

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



KAJA ZUPANČIČ BIBER

VPLIV STRUKTURE TEKOČIH KRISTALOV ZA DERMALNO UPORABO NA
SPROŠČANJE ASKORBILPALMITATA

STRUCTURE IMPACT OF LIQUID CRYSTALS FOR DERMAL USE ON THE
RELEASE OF ASCORBYL PALMITATE

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm. in somentorstvom dr. Mirjam Gosence, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag.farm

in

somentorici dr. Mirjam Gosenca, mag. farm

za njune komentarje in napotke.

Izjava

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

Kaja Zupančič Biber

Diplomska komisija:

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

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

Somentorica: asist. dr. Mirjam Gosenca, mag.farm.

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

KAZALO

KAZALO.....	I
POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA SEVANJA NA KOŽO	1
1.2 ZAŠČITA KOŽE PRED ULTRAVIJOLIČNIM SEVANJEM	1
1.3 ASKORBILPALMITAT	3
1.4 TEKOČI KRISTALI	6
1.5 IN VITRO SISTEM ZA VREDNOTENJE SPROŠČANJA UČINKOVINE IZ (TRANS)DERMALNE FARMACEVTSKE OBLIKE	10
1.6 MODELIRANJE IN PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA	11
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Učinkovina	16
3.1.2 Sestavine tekočih kristalov	16
3.1.3 Ostale kemikalije	18
3.2 METODE	20
3.2.1 Izdelava tekočih kristalov	20
3.2.2 Optimizacija temperature shranjevanja vzorcev z vgrajenim askorbilpalmitatom	20
3.2.3 Določanje strukture tekočih kristalov	21
3.2.4 Določanje vsebnosti askorbilpalmitata v tekočih kristalih.....	22
3.2.5 Priprava in izbira receptorskega medija	22
3.2.6 Določanje nasičene topnosti askorbilpalmitata v izbranih receptorskih medijih	23
3.2.7 In vitro sproščanje askorbilpalmitata iz tekočih kristalov	23
3.2.8 HPLC metoda	24
3.2.9 Modeliranje in primerjava profilov sproščanja	25
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1 IZDELAVA TEKOČIH KRISTALOV	27
4.2 OPTIMIZACIJA TEMPERATURE SHRANJEVANJA VZORCEV Z VGRAJENIM ASKORBILPALMITATOM	27

4.3 DOLOČANJE STRUKTURE TEKOČIH KRISTALOV	28
4.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI ASKORBILPALMITATA V TEKOČIH KRISTALIH	31
4.5 IN VITRO SPROŠČANJE ASKORBILPALMITATA	32
4.6 MODELIRANJE IN PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA	40
5. SKLEP	44
6. LITERATURA	46
7. PRILOGE.....	52

POVZETEK

Študije *in vitro* sproščanja so pomemben element tako faze razvoja farmacevtske oblike (FO) kot kontrole kakovosti. Glede na priporočila FDA se v fazi razvoja (trans)dermalnih FO v namene *in vitro* sproščanja še vedno uporabljajo Franz-ove difuzijske celice. Tekoči kristali (TK) so kot novejši dostavni sistem razviti za številne aplikacije, kot so: dermalna, transdermalna, oralna, nazalna in rektalna. Pred klasičnimi FO imajo številne prednosti, kot so: povečana solubilizacija in možnost vgrajevanja tako lipofilnih kot hidrofilnih učinkovin, kemijska stabilnost vgrajenih učinkovin, pospešena absorpcija ter nadzorovano sproščanje. Namen diplomske naloge je bil vrednotenje *in vitro* sproščanja askorbilpalmitata (AP) iz lamelarnih TK za dermalno uporabo z ugotavljanjem kinetike sproščanja. Pri sproščanju nas je zanimal vpliv strukture TK z vidika različnega deleža lipofilnih sestavin in vode. Sestavine TK so bile lecitin/Tween[®] 80 (v razmerju 1:1)/izopropilmiristat/voda.

Osmim sistemom TK smo s polarizacijskim mikroskopom določili strukturo in potrdili prisotnost lamelarne ali heksagonalne faze. V primeru lamelarnih TK smo ugotovili, da z naraščanjem deleža vode v TK število malteških križev pada, kar nakazuje na manj izrazito lamelarno strukturo, dodatek AP v TK pa ne poruši lamelarne strukture, ampak povzroči upad dobro definiranih malteških križev.

Za *In vitro* vrednotenje sproščanja AP smo uporabili Franz-ove difuzijske celice z acetat celulozno membrano in 0,9 % NaCl + 50 % etanol kot receptorski medij (RM). Rezultati nakazujejo, da naraščanje masnega deleža vode v TK vpliva tako na hitrost kot tudi obseg sproščanja AP iz TK. Natančneje, iz sistemov z večjim deležem vode se je sproščanje AP upočasnilo, kar pripisujemo višjim viskoznostim TK in večjim interlamelarnim razdaljam. Nadalje, AP se je načeloma hitreje in v večjem obsegu sproščal iz lamelarnih TK v primerjavi s TK heksagonalne strukture, saj notranja prostorska ureditev oziroma drsenje vzporednih lamel olajša difuzijo AP.

S primerjavo profilov sproščanja z od modela neodvisnimi in odvisnimi metodami smo dokazali, da so vsi profili dejansko podobni med seboj z razliko v obsegu sproščanja do 10 %. Z računanjem ujemanja eksperimentalnih rezultatov sproščanja z matematičnimi modeli pa smo ugotovili, da se sproščanje AP najbolj približa kinetiki Korsmeyer-Peppas ali kinetiki 1. reda.

Z diplomskim delom potrjujemo, da delež vode v TK vpliva na sproščanje AP in da lamelarna struktura TK zagotavlja podaljšano sproščanje in podaljšano antioksidativno zaščito kože AP. In čeprav *in vitro* študije ne odražajo povsem realnega stanja *in vivo*, so pomemben del razvoja lamelarnih TK kot potencialnih dermalnih dostavnih sistemov za AP.

Ključne besede: askorbilpalmitat, lamelarni tekoči kristali, polarizacijska mikroskopija, sproščanje, modeliranje in primerjava profilov sproščanja.

SEZNAM OKRAJŠAV

AP	askorbilpalmitat
AUC	površina pod krivuljo (<i>ang. Area under curve</i>)
BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem (<i>ang. Biopharmaceutics Classification System</i>)
BHA	butil hidroksi anizol
BHT	butil hidroksi toluen
EMA	evropska agencija za zdravila (<i>ang. European Medicines Agency</i>)
FDA	ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
FO	farmacevtska oblika
FT	farmacevtska tehnologija
GRAS	splošno prepoznano kot varno (<i>ang. Generally recognized as safe</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>ang. High performance liquid chromatography</i>)
IPM	izopropilmiristat
ME	mikroemulzija
m/m	masni odstotek
OR	osnovna raztopina
O/V	olje v vodi
PAS	površinsko aktivna snov
R [·]	radikal
ROS	reaktivne kisikove spojine (<i>ang. Reactive oxygen species</i>)
SDS	natrijev lavrilsulfat (<i>ang. Sodium laurilsulfate</i>)
SLN	trdni lipidni nanodelci (<i>ang. Solid lipid nanoparticles</i>)
SOD	superoksid dismutaza
TK	tekoči kristali
UV	ultravijolično
UVA, UVB	ultravijolični žarki A in B
V/O	voda v olju
v/v	volumski odstotek
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (<i>ang. World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1 VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA SEVANJA NA KOŽO

Izpostavljenost UV sevanju povzroča nastajanje radikalov (R[•]) v koži, ki povzročajo akutne spremembe kože, vidne kot rdečina, oteklina, mehurji, opekline ter tanjšanje kože, ali pa kronične spremembe, ki vodijo do prezgodnjega staranja kože (gube, temne lise, izguba elastičnosti in vlažnosti, elastoza) zlasti v predelu zgornjih okončin, vratu in obraza. Najhujša posledica delovanja R[•] je kožni rak. Za kožo sta škodljiva UVA (320-400 nm) in UVB (280-320 nm) sevanje, pri čemer UVA predstavlja več kot 90 % celotnega sevanja ter je konstantno skozi celo leto, izpostavljenost UVB sevanju pa je najvišja poleti. UVB žarki se pretežno absorbirajo v povrhnjico, zato povzročajo bolj površinske spremembe kože kot so porjavitev, rdečina, opekline, gube in nenazadnje tudi kožni rak. UVA žarki se absorbirajo globlje v kožo vse do usnjice, a so v primerjavi z UVB manj kancerogeni in vpleteni predvsem v proces staranja kože, medtem ko UVB pospešujejo omenjeni proces. Na molekularnem nivoju nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS) privede do poškodb DNA, proteinov in lipidov. DNA poškodbe zajemajo tvorbo dimerov, oksidacijo nukleinskih kislin ter proliferacijo mutiranih celic. Poškodovana DNA je iniciator imunosupresije, kar ob kopičenju mutiranih celic predstavlja povečano tveganje za kožnega raka. Oksidacija proteinov vodi v premreženje z denaturacijo in izgubo funkcionalnosti. Lipidna peroksidacija membran celic lahko spremeni gibljivost lipidov v membrani s posledično spremenjeno prepustnostjo membrane za telesu tuje snovi. Vendar pa ima UV sevanje za kožo tudi koristne učinke, saj že kratkotrajna izpostavljenost (5-15 min) stimulira sintezo vitamin D v koži, fototerapija z UVA in UVB žarki pa ima, kljub neželenim učinkom pozitivne učinke pri zdravljenju kožnih bolezni, kot so luskavica, atopični dermatitis in vitiligo (1-5).

1.2 ZAŠČITA KOŽE PRED ULTRAVIJOLIČNIM SEVANJEM

Človeško telo se pred oksidativnim stresom, to je neravnovesjem med antioksidanti (AO) in oksidanti v korist slednjih, ki ga povzročajo ROS, brani z encimski in neencimski AO, katerih kapaciteta je omejena, kar vodi v nezadostno zaščito pri pretiranem izpostavljanju UV sevanju. V takem primeru je potrebno kožo zaščititi z AO eksogenega izvora.

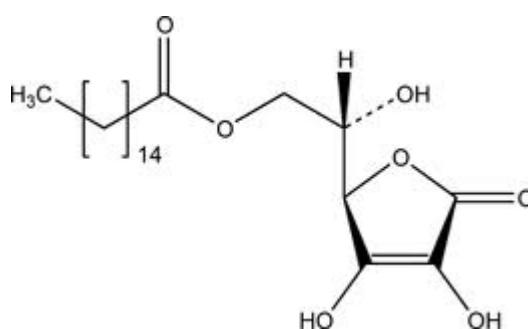
V okviru endogene zaščite kože *protein p53* odstranjuje poškodovano DNA z reparacijo DNA ali apoptozo (smrt celice), s čimer se prepreči prenos mutacij na hčerinske celice, ki bi lahko vodile v transformacijo celic in kancerogenezo. Encimski AO pretežno delujejo intracelularno. *Glutation peroksidaza* ob prisotnosti glutationa odstranjuje vodikov peroksid in lipidne hidroperoksidge s pretvorbo v vodo, nato pa *glutation reduktaza* nastali glutacion disulfid reducira v glutacion. *Superoxid dismutaza* pretvori superoksidni anion v vodikov peroksid in kisik, *katalaza* pa nato le-tega pretvori nazaj v vodo in kisik. Aktivnost encimskih AO je višja v povrhnjici kot v usnjici, pri čemer je aktivnost katalaze še posebej visoka. Enako velja za neencimske AO, ki delujejo ekstra/intracelularno, med katere spadajo hidrofilni *vitamin C*, lipofilni *α -tokoferol*, *koencim Q*, *β -karoten* ter *glutation*. Vitamina C in E (*α -tokoferol*) ter koencim Q delujejo kot lovilci R[•], saj s cepitvijo OH vezi in z nastankom stabilnejšega fenolnega R[•] pretvorijo manj stabilne R[•] v stabilnejšo molekulo ter ustavijo verižno reakcijo. *β -karoten* deluje kot lovilec predvsem singletnega kisika in zmanjša njegovo reaktivnost. Takojšnja zaščita povrhnjice temelji na melaninu, ki deluje kot AO, delno absorbira UV sevanje, zato imajo ljudje temnejše polti manjše tveganje za razvoj kožnega raka.

Uporaba zaščitnih krem pred soncem še vedno velja za zlati standard zaščite pred škodljivimi učinki UV sevanja, vendar se pomanjkljivosti kažejo v prepuščanju UV sevanja določenih valovnih dolžin, v pretvorbi sestavin zaščitnih krem pred soncem v R[•] pod vplivom UV sevanja in posledično v neželenih učinkih. Zato je potrebno UV zaščito nadgraditi z eksogenimi AO, ki jih najpogosteje zaužijemo s hrano in v obliki peroralnih farmacevtskih oblik (FO) kot prehranska dopolnila. Kot eksogene AO lahko uporabimo fiziološko prisotne AO, torej vitamin C in E (*α -tokoferol*), *β -karoten* ter koencim Q ali pa AO rastlinskega izvora (polifenoli in flavonoidi), ki so močnejši AO, saj imajo poleg antioksidativnih lastnosti tudi zmožnost absorpcije UVB sevanja ob dermalnem nanosu. Polifenoli in flavonoidi v kombinaciji imajo dokazano sinergistično delovanje, ki zagotavlja učinkovitejšo UV zaščito v primerjavi s samostojnim delovanjem. Narejena je bila raziskava na zdravih prostovoljcih, ki so 3 mesece peroralno v obliki 250 mg odmerka prejeli kombinacijo polifenolnih ekstraktov rožmarina in flavonoidnih ekstraktov agrumov. Ugotovljeno je bilo, da dolgotrajno jemanje polifenolov in flavonoidov zagotavlja boljše UV zaščito kot dnevna uporaba zaščitnih krem pred soncem, saj je bilo že po 2 mesecih zaznati višji minimalni eritemski odmerek (minimalni odmerek UV žarkov za nastanek eritema na koži), ki je bil po 3 mesecih najvišji, kar kaže na vzdrževano

UV zaščito skozi daljše časovno obdobje (2). Peroralna uporaba vitamina C se je izkazala za nezadostno pri dopolnjevanju koncentracij vitamina C v koži, zaradi fiziološko prisotnih mehanizmov, ki omejujejo njegovo biološko uporabnost. Tako na primer visoki peroralni odmerki (1 g) vitamina C vodijo v zmanjšano absorpcijo in povečano eliminacijo iz telesa, poleg tega vitamin C zaradi ionskega značaja težje prehaja v/skozi kožo, zato je boljši kandidat za dermalno uporabo amfilen derivat askorbilpalmitat (AP) (podrobneje opisan v poglavju 1.3), ki ima prosto vinilogno OH skupino in deluje kot lovilec R[•] (1-6).

1.3 ASKORBILPALMITAT

AP je bel prašek brez vonja. Je derivat vitamina C, in sicer lipofilen ester askorbinske kisline s palmitinsko kislino z molekulsko formulo C₂₂H₃₈O₇, molekulsko maso 414,54 g/mol in temperaturo tališča med 107 °C in 117 °C. Pridobivamo ga ali s kemijsko ali encimsko sintezo. Pri kemijski sintezi poteče kislinsko katalizirana (žveplova kislina) esterifikacija askorbinske kisline s palmitinsko kislino. Encimska sinteza pa poteče ob prisotnosti biokatalizatorja lipaze. AP je amfilna molekula s hidrofilno glavo (askorbinska kislina) in lipofilnim repom (palmitinska kislina) (slika 1). Lahko topen je v organskih topilih (metanol, etanol) in skoraj netopen v vodi. Po biofarmacevtski klasifikaciji (BCS) ga uvrščamo v razred II spojin z nizko topnostjo in visoko permeabilnostjo (7-11).



Slika 1: Strukturna formula askorbilpalmitata.

Varnost

Ima GRAS status (splošno prepoznano kot varno), zato se uporablja kot aditiv v prehrani z namenom upočasnitve in omejitve procesa oksidacije lipidov. Dovoljen dnevni vnos AP je 1,25 mg/kg telesne mase. Predklinična študija na živalih (kuncih) je pokazala, da 10 % raztopina AP po 24-urnem nanosu na kožo ne povzroča draženja kože. Enako potrjuje tudi klinična študija na 26 preiskovancih, pri katerih niso zaznali preobčutljivostne reakcije po petkratnem, dva dni trajajočem nanosu 0,2 % AP vgrajenega v kremo za oči (7), (12-13).

Uporaba v farmaciji

AP se zaradi svojega antioksidativnega delovanja najpogosteje uporablja v dermalnih, peroralnih in rektalnih FO. V nižjih koncentracijah (0,05 do 0,1 %) se uporablja kot pomožna snov za zaščito lipofilnih sestavin formulacije pred oksidacijo, medtem ko v višjih koncentracijah (1 do 2 %) v vlogi učinkovine ščiti kožo pred oksidativnimi spremembami in posledično staranjem kože (7), (14-16).

Stabilnost

Vitamina C velja za izredno reaktiven AO, saj se hitro oksidira pod vplivom svetlobe ali kovinskih ionov, v sledih prisotnih v FO. AP je po strukturi ester in je v primerjavi z vitamin C kemijsko bolj stabilen (16-18). Kristl in sodelavci (14) so proučevali stabilnost AP, vgrajenega v različne nosilne sisteme, in sicer mikroemulzije (ME), liposome in trdne lipidne nanodelce (SLN). Ugotovili so, da je kemijska stabilnost AP odvisna tako od sestave dostavnega sistema kot amfifilnega značaja AP. Pomembna je namreč lokacija nestabilnega dela AP v formulaciji. Hidrofilni del (obroč) je občutljiv na oksidacijo in v kolikor je manj izpostavljen hidrofilnemu okolju, se zmanjša njegova reaktivnost. Nadalje so ugotovili, da delež lipidov v dostavnem sistemu vpliva na stabilnost AP, ki je bila višja v SLN kot liposomih. Čeprav so ME vsebovale najvišji delež lipidov, se niso izkazale za ustrezen sistem zaradi tekoče faze lipidov, ki omogoča olajšano prehajanje AP v hidrofilno fazo. Tako je bila dokazana največja stabilnost za AP vgrajen v trdno lipidno jedro SLN (25 % nerazgrajenega AP v 4. tednu). Stabilnost AP v liposomih in ME je bila manjša, saj je bil delež nerazgrajenega AP 7 % ter 19 % (V/O) in 13 % (O/V). Dolgoročna stabilnost AP v omenjenih dostavnih sistemih pa še vedno ni ustrezna. Poznavanje ključnih faktorjev, ki vplivajo na stabilnost, omogoča optimizacijo dostavnih sistemov in s tem rešitev problema nestabilnosti. Dodatek strukturno podobnega ko-antioksidanta TDBO (4-(trideciloksil)benzaldehyd oksim) se je izkazal za obetaven pristop povečanja stabilnosti

AP (18). TDBO, ki se zaradi amfifilne narave prav tako nahaja na medfazi, je značilno povečal stabilnost AP v O/V ME, najverjetneje zaradi vezave kovinskih ionov in/ali lovljenja radikalov, saj je bil delež nerazgrajenega AP po 84. dnevu 41,5 % (8-9).

Učinkovitost

Z esterifikacijo na mestu 6 ohranimo antioksidativno delovanje AP, ki temelji na prosti vinilogni OH skupini, s cepitvijo OH vezi in z nastankom askorbatnega R[•] ter posledično pretvorbo reaktivnejših R[•] v stabilno molekulo. Stabilnost askorbatnega R[•] je odraz delokalizacije nesparjenega elektrona v π -sistemu. Tovrsten R[•] je premalo reaktiven in verižna reakcija se ustavi. Antioksidativno delovanje AP je primerljivo z vitaminom C, kot ester pa lažje prehaja v/skozi kožo v primerjavi z negativno nabitim hidrofilnim vitaminom C (13), (19-20).

AP je v rastlinskih oljih s polinenasičenimi maščobnimi kislinami že v majhnih količinah (200 ppm) učinkovitejši pri upočasnitvi in omejitvi oksidacije in posledičnem podaljšanju njihovega roka uporabe v primerjavi z drugimi sintetičnimi AO (BHA-butil hidroksi anizol, BHT-butil hidroksi toluen). Nadalje, v kombinaciji z α -tokoferolom in AO rastlinskih ekstraktov (origano, majaron, timijan, rožmarin) v rastlinskih oljih deluje sinergistično pri oksidativni zaščiti α -tokoferola in nenasičenih maščobnih kislin, poleg tega zaradi večje občutljivosti hitreje reagira z R[•] kot pa α -tokoferol in AO rastlinskih ekstraktov. Zaradi sinergističnega delovanja tako lahko zmanjšamo vsebnost rastlinskih AO (na 250 ppm) v rastlinskih oljih, ki je v nasprotnem primeru precej višja za doseganje primerljivega antioksidativnega delovanja (2000 ppm) (21-22).

Dermalna uporaba AP zmanjša nastajanje R[•] v koži. Učinkovitost antioksidativnega delovanja AP je odvisna tako od njegove koncentracije kot lastnosti FO, kar so proučevali v primeru ME tipa O/V in V/O na prašičji koži, predhodno izpostavljeni UV sevanju. Učinkovitost AP so posredno vrednotili preko padca koncentracije R[•] v koži in pri tem dokazali vpliv tipa ME ter koncentracije AP. UV zaščita kože je bila učinkovitejša v primeru ME tipa O/V, ker se je sproščeni AP pretežno zadržal v zgornjih plasteh rožene plasti in povrhnjice, ki so najbolj izpostavljene UV sevanju, poleg tega je AP hitreje prehajal skozi hidratirano roženo plast, k čemur je pripomogla zunanja vodna faza. Z naraščanjem koncentracije AP je naraščala tudi UV zaščita, medtem ko je v nižjih koncentracijah AP deloval prooksidativno zaradi fiziološke prisotnosti kovinskih ionov v koži. Čas zadrževanja na koži ni značilno vplival na delovanje AP (23).

1.4 TEKOČI KRISTALI

Klasične FO (tablete, kapsule in raztopine) še vedno prevladujejo med dostavnimi sistemi za dostavo AO po peroralni poti. Glavna ovira peroralnega uživanja AO je nizka biološka uporabnost, ki je posledica neustreznih fizikalno kemijskih lastnosti AO (nizka topnost, permeabilnot, nestabilnost), ki vplivajo tudi na neustrezno absorpcijo, porazdelitev, eliminacijo in biotransformacijo. AO v višjih odmerkih (1 g) lahko vodijo v zmanjšano absorpcijo in povečano eliminacijo z izgubami ter zmanjšano učinkovitostjo delovanja. Poleg tega so AO izpostavljeni metabolizmu z gastrointestinalnimi in jetrnimi encimi, kar zmanjša delež nerazgrajenega AO za nadaljnjo sistemsko delovanje. Zato je šel razvoj novejših dostavnih sistemov z AO v smer dermalnih/transdermalnih FO, ki omogočajo neposreden nanos na mesto delovanja. Tekoči kristali (TK) spadajo med novejšje dermalne/transdermalne dostavne sisteme, katerih prednost je zlasti povečana solubilizacija in možnost vgrajevanja tako lipofilnih kot hidrofilnih učinkovin, kemijska stabilnost vgrajenih učinkovin, pospešena absorpcija ter nadzorovano sproščanje. Uporabljajo se tudi za oralno, nazalno in rektalno aplikacijo (3), (6), (24-25).

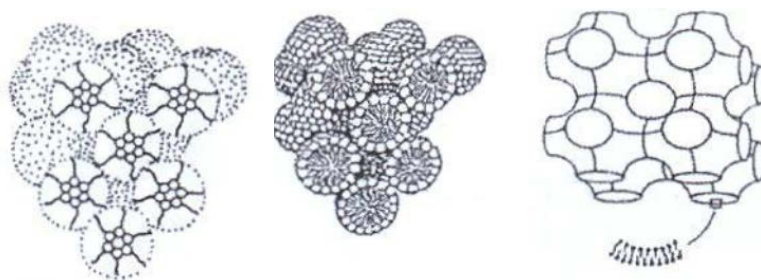
TK so vmesno stanje med tekočim in trdnim. Imajo lastnosti tekočin (tok) kot tudi kristalov (mehanska stabilnost, pozicijska in orientacijska urejenost, anizotropnost, dvolomnost). Obstajajo v različnih strukturah, prehod med strukturami pa poteka v določenem zaporedju in pod ustreznimi pogoji. Poznamo termotropne in liotropne TK. Prvi nastanejo s segrevanjem trdne snovi, slednji pa z raztapljanjem trdne snovi v topilu. Razlika med omenjenima vrstama TK je tudi v minimalnem številu komponent, potrebnih za tvorjenje strukture TK: pri termotropnih zadostuje ena, medtem ko sta pri liotropnih potrebni vsaj dve (24), (26-29).

Liotropni TK

Površinsko aktivne snovi (PAS) kot amfifilne molekule tvorijo asociacijske strukture v vodni ali oljni fazi. V raztopini tvorijo agregate različnih oblik, ki se urejajo v specifične strukture glede na naraščajočo koncentracijo. V primeru nizke koncentracije PAS, nad kritično micelarno koncentracijo, govorimo o izotropni raztopini micelov, z naraščanjem koncentracije pa se tvorijo liotropni TK, ki izkazujejo optično anizotropijo. Oblika molekule PAS, narava topila (lipofilnost/hidrofilnost) ter koncentracija PAS in topila napovedujejo določeno strukturo TK (24), (26), (28-29).

Strukture liotropnih TK*a) Kubične strukture*

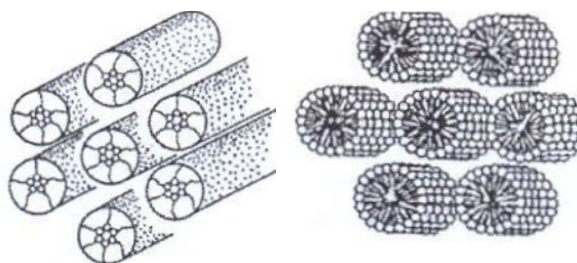
Miceli sferične ali paličaste oblike tvorijo kubično rešetko, ki izkazuje pozicijsko urejenost na dolge razdalje v treh dimenzijah. Zaradi svoje izotropnosti tovrstne strukture ne moremo zaznati s polarizacijskim mikroskopom, ker v nasprotju z ostalimi ne izkazujejo dvolomnosti, imajo pa značilno izrazito visoko viskoznost, ki je posledica tridimenzionalne strukture. Sferični miceli tvorijo kubično strukturo tipa I oziroma tipa IV v primeru reverzних micelov, paličasti miceli pa tvorijo kubično strukturo tipa II oziroma tipa III (slika 2) (24), (26), (28-29).



Slika 2: Kubične strukture; tip IV (levo), tip I (sredina), tip II (desno).

b) Heksagonalne strukture

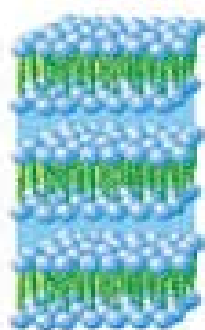
Miceli stožčaste oblike so paličasto zloženi v heksagonalno, kadar je topilo polarno oziroma inverzno heksagonalno strukturo, kadar je topilo nepolarno. Tovrstna struktura (slika 3) izkazuje pozicijsko urejenost na dolge razdalje v dveh dimenzijah in se tvori v koncentracijskem območju 30-50 % PAS v raztopini. Viskoznost je v primerjavi z micelarno raztopino mnogo večja. Zaradi anizotropnosti heksagonalno strukturo lahko zaznamo s polarizacijskim mikroskopom (24), (29).



Slika 3: Reverzna heksagonalna struktura (levo), heksagonalna struktura (desno).

c) *Lamelarne strukture*

PAS v obliki valja se urejajo v lamelarne strukture (slika 4), za katere je običajno značilen dvoplastni ponavljajoči se vzorec in pozicijska urejenost na dolge razdalje v eni dimenziji. Dvoplastni sloji so paralelno urejeni. Plasti drsijo druga ob drugi, gibanje pa je omejeno s posamezno ravnino. Gravitacija ne vpliva na razdaljo med plastmi, zato je ta konstantna. Znotraj lamelarne strukture se voda nahaja med polarnimi ionskimi glavami amfifilnih molekul, nepolarne verige niso v stiku z vodo. Glede na to, kako se molekule lamelarne strukture urejajo, jih delimo na tri podvrste. *Tekoče lamelarne faze* (L_{α}), za katere je značilno, da je gibanje znotraj plasti zaradi gibljivih lipofilnih verig neomejeno in tako veljajo za najmanj urejene. *Lamelarne gel faze* (L_{β}) imajo lipofilne verige delno urejene, poleg tega se lahko nahajajo v trans konfiguraciji. *Lamelarne kristalinične faze* (L_c) imajo lipofilne verige »zamrznjene« v rešetko in veljajo za najbolj urejeno fazo. Lamelarne strukture imajo v primerjavi s heksagonalnimi značilno nižjo viskoznost ter nastanejo v širšem koncentracijskem in temperaturnem območju. So optično aktivni, zaradi česar jih proučujemo s polarizacijskim mikroskopom (24), (28-29).

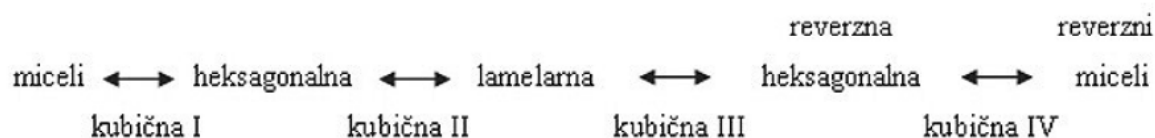


Slika 4: *Lamelarna struktura.*

Fazni prehodi liotropnih TK

Fazni prehodi med strukturami so odvisni od temperature in koncentracije PAS/topila (slika 5). Tako se lahko v isti raztopini pojavijo vse faze. Prehajanje med strukturami poteka v obe smeri, odvisno od lipofilnih/hidrofilnih lastnosti topila, tako da nastane najbolj stabilna struktura z doseženim minimumom proste energije. Ob prisotnosti nizkih koncentracij PAS v raztopini nastajajo miceli, z naraščanjem koncentracije pa se tvorijo TK različnih struktur - lamelarne, heksagonalne ter kubične. Lamelarne strukture nastanejo

iz molekul v obliki valja, ki se izmenično urejajo v plasti. Z naraščanjem deleža vode gre fazni prehod v smeri kubičnih struktur, katere prehajajo v heksagonalne, in nenazadnje se tvorijo miceli. Razlaga za tovrstni fazni prehod je v vezavi molekul vode na polarne glave PAS in s posledičnim vključevanjem proste vode med lamelarne plasti, zaradi česar se poveča njihova debelina. Z naraščanjem deleža polarnega topila se molekule topila vključujejo med molekule PAS in s tem spremenijo njihovo obliko v stožčasto, kar vodi v nastanka heksagonalnih struktur. V primeru lipofilnega topila se oblika PAS spremeni v obrnjen stožec in tvori se reverzna heksagonalna struktura. Struktura sprejme le določeno količino topila, zato se oblika molekule z nadaljnjo solvatacijo spremeni in tvorijo se kubične strukture tipa I oziroma tipa IV. Sile, ki se pojavijo v liotropnih TK, so elektrostatske in disperzijske. Disperzijske sile so med nepolarnimi molekulami in so šibkejšje od elektrostatskih. Slednje so vez med ioni ali dipoli (ion-ion, dipol-dipol, ion-dipol). Visoka temperatura lahko razbije vezi in zgodi se fazni prehod iz ene strukture v drugo (24), (26), (28).



Slika 5: Fazni prehodi liotropnih TK.

Lamelarni tekoči kristali kot ustrezen dostavni sistem za dermalno uporabo AP

Pri razvoju TK je eden izmed ključnih dejavnikov, ki vpliva na njihovo nadaljnjo uporabo, biološka sprejemljivost. Pomembno je, da že v fazi razvoja upoštevamo iritacijski potencial posameznih sestavin TK. Netoksičnost, biorazgradljivost ter biokompatibilnost so lastnosti, ki jih morajo imeti sestavine TK. V skladu z navedenimi kriteriji so se za ustrezne gradnike izkazali neionske (Tween in višji maščobni alkoholi), amfifilne (lecitin) PAS ter izopropilmiristat (IPM). V kombinaciji lecitin-Tween-IPM je lecitin ključna sestavina, ki tvori lamelarno strukturo, saj je po strukturi amfifilna molekula z dvema nepolarnima verigama in polarno glavo. Kombinacija dveh delov z nasprotno polarizacijo pa definira lastnosti lecitina (15), (30-32).

Gosenca in sodelavci so naredili raziskavo, s katero so vrednotili *in vitro* citotoksičnost lamelarnih TK na celični liniji keratinocitov. Citotoksičnost so spremljali preko vpliva TK na celično proliferacijo. Testirali so TK, zgrajene iz lecitina, Tween-a[®] 80, IPM in vode v

različnih koncentracijah in ugotavljali razlike v proliferaciji keratinocitov. Ugotovljeno je bilo, da proučevani lamelarni TK veljajo za potencialno netoksični dermalni dostavni sistem, saj je bila proliferacija keratinocitov značilno višja od proliferacije keratinocitov po izpostavljenosti SDS raztopini, ki se uporablja kot pozitivna kontrola pri vrednotenju draženja kože (15).

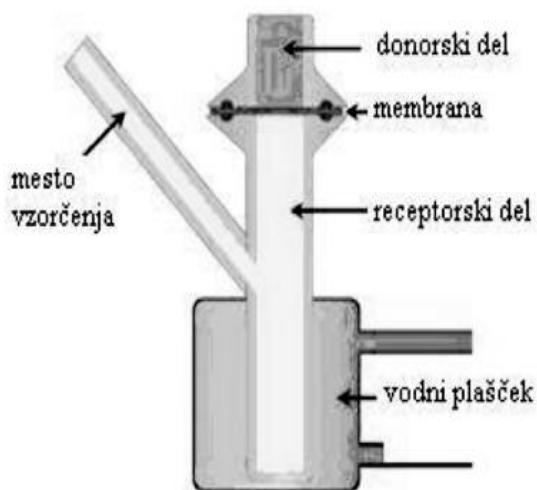
Lamelarni TK so primerni za dermalno uporabo tako zaradi svoje fizikalne stabilnosti, konsistence, hidratantnih lastnosti kot strukturne podobnosti z medceličnimi lipidi povrhnjice. Zlasti slednja lastnost omogoča podaljšano sproščanje tako zelo vodotopnih kot v vodi netopnih učinkovin z boljšo dermalno absorpcijo. Poleg tega z uporabo neionskih PAS v lamelarnih TK dosežemo reverzibilen porast prepustnosti rožene plasti, brez ireverzibilnega draženja kože. Dobra penetracija učinkovin je posledica zelo nizke medfazne površinske napetosti, kar vodi v olajšano difuzijo učinkovin v kožo. Prednost lamelarne strukture za dermalno uporabo je tudi v tem, da se ta ob nanosu pri temperaturi na površini kože tudi ohrani (15), (25).

1.5 IN VITRO SISTEM ZA VREDNOTENJE SPROŠČANJA UČINKOVINE IZ (TRANS)DERMALNE FARMACEVTSKE OBLIKE

Študije *in vitro* sproščanja se v industriji uporabljajo v fazi razvoja FO, za ugotavljanje potencialnih razlik med različnimi FO ali zdravili različnih proizvajalcev ter za kontrolo kakovosti različnih serij. Pogosto je *in vitro* test sproščanja bolj občutljiv za ugotavljanje razlik v sproščanju kot *in vivo*. Z vidika zagotavljanja kakovosti je občutljivejša metoda prvi izbor, saj njeni rezultati lahko nakazujejo na razlike v kakovosti produkta še preden bi prišlo do *in vivo* učinka. V fazi razvoja FO se za eksperimentalno ugotavljanje kinetike sproščanja učinkovine skozi membrano, glede na priporočila FDA, še vedno uporabljajo Franz-ove difuzijske celice (33-34).

Franz-ova difuzijska celica (slika 6) je razdeljena na donorski in receptorski del, med katerima je vstavljena membrana, ki je lahko naravna ali umetna. Donorski del vsebuje učinkovino, vgrajeno v formulacijo ali raztopljeno v ustreznemu mediju, receptorski del pa je napolnjen z receptorskim medijem (RM). Puffer s pH=7,4 se lahko uporabi kot RM v primeru testiranja dermalne absorpcije, ker ustreza fiziološkemu pH. Sicer pa je pri izboru RM pomembno, da je učinkovina v njem ustrezno topna in da medij ne poškoduje membrane. Temperatura na površini kože je 32 °C, zato vzdržujemo RM na tej

temperaturi. Učinkovina se sprošča iz formulacije skozi membrano v RM. V naprej določenih časovnih intervalih iz receptorskega dela jemljemo vzorce, ki jim z analiznimi metodami kvantitativno določimo vsebnost učinkovine. Rezultat je kumulativna količina sproščene učinkovine v določenem časovnem intervalu (35-36).



Slika 6: Sestavni deli Franz-ove difuzijske celice (levo) in v diplomskem delu uporabljena Franz-ova difuzijska celica (desno).

Za *in vitro* testiranje je pomembno, da izberemo ustrezno membrano. Membrane delimo na naravne (človeška koža ali koža kač, podgan, miši, zajcev in prašičev) in umetne (filtrske, polimerne membrane ter membrane prevlečene z lipidno mešanico). Sproščanje skozi naravne membrane posnema prehod učinkovine v/skozi kožo, zato se tovrstne membrane uporabljajo za vrednotenje dermalne absorpcije. Umetne membrane uporabljamo za proučevanje vpliva FO na sproščanje učinkovine (35-37).

1.6 MODELIRANJE IN PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA

Pri razvoju FO je pomembno, da ima učinkovina ustrezen profil sproščanja. Zato eksperimentalne rezultate, dobljene z *in vitro* sproščanjem, kvantitativno analiziramo s pomočjo različnih matematičnih modelov, s katerimi želimo napovedati kinetiko sproščanja učinkovine iz FO, še preden je ta dokončno razvita. Matematični modeli pretvorijo krivuljo sproščanja v časovno odvisno funkcijo (količina sproščene učinkovine na časovno enoto). S poznavanjem kinetike sproščanja učinkovine lahko napovemo *in vivo* biološko učinkovitost zdravila, kar je pomembno pri optimizaciji FO s prirejenim

sproščanjem. V primeru neustrezne kinetike lahko pride do neustrezne koncentracije učinkovine v plazmi, kar lahko vodi v pojav neželenih učinkov. Kinetika je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine (velikost delcev, topnost, polimorfna/kristalinična struktura, količina vgrajene učinkovine v FO) in lastnosti FO (oblaganje, ogrodje, sestava FO). Literatura navaja številne matematične modele za proučevanje kinetike sproščanja učinkovine, vendar se zaradi najboljše korelacije med odvisno in neodvisno spremenljivko *in vitro* sproščanja najpogosteje uporabljajo spodaj opisani modeli (38-41):

0. red

Sproščanje učinkovine iz FO je neodvisno od koncentracije sproščene učinkovine v raztopini, hitrost sproščanja pa je konstantna in tako časovno neodvisna. Koncentracija učinkovine v plazmi je bolj konstantna kot pri kinetiki 1. reda, pri slednjem je hitrost sproščanja na začetku večja. Pri FO s podaljšanim sproščanjem (dermalne/transdermalne oblike, depo vsadki, ogrodne tablete s slabo topnimi učinkovinami) je zaželeno, da imajo profil kinetike 0. reda. Sicer pa velja, da se po kinetiki 0. reda sproščajo učinkovine iz tistih FO, ki ne razpadajo oziroma njihova površina ostaja enaka, prav tako sproščanje ne doseže ravnotežnega stanja. Matematični model za kinetiko 0. reda je linearna funkcija, kjer je kumulativni delež sproščene učinkovine odvisna, čas pa neodvisna spremenljivka (38-42).

$$F = k_0 * t$$

Enačba 1: Kinetika 0. reda

F delež sproščene učinkovine ob času t

k_0 hitrostna konstanta 0. reda

t čas

1. red

Sproščanje učinkovine iz FO je odvisno od njene koncentracije, hitrost sproščanja pa se s časom spreminja. Ker je ta največja na začetku, je posledično tudi koncentracija učinkovine v mediju visoka. S časom se sproščanje upočasni in koncentracija učinkovine v mediju pade, lahko celo pod mejo terapevtske učinkovitosti. Takšen profil sproščanja imajo FO z zadržanim sproščanjem oziroma formulacije, ki vsebujejo vodotopne učinkovine v poroznem ogrodju. Matematični model za kinetiko 1. reda je linearna funkcija, kjer je ln kumulativnega deleža nesproščene učinkovine odvisna, čas pa neodvisna spremenljivka (38-42).

$$\ln(100-F) = -k_1 * t$$

Enačba 2: Kinetika 1. reda

F delež sproščene učinkovine ob času t

k_1 hitrostna konstanta 1. reda

t čas

Higuchijev model

Higuchijev model je bil sprva zasnovan za planarne sisteme, vendar se je izkazalo, da je primeren tudi za opis poroznih ali drugače geometrijsko zasnovanih sistemov.

Model temelji na sledečih predpostavkah:

- začetna koncentracija učinkovine v ogrodju je višja od njene topnosti v ogrodju;
- difuzija učinkovine poteka v eni dimenziji;
- velikost delcev učinkovine je manjša od debeline sistema;
- nabrekanje in raztapljanje ogrodja je zanemarljivo;
- difuzivnost učinkovine je konstanta;
- sproščanje učinkovine poteka v sink pogojih.

Sproščanje učinkovine poteka z difuzijo, ki temelji na Fickovem zakonu. Model upošteva, da je raztapljanje učinkovine hitrejše kot sama difuzija. Takšen profil sproščanja je zaželen pri poltrdnih in trdnih FO, ki imajo vgrajene v vodi dobro topne ali slabo topne učinkovine, kot na primer transdermalni sistemi in ogrodne tablete s hidrofilnimi učinkovinami. Matematični model za Higuchi-jevo kinetiko je linearna funkcija, kjer je kumulativni delež sproščene učinkovine odvisna, kvadratni koren časa pa neodvisna spremenljivka (38-42).

$$F = k_H * t^{1/2}$$

Enačba 3: Higuchijeva kinetika

F delež sproščene učinkovine ob času t

k_H Higuchijeva hitrostna konstanta

t čas

Korsmeyer-Peppasov model

Korsmeyer-Peppasov profil sproščanja je značilen za FO s polimeri, kjer obstaja možnost, da sproščanje poteka po različnih mehanizmih, glede na vrednost eksponenta n v enačbi 4. Za cilindrične tablete, kjer je $n = 0,5$, velja sproščanje z difuzijo (t.i. Fickovo sproščanje). V primeru, da je n med 0,5 in 1,0, velja difuzijsko sproščanje z anomalijo (t.i. ne-Fickovo sproščanje). Kadar je vrednost $n > 1,0$, govorimo o t.i. Super case II transportu. Matematični model za Korsmeyer-Peppasovo kinetiko je eksponentna funkcija, ki jo pretvorimo v linearno funkcijo in velja, da je \ln kumulativnega deleža sproščene učinkovine odvisna, \ln časa pa neodvisna spremenljivka (38-39), (41-42).

$$F = k_{KP} * t^n \rightarrow \ln F = \ln k_{KP} + n \ln t$$

Enačba 4: Korsmeyer-Peppasova kinetika

F delež sproščene učinkovine ob času t

k_{KP} Korsmeyer-Peppasova hitrostna konstanta

t čas

n eksponent

Hixon-Crowellov model

Hixon-Crowellov model velja za FO, kot so na primer tablete, kjer raztapljanje FO poteka po planarno vzporednih plasteh, kar pomeni, da se dimenzija FO zmanjšuje sorazmerno, medtem ko je oblika konstantna. To pomeni, da je hitrost sproščanja učinkovine odvisna od hitrosti raztapljanja njenih delcev in ne od difuzije. Matematični model za Hixon-Crowellovo kinetiko je linearna funkcija, kjer je tretji koren kumulativnega deleža nesproščene učinkovine odvisna, čas pa neodvisna spremenljivka (38-39), (41-42).

$$(100-F)^{1/3} = Q_0^{1/3} - k_{HC} * t$$

Enačba 5: Kinetika po Hixon Crowell

F delež sproščene učinkovine ob času t

Q_0 delež učinkovine v FO ob času 0

k_{HC} Hixon-Crowellova hitrostna konstanta

t čas

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ovrednotiti *in vitro* sproščanje AP iz lamelarnih TK za dermalno uporabo z ugotavljanjem kinetike sproščanja. TK z vgrajenim AP (1 % (m/m)) so bili predhodno razviti na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Pri sproščanju se bomo osredotočili na vpliv strukture TK z vidika različnega deleža lipofilnih sestavin in vode z namenom določiti optimalno sestavo za sproščanje AP v največjem obsegu.

Najprej bomo glede na določeno nasičeno topnost AP izbrali ustrezen receptorski medij ter za izbran sistem TK optimizirali pogoje sproščanja s prilagajanjem časovnih intervalov vzorčenja in temperature vodne kopeli. *In vitro* sproščanje bo potekalo s Franzovimi difuzijskimi celicami v vodni kopeli s temperaturo 32 °C, kar ustreza temperaturi na površini kože ter z umetno acetat celulozno membrano v vlogi bariere sproščanja. V nadaljevanju bomo izvedli *in vitro* sproščanje iz osmih sistemov TK, katerih strukturo bomo predhodno ovrednotili s polarizacijskim mikroskopom.

Končni rezultat *in vitro* sproščanja bo osem profilov sproščanja AP, na podlagi katerih bomo izračunali ujemanje eksperimentalnih rezultatov *in vitro* sproščanja s petimi najpogosteje uporabljenimi matematičnimi modeli za napovedovanje kinetike sproščanja AP iz TK.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

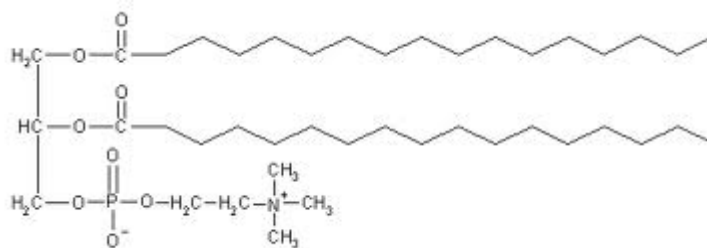
3.1.1 Učinkovina

Askorbilpalmitat (askorbilpalmitat, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Nemčija)
Opisan v poglavju 1.3.

3.1.2 Sestavine tekočih kristalov

Lipoid S-100® (Lipoid GmbH, Nemčija) je prečiščena vrsta sojinega lecitina, ki vsebuje vsaj 94 % fosfatidilholina, poleg fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitola, maščobnih kislin in trigliceridov. Sestava lecitina je odvisna od njegovega izvora in stopnje čistote. Fosfatidilholin je po strukturi amfifilna molekula (slika 7). Lecitin se nahaja v poltrdni obliki ali kot prašek, odvisno od deleža prostih maščobnih kislin. Običajno je rumene barve, ki na zraku zaradi oksidacije barvo spremeni v rjavo. Topen je v mineralnih oljih, v vodi ali polarnih topilih pa je skoraj netopen. Lecitin je sestavina celične membrane in je tako biokompatibilen ter biorazgradljiv. Varen je za peroralno in dermalno uporabo, prav tako niso dokazali povezave z genotoksičnostjo ali reproduktivno toksičnostjo, zato se uporablja v farmaciji, kozmetiki in živilski industriji. V FO, kot so i.v./i.m. injekcije, parenteralna/enteralna prehranska dopolnila, kreme in mazila, ima vlogo emolienta, emulgatorja, solubilizatorja ali stabilizatorja. V svečke za rektalno uporabo se dodaja za zmanjšanje krhkosti pripravka. (7), (15), (31), (43-45).

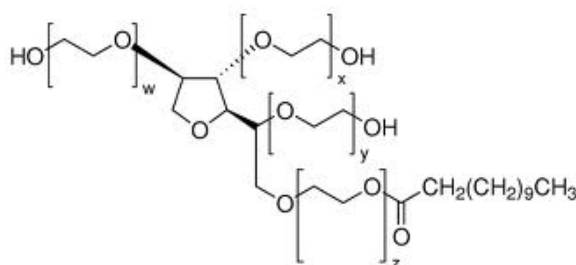
V TK molekule lecitina tvorijo lamelarno fazo.



Slika 7: Strukturna formula fosfatidilholina.

Tween[®] 80 (SIGMA-ALDRICH, Francija) je ester oleinske kisline s cikličnim derivatom sorbitola, ki je kondenziran z 20 etilen oksid enotami. Hidrofobni del molekule predstavlja alifatska veriga, hidrofilni del pa etilen oksidne enote (slika 8). Je rumena viskozna tekočina brez vonja in okusa. Dobro je topen v vodi, etanolu in netopen v maščobnih oljih. Zaradi ugodne cene, relativno nizke toksičnosti in biokompatibilnosti se v široki meri uporablja v farmaciji in kozmetiki kot emulgator, solubilizator ter močljivec. Je sestavina peroralnih, dermalnih in parenteralnih FO (15), (32), (46-48).

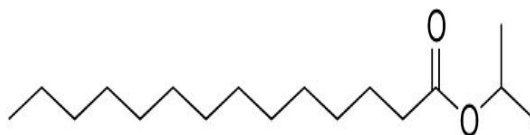
V TK molekule Tween[®] 80 skupaj z molekulami lecitina tvorijo lamelarno fazo.



Slika 8: Strukturna formula Tweena[®] 80.

IPM, izopropilmiristat (SIGMA-ALDRICH, Francija) je ester izopropanola in miristinske kisline (slika 9). Je tekočina z nizko viskoznostjo, brez vonja in barve. Topen je v številnih nepolarnih organskih topilih (acetone, kloroform, olje), v vodi pa je praktično netopen. Je neobčutljiv na oksidacijo ali hidrolizo. Pridobiva se ga sintezno s postopkom esterifikacije ali pa naravno z encimsko esterifikacijo pri nizki temperaturi. Ker je inerten, netoksičen, biorazgradljiv in ne draži človeške ali živalske kože, se uporablja v kozmetiki in farmaciji. Vgrajujemo ga v emulzije, mikroemulzije in kreme, deodorante, parfume in šampone. V farmaciji ima vlogo emolienta, topila ter pospeševalca penetracije učinkovin skozi kožo (7), (15), (47).

V TK ima vlogo oljne faze in topila za AP.



Slika 9: Strukturna formula izopropilmiristata.

Bidestilirana voda Pridobljena na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo.

V TK ima vlogo hidrofilne faze in omogoča nastanek TK zaradi strukturiranja hidratiranih PAS.

3.1.3 Ostale kemikalije

- a) CH_3OH ; metanol za HPLC (Merck KGaA, Nemčija)
sestavina mobilne faze in topilo za redčenje vzorcev pred injiciranjem na HPLC
- b) CH_3CN ; acetonitril (Panreac Quimica S.A.U, Španija)
sestavina mobilne faze ter raztopine za redčenje vzorcev pred injiciranjem na HPLC
- c) aparatura za bidestilirano vodo; Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, sestavina topila za redčenje vzorcev pred injiciranjem na HPLC
- d) KH_2PO_4 ; kalijev dihidrogenfosfat (Merck KGaA, Nemčija)
sestavina fosfatnega pufra
- e) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, natrijev dihidrogenfosfat (Merck KGaA, Nemčija)
sestavina fosfatnega pufra
- f) H_3PO_4 ; orto-fosforjeva (V) kislina 85 % (Merck KGaA, Nemčija)
sredstvo za umerjanje pH fosfatnega pufra
- g) $NaOH$; natrijev hidroksid (pridobljen na Katedri za farmacevtsko tehnologijo (FT))
sredstvo za umerjanje pH fosfatnega pufra
- h) Brij[®] 98 (SIGMA-ALDRICH Co., USA)
sestavina receptorskega medija
- i) $NaCl$; natrijev klorid (Merck KGaA, Nemčija)
sestavina receptorskega medija
- j) Span[®] 80 (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
sestavina receptorskega medija

- k) $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$; natrijev tiosulfat pentahidrat (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemčija) sestavina receptorskega medija
- l) *Tween*[®] 40 (Merck Schuchardt OHG, Nemčija) sestavina receptorskega medija
- m) $C_{12}H_{25}NaO_4S$; natrijev dodecil sulfat (Merck KGaA, Nemčija) sestavina receptorskega medija
- n) $C_{17}H_{34}O_2$; izopopilmiristat (SIGMA-ALDRICH, Francija) sestavina receptorskega medija
- o) *Kolliphor*[®] EL (BASF SE, Nemčija) sestavina receptorskega medija
- p) *TRANSCUTOL P* (GATTEFOSSE SAS, Francija) sestavina receptorskega medija
- q) CH_3CH_2OH ; etanol 96 % (v/v) (PHARMACHEM SUŠNIK JOŽEF, Slovenija) sestavina receptorskega medija

3.2 METODE

3.2.1 Izdelava tekočih kristalov

V eksperimentalni del diplomske naloge smo vključili osem sistemov TK znane sestave, ki so jo razvili na katedri za FT. Sestava posameznih sistemov TK je navedena v preglednici I. Za izdelavo TK smo v erlenmajerico z obrusom na analitski tehtnici (AG245, Mettler Toledo, Švica) natehtali predpisane količine lecitina, Tweena[®] 80 in IPM. Zmes smo v zaprti erlenmajerici mešali pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu približno 24 ur do nastanka rumene homogene zmesi. V primeru vzorcev z vgrajenim AP (1 % (m/m)) smo le-tega s plastičnim priborom dodali v pripravljeno homogeno zmes, jo zaščitili pred svetlobo ter pustili mešati nekaj ur, dokler se AP ni popolnoma raztopil. Na koncu smo dodali predpisano količino bidestilirane vode, katero smo predhodno prepihali z argonom, in pustili mešati do nastanka TK (viskozna transparentna snov blede rumene barve). Pripravljene TK smo zaradi boljše stabilnosti shranjevali v hladilniku.

Preglednica I: Sestava posameznih sistemov TK.

Sistem TK	Lecitin (m/m) %	Tween [®] 80 (m/m) %	IPM (m/m) %	bidestilirana voda (m/m) %
1	28,0	28,0	24,4	20,0
2	26,2	26,2	22,8	25,0
3	24,5	24,5	21,3	30,0
4	22,7	22,7	20,0	35,0
5	21,0	21,0	18,3	40,0
6	19,2	19,2	16,7	45,0
7	17,5	17,5	15,2	50,0
8	15,7	15,7	13,7	55,0

3.2.2 Optimizacija temperature shranjevanja vzorcev z vgrajenim askorbilpalmitatom

Osnovno raztopino (OR) AP s točno določeno koncentracijo smo razdelili na tri enake dele v erlenmajerice z obrusom, tesno zaprli in zavili v aluminijasto folijo. Vzorce smo hranili čez noč na treh različnih mestih: v hladilniku (8 °C), pri sobni temperaturi (25°C) ter v

sušilniku (37 °C). Naslednje jutro smo jih ustrezno redčili z metanolom, predhodno preprihanim z argonom, nato pa še filtrirali skozi filter Minisart RC4 z velikostjo por 0,2 µm. Pripravljene vzorce smo analizirali s HPLC metodo. Kromatografski pogoji so navedeni v poglavju 3.2.8. Kot rezultat smo upoštevali površino pod krivuljo (AUC) kromatografskega vrha AP.

3.2.3 Določanje strukture tekočih kristalov

Strukturo TK lahko določamo z različnimi komplementarnimi metodami. Med neposredne metode določanja strukture spadajo polarizacijska in transmisijska elektronska mikroskopija, mikroskopija na atomsko silo, rentgensko sipanje in jedrska magnetna resonanca, med tem ko diferencialna dinamična kalorimetrija in reologija služita za posredno določanje strukture TK (24).

Za TK je značilna optična anizotropija, kar pomeni, da se svetloba, ki potuje skozi v različnih smereh, med preходом različno obnaša. Svetlobni žarek, ki gre skozi sistem TK, se cepi na dva žarka. Temu pojavu pravimo dvolomnost, ki ga opazujemo pod polarizacijskim mikroskopom. Navadna žarnica je izvor svetlobe, ta pa s pomočjo zrcal in leč pada pravokotno na vzorec. Pred vzorcem je nameščen polarizator, ki polarizira normalno belo svetlobo in prepušča le linearno polarizirano svetlobo. Kondenzor usmeri žarke polarizirane svetlobe tako, da padejo pravokotno na vzorec. Vzorec se nahaja med polarizatorjem in analizatorjem, ki sta pravokotna drug na drugega. Če imamo izotropni vzorec, pri potovanju polarizirane svetlobe skozenj ne pride do spremembe smeri polarizacije in posledično svetloba ne pade na analizator, rezultat je črno polje. Pri anizotropnem vzorcu, ki je optično aktivna snov, pa pride do spremembe smeri polarizacije, tako da ni več pravokotna na analizator, slednji prepusti svetlobo, ki pade nanj in rezultat je svetlo polje. Heksagonalno strukturo TK vidimo kot različne pahljačaste oblike, lamelarno strukturo pa kot oljne črte z malteškimi križi. Včasih so malteški križi prevladujoča oblika (24), (26), (49).

Osmim sistemom TK smo pri sobni temperaturi določili strukturo s polarizacijskim mikroskopom pri 20× povečavi. V ta namen smo uporabili Physica MCR 301 reometer (Anton Paar, Graz, Austria), ki ima vključen polarizacijski mikroskop kot del dodatne opreme. Fotografije smo posneli z digitalno kamero. Pripravili smo osem vzorcev TK brez

AP in osem z 1 % (m/m) AP. Strukture smo določili na podlagi referenčnih slik iz dostopne literature.

3.2.4 Določanje vsebnosti askorbilpalmitata v tekočih kristalih

Priprava vzorcev za določanje vsebnosti AP v TK

Zatehtali smo približno 20 mg TK z 1 % (m/m) AP in jih raztopili v 10 ml metanola, predhodno prepihanem z argonom. Zaradi nestabilnosti AP smo vzorce pripravljali neposredno pred analizo. Tako pripravljene vzorce smo filtrirali skozi filter Minisart RC4 z velikostjo por 0,2 µm in jih analizirali s HPLC metodo. Kromatografski pogoji so navedeni v poglavju 3.2.8.

Izračun vsebnosti AP v TK

Vsebnost AP smo podali kot povprečje treh paralel za posamezen vzorec na podlagi umeritvene premice. Kot rezultat smo podali povprečno vsebnost AP, in sicer kot % (m/m) nerazgrajenega AP upošteva je zatehto TK.

3.2.5 Priprava in izbira receptorskega medija

V preglednici II je navedena sestava preskušanih RM, vodnih ali organskih, z dodanimi različnimi solubilizatorji in/ali solmi. V primeru vodnih medijev smo kot topilo uporabili fiziološko raztopino, ki smo jo predhodno prepihali z argonom in tako izgnali kisik, ki povzroča oksidacijo AP. Pri organskih medijih smo kot topilo uporabili IPM.

Posamezne RM smo tesno zaprte mešali pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu (Rotamix 550 MMH, Železniki, Slovenija) do homogenosti.

Preglednica II: Sestava receptorskih medijev.

Organski receptorski medij	Vodni receptorski medij
IPM + 1 % Tween [®] 40	0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98
nasičena raztopina IPM+ SDS	0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98 + 0,01 M Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O
	0,9 % NaCl + 0,5 % Kolliphor [®] EL
	0,9 % NaCl + 0,5 % Span [®] 80
	0,9 % NaCl + 0,5 % TRANSCUTOL P

3.2.6 Določanje nasičene topnosti askorbilpalmitata v izbranih receptorskih medijih

Priprava vzorcev za določanje nasičene topnosti AP v izbranih RM

K posameznim RM smo dodali prebitek AP ter jih mešali 48 ur na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo in v tesno zaprtih vsebnikih. Vzorce smo pustili mirovati približno 24 ur, nato smo jih centrifugirali (Centric 322A, Železniki, Slovenija) 5 min pri 5000 min^{-1} in temperaturi $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatante vodnih RM smo filtrirali skozi filter Sartorius RC z velikostjo por $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, jih razdelili na 2 paraleli ter redčili 1 ml/10 ml s $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{bidestilirana voda} = 75 : 10 : 15$. Supernatante organskih RM pa smo filtrirali skozi filter Minisart RC4 z velikostjo por $0,2 \text{ }\mu\text{m}$, jih razdelili na 2 paraleli ter redčili 1 ml/10 ml z metanolom. Pripravljene vzorce smo analizirali s HPLC metodo. Kromatografski pogoji so navedeni v poglavju 3.2.8.

Izračun nasičene topnosti AP v izbranih RM

Nasičeno topnost AP smo določali na podlagi umeritvene premice. Vsak vzorec smo injicirali enkrat. Masno koncentracijo AP posamezne paralele smo izračunali iz umeritvene premice upoštevaje AUC kromatografskega vrha AP in faktor redčenja. Kot rezultat smo podali povprečno nasičeno topnost AP, in sicer kot maso AP na volumen RM (mg/ml).

3.2.7 *In vitro* sproščanje askorbilpalmitata iz tekočih kristalov

In vitro sproščanje smo izvedli v Franzovih difuzijskih celicah z difuzijsko površino $0,785 \text{ cm}^2$ v štirih paralelah, uporabili smo acetat celulozno membrano (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija)

Izbira RM

Testirali smo različne RM (navedeni v preglednici II) z namenom izbrati optimalen RM. Ključni kriterij pri izboru RM za sproščanje je bila čim večja nasičena topnost AP.

Priprava vzorcev za sproščanje

Sproščanje je potekalo v vodni kopeli s temperaturo $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Z argonom prepihane RM smo predhodno temperirali 15 minut, nato pa jih po 8 ml polnili v receptorski del Franzove difuzijske celice. Acetat celulozno membrano, ki smo jo predhodno namakali 24 ur v odgovarjajočem RM, smo namestili na donorski del Franzove difuzijske celice. Šele nato smo natančno zatehtali okrog 600 mg TK na membrano. Odstranili smo morebitne zračne

mehurčke, ki so se pojavili pod membrano, in tako pripravljene celice postavili na magnetno mešalo (Thermo Electron Corporation Variomag Telesystem) v vodni kopeli.

Vzorčenje

Vzorčili smo po 750 μ l RM v sledečih časovnih intervalih: 0,5 ure, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8 ur, odvzeti volumen smo ustrezno nadomestili s svežim RM. Tako smo skozi celoten poskus sproščanja ohranjali konstantni volumen RM.

Določanje sproščene količine AP

Sproščeno količino AP smo kvantitativno določali s HPLC metodo (poglavje 3.2.8).

3.2.8 HPLC metoda

Koncentracijo sproščenega AP smo določili s HPLC metodo na podlagi umeritvene premice, ki smo jo določili na podlagi dveh paralel OR AP. OR1 smo pripravili tako, da smo s plastično žličko zatehtali približno 23,5 mg AP v 100 ml bučko iz rjavega stekla in jo do oznake napolnili z RM 0,9 % NaCl + 50 % EtOH, katerega smo predhodno preprihali z argonom. Bučko smo pustili mešati na magnetnem mešalu, dokler se ni AP popolnoma raztopil, nato pa za nekaj sekund postavili v ultrazvočno kadičko (Sonis 2, Iskra pio d.o.o., Slovenija), da smo odstranili zračne mehurčke. Na enak način smo pripravili OR2. OR1 in OR2 smo redčili z metanolom (prepihan z argonom) in dobili raztopine s koncentracijami od 0,024 mg/ml do 0,25 mg/ml. Tako pripravljene raztopine smo filtrirali skozi filter Minisart RC4 z velikostjo por 0,2 μ m in jih analizirali s HPLC metodo. Upoštevali smo AUC kromatografskega vrha AP in z linearno regresijo izračunali umeritveno premico ter kvadrat Pearsonovega koeficienta ($R^2 = 0,9991$).

Uporabljena HPLC aparatura (Agilent Technologies, ZDA) je sestavljena iz razplinjevalca (Agilent 1100), binarne črpalke (Agilent 1100), injektorja (Agilent 1100; WPALS), kolone (EC 125/4 NUCLEOSIL 100-5-C18) in UV detektorja (Agilent 1100, DAD).

Kromatografski pogoji:

- mobilna faza: CH₃OH: CH₃CN: KH₂PO₄ pufer (0,01 M, pH= 3,5) = 75 : 10 : 15
- kolona: Nucleosil 100 C₁₈, 5 μ m delci, 125 x 4,0 mm
- volumen injiciranja: 20 μ l
- pretok: 1,5 ml/min

- valovna dolžina detekcije. $\lambda = 254 \text{ nm}$
- t_{RUN} : 6 min
- retencijski čas AP je bil 3,2 min.

Na podlagi AUC kromatografskega vrha AP in umeritvene premice smo izračunali koncentracijo sproščene AP v posamezni časovni točki (enačba 6). Pri izračunu mase sproščene AP smo upoštevali dodatek svežega RM ter difuzijsko površino in rezultat podali kot kumulativno količino sproščene AP v določenem časovnem intervalu na enoto površine za sproščanje (mg/cm^2) (enačba 7).

$$c_n = (\text{AUC} + 56,04)/16716$$

Enačba 6: Koncentracija sproščene AP

$$m_n = c_n * V_n + \sum (c_n * V_{vz})$$

Enačba 7: Masa sproščene AP v dejanskem volumnu RM

m_n masa sproščene AP v dejanskem RM ob n-tem vzorcu (mg)

c_n koncentracija sproščene AP ob n-tem vzorcu (mg/ml)

V_n volumen RM po vzorčenju, ki je enak začetnemu volumnu (ml)

V_{vz} volumen odvzetega vzorca (μl)

Sproščeno količino AP izraženo v odstotkih smo izračunali na podlagi mase sproščene AP in začetne mase AP vgrajene v TK.

3.2.9 Modeliranje in primerjava profilov sproščanja

Kumulativne rezultate *in vitro* sproščanja izražene v odstotkih sproščene AP smo vzeli kot izhodišče za primerjavo osmih profilov sproščanja AP. Pri tem smo uporabili od modela neodvisne in od modela odvisne metode.

Od modela neodvisne metode

Določali smo faktor razlike (f_1) in faktor podobnosti (f_2). Z f_1 izračunamo razliko v odstotkih med dvema krivuljama sproščanja za vsako časovno točko in podamo relativno napako med dvema krivuljama. Z f_2 izračunamo podobnost med dvema krivuljama prav tako izraženo v odstotkih. Omenjena faktorja smo računali po enačbi 8 in 9, pri čemer R_j in

T_j pomenita kumulativni odstotek sproščene učinkovine referenčnega oziroma testnega produkta za vsako časovno točko vzorčenja j . Krivulje sproščanja v našem primeru nismo klasificirali kot referenčne oziroma testne, ampak smo med seboj primerjali posamezne krivulje. Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali mejne vrednosti $f_1 = 0-15$ in $f_2 = 50-100$ (33), (38), (50).

$$f_1' = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n (R_j + T_j) / 2} \times 100$$

Enačba 8: Faktor razlike f_1

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Enačba 9: Faktor podobnosti f_2

Od modela odvisne metode

Računali smo ujemanje eksperimentalnih rezultatov *in vitro* sproščanja s petimi v farmaciji najpogosteje uporabljenimi matematičnimi modeli, s katerimi smo ugotavljali kinetiko ter mehanizem sproščanja AP. Preverjali smo kinetiko 0. in 1. reda, Higuchijevo kinetiko, Korsmeyer-Peppasovo kinetiko ter Hixon-Crowellovo kinetiko, katerih enačbe so predstavljene v poglavju 1.6. Kriterij za določanje kinetike je R^2 , ki je merilo za moč linearne povezave spremenljivk X (ure) in Y (% sproščenega AP). Najbolj ustrezen model za napovedovanje kinetike sproščanja je tisti z najvišjim R^2 . Rezultate smo podali kot R^2 in hitrostno konstanto sproščanja (k) (25).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZDELAVA TEKOČIH KRISTALOV

TK so se med seboj razlikovali v masnih deležih posameznih sestavin, pri čemer je masni delež vode naraščal v smeri TK8. Med izdelavo smo opazili, da z dodajanjem vode viskoznost sistema narašča, saj se je magnetno mešalo težje vrtelo okoli svoje osi, še posebej v primeru TK7 in TK8. Porast viskoznosti je posledica vodikovih vezi med lecitinom in vodo ter posledično nabrekanja lecitina. Poleg viskoznosti se je spreminjala tudi barva TK. TK1 je bil sistem z najbolj izrazito rumeno barvo zaradi najvišjega deleža PAS, z dodajanjem vode pa je rumena barva bledela. Da bi omejili dejavnike oksidacije (svetloba, kovinski ioni, kisik), smo AP dodajali v TK s plastičnim priborom v delno zatemnjenem prostoru in tako pripravljene TK shranjevali v tesno zaprtem vsebniku. S prilaganjem hitrosti vrtenja na magnetnem mešalu smo še dodatno vplivali na čim manjšo količino primešanega kisika.

4.2 OPTIMIZACIJA TEMPERATURE SHRANJEVANJA VZORCEV Z VGRAJENIM ASKORBILPALMITATOM

Do nestabilnosti AP pride zaradi vpliva zunanjih dejavnikov, kot so kisik, svetloba, temperatura ali kovinski ioni, kar vodi v oksidativni razpad. S shranjevanjem vzorcev z vgrajenim AP v tesno zaprtih vsebnikih, zaščiteneh pred svetlobo, smo se želeli izogniti vplivu kisika in svetlobe, z uporabo plastičnega pribora pa zanemariti vpliv kovinskih ionov. Da bi preučili vpliv temperature na stabilnost AP, smo izvedli preliminarni poskus, in sicer smo vzorce z raztopljenim AP hranili 24 ur pod različnimi pogoji shranjevanja, kot je razvidno iz Preglednice III.

Preglednica III: Vpliv temperature shranjevanja na razgradnjo AP.

Pogoji shranjevanja	AUC AP
5 °C (hladilnik)	3122
sobna temperatura (25 °C)	3024
povišana temperatura (37 °C)	2906

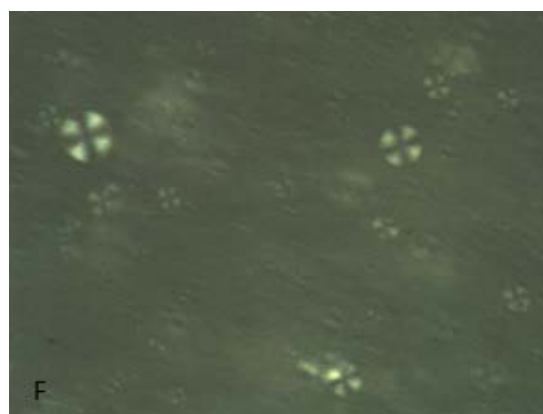
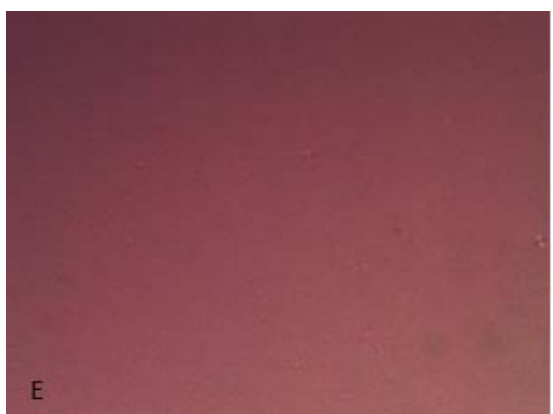
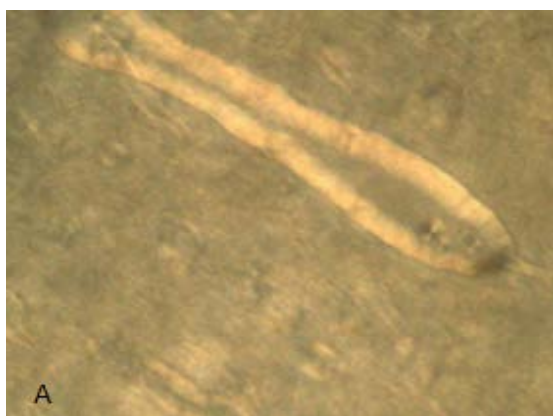
Kljub majhnim razlikam (kot rezultat smo upoštevali AUC kromatografskega vrha AP) lahko rečemo, da je raztopina AP najbolj stabilna v hladilniku in najmanj pri temperaturi 37 °C, kar je pričakovano, saj oksidacija poteka v večjem obsegu in hitreje pri povišani temperaturi. Na podlagi dobljenih rezultatov smo vzorce z vgrajenim AP shranjevali v hladilniku (51-52).

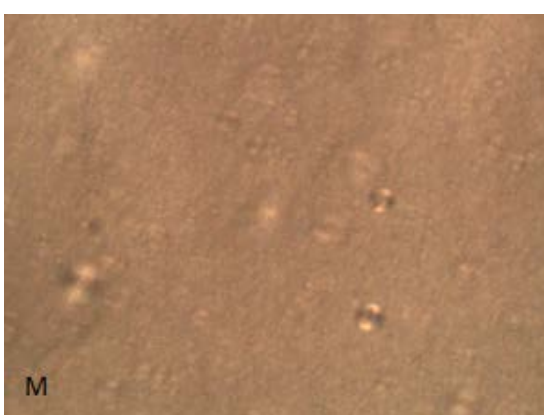
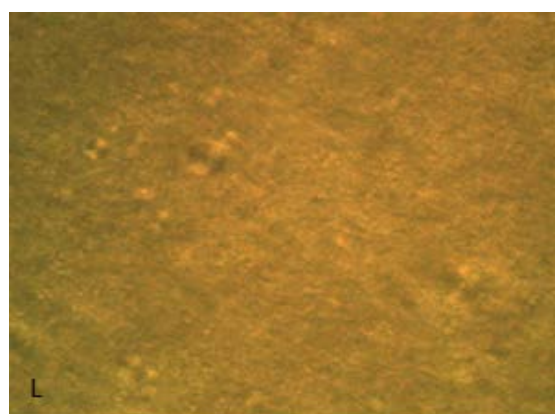
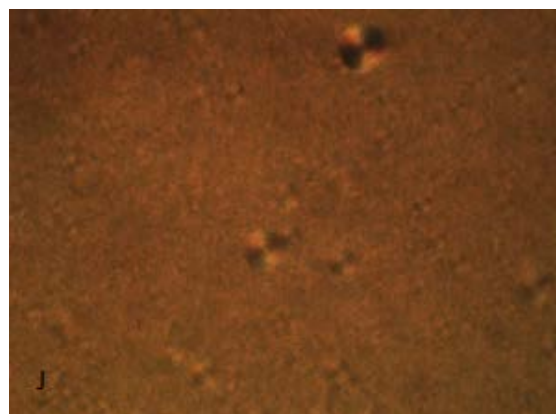
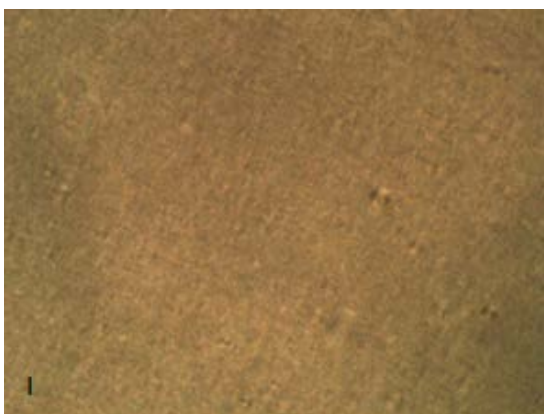
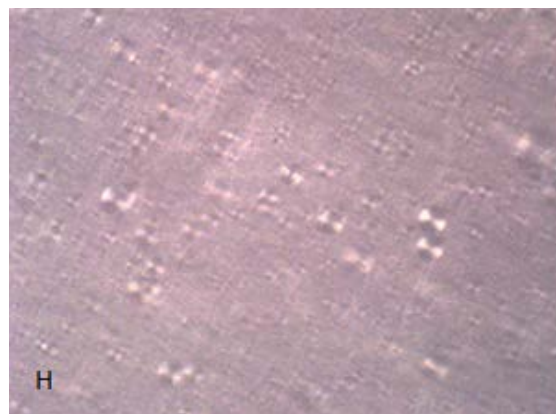
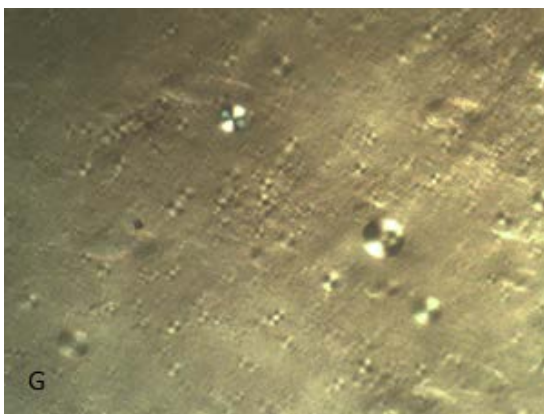
4.3 DOLOČANJE STRUKTURE TEKOČIH KRISTALOV

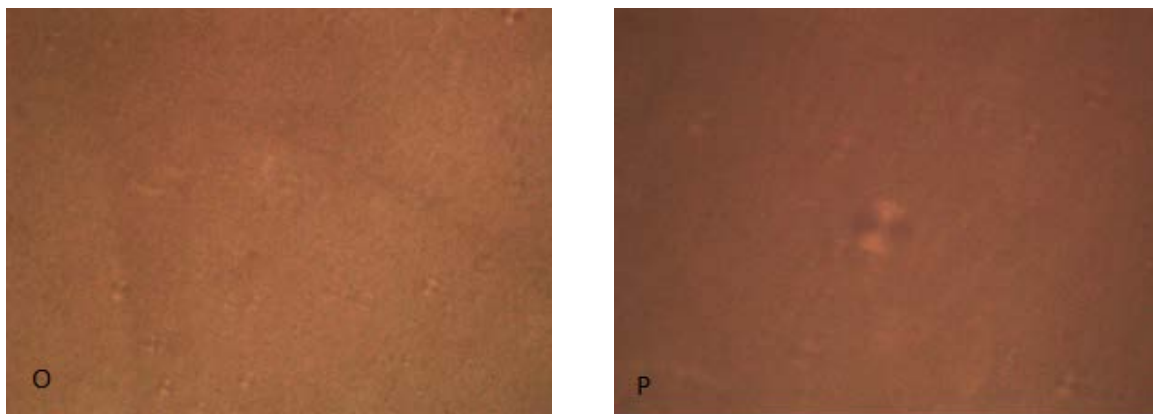
Proučevanim sistemom TK (z in brez vgrajenega 1 % AP(m/m)) smo preverili tudi strukturo s polarizacijskim mikroskopom in dobljene slike primerjali z referenčnimi slikami iz literature. Polarizacijsko mikroskopijo smo uporabili kot komplementarno tehniko za določanje strukture TK, ki je bila v okviru predhodnih raziskav že vrednotena z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja (53). V levem stolpcu slike 10 so prikazane strukture praznih TK, v desnem stolpcu pa identične strukture z vgrajenim AP. Kot je razvidno iz slike 10 C do P, imajo proučevani sistemi TK2-TK8, z izjemo TK1, lamelarno strukturo. Za slednjo so namreč značilni malteški križi, ki so bili vidni posamično ali pa kot oljne črte. Takšna postavitev malteških križev je odvisna od strukturnih lastnosti lecitina, ki jih opišemo s kritičnim ureditvenim parametrom, ki ima vrednost $\frac{1}{2}$ -1. Če primerjamo prazne sisteme TK2-TK8, je razvidno, da z naraščanjem deleža vode v TK število malteških križev pada, kar nakazuje na manj izrazito lamelarno strukturo. Nadalje, dodatek AP v TK sicer ni porušil lamelarne stukture, vendar pa je povzročil zmanjšanje dobro definiranih malteških križev. Rezultati kažejo, da je lamelarna struktura zlasti izrazita v primeru TK3 in TK4, kar dokazujejo jasno vidni in najštevilčnejši malteški križi (F-H). Ugotovitve so skladne z raziskavo, kjer so s (psevdo)trikomponentnim faznim diagramom za Tween[®] 80/lecitin/IPM/voda določili območje nastanka lamelarnih TK znotraj 15-55 % deleža vode in 12,5-35 % IPM (15).

Nasprotno pa smo za TK1 na podlagi Schlierenove strukture določili heksagonalno strukturo (slika 10 A do B). TK1, v primerjavi s preostalimi sedmimi sistemi TK, vsebujejo najmanj vode (20,0 %) in največ Tween[®] 80 (28,0 %), naraščanje koncentracije Tween[®] 80 pa je povezano z nastankom micelov ali heksagonalnih faz. Tovrstni fazni nastanek je tesno povezan s strukturnimi lastnostmi Tween[®] 80 oziroma kritičnim ureditvenim parametrom, katerega vrednost 0,07 nakazuje na tvorbo sferičnih struktur, dodatek Tweena[®] 80 pa tako zmanjša kritični ureditveni parameter lecitina. TK2 vsebujejo večji

delež vode (25 %) kot TK1, kar je že dovolj za tvorbo lamelarne strukture (slika 10 C). Enako velja za vse nadaljnje sisteme (TK3-TK8) (15).







Slika 10: Slike praznih TK posnete s polarizacijskim mikroskopom: A) TK1, C) TK2, E) TK3, G) TK4, I) TK5, K) TK6, M) TK7, O) TK8, in z vgrajenim 1 % AP B) TK1+AP, D) TK2+AP, F) TK3+AP, H) TK4+AP, J) TK5+AP, L) TK6+AP, N) TK7+AP, P) TK8+AP.

4.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI ASKORBILPALMITATA V TEKOČIH KRISTALIH

Količino vgrajenega AP v TK smo natančno določili in v preglednici IV je vsebnost podana kot razmerje med maso vgrajene učinkovine in maso sistema (izraženo v %, teoretična vsebnost naj bi znašala 1 %). Vsebnost smo določali z namenom določiti dejansko količino AP v TK, ki je bila potrebna za nadaljnje računanje sproščene količine AP.

V primeru, da bi v TK vgrajevali AP v nasičeni koncentraciji, bi delež hidrofilne faze vplival na vgrajevanje AP in posledično na njegovo vsebnost v TK zaradi hidrolizne reakcije med AP in vodo, kjer preko cepitve estrske vezi pride do razpada AP ter nastanka askorbinske in palmitinske kisline.

Delež hidrofilne/lipofilne faze pa je pomemben tudi z vidika oksidacije, ki poteče na cikličnemu delu amfifilne molekule AP ob prisotnosti kisika. Splošno velja, da je kisik boljše topen v olju kot vodi, kar pomeni, da ima večjo afiniteto do oljne faze, kamor se pretežno porazdeljuje, to pa pomeni fizično bariero za difuzijo kisika v hidrofilno fazo. Amfifilna molekula AP se s cikličnim obročem orientira v vodno fazo in s tem, ko je manj kisika na voljo v hidrofilni fazi, zmanjšamo obseg oksidacije (14), (17).

Na podlagi minimalne razlike med eksperimentalno in teoretično vrednostjo vsebnosti AP smo vseh osem sistemov TK označili kot ustrezne in jih uporabili v nadaljnjih raziskavah *in vitro* sproščanja.

Preglednica IV: Vsebnost AP v TK.

	TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	TK8
Vsebnost AP (%)	0,984	0,979	0,980	1,03	0,941	0,961	1,00	0,972

4.5 IN VITRO SPROŠČANJE ASKORBILPALMITATA

Z *in vitro* študijami lahko preučujemo tako sproščanje učinkovine iz dostavnega sistema (umetne membrane), kot tudi simuliramo absorpcijo učinkovine v/skozi kožo (naravne membrane). Tovrstne študije se izvajajo pri razvoju in vrednotenju dermalnih in transdermalnih FO. Osnovni pogoj je, da se učinkovina sprošča iz dostavnega sistema, v nasprotnem primeru njena nadaljnja uporaba kljub siceršnji ustreznosti za dermalno absorpcijo v izbranem sistemu ni smiselna. Velja, da na sproščanje učinkovine vplivajo naslednji dejavniki (45):

- hidro-lipofilne lastnosti učinkovine, dostavnega sistema, RM in medsebojne interakcije,
- delež vgrajene učinkovine,
- membrana kot fizična bariera,
- struktura in viskoznost dostavnega sistema.

V okviru diplomske naloge smo proučevali sproščanja AP iz osmih sistemov TK glede na različen delež lipofilnih sestavin in vode z nadaljnjim ugotavljanjem kinetike sproščanja AP.

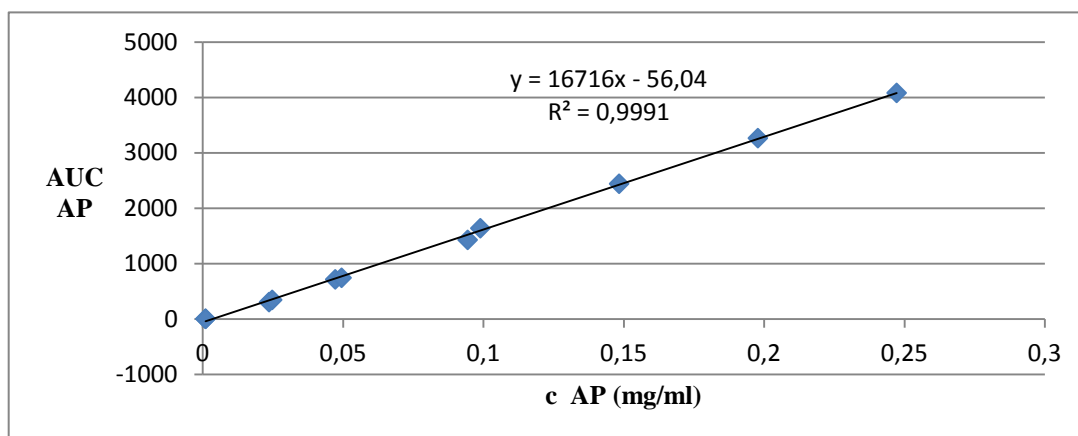
Kvantitativno določanje sproščene količine AP s HPLC metodo

Koncentracijo sproščenega AP smo določili s HPLC metodo na podlagi umeritvene premice. Z linearno regresijo smo izračunali enačbo premice ter R^2 (slika 11), pri čemer smo izhajali iz številčnih vrednosti spremenljivk X (c AP (mg/ml)) in Y (AUC AP), prikazanih v preglednici V. Vrednost R^2 potrjuje linearen odnos spremenljivke. Upoštevali smo AUC simetričnega kromatografskega vrha AP z ozko porazdelitvijo ter izračunali koncentracijo AP v posamezni časovni točki (enačba 6). Rezultate sproščanja smo podali

grafično kot kumulativno količino sproščenega AP v določenem časovnem intervalu na enoto površine za sproščanje (mg/cm^2) (enačba 7) ali pa izraženo v odstotkih (%) v odvisnosti od časa (slika 12-13).

Preglednica V: Številčne vrednosti spremenljivk X (c AP(mg/ml)) in Y (AUC AP)

C (mg/ml)	0,024	0,025	0,047	0,049	0,094	0,099	0,15	0,20	0,25
AUC	306,8	346,9	717,1	745,5	1429,5	1639,5	2442,3	3265,7	4081,7



Slika 11: Umeritvena premica sproščenega AP in enačba premice.

Izbira receptorskega medija in določanje nasičene topnosti

Na podlagi literaturnih podatkov o sproščanju AP iz različnih dostavnih sistemov preko umetne membrane smo pripravili nabor RM na potencialno ustrezne za sproščanje AP iz TK. Z lipofilnimi mediji smo želeli posnemati lastnosti intracelularnih lipidov povrhnjice kože, z vodnim medijem pa fiziološke pogoje. Ključni kriterij pri izbiri ustreznega RM za izvedbo je bila nasičena topnost AP v RM. Najprej smo testirali naslednje RM:

- 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M Na₂S₂O₃·5H₂O
- 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98
- 0,9 % NaCl + 0,5 Span[®] 80
- 0,9 % NaCl + 0,5 % Kolliphor[®] EL
- 0,9 % NaCl + 0,5 % TRANSCUTOL P
- IPM + 1 % Tween[®] 40

- Nasičena raztopina IPM + SDS

V preglednici VI so predstavljeni rezultati nasičene topnosti AP v izbranih RM, podani kot mg AP/ml RM. V RM 0,9 % NaCl + 0,5 % Span[®] 80 se dodana PAS ni raztopila, tako da medij ni bil primeren za določanje nasičene topnosti AP, v RM 0,9 % NaCl + 0,5 % TRANSCUTOL P pa z metodo HPLC nismo zaznali kromatografskega vrha AP. Oba medija smo izločili iz nadaljnjih poskusov.

Preglednica VI: Nasičena topnost AP v izbranih receptorskih medijih.

Receptorski medij	Nasičena topnost AP (mg/ml)
0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98 + 0,01 M Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,70
0,9 % NaCl + 0,5 % Brij [®] 98	0,59
IPM + 1 % Tween [®] 40	0,55
Nasičena raztopina IPM + SDS	0,38
0,9 % NaCl + 0,5 % Kolliphor [®] EL	0,27
0,9 % NaCl + 0,5 % TRANSCUTOL P	*/

* Nasičene topnosti nismo določili, saj predpostavljamo, da je bila vrednost sproščenega AP, pod danimi kromatografskimi pogoji, pod mejo detekcije.

Najnižjo topnost AP smo določili v RM 0,9 % NaCl + 0,5 % Kolliphor[®] EL (0,27 mg/ml). V RM 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 smo v primerjavi z dodatkom stabilizatorja Na₂S₂O₃·5H₂O določili manjšo vrednost (59 mg/ml), kar je skladno z dejstvom, da več AP razpade v mediju brez stabilizatorja. Topnost v organskem RM (IPM) je bila ob dodatku solubilizatorja Tween[®] 40 ali SDS nižja (55 in 38 mg/ml) od topnosti v vodnem RM, kar je bilo nepričakovano glede na lipofilne lastnosti AP (log P=5,1). AP je skoraj netopen v vodi in nestabilen zaradi poteka oksidacije, vendar z dodatkom solubilizatorja (Brij[®] 98) in/ali stabilizatorja reducenta (Na₂S₂O₃·5H₂O) povišamo njegovo topnost in izboljšamo

stabilnost. Tako smo za nadaljnje sproščanje izbrali RM 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M Na₂S₂O₃·5H₂O z nasičeno topnostjo (0,70 mg/ml) (7), (9) (45), (54-55).

Optimizacija pogojev sproščanja

a) Sproščanje AP v RM: 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M Na₂S₂O₃·5H₂O

V vodni kopeli s temperaturo 37 °C smo v dveh Franzovih celicah sproščali AP iz TK1 preko acetat celulozne membrane v izbrani medij, vendar tudi po 24-tih urah nismo zaznali AP v RM. Iz rezultatov sklepamo, da ima AP večjo tendenco do lipofilnega okolja TK1 kot do hidrofilnega RM. V kolikor se je AP sproščal iz TK1, je bila količina sproščenega AP pod limito detekcije.

b) Sproščanje AP v RM: IPM + 1 % Tween[®] 40

RM 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M Na₂S₂O₃·5H₂O se je izkazal za neustreznega, zato smo izbrali bolj lipofilen RM glede na lipofilne lastnosti AP. AP v RM smo zaznali šele po 24. in nadalje 48. in 72. urah. Vodna kopel s temperaturo 37 °C je vplivala na izhlapevanje IPM iz receptorskega dela Franzove celice preko membrane v donorski del, kar je povzročilo redčenje sistema TK1 nad membrano, vplivalo na prehajanje AP in povzročalo tudi praktične težave pri vzorčenju. Zato smo pri ponovnem sproščanju znižali temperaturo na 32 °C (temperatura kože) in vzorčili vse do 19. ure. Ugotovili smo, da je temperatura 32 °C optimalna, saj IPM ni izhlapeval, a sproščanja AP do 19. ure nismo zaznali. Rezultati so nakazovali, da se AP sprošča na daljše časovne intervale. Pri ponovitvi poizkusa smo zaznali sproščanje AP med 24. in 48. uro. Vendar smo v 35. in 48. uri določili manjšo količino sproščenega AP glede na predhodne časovne točke. Sklepali smo, da AP prehaja nazaj skozi membrano v donorski del celice oziroma razpada pri 32 °C. Prav tako smo po predhodnem 24-urnem namakanju v RM opazili lise na membrani, kar nakazuje na morebitne interakcije Tween[®] 40 z membrano. Zaradi nihanja sproščene količine AP ter nesimetričnega kromatografskega vrha AP smo ocenili, da RM ni primeren za nadaljnje poizkuse sproščanja.

c) Sproščanje v RM: IPM + SDS (nasičena raztopina)

Pri enakih pogojih sproščanja kot v primeru RM IPM + 1 % Tween[®] 40 se je AP sprostil hitreje in v večjem obsegu, a smo v enakih časovnih točkah (35. in 48. uri) s HPLC zaznali padec sproščene količine AP. Po ponovitvi poskusa v časovnih intervalih med 12. in 24.

uro smo zopet zaznali nihanje v sproščanju AP. Rezultati so nakazovali na nepredvidljivo sproščanje AP, kar smo ocenili kot neugodno za nadaljnje poizkuse sproščanja.

d) Sproščanje v RM: 20 % EtOH in 50 % EtOH v 0,9 % NaCl

Glede na to, da lipofilni AP ni prehajal v vodni medij 0,9 % NaCl + 0,5 % Brij[®] 98 + 0,01 M Na₂S₂O₃·5H₂O, smo sklepali, da je rešitev v dodatku solubilizatorja EtOH, saj velja, da je AP lahko topen v EtOH. Tako smo v zaključni fazi optimizacije preiskusili sproščanje v RM 0,9 % NaCl z 20 % EtOH oziroma 50 % EtOH. Sproščanje smo izvedli pri sobni temperaturi in temperaturi 32 °C. V primeru 20 % EtOH AP tekom 8. ure nismo zaznali, medtem ko se je RM s 50 % EtOH izkazal za ustrezen medij, saj smo vsako uro do vključno 8. ure določili kvantitativno količino sproščenega AP. Na podlagi rezultatov smo izbrali RM s 50 % EtOH kot optimalen RM za nadaljnje sproščanje AP iz osmih sistemov TK. Dodatna kriterija, ki sta pripomogla k tej odločitvi, sta bila še najvišja nasičena topnost AP (1,3 mg/ml) v izbranem RM glede na ostale RM in pa simetričen kromatografski vrh AP z ozko porazdelitvijo. Rezultati sproščanja AP v RM z EtOH so skladni z raziskavo, s katero so izvedli *in vitro* transdermalno študijo, kjer so proučevali permeabilnost lipofilne učinkovine skozi mišjo kožo. V primeru 0,9 % NaCl brez EtOH so s HPLC metodo komaj zaznali učinkovino zaradi njene slabe topnosti v vodi, med tem ko se je 20 % EtOH v 0,9 % NaCl izkazal za najbolj optimalen RM (54), (56).

In vitro sproščanje

In vitro sproščanje, ki je sledilo fazi optimizacije RM, smo izvedli za osmih sistemov TK, pod naslednjimi pogoji:

- Franzove difuzijske celice z difuzijsko površino 0,785 cm², 4 paralele
- vodna kopel s temperaturo 32 °C
- acetat celulozna membrana
- RM: 0,9 % NaCl + 50 % EtOH

TK so vsebovali po 1 % (m/m) AP, kot je tudi sicer standardna koncentracija AP v dermalnih pripravkih (navadno med 1 – 2 %), lamelarna struktura se je pri tej koncentraciji ohranila. Vzpostavili smo sistem odprtih Franzovih difuzijskih celic in na ta način posnemali realno stanje po nanosu dermalnih FO. Sliki 12 in 13 prikazujeta sproščanje AP iz osmih sistemov TK, rezultati pa so podani kot mg sproščenega AP na cm² oziroma

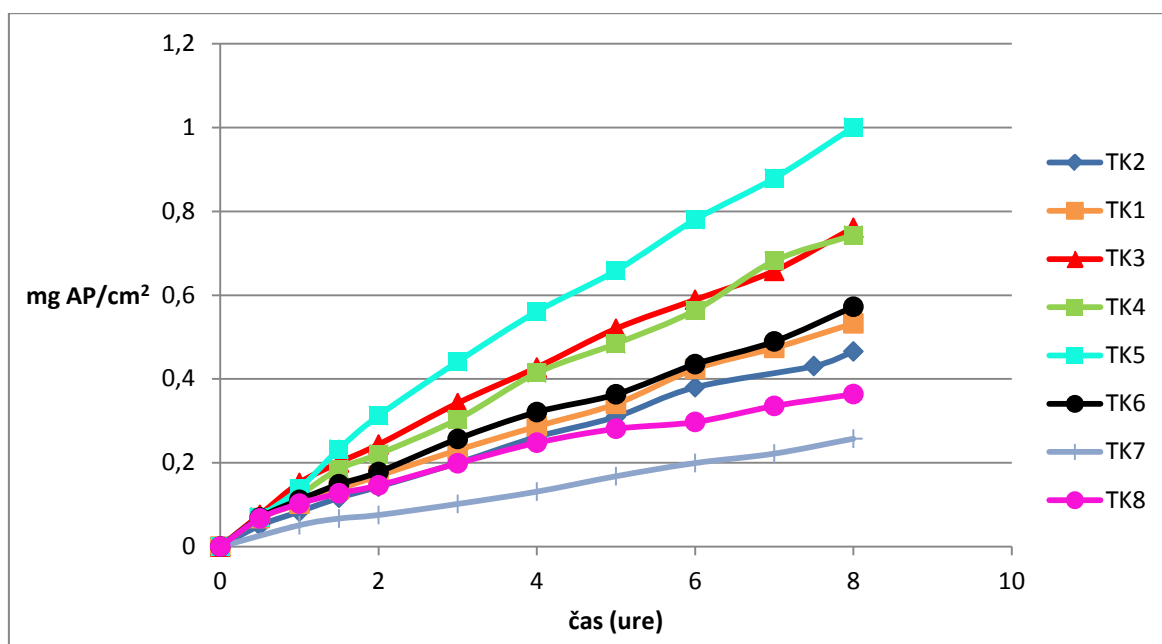
odstotek sproščenega AP. Zaradi bolj jasne grafične predstavitve rezultatov smo standardni odklon (SD) predstavili ločeno v Preglednici VII in VIII (45), (57).

Zanimale so nas razlike v profilu sproščanja iz sistemov z lamelarno strukturo (TK2-TK8) glede na sistem s heksagonalno (TK1), znotraj sistemov z lamelarno strukturo pa smo proučevali vpliv različnega deleža vode in lipofilnih sestavin sproščanje AP. Delež vode je v zaporedju od TK1 (20 %) do TK8 (55 %) naraščal, delež ostalih sestavin (lecitin, Tween[®] 80 in IPM) pa je sorazmerno padal, med tem ko je bilo razmerje lecitin/Tween[®] 80 konstantno (1/1).

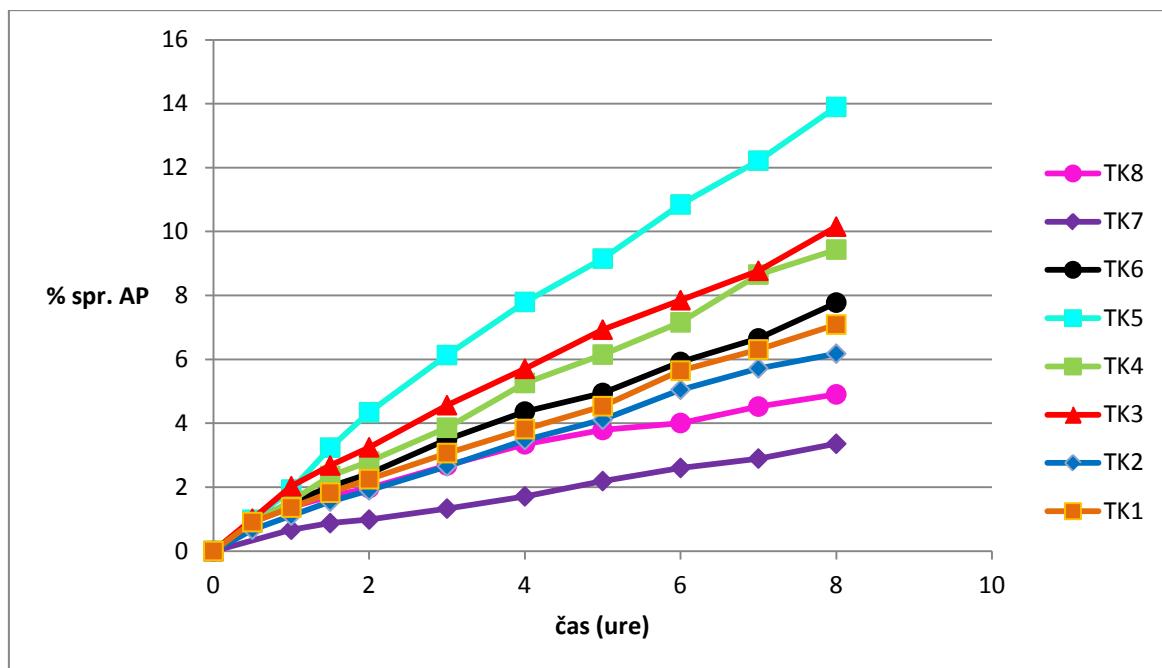
Ugotovili smo, da naraščanje deleža vode vpliva tako na hitrost kot tudi obseg sproščanja AP. Glede na rezultate polarizacijske mikroskopije je lamelarna struktura najbolj izrazita v primeru TK3 in TK4, zato smo na podlagi dejstva o paralelnem drsenju lamelarnih plasti in olajšani difuziji učinkovine predvidevali, da se bo AP najhitreje in v največjem obsegu sproščal iz omenjenih dveh sistemov. Kot je razvidno iz profilov sproščanja, je bilo temu res tako, z izjemo TK5. Tako se je sprostilo največ AP (1 mg/cm^2 oziroma 14 %) po 8-ih urah iz TK5, kar kaže na podaljšano sproščanje. TK6-8 pa kažejo na počasnejše sproščanje AP zaradi večjih interlamelarnih razdalj, ugotovljeno s predhodno raziskavo ozkokotnega rentgenskega sipanja (11 nm v primerjavi z 8 nm TK3-TK4). Voda je v lamelarnih strukturah vezana na polarne glave PAS, saj z višanjem deleža vode narašča delež proste vode, ki se razporedi v interlamelarni prostor, kar pomeni, da se razdalje med lamelami večajo, AP pa je zaradi svoje amfifilne strukture delno vgrajen v interlamelarni prostor, delno pa je lokaliziran v področju polarnih glav amfifilnih molekul. Delež vode je v TK7-8 največji (50 % in 55 %), kar se odraža v višji viskoznosti, ki je posledica vodikovih vezi med lecitinom in vodo ter posledično nabrekanja lecitina. Višja viskoznost tako vpliva na počasnejše sproščanje AP. Za TK2 pa lahko sklepamo, da je počasnejše sproščanje odraz večje afinitete AP do prevladujoče lipofilne faze TK glede na hidrofilni RM, kljub prisotnem EtOH, ki poveča solubilizacijo AP v vodi. Iz profilov sproščanja je tudi razvidno, da se AP hitreje in v večjem obsegu sprošča iz lamelarnih TK (TK3-5) v primerjavi s TK1 s heksagonalno strukturo. Razlog je v notranji prostorski ureditvi lamelarnih TK s paralelnim drsenjem plasti in olajšano difuzijo AP. Poleg tega so heksagonalni TK bolj viskozni, kar omejuje sproščanje AP skozi membrano v RM. Rezultati *in vitro* sproščanja potrjujejo, da lamelarna struktura TK zagotavlja podaljšano sproščanje in posledično podaljšano antioksidativno zaščito kože AP (15), (53).

Naše ugotovitve glede vpliva interlamelarnih razdalj na sproščanje AP so v skladu z rezultati raziskave, ki so jo naredili Makai in sodelavci (57). Proučevali so sproščanje hidofilne in lipofilne učinkovine iz lamelarnih TK, kjer so povečevali delež glicerola in ugotavljali vpliv glicerola na strukturo TK in povezavo strukture s sproščanjem učinkovin. Ugotovili so, da dodatek glicerola povečuje interlamelarne razdalje, skladno s tem pa so zaznali počasnejše sproščanje v primeru obeh tipov učinkovin, saj sta bili obe učinkovini delno vgrajeni v interlamelarni prostor, delno pa lokalizirani v področju polarnih glav amfifilnih molekul.

Vpliv viskoznosti na sproščanje učinkovine pa so potrdili v raziskavi, kjer so lamelarnim TK spreminjali delež glicerol monooleata, poloksamera in vode. Ugotovili so, da se je z višanjem deleža poloksamera (18 % do 21 %) sproščanje učinkovine upočasnilo zaradi nabrekanja poloksamera in posledično višje viskoznosti sistema (25).



Slika 12: Sproščanje AP iz sistemov TK, prikazano v mg AP/cm^2 . Vrednosti so povprečje štirih meritev.



Slika 13: Sproščanje AP iz sistemov TK, prikazano kot % sproščene AP. Vrednosti so povprečje štirih meritev.

Preglednica VII: Prikaz vrednosti in standardnih odklonov za graf in vitro sproščanja (mg/cm^2) AP iz osmih sistemov TK.

Čas (ure)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK1)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK2)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK3)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK4)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK5)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK6)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK7)	mg/cm^2 $\pm\text{SD}$ (TK8)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	0,068 $\pm 0,010$	0,050 $\pm 0,009$	0,076 $\pm 0,018$	0,070 $\pm 0,026$	0,070 $\pm 0,007$	0,069 $\pm 0,008$	0,000	0,067 $\pm 0,015$
1	0,102 $\pm 0,012$	0,083 $\pm 0,016$	0,152 $\pm 0,067$	0,123 $\pm 0,009$	0,138 $\pm 0,024$	0,112 $\pm 0,016$	0,051 $\pm 0,009$	0,102 $\pm 0,025$
1,5	0,137 $\pm 0,018$	0,117 $\pm 0,038$	0,200 $\pm 0,010$	0,185 $\pm 0,023$	0,233 $\pm 0,073$	0,149 $\pm 0,032$	0,067 $\pm 0,013$	0,127 $\pm 0,041$
2	0,169 $\pm 0,031$	0,143 $\pm 0,056$	0,243 $\pm 0,027$	0,221 $\pm 0,050$	0,312 $\pm 0,095$	0,178 $\pm 0,040$	0,075 $\pm 0,014$	0,146 $\pm 0,052$
3	0,230 $\pm 0,081$	0,200 $\pm 0,095$	0,342 $\pm 0,039$	0,304 $\pm 0,078$	0,441 $\pm 0,154$	0,257 $\pm 0,025$	0,102 $\pm 0,020$	0,199 $\pm 0,095$
4	0,287 $\pm 0,104$	0,262 $\pm 0,125$	0,427 $\pm 0,078$	0,414 $\pm 0,111$	0,561 $\pm 0,210$	0,321 $\pm 0,021$	0,131 $\pm 0,028$	0,248 $\pm 0,145$
5	0,341 $\pm 0,106$	0,310 $\pm 0,154$	0,520 $\pm 0,067$	0,484 $\pm 0,118$	0,658 $\pm 0,056$	0,363 $\pm 0,027$	0,168 $\pm 0,041$	0,281 $\pm 0,163$
6	0,424 $\pm 0,017$	0,380 $\pm 0,107$	0,589 $\pm 0,117$	0,564 $\pm 0,114$	0,780 $\pm 0,256$	0,435 $\pm 0,088$	0,199 $\pm 0,033$	0,297 $\pm 0,164$
7	0,474 $\pm 0,121$	0,431 $\pm 0,176$	0,658 $\pm 0,212$	0,681 $\pm 0,115$	0,879 $\pm 0,054$	0,490 $\pm 0,104$	0,222 $\pm 0,035$	0,336 $\pm 0,173$
8	0,533 $\pm 0,122$	0,467 $\pm 0,181$	0,761 $\pm 0,099$	0,743 $\pm 0,115$	1,000 $\pm 0,027$	0,572 $\pm 0,135$	0,257 $\pm 0,045$	0,364 $\pm 0,197$

Preglednica VIII: Prikaz vrednosti in standardnih odklonov za graf *in vitro* sproščanja (%) AP iz osmih sistemov TK.

čas (ure)	% ± SD (TK1)	% ± SD (TK2)	% ± SD (TK3)	% ± SD (TK4)	% ± SD (TK5)	% ± SD (TK6)	% ± SD (TK7)	% ± SD (TK8)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	0,905 ±0,131	0,669 ±0,113	1,011 ±0,236	0,885 ±0,321	0,977 ±0,091	0,942 ±0,108	0,000	0,905 ±0,201
1	1,360 ±0,156	1,107 ±0,214	2,027 ±0,900	1,564 ±0,108	1,923 ±0,330	1,517 ±0,211	0,665 ±0,115	1,138 ±0,340
1,5	1,825 ±0,241	1,546 ±0,509	2,675 ±0,131	2,348 ±0,291	3,235 ±1,006	2,023 ±0,429	0,872 ±0,169	1,715 ±0,549
2	2,248 ±0,417	1,898 ±0,744	3,245 ±0,364	2,803 ±0,649	4,342 ±1,313	2,419 ±0,543	0,984 ±0,187	1,968 ±0,697
3	3,064 ±1,073	2,651 ±1,257	4,564 ±0,519	3,858 ±0,992	6,133 ±2,133	3,492 ±0,329	1,328 ±0,268	2,678 ±1,285
4	3,817 ±1,380	3,475 ±1,667	5,702 ±1,046	5,259 ±1,412	7,794 ±2,916	4,362 ±0,283	1,710 ±0,368	3,340 ±1,953
5	4,531 ±1,405	4,109 ±2,038	6,928 ±0,879	6,148 ±1,508	9,152 ±0,793	4,946 ±0,375	2,189 ±0,532	3,789 ±2,201
6	5,644 ±0,231	5,047 ±1,424	7,849 ±1,550	7,156 ±1,472	10,845 ±3,553	5,916 ±1,183	2,600 ±0,436	4,006 ±2,210
7	6,306 ±1,607	5,716 ±2,337	8,770 ±2,814	8,652 ±1,479	12,217 ±0,730	6,653 ±1,409	2,893 ±0,464	4,521 ±2,333
8	7,086 ±1,620	6,177 ±2,409	10,152 ±1,319	9,434 ±1,477	13,898 ±0,360	7,774 ±1,812	3,357 ±0,585	4,901 ±2,660

4.6 MODELIRANJE IN PRIMERJAVA PROFILOV SPROŠČANJA

Kumulativne rezultate *in vitro* sproščanja, izražene v odstotkih, smo vzeli kot izhodišče za primerjavo osmih profilov sproščanja AP. Pri tem smo uporabili od modela neodvisne in od modela odvisne metode.

Od modela neodvisne metode

Pri faktorju f_1 in f_2 gre za pristop direktne primerjave rezultatov sproščanja AP vzdolž profila sproščanja med dvema krivuljama. Rezultat je odvisen od števila časovnih točk (i...n), ki jih vključimo v izračun in ne od izbire specifičnega parametra. Metodi sta uporabni, kadar je število časovnih točk večje od 3. Priporočljivo je, da se za ustrezno razlikovanje krivulj upošteva čim večje število časovnih točk. Naš eksperiment *in vitro* sproščanja je tako zajemal 11 točk vzorčenja, vendar pri izračunu nismo upoštevali točke ob času 0, saj bi v nasprotnem primeru dobili lažne vrednosti f_2 . Faktorja f_1 in f_2 veljata za pomembni kvantitativni metodi, ki ju priporočajo FDA smernice in jih uporablja farmacevtska industrija za primerjavo profilov sproščanja. EMA pa se bolj nagiba k

uporabi f_2 , kar je zapisano tudi v evropskih smernicah. Velja, da je f_2 bolj občutljiv za iskanje razlik med dvema krivuljama sproščanja kot f_1 . FDA in EMA navajata mejni vrednosti $f_1 = 0-15$ in $f_2 = 50-100$, na podlagi katerih velja, da sta dva profila sproščanja ekvivalentna oziroma podobna z razliko $\leq 10\%$ v vsaki časovni točki skozi celoten profil sproščanja. V kolikor sta vrednosti $f_1 = 0$ in $f_2 = 100$ velja, da sta krivulji sproščanja ekvivalentni. Preglednici IX in X prikazujeta izračunane vrednosti f_1 in f_2 . Kljub temu, da rezultati za f_1 kažejo, da so podobni le 4 profili sproščanja (TK1-TK2, TK1-TK6, TK2-TK8 in TK3-TK4), pa rezultati za f_2 potrjujejo, da so vsi profili podobni med seboj, saj so razlike med njimi vzdolž celotnega profila $\leq 10\%$, kar ustreza kriteriju za podobnost. Poleg tega sta profila TK1-TK6 in TK1-TK2 glede na vrednost $f_2 = 99$ ter $f_2 = 98$ skoraj identična, saj je razlika v sproščeni količini AP skozi celoten profil $< 1\%$ (33), (39), (50). Raziskava, ki so jo naredili Costa in sodelavci, podpira naše ugotovitve, torej da je možna razlika med profili glede na vrednosti f_1 , glede na f_2 pa podobnost in obratno. Ko so primerjali dva profila sproščanja iz pelet, je bilo razvidno, da sta profila podobna glede na vrednosti f_1 , po drugi strani pa sta bila glede na občutljivejši faktor f_2 različna (50).

Preglednica X: Izračunane vrednosti f_1 .

	TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	TK8
TK1		13	36	27	63	8	76	23
TK2			48	39	74	21	64	15
TK3				10	29	28	105	58
TK4					38	19	97	49
TK5						55	124	83
TK6							83	31
TK7								55
TK8								

Preglednica X: Izračunane vrednosti f_2 .

	TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	TK8
TK1		98	84	88	69	99	80	92
TK2			80	84	67	94	84	96
TK3				97	81	87	69	76
TK4					77	92	71	79
TK5						71	60	64
TK6							78	88
TK7								89
TK8								

Tako kot ostale metode, imata tudi faktorja f_1 in f_2 prednosti in slabosti. Njuna prednost je predvsem v enostavni uporabi, saj lahko zgolj z eno številko opišemo dve krivulji, ki sta predmet primerjave. Kljub njuni robustnosti in zanesljivosti pa faktorja ne upoštevata oblike krivulje ter variabilnost znotraj posameznih krivulj. Ker na rezultat vpliva število časovnih točk, sta kot kumulativni funkciji občutljiva, kadar se sprostijo več kot 85 % učinkovine. V tem primeru je zadnja meritev v točki do 85 %, kar se upošteva tudi pri izračunu. V našem primeru se je po osmih urah sprostilo največ 14 %, kar pomeni, da smo tudi to meritev upoštevali pri izračunu (50).

Z namenom, da bi upoštevali obliko krivulje ter ugotovili kinetiko in mehanizem sproščanja AP, smo primerjavo profilov naredili še z metodami odvisnimi od modela.

Od modela odvisne metode

Ugotavljanje kinetike sproščanja je pomembno v fazi razvoja in optimizacije FO, saj s kinetiko razložimo mehanizem sproščanja učinkovine, poleg tega lahko napovemo plazemske koncentracije učinkovine v odvisnosti od časa in s tem njeno biološko učinkovitost. Računali smo ujemanje rezultatov sproščanja AP s petimi, v farmaciji najpogosteje uporabljenimi, matematičnimi modeli za napovedovanje kinetike 0. in 1. reda, Higuchijeve in Hixon-Crowellove kinetike ter kinetike po Korsmeyer-Peppasu. Najvišja vrednost R^2 je merilo za najustreznejši matematični model, kot je razvidno iz preglednice XI. Rezultati nakazujejo, da sproščanje AP iz lamelarnih TK večinoma sledi kinetiki po Korsmeyer-Peppas ($R^2 = 0,9973-0,9986$), z izjemo sistemov TK5 in TK7, ki kažeta na kinetiko 1. reda ($R^2 = 0,9946-0,9966$), pri čemer gre za koncentracijsko odvisno sproščanje. To pomeni, da je hitrost sproščanja AP največja na začetku, s časom pa se sproščanje upočasni kot posledica naraščajoče koncentracije sproščenega AP, kar je razvidno tudi iz slik 12 in 13. V primeru Korsmeyer-Peppasovi kinetike se mehanizem sproščanja določi na podlagi klasifikacije n eksponenta, kar je razvidno iz Preglednice XII. Izračunane vrednosti n eksponenta nakazujejo, da gre v vseh primer za difuzijo z anomalijo. Primer sproščanja AP iz sistema TK1 s heksagonalno strukturo pa nakazuje na kinetiko 1.reda. Glede na to, da rezultati kinetike pri posameznih sistemih TK ne odstopajo, ponekod so razlike šele na tretji decimalki, bi lahko rekli, da pri sproščanju AP sodelujejo številni procesi, pri čemer je prehod AP skozi membrano v RM pretežno odvisen od koncentracije oziroma difuzije z anomalijo.

Preglednica XI: Izračunane vrednosti (R^2) in konstante sproščanja (k) AP iz osmih sistemov TK.

	0.red		1.red		Higuchi		Korsmeyer Peppas		Hixon Crowell	
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k
TK1	0,9948	0,848	0,9956	-0,0088	0,9527	2,5827	0,9945	1,3950	0,9953	-0,0134
TK2	0,9938	0,749	0,9948	-0,0077	0,9546	2,3124	0,9985	1,1237	0,9945	-0,0118
TK3	0,9917	1,210	0,9938	-0,0128	0,9621	3,711	0,9976	1,881	0,9932	-0,0194
TK4	0,9963	1,160	0,9971	-0,0122	0,9463	3,5197	0,9986	1,5853	0,9969	-0,0186
TK5	0,9942	1,720	0,9966	-0,0185	0,9512	5,2403	0,9946	2,0354	0,9959	-0,028
TK6	0,9924	0,910	0,9936	-0,0095	0,9583	2,7832	0,9974	1,5189	0,9933	-0,0145
TK7	0,9943	0,399	0,9946	-0,0041	0,937	1,2057	0,9881	0,6133	0,9945	-0,0062
TK8	0,9613	0,567	0,9638	-0,0058	0,9896	1,7924	0,9973	1,3621	0,963	-0,0089

Preglednica XII: Mejne teoretične vrednosti n eksponenta Korsmeyer-Peppasovega modela in mehanizmi sproščanja (levo) ter izračunane vrednosti n eksponenta (desno).

n	Mehanizem sproščanja	n
0,5	Fickov zakon	TK2 (0,81)
$0,5 < n \leq 1$	Ne Fickov zakon-anomalija	TK3 (0,80) TK6 (0,76)
$n > 1$	Super case II transport	TK4 (0,85) TK8 (0,62)

5. SKLEP

S polarizacijskim mikroskopom smo potrdili prisotnost lamelarne strukture v vseh sistemih TK (brez in z vgrajenim AP (1 % (m/m))), z izjemo TK1, ki izkazuje heksagonalno ureditev. Lamelarno strukturo smo določili na podlagi malteških križev, heksagonalno pa s Schlierenovo strukturo. Jasno vidni in najštevilčnejši malteški križi so bili vidni v sistemu TK3 in TK4, ki imata tako optimalno sestavo za tvorbo lamelarne strukture. Z naraščajočim masnim deležem vode v TK je prišlo do upada števila malteških križev, kar nakazuje na manj izrazito lamelarno strukturo. Čeprav dodatek AP ni porušil lamelarne strukture TK, je vgradnja amfifilnega AP vplivala na notranjo strukturo, kar je bilo razvidno v obliki zmanjšanja dobro definiranih malteških križev.

Z *in vitro* sproščanjem AP smo potrdili, da notranja struktura TK vpliva tako na hitrost kot tudi obseg sproščanja AP. Kljub najbolj izraziti lamelarni strukturi v sistemih TK3 in TK4, se je največ AP sprostilo iz TK5, iz česar sklepamo, da ima TK5 kljub manj izraziti lamelarni strukturi najbolj optimalno sestavo za sproščanje AP. Potrdili smo, da se z višanjem deleža vode v TK sproščanje AP upočasni, in sicer zaradi višje viskoznosti TK in pa večjih razdalj med posameznimi lamelami. Slednje so posledica proste vode, ki se razporedi v interlamelarni prostor, kar pomeni da je AP kot amfifilna molekula posledično delno vgrajen v interlamelarni prostor, delno pa je lokaliziran v področju polarnih glav amfifilnih molekul. Grafična primerjava profilov sproščanja je pokazala, da se AP načeloma hitreje in večjem obsegu sprošča iz lamelarnih TK v primerjavi s TK heksagonalne strukture zaradi notranje prostorske ureditve lamelarnih TK s paralelnim drsenjem plasti in olajšano difuzijo AP.

Kvantitativna primerjava profilov sproščanja z od modela neodvisnimi in odvisnimi metodami je pokazala, da so vsi profili dejansko podobni med seboj z razliko v obsegu sproščanja do 10 %. Poleg tega sta bila profila TK1-TK6 in TK1-TK2 skoraj identična z razliko manjšo od 1 %.

S primerjavo eksperimentalnih rezultatov sproščanja z matematičnimi modeli pa smo ugotovili, da se sproščanje AP iz TK najbolj približa kinetiki Korsmejer-Peppas ali kinetiki 1. reda.

Z diplomsko nalogo smo potrdili vpliv strukture TK na sproščanje AP. Dokazali smo, da lamelarna struktura TK zagotavlja podaljšano sproščanje AP, pri čemer tovrstno sproščanje prepreči prekomerno kopičenje AP v povrhnjici kože in zagotavlja podaljšano antioksidativno zaščito kože. Poudarjamo, da *in vitro* študije ne odražajo povsem realnega stanja *in vivo*, so pa pomemben del razvoja lamelarnih TK, ki veljajo za potencialni dermalni dostavni sistem AP, zato so nadaljne raziskave *in vitro* vrednotenja dermalne absorpcije logično nadaljevanje raziskovalnega dela.

6. LITERATURA

1. Matsumura Y, Ananthaswamy HN: Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Tox App Pharmacol* 2004; 195: 298-308
2. Perez-Sanchez A, Barrajon-Catalan E, Caturla N, Castillo J, Benavente-Garcia O, Alcaraz M, Micol V: Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J Photochem Photobio B: Biology* 2014; 136: 12–18
3. Sheldon RP, Durham MD: Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Derm* 2003; 48: 1-22
4. Špiclin P, Gašperlin M: Vitamin C in koža. *Farm Vestn* 2001; 52: 287-293.
5. Elektronski vir: <http://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/en/index1.html>,
(dostop 11.02.2015)
6. Ratnam D. Venkat, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNV Ravi: Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Controll Rel* 2006; 113: 189-207.
7. Rowe RC, Sheskey PJ QM: Handbook of pharmaceutical excipients, 6th, Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, London, 2009: 46-47.
8. Gašperlin M, Gosenca M: Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Exp Opinion Drug Deliv* 2011; 8: 905-919.
9. Teeranachaidekul V, Junyaprasert VB, Souto EB, Muller RH: Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. *Int J Pharm* 2008; 354: 227-234.
10. Junmin J: Chemical Synthesis of Ascorbyl Palmitate in [BMIM]BF₄. *Adv Mat Res* 2011; 236-238: 1962-1965.
11. Gopinath D, Ravi D, Rao BR, Apte SS, Renuka D, Rambhau D: Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int J Pharm* 2004; 271: 95-113.

12. Elektronski vir:

<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260868.htm>

(dostop 1.8.2013)

13. Andersen FA: Final Report on the Safety Assessment of Ascorbyl Palmitate, Ascorbyl Dipalmitate, Ascorbyl Stearate, Erythorbic Acid, and sodium Erythorbate. *Int J Tox* 1999; 18: 1-26

14. Kristl J, Volk B, Gašperlin M, Šentjerc M, Jurkovič P: Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19: 181-189.

15. Gosenca M, Bešter-Rogač M, Gašperlin M: Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. *Eur J Pharm Sci* 2013; 50: 114-122.

16. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int J Pharm* 2001; 222: 271-279.

17. Austria R, Semenzato A, Bettero A: Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15: 795-801.

18. Gosenca M, Obreza A, Pečar S, Gašperlin M: A New Approach for Increasing Ascorbyl Palmitate Stability by Addition of Non-irritant Co-antioxidant. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11: 1485-1492.

19. Ramis-Ramos G: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2nd, Academic Press, Oxford, 2003: 265-275.

20. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P: Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 2007; 46: 244-282.

21. McMullen LM, Hawrysh ZJ, Lin C, Tokarska B: Ascorbyl Palmitate Efficacy in Enhancing the Accelerated storage stability of canola oil. *J Food Sci* 1991; 56: 1651-1654

22. Beddows CG, Jagait C, Kelly MJ: Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. *Food Chem* 2001; 73: 255-261

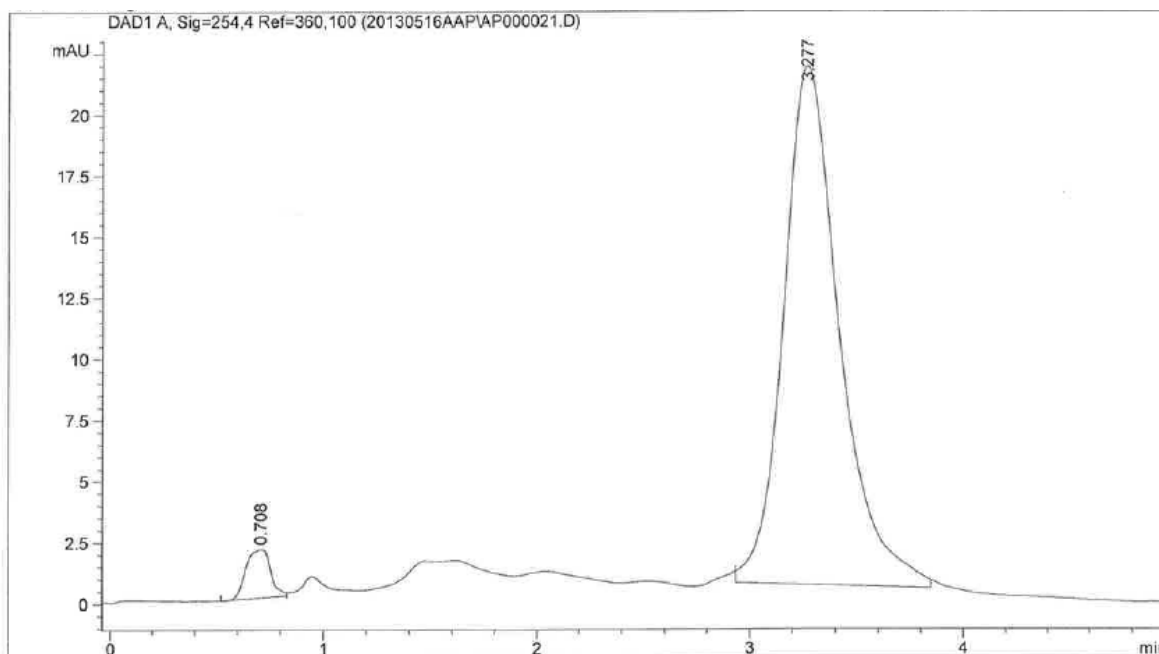
23. Jurkovič P, Šentjerc M, Gašperlin M, Kristl J, Pečar S: Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56: 59-66.
24. Gosenca M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje. *Farm Vestn* 2011; 62: 15-25.
25. Tambade SA, Aloorkar NH, Dabane NS, Osmani RM, Kale BB, Indalkar YR: Formulation and Evaluation of Novel Gel Containing Liquid Crystals of Naproxen. *Am J Adv Drug Deliv* 2014; 2: 364-386
26. Müller-Goymann CC: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 343-356.
27. Elektronski vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_crystal (dostop 19.8.2013)
28. Burducea G: LYOTROPIC LIQUID CRYSTALS I. SPECIFIC STRUCTURES. *Romanian Reports in Physics* 2004; 56: 66-86.
29. Bunjes H, Rades T: Thermotropic liquid crystalline drugs. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 807-816.
30. Kumar R, Katare OP: Lecithin organogels as a potential phospholipidstructured system for topical drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 2005; 6: 298-310.
31. Fiume Z: Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin. *Int J Tox* 2001; 20: 21-45.
32. Poša M, Ćirin D, Krstonošić V: Physico-chemical properties of bile salt-Tween 80 mixed micelles in the viewpoint of regular solution theory. *Chem Eng Sci* 2013; 98: 195-202.
33. Khan F, Li M, Schlindwein W: Comparison of In Vitro Dissolution Tests for Commercially Available Aspirin Tablets. *Dissolution Technol* 2013; 20: 48-58.
34. Lucero MJ, Claro C, Casas M, Jiménez-Castellanos MR: Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer® vs Franz cells. *Carbohydr Polym* 2013; 92: 149-156.

35. Gosenca M, Gašperlin M: Membrane za in vitro testiranje dermalne absorpcije. *Farm Vestn* 2009; 60: 8-13.
36. Poet TS, McDougal JN: Skin absorption and human risk assessment. *Chem-Biol Interact* 2002; 140: 19-34.
37. Barbero AM, Frederick Frasch H: Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol in Vitro* 2009; 23: 1-13.
38. Costa P, Sousa Lobo JM: Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J of Pharm Sci* 2001; 13: 123-133.
39. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P: Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 2010; 67: 217-223.
40. Baumgartner S, Klančar U: Izzivi in možni tehnološki pristopi za doseganje kinetike 0.reda iz ogrodnih tablet. *Farm Vestn* 2009; 60: 257-264
41. Singhvi, Singh M: REVIEW: IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. *Int J Pharm Stud Res* 2011; 2: 77-84.
42. Elektronski vir: <http://www.scribd.com/doc/56125788/In-Vitro-Drug-Release-Kinetics-amp-Release-Profile-Comparison> (dostop 15.8.2013)
43. Stancampiano AHS, Puglisi G, Pignatello R: Effect of Lipophilicity of Dispersed Drugs on the Physicochemical and Technological Properties of Solid Lipid Nanoparticles. *The Open Drug Deliv J* 2008; 2: 26-32.
44. Honda K, Enoshima T, Oshikata T, Kamiya K, Hamamura M, Yamaguchi N, Namakura K, Oguma Y, Fujiwara S, Takobe M, Sono A, Kawasaki T, Nasu M, Otsubo K, Wakigawa K: Toxicity studies of Asahi Kasei PI purified phosphatidylinositol from soy lecithin. *J Toxicol Sci* 2009; 34: 265-280.
45. Čerpnjak K: Vrednotenje koloidnih sistemov z lecitinom za dermalno aplikacijo askorbilpalmitata, *Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana* 2010.

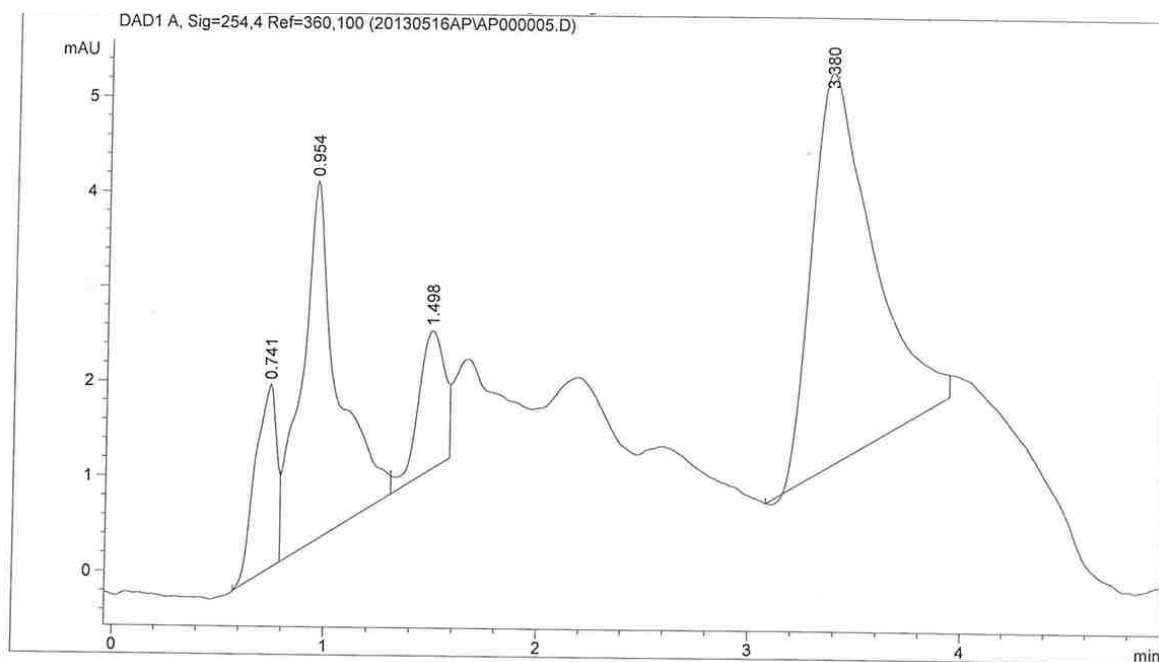
46. Graca M, Bongaerts Jeroen HH, Stokes JR, Granick S: Friction and adsorption of aqueous polyoxyethylene (Tween) surfactants at hydrophobic surfaces. *J Coll Inter Sci* 2007; 315: 662-670.
47. Karjibana RA, Basria M, Rahman MBA, Salleh AB: Structural Properties of Nonionic Tween 80 Micelle in Water Elucidated by Molecular Dynamics Simulation. *2nd Int Conf Chem Chemical Process (ICCCP 2012)* 2012; 3: 287-297.
48. Simões SI, Tapadas JM, Marques CM, Cruz MEM, Martins MBF, Cevc G: Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26: 307-317.
49. Ambrožič M: Optična polarizacijska mikroskopija za analizo struktur v tekočih kristalih. *VAKUUMIST* 1998; 18: 19-22.
50. Costa FO, Sousa JJS, Pais AACC, Formosinho SJ: Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *J Control Release* 2003; 89: 199-212.
51. Karabulut I: Effects of a-tocopherol, b-carotene and ascorbyl palmitate on oxidative stability of butter oil triacylglycerols. *Food Chem* 2010; 123: 622-627.
52. Li C, Yang X, Li X, Chen J, Qiao X: Development of a model for predicting hydroxyl radical reaction rate constants of organic chemicals at different temperatures. *Chemosphere* 2014; 95: 613-618.
53. Kos S. Vrednotenje vpliva deleža vodne faze in vgradnje askorbilpalmitata na strukturo tekočih kristalov za dermalno dostavo učinkovin, *Diplomska naloga*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011.
54. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare: *European pharmacopeia*, 7th, Strasbourg, 2014: 1420
55. Elektronski vir: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=ascorbyl+palmitate>, (dostop 10.02.2015)
56. Guo J, Ping Q, Sun G, Jiao C: Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm* 2000; 194: 201-207.

57. Makai M, Csányi E, Némethb ZS, Pálinkás J, Er'ó's I: Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 2003; 256: 95-107.

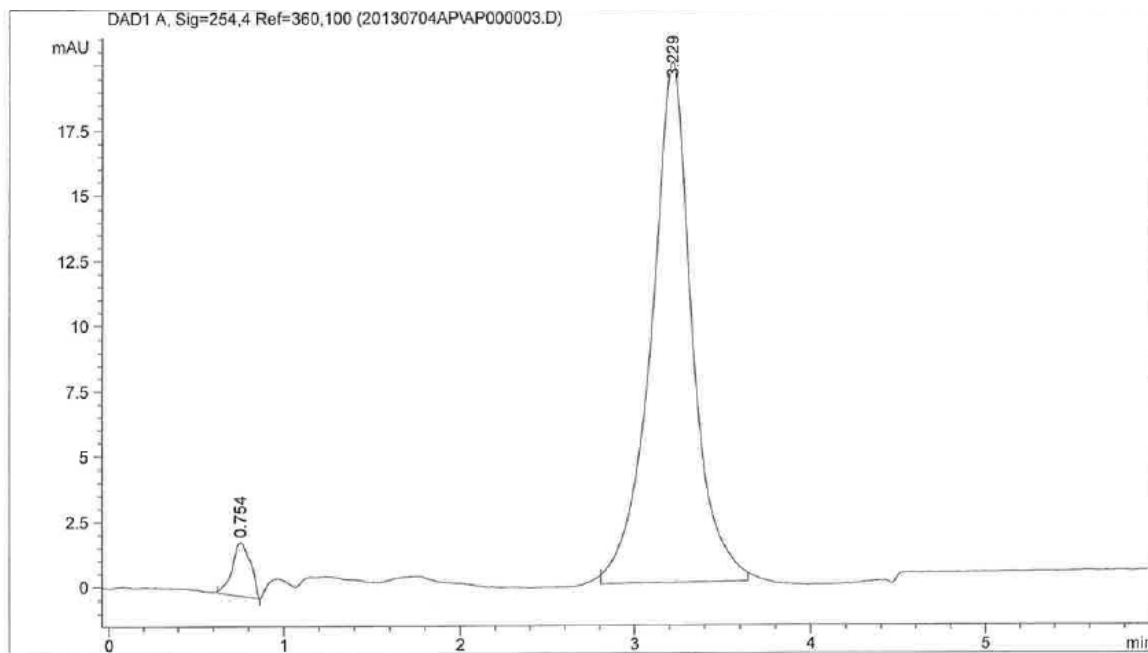
7. PRILOGE



Slika 14: Kromatografski vrh AP neustreznega RM (IPM + SDS (nasičena raztopina)).



Slika 15: Kromatografski vrh AP neustreznega RM (IPM + 1% Tween® 40).



Slika 16: Kromatografski vrh AP ustreznega RM (0,9 % NaCl + 50 % EtOH).