

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA STANČEV

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SARA STANČEV

***IN VITRO* LIPOLIZA SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH
SISTEMOV Z IBUPROFENOM IN VALSARTANOM**

***IN VITRO* LIPOLYSIS OF SELF-MICROEMULSIFYING
DRUG DELIVERY SYSTEMS WITH IBUPROFEN AND
VALSARTAN**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in delovni mentorici Katarini Bolko Seljak, mag. farm. za strokovno vodstvo in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem strokovnima sodelavkama, Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan, za koristne nasvete pri eksperimentalnem delu v laboratoriju.

Posebna zahvala gre mojim najbližjim, družini, fantu Nejc in prijateljem, ki so me tekom študija podpirali in verjeli vame.

Izjava

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

Sara Stančev

Diplomska komisija:

Predsednik: prof. dr. Danijel Kikelj, mag.farm.

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

Član: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1. UVOD.....	1
1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI DOSTAVNI SISTEMI	1
1.1.1 Samomikroemulgirajoči sistemi (SMES).....	3
1.2 PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH DOSTAVNIH SISTEMOV	7
1.3 <i>IN VITRO</i> LIPOLIZA	9
1.3.1 pH-stat metoda.....	10
1.3.2 Pankreasna lipaza	11
1.3.3 Prebavni medij za <i>in vitro</i> lipolizo	11
1.3.4 Titracija prostih maščobnih kislin	13
1.3.5 Odvzem vzorcev in zaključek <i>in vitro</i> lipolize.....	13
1.3.6 Ustavljanje lipolize z boronskimi kislinami	14
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Zdravilni učinkovini	16
3.1.2 Sestavine za izdelavo tekočega SMES-a.....	17
3.1.3 Trdni nosilci za adsorpcijo tekočega SMES-a.....	18
3.1.4 Pomožne snovi pri tabletiranju	18
3.1.5 Drug material.....	19
3.2 NAPRAVE.....	20
3.3 METODE.....	21
3.3.1 Priprava vzorcev	21

3.3.2	<i>In vitro</i> lipoliza	23
3.3.3	Ugotavljanje koncentracije ZU v vodni fazi po <i>in vitro</i> lipolizi.....	27
3.3.4	Ustavljanje lipolize v časovnih točkah	29
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1	AKTIVNOST PANKREASNE LIPAZE	31
4.2	<i>IN VITRO</i> LIPOLIZA VZORCEV	32
4.2.1	<i>In vitro</i> lipoliza tekočega SMES-a z vgrajeno ZU	34
4.2.2	<i>In vitro</i> lipoliza samomikroemulgirajočih praškov	37
4.2.3	<i>In vitro</i> lipoliza samomikroemulgirajočih tablet	39
4.2.4	Analiza vzorcev z različno količino v tekoči SMES vgrajene ZU	40
4.2.5	<i>In vitro</i> lipoliza VAL v posameznih komponentah tekočega SMES-a	41
4.3	USTAVLJANJE LIPOLIZE V ČASOVNIH TOČKAH.....	43
4.3.1	Ugotavljanje količine BFBK za inhibicijo pankreasne lipaze.....	43
4.3.2	Lipoliza tekočega SMES-a z ZU v posameznih časovnih točkah.....	45
5.	SKLEP	48
6.	LITERATURA	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razvrstitev na lipidih osnovanih dostavnih sistemov v posamezne razrede. Povzeto po (3, 6, 8, 9).....	3
Preglednica II: Pregled glavnih prednosti in slabosti SMES. Povzeto po (11, 12).	4
Preglednica III: Pregled glavnih značilnosti ibuprofena. Povzeto po (20).....	16
Preglednica IV: Kemijske značilnosti valsartana. Povzeto po (22, 23, 24).....	17
Preglednica V: Komponente tekočega SMES-a in njihova vloga (37).....	21
Preglednica VI: Receptura za izdelavo tablet (37).	22
Preglednica VII: Položaj pečatov pri stiskanju tablet z različnimi nosilci ter povprečna sila stiskanja tablet.....	22
Preglednica VIII: Nastavitve za izvedbo pH-stat metode za ugotavljanje aktivnosti pankreasne lipaze – a in analizo vzorcev-b (37).....	23
Preglednica IX: Topnost IBU in VAL v posameznih komponentah SMES-a. Povzeto po (42, 45, 46, 47, 48).	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Postopek izdelave in nastanka mikroemulzije. Prirejeno po (12).	6
Slika 2: Shematski prikaz prebave na lipidih osnovanega dostavnega sistema. Prirejeno po (1).	9
Slika 3: Aparatura za izvedbo <i>in vitro</i> lipolize. Prirejeno po (16).	10
Slika 4: Prikaz ločitve vzorca po reakciji lipolize na različne faze s centrifugiranjem. Prirejeno po (13, 15).	14
Slika 5: Shematski prikaz inhibicije lipaze z boronsko kislino. Prirejeno po (18).	14
Slika 6: Tabletirka, ki smo jo uporabljali za izdelavo samomikroemulgirajočih tablet.	22
Slika 7: Umeritvena premica za ibuprofen (38).	27
Slika 8: Umeritvena premica za valsartan (39).	28
Slika 9: HPLC naprava, ki smo jo uporabljali za ugotavljanje koncentracij ZU.	29
Slika 10: Prikaz porabe titranta v odvisnosti od časa pri ugotavljanju aktivnosti pankreasne lipaze. Pri izračunu povprečnega volumna NaOH smo upoštevali časovni interval od 70. do 300. s (prikazano z rdečo barvo).	31
Slika 11: Prikaz poteka <i>in vitro</i> lipolize naključnih vzorcev tekočega SMES-a, praška in tablete z IBU.	32
Slika 12: Primerjava poteka <i>in vitro</i> lipolize naključnih vzorcev tekočega SMES-a, praška in tablete z VAL.	32
Slika 13: Prikaz spreminjanja pH vrednosti reakcijske zmesi v odvisnosti od časa med lipolizo.	33
Slika 14: Grafični prikaz deležev sproščenih ZU iz tekočega SMES-a po <i>in vitro</i> lipolizi.	35
Slika 15: Prikaz deležev sproščenih ZU po lipolizi praškov za tri različne nosilce.	37
Slika 16: Deleži ZU, ki so se pri lipolizi tablet, izdelanih s tremi različnimi nosilci, sprostili v vodno fazo.	39
Slika 17: Prikaz odstotkov sproščenih ZU pri lipolizi tekočega SMES-a glede na vgraditev različnih mas ZU.	41
Slika 18: Prikaz poteka <i>in vitro</i> lipolize posameznih komponent tekočega SMES-a z vgrajenim VAL.	42
Slika 19: Deleži sproščenega VAL pri vgradnji le-tega v posamezne komponente tekočega SMES-a.	43

Slika 20: Primerjava vpliva različnih količin BFBK na delovanje lipaze.	44
Slika 21: Deleži sproščene IBU in VAL po lipolizi tekočega SMES-a brez in z dodatkom BFBK.	44
Slika 22: Grafični prikaz deležev sproščene IBU v posameznih časovnih točkah med lipolizo tekočega SMES-a.	46
Slika 23: Prikaz deležev VAL v vodni fazi v posameznih časovnih točkah med lipolizo.	47

POVZETEK

Uspešna izdelava peroralnih farmacevtskih oblik je v veliki meri odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti posamezne zdravilne učinkovine, kar v zadnjem času zaradi naraščajočega števila novo odkritih slabo vodotopnih učinkovin predstavlja vse večji izziv za farmacevtsko industrijo. Eden izmed možnih tehnoloških pristopov za izboljšanje topnosti in posledično absorpcije ter biološke uporabnosti takšnih učinkovin je vgrajevanje le-teh v na lipidih osnovane dostavne sisteme, na primer samomikroemulgirajoče sisteme. Ti sistemi, ki so zmes lipidov, emulgatorjev, hidrofilnih sopolimerov in koemulgatorjev ter slabo topne zdravilne učinkovine, ob redčenju z vodnim medijem in sočasnem rahlem mešanju spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi.

V magistrski nalogi smo z metodo *in vitro* lipolize, in sicer s pH-stat metodo, poskušali ovrednotiti tekoče in trdne samomikroemulgirajoče sisteme, v katere smo posamično vgrajevali dve slabo vodotopni zdravilni učinkovini, ibuprofen in valsartan. Tekoči dostavni sistem smo pripravili iz oljnih komponent, Capmula[®] MCM in ricinusovega olja, ter emulgatorjev, Cremophorja[®] EL in Cremophorja[®] RH40. Za tvorbo trdnih formulacij smo uporabili tri različne trdne porozne nosilce, in sicer Neusilin[®] US2 (magnezijev aluminometasilikat), Sylysia[®] 350 (silicijev dioksid) in Syloid[®] 244FP (silicijev dioksid). Z adsorpcijo tekočega samomikroemulgirajočega sistema na trdne nosilce smo izdelali samomikroemulgirajoče praške, ki smo jim v nadaljevanju dodali ustrezne pomožne snovi za tabletiranje in jih ročno stisnili v samomikroemulgirajoče tablete. V primeru tekočih formulacij smo z vgrajevanjem različne količine posamezne učinkovine vrednotili še morebiten vpliv slednjega na potek lipolize. V drugem delu magistrske naloge smo z uporabo inhibitorja encima lipaze, 4-bromofenil-boronske kisline, ustavljali lipolizo v izbranih časovnih točkah, s čimer smo proučevali porazdeljevanje vgrajenih učinkovin v posamezne faze reakcijske zmesi.

Pri analizi vseh vzorcev smo opazili ponavljajoči se trend, in sicer je bil delež pri lipolizi sproščenega ibuprofena precej večji v primerjavi z valsartanom. Sklepamo, da so razpadni produkti lipidne formulacije, ki so nastali med lipolizo, v primeru valsartana izkazovali manjšo solubilizacijsko kapaciteto, kar je povzročilo njegovo obarjanje. Pri proučevanju trdnih sistemov smo ugotovili, da je med uporabljenimi trdnimi nosilci in emulgatorji prišlo do ireverzibilne adsorpcije slednjih, kar se je odražalo z nižjo izmerjeno vrednostjo

ibuprofena, ki je zaradi boljše topnosti v emulgatorskih komponentah sistema deloma ostal vezan na nosilcih. Ker je kemijska sestava nosilca Neusilina® US2 drugačna od drugih dveh uporabljenih nosilcev, ki se sicer med seboj razlikujeta le po velikosti delcev, smo pričakovali, da bomo med vzorci opazili odstopanje. Analiza vzorcev je pokazala, da je bil Neusilin® US2 v primeru valsartana najboljša izbira, saj se je sprostil celo več učinkovine kot pri lipolizi tekoče formulacije, medtem ko smo pri vzorcih z ibuprofenom in omenjenim nosilcem izmerili najnižje deleže učinkovine. Ugotovili smo še, da delež učinkovine, ki se je po lipolizi sprostil v vodno fazo, ni bil odvisen od nasičenosti formulacije z le-to. Raziskovalno delo smo zaključili z zaustavljanjem lipolize v posameznih časovnih točkah. Pri tem smo opazili, da se je tako pri ibuprofenu kot valsartanu vsebnost učinkovine v vodni fazi med reakcijo zmanjševala. Menimo, da je bilo to posledica samega vzorčenja, saj smo z vsakokratnim odvzemom medija zmanjšali volumen reakcijske zmesi, kar je vodilo do manjše solubilizacijske kapacitete medija.

Čeprav obe uporabljeni zdravilni učinkovini po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo v razred II (slabo vodotopne in dobro permeabilne učinkovine), dobljeni rezultati potrjujejo, da preučevani na lipidih osnovan dostavni sistem ni bil enako učinkovit za posamezno učinkovino. S skrbnim izborom pomožnih snovi in razvojem specifične formulacije za določeno zdravilno učinkovino lahko tako z uporabo omenjenih dostavnih sistemov izboljšamo njene biofarmaceutske lastnosti.

KLJUČNE BESEDE: ibuprofen, valsartan, samomikroemulgirajoči sistem, *in vitro* lipoliza, pH-stat metoda.

ABSTRACT

Successful production of oral pharmaceutical dosage forms largely depends on the physico-chemical properties of a particular active substance. This represents a growing challenge for the pharmaceutical industry due to recently increasing number of newly discovered poorly water-soluble substances. One of the possible technological approaches for improving the solubility and, consequently, the absorption and bioavailability of such drugs is their incorporation in the lipid-based drug delivery systems, for example, self-microemulsifying systems. These systems, which are a mixture of lipids, surfactants, hydrophilic cosolvents, cosurfactants and poorly soluble active substance, spontaneously form a microemulsion type oil in water after dilution with an aqueous medium and under gentle simultaneous mixing.

In this master thesis, *in vitro* lipolysis, more specifically a pH-stat method, was used to evaluate liquid and solid self-microemulsifying systems, within which two poorly water-soluble active substances, ibuprofen and valsartan were individually incorporated. The liquid delivery system was prepared from the oil components, Capmul[®] MCM and castor oil, and emulsifiers, Cremophor[®] EL and Cremophor[®] RH40. For the formation of solid formulations three different solid porous carriers, Neusilin[®] US2 (magnesium aluminometasilicate), Sylsilia[®] 350 (silicon dioxide) and Syloid[®] 244FP (silicon dioxide) were used. Through adsorption of the liquid self-microemulsifying system onto these carriers self-microemulsifying powders were produced. Later, appropriate tableting excipients were added and powder mixtures were manually pressed to prepare self-microemulsifying tablets. In the case of liquid formulations, potential impact of the amount of each drug on the course of lipolysis was also evaluated. In the second part of this thesis, an inhibitor of the enzyme lipase, 4-bromophenyl-boronic acid, was used to stop lipolysis in the selected time points in order to examine the distribution of embedded active substances in each layer of the reaction mixture.

During the analysis of all samples a recurrent trend was observed, namely, the proportion of the released ibuprofen after lipolysis was significantly greater compared to valsartan. It was concluded that the decomposition products of the lipid formulations, which were formed during the course of lipolysis, exhibited less solubilizing capacity in the case of valsartan. Lower solubilizing capacity then resulted in precipitation of valsartan. During

the research of solid systems we found out that the applied emulsifiers were irreversibly adsorbed on the surface of solid carriers, which was reflected by the lower measured value of ibuprofen. Therefore it partly remained on carriers due to its better solubility in the emulsifier component of our system. Due to the difference in chemical composition of the carrier Neusilin[®] US2 and the other two carriers, which differ only by particle size, deviation between samples was expected. Analysis of the samples showed that the Neusilin[®] US2 was in the case of valsartan the best choice as it released even more drug compared to lipolysis of liquid formulation. Meanwhile, solid self-microemulsifying systems with ibuprofen released the lowest amount of drug from mentioned carrier. We also found out that the proportion of active substance that was released in the aqueous phase after lipolysis did not depend on the saturation of the formulation with drug. The research work was completed by terminating lipolysis in the individual time points where we observed that the content of both active substances in the aqueous phase was decreasing during the reaction. We believe this was an outcome of the sampling as the volume of the reaction mixture was reduced with every sample taken, which possibly resulted in lower solubilizing capacity of the medium.

Although both of the drugs studied are classified as class II (poorly water-soluble and well-permeable substances) by the biopharmaceutical classification system, the results confirmed that selected lipid-based drug delivery system was not equally effective for both individual substances. By careful selection of excipients and the development of specific formulations we can improve biopharmaceutical properties of the individual active substances with the use of such delivery systems.

KEY WORDS: ibuprofen, valsartan, self-microemulsifying system, *in vitro* lipolysis, pH-stat method.

SEZNAM OKRAJŠAV

BFBK – 4-bromofenil-boronska kislina

DG – diglicerid

GIT – gastrointestinalni trakt

HLB – hidrofilno-lipofilno ravnotežje

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

IBU - ibuprofen

IBU-SMES – ibuprofen vgrajen v tekoči samomikroemulgirajoči sistem

MG – monoglicerid

MK – maščobna kislina

o/v – olje v vodi

PAS – površinsko aktivna snov

SES – samoemulgirajoči sistem

SMES – samomikroemulgirajoči sistem

TBU – tributirinska enota

TG – triglicerid

VAL - valsartan

VAL-SMES – valsartan vgrajen v tekoči samomikroemulgirajoči sistem

ZU – zdravilna učinkovina

1. UVOD

Peroralna uporaba zdravil je najbolj razširjen in bolniku najbolj prijazen način vnosa zdravil v organizem. Zaradi želje po doseganju čim boljše vodljivosti bolnikov farmacevtska industrija stremi k razvoju peroralnih farmacevtskih oblik (1, 2). Pri razvoju in izdelavi slednjih je ustrezna vgradnja posamezne zdravilne učinkovine (ZU) pogojena z njenimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot so primerna topnost, permeabilnost in stabilnost ter način metabolizma (2, 3).

Farmacevtska industrija se v zadnjih letih srečuje s problematiko nezadostne vodotopnosti in posledično majhne absorpcije ter variabilne biološke uporabnosti pri kar 40-70 % na novo razvitih potencialnih ZU (4). Brez ustrezne modifikacije lastnosti so te ZU izključene iz nadaljnjega razvoja (5).

Pristopi za izboljšanje topnosti ZU v prebavnem mediju obsegajo spreminjanje njenih kemijskih in/ali fizikalnih lastnosti ter načrtovanje primerne farmacevtske oblike. Pretvorba ZU v sol, amorfno obliko, zmanjšanje velikosti delcev, priprava trdnih disperzij, vgrajevanje ZU v ciklodekstrine in oblikovanje na lipidih osnovanih dostavnih sistemov so tako le nekateri izmed možnih načinov povečevanja vodotopnosti (5, 6).

1.1 NA LIPIDIH OSNOVANI DOSTAVNI SISTEMI

Spoznanje, da lahko obrok, bogat z maščobami, pripomore k izboljšanju biološke uporabnosti sočasno zaužite slabo vodotopne ZU, je vodilo do razvoja na lipidih osnovanih dostavnih sistemov (3). Mednje uvrščamo vse od preprostih oljnih raztopin do bolj kompleksnih zmesi olj, emulgatorjev, koemulgatorjev in sotopil. Glede na njihovo sestavo in lastnosti je Pouton oblikoval klasifikacijski sistem, znotraj katerega je na lipidih osnovane dostavne sisteme razvrstil v štiri razrede (preglednica I). Klasifikacijski sistem na podlagi fizikalno-kemijskih značilnosti ZU omogoča izbor ustrezne formulacije ter napoveduje njeno *in vivo* obnašanje (2, 7).

Razred I vključuje formulacije, v katerih je ZU raztopljen v trigliceridih (TG) in/ali mešanih gliceridih ali vgrajena v emulzije tipa olje v vodi (o/v), ki so stabilizirane z nizkimi koncentracijami emulgatorjev. V vodnem mediju se dispergirajo šele po lipolizi lipidnih komponent, katere rezultat so amfifilni produkti, ki tvorijo koloidne strukture. Ti

sistemi so primerni za zelo lipofilne ZU, ki so v izbranih lipidih dovolj topne, da omogočajo vgraditev odmerka, ki je potreben za terapevtski učinek (6). Sistemi razreda II vsebujejo gliceride in v vodi netopne emulgatorje (hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB) <12). Vsebnost slednjih mora biti več kot 25 %, da pridejo ob stiku z vodno fazo do izraza samoemulgirajoče sposobnosti sistema in se tvori emulzija tipa o/v (3). V razred III uvrščamo formulacije, ki poleg lipidnih komponent vsebujejo še hidrofilne emulgatorje (HLB >12) in sotpila, na primer etanol, propilen-glikol ali polietilen-glikol. Glede na sestavo lahko te sisteme razvrstimo v dva podrazreda, in sicer IIIA in IIIB, pri čemer velja zadnji za bolj hidrofilnega, saj vsebuje večji delež vodotopnih emulgatorjev in sotpil na račun zmanjšanja vsebnosti lipidov. Za podrazred IIIA so značilni sistemi, ki izkazujejo samoemulgirajoče lastnosti in ob stiku z vodnim medijem tvorijo opalescentne emulzije, medtem ko v podrazred IIIB vključujemo sisteme z mikroemulgirajočimi lastnostmi, kar v vodnem okolju vodi do nastanka bistrih ali le rahlo opalescentnih mikroemulzij. Formulacije podrazreda IIIB se ob stiku z vodnim medijem praviloma hitreje dispergirajo, vendar po drugi strani predstavljajo večje tveganje za obarjanje ZU v primerjavi s sistemi podrazreda IIIA (3,8). Razred IV obsega najbolj hidrofilne sisteme, ki so sestavljeni le iz vodotopnih emulgatorjev in sotpil. Prednost kombiniranja sotpil in emulgatorjev je v tem, da se zmanjša verjetnost obarjanja vgrajene ZU, kar je pogost pojav, kadar jo vgrajujemo zgolj v sotpila. Poleg tega dodatek sotpil k emulgatorjem pospeši njihovo raztapljanje in zmanjša škodljivo draženje gastrointestinalnega trakta (GIT). Prednost teh sistemov je, da je večina ZU v njih dobro topna, kar omogoča vgrajevanje večjih količin le-teh ter da ob stiku z vodnim medijem tvorijo koloidno raztopino micelov, kar ob uspešno preprečenem obarjanju vgrajene ZU vodi do njenega hitrega sproščanja in absorpcije (3, 8).

Z uporabo na lipidih osnovanih dostavnih sistemov lahko povečamo biološko uporabnost slabo vodotopnih učinkovin preko različnih mehanizmov. Njihova glavna prednost je v tem, da je vgrajena ZU prisotna že v raztopljeni obliki, s čimer se izognemo fazi raztapljanja le-te v GIT, ki je pogosto omejujoč dejavnik pri zagotavljanju ustrezne absorpcije. Lipidne komponente dostavnih sistemov lahko spremenijo biofarmaceutske lastnosti ZU (topnost in hitrost raztapljanja v prebavnem mediju), lahko povečajo stabilnost ZU, saj jo ščitijo pred kemijsko in encimsko razgradnjo ter z upočasnjevanjem prehoda formulacije skozi GIT podaljšajo čas, ko se le-ta zadržuje na mestu absorpcije.

Poleg tega lahko stimulirajo njeno vključevanje v lipoproteine, ki se absorbirajo v limfni obtok in s tem zmanjšujejo obseg metabolizma prvega prehoda v jetrih. Z izborom ustreznih emulgatorjev vplivamo na biološko uporabnost vgrajene ZU poleg izboljšanja topnosti tudi preko povečevanja permeabilnosti skozi epitelij GIT, odpiranja tesnih stikov, inhibicije s P-glikoproteini posredovanim efluksom učinkovin in zmanjševanjem metabolizma v enterocitih (2, 5, 6, 10).

Preglednica I: Razvrstitev na lipidih osnovanih dostavnih sistemov v posamezne razrede. Povzeto po (3, 6, 8, 9).

	Razred I	Razred II	Razred IIIA	Razred IIIB	Razred IV
Sestava	TG ali mešani monogliceridi (MG) in digliceridi (DG) (100 %);	TG ali mešani MG in DG (40-80 %); površinsko aktivne snovi (PAS) s HLB<12 (20-60 %);	TG ali mešani MG in DG (40-80 %); PAS s HLB>12 (20-40 %); hidrofilna sotopila (0-40 %);	TG ali mešani MG in DG (<20 %); PAS s HLB>12 (20-50 %); hidrofilna sotopila (20-50 %);	PAS s HLB<12 (0-20 %); PAS s HLB>12 (30-80 %); hidrofilna sotopila (0-50 %);
Lastnosti	Dispergiranje sistema po prebavi.	Nastanek SES brez hidrofilnih PAS.	Nastanek SES s hidrofilnimi PAS.	Nastanek SMES s hidrofilnimi PAS.	Nastanek koloidne raztopine micelov.
Velikost kapljic	Groba disperzija.	100-250 nm	100-250 nm	50-100 nm	<50 nm
Prednosti	<ul style="list-style-type: none"> •preprosta izdelava; •varne pomožne snovi; •kompatibilno s kapsulami; 	<ul style="list-style-type: none"> •zmanjšanje sposobnosti raztapljanja topila po dispergiranju je malo verjetna; 	<ul style="list-style-type: none"> •nastanek bistre ali rahlo opalescentne emulzije; •možna absorpcija ZU brez predhodne prebave komponent; 	<ul style="list-style-type: none"> •nastanek bistre emulzije; •možna absorpcija ZU brez predhodne prebave komponent; 	<ul style="list-style-type: none"> •dobra sposobnost raztapljanja topila za večino ZU;
Slabosti	<ul style="list-style-type: none"> •majhna sposobnost raztapljanja topila, razen za visoko lipofilne ZU; 	<ul style="list-style-type: none"> •nastanek opalescentne emulzije; 	<ul style="list-style-type: none"> •možna izguba sposobnosti raztapljanja topila po dispergiranju; 	<ul style="list-style-type: none"> •verjetna izguba sposobnosti raztapljanja topila po dispergiranju; 	<ul style="list-style-type: none"> •izguba sposobnosti raztapljanja topila po dispergiranju;

1.1.1 Samomikroemulgirajoči sistemi (SMES)

SMES so fizikalno stabilne, izotropne zmesi olj, emulgatorjev, hidrofilnih sotopil in koemulgatorjev ter solubilizirane ZU. Ob redčenju z vodnim medijem (na primer prebavni

medij) in rahlem mešanju (na primer peristaltika GIT) spontano tvorijo mikroemulzije tipa o/v z velikostjo kapljic pod 100 oziroma 50 nm (slika 1) (4, 5, 6). Prednost drobnih kapljic mikroemulzij je v tem, da predstavljajo veliko specifično površino za porazdeljevanje vgrajene ZU med oljno in vodno fazo ter da se zaradi svoje majhnosti lahko v GIT absorbirajo tudi brez predhodne lipolize komponent, kar eno z drugim omogoča hitrejšo in boljšo absorpcijo ter večjo biološko uporabnost lipofilne ZU (11, 12). Druge prednosti in slabosti SMES so predstavljene v preglednici II.

Preglednica II: Pregled glavnih prednosti in slabosti SMES. Povzeto po (11, 12).

Prednosti SMES	Slabosti SMES
<ul style="list-style-type: none"> • povečana topnost in posledično boljša biološka uporabnost lipofilne ZU; • zmanjšanje interindividualnih in intraindividualnih razlik ter učinka hrane na vgrajeno ZU; • preprosti proizvodni postopki za njihovo izdelavo; • omogočajo vgrajevanje večjih količin ZU; • možnost vgradnje peptidov, ki so sicer podvrženi encimski razgradnji v GIT; • za absorpcijo ZU ni nujna lipoliza komponent SMES; • zaščita GIT pred morebitnimi neželenimi učinki ZU; • možnost razvoja tekočih ali trdnih farmacevtskih oblik ter formulacij s podaljšanim sproščanjem; • omogočajo absorpcijo ZU v specifičnem absorpcijskem oknu v GIT; • izboljšana stabilnost ZU; 	<ul style="list-style-type: none"> • pomanjkanje ustreznih <i>in vitro</i> metod za vrednotenje formulacij; • preprosti testi sproščanja niso dovolj natančni za napovedovanje <i>in vivo</i> obnašanja teh sistemov, ker ne zajemajo encimske razgradnje komponent; • višje koncentracije PAS dražijo GIT; • problem kemične nestabilnosti ZU; • formulacije z več komponentami je težko validirati; • z večanjem deleža hidrofilnih komponent se poveča verjetnost obarjanja vgrajene ZU ob razredčevanju z vodnim medijem; • hlapna sotpila lahko preidejo v ovojnico trdih ali mehkih želatinskih kapsul ter tako povzročijo obarjanje lipofilne ZU; • tekoči SMES-i so problematični s stališča visokih proizvodnih stroškov in nestabilnosti;

Za spontan nastanek mikroemulzije mora biti prosta energija negativna oziroma le rahlo pozitivna, do česar pride, kadar je entropijska sprememba zaradi dispergiranja večja od energije, ki je nujna za povečanje medfazne površine ob tvorjenju drobnih kapljic emulzije. Na začetku se med oljno in vodno fazo oblikuje medfaza, skozi katero nato prehajajo molekule vode. Sprva jih emulgatorji v oljni fazi vgradijo v micelle, kasneje, ko je dosežena maksimalna solubilizacijska kapaciteta, pa se na medfazi oblikujejo tekoči

kristali. Slednji omogočajo nadaljnje prehajanje molekul vode, kar ob sočasnemu blagem mešanju vodi do kolapsa medfazne površine in nastanka oljnih kapljic, obdanih s plastjo tekočih kristalov. Predvidevajo, da je plast tekočih kristalov, ki oblivajo kapljice, ključna za dobro fizikalno stabilnost mikroemulzij (5).

Pri načrtovanju SMES se moramo zavedati, da je njegov nastanek mogoč le ob uporabi specifičnih kombinacij pomožnih snovi. S skrbno izbiro slednjih stremimo k doseganju maksimalne kapacitete vgrajene ZU, k nastanku čim manjših kapljic mikroemulzije v čim krajšem času, k zmanjšanju vpliva pH vodnega medija na velikost kapljic in k zaščiti ZU pred razgradnjo v fizioloških razmerah (6). Zadosten samomikroemulgirajoči učinek je odvisen od narave in razmerja lipidov in emulgatorjev, od koncentracije emulgatorjev ter temperature, pri kateri se spontano tvori mikroemulzija (4, 6). Ugotavljanje optimalnega razmerja komponent SMES poteka z načrtovanjem (pseudo)trikomponentnega diagrama, ki prikazuje območja, v katerih spontano nastane mikroemulzija (4, 5, 12).

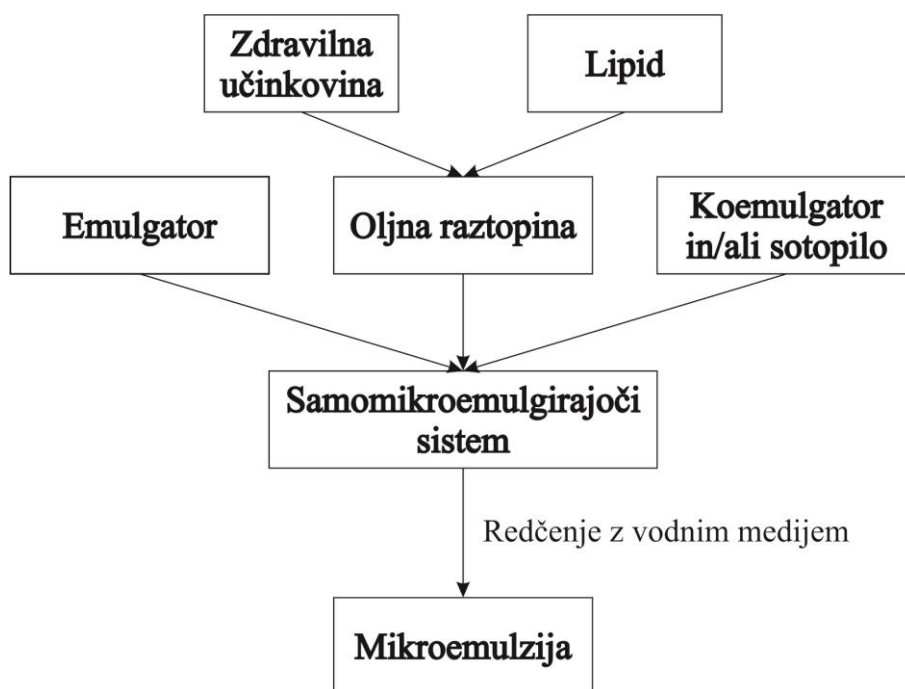
Glavna sestavina SMES so lipidne komponente, in sicer različno nasičeni srednjeveržni ali dolgoveržni TG iz rastlinskih olj kot tudi polysintezni mešani gliceridi, pridobljeni z delno hidrolizo rastlinskih olj. Prednost prvih je v tem, da so z vidika varnosti neproblematični, vendar jih zaradi slabše sposobnosti raztapljanja večjih količin ZU pogosto zamenjujemo s polysintezniimi lipidi. Slednji poleg boljšega raztapljanja lipofilnih ZU izkazujejo tudi boljše emulgatorske lastnosti in so manj podvrženi oksidativnim spremembam. Uporabi nerazgradljivih lipofilnih snovi (na primer tekoči parafin) se izogibamo, saj zadržujejo ZU v formulaciji in s tem preprečijo njeno absorpcijo (2, 3, 12).

Druga komponenta SMES so emulgatorji, amfifilne molekule, ki lahko solubilizirajo večje količine lipofilnih ZU. Njihovi glavni nalogi sta ustrezno znižanje medfazne napetosti in tvorba gibljivega emulgatorskega filma med oljno in vodno fazo. Pri izboru ustreznih emulgatorjev je treba nameniti pozornost njihovi morebitni toksičnosti. Naravni emulgatorji imajo sicer slabše sposobnosti samoemulgiranja, vendar so varnejši kot sintezni. Prav tako imajo zaradi varnosti neionogeni emulgatorji prednost pred ionogenimi. Za izdelavo SMES najpogosteje uporabljamo neionogene emulgatorje z velikimi HLB vrednostmi (na primer polisorbati, glikolizirani etoksilirani gliceridi), ki pospešijo nastanek mikroemulzije in omogočijo njeno dobro porazdelitev po GIT (5, 12). Zaradi neželenih učinkov, ki jih imajo lahko emulgatorji na sluznico GIT, so v zadnjem času razvili

supernasičene SMES, ki vsebujejo manjši delež le-teh, ZU pa je pred obarjanjem zavarovana z dodatkom polimera, na primer hidroksipropilmetilcelulozo (6, 7).

V SMES dodana sotpila izboljšajo raztapljanje lipofilne ZU in hidrofilnih emulgatorjev v lipidnih komponentah. V te namene se najpogosteje uporabljamo etanol, polietilen-glikol, propilen-glikol ali glicerol. Za doseganje učinka je treba dodati relativno visoke količine omenjenih sotopil, kar lahko vpliva na neželeno obarjanje ZU, saj se ob redčenju sistema z vodnim medijem solubilizacijska kapaciteta sotopil hipno zmanjša (7). Dodatno slabost predstavlja njihovo morebitno izhlapevanje v ovojnico želatinskih kapsul, kar ob sočasnem obarjanju ZU lahko vpliva še na porušenje celovitosti ovojnine (4, 5, 7).

Potencialne oksidativne spremembe nenasičenih trigliceridov ali ZU lahko preprečimo z vgrajevanjem lipofilnih antioksidantov (na primer α -tokoferol, β -karoten, butilhidroksitoluen) v SMES (7).



Slika 1: Postopek izdelave in nastanka mikroemulzije. Prirejeno po (12).

Kako uspešna bo vgradnja lipofilne ZU v SMES, je v veliki meri odvisno od njene topnosti v posameznih komponentah formulacije. Zavedati se moramo, da ima lahko tudi vgrajena ZU vpliv na samomikroemulgirajoče sposobnosti sistema, saj se lahko le-te zaradi njenega vrivanja v sloj emulgatorjev na medfazi ali tvorjenja kompleksov s komponentami sistema spremenijo (5).

Zaradi slabe fizikalne in kemične stabilnosti tekočin je velik poudarek na pretvorbi tekočih SMES v trdne. Ena izmed možnosti je, da tekoče SMES polnimo v želatinske kapsule, vendar zaradi visokih proizvodnih stroškov iščejo nove tehnološke pristope. Nekateri izmed njih so na primer adsorpcija SMES na trdne nosilce, sušenje z razprševanjem, granuliranje talin in iztiskanje talin. Tako izdelane trdne delce (na primer prašek, granulat) lahko potem polnimo v kapsule ali skupaj z ustreznimi pomožnimi snovmi stisnemo v tablete (2, 5).

1.2 PREBAVA NA LIPIDIH OSNOVANIH DOSTAVNIH SISTEMOV

Po peroralni aplikaciji se na lipidih osnovani dostavni sistemi vključujejo v niz kompleksnih fizioloških procesov v GIT, ki trenutno še niso popolnoma razjasnjeni. Podvrženi so procesom prebave lipidov, kar vodi do nastanka različnih koloidnih struktur, v katere se lahko porazdeljuje v dostavni sistem vgrajena slabo vodotopna ZU, kar olajša oziroma izboljša njeno absorpcijo (slika 2) (1, 13).

Encimska razgradnja lipidov ali lipoliza se začne v želodcu, kjer se pod vplivom lingvalne in želodčne lipaze TG hidrolizirajo do DG in proste maščobne kisline (MK). Želodčna lipaza izkazuje optimalno aktivnost pri pH vrednosti med 3 in 6 ter hidrolizira estrsko vez TG na mestu 1 ali 3. Lingvalna lipaza, ki je pri človeku manj pomembna kot želodčna, je sicer najbolj aktivna pri pH vrednosti 4, vendar izkazuje zadostno aktivnost za hidrolizo TG na mestu 3 tudi pri višjih vrednostih pH. Skupne lastnosti obeh lipaz so, da imata višjo afiniteto do srednjeveržnih TG v primerjavi z dolgoveržnimi, da ne hidrolizirata fosfolipidov in holesterolnih estrov ter da je njuna aktivnost odvisna od sposobnosti adsorpcije na površino oljnih kapljic. Lipoliza se v želodcu zaključi, ko se hidrolizira 10-30 % zaužitih lipidov, kar je verjetno posledica tega, da se nastali produkti lipolize, ki so bolj polarni od TG, akumulirajo na površino oljnih kapljic in s tem lipazi onemogočijo dostop (3, 14).

Z vstopom kisle želodčne vsebine v dvanajstnik se prične druga, glavna stopnja lipolize. Prisotni lipidi stimulirajo izločanje žolčnih soli, fosfolipidov in holesterola iz žolčnika ter prebavnega soka iz trebušne slinavke, ki vsebuje encime, med katerimi sta za lipolizo najpomembnejša pankreasna lipaza in njen kofaktor kolipaza ter hidrogenkarbonatne ione, ki dvignejo pH vsebine na 6 do 8, kar predstavlja optimalno območje za delovanje lipaze. Pankreasna lipaza katalizira hidrolizo TG na mestu 1 in 3, kar vodi do nastanka 2-MG in

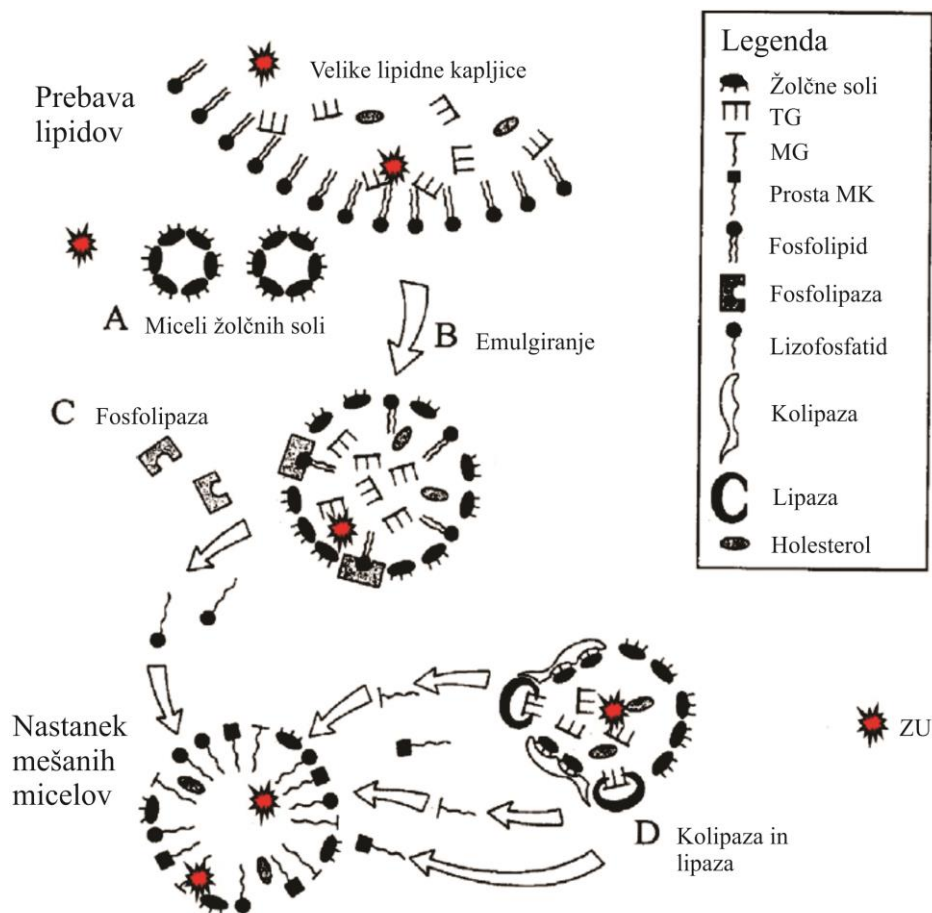
dveh prostih MK. Nastali 2-MG lahko spontano izomerizira v 1-MG, ki ga lipaza hidrolizira do glicerola in še tretje MK. Za delovanje se mora encim vezati na medfazo olje/voda, kar je med lipolizo vedno težje, saj se na površino oljnih kapljic adsorbirajo amfifilni produkti razgradnje. Ključno vlogo pri odstranjevanju in solubilizaciji slednjih imajo žolčne kisline oziroma njihove soli, vendar po drugi strani tudi te tekmujejo z lipazo za vezavna mesta na medfazi in ji na ta način onemogočajo dostop do substrata. Da je lipaza kljub temu aktivna, poskrbi kolipaza, ki se preko elektrostatskih vezi poveže z žolčnimi solmi ter hkrati tvori kompleks z encimom, kar olajša pritrjevanje slednjega na površino lipidnih kapljic. Poleg tega je kolipaza nujna tudi za konformacijsko spremembo encima in razkritje njegovega aktivnega mesta (3, 13, 14).

Pomemben vpliv na *in vivo* lipolizo naj bi imeli tudi kalcijevi ioni. Predvidevajo, da zmanjšujejo negativni naboj na površini oljnih kapljic, s čimer zmanjšujejo elektrostatski odboj pankreasne lipaze ter ji na ta način olajšajo vezavo na medfazo. Poleg tega naj bi sodelovali pri pretvorbi encima v aktivno obliko ter tvorili tekoče kristale z žolčnimi solmi, na katere se lahko vežejo proste MK, ki sicer lipazi ovirajo dostop do substrata (13).

Končni produkti lipolize (MG in MK) skupaj z žolčnimi lipidi (žolčne soli, fosfolipidi in holesterol) tvorijo različne koloidne strukture (na primer mešane micele, multilamelarne in unilamelarne vezikle), v katere se porazdeljuje lipofilna ZU. Omenjene strukture predstavljajo zalogo solubilizirane ZU, ki se lahko nato absorbira (3). Po vstopu v enterocite je nadaljnja pot absorpcije lipofilnih molekul odvisna od vrste prostih MK. Medtem ko se srednjeveržne MK absorbirajo v sistemski krvni obtok preko portalne vene, vstopijo dolgoveržne MK v sistemski obtok brez predhodnega prehoda skozi jetra. Slednje se namreč v enterocitih preestrijo v TG, ki se vgradijo v lipoproteine in sprostijo v limfni obtok (13).

Zavedati se moramo, da v določenih primerih med procesom *in vivo* lipolize lahko pride do obarjanja vgrajene ZU. Eden izmed možnih vzrokov za obarjanje ZU je ta, da imajo koloidne strukture, ki nastanejo po koncu lipolize, manjšo solubilizacijsko kapaciteto, kot jo je imela prvotna emulzija. Upad solubilizacijske kapacitete je lahko tudi posledica hidrolize nekaterih emulgatorjev, ki so del dostavnega sistema. Znano je namreč, da so komponente, ki vsebujejo v svojih strukturah esterske vezi podvržene razgradnji pod vplivom lipaz ali esteraz, ki so prisotne v GIT. Naslednji možni vzrok za pojav oborine ZU

je, da pri razredčevanju formulacije v GIT hidrofilne komponente sistema, najpogosteje sotopila, migrirajo v vodni prebavni medij, s čimer se zmanjša zmogljivost formulacije za raztapljanje ZU. Poleg naštetega pa na obarjanje vpliva tudi količina vgrajene ZU, saj pri višjih koncentracijah le-te že minimalen padec solubilizacijske kapacitete sistema vodi v nastanek oborine. Iz GIT se lahko absorbira le ZU, ki je v raztopljenem stanju, zaradi tega je proces obarjanja ZU nezaželen, razen v primeru, ko se ta obori v amorfni obliki, ki je bolj topna od kristalne (1, 7, 10).



Slika 2: Shematski prikaz prebave na lipidih osnovanega dostavnega sistema. Prirejeno po (1).

1.3 IN VITRO LIPOLIZA

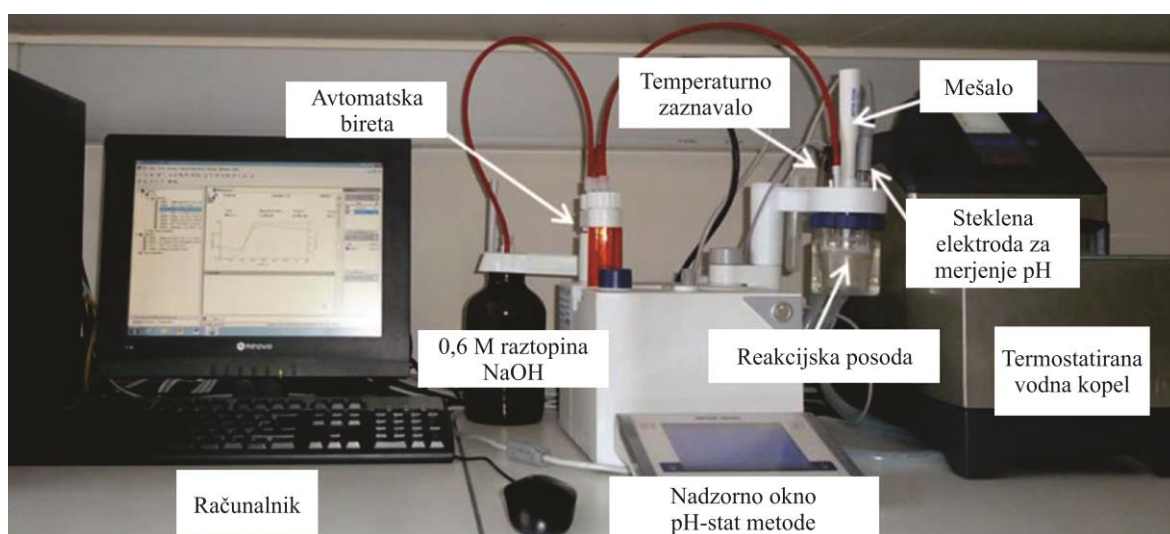
Preprosti testi *in vitro* sproščanja v primeru na lipidih osnovanih dostavnih sistemov predstavljajo pomanjkljivo orodje za njihovo vrednotenje, saj ne upoštevajo hidrolize komponent sistema pod vplivom lipaze pri prehodu skozi GIT, kar je bil vzrok za razvoj metod *in vitro* lipolize, s katerimi lahko bolje ocenimo sproščanje ZU iz omenjenih dostavnih sistemov (10).

Za doseganje čim boljše napovedne moči naj bi model *in vitro* lipolize posnemal strukturo in lastnosti posameznih delov GIT oziroma prebavnega medija. To je v praksi pogosto nemogoče, saj je takšen model preveč zapleten, njegovo načrtovanje pa je dolgotrajno in drago. Zaradi tega je smotno modele poenostaviti do te mere, da vključujejo le komponente, ki odločilno vplivajo na usodo na lipidih osnovanih sistemov v GIT.

Modeli *in vitro* lipolize so lahko enostopenjski ali večstopenjski. Medtem ko prvi posnemajo razmere le v eni izmed regij GIT (ustna votlina, želodec, ozko črevo ali široko črevo), drugi vključujejo simulacijo dveh ali več delov prebavnega trakta. Razvili so več različnih modelov, med katerimi najpogosteje uporabljamo preprosto in hitro pH-stat metodo (10, 15, 16).

1.3.1 pH-stat metoda

pH-Stat metoda je primer enostopenjskega modela *in vitro* lipolize v ozkem črevesu, ki temelji na principu, da se skozi celotni čas reakcije vzdržuje konstantna vrednost pH. V termostatirano reakcijsko posodo z mešalom in stekleno elektrodo, ki meri pH vsebine, vstavimo prebavni medij in vzorec ter z dodatkom pankreasne lipaze in kolipaze sprožimo začetek lipolize. Pri hidrolizi lipidnih komponent nastanejo proste MK, ki povzročijo padec pH v mediju. Sistem zazna spremembo ter v reakcijsko zmes doda toliko baze (NaOH), da doseže predhodno nastavljeno pH vrednost. Iz končnega volumna NaOH lahko ob poznavanju stehiometrijskega razmerja med MK in bazo (1:1) izračunamo obseg lipolize (2, 16). Aparatura za izvajanje pH-stat metode je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Aparatura za izvedbo *in vitro* lipolize. Prirejeno po (16).

1.3.2 Pankreasna lipaza

Za izvedbo *in vitro* lipolize lahko kot vir pankreasne lipaze uporabimo pankreatin, čisto obliko pankreasne lipaze ali lipazo, ki je izolirana iz drugih virov (na primer iz nekaterih gliv). Pankreatin, ki nastaja v eksokrinih celicah trebušne slinavke, je kompleksna zmes prebavnih encimov (na primer lipaza, proteaza, amilaza) in drugih bioloških sestavin. Najpogosteje uporabljamo prašičji ali goveji pankreatin. Kemijska sestava pankreatina in aktivnost encimov sta odvisni od biološkega izvora ter postopkov izolacije in čiščenja. Variiranju slednjega se lahko izognemo z uporabo čiste pankreasne lipaze, vendar je v tem primeru za učinkovito lipolizo treba dodati še kolipazo. Prednosti lipaz, pridobljenih iz drugih virov, so večja čistota, manjše razlike med serijami ter nižja cena, vendar le-te niso popolnoma enake pankreasni lipazi pri procesu prebave lipidov (15).

Katalizna aktivnost lipaze se lahko zmanjša, če je izpostavljena višjim temperaturam, kemičnim denaturantom ali med daljšim časom shranjevanja. Zaradi tega je treba pred izvedbo lipolize pankreasni lipazi ugotoviti aktivnost. Navadno aktivnost lipaze ugotovimo z merjenjem količine sproščenih MK iz znane mase lipidnega substrata (na primer tributirin ali triolein) in jo izrazimo v tributirinskih enotah (TBU). 1 TBU je ekvivalentna 1 μ mol maslene kisline, ki se sprosti iz substrata v 1 minuti na gram encima (15, 16).

1.3.3 Prebavni medij za *in vitro* lipolizo

- **Žolč**

Žolč oziroma njegove sestavine sodelujejo pri emulgiranju in prebavi lipidov, zato je pomembna komponenta prebavnega medija, če želimo posnemati fiziološke razmere. Pri *in vitro* lipolizi uporabljamo ekstrakt žolča ali posamezne žolčne kisline. Z ekstraktom se sicer bolj približamo *in vivo* razmeram kot z uporabo posameznih žolčnih kislin, vendar tvegamo neponovljive rezultate zaradi razlik med posameznimi serijami. Poleg tega lahko ekstrakt žolča vsebuje netopne komponente, ki vplivajo na analizo, zato ga je treba pred uporabo prefiltrirati. Pogosto zaradi tega uporabljamo zmes čistih žolčnih kislin (na primer holna, deoksiholna, henodeoksiholna in litoholna kislina), ki jim dodajo fosfolipide v razmerju 4:1. Fosfolipidi lahko skupaj z žolčnimi solmi vplivajo na kompleks lipaza-kolipaza in s tem zavirajo nadaljnji potek lipolize, kar lahko preprečimo z dodatkom fosfolipaze A2 (10, 15, 16).

- **Kalcij**

Z dodatkom kalcija v prebavni medij posnemamo *in vivo* razmere, kjer se razpadni produkti lipolize z absorpcijo odstranijo iz GIT. Pri *in vitro* lipolizi sproščene MK ostanejo v reakcijski zmesi in z adsorpcijo na površino lipidnih kapljic preprečijo dostop pankreasni lipazi, s čimer preprečujejo nadaljnji potek prebave. Kalcij s prostimi MK tvori slabo topna kalcijeva mila, ki se oborijo. Kalcij lahko v prebavni medij dodajamo neprekinjeno med celotno meritvijo (dinamična lipoliza) ali v enkratnem odmerku pred pričetkom analize. Prva možnost omogoča bolj nadzorovano hitrost lipolize, medtem ko pri drugi večina lipolize poteče v prvih 5-10 minutah po začetku reakcije (10).

- **Drugi minerali**

Prebavni medij v *in vivo* razmerah vsebuje še nekatere druge ione mineralov, na primer natrijeve, kalijeve, sulfatne, fosfatne in hidrogenkarbonatne, ki lahko preko elektrostatskih interakcij pomembno vplivajo na prebavo komponent sistema, saj spremenijo njihove fizikalno-kemijske lastnosti, topnost ali agregatno stanje. Za zagotavljanje ustrezne ionske moči reakcijske zmesi zato v medij navadno dodamo monovalentno sol, na primer NaCl ali KCl (15, 16).

- **pH medija**

Fiziološki pH v ozkem črevesu je med 6 in 7,5 na tešče ter med 5 in 6,6 po obroku. Izbrana pH vrednosti za *in vitro* lipolizo mora po eni strani posnemati fiziološke razmere in po drugi strani omogočiti izvedbo eksperimenta. Posnemanje fizioloških razmer je pomembno zaradi zagotavljanja optimalne aktivnosti pankreasne lipaze, ki je v območju nevtralnih pH vrednosti (6,5-8). Titracija med lipolizo sproščenih MK je možna le, če so te v ionizirani obliki. pKa vrednost dolgoverižnih MK je nad 8, vendar se ob prisotnosti žolčnih soli in kalcija zniža na 6,5 (nastanek soli med kalcijem in prostimi MK pomakne ravnotežje v smer ionizirane oblike MK). Najpogosteje tako za izvedbo *in vitro* lipolize uporabljamo medij s pH med 6,5 in 8,5. Ker ne moremo natančno vedeti, kakšen pKa imajo med meritvijo sproščene MK, je po koncu reakcije priporočljivo dvigniti pH reakcijske zmesi na približno 9, kar omogoči titracijo vseh prisotnih MK. Prebavni pufer, ki ga uporabljamo pri lipolizi, mora imeti majhno pufersko kapaciteto, da lahko sproščene MK povzročijo hiter padec pH v reakcijski posodi (10, 13, 16, 17).

1.3.4 Titracija prostih maščobnih kislin

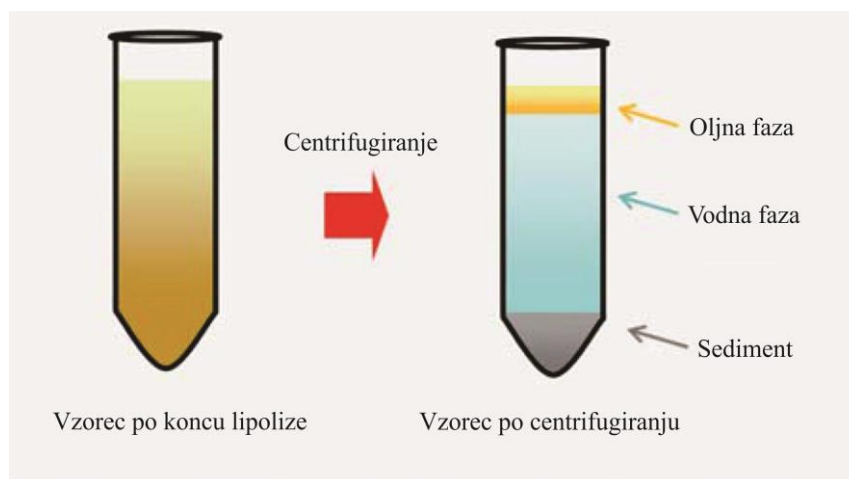
Koncentracija titranta (NaOH), s katerim nevtraliziramo med *in vitro* lipolizo sproščene MK, je pomembna, saj lahko vpliva na sam proces, kar vodi do nepravilnih zaključkov. V primeru prenizke koncentracije NaOH lahko pride do razredčevanja reakcijskega medija, kar lahko vpliva na sposobnost komponent sistema za solubilizacijo vgrajene ZU. Prav tako niso primerne previsoke koncentracije titranta, saj je v tem primeru, zaradi zelo majhnega volumna dodane baze, eksperimentalna napaka večja. Poleg tega lahko z uporabo visoko koncentriranega NaOH povzročimo pretitracijo sistema (10, 16).

Pomembno je poudariti, da je titracija prostih MK z bazo indirektna in nespecifična metoda za prikaz lipolize, saj je lahko padec vrednosti pH posledica tudi nekaterih drugih procesov, ki se odvijajo med meritvijo. Na znižanje pH lahko tako vpliva na primer v medij vnesen ogljikov dioksid ali pa se poveča količina prostih MK, in sicer ob razgradnji proteinov ali hidrolizi nečistot, ki so v ekstraktih žolča ali pankreatina, ali ob hidrolizi fosfolipidov, ki so del prebavnega medija. Omenjene dejavnike lahko ovrednotimo s slepo meritvijo, in sicer tako, da izvedemo lipolizo prebavnega medija v odsotnosti vzorca (13).

1.3.5 Odvzem vzorcev in zaključek *in vitro* lipolize

Med izvajanjem *in vitro* lipolize je treba reakcijski medij konstantno mešati, da ustrezno dispergiramo na lipidih osnovan dostavni sistem v vodni medij in preprečimo ločitev sistema v dve fazi. Hkrati nenehno mešanje omogoča odvzem homogenih vzorcev iz reakcijske zmesi v posameznih časovnih točkah med lipolizo, s katerimi lahko spremljamo in ocenjujemo potek razgradnje lipidnih komponent in sproščanje ZU iz formulacije. Odvzetim vzorcem moramo dodati inhibitor lipaze (najpogosteje dodamo 4-bromofenilboronsko kislino (BFBK) ali orlistat oz. tetrahidrolipstatin), da preprečimo nadaljnjo reakcijo. Na koncu vzorce ultracentrifugiramo, da posamezne komponente ločimo med seboj (slika 4). Navadno lahko razločimo tri faze, in sicer oljno fazo, vodno (micelarno) fazo in sediment. Pojav posamezne faze ter razmerje med njimi je odvisno od sestave na lipidih osnovanega dostavnega sistema (na primer nekatere formulacije ne tvorijo oljne faze) in časovne točke med potekom lipolize. Količina oljne faze namreč med reakcijo pada, kar je posledica razgradnje lipidnih komponent. Nasprotno velja za sediment, ki ga tvorijo kalcijeva mila z MK in morebitna oborjena ZU, saj njegova količina med lipolizo narašča. Vodno fazo oblikujejo različne koloidne strukture, ki vsebujejo solubilizirano ZU.

Ker lahko omenjene koloidne strukture prenesejo ZU iz lumna GIT skozi nemešajoči se vodni sloj do membrane enterocitov, kjer poteka absorpcija le-te, je ključno, da ovrednotimo vsebnost ZU v vodni fazi po lipolizi (na primer z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)) (13, 16).

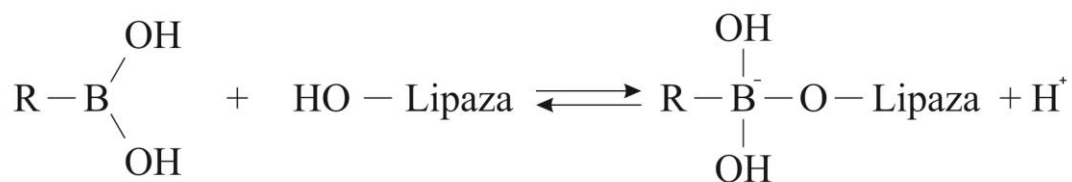


Slika 4: Prikaz ločitve vzorca po reakciji lipolize na različne faze s centrifugiranjem. Prirejeno po (13, 15).

1.3.6 Ustavljanje lipolize z boronskimi kislinami

Boronske kisline so sestavljene iz trivalentnega borovega atoma, ki eno vez tvori z alkilnim ali arilnim substituentom, drugi dve pa s hidroksilno skupino. V naravi sicer niso prisotne, vendar so zaradi dobre stabilnosti ter vsestranskosti v uporabi na različnih področjih, med drugim tudi kot encimski inhibitorji (18).

Znano je, da fenilboronske kisline (na primer BFBK) zavirajo delovanje hidrolaz, vključno z lipazami in proteazami. Do inhibicije lipaze pride zaradi pretvorbe boronske kisline iz trigonalne oblike v tetraedrično z negativnim nabojem, ki tvori vez s serinsko hidroksilno skupino, ki je v aktivnem mestu encima (slika 5). Za uspešno encimsko inhibicijo je ključno, da je afiniteta lipaze do derivatov boronske kisline precej večja kot do lipidnih substratov (za faktor 10^2 - 10^4) (18).



Slika 5: Shematski prikaz inhibicije lipaze z boronsko kislino. Prirejeno po (18).

2. NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo izdelali ter nato z metodo *in vitro* lipolize ovrednotili različne SMES z vgrajeno slabo vodotopno ZU. Kot modelni učinkovini bomo uporabili ibuprofen (IBU) in valsartan (VAL). Posamezno ZU bomo najprej vgradili v tekoči SMES, ki ga bomo izdelali iz Capmula[®] MCM in ricinusovega olja, ki bosta služila kot oljna faza sistema, ter Cremophorja[®] EL in Cremophorja[®] RH40 v vlogi emulgatorjev. V nadaljevanju bomo z adsorpcijo tekočega SMES-a na tri različne trdne nosilce, Neusilin[®] US2, Sylysia[®] 350 in Syloid[®] 244FP, pripravili samomikroemulgirajoče praške. Slednjim bomo dodali ustrezne pomožne snovi za tabletiranje, Ac-Di-Sol[®], Avicel[®] PH102, Kollidon[®] VA64 in magnezijev stearat ter nastalo zmes ročno stisnili v tablete. Pripravili bomo še dodatne vzorce, in sicer tako, da bomo v tekoči SMES vgradili takšno količino ZU, da bomo dosegli 10 % oziroma 80 % nasičene topnosti posamezne ZU v tekočem SMES-u, s čimer bomo vrednotili potek lipolize v odvisnosti od nasičenosti formulacije z ZU. Vse vzorce bomo analizirali z uporabo preproste pH-stat metode, enostopenjskega modela *in vitro* lipolize, ki posnema prebavo lipidov *in vivo*. Metoda temelji na nevtralizaciji MK, ki se pri encimsko katalizirani hidrolizi sprostitjo iz lipidov, s čimer ohranja konstantno pH vrednost reakcijske zmesi.

V drugem delu naloge bomo z uporabo inhibitorja pankreasne lipaze, 4-bromofenilboronske kisline, na tekočem SMES-u z vgrajeno ZU izvedli ustavljanje lipolize v posameznih časovnih točkah. S tem bomo pridobili vpogled v porazdeljevanje vgrajene ZU v posamezne faze medija med reakcijo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Zdravilni učinkovini

- **Ibuprofen** (Lex, Slovenija)

Ibuprofen (IBU) s kemijskim imenom (2*R,S*)-1[4-(2-metilpropil)fenil]propanojska kislina uvrščamo med nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine z analgetičnim in antipiretičnim delovanjem. Je neselektivni inhibitor ciklooksigenaze 1 in ciklooksigenaze 2, encimov, ki sodelujeta pri tvorbi prostaglandinov, ki so odgovorni za nastanek vnetja, bolečine in vročine. Farmakološki učinki so doseženi preko inhibicije ciklooksigenaze 2, medtem ko inhibicija ciklooksigenaze 1 vodi v neželene učinke (na primer draženje sluznice GIT). IBU obstaja v obliki dveh optičnih izomerov, pri čemer je farmakološko aktiven *S*-enantiomer, vendar se pri *in vivo* razmerah *R*-enantiomer pretvori v *S*-enantiomer, zato pogosto uporabljamo racemno zmes obeh izomerov (19, 20, 21). Po peroralni aplikaciji se IBU dobro absorbira in doseže najvišjo serumsko koncentracijo v 1 do 2 urah. Presnovki, ki nastanejo pri obsežnem metabolizmu v jetrih, se izločijo z urinom. IBU je indiciran za zdravljenje blage do zmerne bolečine, na primer pri zobobolu, glavobolu, migreni, dismenoreji, revmatoidnem artritisu ali poškodbah mehkih tkiv ter za zniževanje povišane telesne temperature (20, 21).

Preglednica III: Pregled glavnih značilnosti ibuprofena. Povzeto po (20).

Kemijska formula	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Molekulska masa [g/mol]	206,28
logP	3,97
pKa	4,91
Topnost v vodi [mg/l]	21
Temperatura tališča [°C]	75,0-77,5

- **Valsartan** (Krka, Slovenija)

Valsartan (VAL) s kemijskim imenom (2*S*)-3-metil-2-[*N*-({4-[2-(2*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)pentanamido]-butanojska kislina je kompetitivni antagonist receptorjev angiotenzina II s selektivnim delovanjem na angiotenzinski receptor tipa I. Z blokado slednjega prepreči delovanje angiotenzina II (povečevanje perifernega upora in

reabsorpcije vode in natrija v ledvicah pod vplivom aldosterona), kar vodi do vazodilatacije in posledično do padca krvnega tlaka. Uporabljamo ga pri zdravljenju hipertenzije, srčnega popuščanja ter v kombinaciji z drugimi ZU pri koronarnem sindromu in po miokardnem infarktu. Po peroralni aplikaciji je VAL podvržen obsežnemu metabolizmu pri prvemu prehodu skozi jetra in efluksu zaradi P-glikoproteinov. Poleg tega na že tako nizko biološko uporabnost (<25 %) vpliva tudi prisotnost hrane, ki lahko zmanjša najvišjo plazemsko koncentracijo tudi za 50 % (22, 23).

Preglednica IV: Kemijske značilnosti valsartana. Povzeto po (22, 23, 24).

Kemijska formula	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃
Molekulska masa [g/mol]	435,52
logP	5,8
pKa	3,9 (karboksilna kislina) 4,73 (tetrazol)
Topnost v vodi [mg/ml]	< 0,1
Temperatura tališča [°C]	116-117

3.1.2 Sestavine za izdelavo tekočega SMES-a

- **Capmul[®] MCM EP** (Abitec Corporation, ZDA) je zmes MG in DG, ki nastanejo pri estrenju glicerola z oktanojsko in dekanajojsko kislino. Pri sobni temperaturi je v obliki brezbarvne ali rahlo rumene olju podobne tekočine ali poltrdne snovi. V farmaciji ga uporabljamo kot vehikel, solubilizator, emulgator/koemulgator ali kot pospeševalec penetracije in absorpcije (25).
- **Cremophor[®] EL** (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija) je neionogen emulgator s HLB vrednostjo med 12 in 14, ki ga pridobivamo z reakcijo med ricinusovim oljem in etilen-oksikom v molskem razmerju 1:35. Je blede rumena olju podobna tekočina z značilnim vonjem. Uporabljamo ga kot solubilizator pri izdelavi tekočih farmacevtskih oblik za peroralno ali dermalno uporabo, ki vsebujejo v lipidih topne vitamine, eterična olja ali lipofilne ZU (26).
- **Cremophor[®] RH40** (Sigma Aldrich, Nemčija) je neionogen emulgator s HLB vrednostjo med 14 in 16. Nastane pri reakciji med 1 molom hidrogeniranega ricinusovega olja in 40 moli etilen-oksida. Pri sobni temperaturi je v obliki bele do rumenkaste poltrdne snovi z blagim vonjem. V farmaciji ga uporabljamo kot emulgator in solubilizator pri izdelavi vodnih raztopin v lipidih topnih vitaminov in drugih hidrofobnih komponent za peroralno ali dermalno aplikacijo (27).

- **Ricinusovo olje** (Lex, Slovenija) sestavljajo TG naslednjih MK: ricinolne (87 %), oleinske (7 %), linolenske (3 %), palmitinske (2 %), stearinske (1 %) in dihidrostearinske v sledovih. Bistro, brezbarvno ali blede rumeno olje z rahlim vonjem in okusom pridobivajo s hladnim stiskanjem semen ricinusa. Ricinusovo olje uporabljamo v prehrabni, kozmetični in farmacevtski industriji. V slednji je lahko pomožna snov v dermalnih farmacevtskih oblikah, tabletah, kapsulah, farmacevtskih oblikah za oko ali kot topilo v intramuskularnih injekcijah (28).

3.1.3 Trdni nosilci za adsorpcijo tekočega SMES-a

- **Neusilin[®] US2** (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) je sintezen in amorfen magnezijev aluminometasilikat (empirična formula: $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1,7 \text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) v obliki finega praška ali granul s povprečno velikostjo delcev med 44 in 177 μm . Ima veliko specifično površino (300 m^2/g) in veliko sposobnost za adsorpcijo olja ali vode. V farmaciji ga uporabljamo pri tabletiranju, saj izboljša pretočne lastnosti praškov in poveča trdnost tablet že pri manjši sili stiskanja, pri izdelavi farmacevtskih oblik z olji ali slabo topnimi ZU ali kot nosilec pri izdelavi trdnih disperzij in SMES-ov (29).
- **Syloid[®] 244FP** (Grace Davision, ZDA) je mikroniziran, sintezen in amorfen silicijev dioksid s povprečno velikostjo delcev 5,5 μm . Zaradi velike specifične površine in poroznosti je področje njegove uporabe široko. Uporabljamo ga kot nosilec, drsilo, razgrajevalo, kot pomožna snov pri izdelavi tablet ali kot vezalec vlage (30).
- **Sylsya[®] 350** (Fuji Chemical Industry Co. LTD, Japonska) je sintezen, amorfen in mikroniziran silicijev dioksid s povprečno velikostjo delcev 3,9 μm in veliko specifično površino (300 m^2/g). Uporabljamo ga kot nosilec, pri tabletiranju, kjer izboljšuje pretočne lastnosti praškov, pri oblaganju tablet in tudi kot pomožno snov pri izdelavi dermalnih farmacevtskih oblik (31).

3.1.4 Pomožne snovi pri tabletiranju

- **Ac-Di-Sol[®]** (FMC Biopolymers, ZDA) je premrežena natrijeva karboksimetil celuloza v obliki belega praška brez vonja. Zaradi močnega in hitrega nabrekanja ob stiku z vodo jo v trdnih farmacevtskih oblikah uporabljamo kot razgrajevalo (32, 33).

- **Avicel® PH102 (FMC Biopolymers, ZDA)** ali mikrokristalna celuloza je bel, porozen, v vodi netopen prašek z velikostjo delcev 100 µm ter brez vonja in okusa. Uporabljamo jo v prehrabni, kozmetični in farmacevtski industriji, kjer ima v proizvodnji tablet in kapsul različno vlogo: lahko je polnilo, vezivo, razgrajevalo ali drsilo (28, 34, 35).
- **Kollidon® VA64 (BASF, Chem Trade GmbH, Nemčija)** je kopolimer vinilpirolidona in vinil acetata. Je bel ali rumenkast prašek z blagim vonjem in okusom, ki je topen v vodi in alkoholih. V farmaciji ga uporabljamo kot vezivo pri direktnem tabletiranju ali vlažnem granuliranju in kot sestavino raztopin za oblaganje tablet (36).
- **Magnezijev stearat (Merck KGaA, Nemčija)** je zmes magnezijevih soli s trdnimi organskimi kislinami, večinoma magnezijevega stearata in magnezijevega palmitata, katerih razmerje je variabilno. Je fin, bel prašek, ki je na otip masten in se oprijema kože. V farmacevtski industriji ga v koncentraciji od 0,25 do 5 % uporabljamo kot drsilo pri izdelavi tablet (28).

3.1.5 Drug material

- **Acetonitril za tekočinsko kromatografijo**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Gliceril-tributirat**, Sigma Aldrich, Švica
- **Kalcijev klorid dihidrat**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Kalijev dihidrogen-fosfat**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Lipoid® S100**, Lipoid GmbH, Nemčija
- **Metanol za tekočinsko kromatografijo**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Natrijev deoksiholat**, Sigma Aldrich, ZDA
- **Natrijev hidroksid**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Natrijev klorid**, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Ocetna kislina**, brezvodna oblika za analizo, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- **Pankreatin iz prašičje trebušne slinavke**, Sigma Aldrich, ZDA
- **Prečiščena voda**, Fakulteta za farmacijo, Slovenija
- **4-bromofenil-boronska kislina**, Sigma Aldrich, Nemčija
- **Trizma® maleat**, Sigma Aldrich, ZDA
- **Ultra čista voda**, Fakulteta za farmacijo, Slovenija

3.2 NAPRAVE

- **Analizna tehtnica**, Mettler Toledo AG245, Švica
- **Analizna tehtnica**, Mettler Toledo XS205, Švica
- **Elektronska pipeta**, BIOHIT, eLINE[®] 50-500 µl, Finska
- **Elektronska pipeta**, BIOHIT, eLINE[®] 500-1000 µl, Finska
- **Centrifuga**, Eppendorf, Microcentrifuge 5415R, Nemčija
- **HPLC**, Agilent Technologies, Agilent 1100 Series, Nemčija
- **Instrumentalna tabletirka na udarec**, Killian SP300, Nemčija
- **Kolona za HPLC**, Symmetry 150 x 4,6 mm; 5 µm
- **Kolona za HPLC**, Thermo ODS Hypersil, 250 x 4 mm; 5 µm
- **Kombinirana steklena elektroda**, Mettler Toledo, InLab[®] Expert Pro ISM, Švica
- **Magnetni mešalnik**, Rotamix 550 MM, Tehnica Železniki, Slovenija
- **Mešalo za titrator**, Mettler Toledo, Compact Stirrer, Švica
- **pH meter**, Mettler Toledo, Seven Compact[™] pH/Ion S 220, Švica
- **Rotor za ultracentrifugo**, Thermo Scientific[®], FiberLite F50L-24x1,5 Rotor, ZDA
- **Rotor za ultracentrifugo**, Thermo Scientific[®], T-1250 Fixed Angle Rotor, ZDA
- **Termostat**, Huber, Ministat 125-cc-NR, Nemčija
- **Titrator**, Mettler Toledo T70 Titrator, Švica
- **Ultracentrifuga**, Thermo Scientific[®] Sorwall, WX ULTRA Series Centrifuge, ZDA
- **Ultrazvočna kadička**, Sonis 4, Iskra, Slovenija
- **Viale za HPLC**, Agilent Technologies, Nemčija
- **Vortex lab dancer**, IKA[®], Nemčija

3.3 METODE

3.3.1 Priprava vzorcev

- **Priprava tekočega samomikroemulgirajočega sistema (SMES)**

Preglednica V: Komponente tekočega SMES-a in njihova vloga (37).

Sestavina	% m/m	Vloga komponente
Cremophor [®] EL	30	Emulgator
Cremophor [®] RH40	30	Emulgator
Capmul [®] MCM	20	Oljna faza
Ricinusovo olje	20	Oljna faza

Sestavine, predstavljene v preglednici V, smo natehtali v čašo, jo pokrili s parafilmom ter mešali na magnetnem mešalu do nastanka bistre homogene zmesi. V tekoči SMES smo nato vgradili učinkovini, IBU ali VAL, in sicer po recepturi, ki je bila predhodno razvita na Katedri za farmacevtsko tehnologijo glede na ugotovljene nasičene topnosti obeh ZU v SMES-u: 25 mg IBU v 225 mg SMES-a in 15 mg VAL v 235 mg SMES-a. Navedeno količino ZU smo natehtali v SMES in pokrito mešali na magnetnem mešalu preko noči.

- **Priprava samomikroemulgirajočih praškov**

Pripravili smo praške s tremi različnimi nosilci: Neusilinom[®] US2, Sylysio[®] 350 in Syloidom[®] 244FP. IBU-SMES oziroma VAL-SMES smo adsorbirali na omenjene trdne nosilce v masnem razmerju 1:1, in sicer tako, da smo v pateno natehtali ustrezno količino SMES z vgrajeno ZU in posamezni nosilec postopno dodajali ter intenzivno mešali tako dolgo, da se praškasta zmes ni več oprijemala sten patene.

- **Priprava samomikroemulgirajočih tablet**

Tablete smo pripravili po postopku, ki je bil predhodno razvit na Katedri za farmacevtsko tehnologijo in je prikazan v preglednici VI. Izdelane tablete so se med seboj razlikovale le po izbiri trdnega nosilca.

Zmes za tabletiranje smo pripravili tako, da smo k izdelanim praškom postopno dodajali druge komponente in vsakič dobro premešali združene sestavine. Na koncu smo dodali še drsilo in ga rahlo vmešali v zmes, da je ostalo na površini. Pripravljeno zmes smo natehtali na čolniček (približno 600 mg), jo vsuli v matrično vdolbino tabletirke in ročno stisnili tablete s tabletirko na udarec (slika 6). Uporabili smo okrogel pečat z ravno površino s

premerom 12 mm. Položaj zgornjega pečata in sila stiskanja sta se razlikovala glede na izbran trdni nosilec, kar je prikazano v preglednici VII.

Preglednica VI: Receptura za izdelavo tablet (37).

Komponenta	Masa (mg)	Vloga komponente
Tekoči SMES z ZU	250,5	Na lipidih osnovan dostavni sistem z ZU
Neusilin [®] US2/ Sylsia [®] 350/ Syloid [®] 244FP	250,5	Trdni nosilec
Avicel [®] PH102	60	Vezivo
Ac-Di-Sol [®]	30	Razgrajevalo
Kollidon [®] VA64	6	Vezivo
Mg stearat	3	Drсило

Preglednica VII: Položaj pečatov pri stiskanju tablet z različnimi nosilci ter povprečna sila stiskanja tablet.

Trdni nosilec	Zgornji pečat (mm)	Spodnji pečat (mm)	Povprečna sila stiskanja (kN)
Neusilin [®] US2	15,9	20	IBU-3,5 VAL-3,75
Sylsia [®] 350	16,3	20	IBU-8,97 VAL-5,9
Syloid [®] 244FP	16,2	20	IBU-6,0 VAL-6,8



Slika 6: Tabletirka, ki smo jo uporabljali za izdelavo samomikroemulgirajočih tablet.

- **Priprava dodatnih vzorcev**

Poleg osnovnega postopka smo v tekoči SMES vgradili tudi takšne količine IBU oziroma VAL, da smo dosegli 10 % oziroma 80 % ugotovljene nasičene topnosti posamezne ZU v tekočem SMES-u. V prvem primeru smo vgradili 5,3 mg IBU v 244,7 mg SMES-a in 11,5 mg VAL v 238,5 mg SMES-a, v drugem primeru pa 42,2 mg IBU v 207,8 mg SMES-a ter 91,8 mg VAL v 158,2 mg SMES-a. Dodatno smo vgradili še VAL v posamezne komponente SMES-a, in sicer 15 mg VAL v 235 mg Cremophorja[®] EL/ Cremophorja[®] RH40/ Capmula[®] MCM/ ricinusovega olja.

3.3.2 *In vitro* lipoliza

In vitro lipolizo smo izvedli s pH-stat metodo. Aparaturo (Titrator T70) sestavlja termostatorirana reakcijska posoda, ki je opremljena z mešalom in stekleno elektrodo za merjenje pH in je povezana z elektronskim titratorjem in računalnikom. V računalniškem programu LabX Pro smo pred začetkom meritve nastavili ustrezne parametre (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Nastavitve za izvedbo pH-stat metode za ugotavljanje aktivnosti pankreasne lipaze – a in analizo vzorcev-b (37).

Vzorec	Določen volumen (ml)	1
	Gostota (g/ml)	1
	Korekcijski faktor	1,0
	Temperatura (°C)	25,0
Vzdrževanje pH	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 ⁴)	5	
Prekinitev metode	V (max) (ml) (0,01-1000)	70
	t (max) (min) (1-10 ⁶)	30 ^a ; 60 ^b
	dV (ml/min) (0,0001-10)	0,01
	dt (min) (1-10 ⁶)	30 ^a ; 60 ^b
	Interval shranjevanja rezultatov (s) (0,1-10 ⁶)	10

Reakcijo hidrolize vzorca smo sprožili z dodatkom encima v medij in istočasno aktivirali metodo. Ob razpadu TG iz vzorca so se sprostile MK, zaradi česar je prišlo do padca vrednosti pH. Elektronski titrator je nato iz birete dodal ustrezno količino 0,6 M NaOH, da se je pH vrednost vrnila na predhodno nastavljeno (to je 7,5). Med reakcijo smo spremljali volumen dodane baze v odvisnosti od časa ter preverjali konstantnost vrednosti pH in temperature medija. Z opisano metodo smo ugotovili aktivnost pankreasne lipaze in analizirali vzorce (tekoč SMES z ZU, samomikroemulgirajoče praške z ZU in samomikroemulgirajoče tablete z ZU) ter izvedli ustavljanje lipolize v časovnih točkah.

- **Priprava prebavnega pufra**

Za pripravo prebavnega pufra smo potrebovali: 50 mM Trizma[®] maleata, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂·2H₂O, 4,98 mM natrijevega deoksiholata in 1,22 mM Lipoida[®] S100. Posamezne komponente smo natehtali na čolničke ter eno za drugo kvantitativno prenesli v merilno bučko in dobro raztopili v nekaj prečiščene vode v naslednjem zaporedju: natrijev deoksiholat, NaCl, CaCl₂·2H₂O, Lipoid[®] S100 in Trizma[®] maleat. Puffer smo nato na magnetnem mešalu mešali 12 ur. Po umerjanju pH na 7,5 z 0,5 oziroma 1 M NaOH smo do oznake na bučki puffer dopolnili s prečiščeno vodo. Hranili smo ga v hladilniku in porabili v enem do dveh dneh.

- **Priprava maleatnega pufra**

Puffer smo pripravili po naslednjem predpisu: 50mM Trizma[®] maleata, 150 mM NaCl in 5 mM CaCl₂·2H₂O. Posamezne komponente smo natehtali na čolničke, jih kvantitativno prenesli v merilno bučko in raztopili v nekaj prečiščene vode. Nastali raztopini smo umerili pH na 7,5 z 0,5 oziroma 1M NaOH ter bučko dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

- **Priprava raztopine pankreatina za ugotavljanje aktivnosti lipaze**

Za doseganje zahtevane koncentracije, in sicer 5 mg encima/1 ml pufra, smo v 2 ml eppendorf epruvetke natehtali 10 mg pankreatina in z električno pipeto dodali 2 ml maleatnega pufra. Po 15-minutnem mešanju na Vortexu smo jih uravnotežili in centrifugirali 15 minut pri 5°C in pri ref 775 x g. Tako pripravljeno raztopino smo zaradi nestabilnosti hranili na ledu in porabili v enem dnevu.

- **Ugotavljanje aktivnosti pankreasne lipaze – tributirinski test**

Kot substrat za lipazo smo uporabili tributirin, ki je ester glicerola in butanojske kisline. V termostatirano reakcijsko posodo smo dodali 20 ml maleatnega pufru in 3 ml tributirina ter ju mešali 2 min na 40 % moči mešala. Potem smo zmesi umerili pH na 7,5 z uporabo 0,5 oziroma 1M NaOH in nastavili parametre pH-stat metode za ugotavljanje aktivnosti pankreasne lipaze. Zmesi smo dodali 500 μ l pripravljene raztopine pankreatina in sočasno na računalniku aktivirali metodo, ki je trajala 30 min. Dodan encim je sprožil hidrolizo substrata, sproščena butanojska kislina pa je bila avtomatsko nevtralizirana z 0,6 M NaOH, da je bil pH med reakcijo konstanten.

Po končani reakciji smo iz začetnega linearne delu grafa, kjer smo spremljali volumen dodanega NaOH v odvisnosti od časa, s pomočjo naklona premice ugotovili povprečni volumen dodanega titranta in po enačbi 1 izračunali aktivnost lipaze, pri čemer 1 TBU enota pomeni 1 μ mol butanojske kisline sproščene v minuti na gram encima.

Enačba 1

$$\text{Aktivnost} \left(\frac{\text{TBU}}{\text{g}} \right) = \frac{\bar{V}(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 1000}{m(\text{natehtan pankreatin})}$$

$\bar{V}(\text{NaOH})$ – povprečni volumen dodatnega NaOH [ml/min]

$c(\text{NaOH})$ – koncentracija NaOH [mol/l]

$m(\text{natehtan pankreatin})$ – masa natehtanega pankreatina [g]

- **Priprava pankreatina za *in vitro* lipolizo**

Glede na določeno aktivnost pankreasne lipaze smo izračunali, koliko encima potrebujemo za pripravo suspenzije encima s koncentracijo 1 g encima/5 ml maleatnega pufru ob upoštevanju priporočene aktivnosti encima 1000 TBU/ml (primer izračuna 1) (37).

Izračunano maso encima smo natehtali v čašo in dodali ustrezen volumen maleatnega pufru. Suspenzijo smo mešali na magnetnem mešalniku 15 min, potem smo jo prenesli v 2 ml eppendorf epruvetke, ki smo jih centrifugirali 15 min pri 5°C in pri $r_{\text{cf}} 775 \times g$. Po centrifugiranju smo združili supernatant in mu umerili pH na 7,5 z 0,5 oziroma 1 M NaOH. Tako pripravljen encim smo shranjevali na ledu in ga porabili v enem dnevu.

Primer izračuna 1

Aktivnost encima: 23726 TBU/g

Volumen reakcijskega medija: 40 ml

Zahtevana aktivnost encima za izvedbo reakcije: $40\text{ml} \times 1000\text{ TBU/ml} = 40000\text{ TBU}$

Masa pankreatina, ki ga potrebujemo za reakcijo:

23726 TBU ... 1 g encima

$40000\text{ TBU} \dots x\text{ g encima} \rightarrow x = ((40000\text{ TBU} \times 1\text{ g})/23726\text{ TBU}) = 1,686\text{ g encima}$

Volumen maleatnega pufra za pripravo suspenzije z encimom:

1 g encima ... 5 ml maleatnega pufra

$1,686\text{ g encima} \dots x\text{ ml pufra} \rightarrow x = ((1,686\text{ g} \times 5\text{ ml})/1\text{ g}) = 8,4296\text{ ml} \sim 8,430\text{ ml}$

- **In vitro lipoliza tekočega SMES-a**

V čašo smo natehtali približno 250 mg tekočega SMES-a z vgrajeno ZU in dodali tolikšno količino prebavnega pufra, da je bilo v reakcijski posodi skupaj z raztopino pankreatina 40 ml medija (na primer $40\text{ ml} - 8,430\text{ ml} = 31,570\text{ ml}$). Zmes smo pustili mešati na magnetnem mešalu 15 min ter jo nato prelili v reakcijsko posodo in ji umerili pH na 7,5 z dodajanjem 0,5 oziroma 1 M NaOH. Nastavili smo parametre pH-stat metode ter jo ob sočasnem dodatku pankreatina k vzorcu aktivirali. Po končani lipolizi smo medij prenesli v centrifugirke in ultracentrifugirali 45 min pri 20 °C in pri rcf 108670 x g. Bister supernatant smo nato analizirali z uporabo HPLC-ja.

- **In vitro lipoliza samomikroemulgirajočega praška**

Pred začetkom lipolize smo SMES prašek natehtali v čašo (približno 500 mg) in ga skupaj s prebavnim pufrom 60 minut mešali na magnetnem mešalu. Količina prebavnega pufra in sama lipoliza (potek in parametri lipolize) sta bila enaka kot pri tekočem SMES-u z ZU.

- **In vitro lipoliza samomikroemulgirajočih tablet**

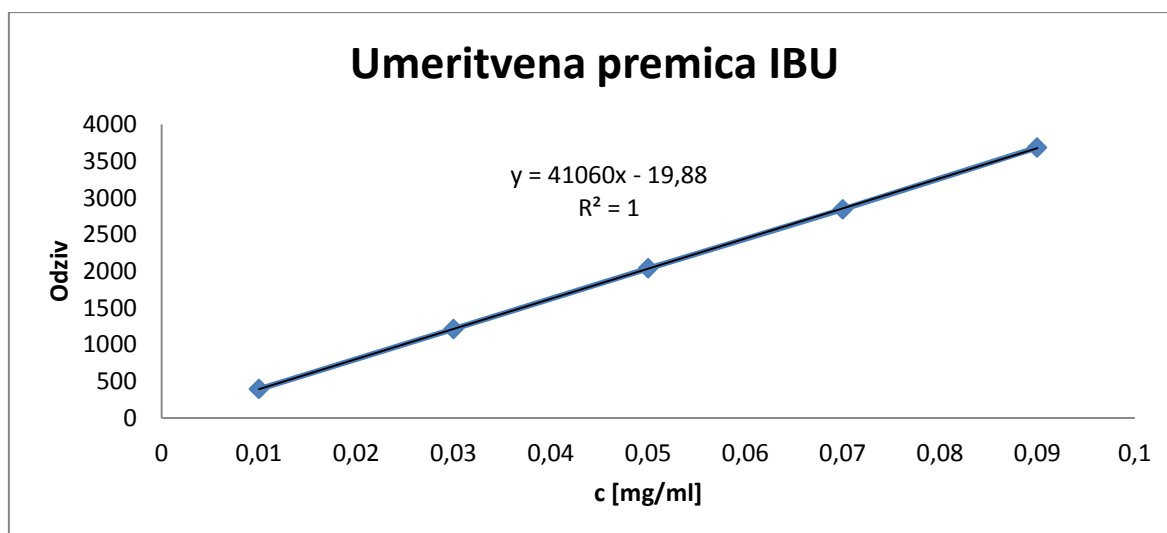
Tableto smo skupaj s prebavnim pufrom mešali na magnetnem mešalniku 30 minut, potem pa vsebino iz čaše prelili v reakcijsko posodo in z mešanjem nadaljevali še 30 minut pri 40% moči mešalnika. Količina prebavnega pufra in sama lipoliza (potek in parametri lipolize) sta bila enaka kot pri tekočem SMES-u z ZU.

3.3.3 Ugotavljanje koncentracije ZU v vodni fazi po *in vitro* lipolizi

- Ugotavljanje koncentracije IBU

Koncentracijo IBU v vzorcu smo ugotavljali z metodo HPLC. Uporabili smo kolono Thermo ODS Hypersil, 250 x 4 mm, 5 μ m. Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo zmešali 250 ml 0,2 M KH_2PO_4 in 200 ml 0,2 M NaOH. Zmesi smo nato z 1 M NaOH uravnali pH na približno 7,6 in do 1 l dopolnili z ultra čisto vodo. K 1 l tako pripravljene raztopine smo dodali 400 ml acetonitrila. Temperatura kolone je bila 35 $^{\circ}\text{C}$, pretok mobilne faze 1,2 ml/min, volumen injiciranja 20 μ l, valovna dolžina UV detektorja pa 225 nm. Retencijski čas za IBU je bil približno 4,6 min (38).

Za izračun koncentracije IBU v vzorcih smo pripravili umeritveno premico. Osnovno raztopino smo pripravili tako, da smo na čolniček natehtali 10 mg IBU, ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in do oznake dopolnili z mobilno fazo. Bučko smo za nekaj časa postavili v ultrazvočno kadičko, da se je ZU popolnoma raztopila. Tako pripravljeno raztopino smo nadalje redčili z mobilno fazo, da smo dobili nove raztopine s koncentracijami od 0,01 mg/ml do 0,09 mg/ml. Raztopinam smo s HPLC-jem izmerili površine pod krivuljo ter z metodo linearne regresije izračunali enačbo umeritvene premice in kvadrat Pearsonovega koeficienta (slika 7) (38).

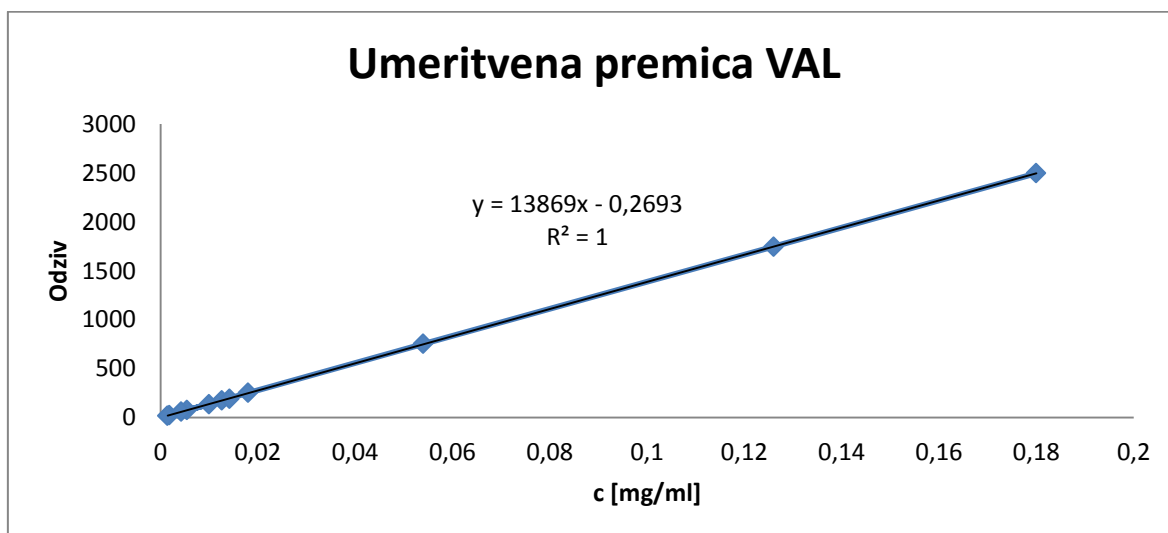


Slika 7: Umeritvena premica za ibuprofen (38).

- **Ugotavljanje koncentracije VAL**

Koncentracijo VAL v vzorcu smo ugotavljali z metodo HPLC, pri čemer smo uporabili kolono Symmetry 150 x 4,6 mm; 5 μ m. Za mobilno fazo smo pripravili zmes acetonitrila in ultra čiste vode v razmerju 1:1, ki smo ji dodali 1 ml očetne kisline na 1 l zmesi. Temperatura kolone je bila 25 $^{\circ}$ C, pretok mobilne faze 1 ml/min, volumen injiciranja 20 μ l, valovna dolžina UV detektorja pa 273 nm. Retencijski čas za VAL je bil približno 5,8 min (39).

Koncentracijo VAL v vzorcih smo izračunali s pomočjo umeritvene premice. Standardni raztopini smo pripravili tako, da smo na čolničke natehtali 10 oziroma 20 mg VAL ter vsakega posebej kvantitativno prenesli v 100 ml bučko. Do oznake smo bučki napolnili z mobilno fazo in ju postavili v ultrazvočno kadičko, da se je ZU raztopila. Pripravljeni raztopini smo nato redčili z mobilno fazo, da smo dobili nove raztopine s koncentracijami od 0,0015 mg/ml do 0,18 mg/ml. Z uporabo HPLC-ja smo raztopinam izmerili površine pod krivuljo in z metodo linearne regresije izračunali enačbo umeritvene premice ter kvadrat koeficienta korelacije (slika 8) (39).



Slika 8: Umeritvena premica za valsartan (39).



Slika 9: HPLC naprava, ki smo jo uporabljali za ugotavljanje koncentracij ZU.

3.3.4 Ustavljanje lipolize v časovnih točkah

- **Priprava raztopine inhibitorja in ugotavljanje količine le-te za zaustavitev delovanja encima**

Kot inhibitor pankreasne lipaze smo uporabili BFBK. Pripravili smo 1M raztopino inhibitorja v metanolu, in sicer tako, da smo natehtali 0,2 g BFBK v čašo, z elektronsko pipeto dodali 1 ml MeOH, čašo dobro pokrili s parafilmom, da topilo ni izhlapelo, ter za nekaj minut pustili mešati na magnetnem mešalniku, da se je BFBK popolnoma raztopila (40). Da smo ugotovili, koliko BFBK moramo dodati vzorcem, da dosežemo popolno inhibicijo encima, smo dodajali različne volumne le-te k reakcijski zmesi ter hkrati ugotavljali aktivnost lipaze po postopku opisanem v podpoglavju 3.3.2. Morebitno topnost IBU oziroma VAL v BFBK in s tem povezano napako pri ugotavljanju koncentracije ZU smo preverili tako, da smo izvedli dve neodvisni lipolizi, pri čemer smo k enemu izmed vzorcev po končani reakciji dodali BFBK ter obema vzorcema ugotovili koncentracijo ZU v vodni fazi.

- **Zaustavitev lipolize v časovnih točkah in obravnava vzorcev**

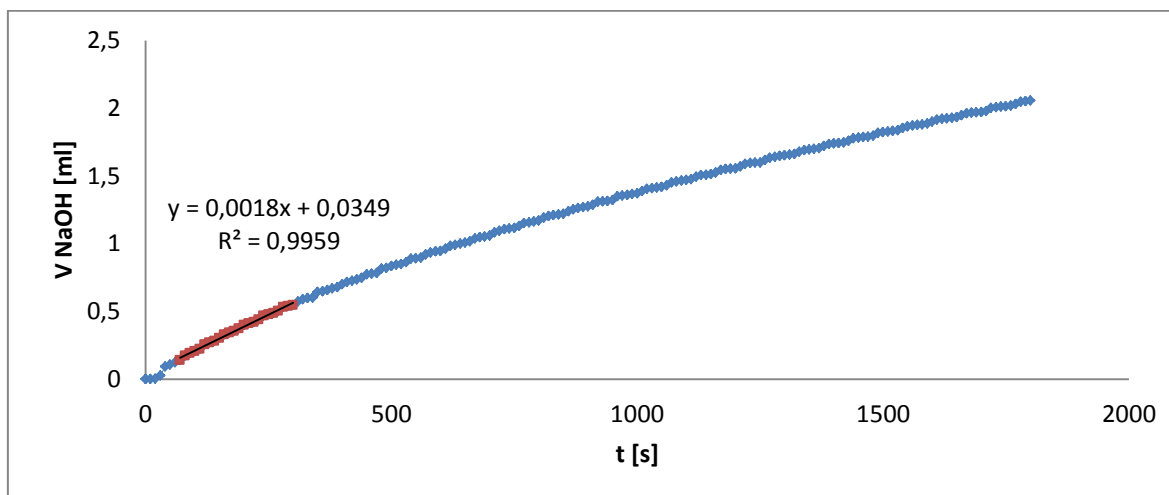
Lipolizo smo ustavljali v naslednjih časovnih točkah: ob 1., 2., 3., 4., 5., 10., 15., 20., 30., 40., 50. in 60. minuti reakcije. V 1,5 ml eppendorf epruvetke smo predhodno odpipetirali 100 μ l metanolne raztopine BFBK. Ob določenih časovnih točkah smo nato z elektronsko

pipeto odvzeli 1,2 ml vzorca iz reakcijske zmesi in ga dodali v pripravljene eppendorf epruvice. Vsako epruvetko smo dobro premešali na Vortex-u. Po končani lipolizi smo vzorce ultracentrifugirali 45 minut pri 20° C in pri rcf 100620 x g. Koncentracijo učinkovine v vodni fazi smo ugotovili s HPLC analizo, po postopku opisanem v podpoglavju 3.3.3.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 AKTIVNOST PANKREASNE LIPAZE

Preden smo začeli z izvedbo *in vitro* lipolize vzorcev, smo pankreasni lipazi s tributirinskim testom ugotovili aktivnost. Substrat, tributirin, se je pod vplivom pankreasne lipaze hidroliziral do DG in butanojske kisline, ki je bila nevtralizirana z ustreznim dodatkom titranta (NaOH). Med reakcijo, ki je potekala 30 minut, smo spremljali volumen dodanega NaOH v odvisnosti od časa, kar je prikazano na spodnjem grafu. Aktivnost pankreasne lipaze smo izračunali z enačbo 1, pri čemer smo za vsako meritev posebej s pomočjo linearne regresije izračunali enačbo premice iz začetnih točk krivulje (območje med 1. in 5. minuto), katere naklon je predstavljal povprečni volumen dodanega NaOH (primer izračuna 2).



Slika 10: Prikaz porabe titranta v odvisnosti od časa pri ugotavljanju aktivnosti pankreasne lipaze. Pri izračunu povprečnega volumna NaOH smo upoštevali časovni interval od 70. do 300. s (prikazano z rdečo barvo).

Primer izračuna 2

$$\bar{V}(\text{NaOH}) = k (\text{premise}) = 0,0018 \text{ ml/s} = 0,108 \text{ ml/min}$$

$$m (\text{pankreatin}) = 2,523 \times 10^{-3} \text{ g}$$

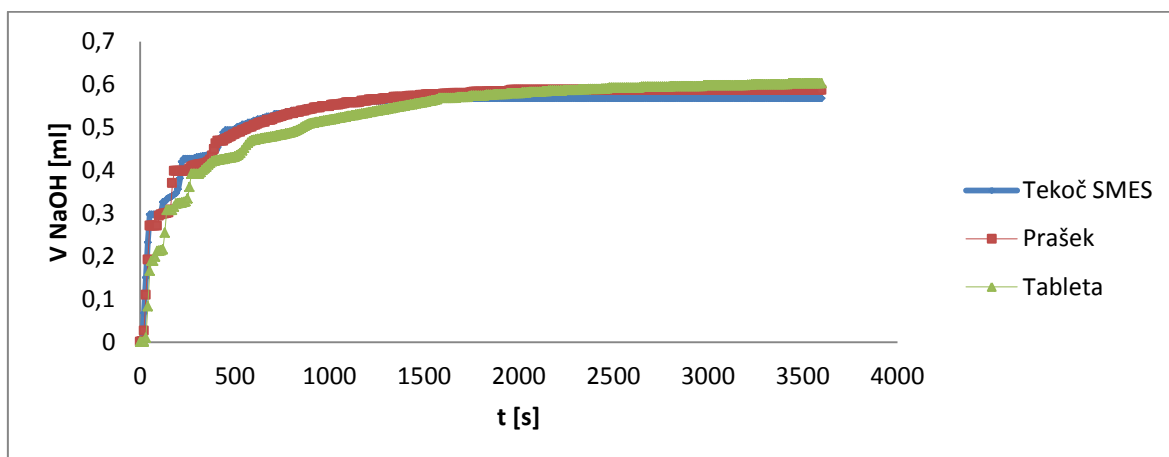
$$c (\text{NaOH}) = 0,6 \text{ mol/l}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivnost pankreasne lipaze} &= \frac{0,108 \text{ ml/min} \times 0,6 \text{ mol/l} \times 1000}{2,532 \times 10^{-3} \text{ g}} \\ &= 25689 \text{ TBU/g} \end{aligned}$$

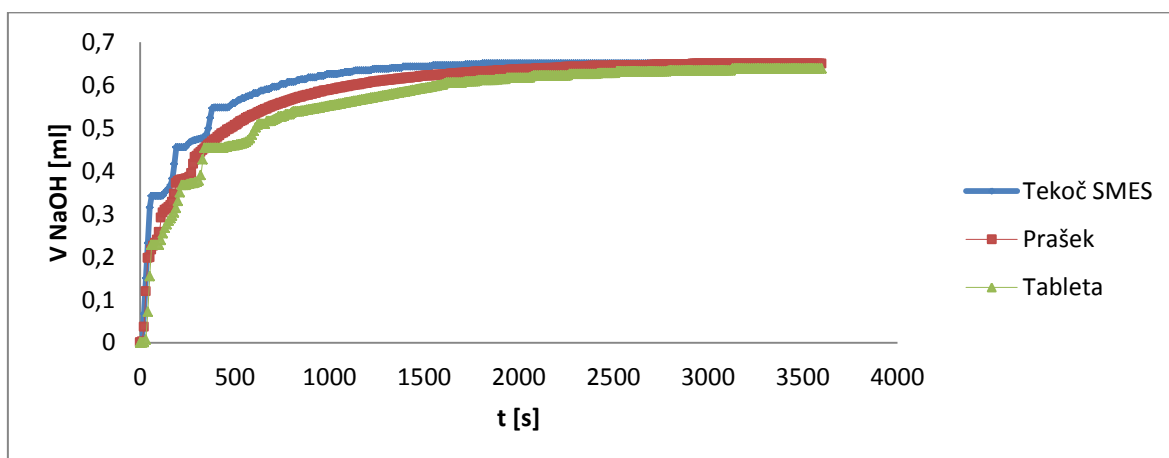
4.2 IN VITRO LIPOLIZA VZORCEV

Pri raziskovalnem delu smo kot modelni učinkovini uporabljali IBU in VAL, ki ju zaradi slabe vodotopnosti in dobre permeabilnosti po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo v razred II. Z izboljšanjem topnosti in/ali hitrosti raztapljanja takšnih ZU lahko povečamo njihovo absorpcijo in s tem biološko uporabnost. Izdelava na lipidih osnovanih dostavnih sistemov je le ena izmed tehnoloških možnosti za doseganje slednjega, kar smo z uporabo testov *in vitro* lipolize želeli preveriti na vzorcih (16, 24, 41, 42, 43).

In vitro lipolizo tekočega SMES-a in trdnih SMES-ov (praški in tablete) z vgrajenima ZU smo izvedli z uporabo pH-stat metode, ki je podrobno opisana v podpoglavju 3.3.2. Vse reakcije smo izvajali 60 minut, čeprav se iz spodnjih grafov, ki prikazujeta volumen dodanega titranta v odvisnosti od časa, vidi, da hidroliza TG poteče do konca že prej (približno v prvih 15-20 minutah po začetku meritve).

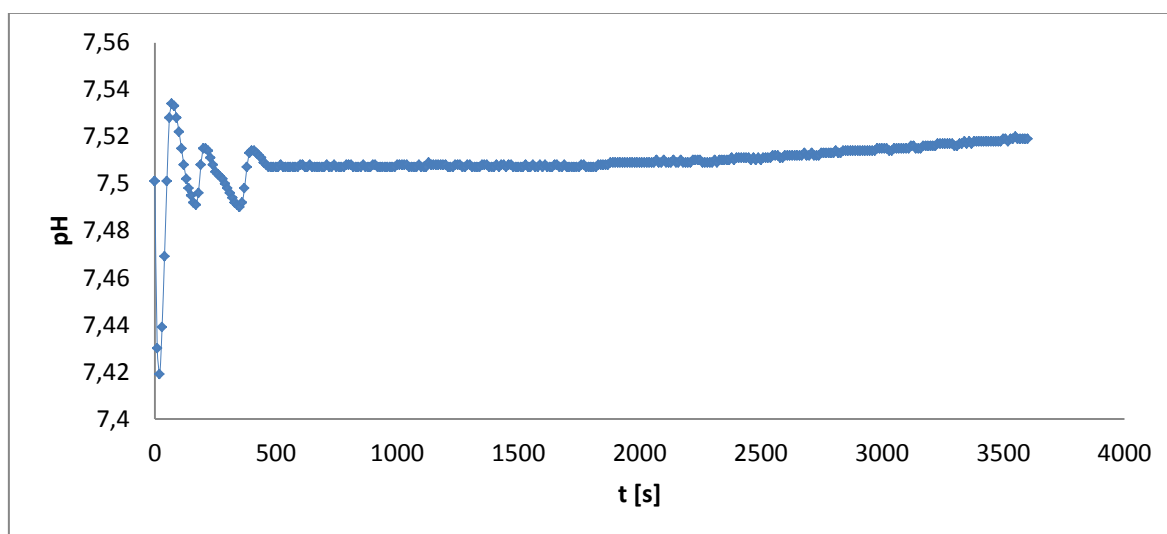


Slika 11: Prikaz poteka *in vitro* lipolize naključnih vzorcev tekočega SMES-a, praška in tablete z IBU.



Slika 12: Primerjava poteka *in vitro* lipolize naključnih vzorcev tekočega SMES-a, praška in tablete z VAL.

Na grafu, kjer so prikazani sistemi z VAL, vidimo, da je bila poraba titranta nekoliko višja v primerjavi s formulacijami z IBU, kar je posledica tega, da smo vgrajevali 15 mg VAL v 235 mg SMES, medtem ko smo vzorce z IBU pripravili tako, da smo 25 mg ZU vgradili v 225 mg SMES. Zaradi nekoliko večjega deleža nosilnega sistema v prvem primeru se je tako pri njegovi razgradnji sprostilo več MK, kar se je odrazilo v večji porabi NaOH. Dobljeni profili lipoliz so si bili med seboj zelo podobni, iz česar lahko sklepamo, da uporabljeni ZU ter trdni nosilci in pomožne snovi za tabletiranje niso vplivali na končni obseg encimske razgradnje komponent SMES-a. Vendar pa lahko opazimo, da je bil začetni potek lipolize pri praških in tabletah nekoliko počasnejši v primerjavi s tekočimi vzorci. Vzrok temu je najverjetneje adsorpcija tekočega SMES-a na trdne nosilce, kar je nekoliko otežilo dostop encimu. To je še toliko bolj vidno v primeru tablet, saj je sila stiskanja pri tabletiranju potisnila SMES globlje v pore trdnega nosilca. Razvidno je tudi, da so bile vse dobljene krivulje v začetnem delu (do približno 500. sekunde) stopničaste, kar je posledica tega, da smo morali istočasno aktivirati metodo in z elektronsko pipeto k reakcijski zmesi dodati pankreatin, ki smo ga zaradi kapacitete pipete ter oblike pokrova reakcijske posode dodali v treh zaporednih korakih. Vsakokratni dodatek encima je hipno sprožil obsežno začetno lipolizo TG in fosfolipidov v vzorcu, pri čemer so se sprostile MK in znižale pH sistema (slika 13). Slednje se je kompenziralo z večjo hitrostjo dodajanja titranta iz avtomatske birete v prvih petih minutah reakcije, da je sistem dosegel nastavljeno pH vrednost 7,5 (44). Poleg omenjenega je vzrok za stopničasto obliko dobljenih profilov tudi ta, da lipoliza posameznih sestavin SMES-a zaradi razlik v njihovi kemijski sestavi ni potekala enako hitro (10).



Slika 13: Prikaz spreminjanja pH vrednosti reakcijske zmesi v odvisnosti od časa med lipolizo.

Po končani lipolizi smo medij iz reakcijske posode prenesli v centrifugirke in ga ultracentrifugirali. Bistremu supernatantu smo nato izračunali površino pod krivuljo z uporabo HPLC-ja, le-to pa uporabili pri izračunu koncentracije s pomočjo umeritvene premice (opis v podpoglavju 3.3.3). Glede na znano začetno natehto ZU v SMES smo nato izračunali delež sproščene ZU iz dostavnega sistema, ki je bila na voljo za absorpcijo (primer izračuna 3 in 4).

Primer izračuna 3 - Izračun deleža sproščenega IBU

$$A = 2490,14$$

$$\text{Faktor redčitve} = 10$$

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

$$m(\text{začetna natehta IBU}) = 25,15 \text{ mg}$$

$$c(\text{IBU}) = \frac{A + 19,88}{41060} \times 10 = \frac{2490,14 + 19,88}{41060} \times 10 = 0,6113 \text{ mg/ml}$$

$$m(\text{IBU}) = c(\text{IBU}) \times V(\text{medija}) = 0,6113 \text{ mg/ml} \times 40 \text{ ml} = 24,45 \text{ mg}$$

$$\%(\text{IBU}) = \frac{m(\text{IBU})}{m(\text{začetna natehta IBU})} \times 100 \% = \frac{24,45 \text{ mg}}{25,15 \text{ mg}} \times 100 \% = 97,2 \%$$

Primer izračuna 4 - Izračun deleža VAL v vodni fazi po lipolizi

$$A = 374,6$$

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

$$m(\text{začetna natehta VAL}) = 15,00 \text{ mg}$$

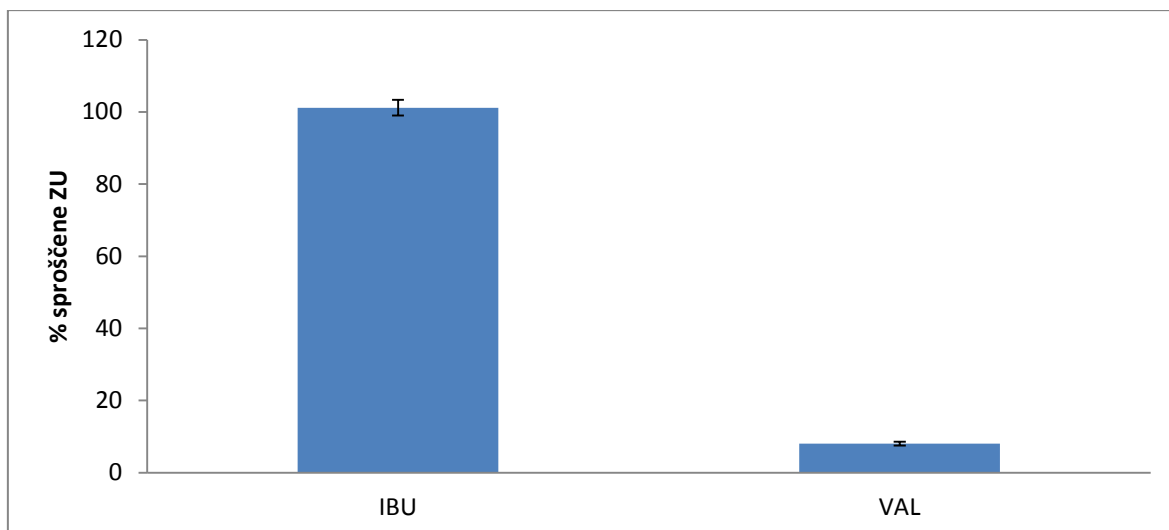
$$c(\text{VAL}) = \frac{A + 0,2693}{13869} = \frac{374,6 + 0,2693}{13869} = 0,02703 \text{ mg/ml}$$

$$m(\text{VAL}) = c(\text{VAL}) \times V(\text{medija}) = 0,02703 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 40 \text{ ml} = 1,081 \text{ mg}$$

$$\%(\text{VAL}) = \frac{m(\text{VAL})}{m(\text{začetna natehta VAL})} \times 100 \% = \frac{1,081 \text{ mg}}{15,00 \text{ mg}} \times 100 \% = 7,2 \%$$

4.2.1 *In vitro* lipoliza tekočega SMES-a z vgrajeno ZU

Najprej smo izvedli *in vitro* lipolizo tekočega SMES z IBU oziroma VAL. Po končani reakciji smo ugotovili, da se je v prvem primeru v vodno fazo sprostil ves vgrajeni IBU, medtem ko se je iz vzorca z VAL sprostilo le 8,0 % ZU (slika 14).



Slika 14: Grafični prikaz deležev sproščenih ZU iz tekočega SMES-a po *in vitro* lipolizi.

Menimo, da je do razlike v deležu sproščenega IBU oziroma VAL, ki smo ju izmerili v vodni fazi po lipolizi, prišlo zaradi različne topnosti ZU v samem SMES-u in njegovih sestavinah. Na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pri ugotavljanju nasičenih topnosti IBU in VAL v SMES-u ugotovili, da je VAL približno dvakrat bolj topen od IBU. Poleg tega so ugotovili še, da je IBU bolje topen v emulgatorjih, medtem ko VAL izkazuje večjo topnost v lipidnih komponentah uporabljenega SMES-a (39). Slednje potrjujejo tudi literaturni podatki, ki so zbrani v preglednici IX ter je hkrati v skladu z vrednostma logaritma porazdelitvenega koeficienta obeh ZU, ki sta 3,97 za IBU in 5,8 za VAL (20, 23).

Preglednica IX: Topnost IBU in VAL v posameznih komponentah SMES-a. Povzeto po (42, 45, 46, 47, 48).

Komponenta SMES-a	Topnost ZU v sestavinah SMES-a [mg/ml]	
	IBU	VAL
Cremophor [®] EL	304	615
Cremophor [®] RH40	259	489
Capmul [®] MCM	292	823
Ricinusovo olje	224	534

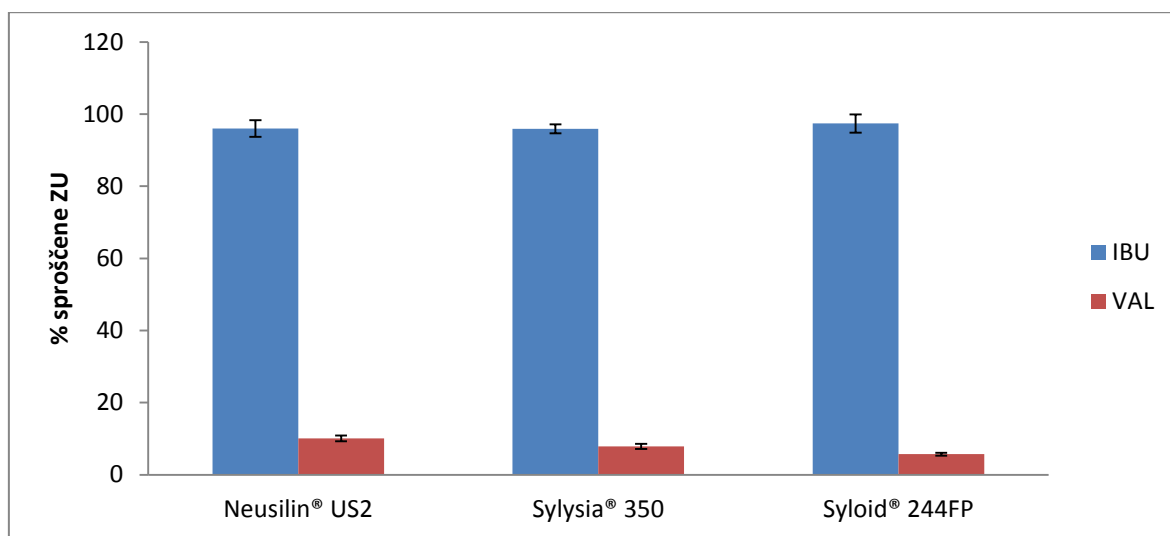
Izmerjena nizka vsebnost VAL v vodni fazi pomeni, da se je ta med samo analizo oboril, kar je posledica spremenjene solubilizacijske kapacitete sestavin SMES-a zaradi njihove lipolize. Med hidrolizo komponent sistema prihaja do dinamičnih sprememb v sestavi medija, kar pomembno vpliva na solubilizacijo oziroma, nasprotno, obarjanje vgrajene ZU. V primeru, da produkti lipolize za določeno ZU izkazujejo manjšo solubilizacijsko kapaciteto kot začetna formulacija, se bo slabo vodotopna ZU obarjala (10, 44, 49).

Glede na to, da je bila oljna faza sistema v primerjavi z emulgatorji popolnoma in bistveno hitreje podvržena encimski razgradnji pri izvajanju *in vitro* lipolize (slednje je podrobneje opisano v podpoglavju 4.2.5), domnevamo, da je bil to vzrok za dobljene rezultate. Zaradi bistveno večje topnosti VAL v lipidnih komponentah je bil le-ta ob njihovi takojšnji in obsežni hidrolizi najverjetneje bolj občutljiv na zmanjšanje solubilizacijske kapacitete v primerjavi z IBU, ki izkazuje boljšo topnost v emulgatorjih oziroma je približno enako topen v vseh sestavinah uporabljenega SMES-a.

Mešani miceli, ki so po lipolizi v vodni fazi, vsebujejo razpadne produkte lipolize in žolčne soli ter solubilizirano slabo vodotopno ZU. Te strukture naj bi predstavljale zalogovnik ZU, ki bi se v nadaljevanju v *in vivo* razmerah lahko absorbirala iz GIT. Oborjena ZU po eni strani lahko omejuje proces absorpcije, saj se mora pred tem ponovno raztopiti, po drugi strani pa je pomembno tudi, v kakšni obliki se obori, saj je na primer amorfna oblika bolj topna od kristalne (1, 13, 44, 49). Brez dodatne analize sedimenta in *in vivo* testov tako ne moremo le na podlagi vsebnosti ZU v vodni fazi po lipolizi sklepati, kakšna bi bila biološka uporabnost sistemov v organizmu. Poleg tega bi bilo morda zanimivo, če bi pri formulacijah z vgrajenim VAL izvedli še dinamično *in vitro* lipolizo in primerjali rezultate z dosedanjimi, saj kontinuiran dodatek kalcijevih ionov omogoča nadzorovanje hitrosti same lipolize in hkrati vpogled v porazdeljevanje ZU v posamezne faze med analizo (44, 49). Menimo, da bi z nadzorovanim dodajanjem kalcijevih ionov lahko dosegli počasnejše obarjanje med lipolizo sproščenih MK, ki se sicer vključujejo v mešane micide s solubilizirano ZU. To bi posledično pomenilo postopno zmanjševanje solubilizacijske kapacitete v sistemu, s čimer bi lahko omejili obsežno obarjanje VAL. V literaturi smo zasledili, da so Zangenberg in sodelavci ugotovili, da je bil delež probukola in danazola v vodni fazi po lipolizi večji, če so v prebavnem mediju povečali koncentracijo žolčnih soli (40). Slednje bi lahko preizkusili tudi na vzorcih z VAL in tako preverili, če na njegovo topnost v vodni fazi lahko vplivamo s količino žolčnih soli. Rezultati, ki smo jih dobili pri vzorcih z VAL, kažejo, da obstoječi dostavni sistem, tako v smislu izbora sestavin kot njihove količine, morda ni bil najbolj primeren. Za razvoj optimalnega sistema bi najprej morali izbrati ustrezne sestavine na podlagi nasičenih topnosti VAL v njih in njihove sposobnosti za solubilizacijo VAL po izpostavitvi prebavnemu mediju. Z načrtovanjem faznega diagrama bi nato določili še razmerja med sestavinami, ki bi omogočala nastanek mikroemulzije (4, 12, 45).

4.2.2 *In vitro* lipoliza samomikroemulgirajočih praškov

V nadaljevanju smo tekoči SMES z ZU adsorbirali na tri različne trdne nosilce, da smo dobili samomikroemulgirajoče praške. Na sliki 15 je grafični prikaz rezultatov, ki smo jih dobili po lipolizi. Pri prašku z Neusilinom[®] US2 smo v vodni fazi izmerili 96,0 % IBU oziroma 10,1 % VAL, pri prašku s Sylsio[®] 350 95,9 % IBU oziroma 7,9 % VAL, po lipolizi praškov s Syloidom[®] 244 FP pa se je sprostil 97,4 % IBU ter 5,7 % VAL. Opazimo lahko, da so bili v splošnem deleži sproščenega IBU oziroma VAL iz praškov podobni kot v primeru tekočega SMES-a, kar je najverjetneje posledica razlogov, ki so bili opisani v prejšnjem podpoglavju. Pri rezultatih za IBU lahko vidimo, da se je sprostil nekaj manj ZU kot pri lipolizi tekočega SMES-a, vendar pa so bile izmerjene vrednosti za vse tri nosilce približno enake. Pri prašku z VAL in Neusilinom[®] US2 se je v vodno fazo sprostil 2,1 % več ZU v primerjavi s tekočim SMES-om, iz praška s Sylsio[®] 350 se je sprostila enaka količina VAL kot iz tekočega SMES-a in pri prašku s Syloidom[®] 244 FP je bilo sproščenega VAL za 2,3 % manj kot pri tekoči formulaciji.



Slika 15: Prikaz deležev sproščenih ZU po lipolizi praškov za tri različne nosilce.

Interakcije, ki se vzpostavijo ob adsorpciji na trdne nosilce, so lahko fizikalne ali kemijske, na podlagi česar govorimo o fizikalni ali kemijski adsorpciji. Medtem ko je fizikalna adsorpcija šibka in reverzibilna, je za kemijsko adsorpcijo značilno, da je močna, ireverzibilna in za nastanek potrebuje visoko aktivacijsko energijo. V prvem primeru se vzpostavijo Van der Waalove in elektrostatske sile, pri kemijski adsorpciji pa se tvorijo kovalentne vezi (50). V kakšni meri bo v nadaljevanju v prebavnem mediju potekla desorpcija ZU in komponent SMES-a s površine trdnega nosilca je odvisno od več

različnih faktorjev, na primer velikosti delcev poroznega nosilca ter velikosti, dolžine in geometrije njihovih por, specifične površine nosilca in celotne kontaktne površine med tekočim SMES-om in nosilcem. Večji delci imajo ožje in daljše pore, s čimer je dostop prebavnega medija oviran in s tem sproščanje adsorbiranih komponent počasnejše. Na delce z manjšo specifično površino se SMES adsorbira v obliki tankega filma in le na zunanje površine, medtem ko pri nosilcih z večjo specifično površino adsorpcija prednostno poteče v notranjosti por. Kadar je kontaktna površina med tekočo formulacijo in trdnim nosilcem velika, lahko v primeru velike afinitete vgrajene ZU do površine nosilca pride do njene kristalizacije, saj se njena topnost ob tvorjenju tankega filma na površini nosilca zmanjša. Zaradi omenjenih razlogov je za boljše vrednotenje trdnih SMES priporočljivo ugotavljanje molekulskih vezi med nosilci in posameznimi sestavinami ter ocenjevanje njihove morebitne nepopolne desorpcije (51).

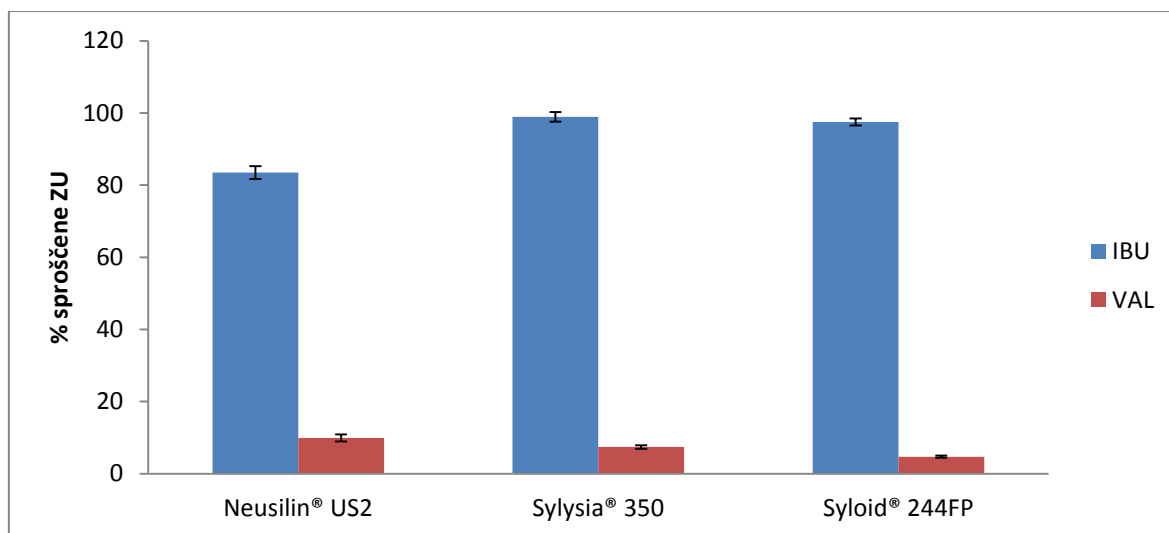
V proučevanem primeru se je med poroznimi nosilci in neionogenimi etoksiliranimi emulgatorji vzpostavila fizikalna adsorpcija, in sicer preko tvorbe vodikove vezi (50). Iz dobljenih rezultatov pri lipolizi praškov lahko sklepamo, da je pri dispergiranju vzorcev v prebavnem mediju prišlo do nepopolne desorpcije emulgatorjev s površine trdnih nosilcev. Slednje potrjujejo nekoliko manjši deleži sproščenega IBU iz praškov v primerjavi s tekočim SMES-om, kar je najverjetneje posledica tega, da je IBU, kot smo že omenili, bolje topen v emulgatorjih in je tako ostal vezan na nosilec. V prejšnjem podpoglavju smo že omenili, da je količina VAL v vodni fazi po lipolizi bolj odvisna od lipidnih komponent SMES-a in ne toliko od emulgatorjev, zaradi česar smo predvidevali, da adsorpcija emulgatorjev na porozne nosilce ne bo vplivala na rezultate. Glede na to, da so bili dobljeni rezultati za praške in tekoči SMES z VAL podobni, lahko potrdimo opisano razlago o nepopolni desorpciji emulgatorjev.

Nepopolno desorpcijo emulgatorjev, Cremophorja[®] EL in Cremophorja[®] RH40, so pri proučevanju SMES-ov z vgrajenim resveratrolom opazili že predhodni raziskovalci na Katedri za farmacevtsko tehnologijo (37). Tudi Speybroeck in sodelavci so med preizkušanjem sproščanja danazola iz trdnih SMES-ov ugotovili, da se je emulgator (Cremophor[®] EL) zadržal na trdnem nosilcu (Neusilin[®] US2), kar je vodilo do zmanjšanja razmerja med emulgatorsko in lipidno fazo v vodnem mediju. Posledično se je zmanjšala sposobnost emulgiranja sistema, oblikovale so se večje kapljice in zmanjšala se je solubilizacijska kapaciteta sistema, kar je povzročilo obsežnejše obarjanje ZU (52).

4.2.3 *In vitro* lipoliza samomikroemulgirajočih tablet

Tekoče in poltrdne formulacije navadno polnimo v želatinske kapsule, pri čemer je ena izmed glavnih slabosti ta, da zaradi volumske omejitve kapsule v kombinaciji z morebitno majhno nasipno gostoto izdelanih praškov ni možno zagotoviti zadostne količine formulacije za doseganje terapevtskega učinka. Izdelava tablet nam omogoča, da kar dva- do trikrat več praška, kot ga lahko polnimo v kapsule, stisnemo v tableto. Poleg tega so pri izdelavi tablet proizvodni postopki cenejši, boljše so sprejete s strani bolnikov in večinoma so tudi bolj stabilne. Glavno pomanjkljivost predstavlja izbira primerne nosilca za izdelavo tablet, saj mora le-ta po adsorpciji lipidne formulacije izkazovati ustrezne pretočne lastnosti in stisljivost. Poleg tega lahko pri tabletiranju pride do iztiskanja adsorbiranih komponent, čas sproščanja je pogosto daljši zaradi vgrajenih hidrofobnih lipidnih komponent in, kot smo že omenili, se v primeru ireverzibilne adsorpcije sestavin na površino nosilcev vgrajena ZU ne more v celoti sprostiti (53).

V nadaljevanju dela nas je zato zanimalo, kakšni bodo rezultati *in vitro* lipolize, če iz že pripravljenih samomikroemulgirajočih praškov izdelamo še samomikroemulgirajoče tablete. Praškom smo dodali ustrezne pomožne snovi in zmes ročno stisnili v tablete. Najprej smo izvedli lipolizo tablet z Neusilinom[®] US2, potem s Sylysio[®] 350 in nazadnje s Syloidom[®] 244 FP. Dobljene rezultate prikazuje spodnja slika.



Slika 16: Deleži ZU, ki so se pri lipolizi tablet, izdelanih s tremi različnimi nosilci, sprostili v vodno fazo.

Pri tabletah z vgrajenim IBU se je v vodno fazo sprostilo 83,5 %, 98,9 % oziroma 97,5 % IBU. Pri tabletah VAL pa je bilo po lipolizi na voljo za absorpcijo 9,9 %, 7,4 % oziroma

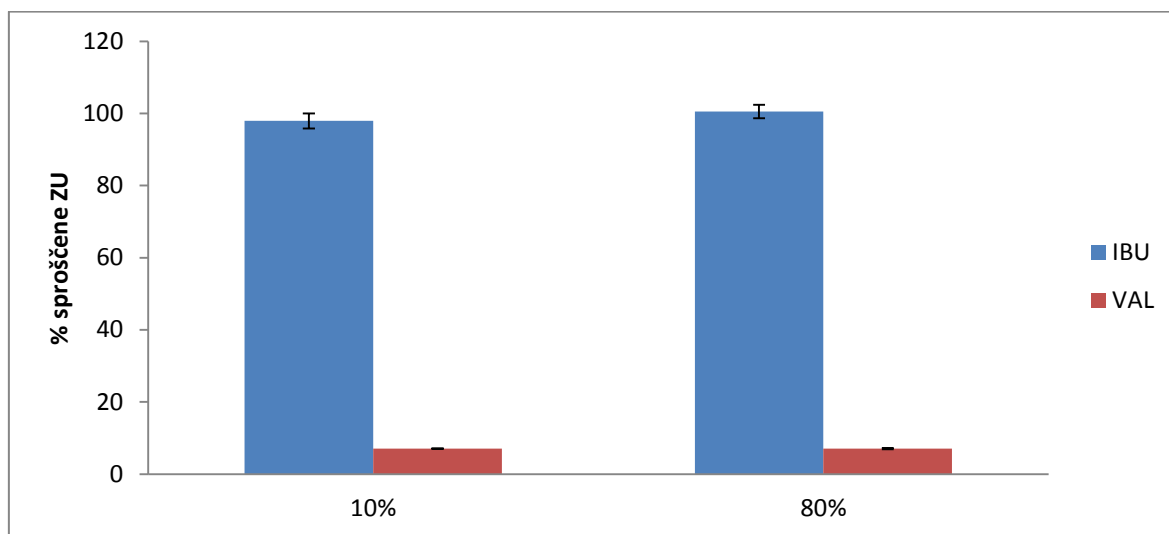
4,7 % od celotne vrednosti vgrajene ZU. Tudi tu vidimo, da se na splošno nadaljuje trend, ki smo ga opazili in opisali že pri predhodnih vzorcih; delež sproščene IBU je namreč veliko večji kot pri VAL. Dobljeni rezultati pri analizi tablet so bili zelo podobni izmerjenim vrednostim pri praških. Le pri tabletah z IBU in Neusilinom[®] US2 smo opazili, da se je sprostilo 12,5 % ZU manj kot v primerjavi s praškom.

Pričakovali smo, da bo sila pri izdelavi tablet potisnila SMES z ZU globlje v pore trdnega nosilca in bomo zaradi tega v vodni fazi po lipolizi izmerili manjše deleže sproščenih ZU v primerjavi s praški. Poleg tega smo že pri analizi praškov pričakovali, da bomo med dobljenimi rezultati opazili večja odstopanja zaradi uporabe treh različnih nosilcev. Sklepali smo, da bomo pri vzorcih s Sylysio[®] 350 in Syloidom[®] 244 FP dobili podobne rezultate, saj sta nosilca kemijsko enaka in se razlikujeta le v velikosti delcev ter njihovih por. Delci Syloida[®] 244 FP so nekoliko večji in imajo ožje pore v primerjavi s Sylysio[®] 350, zaradi česar bi se lahko med lipolizo sprostilo manj ZU (30, 31, 51). Čeprav so bile razlike majhne, smo pri vzorcih z VAL, tako v primeru praškov kot tablet, lahko potrdili prej opisano domnevo. V primeru IBU pa je to veljalo le pri praških, medtem ko smo pri tabletah dobili obratne rezultate. Neusilin[®] US2 je za razliko od drugih dveh nosilcev amorfna oblika magnezijevega aluminometasilikata in je v obliki granul, torej precej večjih delcev z izjemno ozkimi in dolgimi porami (51). Zaradi tega smo pričakovali, da se bo pri lipolizi vzorcev, praškov in tablet, z Neusilinom[®] US2 sprostilo najmanj ZU, saj ozke pore otežujejo dostop prebavnemu mediju. Pri IBU smo to hipotezo potrdili le pri analizi tablet, medtem ko se je Neusilin[®] US2 v primeru VAL izkazal celo kot najboljši nosilec, saj se je tako v primerjavi z drugima dvema nosilcema v obliki praškov in tablet, kot v primerjavi s tekočim SMES-om sprostilo največ ZU.

4.2.4 Analiza vzorcev z različno količino v tekoči SMES vgrajene ZU

Zanimalo nas je tudi, ali na delež ZU, ki je po lipolizi na voljo za absorpcijo, vpliva sama količina ZU, ki jo vgradimo v tekoči SMES. Slednje smo ovrednotili s pomočjo vzorcev, ki smo jih pripravili tako, da smo v SMES vgradili manjšo količino ZU (izbrali smo količino ZU, ki je ustrezala 10 % ugotovljene nasičene topnosti ZU v SMES) in večjo količino ZU (80 % nasičene topnosti). Pri izboru količine ZU smo pazili, da je bila le-ta dovolj velika, da smo lahko natehtali vzorec ter da smo po meritvi na HPLC-ju dobili odziv, ki je ustrezal linearnemu območju določene umeritvene premice. Po reakciji smo ugotovili, da se je v primeru vgradnje manjše količine ZU iz sistema sprostilo 97,9 % IBU

oziroma 7,0 % VAL, iz vzorcev z večjo količino ZU pa se je sprostil 100 % IBU oziroma 7,1 % VAL (slika 17).



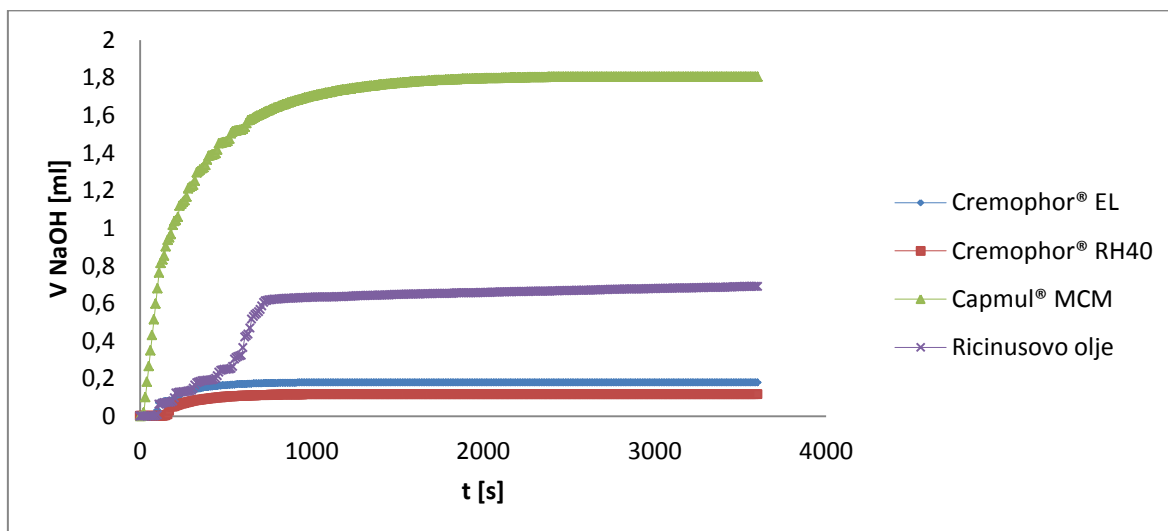
Slika 17: Prikaz odstotkov sproščenih ZU pri lipolizi tekočega SMES-a glede na vgraditev različnih mas ZU.

Larsen in sodelavci so izvedli podoben preizkus s cinarizinom ter ugotovili, da večji kot je bil delež vgrajene ZU v vzorcu oziroma manjši kot je bil delež lipidnega dostavnega sistema, hitreje in v večjem obsegu se je ZU med lipolizo začela obarjati. Prišli so do zaključkov, da je bilo v vzorcih z več vehikla treba več časa, da se je solubilizacijska kapaciteta zaradi razgradnje lipidne formulacije zmanjšala. Hkrati se je pri tem sprostilo več razpadnih produktov lipolize, ki so se lahko vgradili v mešane micelle in ohranili ZU v solubilizirani obliki (54). Znano je tudi, da se pri sistemih, ki so bolj nasičeni z ZU, začne obarjanje slednje že ob minimalnem zmanjšanju solubilizacijske kapacitete nosilnega sistema (10, 44). V skladu z opisanima razlagama smo pričakovali, da bomo pri vzorcih, v katere smo vgradili manjšo količino ZU, izmerili večji delež le-te v vodni fazi po reakciji. Iz dobljenih rezultatov lahko vidimo, da je bil delež sproščenih ZU v obeh primerih skoraj enak in so bila odstopanja minimalna. Iz teh ugotovitev lahko zaključimo, da tako v primeru IBU kot VAL delež ZU, ki se je po lipolizi sprostil iz dostavnega sistema, ni bil odvisen od vgrajene količine ZU v SMES.

4.2.5 *In vitro* lipoliza VAL v posameznih komponentah tekočega SMES-a

Zaradi nizke vsebnosti VAL, ki smo jo izmerili po analizi vseh vzorcev, smo se odločili za izvedbo dodatnih meritev, in sicer smo VAL vgradili v posamezne sestavine tekočega SMES-a, ki smo jih nato ovrednotili z izvedbo *in vitro* lipolize.

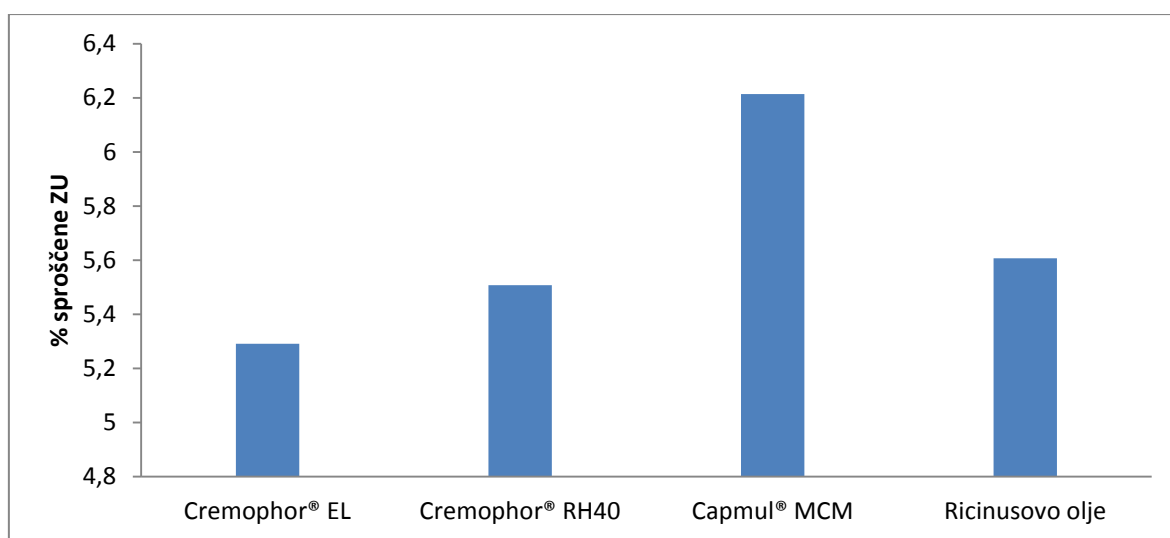
S slike 18 lahko iz porabe titranta v odvisnosti od časa razberemo potek lipolize za posamezne komponente SMES-a. Reakcija je najhitreje potekala pri Capmulu[®] MCM, kar vidimo iz začetnega strmega naklona zelene krivulje. Nekoliko počasneje in v manjšem obsegu je potekala hidroliza druge lipidne komponente, ricinusovega olja. Ti rezultati se ujemajo z literaturnimi podatki, saj ima pankreasna lipaza večjo afiniteto do srednjeveržnih TG v primerjavi z dolgoveržnimi, zaradi česar poteče lipoliza prvih hitreje ter v večjem obsegu (10). Nizka poraba titranta v primeru obeh emulgatorjev kaže na to, da sta bila tudi slednja substrata za encimsko razgradnjo. Razgradnja je posledica esterskih vezi v njihovih strukturah, pri čemer je Cremophor[®] EL lipolizi bolj podvržen kot Cremophor[®] RH40. Predvidevajo, da je vzrok za razlike v prebavljivosti obeh komponent njuna izdelava, saj naj bi hidrogenirano ricinusovo olje, ki ga uporabljajo pri sintezi Cremophorja[®] RH40, drugače reagiralo s polietilen-oksikom v primerjavi s polietoksilacijo nenasičenega ricinusovega olja pri izdelavi Cremophorja[®] EL. Poleg tega naj bi pri slednjem, zaradi manjše vsebnosti etilen-oksida v strukturi, lipaza lažje dostopala do reakcijskih mest (3).



Slika 18: Prikaz poteka *in vitro* lipolize posameznih komponent tekočega SMES-a z vgrajenim VAL.

Po lipolizi posameznih komponent tekočega SMES-a z vgrajenim VAL smo ugotovili, da se je največ ZU sprostil iz Capmula[®] MCM, in sicer 6,2 %. Iz ricinusovega olja se je sprostil 5,6 % VAL, iz Cremophorja[®] RH40 5,5 % ter iz Cremophorja[®] EL 5,3 % ZU (slika 19).

Ugotovili smo, da se je v vseh štirih primerih iz posameznih komponent sprostilo manj VAL v primerjavi s tekočim SMES-om, kar kaže na to, da je za ohranjanje zadostne solubilizacijske kapacitete med lipolizo nujna kombinacija ustrezno izbranih lipidnih in emulgatorskih komponent. V skladu s predpostavko, ki smo jo opisali v podpoglavju 4.2.1, smo pričakovali, da bo v primeru vgradnje VAL v Capmul® MCM delež sproščene ZU najmanjši. Vzrok, da temu ni bilo tako, je najverjetneje v sami količini lipidov. Ker je bil delež slednjih v vzorcu tako velik, je encimska razgradnja potekala počasneje, zaradi česar se je tudi solubilizacijska kapaciteta medija zniževala bolj postopno. To je vodilo v bolj nadzorovano in manjše obarjanje VAL v primerjavi z drugimi vzorci.

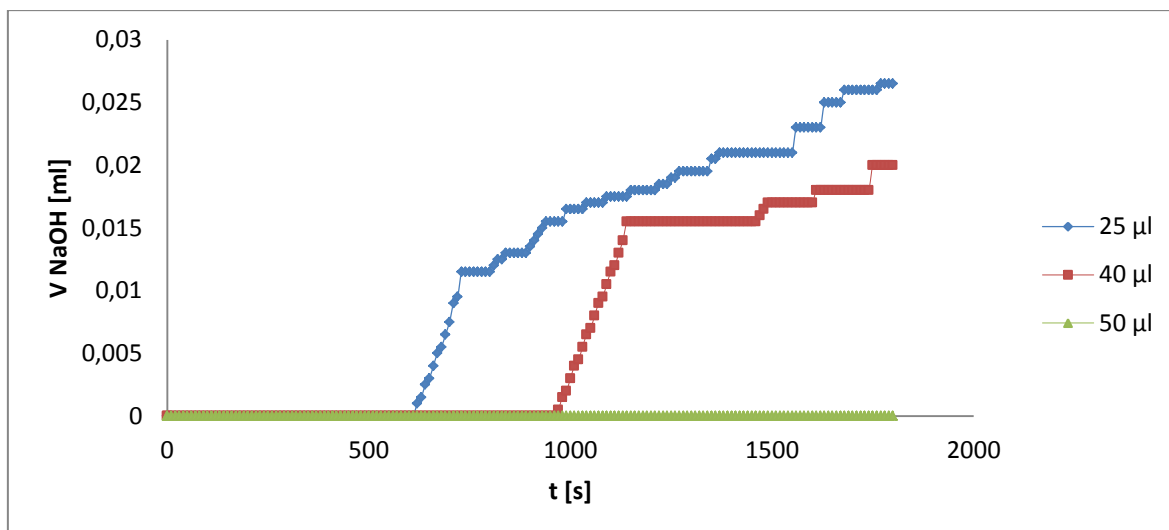


Slika 19: Deleži sproščene VAL pri vgradnji le-tega v posamezne komponente tekočega SMES-a.

4.3 USTAVLJANJE LIPOLIZE V ČASOVNIH TOČKAH

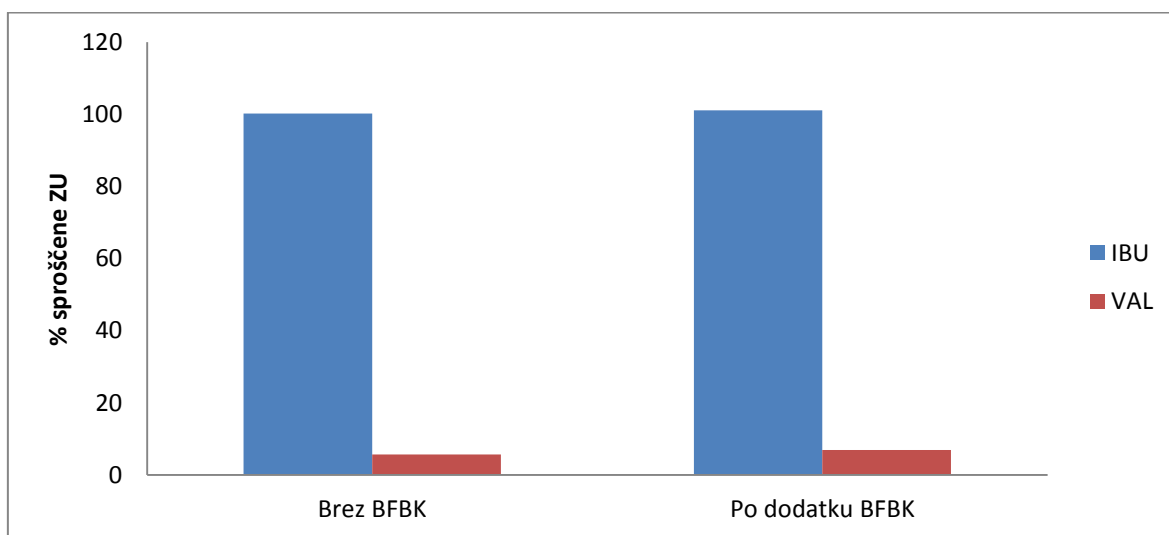
4.3.1 Ugotavljanje količine BFBK za inhibicijo pankreasne lipaze

Lipolizo smo ustavljali z 1 M metanolno raztopino BFBK. Količino inhibitorja za zaustavitev delovanja encima, smo ugotovili tako, da smo reakcijski zmesi dodajali naraščajoče količine le-tega in hkrati merili aktivnost pankreasne lipaze. Iz spodnjega grafičnega prikaza vidimo, da smo popolno neaktivnost encima dosegli ob dodatku 50 μ l raztopine BFBK. Pri pripravi raztopine inhibitorja smo imeli nekaj težav, saj se je zaradi izhlapevanja metanola BFBK obarjala. Raztopino smo zato vedno pripravljali sproti, z njo ravnali čim hitreje in jo do odvzema posameznih vzorcev shranili v dobro zaprte eppendorf epruvetke.



Slika 20: Primerjava vpliva različnih količin BFBK na delovanje lipaze.

Preden smo začeli z meritvami, smo še preverili, če dodatek BFBK k reakcijski zmesi vpliva na delež ZU, ki ga po lipolizi izmerimo v vodni fazi, kar je prikazano na sliki 21. To smo ugotovili tako, da smo izvedli dve neodvisni lipolizi za vsako ZU posebej, pri čemer smo po koncu druge vzorcu dodali raztopino inhibitorja. Pri preizkušanju IBU smo vsakič ugotovili 100 % vsebnost v vodni fazi. Ko smo merili delež sproščene VAL, pa sta se ugotovljeni vrednosti razlikovali le za 1,2 %, in sicer smo pri lipolizi tekočega SMES-a izmerili 5,7 % ZU, po dodatku BFBK pa 6,9 %. Dobljeni rezultati potrjujejo, da inhibitor ni imel vpliva na količino ZU, ki se je med analizo sprostila iz formulacije.



Slika 21: Deleži sproščene IBU in VAL po lipolizi tekočega SMES-a brez in z dodatkom BFBK.

4.3.2 Lipoliza tekočega SMES-a z ZU v posameznih časovnih točkah

Prikaz poteka lipolize z ustavljanjem le-te v posameznih časovnih točkah je bil glavni namen raziskovalnega dela. Potek same reakcije je bil za obe ZU popolnoma enak kot pri predhodnih vzorcih, le da smo iz reakcijske zmesi v različnih časovnih točkah odvzemali vzorce, ki smo jih dodali k raztopini inhibitorja. Ko smo aktivirali metodo, smo v prvih petih minutah reakcije vzorce odvezli vsako minuto, saj je glavnina lipolize potekla v prvih petih do desetih minutah po dodatku encima (10). V nadaljevanju smo odvezemali vzorce vsakih pet oziroma deset minut. Po koncu meritve smo vzorcem s HPLC metodo izračunali površino pod krivuljo, iz katere smo lahko ugotovili delež sproščene ZU med lipolizo. Pri izračunu smo upoštevali, da smo z vsakim odvzetim vzorcem zmanjšali volumen reakcijske zmesi in količino celotne ZU, kar prikazuje spodnji izračun.

Primer izračuna 5- Prikaz računanja deležev sproščenega IBU v prvih dveh časovnih točkah med in vitro lipolizo

$$A_1 = 1730,06$$

$$\text{Faktor redčitve} = 10$$

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

$$m (\text{začetna natehta IBU}) = 25,034 \text{ mg}$$

$$V (\text{odvzeti vzorec}) = 1,2 \text{ ml}$$

$$c_1 (\text{IBU}) = \frac{A + 19,88}{41060} \times 10 = \frac{1730,06 + 19,88}{41060} \times 10 = 0,4262 \text{ mg/ml}$$

$$m_1 (\text{IBU}) = c_1 (\text{IBU}) \times V (\text{medija}) = \frac{0,4262 \text{ mg}}{\text{ml}} \times 40 \text{ ml} = 17,048 \text{ mg}$$

$$\%_1 (\text{IBU}) = \frac{m_1 (\text{IBU})}{m (\text{začetna natehta IBU})} \times 100 \% = \frac{17,048 \text{ mg}}{25,034 \text{ mg}} \times 100 \% = 68,1 \%$$

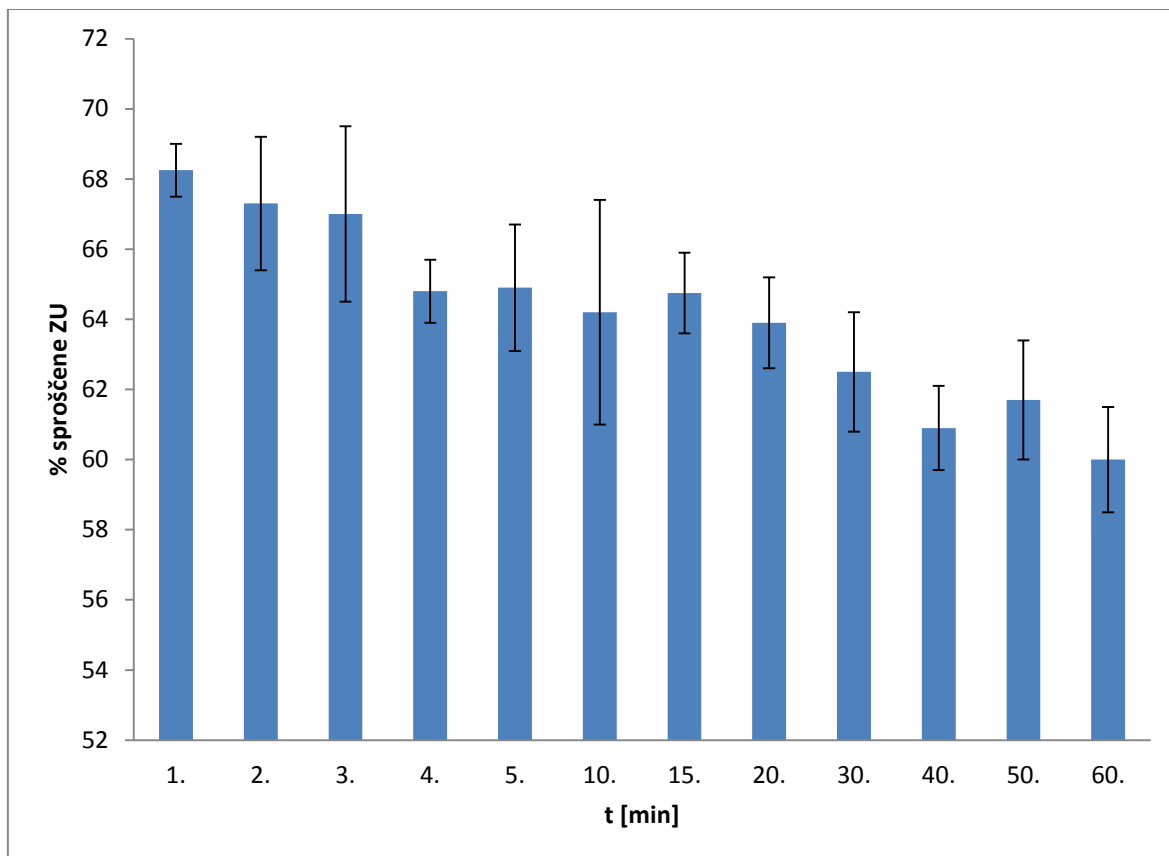
$$A_2 = 1752,30$$

$$c_2 (\text{IBU}) = 0,4316 \text{ mg/ml}$$

$$\begin{aligned} m_2 (\text{IBU}) &= c_2 (\text{IBU}) \times (V (\text{medija}) - V (\text{odvzeti vzorec})) = \frac{0,4316 \text{ mg}}{\text{ml}} \times 38,8 \text{ ml} \\ &= 16,746 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \%_2 (\text{IBU}) &= \frac{m_2 (\text{IBU})}{(m (\text{začetna natehta IBU}) - m (\text{IBU v prvem vzorcu}))} \times 100 \\ &= \frac{16,746 \text{ mg}}{\left(25,034 - \left(\frac{1,2 \text{ ml} \times 17,048 \text{ mg}}{40 \text{ ml}}\right)\right)} \times 100 \% = 68,3 \% \end{aligned}$$

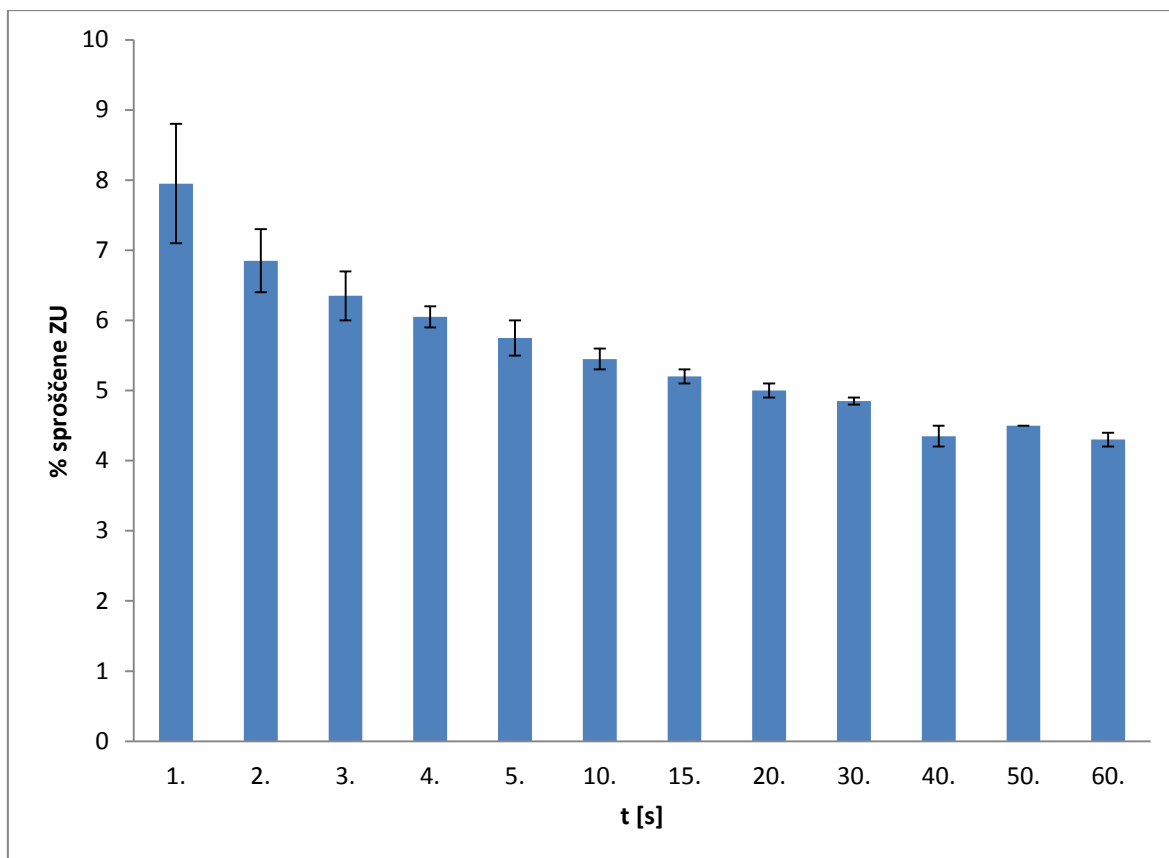
Na sliki 22 je grafični prikaz rezultatov, ki smo jih pridobili med lipolizo tekočega SMES-a z IBU. Delež ZU, ki smo ga izmerili v vodni fazi, se je med reakcijo postopno zniževal, in sicer smo po prvi minuti izmerili 68,3 % ZU, ob koncu meritve, po eni uri, pa je bilo sproščenega IBU le še 60 %.



Slika 22: Grafični prikaz deležev sproščenega IBU v posameznih časovnih točkah med lipolizo tekočega SMES-a.

Tudi pri vzorcih z VAL, ki so prikazani na sliki 23, smo opazili, da se je količina ZU v vodni fazi v odvisnosti od časa lipolize zmanjševala. V prvem primeru smo izmerili 8,0 % sproščene ZU, medtem ko je bilo v zadnjem vzorcu le še 4,3 % VAL.

Z ustavljanjem *in vitro* lipolize v posameznih časovnih točkah lahko dobimo vpogled v porazdeljevanje ZU med oljno in vodno fazo ter njeno morebitno obarjanje. Številni znanstveniki so v svojih delih opisali, da so med izvajanjem lipolize opazili, da se je količina ZU v vodni fazi med reakcijo zmanjševala in z analizo sedimenta potrdili, da je delež slabo vodotopne ZU v njem naraščal, kar je tudi v skladu z našimi rezultati (10, 40, 44, 49, 54, 55).



Slika 23: Prikaz deležev VAL v vodni fazi v posameznih časovnih točkah med lipolizo.

Glavni vzrok, ki je vplival na razliko med izmerjenimi deleži sproščenega IBU oziroma VAL je bil, kot smo že omenili v prejšnjih podpoglavjih, da so produkti, ki so se sprostili ob encimski razgradnji sistema, izkazovali različno solubilizacijsko kapaciteto za posamezno ZU. Zaradi lipolize formulacije se je delež oljne faze postopno zmanjševal in je postajala vedno bolj nasičena z ZU. To je vodilo v prehod ZU iz oljne faze v micelne vodne faze, pri čemer se je IBU vanje vgradil, VAL pa se je zaradi premajhne solubilizacijske kapacitete micelov oboril. Kljub temu smo ob koncu lipolize v primeru, ko smo med meritvijo v časovnih točkah odzimali vzorce, izmerili precej nižjo vsebnost obeh ZU v primerjavi z deležem, ki smo ga ugotovili, če smo izvedli le meritev po koncu reakcije. Predvidevamo, da je do tega prišlo zaradi samega odvzemanja vzorcev iz reakcijske zmesi. Pri vsakokratnem vzorčenju smo tako ne le zmanjšali volumen zmesi in količino vgrajene ZU, ampak smo odvzeli tudi del lipidne formulacije oziroma njenih razpadnih produktov, s čimer smo še dodatno zmanjšali solubilizacijsko kapaciteto medija in s tem povečali obseg obarjanja ZU, kar se je izrazilo s padajočim trendom vsebnosti ZU v vodni fazi. Poleg tega je možno tudi, da se je pri vzorčenju manjši del odvzetega vzorca zadržal znotraj pipete in smo tako izmerili nekoliko nižjo vsebnost ZU.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo z metodo *in vitro* lipolize ovrednotili tekoče in trdne (praški in tablete) SMES-e z vgrajenima slabo vodotopnima učinkovinama, IBU in VAL. S tekočimi vzorci smo z uporabo inhibitorja encima lipaze izvedli še ustavljanje lipolize v posameznih časovnih točkah. Iz dobljenih rezultatov smo povzeli naslednje ugotovitve:

- V na lipidih osnovan dostavni sistem vgrajeni ZU in uporabljeni trdni nosilci ter pomožne snovi za tabletiranje niso imeli vpliva na končni obseg encimske razgradnje sestavin formulacije, saj so si bili dobljeni profili lipoliz med seboj skoraj enaki. Opazili smo le, da je v primeru praškov in še toliko bolj v primeru tablet lipoliza na začetku potekala počasneje, kar je posledica oteženega dostopa encima zaradi adsorpcije sestavin tekočega SMES-a v notranjost por nosilcev.
- Pri vseh vzorcih smo ob aktivaciji metode z dodatkom pankreatina opazili hitro in obsežno začetno lipolizo. Da je glavna reakcija potekla znotraj prvih petih minut od začetka meritve, smo razbrali iz začetnega strmega naklona krivulje, ki je prikazovala porabo titranta v odvisnosti od časa analize.
- S primerjavo deleža sproščenih ZU, ki smo jih po koncu lipolize izmerili v vodni fazi, smo opazili ponavljajoči se trend, in sicer je bil delež IBU v vseh primerih bistveno večji kot delež VAL. Menimo, da je bil vzrok za razliko v tem, da so razpadni produkti, ki so se sprostili med lipolizo komponent SMES-a, izkazovali različno solubilizacijsko kapaciteto za posamezno ZU. V primeru VAL tako nastali produkti niso v zadostni meri kompenzirali izgube solubilizacijske kapacitete zaradi razpada lipidnega vehikla, kar je vodilo do njegovega obsežnega obarjanja.
- Pri analizi praškov z IBU med posameznimi nosilci nismo opazili razlik, se je pa v vseh treh primerih sprostilo manj ZU kot iz tekočega SMES-a. Pri vzorcih z VAL je bilo zanimivo, da se je iz praška z Neusilinom[®] US2 sprostilo celo več ZU kot pri tekočem SMES-u. Delež izmerjenega VAL pri lipolizi praškov s Sylysio[®] 350 in Syloidom[®] 244FP je bil primerljiv oziroma nekoliko nižji kot pri tekočem vzorcu.
- Rezultati, ki smo jih dobili po analizi tablet, so se le malo razlikovali od rezultatov pri preizkušanju praškov za obe ZU. Odstopanje smo opazili le v primeru tablet z IBU in Neusilinom[®] US2, saj se je sprostilo precej manj IBU kot iz praška z enako sestavo.

- Med uporabljenimi trdnimi nosilci in emulgatorskima komponentama SMES-a je pri izdelavi praškov in tablet preko vzpostavitve vodikove vezi prišlo do fizikalne adsorpcije. Ugotovili smo, da se emulgatorja po dispergiranju vzorcev v prebavnem mediju nista v celoti desorbirala s površine nosilcev. Slednje smo lahko potrdili z dobljenimi rezultati, saj smo pri vzorcih z IBU za vse uporabljene nosilce, tako v primeru praškov kot tablet, izmerili nižjo vsebnost ZU v vodni fazi, kar je posledica tega, da je IBU bolje topen v emulgatorjih kot v oljni fazi dostavnega sistema in je zaradi tega ostal vezan na nosilec.
- Pričakovali smo, da se bodo rezultati praškov in tablet z nosilcem Neusilinom[®] US2 razlikovali od vzorcev, pripravljenih z drugima dvema nosilcema, saj se prvi kemijsko razlikuje od slednjih, ki sta si različna le po velikosti delcev. Rezultati, ki smo jih dobili, so bili zelo zanimivi: pri praških in tabletah z VAL sta bila deleža sproščene ZU enaka in se je nosilec Neusilin[®] US2 izkazal kot najboljši v primerjavi z drugima. Pri praških z IBU smo za vse tri nosilce dobili enake rezultate, medtem ko smo pri tabletah opazili, da se je v primeru Neusilina[®] US2 sprostilo najmanj IBU.
- Ugotovili smo, da količina vgrajenega IBU oziroma VAL v tekoči SMES ni imela vpliva na delež ZU, ki se je med lipolizo sprostil v vodno fazo, saj je bil rezultat vedno enak, ne glede na nasičenost sistema z ZU.
- Pri preizkušanju vzorcev, ki smo jih pripravili tako, da smo VAL vgradili v posamezne sestavine tekočega SMES-a, smo potrdili, da je imela kombinacija oljne in emulgatorske faze boljšo solubilizacijsko kapaciteto za slabo vodotopno ZU, kot so jo imele posamezne komponente.
- Z uporabo BFBK smo uspešno zaustavili delovanje pankreasne lipaze in izvedli ustavljanje lipolize v posameznih časovnih točkah. Ugotovili smo, da se je vsebnost IBU oziroma VAL v vodni fazi med analizo zmanjševala in da je bila tudi zadnja izmerjena vrednost nižja, kot če smo izvedli lipolizo brez vmesnega vzorčenja. Predvidevamo, da je to posledica tega, da smo z vsakim vzorčenjem poleg zmanjšanja volumna reakcijske zmesi in celotne količine ZU odvzeli tudi del lipidnega sistema oziroma njegovih razpadnih produktov, s čimer smo zaradi zmanjšanja solubilizacijske kapacitete zmesi povečali obarjanje ZU.
- Na osnovi dobljenih rezultatov zaključujemo, da uporabljeni dostavni sistem ni bil enako ustrezen oziroma učinkovit za obe modelni ZU. Glede na izmerjene

vrednosti, ki smo jih dobili pri vseh vzorcih z VAL, smo sklepali, da same sestavine tekočega SMES-a oziroma razmerja med njimi niso bila najbolj optimalna za izbrano ZU. Kljub temu, da smo pri IBU dobili boljše rezultate in da naj bi z metodo *in vitro* lipolize dobro posnemali dogajanje v organizmu, bi bilo za celostno in popolno vrednotenje obeh sistemov treba izvesti še *in vivo* preizkuse.

- Pri proučevanju trdnih SMES-ov smo dobili precej raznolike rezultate, ki smo jih težko ovrednotili in primerjali med seboj. Za uspešen razvoj trdnih na lipidih osnovanih dostavnih sistemov bi bilo v prihodnje treba dodatno raziskati mehanizme adsorpcije pomožnih snovi dostavnih sistemov na trdne porozne nosilce.
- Posledica naraščajočega števila slabo vodotopnih ZU je tudi vse večje zanimanje za njihovo vgradnjo v na lipidih osnovane dostavne sisteme. Zaradi raznolikosti slednjih, raznovrstnosti pomožnih snovi, ki jih lahko uporabimo za njihovo izdelavo in kompleksnosti procesov, ki so jim omenjeni sistemi izpostavljeni po peroralni aplikaciji, menimo, da bo v prihodnje treba posebno pozornost nameniti nadaljnjemu razvoju metod *in vitro* lipolize.

6. LITERATURA

- 1.) Mu H, Holm R, Müllertz A: Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2013; 453: 215-224.
- 2.) Kalepu S, Manthina M, Padavala V: Oral lipid-based drug delivery system – an overview. *Acta Pharm. Sin. B* 2013; 3: 361-372.
- 3.) Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN: Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 673-691.
- 4.) Hauss DJ: Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59: 667-676.
- 5.) Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farmaceutski vestnik* 2008; 59: 263-268.
- 6.) Rahman MDA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Iqbal Z: Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013; 39: 1-19.
- 7.) Pouton CW, Porter CJH: Formulations of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 625-637.
- 8.) Pouton CW: Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 29: 278-287.
- 9.) Porter CJH, Charman WN: In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 50: S127-S147.
- 10.) Larsen AT, Sassene P, Müllertz A: *In vitro* lipolysis models as a tool for the characterization for oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2011; 417: 245-255.
- 11.) Mahendrabhai MM, Bharatbhai KN: Newer Approches To Self Emulsifying Drug Delivery System. *J. Pharm. Res.* 2011; 4: 2639-2642.
- 12.) Pathak CV, Gujranthi NA, Rane BR, Pawar SP: A review on self microemulsifying drug delivery system. *Pharma Science Monitor – Int. J. Pharm. Sci.* 2013; 4: 3628-3648.

- 13.) Thomas N, Holm R, Rades T, Müllertz A: Characterising Lipid Lipolysis and Its Implication in Lipid-Based Formulation Development. *AAPS J.* 2012; 14: 860-871.
- 14.) Wilde PJ, Chu BS: Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2011; 165: 14-22.
- 15.) McClements DJ, Li Y: Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* 2010; 1: 32-59.
- 16.) Bolko K, Zvonar A, Gašperlin M: Simulating the Digestion of Lipid-based Drug Delivery Systems (LBDDS): Overview of *In Vitro* Lipolysis Models. *Acta Chim. Slov.* 2014; 61: 1-10.
- 17.) Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L: A dynamic *in vitro* lipolysis model I. Controlling the rate of lipolysis of continuous addition of calcium. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 14: 115-122.
- 18.) Cambre JN, Sumerlin BS: Biomedical application of boronic acid polymers. *Polymer* 2011; 52: 4631-4643.
- 19.) Varagić VM, Milošević MP: *Farmakologija*, XXIII. izd., Elit Medica, Beograd, 2012: 224-227.
- 20.) Elektronski vir: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050> (dostop 26.11.2014)
- 21.) Bushra R, Aslam N: An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med. J.* 2010; 25: 155-161.
- 22.) Beg S, Swain S, Singh HP, Patra CH, Rao MEB: Development, Optimization, and Characterization of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Valsartan Using Porous Carriers. *AAPS PharmaSciTech* 2012; 13: 1416-1427.
- 23.) Elektronski vir: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00177> (dostop 26.11.2014)
- 24.) Sharma G, Khattry S, Arora S: Formulation and characterization of liquid compact of valsartan. *J. Pharm. Res.* 2012; 5: 4158-4162.
- 25.) Elektronski vir: http://www.abiteccorp.com/wp-content/files_mf/1392129289CapmulMCMEPTDSI10.pdf (dostop 27.11.2014)
- 26.) Elektronski vir: http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/TechnicalInformations/EN/PharmaSolutions/EMP030711e_CremophorEL.pdf (dostop 27.11.2014)
- 27.) Elektronski vir: http://www.pharmaceuticals.basf.com/Statements/TechnicalInformations/EN/PharmaSolutions/03_030713e_CremophorRH40.pdf (dostop 27.11.2014)

- 28.) Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, Chicago, 2009: 126-127, 129-133, 404-407.
- 29.) Elektronski vir: http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusimin.pdf
(dostop 27.11.2014)
- 30.) Elektronski vir: http://www.adymis.com/files/project_3641/GRACE_Davisil_Silica/M309_Syloid_F_P_silica.pdf (dostop 28.11.2014)
- 31.) Elektronski vir: <http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Tech-Data-Sheet-SYLYSIA-350.pdf> (dostop 27.11.2014)
- 32.) Elektronski vir: <http://www.fmcbiopolymer.com/portals/pharm/content/docs/acdisolmsds.pdf> (dostop 28.11.2014)
- 33.) Elektronski vir: http://www.fmcbiopolymer.com/portals/pharm/content/docs/fmc_acdisol_brochure_final2.pdf (dostop 28.11.2014)
- 34.) Elektronski vir: <http://www.fmcbiopolymer.com/portals/pharm/content/docs/avicelphmsds.pdf>
(dostop 28.11.2014)
- 35.) Elektronski vir: <http://www.signetchem.com/Signet-The-Complete-Excipients-Company-Product-Avicel-PH> (dostop 26.11.2014)
- 36.) Elektronski vir: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_050602e_Kollidon%20VA%2064_VA%2064%20Fine.pdf (dostop 28.11.2014)
- 37.) Žiberna T: Stabilnost resveratrola v trdnih samomikroemulgirajočih sistemih. Magistrska naloga 2014. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
- 38.) Ivković T: Formulation and evaluation of drug loaded polycaprolactone nanofibers. Magistrska naloga 2014. Univerza v Zagrebu, Fakulteta za farmacijo in biokemijo.
- 39.) Jović S: Vpliv topnosti učinkovin na sproščanje iz samomikroemulgirajočih sistemov *in vitro*. Magistrska naloga 2015. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

- 40.) Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L: A dynamic in vitro lipolysis model II: Evaluation of the model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 14: 237-244.
- 41.) Alvarez C, Nunez I, Torrado JJ, Gordon J, Potthast H, Arieta AG: Investigation on the Possibility of Biowaivers for Ibuprofen. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100: 2343-2349.
- 42.) Hu L, Yang J, Liu W, Li L: Preparation and evaluation of ibuprofen-loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability. *Drug Delivery* 2011; 18: 90-95.
- 43.) Beg S, Swain S, Singh HP, Patra CN, Rao MEB: Development, Optimization, and Characterization of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Valsartan Using Porous Carriers. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13: 1416-1427.
- 44.) Sassene PJ, Knopp MM, Hesselkilde JZ, Koradia V, Larsen A, Rades T, Müllertz A: Precipitation of a Poorly Soluble Model Drug during *In Vitro* Lipolysis: Characterization and Dissolution of the Precipitate. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99: 4982-4991.
- 45.) Shahu SG, Wadetwar RN, Dixit GR: Development of Microemulsion for Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drug Valsartan. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2013; 22: 246-251.
- 46.) Kang MJ, Jung SY, Song WH, Park JS, Choi SU, Oh KT, Choi HK, Choi YW, Lee J, Lee BJ, Chi SC: Immediate release of ibuprofen from Fujicalin[®]-based fast-dissolving self-emulsifying tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2011; 37: 1298-1305.
- 47.) Roni MA, Jalil R: Comparative Study of Ibuprofen Solubility in Synthetic and Natural Lipid Vehicles. *Dhaka Universal Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 10: 65-66.
- 48.) Saritha D, Bose PSC, Nagaraju R: Formulation and evaluation of self emulsifying drug delivery system (SEDDS) of ibuprofen. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2014; 5: 3511-3519.
- 49.) Larsen A, Holm R, Pedersen ML, Müllertz A: Lipid-based Formulations for Danazol Containing a Digestible Surfactant, Labrafil M2125CS: *In Vivo* Bioavailability and Dynamic *In Vitro* Lipolysis. *Pharm. Res.* 2008; 25: 2769-2777.
- 50.) Somasundaran P, Krishnakumar S: Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 1997; 123-124: 491-513.

- 51.) Tan A, Rao S, Prestidge CA: Transforming Lipid-Based Oral Drug Delivery Systems into Solid Dosage Forms: An Overview of Solid Carriers, Physicochemical Properties, and Biopharmaceutical Performance. *Pharm. Res.* 2013; 30: 2993-3017.
- 52.) Speybroeck MV, Williams HD, Nguyen TH, 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: 2750-2760.
- 53.) Gumaste SG, Dalrymple DM, Serajuddin ATM: Development of Solid SEDDS, V: Compaction and Drug Release Properties of Tablets Prepared by Adsorbing Lipid-Based Formulation onto Neusilin[®] US2. *Pharm. Res.* 2013; 30: 3186-3199.
- 54.) Larsen AT, Akesson P, Jureus A, Saaby L, Rmaileh RA, Abrahamsson B, Ostergaard J, Müllertz A: Bioavailability of Cinnarizine in Dogs: Effect of SNEDDS Loading Level and Correlation with Cinnarizine Solubilization During *In Vitro* Lipolysis. *Pharm. Res.* 2013; 30: 3101-3113.
- 55.) Christophersen PC, Christiansen ML, Holm R, Kristensen J, Jacobsen J, Abrahamsson B, Müllertz A: Fed and fasted state gastro-intestinal *in vitro* lipolysis: *In vitro in vivo* relations of conventional tablet, a SNEDDS and solidified SNEDDS. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 57: 232-239.