

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



TJAŠA ŽIBERNA

**STABILNOST RESVERATROLA V TRDNIH  
SAMO-MIKROEMULGIRAJOČIH SISTEMIH**

**STABILITY OF RESVERATROL IN SOLID  
SELF-MICROEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo 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 vse koristne nasvete, usmeritve in spodbude pri izdelavi magistrske naloge. Zahvala gre tudi doc. dr. Alenki Zvonar, mag. farm, za pomoč pri DSC analizi ter obema strokovnima sodelavkama, Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan, za njuno dostopnost in pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju. Dodatno se zahvaljujem tudi svojim staršem, ker so mi omogočili študij, me spodbujali in mi stali ob strani, in vsem prijateljem, ki so mi tekom študija pomagali in verjeli vame.*

## **Izjava**

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

**Tjaša Žiberna**

Diplomska komisija:

Predsednik: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

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

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

**KAZALO**

<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 RESVERATROL.....	1
1.1.1 Farmakodinamske lastnosti resveratrola .....	1
1.1.2 Farmakokinetične lastnosti resveratrola .....	3
1.1.3 Farmacevtske oblike z resveratrolom .....	4
1.2 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI.....	6
1.2.1 Samo-mikroemulgirajoči sistemi (SMES).....	7
1.2.2 Pomožne snovi pri izdelavi samo-mikroemulgirajočih sistemov.....	8
1.2.3 Supernasičeni in trdni samo-mikroemulgirajoči sistemi .....	9
1.3 PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV IN ABSORPCIJA HIDROFOBNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN IZ GIT .....	10
1.4 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA .....	13
1.4.1 Sestavine medija pri <i>in vitro</i> lipolizi.....	13
1.4.2 pH-stat metoda.....	15
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>17</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	<b>18</b>
3.1 MATERIALI .....	18
3.2 NAPRAVE.....	22
3.3 METODE.....	23

3.3.1	Priprava fizikalnih zmesi .....	23
3.3.2	Priprava tekočega samo-mikroemulgirajočega sistema .....	23
3.3.3	Priprava samo-mikroemulgirajočih praškov .....	23
3.3.4	Priprava samo-mikroemulgirajočih tablet .....	23
3.3.5	Staranje trdnih samo-mikroemulgirajočih dostavnih sistemov in fizikalnih zmesi .....	25
3.3.6	Določanje vsebnosti v samo-mikroemulgirajočih praških, tabletah in fizikalnih zmesih .....	25
3.3.7	<i>In vitro</i> sproščanje resveratrola .....	26
3.3.8	<i>In vitro</i> lipoliza .....	28
3.3.9	Določanje koncentracije RSV z metodo HPLC .....	33
3.3.10	Diferenčna dinamična kalorimetrija .....	35
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>36</b>
4.1	DOLOČANJE VSEBNOSTI RESVERATROLA V TEKOČEM IN TRDNIH SMES TER V FIZIKALNIH ZMESEH .....	36
4.2	<i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE RESVERATROLA .....	37
4.3	<i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ FIZIKALNIH ZMESI PRED IN PO STARANJU .....	38
4.4	<i>IN VITRO</i> SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ TRDNIH SMES.....	41
4.5	<i>IN VITRO</i> LIPOLIZA TRDNIH SMES.....	49
4.6	DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA.....	52
<b>5</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>60</b>

## POVZETEK

Resveratrol (RSV) je polifenol naravnega izvora in je slabo vodotopna zdravilna učinkovina (ZU) z dobro permeabilnostjo (skupina II po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu). Najdemo ga lahko v različnih rastlinah: vinski trti, borovnicah, brusnicah, arašidih, japonskem dresniku (*Polygonum cuspidatum*) in mnogih drugih. Zaradi neugodnih farmakokinetičnih lastnosti (slaba topnost v vodi in hiter metabolizem) kljub obetavnim terapevtskim lastnostim ne dosega ustrezno visokih plazemskih koncentracij za ugoden terapevtski učinek. Z namenom izboljšati njegovo topnost smo ga v okviru naše raziskave vgradili v tekoč samo-mikroemulgirajoči sistem (SMES), izotropno zmes naravnih ali sinteznih olj, trdnih/tekočih emulgatorjev ali hidrofilnih topil in sotopil/koemulgatorjev, ki pod vplivom rahlega mešanja (npr. peristaltika) in redčenja z vodnim medijem spontano tvorijo transparentne mikroemulzije tipa olje v vodi (o/v) z velikostjo kapljic 50–100 nm. Tekoči SMES z RSV smo nato adsorbirali na porozne nosilce (Neusilin<sup>®</sup> US2, Sylysia<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244FP) in izdelali praške. Tem smo dodali pomožne snovi za tabletiranje in jih stisnili v tablete. Z omenjenimi poroznimi nosilci smo izdelali tudi fizikalne zmesi z RSV v masnem razmerju 1 : 1. Da bi proučili, kako se spreminja stabilnost RSV v trdnih SMES med staranjem, smo trdne SMES (praške in tablete) in fizikalne zmesi starali v sušilniku pri zvišani temperaturi 40 °C. Po 30 in 90 dnevih staranja smo preverili vsebnost RSV v vseh vzorcih, izvedli preizkus *in vitro* sproščanja v pufrih s pH 1,2 in s pH 6,8 in posneli DSC termograme za vsak vzorec. Trdne SMES smo še dodatno analizirali z *in vitro* lipolizo. Ta metoda upošteva tudi vpliv razgradnje lipidov, ki so sestavni del na lipidih oblikovanih sistemov (v katere sodijo SMES), na sproščanje ZU. Zaradi omenjenega je lahko napovedovanje dogajanja *in vivo* relevantnejše kot napovedovanje na podlagi preizkusa *in vitro* sproščanja. Vse pridobljene rezultati smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili z istimi metodami pred staranjem.

Ugotovili smo, da lahko z vgradnjo RSV v SMES dosežemo boljše stabilnost in večjo zaščito RSV kot s pripravo fizikalnih zmesi, saj se je vsebnost v trdnih SMES med staranjem manj zmanjšala kot vsebnost v fizikalnih zmesih. Sproščanje RSV iz trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244FP, ki imata enak kemizem, se s časom ni enakomerno spreminjalo, saj smo največji obseg sproščanja ponekod opazili po 30- ali 90-dnevnem staranju. Sproščanje iz

trdnih SMES z Neusilinom<sup>®</sup> US2 pa se je s staranjem enakomerno zmanjševalo v fosfatnem puftru, v kislem pa nismo opazili sprememb. Ker je Neusilin<sup>®</sup> US2 kemijsko drugačen od Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloida<sup>®</sup> 244FP, smo domnevali, da je pri adsorpciji emulgatorjev na Neusilin<sup>®</sup> US2 prišlo do drugačnih povezav kot pri ostalih dveh nosilcih, po staranju pa so se emulgatorji najverjetneje kemijsko tako spremenili, da je njihova adsorpcija na Neusilin<sup>®</sup> s časom postajala vse močnejša. Manjši premer por Neusilina<sup>®</sup> US2 v primerjavi z ostalimi nosilci dodatno otežuje izpostavljenost por mediju in s tem sproščanje RSV. Pri *in vitro* sproščanju se je ne glede na dolžino staranja iz praškov vedno sprostilo več RSV kot iz tablet. Rezultati *in vitro* lipolize so pokazali, da se je delež raztopljenega RSV pri praških s časom staranja povečeval, pri tabletah pa je ostal skoraj enak. Iz DSC termogramov smo razbrali, da se je RSV v fizikalnih zmesih nahajal deloma v kristalinični obliki, na kar staranje ni vplivalo. V vseh trdnih SMES pa je med staranjem ostal raztopljen in ni prišlo do njegove rekristalizacije.

V okviru magistrske naloge smo torej ugotovili, da vgradnja RSV v trdni SMES izboljša stabilnost v primerjavi s fizikalnimi zmesmi, saj se je vsebnost po staranju v trdnih SMES zmanjšala za manj kot 10 %. Pri sproščanju v kislem puftru med samim *in vitro* preizkusom pri trdnih SMES nismo opazili padca deleža sproščenega RSV, ki je bil pri fizikalnih zmesih najverjetneje posledica pretvorbe iz *trans* v *cis* obliko. Sproščanje iz trdnih SMES se je najverjetneje spreminjalo zaradi kemijskih sprememb emulgatorjev, kar pa bi morali v prihodnosti bolj temeljito proučiti. Z *in vitro* testom sproščanja sta se za najbolj stabilnega izkazala prašek s Sylysio<sup>®</sup> 350 in tablete s Syloidom<sup>®</sup> 244FP, z *in vitro* lipolizo pa smo videli, da so bile najstabilnejše tablete z Neusilinom<sup>®</sup> US2 in Sylysio<sup>®</sup> 350. Da bi ugotovili, po kateri metodi je bolje napovedovati *in vivo* doganje, bi morali zvesti še *in vivo* študije in preveriti korelacijo z *in vitro* metodama.

**KLJUČNE BESEDE:** resveratrol, trdni samo-mikroemulgirajoči sistem, stabilnost, staranje, *in vitro* lipoliza

## ABSTRACT

Resveratrol (RSV) is a natural polyphenol found in several plants: grapevine, blueberries, cranberries, peanuts, Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*) and many others. It has very poor aqueous solubility but high permeability, classifying it as a class II active substance according to the Biopharmaceutics Classification System. Due to its unfavorable pharmacokinetic properties (poor aqueous solubility and extensive metabolism) and consequently low oral bioavailability, sufficient plasma concentration for beneficial therapeutic effects cannot be reached. In this study, we aimed to improve its aqueous solubility by incorporating it into a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). By definition, SMEDDS is an isotropic mixture of natural/synthetic oils, solid/liquid surfactants, or hydrophilic solvents and co-solvents/co-surfactants that have the ability to form transparent oil in water (o/w) microemulsions only by mild agitation (e.g. peristalsis) and dilution with an aqueous media. The droplet size of the microemulsions ranges from 50 to 100 nm. We adsorbed the liquid SMEDDS with the RSV onto porous carriers (Neusilin<sup>®</sup> US2, Sylysia<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244FP) to produce powders. Excipients were added to the powders which were then made into tablets by direct compression, using a single-punch tableting press. We also prepared physical mixtures of RSV and each porous carrier with a mass ratio of 1 : 1. In order to investigate the stability of the RSV in solid SMEDDS (powders, tablets) during storage, physical mixtures and solid SMEDDS were stored in a dryer at the increased temperature of 40 °C. After 30 and 90 days of storage, we assessed the RSV content of all samples and performed *in vitro* dissolution tests in two buffers with a pH value of 1,2 and 6,8. Additionally, DSC analysis was carried out to determine any thermal changes during storage. Furthermore, solid SMEDDS were analyzed by an *in vitro* lipolysis method, which also considers the influence of lipid degradation (SMEDDS is a lipid based drug delivery system) on the drug release. Therefore, the *in vitro* lipolysis method is considered relevant than the *in vitro* dissolution test for predicting the *in vivo* release of the drugs. All acquired results were compared to those obtained before storage.

We found that incorporating the RSV into solid SMEDDS increased the stability of the RSV in comparison with physical mixtures, as the content of RSV in solid SMEDDS decreased less

during storage than in the physical mixtures. RSV is therefore more protected from isomerization in solid SMEDDS.

The RSV release from solid SMEDDS with Sylysia<sup>®</sup> 350 and Syloid<sup>®</sup> 244 (which are chemically identical) as porous carriers did not change evenly with time, sometimes the highest drug release was determined after 30 or 90 days of storage. The most probable reason are chemical changes of surfactants (probably due to hydrolysis and peroxidation), caused during storage, which result in differences in their adsorption onto porous carriers. On the other hand, the RSV release from solid SMEDDS with Neusilin<sup>®</sup> US2 was decreased with the duration of storage. In comparison to the other two carriers, we assumed that slightly different bonds were established between emulsifiers and carriers in the case of Neusilin<sup>®</sup> US2, the chemical changes in the surfactants leading to their increased adsorption. Using the *in vitro* lipolysis method, we obtained the following results: after storage the amount of dissolved RSV increased in the case of powders, but stayed almost unaltered during the *in vitro* lipolysis test of the tablets. From thermograms of the DSC analysis we concluded that RSV existed partially in crystalline form and there were no changes during the storage. The RSV in solid SMEDDS stayed dissolved and no recrystallization was observed.

In conclusion, the stability of the RSV in solid SMEDDS improved in comparison with physical mixtures, because the RSV-content after storage in solid SMEDDS decreased by less than 10 %. Furthermore, during the *in vitro* dissolution test of the physical mixtures in an acidic buffer we observed some decline in the amount of released RSV, which was not present in the case of solid SMEDDS. The RSV was better protected in solid SMEDDS and a conversion of its *trans* form to *cis* did not occur. The Sylysia<sup>®</sup> 350 powder and Syloid<sup>®</sup> 244 FP tablets exhibited the highest stability during the *in vitro* dissolution test. On the other hand, limited differences were noticed after the *in vitro* lipolysis of the Neusilin<sup>®</sup> US2 and Sylysia<sup>®</sup> 350 tablets. To check which method is better in predicting the *in vivo* events we should carry out *in vivo* studies.

**KEY WORDS:** resveratrol, solid self-microemulsifying system, stability, storage, *in vitro* lipolysis



**SEZNAM OKRAJŠAV**

COX – ciklooksigenaza

DG – diglicerid

eNOS – endotelijska NO sintaza

FO – farmacevtska oblika

GIT – gastrointestinalni trakt

HLB – hidrofilno–lipofilno ravnotežje

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

MG – monoglicerid

o/v – olje v vodi

PMK – prosta maščobna kislina

ROS – reaktivne kisikove snovi

RSV – resveratrol

RSV-SMES – samo-mikroemulgirajoči sistem z vgrajenim resveratrolom

SES – samoemulgirajoči sistem

SMES – samo-mikroemulgirajoči sistem

SOD – superoksid dizmutaza

TG – trigliceridi

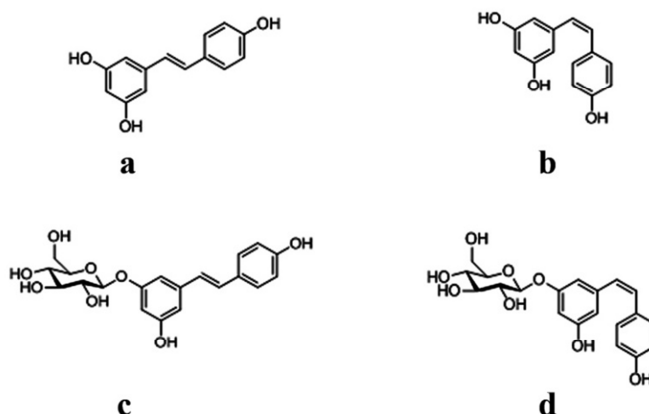
TBU – tributirinska enota

ZU – zdravilna učinkovina

# 1 UVOD

## 1.1 RESVERATROL

Resveratrol (RSV) ali 3,4',5-trihidroksistilben je fitoaleksin, sekundarni metabolit nekaterih rastlin, ki ga te sintetizirajo ob poškodbi ali napadu patogenih mikroorganizmov. V rastlinah je prisoten v prosti obliki – aglikonu in v obliki glikozida (slika 1). RSV najdemo v grozdju, murvah, arašidih, pistacijah, borovnicah in brusnicah. Ponavadi ga pridobivajo z ekstrakcijo iz grozdja in japonskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*). 1 g kožice grozdja vsebuje 50–100 µg RSV, njegova koncentracija v rdečem vinu se giblje med 0,2 in 5,8 mg/l (1, 2). Obstaja v dveh izomernih oblikah: *cis* in *trans*. Slednja je relativno stabilnejša, zato je v naravi pogostejša in bolje raziskana. Pod vplivom UV svetlobe se izomerizira v *cis* obliko (3).



Slika 1: Različne oblike RSV: a – *trans* RSV, b – *cis* RSV, c – *trans* glikozid, d – *cis* glikozid

### 1.1.1 Farmakodinamske lastnosti resveratrola

Znano je, da lahko snovi v hrani prispevajo k antioksidativni obrambi pred radikali, po drugi strani pa tudi k oksidativnemu stresu, ki povzroča neželjeno oksidacijo lipidov, proteinov, nukleinskih kislin in ogljikovih hidratov ter s tem povezan nastanek bolezni. RSV je polifenol, ki izkazuje svoje antioksidativne lastnosti na različne načine: ima sposobnost lovljenja reaktivnih kisikovih snovi (ROS) ter hkrati povečuje aktivnost encimov, ki metabolizirajo ROS, in zmanjšuje aktivnost encimov, ki povzročajo nastanek ROS (1). Zaradi njegovega

delovanja v stroki vse bolj narašča zanimanje za proučevanje njegove terapevtske vloge pri zdravljenju raka, srčno-žilnih boleznih, diabetesa in vnetja. RSV *in vitro* zavira proliferacijo tumorskih celic raka na prsih, debelem črevesju, želodcu, pljučih, prostati, jetrih in trebušni slinavki tako, da zavira delovanje ciklooksigenaze-1 (COX-1), ciklooksigenaze-2 (COX-2) in ornitin dekarboksilaze, kar povzroči zmanjšanje napredovanja raka. Preprečuje angiogenezo, z aktiviranjem kaspaz in preko nekaterih drugih mehanizmov povzroči apoptozo celic. Z aktiviranjem encimov druge faze metabolizma, ki sodelujejo pri odstranjevanju toksičnih snovi iz organizma, lahko prepreči aktivacijo karcinogenov (4, 5, 6). S posnemanjem kalorične restrikcije pa poveča občutljivost tumorskih celic na citostatike, saj zmanjša aktivnost glikolitičnih encimov in posledično povzroči ponovno aktivacijo mitohondrija in apoptoze (7).

RSV zmanjšuje pojav endotelijske disfunkcije, za katero je značilno manjše nastajanje NO, pospešeno vstopanje lipoproteinov, monocitov in limfocitov T, proliferacija gladkomišičnih celic in sinteza zunajceličnega matriksa, kar spodbuja protrombotično stanje v svetlini arterij (8). RSV namreč poveča izražanje manganove superoksid dizmutaze (SOD) in katalaze ter zmanjša oksidacijo lipoproteinov z nizko gostoto (LDL), ki se akumulirajo v aterosklerotičnih plakih. Zmanjšuje tudi agregacijo trombocitov, saj zavira interakcije med trombociti, kolagenom in trombinom ter relativno selektivno zavira COX-1. Po drugi strani RSV poveča nastajanje NO in s tem povezano vazodilatacijo tako, da poveča izražanje endoteliljske NO sintaze in zavira žilno NADP/NADPH oksidazo, pri čemer nastaja manj superoksidnega radikala, ki ga NO inaktivira (1, 9). Študije na živalih nakazujejo varovalno vlogo RSV pri sladkorni bolezni, saj ta varuje  $\beta$ -celice trebušne slinavke pred oksidativnimi poškodbami, znižuje nivo glukoze v krvi in poveča privzem glukoze v periferna tkiva ter odzivnost na inzulin (9).

RSV je zmožen prehajati hematoencefalno bariero in v možganih izkazuje nevroprotektivne učinke, ker poveča izražanje antioksidativnih encimov SOD in katalaze. Prav tako zavira aktivacijo jedrnega faktorja kapa B (NF- $\kappa$ B), na tak način se zmanjša nastajanje ROS in ekspresija vnetnih citokinov (1). Na živalskih modelih so opazili varovalni učinek RSV pri nekaterih nevrodegenerativnih boleznih: Alzheimerjevi (RSV aktivira AMP-protein kinazo, ki zmanjšuje akumulacijo amiloidnih plakov), Parkinsonovi (varuje dopaminergične nevrone) in

Huntingtonovi bolezni (izboljšuje motorično in kognitivno funkcijo), amiotrofni lateralni sklerozi ter nevropatski bolečini (2).

### 1.1.2 Farmakokinetične lastnosti resveratrola

Kljub mnogim koristnim učinkom RSV nima ugodnih farmakokinetičnih lastnosti. Biološka uporabnost zdravilne učinkovine (ZU) je odvisna od topnosti učinkovine, njene permeabilnosti skozi celične membrane in metabolizma. Biološka uporabnost RSV znaša manj kot 1 % (10). RSV pri prehajanju skozi epitelne celice črevesja zaradi svoje lipofilnosti in polifenolne strukture nima težav, je pa zaradi tega zelo slabo topen v vodi (3mg/100 ml) (11) in podvržen hitremu ter obsežnemu metabolizmu (12). Zanj so značilne predvsem tri metabolne poti: konjugacija hidroksilnih skupin s sulfatno in glukuronsko kislino ter hidrogeniranje alifatske dvojne vezi. Zadnje je najverjetneje produkt delovanja črevesnih bakterij. Glavni metabolit je glukuronid; pri velikih odmerkih RSV pa pride do nasičenja metabolnih encimov in nastanka večje količine sulfatnih metabolitov (3, 10, 12, 13). Ker RSV povečuje aktivnost jetrnih encimov druge faze, lahko inducira lasten metabolizem (3). Kolikšni odmerki so potrebni za določen terapevtski učinek še ni čisto znano. Do sedaj so pri *in vitro* študijah zaznali terapevtski učinek, če je bila koncentracija RSV v mikromolarnem območju (14). *In vivo* lahko z odmerkoma 0,5 g in 5 g dosežemo plazemski koncentraciji 0,3  $\mu\text{mol/l}$  oziroma 2,4  $\mu\text{mol/l}$  (15). Kljub majhni biološki uporabnosti je RSV učinkovit ne le *in vitro*, ampak tudi *in vivo*, zato je možno, da so metaboliti farmakološko aktivni in da lahko konjugirani derivati, predvsem glukuronidi, predstavljajo zalogo, iz katere se pod vplivom tkivnih  $\beta$ -glukuronidaz sprošča RSV. Pri proučevanju plazemskega profila po peroralni aplikaciji so opazili dva vrhova, enega po eni uri, drugega po šestih. Zadnji je najverjetneje rezultat enterohepatičnega kroženja metabolitov in njihove ponovne reabsorpcije po hidrolizi v črevesju (3, 10, 12, 13). Zaradi svoje slabe vodotopnosti je RSV v plazmi vezan na albumin in lipoproteine (3). Omenjene farmakokinetične lastnosti RSV in posledično majhne plazemske koncentracije RSV po peroralni aplikaciji predstavljajo razlog za pomisleke glede njegove uporabe v preprečevanju in zdravljenju kroničnih bolezni. Hkrati pa so znanstvenikom izziv, da se lotijo razvijanja novih strategij za povečanje biološke uporabnosti in s tem doseganje zadovoljive plazemske koncentracije RSV za terapevtski učinek.

### 1.1.3 Farmacevtske oblike z resveratrolom

Biolško uporabnost RSV lahko izboljšamo na različne načine: RSV lahko dodamo zaviralce njegovega metabolizma, namesto RSV lahko uporabimo njegove analoge, ki imajo morda boljše farmakokinetične lastnosti, ali pa RSV vgradimo v takšno farmacevtsko obliko (FO), ki bo izboljšala njegovo vodotopnost, ga zaščitila pred razgradnjo ali celo omogočila podaljšano oziroma ciljno sproščanje (16, 17). Oblikovanje novih dostavnih sistemov je v znanosti zaenkrat glavni pristop za izboljšanje farmakokinetičnih lastnosti RSV. Nekatere do sedaj razvite FO z RSV so prikazane v preglednici I.

*Preglednica I: Pregled do sedaj razvitih farmacevtskih oblik z RSV. Povzeto po (17–21).*

NAMEN	FARMACEVTSKA OBLIKA/VELIKOST	POMOŽNE SNOVI	OPOMBE
<b>Stabilizacija in zaščita RSV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• monodisperzne porozne polimerne mikrosfere (polimerizacija v prisotnosti porogena)</li> <li>• 5 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• polistiren</li> <li>• divinilbenzen</li> <li>• akrilonitril</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ohranjena antioksidativna aktivnost v primerjavi s čistim RSV</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kvasovke enkapsulirane z RSV</li> <li>• 6–8 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>• etanol</li> <li>• voda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RSV bolje zaščiten pred vplivom svetlobe – zmanjšano pretvarjanje v <i>cis</i> obliko</li> <li>• boljša stabilnost med shranjevanjem in antioksidativna učinkovitost mikrokapsul kot samega RSV</li> </ul>
<b>Povečana vodotopnost RSV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kompleksiranje z ciklodekstrini</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math>-ciklodekstrini,</li> <li>• hidroksipropil <math>\beta</math>-ciklodekstrin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• izboljšana vodotopnost</li> <li>• antioksidacijska sposobnost se v primerjavi s čistim RSV značilno ne zmanjša</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nanoemulzije</li> <li>• 17 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hidrogenirano polietoksilirano ricinusovo olje: surfaktant</li> <li>• EtOH: koemulgator,</li> <li>• izopropilmiristat: oljna faza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nanoemulzija je bila razvita s pomočjo psevdo-trikomponentnega diagrama</li> <li>• po treh mesecih ni prišlo do razplastitve faz</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• micelarne raztopine žolčnih kislin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• derivati žolčnih kislin</li> </ul>	/
<b>Zakasnjeno sproščanje in/ali povečana vodotopnost RSV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ca-pektinatne minisfere in mikrodenci</li> <li>• ~1 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pektin</li> <li>• <math>\text{CaCl}_2</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ciljno sproščanje v debelem črevesju ni bilo doseženo</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zn-pektinatne kroglice</li> <li>• ~950 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cinkov acetat dihidrat</li> <li>• pektin</li> <li>• hitosan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• močnejša mreža kot pri Ca-pektinatu</li> <li>• ciljno sproščanje v debelem črevesju je bilo doseženo</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akustično aktivne liposfere</li> <li>• 250–350 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kokosovo olje</li> <li>• fosfatidilholin</li> <li>• holesterol</li> <li>• perfluoropentan</li> <li>• perfluoroheksan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• podaljšano sproščanje</li> <li>• sproščanje je specifično na določenem mestu s pomočjo ultrazvoka</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>ultrafina vlakna z dvojnimi sloji</li> <li>134–1585 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>polikaprolakton – ovoj</li> <li>etanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>izdelana s pomočjo elektrospininga</li> <li>po začetnem hitrem sproščanju izkazujejo podaljšano sproščanje</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>polimerne lipidne nanokapsule</li> <li>240 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>polikaprolakton</li> <li>kaprilska, kapronska kislina</li> <li>polisorbitat 80</li> <li>sorbitan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>značilno višje koncentracije v možganih, jetrih kot v drugih tkivih pri podganah</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>biorazgradljivi nanodelci</li> <li>90 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>metoksi poli(etilen glikol)-poli(kaprolakton)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>izdelani z nanoprecipitacijo biorazgradljivega blok polimera</li> <li>po začetnem hitrem sproščanju izkazuje podaljšano sproščanje</li> <li>izboljšano prehajanje skozi glioma celice</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>liposomi</li> <li>70–100 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sojin fosfatidilholin</li> <li>holesterol</li> <li>diacetil fosfat</li> <li>pufer Tris-HCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>povečana stabilnost RSV pred oksidativno škodo UV-B žarkov in zmanjšana citotoksičnost RSV v velikih koncentracijah</li> <li>podaljšano sproščanje</li> <li>kombinacija kurkumina in RSV v liposomih poveča njen antitumorski učinek na raka na prostati</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>mešanice emulzij in liposomov</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kokosovo olje</li> <li>sojin lecitin</li> <li>glicerol</li> <li>neionskisurfaktanti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>podaljšano sproščanje</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>emulzije tipa o/v</li> <li>100–130 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kokosovo olje</li> <li>fosfatidilholin</li> <li>glicerol</li> <li>neioniki emulgatorji: Brij 30 in 35, Span 80, Tween 80</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>podaljšano sproščanje</li> <li>emulgiranje RSV je eden od glavnih pristopov za razvijanje farmacevtskih oblik z RSV</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>dvojne emulzije v/o/v (18)</li> <li>0,3–1,7 <math>\mu</math>m</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>etanol</li> <li>poliglicerolpoliricinolat : emulgator</li> <li>raztopina NaOH</li> <li>Tween 20: emulgator</li> <li>Natrijeva karboksimitil celuloza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>natrijeva karboksimitil celuloza zmanjšuje medfazno napetost in velikost kapljic, povečuje viskoznost in stabilnost zunanje faze</li> <li>potrebne so nadaljnje raziskave za izboljšanje vgrajevanja RSV v formulacijo</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>niosomi (19)</li> <li>0,4–11 <math>\mu</math>m</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Span 80, Span 60 s holesterolom</li> <li>etanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>majhna sposobnost vgrajevanja</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>elastični liposomi (20)</li> <li>RSV vključen skupaj s kvercetinom</li> <li>149 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hidroksipropil <math>\beta</math>-ciklodekstrin</li> <li>fosfatidilholin</li> <li>holesterol</li> <li>sterilamin</li> <li>natrijev deoksiholat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>obetavni dostavni sistemi primerni za podkožno aplikacijo pri zdravljenju prekomernega podkožnega maščevja</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>samoemulgirajoči sistem(21)</li> <li>24–200 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Izopropil miristat/Miglyol 812</li> <li>Monstanox 80/Lauroglycol FCC</li> <li>Etanol/Labrasol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>po inkubaciji endotelijskih celic s SES se je koncentracija RSV v citosolu in membranah značilno povečala v primerjavi z inkubacijo v etanolni raztopini RSV</li> </ul>

Ker naj bi bil RSV namenjen kronični uporabi (oziroma za preprečevanje/zdravljenje kroničnih bolezni), se raziskovalci pri načrtovanju osredotočajo predvsem na peroralne farmacevtske oblike, saj te bolnikom omogočajo najlažjo in najenostavnejšo uporabo. Iz zgornje preglednice lahko razberemo, da se v zadnjem času raziskave vse bolj usmerjajo k na lipidih osnovanim sistemom, ki bodo predstavljeni v nadaljevanju (17).

## 1.2 NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Slabo vodotopen ni samo RSV, s sodobnimi metodami razvijanja novih ZU (kombinatorična kemija in visoko zmogljivostno reševanje) je takšnih molekul vse več. Ocenili so, da je 40–70 % spojin, ki so kandidatke za nove ZU, slabo vodotopnih in posledično ne omogočajo dobre, enakomerne in ponovljive absorpcije, katere rezultat bi bila dovolj velika koncentracija ZU v plazmi za ustrezen terapevtski učinek. Absorpcija takšnih ZU iz konvencionalnih farmacevtskih oblik je neponovljiva, nanjo vpliva tudi hrana, ki lahko povzroči, da se naenkrat absorbira večja količina slabo vodotopne ZU, kar je lahko velika težava, če imajo ZU ozko terapevtsko okno. Z na lipidih osnovanimi sistemi se lahko izognemo slabi vodotopnosti ZU, povečamo čas zadrževanja ZU v želodcu in kasneje v tankem črevesju, zmanjšamo učinek hrane ter normaliziramo in povečujemo absorpcijo s povečevanjem prehodnosti gastrointestinalne membrane, z inhibicijo P-glikoproteina, s povečevanjem absorpcije v limfni obtok in z inhibicijo predsistemskega metabolizma (22).

Na lipidih osnovani sistemi so lahko enostavne raztopine iz olj ali kompleksnejše zmesi, sestavljene iz olj, emulgatorjev, koemulgatorjev in sotopil. Na podlagi njihove sestave in lastnosti jih je Pouton razporedil v 4 različne skupine v klasifikacijskem sistemu na lipidih osnovanih dostavnih sistemov (23):

- **Tip I:** ZU je raztopljen v trigliceridih (TG) oziroma mešanih gliceridih. Na lipidih osnovani sistemi tipa I so primerni za ZU, ki se v izbranih gliceridih dovolj dobro raztapljajo in ne potrebujejo hitre absorpcije (24). Da se lahko doseže želena biološka uporabnost vgrajene ZU, se morajo gliceridi najprej prebaviti, pri čemer nastanejo proste maščobne kisline (PMK) in 2-monogliceridi, ki skupaj z žolčnimi solmi in fosfolipidi tvorijo micelle, v katerih se ZU solubilizira. Topnost ZU po dispergiranju v prebavnem traktu je odvisna od dolžine verig maščobnih kislin, ki sestavljajo TG (23).

- **Tip II:** Sestavljeni so iz polarnih olj (srednjeverižna trigliceridna olja) in emulgatorjev s hidrofilno-lipofilnim ravnotežjem (HLB) pod 12 (npr. polisorbit 85). Če je vsebnost emulgatorjev nad 25 %, sistemi izkazujejo samoemulgirajoče lastnosti in v stiku z vodo spontano tvorijo emulzije tipa o/v. V kolikor delež emulgatorjev preseže 50 %, se zaradi nastanka viskoznih tekočih kristalov na medfazni površini med oljem in vodo proces emulgiranja upočasni (23).
- **Tip III:** Oblikujemo jih iz lipidnih komponent, hidrofilnih emulgatorjev (HLB vrednost nad 12) in iz sotopil. Pod vplivom rahlega mešanja in redčenja z vodo se hitro dispergirajo in tvorijo submikronske disperzije, prebava komponent pa ni več ključna za absorpcijo ZU (23). Razdelimo jih na dve podskupini: IIIa so sistemi, ki vsebujejo 40–80 % lipidov in 20–40 % sotopil/emulgatorjev, po dispergiranju se velikost kapljic giblje med 100–250 nm. Če zmanjšamo vsebnost lipidnih sestavin in povečamo delež emulgatorjev in sotopil na 20–50 %, dobimo samo-mikroemulgirajoče sisteme – IIIb, ki z vodo tvorijo transparentne mikroemulzije z velikostjo kapljic 50–100 nm (25).
- **Tip IV:** Sestavljajo jih samo emulgatorji ali zmesi emulgatorjev in sotopil. So najbolj hidrofilni izmed vseh štirih skupin, saj ne vsebujejo lipidnih komponent. Njihova prednost v primerjavi z ostalimi na lipidih osnovanimi sistemi je ta, da lahko v njih vgradimo velike količine ZU, vendar pa visoka vsebnost hidrofilnih emulgatorjev predstavlja večje tveganje za obarjanje ZU med prehodom skozi gastrointestinalni trakt (GIT). Poleg tega emulgatorji dražijo GIT in povzročajo lokalne poškodbe. Zaenkrat so v takšne formulacije vgradili nekatere zaviralce HIV proteaz (npr. Agenerase<sup>®</sup> z učinkovino aprenavir), ki so se kljub visokemu deležu emulgatorjev, visokim odmerkom in dolgotrajni uporabi izkazali za relativno varne (23).

### 1.2.1 Samo-mikroemulgirajoči sistemi (SMES)

V nadaljevanju se bomo osredotočili na samo-mikroemulgirajoče sisteme (SMES), ki so po definiciji izotropne zmesi naravnih ali sinteznih olj, trdnih/tekočih emulgatorjev ali hidrofilnih topil in sotopil/koemulgatorjev, ki pod vplivom rahlega mešanja (npr. peristaltika) in redčenja z vodnim medijem spontano tvorijo fine transparentne mikroemulzije tipa o/v, katere velikosti kapljic znašajo 50–100 nm (26). SMES izdelamo enostavno z mešanjem vseh sestavin. Z vgradnjo ZU v SMES se izboljša biološka uporabnost po peroralni aplikaciji. Za absorpcijo



ZU namreč ni nujno potrebno, da se SMES razgradi pod vplivom pankreasne lipaze. Ker po dispergiranju v prebavnem traktu nastane mikroemulzija, so nekatere kapljice tako majhne, da lahko prehajajo mucin in nemešajoči vodni sloj črevesnega epitelijskega. Zmanjša se vpliv hrane in absorpcija iz GIT je lažje ponovljiva. Površina kapljic po dispergiranju je zelo velika, zato je absorpcija lažja in hitrejša (24). Emulgatorji prav tako interagirajo z lipidnim dvoslojem celičnih membran, pri tem porušijo njihovo strukturo in povečajo absorpcijo ZU. Preko inhibicije P-glikoproteinov pomožne snovi v SMES zmanjšujejo predsystemske metabolizem. ZU je ujeta v oljnih kapljicah, ki ZU ščitijo pred kemijsko in encimatsko razgradnjo. Nekatere lipidne sestavine sodelujejo pri tvorbi lipoproteinov, s čimer lahko spodbudijo privzem ZU v limfo (27).

Mehanizem samoemulgiranja ni v celoti raziskan. Do samoemulgiranja pride, ko je entropijska sprememba pri dispergiranju večja od energije, ki je potrebna, da se pri nastanku majhnih kapljic poveča medfazna energija. Najprej se tvori medfazna površina med vodno in oljno fazo, nato pride zaradi prehajanja vode skozi medfazno površino do solubilizacije vode v oljni fazi. Nadaljnje prehajanje vode privede do nastanka dispergiranih tekočih kristalov. Postopno se na celotni medfazni površini izoblikuje plast tekočih kristalov, ki pospeši prehajanje vode, to pa na koncu poruši medfazo. Izoblikujejo se kapljice, obdane s tekočimi kristali. Zaradi teh so SMES termodinamsko zelo stabilni in v času shranjevanja ter uporabe ne pride do razslojevanja faz, tako kot pri navadnih emulzijah (27).

### **1.2.2 Pomožne snovi pri izdelavi samo-mikroemulgirajočih sistemov**

Nastanek SMES omogočajo le zelo specifične kombinacije pomožnih snovi. Optimalne koncentracije posameznih komponent za samo-mikroemulgirajoče lastnosti določimo s konstrukcijo (psevdo)trikomponentnih diagramov. Zavedati se moramo, da lahko tudi sama ZU vpliva na sposobnost mikroemulgiranja, saj lahko interagira s tekočimi kristali ali pa se vrine v sloj emulgatorjev. Mikroemulzije z manjšo velikostjo kapljic so dovezetnejše za spremembe zaradi dodatka ZU (27).

**Olja** predstavljajo najpomembnejšo komponento za raztapljanje ZU, pospešujejo samoemulgiranje in absorpcijo v limfni sistem. Olj, ki jih najdemo v hrani, ponavadi ne vključimo v SMES, ker imajo slabšo sposobnost raztapljanja večjih količin ZU. Pogosteje

uporabimo modificirana in hidrolizirana rastlinska olja, ker imajo emulgatorske lastnosti in zaradi tega ZU bolje raztapljajo (27, 28). Nerazgradljivim lipidom se običajno izognemo, ker zadržujejo ZU in se ne razgradijo, s tem pa zmanjšujejo absorpcijo ZU (29). Če želimo, da se ZU absorbira v limfo, raje izberemo dolgoveržne TG. Z njimi pospešimo nastanek hilomikronov, ki skupaj s vključenimi TG in ZU prehajajo v limfo (25, 30).

Za izdelavo SMES najraje uporabimo neionske **emulgatorje** z visokimi HLB vrednostmi, ker so veliko manj toksični od ionskih. Visoka HLB vrednost je potrebna za to, da so dovolj hidrofilni za takojšnjo tvorbo emulzije o/v ob redčenju z vodno fazo. Pogosto izberemo trdne ali tekoče etoksilirane poliglikolirane gliceride in polioksietilen-20-oleat (Tween 20). Vsebnost emulgatorjev se navadno giblje okrog 30–60 %, pri čemer se izognemo draženju GIT (27, 28).

**Sotopila**, ki so primerna za peroralno aplikacijo, so EtOH, polipropilen glikoli in polietilen glikoli. Omogočajo raztapljanje večjih količin emulgatorjev in ZU v lipidni osnovi, imajo pa tudi emulgatorske lastnosti. Pri uporabi hlapnih sotopil se moramo zavedati, da lahko ta izhlapijo in posledično povzročajo obarjanje ZU, pri polnjenju tekočega SMES v kapsulo pa obstaja verjetnost, da sotopila raztopijo želatinsko ovojnico (27, 28).

### 1.2.3 Supernasičeni in trdni samo-mikroemulgirajoči sistemi

Zaradi negativnih učinkov emulgatorjev na GIT so razvili supernasičene SMES, ki vsebujejo manjši delež emulgatorjev, dodani pa so jim bili polimerni inhibitorji precipitacije, da ni prišlo do obarjanja ZU (npr. hidroksipropilmetilceluloza) (24). Ko so silibin vgradili v supernasičeni SMES, se je njegovo obarjanje upočasnilo, biološka uporabnost pa se je v primerjavi z običajnimi SMES povečala za 3-krat (31).

Tekoče SMES lahko pretvorimo tudi v trdne in s tem združimo prednosti SMES in trdnih farmacevtskih oblik: večja topnost in izboljšana biološka uporabnost ter enostavnost kontrole procesa izdelave, stabilnost trdnih SMES, ponovljiva, cenovno ugodna izdelava in dobra komplanca bolnikov. Trdne SMES izdelamo tako, da tekoče/poltrdne SMES polnimo v kapsule ali jih pretvorimo v praške/nanodelce/mikrokapsule/zrnca/pelete z različnimi metodami:

- s preprosto absorpcijo tekočih SMES na trdne nosilce;
- s sušenjem z razprševanjem;
- z granulacijo talin;
- z iztiskanjem ali krogličanjem talin (32);
- z mikrokapsuliranjem (33).

Večenočne trdne SMES lahko nato naprej polnimo v kapsule ali jih stisnemo v tablete. V znanstveni literaturi lahko zasledimo, da so že izdelali tudi SMES svečke, globule in vsadke. (32). Trenutno so komercialno dostopne le SMES kapsule, da se bodo lahko na tržišču pojavili še drugi trdni SMES, bo treba dobro proučiti, katere pomožne snovi izbrati, kakšne so interakcije med njimi in ZU ter kakšna je stabilnost trdnih SMES med staranjem. Vsekakor pa je treba s pretvorbo tekočih SMES v trdne zagotoviti, da se ohranijo samo-mikroemulgirajoče lastnosti. FO se bo lahko na tak način hitro dispergirala, absorpcija pa bo tako kot pri tekočih SMES hitra in ponovljiva (34).

### **1.3 PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH SISTEMOV IN ABSORPCIJA HIDROFOBNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN IZ GIT**

Hitrost absorpcije neelektrolitov iz kristalinične oblike je odvisna od hitrosti raztapljanja in prehajanja skozi celično membrano črevesnih celic. Nekatere hidrofobne ZU so zaradi svojega pKa v GIT šibki elektroliti, kar jim omogoča, da so bolj ali manj v ionizirani obliki, ki je z neionizirano obliko v ravnotežju. Slednja prehaja celično membrano, ionizirana pa predstavlja rezervoar, iz katerega neprestano nastaja neionizirana oblika. Pri ZU, ki niso elektroliti ali imajo takšen pKa, ki jim ne omogoča, da bi bile v GIT ionizirane, predstavlja proces raztapljanja omejujoč dejavnik za absorpcijo. Zato je primerno, da jih vgradimo v takšno FO, ki bo omogočala, da bo ZU pri prehodu skozi GIT ves čas raztopljena, npr. v na lipidih osnovane sisteme (34).

Do sproščanja in absorpcije ZU iz na lipidih osnovanih sistemov pride po razgradnji pomožnih snovi in nastanku koloidnih struktur, v katere se ZU porazdeljuje – mehanizem je zelo kompleksen in zaenkrat še ni v celoti poznan (22, 35). FO z lipidi je po zaužitju pod vplivom encimov izpostavljena hidrolizi. Hidrolizo lipidnih komponent začneta lingvalna in želodčna

lipaza. Do DG in PMK se hidrolizira le manjša količina TG. Ti produkti skupaj z gibanjem želodca tvorijo grobo emulzijo, katere velikost kapljic znaša 1–100  $\mu\text{m}$  (29, 30).

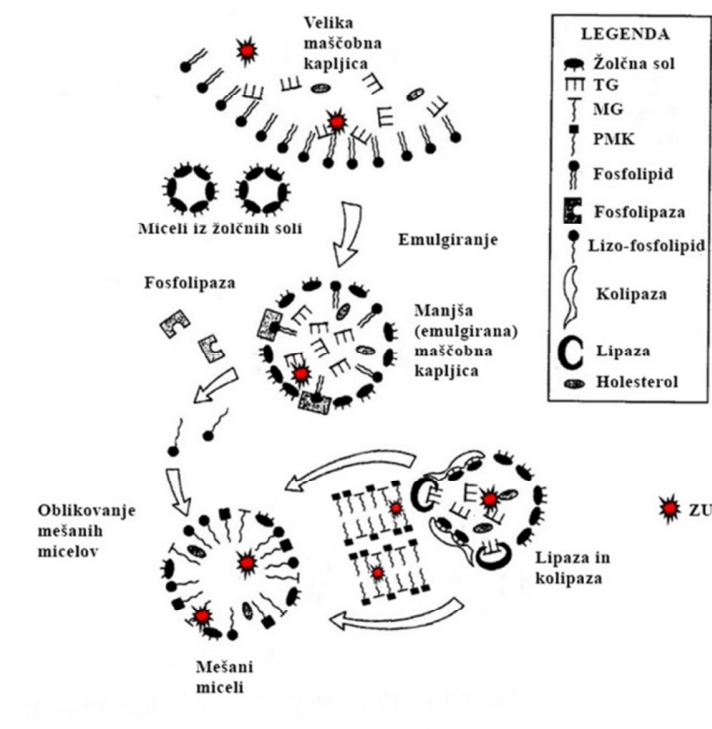
Nastala emulzija je v tankem črevesju izpostavljena žolčnim solem, fosfolipidom in naslednjim prebavnim encimom trebušne slinavke:

- **Pankreasna lipaza** hidrolizira TG na mestu ena in tri, pri čemer nastaneta dve PMK in 2-monoglicerid. Zadnji lahko spontano prehaja v 1-monoglicerid, 3-monoglicerid, ki sta prav tako substrata za pankreasno lipazo. Afiniteta encima je večja za srednjeveržne TG kot za dolgoveržne. Reakcija poteka na medfazni površini olje – voda. Količina lipaze, ki se izloči v GIT, je večja, kot je dejansko potrebna za razgradnjo lipidov. Lipaza za svoje delovanje potrebuje kolipazo, ki ji omogoča pritrjevanje na medfazno površino. Optimalni pH za delovanje lipaze je 6,5–8 (35).
- **Fosfolipaza A<sub>2</sub>** hidrolizira fosfolipide na poziciji 2, pri tem nastaneta produkta lizofosfolipid in ena PMK. Da je fosfolipaza A<sub>2</sub> aktivna, potrebuje prisotnost Ca<sup>2+</sup> ionov (35).
- **Holesterol esteraza** ima široko specifičnost. Z njeno pomočjo poteče hidroliza karboksilnih estrov. Slabo vodotopni estri morajo biti predhodno solubilizirani z žolčnimi solmi. Substrati za ta encim so lizofosfolipidi in 2-monogliceridi (35).

TG v na lipidih osnovanih dostavnih sistemih (tip I) se tako razgradijo do dveh PMK in monoglicerida (MG), iz katerih se na površini oljne kapljice tvorijo multilamelarni tekoči kristali, ki služijo kot hidrofobni kanalčki, po katerih se lahko premika hidrofobna ZU (slika 2). Ob prisotnosti žolčnih soli se iz tekočih kristalov postopoma tvorijo različne koloidne strukture kot so uni- in multilamelarni ter mešani miceli. Zadnje sestavljajo žolčne soli, fosfolipidi, produkti prebave gliceridov in ZU. Mešani miceli predstavljajo zalogo ZU. Hitrost, s katero ZU difundira iz dispergiranih oljnih kapljic v mešane micide, je odvisna od njene topnosti v mešanih micelih in hitrosti, s katero ti pri lipolizi nastajajo. Ker pankreasna lipaza deluje na površini oljnih kapljic, je hitrost nastajanja micelov odvisna od površine kapljic in s tem njihove velikosti. Manjše kot so kapljice, večja je njihova celokupna površina, ki je na voljo pankreasni lipazi. Posledično lahko nastane več PMK in MG, ki izoblikujejo mešane micide. ZU lahko iz njih v enterocite prehaja na tri različne načine: ZU se porazdeljuje

v vodni medij in se v nadaljevanju absorbira v enterocite, komponente mešanega micela se lahko tudi zlijejo z membrano enterocita ali pa jih posebni prenašalci aktivno prenesejo v enterocit (30).

Za na lipidih osnovane sisteme tipa I je, kot je opisano zgoraj, prebava lipidnih komponent ključnega pomena, za tip II in III pa ni več nujna, saj pride že v želodcu zaradi emulgatorjev do hitrega nastanka (mikro)emulzije, ki se nato enakomerno razporedi po prebavnem traktu. Kapljice fine emulzije in mikroemulzije so tako majhne, da lahko direktno prehajajo nemešajoči vodni sloj, ni pa izključeno, da skupaj z žolčnimi solmi in fosfolipidi tvorijo tudi mešane micelle (36). Če hidrofobna ZU uspešno preide 500  $\mu\text{m}$  debel nemešajoči vodni sloj ob membrani enterocitov, ki predstavlja glavno oviro pri procesu prehajanja skozi membrano (29), in se v enterocitu izogne delovanju metabolnih encimov in sekretornih prenašalcev (P-glikoprotein in proteini iz družine MRP), lahko oddifundira iz enterocita v portalni ali limfni krvni obtok (30).



**Slika 2:** Shematični prikaz absorpcije zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike z lipidi. Prirejeno po (34, 37).

## 1.4 IN VITRO LIPOLIZA

Test *in vitro* sproščanja se običajno uporablja v kontroli kakovosti (določanje variabilnosti med serijami, proučevanje bioekvivalentnosti) in kot test, s katerim lahko predvidevamo, kakšen bo *in vivo* profil sproščanja in posledična absorpcija ZU, če je sproščanje omejujoč dejavnik (28). Kljub temu je razgradnja na lipidih osnovanih sistemov v GIT tako kompleksna, da je bolje uporabiti test *in vitro* lipolize, saj nam ta omogoča bolj relevantno predvidevanje *in vivo* sproščanja (28, 35). V nasprotju s preizkusom *in vitro* sproščanja namreč upošteva encimatsko razgradnjo lipidov ter vpliv nastalih produktov na topnost ZU, njeno prehajanje v koloidne strukture in nenazadnje tudi na absorpcijo ZU.

### 1.4.1 Sestavine medija pri *in vitro* lipolizi

#### *Žolčne soli in fosfolipidi*

Koncentracija žolčnih soli in fosfolipidov GIT variira in je odvisna od prisotnosti hrane. Koncentracija žolčnih soli se giblje v območju 2–5 mM na tešče in 8–15 mM po obroku. Fosfolipidi izhajajo iz žolča in hrane, žolčne soli pa samo iz žolča, njuno razmerje je tako lahko zelo variabilno. Če lipolizni medij vsebuje več različnih žolčnih soli, bolje posnema dogajanje *in vivo*. Za *in vitro* lipolizo ponavadi uporabljamo žolčne soli svinjskega izvora v koncentraciji 5–20 mM, ki so konjugirane s glicinom, kar je enako kot pri človeku, vsebujejo pa še hioholno in hiodeoksiholno kislino, ki ju pri človeku ni. Mešani miceli, ki nastanejo iz različnih žolčnih soli, imajo različno zmožnost solubilizacije. Obseg lipolize se poveča, če dodamo večjo koncentracijo žolčnih soli, saj te solubilizirajo tudi nekatere produkte lipolize, ki inhibirajo lipazo. Koncentracija fosfolipidov na tešče se giblje med 0,1 in 0,6 mM in med 0,1 in 4,8 mM po obroku. Ocenjujejo, da razmerje med žolčnimi solmi in fosfolipidi variira med 1 in 38,9, pri *in vitro* lipolizi se uporablja razmerje 4. Fosfolipidi lahko ob prisotnosti žolčnih soli zavirajo delovanje pankreasne lipaze (lipaza je izpodrinjena iz površine kapljic). To je ob prisotnosti fosfolipaze A<sub>2</sub> reverzibilno (35).

#### *Lipaza*

Pankreatin svinjskega izvora, ki ga uporabljamo za *in vitro* lipolizo, vsebuje: lipazo, fosfolipazo A<sub>2</sub>, holesterol esterazo in protein 2, podoben pankreasni lipazi, ki ima majhno lipolitično aktivnost. Pomembno je, da pri *in vitro* lipolizi uporabimo mešanico encimov, ker

na lipidih osnovani sistemi vsebujejo različne pomožne snovi in s tem različne substrate. Ker je pankreatin naravnega izvora in lahko pričakujemo variacije med posameznimi serijami, moramo vsaki seriji pankreatina pred uporabo določiti aktivnost lipaze. To lahko naredimo z različnimi testi, najbolj razširjen je tributirinski test s pH-stat metodo (35). Temelji na hitrosti, s katero lipaza hidrolizira tributirin pri pH 7,5. Pri reakciji nastane maslena kislina, ki jo titriramo z dodatkom NaOH. Aktivnost pri tem testu izrazimo v tributirinskih enotah (TBU). 1 TBU nam predstavlja količino lipaze, ki je potrebna, da se sprosti 1  $\mu$ mol butirne kisline v 1 min (38).

### ***Kalcij***

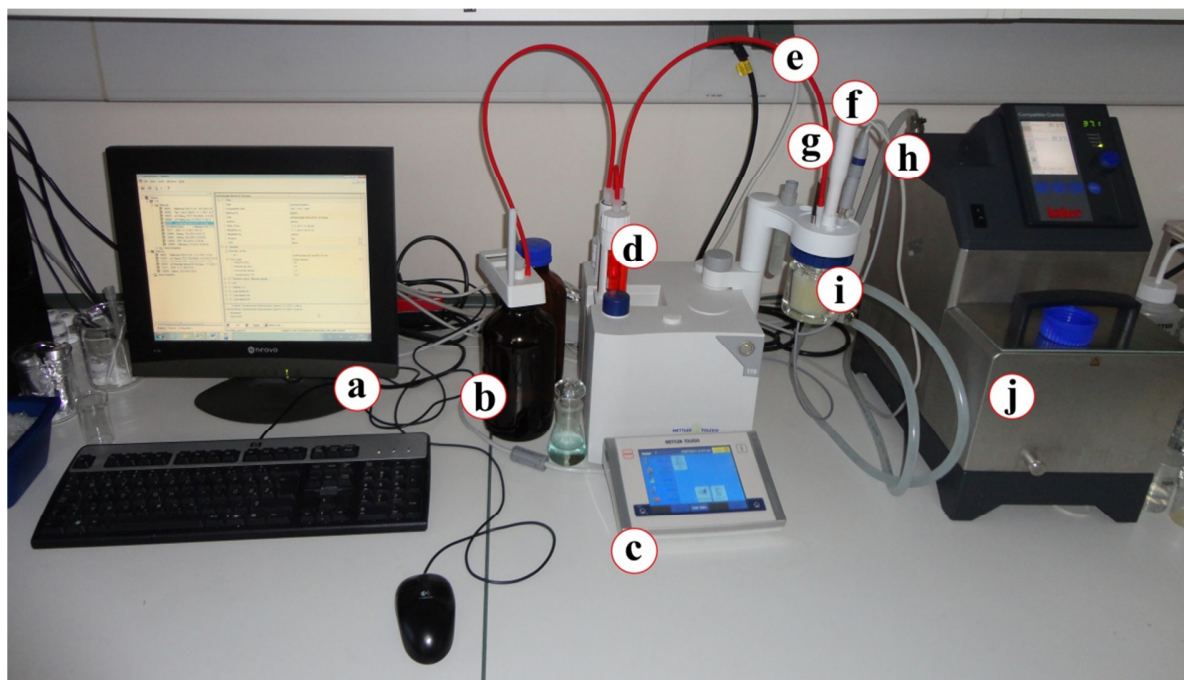
Pri hidrolizi TG nastale PMK zavirajo lipazo, ker se skupaj z MG nalagajo na medfazni površini kapljic in ovirajo lipolizo (*in vivo* ni te težave, ker se PMK absorbirajo). Pomembno je, da jih odstranimo oz. solubiliziramo s pomočjo žolčnih soli. Druga možnost je, da tvorimo soli z enim dvovalentnim  $\text{Ca}^{2+}$  ionom in dvema PMK. Soli nastajajo na površini oljne kapljice. Ko jo popolnoma obdajo, se neprebavljen del odcepi. S tem posnemamo *in vivo* absorpcijo PMK. Proces se ponavlja, dokler lipoliza ni dokončana. Nastajanje kalcijevih soli (mil) je odvisno tudi od hitrosti ioniziranja PMK. Mila nastajajo precej počasi, zato proces odstranjevanja produktov lipolize s tvorbo mil ni najučinkovitejši mehanizem. Produktov lipolize srednjeveržnih TG ni potrebno odstranjevati iz površine kapljic, ker so vodotopni (34). Kalcij lahko v medij za lipolizo dodajamo na dva različna načina. Že na začetku lahko v medij dodamo določeno končno količino  $\text{Ca}^{2+}$ . Pri tem je začetna hitrost reakcije zelo hitra, večina substratov se hidrolizira v prvih 5–10 min. Če pa  $\text{Ca}^{2+}$  dodajamo neprekinjeno, gre za **dinamično lipolizo**, pri kateri lahko s hitrostjo dodajanja  $\text{Ca}^{2+}$  uravnavamo hitrost lipolize (35).

### ***pH medija***

pH v tankem črevesju na tešče znaša 6–7,5 in 5–6,6 po obroku. Da lahko PMK, ki nastajajo pri lipolizi, titriramo z NaOH, morajo biti ionizirane. pKa dolgoveržnih PMK je nad 8, vendar se vrednost ob prisotnosti žolčnih soli in  $\text{Ca}^{2+}$  zmanjša, v mešanih micelih je pKa 5. Zato je optimalni pH za *in vitro* lipolizo nekje med 6,5 in 8,5. Puffer, ki ga damo v medij, mora imeti čim manjšo pufersko kapaciteto, da nastanek prostih maščobnih kislin povzroči padeč pH (35).

### 1.4.2 pH-stat metoda

*In vitro* lipolizo izvajamo v termostahirani posodi s pomočjo pH-stat metode. Termostahirana posoda vsebuje medij s pufrom, fosfolipidi in žolčnimi solmi. pH vsebine je uravnan na željeno vrednost. Posoda je opremljena z mešalom in pH elektrodo, ki neprestano spremlja pH vsebine (sama aparatura je prikazana na sliki 3). V prebavni medij damo farmacevtsko obliko, lipolizo pa zaženemo z dodatkom suspenzije pankreatina. Pankreasno lipazo dodamo vedno v presežku, da posnemamo *in vivo* pogoje. Lipaza hidrolizira TG, pri čemer nastajajo PMK, ki znižajo pH reakcijske mešanice. To zazna pH elektroda, zato se iz birete doda količina NaOH, ki je potrebna, da se pH vrednost reakcijske mešanice ponovno vrne na začetno nastavljeno vrednost (28, 34, 35).



**Slika 3:** Naprava za izvajanje *in vitro* lipolize: a – računalnik, b – steklenica z 0,6M NaOH, c – titrator T70 z zaslonom, d – 10 ml bireta z 0,6M NaOH, e – dozirnik za NaOH, g – senzor za temperaturo, f – mešalo, h – steklena elektroda za merjenje vrednosti pH, i – termostahirana posoda z reakcijsko mešanico, j – termostat

Paziti moramo na to, s kakšno koncentracijo NaOH titramo nastale PMK. Če je koncentracija NaOH premajhna, se reakcijska mešanica po nepotrebem razredčuje, če pa je koncentracija NaOH prevelika, lahko pride do pretitracije in prekomernega dviga pH nad nastavljeno vrednost. To zveča eksperimentalno napako, saj ob naslednjem nastanku prostih



maščobnih kislin pride do premajhnega padca vrednosti pH, da bi se sistem uspel ustrezno odzvati z dodatkom NaOH (35). Sek je s sodelavci za lipolizo dolgoverižnih TG uporabljal 0,2 M NaOH, za lipolizo srednjeverižnih TG pa 0,6 M (39). Iz volumna dodanega NaOH lahko na koncu izračunamo, koliko prostih maščobnih kislin je nastalo, s čimer dobimo obseg lipolize.

Po končani lipolizi reakcijsko mešanico ultracentrifugiramo, pri čemer običajno dobimo 3 različne faze:

- lipidna faza, ki je sestavljena iz nerazgrajenih lipidov (proti koncu lipolize se količina te faze zmanjšuje, če lipoliza poteče do konca, je sploh več ni);
- vodna micelarna faza vsebuje solubilizirano ZU v mešanih micelih;
- oborina kalcijevih soli prostih maščobnih kislin in oborjena ZU.

Vsako fazo lahko analiziramo in določimo vsebnost ZU. Tista količina ZU, ki je solubilizirana v vodni fazi, je na voljo za takojšnjo absorpcijo. Možno je tudi, da že med samo lipolizo odvezemamo vzorce iz reakcijske mešanice in s tem spremljamo, v kateri fazi je ZU tekom reakcije. V tem primeru moramo odvzetim vzorcem takoj dodati inhibitor lipolize (4-bromobenzen-boronska kislina ali orlistat) in šele nato vzorce naprej analiziramo (29, 35).

## 2 NAMEN DELA

Vgradnja hidrofobne ZU v tekoči SMES je eden izmed obetavnejših načinov za izboljšanje biološke uporabnosti ZU po peroralnem vnosu, saj s tem izboljšamo topnost ZU v prebavnem traktu, pomožne snovi v SMES pa lahko izboljšujejo tudi absorpcijo in zmanjšajo predsistemski metabolizem. V zadnjem času vse bolj narašča zanimanje za razvoj trdnih SMES iz tekočih, saj so trdne farmacevtske oblike s stališča proizvodnje, stabilnosti in uporabe bolj zaželene.

Namen magistrske naloge je vrednotenje stabilnosti slabo vodotopne učinkovine RSV v trdnih SMES po staranju pri povišani temperaturi 40 °C. RSV bomo najprej vgradili v tekoči SMES, ki ga bomo potem adsorbirali na tri različne nosilce: Nesuilin<sup>®</sup> US2, Sylysia<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244FP, in pri tem dobili SMES praške. Za izdelavo SMES tablet bomo praškom dodali pomožne snovi za tabletiranje: Ac-Di-Sol<sup>®</sup>, Avicel<sup>®</sup> PH102, magnezijev stearat, Kollidon<sup>®</sup> VA64. Nastalo zmes za tabletiranje bomo z instrumentirano tabletirko na udarec stisnili v tablete. Vse serije tablet s prej omenjenimi nosilci bomo izdelali ročno, dodatno pa bomo serijo tablet z Neusilinom<sup>®</sup> US2 stisnili še polavtomatsko. Z namenom ugotoviti učinkovitost vgradnje RSV v trdne SMES, bomo trdne SMES primerjali s fizikalnimi zmesmi. Izdelali jih bomo z RSV in vsem nosilci v masnem razmerju 1 : 1. Pred staranjem bomo izvedli preizkus *in vitro* sproščanja RSV iz fizikalnih zmesi v dveh puffih: s kislim puffom s pH 1,2 bomo simulirali pogoje v želodcu, s fosfatnim puffom s pH 6,8 pa pogoje v tankem črevesju. Trdne SMES in fizikalne zmesi bomo starali 30 in 90 dni v termostatu pri zvišani temperaturi 40 °C. Ob koncu staranja bomo v vseh vzorcih določili vsebnost RSV in jih primerjali z izhodiščinimi vrednostmi (pred staranjem). Za vse vzorce bomo po 30- in 90-dnevem staranju izvedli osemurni preizkus *in vitro* sproščanja RSV v kislem in fosfatnem puffu. Za trdne SMES bomo naredili še test *in vitro* lipolize, ki je bolj reprezentativna metoda, saj z njo lažje posnemamo *in vivo* dogajanje v prebavnem traktu kot s testom *in vitro* sproščanja. Izvajali jo bomo v prebavnem mediju z žolčnimi solmi in fosfolipidom, reakcijo lipolize pa bomo sprožili z dodatkom pankreasne lipaze. Z omenjenima metodama želimo ugotoviti, ali se sproščanje RSV s staranjem spreminja. Za vse vzorce bomo posneli tudi DSC termogram in preverili, ali je med staranjem prišlo do rekristalizacije RSV.

### 3 EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1 MATERIALI

##### Zdravilna učinkovina:

*Resveratrol* (ChromaDex, Irvine, ZDA)

##### Komponente tekočega samo-mikroemulgirajočega sistema:

*Kolliphor*<sup>®</sup> *EL* (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je topilo, neionski emulgator s HLB vrednostjo med 12–14, ki se v farmaciji uporablja za izdelavo tekočih in poltrdnih FO z v vodi slabo topno ZU. Sintetizirajo ga z reakcijo med ricinusovim oljem in etilen oksidom v molskem razmerju 1:35. Hidrofobni del sestavlja glavna komponenta makrogolglicerol ricinolat in estri maščobnih kislin s polietilen glikolom, vsebuje pa še manjši delež hidrofilnih komponent: polietilen glikol in etoksiliran glicerol (40).

*Kolliphor*<sup>®</sup> *RH 40* (Sigma Aldrich, Nemčija) je topilo, neionski emulgator s HLB vrednostjo med 14 in 16. Pridobijo ga z reakcijo med hidrogeniranim ricinusovim oljem in etilen oksidom z molskim razmerjem 1:40. Njegova glavna komponenta je makrogolglicerol hidroksistearat. Pri sobni temperaturi je v obliki rahlo rumeno obarvane paste, ki se pri 25 °C raztopi, v vodni raztopini pa je skoraj brez okusa. V farmaciji ga uporabljamo za pripravo vodnih raztopin v maščobah topnih vitaminov A, D, E, K in drugih hidrofobnih zdravilnih učinkovin za peroralno ali dermalno aplikacijo (41, 42).

*Ricinusovo olje* (deviško, Lex, Slovenija) pridobivamo s hladnim stiskanjem semen ricinusa oziramo kloščevca (*Ricinus communis*). Sestavljeno je iz trigliceridov naslednjih maščobnih kislin: ricinolne (87 %), oleinske (7 %), linolenske (3 %), palmitinske (2 %), stearinske (1 %) in dihidrostearinske (v sledovih). Na videz je bistro, brezbarvno ali rahlo rumenkasto obarvano z rahlim vonjem in okusom. Ricinusovo olje je stabilno in se ne oksidira, razen če je izpostavljeno prekomerni toploti. Kot pomožna snov se v koncentraciji 5 – 12,5 % uporablja v dermalnih FO (kremah, mazilih), lahko pa je tudi topilo v FO za intramuskularno aplikacijo, v FO za oko in v tabletah ter kapsulah. Terapevtsko se lahko uporablja kot odvajalo, v večjih količinah povzroča slabost, bruhanje, krče (43).

**Capmul<sup>®</sup> MCM EP** (glicerol monokaprilokaprat tip I, Abitec Corporation, ZDA) je mešanica mono- in digliceridov kaprilske in kapronske kisline. Na videz je brezbarvna ali rahlo rumeno obarvana pri sobni temperaturi tekoča ali poltrdna snov. V farmaciji jo uporabljamo kot nosilec, emulgator in kot topilo za v vodi slabo topne ZU. Omogoča pripravo stabilnih emulzij, uravnavanje viskoznosti in pospešuje peroralno ter dermalno absorpcijo (44, 45).

**Pomožne snovi pri izdelavi trdnih samo-mikroemulgirajočih sistemih:**

**Neusilin<sup>®</sup> US2** (Fuji Chemical Industry Co LTD, Japonska) je sintetična in amorfna oblika magnezijevega aluminometasilikata s kemijsko formulo  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1,7 \text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ . V obliki lahkih granul (povprečna velikost 60–120  $\mu\text{m}$ ) je s specifično površino 300  $\text{m}^2/\text{g}$ , z dobro adsorpcijo olj 3,2 ml/g in vode ter z nevtralnimi pH 5 % vodne raztopine vsestransko uporabna pomožna snov v farmaciji. Uporabljamo ga lahko pri direktnem tabletiranju (omogoča dobro trdnost tablet ob majhni sili stiskanja), vlažnem granuliranju, v farmacevtskih oblikah z olji ali težko topnimi učinkovinami, primeren pa je tudi kot nosilec za trdne disperzije in SMES (46,47).

**Sylsya<sup>®</sup> 350** (Fuji Chemical Industry Co LTS, Japonska) je sintetičen, amorfni silicijev dioksid v obliki mikroniziranega praška. V farmaciji se uporablja kot nosilec, izboljšuje pretočnost praškov v proizvodnji tablet, uporablja se tudi pri oblaganju in kot pomožna snov pri izdelavi mazil in losjonov. Njegova specifična površina znaša 300  $\text{m}^2/\text{g}$ , volumen por 1,6 ml/g, velikost delcev 3,9  $\mu\text{m}$  in kapaciteta za adsorpcijo olj 3,1 ml/g (48).

**Syloid<sup>®</sup> 244 FP EU** (Grace Davison, ZDA) je sintetičen, amorfni silicijev dioksid v obliki praška. Od Sylsya<sup>®</sup> 350 se razlikuje le po svojih fizikalnih lastnosti: njegova kapaciteta za adsorpcijo olja znaša 3,0 ml/g, delci so veliki povprečno 5,5  $\mu\text{m}$  in imajo volumen por 1,5 ml/g. Uporabljamo ga kot nosilec, drsilo, pri oblaganju tablet, izboljšuje pretočnost praškov pri tabletiranju in veže vlago (49).

**Ac-Di-Sol<sup>®</sup>** (FMC Biopolymers ZDA) je premrežena natrijeva karboksimetil celuloza v obliki belega praška in ima v trdnih FO funkcijo razgrajevala. Je hidrofilni polimer, ki je sicer v vodi netopen, vendar pa jo adsorbira in močno nabreka. Zaradi povečanja volumna v tableti nastane tlak, ki povzroči, da se prekinejo vezi med delci in tableta razpade (50).

**Avicel<sup>®</sup> PH102** (FMC Biopolymers, ZDA) je kemijsko mikrokristalna celuloza, ki je prečiščena, delno depolimerizirana celuloza. Na videz je v obliki belega poroznega praška z velikostjo delcev 100 µm, brez vonja, okusa in slabo vodotopna. Zaradi njene velike higroskopnosti jo moramo shranjevati v dobro zaprtem vsebniku in v hladnem, suhem prostoru. Ker je netoksična in se ne absorbira, jo široko uporabljamo v prehrambeni in farmacevtski industriji. V proizvodnji tablet in kapsul ima lahko različno vlogo, odvisno od njene vsebnosti v farmacevtski obliki: lahko je polnilo ali vezivo, ima pa tudi lastnosti razgrajevala in drsila (43).

**Kollidon<sup>®</sup> VA64** (BASF, Chem Trade GmbH, Nemčija) je kopolimer 1-etenilpirolidin-2-ona in etenil acetata v masnem razmerju 3:2. V obliki amorfnega, brezbarvnega do rumenega praška rahlega okusa in vonja ga uporabljamo kot vezivo v tabletah pri direktnem tabletiranju in vlažni granulaciji. Lahko pa je tudi sestavni del raztopine za oblaganje tablet, saj omogoča dobro adhezivnost, elastičnost in oviro za vezavo vlage (43).

**Magnezijev stearat** (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) je zmes trdnih organskih kislin, sestavljenih večinoma iz magnezijevega stearata in magnezijevega palmitata, katerih razmerje lahko varira. Je v obliki finega, belega praška, ima rahel vonj in karakterističen okus. Na otip je masten in se zlahka oprime kože. V etanolu, etru in vodi je slabo topen. Pri rokovanju z njim je priporočljivo, da preprečimo vdihovanje delcev. Uporabljamo ga kot drsilo pri proizvodnji tablet in kapsul v masnem deležu 0,25–5 % (43).

#### Ostali materiali:

**Pankreatin iz svinjske trebušne slinavke** (Sigma Aldrich, ZDA)

**Trizma<sup>®</sup> maleat** (Sigma Aldrich, ZDA)

**Metanol za analizo** (Merck KGaA, Nemčija)

**Metanol za tekočinsko kromatografijo** (Merck KGaA, Nemčija)

**Acetonitril za tekočinsko kromatografijo** (Merck KGaA, Darmstadt Nemčija)

**Prečiščena voda** (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)

**Dvakrat prečiščena voda** (Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Slovenija)

**Kalijev klorid** (KCl, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Kalijev dihidrogen fosfat** ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Kalcijev klorid dihidrat** ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Natrijev hidroksid** ( $\text{NaOH}$ , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Natrijev klorid** ( $\text{NaCl}$ , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Natrijev deoksiholat** (Sigma Aldrich, ZDA)

**Lipoid<sup>®</sup> S100** (Lipoid GmbH, Nemčija)

**Ocetna kislina** ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), *brezvodna oblika za analizo* (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

**Gliceril tributirat** (Sigma Aldrich, Švica)

**Klorovodikova kislina** ( $\text{HCl}$ ) Titrisol<sup>®</sup> (Merck, KGaA, Nemčija)

### 3.2 NAPRAVE

Instrumentalna tabletirka na udarec SP300, Killian, Nemčija

Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG 245, Švica

Analitska tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Švica

Magnetno mešalo, Rotamix 550 MM, Tehnica Železniki, Slovenija

Dissolution testing Station, VanKel, VK 7000, Slovenija

Pretočni filter 10  $\mu\text{m}$ , Full flow filt, Agilent Technologies, Nemčija

pH meter, Mettler Toledo, Seven Compact<sup>TM</sup> pH/Ion S 220, Švica

Ultracentrifuga, Thermo Scientific<sup>®</sup> Sorwall, WX ULTRA Series Centrifuge, ZDA

Rotor za ultracentrifugo, Thermo Scientific, T-1250 Fixed Angle Rotor, ZDA

Centrifuga, Eppendorf, Microcentrifuge 5415R, Nemčija

Elektronska pipeta BIOHIT, eLINE<sup>®</sup> 50-500  $\mu\text{l}$ , Finska

Elektronska pipeta BIOHIT, eLINE<sup>®</sup> 500-1000T  $\mu\text{l}$ , Finska

Avtomatska pipeta (obvezno dopiši)

Vortex lab dancer IKA<sup>®</sup>, Nemčija

Titratore, Mettler Toledo T70 Titratore, Švica

Kombinirana stkljena elektroda, Mettler Toledo InLab<sup>®</sup> Expert Pro ISM, Švica

Termostat, Huber, Ministat 125-cc-NR, Nemčija

Mešalo za titratore, Mettler Toledo, Compact Stirrer, Švica

Sušilnik Kambič SP-45, Slovenija

Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Slovenija

HPLC Agilent Technologies, Agilent 1100 Series, Nemčija (5 $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4,6mm)

Kolona za HPLC YMC Pack ODS-AM, Nemčija

Viale za HPLC, Agilent Technologies, Nemčija

Membranski filter RC 0,45 $\mu\text{m}$ , Lab Logistic Group GmbH, ZDA

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Priprava fizikalnih zmesi

Naredili smo 3 različne vrste fizikalnih zmesi z RSV in posameznim trdnim nosilcem (Sylsya<sup>®</sup> 350, Syloid<sup>®</sup> 244FP in Neusilin<sup>®</sup> US2) v masnem razmerju 1:1 tako, da smo obe sestavini natehtali v pateno in s pestilom natančno premešali.

#### 3.3.2 Priprava tekočega samo-mikroemulgirajočega sistema

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali tekoči SMES, ki so ga predhodno razvili na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Sestava uporabljenega SMES-a je navedena v preglednici II.

*Preglednica II: Sestava tekočega SMES in vloga posameznih komponent. Povzeto po (51).*

Sestavina	Količina (%(m/m))	Vloga sestavine
Kolliphor <sup>®</sup> EL	30	Emulgator
Kolliphor <sup>®</sup> RH40	30	Emulgator
Capmul <sup>®</sup> MCM	20	oljna faza
Ricinusovo olje	20	oljna faza

Tekoči SMES smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico z obrusom natehtali vse sestavine in mešali na magnetnem mešalu do nastanka bistre homogene zmesi. Tej smo nato dodali toliko učinkovine RSV, da je bila vsebnost RSV v RSV-SMES 10% in mešali na magnetnem mešalu zaščiteno pred svetlobo 12 ur oziroma do popolnega raztapljanja RSV.

#### 3.3.3 Priprava samo-mikroemulgirajočih praškov

SMES-RSV smo v zatemnjenem prostoru adsorbirali na trdne nosilce (Neusilin<sup>®</sup> US2, Sylsya<sup>®</sup> 350, Syloid<sup>®</sup> 244FP) v masnem razmerju 1:1. V pateno smo najprej natehtali SMES-RSV in postopoma dodajali trdni nosilec ter mešali tako dolgo, da se nastala praškasta zmes ni več oprijemala sten patene.

#### 3.3.4 Priprava samo-mikroemulgirajočih tablet

Receptura in postopek izdelave samo-mikroemulgirajočih tablet z RSV sta bila predhodno razvita na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Sestava vseh tablet je bila enaka, posamezne serije so se razlikovale le po izbiri trdnega nosilca. Receptura je predstavljena v preglednici III.

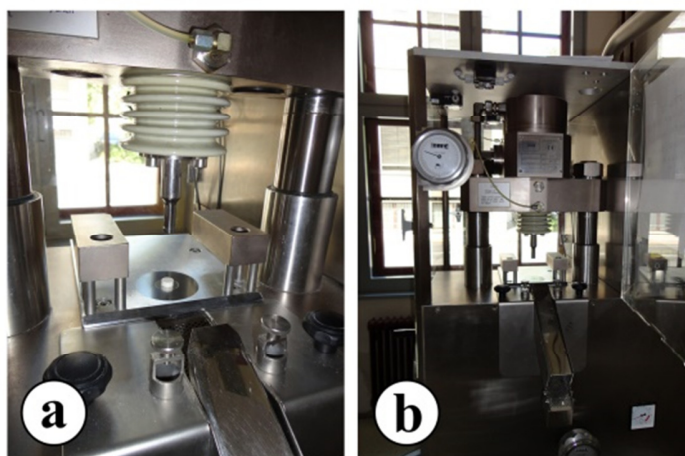


*Preglednica III: Sestava SMES tablet in vloga pomožnih snov. Povzeto po (51).*

Sestavina	Masa (mg)	% (m/m)	Vloga sestavine
SMES-RSV	250,5	41,75	Lipidni dostavni sistem z učinkovino
Neusilin® US2 Sylysia® 350 Syloid® 244FP	250,5	41,75	Trdni nosilec (adsorbent)
Avicel® PH102	60	10,00	Suho vezivo
Ac-Di-Sol®	30	5,00	Razgrajevalo
Kollidon® VA64	6	1,00	Suho vezivo
Mg-stearat	3	0,50	Drсило
Skupaj	600	100	/

Zmes za tabletiranje smo pripravili tako, da smo samo-mikroemulgirajoči prašek z RSV prenesli v lonček iz temnega stekla in po dodatku vsake od pomožnih snovi lonček pretresli, da so se sestavine dobro premešale. Nato smo dodali še drsilno in ponovno zmešali.

Tablete smo izdelali po metodi direktnega tabletiranja z instrumentirano tabletirko na udarec (Killian SP300), ki je prikazana na spodnji sliki 4.



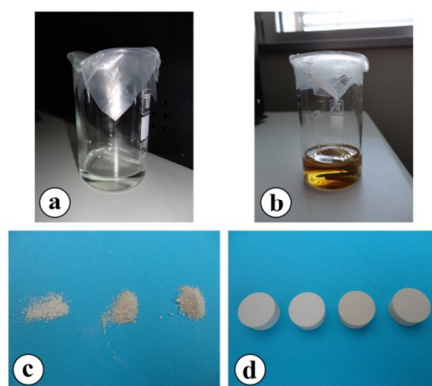
*Slika 4: Izdelava tablet: a - proces tabletiranja, b - instrumentirana tabletirka na udarec Killian SP300*

Za vsako tableto smo v plastični čolniček ročno natehtali približno 600 mg zmesi za tabletiranje in jo stresli v matrično vdolbino tabletirke. Pri stiskanju tablet smo uporabljali okrogel pečat z ravnimi površinami s premerom 12 mm. Položaj zgornjega pečata je bil odvisen od tega, kateri nosilec smo uporabili, kar je razvidno iz preglednice IV.

**Preglednica IV:** Položaj pečatov pri stiskanju tablet z različnimi nosilci- Povzeto po (51).

Trdni nosilec	Način stiskanja	Nastavitev zgornjega pečata (mm)	Nastavitev spodnjega pečata (mm)
Neusilin <sup>®</sup> US2	polavtomatsko	15,9	20
Neusilin <sup>®</sup> US2	ročno	15,9	20
Sylysia <sup>®</sup> 350	ročno	16,3	20
Syloid <sup>®</sup> 244FP	ročno	16,2	20

Izdelali smo štiri serije tablet: tri serije tablet z različnimi nosilci smo stisnili ročno z vrtenjem kolesa, tablete z nosilcem Neusilin<sup>®</sup> US2 pa smo stisnili še polavtomatsko. Na spodnji sliki 5 so prikazani različni SMES.



**Slika 5:** Različni samo-mikroemulgirajoči sistemi: a–SMES brez RSV, b–SMES z RSV, c–SMES praški po trimsečnem staranju z nosilci (Neusilin US2, Sylysia, Syloid, d–SMES tablete po staranju z nosilci

### 3.3.5 Staranje trdnih samo-mikroemulgirajočih dostavnih sistemov in fizikalnih zmesi

Po izdelavi smo samo-mikroemulgirajoče praške, tablete in fizikalne zmesi stekali in jih prenesli v steklene posodice s plastičnim pokrovom. Posodice smo dali v termostatski Kambič in vzorce starali 30 in 90 dni pri temperaturi 40 °C.

### 3.3.6 Določanje vsebnosti v samo-mikroemulgirajočih praških, tabletah in fizikalnih zmesih

Vsebnost smo določili vsem vzorcem pred staranjem in po 30 in 90 dneh staranja. Na stekleni čolnici smo natančno zatehtali 15-20 mg vzorca, ga kvantitativno prenesli v 200 ml temno bučko in z medijem (raztopino MeOH v prečiščeni vodi v volumskem razmerju 1:1) dopolnili do oznake. Raztopino smo 1 uro mešali na magnetnem mešalu zaščitenem pred svetlobo, nato jo

dali za 15 min še v ultrazvočno kadičko, jo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45  $\mu\text{m}$  v vialo in s HPLC analizo določili koncentracijo RSV.

### 3.3.7 *In vitro* sproščanje resveratrola

Preizkus sproščanja RSV smo izvedli na samem kristaliničnem RSV, fizikalnih zmesih pred staranjem in na samo-mikroemulgirajočih praških in tabletah ter fizikalnih zmesih po 30- in 90-dnevnem staranju (za vsako serijo v treh paralelah).

Za preučevanje *in vitro* sproščanja RSV smo uporabili napravo z veslastim mešalom VK 7000 – VanKel (naprava 2 po Ph. Eur. 7th Ed. in naprava 2 po USP). Parametri preizkusa so bili vedno konstantni in sicer: začetni volumen medija je bil 900 ml, temperatura vodne kopeli  $37,0 \pm 0,5$  °C, vesla so se vrtela s hitrostjo 50 obratov/min. Sproščanje smo izvajali v dveh različnih medijih: v kislem pufru s pH=1,2 in v fosfatnem pufru s pH=6,8. Naprava je bila opremljena z avtomatskim vzorčevalnikom, ki je v vsaki časovni točki (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h, 4h, 8h) odvzel 5 ml medija v epruveto. Ta vzorec smo nato filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45  $\mu\text{m}$  v vialo in s HPLC analizo določili koncentracijo sproščenega RSV. Ves čas smo pazili, da je sproščanje potekalo v zatemnjenem prostoru.

Pri izračunu koncentracije RSV smo morali upoštevati, da se je volumen medija ob vsakem vzorčenju zmanjšal zaradi odvzema vzorcev (*Enačba 1*)

Enačba 1 
$$V_n = V_0 - (n \times V_{vz})$$

$V_n$  ... volumen medija po vzorčenju (ml)

$V_0$  ... začetni volumen medija (900 ml)

$V_{vz}$  ... volumen odvzetega vzorca (5 ml)

S pomočjo umeritvene premice smo iz površine pod krivuljo, ki smo jo določili s HPLC analizo, izračunali koncentracijo v odvzetem vzorcu. Da smo dobili maso sproščenega RSV, smo to koncentracijo pomnožili z volumnom medija v časovni točki in prišteli maso RSV, ki je bila odvzeta v predhodnih časovnih točkah.

Enačba 2 
$$m_n = c_n \times V_n + \Sigma(c_n \times V_{vz})$$

$m_n$  ... masa sproščene RSV v  $n$ -ti časovni točki (mg)

$c_n$  ... koncentracija RSV v  $n$ -ti časovni točki (mg/ml)

Delež sproščene RSV smo izračunali kot kvocient med maso sproščene RSV in teoretično maso RSV v prašku/tableti/fizikalni zmesi in pri tem upoštevali še določeno vsebnost RSV.

Enačba 3 
$$X_n = \left(\frac{m_n}{m_0}\right) \times \text{vsebnost} \times 100$$

$X_n$  ... delež sproščene RSV v  $n$ -ti časovni točki (%)

$m_0$  ... teoretična masa RSV (mg)

### **Priprava medijev za preizkus sproščanja**

#### Fosfatni pufer s pH=6,8

Pufer pH 6,8 smo pripravili tako, da smo v 5000 ml merilno bučko odmerili 1250 ml 0,2 M raztopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 560 ml 0,2 M raztopine NaOH ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljene raztopine smo med mešanjem na magnetnem mešalu z dodajanjem standardnih raztopin 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali pH na 0,05 enote natančno.

→ 0,2 M raztopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : v 2000 ml merilno bučko smo natehtali 54,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in mešali, dokler se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ni v popolnoma raztopil.

→ 0,2 M raztopina NaOH: v 1000 ml merilno bučko smo natehtali 8 g NaOH v peletah, s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in mešali na magnetnem mešalu, dokler se NaOH ni popolnoma raztopil.

#### Kisel pufer s pH=1,2

V 5000 ml bučko smo odmerili 1250 ml 0,2 M raztopine KCl in 2125 ml 0,2 M raztopine HCl ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Raztopino smo dobro premešali in s pH lističem preverili pH.

- 0,2M raztopina KCl: v 2000 ml merilno bučko smo natehtali 29,84 g KCl, s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in nato mešali na magnetnem mešalu, dokler se KCl ni popolnoma raztopil.
- 0,2 M raztopina HCl: s prečiščeno vodo smo do tretjine napolnili 1000 ml merilno bučko, nato vanjo prenesli HCl Titrisol® (standard za 1000 ml 1M HCl), s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in temeljito premešali. 400 ml te raztopine smo potem prenesli v 2000 ml merilno bučko, s prečiščeno vodo dopolnili do oznake in dobro premešali.

### 3.3.8 In vitro lipoliza

Z *in vitro* lipolizo smo določili aktivnost pankreasne lipaze, analizirali samo-mikroemulgirajoče tablete ob t=0 in samo-mikroemulgirajoče tablete in praške po 30- in 90-dnevnem staranju.

**Preglednica V:** Nastavitve v programu LabXPro za določanje aktivnosti lipaze –\* in za *in vitro* lipolizo trdnih SMES –\*\*. Prirejeno po (52).

<b>Vzorec</b>	Določen volumen (ml)	1
	Gostota (g/ml)	1
	Korekcijski faktor	1,0
	Temperatura (°C)	25
<b>Vzdrževanje pH</b>	Titrant	NaOH
	Koncentracija (mol/l)	0,6
	Senzor	pH
	Mešanje (%) (0-100)	40
	Predhodna titracija	Ne
	Predhodni dodatek titranta	Ne
	Nastavljen pH	7,5
	Odstopanje od nastavljenega pH (0,01-100)	0,01
	Nagnjenost odstopa od nastavljenega pH	Pozitivna
	Največji pretok titranta (ml/min) (0,001-60)	0,5
	Najmanjši pretok titranta (µl/min) (1-10 <sup>4</sup> )	5
<b>Prekinitiv metode</b>	V (max) (ml) (0,01-1000)	70
	t (max) (min) (1-10 <sup>6</sup> )	30* ; 60**
	dV (ml/min) (0,0001-10)	0,01
	dt (min) (1-10 <sup>6</sup> )	30* ; 60**
	Interval shranjevanja rezultatov (s) (0,1-10 <sup>6</sup> )	10

### Priprava prebavnega pufra

Sestava prebavnega pufra je prikazana v preglednici VI. V merilno bučko smo najprej kvantitativno prenesli na čolniček natehtan natrijev deoksiholat, in ga popolnoma raztopili v prečiščeni vodi. V merilni bučki smo potem raztopili natehtan NaCl in nato  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dodali še Lipoid S100 in dobro premešali. Trizma<sup>®</sup> maleat smo dodali na koncu. Merilno bučko smo s prečiščeno vodo napolnili do 2/3 in na magnetnem mešalu mešali 12 ur. Raztopini smo s 0,5M in 1M NaOH umerili pH na 7,5 in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Puffer smo shranjevali v hladilniku in ga porabili v dveh dneh.

*Preglednica VI: Sestava prebavnega in maleatnega pufra. Povzeto po (52).*

Sestavina	Koncentracija v prebavnem pufu (mM)	Koncentracija v maleatnem pufu (mM)
Trizma <sup>®</sup> maleat	50	50
NaCl	150	150
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5	5
Natrijev deoksiholat	4,89	/
Lipoid <sup>®</sup> S100	1,22	/

### Priprava maleatnega pufra

Vse sestavine (preglednica VI) smo natehtali v merilno bučko, s prečiščeno vodo napolnili bučko do 2/3 in mešali 15 min na magnetnem mešalu, da so se snovi popolnoma raztopile. Raztopini smo z 0,5 M oziroma 1 M NaOH umerili pH na 7,5 in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

### Priprava pankreatina za določanje aktivnosti lipaze v pankreatinu

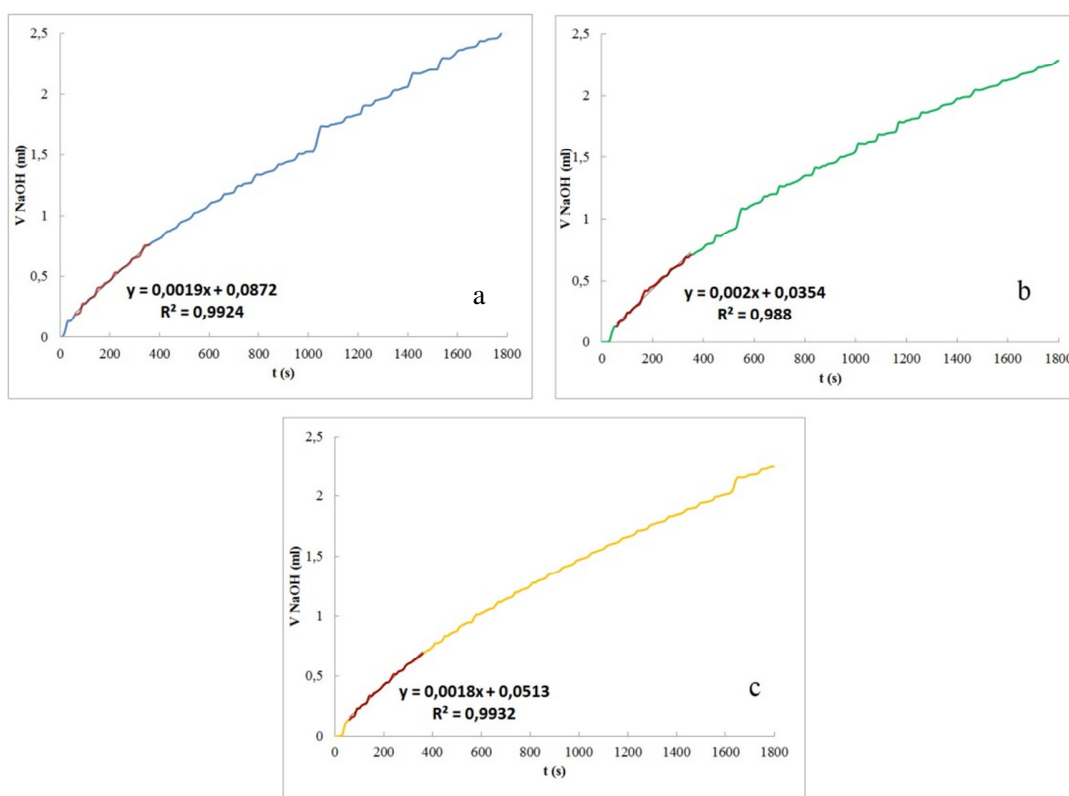
V 2 ml epico smo natehtali 10 mg pankreatina in dodali 2 ml maleatnega pufra. Epico smo nato 15 min mešali na Vortexu in centrifugirali 15 min pri 5 °C in 3000 rcf. Pripravljen encim smo ves čas shranjevali na ledu in ga uporabili v istem dnevu.

### Določanje aktivnosti lipaze v pankreatinu

Aktivnost lipaze smo določali s tributirinskim testom. Za substrat smo uporabili tributirin, ki je ester glicerola in maslene kisline. V posodo titratorja smo odmerili 20 ml pufra za pankreatin in 3 ml tributirina. Reakcijsko posodo smo namestili na titrator in dve minuti mešali pri 40 % moči mešala. Nato smo ob mešanju pri enaki hitrosti z 0,1 M in 1M NaOH

umerili pH na 7,5. V programu LabX Pro smo nastavili parametre pH-stat metode za določanje aktivnosti lipaze (preglednica V). Skozi odprtino nad reakcijsko posodo smo z elektronsko pipeto reakcijski mešanici dodali 500  $\mu\text{l}$  raztopine pankreatina, istočasno pa na računalniku in zaslonu titratorja aktivirali metodo. Lipaza je sprožila reakcijo hidrolize tributirina, pri kateri je nastajala diglicerid in maslena kislina. Slednjo je titrator nevtraliziral z ustreznim dodatkom 0,6 M NaOH iz birete.

Substrat tributirin je bil v prebitku, s čimer smo omogočili, da je bila celotna količina dodane lipaze aktivna. Med določevanjem aktivnosti smo spremljali količino dodanega volumna NaOH v odvisnosti od časa, kar prikazujejo spodnja slika (aktivnost smo določevali v treh paralelah). Za vsako meritev posebej smo iz začetnega dela krivulje s pomočjo Pearsonovega koeficienta določili najbolj linearen del in njegov naklon, ki nam je predstavljal povprečno volumen dodanega NaOH. Običajno je bil najbolj linearen del na območju 1–6 min.



**Slika 6:** Določevanje aktivnosti pankreasne lipaze. Z rdečo barvo je označen interval, ki smo ga upoštevali za določitev enačbe premice, katere naklon predstavlja povprečno porabo NaOH.

Nato smo z enačbo 4 za vsako paralelo izračunali aktivnost lipaze, iz njih pa povprečno aktivnost, ki smo jo nadalje upoštevali pri izračunu količine lipaze, ki je bila potrebna za *in vitro* lipolizo trdnih SMES (primer izračuna 1).

Enačba 4

$$\text{Aktivnost pankreasne lipaze (TBU/g)} = \frac{\bar{V}(\text{NaOH}) \times c(\text{NaOH}) \times 1000}{m(\text{pankreatina})}$$

$\bar{V}(\text{NaOH})$  ... povprečni volumen dodanega NaOH (ml/min)

$c(\text{NaOH})$  ... koncentracija NaOH (0,6 mol/l)

$m(\text{pankretina})$  ... masa zatehtanega pankretina (g)

Primer izračuna 1:

$$\bar{V}(\text{NaOH}) = 0,018 \text{ ml/s} = 0,114 \text{ ml/min}$$

$$m(\text{pankreatina}) = \frac{m(\text{zatehtanega pankreatina}) \times V(\text{pankreatina za aktivnost})}{V(\text{pufra za pankreatin})}$$

$$= \frac{10,72 \text{ mg} \times 0,5 \text{ ml}}{2,0 \text{ ml}} = 2,68 \text{ mg}$$

$$\text{aktivnost 1} = \frac{0,114 \text{ ml/min} \times 1000}{0,00268 \text{ g}} = 25522,39 \text{ TBU/g}$$

$$\text{aktivnost 2} = 26731,34 \text{ TBU/g}$$

$$\text{aktivnost 3} = 24313,43 \text{ TBU/g}$$

$$\overline{\text{aktivnost}} = 25522,39 \frac{\text{TBU}}{\text{g}}$$

### **Priprava pankreatina za *in vitro* lipolizo**

Za *in vitro* lipolizo smo potrebovali suspenzijo pankreatina s koncentracijo 1 g encima/5 ml maleatnega pufra, priporočena aktivnost pankreasne lipaze v reakcijski mešanici je bila 1000 TBU/ml (39). Iz določene aktivnosti lipaze v pankreatinu smo izračunali, koliko encima potrebujemo za eno lipolizo (primer izračuna 2).

Primer izračuna 2:

$$\text{Določena aktivnost pankreasne lipaze} = 25522 \text{ TBU/g}$$

$$V \text{ reakcijskega medija} = 40 \text{ ml}$$



Aktivnost pankreasne lipaze, ki je potrebna za *in vitro* lipolizo:

$$1\text{ ml} \dots \dots \dots 1000\text{ TBU}$$

$$40\text{ ml} \dots \dots \dots x$$

$$x = \frac{40\text{ ml} \times 1000\text{ TBU}}{1\text{ ml}} = 40000\text{ TBU}$$

Masa pankreatina za *in vitro* lipolizo:

$$25522\text{ TBU} \dots \dots \dots 1\text{ g}$$

$$40000\text{ TBU} \dots \dots \dots x$$

$$x = \frac{40000\text{ TBU} \times 1\text{ g}}{25522\text{ TBU}} = 1,567\text{ g}$$

Volumen maleatnega pufra za pripravo suspenzije pankreatina za *in vitro* lipolizo:

$$1\text{ g} \dots \dots \dots 5\text{ ml}$$

$$1,567\text{ g} \dots \dots \dots x$$

$$x = \frac{1,567\text{ g} \times 5\text{ ml}}{1\text{ g}} = 7,836\text{ ml} \sim 7,840\text{ ml}$$

V čašo smo natehtali ustrezno količino pankreatina, mu dodali ustrezen volumen maleatnega pufra in mešali na magnetnem mešalu 15 min. Nato smo nastalo suspenzijo odpipetirali v 2 ml epice in suspenzijo centrifugirali (centifuga Microcentrifuge 5415R) 15 min pri 5 °C in 3000 rcf. Supernatant iz epic smo nato združili in mu z 0,1 M NaOH in z 0,1 M HCl umerili pH na 7,5. Encim smo ves čas shranjevali na ledu in ga porabili v enem dnevu.

### ***In vitro* lipoliza samo-mikroemulgirajočih praškov in tablet**

*In vitro* lipolizo smo izvajali v reakcijski posodi titratorja v ustreznem volumnu prebavnega pufra (primer izračuna 3):

#### Primer izračuna 3:

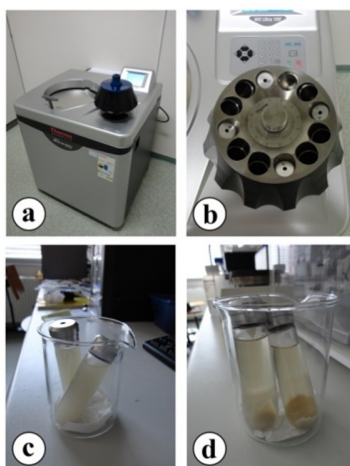
$$V(\text{suspenzije pankreatina}) = 7,840\text{ ml}$$

$$V(\text{reakcijskega medija}) = 40\text{ ml}$$

$$V(\text{prebavnega pufra}) = 40\text{ ml} - 7,840\text{ ml} = 32,160\text{ ml}$$

V posodo titratorja smo odmerili ustrezen volumen prebavnega pufra, posodo namestili na nastavek titratorja in skozi odprtino dodali natančno 400 mg SMES praška ter 60 min mešali

pri 40 % moči mešala. Za SMES tablete smo prebavni pufer odmerili v stekleno čašo, vanjo vrgli tableto in 30 min mešali na magnetnem mešalu, nato pa vsebino prenesli v reakcijsko posodo titratorja in mešali 30 min pri 40% moči mešala. Po končanem mešanju smo vsebini v posodi z 1M in 0,1M NaOH umerili pH vrednost na 7,5. V programu LabX Pro smo nastavili ustrezne parametre (preglednica V) in sočasno z dodatkom ustreznega volumna suspenzije pankreatina na računalniku in zaslonu titratorja aktivirali metodo. Sproščene maščobne kisline je titrator nevtraliziral z dodajanjem 0,6 M NaOH. Po lipolizi smo vsebino reakcijske posode prenesli v dve 20 ml ultracentrifugirki in 45 minut centrifugirali z ultracentrifugo Thermo Scientific® Sorwall pri 30000 obratih/min in 20 °C (slika 7). 1 ml supernatanta smo nato redčili na 10 ml raztopine MeOH in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1 in nastalo raztopino filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 45 µm v vialo in s HPLC analizo določili koncentracijo RSV.



**Slika 7:** Ultracentrifugiranje vzorcev po in vitro lipolizi: a–ultracentrifuga Thermo Scientific® Sorwall, b–rotor ultracentrifuge, c–vsebina ultracentrifugirk pred ultracentrifugiranjem, d–vsebina ultracentrifugirk po ultracentrifugiranju, kjer lepo vidimo usedlino in supernatant.

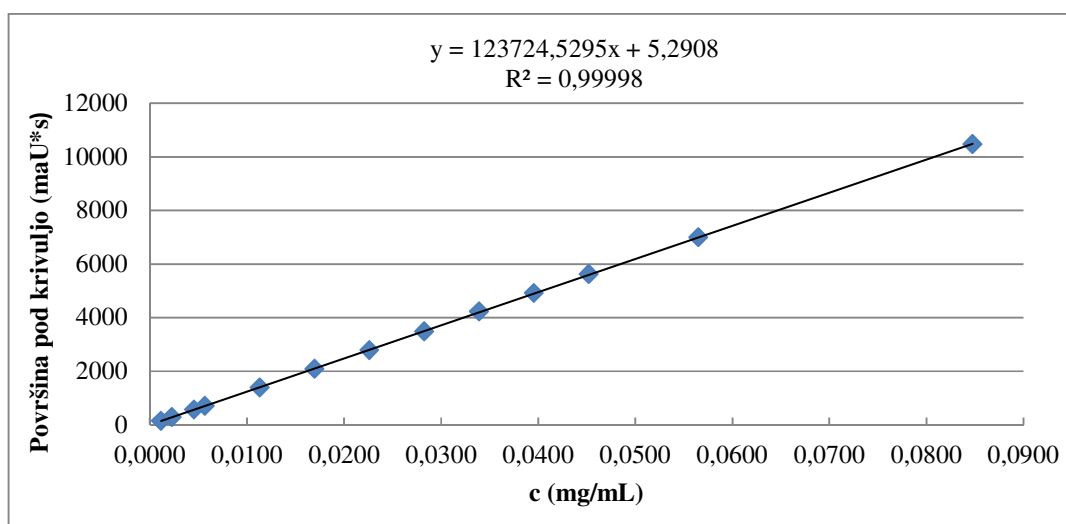
### 3.3.9 Določanje koncentracije RSV z metodo HPLC

Koncentracijo RSV v vzorcih smo določili z metodo HPLC. Za analizo smo uporabili reverznofazno kolono C<sub>18</sub> YMC Pack ODS-AM z dolžino 250 µm, z notranjim premerom 4,6 µm in velikostjo delcev 5 µm. Temperatura kolone je bila nastavljena na 25 °C. Za mobilno fazo smo uporabljali 0,5% očetno kislino v raztopini MeOH za HPLC in bidestilirane vode v volumskem razmerju 1:1. Pretok mobilne faze je znašal 1 ml/min, volumen injiciranja vzorca

20  $\mu$ l. Valovna dolžina UV detekcije je bila 303 nm – pri maksimalni absorbanci *trans* RSV, katerega retencijski čas je znašal približno 7,5 min.

*Cis* resveratrol je izredno nestabilen, zato standard ni komercialno dostopen. Pridobimo ga lahko tako, da *trans* RSV izpostavimo UV žarkom (pri 254 nm ali 366 nm) ali sončni svetlobi. Pri tem dobimo zmes *cis* in *trans* oblike, njuno razmerje variira med 67–90 %. Izpostavitve sončni svetlobi je manj primerna, ker je delež nastale *cis* oblike odvisen od valovne dolžine svetlobe, ki doseže vzorec. Priprava standardnih raztopin *cis* RSV je zelo zahtevna, saj tudi skoraj popolna tema že povzroči rahlo izomerizacijo (53). Zaradi kompleksnosti priprave in rokovanja s *cis* RSV, smo v naši raziskavi določevali le *trans* obliko.

Koncentracije RSV smo izračunali iz površin pod krivuljo s pomočjo umeritvene premice (slika 8). Za določitev njene enačbe smo najprej pripravili osnovno raztopino RSV. Na čolniček smo natehtali natančno zatehto 10 mg RSV, ga kvantitativno prenesli v 100 ml temno bučko in z medijem (raztopina MeOH za analizo in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1) dopolnili do oznake. Bučko smo dobro pretresli in jo za nekaj časa postavili v ultrazvočno kadičko, da se je RSV popolnoma raztopil. Z redčenjem osnovne raztopine smo pripravili nove raztopine s koncentracijami med 0,0010 in 0,0900 mg/ml in s HPLC ob računalniški podpori programa Chem32 raztopinam izmerili površine pod krivuljo. Enačbo umeritvene premice in kvadrat Pearsonovega koeficienta smo določili s pomočjo linearne regresije.

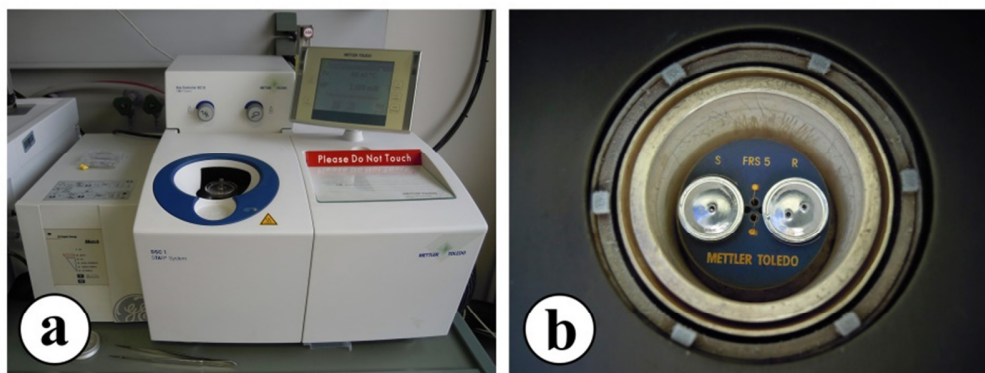


Slika 8: Umeritvena premica za določanje koncentracije RSV s HPLC analizo.

### 3.3.10 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Ena od najpogosteje uporabljenih metod termične analize je diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), s katero na podlagi sprememb v entalpiji ali toplotni kapaciteti opazujemo fizikalne in kemijske lastnosti vzorca: zaznamo različne polimorfne oblike, proučujemo kompatibilnost pomožnih snovi in učinkovin, oksidativno stabilnost, hitrost in kinetiko reakcije, določujemo lahko čistost, tališče, temperaturo steklastega prehoda (54).

Z metodo DSC smo želeli ugotoviti, če se interakcije med sestavinami v trdnih SMES in v fizikalnih zmesih tekom staranja spreminjajo. Uporabili smo tako imenovano »heat-flux« DSC metodo, pri kateri sta vzorec in referenca v isti komori in ju segreva isti grelec. Med segrevanjem pride zaradi sprememb v entalpiji ali toplotni kapaciteti vzorca do razlike v temperaturi vzorca in reference, kar zaznamo kot toplotni tok med vzorcem in referenco (55). 3 – 5 mg posameznega vzorca (tablete smo predhodno zdrobili) smo natehtali v aluminijasti lonček za DSC in ga segrevali od 25 do 350 °C s hitrostjo 20 K/min (slika 9). Med meritvijo smo prepihovali z inertnim plinom dušikom in sicer s hitrostjo 50 ml/min. Za referenco smo uporabili prazne aluminijaste lončke.

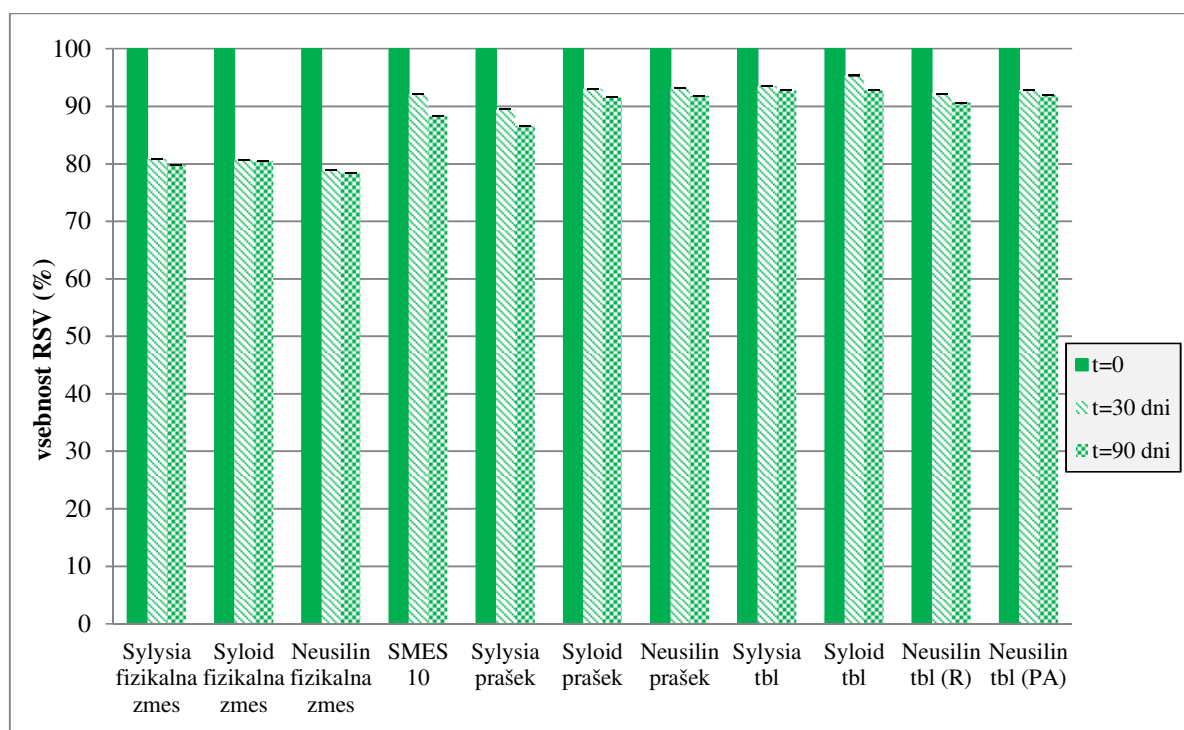


*Slika 9: DSC analiza: a–DSC aparatura; b–lonček z natehtanim vzorcem (levo), prazen lonček–referenca (desno).*

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI RESVERATROLA V TEKOČEM IN TRDNIH SMES TER V FIZIKALNIH ZMESEH

*Trans* RSV je občutljiv tako na svetlobo kot tudi na temperaturo (56), zato smo s preizkusom vsebnosti najprej želeli preveriti, kako je 30- in 90-dnevno staranje pri zvišani temperaturi vplivalo na količino *trans* RSV v fizikalnih zmesih in tekočem ter trdnih SMES. Rezultati preizkusa so prikazani na sliki 10.



**Slika 10:** Vsebnost *trans* RSV pred in po 30- ter 90-dnevnem staranju v fizikalnih zmesih in SMES formulacijah.

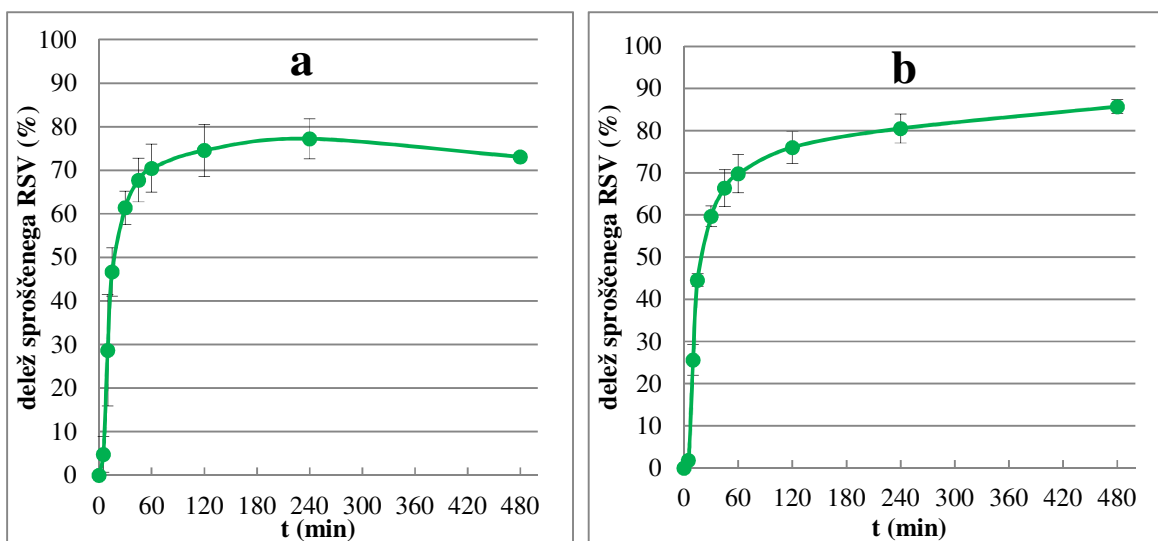
Največji upad vsebnosti RSV smo opazili pri fizikalnih zmesih. Po 30 dneh staranja je bilo v njih 20 % manj RSV kot pred staranjem, pri čemer ni prišlo do dodatnega znižanja po 90 dneh. V tekočem SMES se je vsebnost po 30 dneh zmanjšala na 92,1 %, po 90 dneh pa je znašala 88,2 %. Skoraj pri vseh trdnih SMES se je vsebnost po 90-dnevnem staranju zmanjšala za manj kot 10 %, le pri prašku s Sylysio® 350 je padla na 86,8 %. Vsebnost se med 30- in 90-dnevnim staranjem v nobeni formulaciji ni bistveno spremenila. S HPLC metodo smo lahko določali le *trans* RSV, zato predvidevamo, da se je v prvih 30 dneh najverjetneje

vzpostavilo ravnotežje med *trans* in *cis* obliko, do nadaljnje pretvorbe RSV pa po 90 dneh staranja ni prišlo. Pretvorba *trans* oblike v *cis* ne predstavlja nujno izgube učinka, saj domnevajo, da je tudi *cis* oblika farmakološko aktivna, vendar pa naj bi bili učinki v primerjavi s *trans* obliko nekoliko drugačni (antioksidativna sposobnost *cis* oblike naj bi bila manjša, vendar pa ima močnejše antiagregacijsko delovanje) (3).

Z adsorbicijo tekočega SMES na trdne nosilce se torej stabilnost v primerjavi s tekočim SMES ni spremenila. Ker se je vsebnost v fizikalnih zmesih bolj zmanjšala kot v tekočem in trdnih SMES, lahko potrdimo, da smo z vgradnjo RSV v SMES izboljšali stabilnost. RSV je tako v tekočem kot tudi v trdnem SMES občutno bolj zaščiten kot v fizikalnih zmesih.

#### 4.2 IN VITRO SPROŠČANJE RESVERATROLA

Da smo lahko zaznali, do kakšnih sprememb v sproščanju pride z vgradnjo RSV v fizikalne zmesi in trdne SMES, smo najprej naredili preizkus sproščanja samega RSV v obeh pufrih. Rezultati tega preizkusa so predstavljeni na sliki 11.



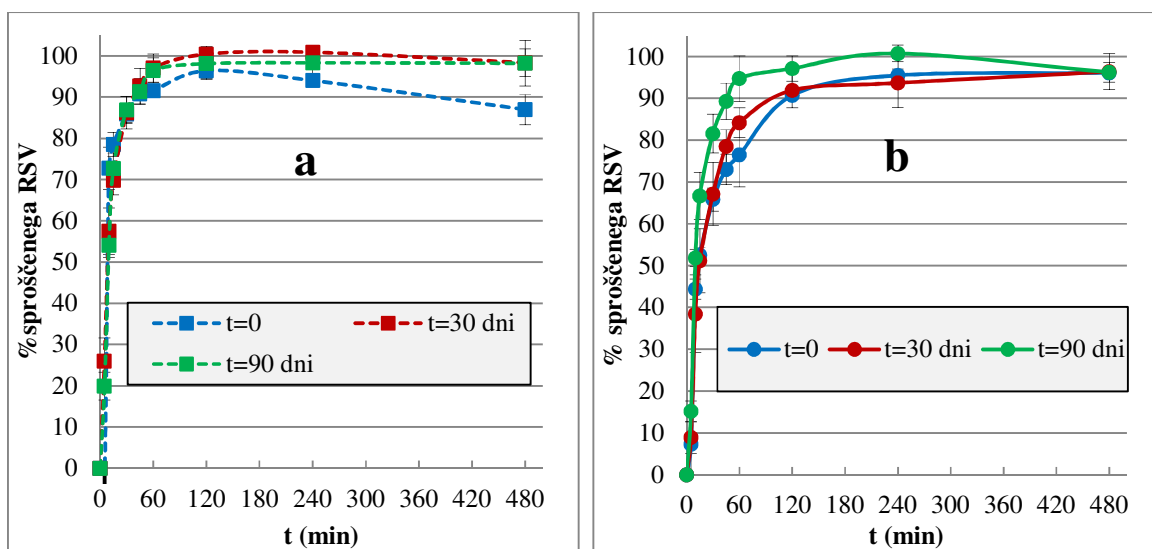
Slika 11: Profila sproščanja RSV v pufrih s pH 1,2 (a) in v pufrih s pH 6,8 (b).

Profila sproščanja sta bila v prvih štirih urah preizkusa v obeh pufrih skoraj enaka, nato se je v pufrih s pH 1,2 koncentracija RSV malenkost znižala. V fosfatnem pufrih se je RSV še nadalje postopoma sproščal in po osmih urah je delež sproščenega RSV znašal 85,7 %. Tudi Bin s sodelavci je v fosfatnem pufrih po osmih urah dobil podobno vrednost sproščenega RSV – 80

% (57). RSV je sicer zaradi svojega pKa, ki znaša 8,8 (58), bolje topen v fosfatnem pufru kot pa v kislem mediju, vendar to ni razlog za manjše sproščanje RSV v kislem mediju, saj smo imeli vzpostavljene *sink* pogoje. Razlog je najverjetneje to, da je med samim preizkusom sproščanja v kislem pufru prišlo do večje pretvorbe *trans* oblike v *cis* kot v fosfatnem pufru.

#### 4.3 IN VITRO SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ FIZIKALNIH ZMESI PRED IN PO STARANJU

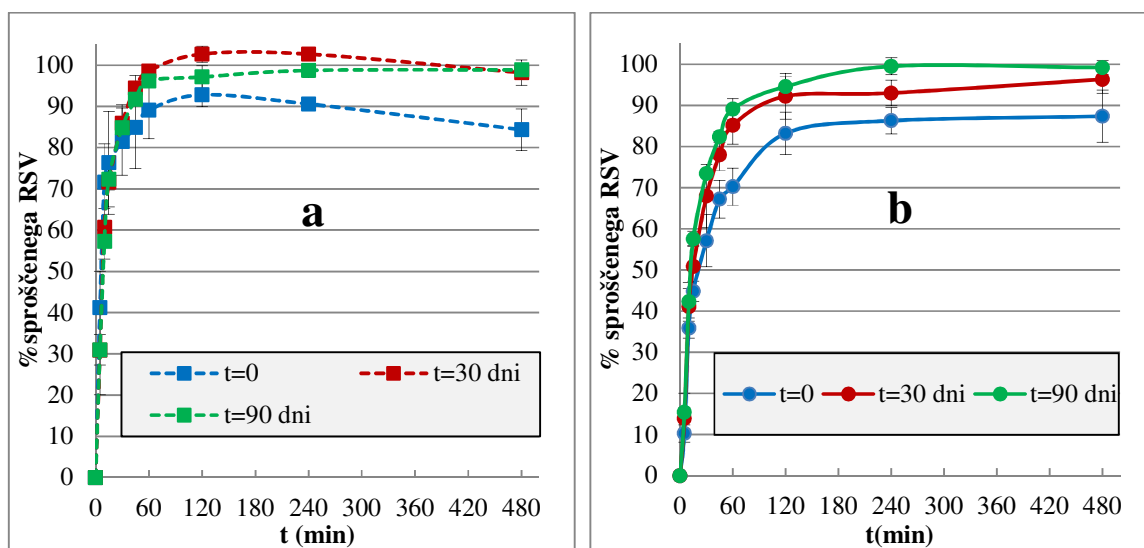
V nadaljevanju našega raziskovalnega dela smo preverili, kako adsorpcija *trans* RSV na trdne nosilce vpliva na njegovo sproščanje. Pri preizkusu sproščanja fizikalne zmesi s Sylysio® 350 smo v pufru s pH 1,2 (slika 12a) pred staranjem po dveh urah zaznali najvišjo koncentracijo RSV, to je 96,4 %. Po osmih urah se je koncentracija RSV v mediju zmanjšala na 87,0 %. Predvidevali smo, da je med preizkusom prišlo do zmanjšanja količine sproščenega RSV, ker se ga je nekaj pretvorilo iz *trans* v *cis* obliko. Po 30 in 90 dneh staranja smo dobili med seboj primerljive profile sproščanja, le da po dveh urah preizkusa v obeh primerih ni bilo tako velikega znižanja koncentracije RSV v mediju kot pred staranjem. Najverjetneje se je že po 30 dneh staranja v fizikalni zmesi vzpostavilo ravnotežje med *trans* in *cis* obliko, zaradi česar med samim preizkusom sproščanja ni prihajalo do nadaljnje pretvorbe oziroma je bila ta minimalna.



**Slika 12:** Rezultati preizkusa sproščanja fizikalnih zmesi s Sylysio® 350 pred in po 30- ter 90-dnevem staranju v kislem (a) in fosfatnem pufru (b).

V pufru s pH 6,8 se je pred staranjem po osmih urah preizkusa iz fizikalne zmesi s Sylysio® 350 sprostil 96,1 % RSV, nekaj ga je torej ostalo v porah nosilca (slika 12b). Podobna profila smo dobili tudi po 30 in 90 dneh staranja – obseg sproščanja je bil enak kot pred staranjem. V primerjavi s sproščanjem samega RSV se je iz fizikalne zmesi s Sylysio® 350 pred staranjem sprostil za 10 % več RSV. Razlog za to je večja specifična površina fizikalne zmesi, ki pride v neposreden stik z medijem. Podoben učinek Sylysie® 350 je opazil tudi Sruti s sodelavci, ki je dosegel izboljšano sproščanje cefuroksima iz fizikalne zmesi s Sylysio® 350 v primerjavi s samim cefuroksimom (59).

Po dveh urah preizkusa sproščanja pred staranjem se je v kislem pufru iz fizikalne zmesi s Syloidom® 244 FP (slika 13a) sprostil 92,8 % RSV. Nadalje se je koncentracija RSV v mediju postopoma zniževala, najverjetneje zaradi pretvorbe *trans* RSV v *cis* obliko. V primerjavi s preizkusom pred staranjem se je obseg sproščanja po 30 in 90 dneh staranja povečal. Z izdelavo fizikalnih zmesi s Syloidom® 244FP smo v kislem pufru dosegli večje količine sproščene ZU kot pri preizkusu sproščanja samega RSV. Podobno se je pokazalo pri vgradnji itrakonazola v mikrodelce iz Syloida® 244 FP (60).



**Slika 13:** Prikaz sprememb v deležih sproščene RSV iz fizikalnih zmesi s Syloidom® 244FP pred in po staranju v kislem (a) in fosfatnem pufru (b).

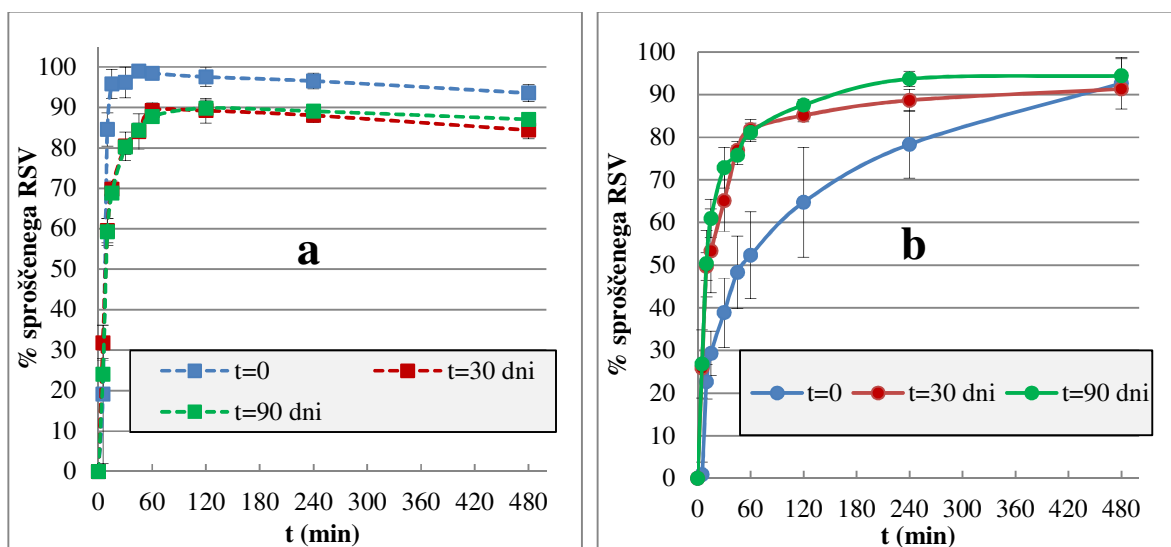
V fosfatnem pufru se je iz fizikalne zmesi z nosilcem Syloidom® 244FP (slika 13b) pred staranjem sprostil 87,4 % RSV, kar je manj kot v kislem mediju. Ker je verjetno nekaj ZU (~ 12,5 %) ostalo v porah nosilca, lahko sklepamo, da ima sam RSV izraženo afiniteto do



nosilca. Med silanolno skupino nosilca in -OH skupino RSV lahko namreč pride do nastanka vodikove vezi. Po 30 dneh staranja se je delež sproščene RSV rahlo povečal. Med profiloma po 30- in 90-dnevnem staranju znova nismo zaznali večjih razlik.

Obseg sproščanja pred staranjem je bil iz fizikalne zmesi s Syloidom<sup>®</sup> 244FP manjši kot iz fizikalne zmesi z nosilcem Sylysia<sup>®</sup> 350. Omenjena nosilca sta kemijsko gledano enaka, razlikujeta pa se po velikosti delcev. Ker so delci Syloida<sup>®</sup> 244FP večji, lahko to vpliva na nekoliko manjše sproščanje RSV, saj je pri večjih delcih na voljo manj površine, ki pride v stik z medijem.

Iz fizikalne zmesi z Neusilinom<sup>®</sup> US2 se je RSV v pufru s pH 1,2 (slika 14a) hitreje sprostil kot v fosfatnem pufru. V prvi uri testa sproščanja pred staranjem je količina sproščene ZU znašala 98,9 %, po osmih urah pa je količina padla na 93,6 %. Po 30 dneh staranja je bil obseg sproščanja manjši, saj je v prvi uri dosegel vrednost 89,2 %, manjša je bila tudi hitrost, po osmih urah preizkusa pa se je delež znižal na 84,4 %. Po 90 dneh staranja smo dobili skoraj identičen profil sproščanja.



**Slika 14:** Vpliv staranja pri povišani temperaturi na sproščanje RSV iz fizikalne zmesi z nosilcem Neusilin<sup>®</sup> US2 v pufru s pH 1,2 (a) in v pufru s pH 6,8 (b).

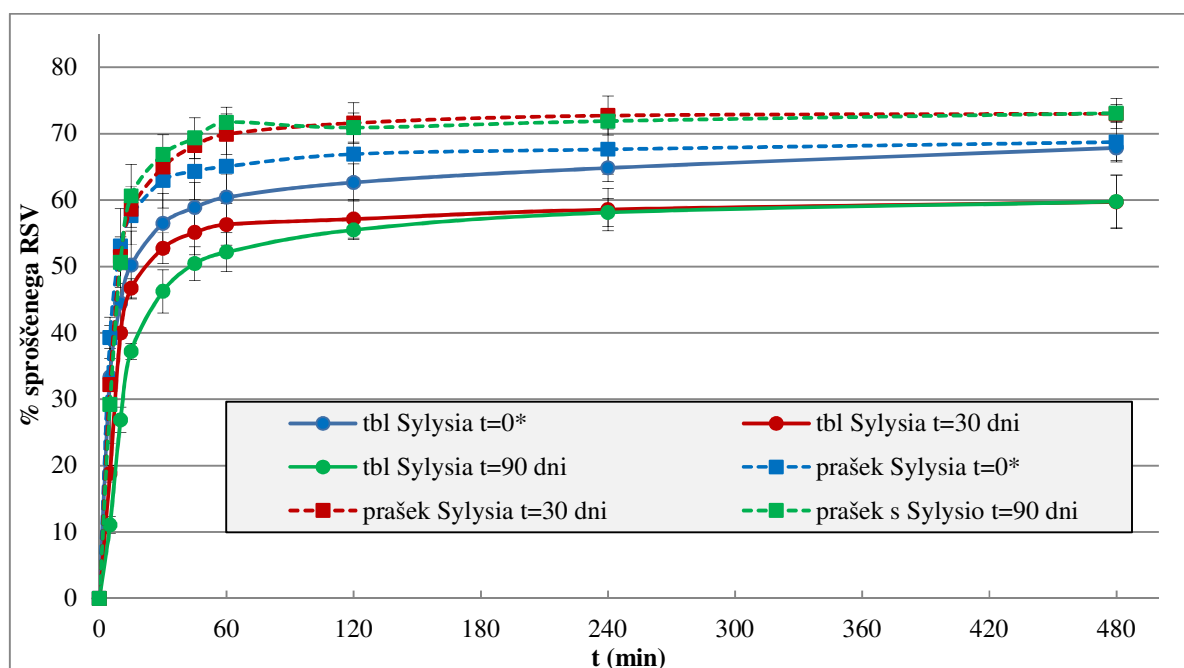
V pufru s pH 6,8 se je iz fizikalne zmesi z nosilcem Neusilin<sup>®</sup> US2 (slika 14b) pred staranjem po osmih urah sprostil 92,7 % RSV, možno je, da nekaj RSV ostaja v porah nosilca. Po 30 in 90 dneh staranja smo opazili hitrejše sproščanje, vendar je bil delež sproščene RSV po

osmih urah enak kot pri sproščanju pred staranjem. Med krivuljama sproščanja po 30 in 90 dneh staranja ni bilo posebnih razlik.

V pufru s pH 1,2 se je RSV iz vseh fizikalnih zmesi sproščal hitreje kot v fosfatnem pufru – pri Neusilinu<sup>®</sup> US2 je bila najvišja koncentracija RSV dosežena po eni uri, pri Sylysii<sup>®</sup> 350 ter Syloidu<sup>®</sup> 244 FP pa po dveh urah. Kasneje smo na vseh grafih opazili padec deleža sproščenega RSV v kislem pufru. Delež sproščenega RSV je v vsaki časovni točki testa sproščanja preračunan na vsebnost *trans* RSV, ki je s staranjem padala. Kot smo že omenili, predvidevamo, da je do padca vsebnosti prišlo zaradi vzpostavitve ravnotežja med *trans* in *cis* obliko. Tudi pri sproščanju smo pričakovali, da se bo med samim preizkusom vzpostavljalo ravnotežje med *trans* in *cis*, kar smo opazili kot padec količine RSV po dveh urah preizkusa pred staranjem. Pri staranih vzorcih je ravnotežje med izomeroma že bilo vzpostavljeno, zato je bila po 30- in 90-dnevnem staranju sprememba v količini sproščenega RSV med samim preizkusom manjša. Splošno gledano se je v kislem pufru pri fizikalnih zmesih s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244 FP nakazoval trend povečevanja obsega in hitrosti sproščanja, vendar je bil standardni odklon precej velik. Nasprotno sta se pri fizikalni zmesi z Neusilinom<sup>®</sup> obseg in hitrost zmanjšala. V pufru s pH 6,8 je bilo nekoliko drugače: obseg sproščanja po staranju se je rahlo povečal pri fizikalni zmesi s Syloidom<sup>®</sup> 244FP, pri Sylysii<sup>®</sup> 350 in Neusilinu<sup>®</sup> US2 pa je obseg po staranju ostal enak, nekoliko je narasla le hitrost sproščanja.

#### **4.4 IN VITRO SPROŠČANJE RESVERATROLA IZ TRDNIH SMES**

Po preizkusih sproščanja RSV iz fizikalnih zmesi smo napravili še enake preizkuse za vse trdne SMES po 30- in 90-dnevnem staranju in jih primerjali z rezultati sproščanja pred staranjem, ki so jih predhodno pridobili na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Deleže sproščenega RSV smo preračunali glede na določeno vsebnost *trans* RSV. Ta se je kot že predhodno omenjeno po 30 dneh staranja znižala, po 90 dneh staranja pa dodatnega znižanja ni bilo. Spodnja slika prikazuje sproščanje RSV iz trdnih SMES z nosilcem Sylysio<sup>®</sup> 350.

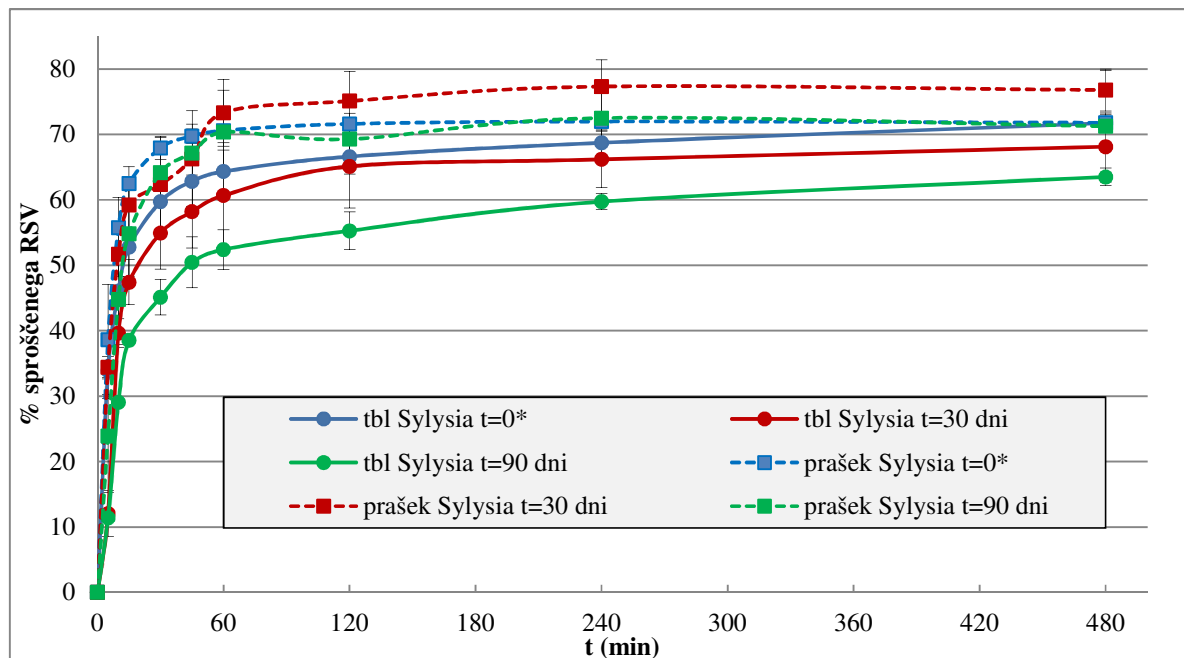


**Slika 15:** Razlike v profilih sproščanja RSV iz trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 pred in po 30- ter 90-dnevnem staranju v pufru s pH 1,2. \*Rezultati pred staranjem (t=0) so povzeti po (61).

Med preizkusom sproščanja v pufru s pH 1,2 se je iz praškov s Sylysio<sup>®</sup> 350 pred in po staranju sprostil več RSV kot iz tablet. Profili sproščanja praškov pred in po staranju se posebej ne razlikujejo med seboj, po dveh urah preizkusa je količina sproščenega RSV ne glede na staranja znašala ~ 70 %. Iz tablet se je v pufru s pH 1,2 pred staranjem sprostil le 67,9 %, po 30 dneh staranja pa se je obseg sproščanja zmanjšal na 59,7 %. Po 90 dneh staranja se profil sproščanja posebej ni spremenil.

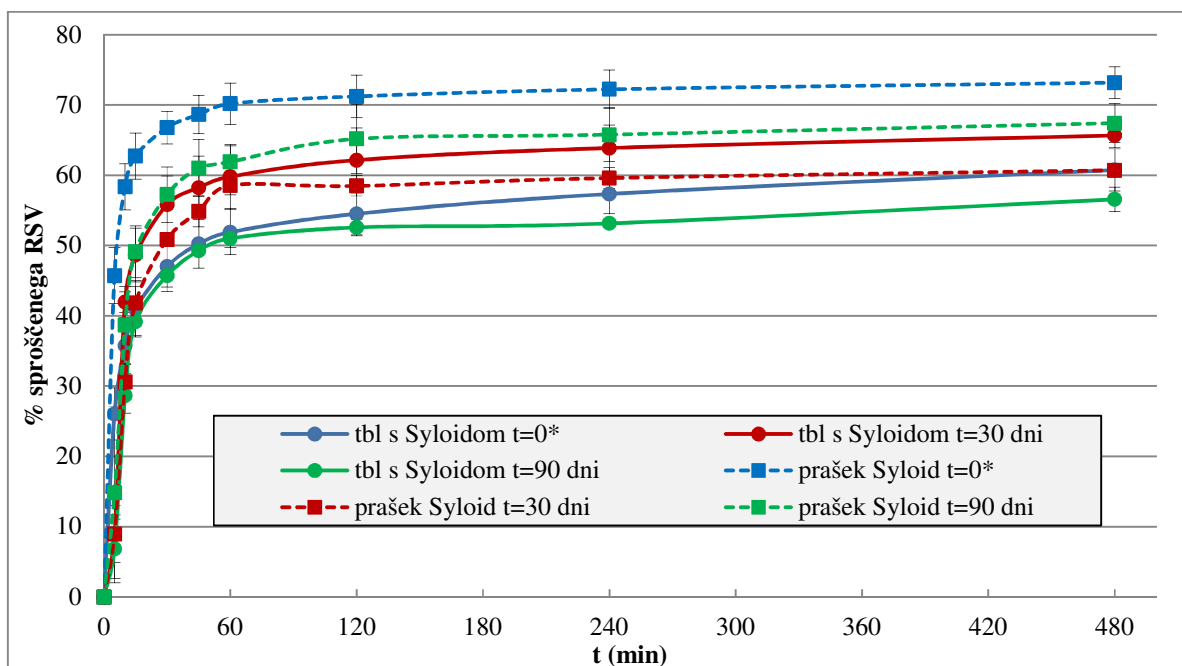
Kot je razvidno iz slike 16, se je tudi v pufru s pH 6,8 iz praškov s Sylysio<sup>®</sup> 350 sprostil več RSV kot iz tablet, v primerjavi s praški v pufru s pH 1,2 smo dobili podobne vrednosti. Pred staranjem je delež iz praškov sproščenega RSV po osmih urah preizkusa znašal 71,8 %, po 30 dneh se je obseg sproščanja rahlo zvišal na 76,8 %, vendar v ostalih časovnih točkah med profiloma pred in po 30-dnevnem staranju ni bilo razlik oziroma so bile razlike v okviru standardne deviacije. Po 90 dneh staranja smo dobili skoraj enake vrednosti iz praškov sproščenega RSV kot pred staranjem. Obseg sproščanja iz tablet se je po 30-dnevnem staranju v primerjavi z obsegom pred staranjem precej ujema, po 90-dnevnem staranju pa se je obseg zmanjšal. Če primerjamo obseg sproščanja v časovni točki dveh ur (razlika je tukaj največja),

je pred staranjem delež sproščene RSV iz tablet znašal 64,3 %, po 90 dneh staranja pa 52,4 %.



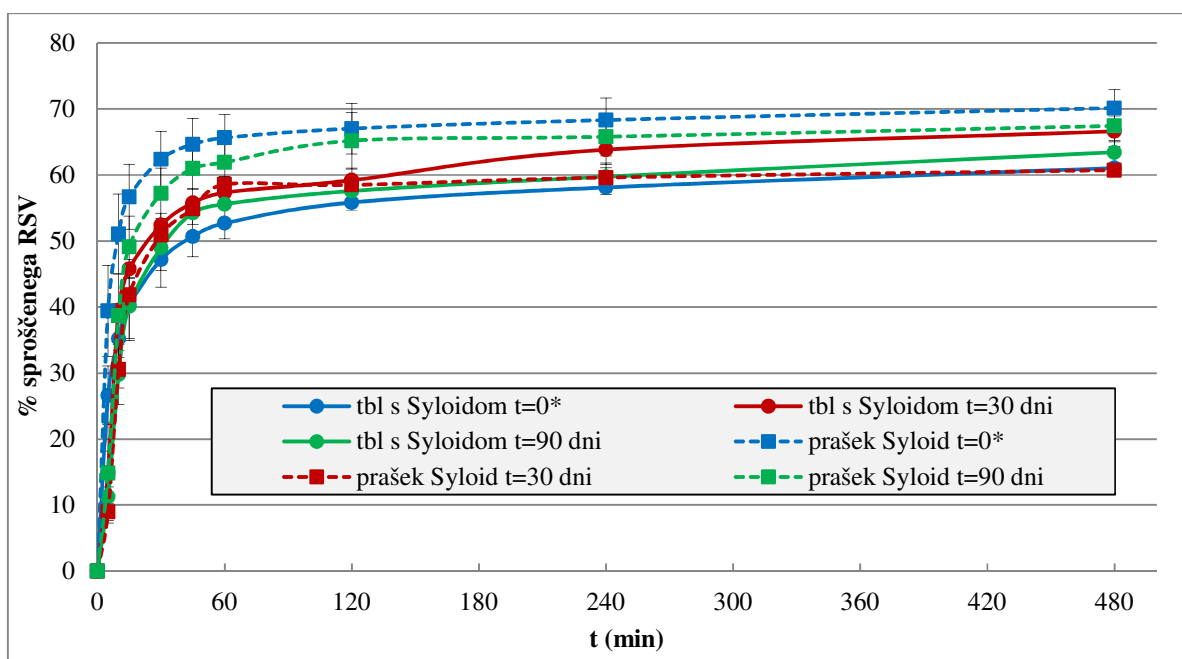
**Slika 16:** Prikaz rezultatov *in vitro* sproščanja RSV iz trdnih SMES s Sylysio® 350 pred in po staranju v fosfatnem pufri. \* Rezultati pred staranjem ( $t=0$ ) so povzeti po (61).

Iz profilov sproščanja RSV iz praškov s Syloidom® 244FP (slika 17) v kislem mediju vidimo, da je bil po osmih urah preizkusa pred staranjem delež sproščene RSV največji, in sicer 73,2 %, po 30 dneh staranja se je obseg sproščanja zmanjšal na 61,8 %, po 90 dneh pa se je spet za malenkost povečal na vrednost 64,7 %. Drugače smo ugotovili pri preizkusu *in vitro* sproščanja RSV iz tablet: največji obseg sproščanja smo zaznali po 30 dneh staranja – 65,7 %, nekoliko manjši obseg, 60,7 %, smo določili pred staranjem, najmanjši pa je bil po 90-dnevnem staranju – 56,7 %. Krivulji sproščanja pred staranjem in po 90 dneh staranja v prvih dveh urah preizkusa se ujemata/prilegata, kasneje pa je pri krivulji sproščanja pred staranjem mogoče opaziti povečano hitrost sproščanja, s tem pa tudi večji končni delež sproščene RSV.



**Slika 17:** Rezultati preizkusa sproščanja RSV iz trdnih SMES s Syloidom<sup>®</sup> 244 FP pred in po staranju v pufru s pH 1,2. \* Rezultati pred staranjem (t=0) so povzeti po (61).

Spremembe v sproščanju RSV iz praškov s Syloidom<sup>®</sup> 244FP po staranju v fosfatnem pufru (slika 18) so bile podobne prej omenjenim razlikam v kislem pufru.



**Slika 18:** Grafični prikaz rezultatov pridobljenih pri preizkusu sproščanja RSV iz trdnih SMES z nosilcem Syloid<sup>®</sup> 244FP pred in po staranju v fosfatnem mediju. \* Rezultati pred staranjem (t=0) so povzeti po (61).

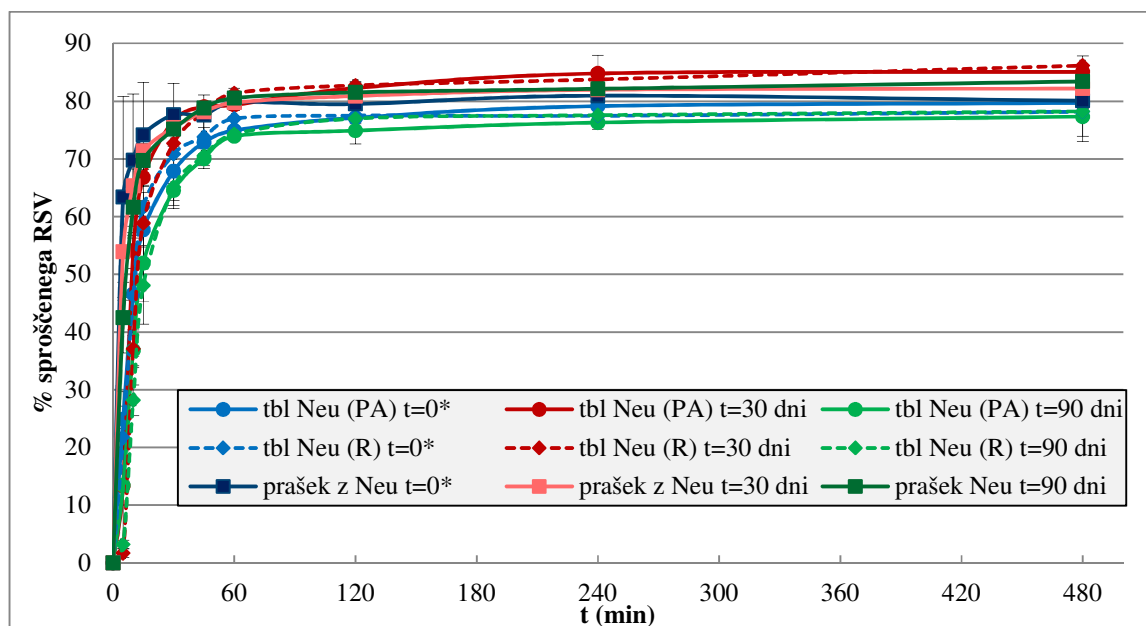
Obseg sproščene se je znižal iz 70,1 % pred staranjem na 60,5 % po 30-dnevnem staranju. Zanimivo je, da je po 90 dneh staranja profil sproščanja skoraj enak profilu pred staranjem, kar pomeni, da je bil obseg sproščene RSV po 90-dnevnem staranju večji kot po 30-dnevnem staranju. Tudi pri sproščanju tablet v fosfatnem pufri smo enako kot v kislem pufri določili največji obseg sproščanja po 30 dneh staranja – 66,6 %, kar je več kot pri sproščanju pred staranjem in po 90-dnevnem staranju, za kar smo dobili skoraj identični krivulji.

Že predhodni raziskovalci na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so ugotovili, da se pri adsorpciji tekočega SMES na porozne nosilce zmanjša sproščanje RSV pred staranjem v primerjavi s tekočim SMES (51). Naši rezultati kažejo, da je tudi obseg sproščanja RSV pred staranjem večji iz fizikalnih zmesi kot iz trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244FP. Domnevni vzrok za to je, da se emulgatorji, v katerih je raztopljen RSV, iz poroznih nosilcev ne desorbirajo v celoti. Sama adsorpcija na porozne nosilce je lahko fizikalna ali kemijska. Fizikalna adsorpcija je ponavadi šibka in reverzibilna, poteka hitro, značilno zanjo pa je še, da so prisotne elektrostatske in van der Waalove sile, molekule pa se lahko adsorbirajo v večih slojih. Za kemijsko adsorpcijo je značilno, da je zelo močna in ireverzibilna, njena hitrost je počasna, potrebuje visoko aktivacijsko energijo, poleg tega pri njej nastanejo kovalentne vezi. V našem primeru se neionski emulgatorji primarno adsorbirajo preko hidracije ali H-vezi, zato gre za fizikalno adsorpcijo (62). Omenjeno nepopolno desorpcijo emulgatorjev med preizkusom sproščanja je predpostavil že Speybroeck s sodelavci, ki je proučeval sproščanje danazola iz trdnih SMES. Ugotovil je, da se, če je vsebnost emulgatorja Kolliphorja<sup>®</sup> EL, adsorbiranega na trdni Neusilin<sup>®</sup> US2, manjša kot 30 % (v našem tekočem SMES je delež Kolliphorja<sup>®</sup> EL 30 %, v trdnem SMES pa manj), desorbira minimalna količina emulgatorja, kar povzroči manjšo solubilizacijsko kapaciteto za ZU in s tem njeno manjše sproščanje (63). Iz naših rezultatov pa je tudi razvidno, da se iz tablet sprosti manj RSV kot iz praškov. Tablete morajo v nasprotju s praški sicer najprej razpasti, kar pa sproščanje le upočasni oziroma zakasni. Zaradi tega smo vzrok za manjši obseg sproščanja iz tablet našli v njihovi izdelavi. Predvidevali smo, da sila stiskanja tablet tekoči SMES potisne globlje v pore nosilca, kar še dodatno doprinese k slabši desorpciji emulgatorjev.

Kot smo že omenili, sta nosilca Sylysia<sup>®</sup> 350 in Syloid<sup>®</sup> 244 FP kemijsko enaka, le delci Syloida<sup>®</sup> 244 FP so večji, zato je lahko obseg sproščanja iz trdnih SMES s Syloidom<sup>®</sup> 244 FP

v fosfatnem pufri manjši kot iz trdnih SMES s Sylysio® 350. Na splošno lahko na podlagi pridobljenih rezultatov vidimo, da se sproščanje RSV iz trdnih SMES z omenjenima nosilcema s časom staranja ni enakomerno spreminjalo, največja količina sproščenega je bila ponekod izmerjena po 30 ali 90 dneh staranja. Pri fizikalnih zmeseh teh nihanj nismo opazili oziroma je pri njih sproščanje po staranju ostalo enako ali se le rahlo povečalo. Tudi med profili po 30 in 90 dneh staranja ni bilo razlik, zaznali smo jih le pri trdnih SMES. Možna razlaga za spremenjeno sproščanje RSV po staranju so lahko spremembe v kemijski strukturi emulgatorjev oziroma v njihovi adsorpciji na porozne nosilce. Lipidi in emulgatorji so namreč občutljivi za hidrolizo in peroksidacijo (še posebej, če vsebujejo dvojne vezi, v našem primeru ricinusovo olje in Kolliphor® EL) (64). Naš SMES vsebuje različne lipide in emulgatorje, ki so v različni meri podvrženi kemijskim spremembam med staranjem, posledično lahko prihaja do spremenjenih povezav med emulgatorjem in nosilcem ter do sprememb v desorpciji emulgatorjev s poroznih nosilcev med preizkusom sproščanja.

Kot zadnje v sklopu preizkusov *in vitro* sproščanja smo analizirali še trdne SMES z Neusilinom® US2 (sliki 19 in 20). Pri preizkusu sproščanja RSV iz praškov z Neusilinom® US2 v kislem pufri iz slike 19 vidimo, da smo po osmih urah preizkusa pred in po staranju dobili skoraj enak delež sproščenega RSV – nekje 82 %. Iz tablet z Neusilinom® US2, ki so bile stisnjene na polavtomatski način, se je pred staranjem sprostil 79,7 %, po 30 dneh staranja se je obseg sproščanja nekoliko povečal na 85,1 %, po 90 dneh pa je padel na isto vrednost kot pred staranjem. Primerljive profile sproščanja smo dobili pri ročno stisnjenih tabletah z Neusilinom® US2, zato smo mnenja, da način tabletiranja ni vplival na sproščanje RSV iz tablet po staranju.

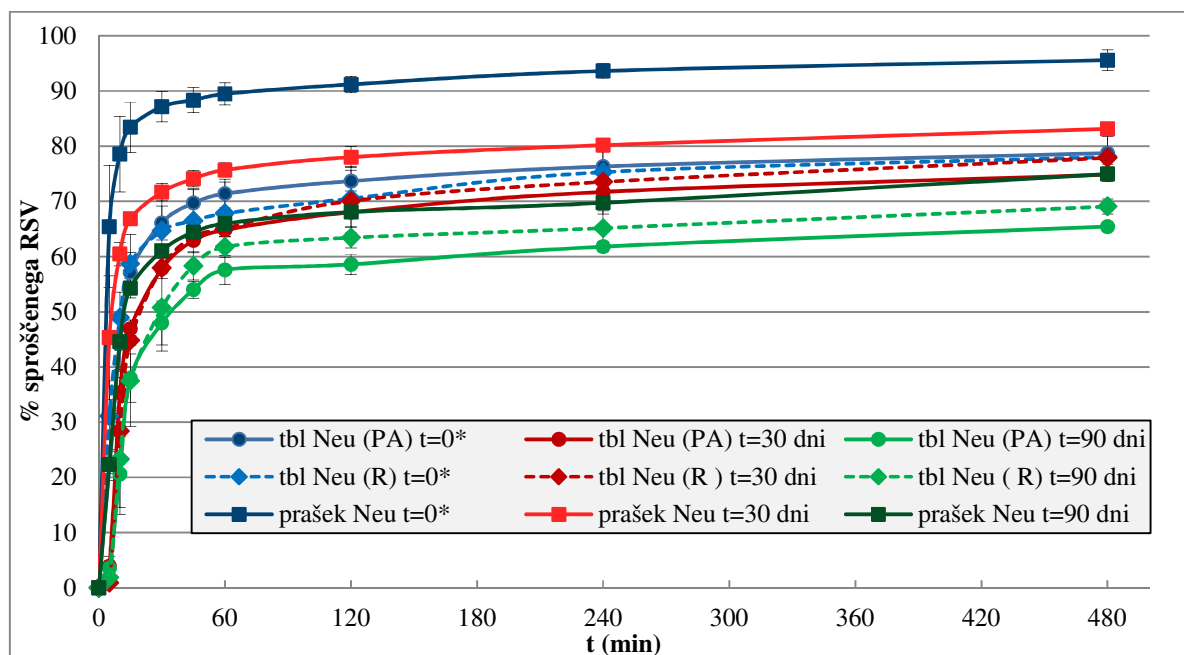


**Slika 19:** Razlike v deležih sproščenega RSV iz trdnih SMES z Neusilinom® US2 v kislem mediju, nastale zaradi vpliva staranja nastale. tbl Neu – tablete z nosilcem Neusilin® US2, (R) – ročni način stiskanja, (PA) – polavtomatski način stiskanja. \* Rezultati pred staranjem ( $t=0$ ) so povzeti po (61).

Staranje pri povišani temperaturi je na sproščanje RSV iz SMES-praškov z Neusilinom® US2 v fosfatnem pufri vplivalo tako, da se je obseg sproščanja RSV s časom zmanjševal (slika 20). Pred staranjem se je tako iz praškov sprostito 95,6 %, po 30 dneh staranja je bila količina sproščenega RSV v primerjavi s sproščeno količino pred staranjem manjša in je znašala 83,1 %, po 90 dneh pa se je obseg sproščanja še dodatno zmanjšal na 74,9 %. Pri proučevanju sproščanja RSV iz tablet Neu (PA) v pufri s pH 6,8 se je delež sproščenega RSV prav tako kot pri praških zmanjševal s časom, vendar so bile razlike v vrednostih manjše. Iz vrednosti 78,7 % pred staranjem se je po 30-dnevnem staranju obseg sproščanja iz tablet zmanjšal na 74,9 % in nato na 65,4 % sproščenega RSV po 90 dneh staranja.

Tako kot v kislem so bili tudi v fosfatnem pufri profili tablet, stisnjenih na polavtomatski oziroma ročni način, skoraj identični. Vidimo lahko tudi, da se po staranju sproščanje RSV v kislem pufri v nasprotju s fosfatnim pufrom ni veliko spremenilo. Možen razlog za to je, da se med staranjem spremenjeni emulgatorji iz Neusilina® US2 bolje desorbirajo v kislem kot v fosfatnem pufri.





**Slika 20:** Vpliv staranja na sproščanje RSV iz trdnih SMES z Neusilinom® US2 v fosfatnem pufru. tbl Neu – tablete z nosilcem Neusilin® US2, (R) – ročni način stiskanja, (PA) – polavtomatski način stiskanja. \* Rezultati pred staranjem ( $t=0$ ) so povzeti po (61).

Tudi pri trdnih SMES z Neusilinom® US2 velja enako kot za trdne SMES z ostalima dvema nosilcema: z adsorbicijo tekočega SMES na Neusilin® US2 se zmanjša sproščanje RSV v primerjavi s tekočim SMES (51), iz zadnjih dveh slik pa razberemo, da se je iz tablet z Neusilinom® US2 sprostil manj RSV kot iz praškov, kar velja tudi za vse trdne SMES z drugima dvema nosilcema. Iz praškov se je RSV sproščal hitreje, pa tudi obseg sproščanja je bil pri praških večji kot pri tabletah. Ne glede na to, koliko časa so bili SMES starani, so se omenjene razlike med sproščanjem ohranile, vsebnost v praških v primerjavi s vsebnostjo v tabletah pa je ostala nespremenjena.

Za razliko od prejšnjih dveh nosilcev se je obseg sproščanja iz trdnih SMES z Neusilinom® US2 v fosfatnem pufru s časom zmanjševal, verjetno se je nepopolna desorbicija emulgatorjev po staranju povečevala. Neusilin® US2 je kemijsko drugačen od Sylysie® 350 in Syloida® 244, saj je amorfna oblika magnezijevega aluminometasilikata. Domnevamo lahko, da je prišlo pri adsorbiciji emulgatorjev na Neusilin® US2 do drugačnih povezav kot pri Sylysii® 350 in Syloidu® 244FP, spremembe emulgatorjev med staranjem pa so najverjetneje pripomogle k zvečanju adsorbicije na Neusilin® US2, saj se je sproščanje s staranjem zmanjševalo.

Specifična površina delcev vseh treh nosilcev je sicer enaka, vendar je Neusilin<sup>®</sup> US2 v obliki največjih delcev – granul. Iz tega smo izpeljali, da so intrapartikularne pore Neusilina<sup>®</sup> US2 dolge in ozke. Z večanjem dolžine pore se zmanjšuje hitrost sproščanja, saj mora medij prodreti globlje v pore kot pri nosilcih s krajšimi porami (65). Prav tako ima Neusilin<sup>®</sup> US2 veliko manjši premer por kot ostali nosilci, kar še dodatno otežuje izpostavljenost por mediju. To bi lahko bil eden izmed dodatnih razlogov, da se je iz Neusilina<sup>®</sup> US2 po staranju sprostilo manj RSV kot iz drugih nosilcev.

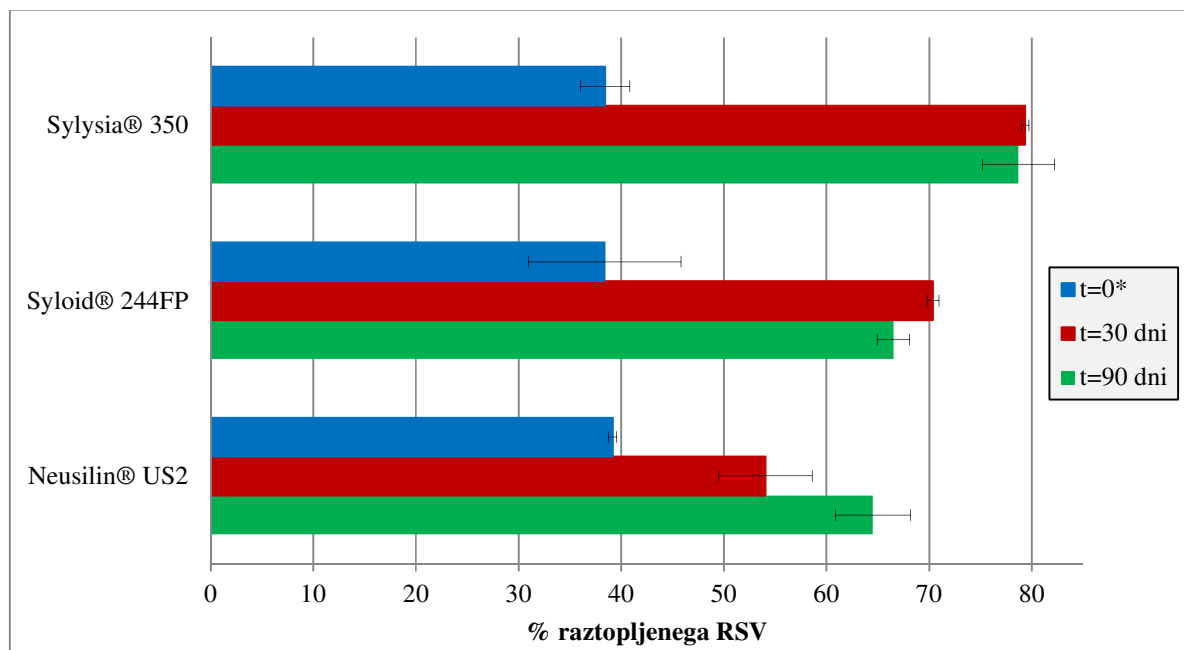
Staranje je najmanj vplivalo na sproščanje RSV iz praška s Sylysio<sup>®</sup> 350 in tablet s Syloidom<sup>®</sup> 244FP v fosfatnem pufru, v kislem pufru pa se je najmanj spremenilo sproščanje iz praška in tablet z Neusilinom<sup>®</sup> US2. Glede na to, da se RSV absorbira v tankem črevesju (17) želimo, da se ga tam največ sprosti in raztopi ter da je sproščanje čim bolj ponovljivo. Iz tega razloga bi se lahko odločili, da so se prašek s Sylysio<sup>®</sup> 350 in tablete s Syloidom<sup>®</sup> 244FP izkazali za med staranjem najbolj stabilne in posledično za vgradnjo RSV najprimernejše trdne SMES. Iz grafov sproščanja trdnih SMES v kislem pufru smo razbrali, da za razliko od fizikalnih zmesi in sproščanja samega RSV, med preizkusom ne prihaja do zniževanja količine sproščenega RSV. Iz tega sklepamo, da smo z vgradnjo RSV v trdne SMES uspeli *trans* RSV bolje zaščititi pred pretvorbo v *cis* obliko.

#### 4.5 IN VITRO LIPOLIZA TRDNIH SMES

Ko smo določili aktivnost lipaze, smo izvedli *in vitro* lipolizo trdnih SMES s pomočjo pH-stat metode, ki je natančneje opisana na strani 31. *In vitro* lipoliza je alternativna metoda *in vitro* sproščanja. V nasprotju z *in vitro* sproščanjem namreč upošteva dinamično dogajanje: prebavo lipidov, nastajanje koloidnih struktur in njihovih interakcij z ZU. Na lipidih osnovani sistemi so običajno pred porazdeljevanjem in absorpcijo izpostavljeni prebavi, zato se zdi metoda *in vitro* lipolize za njihovo vrednotenje primernejša (66, 67).

Na sliki 21 so prikazani rezultati *in vitro* lipolize praškov pred in po staranju. Deleži raztopljenega RSV v prebavnem mediju so preračunani glede na vsebnost in so bili pri vseh praških zelo podobni: od 31,5 % do 38,2 %. Po 30-dnevnem staranju se je delež po lipolizi raztopljenega RSV zvišal. Največji porast je mogoče opaziti pri prašku s Sylysio<sup>®</sup> 350, znašal je 79,4 %. Po 90 dneh staranja je bil delež RSV v primerjavi z deležem po 30-dnevnem

staranju pri vseh praških skoraj enak – opažene razlike so bile v okviru standardne deviacije. Največji delež raztopljenega RSV smo po 90-dnevnem staranju izmerili pri prašku s Sylysio® 350.

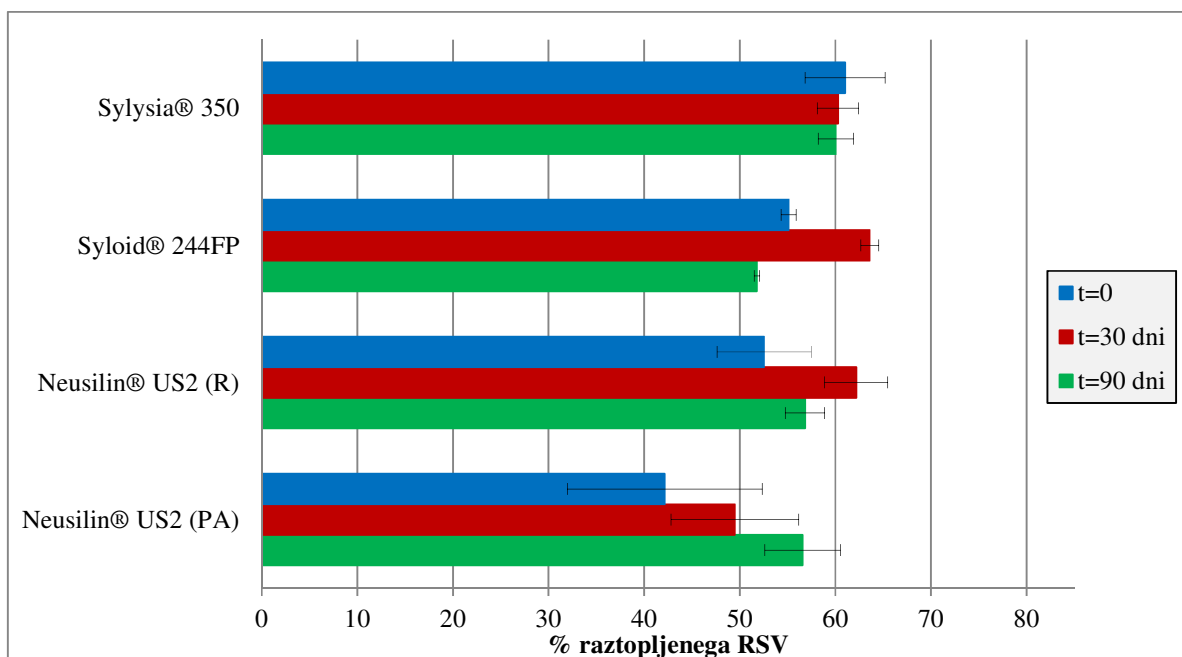


**Slika 21:** Grafični prikaz deležev RSV v prebavnem mediju po lipolizi SMES praškov, pridobljenih pred in po staranju. \* Rezultati pred staranjem ( $t=0$ ) so povzeti po (52).

Največja sprememba v deležu sproščenega RSV iz vseh treh vrst praškov se je torej zgodila po 30 dneh staranja, ko se je delež povsod precej povečal. Glede na to, da rezultati pred staranjem precej odstopajo od ostalih in da so bili pridobljeni s strani predhodnih raziskovalcev, ki so uporabili drugo serijo pankreatina, lahko razlog zato iščemo v slabi ponovljivosti metode, ki morda še ni dovolj dobro uveljavljena, saj so bili parametri (koncentracija NaOH, hitrost dodajanja NaOH) določeni šele pred kratkim. Druga možnost je lahko, da je pri staranju najverjetneje prišlo do kemijskih sprememb emulgatorjev, kar smo omenili že pri *in vitro* sproščanju. To je lahko povzročilo večjo solubilizacijsko kapaciteto za RSV zaradi česar smo v prebavnem pufru dobili več sproščenega RSV. Estri maščobnih kislin s polietilen glikolom so potencialni substrati za lipazo. Christiansen je s sodelavci dokazal, da sta Kolliphor® EL in RH 40 občutljiva za lipolizo, kar pomeni, da se hidrolizirata, pri čemer se jima zmanjša solubilizacijska kapaciteta, sama ZU pa se lahko obori, po drugi strani pa Kolliphor® RH 40 tudi zavira delovanje lipaze (68). Ker med staranjem lahko morda pride do kemijskih

sprememb emulgatorjev, se lahko tudi njuna občutljivost za lipolizo oziroma sposobnost zaviranja lipaze zmanjša, posledica česar je prav tako večji delež raztopljenega RSV v prebavnem mediju.

Na sliki 22 so prikazane koncentracije sproščene RSV v prebavnem pufru po *in vitro* lipolizi tablet. V primerjavi z ostalimi tabletami smo največjo koncentracijo RSV pred staranjem zaznali v tabletah z nosilcem Sylysio® 350, skoraj identične vrednosti smo dobili tudi pri izvedbi *in vitro* lipolize po staranju. Zanimivo je, da je bila pri tabletah s Syloidom® 244FP koncentracija v prebavnem mediju po 30-dnevnem staranju za 8,5 % večja kot pred staranjem, po 90-dnevnem staranju pa se je sprostilo 3,3 % RSV manj kot pred staranjem. Pri tabletah z Neusilinom® US2, ki so bile stisnjene na polavtomatski način, je bila količina raztopljenega RSV izmed vseh tablet najmanjša, po staranju se delež raztopljenega RSV z upoštevanjem standardnega odklona ni bistveno spremenil. Podobno smo opazili tudi pri ročno stisnanih tabletah z Neusilinom® US2, same vrednosti pa so bile nekoliko večje kot pri tabletah, stisnjenih na polavtomatski način.



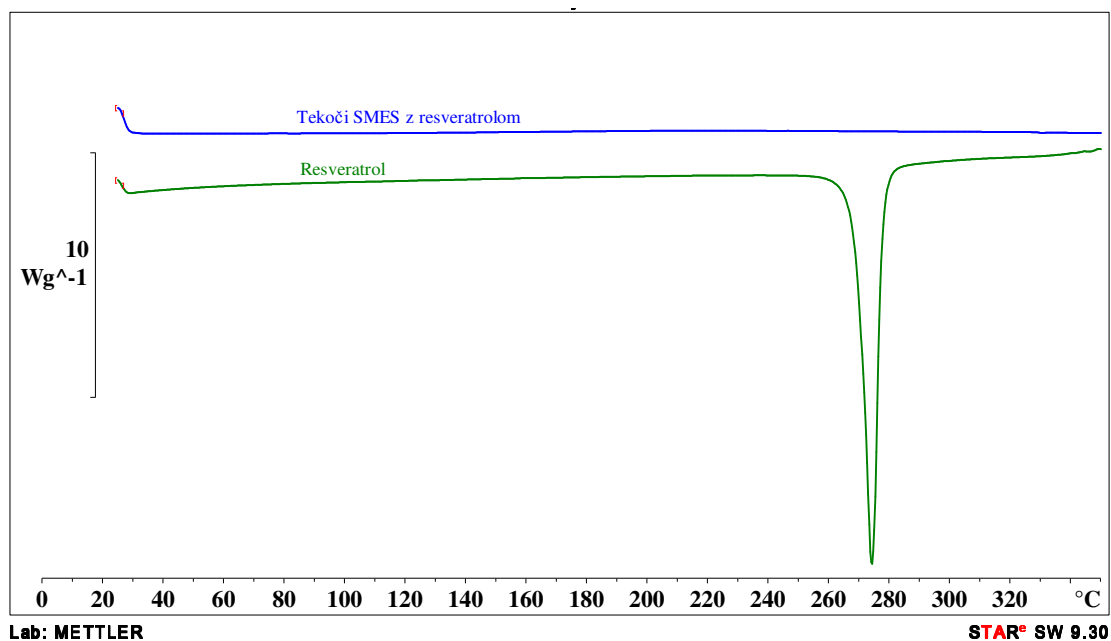
Slika 22: Vpliv staranja na spremembe v deležih RSV v prebavnem pufru po *in vitro* lipolizi SMES tablet.

Pri testu *in vitro* lipolize trdnih SMES smo pred staranjem pri tabletah izmerili večjo vrednost v prebavnem pufru raztopljenega RSV kot pri praških, kar je drugače kot pri *in vitro* sproščanju, kjer se je iz praškov ne glede na staranje sprostilo več RSV kot iz tablet. Rezultati preizkusa *in vitro* lipolize pri tabletah s Syloidom<sup>®</sup> 244FP so primerljivi rezultatom *in vitro* sproščanja: največji delež sproščenega RSV je bil pri obeh metodah opažen po 30-dnevnem staranju. Tudi vrednosti sproščenega RSV v prebavnem mediju po lipolizi tablet s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244 FP so bile podobne tistim, ki smo jih dobili po eni uri preizkusa sproščanja. Rezultati lipolize tablet z Neusilinom<sup>®</sup> US2 so se z rezultati *in vitro* sproščanja, kjer se je obseg sproščanja s staranjem zmanjševal, manj ujemali. Kljub naši domnevi, da je s staranjem prišlo do povečevanja adsorpcije emulgatorjev na Neusilin<sup>®</sup> US2, so imele kemijske spremembe emulgatorjev in s tem večja solubilizacijska kapaciteta za RSV večji vpliv na delež RSV v prebavnem mediju, k dodatni solubilizaciji pa so verjetno pripomogli tudi fosfolipidi in žolčne soli, ki jih medij za preizkus sproščanja ni vseboval. Da so rezultati *in vitro* lipolize drugačni od rezultatov *in vitro* sproščanja, je opazil tudi Ali s sodelavci, ki je pri vrednotenju tekočih SMES z vitaminom E ugotovil, da med rezultati lipolize in *in vitro* sproščanja ter med koncentracijo vitamina E v vodni fazi po lipolizi in obsegom lipolize korelaciji ne obstajata (69). SMES tablete so se z metodo *in vitro* lipolize izkazale za manj občutljive na staranje pri povišani temperaturi, saj so bili rezultati pred in po staranju primerljivejši.

#### 4.6 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

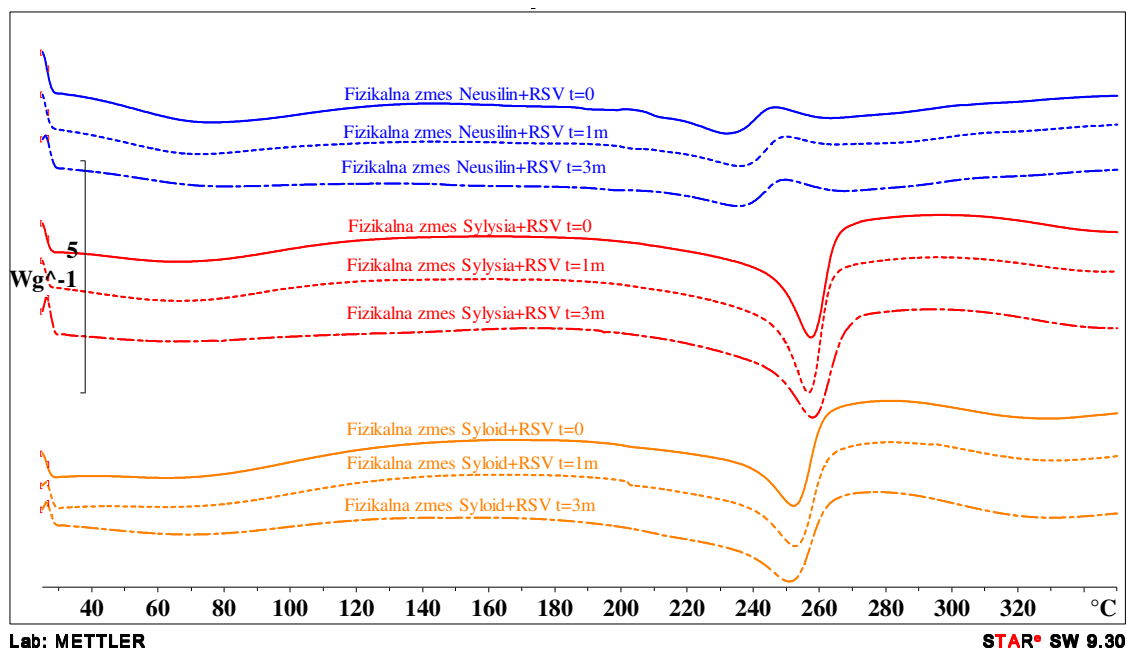
Želeli smo preveriti, kaj se dogaja med staranjem v notranji zgradbi trdnih RSV-SMES in fizikalnih zmesih, zato smo posneli termograme tablet in praškov ter fizikalnih zmesi pred in ob koncu staranja.

Na sliki 23 vidimo termogram *trans* RSV z ostrim endogenim vrhom pri 270 °C, ki predstavlja tališče kristaliničnega RSV pri 265–267 °C (70). Krivulja tekočega RSV-SMES nima omenjenega vrha, iz česar je razvidno, da je RSV v tekočem SMES raztopljen.



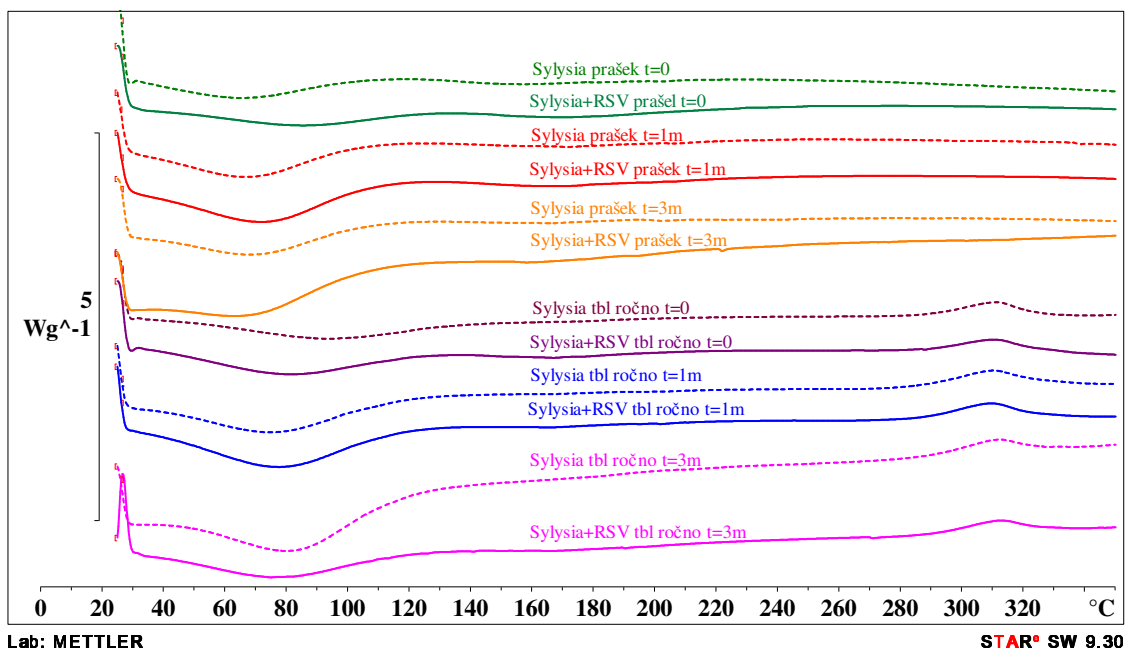
Slika 23: DSC termogram RSV in tekočega SMES z RSV.

Na sliki 24 je predstavljen DSC termogram fizikalnih zmesi z masnim razmerjem nosilec : RSV = 1 : 1. Povsod opazimo endogeni vrh pri 240–260 °C, kar nam nakazuje, da imamo v fizikalnih zmesih prisoten kristaliničen RSV – vrh je sicer manj oster in do taljenja fizikalnih zmesi pride pri nižji temperaturi kot do taljenja čistega RSV. To nam nakazuje, da je RSV prisoten le delno v kristalinični obliki, deloma pa se je verjetno pretvoril v amorfno obliko. Pretvorbo kristalinične oblike v amorfno, ki ima navadno boljšo topnost, lahko dosežemo z adsorbcijo ZU na porozne materiale (71). Do zdaj so že poročali o primerih, ko je v fizikalnih zmesih s silicijem prišlo do postopne pretvorbe kristalinične oblike v amorfno (72, 73). ZU z adsorbcijo na porozni nosilec izgubi svojo kristalno strukturo. Struktura poroznih materialov namreč omogoči prostorske pregrade med molekulami – ena pora ne more adsorbirati toliko molekul ZU, da bi prišlo do aktiviranja nukleacije in rasti kristalov (71). Ko so sočasno zmleti zmesi Neusilina<sup>®</sup> US2 in prednizona povečevali delež Neusilina<sup>®</sup> US2, je endogeni vrh prednizona postopoma izginjal (74). V naših fizikalnih zmesih je največ amorfne oblike prisotne v fizikalni zmesi z Neusilinom<sup>®</sup> US2, saj tukaj opazimo najmanjši endogeni vrh in največje znižanje tališča. Krivulje fizikalnih zmesi po staranju so skoraj enake tistim ob  $t = 0$ , zato sklepamo, da med staranjem ni prišlo do sprememb, kot je npr. povečanje deleža kristalinične oblike.

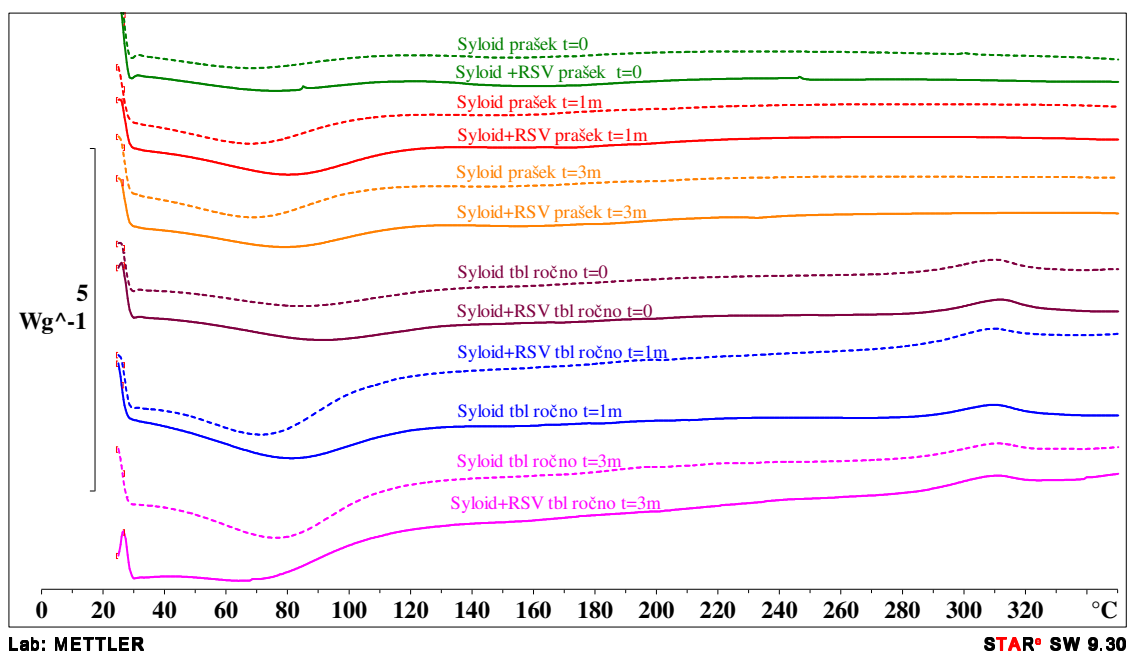


*Slika 24: DSC termogram fizikalnih zmesi z masnim razmerjem nosilec : RSV = 1:1 pred in po staranju.*

Na vseh krivuljah termogramov trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 (slika 25) in Syloidom<sup>®</sup> 244 (slika 26) opazimo pri 80–100 °C endogeni vrh, ki predstavlja izhlapevanje vode. Na krivuljah tablet pri 310–320 °C opazimo eksogeni vrh, ki ga na krivuljah praškov ni zaslediti. Mehanna je s sodelavci posnel termogram Syloida<sup>®</sup> 244 FP s krivuljo, na kateri ni nobenega izrazitega oziroma rahlega eksogenega ali endogenega vrha (75). Eksogeni vrh na našem termogramu se pojavlja tako pri SMES tabletah z RSV kot tudi pri tistih brez njega, kar pomeni, da je vzrok za prisotnost eksogenega vrha ena izmed pomožnih snovi pri tabletiranju. Endogenega vrha, ki bi predstavljal taljenje kristaliničnega RSV, nismo zaznali, zato sklepamo, da je RSV v trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244FP tekom staranja ostal v raztopljeni obliki.



**Slika 25:** Vpliv staranja na rezultate DSC analize trdnih SMES z in brez RSV z nosilcem Sylysia<sup>®</sup> 350 pred in po staranju.

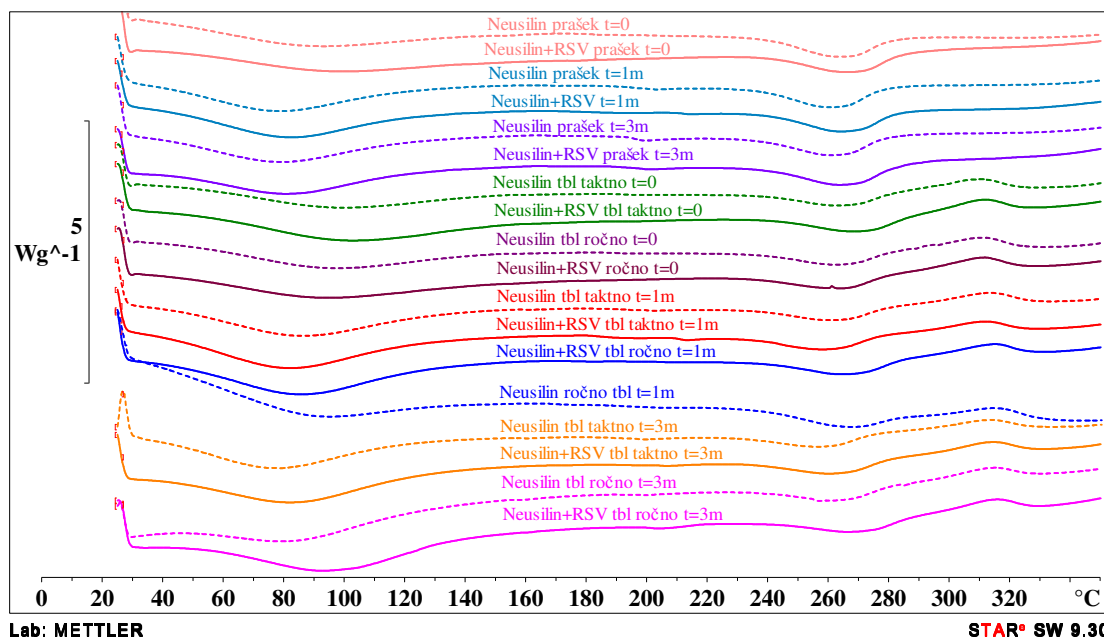


**Slika 26:** Krivulje termične DSC analize trdnih SMES z in brez RSV z nosilcem Syloid<sup>®</sup> 244 FP pred in po staranju.

Na sliki 27 so prikazane DSC krivulje različnih trdnih SMES z Neusilinom<sup>®</sup> US2, ki so si tako z RSV kot tudi brez, zelo podobne. Pri 90–100  $^{\circ}C$  opažen endogeni vrh predstavlja izparevanje vode, ki je adsorbirana na Neusilin<sup>®</sup> US2. Ta ima precejšnjo kapaciteto adsorpcije



vode: 2,4–3,1 ml/g (36). Pri 260 °C vidimo nov rahel endogeni vrh. Ker se pojavlja tako pri vseh trdnih SMES z RSV kot tudi pri tistih brez njega, ga pripisujemo Neusilinu<sup>®</sup> US2. To lahko podkrepimo z na Katedri za farmacevtsko tehnologijo posneto krivuljo samega Neusilina<sup>®</sup> US2, na kateri prav tako opazimo endogeni vrh pri 245–247 °C (61), ki se v prisotnosti ZU običajno nekoliko zamakne (76).



Slika 27: Rezultati DSC analize trdnih SMES z in brez RSV z nosilcem Neusilin<sup>®</sup> US2 pred in po staranju.

Med testiranimi formulacijami opazimo eksogeni vrh pri 315 °C le pri tabletah (z RSV in brez njega), zato sklepamo, da pripada eni izmed pomožnih snovi za tabletiranje. Na nobeni krivulji ni velikega endogenega vrha pri 275 °C, ki bi nakazoval prisotnost kristaliničnega RSV. V praških in tabletah z Neusilinom<sup>®</sup> US2 enako kot v prej omenjenih trdnih SMES s Sylysio<sup>®</sup> 350 in Syloidom<sup>®</sup> 244FP med staranjem nismo našli dokazov za rekristalizacijo. Za razliko od fizikalnih zmesi, kjer je RSV deloma ohranil kristalinčnost, je RSV v vseh trdnih SMES formulacijah ostal raztopljen.

## 5 SKLEP

Našo raziskavo smo izvedli z namenom proučiti stabilnost RSV v trdnih SMES in jih primerjati s fizikalnimi zmesmi RSV z istimi nosilci, ki so bili uporabljeni tudi pri izdelavi trdnih SMES. Trdne SMES in fizikalne zmesi smo ovrednotili z različnimi metodami pred staranjem in po 30 ter 90 dneh staranja pri povišani temperaturi 40 °C. Pri delu smo se posluževali metod *in vitro* sproščanja, *in vitro* lipolize in DSC analize.

- Vsebnost se je med staranjem skoraj v vseh trdnih in tekočem SMES zmanjšala za manj kot 10 % (razen pri prašku s Sylysio® 350 je vsebnost padla za malenkost več kot 10 %), v fizikalnih zmesih pa za 20 %. Ker se je količina RSV zmanjšala po 30 dneh staranja, po 90 dneh staranja pa ni bilo dodatnega zmanjšanja, menimo, da je po 30 dneh staranja prišlo do ravnotežja med *cis* in *trans* obliko, po 90 dneh pa ni prišlo do dodatne pretvorbe v *cis* obliko. Z vgradnjo RSV v SMES smo torej dosegli boljšo stabilnost.
- Pri sproščanju samega RSV v kislem pufru se je njegova koncentracija po dveh urah preizkusa nekoliko znižala. Najverjetneje je med samim testom prišlo do prehajanja *trans* v *cis* obliko. V fosfatnem pufru se ga je sprostilo 85 %, v nasprotju z kislim medijem se vrednost sproščenega RSV po dveh urah ni zniževala.
- Pred staranjem se je delež sproščenega RSV iz fizikalnih zmesi v kislem pufru po dveh urah preizkusa malenkost znižal. Tega po staranju nismo opazili. Sklepali smo, da se pred staranjem med samim preizkusom *trans* oblika pretvarja v *cis*, pri staranih vzorcih pa se je ravnotežje med oblikama že vzpostavilo. Pri fizikalnih zmesih s Sylysio® 350 in Syloidom® 244 FP so nam v kislem pufru rezultati nakazovali trend povečevanja obsega in hitrosti sproščanja, vendar je bil standardni odklon precej velik. Pri fizikalni zmesi z Neusilinom® US2 se je pokazalo drugače: obseg in hitrost sta se zmanjšala. Staranje fizikalnih zmesi je na sproščanje RSV v fosfatnem mediju vplivalo tako, da se je obseg pri fizikalni zmesi s Syloidom® 244FP povečal, pri Sylysii® 350 in Neusilinu® US2 pa je ostal enak.
- Ne glede na to, koliko časa so bili trdni SMES starani, se je iz praškov vedno sprostilo več RSV kot iz tablet, kljub temu da se vsebnost med praški in tabletami ni posebej razlikovala. Vzrok je ta, da s stiskanjem praškov v tablete tekoči SMES potisnemo globlje v pore.

- Sproščanje RSV iz trdnih SMES s Sylysio® 350 in s Syloidom® 244F se s časom staranja ni enakomerno spreminjalo, ponekod smo največji obseg sproščanja določili po 30 dneh staranja. Ker so uporabljeni emulgatorji in lipidi občutljivi na hidrolizo/peroksidacijo, smo domnevali, da je med staranjem prišlo do kemijskih sprememb v njihovi strukturi in s tem do spremenjenih povezav med emulgatorjem in nosilcem ter v desorpciji emulgatorjev s poroznih nosilcev, kar je lahko razlog za neenakomerne spremembe v sproščanju.
- Sproščanje RSV iz trdnih SMES z Neusilinom® US2 je s časom staranja v kislem pufru ostajalo skoraj enako, v fosfatnem pufru pa se je zmanjševalo. Možno je, da se je nepopolna desorpcija emulgatorjev s staranjem zviševala, kar pripisujemo drugačnemu kemizmu Neusilina® US2 v primerjavi s Sylysio® 350 in Syloidom® 244FP. Nepopolno desorpcijo lahko še dodatno povečujejo dolge in ozke pore Neusilina® US2 ter njihov majhen premer. Ker se v kislem pufru sproščanje ni bistveno spreminjalo, je najverjetneje desorpcija emulgatorjev iz Neusilina® US2 lažja kot v fosfatnem pufru.
- V kislem pufru se delež sproščenega RSV med samim preizkusom pri nobenem SMES ni zmanjševal, iz česar lahko sklepamo, da smo z vgradnjo RSV v trdne SMES verjetno dosegli boljšo zaščito pred pretvorbo *trans* oblike v *cis* kot pa pri fizikalnih zmesih.
- Rezultati *in vitro* lipolize praškov so sledeči: po staranju se je količina RSV v prebavnem pufru po lipolizi pri vseh praških povečala. Možen razlog je lahko ta, da so lipolizo pred staranjem izvajali predhodni raziskovalci, ki so uporabili drugo serijo pankreatina, sama metoda še tudi ni uveljavljena, oziroma so parametre (npr. koncentracija in hitrost dodajanja NaOH) določili šele pred kratkim. Drug razlog pa je lahko ta, da so zaradi staranja spremenjeni emulgatorji verjetno izkazovali večjo solubilizacijsko kapaciteto za RSV, zmanjšala se je njihova občutljivost za lipolizo in sposobnost zaviranja lipaze, kar ima za posledico večji delež sproščenega RSV v prebavnem mediju.
- Vrednost raztopljenega RSV v prebavnem mediju po lipolizi vseh vrst tablet se s staranjem ni bistveno spremenila. Pred staranjem je bila količina raztopljenega RSV po *in vitro* lipolizi tablet višja kot pri praških, kar je v nasprotju z *in vitro* sproščanjem.
- Z DSC analizo smo ugotovili, da med staranjem RSV v nobenemtrdnem SMES ni prišlo do rekristalizacije. Pri fizikalnih zmesih smo na termogramih pred in po staranju opazili oster endogeni vrh pri 240–260 °C, ki je najverjetneje predstavlja tališče kristaliničnega

RSV. Iz omenjenega smo sklepali, da je bil RSV v fizikalnih zmesih deloma v kristalinični obliki.

Rezultati magistrske naloge niso potrdili primerljivosti metod preizkusa *in vitro* sproščanja in *in vitro* lipolize. *In vitro* lipoliza naj bi načeloma boljše posnemala *in vivo* dogajanje, vendar bi bilo najbolj relevantno, če bi stabilnost ovrednotili še z *in vivo* preizkusi, saj ni nujno, da *in vivo* rezultati korelirajo z *in vitro* lipolizo. Ker je zaenkrat zelo malo znanega o tem, kaj se dogaja pri adsorpciji emulgatorjev na trdne nosilce, in glede na to, da vgrajevanje slabo vodotopne učinkovine v SMES in nadaljnja izdelava tablet vzbujata vedno večje zanimanje na področju farmacevtske tehnologije, menimo, da bo v prihodnje potreba po temeljitih raziskavah o tem postajala vedno večja.

## 6 LITERATURA

1. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, et al: Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 2013; 61:215–26.
2. Chun-fu WU, Jing-yu Y, Fang W, Xiao-xiao W: Resveratrol: botanical origin , pharmacological activity and applications. *Chin J Nat Med* 2013; 11(1):1–15.
3. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, et al: Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215(4):48–59.
4. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y: Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24(5A):2783–840.
5. Baur J a, Sinclair D a: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(6):493–506.
6. Nakata R, Takahashi S, Inoue H: Recent advances in the study on resveratrol. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(3):273–9.
7. Fouad M, Agha A, Merzabani M Al, Shouman S: Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: Calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2013; 32(10):1067–80.
8. Ribarič S. Temelji patološke fiziologije, Medicinska fakulteta Ljubljana, Ljubljana, 2012: 170.
9. Li H., Xia N., Foerstermann U: Cardiovascuar effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide* 2012; 26:1020–110.
10. Walle T.: Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1215(Lc):9–15.
11. Elektronski vir:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5010?lang=en&region=SI>  
(dostopno: 26.5.2014)
12. Das S, Lin H-S, Ho PC, Ng K-Y: The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm Res* 2008; 25(11):2593–600.
13. Walle T, Hsieh F, Delegge MH, Oatis JE, Walle UK: High absorption but very low bioavailability of oral resvertrol in humans. *Abstract* 2004; 32(12):1377–82.
14. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 2008; 658(1-2):68–94.
15. Cottart C-H, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudoux J-L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(1):7–16.
16. Amiot MJ, Romier B, Dao T-MA, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R, et al: Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* 2013; 95(6):1233–8.

17. Sfar S, Amri a., Chaumeil JC, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012; 158(2):182–93.
18. Matos M, Gutiérrez G, Coca J, Pazos C: Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2014; 442:69–79.
19. Pando D, Gutiérrez G, Coca J, Pazos C: Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol. *J Food Eng* 2013; 117(2):227–34.
20. Cadena PG, Pereira M a, Cordeiro RBS, Cavalcanti IMF, Barros Neto B, Pimentel MDCCB, et al: Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828(2):309–16.
21. Amri A, Le Clanche S, Théron P, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D, Lai-Kuen R, et al: Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; 86: 418–426.
22. Hauss DJ: Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(7):667–76.
23. Pouton CW, Porter CJH: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(6):625–37.
24. Kyatanwar AU, Jadhav KR, Kadam VJ: Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS) : Review. *Journal of Pharmacy Research* 2010; 3(1): 75-83.
25. Pouton CW: Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000; Suppl 2:S93–8.
26. Charman AS, Charman NW, Rogge M, Wilson TD, Pouton CW: Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound- *Pharmaceutical Research* 1992; 9(1):87-93.
27. Gursoy RN, Benita S: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58(3):173–82.
28. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK: Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today* 2010; 15(21-22):958–65.
29. Dahan A, Hoffman A: Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J Control Release* 2008; 129(1):1–10.
30. Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN: Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(3):231–48.
31. Wei Y, Ye X, Shang X, Peng X, Bao Q, Liu M, et al: Enhanced oral bioavailability of silybin by a supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2012; 396:22–8.
32. Tang B, Cheng G, Gu J-C, Xu C-H: Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discov Today.* 2008; 13(13-14):606–12.

33. Zvonar A, Bolko K, Gašperlin M: Microencapsulation of self-microemulsifying systems: optimization of shell-formation phase and hardening process. *Int J Pharm* 2012; 437(1-2):294–302.
34. Macgregor KJ, Embletona JK, Lacy JE, Perry EA, Solomon J, Seagerb H, et al: Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25:33–46.
35. Larsen AT, Sassene P, Müllertz A: In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int J Pharm* 2011; 417(1-2):245–55.
36. Zvonar A: Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom. Doktorska disertacija 2010. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
37. Mu H, Holm R, Müllertz A: Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 2013; 453(1):215–24.
38. Elektronski vir: [http://www.chiralvision.com/pdf/lipase\\_TBU\\_activity\\_assay.pdf](http://www.chiralvision.com/pdf/lipase_TBU_activity_assay.pdf)  
(dostopno 15.12.2013)
39. Sek L, Porter CJH, Kaukonen AM, Charman WN: Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(1):29–41.
40. Elektronski vir:  
[http://www.pharma-ingredients.basf.com/Solubilizer/Kolliphor\\_range/kolliphor\\_EL-ELP.aspx](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Solubilizer/Kolliphor_range/kolliphor_EL-ELP.aspx)  
(dostop 28.10.2013)
41. Elektronski vir:  
[http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical\\_Information/EN/Pharma\\_Solutions/03\\_030713e\\_Cremophor\\_RH\\_40.pdf](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical_Information/EN/Pharma_Solutions/03_030713e_Cremophor_RH_40.pdf)  
(dostopno: 28.10.2013)
42. Elektronski vir  
[http://www.kollidon.com/Documents/ENP/Brochure/EN/b\\_03\\_110921e\\_Solubility\\_Enhance\\_Compendium.pdf#page=90](http://www.kollidon.com/Documents/ENP/Brochure/EN/b_03_110921e_Solubility_Enhance_Compendium.pdf#page=90)  
(dostopno: 28.10.2013)
43. Rowe RC, Sheckey PJ, Quinn ME: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Chicago, 2009: 123–127, 129–133, 196–198, 404–407.
44. Elektronski vir: <http://www.indcheminternational.com/products.htm>  
(dostopno: 27.10.2013)
45. Elektronski vir:  
[http://www.abiteccorp.com/wp-content/files\\_mf/1355148844CapmulMCMC8EPTDSI6.pdf](http://www.abiteccorp.com/wp-content/files_mf/1355148844CapmulMCMC8EPTDSI6.pdf)  
(dostopno: 27.10.2013)
46. Elektronski vir: <http://www.neusilin.com/product/index.php>  
(dostopno 27.10.2013)

47. Elektronski vir:  
[http://www.neusilin.com/multicms/neusilin/pdf/news/29/2\\_neusilin\\_newsletter\\_nov07.pdf](http://www.neusilin.com/multicms/neusilin/pdf/news/29/2_neusilin_newsletter_nov07.pdf)  
(dostopno 27.10.2013)
48. Elektronski vir:  
<http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Tech-Data-Sheet-SYLYSIA-350.pdf>  
(dostopno: 28.10.2013)
49. Elektronski vir:  
[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative\\_and\\_Process/M309\\_Syloid\\_Tech\\_Note\\_USver\\_LR.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Preparative_and_Process/M309_Syloid_Tech_Note_USver_LR.pdf)  
(dostopno 28.10.2013)
50. Elektronski vir:  
[http://usuarios.advance.com.ar/43027787/Brochure\\_of\\_Superdisintegrants.pdf](http://usuarios.advance.com.ar/43027787/Brochure_of_Superdisintegrants.pdf),  
[http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/FMC\\_AcDiSol\\_brochure\\_fina12.pdf](http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/FMC_AcDiSol_brochure_fina12.pdf)  
(dostopno:28.10.2013)
51. Bizjak E: Problematika stiskanja tekočih samo(mikro)emulgirajočih sistemov v tablete. Diplomaska naloga 2013. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
52. Stipanič A: Vrednotenje samomikroemulgirajočih sistemov z metodo in vitro lipolize. Diplomaska naloga 2013. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
53. Camont L, Cottart C-H, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F, et al. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta* 2009; 634(1):121–8.
54. Nichola J. Coleman NJ, Craig Q.M. D: Modulated temperature differential scanning calorimetry : a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics* 1996; 135: 13–29.
55. Elektronski vir:  
<http://wwwswt.informatik.uni-rostock.de/englisch/projekte/Physik2000/ExperimentII/ta2web001.pdf>  
(dostopno 28.10.2013)
56. Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, van Breemen RB. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem* 2002; 50(3):431–5.
57. Li B, Wegiel LA, Taylor LS, Edgar KJ: Stability and solution concentration enhancement of resveratrol by solid dispersion in cellulose derivative matrices. 2013; 1249–60.
58. López-Nicolás JM, García-Carmona F: Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(17):7600–5.
59. Sruti J, Patra CN, Swain S, Dinda SC, Eswar M, Rao B. Cefuroxime Axetil dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous carrier. 2012;3(3):42–8.



60. Kinnari P, Mäkilä E, Heikkilä T, Salonen J, Hirvonen J, Santos H a: Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica materials as drug carriers for itraconazole. *Int J Pharm.* 2011; 414(1-2):148–56.
61. Šetina Z: In vitro vrednotenje sproščanja resvertrola iz samomikroemulgirajočih sistmov. *Diplomska naloga* 2013. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
62. Somasundaran P, Krishnakumar S: Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 1997; 123-124(96):491–513.
63. Van Speybroeck M, Williams HD, Nguyen T-H, Anby MU, Porter CJH, Augustijns P: Incomplete desorption of liquid excipients reduces the in vitro and in vivo performance of self-emulsifying drug delivery systems solidified by adsorption onto an inorganic mesoporous carrier. *Mol Pharm* 2012; 9(9):2750–60.
64. Gumaste SG, Dalrymple DM, Serajuddin ATM: Development of Solid SEDDS, V: Compaction and Drug Release Properties of Tablets Prepared by Adsorbing Lipid-Based Formulations onto Neusilin® US2. *Pharm Res.* 2013; 25:3186–99.
65. Agarwal V, Siddiqui A, Ali H, Nazzal S: Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *Int J Pharm* 2009; 366(1-2):44–52.
66. Thomas N, Holm R, Rades T, Müllertz A: Characterising lipid lipolysis and its implication in lipid-based formulation development. *AAPS J.* 2012; 14(4):860–71.
67. Di Maio S, Carrier RL: Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: in vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery. *J Control Release* 2011; 151(2):110–22.
68. Christiansen A, Backensfeld T, Weitschies W: Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes. *Eur J Pharm Sci* 2010; 41(2):376–82.
69. Ali H, Nazzal M, Zaghloul A-A a, Nazzal S: Comparison between lipolysis and compendial dissolution as alternative techniques for the in vitro characterization of alpha-tocopherol self-emulsified drug delivery systems (SEDDS). *Int J Pharm* 2008; 352(1-2):104–14.
70. Elektronski vir:  
[https://www.chromadex.com/wpresources/Upload/Article/pTeroPure\\_Resveratrol\\_Brochure.pdf](https://www.chromadex.com/wpresources/Upload/Article/pTeroPure_Resveratrol_Brochure.pdf)  
(dostopno: 15.12.2013)
71. Laitinen R, Löbmann K, Strachan CJ, Grohgan H, Rades T: Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *Int J Pharm* 2013; 453(1):65–79.
72. Guan J, Han J, Zhang D, Chu C, Liu H, Sun J, et al: Increased dissolution rate and oral bioavailability of hydrophobic drug glyburide tablets produced using supercritical CO<sub>2</sub> silica dispersion technology. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;
73. Milović M, Djuriš J, Djekić L, Vasiljević D, Ibrić S: Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int J Pharm.* 2012; 436(1-2):58–65.

74. Lou H, Liu M, Wang L, Mishra SR, Qu W, Johnson J, et al: Development of a mini-tablet of co-grinded prednisone-Neusilin complex for pediatric use. *AAPS PharmSciTech* 2013; 14(3):950–8.
75. Mehanna MM, Motawaa AM, Samaha MW: Tadalafil Inclusion in Microporous Silica as Effective Dissolution Enhancer : Optimization of Loading Procedure and Molecular State Characterization *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 100(5):1805–18.
76. Kallakunta VR, Eedara BB, Jukanti R, Ajmeera RK, Bandari S: A Gelucire 44/14 and labrasol based solid self emulsifying drug delivery system: formulation and evaluation. *J Pharm Investig.* 2013; 43(3):185–96.