



Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – гр. Варна
Факултет „Фармация“

Ивайло Константинов Пехливанов

**Самоемулгиращи лекарстводоставящи системи като метод за
повишаване на интестиналната проницаемост на натриев
алендронат**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

по докторска програма

**„Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“,
професионално направление 7.3. „Фармация“**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Проф. Калоян Георгиев, д.ф.н.

Доц. Величка Андонова, д.ф.

Варна, 2025 г.

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет на Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет „Фармация“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, състоял се на 06.06.2025 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Доц. Мая Петрова Радева-Илиева, д.ф., Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет по фармация, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, Председател на Научното жури;
2. Доц. Вилиана Едуардова Гуглева, Катедра „Фармацевтични технологии“, Факултет по фармация, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

Външни членове:

3. Проф. Милен Венциславов Димитров, д.ф., Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“, Факултет по фармация, Медицински университет – София;
4. Проф. Крум Стефанов Кафеджийски, д.ф., Катедра „Фармацевтични науки“, Медицински колеж, Тракийски университет – Стара Загора.
5. Доц. Христо Цачев Цачев, д.ф., Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“, Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – София.

Резервни членове:

6. Проф. Бистра Костова, д.ф., Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“, Факултет по фармация, Медицински университет – София;
7. Доц. Надежда Руменова Къркеселян, д.ф., Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет по фармация, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Дисертационният труд съдържа 140 стандартни страници и е онагледен с 33 таблици и 33 фигури. Библиографията се състои от 301 източника, от които 1 на кирилица и 300 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 11.09.2025 г. от 11:30 часа в on-line платформата Webex.

Материалите по защитата са на разположение и са публикувани на интернет страницата на МУ – Варна.

Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
1. Цел	7
2. Задачи	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Материали	8
2. Използвана апаратура	9
3. Методи	10
3.1. UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на алендронат натрий	10
3.2. Разтворимост на NaALD в липиди и определяне на разпределителния коефициент вода/масло (K_{distr})	11
3.3. Солубилизиране на NaALD в повърхностно активни вещества	12
3.4. Изследване на ХЛР на първичната емулсия В/М	13
3.5. Псевдотрифазови диаграми	13
3.6. Изследване влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия PE1	13
3.7. Приготвяне на моделни състави на ДСЕЛДС–NaALD	14
3.8. Оценка на термодинамична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD	16
3.9. Време за самоемулгиране на ДСЕЛДС–NaALD	16
3.10. Оценка на размера на капките след диспергиране на ДСЕЛДС–NaALD	17
3.11. Оценка на съвместимост	17
3.12. Реологични изследвания	17
3.13. Фармакопейни тестове за контрол на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС–NaALD и <i>in-vitro</i> охарактеризиране	18
3.14. Изследване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar	20
3.15. Статистически анализ	24
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	25
1. UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на NaALD	25
1.1. Избор на дължина на вълната	25
1.2. Валидиране на UV/Vis спектрофотометричния метод за количествено определяне на NaALD	26
1.3. Влияние на polysorbate 80 върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe	28
1.4. Влияние на фосфатите в средата за разтваряне върху образуването на комплекса ALD/Fe и абсорбционните му спектри	29
2. Оптимизиране състава на ДСЕЛДС с включен NaALD	30
2.1. Разтворимост на NaALD в липиди и определяне на разпределителния коефициент вода/масло (K_{distr})	30
2.2. Солубилизиране на NaALD в повърхностно активни вещества	31
2.3. Определяне на критично ХЛР на първичната емулсия В/М	32
2.4. Псевдотрифазови диаграми за определяне на оптималното количество на хидрофилен емулгатор към първичната емулсия PE1 в състава на ДСЕЛДС	33
2.5. Изследване влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия PE1	35
2.6. Псевдотрифазова диаграма за определяне на съотношенията на вторичния емулгатор към първичната емулсия PE2	37
2.7. Моделни състави на ДСЕЛДС–NaALD	38
2.8. Оценка на физична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD чрез центрофугиране	38
2.9. Термодинамична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD	38
2.10. Оценка за съвместимост на натриев алендронат с избраните помощни вещества в състава на ДСЕЛДС–NaALD	39
2.11. Време за самоемулгиране на ДСЕЛДС–NaALD	43
2.12. Оценка на размера на капките на дисперсната фаза след самоемулгиране на ДСЕЛДС–NaALD	43
2.13. Реологични изследвания на ДСЕЛДС–NaALD	44
3. Технологично и биофармацевтично охарактеризиране на формулираните в твърди желатинови капсули ДСЕЛДС–NaALD	45
3.1. Равномерност на масата на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС–NaALD	45
3.2. Равномерност на дозовите единици на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС–NaALD	46
3.3. Време за самоемулгиране и дисперзитет на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС–NaALD в биомиметични среди	47

3.4. <i>In vitro</i> прогнозиране на пермеацията на NaALD от твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD	51
4. Изследване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar	55
4.1. Валидиране на HPLC-UV/Vis аналитичен метод за установяване на NaALD в биологични матрици	55
4.2. Проследяване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar	58
V. ИЗВОДИ	60
VI. ПРИНОСИ	61
VII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	62
VIII. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	62
IX. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ (БЕЗ АВТОЦИТИРАНИЯ)	63
X. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И ФИНАНСИРАНЕ	63
XI. БЛАГОДАРНОСТИ	64

Списък на използваните съкращения

БКС	- Биофармацевтичната класификационна система
В/М	- Вода/масло
В/М/В	- Вода/масло/вода
<i>ДСЕЛДС</i>	- Двойно самоемулгираща се лекарстводоставяща система
<i>ДСЕЛДС-NaALD</i>	- Двойно самоемулгираща се лекарстводоставяща система, натоварена с натриев алендронат
<i>КЕНИ</i>	- Комисия по етика на научните изследвания
КМК	- Критична мицелна концентрация
ЛБЛДС	- Липидно базирани лекарстводоставящи системи
ЛВ	- Лекарствено/и вещество/а
ЛФ	- Лекарствена/и форма/и
М/В	- Масло/вода
М/В/М	- Масло/вода/масло
ПАВ	- Повърхностно активно/и вещество/а
ХЛР	- Хидрофилно липофилно равновесие
ΔT	- Промяната на температурата
<i>C</i>	- Концентрация
<i>C_{oil}</i>	- Концентрация в масло
<i>C_w</i>	- Концентрация във вода
<i>D</i>	- Дифузионен коефициент
<i>DLS</i>	- Динамично разсейване на светлината.
<i>dQ/dt</i>	- Скорост на дифузия на дадено количество ЛВ за единица време
<i>Ph. Eur.</i>	- Европейска фармакопея
<i>FaSSGF</i>	- Симулиран стомашен сок „на гладно“
<i>FaSSIF</i>	- Симулиран интестинален сок „на гладно“
<i>H</i>	- Дебелина на мембраната
ICH	- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
<i>K_{distr}</i>	- Разпределителен коефициент вода/масло
<i>K_e</i>	- Ебулиоскопска константа
<i>K_{m/w}</i>	- Коефициент на разпределение между биологична течност и биологична мембрана в мястото на абсорбция
<i>LOD</i>	- Граница на откриване
<i>log P</i>	- Разпределителен коефициент масло/вода
<i>LOQ</i>	- Граница на количествено определяне
<i>NaALD</i>	- Натриев алендронат
<i>PDI</i>	- Индекс на полидисперсност
<i>PE</i>	- Първична в/м емулсия
ΔG	- Свободна енергия на Гибс
ΔH	- Енталпия
ΔS	- Ентропия
<i>K</i>	- Равновесна константа

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Повишаването на бионаличността при лекарствени форми (ЛФ) за перорално приложение е предизвикателство, свързано със значителна част от новите лекарствени вещества (ЛВ). Болшинството от тях принадлежат към II, III или IV клас на Биофармацевтичната класификационна система (БКС). Пероралното им въвеждане обикновено се свързва с ниска бионаличност, висока интра- и интер вариабилност на плазмените нива и липса на дозова пропорционалност. Съществуват различни подходи за повишаване на пероралната бионаличност като един от все по-популярните е включването на тези молекули в липидни лекарстводоставящи системи. Чрез тях е възможно да се подобрят профилите на разтваряне и способността за мембранна проницаемост на лекарството. Често този подход води до нетно повишаване на бионаличността. Липидните системи са сред най-обещаващите при повишаването на пероралната бионаличност за много молекули и могат да включват: маслени разтвори или суспензии, емулсии, липидни частици, както и самоемулгиращи се системи.

В случаите, в които дисперсната фаза бива от липиден характер, в стомашно-чревния тракт се наблюдава формирането на емулсии или дисперсии от типа масло/вода (М/В). Включването на ЛВ от II клас на БКС във вътрешната фаза на такива системи може да повиши разтворимостта им. В случаите когато дисперсната фаза притежава сложна структура, т.е. изградена е от хидрофилни и липофилни компартименти (напр. емулсии от типа В/М/В или липозоми), ЛВ от III клас на БКС могат да подобрят мукозния си пермеабилитет, когато биват включени във вътрешната водна фаза.

В тази светлина липидните системи показват висок потенциал за лекарствено доставяне. Въпреки че липидно базираните лекарстводоставящи системи (ЛБЛДС) не са нови като концепция, в последните години навлизат все по-широко, тъй като все повече ЛВ представляват предизвикателства при формулиране. Голяма част, близо 40%, от новите лекарствени молекули са с липиден характер¹ висока молекулна маса и притежават ниска водна разтворимост. За други ЛВ високата хидрофилност често е причина за затрудненото преодоляване на стомашно-чревните мембрани и е лимитиращ фактор за тяхната абсорбция². Освен това, сред факторите, които имат важна роля за бионаличността на дадено ЛВ, са ниската скорост на разтваряне, first-pass метаболизъм, пред абсорбционен метаболизъм и клетъчната екскреция. Въпреки че много ЛВ се характеризират с висока фармакологична активност, поради ниска бионаличност те отпадат в следващите етапи на развитие. Голямо предизвикателство пред фармацевтичната наука и практика е включването на тези вещества в перорални лекарствени форми, които да осигурят достатъчно висока бионаличност.

¹ Pattewar, S., Deshmukh, P., Patil, A. and Muley, P. (2016) 'IJPSR', *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(2). [https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.7\(2\).443-52](https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.7(2).443-52)

² Kolhe, S.M., Patel, L.D., Patel, P.A. and Rajput, A.P. (2016) 'Development and evaluation of solid self double emulsifying drug delivery system (SSEDDS): A novel approach to enhance bioavailability of BCS class III drugs', *Journal of Pharmacy Research*, 10(6), pp. 403–409

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се разработи в/м/в двойно самоемулгираща се лекарстводоставяща система, осигуряваща повишена бионаличност на натриев алендронат при перорално приложение на лекарствената форма.

2. Задачи

За постигането на поставената цел се предвижда да се изпълнят следните задачи:

1. Да се разработи и валидира UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на NaALD в моделите като се изследва влиянието на polysorbate 80 и фосфатите в средата за разтваряне върху чувствителността на метода.
2. Да се оптимизира състава на двойната самоемулгираща се лекарстводоставяща система на натриев алендронат (ДСЕЛДС-NaALD).
 - 2.1. Да се определи разпределителния коефициент вода/масло (K_{distr}) и разтворимостта на NaALD в липиди и в повърхностно активни вещества
 - 2.2. Да се определи ХЛР на първичната емулсия В/М
 - 2.3. Да се построят псевдотрифазови диаграми за определяне на оптималното количество на хидрофилен емулгатор към първичната емулсия в състава на ДСЕЛДС
 - 2.4. Да се изследва влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия
 - 2.5. Да се оцени физичната и термодинамичната стабилност на ДСЕЛДС-NaALD
 - 2.6. Да се оцени съвместимостта на NaALD с избраните помощни вещества в състава на ДСЕЛДС-NaALD
 - 2.7. Да се определи времето за самоемулгиране и дисперзитета на ДСЕЛДС-NaALD
 - 2.8. Да се изследва реологичното поведение на ДСЕЛДС-NaALD
3. Да се проведат изследвания за технологично и биофармацевтично охарактеризиране на формулираните в твърди желатинови капсули ДСЕЛДС-NaALD
 - 3.1. Да се определят фармакопейните характеристики „Равномерност на масата на еднородни препарати“ (Ph.Eur. 11 - 2.9.5.) и „Равномерност на дозовите единици“ (Ph.Eur. 11 - 2.9.40) на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD
 - 3.2. Да се определи времето за самоемулгиране и дисперзитета на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD в биомиметични среди
 - 3.3. Да се изследва *in vitro* пермеацията на NaALD от твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD през диализна и биомиметична мембрани
4. Да се определи екскретираното количество NaALD в урината на лабораторни животни в опит след перорално приложение на оптимизирани моделни състави на ДСЕЛДС-NaALD като за целта се разработи и валидира HPLC-UV/Vis аналитичен метод за установяване на лекарственото вещество в биологични матрици.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

За постигане на поставената цел и заложените във връзка с нея задачи са използвани следните материали:

- ✓ Алендронат натрий, моно натриева сол трихидрат (>99,7%, USP-NF, BP, Ph. Eur., Polpharma S.A. – Полша, NaALD);
- ✓ Арабска гума (acaciae gummi, Ph. Eur, Химакс Фарма ЕООД, България, AG);
- ✓ Ацетонитрил (acetonitrile HPLC gradient grade, USP-NF, BP, Ph. Eur., Carlo Erba Reagents srl, Италия, ACN);
- ✓ Гранулиран соев L- α -лецитин (>97% фосфатидилхолин, ARCOS-Thermo Scientific, Португалия, PCH);
- ✓ Динатриев хидроген фосфат (sodium hydrogen phosphate dodecahydrate cryst., USP-NF, BP, Ph. Eur., Merck, Германия);
- ✓ Дихлорметан, стабилизирани с етанол (dichloromethane, stabilized with ethanol, HPLC-isocratic gradient grade, USP-NF, BP, Ph. Eur., Carlo Erba Reagents srl, Италия);
- ✓ Етанол, абсолютен (ethanol HPLC gradient grade, USP-NF, BP, Ph. Eur., Carlo Erba Reagents srl, Италия);
- ✓ Желатин (80-100 bloom, USP-NF, BP, Ph. Eur., Panreac Applichem, Spain, G);
- ✓ Железен трихлорид ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, analytical grade >97%, Chemipur, Полша);
- ✓ Калиев дихидроген фосфат (Potassium dihydrogen phosphate, USP-NF, BP, Ph. Eur., ChemLab, Belgium);
- ✓ Магнезиев дихлорид ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, USP-NF, BP, Ph. Eur., PPHU, Полша);
- ✓ Масло от черен дроб на треска (Ph. Eur., FU XII R. Italiana – Marco Viti s.p.a. Italia, Cod Liver oil, CLO);
- ✓ Метанол, абсолютен (methanol HPLC gradient grade, USP-NF, BP, Ph. Eur., Carlo Erba Reagents srl, Италия);
- ✓ Натриев дихидроген фосфат (sodium dihydrogen phosphate, USP-NF, BP, Ph. Eur., ChemLab, Белгия);
- ✓ Натриев хидроксид гранули (NaOH pearls, $\geq 98\%$, laboratory grade, Fisher Chemical, Германия);
- ✓ Натриев хлорид (NaCl, USP-NF, BP, Ph. Eur., Panreac, Испания);
- ✓ Олеинова киселина ($\geq 70\%$, technical grade, Fisher Scientific, Великобритания, oleic acid, OA);
- ✓ Оцетна киселина, ледена (acetic acid glacial, $\geq 99\%$, Fisher Scientific, Великобритания); Перхлорна киселина (HClO_4 70-72%, Chemipur, Полша);
- ✓ Полиоксиетилен 20 sorbitan monooleate моноолеат (polysorbate 80, tween 80, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия, PS);
- ✓ Полиоксиетилен гликол sorbitan monooleate монолаурат (polysorbate 20, tween 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия, PL); Sorbitan monooleate монолаурат (sorbitan monolaurate, span 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия, SL);
- ✓ Sorbitan monooleate моноолеат (sorbitan monooleate, span 80, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия, SM);

- ✓ Средно верижни триглицериди (Caprilic Acid (C 8:0) и Capric Acid (C 10:0) – USP-NF бяха закупени от Now Sports, USA, MCT oil);
- ✓ Суроватъчен протеинов концентрат (whey protein concentrate 80, food grade, whey proteins 81%, lactose monohydrate ≤ 12%, Alimco, Полша, WPC 80);
- ✓ Сурово кокосово масло (сертификат # BG-Bio-18, произход: Филипини) е закупено от БиоБалев ООД – България, СО);
- ✓ 9-флуоренилметил хлороформат, 98% (9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride), Tokyo Chemical Industry Co., LTD, Япония;
- ✓ Трифлуороцетна киселина, чиста 99%, HPLC grade, Tokyo Chemical Industry Co., LTD, Япония;
- ✓ Памидронат, динатриева сол (pamidronate, disodium salt), Calbiochem, Merck, Германия;
- ✓ SPE, Cartridge Bond Elut DEA, 100 mg, 3 mL, Agilent Technologies, САЩ;
- ✓ Клинични вакутейнери с цитратен буфер 3,2% 1,8 mL, Vacusera Disera, Турция;
- ✓ Целулозно-ацетатна диализна мембрана MWCO 10 000 - 14 000 Da, 35 mm, Carl Roth GmbH, Германия
- ✓ Биомиметична мембрана PermeaPad® Barrier 25 mm (Германия) са закупени от Биомедика България ООД.

2. Използвана апаратура

- ✓ Прецизна електронна везна Kern ABJ 120-4M (0.001 g – 120 g), KERN & Sohn GmbH, Германия;
- ✓ Хомогенизатор IKA T25 Ultra Turrax Homogenizer с диспергиращ елемент Dispersing Element for T 10 basic ULTRA-TURRAX®. Type: S 10 N-8G, IKA – Werke GmbH & Co. KG, Германия;
- ✓ Нагревателна плоча с магнитна бъркалка IKA RCT Digital Hotplate Stirrer (0-310°C, 0-1500 rpm), IKA – Werke GmbH & Co. KG, Германия;
- ✓ Нагревателна плоча с магнитна бъркалка BOECO Magnetic stirrer MSH- 300N (0-310°C, 50-1250 rpm);
- ✓ Спектрофотометър T60 Visible Spectrophotometer (PG Instruments Limited, UK);
- ✓ Термостатирана вертикална Францова дифузионна клетка, 25 mm диаметър и акцепторен компартимент с обем 10 mL, Perme Gear, SES GmbH, Германия;
- ✓ Вискозиметър Thermo Scientific HAAKE Viscotester 550 със софтуър HAAKE™ RheoWin™ Measuring and Evaluation Software, Германия;
- ✓ FT-IR Thermo Fischer Nicolet iS50 spectrometer с отражателна приставка ATR;
- ✓ Анализатор на размера частиците и дзета-потенциал - ZetaSizer сериен номер MAL 1106241 (Malvern Instruments, British);
- ✓ Центрофуга BOECO centrifuge S-8, BOECO GmbH, Германия – за проби над 10 mL;
- ✓ Центрофуга DLAB D2012 Mini Centrifuge, DLAB Scientific Instruments Inc, USA. – за проби с обем над 2 mL
- ✓ HPLC: Nexera-I LC 2040C 3D plus RF-20A prominence; Fluorescence detector, Shimadzu, Япония;
- ✓ HPLC column, NUCLEODUR®, C18 EC, Stainless steel, Int.OxL: 4,6x250 mm, Pore size:110 Å, Particle size: 5 µm, Macherey-Nagel, Agilent Technologies, САЩ;

- ✓ Клинична центрофуга DLAB DM0412 Low speed Centrifuge, DLAB Scientific Instruments Inc, USA. – за биологични проби (кръв);

3. Методи

3.1. UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на алендронат натрий

За количественото определяне на NaALD в моделите от предварителните изследвания е адаптиран разработеният от Kuljanin, J. *et al.* (2002)³ спектрофотометричен UV/Vis метод, който предвижда приготвяне на комплекс на NaALD с Fe (III). Веществата реагират в еквимоларни съотношения в присъствието HClO₄. Тъй като NaALD няма хромофори в молекулата си, образуването на комплекс с железни йони представлява бърз и удобен метод за провеждане на анализ (Kuljanin, J. *et al.*, 2002).

Съгласно предложената методика е приготвен изходен разтвор на NaALD (5 mM) в H₂O_{dest} и еквимоларна концентрация на FeCl₃ (5 mM) в HClO₄ 2M (комплексът има стехиометрия 1:1). Изследван е абсорбционният спектър на разтвора и след това е сравнен с абсорбционния спектър на р-р FeCl₃ в HClO₄ в различни концентрации. Избрана е $\lambda = 300$ nm, тъй като при тази дължина на вълната Fe (III) йоните имат най-ниска абсорбция.

За построяване на стандартната калибрационна крива от изходния разтвор са направени серия разреждания в диапазона 8,125 – 325,0 $\mu\text{g/mL}$. Построена е стандартна калибрационна крива, представяща графично зависимостта на абсорбцията от концентрацията при $\lambda = 300$ nm.

3.1.1. Валидиране

Методиката е валидирана по отношение на:

- ✓ *Линейност* – наблюдава се в интервала от концентрации на анализирания компонент, в който абсорбцията е в линейна зависимост от концентрацията му. Линейността е оценена чрез определяне на коефициента на детерминация (R^2) на уравнението на стандартната права, получена за 7 експериментални точки.
- ✓ *Точност* – степента на съвпадение на резултата от измерването с истинската стойност на измерената величина. Установена е като към предварително анализиран пробен разтвор, се добавя известно количество стандартен изходен разтвор при различни нива: 80%, 100% и 120%.
- ✓ *Прецизност* – показва вариацията в стойностите на паралелни измервания на една и съща проба, получени при определени условия. Количествена мярка за оценка на прецизността е стандартното отклонение (SD), изчислено на база стойностите от n брой измервания. Прецизността на метода е изследвана както в рамките на деня, така и по отношение на междудневни вариации.
- ✓ *Чувствителност* – чувствителността на измерванията на алендронат по предложения метод, съгласно препоръките на ICH Q2(R2) Guideline е оценена по

³ Kuljanin, J. *et al* (2002) 'Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(6), pp. 1215–1220. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00021-3](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00021-3)

отношение на границата на количествено определяне (LOQ) и границата на откриване (LOD). LOQ и LOD са изчислени с помощта на:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}, \quad (2)$$

където „ σ “ е стандартно отклонение на пиковите площи на лекарствата ($n = 3$), а „ S “ е наклонът на съответната калибровъчна крива.

3.1.2. Влияние на polysorbate 80 върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe

Приготвени са серия от разтвори с различни концентрации на polysorbate 80 в присъствието на функционализиращия реагент FeCl_3 или на комплекса ALD/Fe. Снети са UV-Vis спектрите на изготвените разтвори и са сравнени със спектрите на референтните разтвори на polysorbate 80, FeCl_3 и комплекса ALD/Fe. Оценено е влиянието на хидрофилния ПАВ върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe.

3.1.3. Влияние на фосфатите в средата за разтваряне върху образуването на комплекса ALD/Fe и абсорбционните му спектри

За определяне на влиянието на фосфатите от средата върху образуването на комплекса ALD/Fe и абсорбционните му спектри, точно претеглени количества NaALD са разтворени в SBF 2mM pH 7.4 (Na_2HPO_4 1,51 mM/ NaH_2PO_4 0,49 mM), съдържащ още NaCl 142,0 mM и KCl 5,0 mM. Получените разтвори са с концентрация на NaALD съответно: 17,7 $\mu\text{g/mL}$, 28,6 $\mu\text{g/mL}$ и 35,4 $\mu\text{g/mL}$. По 1 mL от всеки разтвор са отмерени в 10 mL мерителни колби, функционализирани с разтвор на FeCl_3 в HClO_4 2M и доведени до обем 10 mL. Измерени са абсорбциите на комплекса ALD/Fe при три различни концентрации NaALD с Fe^{3+} във фосфатен буфер в спектралния диапазон от 200 до 400 nm. За сравнение е измерена абсорбцията на Fe^{3+} във фосфатен буфер без NaALD.

3.2. Разтворимост на NaALD в липиди и определяне на разпределителния коефициент вода/масло (K_{distr})

За определяне на разпределителния коефициент на NaALD са смесени 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ с 1 g от всеки вид масло (oleic acid, OA; medium chain triglyceride oil, MCT; cod-liver oil, CLO; pleum cocois, OC) на магнитна бъркалка (BOECO Magnetic stirrer MSH-300N) при 250 rpm в термостатирана баня при 70°C. Тези условия позволяват пълното насищане на двете фази една с друга. След това са включени 10 mg NaALD във всяка постановка, поддържайки постоянно разбъркване при 250 rpm в продължение на 30 min. В таблица 1 са представени изследваните моделни състави.

Таблица 1: Моделни системи масло / вода / NaALD

Модел 1	Модел 2	Модел 3	Модел 4
10 mg NaALD	10 mg NaALD	10 mg NaALD	10 mg NaALD
1g Oleic Acid	1g MCT Oil	1g Cod-liver Oil	1g Oleum Coccois
10 ml H ₂ O _{dest}	10 ml H ₂ O _{dest}	10 ml H ₂ O _{dest}	10 ml H ₂ O _{dest}
30 min, 250 rpm 70°C	30 min, 250 rpm 70°C	30 min, 250 rpm 70°C	30 min, 250 rpm 70°C
охлаждане	охлаждане	охлаждане	охлаждане
до 25 °C	до 25 °C	до 25 °C	до 25 °C

След 72 h престой на стайна температура пробите са подложени на центрофугиране при 6000 rpm за 30 min (BOECO centrifuge S-8), след което водната фаза е отделена от маслената. Към водната фаза са добавени 2 mL от разтвор на FeCl₃ 0,62 M в HClO₄ 2 M и получената реакционна смес е разредена с дестилирана вода до 100 mL в мерителна колба. Количественото съдържание на NaALD във водната фаза е определено спектрофотометрично при $\lambda = 300 \text{ nm}$ (T60 Visible Spectrophotometer).

Разпределителният коефициент K_{distrb} е изчислен според следното уравнение⁴:

$$K_{distrb} = \frac{C_w}{C_{oil}} \quad (3)$$

Разтворимостта на NaALD в маслената фаза (mg/g) е изразена като разликата между вложеното в системите количество и намереното във водната фаза.

3.3. Солубилизиране на NaALD в повърхностно активни вещества

Разтворимостта на NaALD бе изследвана в различни липидни емулгатори (Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate, PS; sorbitan monolaurate, SL; sorbitan monooleate, SM; polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate, PL) както следва: 100 mg NaALD са суспендирани в 2 mL от следните емулгатори: PS, SL, SM, PL. Така получените суспензии са хомогенизирани при 250 rpm на магнитна бъркалка при 70°C в продължение на 2 h, след което са оставени при 37°C за 48 h за постигане на равновесие. След този период суспензиите са центрофугирани при 6000 rpm за 30 min (BOECO centrifuge S-8). Супернатантът е подложен на екстрахиране с 2 mL разтвор на FeCl₃ 0,62 M в HClO₄ 2 M в продължение на 10 min. След разделянето на двете фази, водната фаза е отделена и филтрирана през филтър с размер на порите 0,45 μm . Полученият филтрат е разреден до 100 mL с H₂O_{dest} и подложен на UV/Vis спектрофотометричен анализ при $\lambda = 300 \text{ nm}$ (T60 Visible Spectrophotometer) за количествено определяне на NaALD.

⁴ Martin, A. (1997) *Physical pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. ISBN: 81-7431-001-0.

3.4. Изследване на ХЛР на първичната емулсия В/М

За определяне на ХЛР на първичната емулсия H_2O_{dest} / ОС са приготвени серия от смеси с различно процентно съдържание на ПАВ/съ-ПАВ за покриване на възможно най-широк спектър, т.е. в диапазон на ХЛР от 4 до 9. Маслената фаза (ОС) и водната фаза са в съотношение 1:1, а ПАВ е в количество 20% от маслената фаза, а именно 5 mL ОС, 5 mL H_2O_{dest} и 1g ПАВ/съ-ПАВ.

Използвана е техниката с инверсия на фазата: на магнитна бъркалка в бехерова чаша към H_2O_{dest} при 70°C и 250 rpm е добавена маслената фаза (ОС с ПАВ/съ-ПАВ) на капки. Така получената дисперсия е хомогенизирана в продължение на 5 min, а после охладена в продължение на 5 min при постоянно разбъркване (750 rpm). Получените емулсии са прехвърлени в центрофужни епруветки и оставени в покой при 25°C в продължение на 24 h. След това емулсиите са центрофугирани (BOECO centrifuge S-8) при 6000 rpm за 30 min и са оценени визуално.

3.5. Псевдотрифазови диаграми

За да бъдат оценени подходящите съотношения на ПВ за самоемулгиране, са конструирани псевдотрифазови диаграми. За целта е използван методът на водно титруване⁵.

Предварително е приготвена първична в/м емулсия (PE1), съставена от вода, ОС и система емулгатор/съ-емулгатор (HLB 7-7,5). Последователно са приготвени серия смеси между PE1 и избраното хидрофилно ПАВ в подходящи тегловни съотношения (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9). Смесите са оставени в покой на стайна температура (25°C) в продължение на 24 h с цел еквилибриране на съставите. Към всяка от получените смеси е прибавена на капки дестилирана вода при постоянно разбъркване. Водното титруване е проведено при стайна температура (25°C), при постоянно разбъркване (BOECO MSH-300N) със скорост 250 rpm. Водата е прибавена на порции от 0,100 mL през 2 min. Добавянето на всяка водна фракция е последвано от визуална проверка и отбелязване появата на млекоподобна, опалесцираща или бистра дисперсия. Количеството вода, добавено към всяка проба, е от 5% до 95%.

Визуалната оценка е извършена според следните критерии:

- бяло/млекоподобен вид – груба дисперсия/емулсия;
- сиво оцветен гелоподобен вид – транзиционни течно кристални структури;
- опалесцираща до прозрачна дисперсия – формиране на микро/нано емулсия.

3.6. Изследване влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия PE1

С цел оценка на влиянието на ПВ върху стабилността на съставите с включен NaALD и проучване на възможностите да бъдат предотвратени явления като коалесценция, флокулация и седиментация, са изготвени серии от моделни състави с желатин, арабска гума и суроватъчен протеин. Като В/М емулгаторни двойки са

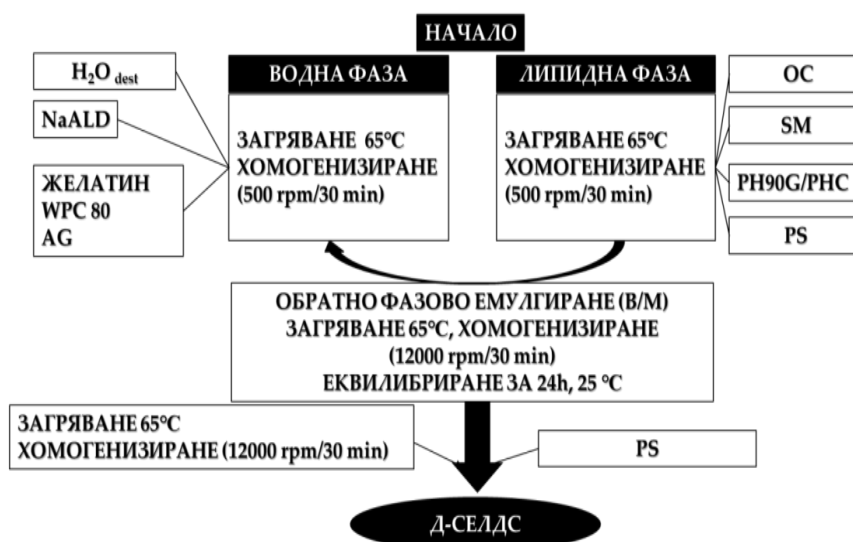
⁵Khan, A.A. *et al.* (2013) 'Formulation, optimization and characterization of self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of paclitaxel for solubility enhancement', *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 5(8), pp. 861–867.
<https://doi.org/10.1166/nnl.2013.1619>.

използвани sorbitan monooleate /polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (SM/PS) и sorbitan monooleate /phosphatidylcholine (SM/ PCH).

Съставите са приготвени по общата технологична схема на първично обратнофазово емулгиране. NaALD е разтворен в дестилирана вода до получаване на 5% бистър разтвор. Последователно към аликвоти от разтвора са добавени съответно 3% суроватъчен протеин (WPC 80), 3% арабска гума на прах (AG), и 3% желатин (G). Веществата се диспергират при постоянно разбъркване (500 rpm, магнитна бъркалка IKA RCT, Германия), след което се загряват до $T = 65^{\circ}\text{C}$ с цел постигане на хомогенност. Лецитинът (PCH) е избран за съ-емулгатор на SM в такива съотношения, че теоретичното ХЛР да е приблизително 7,0-7,5. Комбинациите от ПАВ са разтворени в подходящо количество ОС при 500 rpm и $T = 65^{\circ}\text{C}$. Маслената фаза е добавена към водната при 12 000 rpm за 15 min (IKA T25 Ultra Turrax Homogenizer), като хомогенизирането продължава до достигане на стайна температура. След 12 h покой при стайна температура (25°C) съставите са подложени на визуална оценка. Тези, които не показват признаци на фазово разделяне, се центрофугират (BOECO centrifuge S-8) при 6000 rpm и се оценяват визуално на интервали от 2 min.

3.7. Приготвяне на моделни състави на ДСЕЛДС–NaALD

Моделните състави на ДСЕЛДС–NaALD са приготвени чрез двуетапна техника на емулгиране (IKA T25 Ultra Turrax Homogenizer, IKA RCT нагревателна плоча, Германия) (фигура 1). В първия етап се приготвя първичната емулсия в/м чрез фазова инверсия. Вторият етап се състои от уравновесяване на първичните емулсии за 24 h и добавяне на хидрофилното ПАВ към съставите. Моделните състави са представени в таблица 2.



Фигура 1: Технологична схема за приготвяне на самоемулгиращите се системи

Таблица 2: Състави на ДСЕЛДС–NaALD: с желатин (SM/PS), с фосфатидилхолин (SM/ PCH), и с желатин и фосфатидилхолин (SM/ PCH)

<i>Състави с желатин (SM/PS)</i>					
Състав, % (т/т)	SMIX1 3.0	SMIX1 3.1	SMIX1 3.2	SMIX1 3.3	SMIX1 „blank”
Алендронат натрий (NaALD)	6,42	6,34	6,22	6,04	-
Gelatine (G)	0,63	1,26	3,12	6,04	-
H ₂ O _{dest}	18,24	18,12	17,78	17,24	18,34
Фосфатидил холин (PCH)	-	-	-	-	-
Sorbitan monooleate (SM)	2,96	2,94	2,88	2,80	2,98
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS)	1,59	1,58	1,55	1,50	1,60
Кокосово масло (OC)	18,24	18,12	17,78	17,24	19,61
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS) – – хидрофилен II	51,92	51,64	50,67	49,14	57,47

<i>Състави с фосфатидилхолин (SM/ PCH)</i>				
Състав, % (т/т)	PC 2.1	PC 2.2	PC 2.3	PC „blank”
Алендронат натрий (ALDNa)	6,42	6,33	6,23	-
Gelatine (G)	-	-	-	-
H ₂ O _{dest}	18,36	18,07	17,80	18,34
Фосфатидил холин (PCH)	1,54	3,04	4,48	2,88
Sorbitan monooleate моноолеат (SM)	3,03	2,99	2,94	1,69
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS)	-	-	-	-
Кокосово масло (OC)	18,36	18,07	17,80	19,61
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS) – – хидрофилен II	52,29	51,50	50,75	57,48

<i>Състави с желатин и фосфатидилхолин (SM/ PCH)</i>				
Състав, % (т/т)	PLG 1.1	PLG 1.2	PLG 1.3	PLG 1.4
Алендронат натрий (ALDNa)	6,42	6,17	6,06	5,88
Gelatine (G)	0,63	1,23	3,03	5,88
H ₂ O _{dest}	18,24	17,64	17,32	16,81
Фосфатидил холин (PCH)	4,59	4,44	4,36	4,23
Sorbitan monooleate (SM)	2,96	2,61	2,56	2,48
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS)	-	-	-	-
Кокосово масло (OC)	18,24	17,64	17,32	16,81
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (PS) – – хидрофилен II	48,92	50,27	49,35	47,91

3.8. Оценка на термодинамична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD

Като стандарти са използвани водни дисперсии с различна концентрация на емулсия (об/об). Разрежданията са направени както следва: 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL и 0,5 mL от емулсиите са разредени с пречистена вода в 50 mL мерителна колба. Оптичната плътност на получените дисперсии е изследвана във видимия спектър. Измерванията са извършени с помощта на спектрофотометър (Genesys 10UV Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Сканиран е спектърът на абсорбция на пробата с най-висока концентрация за определяне дължината на вълната, при която абсорбцията на пробата е най-висока. Изследването е проведено с кювета с дебелина 1 cm при $\lambda = 230$ nm. Равновесната константа на процеса е определена по метода на разреждане.

Теоретични основи за определяне на термодинамичните параметри

Енталпията, ентропията и свободната енергия на Гибс са термодинамични параметри, свързани със стабилността на системата. Стабилността на емулсията се влияе от различни фактори – състав на емулсията, размер на капките на емулсията (колоидни частици) и др.

Енталпията се определя с помощта на уравнението на Клаузиус и Клапейрон (4), а ентропията и енергията на Гибс се определят с помощта на класическите термодинамични уравнения (5, 6).

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = \frac{-\Delta H}{R}, \quad (4)$$

където ΔH е енталпия (kJ mol^{-1}), R е универсална газова константа ($R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), K е равновесна константа.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$

Ентропията се изчислява с помощта на класическото уравнение след определяне на енталпията и енергията на Гибс:

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}, \quad (6)$$

където ΔS е ентропия ($\text{kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

3.9. Време за самоемулгиране на ДСЕЛДС–NaALD

Установено е времето за самоемулгиране (BCE) или времето, необходимо за ДСЕЛДС прекоцентрират, еквивалентен на 35 mg NaALD, да образува хомогенна дисперсия при разреждане. Процесът е проследен визуално, като се следи за образуване на опалесциращ или бистър вид на дисперсията.

Експериментите са проведени трикратно. Наблюдаването на опалесцираща до бистра дисперсия показва, че е образувана микро- или наноемулсия⁶. Предварително напълнена с модел ДСЕЛДС–NaALD желатинова капсула е въведена в 200 mL симулирана стомашна среда (pH=1,2, 0,1N HCl) при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и при леко разбъркване (75 rpm, магнитна бъркалка IKA RCT, Германия). Един милилитър аликвоти от получените дисперсии са използвани за оценка на разпределението на размера на капките на дисперсната фаза.

⁶ Prajapati, S.T., Joshi, H.A. and Patel, C.N. (2012) 'Preparation and characterization of self-microemulsifying drug delivery system of olmesartan medoxomil for bioavailability improvement', *Journal of Pharmaceutics*, 2013, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/728425>

3.10. Оценка на размера на капките след диспергиране на ДСЕЛДС–NaALD

Размерът на капките (изразен като Z-средно) на ДСЕЛДС–NaALD след диспергиране (след самоемулгиране) и разпределението им по размер (изразен като индекс на полидисперсност, PDI) са определени с помощта на ZetaSizer сериен номер MAL 1106241 (Malvern Instruments, British), He-Ne лазерен лъч (633 nm), с фиксиран ъгъл на разсейване от 173° при 25°C по методиката, описана за определяне на време за самоемулгиране. Всички измервания са извършени трикратно и резултатите са отчетени като средни стойности $\pm$ SD от 3 измервания ($n=3$) за всеки състав.

3.11. Оценка на съвместимост

С цел установяване съвместимостта между компонентите на избраните моделни състави е извършен FT-IR анализ⁷.

IR спектрите на моделите и техните отделни компоненти са получени чрез използване на спектрометър Thermo Fischer Nicolet iS50 в честотен диапазон 4000–400 cm^{-1} . Снетите спектрите на изходните вещества са сравнени със спектрите на моделите.

Спектрите на моделите са снети след приготвяне при 65°C и съхранение в продължение на 48 ч в херметично затворени стъклени флакони (25°C, 65% RH).

3.12. Реологични изследвания

Реологичните измервания са извършени при $(20\pm1)^\circ\text{C}$ и $(70\pm1)^\circ\text{C}$ с помощта на Thermo Scientific HAAKE Viscotester 550 (Германия). Анализите са извършени в коаксиален цилиндричен сензор SV DIN при скорости на срязване, вариращи от 0,0123 s^{-1} до 1000 s^{-1} . Диапазонът на скоростите на срязване е избран въз основа на литературна справка за реологични изследвания на емулсии с PS и ОС като основни компоненти. Общото време на измерване е $t = 200 \text{ s}$. Това съответства на 2 s за всяка точка на измерване. Времето за измерване е твърде кратко, за да настъпят структурни промени в емулсиите. Това може да се наблюдава при реологични изследвания при постоянен градиент на скоростта за дълго време. Изследвани са данните за напрежението на срязване като функция на скоростите на срязване за всеки модел. Използвани са три модела за получаване на основните реологични параметри, представени в Таблица 3. Математическото моделиране е извършено чрез специален софтуер към вискозиметъра.

Таблица 3: Математически модели за реологични свойства на образците

Математически модел	Уравнение
Bingham Plastic Model (BPM)	$\tau = \tau_0 + \eta_p \cdot \gamma$
Power Law Model (PLM)	$\tau = K \cdot \gamma^n$
Herschel-Bulkley Model (HBM)	$\tau = \tau_0 + K \cdot \gamma^n$

Забележка: τ е напрежението на срязване (Pa), γ е скоростта на срязване (s^{-1}), τ_0 е гранично напрежение, K е индексът на консистенция (Pa.s), n е реологичен индекс, а η_p е пластичен вискозитет.

Всички измервания са извършени трикратно. Най-добрият модел е избран въз основа на максималния коефициент на детерминация (R^2).

⁷ Tabassum, N., Patel, A., Bansal, A.K. and Bhandari, A. (2016) 'Development and evaluation of solid self double emulsifying drug delivery system (SSEDDDS): A novel approach to enhance bioavailability of BCS class III drugs', *Journal of Pharmacy Research*, 10(6).

3.13. Фармакопейни тестове за контрол на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD и *in-vitro* охарактеризиране

3.13.1. Равномерност на масата на еднородни препарати

Най-често ДСЕЛДС за перорално приложение се формулират в капсули. За нуждите на изследванията, желатинови капсули размер „1“ (номинален обем 0,5 mL) са напълнени с моделни ДСЕЛДС с теоретично съдържание на NaALD 32,1 mg (7% т/т). По 20 капсули, съдържащи съответно моделните ДСЕЛДС PLG 1.1 и Smix1 3.0, са претеглени поотделно, определена е средната им маса, както и индивидуалните отклонения съгласно насоките на Ph.Eur. 11.0 .

3.13.2. Равномерност на дозовите единици

За да се определи ефективното натоварване на моделните ДСЕЛДС с NaALD, е извършен тест за равномерност на дозовите единици (Ph.Eur.11.0). За целта са претеглени 10 капсули, съдържащи моделни ДСЕЛДС. Освободени от съдържанието, празните обвивки са претеглени (3.13.1. Равномерност на масата). Съдържанието на всяка капсула е диспергирано в 1,5 mL от органични разтворители $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ в съотношение 3:2 (етилацетат/дихлорметан). Наблюдава се отделянето на бяла утайка от NaALD. Получената дисперсия се екстрахира трикратно с равни обеми дестилирана вода. Водните фракции се филтруват (0,45 μm) в мерителна колба и се добавя вода до 100 mL.

Един милилитър от получения разтвор се прехвърля в мерителна колба от 10 mL, функционализира се с 1 mL реагент $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ и се добавя дестилирана вода до 10 mL. Полученият разтвор е анализиран спектрофотометрично при $\lambda=300\text{ nm}$.

Съгласно Ph.Eur. 11.0 съдържанието на NaALD трябва да е в границите $\pm 15\%$ от теоретичното, за да удовлетвори теста.

3.13.3. Поведение в биомиметични среди

Класическите фармакопейни тестове за разтворимост са приложими предимно за конвенционалните ЛДС⁸ (Wolska, E. and Szymańska, M., 2023).

При прием на дозираната форма на гладно с 200–250 mL вода максималният общ обем на течности, наличен в проксималната част на тънките черва, ще бъде около 300–500 mL⁹.

Целта на изследването е да се проследи поведението на ДСЕЛДС-NaALD в биомиметични среди, като се оцени скоростта и степента на самоемулгиране, чрез определяне на времето за самоемулгиране (BCE) и дисперзитета на системата след самоемулгиране в средата. За целта по една капсула, съдържаща модел Smix1 3.0 или модел PLG 1.1, е поставена съответно в 200 mL от средите FaSSGF pH 1.6 и FaSSIF pH 6.5, чиито състави са представени в Таблица 4.

⁸ Wolska, E. and Szymańska, M. (2023) 'Comparison of the in vitro drug release methods for the selection of test conditions to characterize solid lipid microparticles', *Pharmaceutics*, 15(2), p. 511. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020511>.

⁹ Klein S. (2010) The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS J.* 2010 Sep;12(3):397–406. doi: 10.1208/s12248-010-9203-3

Таблица 4: Състав на средите FaSSGF pH 1.6 и FaSSIF pH 6.5

FaSSGF pH 1.6		FaSSIF pH 6.5	
Sodium taurocholate	80 μ M	Sodium taurocholate	3 mM
Lecithin	20 μ M	Lecithin	0.75 mM
Pepsin	0.1 mg.mL ⁻¹	NaH ₂ PO ₄	3.438 g
NaCl	34.2 mM	NaCl	6.186 g
HCl conc.	qs ad pH 1.6	NaOH	qs ad pH 6.5
H ₂ O _{dest}	ad 1 L	H ₂ O _{dest}	ad 1 L

Методите, предвиждащи използването на диализна мембрана и PermeaPad® мембрана, могат да бъдат адаптирани според особеностите на ЛДС с цел осъществяване на по-точно охарактеризиране.

3.13.4. *In vitro* прогнозиране на пермеацията на ДСЕЛДС с NaALD

Тестовите са проведени с помощта на дифузионна клетка на Franz (тип 3), чието устройство е показано на фигура 2. Аликвота (8 mL) от дисперсия на моделна ДСЕЛДС-NaALD в симулирания интестинален сок (FaSSIF pH 6.5), се прехвърля в донорния компартимент. Акцепторният компартимент (10 mL) е напълнен с модифициран фосфатен буфер (таблица 5, модифициран SBF съгласно Kokubo, T. and Takadama, H., 2006¹⁰). За експериментите са използвани целулозно-ацетатна диализна мембрана 10 000 – 14 000 Da и биомиметична мембрана PermeaPad® Barrier. Площта на дифузия е 490,87 mm². Хомогенността по време на експериментите се осигурява от малка магнитна бъркалка с Teflon® покритие при 700 rpm и T = (37±1)°C. На равни интервали от време се вземат проби (500 μ L) за анализ от рецепторния компартимент в продължение на седем часа и се анализират спектрофотометрично. Обемите се възстановяват с чист SBF. На базата на получените резултати е построена графична зависимост на кумулативния процент освободено ЛВ в средата от времето.



Фигура 2: Вертикална дифузионна клетка на Franz (тип 3) 25 mm диаметър и акцепторен компартимент с обем 10 mL.

¹⁰ Kokubo, T. and Takadama, H. (2006) 'How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?', *Biomaterials*, 27(15), pp. 2907–2915.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>

Таблица 5: Модифицирана симулирана телесна течност, SBF

Йони	Плазма (mM)	Модифицирана SBF (mM)
Na ⁺	142,0	147,44
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	-
Ca ²⁺	2,5	-
Cl ⁻	103,0	147,0
HCO ₃ ⁻	27,0	-
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,51
H ₂ PO ₄ ⁻	-	0,49
SO ₄ ²⁻	6,5	-

Получените данни от изследванията с диализна и биомиметична мембрани са използвани за описание на поведението на изследваните системи с NaALD. Проведен е регресионен анализ с цел установяване на модела, най-достоверно описващ процеса на пермеация¹¹.

3.14. Изследване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar

3.14.1. Експериментални животни

Опитите са проведени върху мъжки Wistar плъхове на възраст около 100 дни и средно тегло 250 g. Плъховете са отглеждани в пластмасови клетки, максимум по 6 животни в клетка. Осигурени са стандартните условия за отглеждане на лабораторни животни – при температура на обкръжаващата среда (22±1)°C и 12 часов режим светлина/тъмнина, като им се провежда предварителна аклиматизация със свободен достъп до храна и вода.

Третирането на животните и планираните експерименти са в съответствие с националните разпоредби (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им), международните изисквания (EU Directive, 2010/63/EU for animal experiments) и правилата на Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – гр. Варна. Експериментите са извършени след получено разрешение за работа с експериментални животни (Разрешително за използване на животни в опити № 372, издадено от Българската агенция по безопасност на храните към Министерство на земеделието и храните, на основание чл. 155, ал 7 от ЗВД и становището на комисията по етика № 288 от 30.11.2023 г.).

¹¹ Bruschi, M.L., 2015 Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, 1st Edition - June 10, 2015, Woodhead Publishing, ISBN: 9780081001127. 9 7 8 - 0 - 0 8 - 1 0 0 1 1 2 - 7.

3.14.2. Аналитичен метод за качествено и количествено определяне на NaALD в биологични матрици

Използвана е адаптирана методика съгласно описаната от Han, H.-K. *et al.* (2012)¹² и Lin, J.H. *et al.* (1994)¹³.

Директният хроматографски анализ на натриев алендронат е сложен поради неговата полярност, липсата на подходящ хромофор (UV-Vis детекция) за конвенционален HPLC анализ и недостатъчна летливост за газов хроматографски анализ. Алендронатът може да се дериватизира с някои реагенти при amino групата и по този начин да позволи лесен хроматографски анализ чрез техниката на HPLC-UV-Vis (FABAD, 2006).

Използвана е хроматографска система Shimadzu LC -2040C с аналитична колона – 250 x 4.6 Nucleodur 100 RP18, 5 µm, Macherey Nagel и предколона – 40 x 4.6 LiChrospher 100 RP18, 5 µm, Merck, Germany. Хроматографският анализ е проведен при следните условия:

- Подвижна фаза: ацетонитрил:метанол = 1:1 (разтвор 1) и буфер 12,5 mM лимонена киселина и 12,5 mM натриев пирофосфат (разтвор 2) според градиентна програма (таблица 6);
- Скорост на подвижната фаза: 1,1 mL.min⁻¹;
- Температура на колоната: 35°C;
- Инжектиран обем: 50 µL
- Време на задържане: алендронат – 7,85 ± 0.30 min и памидронат – 8,60 ± 0,30 min;
- Детекция: флуоресценция при λ_{ex} = 260 nm, λ_{em} = 310 nm;

Таблица 6: Градиентна програма

Време, min	Разтвор 1, %	Разтвор 2, %
0 – 22	33	67
22 – 30	68	32
30 – 45	33	67

Подготовка на пробите

Преди и по време на анализа на биологичните проби методът е валидиран в концентрационен обхват 1÷1000 ng.mL⁻¹ в съответствие с изискванията и принципите на добрата лабораторна практика (ICH Q2R2 Validation of analytical procedures, 2022). Пробите са обработени в съответствие с предложената методика¹².

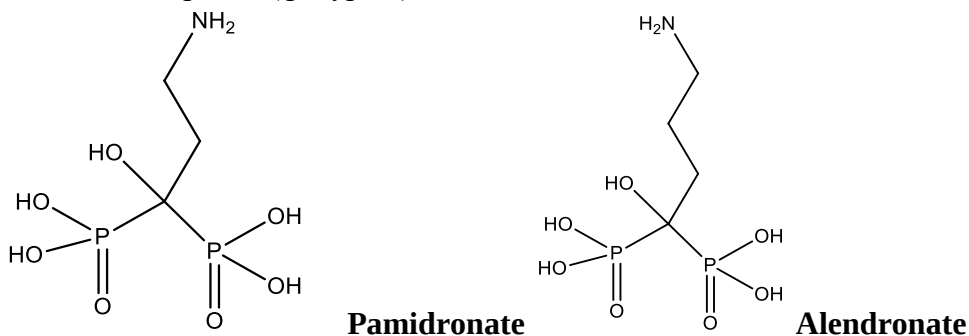
¹² Han, H.-K., Shin, H.-J. and Ha, D.H. (2012) 'Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), pp. 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.002>

¹³ Kang, H., Park, J., Cho, H., Lee, H. and Kim, C. (2006) 'HPLC method validation and pharmacokinetic study of alendronate sodium in human urine with fluorescence detection', *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(11), pp. 1589–1600. <https://doi.org/10.1080/10826070600678308>.

Разтвори на алендронат

Приготвя се начален стандартен разтвор във вода с концентрация на алендронат 1 mg.mL^{-1} . От този изходен разтвор чрез разреждане с вода са получени аналитични стандартни работни разтвори. Прибавени са $200 \text{ }\mu\text{L}$ от тях към 1 mL урина, които отговарят на концентрации в урината $1, 2, 10, 100, 500$ и 1000 ng.mL^{-1} . За приготвяне на пробите за качествен контрол (QC), по подобен начин на стандартите, са приготвени разтвори, отговарящи на концентрации $40, 100$ и 400 ng.mL^{-1} .

Като вътрешен стандарт е използван памидронат, поради структурната си прилика с алендронат (фигура 3).



Фигура 3: Структури на памидронат и алендронат.

Разтвори на памидронат (вътрешен стандарт, IS)

Ампула Panogin[®], съдържаща лиофилизирана смес динатриев памидронат, се разрежда с вода и се получава концентрация от $15\,000\,000 \text{ ng.mL}^{-1}$. Чрез разреждане се получава разтвор на вътрешен стандарт с концентрация $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Всички разтвори се съхраняват при 4°C и се защитават от светлина.

Дериватизация на анализа

Към проба от 1 mL урина се прибавя $100 \text{ }\mu\text{L}$ вътрешен стандарт ($12,500 \text{ ng.mL}^{-1}$ динатриев памидронат) и пробата се хомогенизира. Прибавят се 3 mL 6% трихлороцетна киселина, за преципитация на протеините, и пробата се центрофугира при 4000 rpm за 10 min . След това супернатантът се прехвърля в друга епруветка и към него се добавят $200 \text{ }\mu\text{L}$ $0,1\text{M}$ KH_2PO_4 , $200 \text{ }\mu\text{L}$ $0,1\text{M}$ CaCl_2 и $400 \text{ }\mu\text{L}$ 1M NaOH . Полученият разтвор се центрофугира при 3000 rpm за 5 min . Супернатантът се изсмуква с водна помпа, а останалата утайка се разтваря напълно в $500 \text{ }\mu\text{L}$ $0,2\text{M}$ CH_3COOH , добавят се 3 mL H_2O . Утаяването с NaOH се повтаря два пъти. Получената утайка се разтваря в 1 mL $0,2\text{M}$ ацетатен буфер ($\text{pH } 6.0$) и $40 \text{ }\mu\text{L}$ CH_3COOH , разредени с 2 mL вода. След това пробата се зарежда на DEA SPE картридж, през който предварително са пропуснати 5 mL H_2O . Следва двукратно измиване на SPE картриджа с по $500 \text{ }\mu\text{L}$ вода, лекарството се елуира с 1 mL $0,2\text{M}$ натриев цитрат.

От получения разтвор $540 \text{ }\mu\text{L}$ се подлагат на процедура за дериватизация чрез прибавяне на $200 \text{ }\mu\text{L}$ 1M натриево-карбонатен буфер ($\text{pH } 11,9$), $200 \text{ }\mu\text{L}$ от FMOC разтвор (1 mg в 4 mL ацетонитрил). След 5 min се добавят и $200 \text{ }\mu\text{L}$ 1M лимонена киселина. От така получената проба се инжектират $50 \text{ }\mu\text{L}$.

Подготовка на биологични калибрационни проби и проби за качествен контрол

За приготвяне на пробите е използвана чиста от бисфосфонати урина. Предварително урината е анализирана и е установено, че няма пречещи пикове с времена на задържане, близки с тези на алендронат и вътрешния стандарт памидронат. За приготвянето на калибрационни проби се взема по 1,0 mL урина и към нея се добавят по 200 μL от стандартните разтвори на алендронат и по 100 μL от вътрешния стандарт. Калибрационните проби са с концентрации 1, 2, 10, 100, 500 и 1000 ng.mL^{-1} . Пробите за качествен контрол с концентрации 40, 100 и 400 ng.mL^{-1} се приготвят по същия начин.

За построяване на калибрационната права е използвана линейна регресия

$$y = mx + b, \quad (7)$$

където m определя наклона на правата, а b е отрез на правата от ординатната ос. Тъй като правата трябва да минава през нулата, уравнението придобива вида $y = mx$, където x е концентрация на алендронат, а y се определя от съотношението

$$y = \frac{\text{площ на пика на алендронат}}{\text{площ на пика на памидронат}} \quad (8)$$

Валидиране

Методиката е валидирана по селективност, чувствителност, точност и прецизност.

- ✓ *Селективност* – селективността на метода може да се илюстрира чрез сравняване на хроматограми от анализа на калибрационни проби с хроматограми от празна плазма и урина (blank).
- ✓ *Чувствителност* – чувствителността на метода е определена съгласно препоръките на ICH Q2(R2) по отношение на LOQ и LOD.
- ✓ *Точност и прецизност* – точността и прецизността са определени в рамките на деня и между дните. За всяко концентрационно ниво са анализирани по 5 проби.

3.14.3. Експериментален модел за проследяване на пероралана бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar

Моделните ДСЕЛДС са с адаптирано съдържание на NaALD. В моделите с NaALD, дозата на лекарството е изчислена на 5 mg/kg телесно тегло. Така, при средно тегло от 250 грама, на всяко животно са въведени 1,25 mg алендронат, съдържащи се в моделна ДСЕЛДС, еквивалентни на 0,5 mL. При моделите без NaALD се въвежда еквивалентен обем от ПВ.

Животните са разделени по 3 броя в 5 групи (таблица 7) съгласно „resource equation” модела¹⁴. Двадесет и четири часа преди изследването животните се държат на гладно, но със свободен достъп до вода.

¹⁴ Arifin, W.N. and Zahiruddin, W.M. (2017) ‘Sample size calculation in animal studies using resource equation approach’, *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 24(5), pp. 101–105. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>

Таблица 7: Разпределение на животните по групи и обем на въведените моделни ДСЕЛДС

№	Група контролна (+)		Група PLG 1.1 (-)		Група PLG 1.1 (+)		Група Smix1 3.0 (-)		Група Smix1 3.0 (+)	
	тегло, g	разтвор, mL	тегло, g	ДСЕЛДС, mL	тегло, g	ДСЕЛДС mL	тегло, g	ДСЕЛДС mL	тегло, g	ДСЕЛДС mL
1	260	0,52	220	0,44	250	0,50	260	0,52	200	0,40
2	250	0,50	260	0,52	220	0,44	270	0,54	235	0,47
3	290	0,58	280	0,56	240	0,48	260	0,52	250	0,50

*Група положителен контрол – разтвор на NaALD; Група PLG 1.1 (-) - Модел PLG 1.1 (-), без NaALD; Група PLG 1.1 (+) - Модел PLG 1.1 (+), с NaALD; Група Smix1 3.0 (-) - Модел Smix1 3.0 (-), без NaALD; Група Smix1 3.0 (+) - Модел Smix1 3.0 (+), с NaALD.

Събраната урина се съхранява в стерилни контейнери при T = -18°C

3.15. Статистически анализ

Всички експерименти са трикратно проведени. Изследваните параметри са обработени статистически. Представени са средната стойност и стандартното отклонение (SD). Анализът на дисперсията е използван за сравняване на средните стойности с ниво на значимост $p < 0,05$. Нелинейните модели са получени от компютърната програма IBM SPSS Statistic 26, САЩ.

Регресионният анализ за получаване на моделите, описващи процеса на проникване през мембрана е извършен с програмния пакет TableCurve™ 2D (версия 5.01, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на NaALD

Адаптиран е спектрофотометричен метод за количествено определяне на NaALD, включен в изследваните модели на ДСЕЛДС³. Той е валидиран по четири основни показателя: линейност, точност, прецизност и чувствителност.

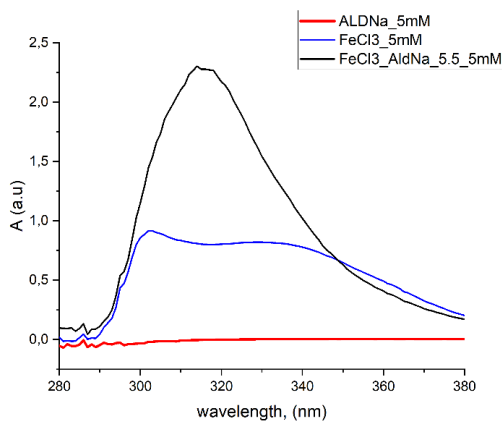
1.1. Избор на дължина на вълната

Смесени са равни обеми от стандартните разтвори на NaALD и FeCl₃ с цел определяне на абсорбцията на комплекса ALD/Fe. Полученият абсорбционен спектър е сравнен съответно с този на FeCl₃ (5 mM) в HClO₄ 2M и на NaALD (5 mM) в HClO₄ 2M (фигура 4). Условия за избор на работни дължини на вълните са:

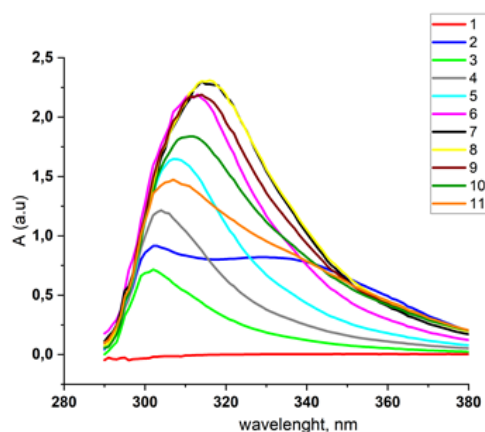
- Максимална абсорбция на комплекса ALD/Fe;
- Минимална абсорбция на Fe³⁺.

Абсорбционните спектри са получени в спектралния диапазон (280 – 400) nm. За комплекса ALD/Fe е установена $\lambda_{\text{max}} = 314$ nm. Нарастването на абсорбцията на желязните йони е приблизително равномерно в интервала (303–335) nm, с отчетена най-ниска стойност при 290 nm. NaALD не абсорбира в посочения диапазон. Изследвано е влиянието на промяната на моларните концентрации на реагиращите вещества върху максималната абсорбция на комплекса (фигура 5).

При промяна на моларните концентрации на реагиращите вещества се наблюдава отместване на абсорбционния максимум към по-големи дължини на вълните. Абсорбцията нараства пропорционално с моларната концентрация на образувания комплекс ALD/Fe при $\lambda = 300$ nm.



Фигура 4: Абсорбционни спектри на NaALD, FeCl₃ и комплекс NaALD-FeCl₃ (ALD/Fe).



(1) NaALD 5mM; (2) FeCl₃ 5mM; (3) FeCl₃/NaALD – 1:9; (4) FeCl₃/NaALD – 2:8; (5) FeCl₃/NaALD – 3:7; (6) FeCl₃/NaALD – 4:6; (7) FeCl₃/NaALD – 5:5; (8) FeCl₃/NaALD – 6:4; (9) FeCl₃/NaALD – 7:3; (10) FeCl₃/NaALD – 8:2; (11) FeCl₃/NaALD – 9:1.

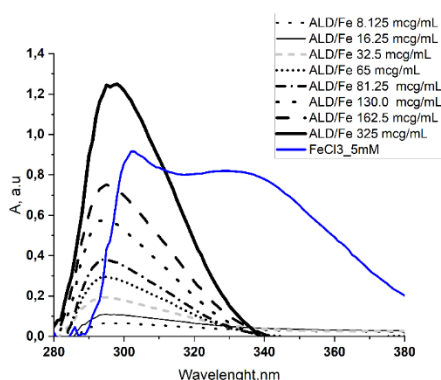
Фигура 5. Абсорбционни спектри на комплекса ALD/Fe в разтвори, получени при смесване на FeCl₃ и NaALD в различни моларни концентрации.

Установена е максимална разлика в абсорбциите на получения комплекс и Fe(III) при $\lambda = 300$ nm. Затова е избрана посочената дължина на вълната за количествено определяне на NaALD. Подобен резултат е установен от Mabrouk, M. *et al.* (2018)¹⁵.

1.2. Валидиране на UV/Vis спектрофотометричния метод за количествено определяне на NaALD

1.2.1. Линейност

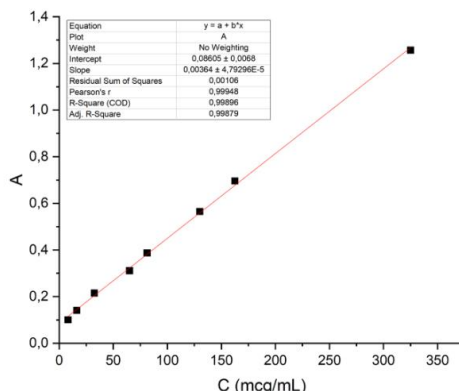
Линейността на метода е определена чрез спектрофотометрично измерване на абсорбционните спектри на серия от разтвори, получени чрез подходящи разреждания на FeCl₃ (5mM) в HClO₄ 2M и на NaALD (5mM) в HClO₄ 2M при $\lambda = 300$ nm. Концентрацията на комплекса ALD/Fe е в диапазона 8,125 – 325,0 $\mu\text{g/mL}$ (фигура 6).



Фигура 6. Абсорбционни спектри на комплекса в концентрационен диапазон 8,125 – 325,0 $\mu\text{g/mL}$.

Построена е стандартна калибрационна крива на зависимостта на абсорбцията от концентрацията на комплекса ALD/Fe при $\lambda = 300$ nm (фигура 7).

¹⁵ Mabrouk, M. *et al.* (2018) 'Ligand exchange method for determination of mole ratios of relatively weak metal complexes: A comparative study', *Chemistry Central Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0512-4>



Фигура 7. Калибрационна крива на комплекса ALD/Fe при $\lambda = 300$ nm.

Установена е линейна зависимост между абсорбцията и концентрацията в диапазона 8,125 – 325,0 $\mu\text{g/mL}$, представена чрез уравнение (9) с коефициент на детерминация $R^2 = 0,9989$.

$$y = 0,0036x + 0,086 \quad (9)$$

1.2.2. Точност

Точността е определена чрез метода на „стандартната добавка“. За целта е приготвен стандартен разтвор на NaALD с концентрация 0,35 mg/mL. Аликвота 1 mL от него се прехвърля в мерителна колба от 10 mL, функционализира се с 1 mL $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ (5mM) и се разрежда до обем 10 mL с дестилирана вода. Измерва се абсорбцията при $\lambda = 300$ nm. Към предварително анализирания пробен разтвор (с концентрация 35 $\mu\text{g/mL}$) се добавя стандартен изходен разтвор с количество съответно 28, 35 и 42 $\mu\text{g/mL}$. В таблица 8 са представени средните резултати от три измерванията ($n=3$) на серията от разтвори.

Таблица 8: Изследвания на аналитичен добив, средни стойности от 3 измервания

Предварително анализирано, ($\mu\text{g/mL}$)	Добавено количество ($\mu\text{g/mL}$)	Намерено количество ($\mu\text{g/mL}$)	Аналитичен добив, %	RSD, %
35	0	34,4	98,28	1,55
	28	62,68	98,85	0,64
	35	68,41	97,74	1,62
	42	76,94	99,92	0,25

Установено е, че аналитичният добив е в рамките от 97,74 до 99,92 % и $\text{RSD}\% < 2$.

1.2.3. Прецизност

Прецизността на метода е изследвана както в рамките на деня, така и по отношение на междудневни вариации. В таблица 9 са представени средните стойности от три измервания.

Таблица 9: Изследвания за прецизност

Вещество	Концентрация (µg/mL)	В рамките на деня		Между три различни дни	
		C, µg/mL	RSD, %	C, µg/mL	RSD, %
NaALD	17,5	17,7	1,95	17,4	1,47
	35	36,57	1,55	35,26	1,82
	52,5	51,75	0,77	51,74	0,88

Прецизността е изследвана като е определено относителното стандартно отклонение (RSD%). Данните, представени в таблица 9, показват възпроизводимостта на метода.

Намерените стойности на RSD% са по-малки от 2%, следователно методът е точен по отношение на анализа (ICH Q2(R2) Guideline).

1.2.4. Чувствителност

Чувствителността на измерванията е изразена като границата на количествено определяне (LOQ) и граница на откриване (LOD). Стойностите за LOQ и LOD са изчислени съгласно уравнения 1 и 2. Получените стойности са представени в таблица 10.

Таблица 10: Стандартно отклонение, LOD и LOQ

Standart error of the intersept, SE	0,0068
Standart deviation of the intersept, SD	0,0192
LOD	17,637
LOQ	53,445

Намереното линейно уравнение (9) $y = 0,0036x + 0,086$ е с $LOD = 17,636 \mu\text{g/mL}$ и $LOQ = 53,445 \mu\text{g/mL}$. Освен избор на подходяща дължина на вълната е необходимо установяване на условията за прилагане на методиката. Тъй като включването на някои ПВ в състава на лекарстводоставящите системи може да затрудни количествения анализ, бе проучено потенциалното им влияние върху аналитичния метод за определяне на NaALD.

1.3. Влияние на polysorbate 80 върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe

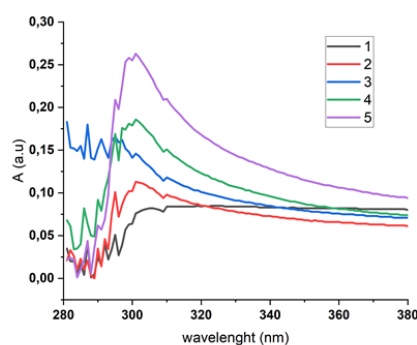
Според литературни данни, както и на базата на собствени непубликувани предварителни проучвания, е установено, че някои ПВ могат да повлияят абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe, а оттам и на количественото определяне на NaALD в изследваните модели¹⁶. В резултат на това е проучено влиянието на polysorbate 80, като хидрофилен емулгатор, върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe в серия от разтвори със следния състав:

- разтвор FeCl_3 0,37mM (HClO_4) ;
- разтвор на Polysorbate 80 0,3%;
- разтвор ALD/Fe 0,37mM (HClO_4) без polysorbate 80;
- разтвор ALD/Fe 0,37mM (HClO_4) с polysorbate 80 0,3%;
- разтвор Fe^{3+} 0,37mM (HClO_4) / polysorbate 80 0,3%;
- разтвор Fe^{3+} 0,37 mM (HClO_4) / polysorbate 80 0,6%;
- разтвор Fe^{3+} 0,37 mM (HClO_4) / polysorbate 80 0,9%;

¹⁶ Wuelfing, W.P., Wang, C.Y., Pan, Y. and Raghavan, K. (2006) 'Polysorbate 80 UV/Vis spectral and chromatographic characteristics – Defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), pp. 774–782. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.020>

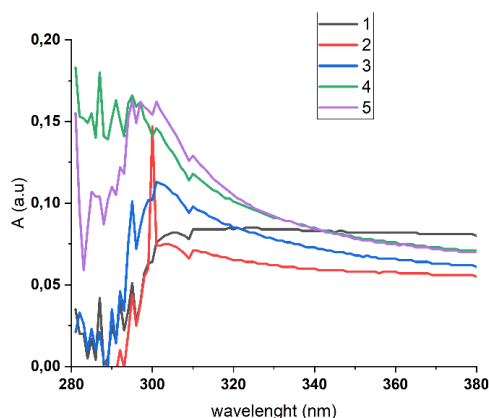
Резултатите са представени на фигури 8 и 9. Влиянието на polysorbate 80 върху абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe в серията от разтвори е значително. Абсорбцията му в интервала (290 – 330) nm се запазва максимална дори при ниски концентрации. Fe^{3+} йони имат ниска абсорбция при $\lambda = 300$ nm в сравнение с комплекса ALD/Fe, която се увеличава значително при наличието на polysorbate 80 в разтвора. Тъй като абсорбцията на polysorbate 80 съвпада по дължина на вълната с тази на комплекса от ALD/Fe, тя често припокрива сигнала от комплекса.

Този резултат показва, че присъствието на polysorbate 80 в средата може да компрометира приложението на методиката. Решение на проблема при количественото определяне на NaALD в моделните ДСЕЛДС е отстраняването на polysorbate 80 от средата преди измерването, например чрез филтруване.



(1) FeCl_3 0,37mM; (2) Polysorbate 80 0,3%; (3) Fe^{3+} 0,37mM/Polysorbate 80 0,3%; (4) Fe^{3+} 0,37mM/Polysorbate 80 0,6%; (5) Fe^{3+} 0,37mM/Polysorbate 80 0,9%;

Фигура 8. Абсорбционни спектри на Fe^{3+} в присъствие на polysorbate 80.



(1) FeCl_3 0,37 mM; (2) ALD/Fe; (3) Polysorbate 80 0,3%; (4) Fe^{3+} 0,37mM/Polysorbate 80 0,3%; (5) ALD/Fe /Polysorbate 80 0,3%;

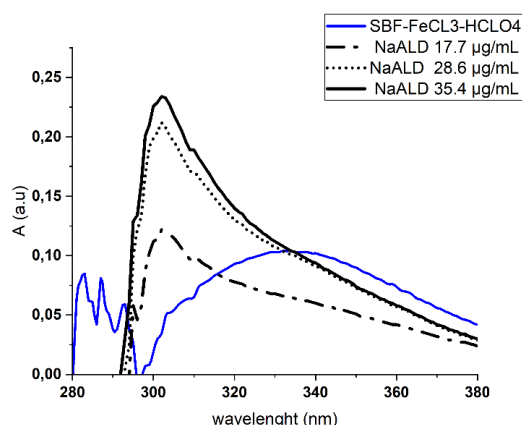
Фигура 9. Абсорбционни спектри на ALD/Fe в присъствие на polysorbate 80.

1.4. Влияние на фосфатите в средата за разтваряне върху образуването на комплекса ALD/Fe и абсорбционните му спектри

Свободните фосфати в средата могат да образуват съединения с Fe^{3+} йоните¹⁷, като от своя страна новообразуваните съединения биха могли да повлияят

¹⁷ Mo, G., Zhao, H., Xu, Y. and Yang, C. (2019) 'Extraction of Fe^{3+} from NaH_2PO_4 solution in a spiral microchannel device', *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 144, p. 107654. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107654>

количественото определяне на анализа. Изборът на модифициран фосфатен буфер, SBF¹⁸ за среда за прогнозиране на пермеацията на NaALD през мембрана в по-нататъшните изследвания наложи оценка на влиянието на фосфатите от средата SBF върху образуването на комплекса ALD/Fe и абсорбционните му спектри. За целта са измерени абсорбционните спектри на комплекса ALD/Fe, получен при три различни концентрации на NaALD в SBF в спектралния регион $\lambda = (200 - 400)$ nm. За сравнение е използван полученият абсорбционен спектър на Fe³⁺ във фосфатен буфер, без NaALD (фигура 10).



Фигура 10: Абсорбционни спектри NaALD в SBF.

Абсорбцията на Fe³⁺ в SBF при $\lambda = 300$ nm е минимална и не съвпада с абсорбционните максимуми на тестваните разтвори, което свидетелства за приложимостта на метода при посочените условия.

От съществено значение за успешното формулиране на стабилна и функционална лекарстводоставяща система е изборът на помощни вещества.

2. Оптимизиране състава на ДСЕЛДС с включен NaALD

2.1. Разтворимост на NaALD в липиди и определяне на разпределителния коефициент вода/масло (Kdistr)

Натриевият алендронат е добре разтворим във вода. С оглед да се прогнозира поведението му в предложената ЛДС е изследвана неговата разтворимост в различни масла¹⁹. Условията на провеждане на експеримента и съставът на моделните системи масло / вода / NaALD са представени в таблица 1 в глава „Материали и методи“. Основната разлика в четирите изследвани модела е маслената фаза, която е съответно олеинова киселина (Модел 1), средноверижни триглицериди (Модел 2), масло от черен дроб на треска (Модел 3) и кокосово масло (Модел 4). Изборът на посочените липиди е направен въз основа на присъствието им в диетата на хората и поради съдържащите се в

¹⁸ Zameer, S., Qadir, M.I., Ali, M., Khan, M.S. and Shahzad, Y. (2020) ‘Development, optimisation and evaluation of chitosan nanoparticles of alendronate against Alzheimer’s disease in intracerebroventricular streptozotocin model for brain delivery’, *Journal of Drug Targeting*, 29(2), pp. 199–216. <https://doi.org/10.1080/1061186x.2020.1817041>.

¹⁹ Hosny, K.M. (2016) ‘Alendronate sodium as enteric coated solid lipid nanoparticles; preparation, optimization, and in vivo evaluation to enhance its oral bioavailability’, *PLoS ONE*, 11(5), p. e0154926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154926>

тях абсорбционни подобрители²⁰. В посочените системи е определен разпределителният коефициент вода/масло на NaALD, който е изчислен съгласно уравнение 3. Концентрацията на NaALD във водната фаза (C_w) е определена съгласно уравнение 9, като е използвана средната стойност на абсорбцията от три последователни измервания. Концентрацията на NaALD в маслена фаза (C_{oil}) е определена като разлика между вложеното количество NaALD и намереното спектрофотометрично във водната фаза. Резултатите са представени в таблица 11.

Таблица 11: Разпределителен коефициент вода/масло на NaALD в моделните системи

	Модел 1	Модел 2	Модел 3	Модел 4
Вложено количество NaALD, mg	10	10	10	10
Абсорбция (A) при 300 nm	0,383	0,407	0,409	0,363
Установено количество на NaALD във водната фаза (C_w), mg	8,260	8,931	8,970	7,703
Установено количество на NaALD в маслена фаза (C_{oil}), mg	1,740	1,070	1,031	2,297
Разпределителен коефициент (K_{distr})	4,746	8,355	8,704	3,354

Натриевият алендронат се разпределя в избраните масла в низходящ ред както следва: OC > OA > CLO > MCT. По-доброто разпределяне на NaALD в OC може да бъде обяснено с йонни взаимодействия между първичната амино група на алендронат и свободните мастни киселини в кокосовото масло (Eur.Ph 11.0). В същия ред намалява и разтворимостта на NaALD в посочените липиди: OC – 1,15 mg/g, OA – 0,87 mg/g, CLO – 0,54 mg/g, MCT – 0,52 mg/g.

Изборът на ПАВ и съ-ПАВ е от съществено значение за стабилността на системата. Стабилизиращото им действие зависи от:

- Структурната им съвместимост с избрания липид и помежду им;
- Склонността им към образуване на стабилни микроемулсии и наноемулсии;
- Приносът им към солубилизиращата способност на лекарствотодавящата система.

2.2. Солубилизиране на NaALD в повърхностно активни вещества

Солубилизирането на NaALD в избрани ПАВ (polysorbate 80 (PS), polysorbate 20 (PL), sorbitan monooleate (SM), sorbitan monolaurate (SL)) е извършено съгласно описаната методика в глава „Материали и методи“. Изследването е необходимо за прогнозиране на миграцията на лекарството от вътрешната водна фаза в липидния слой. Получените резултати са представени в таблица 12.

²⁰ Nakmode, D. et al (2022). Fundamental Aspects of Lipid-Based Excipients in Lipid-Based Product Development. *Pharmaceutics*, 14(4), 831. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040831>

Таблица 12: Солубилизиране на NaALD в избрани ПАВ

Използвани ПАВ	Количество NaALD в супернатанта, mg/mL
SM	2,638
PL	5,617
PS	2,779
SL	4,493

Polysorbate 20 и sorbitan monolaurate 20 солубилизират съответно 5,6170 mg/mL и 4,4930 mg/mL NaALD. Тези ПАВ са от групата на полисорбатите и са структурно съвместими с ОС, тъй като хидрофобната част на молекулите на SL и на PL е съставена от лауринова киселина (монолаурат), а ОС съдържа между 40 – 50% лауринова киселина. Въпреки че солубилизират по-малко количество и структурно представляват олеати, повърхностно активните вещества SM и PS са избрани за последващи изследвания, тъй като водят до получаване на по-стабилни емулсии с ОС²¹. Освен това, стабилността на емулсиите се определя и от избора на подходящото съотношение между емулгатор и съ-емулгатор.

2.3. Определяне на критично ХЛР на първичната емулсия В/М

Въз основа на резултатите от предходните изследвания (т. 2.1. и т. 2.2.) са приготвени моделни емулсии. Те съдържат в равни съотношения вода и кокосово масло, и система от две ПАВ (polysorbate 80, polysorbate 20, sorbitan monooleate, sorbitan monolaurate, lecithine) със съответно теоретично ХЛР²². Съставите на системите емулгатор/съ-емулгатор, както и оценката на физичната стабилност на емулсиите след центрофугиране са представени в таблица 13.

Таблица 13: Състав на емулгаторните двойки и резултати от оценка на физичната стабилност след центрофугиране

ХЛР	ПАВ 20%	Визуална оценка
4,0	SM (100%)	разделяне
4,4	SM (99,06%) PS (0,94 %)	разделяне
5,0	SM (93,45%) PS (6,54 %)	разделяне
6,0	SM (84,11%) PS (15,90%)	без разделяне
7,0	SM (74,77%) PS (25,23%)	без разделяне
8,0	SM (65,40%) PS (34,60)	без разделяне
8,6	SL (100%)	разделяне
9,0	PCH (100%)	разделяне

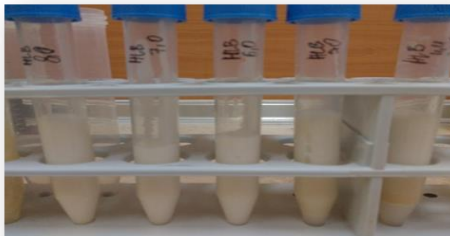
*ХЛР на използваните ПАВ: SM = 4,0; PS = 15,0; SL = 8,6; PCH = 9,0

Моделните емулсии са центрофугирани при 6000 rpm за 30 мин. Всички показват признаци на разделяне в различна степен с изключение на тези с ХЛР 6,0, 7,0 и 8,0. По

²¹ Ja' Afar, S. M., Khalid, R. M., Othaman, R., Mokhtar, W.N.A.W. and Ramli, S. (2019); Coconut oil based microemulsion formulations for hair care product application. J. Rheo. Sci. 48(3), 599–605

²² Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C. and Runkel, F. (2009) 'Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions', *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), pp. 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.033>

този начин визуално е определен интервалът на стойности на ХЛР, при който се получават стабилни първични емулсии В/М (фигура 11). За следващи изследвания е избрана първична емулсия (PE1) с ХЛР 7,0-7,5 и състав: вода 45,45%, ОС 45,46%, SM 6,79% и PS 2,29%. Съгласно Rukmini, A., *et al.* (2012) кокосовото масло образува в посочения диапазон от стойности на ХЛР стабилни В/М емулсии.



Фигура 11: Моделни емулсии след центрофугиране.

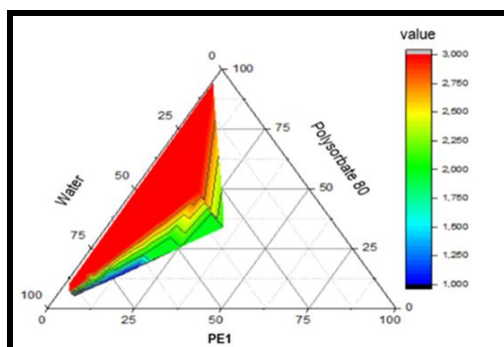
За да може ДСЕЛДС да се самоемулгира до стабилна В/М/В емулсия е необходимо ПАВ да са в оптимално съотношение. При недостатъчно количество на хидрофилен ПАВ няма да се образува стабилна множествена емулсия. Твърде високата концентрация, обаче, може да предизвика токсичност²³ (Maher, S., *et al.*, 2023).

За определяне на оптимални съотношения на веществата в състава на емулсията са построени псевдотрифазови диаграми.

2.4. Псевдотрифазови диаграми за определяне на оптималното количество на хидрофилен емулгатор към първичната емулсия PE1 в състава на ДСЕЛДС

Самообразуването на микроразмерни двойни емулсии В/М/В изисква добавянето на вторичен (хидрофилен) емулгатор. Избран е PS на базата на резултатите от изследванията, описани по-горе в точки 2.1., 2.2. и 2.3. Псевдотрифазовите диаграми са получени по методиката, описана в глава „Материали и методи“. Резултатите са обобщени на фигура 12. Установено е, че системата PE1/PS/H₂O (т/т) образува микроемулсии в следния диапазон: (5-95)% H₂O и съотношения PE1/PS от 1:9 до 4:5. В диапазона (33,3-50)% H₂O, PE1 (11,2-14)%, PS (38,85-51,8)% се наблюдава образуването на силно вискозна гелоподобна структура (фигура 12).

²³ Maher, S. *et al* (2023) 'Safety of surfactant excipients in oral drug formulations', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 202, p. 115086. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.115086>



Вид на дисперсията при визуална инспекция											
Бяла/млекоподобна				Сива/опалесцираща				Леко опалесцираща/прозрачна			

Фигура 12: Псевдотрифазова диаграма, където PE1 е първична в/м емулсия с ПАВ система SM/PS в отношение 74,77%/25,23%.

За формулирането на самоемулгираща се система минималните количества PS като вторичен емулгатор към PE1 са в диапазона (51-54)% (v/v).

Вътрешната водна фаза, представляваща разтвор на включеното ЛВ, е диспергирана в маслената фаза. Изборът на подходяща система от емулгатори е от съществено значение, но не винаги е достатъчно за образуване на стабилна емулсия²⁴.

NaALD във вода се дисоциира до алендронат и Na^+ йони (pH 4-5). Изо-осмотичната концентрация, изчислена по закона на Raoult, приложен за електролити, е приблизително 5,06% (уравнение 10):

$$\Delta T = iK_e m, \quad (10)$$

където ΔT е промяната на температурата на кипене/замръзване, K_e е ебулиоскопската константа на разтворителя (0,52°C kg/mol за водата), m е моларност и i е йонизационният коефициент.

Разликите в осмоларитета между вътрешната и външната водни фази е предпоставка за миграция на вода през липидната бариера. Промените в съотношението между вътрешната водна и маслена фази е предпоставка за нарушена физична стабилност. Това може да бъде предотвратено чрез включване на осмотично активен агент. Друг подход за ограничаване на коалесценцията на капките на вътрешната водна фаза е чрез нейното желиране²⁴.

Изследвано е натоварването на моделни първични емулсии с NaALD (5%), както и възможността за стабилизиране на вътрешната водна фаза посредством включването съставите на phosphatidylcholine, протеини, хидроколоиди или полизахариди (напр. желатин, суроватъчен протеин, арабска гума, др.)^{25 26}, както и комбинации между тях.

²⁴ Oppermann, A.K.L., Moreira, A.L.T., Cavalcanti, R.N. and Hubinger, M.D. (2015) 'Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (W1/O/W2) multiple emulsions', *Food Hydrocolloids*, 48, pp. 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.027>

²⁵ Devi, L.M., Das, A.B. and Badwaik, L.S. (2023) 'Effect of gelatin and acacia gum on anthocyanin coacervated microcapsules using double emulsion and its characterization', *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, p. 123896. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123896>

²⁶ Aniya, N., Peng, Y., Cui, B., Liu, Y. and Guo, J. (2022) 'Improved stabilization and in vitro digestibility of mulberry anthocyanins by double emulsion with pea protein isolate and xanthan gum', *Foods*, 12(1), p. 151. <https://doi.org/10.3390/foods12010151>

2.5. Изследване влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия PE1

Приготвена е серия от моделни емулсии В/М с включен във водната фаза NaALD (таблица 14). Като В/М емулгаторни системи са използвани sorbitan monooleate /polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (SM/PS) и sorbitan monooleate /phosphatidylcholine (SM/PCN). Изборът на phosphatidylcholine е базиран на литературни данни за потенциала му да стабилизира В/М емулсии с разтворени във вътрешната фаза осмотично активни вещества²⁷. Според Orpermann, A.K.L. *et al.* (2015) желирането на вътрешната водна фаза посредством суроватъчен протеин (WPC 80) или желатин (G) може да повиши стабилността и ефективното включване на активни вещества във В/М/В емулсии. В тази връзка, както и поради способността им да повишават вискозитета и да стабилизират междофазовия филм, е проучено влиянието на арабска гума (AG), WPC 80 и G върху стабилността на изследваните моделни първични емулсии (PE) (таблица 14). Концентрацията на полимерите (3%) е избрана въз основа на литературни данни^{25,26,27}.

След 12 часов престой при стайна температура (25°C) моделните системи с включена арабска гума (AG) показват признаци на разделяне, а тези със суроватъчен протеин (WPC) и желатин (G) остават стабилни (фигура 13).

Показалите стабилност емулсии с WPC 80 и G са аналитично центрофугирани при 6000 rpm на цикли по 2 min според методиката, описана в т. 3.6. на глава „Материали и методи“. След първия цикъл моделите WPC 80 (1) и (2) показват значително разделяне на фазите (фигура 14). При съставите с желатин, NaALD/G (1) показва признаци на разделяне след 3-ти цикъл на центрофугиране, докато NaALD/G (2) остава стабилен през цялото време.

Phosphatidylcholine представлява валидна алтернатива като съ-емулгатор на sorbitane monooleate 80 при стабилизиране на В/М емулсията с включен NaALD. Това може да бъде обяснено със структурата на съединението. Използваният phosphatidylcholine е 3-sn-phosphatidylcholine и е производно на олеиновата киселина, подобно на polysorbate 80. Това го прави структурно съвместим както с избраното масло (съставено предимно от наситени мастни киселини), така и със sorbitane monooleate 80.

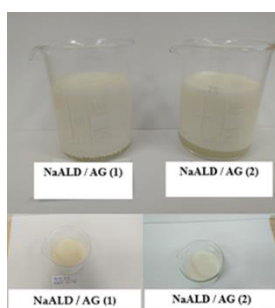
От получените резултати могат да се направят следните изводи:

- **Желатин е подходящ за стабилизиране на вътрешната водна фаза на първичните емулсии, базирани на polysorbate 80 / sorbitane monooleate 80 (PE1) и phosphatidylcholine / sorbitane monooleate 80 (PE2) с включен NaALD. Необходими са допълнителни изследвания за определяне на най-подходящата концентрация на желатин, осигуряваща оптимална стабилност на PE1 и PE2.**
- **phosphatidylcholine е потенциална алтернатива на polysorbate 80 като съ-емулгатор на sorbitane monooleate 80 за В/М емулсии.**

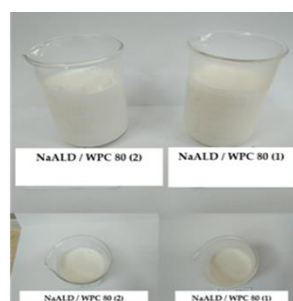
²⁷ Züge, L.C.B., Borsato, D., Silva, J.L. and Pinho, S.C. (2012) 'Catastrophic inversion and rheological behavior in soy lecithin and Tween 80 based food emulsions', *Journal of Food Engineering*, 116(1), pp. 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.008>

Таблица 14: Състав на първичните в/м емулсии

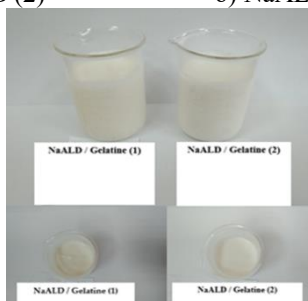
Състав, % (т/т)	NaALD / AG (1)	NaALD / AG (2)	NaALD / WPC 80 (1)	NaALD / WPC 80 (2)	NaALD / G (1)	NaALD / G (2)
Алендронат натрий (ALDNa)	1.875	1.875	1.875	1.875	1.875	1.875
Кокосово масло (OC)	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00
Acacia Gum (AG)	1.125	1.125	-	-	-	-
WPC 80	-	-	1.125	1.125	-	-
Gelatine (G)	-	-	-	-	1.125	1.125
Phosphatidylcholine (PCH)	1.250	-	1.250	-	1.250	-
Сорбитан моноолеат (SM)	1.250	1.875	1.250	1.875	1.250	1.875
полиоксиетилен 20 сорбитан моноолеат (PS)	-	0.625	-	0.625	-	0.625
H ₂ O _{dest}	14.50	29.5	34.995	34.995	34.995	34.995
наблюдение след 12ч	разделяне на фази	разделяне на фази	не се наблюдава разделяне	не се наблюдава разделяне	не се наблюдава разделяне	не се наблюдава разделяне
след центрофугиране	-	-	разделяне на фазите	разделяне на фазите	не се наблюдава разделяне	не се наблюдава разделяне



а) NaALD/AG (1) и NaALD/AG (2)



б) NaALD/WPC 80 (1) и NaALD/WPC 80



в) NaALD/G (1) и NaALD/G (2)

Фигура 13: Моделни емулсии с NaALD след 12-часово съхранение.



Фигура 14: Първични емулсии след аналитично центрофугиране.

Необходимо е да се проучи склонността към самоемулгиране на PE2 с фосфатидил холин като съ-емулгатор на sorbitane monooleate 80 (SM) и вторичен емулгатор polysorbate 80 (PS).

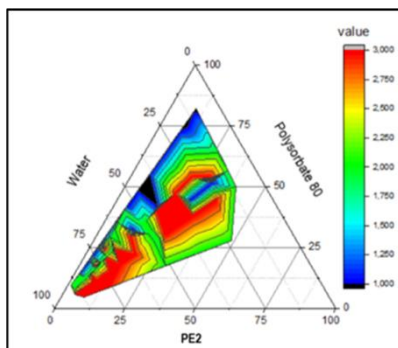
2.6. Псевдотрифазова диаграма за определяне на съотношенията на вторичния емулгатор към първичната емулсия PE2

На базата на резултатите, представени в предходната точка 2.5. е предложено първичната В/М емулсия (PE2) да бъде съставена от вода, кокосово масло и емулгаторна система SM/PSH с приблизително ХЛР 7÷7,5. Визуалната оценка е извършена според критерии в т. 2.3 от глава „Резултати и дискусия“. На базата на резултатите е построена псевдотрифазова диаграма (фигура 15).

Системата PE2/PS/H₂O (т/т) образува микроемулсии в следния диапазон: H₂O (5-95)% и съотношения PE2/PS от 2:8 до 5:5. В диапазона PE2 (2,5-9)%, PS (32-45)% и H₂O (12-25)% се наблюдава образуването на вискозна прозрачна гелообразна дисперсия. За формулирането на самоемулгираща се система, минималните количества PS за добавяне към PE2 са в диапазона (54-56)% (т/т).

Както е отбелязано в предходната т. 2.5., необходимо е да се определи оптималната концентрация на желатин във вътрешната водна фаза на В/М/В емулсиите.

За целта са изготвени серии от моделни ДСЕЛДС с нарастваща концентрация на G във вътрешната водна фаза. За В/М емулсионни системи са използвани двойките SM/PSH и SM/PS.



Вид на дисперсията при визуална инспекция									
Бяла/млекоподобна				Сива/опалесцираща				Леко опалесцираща/прозрачна	

Фигура 15: Псевдотрифазова диаграма в/м PE2/SM/PSH с PS.

2.7. Моделни състави на ДСЕЛДС–NaALD

Моделните състави на ДСЕЛДС–NaALD са приготвени чрез двуетапна техника на емулгиране, описана в раздел „Материали и методи“ (таблица 2). Получени са гелоподобни непрозрачни хомогенни концентрати с бледо жълто-зелен цвят.

Оценката на физичната и на термодинамичната стабилност на моделните ДСЕЛДС е от съществено значение за прогнозиране на поведението им *in vivo*, при мащабиране на производството и при съхранение.

2.8. Оценка на физична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD чрез центрофугиране

Физичната стабилност е оценена чрез аналитично центрофугиране, извършено съгласно методиката, описана в т. 3.6. „Изследване влиянието на ПВ върху стабилността на първичната емулсия PE1“ от глава „Материали и методи“.

Времето за центрофугиране до пълното разделяне на фазите е оценено след всеки температурен цикъл. Всички моделни системи показват разделяне на фазите след един или два цикъла на центрофугиране. Модели PLG 1.1 и Smix1 3.0 (таблица 2) показват разделяне на фазите след 4 цикъла на центрофугиране (фигура 16).



Фигура 16: Модели ДСЕЛДС PLG 1.1 и Smix1 3.0, показали фазово разделяне след четири цикъла на аналитично центрофугиране.

Съотношението 1:10 G/NaALD стабилизира вътрешната водна фаза на моделната система. Нарастването на концентрацията на желатин във вътрешната водна фаза (таблица 3), независимо от използваните В/М емулгаторни системи, води до увеличаване на нейната плътност. Това предизвиква ускорена седиментация на системата при прилагане на центрофугални сили²⁸.

2.9. Термодинамична стабилност на ДСЕЛДС–NaALD

Термодинамичната стабилност е определена по метода на разрежданията, като равновесната константа е определена спектрофотометрично²⁹.

²⁸ Wankhede, V.P., Sharma, P., Hussain, S.A. and Singh, R.R.B. (2020) 'Structure and stability of W 1/O/W 2 emulsions as influenced by WPC and NaCl in inner aqueous phase. Journal of food science and technology, 57, pp.3482-3492. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04383-9>

²⁹ Pokhrel, D.R. et al. (2023) 'A recent overview of surfactant–drug interactions and their importance,' RSC Advances, 13(26), pp. 17685–17704. <https://doi.org/10.1039/d3ra02883f>.

Изчислените енталпии на емулсиите имат отрицателни стойности. Получените резултати могат да се свържат с екзотермични³⁰ процеси. Ентропиите в системите имат минимални отрицателни стойности, клонящи към нула. Резултатите са представени в таблица 15.

Модел PLG 1.1 се характеризира с най-висока обща енергия на Гибс, следван от Smix1 3.0. Свободната енергия на Гибс нараства по модул в присъствието на желатин и phosphatidylcholine в емулсията. Следователно, PLG 1.1 е термодинамично по-стабилен от Smix1 3.0.

Таблица 15: Термодинамични параметри на моделните ДСЕЛДС-NaALD

Модели	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [kJ/mol.K]	K
PLG 1.1	-6,37 $\pm$ 0,13	-20,11 $\pm$ 0,39	-005 $\pm$ 0,01	13,0 $\pm$ 0,12
Smix1 3.0	-1,91 $\pm$ 0,07	-18,17 $\pm$ 0,61	-0,05 $\pm$ 0,01	2,17 $\pm$ 0,07

2.10. Оценка за съвместимост на натриев алендронат с избраните помощни вещества в състава на ДСЕЛДС-NaALD

Снетите ИЧ спектри на помощните вещества са представени в таблица 16, а тези на моделните състави – в таблици 17 и 18 и фигури 17 и 18.

В диапазона 3650 – 3400 cm⁻¹ и при двата модела (таблици 17 и 18, фигури 17 и 18) е установена характеристична ивица, дължаща се на терминалните –ОН групи в структурите на polysorbate 80, sorbitan monooleate 80 и на водата в системата³¹. При ~3440 cm⁻¹ не се наблюдават валентни трептения (stretching) на N-H връзките, характерни за алифатната –NH₂ група, в структурата на NaALD³². Около ~1650 cm⁻¹ и при двата модела се наблюдава средна по интензитет честотна ивица, характерна за положително зареден N-атом на аминна група, при наличието на водородни връзки³³.

При участието на –NH₂ група във водородни връзки, характеристичните вибрации се изместват към по-ниски честоти, като интензитетите са по-слаби и се припокриват от тези на –ОН групите. Ивиците при ~2950 cm⁻¹ в съчетание с характеристичните ивици на поглъщане за амид II при ~1470, ~1452, ~1395 cm⁻¹ (таблици 17 и 18, фигури 17 и 18) потвърждават наличието на желатин и в двата състава. Ивиците в региона при ~1750-1730, ~1250 cm⁻¹, характерни за вибрациите на –C=O– от естерна група в съчетание със сигналите ~2980, ~2920, ~2850 cm⁻¹ доказват наличието на алифатни вериги от кокосови триглицериди, polysorbate 80 и sorbitan 80.

В спектъра на модел PLG 1.1 се установяват ивици при ~1452 cm⁻¹ и ~1280 cm⁻¹, характерни съответно за четвъртична амониева група и фосфатните остатъци в структурата на лецитин/phosphatidylcholine. В зоната на тройните връзки, при честота

³⁰ Gandova, V. and Genov, I. (2020) 'Influence of casein and different supplements into stability of corn oil/water emulsions', *Food Science and Applied Biotechnology*, 3(1), p. 9. <https://doi.org/10.30721/fsab2020.v3.i1.48>

³¹ Shadmani, N. et al. (2023) 'The synthesis and development of poly (ε-caprolactone) conjugated polyoxyethylene sorbitan oleate-based micelles for curcumin drug release: an in vitro study on breast cancer cells'. *RSC advances*, 13(34), pp.23449-23460

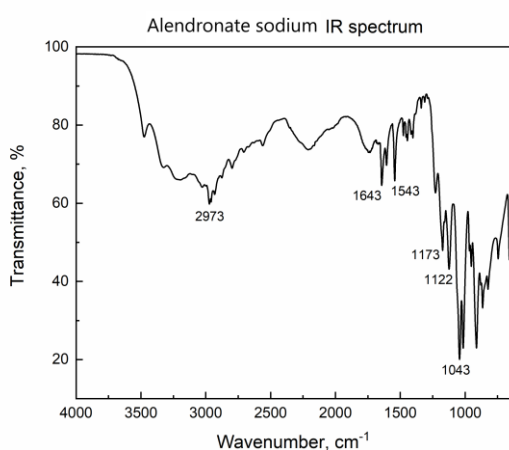
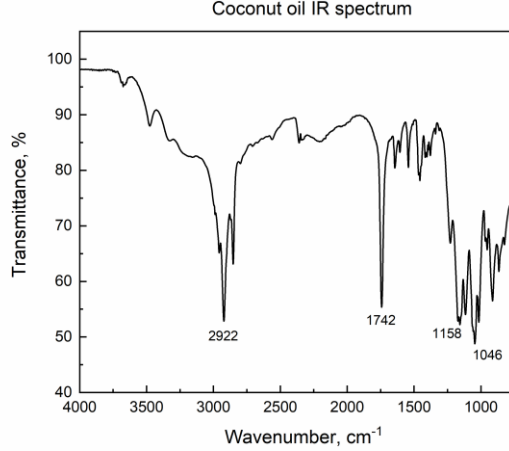
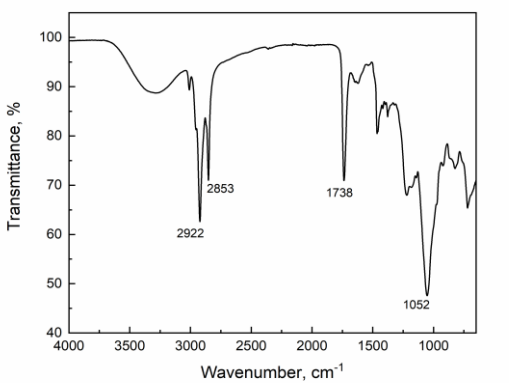
³² Ananchenko, G. et al., (2013) 'Alendronate sodium', *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 38, pp.1-33. <https://doi.org/10.3390/ma15238624>

³³ Nandiyanto, A.B.D. et al. (2022) 'Interpretation of fourier Transform Infrared Spectra (FTIR): a practical approach in the Polymer/Plastic thermal decomposition,' *Indonesian Journal of Science and Technology*, 8(1), pp. 113–126. <https://doi.org/10.17509/ijost.v8i1.53297>

$\sim 2350\text{ cm}^{-1}$, се установява слаб сигнал, характерен за -ОН групи (Shadmani, N. *et al.*, 2023). Такъв сигнал отсъства в спектъра на Smix1 3.0.

Във fingerprint зоната се наблюдават характерни за NaALD ивици C-P-O, PO₃ и -P-O-C при честоти ~ 1100 , ~ 1070 и $\sim 720\text{ cm}^{-1}$. При модел PLG 1.1 в честотния диапазон ~ 1100 до $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ се установява много интензивна ивица поради наслагването на сигналите на фосфатните остатъци на NaALD ($\sim 1043\text{ cm}^{-1}$) с тези на лецитин ($\sim 1052\text{ cm}^{-1}$).

Таблица 16: ИЧ спектри на помощни вещества

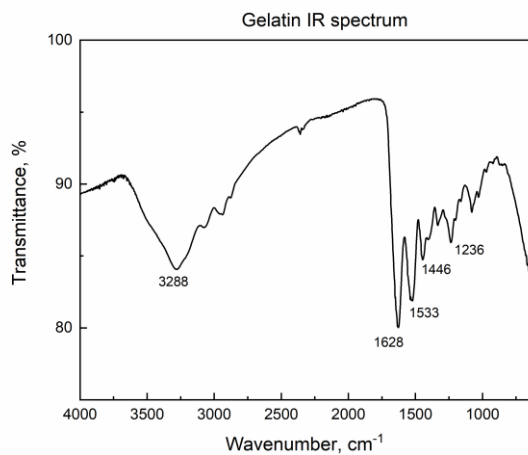
No.	Функционална група	Установени ивици (cm ⁻¹)	
Натриев алендронат			
1	-OH, третичен	~ 3500	
2	N-H, амини, str.*	$\sim 3440, \sim 1643$	
3	C-H, алиф, str.	~ 2973	
4	C-N, амин, str.	$\sim 1173, \sim 1122$	
5	C-C str.	~ 1543	
6	C-H, алкани, str.	$\sim 2973, \sim 2958, \sim 2917$	
7	C-P-O PO ₃	~ 1043 ~ 720	
Кокосово масло			
1	C-H, алифатни вериги, -CH ₃ , bend.** -CH ₂ -, bend.	~ 2922 ~ 2820	
2	C=O, мастни киселини, str.	~ 1742	
3	-(C=O)-O-, естери, str.	~ 1158	
4	-O-CH ₂ -, алифатни естери, str.	~ 1046	
L-α-Lecithin, phosphatidylcholine			
1	-CH ₃ , bend. -CH ₂ -, bend.	~ 2922 ~ 2853	
2	-P=O, str.	~ 1280	
3	-C=O, естер, str.	~ 1738	
4	-N ⁺ (CH ₃) ₃ , str.	~ 1400	
5	-O-CH ₂ -, алифатни, str.	~ 1100	
6	-P-O-C, str.	~ 1052	

(вал. трептения тип *stretching, **bending)

Таблица 16: ИЧ спектри на помощни вещества (продължение)

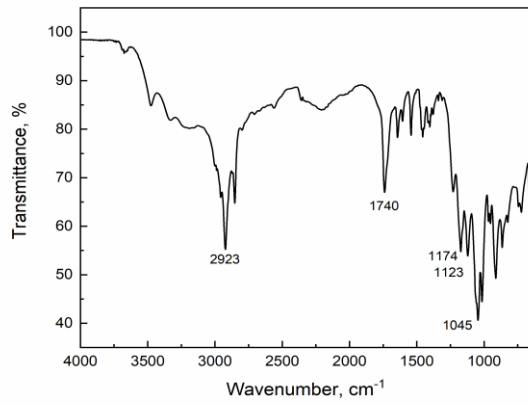
No.	Функционална група	Установени ивици (cm ⁻¹)
Желатин		
1	-(C=O)-N-, амид А, str.	~3288
2	-(C=O)-N-, амид I, str.	~1628
3	-(C=O)-N-, амид II, str.	~1533, ~1521, ~1446
4	-(C=O)-N-, амид III, str.	~1236, ~1162, ~1080,
5	-C-H, амиди, str	~2934
6	-C-H, Пролин, str	~1334
7	-COOH, амидна връзка	~1446, ~1334, ~1236

Gelatin IR spectrum



Sorbitan monooleate 80, SP80		
1	-OH , широка, str.	~3399
2	-C-H, при -CH ₂ - и -CH ₃ от странични алифатни, str.	~2923 , ~2855
3	-C=O- , естер , str.	~1740
4	-C-O, естер, str. O-CH ₂ -, алифатни естери, str.	~1174 , ~1123, ~1045

Sorbitan monooleate 80 IR spectrum



No.	функционална група	установени ивици (cm ⁻¹)
Polysorbate 80, TW80		
1	-OH , ивица, str.	~3428
2	-C-H, при -CH ₂ - и -CH ₃ от странични алифатни, str.	~2922 , ~2912
3	-C=O-, естер, остра ивица, str.	~1735
4	-C-O-C, естер, bend.	~1103
5	C=C, аром. , str.	~1456
6	C-O-C, str.	~1242

Polysorbate 80 IR spectrum

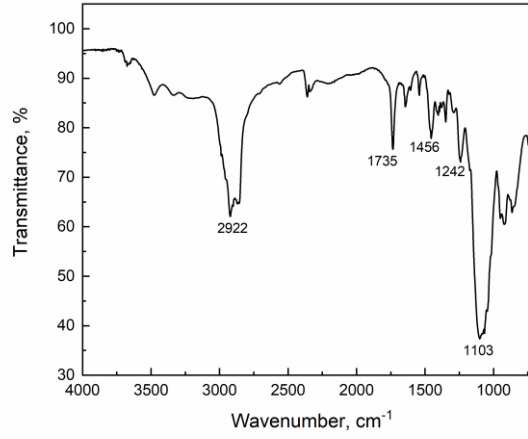
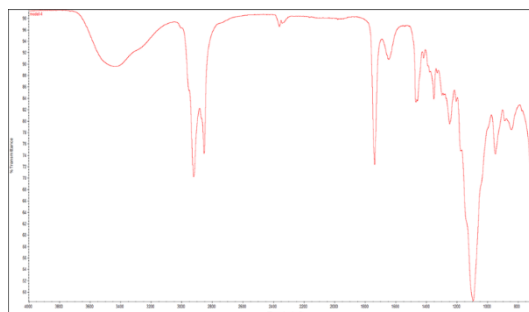
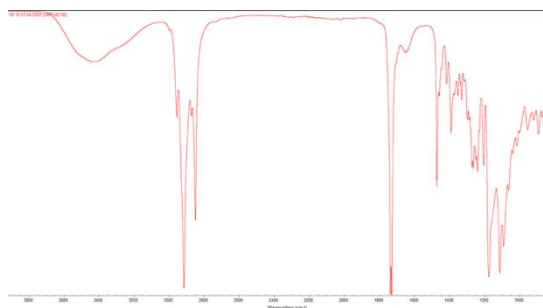


Таблица 17: ИЧ спектър на Модел Smix1 3.0

№	Функционална група	Установени ивици (cm ⁻¹)
1	-OH	~3450
2	-C-H, при -CH ₂ - и -CH ₃ от странични алифатни	~2980, ~2920, ~2850
3	-C-H при -CO-NH-	~2950
4	-C=O-, TW80, SP80, мастни к-ни, естер, остра ивица	~1730
5.	водородни връзки	~1650
6	-C=O-, амид II, желатин	~1470, ~1452, ~1395
7	-C-O, естер, коксово масло	~1250, ~1100
8	-N-C-, амин	~1150
9	C-P-O	~720
	PO ₃	~1100

Таблица 18: ИЧ спектър на Модел PLG 1.1

№	Функционална група	Установени (cm ⁻¹)
1	-OH, ивица	~3450
2	-C-H, при -CH ₂ - и -CH ₃ от странични алифатни	~2980, ~2920, ~2850
3	-C-H при -CO-NH-	~2950
4	C-C, циклични	~2350
5	-C=O-, TW80, SP80, мастни к-ни, естер, остра ивица	~1730
6	водородни връзки	~1650
7	-C=O-, амид II, желатин	~1470, ~1452, ~1395
8	-C-O ₂	~1475, ~1440
9	-P=O, естер, лецитин	~1280
10	-N-C-, амин	~1150
	C-P-O	~720
11	PO ₃	~1100

**Фигура 17:** ИЧ спектър на модел Smix1 3.0. **Фигура 18:** ИЧ спектър на модел PLG 1.1.

Изследването не показва съществени изменения, протичащи в условията на изготвяне на моделите, което потвърждава липсата на несъвместимости. Установено е наличието на водородни връзки с участието на първична аминна

група (от алендронат) в спектрите на двата модела. Този резултат може частично да обясни по-високата физична стабилност на избраните моделни състави.

ДСЕЛДС трябва да се диспергира напълно и бързо, когато се подложи на разреждане във водна среда, при леко разбъркване. Времето за самоемулгиране (BCE) е важен показател за оценка на ефективността на образуване на емулсия. Оптимално е BCE да съвпада с времето за гастрален транзит.

2.11. Време за самоемулгиране на ДСЕЛДС-NaALD

Установено е времето за самоемулгиране (BCE), определено съгласно методиката, описана в т. 3.9. „Време за самоемулгиране“ от глава „Материали и методи“ (фигура 19).

Времето за самоемулгиране при избраните условия е 70 min за PLG 1.1 и 69 min за Smix1 3.0. Резултатът е в съответствие със средното време за преминаване на лекарствените форми през стомаха на гладно³⁴. Този резултат е потвърден от проучванията на Worsøe *et al.* (2011)³⁵, според които то е от 56 до 57,5 min.

Получената леко опалесцираща дисперсия (фигура 19) при определяне на BCE на моделните ДСЕЛДС-NaALD потвърждава резултатите от псевдотрифазовите диаграми (фигури 12 и 15).



Фигура 19: Определяне на BCE.

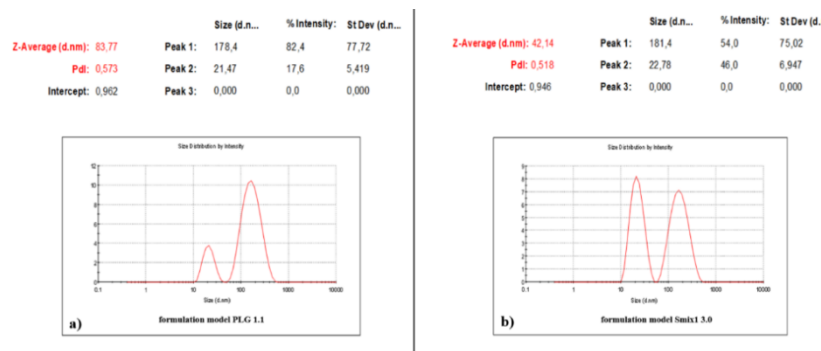
2.12. Оценка на размера на капките на дисперсната фаза след самоемулгиране на ДСЕЛДС-NaALD

Аликвотни части (1 mL) от получената дисперсия при определяне на BCE са анализирани за оценка разпределението на размера на капките на дисперсната фаза. Според получените резултати PLG 1.1 (фигура 20a) и Smix1 3.0 (фигура 20b) се самоемулгират до микроемулсии. И двата модела се характеризират с бимодално

³⁴ O'Grady, J., Murphy, C.L., Barry, L., Shanahan, F. and Buckley, M. (2020) 'Defining gastrointestinal transit time using video capsule endoscopy: a study of healthy subjects', *Endoscopy international open*, 8(03), pp.E396-E400

³⁵ Worsøe, J., Fynne, L., Gregersen, T., Schlageter, V., Christensen, L.A., Dahlerup, J.F., Rijkhoff, N.J., Laurberg, S. and Krogh, K. (2011) 'Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system', *BMC gastroenterology*, 11, pp.1-10.
<https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-145>

разпределение на размера на капчиците. PLG 1.1 показва пикове при 178,4 nm (82,4%) и при 21,47 nm (17,6%), а Smix1 3.0 – при 181,4 nm (54%) и 22,78 nm (46%).

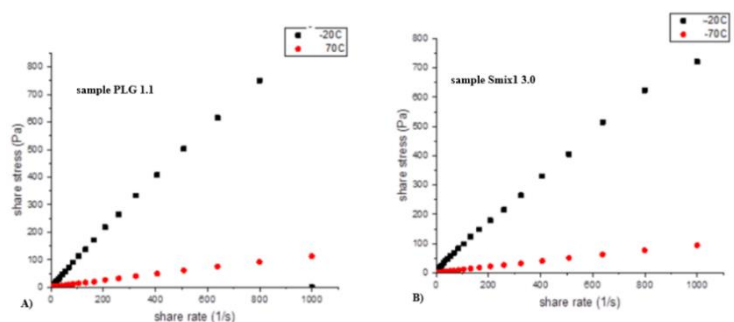


Фигура 20: Разпределение на размера на частиците след самоемулгиране на PLG 1.1 (a) и Smix1 3.0 (b).

Реологичните свойства при различни температури са основни характеристики, както по време на производство, така и по време на съхранение. ДСЕЛДС обикновено се включват в меки желатинови капсули при 65-70°C и се съхраняват при стайна температура.

2.13. Реологични изследвания на ДСЕЛДС–NaALD

Резултатите от проведените реологични изследвания показват, че съставите PLG 1.1 и Smix1 3.0 са Ненютонови течности с псевдопластично поведение при 20°C. Smix1 3.0 има по-висок пластичен вискозитет от PLG 1.1. При 70°C моделите PLG 1.1 (фигура 21a) и Smix1 3.0 (фигура 21b) показват поведение на Нютонов флуид. Тези резултати предполагат, че PLG 1.1 и Smix1 3.0 са подходящи за пълнене в меки капсули, когато се изисква стабилност на състава при високи температури³⁶.



Фигура 21: Реологично поведение на ДСЕЛДС-NaALD при 20 и 70°C: PLG 1.1 (A) и Smix1 3.0 (B).

Най-подходящият реологичен модел, описващ PLG 1.1 и Smix1 3.0, е моделът Herschel-Bulkey. Резултатите от приложените реологични модели при температура от 20°C са представени в таблица 19. Моделът Herschel-Bulkey показва най-добро съвпадение с експерименталните данни, като оценката е направена чрез коефициент на детерминация R^2 и минимална квадратична грешка (RMSE).

³⁶Gullapalli, R.P. (2010) 'Soft gelatin capsules (Softgels),' Journal of Pharmaceutical Sciences, 99(10), pp. 4107–4148. <https://doi.org/10.1002/jps.22151>

Определянето на граничното напрежение дава информация за структурната стабилност на материалите. При напрежение на срязване под граничното, веществото се деформира като еластично твърдо тяло, а при напрежение над граничното тече като вискозна течност³⁷. PLG 1.1 няма гранично напрежение, за разлика от Smix1 3.0. Този резултат може да се обясни с наличието на соев лецитин в състава на PLG 1.1. Подобни данни са докладвани от Bhattacharya, S. *et al.* (1993)³⁸. Авторите отбелязват, че не е наблюдавано гранично напрежение за лецитинови емулсии със соево масло.

Таблица 19: Реологични параметри на моделните състави PLG 1.1 и Smix1 3.0 при 20°C

Образец	Herschel-Bulkey model				
	R ²	RMSE	n	K, Pa.s	τ ₀ , Pa
PLG 1.1	0,85	0,1084	0,55 ±0,10	11,8 ±1,10	0±0,10
Smix1 3.0	0,999	0,0895	0,89 ±0,10	1,6 ±0,10	1,41±0,10
	Ostwald-Weel model				
	R ²	RMSE	n	K, Pa.s	τ ₀ , Pa
PLG 1.1	0,845	0,1084	0,56 ±0,10	10,83 ±0,70	
Smix1 3.0	0,995	0,0895	0,89 ±0,01	1,63 ±0,08	
	Бингамово поведение				
	R ²	RMSE	n	K, Pa.s	τ ₀ , Pa
PLG 1.1	0,849	0,1084	0,58 ±0,08		23,72±1,90
Smix1 3.0	0,995	0,0895	0,76 ±0,01		7,63±1,78

3. Технологично и биофармацевтично охарактеризиране на формулираните в твърди желатинови капсули ДСЕЛДС-NaALD

За перорално приложение ДСЕЛДС се доставят в капсулна лекарствена форма. За целта на изследванията желатинови капсули размер „1“ (номинален обем 0,5 mL) са напълнени с избраните моделни ДСЕЛДС и са технологично охарактеризирани. Всяка капсула е с теоретично съдържание на NaALD 32,1 mg.

3.1. Равномерност на масата на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD

Равномерността на масата е определена съгласно методиката, описана в глава „Материали и методи“. Резултатите са представени в Таблица 20.

Съгласно Ph.Eur. 11.0 за капсули с:

- маса до 300 mg допустимото отклонение е $\pm 10\%$;
- маса 300 mg и повече допустимото отклонение е $\pm 7,5\%$.

³⁷ Martins, L.S. et al., (2021) 'Properties of cellulose nanofibers extracted from eucalyptus and their emulsifying role in the Oil-In-Water pickering emulsions,' Research Square (Research Square) [Preprint]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-413307/v1>

³⁸ Bhattacharya, S., (1993) 'Some physical and engineering properties of tamarind (Tamarindus indica) seed,' Journal of Food Engineering, 18(1), pp. 77–89. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(93\)90076-v](https://doi.org/10.1016/0260-8774(93)90076-v)

Средната маса на капсулите, съдържащи Smix1 3.0 и PLG 1.1, е съответно 0,476 g и 0,447 g. Приложимото отклонение е в рамките $\pm 7,5\%$. Измерената средна маса на желатиновите обвивки е 73,5 mg.

Само една капсула, съдържаща Smix1 3.0, се отклонява от границите 0,512-0,440 g, но с не повече от двойно допустимото отклонение. Всички капсули, съдържащи PLG 1.1, попадат в определеният интервал (0,481 – 0,413) g (таблица 20).

Таблица 20. Равномерност на масата на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD

№	Smix1 3.0 маса/капсула (g)	PLG 1.1 маса/капсула (g)	№	Smix1 3.0 маса/капсула (g)	PLG 1.1 маса/капсула (g)
1	0,464	0,450	11	0,475	0,449
2	0,476	0,447	12	0,475	0,448
3	0,475	0,440	13	0,475	0,440
4	0,488	0,441	14	0,487	0,444
5	0,491	0,466	15	0,489	0,465
6	0,476	0,447	16	0,476	0,447
7	0,475	0,440	17	0,475	0,440
8	0,424*	0,447	18	0,468	0,447
9	0,476	0,450	19	0,476	0,450
10	0,488	0,441	20	0,488	0,441

И двата модела удовлетворяват теста за равномерност на масата на еднородни препарати.

3.2. Равномерност на дозовите единици на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD

Равномерността на дозовите единици е определена съгласно методиката, описана в глава „Материали и методи“. Резултатите са представени в таблица 21.

Таблица 21: Равномерност на дозовите единици

Модел ДСЕЛДС	Съдържание на NaALD в капсулите (mg)		
	Теоретично *	Установено**	Изискване
Модел Smix1 3.0	32,95	32,85	37,89-28,01
Модел PLG 1.1	31,42	31,30	36,13-26,71

*установено на основата на средната маса от 10 капсули; **средна стойност от 10 измервания

Установените стойности и при двата модела попадат в допустимото отклонение и, следователно, изискването на теста е удовлетворено.

Получените резултати (т.3.1 и т.3.2) потвърждават заключенията от реологичните изследвания (т.2.13). Изследваните моделни ДСЕЛДС имат потенциала да гарантират производството на капсулни дозови единици с равномерно разпределение на дозата на NaALD. Мащабирането на процеса към производствена скала е предмет на допълнителни изследвания, които са извън целите на настоящия дисертационен труд.

Биофармацевтичното охарактеризиране на моделните ДСЕЛДС в условия, максимално близки до физиологичните, е от значение за прогнозирането на тяхното *in vivo* представяне. То е предпоставка за установяване на *in vitro* – *in vivo* корелация, която може да се използва като инструмент за контрол на качеството, оптимизиране на готовия продукт и заместител на изследването на бионаличността.

3.3. Време за самоемулгиране и дисперзитет на твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD в биомиметични среди

По една капсула, съдържаща съответно модел Smix1 3.0 и модел PLG 1.1, е поставена в 200 mL от средите FaSSGF (pH 1,6) и FaSSIF (pH 6,5), чийто състав е описан в глава „Материали и методи“. Установено е времето за самоемулгиране (BCE) на моделите в различните биомиметични среди (таблица 22).

Таблица 22: Време за самоемулгиране в биомиметични среди

Модел	BCE в FaSSGF pH 1,6, (min)	BCE в FaSSIF pH 6,5, (min)
Smix1 3.0	49*	62*
PLG 1.1	80 **	82**

Бледо сива опалесцираща дисперсия*; Бледо жълта дисперсия**

Определен е дисперзитетът на моделите в различните среди. Полидисперсността им по интензитет и обем е представена на фигури (22 – 25), като е сравнена с тези на празните среди.

Анализът на средата FaSSGF (pH 1,6) за разпределение по интензитет показва пик при 596,8 nm със Z-average 675,2 nm и PDI 1,0 (фигура 22). Разпределението по обем на същата средата FaSSGF (pH 1,6) се характеризира отново с един основен пик при 559,8 nm и z-average 675,2 nm (фигура 23). Този резултат може да бъде обяснен с образуването на агрегати и мицели от съдържащите се в средата лецитин и тауроколат³⁹ (фигура 22). Наблюдаваните агрегати представляват широко дисперсна популация, видно от стойността на PDI 1,0⁴⁰.

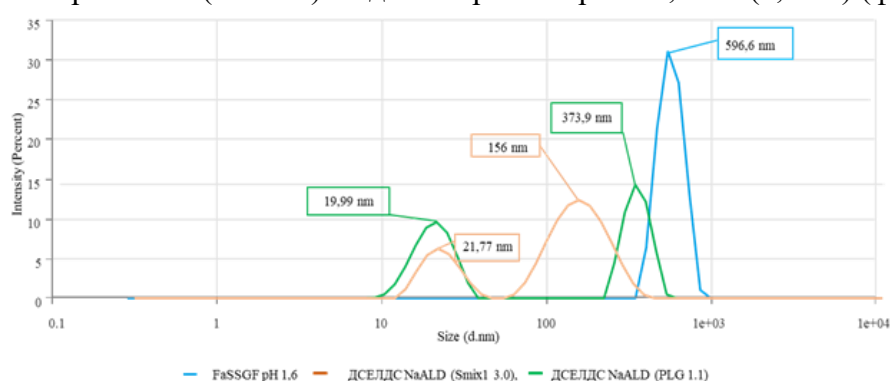
Анализът на дисперзитета на моделите в същата среда (FaSSGF, pH 1,6) показва следните резултати (фигури 22 и 23):

³⁹ Naso, J.N. *et al* . (2019) ‘Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, pp.493-500. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.024>

⁴⁰ Nobbmann, U. (2017) *Polydispersity – What does it mean for DLS and chromatography?* Available at: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/insights/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography>

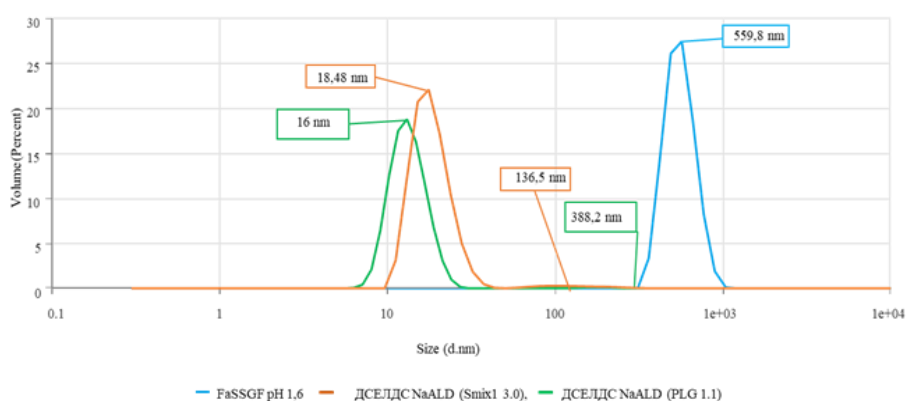
- **Модел Smix1 3.0:** При измерването по интензитет се установява бимодално разпределение с пикове при 156 nm (74,71%) и 21,77 nm (25,29%), z-average 63,13 nm и PDI 0,553 (фигура 22). Разпределението по обем показва също бимодално разпределение с два основни пика при 136,5 nm (2,29%) и 18,48 nm (97,7%) (фигура 23).

- **Модел PLG 1.1:** Установяват се бимодално разпределение с два основни пика, по интензитет, съответно при 373,9 nm (50,67%) и 19,99 nm (49,33%), със z-average 199,1 nm и PDI 0,4064 (фигура 22). Анализът на разпределението по обем показва един основен пик при 16 nm (99,39%) и един вторичен при 388,2 nm (0,61%) (фигура 23).



Разпределение по интензитет	Z-Average, (nm)	PDI	Intercept	Peak 1 nm	Peak 1 %	Peak 2 nm	Peak 2 %
FaSSGF pH 1,6	675,2	1	0,7276	596,6	100,0	-	-
ДСЕЛДС ALDNa (Smix1 3.0)	63,13	0,553	0,7678	156	74,71	21,77	25,29
ДСЕЛДС ALDNa (PLG 1.1)	199,1	0,4064	0,9318	373,9	50,67	19,99	49,33

Фигура 22: Сравнителен анализ на разпределението по интензитет на Smix1 3.0 и PLG 1.1 в среда FaSSGF (pH 1,6).



Разпределение по обем	Z-Average, (nm)	Standart Deviation SD	Peak 1 nm	Peak 1 %	Peak 2 nm	Peak 2 %
FaSSGF pH 1,6	675,2	-	559,8	100	-	-
ДСЕЛДС ALDNa (Smix1 3.0)	63,13	0,5378	136,5	2,296	18,48	97,70
ДСЕЛДС ALDNa (PLG 1.1)	199,1	0,5378	388,2	0,61	16,00	97,46

Фигура 23: Сравнителен анализ на разпределението по обем на Smix1 3.0 и PLG 1.1 в среда FaSSGF (pH 1,6).

Сравнителният анализ на дисперзитета на двата модела показва липсата на пика, характерен за средата FaSSGF (pH 1,6). Това показва, че компонентите на средата имат влияние върху процеса и степента на самоемулгиране. При анализа на разпределение по обем, установените пикове при 18,48 nm (модел Smix1 3.0) и при 16,00 nm (PLG 1.1) (фигура 23) са показателни за образуване на микроразмерна емулсия. Установените размери на капките на преобладаващата популация в дисперсната фаза и в двата случая са обясними със значителното количество хидрофилен ПАВ (над 30%), а процесът е подпомогнат в известна степен от присъствието в средата на малки количества NaCl, тауроколат и лецитин⁴¹.

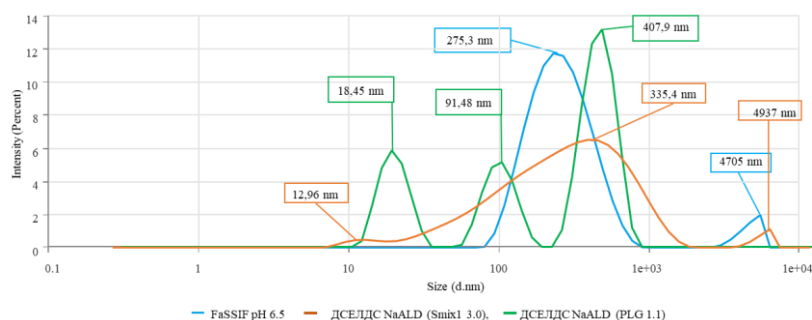
Аналогично е изследвано поведението на моделните ДСЕЛДС в биомиметична среда FaSSIF с pH 6,5, тъй като NaALD се абсорбира основно в дванадесетопръстника и проксималната част на тънките черва. Поведението на моделните системи в биомиметична среда е от съществено значение за прогнозирането на тяхното действие *in vivo*.

Анализът на средата за разпределение по интензитет показва бимодално разпределение с пик при 275,3 nm (94,87%) и при 4705 nm (5,13%) със z-average 240,9 nm с полидисперсност в тесни граници – PDI 0,3214 (фигура 24). Бимодално е и разпределението по обем: установени са пикове при 314,4 nm (85,96%) и при 4892 nm (14,04%) (фигура 25). Тези резултати са в съответствие с по-големите концентрации на лецитин и жлъчни соли.

По една капсула, съдържаща съответно модел Smix1 3.0 и модел PLG 1.1, е поставена в 200 mL FaSSIF (pH 6,5). След получаване на хомогенна дисперсия, анализираниите аликвоти показват следните резултати (фигури 24 и 25):

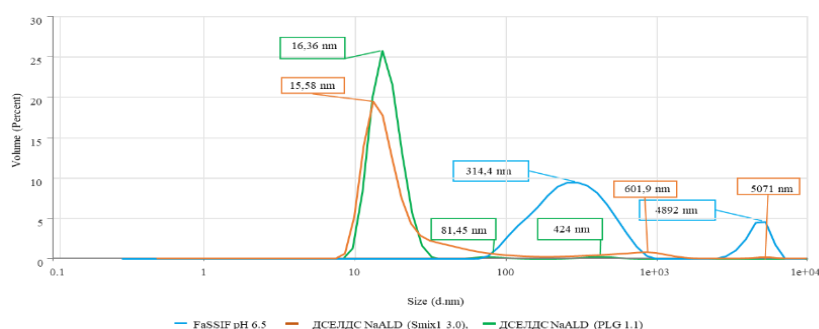
- **Модел Smix1 3.0:** Установява се мултимодално разпределение по интензитет с пикове при 335,4 nm (95,96%), 4937 nm (2,174%) и при 12,96 nm (2,134%) със z-average 177,1 nm и PDI 0,5155, което е показателно за полидисперсност в по-широки граници. Разпределението по обем отново е мултимодално и се характеризира с пикове при 601,9 nm (6,705%), 5071 nm (0,4239%) и при 15,58 nm (92,87%).
- **Модел PLG 1.1:** Разпределението по интензитет е мултимодално с пикове при 407,9 nm (56,28%), при 18,45 nm (22,31%) и при 91,48 nm (21,41%) със z-average 365,7 nm и PDI 0,4485, което е показателно за полидисперсност в умерени граници⁴⁰. Разпределението по обем отново е мултимодално и се характеризира с пикове при 424 nm (1,174%), при 16,36 nm (97,81%) и 81,45 nm (1,016%).

⁴¹ Omarova, M., Swientoniewski, L. T., Mkam Tsengam, I. K., Blake, D. A., John, V., McCormick, A., et al. (2019). Biofilm Formation by Hydrocarbon-Degrading Marine Bacteria and Its Effects on Oil Dispersion. ACS Sustainable Chem. Eng., 7(17), 14490–14499.



Разпределение по интензитет	Z-Average, (nm)	PDI	Intercept	Peak 1 nm	Peak 1 %	Peak 2 nm	Peak 2 %	Peak 3 nm	Peak 3 %
FaSSIF pH 6,5	240,9	0,3214	0,9666	275,3	94,87	4705	5,13	-	-
ДСЕЛДC ALDNa (Smix1 3.0)	177,1	0.5155	0.9761	335,4	95,69	4937	2,174	12,96	2,134
ДСЕЛДC ALDNa (PLG 1.1)	365.7	0.4485	0.8949	407,9	56.28	18.45	22.31	91.48	21.41

Фигура 24: Сравнителен анализ на разпределението по интензитет на Smix1 3.0 и PLG 1.1 в среда FaSSIF (pH 6,5).



Разпределение по обем	Z-Average, (nm)	Standart Deviation SD	Peak 1 nm	Peak 1 %	Peak 2 nm	Peak 2 %	Peak 3 nm	Peak 3 %
FaSSIF pH 6,5	240,9	24,24	314,42	85,96	4892	14,04	-	-
ДСЕЛДC ALDNa (Smix1 3.0)	177,1	199,6	601,9	6,705	5071	0,4239	15,58	92,87
ДСЕЛДC ALDNa (PLG 1.1)	365,7	275,8	424	1.174	16,36	97,81	81,45	1,016

Фигура 25: Сравнителен анализ на разпределението по обем на Smix1 3.0 и PLG 1.1 в среда FaSSIF (pH 6,5).

Сравнителният анализ на разпределението по интензитет на модел Smix1 3.0 показва наличието на типичен за FaSSIF (pH 6,5) пик (4937 nm) на дисперсната фаза, докато при модел PLG 1.1 той отсъства. Същият анализ на разпределението по обем показва наличие на агрегати с характерните за средата размери от 5071 nm отново само при модел Smix1 3.0. Агрегатите с големи размери са присъщи на съдържащия се в биомиметичната среда лецитин³⁹. Моделът Smix1 3.0 (Z-Average 177,1 nm) образува

дисперсна фаза с размери, които са по-малки от тези при PLG 1.1 (Z-Average 365,7 nm) и при двата сравнителни анализа. Анализът на разпределението по обем ясно показва, че и при двата модела преобладават капки с размери на микроемулсии съответно 92,87 % и 97,81 % (фигура 25).

Промяната на размера на дисперсната фаза при модел PLG 1.1 може да бъде обяснена с наличието в средата на по-големи концентрации жлъчни соли и лецитин, които допълнително влияят на процеса на самоемулгиране. Според A. Torcello-Gómez *et al.* (2012)⁴² жлъчните соли могат да повлияят значително върху стабилността на емулсиите в зависимост от състава им. Процесът се характеризира с адсорбция на междофазовата повърхност и проникване в би-слоя от емулгатори и съ-емулгатори, увеличаване на обема на капката и последващото ѝ разрушаване. В състава на модел PLG 1.1 е включен phosphatidylcholine като съ-емулгатор, който като цвтерйонен ПАВ може да благоприятства адсорбцията на таурохолат на фазовата граница м/в. От друга страна, процесът е възпрепятстван от наличието на нейонен ПАВ като polysorbate 80, тъй като последният е резистентен към влиянието на жлъчните соли.

От резултатите може да се заключи, че биомиметичните среди оказват влияние върху дисперзитета на моделните системи. Може също да се прогнозира, че в зависимост от *in vivo* условията на средата, моделните системи (Smix1 3.0 и PLG 1.1) ще се самоемулгират първо до микроемулсии и след това в различна степен до наноемулсии.

Наноемулсиите (20 – 500 nm) са термодинамично нестабилни, но кинетично стабилни системи. Следователно, от съществено значение е да се определи скоростта и степента, с която ДСЕЛДС ще преодолеят епителните мембрани.

Класическите фармакопейни тестове за разтворимост са приложими предимно за конвенционалните лекарстводоставящи системи (ЛДС)⁴³. Методите, предвиждащи използването на диализна мембрана и PermeaPad® мембрана, могат да бъдат адаптирани в зависимост от спецификата на ЛДС, за да се осъществи по-точно охарактеризиране.

3.4. *In vitro* прогнозиране на пермеацията на NaALD от твърди желатинови капсули с включени ДСЕЛДС-NaALD

Прогнозирането е направено съгласно методиката, описана в глава „Материали и методи“. Профилите на дифузия на двата модела ДСЕЛДС с NaALD, включени в твърди желатинови капсули са сравнени с тези на дисперсии на NaALD от продукт с разрешително за употреба.

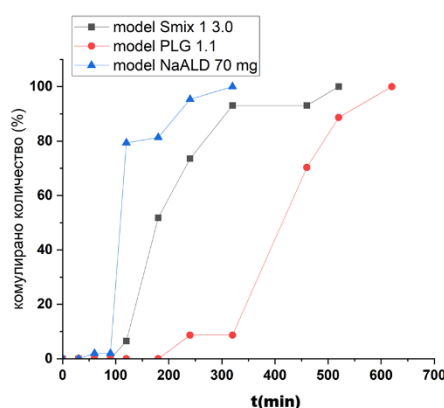
3.4.1. Дифузия през диализна мембрана

На фигура 26 са представени графиките, показващи зависимостта на освободеното количество NaALD (%) в средата като функция от времето. Хидродинамичните условия както в донорния, така и в акцепторния компартименти на дифузионната клетка, са 70 rpm и $T = (37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Концентрацията на

⁴² Torcello-Gómez, A. and Foster, T.J. (2014) 'Interactions between cellulose ethers and a bile salt in the control of lipid digestion of lipid-based systems', Carbohydrate polymers, 113, pp.53-61, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.070>

⁴³ Wolska, E. and Szymańska, M. (2023) 'Comparison of the *in vitro* drug release methods for the selection of test conditions to characterize solid lipid microparticles', Pharmaceutics, 15(2), p. 511. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020511>

освободения NaALD от референтната дисперсия нараства най-бързо, следвана от Smix1 3.0 и PLG 1.1. При всички модели е наблюдаван своеобразен *lag-time* (t_{lag}). От резултатите може да се заключи, че NaALD дифундира свободно по посока на концентрационния градиент. При моделните ДСЕЛДС се наблюдава ефект на задържане (Smix1 3.0 t_{lag} ~120 min и PLG 1.1 t_{lag} ~240 min), който може да се обясни с необходимостта на NaALD да дифундира първо през липидния слой на емулсиите. Разликите във времената на задържане могат да се обяснят с различната плътност на външния липофилен слой при съответните моделни ДСЕЛДС ⁴⁴. Наличието на кратък *lag-time* и в профила на референтната дисперсия (NaALD 70mg t_{lag} ~60 min) може да се дължи на депозиране на мицели от тауроколат или други компоненти от средата върху диализната мембрана.



Фигура 26: Профили на освобождаване на моделите ДСЕЛДС с NaALD през диализна мембрана

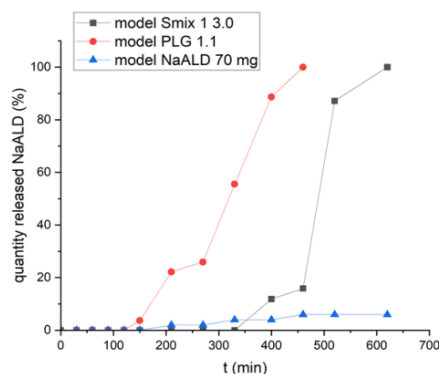
3.4.2. Дифузия през PermeaPad® биомиметична мембрана.

На фигура 27 са представени графиките на освободеното количество NaALD (%) в средата в зависимост от времето.

PermeaPad® е изградена от фосфолипиден слой върху полимерен порьозен носител. В този експеримент диализната мембрана е заменена с PermeaPad® мембрана, като другите условия се запазват.

Фосфолипидният слой има „стопиращ“ ефект върху пермеацията на NaALD, преодоляващ свободно хидрофилни бариери. Наблюдавана е прилика във формата на кумулативните криви на двете моделни ДСЕЛДС с NaALD. Това, както и разликата в *lag-time* времето, се свързва с влиянието на помощните вещества в състава на емулсиите.

⁴⁴ Kalosakas, G. and Panagopoulou, E. (2022) 'Lag time in Diffusion-Controlled release formulations containing a Drug-Free outer layer,' Processes, 10(12), p. 2592. <https://doi.org/10.3390/pr10122592>



Фигура 27: Профили на освобождаване на моделите ДСЕЛДС с NaALD през PermeaPad® мембрана.

Наличието на лецитин в състава на PLG 1.1 е вероятната причина за по-късото lag-time време при нарастване на концентрацията на NaALD в акцепторния компартимент.

И при двете моделни ДСЕЛДС се постига практически пълна пермеация на NaALD при условия, близки до физиологичните. При модел PLG 1.1 в рамките на 5 часа е освободено близо 88% от количеството NaALD, налично в донорния компартимент в началния момент "0". Модел Smix1 3.0 освобождава същото количество NaALD приблизително след 9 h. Количеството NaALD от референтния модел, преминало в акцепторния компартимент, е приблизително 5,96% след 7 h.

За по-детайлното охарактеризиране на механизма на освобождаване на NaALD от моделните ДСЕЛДС и влиянието им върху способността на лекарството за мембранно преодоляване, получените данни от *in vitro* изследванията, са фитирани към основни кинетични модели: кинетика от първи порядък и моделите на Higuchi и Корсмейер-Пепас. Резултатите са представени в таблица 23.

За всички разглеждани модели, при използване на PermeaPad® мембрана, най-подходящ за описание на процеса на освобождаване е моделът на Корсмейер-Пепас. Това е видимо от коефициента на детерминация R^2 , представен в таблица 23.

Освобождаването от ДСЕЛДС Smix1 3.0, изследвано с дифузионен модел, използващ диализна мембрана, се описва с кинетичния модел от първи порядък с $R^2=0,958$, а това от ДСЕЛДС PLG 1.1 – отново с модела на Корсмейер-Пепас с коефициенти на детерминация над 0,9.

Помощните вещества като lecithin и polysorbate 80 оказват съществена роля при подобряване на способността за преодоляване на биологични мембрани на силно хидрофилни лекарства, каквото е NaALD. Модел PLG 1.1 показва по-добър профил на освобождаване в сравнение със Smix 1 3.0 при *in vitro* изпитванията, което го прави потенциално подходящ модел за *in vivo* приложение. Съгласно предложения кинетичен модел на Корсмейер-Пепас, процесът на освобождаване и

съответно дифузия през мембраната е основно зависим от „ерозията“ на външния липиден слой ($n \geq 0,89$)⁴⁵.

Таблица 23: Параметри на различни математични модели, които са използвани при моделиране на процесите на освобождаване и преодоляване на мембрани

Модел на Хигучи – Диализна мембрана			
	K, mg/min		R ²
Smix1 3.0	4,2172±0,613		0,621
PLG 1.1	неприложим		неприложим
NaALD	5,2090±0,0956		0,557
Модел на Хигучи – PermeaPad® мембрана			
Smix1 3.0	2,5270 ± 0,9320		0,1900
PLG 1.1	3,2599 ± 0,2319		0,4601
NaALD	0,2125± 0,0009		0,5928
Модел на Корсмейер-Пепас – Диализна мембрана			
	K, min ⁻¹	n	R ²
Smix1 3.0	0,5180± 0,0060	0,8680 ± 0,0325	0,748
PLG 1.1	1,67.10 ⁻¹⁰ ± 0,9.10 ⁻¹¹	4,3631 ± 1,2830	0,9790
NaALD	0,5020± 0,1370	0,9407 ± 0,0414	0,695
Модел на Корсмейер-Пепас – PermeaPad® мембрана			
Smix1 3.0	5,868.10 ⁻⁹ ± 0,9.10 ⁻¹⁰	3,6754± 0,0425	0,767
PLG 1.1	0,0023± 0,0001	1,7578± 0,0220	0,9005
NaALD	0,0013± 0,0001	1,3694± 0,184	0,9586
Модел от първи порядък - Диализна мембрана			
	K, min ⁻¹	logC ₀	R ²
Smix1 3.0	0,0088± 0,0004	4,462± 0,1330	0,958
PLG 1.1	0,214 ± 0,0003	3,1380 ± 0,0133	0,4515
NaALD	0,0035± 0,0014	0,6465± 0,235	0,5810
Модел от първи порядък – PermeaPad® мембрана			
Smix1 3.0	0,01656± 0,0001	5,486.10 ⁻⁷ ± 0,9.10 ⁻⁸	0,767
PLG 1.1	0,02134± 0,0003	0,8360± 0,0024	0,7738
NaALD	неприложим	неприложим	неприложим

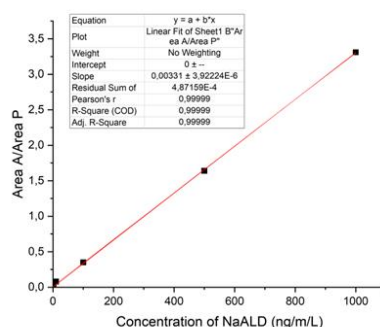
⁴⁵ Klimashevich, V.B., Kazyuchits, O.A, Zhebentyaev, A.I., Gudovich, V.V., Nasennikova, E.E. (2019) 'Technological aspects of the pharmaceutical development of the ranolazine-based drug,' Vestnik of Vitebsk State Medical University, 18(4), pp. 98–112.
<https://doi.org/10.22263/2312-4156.2019.4.98>

За да се потвърди хипотезата е необходимо моделите да се тестват *in vivo*, тъй като *in vitro* методите не са съвършени и не отразяват напълно реалната физиология на организмите

4. Изследване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar

4.1. Валидиране на HPLC-UV/Vis аналитичен метод за установяване на NaALD в биологични матрици

За построяване на калибрационната права е използвана линейна регресия, съгласно методиката, описана в глава „Материали и методи“ (фигура 28). Методиката е валидирана по селективност, чувствителност, точност и прецизност.



Фигура 28: Калибрационна крива за NaALD в урина.

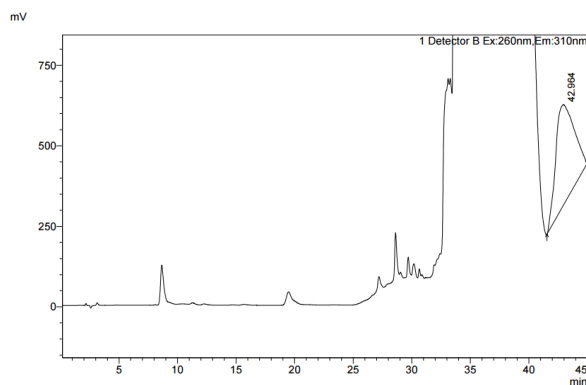
4.1.1. Селективност

Селективността на метода е илюстрирана чрез сравняване на хроматограми от анализа на калибрационни проби с хроматограми от празна урина (blank). Не са установени пикове с времена на задържане, близки със съответните времена на задържане на определяното вещество и вътрешния стандарт.

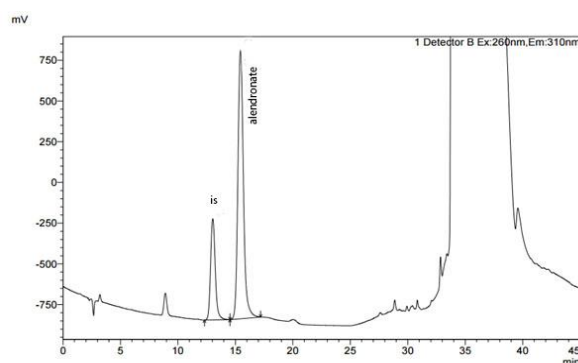
На фигура 29 е представена хроматограма на проба от урина, която не съдържа изследваните вещества. На фигура 30 е представена хроматограма от калибрационна проба с концентрация на алендронат 400 ng/mL и памидронат 10 ng/mL, а на фигура 31 е представена хроматограма на проба от урина на плъх, третиран с ДСЕЛДС-NaALD.

4.1.2. Чувствителност

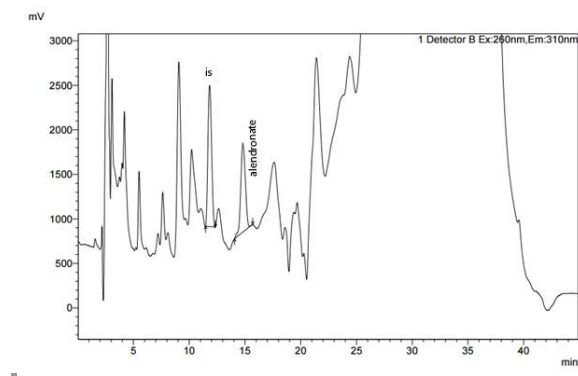
Количествено определеният минимум (LOQ) е 1 ng/mL с коефициент на вариация (CV) ~ 17,4 % и праг на чувствителност (LOD) – 0,5 ng/mL.



Фигура 29: Хроматограма на проба от урина, чиста от алендронат – blank.



Фигура 30: Хроматограма на проба от урина, натоварена със стандартен разтвор на NaALD и памидронат (вътрешен стандарт - is) – 500 ng/mL.



Фигура 31: Хроматограма на проба от урина на плъх, третиран с ДСЕЛДС-NaALD, към която е добавен памидронат, като вътрешен стандарт.

4.1.3. Точност и прецизност

- Точност и прецизност в рамките на деня

За всяко концентрационно ниво са анализирани по 5 проби. Резултатите са представени в таблица 24. Прецизността на метода, изразена с CV% за деня е под 8,4% за целия концентрационен обхват.

Таблица 24: Точност и прецизност в рамките на деня

	St 40 ng/L	St 100 ng/L	St 400 ng/L
	40,43	91,14	403,39
	39,01	91,65	344,04
	38,71	90,97	368,19
	40,52	109,62	371,59
	40,18	97,35	389,81
N	5	5	5
Средно	39,77	96,15	375,40
SD	0,85	7,99	22,59
Ac%	99,43	96,15	93,85
CV%	2,13	8,31	6,02
C_{nom}	40,0	100	400

- Точност и прецизност между дните

В три последователни дни са анализирани по пет проби от три концентрационни нива. Резултатите са представени в таблица 25.

Таблица 25: Точност и прецизност между дните от предварителното валидиране

	St 40,0 ng/L	St 100 ng/L	St 400 ng/L
I ден	42,48	103,46	394,17
	44,17	99,42	374,43
	38,06	96,08	386,86
	40,23	101,03	393,78
	39,36	109,32	385,68
II ден	41,87	85,75	356,98
	41,06	84,75	348,72
	38,94	85,77	434,79
	37,40	90,56	378,71
	38,88	106,00	360,17
III ден	42,90	102,24	401,69
	42,54	90,62	390,43
	38,51	101,25	358,48
	42,14	104,30	391,93
	40,20	105,09	386,06
N	15	15	15
Средно	40,58	97,71	382,86
SD	2,04	8,19	21,56
Ac%	100,5	105,09	96,52
CV%	5,02	8,38	5,63
C_{nom}	40,0	100	400

Прецизността на метода, оценена между дните, е под 8,4%, а точността е над 96% за целия концентрационен обхват.

4.2. Проследяване на пероралната бионаличност на NaALD от ДСЕЛДС чрез определяне на количеството на екскретираното лекарство в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar

За лекарствата, екскретирани предимно непроменени в урината, бионаличността може да бъде оценена чрез измерване на общото количество лекарство, екскретирано след единична доза⁴⁶. Алендронат се екскретира непроменен в урината⁴⁷, което е основен път за елиминиране и само пренебрежимо количество се установява във фецеса. Извършена е оценка на абсорбцията чрез определяне на екскретираното количество лекарство в урината след перорално приложение на различните моделни състави, като са сравнени с референт⁴⁸. В таблица 26 са представени резултатите от HPLC изследването на пробите от урина.

При това пилотно изследване не се наблюдава съществена разлика в установените стойности между референта (FOS) и ДСЕЛДС модел Smix1 3.0. Моделът PLG 1.1 на ДСЕЛДС изпъква с увеличение на абсорбцията от 1,8 пъти в сравнение с референта.

Може да се заключи, че моделният състав с phosphatidylcholine благоприятства проникваемостта на NaALD. Този резултат е потвърждение на предположенията, направени след *in vitro* изследванията с PermeaPad[®] мембрана. По-задълбочени изследвания могат да потвърдят хипотезата, че моделът PLG 1.1 има потенциал да увеличи пероралната бионаличност на NaALD чрез благоприятстване на интестиналната абсорбция.

⁴⁶ Le, J. (2022) 'Overview of pharmacokinetics', Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California: San Diego, CA, USA

⁴⁷ Watts, N.B. and Diab, D.L. (2010) 'Long-Term use of bisphosphonates in osteoporosis,' The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 95(4), pp. 1555–1565. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1947>

⁴⁸ Han, H.-K., Shin, H.-J. and Ha, D.H. (2012) 'Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system', European Journal of Pharmaceutical Sciences, 46(5), pp. 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.002>

Таблица 26. Концентрации на алендронат (ng/mL), получени след анализ на урина от мъжки бели плъхове, порода Wistar.

No.	Име	Введено количество (mg)	Обем на урината (mL)	Съотношение между пиковите	Концентрация в урината (ng/mL)	Общо количество алендронат (ng)
1	ГК (+) 1	1,5 (2,5 mg/mL)	4,9	0,039	11,77	57,66
2	ГК (+) 2	1,5 (2,5 mg/mL)	12	0,125	37,83	453,96
3	ГК (+) 3	1,5 (2,5 mg/mL)	3,2	0,025	7,68	24,59
4	PLG 1.1 (-) 1	0	12	-	Под LOQ	-
5	PLG 1.1(+) 1	1,25 (2,5 mg/mL)	6	0,025	7,61	45,69
6	PLG 1.1 (-) 2	0	1	-	Под LOQ	-
7	PLG 1.1 (+) 2	1,0 (2,5 mg/mL)	13	0,099	29,98	389,70
8	PLG 1.1 (-) 3	0,0	28	-	Под LOQ	-
9	PLG 1.1 (+) 3	1,25 (2,5 mg/mL)	2,4	0,074	22,40	53,77
10	Smix1 3.0 (-) 1	0,0	5,8	-	Под LOQ	-
11	Smix1 3.0 (+) 1	1,0 (2,5 mg/mL)	3,1	0,059	17,94	55,61
12	Smix1 3.0 (-) 2	0,0	40	-	Под LOQ	-
13	Smix1 3.0 (+) 2	1,25 (2,5 mg/mL)	6,2	0,007	2,08	12,87
14	Smix1 3.0 (-) 3	0,0	28	-	Под LOQ	-
15	Smix1 3.0 (+) 3	1,25 (2,5 mg/mL)	12,5	0,058	17,54	219,25

В таблица 27 са представени обобщените резултати от проучването.

Таблица 27: Количество на NaALD, екскретирано в урината за период от 48 часа (средна стойност $\pm$ SD, n=3)

	Общо количество в урината, ng	% от приетата доза, екскретирана в урината
Водна дисперсия, референт (ГК)	178,73 $\pm$ 1,33	0,012 $\pm$ 0,007
Модел PLG 1.1	163,053 $\pm$ 1,33	0,025 $\pm$ 0,008
Модел Smix1 3.0	95,91 $\pm$ 1,33	0,011 $\pm$ 0,008

V. ИЗВОДИ

1. Разработени са модели на ДСЕЛДС, подходящи за перорално доставяне на NaALD, базирани на кокосово масло, полисорбат 80, сорбитан моноолеат, фосфатидилхолин, желатин и вода. Оптималното натоварване на NaALD в ДСЕЛДС е 7% (w/w).
2. Оптимизирани модели на ДСЕЛДС с включен NaALD се самоемулгират до в/м/в микроемулсии, като във водна среда (0,1N HCl) показват бимодално разпределение по размер на дисперсната фаза.
3. Получените състави са съвместими с NaALD, физично и термодинамично стабилни, и при стайна температура (20°C) показват поведение на не-Нютонови тености, а при по-високи температури (70°C) – на Нютонов флуид.
4. При разпределение на концентрацията на ДСЕЛДС с включен NaALD в твърди желатинови капсули, получените дозираните лекарствени форми удовлетворяват фармакопейните тестове за развномерност на масата на едnodозни препарати (2.9.5) и равномерност на дозовите единици при едnodозни препарати (2.9.40).
5. Времето за самоемулгиране на ДСЕЛДС с NaALD, включени в твърди желатинови капсули, съвпада със средното време на стомашен транзит на ЛФ „на гладно“. При тези условия концентратите се самоемулгират в среда с рН 1,6 до микроемулсии с бимодално разпределение по размер на капките на дисперсната фаза, а в среда с рН 6,5 – до наноемулсии с мултимодално разпределение по размер на капките на дисперсната фаза.
6. Моделите на твърди желатинови капсули с включена ДСЕЛДС с NaALD освобождават лекарственото вещество при използване на дифузионен модел с биомиметична мембрана по кинетичния модел на Корсмейер-Пепас.
7. Пероралната бионаличност на NaALD от твърди желатинови капсули с включен ДСЕЛДС, определена чрез проследяване на екскретираното количество от ЛВ в урината на мъжки бели плъхове от порода Wistar, показва 1,8 пъти увеличение спрямо реферанта за модела, базиран на полисорбат 80, кокосово масло, фосфатидилхолин, сорбитан моноолеат и желатин (PLG1.1).

VI. ПРИНОСИ

Приноси с научно-теоретичен характер

1. За първи път са формулирани химично, физично и термодинамично стабилни ДСЕЛДС с NaALD (7%, w/w), базирани на кокосово масло, полисорбат 80, сорбитан моноолеат, фосфатидилхолин, желатин и вода, които се самоемулгират във водна среда (0,1N HCl) до микроемулсии.

Приноси с научно-приложен характер

1. Валидирано е приложението на UV-Vis спектрофотометричен метод за количествено определяне на NaALD, включен в липидно базирани лекарстводоставящи системи, посредством образуване на комплекс с Fe^{3+} .
2. Дифузионният модел с биомиметична мембрана за изследване на пермеацията на NaALD от ДСЕЛДС е подходящ за прогнозиране на поведението на системата *in vivo*.
3. За първи път е разработен подход за включване на NaALD в ДСЕЛДС с подобрена проницаемост на лекарственото вещество през биологични мембрани.
4. Разработеният подход за включване на NaALD в ДСЕЛДС с подобрена проницаемост на лекарственото вещество през биологични мембрани е подходящ за мащабиране в индустриални условия.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в журнали, индексирани в Scopus

1. Pehlivanov I., Self-emulsifying drug delivery systems (sedds): excipient selection, formulation and characterization. J of IMAB. 2020 Jul-Aug; 26 (3):<https://doi.org/10.5272/jimab.2020263.3226> (SJP 0,115)
2. I.Pehlivanov, Kr. Nikolova, V.Andonova, Evaluation of the influence of some polymers on the physical stability of lipid self-double-emulsifying systems with Alendronate Sodium, Proceedings of science, October 02, 2023 (SJP 0,115)

Публикации в реферирани и неиндексирани научни периодични издания

3. I. Pehlivanov, Y. Sotirova, M. Dangova, V. Andonova, Self-Emulsifying Drug Delivery Systems as an Approach to Improved Oral Bioavailability of Drugs, Varna Medical Forum, 2022,11(2). doi: 10.14748/vmf.v11i0.8981. (индексирано в национален референтен списък)

VIII. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. И. Пехливанов, Кр. Николова, В. Андонова, Оценка на влиянието на желатин и лецитин върху физичната стабилност на липидни двойносамоемулгиращи се системи с алендронат натрий, Осми Конгрес по фармация с международно участие, 27-30 април 2023 г., хотел "Рила", к.к. Боровец, постерна презентация.
2. I.Pehlivanov, Kr. Nikolova, V.Andonova, Evaluation of the influence of some polymers on the physical stability of lipid self-double-emulsifying systems with Alendronate Sodium, 11th International Conference of the Balkan Physical Union, 28 August to 1 September 2022, Belgrade, Serbia - S13-BMP-109/ Oral presentation
3. И. Пехливанов, Й. Сотирова, М. Дангова, В. Андонова, Самоемулгиращи лекарство-доставящи системи като подход за подобряване на оралната бионаличност на лекарствата, Десета научна сесия с международно участие „80 години Медицински колеж - Варна“ – 20-21 септември 2022г., гр. Варна., орална презентация.

IX. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ (БЕЗ АВТОЦИТИРАНИЯ)

Статия:

Pehlivanov I., Self-emulsifying drug delivery systems (sedds): excipient selection, formulation and characterization. J of IMAB. 2020 Jul-Aug; 26 (3):<https://doi.org/10.5272/jimab.2020263.3226>

Цитирания:

1. Poudwal, S. and Shende, P., 2022. Multi-strategic approaches for enhancing active transportation using self-emulsifying drug delivery system. Journal of Drug Targeting, 30(7), pp.726-736.
2. Gołdyn, M., Komasa, A., Pawlaczyk, M., Lewandowska, A. and Bartoszak-Adamska, E., 2021. Salts of purine alkaloids caffeine and theobromine with 2, 6-dihydroxybenzoic acid as coformer: structural, theoretical, thermal and spectroscopic studies. Crystal Structure Communications, 77(11), pp.713-724.
3. Bodnar, L., Polovko, N., Bevez, N., Hrudko, V. and Perepelytsia, O., 2023. Biopharmaceutical justification of the creation of self-emulsifying drug delivery systems with simvastatin. ScienceRise: Pharmaceutical Science, (2 (42)), pp.4-10.
4. Darusman, F., Dwiatama, A. and Priani, S.E., 2023. Formulasi dan Karakterisasi SelfNanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Esomeprazol Magnesium Trihidrat.
5. Madhuri, D., 2023. Design and Development of Self-Emulsifying Drug Delivery Systems of Tolvaptan. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 17(2).
6. Aishwarya, N. and ul Haq, S.M.F., 2022. Formulation and Evaluation of Solid-Self Nano Emulsifying Drug Delivery System of Darunavir. Saudi J Med Pharm Sci, 8(10), pp.558-574.

X. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И ФИНАНСИРАНЕ

Част от изследванията са финансирани чрез проект по Фонд „Наука“ № 22023 „Оценка на фармакокинетични параметри на двойно самоемулгиращи се лекарстводоставящи системи с алендронат натрий за орално приложение“, Ръководител на проекта: Величка Йорданова Андонова

XI. БЛАГОДАРНОСТИ

Преди всичко бих искал да благодаря на научните си ръководители – доц. Величка Андонова и проф. Калоян Георгиев !

Благодаря на доц. Величка Андонова за търпението, безсънните нощи, подкрепата и насоките ѝ към мен при изготвяне на настоящия дисертационен труд!

Благодаря на проф. Калоян Георгиев за помощта и съветите при планирането и подготовката на фармакокинетичните експерименти с животни!

Благодаря на Катедра по фармакология, токсикология и фармакотерапия, за предоставената възможност да изготвя при тях настоящият дисертационен труд!

Благодаря на Катедра по фармацевтични технологии за предоставената лабораторна база за реализирането на експерименталната работа по моята дисертация!

Поднасям сърдечни благодарности на проф. Къстена Николова за помощта при статистическата обработка, физичното и термодинамичното моделиране и тълкуване на някои от резултатите.

Благодаря на ас. Стефан Стефанов и гл.ас. Стела Драгоманова, които бяха заедно с мен в онези горещи летни дни, затворени във вивариума! Благодаря на д-р Красимир Кузманов за ценните практически съвети !

Благодаря на гл. ас. Кристина Божинова за помощта при хроматографските анализи.

Благодаря на доц. Стефка Титева, проф. Николай Ламбов, проф. Милен Димитров и проф. Крум Кафеджийски, които при нашите запознанства и срещи са ме насърчавали и съветвали в това мое начинание!

Благодаря на всички колеги и приятели, които по един или друг начин ми помогнаха в изготвянето на настоящата дисертация!

Огромна благодарност изказвам и към семейството ми, за подкрепата и търпението, които проявиха към мен по време на цялата ми докторантура!