki se lahko tudi ponovno pretvorijo v RSV na mestu delovanja (1).

Na izboljšanje procesa absorpcije lahko posredno vplivajo tudi posamezne sestavine SMES – npr. PAS Kolliphor EL in RH40 inhibirata P-gp in MRP transporterje in tako zmanjšata efluks RSV in metabolitov RSV preko apikalne membrane enterocitov nazaj v lumen črevesja (1).

Z vgradnjo RSV v SMES zmanjšamo tudi njegovo citotoksičnost na črevesne epitelne celice v primerjavi s citotoksičnim učinkom raztopine RSV (1). Citotoksičnost RSV se močno zniža tudi z vgradnjo le-tega v druge koloidne nosilce, kot so liposomi (48) in nanodelci (49).

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je pretvorba tekočega samo-mikroemulgirajočega sistema (SMES) v trdno obliko z metodo sušenja z razprševanjem in vrednotenje dobljenega trdnega produkta.

Pripravili bomo tekoči SMES in vanj vgradili v vodi slabo topno učinkovino resveratrol. V vodne disperzije posameznih trdnih poroznih nosilcev (Neusilin<sup>®</sup> US2, Syloid<sup>®</sup> 244FP, Sylysia<sup>®</sup> 350) bomo dodali SMES z ali brez vgrajene učinkovine; tako pripravljene disperzije bomo z metodo sušenja z razprševanjem pretvorili v trden samo-mikroemulgirajoči sistem (*angl. Solid SMES – SSMES*).

Izdelanim prahovom, ki bodo vsebovali različne trdne nosilce, bomo določali izbrane lastnosti ter jih medsebojno primerjali. S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti bomo določili učinkovitost vgradnje in vsebnost vgrajene učinkovine v nastalih SSMES. S preizkusom sproščanja bomo določili tudi profil sproščanja učinkovine iz izdelanih formulacij v vodni raztopini HCl s pH 1,2 in raztopini fosfatnega pufru s pH 6,8.

Ohranitev samo-emulgirajočih lastnosti SMES po pretvorbi v trdno obliko bomo vrednotili z merjenjem velikosti kapljic emulzije, ki nastane po dispergiranju SSMES v vodi, v raztopini HCl in v fosfatnem pufru. Odsotnost (ali prisotnost) kristalinične oblike RSV v trdnih SSMES bomo dokazovali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC).

Ker je končni cilj raziskav na tem področju polnjenje samo-emulgirajočih prahov v trdne kapsule oz. izdelava tablet, bomo določili tudi pretočne lastnosti izdelanih prahov, njihov nasipni volumen ter vsebnost vlage.

## 3. MATERIALI in METODE

### 3.1. MATERIALI

#### 3.1.1. Materiali za pripravo SMES

Capmul<sup>®</sup> MCM EP (Abitec Corporation, ZDA)

Kemijsko je zmes srednjedolgoverižnih monogliceridov (60 %) in digliceridov (35 %) kaprilne in kaprinske kisline. Je lipofilen in netopen v vodi. Pri 25 °C je v tekočem ali poltrdnem agregatnem stanju, njegova HLB vrednost pa je 5–6. V farmacevtskih pripravkih ga najdemo v vlogi emulgatorja, vehikla, solubilizatorja v vodi slabo topnih ZU in pospeševalca transdermalne absorpcije ZU. Uporablja se tudi za povečanje biološke uporabnosti ZU in uravnavanje viskoznosti (30, 31, 32).

Kolliphor<sup>®</sup> EL (SIGMA Life Science, Nemčija) in

Cremophor<sup>®</sup> EL, Castor oil (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija)

Pridobivajo ga z reakcijo etilenoksida (35 molov) z ricinusovim oljem (1 mol). V reakciji nastane zmes hidrofobnih in hidrofilnih komponent. Med hidrofobne komponente spadajo glicerol polietilenglikol ricinoleati (v celotni zmesi jih je največ) in estri maščobnih kislin s polietilenglikolom. Med hidrofilne komponente pa spadajo prosti polietilenglikoli in glicerol etoksilat. Pri 26 °C je snov svetlorumena, prozorna, olju podobna tekočina s HLB vrednostjo 12–14. Spada med neionske površinsko aktivne snovi. V farmacevtskih izdelkih za peroralno, dermalno in parenteralno uporabo se uporablja v vlogi emulgatorja in solubilizatorja hidrofobnih spojin (32, 33, 34, 35, 36).

Kolliphor<sup>®</sup> RH40 (SIGMA Life Science, Nemčija)

Cremophor<sup>®</sup> RH40 (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija)

Pridobivajo ga z reakcijo etilenoksida (40 molov) s hidrogeniranim ricinusovim oljem (1 mol), v kateri nastane zmes hidrofobnih in hidrofilnih komponent. V največjem deležu vsebuje glicerol polietilenglikol hidroksistearat, poleg njega spadajo med hidrofobne komponente tudi estri maščobnih kislin s poliglikolglicerolom. Med hidrofilne komponente spadajo polietilenglikoli in glicerol etoksilat. Pri 20 °C je bela do svetlorumena poltrdna snov s šibkim vonjem, katere vodna raztopina je skoraj brez okusa. Spada med neionske površinsko aktivne snovi s HLB vrednostjo 14–16. V farmacevtskih pripravkih za

dermalno, peroralno in parenteralno uporabo je v vlogi emulgatorja ali solubilizatorja. Uporablja se tudi za izdelavo svečk, in sicer z namenom povečanja obsega sproščanja ZU (36, 37).

#### Ricinusovo olje (Lex, Slovenija)

Pridobivajo ga s hladnim stiskanjem semen navadnega kloščevca (*Ricinus communis*). Kemijsko je zmes trigliceridov maščobnih kislin, ki so zastopane v različnih deležih: ricinoleinska kislina (87 %), oleinska kislina (7 %), linolna kislina (3 %), palmitinska kislina (2 %), stearinska kislina (1 %) in dihidroksistearinska kislina v sledovih. Pri sobni temperaturi je brezbarvna do rumenkasta bistra oljna tekočina, skoraj brez vonja in okusa. V farmacevtskih izdelkih za peroralno, parenteralno in dermalno uporabo je v vlogi topila, oljnega vehikla in emolienta (36, 38).

### **3.1.2. Trdni nosilci za SMES**

#### Neusilin<sup>®</sup> US2 (Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Japonska)

Kemijsko je magnezijev aluminometasilikat ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1.7\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ) v obliki drobnega, ultra lahkega, poroznega granulata s povprečno velikostjo delcev 44–177  $\mu\text{m}$ . Ima veliko specifično površino (300  $\text{m}^2/\text{g}$ ) in lahko absorbira veliko količino olj (270–340 ml/100g) ali/in vode (240–310 ml/100g). Nasipna gostota je 0,13–0,18 g/ml, pH 5 % vodne suspenzije pa nevtralen (6–8). Uporablja se kot večfunkcionalna pomožna snov, ki na različne načine izboljšuje kakovost farmacevtskih izdelkov (39, 40).

#### Syloid<sup>®</sup> 244FP silica (W. R. Grace & Co.-Conn., ZDA)

Je sintetični amorfni silicijev dioksid v obliki mezopornega mikroniziranega silikagela s povprečno velikostjo delcev 3,2  $\mu\text{m}$  in povprečnim volumnom por 1,5 ml/g. Ima veliko specifično površino in lahko absorbira do 300 g tekočine na 100 g prahu. Nasipna gostota je 60 g/l, pH 5 % vodne suspenzije pa je 7,0. Je večfunkcionalna pomožna snov, ki se v farmacevtski industriji med drugim uporablja kot nosilec za zdravilne učinkovine, drsilo, kot snov, ki ščiti ostale komponente pred vlago, ter kot sredstvo za povečevanje viskoznosti disperzij (41, 42).



### Sylsias<sup>®</sup> 350 (Fuji Silysia Chemical, Ltd, Japonska)

Je visokoporozni sintetični amorfni mikroniziran silicijev dioksid, z volumnom por 1,6 l/g in s povprečno velikostjo delcev 3,9  $\mu\text{m}$ . Velika specifična površina (300  $\text{m}^2/\text{g}$ ) omogoča absorpcijo olja do 310 ml/100g. Nasipna gostota je 90 ml/5g, pH 5 % vodne suspenzije pa je 7,5. V farmaciji se med drugim uporablja kot nosilec za učinkovine, kot pomožno sredstvo pri tabletiranju (deluje kot antiadheziv in tako zmanjša lepljenje na pečate) in kot pomožna snov, ki ščiti vgrajeno učinkovino pred vlago (43).

### 3.1.3. Učinkovina

#### Resveratrol (ChromaDex Inc., ZDA)

### 3.1.4. Ostalo

- HCl, 37 % (Merck KGaA, Nemčija)
- KCl (Merck KGaA, Nemčija)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck KGaA, Nemčija)
- NaOH (Merck KGaA, Nemčija)
- $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 100 % (Merck KGaA, Nemčija)
- $\text{CH}_3\text{OH}$ , za analizo (Merck KGaA, Nemčija)
- $\text{CH}_3\text{OH}$  za HPLC (Merck KGaA, Nemčija)
- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- dvojno prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)

### 3.1.5. Naprave

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Švica
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Švica
- Analitska tehtnica, Vibra AJ Tuning-Fork Balance, Tehtnica, Slovenija
- Magnetno mešalo, Rotamix 560 MMH, Tehtnica, Slovenija
- Magnetno mešalo, RO 15, IKA WERKE, Nemčija
- Elektonski pH meter, Seven Compact, Mettler Toledo, Švica
- Sušilnik z razprševanjem, Büchi B-290, Büchi Labortechnik AG, Švica
- Dinamic Angle Tester (Pharmaceutical Technology); Gravo & PRB 10, Slovenija

- Naprava za merjenje vlage, Büchi Moisture Analyzer B-302, Büchi Labortechnik AG, Švica
- Ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Slovenija
- Membranski filter 0,45 µm RC, Lab Logistics Group GmbH, Nemčija
- Centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- Zeta Seizer Nano series, Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija
- Polistirenske kivete, Sarstedt AG&Co, Nemčija
- Naprava za sproščanje VK 7000 z vesli, z napravo za avtomatsko vzorčenje VK 8000, VanKel, ZDA
- Pretočni filter 10 µm, Full flow filt, Agilent Tehnologies, ZDA
- Diferenčni dinamični kalorimeter, Mettler Toledo DSC1 STAR<sup>e</sup> System, Švica
- Aluminijski lončki, 40 µl, Mettler Tolledo, Švica
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, Agilent Series, Agilent Technologies, ZDA; kolona: YMC-Pack ODS-AM, 5 µm, 250 x 4,6 mm
- Viale za HPLC, Agilent, ZDA

## 3.2. METODE

### 3.2.1. PRIPRAVA VZORCEV

#### 3.2.1.1. Priprava SMES

Za pripravo SMES smo uporabili v preglednici IV navedene komponente v razmerju, ki so ga predhodno določili in preizkusili na Katedri za tehnologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (1).

*Preglednica IV: Sestava SMES*

SESTAVINA	VLOGA V SMES	DELEŽ V KONČNEM SMES (%)
Ricinusovo olje	oljna faza	20
Capmul <sup>®</sup> MCM EP	oljna faza	20
Cremophor <sup>®</sup> EL	emulgator	30
Cremophor <sup>®</sup> RH40	emulgator	30

Izbrali smo stekleno erlenmajerico, katere velikost je ustrezala končnemu volumnu pripravljene SMES. V njo smo točno natehtali ustrezno količino vseh komponent SMES

in z magnetnim mešalom mešali do homogenosti. Pripravili smo največ 100 g SMES naenkrat.

### 3.2.1.2. Ravnanje z RSV in vzorci, ki ga vsebujejo

Zaradi nestabilnosti RSV (opisano v uvodu, v poglavju 1.5.) smo z RSV in z vzorci, ki ga vsebujejo, rokovali v zatemnjenem prostoru, v steklovini iz temnega stekla oz. v steklovini, oviti v aluminijasto folijo. Za tehtanje smo uporabljali plastično spatulo.

### 3.2.1.3. Priprava SMES z RSV

V 50 ml stekleno erlemajerico s širokim vratom smo natehtali 9 g SMES. V stekleni tehtalni čolniček smo točno natehtali 1 g RSV in ga kvantitativno prenesli v erlenmajerico s SMES. Na magnetnem mešalu smo mešali čez noč (cca 12 ur) pri nizki hitrosti. SMES je bil na videz homogen že po štirih urah. Posebno pozorni smo bili na hitrost mešanja, saj je pri visoki hitrosti zaradi nastanka zračnih mehurčkov zmes postala popolnoma bela; v tem primeru smo za odstranitev zračnih mehurčkov potrebovali več ur.

### 3.2.1.4. Priprava disperzije za sušenje z razprševanjem

Določeno maso nosilca smo natehtali v erlenmajerico in dodali predvideno količino prečiščene vode, ki smo jo odmerili z merilnim valjem (preglednica V).

*Preglednica V: Trdni nosilci in volumen prečiščene vode, v katerem smo jih dispergirali*

NOSILEC	MASA (g)	PREČIŠČENA VODA (ml)
Neusilin <sup>®</sup> US2	10	100
Syloid <sup>®</sup> 244FP	10	100
Syllysia <sup>®</sup> 350	10	200*
Neusilin <sup>®</sup> US2	5	100
Syloid <sup>®</sup> 244FP	5	100
Syllysia <sup>®</sup> 350	5	200*

*\*Disperzija nosilca Syllysia<sup>®</sup> 350 v 100 ml prečiščene vode je bila zelo viskozna in kot taka neprimerna za sušenje z razprševanjem, zato smo nosilec dispergirali v 200 ml prečiščene vode.*

Zmes smo na magnetnem mešalu mešali 1 uro. Nato smo dodali 10 g pripravljenega SMES z ali brez RSV. Da smo dosegli ustrezno homogenost vzorca, smo nastalo disperzijo mešali z magnetnim mešalom približno 4 ure.

### 3.2.1.5. Merjenje pH disperzije za razprševanje

pH smo merili z elektronskim pH metrom (Seven Compact, Mettler Toledo). Med merjenjem smo vzorce neprestano mešali na magnetnem mešalu.

### 3.2.1.6. Izdelava trdnega SMES

Tekoči SMES smo pretvorili v trden SMES (*angl. Solid SMES – SSMES*) z metodo sušenja z razprševanjem. Pred pričetkom dela smo zagotovili ustrezne povezave za zrak med razvlaževalnikom, sušilnikom z razprševanjem, kompresorjem in digestorjem. Nato smo ustrezno namestili vse steklene in kovinske dele sušilnika z razprševanjem in po vklopu vseh naprav v predpisanem vrstnem redu nastavili delovne pogoje na sušilniku z razprševanjem (preglednica VI).

*Preglednica VI: Delovni pogoji na sušilniku z razprševanjem (44)*

PARAMETRI	NASTAVITEV	POMEN
Aspirator	100 %	Maksimalen možen pretok dovajanega segretega zraka, ki je ~ 35 m <sup>3</sup> /h.
Črpalka	15 %	Hitrost črpanja tekočega vzorca za razprševanje, ki ustreza ~ 4,5 ml/min.
Temperatura vhodnega zraka	120 °C	Temperatura dovajanega zraka pred vstopom v procesno komoro.
Višina na rotamtru	50 mm	Hitrost stisnjene zraka na šobi, ki ustreza 60 l/h.

Najprej smo v procesno komoro sušilnika z razprševanjem približno 10 min s pomočjo črpalke dovajali prečiščeno vodo, da so se pogoji za sušenje ustalili. Nato smo začeli dovajati disperzijo za razprševanje iz erlenmajerice; vsebino slednje smo ves čas mešali z magnetnim mešalom, s čimer smo preprečili nastajanje usedline in grudic, ki jih črpalka ne bi mogla zajeti. Ko smo razpršili vso disperzijo, smo 15 min črpali toplo prečiščeno vodo, da smo očistili sistem. Končni trdni produkt iz zbirne posodice in iz ciklona smo zbrali v primeren vsebnik. Pri vzorcih, kjer je volumen trdnega vzorca presegal volumen zbirne posodice, smo večkrat zamenjali zbirno posodico, saj je v nasprotnem primeru produkt »potoval« na filter in smo imeli izgube.

Po končanem delu smo napravo razstavili in očistili ter osušili vse komponente.

Končni produkt – SSMES smo stehali ter rezultate podali kot uporabni izkoristek sušenja z razprševanjem (enačba 1). Za izračun uporabnega izkoristka sušenja z razprševanjem smo uporabili samo maso končnega trdnega produkta, ki smo ga lahko prenesli v vsebnik, saj je to dejanska masa, ki jo lahko uporabimo za potencialno pretvorbo v končne farmacevtske oblike (tablete, kapsule).

$$\eta = \frac{m_c + m_{zp}}{m_n + m_{SMES}} * 100 \%$$

(enačba 1)

$\eta$  – uporabni izkoristek sušenja z razprševanjem

$m_c$  – masa trdnega produkta zbranega iz ciklona (g)

$m_{zp}$  – masa trdnega produkta zbranega iz zbirne posodice (g)

$m_n$  – masa nosilca (g)

$m_{SMES}$  – masa SMES z/brez RSV (g)

## 3.2.2. VREDNOTENJE LASTNOSTI SSMES

### 3.2.2.1. Merjenje vsebnosti vlage v vzorcih s termogravimetrijo

Vsebnost vlage v vzorcu smo določali z aparaturo Büchi Moisture Analyzer B-302. V merilno posodico smo natehtali toliko vzorca (SSMES, SSMES z RSV), da je bila njegova debelina po celotni površini približno 2–3 mm (slika 3). Merili smo zmanjšanje mase SSMES zaradi izhlapevanja vode po 30 minutah segrevanja vzorca na stalni temperaturi 85 °C. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali vsebnost vlage v začetnem vzorcu. Delali smo v dveh paralelkah in rezultate podali kot povprečje meritev.



Slika 3: Levo – Büchi Moisture Analyzer B-302; desno – merilna posodica s SSMES

### 3.2.2.2. Merjenje pretočnih lastnosti

Pretočne lastnosti smo merili z metodo nasipnega kota na napravi Dinamic Angle Tester (Pharmaceutical Technology); Gravo & PRB10. Za izvedbo meritve smo izbrali valjasti merilni vsebnik ustrezne velikosti (slika 4) in ga napolnili z vzorcem tako, da je bil v pokončni legi napolnjen približno do polovice. Nasipni kot smo odčitali pri vrtenju s hitrostjo 2 RPM (obratov na minuto). Meritev smo ponovili 7- do 10-krat in ocenili interval velikosti nasipnega kota.



Slika 4: Levo – naprava Dinamic Angle Tester in razstavljen valjasti merilni vsebnik; desno – vzorec v merilnem vsebniku na napravi, pripravljen na začetek meritve

### 3.2.2.3. Merjenje nasipnega volumna

V merilni valj s premerom 4 cm smo nasipali 5 g vzorca in ocenili njegov volumen.

### 3.2.2.4. Merjenje velikosti kapljic

V tehtalni čolniček smo natehtali približno 1 g vzorca (tekoči ali trdni SMES, z ali brez RSV), ga prenesli v 250 ml bučko, ki smo jo napolnili z medijem do oznake (preglednica VII). Nastalo zmes smo dispergirali s pomočjo magnetnega mešala (10 min).

Preglednica VII: Vzorci in mediji, s katerimi smo izvajali meritve

VZORCI	MEDIJI
SMES	voda
SMES z RSV	raztopina – pH 1,2
SSMES brez RSV z različnimi nosilci	fosfatni pufer – pH 6,8
SSMES z RSV in različnimi nosilci	

Nastale disperzije smo prelili v centrifugirke in jih 10 min centrifugirali s centrifugo Centric 322A na 3500 obrat/min, s čimer smo odstranili večje trdne delce. Nato smo koloidno raztopino, ki je tvorila supernatant, s kapalko prenesli v čisto polistirensko kiveto, natančno obrisali njene zunanje površine in jo vstavili v merilno celico aparature Zeta Seizer Nano Series. Povprečni premer in polidisperzni indeks (PDI) kapljic emulzije, ki nastane po redispergiranju naših vzorcev v mediju, smo določili pri pogojih/nastavitvah, navedenih v preglednici VIII. Meritve temeljijo na metodi fotonske korelacijske spektroskopije (45).

*Preglednica VIII: Pogoji/nastavitve meritev*

PARAMETRI	NASTAVITEV
Čas začetne ekvibracije vzorca	120 s
Temperatura vzorca med meritvijo	25 °C
Disperzni medij	voda
Meritev	2 x povprečje desetih zaporednih meritev

### 3.2.2.5. Diferenčna dinamična kalorimetrija – DSC

Diferenčna dinamična kalorimetrija (*angl. Differential scanning calorimetry*) je termična analizna metoda, pri kateri s stalno hitrostjo segrevamo lonček z vzorcem in referenco (običajno prazen lonček) ter merimo razliko v toplotnem toku (kot funkcijo temperature in časa), ki je potreben, da se oba lončka segrejeta na isto temperaturo. V vzorcu lahko potečeta endotermna reakcija (energija se porablja) ali eksotermna reakcija (sproščanje energije), kar se na DSC krivulji vidi kot odklon od bazne linije. Z DSC lahko opazujemo in določamo različne fizikalne lastnosti trdnih in tekočih snovi, kot so temperatura tališča, temperatura steklastega prehoda, temperatura kristalizacije, polimorfizem, toplotna kapaciteta, določamo pa tudi kinetiko reakcije razpada in vsebnost nečistot (46).

V aluminijast lonček za DSC analizo smo točno natehtali približno 3–7 mg vzorca (RSV, SSMES z RSV, fizikalne zmesi nosilca in RSV), nato smo lonček pokrili s preluknjanim pokrovčkom. Pripravili smo tudi referenčni vzorec – prazen lonček s preluknjanim pokrovčkom. Lončka smo vstavili v merilno celico DSC in ju segrevali od 25 °C do 350 °C (298,15 K–623,15 K) z linearnim naraščanjem temperature s hitrostjo 20 K/min. Med meritvijo smo za atmosfero nad vzorcem uporabili inertni plin dušik, ki smo ga vpihovali s hitrostjo 50 ml/min. Za obdelavo rezultatov smo uporabili program

STARe software 9.30. Vrednotili smo fizikalno stanje RSV in morebitne fazne spremembe v izdelanih formulacijah in fizikalnih zmesih.

### 3.2.2.6. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC

Napravo HPLC Agilent Series (slika 5) smo pripravili za delovanje (spiranje sistema in kolone, priprava mobilne faze) in nastavili parametre analize (preglednica IX), nato smo vstavili plošče z vialami, ki smo jih napolnili s približno 1–1,5 ml tekočega vzorca. Vzorčenje je potekalo z avtomatskim vzorčevalnikom. Po končani analizi smo dobljene rezultate (površina pod krivuljo – AUC) prenesli v računalniški program Excel (MS Office) ter jih matematično in statistično obdelali.



Slika 5: HPLC Agilent Series

Preglednica IX: Parametri HPLC analize

PARAMETER	
Mobilna faza	0,5 % očetna kislina v mešanici metanola in dvojno prečiščene vode (1 : 1)
Kolona	reverznofazna C18 kolona; velikost delcev – 5 $\mu$ m; dolžina – 25 cm; notranji premer – 4,6 mm
Pretok mobilne faze	0,9 ml/min
Čas meritve	10 min
Volumen injiciranja	20 $\mu$ l
Detekcija	UV detekcija; DAD (detektor z diodnim nizom); valovna dolžina 303 nm



Priprava mobilne faze za HPLC

V steklenico s pokrovom na navoj smo z merilnim valjem odmerili metanol za HPLC in dvojno prečiščeno vodo v razmerju 1 : 1 in nastalo raztopino dobro premešali. Nato smo dodali stodontno očetno kislino (0,5 %), ki smo jo odmerili z merilnim valjem, ter raztopino s stresanjem homogenizirali. Steklenico z odprtim pokrovom smo za 5 min položili v ultrazvočno kadičko, da smo odstranili morebitne zračne mehurčke.

Umeritvena premica*Priprava medija za redčenje*

Z merilnim valjem smo odmerili enaki količini metanola za analizo in prečiščene vode (razmerje 1 : 1) ter ju združili v primerni stekleni posodi, nato smo nastalo zmes stresali do homogenosti.

*Redčenje*

Za določitev umeritvene premice smo najprej pripravili osnovno raztopino RSV, tako da smo točno natehtali približno 10 mg standarda RSV, ga prenesli v temno bučko in ga raztopili v 100 ml medija; vzorec smo 1 uro mešali z magnetnim mešalom, nato pa ga za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Iz osnovne raztopine RSV smo pripravili standardne raztopine z različnimi koncentracijami RSV (med približno 0,002 mg/ml in 0,1 mg/ml), tako da smo s stekleno polnilno pipeto prenesli izbrano količino natančno odmerjene osnovne raztopine v temne bučke izbranih volumnov (preglednica X), jih napolnili do oznake z medijem za redčenje in dobro premešali. Del vsake raztopine smo filtrirali preko membranskega filtra z velikostjo por 0,45 µm neposredno v vialo za HPLC.

*Preglednica X: Redčenje za izračun umeritvene premice*

	<b>VOLUMEN OSNOVNE RAZTOPINE (ml)</b>	<b>VOLUMEN BUČKE (ml)</b>
1.	15 ml	20
2.	10 ml	20
3.	8 ml	20
4.	6 ml	20
5.	4 ml	20
6.	2 ml	20
7.	1 ml	25
8.	1 ml	50

Enačbo umeritvene premice smo izračunali po analizi s HPLC s pomočjo linearne regresije iz znanih koncentracij različnih raztopin analita in njihovih izmerjenih vrednosti površin pod krivuljo (AUC). Prav tako smo določili kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije ( $R^2$ ). Enačbo umeritvene premice smo uporabljali za izračun koncentracij učinkovine pri določanju vsebnosti RSV v vzorcu in pri določanju koncentracije učinkovine pri preizkusu sproščanja RSV iz SSMES in fizikalnih zmesi.

### 3.2.2.7. Določanje vsebnosti učinkovine v vzorcih SSMES z RSV

Vzorec za določanje vsebnosti RSV v SSMES z učinkovino smo pripravili tako, da smo točno natehtali približno 200 mg SSMES z RSV v 250 ml temno bučko in dopolnili z medijem za redčenje (glej prejšnjo stran) do oznake. Disperzijo smo 1 uro mešali z magnetnim mešalom, nato pa smo bučko za 15 minut položili v ultrazvočno kadičko. Vzorec smo s pomočjo injekcijske brizge prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$  neposredno v vialo za HPLC. Po HPLC analizi smo s pomočjo umeritvene premice iz dobljenih rezultatov (AUC) izračunali koncentracijo RSV v SSMES. Vsebnost smo izračunali tako, da smo upoštevali volumen raztopine in maso natehte SSMES (enačba 2).

$$w = \frac{c_{uvz} * V}{m_{vz}} * 100$$

(enačba 2)

$w$  – vsebnost učinkovine v natehti SSMES (%)

$c_{uvz}$  – izračunana koncentracija učinkovine v vzorcu (mg/ml)

$V$  – volumen raztopine vzorca (ml)

$m_{vz}$  – masa natehte vzorca SSMES (mg)

Vsebnost smo določali v treh paralelkah in rezultate podali kot povprečje vseh meritev. Nato smo iz dobljenih podatkov izračunali učinkovitost vgradnje učinkovine po naslednji enačbi.

$$\text{učinkovitost vgradnje} = \frac{w_p * m_{tp}}{m_{zu}} * 100$$

(enačba 3)

$w_p$  – povprečna vsebnost učinkovine v zbranem SSMES

$m_{tp}$  – masa zbranega trdnega produkta (g)

$m_{zu}$  – začetna masa učinkovine, ki smo jo vgrajevali v SMES

### 3.2.2.8. Sproščanje RSV

#### Priprava medijev za sproščanje

##### *Raztopina HCl – pH 1,2*

1 M HCl: Z merilnim valjem smo odmerili 83 ml 37 % HCl ter jo prelili v 1000 ml bučko, nato smo s prečiščeno vodo napolnili bučko do oznake in dobro premešali.

V 5000 ml bučko smo natočili približno 1000 ml prečiščene vode. V plastični tehtalni čolniček smo natehtali 18,65 g KCl in ga kvantitativno prenesli v bučko z vodo, nato smo z merilnim valjem dodali 425 ml pripravljene 1 M HCl. S prečiščeno vodo smo napolnili bučko do oznake in mešali na magnetnem mešalu, dokler se KCl ni raztopil. pH smo preverili s testnim lističem in ga uravnavali z dodajanjem 1 M HCl ali 1 M NaOH po kapljicah.

##### *Fosfatni pufer – pH 6,8*

V plastična čolnička smo natehtali 34 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 4,48 g NaOH. Obe snovi smo kvantitativno prenesli v 5000 ml bučko in dodali prečiščeno vodo do oznake. Na magnetnem mešalu smo mešali, dokler se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NaOH nista raztopila. pH smo izmerili z elektronskim pH-metrom in ga uravnavali do  $\pm 0,05$  enote natančno z dodajanjem 1M HCl ali 1M NaOH po kapljicah.

#### Priprava fizikalnih zmesi (FZ)

Pripravili smo naslednje fizikalne zmesi:

FZ1: 50 % RSV + 50% Neusilin<sup>®</sup> US2

FZ2: 50 % RSV + 50% Syloid<sup>®</sup> 244FP

FZ3: 50 % RSV + 50% Sylysia<sup>®</sup> 350

Enaki količini učinkovine in posameznega izbranega nosilca smo natehtali na tehtalni čolniček in obe snovi prenesli v terilnico, kjer smo ju previdno premešali do homogenosti.

#### Izvedba preizkusa

Preizkus sproščanja RSV iz SSMES z RSV oz. raztapljanja iz fizikalnih zmesi smo izvajali na napravi za sproščanje VanKel z veslastimi mešali (Naprava 2 po Ph. Eu. 8. Ed.) (slika 6). Testne posode, ki so bile potopljene v vodno kopel, smo napolnili z medijem, ki smo ga odmerili z merilnim valjem (pH 1,2 in pH 6,8; vsak po tri paralelke) in počakali, da je temperatura medija dosegla predpisano (preglednica XI). Točno smo natehtali približno

tolikšno količino trdnega vzorca, da je količina RSV v vzorcu ustrezala sink pogojem (največ 7 mg RSV/900 ml medija). Vzorce smo vse hkrati kvantitativno prenesli v testne posode in vključili vrtenje vesel. Preizkus je potekal 8 ur. Vzorčenje v izbranih časovnih točkah je bilo avtomatsko. Dobljene vzorce smo preko membranskega filtra z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$  prefiltrirali v vialo za HPLC in jih analizirali s HPLC.



Slika 6: Naprava za sproščanje VanKel-7000 z veslastimi mešali in avtomatskim vzorčevalnikom

Preglednica XI: Pogoji sproščanja učinkovine

PARAMETER	
Medij	raztopina pH 1,2 fosfatni pufer pH 6,8
Volumen medija	900 ml
Temperatura medija	$37 \pm 0,5$ °C
Mešalo	Veslasto
Hitrost vrtenja mešala	50 obrat/min
Čas sproščanja	8 h
Časovne točke vzorčenja	5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480 min
Volumen vzorčenja	5 ml

Računanje koncentracij

Iz dobljenih rezultatov HPLC analize (vrednosti AUC) smo s pomočjo umeritvene premice s splošno enačbo  $y = a * x + b$  izračunali koncentracijo RSV v določeni posodi v določeni časovni točki vzorčenja (enačba 4).

$$x_n = \frac{y_n - b}{a}$$

(enačba 4)

$x_n = c_n$  – koncentracija učinkovine v n-tem vzorcu (mg/ml)

$y_n$  – AUC izmerjena pri HPLC analizi

$b$  – presečišče premice z ordinatno osjo

$a$  – naklon premice

Nato smo izračunali maso sproščene učinkovine (enačba 5), tako da smo upoštevali zmanjšanje volumna medija zaradi vzorčenja (enačba 6) in prišteli odvzeto maso RSV pri predhodnih vzorčenjih.

$$m_n = c_n * V_n + V_{vz} * (c_1 + c_2 + c_3 + \dots + c_{n-1})$$

(enačba 5)

$m_n$  – masa sproščene učinkovine v času vzorčenja (mg)

$c_n$  – izračunana koncentracija učinkovine v n-tem vzorcu (mg/ml)

$V_n$  – volumen medija ob vzorčenju (ml)

$V_{vz}$  – volumen vzorčenja (ml)

$$V_n = V_0 - (n * V_{vz})$$

(enačba 6)

$V_n$  – volumen medija v času vzorčenja (ml)

$V_0$  – začetni volumen medija (ml)

$n$  – zaporedno število vzorčenja

$V_{vz}$  – volumen vzorčenja (ml)

Delež sproščene učinkovine smo izračunali glede na maso učinkovine v natehti (enačba 7).

$$X_n = \frac{m_n}{m_z * w_p} * 100$$

(enačba 7)

$X_n$  – delež sproščene učinkovine v času vzorčenja v %

$m_n$  – masa sproščene učinkovine v času vzorčenja (mg)

$m_z$  – masa natehte (mg)

$w_p$  – povprečna vsebnost učinkovine v SSMES z RSV oz. v fizikalni zmesi

Rezultate smo podali kot povprečje meritev treh paralelk in jih predstavili v grafu kot profil sproščanja – odstotki sproščene učinkovine v času.

## 4. REZULTATI in RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo izdelali več trdnih SMES (SSMES) z uporabo različnih nosilcev. Pripravljene formulacije smo ovrednotili glede na različne parametre, ki jih opredeljujejo in so pomembni za razumevanje in nadaljnji razvoj trdnih FO.

Trdne produkte smo poimenovali glede na uporabljen nosilec in njegovo začetno maso v disperziji za razprševanje ter glede na to, ali je v SMES vgrajen RSV (preglednica XII).

*Preglednica XII: Poimenovanje trdnih produktov (SSMES) in sestava izhodiščnih tekočih disperzij za razprševanje*

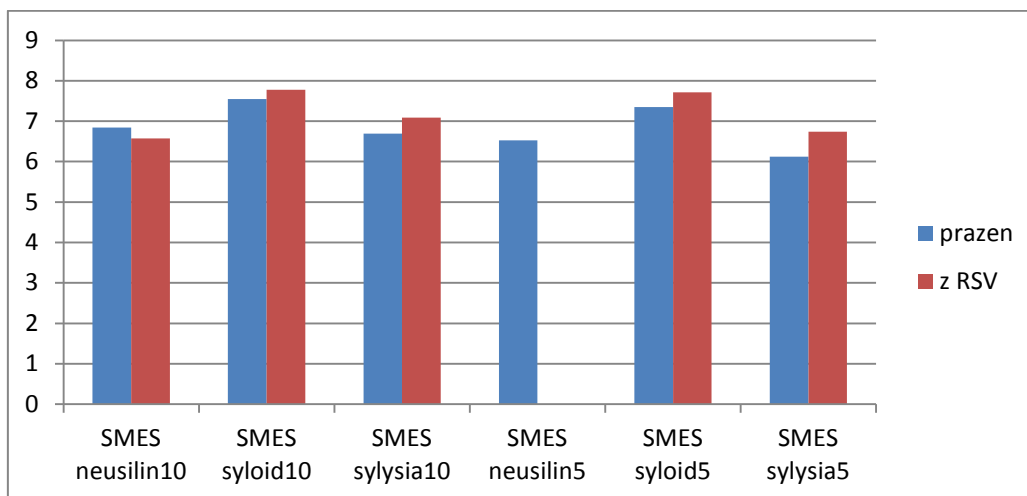
PRODUKT	TEKOČA DISPERZIJA			
	nosilec	masa nosilca (g)	masa SMES (g)	masa resveratrola (RSV) (g)
<i>SSMES neusilin10 prazen</i>	Neusilin <sup>®</sup> US2	10	10	0
<i>SSMES syloid10 prazen</i>	Syloid <sup>®</sup> 244FP	10	10	0
<i>SSMES sylysia10 prazen</i>	Sylaysia <sup>®</sup> 350	10	10	0
<i>SSMES neusilin5 prazen</i>	Neusilin <sup>®</sup> US2	5	10	0
<i>SSMES syloid5 prazen</i>	Syloid <sup>®</sup> 244FP	5	10	0
<i>SSMES sylysia5 prazen</i>	Sylaysia <sup>®</sup> 350	5	10	0
<i>SSMES neusilin10 RSV</i>	Neusilin <sup>®</sup> US2	10	9	1
<i>SSMES syloid10 RSV</i>	Syloid <sup>®</sup> 244FP	10	9	1
<i>SSMES sylysia10 RSV</i>	Sylaysia <sup>®</sup> 350	10	9	1
<i>SSMES syloid5 RSV</i>	Syloid <sup>®</sup> 244FP	5	9	1
<i>SSMES sylysia5 RSV</i>	Sylaysia <sup>®</sup> 350	5	9	1

### 4.1 Vrednotenje lastnosti disperzije za razprševanje

#### 4.1.1 Merjenje pH disperzije za razprševanje

Pred pretvorbo tekočega SMES v trdno formulacijo s sušenjem z razprševanjem smo izmerili pH pripravljenim disperzijam tekočega SMES z ali brez RSV z izbranim nosilcem. Iz rezultatov, ki so grafično prikazani na sliki 7, je razvidno, da so imele disperzije SMES brez RSV razpon pH med ~ 6,1 in ~ 7,6 in da imajo najvišji pH vzorci s trdnim nosilcem Syloidom. Po dodatku RSV se je pH vseh disperzij rahlo povišal (od ~ 0,2 do ~ 0,6 enote), razen pri vzorcu z 10 g trdnega nosilca Neusilin, kjer se je pH znižal za ~ 0,3 enote.

Disperziji z višjo vsebnostjo trdnega nosilca Sylysia (SMES z in brez RSV) sta imeli višji pH od disperzij z nižjo vsebnostjo tega nosilca, kar je v skladu s pričakovanji glede na podatke o pH nosilca v Tech Data Sheet (43).



Slika 7: pH tekočih disperzij za razprševanje v odvisnosti od vrste in mase nosilca in vgrajenega SMES z resveratrolom (RSV) ali brez resveratrola (prazen).

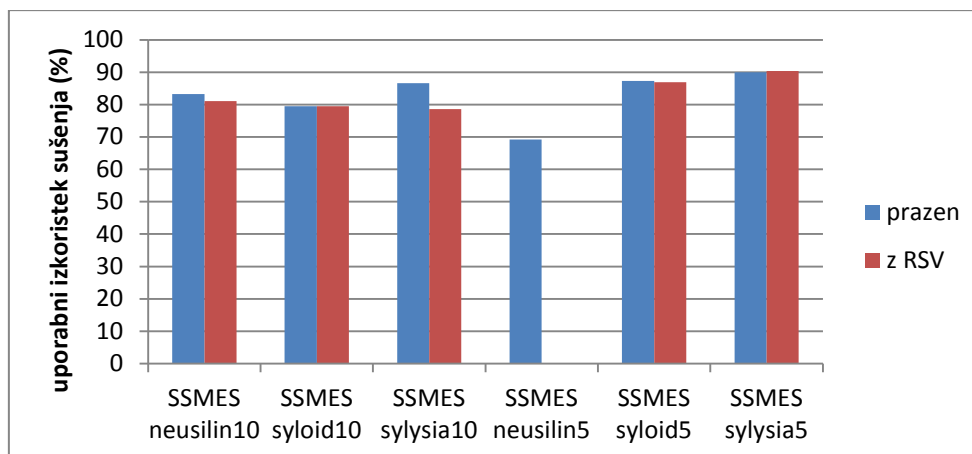
## 4.2 Vrednotenje lastnosti SSMES

Za pretvorbo tekoče disperzije v trdne delce smo uporabili metodo – sušenje z razprševanjem z aparaturo Büchi Moisture Analyzer B-302. Ovrednotili smo vpliv izbranih nosilcev za SMES na učinkovitost procesa sušenja ter na vsebnost vlage, pretočne lastnosti in nasipni volumen nastalih prahov. Spremljali smo tudi vpliv pretvorbe SMES v trdno obliko na ohranjanje sposobnosti samo-mikroemulgiranja in morebitno obarjanje v SMES raztopljene ZU. Proučevali smo tudi vpliv trdnih nosilcev na učinkovitost vgradnje in vsebnost vgrajene ZU v SSMES ter profil sproščanja ZU iz le-tega.

### 4.2.1 Uporabni izkoristek sušenja z razprševanjem

Tehnologija sušenja z razprševanjem se je z vidika doseženih izkoristkov izkazala kot dobra metoda za pretvorbo tekočega SMES v trdne formulacije, saj je bila izguba mase vstopnih komponent nizka (slika 8).





Slika 8: Uporabni izkoristek sušenja z razprševanjem (v %) v odvisnosti od vrste in mase trdnega nosilca za prazne SSMEs in SSMEs z resveratrolom (RSV).

Če izvzamemo formulacijo *SSMES neusilin5 prazen*, lahko ugotovimo, da uporabni izkoristek sušenja ni nikoli padel pod ~ 79 %, kolikor je bil izkoristek sušenja formulacije *SSMES sylysia10 RSV*. Iz slike 8 je tudi razvidno, da smo največje izkoristke dosegli pri sušenju praška s 5 g nosilca Sylysia – tako pri praznem SSMEs kot pri SSMEs z RSV ~ 90 %. V večini primerov je bil izkoristek sušenja rahlo večji pri SSMEs brez vgrajenega RSV, vendar razlike niso bile bistvene, z izjemo formulacij z 10 g Sylysie, kjer je bila razlika 8 %.

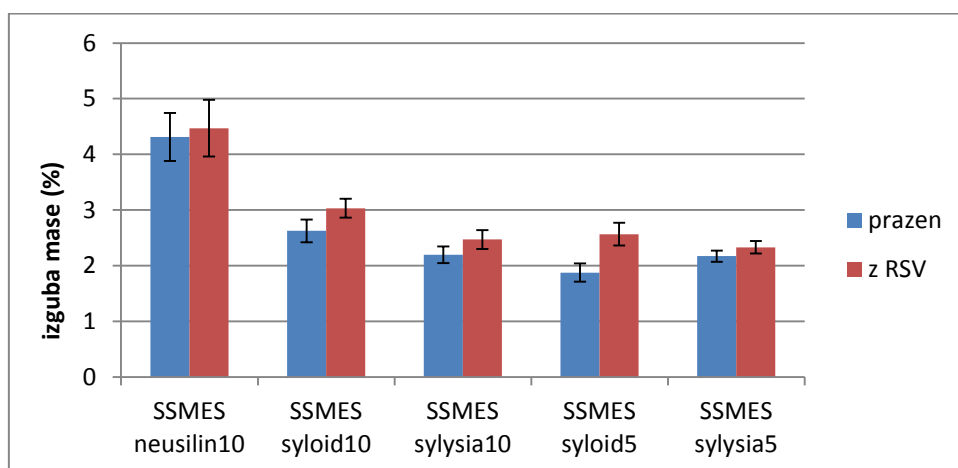
Predvidevamo, da so k visokim izkoristkom v veliki meri prispevali ustrezni sušilni pogoji v komori, ki so omogočali dovolj hitro in učinkovito sušenje trdnih delcev, tako da se ti niso lepili na stene sušilne komore in ciklona.

Iz slike 8 je razvidno tudi izstopanje formulacije s 5 g nosilca Neusilin z vgrajenim SMES brez RSV. Po koncu sušenja z razprševanjem smo v tem primeru opazili, da se je na vrhu ciklona nabrala lipofilna faza. Predvidevamo, da se je to zgodilo, ker smo uporabili prenizko razmerje med nosilcem in tekočim SMES in tako preseglji kapaciteto nosilca za vgradnjo SMES. Najverjetneje je tudi zato imel ta vzorec najnižji uporabni izkoristek sušenja – 69 %. Zaradi neustreznega razmerja med nosilcem in tekočim SMES nismo nadaljevali z izdelavo formulacije z vgrajenim RSV; vzorec *SSMES neusilin5 prazen* smo sicer vseeno vključili v proces vrednotenja, vendar rezultatov nismo prikazali v preglednicah oz. na slikah.

#### 4.2.2 Vrednotene vsebnosti vlage v vzorcih glede na izbran nosilec

Vsebnost vlage v vzorcih smo določali posredno, in sicer smo termogravimetrično merili izgubo mase med segrevanjem vzorcev (30 min na 85 °C); predpostavili smo, da je izguba mase enaka vsebnosti vode v prahovih.

Iz slike 9 je razvidno, da po rezultatih bistveno odstopa vzorec *SSMES neusilin10*, ki je vseboval največ vlage; prazen vzorec ~ 4,3 %, vzorec z RSV pa ~ 4,5 %. Izguba mase ostalih vzorcev je sicer bila med 1,9 % (*SSMES syloid5 prazen*) in 3,0 % (*SSMES syloid10 RSV*). V primerjavi med praznimi SSMES in SSMES z RSV so več vlage vsebovali SSMES z RSV, največja razlika med praznim in SSMES z RSV pa se je pokazala pri formulaciji *SSMES syloid5*.

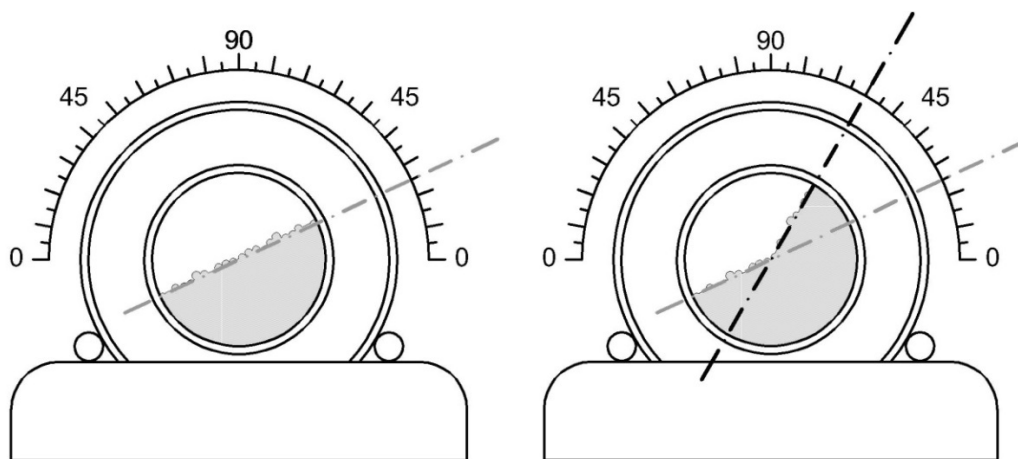


Slika 9: Povprečna termogravimetrično določena izgube mase trdnih vzorcev (v %) v odvisnosti od vrste in mase trdnega nosilca za prazne SSMES in SSMES z resveratrolom (RSV).

#### 4.2.3 Vrednotenje pretočnih lastnosti SSMES z metodo merjenja nasipnega kota

Za izdelavo enodimernih trdnih farmacevtskih oblik, kot so kapsule in tablete, so zelo pomembne tudi pretočne lastnosti prahov oz. granulata. Pretočne lastnosti izdelanih SSMES smo vrednotili z merjenjem nasipnega kota; za merjenje slednjega smo uporabljali nefarmakopejsko metodo z rotirajočim valjastim vsebnikom. Že na otip oz. pri opazovanju s prostim očesom je bilo očitno, da imajo izdelani prahovi zelo slabe pretočne lastnosti. Kljub temu nas je zanimalo, ali lahko med njimi določimo razlike in prahove razdelimo v

skupine glede na način sipanja oz. pretakanja. Med preizkusom nobeden od prahov ni lepo tekkel, večina se jih je nekonsistentno prevračala ali sesedala v približno ravno linijo ali v dve liniji pod različnima kotoma, kar je s skicama ponazorjeno na sliki 10.



Slika 10: Shematski prikaz določanja nasipnega kota po zaustavitvi rotirajočega vsebnika

Ugotovili smo, da sta gibanje, ki je bilo najbolj podobno teku, imela prahova *SSMES syloid10 prazen* in *SSMES syloid10 RSV*, vendar so se pri njima pojavljale druge težave, kot je lepljenje na steklo ali sesedanje vase. V skupino prahov, ki so se premikali tako, da so se kupčki prahu prevračali in nato stresli, spadajo *SSMES neusilin10 prazen*, *SSMES sylsya10 prazen*, *SSMES sylsya10 RSV*, *SSMES sylsya5 RSV* in *SSMES syloid5 RSV*. Ostali SSMES so se gibal tako različno, da jih je bilo nemogoče razvrstiti v skupino. V preglednici XIII so predstavljene meritve s komentarji, ki podrobneje osvetlijo težave pri posameznih prahovih.

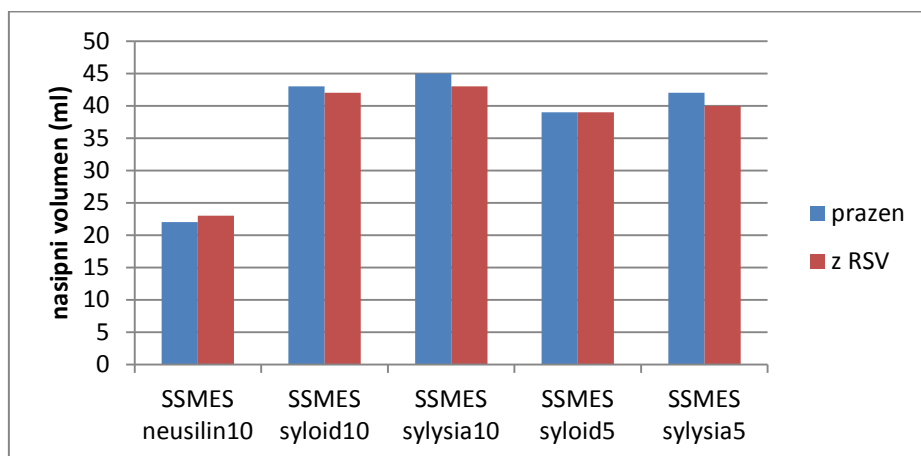
Pred nadaljnjim razvojem trdnih farmacevtskih oblik z izdelanimi SSMES bi bilo tako nujno izboljšati pretočne lastnosti slednjih z dodatkom drsil ali izdelavo granulata.

Preglednica XIII: Rezultati meritev nasipnega kota ( $^{\circ}$ ) s komentarji

VZOREC	MERITVE										INTERVAL	KOMENTAR
<i>SSMES neusilin10 prazen</i>	42	36	37	30	38	34	33	30	26	32	26–42	ne teče lepo; pada v različno velikih kupčkah
<i>SSMES syloid10 prazen</i>	36	35	28	31	29	35	29	33	35	33	29–36	teče; po štirih merjenjih se kot manjša; če obrnemo kolut, da se vrti v drugo stran, se kot ponovno poveča in se spet zmanjšuje, kot da bi se prah »zbil«
<i>SSMES sylysia10 prazen</i>	30	27	32	22	33	34	34	27	25	18/47		kupčki se prevrnejo v približno ravnino
<i>SSMES syloid5 prazen</i>	23	32	29/58	30	35	30	32	33	34	31		grudičast; lepi se na steklo
<i>SSMES sylysia5 prazen</i>	36	36	37	35	35	35	34				34–36	ne teče; zdrsne
<i>SSMES neusilin10 RSV</i>	39	29	30	27	33	33	29	34	31	30	27–39	ne teče lepo; na vrhu se seseda sam vase
<i>SSMES syloid10 RSV</i>	38	39	34	40	38	32	37	41	32	33	32–40	lepše teče; lepi se na steklo
<i>SSMES sylysia10 RSV</i>	26/67	30/64	23/56	27/58	25/68	31/60	27/55	27/62	39	33		prevrača se v kupčkah
<i>SSMES syloid5 RSV</i>	31	25	25/54	25/62	25/57	24/63	24/59	31	35/63			grudičast; se prevrača
<i>SSMES sylysia5 RSV</i>	40	37	37	44	31	31	43	43	35	36	31–44	prevrne se in teče

### 4.2.3 Vpliv izbranega nosilca na nasipni volumen SSMES

Približno enako količino ( $5 \text{ g} \pm 0,02$ ) vsakega posameznega SSMES smo nasipali v merilni valj in odčitali nasipni volumen. Največjo težavo pri odčitavanju slednjega je predstavljala izredno neravna zgornja površina, ki je bila posledica slabih pretočnih lastnosti prahov, zato smo volumen samo ocenili in rezultate podali grafično (slika 11).



Slika 11: Nasipni volumen SSMES (ml) v odvisnosti od vrste in mase trdnega nosilca za prazne SSMES in SSMES z resveratrolom (RSV).

Glede na predhodne vizualne ocene volumna samih nosilcev se je pričakovano izkazalo, da imajo najmanjši nasipni volumen prahovi s trdnim nosilcem Neusilinom, in sicer SSMES neusilin10 prazen 22 ml ter SSMES neusilin10 RSV 23 ml. Pri ostalih SSMES smo določili bistveno višji nasipni volumen, in sicer v intervalu med 39 ml in 45 ml.

Če primerjamo nasipni volumen formulacij s 5 g oz. 10 g nosilcev Sylysia in Syloid vidimo, da imajo SSMES s 5 g nosilca manjši nasipni volumen. Slednje je verjetno posledica nižjega razmerja med nosilcem in SMES, saj smo v tem primeru na manjšo količino nosilca adsorbirali enako količino SMES kot v primeru vzorcev z 10 g nosilca.

### 4.2.5 Ocena sposobnosti samo-mikroemulgiranja SSMES

Z merjenjem velikosti kapljic nastale emulzije smo ocenjevali učinkovitost procesa samo-mikroemulgiranja tako tekočih kot tudi trdnih SMES. Velikost kapljic emulzij, ki nastanejo po dispergiranju trdnih SSMES v vodi ter v medijih s pH 1.2 in 6.8 smo primerjali z velikostjo kapljic emulzije, ki nastane po dispergiranju tekočega SMES brez in

z RSV. Rezultati so predstavljeni v preglednici XIV. Iz njih je razvidno, da lahko glede na velikosti kapljic praktično vse nastale disperzije uvrstimo med mikroemulzije ( $< 50$  nm oz.  $< 100$  nm), kar kaže, da so se med pretvorbo SMES v trdno stanje samo-mikroemulgirajoče lastnosti ohranile. Izjema sta vodni disperziji *SSMES syloid10 RSV* (191 nm) in *SSMES sylsial10 RSV* (268 nm); v primeru slednjih sta nastali emulziji, kar smo videli tudi s prostim očesom, saj je nastala disperzija mlečnega izgleda.

Vsem vzorcem smo izmerili tudi polidisperzni indeks (PDI), ki nam kaže širino porazdelitve velikosti kapljic. Bolj kot je njegova vrednost blizu 0, bolj homogen oz. monodisperzen je vzorec glede velikosti kapljic in bolj, kot se vrednost bliža 1, bolj je vzorec heterogen oz. heterodisperzen. V praksi velja, da med monodisperzne uvrstimo vzorce s PDI pod 0,2; vzorce s PDI, večjim od 0,25, uvrstimo med heterodisperzne, kar pomeni, da lahko samo en naš vzorec (*SSMES neusilin10 prazen*), dispergirani v mediju s pH 1,2, uvrstimo med monodisperzne. Pri večini ostalih vzorcev je bila vrednost PDI pod 0,5, kar po navedbah v literaturi (45) pomeni, da lahko zaupamo meritvam velikosti delcev in jih tudi primerjamo med sabo, če do rezultatov pridemo z enako metodo, kar v našem primeru smo.

Ne glede na to, da so bile pripravljene disperzije na videz transparentne, nas je ob izpisu rezultatov po meritvi program (The Malvern Zetasizer Software) opozoril, da je bilo za merjenje velikosti kapljic z metodo fotonske korelacijske spektroskopije neustreznih kar 15 od 36 izmerjenih vzorcev. Rezultati niso bili bistveno drugačni niti, ko smo ponovili meritve z novo pripravljenimi vzorci, ki smo jih po centrifugiranju še filtrirali skozi filter z velikostjo por  $0,45 \mu\text{m}$ . Program običajno opozori, da vzorec ni primeren za merjenje, ko je sipanje laserske svetlobe zelo neenakomerno, kar je običajno posledica velike heterogenosti vzorca ali prisotnosti prevelikih delcev. Ker so bili vzorci transparentnega do opalescentnega videza, kar kaže na koloidno velikost kapljic, smo rezultate merjenja velikosti le-teh kljub temu vključili v preglednico XIV.

*Preglednica XIV: Velikost kapljic (mikro)emulzije (nm), ki nastane po dispergiranju SSMES oz. SMES v vodi ter v medijih s pH 1.2 oz. 6.8; navedena je tudi vrednost polidisperznega indeksa (PDI), ki je merilo za porazdelitev velikosti kapljic.*

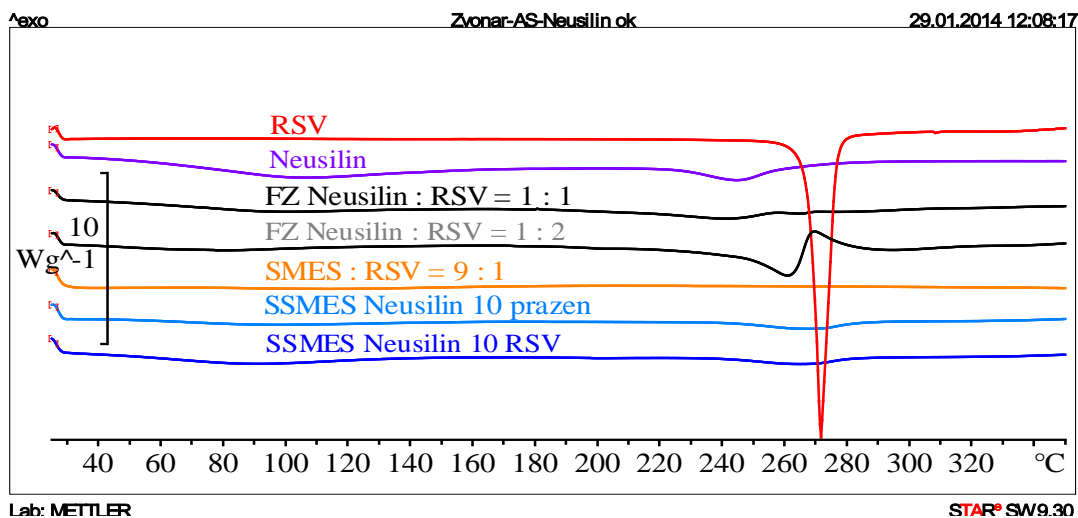
VZOREC	MEDIJ		Velikost (nm)	SD	PDI	SD
SSMES neusilin10 prazen	voda		15,64	0,01	0,35	0,01
SSMES neusilin10 prazen	1,2		12,14	0,10	0,13	0,00
SSMES neusilin10 prazen	6,8		14,69	0,12	0,28	0,01
SSMES syloid10 prazen	voda	x	175,70	0,85	0,56	0,00
SSMES syloid10 prazen	1,2	x	419,00	201,00	0,21	0,18
SSMES syloid10 prazen	6,8	x	1399,00	1030,00	1,00	0,00
SSMES sylysia10 prazen	voda	x	137,90	1,49	0,64	0,00
SSMES sylysia10 prazen	1,2	x	1256,00	311,80	1,00	0,00
SSMES sylysia10 prazen	6,8	x	2516,00	464,60	1,00	0,00
SSMES syloid5 prazen	voda		15,99	0,16	0,38	0,00
SSMES syloid5 prazen	1,2		14,26	0,09	0,28	0,00
SSMES syloid5 prazen	6,8		15,89	0,11	0,38	0,00
SSMES sylysia5 prazen	voda		16,57	0,14	0,49	0,01
SSMES sylysia5 prazen	1,2		22,40	0,07	0,63	0,01
SSMES sylysia5 prazen	6,8		15,89	0,17	0,35	0,00
SSMES neusilin10 RSV	voda		23,77	0,19	0,44	0,01
SSMES neusilin10 RSV	1,2	x	1131,00	2,12	0,41	0,49
SSMES neusilin10 RSV	6,8		21,20	0,08	0,49	0,00
SSMES syloid10 RSV	voda		191,10	1,34	0,21	0,02
SSMES syloid10 RSV	1,2	x	532,00	4,53	0,86	0,02
SSMES syloid10 RSV	6,8	x	4207,00	2715,00	0,89	0,16
SSMES sylysia10 RSV	voda		268,30	5,87	0,39	0,03
SSMES sylysia10 RSV	1,2	x	704,20	45,89	0,94	0,03
SSMES sylysia10 RSV	6,8	x	714,30	233,70	0,90	0,14
SSMES syloid5 RSV	voda		18,60	0,23	0,37	0,00
SSMES syloid5 RSV	1,2		48,72	0,53	0,51	0,01
SSMES syloid5 RSV	6,8	x	26,43	0,15	0,85	0,01
SSMES sylysia 5 RSV	voda	x	27,53	0,05	0,80	0,00
SSMES sylysia 5 RSV	1,2	x	53,65	0,47	0,53	0,05
SSMES sylysia 5 RSV	6,8	x	58,13	0,64	1,00	0,00
SMES	voda		10,73	0,09	0,05	0,00
SMES	1,2		10,90	0,12	0,04	0,00
SMES	6,8		11,18	0,15	0,08	0,01
SMES + RSV	voda		35,64	0,17	0,24	0,01
SMES + RSV	1,2		79,42	1,54	0,45	0,01
SMES + RSV	6,8		107,2	1,56	0,48	0,00

*x – program nas je na koncu meritve opozoril, da je meritev neveljavna (vzorec je bil neprimeren/neustrezen za merjenje)*

#### 4.2.6 Termična analiza SSMES

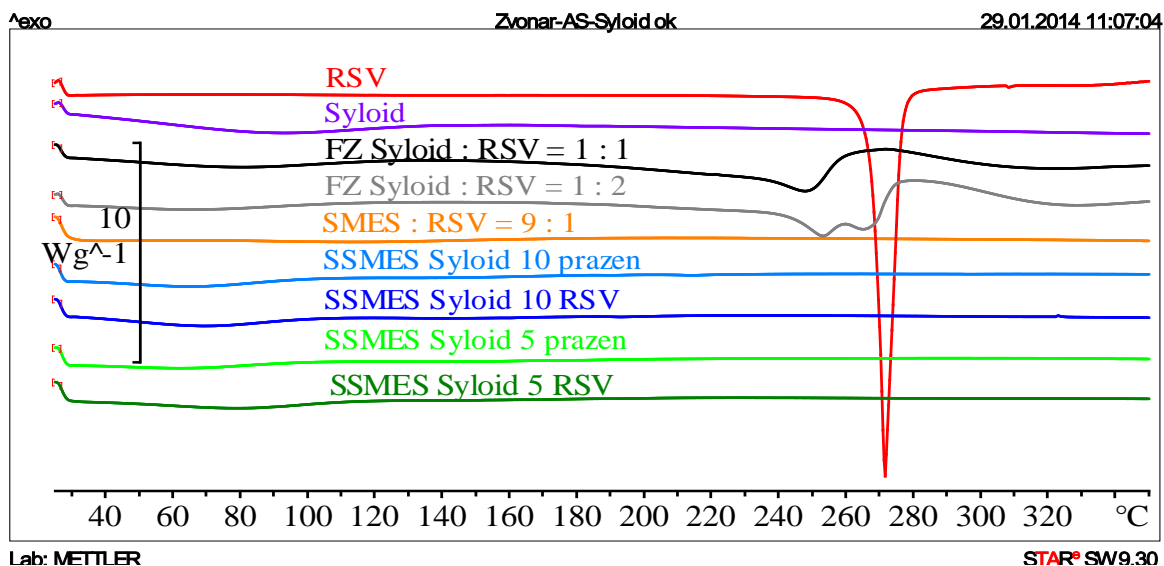
Z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) smo vrednotili fizikalno stanje RSV in morebitne fazne spremembe v izdelanih formulacijah. Zaradi možne precipitacije učinkovine po pretvorbi SMES z ZU v trdno obliko nas je zanimalo, ali je RSV v SSMES ostal v raztopljenem oz. amorfem stanju, kar smo določali posredno s potrditvijo odsotnosti kristalne oblike. Posneli smo DSC krivulje segrevanja samega RSV, posameznih nosilcev, fizikalnih zmesi (FZ) nosilca in RSV v razmerjih 1 : 1 in 1 : 2, tekočega SMES z RSV, praznih SSMES in SSMES z RSV.

Na slikah 12, 13 in 14 je za primerjavo povsod prikazana DSC krivulja segrevanja RSV, kjer je zelo dobro viden oster endotermni vrh pri približno 271 °C, ki prikazuje taljenje kristalov RSV. Iz primerjave DSC krivulj segrevanja SSMES brez in z RSV je razvidno, da slednji v nobenem trdnem vzorcu, ne glede na vrsto in količino nosilca, ni prisoten v kristalni obliki, saj ni nikjer viden talilni vrh RSV. RSV je tako v SSMES prisoten bodisi v raztopljenem bodisi v trdnem amorfem stanju.

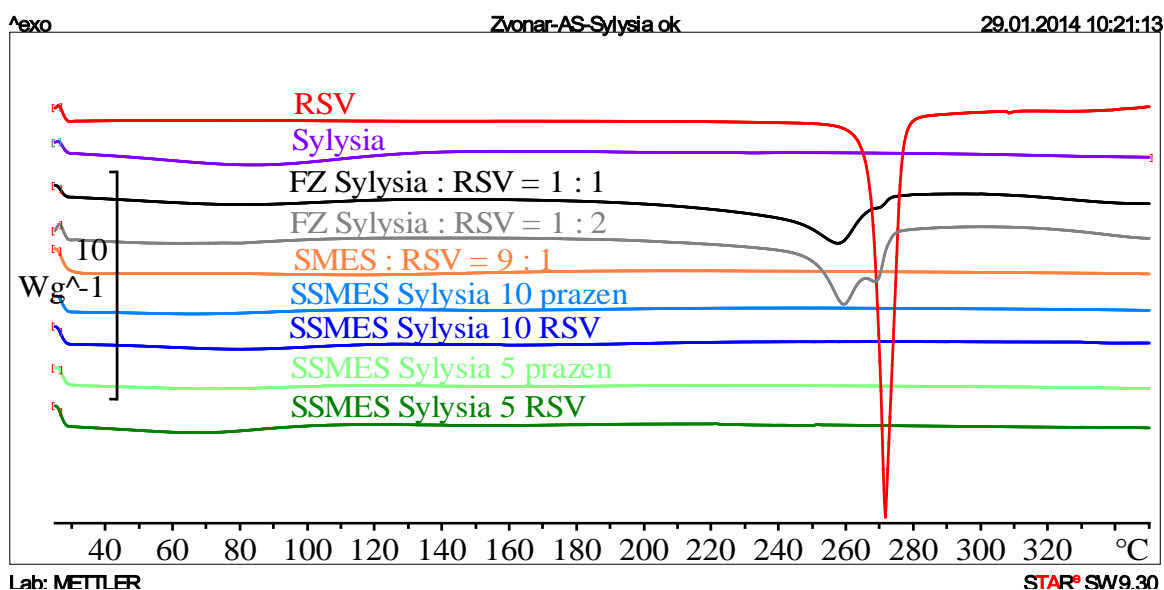


Slika 12: DSC krivulje segrevanja resveratrola (RSV), nosilca Neusilin® US2, fizikalnih zmesi (FZ) nosilca in RSV, tekočega SMES z RSV v razmerju 9 : 1 ter praznega SSMES in SSMES z RSV.





Slika 13: DSC krivulje segrevanja resveratrola (RSV), nosilca Syloid<sup>®</sup> 244FP, fizikalnih zmesi (FZ) nosilca in RSV, tekočega SMES z RSV v razmerju 9 : 1 ter praznega SSMES in SSMES z RSV.



Slika 14: DSC krivulje segrevanja resveratrola (RSV), nosilca Sylysia<sup>®</sup> 355, fizikalnih zmesi (FZ) nosilca in RSV, tekočega SMES z RSV v razmerju 9 : 1 ter praznega SSMES in SSMES z RSV.

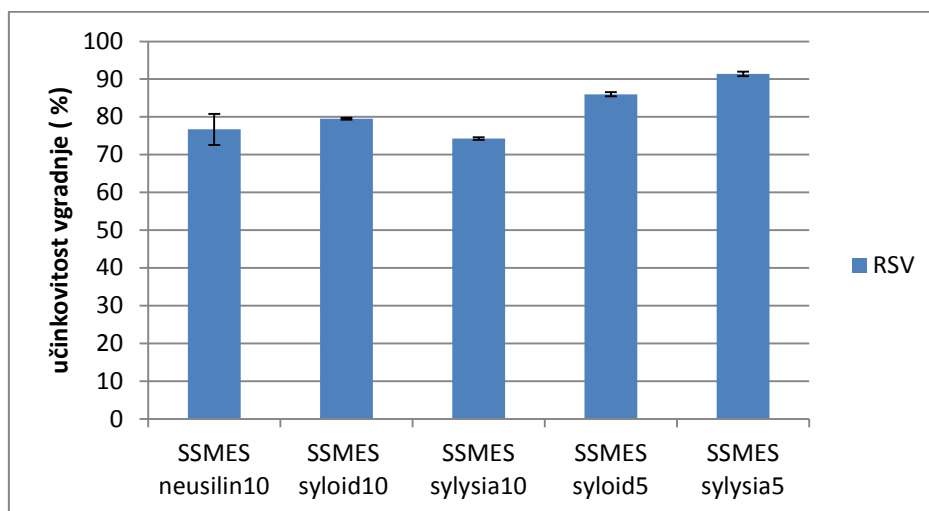
Iz DSC krivulj fizikalnih zmesi trdnega nosilca in RSV je razvidno, da slednji z nosilcem interagira, saj se v primeru Neusilina (slika 12) pojavi spremenjen, manj izražen talilni vrh RSV, ki je pomaknjen proti nižjim temperaturam. V primeru Syloida (slika 13) in Sylysie

(slika 14) pa je talilni vrh RSV razširjen oz. razcepljen in prav tako pomaknjen proti nižjim temperaturam.

Na vseh krivuljah SSMES kot tudi na krivuljah fizikalnih zmesi in samega trdnega nosilca je viden tudi zelo širok endotermni vrh med 40 in 120 °C, ki kaže na izhlapevanje vlage iz vzorcev.

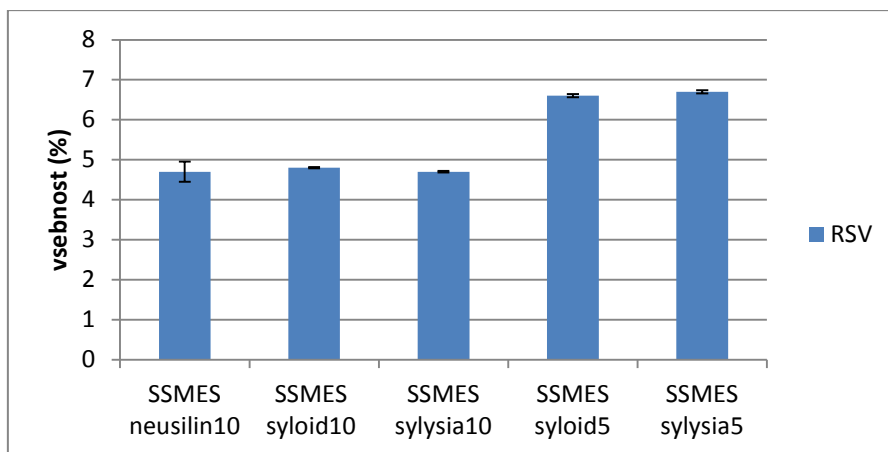
#### 4.2.7 Učinkovitost vgradnje in vsebnost resveratrola in v SSMES

Pri vseh pripravljениh formulacijah SSMES je bila učinkovitost vgradnje RSV visoka. Najvišja je bila pri *SSMES sylysia5 RSV* – 91,4 %, sledi ji *SSMES syloid5 RSV* – 86,0 %. Najnižja pa je bila pri *SSMES sylysia10 RSV* – 74,3 % (slika 15). Iz teh rezultatov lahko predpostavimo, da je takšna metoda vgrajevanja RSV učinkovita in potencialno uporabna za razvoj končnih farmacevtskih oblik.



Slika 15: Učinkovitost vgradnje resveratrola (RSV) v SSMES (v %) v odvisnosti od vrste in mase nosilca.

Po dispergiranju SSMES z RSV v mešanici metanola in vode smo s pomočjo HPLC določili vsebnost RSV v posameznih vzorcih. Po pričakovanjih imata najvišjo vsebnost RSV *SSMES sylysia5 RSV* (6,7 %) in *SSMES syloid5 RSV* (6,6 %), saj je bilo pri teh dveh vzorcih razmerje med nosilcem in SMES z RSV nižje kot pri vzorcih z večjim deležem nosilca. Vzorci SSMES z 10 g nosilca so imeli primerljivo vsebnost RSV; *SSMES neusilin10 RSV* in *SSMES sylysia10 RSV* oba 4,7% in *SSMES syloid10 RSV* 4,8 % (slika 16).

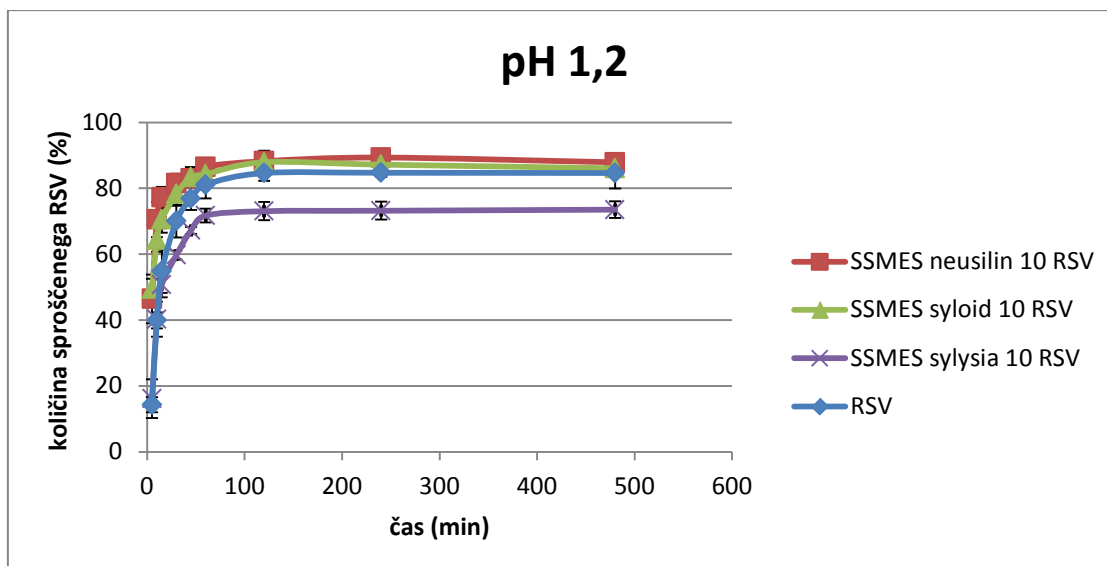


Slika 16: Povprečje vseh izmerjenih vsebnosti resveratrola (RSV)(v %) v odvisnosti od vrste in mase nosilca

#### 4.2.9 Vplivi nosilcev na profil sproščanja resveratrola iz SSMES

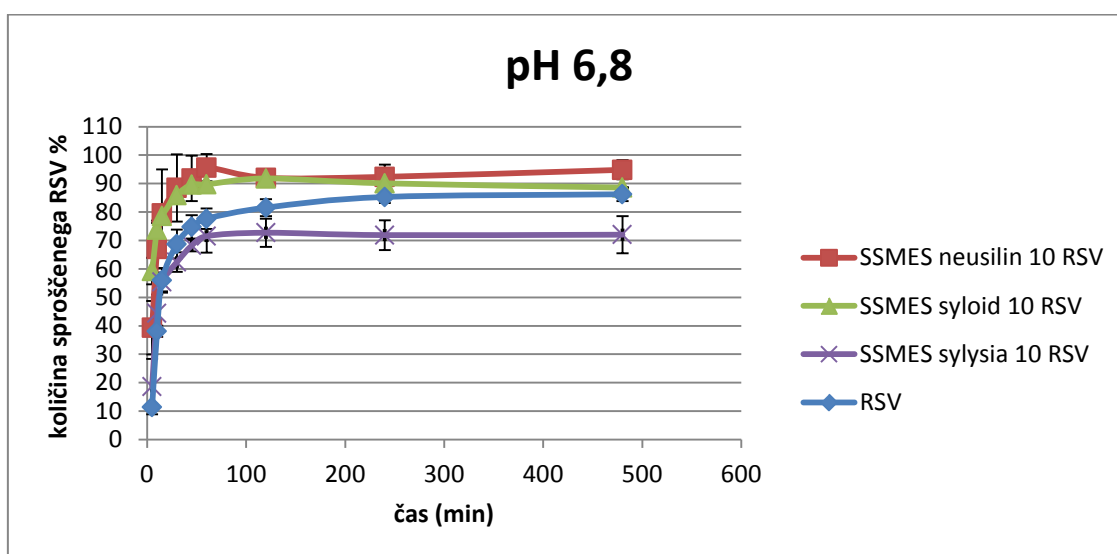
Preizkus sproščanja smo izvajali v raztopini HCl s pH 1,2 in v fosfatnem pufru s pH 6,8 pri *sink* pogojih. Rezultate smo predstavili kot odstotek sproščenega RSV (v %) v odvisnosti od časa.

Pri primerjavi trdnih samo-mikroemulgirajočih sistemov z 10 g nosilca smo ugotovili, da se pri pH 1,2 (slika 17) največ RSV sprosti iz SSMES z Neusilinom; iz slednjega se je po 240 min sproščanja sprostil 89 % vgrajene učinkovine. Iz krivulje sproščanja je razvidno, da se iz te formulacije RSV tudi najhitreje sprošča (v prvih 30 minutah se sprosti 82 % RSV). Nekoliko počasneje se RSV sprošča iz SSMES s Syloidom, iz katerega se je po 120 min sprostil 88 % učinkovine, vendar je razlika med obema sistemoma praktično zanemarljiva. Nasprotno se je iz SSMES z 10 g Sylysie sprostil le 73 % RSV; iz primerjave krivulj sproščanja je razvidno, da se je iz te formulacije RSV sproščal počasneje in v manjšem obsegu, kot se je raztapljal kristalinični RSV v obliki praška. Medtem ko sta formulaciji z Neusilinom in Syloidom v primerjavi s kristaliničnim RSV sproščanje RSV nekoliko pospešili, ga je Sylysia precej upočasnila in zadržala. To je najverjetneje posledica nepopolne desorpcije emulgatorjev iz poroznih nosilcev, kar vodi v zmanjšano solubilizacijsko kapaciteto zdravilne učinkovine. V nasprotju z našimi pričakovanji (enakost kemijske strukture Sylysie in Syloida) si profila sproščanja RSV iz *SSMES sylysia10 RSV* in *SSMES syloid10 RSV* nista podobna.



Slika 17: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz SSMES z 10 g nosilcev v HCL raztopini s pH 1,2.

Pri sproščanju v fosfatnem pufru s pH 6,8 smo ugotovili, da so tu razlike med SSMES z Neusilinom ter Syloidom in kristaliničnim RSV nekoliko bolj izrazite (slika 18). Medtem ko se iz omenjenih formulacij po 60 min sproščanja sprosti ~ 96 % (Neusilin) in ~ 90 % (Syloid) učinkovine, se v istem času raztopi ~ 78 % RSV. Tudi v tem mediju se je najpočasneje in v najmanjšem obsegu sproščal RSV iz SSMES z 10 g Sylsya; iz te formulacije se je po 120 min sprostil 73 % RSV.

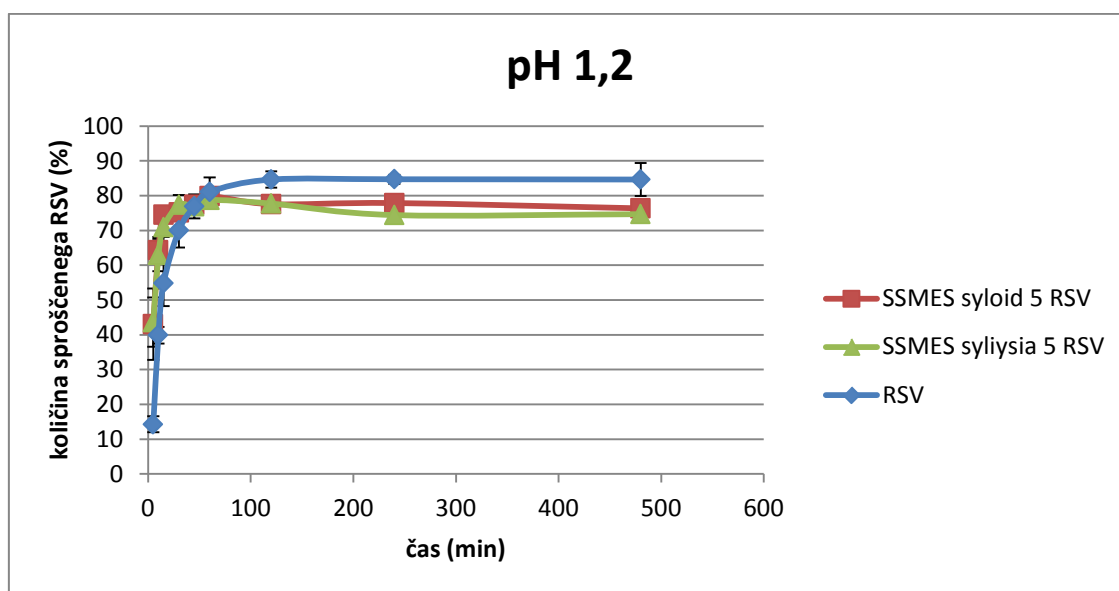


Slika 18: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz SSMES z 10 g nosilcev v fosfatnem pufru s pH 6,8.

Ugotovili smo, da se iz trdnih formulacij z Neusilinom in Syloidom RSV hitreje in v večjem obsegu sprošča v mediju s pH 6,8, medtem ko je sproščanje iz SSMES na osnovi Sylysie neodvisno od pH. Glede na obliko profila sproščanja sta SSMES z 10 g Neusilina in SSMES z 10 g Syloida primerljiva.

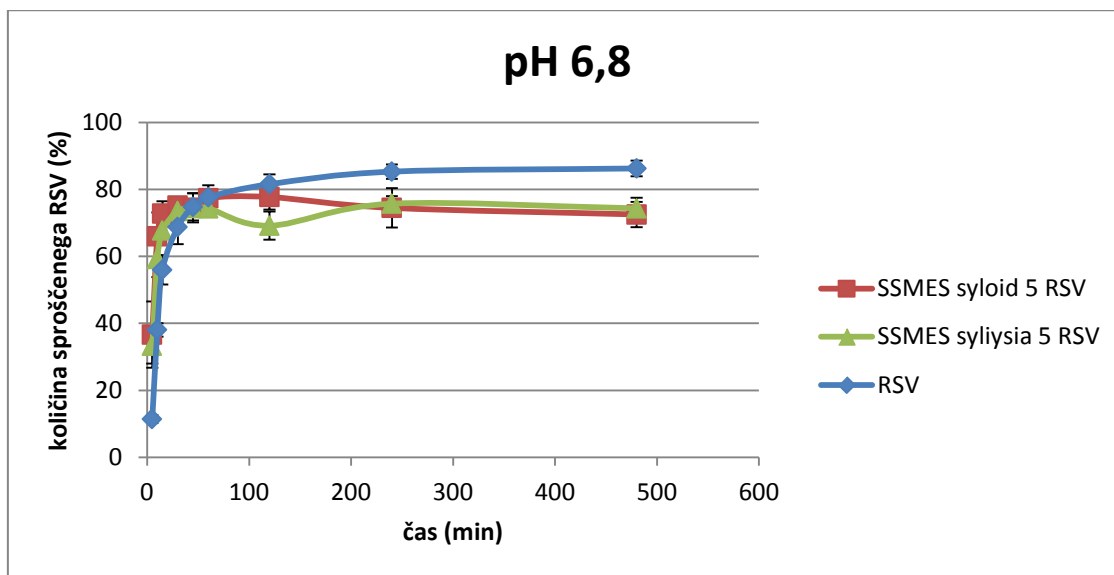
Naše ugotovitve se delno skladajo z ugotovitvami, ki so predstavljene v diplomski nalogi Eve Bizjak (47), opravljeni na Katedri za Farmacijo, FFA. Pri svojih raziskavah so sicer uporabili SSMES z drugačnim razmerjem komponent in drugačno metodo pretvorbe SMES z RSV v trdno obliko (uporabili so adsorpcijo na trdni nosilec z mešanjem v pateni). Tudi oni so ugotovili, da se sproščanje iz SSMES z Neusilinom poveča v mediju s pH 6,8; v nasprotju z nami pa sta si bila v njihovi raziskavi bolj podobna profila sproščanja iz SSMES z nosilcema Sylysia in Syloid, kar so razlagali s podobno strukturo teh dveh nosilcev.

Pri primerjanju sproščanja RSV iz SSMES s 5 g nosilcev smo ugotovili, da je sproščanje RSV iz SSMES v mediju s pH 1,2 (slika 19) v prvih 30 min hitrejše od raztapljanja kristaliničnega RSV, vendar se med testom sproščanja sprosti manj RSV. Medtem ko se po 60 min in iz *SSMES syloid5 RSV* in *SSMES sylysia5 RSV* sprosti 80 % oz. 79 % RSV, se v 240 min raztopi 85 % kristaliničnega RSV.



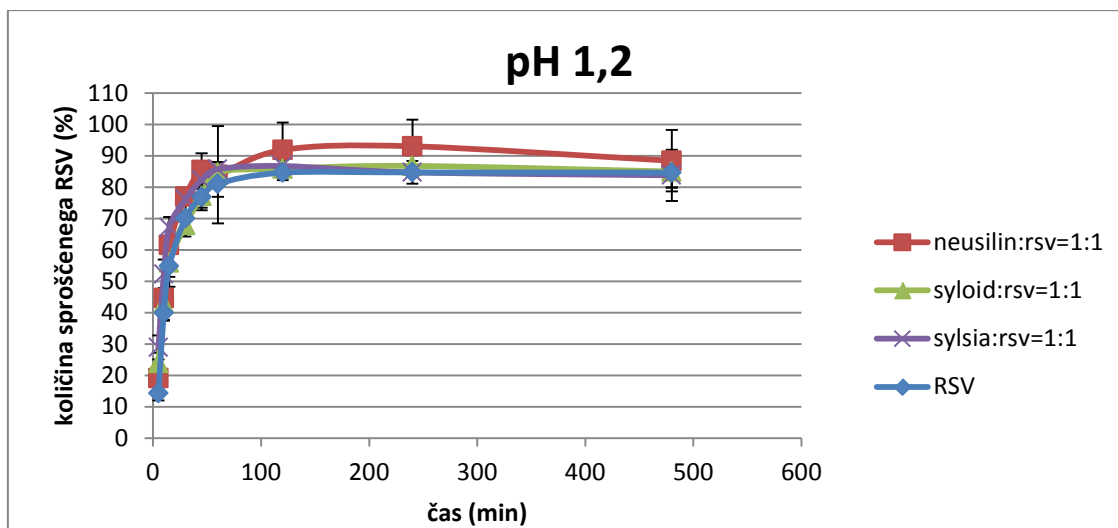
Slika 19: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz SSMES s 5 g nosilcev v raztopini HCl s pH 1,2

Če primerjamo profil sproščene RSV iz analiziranih formulacij s 5 g nosilca pri sproščanju v mediju s pH 6,8 (slika 20) in v mediju s pH 1,2, ugotovimo, da razlika med njimi ni bistvena, saj se pri pH 6,8 sprosti za samo 2–3 % manjša količina RSV kot pri pH 1,2. Padec v krivulji RSV iz *SSMES sylisia5 RSV* (120 min) pri pH 6,8 je možen zaradi napake pri vzorčenju.

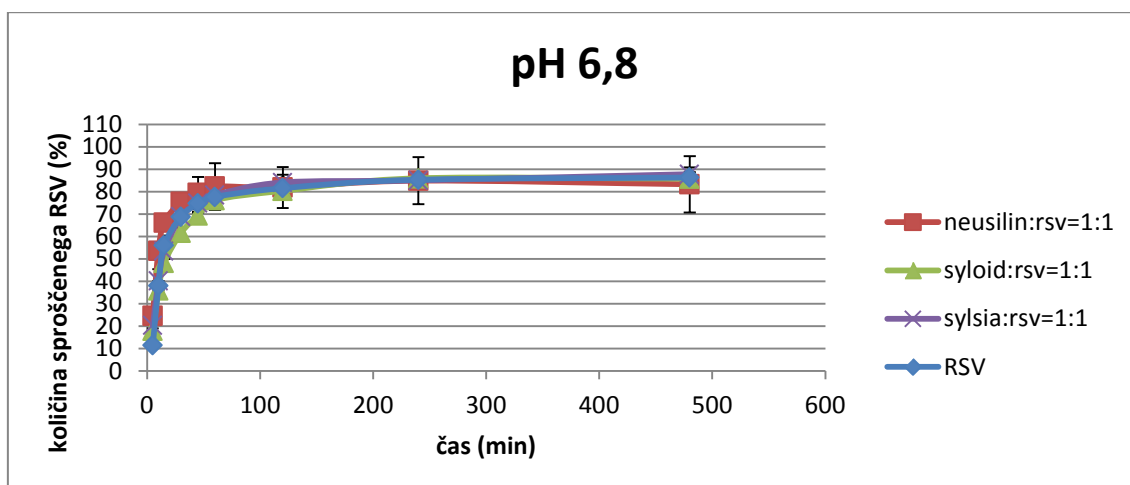


Slika 20: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz *SSMES* s 5 g nosilcev v fosfatnem pufru s pH 6,8

Analizirali smo tudi sproščanje RSV iz posameznih fizikalnih zmesi treh izbranih nosilcev in RSV v razmerju 1 : 1 (slika 21, slika 22). Profila sproščanja RSV iz zmesi RSV z Sylysio in Syloidom sta se v obeh medijih prekrivala s profilom raztapljanja kristaliničnega RSV, medtem ko se je iz zmesi RSV z Neusilinom pri pH 1,2 sprostil nekoliko več RSV (93 % RSV).



Slika 21: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz fizikalnih zmesi RSV in različnih nosilcev v raztopini HCl s pH 1,2



Slika 22: Profili sproščanja resveratrola (RSV) iz fizikalnih zmesi RSV in različnih nosilcev v fosfatnem pufri s pH 6,8

Glede na rezultate poskusa sproščanja menimo, da sta primerna nosilca za izdelavo SSMES Neusilin in Syloid. Četudi rezultati sproščanja niso potrdili želene bistvene razlike v hitrosti in obsegu sproščanja RSV iz SSMES v primerjavi s čistim kristaliničnim RSV, je vgrajevanje v SSMES kljub temu smiselno z vidika citotoksičnost RSV.

## 5. SKLEPI

Po pretvorbi tekočega SMES z ali brez zdravilne učinkovine (RSV) v trdni SSMES s sušenjem z razprševanjem smo vrednotili učinkovitost postopka pretvorbe, fizikalne lastnosti nastalih prahov in ohranitev samo-mikroemulgirajočih lastnosti SMES. Za izdelavo SSMES smo uporabili trdne porozne nosilce – Neusilin® US2, Syloid® 244FP silica in Sylysia® 350.

Ugotovili smo, da je postopek sušenja z razprševanjem primeren za izdelavo SSMES predvsem zaradi majhnih izgub vhodnih sestavin. Menimo, da bi izkoristke pri sušenju lahko še povečali z optimizacijo postopka – v našem primeru je bila zbirna posoda za trden produkt premajhna zaradi velikega volumna nosilcev, zato smo morali postopek prekinjati in menjavati posodo. Možnosti izboljšave vidimo v sušenju manjših količin tekoče disperzije ali uporabi večje aparature.

Pretočne lastnosti nastalih SSMES so bile slabe, zato bi bilo pred nadaljnjo pretvorbo v končne farmacevtske oblike, kot so tablete ali kapsule, nujno njihovo izboljšanje z dodatkom drsil in/ali izdelavo granulata.

Ohranitev samo-mikroemulgirajočih lastnosti po dispergiranju SSMES v vodnem mediju smo ocenjevali z merjenjem velikosti kapljic nastale emulzije z metodo fotonske korelacijske spektroskopije. Pri vzorcih, kjer smo lahko izmerili velikost kapljic, je nastala mikroemulzija ali emulzija (v dveh primerih), kar pomeni, da so se samo-emulgirajoče lastnosti ohranile. Pri nekaterih vzorcih meritve velikosti nastalih kapljic (mikro)emulzije niso bile zanesljive, najverjetneje zaradi preširoke porazdelitve velikosti delcev oz. prisotnosti trdnih delcev nosilca.

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) smo potrdili odsotnost kristalinične oblike RSV v SSMES. To pomeni, da je v trdnih formulacijah RSV prisoten v raztopljenem ali amorfnem stanju. To je tudi eden od ciljev vgradnje RSV v SMES, saj na tak način izboljšamo raztapljanje ZU.

Največjo vsebnost RSV (cca 6,6 %) smo določili v SSMES, pri katerih smo za izdelavo uporabili nižje razmerje med nosilcem (Syloid in Sylysia) in SMES z RSV. Učinkovitost vgradnje ZU je bila zelo visoka pri vseh izdelanih SSMES, in sicer 74–91 %, kar govori v prid nadaljnjim raziskavam za razvoj končnih trdnih FO.



S testom sproščanja RSV iz SSMEs smo potrdili, da je sproščanje RSV iz *SSMEs neusilin10* in *SSMEs syloid10* nekoliko hitreje od hitrosti raztapljanja kristaliničnega RSV pri *sink* pogojih in da je količina sproščene RSV rahlo večja. Pri pH 6,8 je sproščanje iz teh dveh formulacij hitreje in v večjem obsegu kot pri pH 1,2.

Med sproščanjem RSV iz trdnih formulacij s SMES in raztapljanjem kristaliničnega RSV pri *sink* pogojih ni bilo statistično značilne razlike. Dobljen rezultat je nekoliko v nasprotju z našimi pričakovanji, saj so pri *non-sink* pogojih ugotovili značilne razlike (1). Vgradnja RSV v SSMEs je kljub temu smiselna, saj s tem povečamo obseg raztapljanja RSV v vodni fazi in zmanjšamo njegovo citotoksičnost (1).

RSV smo uspešno vgradili v SMES, ki smo ga nato pretvorili v trdno stanje z metodo sušenja z razprševanjem. V prihodnjih raziskavah pa bi se bilo smiselno osredotočiti na interakcije med SMES in RSV s posameznimi nosilci, kar bi nam omogočilo izbiro optimalnih nosilcev in dodatnih pomožnih snovi, ki bi omogočale izdelavo končnih trdnih farmacevtskih oblik, kot so tablete ali kapsule.

## 6. LITERATURA

1. Bolko Seljak K, Berginc K, Trontelj J, Zvonar A, Kristl A, Gašperlin M: A Self-microemulsifying drug delivery system to overcome intestinal resveratrol toxicity and presystemic metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 103(11): 3491–3500
2. Alam M A, Al-Jenoobi F I, Al-mohizea A M: Commercially bioavailable proprietary technologies and their marketed products. *Drug Discovery Today* 2013; 18(19/20): 936–949
3. Kalepu S, Manthina M, Padavala V: Oral lipid-based drug delivery systems. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2013; 3(6): 361–372
4. Mرسny R J: Oral Drug Delivery Research in Europe. *Journal of Controlled Release* 2012; 161(2): 247–253
5. Amidon G L, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR: A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12(3): 413–20
6. Elektronski vir:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Biopharmaceutics\\_Classification\\_System](http://en.wikipedia.org/wiki/Biopharmaceutics_Classification_System) (10. 9. 2014)
7. Elektronski vir:  
<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm> (10. 9. 2014)
8. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farmaceutski vestnik* 2008; 59(5): 263–8
9. Dhillon B, Goyal N K, Malviya R, Sharma P K: Poorly water soluble drugs: Change in solubility for improved dissolution characteristics - a review. *Global Journal of Pharmacology* 2014; 8(1): 26–35
10. Pouton C: Formulation of poorly water soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 29: 278–287

11. Čerpnjak K, Zvonar A, Gašperlin M, Vrečer F: Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharm.* 2013; 63: 427–445
12. Pouton C, Porter C JH: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods, strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 427–445
13. Porter C JH, Pouton C, Cuine J F, Charman W N: Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60(6): 673–691
14. Khan B A, Bakhsh S, Khan H, Mahmood T, Rasul A: Basics of Self Micro Emulsifying Drug Delivery System 2013; 1: 13–20
15. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar R K: Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability 2010; 15(21/22): 958–965
16. Gursoy R N, Benita S: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58(3): 173–182
17. Chavda V P: Are SMEDDs and SNEDDs same? A gimmick or pharmaceutically relevant. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences* 2012; 1: 7–10
18. Pouton C: Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25(1): 47–58
19. Tang B, Cheng G, Gu JC, Xu CH: Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today* 2008; 13(13/14): 606–612
20. Tan A, Rao S, Prestidge CA: Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: an overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. *Pharm. Res.* 2013; 30(12): 2993–3017
21. Katteboina S, Chandrasekhar V S R, Balaji. S: Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 4(4): 240–253
22. Zvonar A, Gašperlin M: Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farmaceutski vestnik* 2011; 62(3): 131–138
23. Cal K, Sollohub K: Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(2): 575–586

24. Elektronski vir:  
[http://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/Set\\_3\\_Training\\_Papers\\_Spray\\_Drying\\_en\\_01.pdf](http://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/Set_3_Training_Papers_Spray_Drying_en_01.pdf) (20. 9. 2014)
25. Wu CF, Yang JY, Wang F, Wang XX: Resveratrol: botanic origin, pharmacological activity and applications. Chinese Journal of Natural Medicines 2013; 11(1): 0001–0015
26. Davidov-Pardo G, McClements D J: Resveratrol encapsulation: design delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. Trends in Food Science & Technology 2014; 38(2): 1–16
27. Amri A, Chaumeil J C, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? Journal of Controlled Release 2012; 158: 182–193
28. Elektronski vir:  
[https://www.chromadex.com/wpresources/Upload/Article/pTeroPure\\_Resveratrol\\_Brochure.pdf](https://www.chromadex.com/wpresources/Upload/Article/pTeroPure_Resveratrol_Brochure.pdf) (12. 6. 2014)
29. Pandita D, Kumar S, Poonia N, Lather N: Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. Food Research International 2014; 62: 1165–1174
30. Elektronski vir:  
<http://www.abiteccorp.com/product-lines/capmul> (3. 1. 2014)
31. Elektronski vir:  
<http://www.indcheminternational.com/products.htm> (8. 1. 2014)
32. Prajapati H N, Dalrymple D M, Serajuddin A TM: A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development. Pharm. Res. 2012; 29: 285–305
33. Elektronski vir: [http://en.wikipedia.org/wiki/Kolliphor\\_EL](http://en.wikipedia.org/wiki/Kolliphor_EL) (8. 1. 2014)
34. Elektronski vir:  
[http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/EMP%20030711e\\_Cremophor%20EL.pdf](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/EMP%20030711e_Cremophor%20EL.pdf) (8. 1. 2014)

35. Elektronski vir:  
<http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/FinRep-FAD-2010-0126-PEG-Castro.doc.pdf> (8. 1. 2014)
36. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th ed., Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association, London 2009; 126–127, 542–549.
37. Elektronski vir:  
[http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03\\_030713e\\_Cremophor%20RH%2040.pdf](http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_030713e_Cremophor%20RH%2040.pdf) (8. 1. 2014)
38. Elektronski vir:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Castor\\_oil](http://en.wikipedia.org/wiki/Castor_oil) (23. 1. 2014)
39. Elektronski vir:  
[http://www.neusilin.com/multicms/neusilin/pdf/news/29/2\\_neusilin\\_newsletter\\_nov07.pdf](http://www.neusilin.com/multicms/neusilin/pdf/news/29/2_neusilin_newsletter_nov07.pdf) (6. 5. 2014)
40. Elektronski vir:  
<http://www.neusilin.com/> (6. 5. 2014)
41. Elektronski vir:  
[https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Syloid/M309a\\_Syloid\\_Tech\\_Note\\_EUver\\_LR.pdf](https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Syloid/M309a_Syloid_Tech_Note_EUver_LR.pdf) (9. 7. 2014)
42. [https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Syloid/M298\\_Syloid244FPSilica\\_TechInfo.pdf](https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Syloid/M298_Syloid244FPSilica_TechInfo.pdf) (30. 5. 14)
43. Elektronski vir:  
<http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Tech-Data-Sheet-SYLYSIA-350.pdf> (7. 6. 2014)
44. Elektronski vir:  
[http://www.bergmanlabora.se/Portals/0/MathinicModules/MathinicProducts/Files/B-290\\_Spraytork\\_EN.pdf](http://www.bergmanlabora.se/Portals/0/MathinicModules/MathinicProducts/Files/B-290_Spraytork_EN.pdf) (8. 6. 2014)
45. Elektronski vir:  
<http://physics.nyu.edu/grierlab/manuals/ZetasizerNanoUserManual.pdf> (21. 5. 2014)
46. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. Farmacevtski vestnik 2001; 52: 173–185

47. Bizjak E: Problematika stiskanja tekočih samo(mikro)emulgirajočih sistemov v tablete. Diplomska naloga 2013, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
48. Isailović D. B, Kostić T. I, Zvonar A, Đorđević B. V, Gašperlin M, Nedović A. V, Bugarski M. B: Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2013; 19: 181–189
49. Teskač K, Kristl J: The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 390(1): 61–69