

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KASTELIC

**RAZVOJ SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMOV Z  
RESVERATROLOM**

**DEVELOPMENT OF SELF-MICROEMULSIFYING DRUG  
DELIVERY SYSTEMS WITH RESVERATROL**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

*Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.*

*Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in delovni mentorici Katarini Bolko, mag. farm. za pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Tatjani Hrovatič za pomoč pri delu v laboratoriju. Hvala staršem in prijateljem, ki so me podpirali v času študija.*

*Izjava*

*Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.*

*Nina Kastelic*

*Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.*

*Član komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.*

## KAZALO VSEBINE

<b>1. POVZETEK</b> .....	<b>4</b>
<b>2. SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>6</b>
<b>3. UVOD</b> .....	<b>7</b>
3.1. RESVERATROL.....	7
3.1.1. UČINKI.....	9
3.1.2. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE.....	9
3.1.3. METABOLIZEM.....	11
3.2. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI .....	11
3.2.1. KLASIFIKACIJSKI SISTEM NA LIPIDIH OSNOVANIH DOSTAVNIH SISTEMOV .....	11
3.2.2. SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI IN MIKROEMULZIJE .....	13
3.2.3. (PSEVDO)TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM .....	14
3.2.4. KOMPONENTE ZA IZDELAVO SMES .....	16
3.2.4.1. OLJA .....	16
3.2.4.2. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI (PAS) - EMULGATORJI.....	18
3.2.4.3. SOTOPILA .....	20
3.2.4.4. OSTALE POMOŽNE SNOVI .....	21
3.2.5. MEHANIZEM SAMO(MIKRO)EMULGIRANJA .....	21
3.2.6. PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV.....	22
<b>4. NAMEN DELA</b> .....	<b>25</b>
<b>5. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>26</b>
5.1. MATERIALI .....	26
5.1.1. RICINUSOVO OLJE .....	27
5.1.2. OLIVNO OLJE .....	27
5.1.3. CAPMUL <sup>®</sup> MCM .....	28
5.1.4. CAPMUL <sup>®</sup> PG-8 .....	28
5.1.5. MIGLYOL <sup>®</sup> 812 .....	28
5.1.6. CREMOPHOR <sup>®</sup> EL.....	29
5.1.7. CREMOPHOR <sup>®</sup> RH 40 .....	29

5.1.8. CREMOPHOR® RH 60 .....	29
5.1.9. PECEOL.....	30
5.1.10. GLICEROL.....	30
5.2. METODE.....	31
5.2.1. TOPNOST RESVERATROLA V IZBRANIH POMOŽNIH SNOVEH.....	32
5.2.2. HPLC ANALIZA .....	32
5.2.3. IZDELAVA (PSEVDO)TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV.....	33
5.2.4. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE SMES ZA RESVERATROL .....	34
5.2.5. VISKOZNOST SMES.....	34
5.2.6. ODPORNOST SMES NA TEMPERATURNE SPREMEMBE.....	34
5.2.7. KOMPATIBILNOST SMES S TRDIMI ŽELATINSKIMI KAPSULAMI.....	34
5.2.8. MERJENJE ČASA SAMO-(MIKRO)EMULGIRANJA .....	35
5.2.9. DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC IN ZETA POTENCIALA MIKROEMULZIJE.....	35
5.2.10. In vitro TEST RAZTAPLJANJA RESVERATROLA IZ SMES.....	35
5.2.10.1. PRIPRAVA MEDIJEV ZA TEST RAZTAPLJANJA.....	36
<b>6. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>38</b>
6.1. TOPNOST RESVERATROLA V IZBRANIH POMOŽNIH SNOVEH.....	38
6.2. IZDELAVA (PSEVDO)TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV .....	39
6.3. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE SMES ZA RESVERATROL .....	50
6.4. VISKOZNOST SMES .....	51
6.5. ODPORNOST SMES NA TEMPERATURNE SPREMEMBE.....	54
6.6. KOMPATIBILNOST SMES Z TRDIMI ŽELATINSKIMI KAPSULAMI.....	54
6.7. ČAS SAMO-MIKROEMULGIRANJA, VELIKOST KAPLJIC IN ZETA POTENCIAL IZ SMES NASTALIH MIKROEMULZIJ.....	56
6.7.1. MERJENJE ČASA SAMO-MIKROEMULGIRANJA.....	56
6.7.2. MERJENJE VELIKOSTI KAPLJIC MIKROEMULZIJ.....	57
6.7.3. MERJENJE ZETA POTENCIALA MIKROEMULZIJ.....	60
6.8. IN VITRO TEST RAZTAPLJANJA RESVERATROLA IZ SMES .....	62
<b>7. SKLEPI .....</b>	<b>64</b>

**8. VIRI IN LITERATURA ..... 67**

## 1. POVZETEK

Resveratrol, eden najbolj preučevanih polifenolov v zadnjem desetletju, je dobro permeabilna, vendar v vodi slabo topna učinkovina, ki je podvržena obsežnemu predsistemskemu metabolizmu. Najdemo ga v več kot 70 vrstah rastlin, predvsem v lupinici grozdnih jagod. Ugotovljenih je bilo veliko pozitivnih učinkov resveratrola na človeški organizem, kot so antioksidativno, protivnetno in protitumorno delovanje ter protektivno delovanje na kardio-vaskularni sistem, vendar so ti učinki prisotni le pri zadostni plazemski koncentraciji učinkovine in njenih metabolitov. Plazemsko koncentracijo resveratrola lahko povečamo s povečanjem njegove topnosti, zato so zelo aktualni različni pristopi za povečanje topnosti. Eden od teh pristopov je tudi razvoj samomikroemulgirajočih sistemov (SMES), ki v stiku z vodnim medijem gastrointestinalnega trakta, ob rahlem mešanju, hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa O/V z velikostjo kapljic manjšo od 50 – 100 nm. SMES so sestavljeni iz lipidov, površinsko aktivnih snovi, enega ali več hidrofilnih sotopil ali koemulgatorjev in zdravilne učinkovine, vendar je nastanek mikroemulzij možen le pri določenih razmerjih olja, površinsko aktivnih snovi in vode. Za določitev ustreznih deležev posameznih sestavin v SMES, je potrebno izdelati (psevdo)trikomponentne fazne diagrame, iz katerih je razvidno območje nastanka mikroemulzije. Samo-mikroemulgiranje SMES pa se najverjetneje pojavi, kadar je sprememba entropije disperzije večja od energije, potrebne za povečanje površine pri dispergiranju. Poleg izboljšanja raztapljanja lahko z vgraditvijo zdravilne učinkovine v SMES vplivamo tudi na pot njene peroralne absorpcije, ki lahko poteka po portalnem ali limfnem obtoku, pri slednjem pa se tudi izognemo predsistemskemu metabolizmu zdravilne učinkovine v jetrih.

Namen magistrskega dela je razvoj SMES z resveratrolom, s katerimi želimo izboljšati topnost resveratrola. Zaradi možne toksičnosti površinsko aktivnih snovi želimo z optimizacijo oljne faze pripraviti SMES s čim manjšo vsebnostjo emulgatorjev.

Na podlagi rezultatov nasičene topnosti smo za oljno fazo SMES izbrali srednjedolgoverižni monoglicerid/diglicerid Capmul<sup>®</sup> MCM, dolgoverižni triglicerid ricinusovo olje ali kombinacijo obeh, za emulgator pa različne Cremophorje. Pripravljenim SMES smo z izdelavo (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama določili območje nastanka mikroemulzij. Primerjali smo, kako na območje nastanka mikroemulzij in na njihove lastnosti, vpliva kemizem lipida in emulgatorja. Izdelanim SMES smo določili

solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol, viskoznost, odpornost na temperaturne spremembe ter kompatibilnost s trdimi želatinskimi kapsulami. Z *in vitro* testom raztapljanja smo primerjali raztapljanje resveratrola iz izbranih SMES s samim resveratrolom v pufrih s pH 1,2 in pH 6,8.

Ugotovili smo, da imajo SMES, ki kot oljno fazo vsebujejo samo ricinusovo olje, večjo viskoznost v primerjavi z ostalimi. Dodatek resveratrola pa je viskoznost vseh sistemov zelo povečal. Viskoznost SMES pa vpliva na čas samo-mikroemulgiranja in s tem tudi na čas sproščanja resveratrola iz SMES, saj imajo nizko viskozni SMES krajše čase samo-mikroemulgiranja in sproščanja resveratrola v primerjavi z visoko viskozni. Po dispergiranju sistemov v različnih medijih ima večina mikroemulzij ustrezno velikost kapljic (pod 50 – 100 nm) in nizek PDI, ki pa se ob dodatku resveratrola v SMES zelo povečata.

Pridobljeni rezultati potrjujejo, da so izdelani SMES zaradi nizke vsebnosti površinsko aktivnih snovi, hitrih časov nastanka mikroemulzij in dobre solubilizacijske kapacitete za resveratrol, obetaven dostavni sistem za peroralno aplikacijo.

**2. SEZNAM OKRAJŠAV**

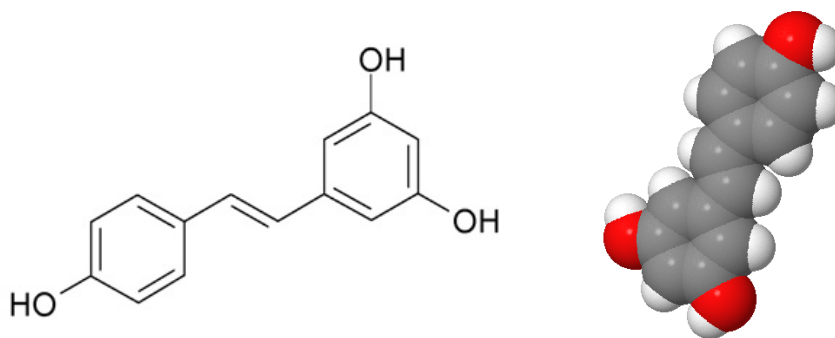
DG	diglicerid
dv-MK	dolgoverižna maščobna kislina
dv-TG	dolgoverižni triglicerid
GIT	gastrointestinalni trakt
GRAS status	status varne snovi (angl.: generally recognized as safe)
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
MG	monoglicerid
MK	maščobna kislina
O/V	emulzija olje v vodi
PAS	površinsko aktivna snov
PDI	polidisperzni indeks
SES	samoemulgirajoči sistem
sdv-MG/DG	srednjedolgoverižni monoglicerid/diglicerid
sdv-MK	srednjedolgoverižna maščobna kislina
sdv-TG	srednjedolgoverižni triglicerid
SMES	samomikroemulgirajoči sistem
TG	triglicerid
UV sevanje	ultravijolično sevanje
V/O	emulzija voda v olju
ZU	zdravilna učinkovina



### 3. UVOD

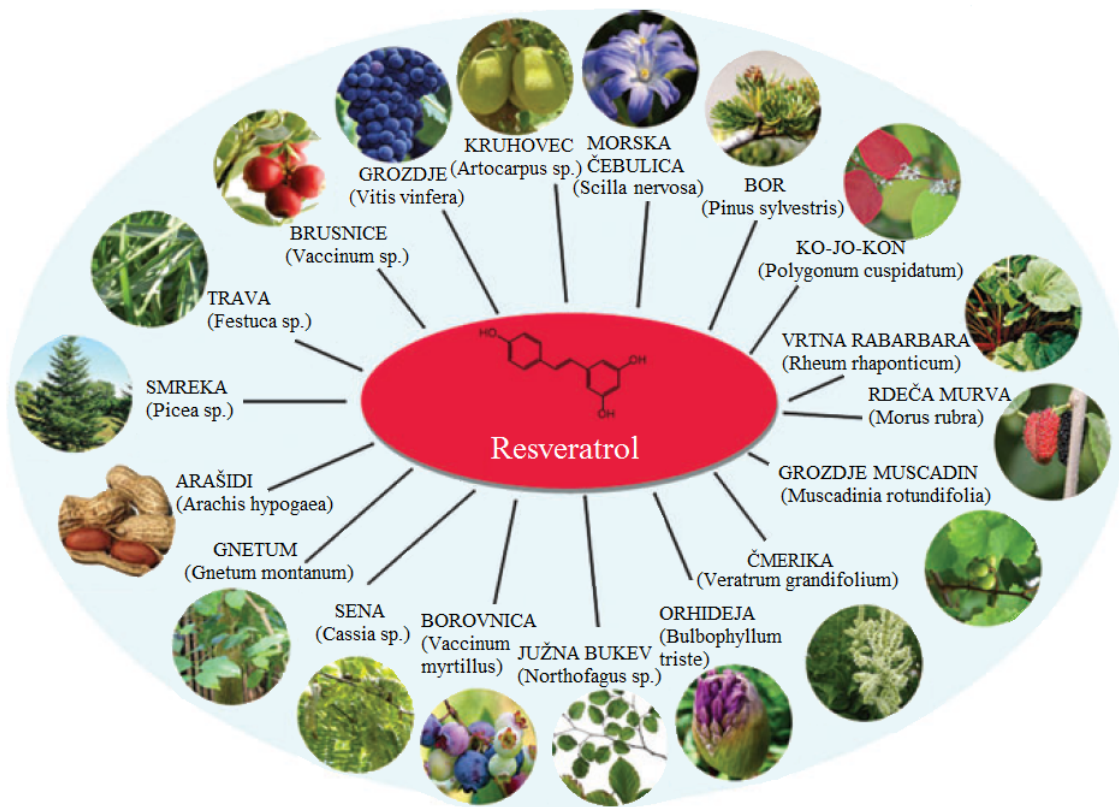
#### 3.1. RESVERATROL

Resveratrol je bel prašek z rahko rumenim odtenkom. Kemijsko ime resveratrola po IUPAC nomenklaturi je 3,5,4'-trihidroksistilben. Njegova molekula je sestavljena iz dveh fenolnih obročev, ki ju povezuje vinilenska skupina (slika 1) (1).



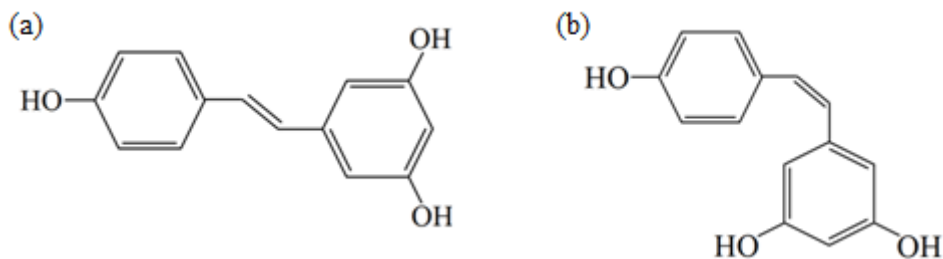
Slika 1: Kemijska struktura resveratrola (1, 2).

Resveratrol je bil prvič izoliran leta 1940 iz vrste čmerike (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), najdemo pa ga v več kot 70 različnih vrstah rastlin in njihovih plodovih, kot so grozdje, borovnice, murva, arašidi... (slika 2) (3, 4). Rastline navadno resveratrol sintetizirajo kot obrambni mehanizem pri izpostavljenosti glivam ali mikrobov, zato resveratrol uvrščamo med fitoaleksine (5). Fitoaleksini so snovi, ki jih rastline sintetizirajo za povečanje odpornosti na različne glive, bakterije, viruse ter stresne dejavnike, kot so npr. ultravijolično sevanje (UV sevanje), sprememba temperature, nihanje razpoložljivosti vode in hranil ter prisotnost različnih onesnažil (npr. težkih kovin, pesticidov in plinov) (3, 6). Zaradi odziva vinske trte na glivično okužbo nastane v lupinici grozdnih jagod od 50 do 100 µg resveratrola na gram svežih lupinic grozdnih jagod (7, 8).



Slika 2: Viri resveratrola v rastlinah (4).

Znana sta dva izomera resveratrola in sicer *trans*- ter *cis*-resveratrol (slika 3). *Trans*-resveratrol je stabilnejša oblika od *cis*-resveratrola. Pod vplivom svetlobe se *trans*-resveratrol pretvarja v *cis*-resveratrol, dokler se ne vzpostavi ravnotežje med izomeroma. Resveratrol je v vodi slabo topen (0,03 g/L), zato se razvijajo različni pristopi za izboljšanje njegove topnosti. Za raztapljanje se lahko uporabljajo različna topila, kot sta etanol in dimetilsulfoksid, vendar lahko njihova uporaba privede do obarjanja resveratrola v vodnem mediju ali škodljivih učinkov na celice tako *in vitro* kot *in vivo* (1, 9, 10, 11).

Slika 3: Strukture *trans*-resveratrola (a) in *cis*-resveratrola (b) (10).

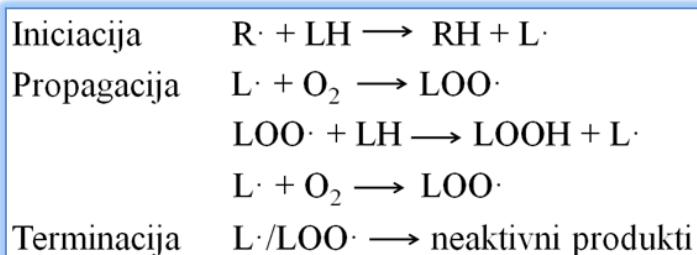
### 3.1.1. UČINKI

Z epidemiološkimi raziskavami so odkrili povezavo med uživanjem rdečega vina in pojavnostjo bolezni srca in ožilja, imenovano »francoski paradoks«, pri kateri domnevajo, da je resveratrol vsaj delno odgovoren za zmanjšano pojavnost kardio-vaskularnih bolezni v Franciji. Raziskave so pokazale, da je pojavnost srčnega infarkta v Franciji za 40 % nižja kot v ostali Evropi, čeprav je njihova tradicionalna prehrana zelo bogata z nasičenimi maščobami. Resveratrol ščiti srce in ožilje na veliko načinov, kot so obramba pred ishemično-reperfuzijsko poškodbo, spodbujanje vazorelaksacije, zaščita in ohranjanje nespremenjenega endotelija, anti-aterosklerozne lastnosti, zaviranje oksidacije lipoproteinov z nizko gostoto, zmanjševanje agregacije trombocitov in ima estrogeno podobno delovanje. Pozitiven učinek resveratrola pa se kaže tudi v njegovem protitumornem delovanju, saj zavira karcinogenezo (iniciacijo, promocijo in progresijo), angiogenezo in metastaziranje. Delovanje proti raku lahko pripišemo njegovim antioksidativnim lastnostim ali pa zaviranju različnih encimov npr. ciklooksigenaze tipa 1 in 2. Protitumorno delovanje pa je lahko tudi posledica sprožitve apoptoze, kar so dokazali na različnih vrstah celic, kot so celice raka debelega črevesja, raka prostate, raka dojke in JB6 epidermalne celice. V JB6 celicah resveratrol v koncentraciji 2,30 – 40  $\mu$ M zavira tumorski promotor TPA ali epidermalni rastni dejavnik (EGF) in celično transformacijo, enak odmerek pa sproži tudi apoptozo, ki poteka po ceramidno-sfingomielinazno-neodvisni poti. Poleg učinkov na kardio-vaskularni sistem in protitumornega delovanja ima resveratrol tudi antioksidativno delovanje, protivnetno delovanje, antidepresivom podobno delovanje, izkazuje pa tudi pozitiven učinek pri sladkorni bolezni, debelosti in Alzheimerjevi bolezni (1, 3, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16).

### 3.1.2. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

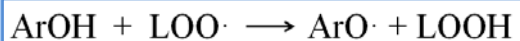
Antioksidant je vsaka snov, endogenega (npr. glutation in ubikinon oz. koencim Q10) ali eksogenega (npr. resveratrol) izvora, ki lahko upočasni ali prepreči oksidacijo celičnih sestavin na različnih stopnjah. Radikali so snovi z vsaj enim nesparjenim elektronom, ki je vzrok za kemično reaktivnost radikala. V bolezenskih stanjih se poveča produkcija endogenih radikalov in/ali reaktivnih kisikovih spojin, kar lahko vodi do škodljivih učinkov, imenovanih oksidativni stres. Vir radikalov pa sta lahko tudi UV sevanje. Proti oksidativnem stresu manjšega obsega se lahko celice ubranijo z razpoložljivimi

endogenimi antioksidanti. Kadar pa je oksidativni stres večjega obsega, se pojavijo motnje v presnovi celice, poškodbe DNK, poškodbe membranskih transportnih sistemov, večanje koncentracije kalcijevih ionov v celici ter lipidna peroksidacija. Lipidna peroksidacija poteka v treh stopnjah, kot je prikazano na sliki 4. Prva stopnja je iniciacija, kjer reaktivni radikal reagira z vodikom iz lipida, pri tem pa nastane lipidni radikal. V drugi stopnji, ki se imenuje propagacija, lipidni radikal reagira z molekulo tripletnega kisika, da nastane lipidni peroksilni radikal. Lipidni peroksilni radikal odtegne vodik iz druge molekule lipida, pri čemer zopet nastane lipidni radikal, ki znova reagira s tripletnim kisikom. Ta verižna reakcija se ponavlja, dokler ne zmanjka kisika ali lipida. Zadnja stopnja je terminacija, kjer radikali reagirajo med seboj in tvorijo neaktivne produkte (9, 17).



Slika 4: Stopnje lipidne peroksidacije ( $R\cdot$ - radikal,  $LH$ - lipid,  $L\cdot$ -lipidni radikal,  $LOO\cdot$ -lipidni peroksilni radikal) (9).

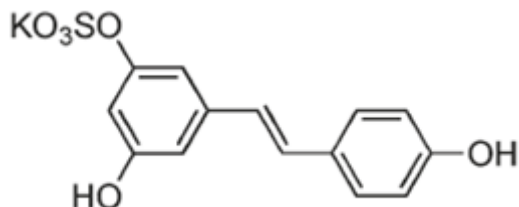
Za zmanjšanje obsega lipidne peroksidacije se uporabljajo antioksidanti, ki lahko delujejo po različnih mehanizmih. Resveratrol se uvršča med fenolne antioksidante, ki zavirajo lipidno peroksidacijo z lovljenjem radikalov, kot je naprimer lipidni peroksilni radikal, in jih pretvorijo v manj reaktivne radikale z dolgo življenjsko dobo (slika 5) (9).



Slika 5: Mehanizem delovanja fenolnih antioksidantov ( $ArOH$ - fenolni antioksidant,  $LOO\cdot$ -lipidni peroksilni radikal,  $ArO\cdot$ -radikal z dolgo življenjsko dobo) (9).

### 3.1.3. METABOLIZEM

Za resveratrol je značilna hitra in učinkovita peroralna absorpcija, vendar tudi hiter metabolizem do sulfatov in glukuronidov. V jetrih se metabolizira preko encima citokrom P450 (CYP 3A4). Plazemski razpolovni čas resveratrola je 8-14 minut, medtem ko je razpolovni čas njegovih metabolitov približno 9,4 ure. *In vitro* študije so pokazale, da vsaj nekaj učinkov resveratrola lahko pripišemo tudi njegovim metabolitom. Hoshino in sodelavci so dokazali manjše protitumorno delovanje sulfatnih metabolitov v primerjavi z resveratrolom, z izjemo kalijeve soli resveratrol-3-O-sulfata (slika 6), ki pa ima primerljivo ali celo boljšo aktivnost od resveratrola. Zaradi višjih plazemskih koncentracij metabolitov v primerjavi s plazemskimi koncentracijami resveratrola, imajo metaboliti kljub manjši učinkovitosti velik pomen (15, 18, 19).



Slika 6: Najučinkovitejši metabolit: kalijeva sol resveratrol-3-O-sulfata (19).

## 3.2. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

### 3.2.1. KLASIFIKACIJSKI SISTEM NA LIPIDIH OSNOVANIH DOSTAVNIH SISTEMOV

Zaradi velikega števila zdravilnih učinkovin (ZU) z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi, se pojavlja potreba po razvijanju različnih pristopov za povečanje topnosti, kot je tudi razvoj na lipidih osnovanih sistemov. Slednje je Pouton razvrstil v štiri razrede (preglednica I) in s tem olajšal izbiro najustreznejše formulacije za specifično ZU, glede na njene fizikalno-kemijske značilnosti ter omogočil lažjo interpretacijo *in vivo* študij (20)

Preglednica I: Razvrstitev na lipidih osnovanih sistemov glede na njihovo sestavo in lastnosti nastale disperzije (MG-monogliceridi, DG-digliceridi, TG-trigliceridi, PAS-površinsko aktivne snovi, HLB- hidrofilno-lipofilno ravnotežje) (20, 21).

Uvrstitev sistema	Sestava sistema	Značilnosti disperzije	Velikost kapljic (nm)
<b>I razred</b>	Gliceridi (MG, DG, TG) (100 %)	Groba disperzija	> 500
<b>II razred</b>	Gliceridi (MG, DG, TG) (40-80 %), PAS s HLB<12 (20-60 %)	Motna disperzija	100 - 250
<b>IIIa razred</b>	Gliceridi (MG, DG, TG) (40-80 %), PAS s HLB>12 (20-40 %), hidrofilna sotopila (0-40 %)	Rahlo motna disperzija	100 - 250
<b>IIIb razred</b>	Gliceridi (MG, DG, TG) (<20 %), PAS s HLB>12 (20-50 %), hidrofilna sotopila (20-50 %)	Bistra disperzija	50 - 100
<b>IV razred</b>	PAS s HLB<12 (0-20 %), PAS s HLB>12 (20-80 %), hidrofilna sotopila (0-80 %)	Raztopina micelov	< 50

V razred I so uvrščene enostavne oljne raztopine, sestavljene iz trigliceridov (TG), digliceridov (DG) in monogliceridov (MG), ki spadajo med ne-emulgirajoče sisteme. Ti sistemi imajo GRAS status, saj ne vsebujejo površinsko aktivnih snovi (PAS), ki imajo lahko toksične učinke. Odsotnost PAS pa lahko zmanjša možnost za spontano dispergiranje lipidnega sistema. Za sisteme tega razreda je značilna enostavna izdelava, dobra kompatibilnost s trdimi in mehкими želatinskimi kapsulami, slabo dispergiranje v vodi in slaba topnost ZU, ki niso zelo lipofilne; za absorpcijo ZU pa je najprej potrebna prebava glicerida (20, 21). Sistemi razreda II pa poleg gliceridov vsebujejo tudi lipofilne PAS, ki izboljšajo solubilizacijsko kapaciteto sistema in lajšajo emulgiranje sistema v prebavnem traktu, zato jih imenujemo samoemulgirajoči sistemi (SES), pri katerih pa obstaja majhna verjetnost za obarjanje ZU po dispergiranju (2, 3). Ko pa se gliceridom doda vodotopne PAS in/ali hidrofilna sotopila, nastanejo sistemi razreda III, ki se ob stiku z vodo hitro razpršijo in tvorijo fine submikronske disperzije, ki so dovolj majhne, da

dajejo disperziji transparenten videz. Za absorpcijo ZU iz teh sistemov ni potrebna prebava olja. Razred III se deli na razreda IIIa in IIIb. Sistemi razreda IIIa, ki jih imenujemo tudi SES, vsebujejo manjši delež vodotopnih komponent in ob dispergiranju tvorijo emulzije; obstaja pa tudi možnost za obarjanje ZU med dispergiranjem ter težjo prebavo lipidnega sistema. V razred IIIb pa uvrščamo sisteme z velikim deležem vodotopnih komponent, ki pri dispergiranju tvorijo mikroemulzije, zato jih imenujemo samomikroemulgirajoči sistemi (SMES), za katere je značilna večja verjetnost obarjanja ZU med dispergiranjem (20, 22). V razred IV pa so uvrščeni sistemi, sestavljeni le iz vodotopnih PAS in sopolil, ki imajo veliko solubilizacijsko kapaciteto za mnoge ZU. Ti sistemi po dispergiranju tvorijo raztopino micelov, pri čemer obstaja velika verjetnost za obarjanje ZU, morda pa se sistem tudi ne bo prebavil (20, 21).

### **3.2.2. SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI IN MIKROEMULZIJE**

SMES so izotropne zmesi, ki ob stiku z vodnim medijem gastrointestinalnega trakta (GIT), ob rahlem mešanju, hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi (O/V) z velikostjo kapljic manjšo od 50 – 100 nm in ozko porazdelitvijo velikosti kapljic. Te zmesi sestavljajo lipidi, PAS, eno ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev ter ZU (21, 23, 24).

Mikroemulzije so bistre oziroma transparentne disperzije olja in vode, ki so nizko viskozne, nastanejo spontano in so termodinamsko stabilizirane z medfaznim filmom PAS. Transparentnost je posledica majhne velikosti kapljic (< 140 nm), spontano pa nastanejo zaradi nizke medfazne napetosti. Za termodinamsko stabilnost mikroemulzij je potrebna negativna prosta energija nastanka sistema, ki jo lahko ponazorimo z enačbo 1. V enačbi upoštevamo, da se zaradi nastanka majhnih kapljic poveča medfazna površina in entropija sistema, ker pa je medfazna napetost zelo nizka, prevlada entropijski člen, ki je vzrok za negativno prosto energijo sistema. Ker je nizko medfazno napetost težko doseči, se poleg emulgatorja uporabljajo tudi koemulgatorji. Izbrana emulgator in koemulgator morata zagotoviti gibljiv film, ki se dovolj hitro preoblikuje okrog majhnih kapljic, imeti pa morata tudi ustrezne hidrofilno-lipofilne lastnosti za želen tip mikroemulzije (25, 26, 27).

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

(Enačba 1)

$\Delta G_f$ .....sprememba proste energije

$\gamma$ ..... medfazna napetost med dvema nemešajočima se tekočinama

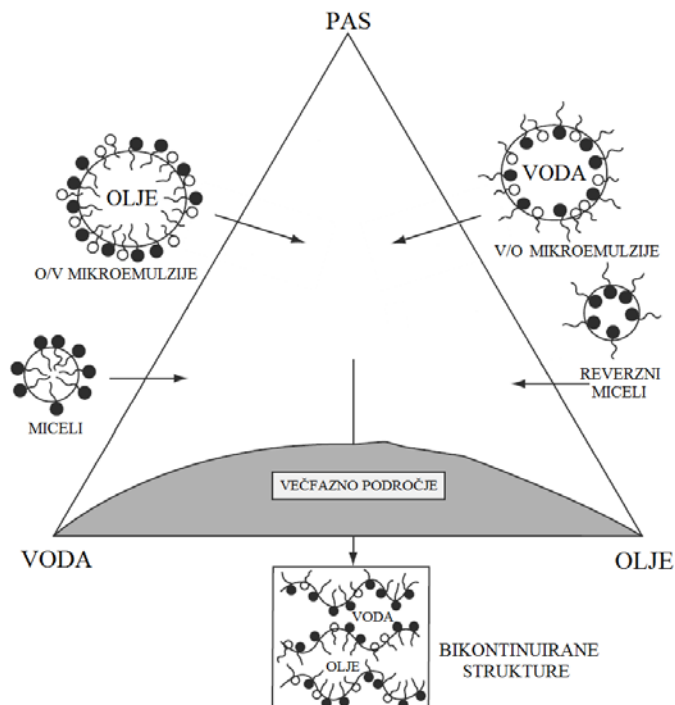
$\Delta A$ .....sprememba površine

$T$ .....temperatura

$\Delta S$ .....sprememba entropije sistema pri nastanku mikroemulzije (26)

### 3.2.3. (PSEVDO)TRIKOMPONENTNI FAZNI DIAGRAM

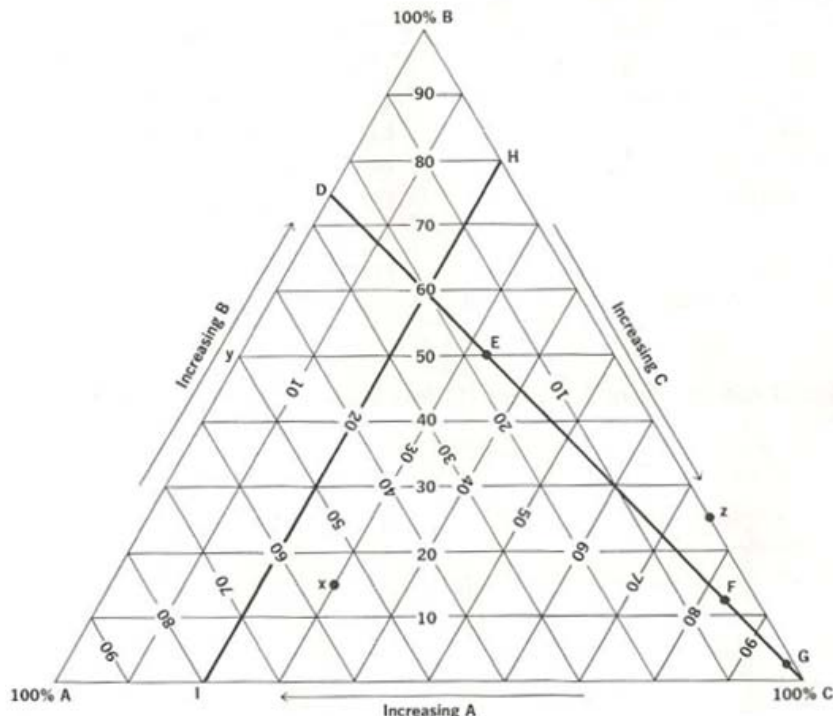
Pri načrtovanju SMES je potrebno posvetiti veliko pozornost njegovi sestavi, saj mikroemulzija nastane le pri določenih razmerjih olja, PAS in vode. Ta ustrezna razmerja pa so za vsako kombinacijo olja in PAS drugačna, zato je potrebno izdelati (psevdo)trikomponentne fazne diagrame, iz katerih je razvidno, v katerem območju nastane mikroemulzija. Ob mešanju olja, vode in PAS v različnih razmerjih, nastanejo različni tipi mikroemulzij, različni miceli, in bikontinuirane strukture (slika 7), kar je odvisno od kemizma, koncentracije posameznih sestavin, temperature in tlaka (25, 27).



Slika 7: Shema planarnega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama, ki nastane ob mešanju olja, PAS in vode (27).



Za opis vpliva štirih različnih komponent v sistemu (npr. ene ali dveh oljnih faz, ene ali dveh PAS in vode) bi potrebovali diagram v obliki tetraedra, zato se za lažjo interpretacijo faznega diagrama pogosteje uporabi (psevdo)trikomponentni fazni diagram, kjer se dve komponenti združi v konstantnem razmerju. Na sliki 8 je prikazan (psevdo)trikomponentni fazni diagram v obliki enakostraničnega trikotnika, kjer oglišča predstavljajo 100 % izbrane komponente, stranice pa zmes dveh komponent (AB, AC ali BC). Vse možne kombinacije komponent (A, B in C) predstavlja površina znotraj trikotnika. Vzporednice stranici AB predstavljajo naraščajoč delež komponente C, ki narašča od 0 % na stranici AB do 100 % v oglišču C. Odčitamo lahko tudi delež komponente A s pomočjo vzporednice stranici BC in delež komponente B s pomočjo vzporednice stranici AC. Vsaka narisana vzporednica (npr. premica HI) predstavlja sisteme, v katerih je delež ene komponente konstanten. V primeru premice HI vsi sistemi vzdolž premice vsebujejo 20 % komponente C in različne koncentracije A in B. V primeru ko pa gre premica skozi oglišče v neko točko na drugi strani trikotnika (npr. premica DC) takrat vse točke na premici predstavljajo sisteme, ki imajo konstantno razmerje dveh komponent. V primeru premice DC sta konstantni komponenti A in B (28).



Slika 8: Interpretacija planarnega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama (28).

### 3.2.4. KOMPONENTE ZA IZDELAVO SMES

Samo-mikroemulgiranje poteče le pri uporabi določenih kombinacij ter razmerij olja in PAS ter ustrezni temperaturi. Iz tega razloga je pri izdelavi SMES zelo pomemben pravilen izbor komponent sistema, na katerega vplivajo predvsem lastnosti komponent, ki so navedene v preglednici II (20, 24).

Preglednica II: Lastnosti, ki vplivajo na izbiro komponent SMES (20).

#### POMEMBNE LASTNOSTI KOMPONENT SMES

Regulatorne zahteve (iritabilnost, toksičnost, poznavanje materiala)

Solubilizacijska kapaciteta

Medsebojno mešanje komponent

Morfologija pri sobni temperaturi (temperatura tališča)

Sposobnost samo-dispergiranja in spodbujanja formulacije k samo-dispergiranju

Prebavljivost in usoda prebavljivih produktov

Kompatibilnost s kapsulami

Čistota, kemijska stabilnost

Cena materiala

Pri izbiri primernih PAS moramo še posebej upoštevati njihovo toksičnost in iritabilnost. Toksičnost PAS praviloma narašča v naslednjem zaporedju: neionske < anionske < kationske, zato se navadno za peroralne na lipidih osnovane sisteme uporabljajo neionske PAS. Pomembna pa je tudi kemijska stabilnost, zato se v formulacije vgrajujejo pomožne snovi z majhno količino peroksidov in aldehydov (20).

#### 3.2.4.1. OLJA

Ena od najpomembnejših sestavin na lipidih osnovanih sistemov so olja oz. lipidi, ki so najpogosteje naravnega ali polsinteznega izvora. Uporabljajo se predvsem zaradi njihove sposobnosti, da lahko raztopijo veliko količino lipofilnih ZU in povečajo njihovo absorpcijo (24).

Večinoma se uporabljajo različno nasičeni TG in MG/DG z različnimi dolžinami verig maščobnih kislin (MK). TG so pridobljeni predvsem iz rastlinskih olj, ki so običajna sestavina človeške prehrane in so kot takšni netoksični, popolnoma prebavljivi in se dobro

absorbirajo skozi steno prebavnega trakta. Sestavlja jih mešanica estrov glicerola z večinoma nenasičenimi dolgoverižnimi maščobnimi kislinami (dv-MK), zato jih poznamo pod imenom dolgoverižni trigliceridi (dv-TG). Na podlagi dolžine ogljikovodikovih verig MK se TG ločijo na kratkoverižne TG (manj kot 5 C atomov), srednjedolgoverižne trigliceride (sdv-TG) (6-12 C atomov) in dolgoverižne-TG (dv-TG) (več kot 12 C atomov). TG so zelo lipofilni, kar lahko vpliva na solubilizacijsko kapaciteto nekaterih ZU (ne zelo lipofilnih), ki je odvisna od števila polarnih estrskih skupin. Za solubilizacijo takšnih ZU so zato bolj primerni sdv-TG, saj imajo več estrskih skupin v 1 g čiste komponente kot pa dv-TG. Prav tako pa so sdv-TG v primerjavi z dv-TG zaradi krajših verig MK pri sobni temperaturi tekoči, med prebavo v GIT se lažje hidrolizirajo ter so zaradi odsotnosti dvojnih vezi manj podvrženi peroksidaciji in zato kemijsko bolj stabilni. Sdv-TG se pridobivajo predvsem iz kokosovega olja, primeri virov dv-TG pa so olivno, sezamovo, sojino in ricinusovo olje, slednje pa je edini vir gliceril ricinoleata z hidroksilno skupino pripeto na alkilno verigo. Polsintezni gliceridi (MG, DG in TG), kot so tudi Capmul<sup>®</sup> MCM, Miglyol<sup>®</sup> 812N in Peceol, so kompatibilni s trdimi in mehкими želatinskimi in se uporabljajo kot vehikli za raztapljanje, emulgatorji, vlažilci in v različnih farmacevtskih oblikah za nadzorovano sproščanje (20, 29, 30).

Med mešane gliceride lahko uvrstimo zmesi MG, DG in TG, pridobivajo pa se z delno hidrolizo TG. Njihova kemijska sestava je odvisna od izvora gliceridov in stopnje hidrolize. V primerjavi s TG, imajo mešani dolgoverižni gliceridi boljše solubilizacijsko kapaciteto za lipofilne ZU, razen v primeru zelo lipofilnih ZU. V sistemih razreda II in III lahko mešani dolgoverižni gliceridi olajšajo medsebojno mešanje in samo-(mikro)emulgiranje. Veliko se uporabljajo mešani srednjedolgoverižni gliceridi, saj imajo veliko sposobnost raztapljanja in emulgiranja ter so manj občutljivi na oksidacijo, vendar je njihova prebava lahko problematična (20).

Delež lipida v formulaciji lahko vpliva na absorpcijo ZU, predvsem zaradi izboljšanja raztapljanja ZU v GIT in zaradi prebave lipidov, ki povzroči povečano izločanje sokov trebušne slinavke in žolča, ki lahko deluje kot emulgator (31). Z ustrezno izbiro lipida pa lahko vplivamo na pot peroralne absorpcije ZU. Kratko in srednjedolgoverižne maščobne kisline (sdv-MK) se transportirajo preko portalnega krvnega obtoka direktno v centralni krvni obtok in se le v manjši meri vgradijo v hilomikrone. Dv-MK in MG pa se najprej

preestrijo do TG, ki se vgradijo v hilomikrone, ti pa vstopijo v limfni obtok, nato pa preko prsne mezgovnice v centralni krvni obtok (22, 23).

### 3.2.4.2. POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI (PAS) - EMULGATORJI

PAS oz. emulgatorji so sestavina na lipidih osnovanih sistemov razredov II-IV, ki se porazdelijo po medfazni površini, znižajo medfazno napetost in tvorijo micele, ki omogočijo razrtapljanje v njih vgrajene lipofilne ZU. Zaradi njihove amfifilne narave so PAS navadno sposobne v vodi raztopiti velike količine lipofilne ZU. Za nastanek mikroemulzije mora PAS močno znižati medfazno napetost, omogočati gibljivost emulgatorskega filma na medfazni površini in imeti ustrezno HLB vrednost. Količina PAS pa ima lahko vpliv na velikost kapljic (mikro)emulzije po dispergiranju SMES. Najpogosteje se uporabljajo neionske PAS z visokim HLB, kot so glikozilirani etoksilirani gliceridi in polisorbati (npr. Tween 80). Zaradi varnosti je priporočena uporaba PAS naravnega izvora, saj so varnejši od sintetičnih, vendar se slabše samo-(mikro)emulgirajo. Neionske PAS so zaradi manjše toksičnosti bolj primerne od ionskih PAS, kljub temu pa imajo lahko vpliv na permeabilnost črevesne stene. Priporočena je uporaba čim manjših koncentracij PAS, saj imajo slednje lahko dražeče učinke. Običajno SMES vsebujejo 30 – 60 % PAS z visoko HLB vrednostjo in hidrofilitnostjo, kar omogoča hiter nastanek mikroemulzij O/V in njihovo dobro porazdelitev po prebavnem traktu (23, 24). Glede na mešanje z vodo delimo PAS na hidrofobne in hidrofilne, kar je odvisno od njihovega hidrofilno-lipofilnega ravnotežja.

#### a) Hidrofilno lipofilno ravnotežje (HLB)

Pri izbiri pomožnih snovi je zelo pomembno njihovo hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB), saj vpliva na vrsto nastalih asociacijskih struktur in na tip nastale disperzije, ki je lahko tipa voda v olju (V/O) ali O/V. HLB je merilo relativne hidrofilnosti in lipofilnosti amfifilnih molekul, ki imajo hidrofilna in lipofilna področja. Vrednost HLB se lahko določi eksperimentalno ali pa se izračuna na podlagi moči in velikosti posameznih delov molekule, kot prikazuje enačba 2 (27, 29).

$$HLB = 20 \times \frac{Mh}{M} \quad (\text{Enačba 2})$$

HLB.....HLB vrednost

Mh.....molska masa hidrofilnega dela molekule

M.....molska masa celotne molekule (32)

Vsak tip emulzije zahteva določeno HLB vrednost in tej vrednosti se prilagodi izbor PAS. Hidrofilni PAS imajo HLB večji od 10, lipofilni pa imajo HLB manjši od 10. Ustrezen HLB se lahko doseže tudi z kombinacijo različnih PAS, kjer se izbere en emulgator z višjo, drugega pa z nižjo HLB vrednostjo od tiste, ki je zahtevana. Delež vsakega emulgatorja se izračuna po enačbi 3 in 4 (27, 29).

$$\% PAS_A = \frac{100 (HLB - HLB_B)}{HLB_A - HLB_B} \quad (\text{Enačba 3})$$

$$\% PAS_B = 100 - \% PAS_A \quad (\text{Enačba 4})$$

HLB.....zahtevana HLB vrednost oljne faze

HLB<sub>A</sub>.....HLB vrednost emulgatorja A

HLB<sub>B</sub>.....HLB vrednost emulgatorja B

% PAS<sub>A</sub>.....delež emulgatorja A

% PAS<sub>B</sub>.....delež emulgatorja B (29)

#### b) Hidrofobni emulgatorji

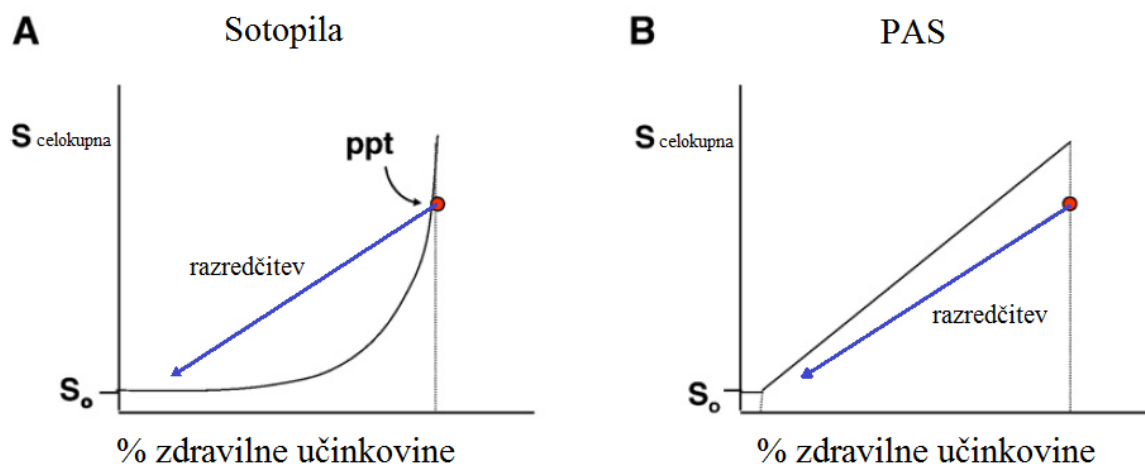
Hidrofobni emulgatorji so amfifilne snovi, ki imajo bolj lipofilen značaj, zato je njihova HLB vrednost od 8 do 12. Z vodo se ne mešajo v vseh razmerjih in ne tvorijo micelov ampak reverzne micelle, olajšajo pa proces samo-(mikro)emulgiranja, kot tudi mešanje hidrofilnih in lipofilnih komponent v na lipidih osnovanih sistemih. V na lipidih osnovanih sistemih razreda II se najpogosteje uporabljajo oleatni estri, kot sta polioksietilen (20) sorbitan trioleat (polisorbat 85 oz. Tween 85) ali polioksietilen (25) gliceril trioleat (Tagat TO), ki imata HLB vrednost med 11 in 11,5 (20).

## c) Hidrofilni emulgatorji

Hidrofilni emulgatorji pa so amfifilne snovi z bolj hidrofilnim značajem. Z vodo se dobro mešajo in imajo HLB vrednost 12 ali več. Običajno se uporabljajo za izdelavo SMES in SES oziroma v na lipidih osnovanih sistemih razreda III in IV. Ko je presežena kritična micelarna koncentracija teh emulgatorjev v vodi, se začne tvorba micelov. Primera hidrofilnega emulgatorja sta derivata ricinusovega olja Cremophor<sup>®</sup> RH 40 in Cremophor<sup>®</sup> EL, izmed teh pa ima prvi nasičene alkilne verige, drugi pa je nenasičen (20).

## 3.2.4.3. SOTOPILA

Sotopila izboljšajo topnost PAS in ZU v oljni fazi, v sistemih z visokim deležem hidrofilnih PAS pa lahko tudi olajšajo dispergiranje. Pomembno je, da se sotopila ustrezno mešajo z oljno fazo sistema. Za izdelavo SMES se najpogosteje uporabljajo etanol, propilenglikol in polietilenglikol. Za povečanje solubilizacijske kapacitete mora biti delež sotopila precej visok, kar lahko privede do obarjanja ZU po dispergiranju sistema v vodi. Vpliv redčenja lipidnih sistemov s sotopili oziroma PAS na topnost ZU, je prikazan na sliki 9. Nizkomolekularna sotopila pa so nezdržljiva s trdimi in mehкими želatinskimi kapsulami, zato lahko sotopila izhlapijo skozi ovojnico želatinskih kapsul, kar lahko privede do obarjanja ZU (20, 24).



Slika 9: Vpliv redčenja lipidnih sistemov s sotopili oziroma PAS na topnost ZU (S<sub>0</sub>- intrinzična topnost ZU v vodi, modra črta- koncentracija ZU v sistemu, ko razredčimo 80 % nasičene topnosti ZU z vodo) (20).

#### **3.2.4.4. OSTALE POMOŽNE SNOVI**

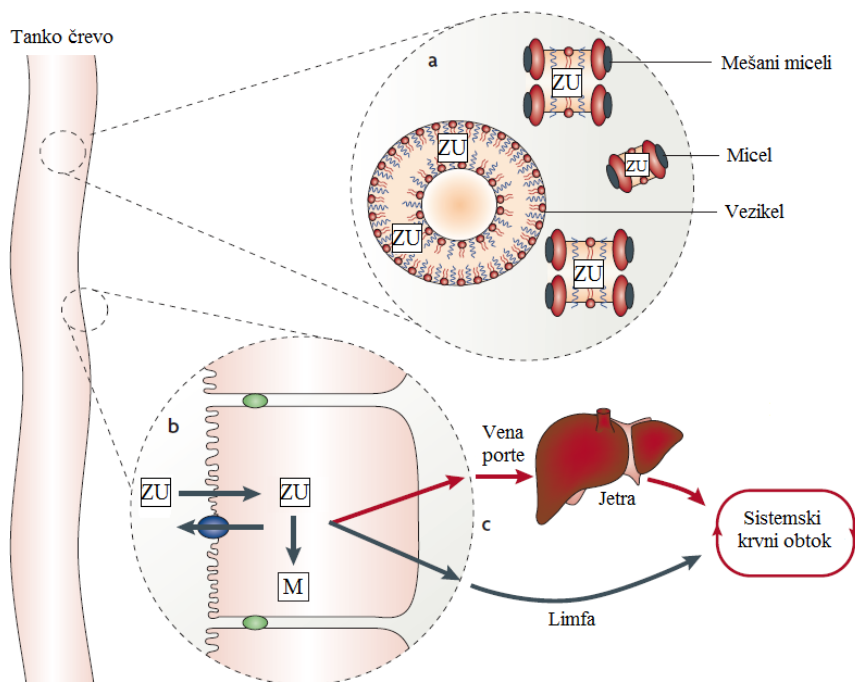
Za preprečitev oksidacije ZU in nenasičenih alkilnih verig MK, lahko v formulacijo vključimo tudi lipofilne antioksidante, med katere uvrščamo  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, butilhidroksitoluen, butilhidroksianizol in propilgalat (20).

#### **3.2.5. MEHANIZEM SAMO(MIKRO)EMULGIRANJA**

Mehanizem samo(mikro)emulgiranja še ni popolnoma poznan. Eden izmed predlaganih mehanizmov je, da se samo-(mikro)emulgiranje lahko pojavi, kadar je sprememba entropije ob nastanku disperzije večja od energije potrebne za povečanje površine pri dispergiranju. Samo-(mikro)emulgiranje poteče spontano že ob rahlem mešanju, ko je prosta energija nastalega sistema negativna ali zelo nizko pozitivna. Ob stiku vode in mešanice olja/neionskega emulgatorja nastane medfazna površina med oljem in kontinuirano vodno fazo. Ko voda vdre v bližino medfazne površine, se najprej solubilizira, dokler ni dosežena maksimalna solubilizacijska kapaciteta, nadaljne prehajanje vode pa vodi do tvorbe dispergiranih tekočih kristalov. Zaradi rahlega mešanja voda predre medfazni film, kar povzroči nastanek emulzijskih kapljic (24, 33).

### 3.2.6. PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV

Na lipidih osnovani sistemi imajo lahko vpliv na absorpcijo lipofilnih ZU in s tem na njihovo biološko uporabnost. Poznamo tri načine, kako lipidi in lipofilne pomožne snovi vplivajo na absorpcijo, biološko uporabnost ter razporeditev ZU po peroralni aplikaciji (slika 10) (34).



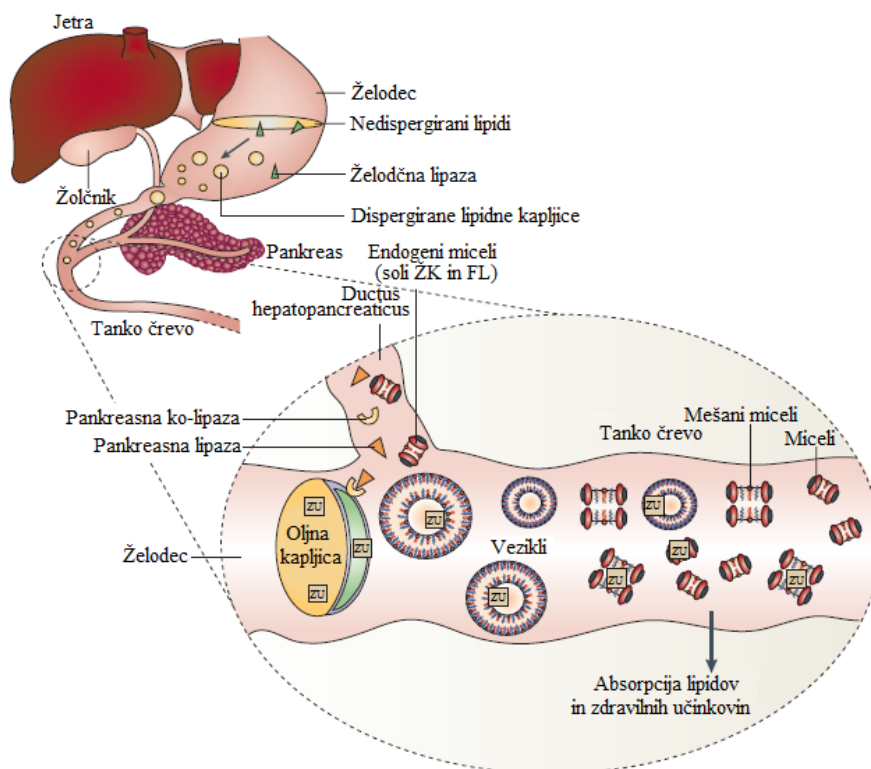
Slika 10: Vpliv lipidov in lipidnih pomožnih snovi na absorpcijo ZU (M- nastajanje metabolitov) (34).

Lipidi lahko spremenijo črevesno okolje, kar lahko povzroči nastanek veziklov, micelov in mešanih micelov, ki izboljšajo solubilizacijo ZU (slika 10a). V SMES vgrajena ZU je pri prehodu skozi GIT ves čas raztopljena, s tem pa se izognemo omejitvam povezanim z raztapljanjem. Prav tako pa lahko lipidi vplivajo na transportne in metabolne procese na osnovi enterocitov, kar ima lahko vpliv na absorpcijo ZU, efluks ter nastanek in porazdeljevanje metabolitov v enterocitu (slika 10b). Z izbiro lipida pa lahko spremenimo transport ZU v sistemski krvni obtok, saj lahko transport poteka preko portalne vene ali limfnega obtoka (slika 10c), slednji potuje direktno v sistemski krvni obtok, s čemer se izognemo pred-sistemskemu metabolizmu ZU v jetrih (34).

Peroralno zaužiti lipidi prehajajo kemično nespremenjeni v želodec, kjer spodbudijo izločanje želodčne lipaze, ki prebavi TG do DG in MK (slika 11). Prebavljeni lipidi



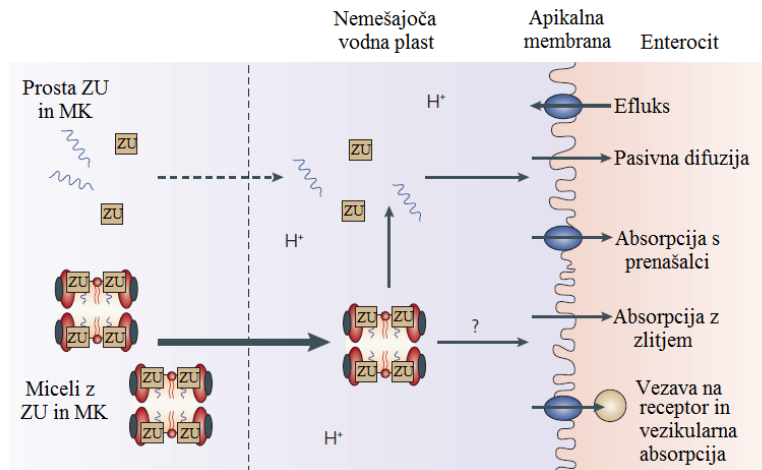
spodbudijo izločanje endogenih žolčnih lipidov, fosfolipidov, žolčnih soli in holesterola iz žolčnika v tanko črevo ter izločanje pankreasnega soka z lipazo in ko-lipazo iz trebušne slinavke. Višje koncentracije žolčnih soli vključijo prebavljene lipide v koloidne strukture, kot so multi- in unilamelarni vezikli, mešani miceli in miceli, ki povečajo raztapljanje prebavljenih maščob in ZU v tankem črevesju. Prebava lipidov pa se zaključi pod vplivom pankreasne lipaze in ko-lipaze (34).



Slika 11: Prebava lipidov in raztapljanje ZU v tankem črevesju (FL-fosfolipidi, soli ŽK-soli žolčnih kislin). Površina oljne kapljice je že prebavljena in je sestavljena iz MK (modra barva) in MG (zelena barva), notranjost pa vsebuje še neprebavljene TG (rumena barva) (34).

Mehanizem prehoda produktov lipolize in raztopljenih lipofilnih ZU v enterocit še ni popolnoma poznan, vendar je bilo predlagano nekaj teorij (slika 12). Oviro za absorpcijo prebavljenih lipidov in lipofilnih ZU skozi lumen tankega črevesja predstavlja nemešajoča vodna plast. Slednja predstavlja mejo med tekočino v tankem črevesju in membrano enterocita ter s črevesno sluznico ustvari kislo mikrookolje. Po prehodu skozi nemešajočo vodno plast se lahko proste MK in lipofilne ZU absorbirajo v enterocit s pasivno difuzijo ali s pomočjo prenašalcev, lahko pa pride tudi do njihovega efluksa nazaj v lumen črevesja

s pomočjo sekretornih prenašalcev. V prisotnosti micelov pa se lahko miceli zlijejo z membrano enterocita ali pa poteče vezikularna absorpcija naprimer z vezavo na receptor, ki se nahaja na membrani enterocita (34).



Slika 12: Možni mehanizmi prenosa ZU, MG in MK iz tekočine tankega črevesja v enterocit (34).

Po vstopu prebavnih produktov v enterocit se lahko direktno transportirajo v centralni krvni obtok skozi jetra ali pa se v endoplazmatskem retikulumu iz njih ponovno sintetizirajo TG. Slednji nato postanejo jedro črevesnih lipoproteinov, ki se sprostijo iz enterocita v medceličnino. Glavni lipoproteini, ki jih izločajo enterociti, se imenujejo hilomikroni, ki zaradi velikosti (50 – 500 nm) ne morejo prehajati endotelij kapilar, zato preidejo v limfne vode črevesnih resic, nato pa se prenesejo preko mezgovnice v centralni krvni (34).

#### 4. NAMEN DELA

Resveratrol je eden najbolj preučevanih polifenolov v zadnjem desetletju, vendar ima kljub dobri permeabilnosti slabo biološko uporabnost zaradi nizke topnosti in obsežnega predsistemskega metabolizma. Za doseg želenih učinkov resveratrola na človeški organizem je potrebna zadostna plazemska koncentracija resveratrola in njegovih metabolitov, zato bomo skušali z vgradnjo resveratrola v SMES izboljšati njegovo topnost in s tem tudi biološko uporabnost.

Najprej bomo izbrali pomožne snovi, ki imajo največjo solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol. Nato pa bomo s titracijsko metodo izdelali več različnih (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov, kjer bomo uporabili izbrane pomožne snovi v različnih kombinacijah in določili območje nastanka mikroemulzij. Zaradi možne toksičnosti emulgatorjev, bomo z optimizacijo oljne faze razvili SMES z najmanjšo možno vsebnostjo emulgatorjev, ki bi ob stiku z vodno fazo še vedno tvorili mikroemulzije po celotni razredčitveni premici. Najustreznejše SMES bomo ovrednotili glede na solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol, viskoznost, odpornost na temperaturne spremembe in kompatibilnost s trdimi želatinskimi kapsulami. Pripravljene SMES bomo dispergirali v različnih medijih (pufer pH 1,2, pufer pH 6,8 in prečiščena voda) in nastalim mikroemulzijam določili velikost kapljic, zeta potencial in hitrost samo-mikroemulgiranja. Na podlagi teh rezultatov bomo izdelali optimalne SMES z resveratrolom, jih napolnili v trde želatinske kapsule in določili hitrost sproščanja resveratrola iz SMES v pufrih s pH 1,2 in pH 6,8.

## 5. MATERIALI IN METODE

### 5.1. MATERIALI

Materiali, ki smo jih uporabljali pri izdelavi in vrednotenju SMES, so zbrani v preglednici III.

Preglednica III: Uporabljeni materiali.

<b>MATERIAL</b>	<b>PROIZVAJALEC</b>	<b>DRŽAVA</b>
<b>Bidestilirana voda</b>	FFA, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko	Slovenija
<b>Capmul<sup>®</sup> MCM</b>	Abitec Corporation	ZDA
<b>Capmul<sup>®</sup> PG-8</b>	Abitec Corporation	ZDA
<b>Cremophor<sup>®</sup> EL</b>	BASF Chem Trade GmbH	Nemčija
<b>Cremophor<sup>®</sup> RH40</b>	BASF Chem Trade GmbH	Nemčija
<b>Cremophor<sup>®</sup> RH60</b>	BASF Chem Trade GmbH	Nemčija
<b>Glicerol</b>	Fluka analytical	ZDA
<b>Kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck KGaA	Nemčija
<b>Kalijev klorid (KCl)</b>	Merck KGaA	Nemčija
<b>Klorovodikova kilina Titrisol<sup>®</sup> za 1000 mL 1 mol/L HCl</b>	Merck KGaA	Nemčija
<b>Metanol (HPLC-gradient grade)</b>	Panreac Quimica S.A.U.	Španija
<b>Miglyol<sup>®</sup> 812</b>	Sasol Germany GmbH	Nemčija
<b>Natrijev hidroksid (NaOH)</b>	Merck KGaA	Nemčija
<b>Ocetna kislina (96 %) (CH<sub>3</sub>- COOH)</b>	Merck KGaA	Nemčija
<b>Olivno olje</b>	Henry Lamotte	Nemčija
<b>Peceol</b>	Gattefossé	Francija
<b>Resveratrol</b>	Calbiochem, Merck	Nemčija
<b>Ricinusovo olje</b>	Lex	Slovenija

### 5.1.1. RICINUSOVO OLJE

Ricinusovo olje je bistro, skoraj brezbarvno ali blede rumeno viskozno olje z blagim vonjem in okusom, ki je na začetku blag, nato pa postane rahlo oster. Pridobiva se iz semen rastline kloščevca (*Ricinus communis* Linne.) in vsebuje dv-TG, kot so ricinolna kislina (87 %), oleinska kislina (7 %), linolenska kislina (3 %), palmitinska kislina (2 %), stearinska kislina (1 %) in sledovi dihidroksistearinske kisline. Zahtevani HLB ricinusovega olja je 14. Netopno je v vodi in mineralnem olju, meša pa se s kloroformom, dietiletrom, etanolom, metanolom, petroletrom in led-očetno kislino. Pogosto je sestavina v kozmetičnih, prehranskih in farmacevtskih izdelkih. Lahko ima vlogo topila in oljnega vehikla, ima pa tudi emolientno delovanje. V farmaciji pa se ga najpogosteje uporablja v kremah in mazilih, lahko se ga pa tudi v tabletah, kapsulah, očesnih emulzijah in kot topilo v intramuskularnih injekcijah. Ricinusovo olje ima tudi odvajalni učinek, vendar se ga kot odvajalo ne uporablja več. Ima GRAS status, lahko pa povzroči blago draženje kože in oči, pri peroralni uporabi pa lahko veliki odmerki povzročijo slabost in bruhanje (29, 35).

### 5.1.2. OLIVNO OLJE

Olivno olje je bistra, rumena oljnata tekočina, ki se pridobiva iz zrelih plodov oljke (*Olea europaea*). Je mešanica dv-TG, kot so miristinska ( $\leq 0,5$  %), palmitinska (7,5-20,0 %), palmitoleinska (0,3-5,0 %), heptadekanojska ( $\leq 0,3$  %), stearinska (0,5-5,0 %), oleinska (55,0-83,0 %), linolna (3,5-21,0 %), linolenska ( $\leq 0,9$  %), arašidna ( $\leq 0,6$  %), eikozanojska ( $\leq 0,4$  %), behenojska ( $\leq 0,2$  %) in lignocerična ( $\leq 1,0$  %), prisotni pa so tudi steroli. Zahtevani HLB olivnega olja je med 7 in 8. Slabo se topi v etanolu, meša pa se z etrom, kloroformom, petroletrom in ogljikovim disulfidom. Uporablja se v mazilih, obličjih, kapsulah, raztopinah in kot vehikel za oljne injekcije, primeren je tudi za farmacevtske oblike s ciljano dostavo. V kozmetičnih izdelkih ima vlogo topila, ima pa tudi ugoden učinek za kožo in lase, zato je sestavina krem, losjonov, šamponov in balzamov za lase. Olivno olje ni toksično in iritantno, pri prekomernem zaužitju/aplikaciji pa lahko deluje blago odvajalno (29, 35).

### 5.1.3. CAPMUL<sup>®</sup> MCM

Capmul<sup>®</sup> MCM je rahlo bela trdna ali tekoča snov z blagim vonjem po maščobi. Vsebuje zmes srednjedolgoverižnih monogliceridov/digliceridov (sdv-MG/DG), predvsem s kaprilno in kapronsko kislino. Njegova HLB vrednost je 4,7. Dobro raztaplja organske snovi, vključno s steroidi. V farmacevtskih izdelkih ima vlogo vehikla, topila za raztapljanje, emulgatorja in koemulgatorja (predvsem v emulzijah V/O), poveča pa tudi biološko uporabnost ZU in izboljša dermalno absorpcijo ZU. Uporablja se ga za izdelavo krem, losjonov, mazil in šmink. Ker so MG in DG pripravljene iz jedilnih maščob in olj ima Capmul<sup>®</sup> MCM GRAS status, kar pomeni, da je splošno sprejet kot varen. Ne draži kože in oči ter nima neželenih učinkov pri zaužitju (36, 37, 38, 39).

### 5.1.4. CAPMUL<sup>®</sup> PG-8

Capmul<sup>®</sup> PG-8 je brezbarvna bistra tekočina z blagim vonjem. Kemijsko je monoester propilenglikola s sdv-MK, predvsem s kaprilno kislino. Capmul<sup>®</sup> PG-8 ima HLB vrednost 6 in je dobro topilo za slabo topne ZU, izboljša pa tudi njeno biološko uporabnost. Uporablja se kot vehikel v mehkih in trdih želatinskih kapsulah in izboljša absorpcijo ZU v transdermalnih farmacevtskih oblikah. Lahko povzroči draženje kože in oči (29, 40, 41).

### 5.1.5. MIGLYOL<sup>®</sup> 812

Miglyol<sup>®</sup> 812 je bistro, rahlo rumenkasto nevtrarno olje, nevtralnega vonja in okusa. Vsebuje sdv-TG, predvsem s kaprilno in kapronsko kislino, ki so pridobljeni iz kokosovega olja. Topen je v heksanu, toluenu, dietiletru, etilacetatu, acetonu, izopropanolu in etanolu, dobro pa se meša tudi z parafinskimi ogljikovodiki in naravnimi olji. Miglyol<sup>®</sup> 812 ima prav tako GRAS status, kot MK s 6 in 10 ogljikovimi atomi. Peroralno se uporablja v tabletah in dražejih in mehkih želatinskih kapsulah kot spodbujevalec absorpcije, nizkoviskozen nosilec olja in kot polirno sredstvo. V kapljicah, aerosolih in parenteralnih izdelkih ima vlogo vehikla. Pri dermalni uporabi se dobro porazdeli po koži in absorbira ter omogoča dihanje kože. Najdemo ga v kremah, losjonih, maskah, ličilih, masažnih in otroških oljih, kremah za sončenje in parfumih (42).

### **5.1.6. CREMOPHOR® EL**

Cremophor® EL ali polioksil-35-ricinusovo olje je svetlo rumena oljnata tekočina z rahlim značilnim vonjem in HLB vrednostjo med 12 in 14. Vsebuje 83 % hidrofobnih komponent, od katerih glavna sestavina je glicerol polietilenglikol ricinooleat. Hidrofilni del pa je sestavljen iz prostih etilenglikolov in glicerol etoksilatov. Topen je v ricinusovem olju, olivnem olju, kloroformu, vodi, etanolu, MK in maščobnih alkoholih. Uporablja se v peroralnih, parenteralnih in dermalnih farmacevtskih oblikah predvsem, kot neionski emulgator in topilo. Primeren je za izdelavo tekočih farmacevtskih oblik, ki vsebujejo eterična olja, v maščobi topne vitamine in druge hidrofobne snovi. V SMES poveča peroralno biološko uporabnost ZU. Je netoksičen ter neiritirajoč za kožo in oči. Pri stiku vodne raztopine Cremophor® EL in živosrebrovega klorida, fenola ali resorcinola pride do obarjanja Cremophor® EL (35).

### **5.1.7. CREMOPHOR® RH 40**

Cremophor® RH 40 ali polioksil-40-hidrogenirano ricinusovo olje je bela ali rumenkasta poltrdna snov, ki ima rahel značilen vonj in je v vodni raztopini skoraj brez okusa. Njegova HLB vrednost je 14-16 in temperatura tališča 30 °C. Sestavljen je predvsem iz glicerol polietilenglikol oksistearata, ki skupaj z maščobno kislinskimi glicerol poliglikolnimi estri tvorijo hidrofobni del, hidrofilni del pa je sestavljen iz polietilenglikola in glicerol etoksilata. Cremophor® RH 40 je topen v ricinusovem olju, olivnem olju, kloroformu, etanolu, vodi, MK in maščobnih alkoholih. Uporablja se kot solubilizator za lipofilne vitamine, eterična olja in druge snovi v peroralnih, parenteralnih in dermalnih farmacevtskih oblikah ter kot emulgator za maščobe. Je netoksičen ter neiritirajoč za kožo in oči (35, 43).

### **5.1.8. CREMOPHOR® RH 60**

Cremophor® RH 60 ali polioksil-60-hidrogenirano ricinusovo olje je pri sobni temperaturi bele barve in ima v vodni raztopini rahel okus ali vonj. Vsebuje glicerol polietilenglikol oksistearat, ki skupaj z maščobno kislinskimi glicerol poliglikolnimi estri tvorijo hidrofobni del, hidrofilni del pa sestavljata polietilenglikol in glicerol etoksilat. V primerjavi s Cremophorjem® RH 40 pa Cremophor® RH 60 vsebuje večje število polioksietilenskih enot, zato ima večjo molekulsko maso in višjo HLB vrednost, ki se giblje med 15 in 17. Cremophor® RH 60 je topen v ricinusovem olju, olivnem olju,

etanolu, vodi, MK in maščobnih alkoholih. Primeren je za izdelavo peroralnih, parenteralnih in dermalnih farmacevtskih oblik. V SMES se uporablja za izboljšanje peroralne biološke uporabnosti ZU in za zmanjšanje plazemskega očistka lipidne emulzije. Je netoksičen ter neiritirajoč za kožo in oči (35,44).

#### **5.1.9. PECEOL**

Peceol je oranžna oljnata tekočina z značilnim vonjem, ki se lahko strdi pri sobni temperaturi. Vsebuje mešanico gliceridov oleinske kisline in drugih MK, sestavljen pa je predvsem iz monooleatov. Njegova HLB vrednost je 3. Topen je v kloroformu, etru, mineralnih in rastlinskih oljih, netopen je v vodi, lahko pa se v vodi samo-emulgira. Uporablja se kot bioadhezijski material, mukoadeziv, emulgator, stabilizator emulzij, gelirno sredstvo, uporaben je tudi v farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem, ima pa tudi emolientne lastnosti. Peceol je polarni lipid, ki nabrekne v vodi in tvori več faz z različnimi reološkimi lastnostmi. Ti nastali geli imajo veliko vlogo pri sproščanju ZU z različnimi topnostmi, kar je uporabno pri mukoadezijskih farmacevtskih oblikah. Primeren je tudi za povečanje transdermalne in bukalne absorpcije. Na tržišču je peceol na voljo v dveh oblikah, kot neemulgirajoči in samo-emulgirajoči, ki vsebuje približno 5 % anionskih PAS. Samo-emulgirajoči peceol se ima lahko vlogo emulgatorja v emulzijah O/V, neemulgirajoči pa v emulzijah V/O, v emulzijah O/V pa je stabilizator. Ima pa tudi GRAS status ter je netoksičen in neiritirajoč (29, 35).

#### **5.1.10. GLICEROL**

Glicerol je bistra, brezbarvna, higroskopna, viskozna tekočina brez vonja, s sladkim okusom (0,6 krat bolj sladek od saharoze). V dermalnih in paranteralnih farmacevtskih oblikah se uporablja predvsem kot hidrofilno topilo. V peroralnih farmacevtskih oblikah pa se uporablja kot topilo, sladilo, konzervans, povečevalec viskoznosti in tudi kot plastifikator pri filmskem oblaganju, ima pa tudi rahlo odvajalni učinek. Glicerol se hitro absorbira iz črevesja in se lahko metabolizira do ogljikovega dioksida in glikogena ali pa se porabi pri sintezi telesnih maščob. Je netoksičen in neiritirajoč ter ima GRAS status, vendar pa lahko v večjih količinah povzroči glavobol, žejo, slabost in hiperglikemijo (35).



## 5.2. METODE

Aparature, ki smo jih uporabljali pri delu, so prikazane v preglednici IV.

Preglednica IV: Uporabljene aparature.

<b>APARATURA</b>	<b>PROIZVAJALEC</b>	<b>DRŽAVA</b>
<b>Analitska tehtnica XS205</b>	Mettler toledo	Švica
<b>Analitska tehtnica Exacta 2200EB</b>	Tehtnica	Slovenija
<b>Aparatura za <i>in vitro</i> test raztapljanja: VK 7000 Dissolution Testing Station</b>	VanKel industries	ZDA
<b>HPLC sistem: Agilent 1100 Series</b>	Agilent technologies	ZDA
<b>Kolona za HPLC: YMC-Pack ODS-AM</b>	YMC Separation Technology	Japonska
<b>Magnetno mešalo 1</b>	Big squid, IKA®WERKE	Nemčija
<b>Magnetno mešalo 2</b>	HI 190M, HANNA instruments	Portugalska
<b>pH meter: SevenMulti</b>	Mettler toledo	Švica
<b>Reometer Physica MCR 301</b>	Anton Paar	Avstrija
<b>Ultracentrifuga: WX ULTRA Series Centrifuge</b>	Thermo Scientific	Japonska
<b>Viale za HPLC</b>	Agilent technologies	Nemčija
<b>Zeta Sizer Nano series</b>	Malvern	Velika Britanija

### 5.2.1. TOPNOST RESVERATROLA V IZBRANIH POMOŽNIH SNOVEH

Za razvoj SMES s čim večjo vsebnostjo vgrajenega resveratrola smo izbrali različne lipide in PAS, katerim smo določili solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol.

Pomožnim snovem smo med mešanjem dodali prebitno količino resveratrola in pustili mešati 48 ur zaščiteno pred svetlobo. Nato smo 1 g zmesi prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali v ultracentrifugi s hitrostjo vrtenja 40000 obratov na minuto pri temperaturi 24,0 °C, 40 minut. Supernatant smo primerno razredčili z raztopino metanol-bidestilirana voda 50 % (v/v). Pripravljene raztopine smo prenesli v vialo iz temnega stekla, jim izmerili absorbanco na aparaturi HPLC in iz nje izračunali solubilizacijsko kapaciteto pomožnih snovi za resveratrol, ki smo jo podali kot 1 mg resveratrola v 100 mg zmesi.

### 5.2.2. HPLC ANALIZA

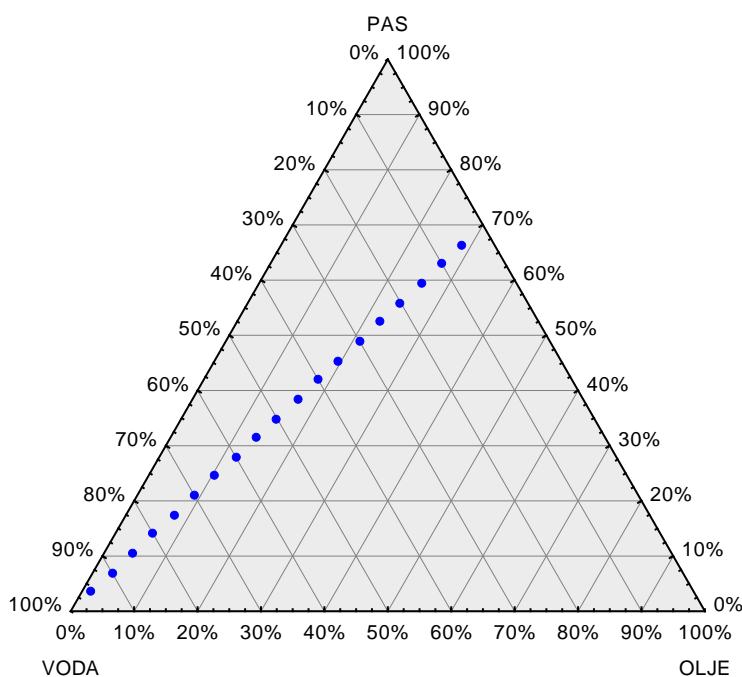
Za vrednotenje vsebnosti resveratrola smo uporabili visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), kjer smo uporabili kolono YMC-Pack ODS-AM (5 µm, 250 ×4,6 mm). Za mobilno fazo smo uporabili 0,5 % očetne kisline v raztopini metanol-bidestilirana voda 50 % (v/v) in uravnali njen pretok na 1 mL/min. Temperatura kolone je bila 25 °C, volumen injiciranega vzorca pa 20 µL. Koncentracijo resveratrola pa smo spremljali z UV detektorjem z valovno dolžino 303 nm. Retencijski čas resveratrola je znašal približno 6,6 minut.

Za izdelavo umeritvene premice, smo pripravili standardne raztopine resveratrola, tako da smo znano zatehto čistega resveratrola raztopili v 100 mL raztopine metanol-bidestilirana voda 50 % (v/v) in raztopino večkrat razredčili ter vzorcem izmerili absorbanco na aparaturi HPLC. Iz dobljenih rezultatov smo narisali umeritveno premico in izračunali njeno enačbo:  $A = 100\,532,7797 \times c - 3,0013$  ( $A$  – površina pod krivuljo,  $c$  – koncentracija izražena v mg/L). Nato smo s pomočjo umeritvene premice iz površin pod krivuljo izračunali koncentracijo resveratrola v vzorcih.

### 5.2.3. IZDELAVA (PSEVDO)TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV

(Psevdo)trikomponentni fazni diagram smo izdelali z metodo titracije na vodni kopeli pri 37 °C, tako da smo SMES z znano začetno sestavo postopoma dodajali prečiščeno vodo. Kot lipidno fazo smo uporabili dv-TG (ricinusovo olje) ali sdv-MG/DG (Capmul® MCM) oziroma kombinacijo obeh, kot PAS pa Cremophorje različnih nasičenosti ali njihovo kombinacijo.

Zatehtani zmesi oljne faze in PAS v različnih razmerjih (10 : 90, 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10), smo med mešanjem, na vodni kopeli segreti na 37 °C, postopoma dodajali prečiščeno vodo (po 5 %). Po vsakem dodatku vode smo nastali disperziji ocenili organoleptične lastnosti (transparentnost oz. motnost). S postopnim dodajanjem vode smo izdelali razredčitvene premice (slika 13), na katerih smo označili tiste točke, pri katerih je pri redčenju nastala mikroemulzija. Devet razredčitvenih premic z različnimi razmerji olja in emulgatorja pa je omogočilo izdelavo celotnega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama. Nastale disperzije smo shranili za 1 mesec in opazovali, ali pride do ločitev faz (mikro)emulzij.



Slika 13: Primer razredčitvene premice (30 % olja : 70 % PAS) (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama.

#### **5.2.4. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE SMES ZA RESVERATROL**

Na podlagi izdelanih (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov smo izbrali SMES z najmanjšo vsebnostjo PAS, ki tvorijo mikroemulzije po celotni razredčitveni premici. Tem sistemom smo določili solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol, tako da smo jim dodali prebitno količino resveratrola in na magnetnem mešalu mešali 48 ur zaščiteno pred svetlobo. 1 g zmesi smo prenesli v centrifugirke in centrifugirali 40 minut v ultracentrifugi s hitrostjo vrtenja 40000 obratov na minuto pri temperaturi 24,0 °C. Supernatant smo primerno razredčili z raztopino metanol-bidestilirana voda 50 % (v/v). Pripravljenim raztopinam smo s pomočjo HPLC izmerili absorbanco in iz slednje izračunali solubilizacijsko kapaciteto SMES za resveratrol, ki smo jo podali kot 1 mg resveratrola v 100 mg zmesi. Za nadaljnje delo pa smo pripravili SMES z 80 % nasičenosti resveratrola in jih označili s črko R.

#### **5.2.5. VISKOZNOST SMES**

SMES brez in z resveratrolom smo določili viskoznost s pomočjo rotacijskega reometra z nastavljivo strižno napetostjo s sistemom stožec-ploščica (CP50-2, premer  $R = 49,961$  mm,  $\alpha = 2,001^\circ$ ) pri 37 °C. Merjenje smo izvedli v treh ponovitvah in izpisali viskoznosti pri strižni hitrosti  $2 \text{ s}^{-1}$ .

#### **5.2.6. ODPORNOST SMES NA TEMPERATURNE SPREMEMBE**

Približno 2 g SMES brez in z resveratrolom smo napolnili v centrifugirke, ki smo jih nato izpostavili štirim ciklom zamrzovanja in segrevanja. Zamrzovanje je potekalo v zamrzovalniku pri -4 °C 24 ur, segrevanje pa na vodni kopeli pri 40 °C 24 ur. Po končanih štirih ciklih zamrzovanja in segrevanja smo vzorce centrifugirali pri hitrosti 4000 rpm 5 minut pri 25 °C. Po centrifugiranju pa smo vizualno ocenili, ali je prišlo do ločitve komponent SMES oz. obarjanja resveratrola.

#### **5.2.7. KOMPATIBILNOST SMES S TRDIMI ŽELATINSKIMI KAPSULAMI**

SMES brez in z resveratrolom smo napolnili v trde želatinske kapsule (~ 500 mg) in jih pustili stati tri mesece v temnem prostoru. Po tem času smo kapsule pregledali, če je prišlo do iztekanja SMES iz kapsule oz. obarjanja resveratrola.

### **5.2.8. MERJENJE ČASA SAMO-(MIKRO)EMULGIRANJA**

1 g SMES segretega na 37 °C, smo razredčili z 250 mL medija (pufer s pH 1,2, pufer s pH 6,8 ali prečiščena voda) segretega na enako temperaturo in mešali (100 rpm). Merili smo čas, v katerem je nastala homogena disperzija. Vsako meritev smo trikrat ponovili.

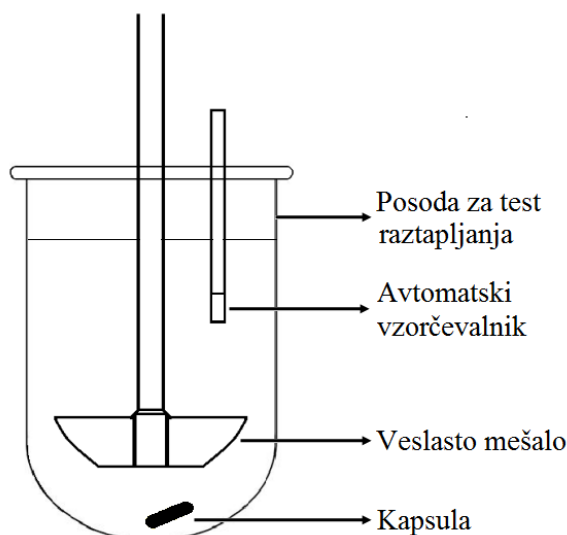
### **5.2.9. DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC IN ZETA POTENCIALA MIKROEMULZIJE**

Na stabilnost mikroemulzije vpliva velikost nastalih kapljic, širina porazdelitve velikosti kapljic in zeta potencial. Mikroemulzije z manjšimi kapljicami so bolj stabilne in imajo boljšo peroralno absorpcijo. Merilo za širino porazdelitve velikosti kapljic izraža polidisperzni indeks (PDI), katerega vrednosti se gibljejo od 0 do 1 in sicer bolj kot je PDI blizu 0, bolj je porazdelitev velikosti kapljic monodisperzna (homogena). Elektrokinetični potencial ali zeta potencial pa je razlika v potencialih med mejno plastjo in notranjostjo raztopine. Ustrezno je, da imajo mikroemulzije čim večji zeta potencial (negativen ali pozitiven), kar pomeni da se kapljice močno odbijajo in se ne bodo združevale. Kadar pa je zeta potencial zelo nizek, se kapljice ne odbijajo in lahko prihaja do njihove združitve (27, 45, 46).

Mikroemulzijam, ki so nastale pri redčenju SMES z različnimi mediji (pufer s pH 1,2, pufer s pH 6,8 ali prečiščena voda), smo izmerili velikost kapljic in zeta potencial na aparaturi Zetasizer Nano. Velikost kapljic smo določili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije pri temperaturi 25 °C.

### **5.2.10. *In vitro* TEST RAZTAPLJANJA RESVERATROLA IZ SMES**

Primerjali smo *in vitro* raztapljanje resveratrola iz izbranih SMES z raztapljanjem čistega resveratrola. *In vitro* test raztapljanja smo izvajali na USP aparaturi 2 (Dissolution Tester, Van Kel), z veslastim mešalom, pri hitrosti vrtenja vesel 50 rpm, v 900 mL medija za raztapljanje (pufer pH 1,2 ali pufer pH 6,8), segretega na 37 °C (slika 14).



Slika 14: Shema aparature za raztapljanje z vesli.

Trde želatinske kapsule smo napolnili s približno 500 mg SMES z resveratrolom in po eno spustili v posodo z ogretim medijem za raztapljanje. Pri vnaprej določenih časih (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h) smo z avtomatskim vzorčevalnikom vzorčili 5 mL raztopine. Odvzetim vzorcem smo nato določili koncentracijo resveratrola s HPLC.

#### 5.2.10.1. PRIPRAVA MEDIJEV ZA TEST RAZTAPLJANJA

- *Raztopina HCl - Pufer s pH 1,2*

Najprej smo pripravili 0,2 M raztopino KCl in 0,2 M raztopino HCl. Raztopino KCl smo pripravili v 2 L buči tako, da smo natehtali 29,84 g KCl, dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna in nato mešali na magnetnem mešalu, dokler se ni KCl popolnoma raztopil. Za pripravo 0,2 M raztopine HCl pa je bilo potrebno najprej pripraviti 1 M HCl tako, da smo v 1 L bučo prenesli HCl titrisol za pripravo 1000 mL 1 mol/L HCl in dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna na buči. V 2 L bučo smo nato prenesli 400 mL pripravljene 1 M raztopine HCl in s prečiščeno vodo dopolnili do označenega volumna na buči.

Pufer s pH 1,2 smo pripravili v 5 L merilni buči tako, da smo zmešali 1250 mL 0,2 M raztopine KCl in 2125 mL 0,2 M raztopine HCl, nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna. pH smo uravnali na 0,05 enote natančno z dodajanjem standardnih raztopin 0,2 M HCl in 0,2 M KOH.

- ***Fosfatna puferna raztopina - Pufer s pH 6,8***

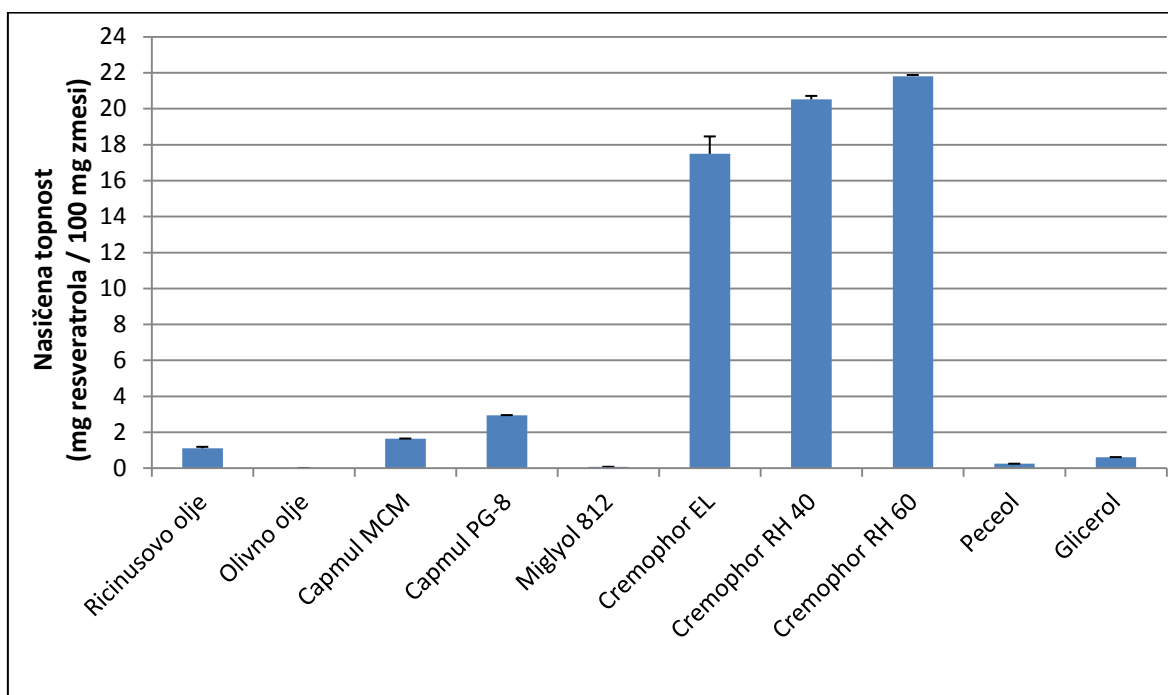
Za pripravo pufera s pH 6,8 smo najprej pripravili 0,2 M raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 0,2 M raztopino NaOH. 0,2 M raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo pripravili v 2 L buči tako, da smo natehtali 54,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna in nato mešali na magnetnem mešalu, dokler se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ni popolnoma raztopil. 0,2 M raztopino NaOH pa smo pripravili tako, da smo 8,0 g NaOH natehtali v 1 L bučo, jo dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna in nato mešali na magnetnem mešalu, dokler se NaOH ni popolnoma raztopil.

Fosfatni pufer s pH 6,8 smo pripravili v 5 L merilni buči tako, da smo zmešali 1250 mL 0,2 M raztopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 560 mL 0,2 M raztopine NaOH, nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do označenega volumna na buči. pH smo uravnali na 0,05 enote natančno z dodajanjem standardnih raztopin 0,2 M HCl in 0,2 M NaOH.

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 6.1. TOPNOST RESVERATROLA V IZBRANIH POMOŽNIH SNOVEH

Z določanjem solubilizacijske kapacitete za resveratrol smo reševali različne potencialne pomožne snovi za izdelavo SMES. Izbrali smo sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM, sdv-TG Miglyol<sup>®</sup> 812, dv-TG – olivno in ricinusovo olje ter hidrofilno sotopilo glicerol in emulgatorje z različnimi HLB vrednostmi (Cremophor<sup>®</sup> RH 40, Cremophor<sup>®</sup> RH 60, Cremophor<sup>®</sup> EL, Capmul<sup>®</sup> PG-8 in Peceol). Iz rezultatov na sliki 15 je razvidno, da se resveratrol najbolje raztaplja v različnih vrstah Cremophorjev, izmed katerih je najbolje topen v Cremophorju<sup>®</sup> RH 60 (21,813 mg resveratrola / 100 mg zmesi). Resveratrol je zmerno topen tudi v Capmulu<sup>®</sup> MCM, Capmulu<sup>®</sup> PG-8 in ricinusovem olju, medtem ko je skoraj netopen v Miglyolu<sup>®</sup> 812 (0,075 mg resveratrola / 100 mg zmesi) in olivnem olju (0,011 mg resveratrola / 100 mg zmesi).



Slika 15: Solubilizacijska kapaciteta (mg resveratrola / 100 mg zmesi) pomožnih snovi za resveratrol.

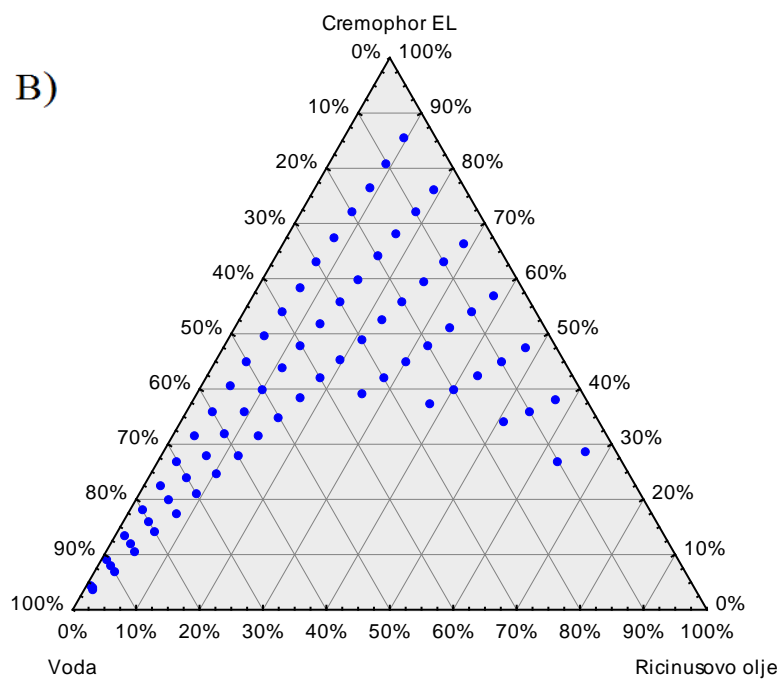
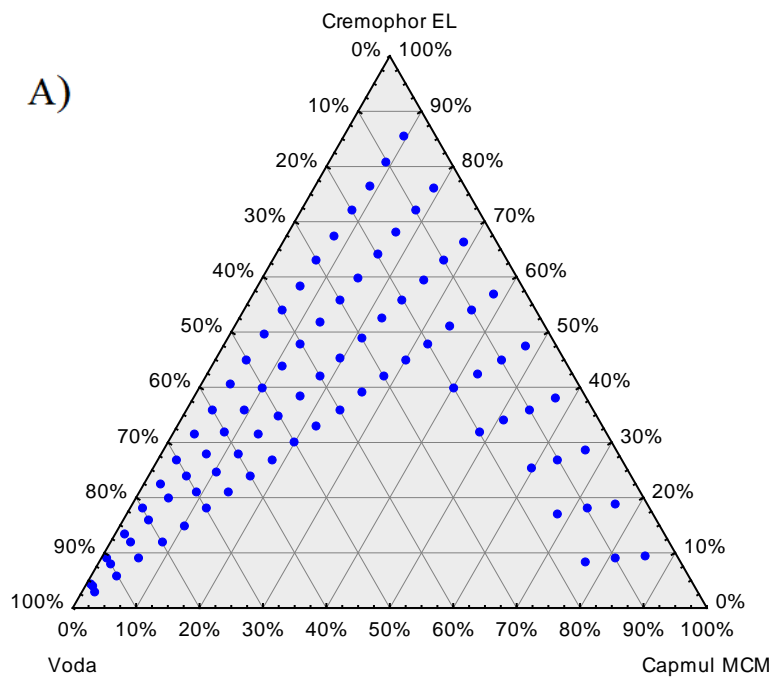
Na osnovi dobljenih rezultatov smo tako za razvoj novih SMES kot oljno fazo izbrali dv-TG ricinusovo olje in sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM, kot PAS pa Cremophor<sup>®</sup> EL, Cremophor<sup>®</sup> RH 40 in Cremophor<sup>®</sup> RH 60.



## 6.2. IZDELAVA (PSEVDO)TRIKOMPONENTNIH FAZNIH DIAGRAMOV

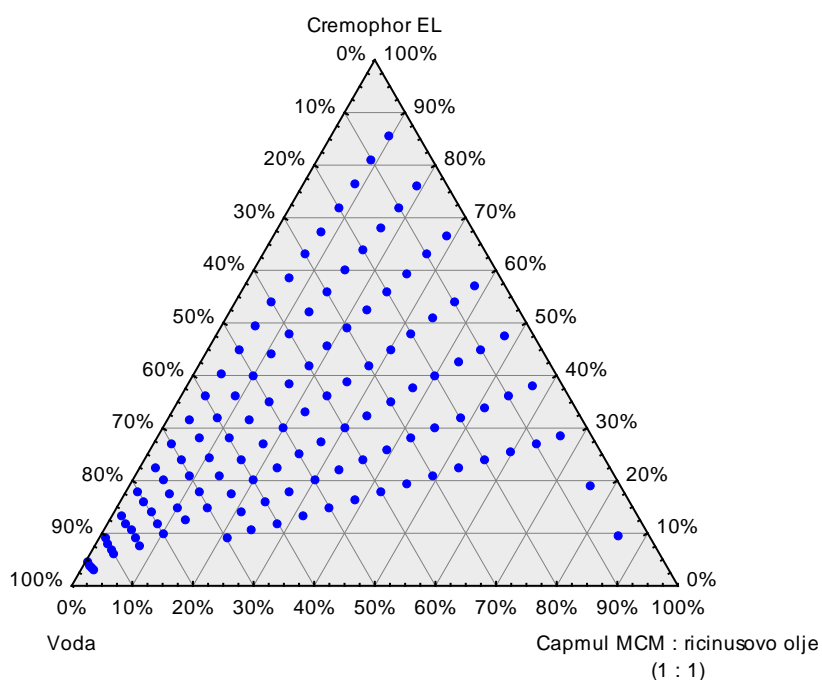
Iz izbranih pomožnih snovi smo izdelali SMES, ki ne vsebujejo sotopil in tvorijo mikroemulzije v čim širšem območju (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama. Ker PAS lahko povzročajo iritacije, je bil naš cilj pripraviti SMES s čim manjšo koncentracijo PAS, ki pa bi bili ob dodatku vode še vedno sposobni tvoriti mikroemulzije po celotni razredčitveni premici (47).

Pripravili smo dva sistema, ki oba vsebujeta Cremophor<sup>®</sup> EL kot emulgatorsko fazo, razlikujeta pa se v oljni fazi: sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM oz. dv-TG ricinusovo olje (48). Izdelana trikomponentna fazna diagrama prikazuje slika 16, iz katere je razvidno, da večji deleži PAS (80 % in 90 %) omogočajo v obeh primerih nastanek mikroemulzij po celotni razredčitveni premici. Pri 70 % PAS se v primeru ricinusovega olja pojavijo mikroemulzije po celotni razredčitveni premici, medtem ko pri uporabi Capmula<sup>®</sup> MCM opazimo nastanek emulzij pri več kot 70 % vode. Zanimivo pa je, da mikroemulzije pri 60 % PAS in 40 % Capmula<sup>®</sup> MCM nastanejo po celotnem območju razredčitvene premice. Capmul<sup>®</sup> MCM omogoča nastanek mikroemulzij tudi pri nižjih deležih PAS (10 – 50 %) in majhni količini vodne faze, saj lahko zaradi nizkega HLB (HLB = 4,7) deluje tudi kot koemulgator ter s tem olajša nastanek mikroemulzij tipa V/O (39). Pri uporabi ricinusovega olja pa opazimo nastanek mikroemulzij le do najmanj 30 % PAS. Sklepamo lahko torej, da sdv-MG/DG omogočajo nastanek mikroemulzij v širšem območju trikomponentnega faznega diagrama, kot dv-TG. Pri sistemih z ricinusovim oljem smo pri vseh deležih PAS opazili tudi nastanek gela, kar bi lahko bila prednost, saj lahko podaljša sproščanje ZU po peroralni ali dermalni uporabi (39). Preverili smo tudi enomesočno stabilnost (mikro)emulzij in ugotovili, da v obeh primerih ostanejo stabilne (mikro)emulzije, izdelane iz SMES z več kot 50 % PAS.



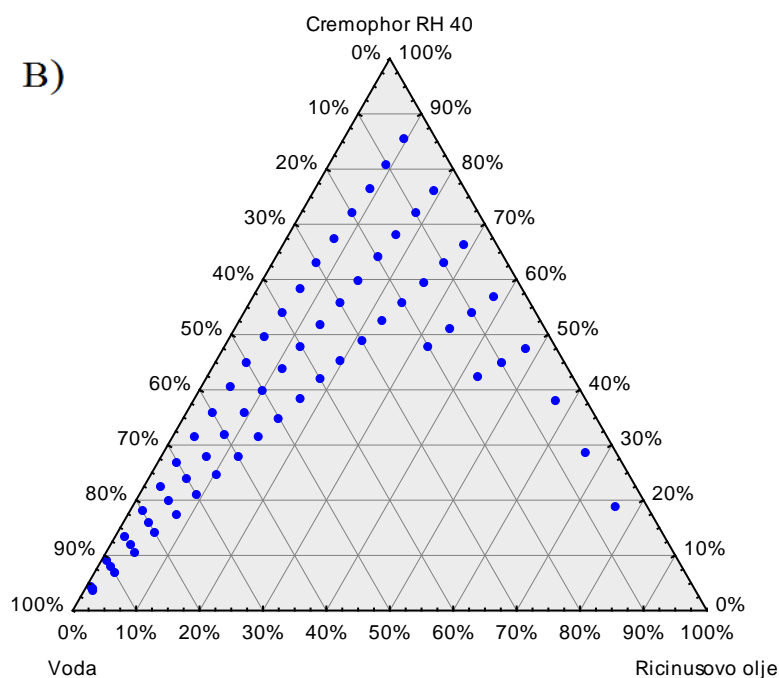
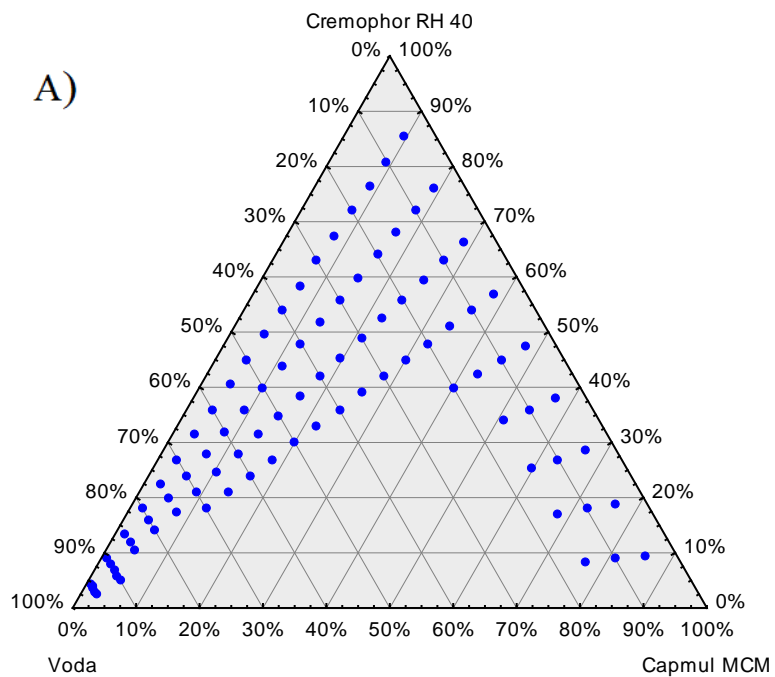
Slika 16: Trikomponentna fazna diagrama za sisteme, ki kot emulgatorsko fazo vsebujejo Cremophor<sup>®</sup> EL, kot oljno fazo pa Capmul<sup>®</sup> MCM (A) oziroma ricinusovo olje (B). Nastanek mikroemulzij je prikazan z modrimi točkami.

Iztočasna uporaba dveh lipidov lahko privede do povečanja območja nastanka mikroemulzij, zato smo preskusili še kombinacijo sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM in dv-TG ricinusovo olje (slika 17) (39). Mikroemulzije nastanejo v celotnem območju razredčitvene premice pri 60 – 90 % emulgatorja. Opazili smo tudi povečano območje nastanka mikroemulzij pri 30 – 50 % PAS, kjer mikroemulzije večinoma nastanejo pri manj kot 75 % vodne faze, iz česar je razvidno, da se je območje nastanka mikroemulzij zelo razširilo. Pri kombinaciji oljnih faz nismo opazili nastanka gela, zato bi lahko tekoča struktura pripomogla k hitrejši absorpciji ZU (39). Po eno mesečnem preverjanju stabilnosti so ostale stabilne (mikro)emulzije pridobljene iz SMES z več kot 40 % PAS.



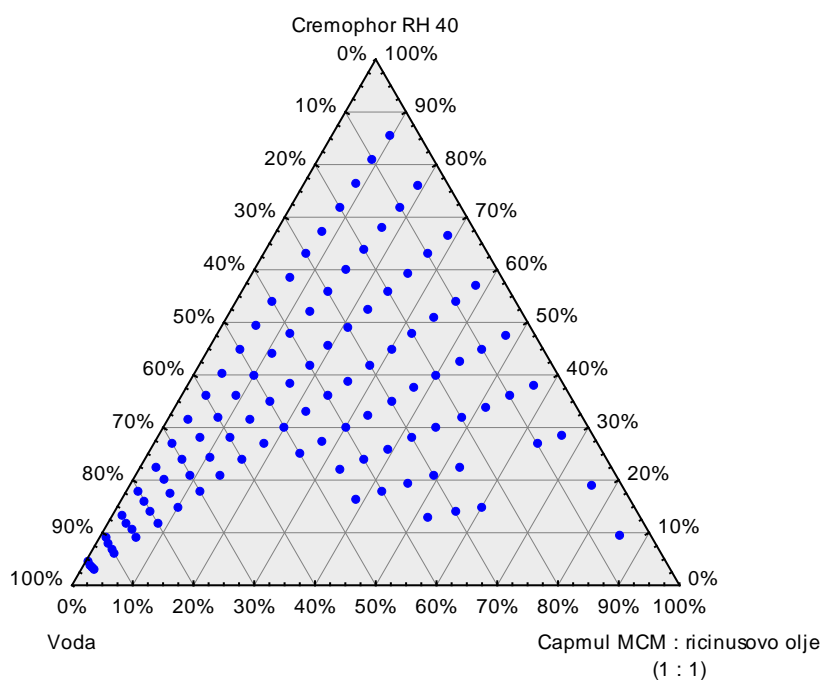
Slika 17: Pseudotrikomponentni fazni diagram za sisteme, ki poleg Cremophorja<sup>®</sup> EL vsebujejo še kombinacijo Capmula<sup>®</sup> MCM in ricinusovega olja. Nastanek mikroemulzij je prikazan z modrimi točkami.

Območje nastanka mikroemulzij smo skušali še povečati z zamenjavo PAS, in sicer smo Cremophorja<sup>®</sup> EL nadomestili s Cremophorjem<sup>®</sup> RH 40 (slika 18). Zamenjava emulgatorja pri uporabi posameznih oljnih faz Capmul<sup>®</sup> MCM oz. ricinusovo olje ni povečala območja nastanka mikroemulzij. Večji deleži emulgatorja Cremophorja<sup>®</sup> RH 40 (70 – 90 %) omogočajo nastanek mikroemulzij po celotni razredčitveni premici. V primerjavi s Cremophorjem<sup>®</sup> EL smo pri sistemih z oljno fazo Capmul<sup>®</sup> MCM, dobili mikroemulzije po celotni razredčitveni premici tudi pri 70 % PAS. Pri 60 % PAS pa se pri sistemu s Capmulom<sup>®</sup> MCM in Cremophorjem<sup>®</sup> RH 40 že pojavi nastanek emulzij v območju med 70 % in 90 % vode, kar pri uporabi Cremophorja<sup>®</sup> EL nismo opazili. Tudi v tem primeru SMES, ki so vsebovali ricinusovo olje, je prišlo pri vseh deležih PAS do nastanka gela. Po preverjanju eno mesečne stabilnosti sistemov z Capmulom<sup>®</sup> MCM so ostale stabilne (mikro)emulzije iz SMES z več kot 40 % Cremophorja<sup>®</sup> RH 40, pri sistemih z ricinusovim oljem pa so ostale stabilne (mikro)emulzije iz SMES, ki so vsebovali več kot 50 % Cremophorja<sup>®</sup> RH 40.



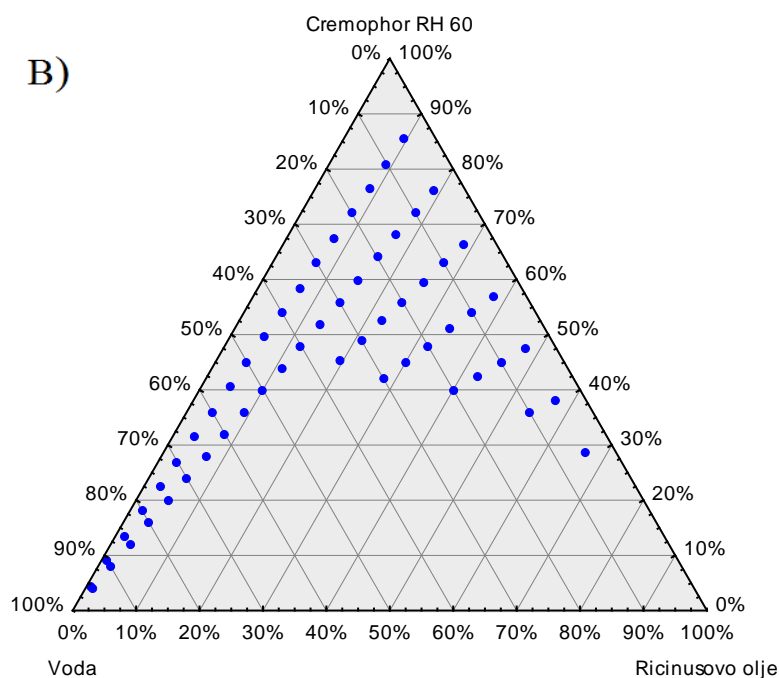
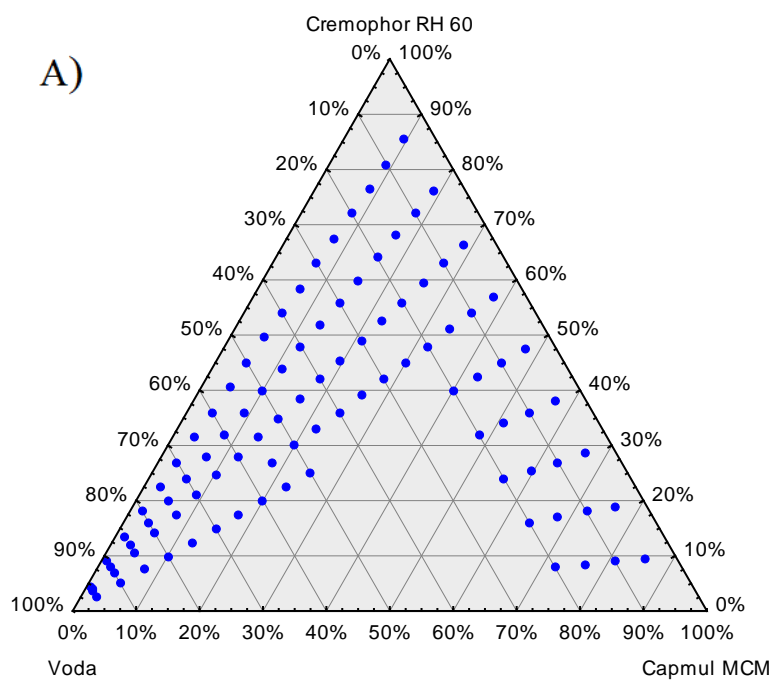
Slika 18: Trikomponentna fazna diagrama sistemov z različnima oljnima fazama (Capmul<sup>®</sup> MCM - A oz. ricinusovo olje - B) in nasičenim PAS (Cremophor<sup>®</sup> RH 40). Nastanek mikroemulzij je prikazan z modrimi točkami.

Pri sistemih (slika 19), kjer smo kot oljno fazo uporabili kombinacijo Capmula® MCM in ricinusovega olja kot PAS pa Cremophor® RH 40, je prišlo do povečanega območja nastanka mikroemulzij v primerjavi s sistemi s posameznimi oljnimi fazami. Mikroemulzije nastanejo po celotni razredčitveni premici tudi pri 60 % PAS, od 30 – 50 % PAS pa pri manj kot 50 % vode. V primerjavi s sistemi, kjer smo kot emulgator uporabili Cremophor® EL in enako kombinacijo oljne faze, pa pride pri uporabi Cremophorja® RH 40, do zmanjšanja območja nastanka mikroemulzij. Kljub temu pa tako pri uporabi Cremophorja® EL kot Cremophorja® RH 40, nastanejo mikroemulzije po celotni razredčitveni premici pri najmanj 60 % PAS. Po enem mesecu so ostale stabilne (mikro)emulzije iz SMES s kombinacijo oljnih faz in z več kot 50 % Cremophorja® RH 40.



Slika 19: Pseudotrikomponentni fazni diagram za sisteme z nasičenim PAS (Cremophor® RH 40) in kombinacijo sdv-MG/DG (Capmul® MCM) in dv-TG (ricinusovo olje).

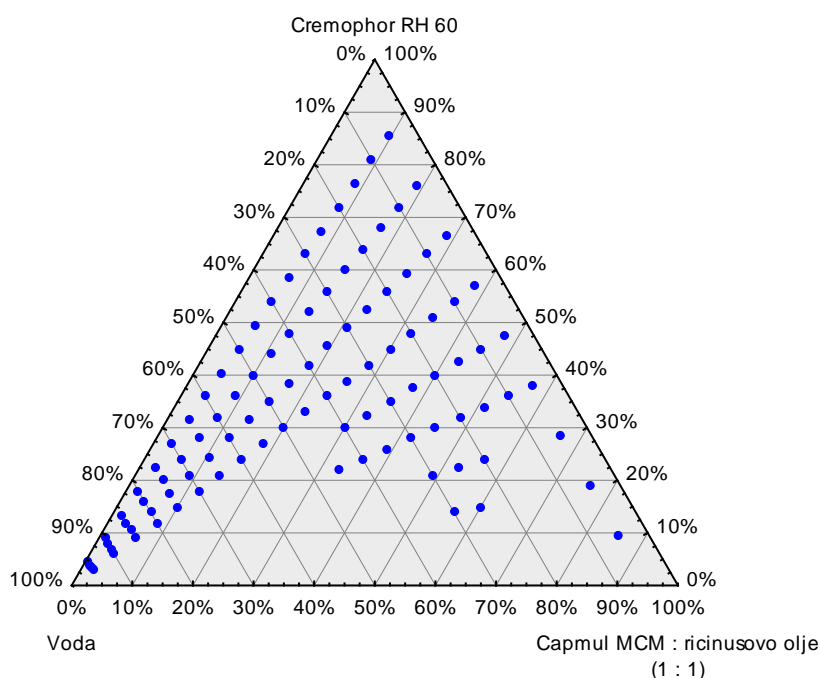
Razvili smo tudi SMES z emulgatorjem Cremophor<sup>®</sup> RH 60 in oljno fazo sdv-MG/DG (Capmul<sup>®</sup> MCM) oz. dv-TG (ricinusovo olje) (slika 20). Pri sistemih s sdv-MG/DG smo opazili, da v primerjavi s predhodno preskušanima PAS, mikroemulzije nastanejo v večjem delu razredčitvene premice s 50 % PAS. Ko pa smo kot oljno fazo uporabili ricinusovo olje, pa se je območje nastanka mikroemulzij močno zmanjšalo v primerjavi s sistemi s Cremophorjem<sup>®</sup> EL ali Cremophorjem<sup>®</sup> RH 40. V tem primeru nastanejo mikroemulzije po celotni razredčitveni premici le pri 80 % in 90 % PAS, pri 30 – 70 % PAS pa nastanejo le pri majhnih dodatkih vodne faze. Nastanek gelske strukture smo tudi pri sistemih z ricinusovim oljem in Cremophorjem<sup>®</sup> RH 60 opazili pri vseh deležih PAS. Po eno mesečnem staranju se niso razplastle (mikro)emulzije, ki so nastale iz SMES, ki so vsebovali Capmul<sup>®</sup> MCM in več kot 40 % Cremophorja<sup>®</sup> RH 60. V primeru mikroemulzij nastalih iz SMES z ricinusovim oljem in Cremophorjem<sup>®</sup> RH 60 pa so po enem mesecu ostale stabilne le tiste, ki so nastale iz SMES z 80 % in 90 % PAS.



Slika 20: Trikomponentni fazni diagram za sisteme z oljno fazo sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM (A) ali dv-TG ricinusovo olje (B) in emulgatorjem Cremophor<sup>®</sup> RH 60. Nastanek mikroemulzij je prikazan z modrimi točkami.



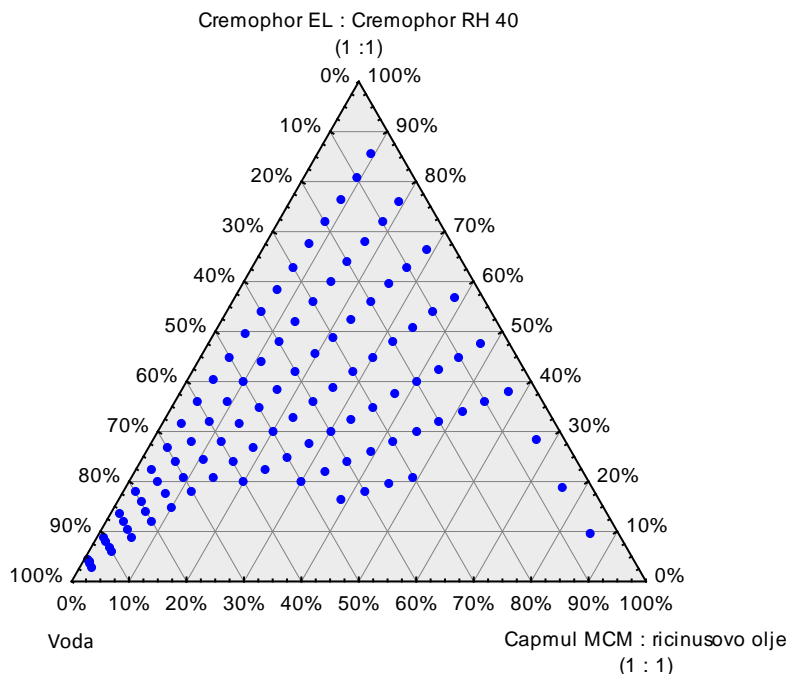
Območje nastanka mikroemulzij se pri sistemih s Cremophorjem<sup>®</sup> RH 60 ter kombinacijo sdv-MG/DG in dv-TG (slika 21) le malo spremeni v primerjavi s sistemi s Cremophorjem<sup>®</sup> RH 40 oziroma se območje nastanka mikroemulzij nekoliko zmanjša v primerjavi s sistemi s Cremophorjem<sup>®</sup> EL. Kljub temu pa pride tudi pri sistemih s Cremophorjem<sup>®</sup> RH 60 do nastanka mikroemulzij po celotni razredčitveni premici pri 60 – 90 % emulgatorja. Glede na sisteme s Cremophorjem<sup>®</sup> RH 60, ki vsebujejo samo po eno izmed oljnih faz, pa pri uporabi kombinacije tako kot pri ostalih Cremophorjih nekoliko poveča območje nastanka mikroemulzij. Čez en mesec so ostale stabilne (mikro)emulzije narejene iz SMES z več kot 50 % Cremophorja<sup>®</sup> RH 60.



Slika 21: Psevdotrikomponentni fazni diagram za SMES, ki vsebuje kombinacijo sdv-MG/DG (Capmul<sup>®</sup> MCM) in dv-TG (ricinusovo olje) ter Cremophor<sup>®</sup> RH 60. Nastanek mikroemulzij je prikazan z modrimi točkami.

Ker se območje nastanka mikroemulzij lahko poveča tudi z uporabo dveh PAS, smo pripravili sisteme s kombinacijo Cremophorja<sup>®</sup> EL in Cremophorja<sup>®</sup> RH 40 (47). Iz psevdotrikomponentnega faznega diagrama na sliki 22 je razvidno, da smo s kombinacijo dveh emulgatorjev uspeli nekoliko povečati območje nastanka mikroemulzij v primerjavi s sistemi s samim Cremophorjem<sup>®</sup> RH 40, vendar se je to območje zmanjšalo v primerjavi s

sistemi s samim Cremophorjem<sup>®</sup> EL. Po enem mesecu so ostale stabilne le mikroemulzije narejene iz SMES z več kot 40 % emulgatorjev Cremophorja<sup>®</sup> EL in Cremophorja<sup>®</sup> RH 40.



Slika 22: Pseudotrikomponentni fazni diagram za sisteme, ki vsebujejo Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje, nenasičen Cremophor<sup>®</sup> EL in nasičen Cremophor<sup>®</sup> RH 40. Nastanek mikroemulzije je prikazan z modrimi točkami.

Kombinacija Capmula<sup>®</sup> MCM in ricinusovega olja se je izkazala za najučinkovitejšo oljno fazo, saj imajo ti sistemi najširše območje nastanka mikroemulzij pri vseh preskušanih PAS. Nastanek različnih (psevdo)trikomponentnih faznih digramov lahko pripišemo različni kemijski sestavi oljnih faz. Capmul<sup>®</sup> MCM je sdv-MG/DG s HLB vrednostjo 4,7, ki ima lahko tudi vlogo koemulgatorja, kar olajša nastanek mikroemulzij V/O. Ricinusovo olje pa je dv-TG (35, 39).

Najučinkovitejša PAS je Cremophor<sup>®</sup> EL, saj takšni sistemi z vodo tvorijo mikroemulzije v najširšem območju (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama. Kombinacija Cremophorja<sup>®</sup> EL in Cremophorja<sup>®</sup> RH 40 ni pokazala povečanja območja nastanka mikroemulzij. Razlika v velikosti območja nastanka mikroemulzij lahko nastane zaradi različnih kemijskih struktur emulgatorjev, ki se nekoliko razlikujejo tudi po HLB vrednosti. Cremophor<sup>®</sup> RH 40 in Cremophor<sup>®</sup> RH 60 imata podobno kemijsko strukturo,

kjer je hidrofolni del sestavljen iz glicerol polietilenglikol oksistearata in maščobno kislinskih glicerol poliglikolnih estrov, hidrofilni del pa iz polietilenglikola in glicerol etoksilata. Prav tako imata podobno HLB vrednost, HLB vrednost Cremophorja® RH 40 je 14-16, Cremophorja® RH 60 pa 15-17. Cremophor® EL pa se nekoliko razlikuje od ostalih dveh emulgatorjev, saj vsebuje glicerol polietilenglikol ricinooleat (hidrofolni del) ter proste etilenglikole in glicerol etoksilate (hidrofilni del). Od prvih dveh emulgatorjev se Cremophor® EL razlikuje tudi po tem da je nenasičen, prva pa sta nasičena. Tudi HLB vrednost Cremophorja® EL je nekoliko nižja in sicer med 12 in 14 (20, 29, 35).

Iz vsakega konstruiranega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama smo izbrali sestavo z najmanjšo vsebnostjo PAS, ki ob dodatki vodne faze tvori mikroemulzije po celotni razredčitveni premici. Sestava izbranih SMES za nadaljna proučevanja, je prikazana v preglednici V.

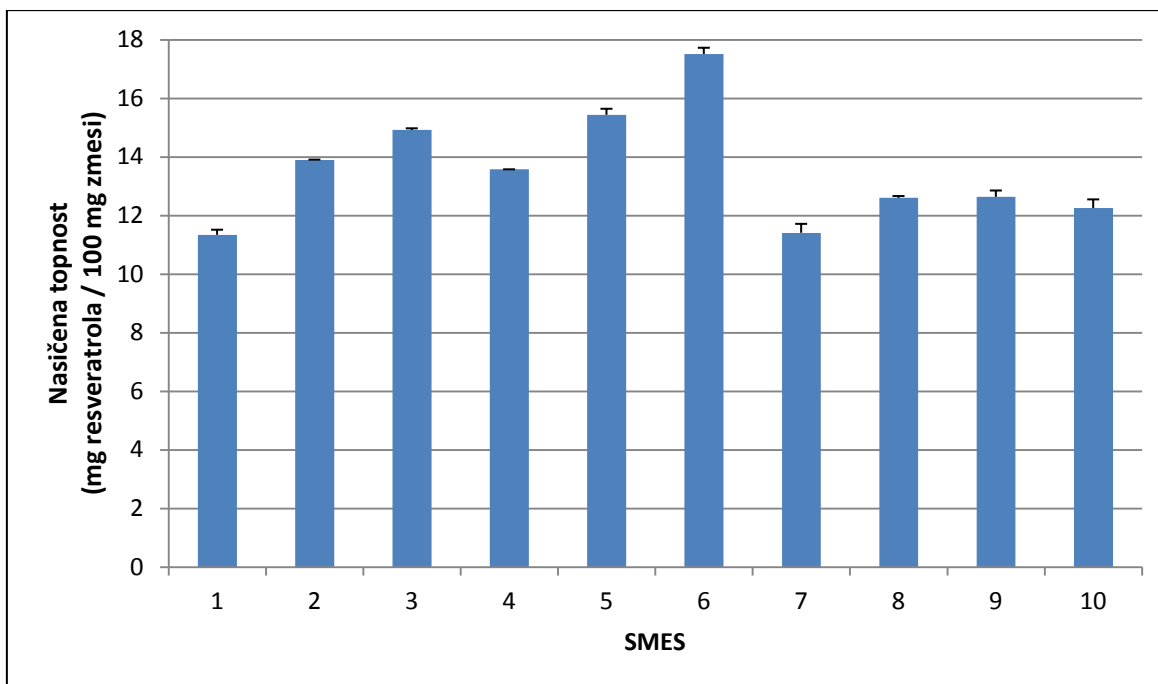
Preglednica V: Sestava izbranih SMES.

SMES	SESTAVA		RAZMERJE	
	OLJE	EMULGATOR	OLJE	EMULGATOR
1	Capmul® MCM	Cremophor® EL	40%	60%
2	Capmul® MCM	Cremophor® RH 40	30%	70%
3	Capmul® MCM	Cremophor® RH 60	30%	70%
4	Ricinusovo olje	Cremophor® EL	30%	70%
5	Ricinusovo olje	Cremophor® RH 40	30%	70%
6	Ricinusovo olje	Cremophor® RH 60	20%	80%
7	Capmul® MCM, ricinusovo olje	Cremophor® EL	40%	60%
8	Capmul® MCM, ricinusovo olje	Cremophor® RH 40	40%	60%
9	Capmul® MCM, ricinusovo olje	Cremophor® RH 60	40%	60%
10	Capmul® MCM, ricinusovo olje	Cremophor® EL, Cremophor® RH 40	40%	60%

### 6.3. DOLOČANJE SOLUBILIZACIJSKE KAPACITETE SMES ZA RESVERATROL

Izbranim SMES, katerih sestava je prikazana v preglednici V, smo določili solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol, ki je podana kot mg resveratrola, ki se raztopi v 100 mg zmesi (slika 23).

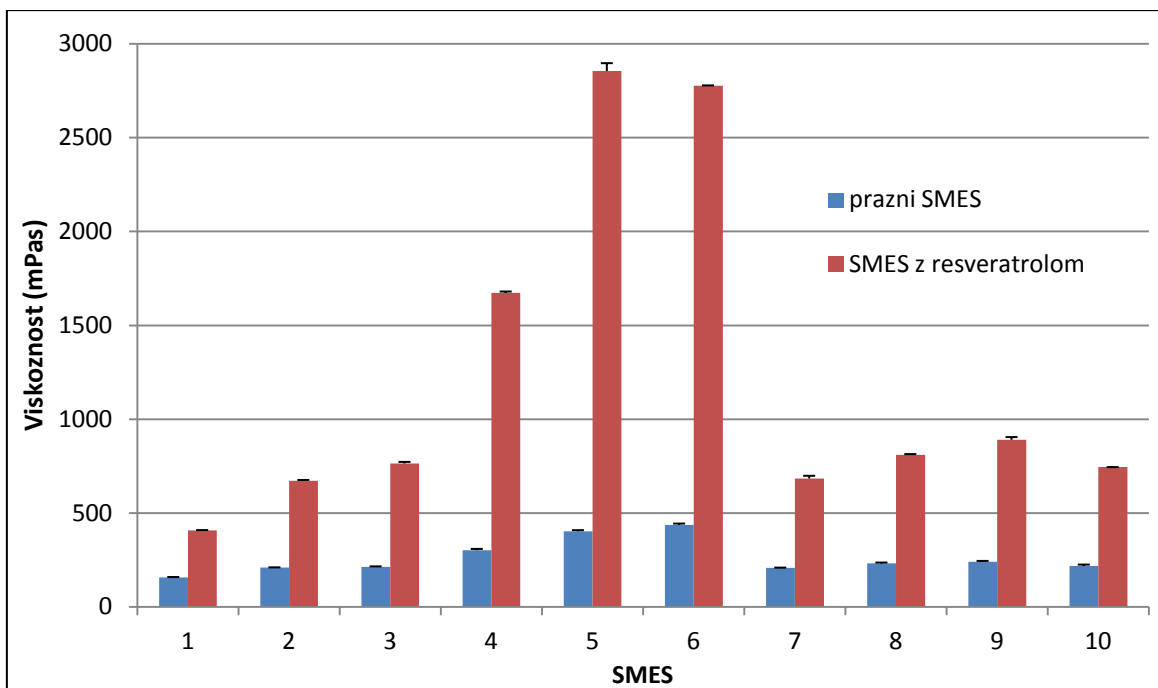
Resveratrol je najbolj topen v SMES 6 (17,515 mg resveratrola / 100 mg zmesi), ki je sestavljen iz 20 % ricinusovega olja (dv-TG) in 80 % Cremophorja® RH 60. Visoko solubilizacijsko kapaciteto tega SMES lahko pripišemo visokemu deležu emulgatorja, v katerem se resveratrol dobro raztaplja. Resveratrol pa se najslabše raztaplja v SMES 1 (11,342 mg resveratrola / 100 mg zmesi) in SMES 7 (11,409 mg resveratrola / 100 mg zmesi), saj imata večji delež olja (40 %), kot ostali SMES. SMES 1 kot oljno fazo vsebuje samo sdv-MG/DG (Capmul® MCM), SMES 7 pa vsebuje kombinacijo sdv-MG/DG (Capmul® MCM) in dv-TG (ricinusovo olje). Oba SMES-a pa kot emulgatorsko fazo vsebujeta Cremophor® EL, kar lahko vpliva na slabšo topnost resveratrola, saj je le-ta v Cremophorju® EL slabše topen kot v ostalih dveh Cremophorjih. Iz slike 23 pa je tudi razvidno, da je resveratrol najboljše topen v SMES, ki kot oljno fazo vsebujejo samo ricinusovo olje (dv-TG), sledijo sistemi s sdv-MG/DG, medtem ko je kombinacija sdv-MG/DG in dv-TG povzročila še nekoliko manjšo topnost resveratrola v SMES, v primerjavi s SMES, ki so vsebovali posamezni oljni fazi.



Slika 23: Solubilizacijska kapaciteta (mg resveratrola / 100 mg zmesi) izbranih SMES za resveratrol.

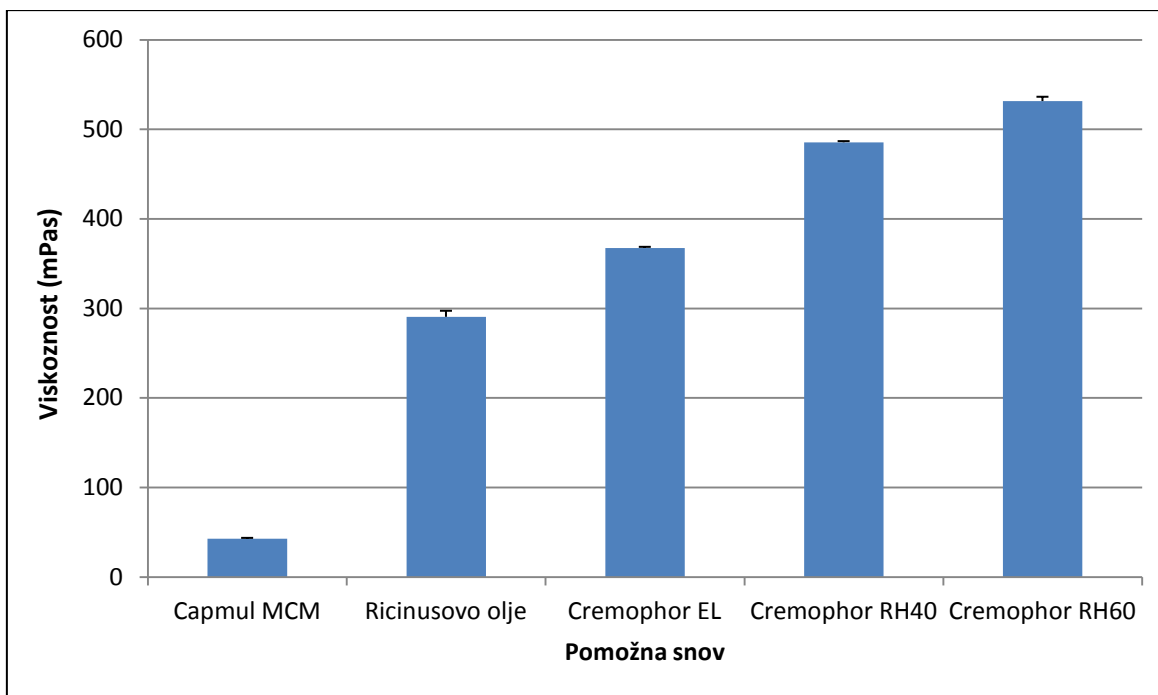
#### 6.4. VISKOZNOST SMES

Vsem SMES iz preglednice V brez resveratrola in z dodanim resveratrolom, katerega masa ustreza 80 % nasičene topnosti, smo izmerili viskoznost pri temperaturi 37 °C s sistemom stožec-ploščica. Povprečne vrednosti izmerjenih viskoznozt so prikazane na sliki 24, iz katere je razvidno, da se z dodatkom resveratrola poveča viskoznost. Največjo viskoznost imajo SMES z resveratrolom, ki kot oljno fazo vsebujejo samo dv-TG ricinusovo olje. Pri teh SMES je tudi opazno večje povečanje viskoznozt po dodatku resveratrola, kot pri ostalih SMES. Naprimer, pri SMES 5, ki vsebuje ricinusovo olje in Cremophor® RH 40, se viskoznost ob dodatku resveratrola poveča za približno 600 %, medtem ko imajo SMES, ki vsebujejo, kot oljno fazo samo sdv-MG/DG ali kombinacijo sdv-MG/DG in dv-TG podobno nizko viskoznost kot brez vgrajenega resveratrola. Najmanj viskozen je SMES 1 (Capmul® MCM in Cremophor® EL) z viskoznostjo 156,21 mPas, ki se ob dodatku resveratrola poveča le za približno 160 %. Nasičenost PAS tudi nekoliko vpliva na viskoznost SMES, saj imajo SMES, ki vsebujejo nenasičen Cremophor® EL manjšo viskoznost kot SMES iz nasičenih Cremophor® RH 40 ali RH 60.



Slika 24: Viskoznost SMES brez in z resveratrolom.

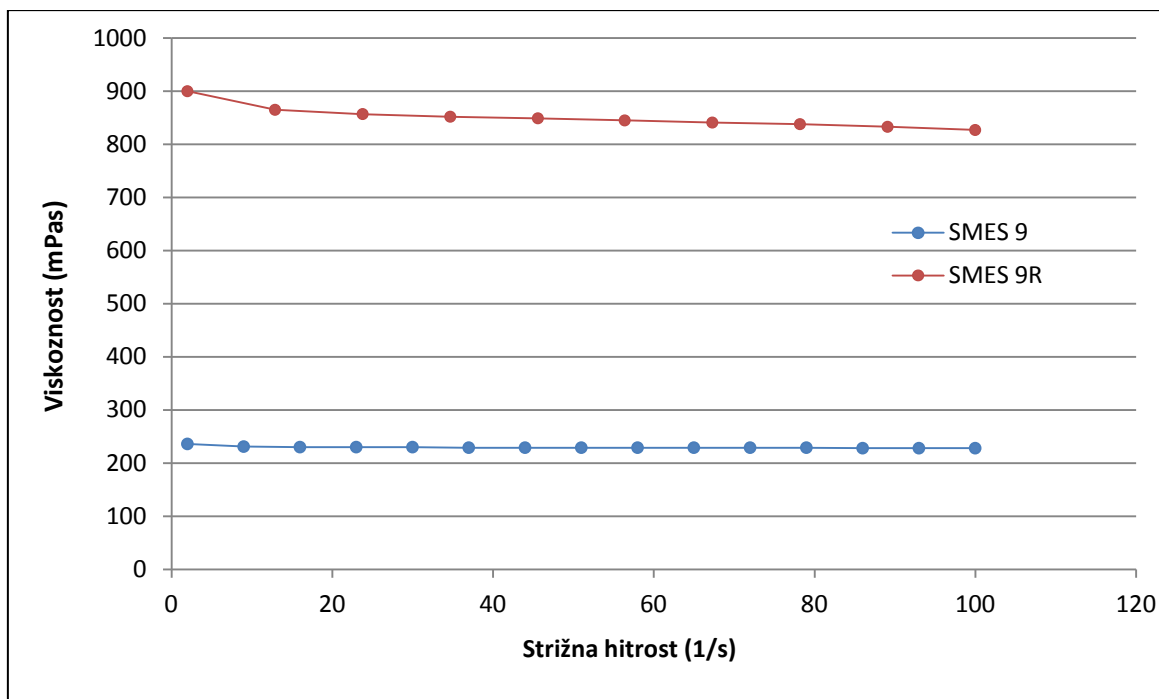
Viskoznost smo izmerili tudi pomožnim snovem, ki smo jih uporabili pri izdelavi SMES. Iz slike 25 je razvidno, da ima pri 37 °C največjo viskoznost Cremophor® RH 60 (531,52 mPas), najnižjo pa Capmul® MCM (42,82 mPas). Zaradi večje viskoznosti ricinusovega olja v primerjavi s Capmulom® MCM, imajo posledično sistemi, ki kot oljno fazo vsebujejo ricinusovo olje, večjo viskoznost. Cremophor® EL ima nižjo viskoznost od ostalih dveh emulgatorjev, zato imajo tudi njegovi sistemi nižjo viskoznost od ostalih.



Slika 25: Viskoznosti pomožnih snovi, ki smo jih uporabili pri izdelavi SMES.

Uporaba visoko viskoznih olj in PAS vodi k nižji stopnji emulgiranja in k daljšim časom nastanka homogene disperzije (dlje kot 2 minuti) (49).

Slika 26 prikazuje odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za SMES 9 in 9R, ki kot oljno fazo vsebujeta kombinacijo sdv-MG/DG in dv-TG ter kot PAS Cremophor® RH 60. Ugotavljamo, da se viskoznost ob povečevanju strižne hitrosti ne spreminja, iz česar sklepamo na stabilnost sistema ob obremenitvah. Potrdili smo tudi povečanje viskoznosti pri SMES z dodanim resveratrolom.



Slika 26: Viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti za primer SMES 9 in 9R.

## 6.5. ODPORNOST SMES NA TEMPERATURNE SPREMEMBE

Pri preverjanju fizikalne stabilnosti smo SMES brez (preglednica V) in z resveratrolom izpostavili ciklom segrevanja in ohlajanja. Opazili smo, da po izpostavljanju ciklom temperaturnih obremenitev ne pride do ločitve faz niti do obarjanja resveratrola. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da so pripravljene SMES odporne na temperaturne spremembe in torej fizikalno stabilni.

## 6.6. KOMPATIBILNOST SMES Z TRDIMI ŽELATINSKIMI KAPSULAMI

Zaradi prednosti trdih farmacevtskih oblik za peroralno uporabo, kot so lažja aplikacija in nadzorovano odmerjanje, smo pripravljene SMES napolnili v trde želatinske kapsule (50). Preverili smo kompatibilnost SMES s trdimi želatinskimi kapsulami brez (preglednica V) in z resveratrolom. Po treh mesecih nismo opazili nobenih poškodb kapsul, izlitja SMES iz kapsule ali obarjanja resveratrola iz SMES. Visoka viskoznost SMES je verjetno razlog, da se SMES niso izlili iz kapsul. Slika 27 prikazuje kapsule, ki so bile tri mesece napolnjene s SMES.



A)



B)



Slika 27: Trde želatinske kapsule napolnjene s SMES brez (A) in z resveratrolom (B) po treh mesecih.

## 6.7. ČAS SAMO-MIKROEMULGIRANJA, VELIKOST KAPLJIC IN ZETA POTENCIAL IZ SMES NASTALIH MIKROEMULZIJ

### 6.7.1. MERJENJE ČASA SAMO-MIKROEMULGIRANJA

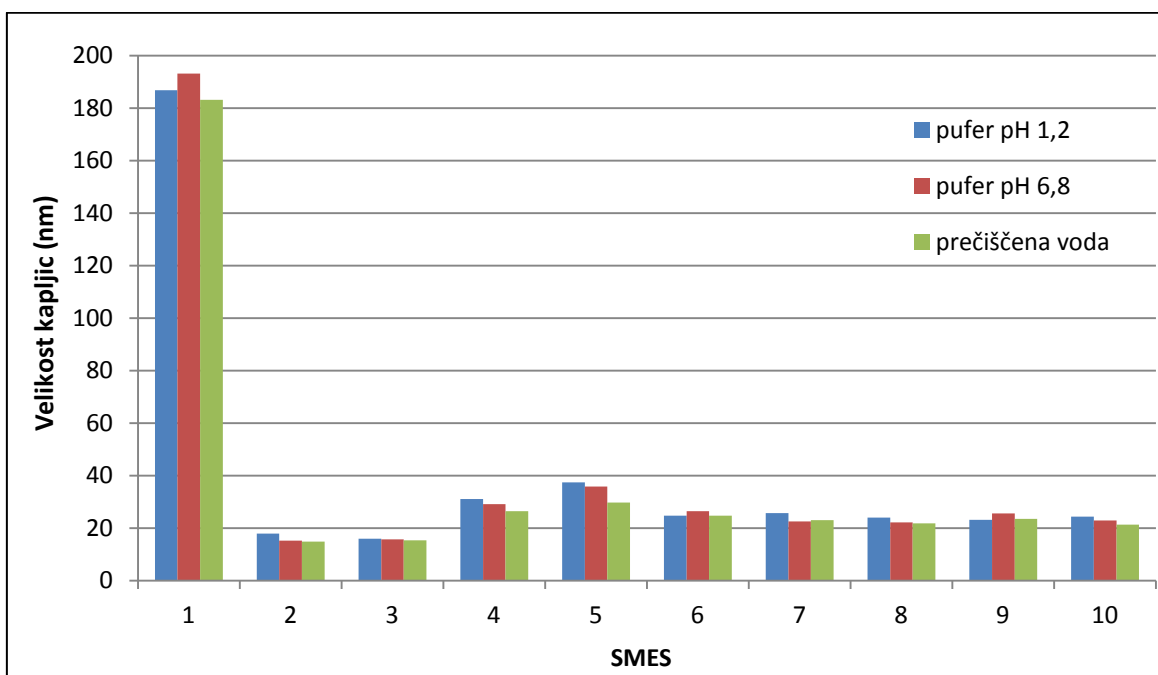
SMES, ki so prikazani v preglednici V, smo razredčili z 250 mL pufru s pH 1,2, pufru s pH 6,8 in prečiščeno vodo. Merili smo čas, v katerem pride do nastanka mikroemulzije v medijih, ki smo jih kasneje uporabili za *in vitro* test raztapljanja. Časovni rezultati redčenja so prikazani v preglednici VI. SMES, ki so kot oljno fazo vsebovali sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM (SMES 2 in SMES 3) ali kombinacijo sdv-MG/DG Capmul<sup>®</sup> MCM in dv-TG ricinusovo olje (SMES 7, SMES 8 in SMES 9) so imeli kratke čase nastanka mikroemulzij, kar je verjetno posledica nizke viskoznosti SMES. Izjema je bil le SMES 1 (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> EL), pri katerem so bili časi samo-(mikro)emulgiranja zelo dolgi, nastala pa je tudi motna disperzija, iz česar lahko sklepamo na nastanek grobe emulzije. SMES, pri katerih je bila oljna faza ricinusovo olje (SMES 4, SMES 5 in SMES 6), pa so imeli daljše čase nastanka mikroemulzij, ki so zelo variirali. Daljši časi samo-mikroemulgiranja in slabša ponovljivost rezultatov sta verjetno posledica velike viskoznosti SMES.

Preglednica VI: Čas nastanka mikroemulzij iz izbranih SMES.

SMES	Pufer 1,2	Pufer 6,8	Prečiščena voda
1	20 min 40 s ±14 s	21 min 12 s ±8 s	39 min 2 s ±1 s
2	1 min 1 s ±3 s	1 min 36 s ±4 s	1 min 55 s ±4 s
3	1 min 52 s ±2 s	2 min 4 s ±0 s	1 min 49 s ±6 s
4	13min 44s ±53s	18min 41s ±3min 53s	1min 33s ±1min 42s
5	17min 11s ±3min 28s	12min 35s ±5min 59s	12min 31s±2min 42s
6	14min 21s ±5min 21s	20min 34s ±4min 53s	14 min 10s ±3min 34s
7	1 min 39 s ±4 s	2 min 37 s ± 6s	1 min 43 s ±3 s
8	1 min 14 s ±0 s	1 min 8 s ±2 s	1 min 20 s ±6 s
9	2 min 2 s ±2 s	2 min 36 s ±3s	3 min 6 s ± 6s
10	1 min 11 s ±6 s	1 min 58 s ±4 s	2 min 38 s ±3 s

### 6.7.2. MERJENJE VELIKOSTI KAPLJIC MIKROEMULZIJ

Mikroemulzijam, ki so nastale pri redčenju SMES (preglednica V) s pufom 1,2, pufrom 6,8 in prečiščeno vodo, smo izmerili velikost kapljic notranje faze (slika 28). Pričakovano je, da iz SMES nastanejo mikroemulzije z velikostjo kapljic pod 50 – 100 nm, če pa so kapljice večje, in sicer med 100 in 300 nm pa govorimo o nastanku emulzij, sistemi pa se v tem primeru imenujejo SES (21, 24). Razvidno je, da imajo skoraj vse nastale mikroemulzije ustrezno velikost kapljic in sicer manj kot 100 nm. Najmanjšo velikost kapljic smo izmerili pri mikroemulziji, ki je nastala pri redčenju SMES 2 (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) s prečiščeno vodo in sicer 14,82 nm. V primeru redčenja SMES 1 (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> EL) pa so nastale motne disperzije z večjimi kapljicami, kar dokazuje nastanek emulzije. Največja velikost nastalih kapljic te disperzije je nastala pri redčenju z pufrom pH 6,8 in sicer 193,10 nm. Pri enakem PAS na velikost kapljic mikroemulzije vpliva oljna faza in sicer pri uporabi sdv-MG/DG nastanejo najmanjše kapljice, pri dv-TG pa največje, kombinacija obeh olj pa daje tudi vmesno velikost nastalih kapljic. Izjema je le SMES 1, ki ima zelo velike kapljice, kljub uporabi sdv-MG/DG, verjetno zaradi prevelikega deleža oljne faze.



Slika 28: Velikost kapljic mikroemulzij, ki so nastale iz izbranih SMES.

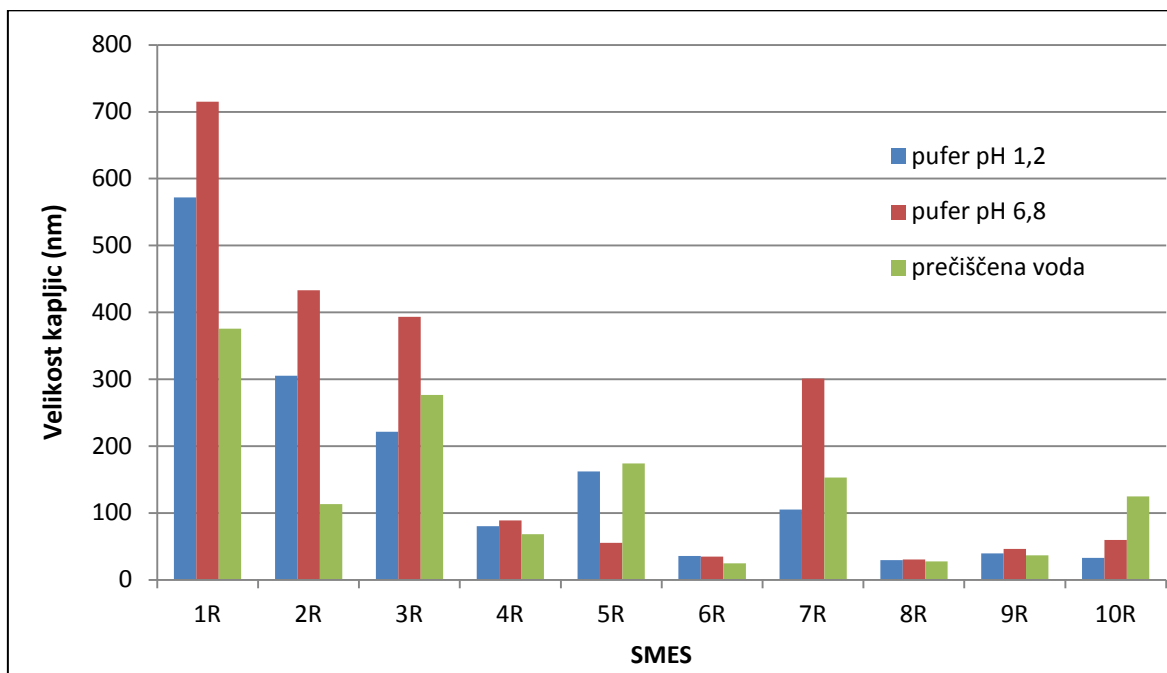
Polidisperzni indeksi, ki so merilo širine porazdelitve velikosti kapljic v mikroemulzijah, ki so nastale iz izbranih SMES, so prikazani v preglednici VII. Izmerjeni polidisperzni indeksi so nizki, kar pomeni, da je distribucija velikosti kapljic monodisperzna (PDI manjši od 0,2). Najbolj monodisperzen sistem je tisti, pri katerem se PDI najbolj približuje vrednosti 0 in to je pri mikroemulziji nastali pri redčenju SMES 2 (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) s pufrom pH 6,8. (Mikro)emulzije iz SMES 1 (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> EL) imajo veliko večji PDI od ostalih sistemov, kar pomeni da je sistem bolj heterogen, zato smo lahko posledično izmerili večjo velikost kapljic v disperziji.

Preglednica VII: Vrednost polidisperznega indeksa mikromulzij, ki so nastale iz izbranih SMES.

SMES	PDI		
	Pufer pH 1,2	Pufer pH 6,8	Prečiščena voda
1	0,480	0,465	0,487
2	0,181	0,025	0,082
3	0,065	0,031	0,110
4	0,067	0,054	0,083
5	0,141	0,058	0,068
6	0,064	0,064	0,064
7	0,050	0,031	0,045
8	0,050	0,044	0,040
9	0,052	0,056	0,048
10	0,038	0,047	0,034

Velikost kapljic smo izmerili tudi mikroemulzijam, ki so nastale iz izbranih SMES (preglednica V), v katerih je bil raztopljen resveratrol. Iz rezultatov na sliki 29 lahko sklepamo, da se pri dodatku resveratrola v SMES bistveno spremeni velikost kapljic. Še vedno je velikost kapljic največja pri emulziji, ki je nastala iz SMES 1R (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> EL) in pufru pH 6,8. Pri raztapljanju SMES 4R (ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> EL), SMES 6R (ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 60), SMES 8R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) in SMES 9R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 60) pa so nastale mikroemulzije z ustrežno velikostjo kapljic v

vseh treh medijih. SMES 5R (ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) in SMES 10R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje, Cremophor<sup>®</sup> EL in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) pa sta tvorila mikroemulzije le v določenih medijih. Najmanjšo velikost kapljic smo izmerili pri redčenju SMES 6R s prečiščeno vodo in sicer 24,93 nm. Kot je iz slike 30 razvidno, imajo mikroemulzije nastale iz sistemov, ki so kot oljno fazo vsebovali sdv-MG/DG, največjo velikost kapljic, sistemi z dv-TG ter sistemi s kombinacijo sdv-MG/DG in dv-TG pa so po velikosti kapljic mikroemulzije podobni in odvisni od posameznega sistema.



Slika 29: Velikost kapljic mikroemulzij, ki so nastale iz izbranih SMES z dodanim resveratrolom.

Dodatek resveratrola je poleg povečanja velikosti kapljic vplival tudi na veliko povečanje vrednosti PDI (preglednica VIII). Visoka vrednost PDI pomeni neenakomerno porazdelitev velikosti kapljic, zato je težko ovrednotiti njihovo dejansko velikost. Iz tega razloga je lahko povprečna velikost kapljic večja kot je v resnici, saj je mogoče da je v disperziji le nekaj velikih kapljic, ki zelo povišajo povprečen rezultat velikosti kapljic. Nekatere mikroemulzije pa so kljub dodatku resveratrola ohranile ustrezen PDI ( $< 0,2$ ). Najmanjšo PDI vrednost je imela mikroemulzija, ki je nastala iz SMES 8R in prečiščene vode, največjo pa mikroemulzija, ki je nastala iz SMES 4R in pufera pH 6,8.

Preglednica VIII: Vrednost polidisperznega indeksa mikromulzij, ki so nastale iz izbranih SMES z resveratrolom.

SMES	PDI		
	Pufer pH 1,2	Pufer pH 6,8	Prečiščena voda
<b>1R</b>	0,539	0,401	0,456
<b>2R</b>	1,000	0,532	0,399
<b>3R</b>	0,542	0,465	0,300
<b>4R</b>	0,478	0,589	0,398
<b>5R</b>	0,257	0,561	0,216
<b>6R</b>	0,463	0,423	0,234
<b>7R</b>	0,133	0,342	0,284
<b>8R</b>	0,149	0,184	0,039
<b>9R</b>	0,373	0,454	0,376
<b>10R</b>	0,198	0,231	0,505

### 6.7.3. MERJENJE ZETA POTENCIALA MIKROEMULZIJ

Nastalim mikroemulzijam, ki so nastale pri redčenju SMES, smo izmerili tudi zeta potencial, katerega rezultati so prikazani v preglednici IX, vrednosti se gobljejo od -20,3 do 6,50 mV. Največji zeta potencial ima mikroemulzija, ki je nastala iz SMES 8 (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje, Cremophor<sup>®</sup> RH 40) in prečiščene vode, kar pomeni da je bolj stabilna od ostalih, zato bo pozneje prišlo do ločitve faz v primerjavi z ostalimi (mikro)emulzijami. Zeta potencial se z dodatkom resveratrola ni bistveno spremenil (preglednica IX), razen pri sistemu 8R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) s prečiščeno vodo, kjer se je zeta potencial znižal in pri sistemu 3R (Capmul<sup>®</sup> MCM in Cremophor<sup>®</sup> RH 60) s prečiščeno vodo, kjer se je povečal.

Preglednica IX: Zeta potencial nastalih (mikro)emulzij.

SMES	Zeta potencial (mV)		
	Pufer pH 1,2	Pufer pH 6,8	Prečiščena voda
<b>1</b>	1,21	1,36	-10,1
<b>2</b>	4,70	-1,54	-5,51
<b>3</b>	6,50	-1,05	-5,68
<b>4</b>	-3,80	-2,19	-13,2
<b>5</b>	-0,593	-1,20	-15,6
<b>6</b>	0,635	-0,850	-7,57
<b>7</b>	4,23	-1,29	-9,88
<b>8</b>	-3,75	-1,62	-20,3
<b>9</b>	0,920	-0,946	-12,8
<b>10</b>	0,153	-1,77	-16,8
<b>1R</b>	-0,436	0,441	0,009
<b>2R</b>	0,731	1,10	-6,98
<b>3R</b>	-0,355	0,795	-19,3
<b>4R</b>	-1,37	-1,90	-6,70
<b>5R</b>	1,90	-0,656	-8,65
<b>6R</b>	0,950	-0,002	-16,7
<b>7R</b>	0,174	-1,54	-15,5
<b>8R</b>	4,70	-4,34	-1,62
<b>9R</b>	0,181	-2,94	-9,89
<b>10R</b>	-0,073	0,344	-14,2

V literaturi najdemo podatke, da lahko pozitivno nabiti delci povečajo absorpcijo ZU iz sluznice GIT in s tem izboljšajo njeno biološko uporabnost (49). Vendar so pri večini naših mikroemulzij nastale kapljice z negativnim zeta potencialom.

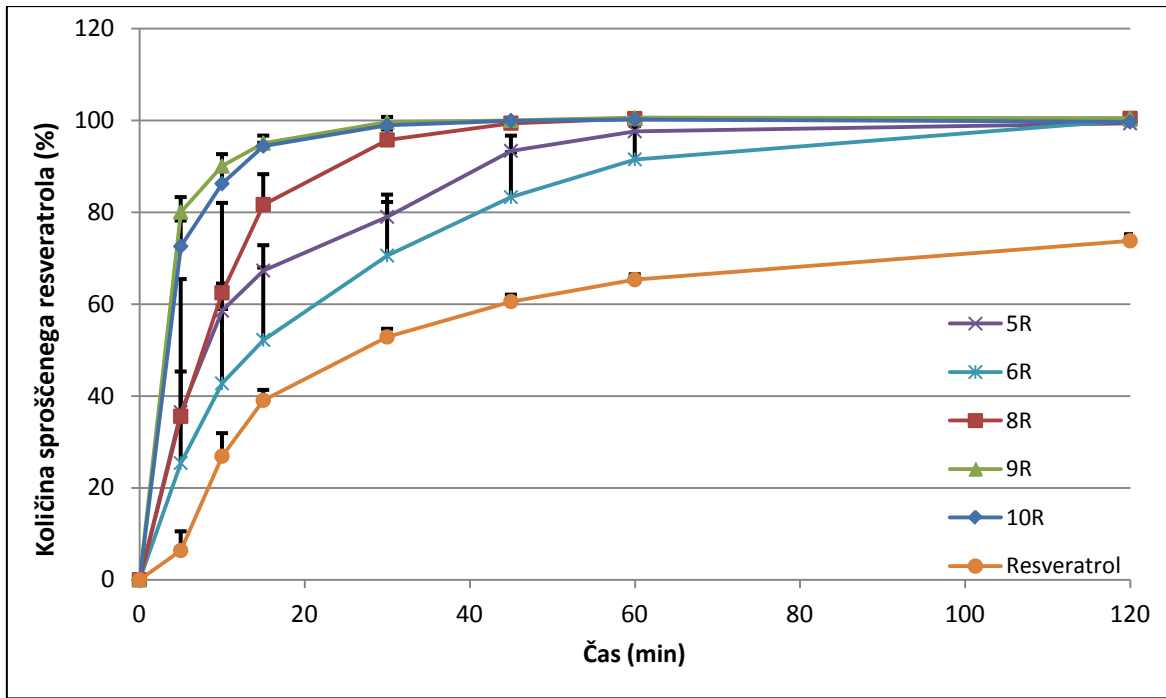
Na podlagi rezultatov analize velikosti kapljic in zeta potenciala mikroemulzij ter nasičene topnosti SMES, smo izbrali najustreznejše sisteme z resveratrolom za preskus *in vitro* raztapljanja. Izbrali smo dva sistema z ricinusovim oljem kot lipofilno fazo in sicer SMES 5R (Cremophor<sup>®</sup> RH 40) in SMES 6R (Cremophor<sup>®</sup> RH 60) ter tri SMES s kombinacijo

ricinusovega olja in Capmula<sup>®</sup> MCM in sicer SMES 8R (Cremophor<sup>®</sup> RH 40), SMES 9R (Cremophor<sup>®</sup> RH 60) in SMES 10R (kombinacija Cremophorja<sup>®</sup> EL in RH 40).

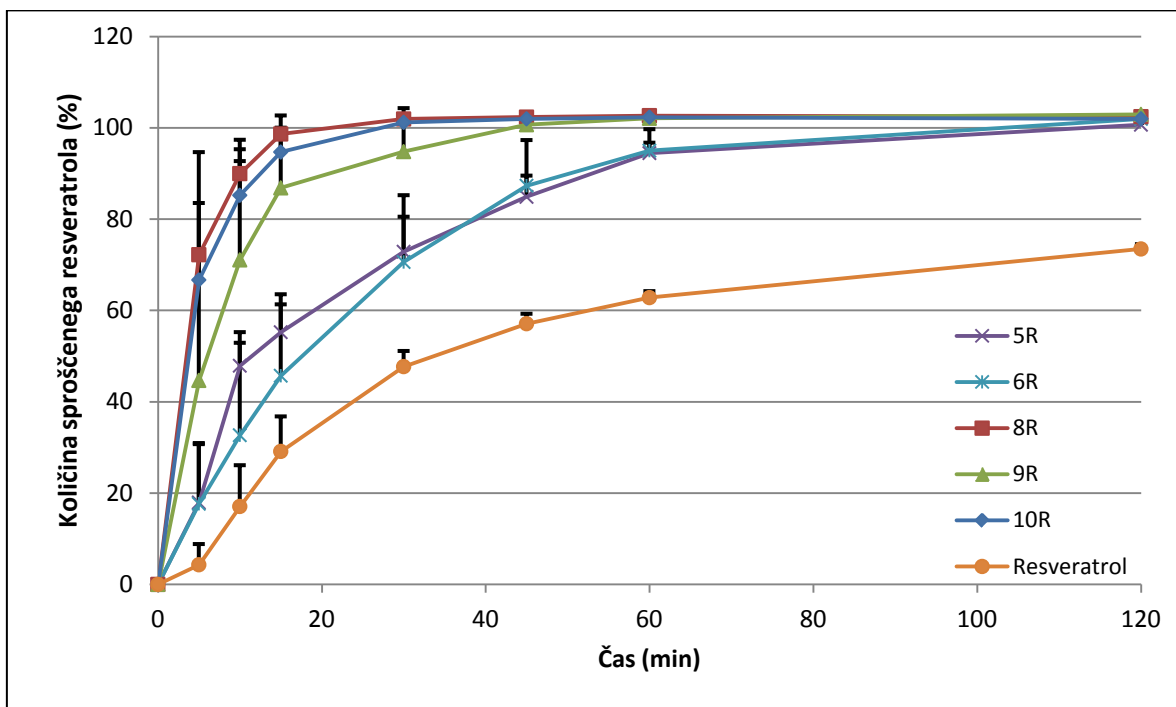
### **6.8. *In vitro* TEST RAZTAPLJANJA RESVERATROLA IZ SMES**

Izbrane SMES z resveratrolom smo napolnili v kapsule in izvedli *in vitro* test raztapljanja z aparatom 2 (veslasto mešalo). Test raztapljanja smo izvedli v dveh medijih in sicer v pufru s pH 1,2 (slika 30), ki ponazarja okolje v želodcu in pufru s pH 6,8 (slika 31), ki ponazarja črevesno okolje. Vsi testirani SMES so vsebovali ricinusovo olje, nekateri pa tudi Capmul<sup>®</sup> MCM, ki je zmanjšal viskoznost sistema in s tem vplival na hitrejše samo-(mikro)emulgiranje, posledica tega pa je hitrejše sproščanje resveratrola iz sistema. Sistemi, ki so kot oljno fazo vsebovali samo ricinusovo olje, pa so imeli zaradi velike viskoznosti daljše čase sproščanja resveratrola. Sproščanje resveratrola iz SMES 5R (ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) in SMES 9R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 60) poteka hitreje v pufru s pH 1,2 v primerjavi s sproščanjem v pufru s pH 6,8, medtem ko se resveratrol iz SMES 8R (Capmul<sup>®</sup> MCM, ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40) hitreje sprosti v pufru s pH 6,8. Iz ostalih dveh sistemov pa se resveratrol sprošča približno enako hitro v obeh testiranih medijih. Dobljene profile sproščanja resveratrola iz SMES smo primerjali s časom raztapljanja enake količine samega resveratrola. Ugotovili smo, da se sam resveratrol še ne raztopi v času, kot se je raztopil če je bil vgrajen v SMES, iz česar lahko sklepamo, da smo z vgraditvijo resveratrola v SMES izboljšali njegovo topnost v pufru s pH 1,2 in pH 6,8.





Slika 30: Profil sproščanja resveratrola iz SMES v pufru pH 1,2.



Slika 31: Profil sproščanja resveratrola iz SMES v pufru pH 6,8.

## 7. SKLEPI

- Na osnovi določitve solubilizacijske kapacitete za resveratrol smo za izdelavo SMES izbrali kot oljno fazo Capmul<sup>®</sup> MCM in ricinusovo olje ter kot emulgatorje različne vrste Cremophorjev kot so: Cremophor<sup>®</sup> EL, Cremophor<sup>®</sup> RH 40 in Cremophor<sup>®</sup> RH 60.
- Za posamezne kombinacije oljnih faz in emulgatorjev smo s titracijsko metodo izdelali (psevdo)trikomponentne fazne diagrame, iz katerih smo določili področje nastanka mikroemulzij, ki so ena od možnih asociacijskih struktur, ki nastanejo po redčenju SMES z vodo.
- Izdelali smo deset (psevdo)trikomponentnih faznih diagramov in sicer:
  - Capmul<sup>®</sup> MCM / Cremophor<sup>®</sup> EL,
  - ricinusovo olje / Cremophor<sup>®</sup> EL,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM : ricinusovo olje (1 : 1) / Cremophor<sup>®</sup> EL,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM / Cremophor<sup>®</sup> RH 40,
  - ricinusovo olje / Cremophor<sup>®</sup> RH 40,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM : ricinusovo olje (1 : 1) / Cremophor<sup>®</sup> RH 40,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM / Cremophor<sup>®</sup> RH 60,
  - ricinusovo olje / Cremophor<sup>®</sup> RH 60,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM : ricinusovo olje (1 : 1) / Cremophor<sup>®</sup> RH 60,
  - Capmul<sup>®</sup> MCM : ricinusovo olje (1 : 1) / Cremophor<sup>®</sup> EL : Cremophor<sup>®</sup> RH 40 (1 : 1).

SMES s Capmul<sup>®</sup> MCM so izkazovali večje območje nastanka mikroemulzij v primerjavi s SMES z ricinusovim oljem, njuna kombinacija pa je območje nastanka mikroemulzij še povečala. To pripisujemo dejstvu, da Capmul<sup>®</sup> MCM zaradi nizkega HLB deluje tudi kot koemulgator ter s tem olajša nastanek mikroemulzij tipa V/O, ki nastanejo pri manjših deležih vodne faze. Za najustrenejši emulgator se je izkazal Cremophor<sup>®</sup> EL, saj njegova prisotnost v SMES poveča območje nastanka mikroemulzij v primerjavi z uporabo ostalih dveh emulgatorjev. Večji nastanek mikroemulzij je verjetno posledica različnih kemizmov emulgatorjev saj ima Cremophor<sup>®</sup> EL nenasičene alikilne verige, ostala dva pa nasičene.

- Za nadaljne proučevanje smo iz vsakega (psevdo)trikomponentnega faznega diagrama izbrali SMES, ki ob najmanjšem deležu emulgatorja tvori mikroemulzije po celotni razredčitveni premici.
- SMES, ki so kot oljno fazo vsebovali samo ricinusovo olje, so kazali višjo solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol v primerjavi s SMES z Capmulom<sup>®</sup> MCM, ob uporabi njune kombinacije pa se je solubilizacijska kapaciteta za resveratrol zmanjšala. Na solubilizacijsko kapaciteto SMES pa ima vpliv tudi izbor emulgatorjev saj imajo SMES, ki vsebujejo Cremophor<sup>®</sup> EL nižjo solubilizacijsko kapaciteto za resveratrol od ostalih.
- Pripravljeni SMES so odporni na temperaturne spremembe in kompatibilni s trdimi želatinskimi kapsulami.
- Sistemi, ki vsebujejo kot oljno fazo samo ricinusovo olje, imajo večjo viskoznost kot ostali sistemi. Dodatek resveratrola pa je viskoznost vseh sistemov zelo povečal. Nizko viskozni SMES so imeli krajše čase samo-(mikro)emulgiranja v primerjavi z visoko viskozni. Izjema je bil le SMES s Capmulom<sup>®</sup> MCM in Cremophorjem<sup>®</sup> EL, ki je imel kljub nizki vizkoznosti daljše čase samo-(mikro)emulgiranja.
- Disperzije, ki so nastale pri redčenju SMES v različnih medijih, so imele ustrezno velikost kapljic (pod 50 – 100 nm) in nizek PDI, kar dokazuje nastanek mikroemulzij. Izjema je bila disperzija iz SMES s Capmulom<sup>®</sup> MCM in Cremophorjem<sup>®</sup> EL, ki je imela večje kapljice in visok PDI. Z dodatkom resveratrola pa se je zelo povečala velikost kapljic mikroemulzij pri vseh preskušanih sistemih, prav tako pa se je zelo povečal tudi PDI, kar pomeni nastanek heterogene disperzije in posledično tudi povečanje povprečja velikosti kapljic mikroemulzij. Zeta potencial mikroemulzij pa se ob dodatku resveratrola skoraj ne spremeni.
- Za *in vitro* test raztapljanja smo izbrali SMES z resveratrolom, iz katerih so pri redčenju s testiranimi mediji nastale disperzije z najustreznejšo velikostjo kapljic, PDI vrednostjo in zeta potencialom. Izbrali smo sisteme, ki so vsebovali ricinusovo olje in Cremophor<sup>®</sup> RH 40 oz. RH 60 ter sisteme ki so vsebovali kombinacijo Capmul<sup>®</sup> MCM / ricinusovo olje z emulgatorji Cremophor<sup>®</sup> RH 40, Cremophor<sup>®</sup> RH 60 oz. kombinacijo Cremophor<sup>®</sup> EL / Cremophor<sup>®</sup> RH 40. Čas sproščanja resveratrola iz SMES je krajši v primerjavi z raztapljanjem samega resveratrola, za

kar je vzrok večja topnost resveratrola vgrajenega v SMES. Znotraj preskušanih kombinacij na čas sproščanja vpliva predvsem viskoznost sistemov.

- Rezultati magistrske naloge potrjujejo, da so vrednoteni samo-mikroemulgirajoči sistemi zaradi spontanega nastanka in dobre solubilizacijske kapacitete za resveratrol primerni dostavni sistem za peroralno aplikacijo. Za potrditev izboljšanja biološke uporabnosti resveratrola z izdelanimi formulacijami, bi bilo potrebno v prihodnjosti narediti še *in vitro* in *in vivo* študije.

## 8. VIRI IN LITERATURA

1. Bisht C, Wagner K.H, Bulmer A.C, Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds, *Toxicology* 2010; 278: 88–100.
2. Elektronski vir:  
<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=277#> Dostop: 13.7.2011
3. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekers T, Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?, *Mutation Research* 2008; 658: 68–94.
4. Gupita S.C, Kannappan R, Reuter S, Kim J.H, Aggarwal B.B, Chemosensitization of tumors by resveratrol, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1215: 150–160.
5. Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N, Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here?, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1215: 144–149.
6. Elektronski vir:  
<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Fitoaleksini> Dostop: 15.7.2011
7. Das M, Das D.K, Resveratrol and cardiovascular health, *Molecular Aspects of Medicine* 2010; 31: 503–512.
8. Dong Z, Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol, *Mutation Research* 2003; 523–524: 145–150.
9. Stojanović S, Sprinz H, Brede O, Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of *trans*-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 391: 79-89.
10. Camont L, Cottart C.H, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F, Beaudeau J.L, Bonnefont-Rousselot D, Simple spectrophotometric assessment of the *trans*-/*cis*-resveratrol ratio in aqueous solutions, *Analytica Chimica Acta* 2009; 634: 121–128.

11. Elektronski vir:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol> Dostop: 10.9.2011

12. Bishayee A, Politis T, Darvesh A.S, Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma, *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36: 43 – 53.

13. Szkudelska K, Szkudelski T, Resveratrol, obesity and diabetes, *European Journal of Pharmacology* 2010; 635: 1–8.

14. Xu J, Wang Z, You W, Zhang X, Li S, Barish P.A, Vernon M.M, Du X, Li G, Pan J, Ogle W.O, Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system, *European Neuropsychopharmacology* 2010; 20: 405–413.

15. Athar M, Back J.H, Tang X, Kim K.H, Kopelovich L, Bickers D.R, Kim A.L, Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; 224: 274–283.

16. Kang S.S, Cuendet M, Endringer D.C, Croy V.L, Pezzuto J.M, Lipton A.M, Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF- $\kappa$ B, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17: 1044–1054.

17. Manček B, Pečar S, Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih, *Farmacevtski vestnik* 2001; 52: 133-144.

18. Chan W.K, Delucchi A.B, Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4, *Life Sciences* 2000; 67: 3103–3112.

19. Hoshino J, Park E.J, Kondratyuk T.P, Marler L, Pezzuto J.M, van Breemen R.B, Mo S, Li Y, Cushman M, Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites, *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 53: 5033–5043.

20. Pouton C.W, Porter C.J.H, Formulation of lipid-based delivery system for oral administration: Materials, methods and strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 625-637.

21. Porter C.J.H, Pouton C.W, Cuine J.F, Charman W.N, Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 673-691.

22. Poulton C.W, Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 11, Suppl. 2: S93-S98.
23. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J, Samo(mikro)emulgirajoči sistemi-alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin, *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 263-268.
24. Gursoy R.N, Benita S, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173–182.
25. Jurkovič P, Gašperlin M, Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin, *Farmacevtski vestnik* 2004; 55: 565-571.
26. Rozman B, Bogataj M, Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo, *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 189-195.
27. Eccleston G.M., Emulsions and Microemulsions, In: Swarbrick J, *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 3th ed., Vol.3, Informa Healthcare, New York, 2007: 1548-1565.
28. Martin A, *Physical pharmacy* 4th ed., Lea & Febiger, London, 1993: 43-44.
29. Gibson L, Lipid-based Excipients for Oral Drug Delivery, In: Hauss D.J: *Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs*, Vol.170, Informa Healthcare, New York, 2007: 33-61.
30. Bowtle W.J, Materials, Process, and Manufacturing Considerations for Lipid-Based Hard-Capsule Formats, In: Hauss D.J: *Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs*, Vol.170, Informa Healthcare, New York, 2007: 79-106.
31. Grove M, Müllertz A, Liquid Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems, In: Hauss D.J.: *Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs*, Vol.170, Informa Healthcare, New York, 2007: 107-127.
32. Elektronski vir:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrophilic-lipophilic\\_balance](http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrophilic-lipophilic_balance) Dostop: 23.7.2011

33. Pouton C.W, Formulation of self-emulsifying drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 47-58.

34. Porter C.J.H, Trevaskis N.L, Charman W.N, Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipiphilic drugs, *Nature reviews Drug discovery* 2007; 6: 231-248.

35. Rowe R.C, Sheskey P.J, Quinn M.E, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6th ed., Pharmaceutical Press and the American pharmaceutical Association, London, 2009: 126-127, 283-286, 288-290, 470-472, 542-549.

36. Elektronski vir:

[http://www.abiteccorp.com/i\\_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20Tech%20Data/CAPMUL%20MCM%20TDS%20I-13.pdf](http://www.abiteccorp.com/i_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20Tech%20Data/CAPMUL%20MCM%20TDS%20I-13.pdf) Dostop: 21.7.2011

37. Elektronski vir:

<http://www.abiteccorp.com/uploads/File/Capmul%20MSDS/Capmul%20MCM.PDF>  
Dostop: 21.7.2011

38. Elektronski vir:

[http://www.abiteccorp.com/i\\_templates/administration/tinymce/uploaded/File/ABITEC%200Brochures/ABITEC\\_PersonalCareBroc\\_WEB\\_FPS.pdf](http://www.abiteccorp.com/i_templates/administration/tinymce/uploaded/File/ABITEC%200Brochures/ABITEC_PersonalCareBroc_WEB_FPS.pdf) Dostop: 22.7.2011

39. Prajapati H.N, Dalrymple D.M, Serajuddin A.T.M, A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid/Surfactant/Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development, *Pharmaceutical Research* 2011; DOI 10.1007/s11095-011-0541-3.

40. Elektronski vir:

[http://www.abiteccorp.com/i\\_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20PG-8%20TDS%20I-11.pdf](http://www.abiteccorp.com/i_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20PG-8%20TDS%20I-11.pdf) Dostop: 21.7.2011

41. Elektronski vir:

[http://www.abiteccorp.com/i\\_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20PG-8%20TDS%20I-11.pdf](http://www.abiteccorp.com/i_templates/administration/tinymce/uploaded/File/Capmul%20PG-8%20TDS%20I-11.pdf) Dostop: 21.7.2011



42. Elektronski vir:

<http://abstracts.aapspharmaceutica.com/expoaaps07/Data/EC/Event/Exhibitors/263/cb63fb76-28f4-4948-a6d0-ae249dae9c30.pdf> Dostop 21.7.2011

43. Elektronski vir:

[http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en\\_US/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30035134/.pdf?title=&asset\\_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase\\_EU:09007af880097ee1.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30035134/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af880097ee1.pdf) Dostop: 22.7.2011

44. Elektronski vir:

[http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en\\_US/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30035153/.pdf?title=&asset\\_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase\\_EU:09007af88011c53c.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30035153/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af88011c53c.pdf) Dostop: 22.7.2011

45. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *Journal of Controlled Release* 2004; 95: 217– 227.

46. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential Theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008: 16-1 DO 16-11.

47. Li P, Ghosh A, Wagner R.F, Krill S, Joshi Y. M, Serajuddin A.T.M, Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 288: 27–34.

48. Müllertz A, Ogbonna A, Ren S, Rades T, New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; DOI 10.1111/j.2042-7158.2010.01107.x.

49. Wei L, Sun P, Nie S, Pan W, Preparation and Evaluation of SEDDS and SMEDDS Containing Carvedilol, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2005; 31:785–794.

50. Zeng J, Challenges and strategies in formulation development of oral solid low-dose drug products, In: Zheng J, *Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products*, Wiley, New Jersey, 2009: 25.