

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA BLAGOTINŠEK

**IZDELAVA IN OVREDNOTENJE MIKROKAPSUL S TEKOČIM
SAMOMIKROEMULGIRAJOČIM SISTEMOM Z RAZLIČNIMI
UČINKOVINAMI**

**PRODUCTION AND EVALUATION OF MICROCAPSULES WITH
LIQUID SELF-MICROEMULSIFYING CORE WITH DIFFERENT
DRUGS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Leku farmacevtski družbi d.d. v Razvojnem centru Slovenija na področju Novih dostavnih sistemov pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag.farm. in somentorstvom asist. dr. Miha Homarja, mag.farm.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Kerču, mag.farm. in somentorju asist. dr. Mihi Homarju, mag.farm. za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvala vsem, ki so mi omogočili in pomagali pri opravljanju diplomske naloge v Leku farmacevtski družbi d.d.

Zahvaljujem se moji družini, Mateju in prijateljem za vso razumevanje in podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag.farm. in somentorja asist. dr. Miha Homarja, mag.farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 FARMACEVTSKE OBLIKE Z V VODI SLABO TOPNIMI UČINKOVINAMI.....	1
1.1.1 <i>Lipidni sistemi</i>	2
1.2 MIKROEMULZIJE	3
1.2.1 <i>Sestava in stabilnost mikroemulzij</i>	4
1.2.2 <i>Sproščanje učinkovin iz mikroemulzij</i>	5
1.2.3 <i>Uporaba mikroemulzij v farmaciji</i>	5
1.3 SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEM (SMES)	6
1.3.1 <i>Sestava SMES</i>	7
1.3.2 <i>Olja</i>	7
1.3.3 <i>Emulgatorji</i>	8
1.3.4 <i>Sotopila</i>	9
1.3.5 <i>Mehanizem samoemulgiranja</i>	10
1.3.6 <i>Lastnosti SMES</i>	10
1.3.7 <i>Vključitev učinkovine v SMES</i>	11
1.4 MIKROKAPSULE	12
1.4.1 <i>Mikrokapsuliranje</i>	13
1.4.2 <i>Metode za izdelavo mikrokapsul</i>	14
1.4.3 <i>Vrednotenje mikrokapsul</i>	16
1.5 POLIMERI	16
1.5.1 <i>Alginska kislina in alginati</i>	17
1.6 ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R.....	20
1.6.1 <i>Princip delovanja</i>	23
1.6.2 <i>Splošna pravila izdelave</i>	25
1.6.3 <i>Težave pri izdelavi in možni vzroki</i>	25
2 NAMEN DELA	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 UPORABLJENE ZDRAVILNE UČINKOVINE	28
3.2 PRIPRAVA RAZTOPINE ALGINATA S POMOŽNIMI SNOVMI	29
3.3 PRIPRAVA SAMOMIKROEMULGIRAJOČEGA SISTEMA (SMES) IN NASIČENJE SMES-a s CaCl ₂	29
3.4 DOLOČANJE GOSTOT RAZTOPINAM OVOJNE IN JEDRNE FAZE Z ZDRAVILNO UČINKOVINO.....	30

3.5	DOLOČANJE VISKOZNOSTI RAZTOPINAM OVOJNE IN JEDRNE FAZE Z ZDRAVILNO UČINKOVINO	31
3.6	OVREDNOTENJE PREMREŽEVALNIH SPOSOBNOSTI SMES-a s CaCl ₂	32
3.6.1	<i>Priprava vzorcev alginata in SMES-a s CaCl₂ za merjenje viskoznosti</i>	33
3.7	STABILNOST ZDRAVILNIH UČINKOVIN V SMES-u	33
3.8	DSC MERITVE ALGINATNIH GELOV Z ZDRAVILNO UČINKOVINO	34
3.9	TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROKAPSUL S ŠOBO 500/750 μM	34
3.10	DOLOČITEV VSEBNOSTI ZDRAVILNE UČINKOVINE V MIKROKAPSULAH.....	36
3.10.1	<i>Izdelava umeritvene premice za določanje NDS1</i>	36
3.10.2	<i>Izdelava umeritvene premice za določanje NDS2</i>	37
3.10.3	<i>Priprava vzorca mikrokapsul za določanje vsebnosti zdravilne učinkovine</i>	38
3.11	TEST SPROŠČANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE IZ MIKROKAPSUL.....	38
3.11.1	<i>Izdelava umeritvene premice v mediju za sproščanje NDS1 iz mikrokapsul</i>	39
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1	PRIJAVA RAZTOPINE ALGINATA S POMOŽNIMI SNOVMI	40
4.2	DOLOČANJE GOSTOT RAZTOPINAM OVOJNE IN JEDRNE FAZE Z ZDRAVILNO UČINKOVINO	42
4.3	DOLOČANJE VISKOZNOSTI RAZTOPINAM OVOJNE IN JEDRNE FAZE Z ZDRAVILNO UČINKOVINO	45
4.4	OVREDNOTENJE PREMREŽEVALNIH SPOSOBNOSTI SMES-a s CaCl ₂	50
4.5	STABILNOST ZDRAVILNIH UČINKOVIN V SMES-u	55
4.6	DSC MERITVE ALGINATNIH GELOV Z ZDRAVILNO UČINKOVINO	55
4.7	DOLOČITEV VSEBNOSTI ZDRAVILNE UČINKOVINE V MIKROKAPSULAH.....	56
4.7.1	<i>Izdelava umeritvene premice in določitev vsebnosti NDS1 v mikrokapsulah</i>	56
4.7.2	<i>Izdelava umeritvene premice in določitev vsebnosti NDS2 v mikrokapsulah</i>	58
4.8	IZDELAVA UMERITVENE PREMICE V MEDIJU ZA SPROŠČANJE NDS1 IZ MIKROKAPSUL	60
4.9	TEST SPROŠČANJA NDS1 IZ MIKROKAPSUL.....	60
5	SKLEP	63
6	LITERATURA.....	65
7	PRILOGA: DSC TERMOGRAMI ZDRAVILNIH UČINKOVIN IN ALGINATNIH GELOV Z ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI	68

POVZETEK

Mikrokapsule so majhni delci, običajno veliki od 1 μm do 1000 μm , z definiranim jedrom in ovojnico. Zdravilna učinkovina se ponavadi nahaja v jedru, ovojnica pa je sestavljena iz različnih polimerov.

Z enkapsulatorjem Inotech IE-50 R smo izdelali mikrokapsule s samomikroemulgirajočim sistemom. Jedrno fazo je sestavljal samomikroemulgirajoči sistem (SMES) nasičen z brezvodnimi CaCl_2 in suspendirano zdravilno učinkovino. Za ovojno fazo smo uporabili raztopino natrijevega alginata in laktoze.

Z optimiranjem koncentracije alginata in laktoze smo uspeli izdelati mikrokapsule, ki so zadržale jedrno fazo. Z dodatkom CaCl_2 k jedrni fazi smo omogočili takojšne premreževanje alginatnih verig in tako omejili mešanje ovojne in jedrne faze.

Ovrednotili smo viskoznost ovojnih in jedrnih faz ter postavili okvirne vrednosti, pri katerih smo uspešneje izdelali mikrokapsule.

Ugotovili smo, da je za uspešno mikrokapsuliranje pomemben položaj jedra v mikrokapsuli. Položaj jedra smo poskušali optimirati s poznavanjem gostot ovojne in jedrne faze.

DSC meritve alginatnih gelov z zdravilnimi učinkovinami smo uporabili za določitev interakcij med alginatno ovojnico in zdravilno učinkovino.

Pri vrednotenju stabilnosti zdravilnih učinkovin v SMES-u smo ugotovili, da SMES vpliva na stabilnost učinkovin, zato je potrebno primernost uporabe SMES-a za izdelavo mikrokapsul določiti glede na posamezno izbrano zdravilno učinkovino.

Izdelali smo mikrokapsule z NDS1 in NDS2 ter določili vsebnost zdravilne učinkovine v mikrokapsuli z UV/VIS spektrofotometrijo.

Za mikrokapsule z NDS1 smo izvedli test sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul. Za primerjavo smo izdelali ogrodni tip mikrokapsule iz alginata in NDS1. Pokazali smo, da se v začetnih minutah iz izdelanih mikrokapsul sprosti več NDS1 v primerjavi z ogrodnim tipom mikrokapsul.

ABSTRACT

Microcapsules are small, spherical particles, usually up to 1000 μm in diameter, with a defined core and shell. Active pharmaceutical ingredient (API) is usually located in the core and the shell is usually made from different types of polymers.

We have used encapsulator Inotech IE-50 R to produce microcapsules. The core was produced with selfmicroemulsifying system (SMES), saturated with anhydrous CaCl_2 , in which API was suspended.

The shell was formed from water solution of sodium alginate and lactose. An optimal shell composition was necessary to prepare stable microcapsules. CaCl_2 in the core interacted with alginate solution to create a barrier which prevented mixing of core and shell phases, allowing for preparation of microcapsules with clearly defined core. Viscosity of the core and shell phases were evaluated and optimal ranges for microcapsules preparation were determined. The position of core within microcapsule is essential for the microencapsulation, therefore the density of core and shell phases were determined and its influence on the microencapsulation was determined.

DSC was used to check for possible interaction between alginate shell and API. It was shown that SMES has influence on the stability of the API.

We prepared microcapsules with NDS1 and NDS2. The concentration of API was determined with help of UV/VIS spectrophotometer. A dissolution test was performed for microcapsules containing NDS1. Matrix microcapsules, composed of alginate and NDS1 were used as reference. During first 15 minutes, the dissolution rate of NDS1 from SMES containing microcapsules was much higher during compared to the matrix microcapsules.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca;
AUC	površina pod krivuljo;
α -L-G	α -L-guluronska kislina;
BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem;
BU	biološka uporabnost;
β -D-M	β -D-manuronska kislina;
c_{\max}	največja koncentracija učinkovine v plazmi v določenem času;
GIT	gastrointestinalni trakt;
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje;
L	dolgo verižne maščobne kisline;
LFCS	lipidni formulacijski klasifikacijski sistem;
LML	dolgo-srednje-dolgo verižni strukturni trigliceridi;
M	srednje verižne maščobne kisline;
m/m	masno/masno razmerje;
MLM	srednje-dolgo-srednje verižni strukturni trigliceridi;
O/V	olje v vodi;
PEG	polietilenglikol;
PG	propilenglikol;
SMES	samomikroemulgirajoči sistem;
SES	samoemulgirajoči sistem;
t_{\max}	čas, ko je koncentracija učinkovine v plazmi največja;
V/O	voda v olju;
ZU	zdravilna učinkovina.

1 Uvod

1.1 Farmaceutske oblike z v vodi slabo topnimi učinkovinami

V procesu razvoja zdravil se velikokrat pojavijo terapevtsko primerni kandidati za učinkovine, ki pa izkazujejo zelo slabo topnost v vodnem mediju (manj kot 1 µg/ml). To bistveno vpliva tudi na razvoj zdravil za peroralno uporabo, ki je eden izmed najpogostejših načinov apliciranja zdravilnih učinkovin. Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (BCS) razdeli učinkovine glede na njihovo topnost in permeabilnost v 4 razrede. Učinkovine v razredu I imajo dobro topnost in dobro permeabilnost, v II slabo topnost in dobro permeabilnost, v III dobro topnost in slabo permeabilnost, v IV pa slabo topnost in slabo permeabilnost. (1)

Absorpcija in posledično biološka uporabnost v vodi slabo topnih učinkovin iz GIT je omejena s procesom raztapljanja. Te učinkovine uvrščamo v razred II oz. IV po BCS klasifikaciji. Učinkovine v razredu IV, ki imajo slabo permeabilnost in slabo vodotopnost, so največkrat slabi kandidati za nadaljnji razvoj, razen v primeru, da je predviden odmerek učinkovine nizek. Izbira farmacevtske oblike je pomemben faktor, a njihovo uporabo še vedno omejuje nizka permeabilnost.

Hitrost in obseg absorpcije učinkovin iz razreda II, ki imajo slabo topnost in dobro permeabilnost, je velikokrat odvisna od lastnosti farmacevtske oblike v katero so vgrajene. Farmaceutska oblika mora biti oblikovana tako, da zagotavlja zadostno topnost in s tem biorazpoložljivost učinkovine. S spreminjanjem fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine z namenom izboljšanja topnosti, kot sta tvorba soli in zmanjševanje velikosti delcev, ne dosežemo vedno pričakovanih rezultatov. Uporaba trdnih disperzij, ciklodekstrinov in nanodelcev ni primerna za vse učinkovine. Zaradi tega je bilo v zadnjih letih veliko raziskav usmerjenih v razvoj lipidnih sistemov. Zelo primeren tehnološki pristop je vgraditev učinkovine v inertni lipidni nosilec (olja, disperzije z emulgatorji, samomikroemulgirajoče oblike, mikrokapsulirane emulzije, samoemulgirajoče pelete, trdni samoemulgirajoči sistemi v obliki tablet, liposomi,...) s poudarkom na samoemulgirajočih sistemih, ki ob stiku z vodo tvorijo fine oljne kapljice ali disperzije micelov. (1, 2, 3)

1.1.1 Lipidni sistemi

Lipidni sistemi imajo to prednost, da lahko dostavijo učinkovino v telo kot stabilno tekočo raztopino. Termin lipidni sistem predstavlja veliko skupino formulacij, katere povezujejo nekatere skupne lastnosti. Lipidne sisteme sestavljajo trigliceridi, mono- in digliceridi, lipofilni emulgatorji, sotpila in pomožne snovi s širokim spektrom fizikalno-kemijskih lastnosti. Oblikovan je bil lipidni formulacijski klasifikacijski sistem (LFCS), ki pomaga ovrednotiti kritične lastnosti lipidnih sistemov. Sistem razdeli lipidne formulacije v 4 razrede; I, II, III, IV (Preglednica I). (1, 4)

Formulacije razreda I sestavljajo olja (trigliceridi, mešani gliceridi). Biorazpoložljivost ZU, ki se raztopi v olju je dobra, saj se trigliceridi hitro metabolizirajo do prostih maščobnih kislin in 2-mono-gliceridov, ki tvorijo koloidno disperzijo mešanih micelov (skupaj z žolčnimi solmi in lecitinom). V micelle se prav tako solubilizirajo hidrofobne učinkovine in ti miceli predstavljajo rezervoar učinkovine, iz katerih nato prehaja učinkovina v sistemski krvni obtok s pasivnim (transcelularnim) transportom. Formulacije razreda II so v vodi netopni samoemulgirajoči dostavni sistemi, ki vsebujejo večjo količino lipofilnih emulgatorjev, kar pospeši emulgiranje in izboljša kapaciteto topila za sprejem hidrofobnih učinkovin. Formulacije razreda III so samoemulgirajoči dostavni sistemi oz. samomikroemulgirajoči dostavni sistemi, ki vsebujejo vodotopne emulgatorje in/ali sotpila (razred IIIA) oz. večje količine vodotopnih komponent (razred IIIB). Razlika med tipom II in III je v tem, da vodotopne komponente pri dispergiranju težijo k ločitvi od oljne faze in raztapljanju v vodnem mediju. Takšna ločitev faz je gonilna sila za samoemulgiranje, a hkrati povzroča zmanjšanje kapacitete topila, kar lahko vodi v obarjanje učinkovine. Obseg obarjanja je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine in hidrofilitnosti formulacije. Formulacije razreda IV vsebujejo precejšni delež hidrofilnih emulgatorjev in sotpil. (1, 4)

Učinkovitost lipidnih sistemov in usoda učinkovine v GIT je odvisna od fizikalnih sprememb, ki se zgodijo pri dispergiranju in redčenju sistema ter od vpliva prebave na solubilizacijo učinkovine.

Največja prednost lipidnih sistemov je v tem, da je učinkovina v raztopljenem stanju pri prehodu skozi celoten prebavni trakt in se tako izogne procesu raztapljanja, ki je omejujoč faktor pri absorpciji hidrofobnih učinkovin v krvni obtok. (1, 4)

Preglednica I: Lipidni formulacijski klasifikacijski sistem (LFCS).

Pomožne snovi v formulaciji	Vsebnost v formulaciji [m/m]				
	I	II	IIIA	IIIB	IV
Olja: trigliceridi, mešani gliceridi	100	40-80	40-80	<20	-
V vodi netopni emulgatorji (HLB<12)	-	20-60	-	-	0-20
V vodi topni emulgatorji (HLB>12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Hidrofilna sotopila	-	-	0-40	20-50	0-50

1.2 Mikroemulzije

Mikroemulzije so optično bistre, termodinamsko stabilne disperzije dveh med seboj nemešajočih se tekočin. Makroskopsko so monofazni, izotropni sistemi, ki vsebujejo fleksibilni medfazni film emulgatorja. Molekule emulgatorja se orientirajo tako, da so njihove hidrofilne skupine v hidrofilni, lipofilne skupine pa v lipofilni fazi in tako tvorijo medfazni film, ki stabilizira mikroemulzijo. Glede na ime lahko mikroemulzije povezujemo s klasičnimi emulzijami, vendar so med njimi pomembne razlike (Preglednica II). (8)

Preglednica II: Razlike med klasičnimi emulzijami in mikroemulzijami.

Klasične emulzije	Mikroemulzije
Termodinamsko nestabilne	Termodinamsko stabilne
Velikost kapljic 200-1000 nm	Velikost kapljic < 140 nm
Grobi disperzni sistemi	Koloidni sistemi
Motne do mlečno bele	Bistre, transparentne
Za nastanek potrebna zunanja energija	Za nastanek potrebno le rahlo stresanje
Možna fazna ločitve	Ni fazne ločitve

Lastnosti mikroemulzij omogočajo uporabo le-teh kot nosilnih sistemov za dostavo in povečanje absorpcije in BU slabo vodotopnih učinkovin, za zaščito učinkovin, nadzorovano sproščanje in za zmanjšanje interindividualne variabilnosti med pacienti. Mikroemulzije se enostavno pripravijo in aplicirajo, njihova termodinamska stabilnost pa podaljša rok uporabnosti.

So bistre, lahko jih filtriramo (sterilizacija), imajo nizko viskoznost (manj boleča parenteralna aplikacija) in omogočajo vgraditev učinkovin z različno topnostjo. (9, 10)

V nekaterih primerih lahko sestavine mikroemulzij spremenijo lastnosti tkiv in delujejo kot pospeševalci absorpcije. Pri O/V mikroemulzijah lahko oljna faza služi kot rezervoar učinkovine, od koder se nato sprošča v vodno fazo. (11)

1.2.1 Sestava in stabilnost mikroemulzij

Poznamo tri vrste mikroemulzij (Slika 1):

- olje v vodi (O/V), kjer je voda kontinuirana faza;
- voda v olju (V/O), kjer je olje kontinuirana faza;
- dvoverižna struktura, kjer sta volumna olja in vode približno enaka.



Slika 1: Primeri različnih tipov mikroemulzij.

Notranja faza se lahko oblikuje v različne mikrostrukture; okrogle, paličaste, diskaste ali dvoverižne strukture. Vedno pa sta lipofilna in vodna faza ločeni s homogenim filmom emulgatorja.

Razmerje volumnov faz in vrsta emulgatorja vplivata na tip nastale mikroemulzije. Če je vsebnost dispergirane faze manjša od 25%, mikroemulzijo sestavlja notranja faza dispergirana v zunanji (V/O ali O/V mikroemulzija), če pa sta deleža obeh faz primerljiva, se v ravnotežju oblikujejo dvoverižne strukture ali pa je mikroemulzija v ravnotežju s prebitkom olja, vode ali obeh, kar imenujemo Windsorjevi sistemi. (8)

Razlika med V/O in O/V mikroemulzijo je tudi v deležu dispergirane notranje faze. Pri uporabi ionskega emulgatorja pri O/V mikroemulzijah kapljice olja obdaja električni dvosloj, ki sega v zunanjo fazo (do 100 nm) in je odvisen od koncentracije elektrolita. To pomeni, da je vsota obeh veliko večja od samega oljnega jedra (oljne kapljice), kar vodi do nastanka močnih osmotskih (odbojnih) sil pri relativno nizkem deležu dispergirane faze.

Te mikroemulzije vsebujejo manjši delež dispergirane notranje faze kot V/O mikroemulzije.

Tudi pri uporabi neionskega emulgatorja je delež dispergirane notranje faze pri O/V mikroemulzijah manjši, na račun hidratacijskega plaščka, ki obdaja polarne glave emulgatorja. Pri V/O mikroemulzijah pa so skupki dispergirane faze in emulgatorja le malo večji od dispergiranih vodnih kapljic. Ti skupki so sterično stabilizirani, interakcije med posameznimi kapljicami delujejo na kratkih razdaljah, kjer prihaja do prepletanja hidrofobnih repkov molekul emulgatorja.

Pri oblikovanju mikroemulzije je potrebno največ pozornosti nameniti izbiri emulgatorja in koemulgatorja. Biti morata fiziološko sprejemljiva, zmanjšati morata medfazno napetost proti vrednosti nič, da lahko poteče dispergiranje in tvoriti morata gibljiv film, ki se lahko prilagodi obliki majhnih kapljic. (8)

1.2.2 Sproščanje učinkovin iz mikroemulzij

Za poskuse *in vitro* velja, da učinkovina raztopljena v notranji fazi, najprej preide iz dispergirane faze v disperzni medij in nato difundira skozi membrano v akceptorski medij. Prehoda v disperzni in akceptorski medij sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, vehikla in membrane. (8)

Na sproščanje učinkovine iz mikroemulzije vpliva: porazdelitveni koeficient učinkovine med oljem in vodo; velikost kapljic notranje faze; topnost ter difuzijski koeficient učinkovine v posameznih fazah mikroemulzije; lastnosti oljne faze in emulgatorja; koncentracija emulgatorja; razmerje volumnov faz in viskoznost sistema. (12, 13)

Za izbiro primerne mikroemulzije kot dostavnega sistema, je potrebno poznati obnašanje učinkovine *in vivo*, najpomembnejši faktor je permeabilnost učinkovine skozi tkiva, ki jih prehaja na svoji poti. (9)

1.2.3 Uporaba mikroemulzij v farmaciji

Mikroemulzije so zelo primerni nosilni dostavni sistemi za lipofilne učinkovine. Njihovo uporabnost povečujejo tudi njihove specifične lastnosti. O/V mikroemulzije omogočajo povečano topnost, zadržano sproščanje in večjo BU lipofilnih učinkovin. Mikroemulzije lahko apliciramo na tri načine: parenteralno, peroralno in dermalno.

Pri parenteralni in peroralni aplikaciji prihaja *in vivo* do redčenja vodne faze s fiziološkimi tekočinami, kar lahko povzroči destabilizacijo sistema (separacija ali inverzija faz).

V/O mikroemulzije omogočajo tudi zaščito hidrofilnih učinkovin (peptidi, nukleotidi) pred vplivi okolja in prebavnega trakta in tako povečajo njihovo BU. Mikroemulzije z dvoveržno strukturo omogočajo izdelavo nosilnih dostavnih sistemov, ki so sposobni sprejeti velike količine vodotopnih ali lipofilnih učinkovin. (9, 10)

1.3 Samomikroemulgirajoči sistem (SMES)

Samomikroemulgirajoči sistemi (SMES) so bistre, transparentne in izotropne zmesi naravnih ali sintetičnih olj, trdnih ali tekočih neionskih emulgatorjev, oziroma enega ali več hidrofilnih topil, sotopil in emulgatorjev ter učinkovine. (2)

Na osnovi blagega stresanja, kot je prisotno v GIT, samoemulgirajoči sistemi (SES) v vodnem mediju tvorijo motne O/V emulzije z velikostjo kapljic od 100-300 nm, medtem ko SMES tvorijo bistre (transparentne) O/V mikroemulzije, z velikostjo kapljic manjših od 140 nm. Samomikroemulgirajoči sistemi se hitro in zelo dobro razporedijo po GIT, motiliteta prebavnega trakta pa zagotavlja zadostno stresanje, ki je potrebno za samoemulgiranje. V primerjavi s klasičnimi emulzijami, ki so občutljivi in nestabilni sistemi, so mikroemulzije fizikalno stabilne in nezahtevne za proizvodnjo. Za peroralno uporabo se lahko SMES polni v mehke ali trde želatinaste kapsule.

S tvorbo SMES se lahko učinkovinom, ki izkazujejo z raztapljanjem omejeno absorpcijo, močno izboljša hitrost in obseg absorpcije oz. njihova biološka uporabnost (BU), kar vpliva na bolj ponovljive plazemske profile učinkovine (c_{max} , t_{max} , AUC) in zmanjšanje intra- in interindividualne variabilnosti, ki jo izkazujejo hidrofobne učinkovine.

Kljub številnim študijam je danes na trgu malo učinkovin v obliki samoemulgirajočih sistemov (ciklosporin A, ritonavir, saquinavir), se pa že leta uporabljajo za pripravo koncentratov hidrofobnih herbicidov in pesticidov. Dejstvo, da več kot 40% na novo odkritih učinkovin izkazuje močno hidrofobnost nas sili, da nadaljnje raziskave usmerimo v iskanje novih sistemov, kot so SMES, da zagotovimo ustrezno BU novih učinkovin. (2, 5)

1.3.1 Sestava SMES

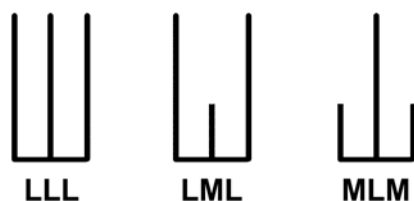
Proces samoemulgiranja je specifičen in je odvisen od narave olja in emulgatorja, koncentracije emulgatorja, razmerja olje/emulgator in od temperature pri kateri se samoemulgiranje zgodi. (1)

1.3.2 Olja

Olja predstavljajo najbolj pomembno sestavino samoemulgirajočih sistemov; omogočajo solubilizacijo hidrofobnih učinkovin, olajšajo samoemulgiranje, ščitijo učinkovino pred kemijsko in encimsko razgradnjo in povečajo absorpcijo hidrofobnih učinkovin s pomočjo tvorbe lipoproteinov, ki odnašajo učinkovino v krvni obtok preko limfnega sistema. Uporabljajo se dolgo in srednje verižni trigliceridi z različno stopnjo nasičenosti. Jedilna olja niso primerna, saj težko solubilizirajo večje količine hidrofobnih učinkovin. Široko uporabna so modificirana ali hidrolizirana rastlinska olja, ki so zmožna večje solubilizacije, hkrati pa dajejo fiziološkim enake razgradnje produkte. Srednje verižne trigliceride lahko zamenjajo novi semisintetični srednje verižni derivati, ki imajo amfifilne in emulgatorske lastnosti. (2, 6)

Absorpcijski profil in porazdelitev učinkovine v kri oz. limfo je odvisen od dolžine kislinskih verig trigliceridov, stopnje nasičenosti in volumna lipidne faze. Kratke in srednje verižne maščobne kisline (z manj kot 12 C-atomi) se prenesejo v sistemsko cirkulacijo s portalno krvjo in niso vključene v tvorbo hilomikronov, absorpcijo učinkovin v krvni obtok pospešujejo z delovanjem na tesne stike epitelnih celic. Dolgo verižne maščobne kisline in monogliceridi so podvrženi re-esterifikaciji v trigliceride znotraj epitelnih celic, ki se nato vključijo v hilomikrone in se izločijo v limfo. V hilomikrone je lahko vključena tudi učinkovina. Žolčne soli, monogliceridi, holesterol, lecitin in lizo-lecitin po vstopu v črevesje emulgirajo velike maščobne kapljice in omogočijo tvorbo manjših kapljic (0,5-1 μm). Temu sledi razgradnja s pankreatičnimi lipazami, produkti pa skupaj z žolčnimi solmi tvorijo mešane micelle. Ti solubilizirajo učinkovino v odvisnosti od njenih fizikalnih lastnosti. Mešani miceli in oljne kapljice mikroemulzije, ki se ne metabolizirajo, prehajajo skozi vodni sloj in mucin do celične membrane, kjer se absorbirajo s pinocitozo, difuzijo ali endocitozo. (2, 4)

Kot lipidni medij se uporabljajo tudi strukturni trigliceridi z različno intramolekularno zgradbo (LLL, LML, MLM) (Slika 2). S spreminjanjem razmerja srednje (M) in dolgo verižnih (L) maščobnih kislin se spreminja tudi absorpcija hidrofobnih učinkovin. Pri uporabi LML trigliceridov se učinkovine v večjem obsegu prenašajo v sistemski krvni obtok preko limfnega sistema kot pa pri uporabi MLM trigliceridov. (2)



Slika 2: Zgradba strukturnih trigliceridov: M-srednje verižne maščobne kisline (C₈-C₁₀), L-dolgo verižne maščobne kisline (C₁₈).

1.3.3 Emulgatorji

Emulgatorji imajo amfifilne lastnosti in lahko raztopijo oz. solubilizirajo večje količine hidrofobnih učinkovin. Molekule emulgatorja se razporedijo na medfazni površini in predstavljajo mehansko oviro za koalescenco kapljic. (2, 6)

Najbolj priporočajo uporabo ne-ionskega emulgatorja z visokim HLB kot so npr. trdni ali tekoči etoksilirani poliglikozilirani gliceridi z različnimi dolžinami verig maščobnih kislin in polietilenglikola ter derivati sorbitana (Tweeni). Hidrofobni emulgatorji (HLB <10), so netopni v vodi in dajejo emulzije s prevelikimi kapljicami. Hidrofilni emulgatorji, s HLB >10, tvorijo fine emulzijske kapljice z veliko površino, a se ne morejo uspešno porazdeliti v hidrofobno okolje. Ne obstaja pa splošna korelacija med HLB vrednostjo emulgatorja in povečanim obsegom absorpcije učinkovine. Oljne raztopine, ki imajo večje razmerje emulgator/koemulgator:oljna faza povzročijo nastanek SMES. Za tvorbo stabilnega SES je potrebno od 30-60% (m/m) emulgatorja. SES sestavljeni iz neionskih komponent (olje, emulgator) niso občutljivi na spremembe pH in ionske moči vodne faze v pH območju 3-10, kar je potrebno upoštevati pri učinkovinah, kjer sta topnost in stabilnost odvisni od pH vrednosti topila. (2, 3)

Emulgatorji morajo imeti relativno visoke HLB vrednosti in hidrofilnost, da se lahko takoj oblikuje sistem O/V oz. da se doseže čim večja razporeditev farmacevtske oblike v vodnem mediju.

Za učinkovito absorpcijo je potrebno preprečiti obarjanje učinkovine v GIT in zagotoviti podaljšano zadrževanje raztopljenе učinkovine na mestu absorpcije. Razgradnja emulgatorjev mora voditi do netoksičnih produktov. (2, 3)

Višja ko je koncentracija emulgatorja, večje je območje samoemulgiranja, vendar previsoke koncentracije zmanjšajo topnost učinkovine in povzročijo obarjanje. Večja je koncentracija emulgatorja, manjša je velikost kapljic emulzije in hitreje se učinkovina sprosti. Pomemben faktor pri izbiri je toksikološka sprejemljivost emulgatorja, emulgatorji naravnega izvora imajo prednost pred sintetičnimi, čeprav imajo ti manjšo sposobnost samoemulgiranja. Ne-ionski emulgatorji izkazujejo manjšo toksičnost kot ionski, a lahko povzročijo reverzibilne spremembe v permabilnosti prebavne stene.

Emulgatorji vplivajo na povečano permeabilnost membrane preko interakcije z lipidnim dvoslojem epitelnih celic GIT, ki skupaj z neprepustnim vodnim slojem tvori oviro za absorpcijo oz. difuzijo učinkovine. Zaradi svoje strukture se vrinejo v lipidni dvosloj in motijo njegovo strukturo, kar vodi v povečano permeabilnost, istočasno povečajo obseg raztapljanja učinkovine, kar pripomore k obsežnejši absorpciji. Na obseg absorpcije prav tako vpliva naboj oljnih kapljic, pozitivno nabite oljne kapljice interagirajo z negativno nabitno membrano, kar povzroči večjo absorpcijo v primerjavi z negativno nabitimi oljnimi kapljicami. (2, 3, 6)

1.3.4 Sotopila

Pri pripravi optimalnega samoemulgirajočega sistema je potrebna visoka koncentracija emulgatorjev (ponavadi več kot 30%). Primerna sotopila so organska topila (etanol, propilenglikol, polietilenglikol), saj lahko raztopijo veliko večje količine hidrofilnih emulgatorjev ali učinkovine v lipidni fazi. Potrebna je pazljivost pri alkoholih in drugih hlapnih topilih, saj izhlapevajo, prehajajo v ovojnico kapsul in povzročijo obarjanje učinkovine. (2)

1.3.5 Mehanizem samoemulgiranja

Klasične emulzije so heterogeni, grobo-disperzni sistemi (velikost kapljic je 0,1-50 μm), termodinamsko so nestabilne, zato jim dodajamo površinsko aktivne snovi (emulgatorje), ki s tvorbo filma okoli kapljic upočasnjujejo njihovo zlitje.

Po videzu so mlečnato bele barve. Mikroemulzije so heterogeni, bistri koloidni sistemi (velikost kapljic je < 140 nm), termodinamsko so stabilne, kar dosežemo z dodatkom velike količine emulgatorjev. (7)

Pri SMES je emulgiranje spontano, saj je prosta energija, ki je potrebna za nastanek nove površine, nizka. Trajna medfazna površina med oljem in vodo se tvori po dodatku binarne zmesi (olje/emulgator) k vodi. Za samomikroemulgirajoči proces sta pomembni zelo nizka medfazna napetost olje/voda in medfazna prekinitev, ki jo povzroči penetracija vode v oljno fazo ali difuzija sotopila iz oblike v vodno fazo. Mikroemulzije, ki nastanejo so termodinamsko stabilne.

Penetracija vode preko medfazne površine v oljno fazo, povzroči povišanje tlaka na medfazni površini in njeno nestabilnost, čemur sledi solubilizacija vode v oljni fazi. Blago mešanje povzroči hitro prehajanje vode v vodno sredico kar povzroči prekinitev medfazne površine in tvorbo emulzijskih kapljic. (2, 5)

Difuzija sotopila v vodno fazo, kjer je bolje topno, povzroči ločitev oljne faze v obliki oljnih kapljic in tvorbo mikroemulzije. Tako se močno poveča stična površina, kar ugodno vpliva na absorpcijo učinkovine. Posledica tega mehanizma je zmanjšanje kapacitete topila in obarjanje učinkovine. (5)

1.3.6 Lastnosti SMES

Učinkovitost samoemulgiranja ovrednotimo z določanjem stopnje emulgiranja in porazdelitvijo velikosti kapljic. Velikost kapljic emulzije je kritični faktor v procesu samoemulgiranja, saj ta določa hitrost in obseg sproščanja učinkovine in posledično absorpcije. Če se velikost kapljic zmanjša pod 140 nm, se oblikuje mikroemulzija, ki je stabilna, bistra in izotropna O/V disperzija. Za ovrednotenje mikroemulzij se uporabljajo: solubilizacija barvil, redčenje s presežkom dispergirane faze, merjenje prevodnosti, merjenje medfazne napetosti, določitev gostote, refrakcijskega indeksa, viskoznosti in velikosti kapljic. (1, 3, 6)

Za ponazoritev uporabljamo trofazni diagram, kjer s spreminjanjem razmerja oljne faze, emulgatorja in koemulgatorja ali sotopila določimo območja samo(mikro)emulgiranja in območja drugih tipov disperzij. Območje na trofaznem diagramu določa optimalne koncentracije vseh sestavin, ki vodijo do nastanka učinkovitega SMES. (2)

Za vsak S(M)ES je potrebno izvesti predformulacijske študije topnosti učinkovine v vodi in/ali olju, določiti porazdelitveni koeficient učinkovine olje/voda, fizikalno in kemijsko stabilnost učinkovine v lipidni fazi, ugotoviti potencialne interakcije učinkovine s komponentami SMES-a in izdelati fazni diagram v prisotnosti učinkovine, če je ta površinsko aktivna in vpliva na območje samomikroemulgiranja. (1, 4)

Na sproščanje učinkovine v vodno fazo vpliva tudi polarnost kapljic emulzije. Ta je odvisna od HLB vrednosti in koncentracije emulgatorja in dolžine verig trigliceridov ter njihove stopnje nasičenosti. Prav tako je potrebno ovrednotiti naboj oljnih kapljic. Običajno je ta negativen zaradi prisotnosti prostih maščobnih kislin, vključitev kationskih lipidov (oleilamin) v koncentraciji 1,0-3,0% pa povzroči nastanek kationskega S(M)ES. Tak sistem ima pozitiven ξ potencial z vrednostjo 35-45 mV, ki je ugoden za vgraditev učinkovin. (2)

Za nastanek koloidne disperzije v GIT sta pomembni občutljivost na prebavne encime in solubilizacija z mešanimi miceli žolčnih soli in fosfolipidov. Zmanjšanje vsebnosti olj v SMES in povečanje deleža emulgatorjev ter sotopil povzroči, da oljne emulzijske kapljice niso podvržene razgradnji s prebavnimi encimi. Posledično se zmanjša obseg raztapljanja in topnost učinkovine v prebavnih sokovih, učinkovina ni vgrajena v oljne kapljice in tako ni zaščitena pred kemično in encimsko razgradnjo, vse to pa vodi v zmanjšano biološko uporabnost (2, 3, 4)

1.3.7 Vključitev učinkovine v SMES

Učinkovine z nizko vodotopnostjo so problematične za vgradnjo v ustrezno farmacevtsko obliko, hkrati pa njihova velika hidrofobnost preprečuje raztapljanje v najbolj primernih in tehnološko sprejemljivih topilih. Nova sintetična olja in emulgatorji lahko raztopijo večje količine hidrofobnih učinkovin v primerjavi z rastlinskimi olji. Dodatek topil kot so etanol, PG in PEG lahko izboljšajo topnost v lipidnih nosilcih.

Učinkovitost vključitve učinkovine v S(M)ES je odvisna od fizikalno-kemijske kompatibilnosti učinkovina/SMES. Prisotnost učinkovine velikokrat vpliva na proces samo(mikro)emulgiranja, zaradi česar je potrebna prilagoditev optimalnega razmerja olje/emulgator. Učinkovitost S(M)ES se lahko spremeni zaradi spremenjenega naboja v sistemu, ki je posledica direktne kompleksacije, s katero izmed komponent sistema ali zaradi penetracije učinkovine v monosloj emulgatorja.

Posledice interakcij učinkovine s S(M)ES se lahko kažejo v spremenjeni velikosti kapljic (mikro)emulzije, kar vpliva na koncentracijo učinkovine. Praviloma so emulzije z manjšimi oljnimi kapljicami bolj občutljive na spremembe v koncentraciji učinkovine. (2, 3, 4)

Sproščanje učinkovine iz SMES poteka na osnovi porazdeljevanja v prebavni tekočini med potovanjem in razgradnjo kapljic v GIT. Učinkovina je med potovanjem skozi GIT ves čas raztopljena v finih oljnih kapljicah, ki imajo veliko medfazno površino za sproščanje/izmenjevanje ali pa se nahaja v koloidnih disperzijah mešanih micelov. Na absorpcijo vplivajo številni parametri: vrsta oljne faze, razmerje lipidov, koncentracije emulgatorja, razmerje oljna faza/emulgator, polarnost emulzije in velikost ter naboj kapljic. (2, 4)

1.4 Mikrokapsule

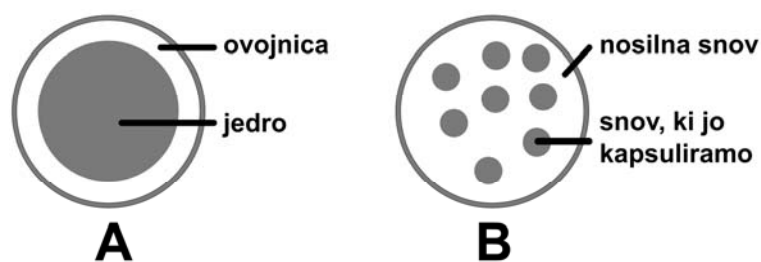
Mikrokapsule so majhni delci, velikosti od 1 μm do 1000 μm , z definiranim jedrom in ovojnico. Zdravilna učinkovina se ponavadi nahaja v jedru, ki je v trdnem ali tekočem agregatnem stanju. Jedro obdaja ovojnica, ki je lahko sestavljena iz različnih polimerov. V ta namen uporabljamo naravne, modificirane naravne in sintetične polimere. (14)

Med naravne in modificirane naravne polimere spadajo celulozni etri in estri, želatina, hitosan, arabski gumi, škrob, gumiji, proteini, maščobe in voski. Med sintetične polimere pa spadajo derivati poliakrilne kisline (Eudragiti, Carbopoli,...), polivinilpirolidon, poliamidi, polialkoholi, poliuretani, itd.

V različnih industrijah v jedro mikrokapsul vgrajujejo zdravilne učinkovine, prav tako tudi barve, hranila, lepila, bakterije, herbicide, viruse, encime, olja, pigmente, vitamine, dišave, itd. (14, 15)

Glede na obliko in notranjo strukturo ločimo (Slika 3):

- mikrokapsule v ožjem pomenu besede oz. filmski tip mikrokapsul. Jedro vsebuje mikrokapsulirano snov in je obdano z oblogo.
- mikrosfere oz. ogrodni tip mikrokapsul. Gre za okrogle delce, kjer sta mikrokapsulirana snov in nosilna snov razporejeni po celotnem volumnu.
- mikrodelce. Ti so nepravilnih oblik, mikrokapsulirana snov ter nosilna snov sta razporejeni po celotnem volumnu. (14)



Slika 3: Shematski prikaz mikrokapsul: A-filmski tip , B- ogrodni tip.

V literaturi se pogosto za vse tri oblike (mikrokapsule, mikrosfere in mikrodelce) uporablja izraz mikrokapsule, kar označuje delce mikrometerskih velikosti, sestavljenih iz snovi, ki jo mikrokapsuliramo in nosilne snovi, ne glede na notranjo strukturo in obliko delcev. (14)

1.4.1 Mikrokapsuliranje

Mikrokapsuliranje je postopek izdelave delcev mikrometrskih velikostih sestavljenih iz zdravilne učinkovine in nosilne snovi. Začetki priprave majhnih delcev, ki imajo jedrni material ujet v lupino-oblogo segajo že v leto 1930. Takrat so razvili brezsajni kopirni papir, ki je vseboval mikrokapsulirane delce. Od tedaj naprej se je uporaba metode prenesla na različna področja kot so farmacija, medicina, kozmetična industrija, biotehnologija, elektronika, fotografija, grafika,... To je pripomoglo k razvoju številnih različnih metod za izdelavo mikrokapsul in mikrosfer. (15, 16)

Zdravilne učinkovine vgrajujemo v mikrokapsule z različnim namenom: za doseganje nadzorovanega sproščanja učinkovine; prikritje neprijetnega vonja in okusa; izboljšanje stabilnosti; spremembe agregatnega stanja (tekoče v trdo); spremembe (povečanje) mase ali volumna; ločitve reaktivne sestavine zmesi (preprečevanje inkompatibilnosti); izboljšanje stisljivosti in vsipljivosti učinkovin v obliki praškov; zmanjšanje draženje želodčne sluznice in toksičnih učinkov; izboljšanja porazdelitev po GIT; povečanja biološke uporabnosti peptidnih učinkovin; doseganja dispergiranja hidrofobnih učinkovin v vodnem mediju ter priprave gastrozistentnih in bioadhezivnih farmacevtskih oblik. (14, 15, 16,)

Postopki mikrokapsuliranja omogočajo tudi enkapsulacijo živih celic (mikrobne, živalske, rastlinske), rekombinantnih učinkovin, cepiv, peptidov, proteinov, encimov, hormonov...

Danes je na trgu prisotnih veliko enkapsuliranih učinkovin: aspirin, teofilin in njegovi derivati, progesteron, antihipertenzivi, pankreatične lipaze, kalijev klorid, vitamini... (15, 16, 17)

1.4.2 Metode za izdelavo mikrokapsul

1. Kemijske:

- polimerizacija na fazni meji;
- »in situ« polimerizacija.

2. Fizikalno kemijske:

- metoda koacervacije;
- metoda z odstranjevanjem topila;
- metoda z ohlajevanjem dispergirane taline.

3. Mehanske:

- mikrokapsuliranje z razprševanjem (fluid bed);
- sušenje z razprševanjem;
- mikrokapsuliranje v dražirnih bobnih;
- centrifugalno prekrivanje. (14)

4. Postopki mikrokapsuliranja v večjem obsegu (omogočajo proizvodnjo v večjem obsegu, kapsuliranje živih celic in biomolekul):
- vibrirajoča membrana (`Vibrating nozzle`);
 - sekalec curka (`JetCutter`);
 - metoda s koaksialnim tokom raztopine polimera in plina (`AirJet`).

Vibrirajoča membrana (`Vibrating nozzle`)

Izdelava mikrokapsul temelji na razbitju laminarnega toka tekočine s pomočjo nihajoče membrane. Komercialni aparat Encapsulator Inotech IE 50-R je razvilo švicarsko podjetje Inotech.

Kapsule izdelamo tako, da eno injekcijsko brizgo napolnimo z raztopino polimera (ovojnica), drugo pa z lipofilno fazo (jedro). Tlačilka ali kompresor na stisnjen zrak potiska obe fazi skozi šobo določenega premera. Ustvari se laminarni curek sestavljen iz obeh faz (zunanja faza obliva notranjo). Membrana, ki niha z določeno frekvenco, razbije curek v kapljice.

Kapljice nato potujejo skozi električno polje in se pri tem nabijejo, kar prepreči njihovo zlepljanje, ko padejo v premreževalno raztopino. Mikrokapsule pustimo nekaj časa v premreževalni raztopini, da se proces premreževanja zaključi. S spreminjanjem procesnih spremenljivk in lastnosti polimera lahko pripravimo mikrokapsule različnih velikosti. (18, 19)

Sekalec curka (`JetCutter`)

Metoda izdelave temelji na razbitju laminarnega toka raztopine s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami, ki prekinjajo tok. Tlak tlačilke potiska raztopino polimera skozi šobo. Tvorijo se delci cilindrične oblike, ki pa se zaradi površinske napetosti oblikujejo v sferično obliko. S spreminjanjem procesnih spremenljivk (hitrost vrtenja kolesja z rezalnimi žičkami in njihovo število, hitrost pretoka raztopine skozi šobe, število šob in njihov premer) dosežemo optimalne pogoje za izdelavo.

Gre za novo, enostavno in učinkovito tehnologijo za izdelavo sferičnih kapljic. V farmaciji se uporablja za kapsulacijo učinkovin, vitaminov, dišav... (18, 20)

Metoda s koaksialnim tokom raztopine polimera in plina (`AirJet`)

Napravo sestavljata cevi z istim osiščem. Skozi notranjo cev teče laminarni tok raztopine polimera, skozi zunanjo pa dušik pod tlakom.

Raztopino polimera napolnimo v brizgo in s pomočjo tlaka tlačilke se tvori laminarni tok. Mikrosfere se tvorijo na distalnem koncu cevi. Tok tekočine prekinja plin in nastajajo kapljice, ki jih lovimo v premreževalno raztopino. Velikost mikrosfer je odvisna predvsem od hitrosti pretoka dušika. (18)

1.4.3 Vrednotenje mikrokapsul

Večina metod, ki se uporabljajo za kontrolo in vrednotenje mikrokapsul, je bila razvita za kontrolo drugih trdnih farmacevtskih oblik in se v ta namen še vedno uporabljajo. (16)

Lastnosti mikrokapsul, ki jih najpogosteje določamo so:

- vsebnost učinkovine v mikrosferah: odstranimo vse moteče substance in uporabimo ustrezno analitsko metodo za kvantitativno analizo učinkovine (npr. UV spektrofotometrijo);
- sproščanje učinkovin iz mikrokapsul: za vse mikrokapsule je zelo pomembno, s kakšno kinetiko se učinkovina sprošča, to velja tudi za mikrokapsule, pri katerih kontrola sproščanja ni osnovni namen mikrokapsuliranja. Mehanizem in kinetika sproščanja sta odvisna od strukture mikrokapsul in od lastnosti učinkovine ter polimera, predvsem od njune topnosti v mediju, kjer sproščanje poteka. Učinkovina se lahko sprošča na več načinov: z difuzijo skozi membrano (pore), z difuzijo iz polimernega matriksa, pri določenih pogojih se lahko obloga raztopi, raztali, razpade, počni zaradi osmotskega ali mehanskega tlaka in tako sprosti učinkovino.
- velikost mikrokapsul: določamo lahko s sejalno analizo, z optično ali elektronsko mikroskopijo, z elektronskim števcem (Coulter counter);
- fizikalne lastnosti: določanje površine, por, gostote, debeline obloge, vsipljivosti... in testiranja, ki so vezana na specifično uporabo mikrokapsul, npr. vrednotenje bioadhezivnih sposobnosti. (14,16)

1.5 Polimeri

Kapsuliranje celic, biomolekul in učinkovin zahteva izbiro polimera z ustreznimi lastnostmi. Ta mora zagotavljati ustrezno mehansko stabilnost sistema, nuditi ustrezno mikrookolje, biti biorazgradljiv, pomembna pa je tudi njegova cena. Z izbiro polimera je povezano tudi doseganje nadzorovanega sproščanja. (21, 22)

Uporabljajo se polimeri, ki lahko v svojo strukturo vključijo večje količine vode in so sposobni tvoriti hidrogel. Hidrogeli so tridimenzionalne hidrofilne polimerne mreže ki tvorijo ogrodje matriks sistema, nastalega s premreževanjem polimernih enot. Te so lahko povezane preko kemičnih (kovalentne vezi) ali fizikalnih vezi (ionske, hidrofobne, Van der Waalove, vodikove vezi). Hidrogele tvorijo tako naravni kot sintetični polimeri. Med naravne spadajo: alginat, hitosan, škrob, kolagen, agar, želatina,... med sintetične pa polivinilpirolidon, derivati poliakrilne kisline, poliamidi ter drugi. (14, 23)

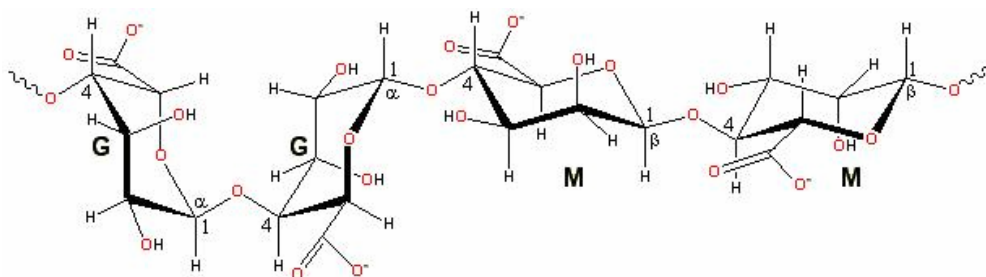
1.5.1 Alginska kislina in alginati

Alginat je prvič opisal Stanford leta 1881 kot strukturni polisaharid prisoten v rjavih algah (Phaeophyta). Količina alginata v rjavih algah je zelo velika, presega lahko tudi do 40% vsebnosti. V morskem rastlinju alginat omogoča njihovo večjo čvrstost in fleksibilnost. Vsebnost alginatov variira tako znotraj posameznih vrst kot med različnimi deli rastline. (24)

Alginska kislina je naravni linearni polimer, sestavljen iz dveh uronskih kislin, α -L-guluronske kisline (G) in β -D-manuronske kisline (M). Je hidrofilni, koloidni polisaharid, ki se nahaja kot strukturni element celične stene v različnih vrstah alg. (25)

G in M enote se med seboj povezujejo in tvorijo polimerno verigo, pri čemer nastanejo trije tipi segmentov; MM, GG in MG bloki (Slika 4). Ti se razlikujejo po vrsti vezi med posameznimi enotami. GG bloki se povezujejo z $\alpha(1,4)$ glikozidno vezjo. Takšna struktura je bolj zaprta in manj fleksibilna.

Struktura je dodatno stabilizirana z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. GG bloki tvorijo votlinska mesta, v katera se dobro prilegajo dvovalentni kovinski ioni. MM bloki se povezujejo z $\beta(1,4)$ glikozidno vezjo pri čemer dobi veriga strukturo podobno ravnemu traku in to ji omogoča večjo fleksibilnost. Pri MG povezavi pa polimerna veriga izgubi običajno linearno strukturo in spremeni svojo smer v MG stiku, kar povzroči, da je MG blok manj tog kot MM in GG bloka. Togost blokov narašča v zaporedju $MG < MM < GG$. (24, 26)



Slika 4: Stereokemična struktura alginata: GG, MG in GG blok.

Na topnost alginske kisline v vodnem mediju vpliva pH vrednost topila, saj le ta vpliva na elektrostatski naboj na uronskih kislinah. Alginska kislina ima polianionski značaj in je v protonirani obliki netopna v vodi. V vodotopno sol se pretvori pri dvigu pH vrednosti medija nad 3. Popolna nevtralizacija nastopi pri vrednosti pH 4, pri kateri je celotna alginska kislina pretvorjena v ustrezno sol. Ima veliko sposobnost sprejemanja vode, saj lahko zadrži 200-300 kratno količino vode glede na njeno maso. (24, 25)

Topnost soli alginske kisline (alginatov) je odvisna od prisotnosti kationov. Alginati enovalentnih kationov (Na^+ , K^+ , NH_4^+) so vodotopni in tvorijo v vodi viskozno koloidno raztopino s psevdoplastičnimi lastnostmi. Ob stiku z divalentnimi kovinskimi ioni (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , razen Mg^{2+}) pa tvorijo elastični gel, ki je v vodi netopen. Vezava ionov je visoko selektivna in afiniteta je močno odvisna od sestave alginske kisline. Afiniteta zemljo-alkalijskih kovin do alginata narašča $\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$. Nadaljnje raziskave so pokazale, da selektivnost narašča z vsebnostjo G enot, medtem, ko pri višanju vsebnosti M in G enot to ni izraženo.

Moč povezave divalentnih ionov z različnimi fragmenti je naslednja:

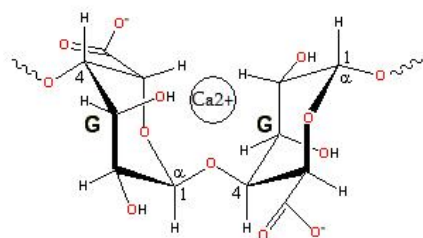
GG bloki: $\text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} \gg \text{Mg}$

MM bloki: $\text{Ba} > \text{Sr} \sim \text{Ca} \sim \text{Mg}$

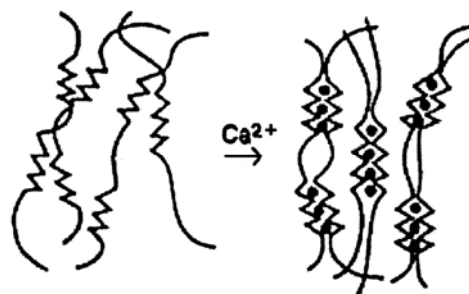
MG bloki: $\text{Ba} \sim \text{Sr} \sim \text{Ca} \sim \text{Mg}$

Visoka selektivnost med podobnimi ioni kaže na to, da interakcije med alginatom in divalentnimi ioni niso samo elektrostatske. Prisotno je tudi kompleksiranje ionov z GG bloki. Mehanizem je razložen z modelom 'jajčna posoda'. G bloki tvorijo votline, ki predstavljajo vezavna mesta za ione (kot jajca v jajčni posodi).

Kalcijevi ioni se ujamejo v ta votlinska mesta GG bloka in prečno povežejo karboksilne skupine polimernih verig, kar vodi v nastanek gela (Slika 5, 6). Cinkovi ioni pa se vežejo na mesta MM in GG blokov. (17, 24, 27, 28)



Slika 5: Stereokemična struktura GG bloka (vezavno mesto za Ca²⁺).



Slika 6: Model 'jajčne posode'.

Alginat pridobivajo z ekstrakcijo iz različnih alg (vrsta, pogoji rasti), zaradi česar imajo različne kemijske in fizikalne lastnosti. Proizvajalci težko zagotovijo enake lastnosti alginatov, zato poskušajo stalnost sestave in kakovost doseči z mešanjem alginatov iz različnih alg in iz različnih krajev rasti, prav tako tudi s kontroliranimi metodami pridobivanja.

Med posameznimi alginati se razmerje med manuronskimi in guluronskimi kislinskimi deli spreminja glede na vrsto alg iz katerih so izolirani. Razmerje vpliva na tridimenzionalno strukturo polimera in posledično na reološke, ionsko izmenjevalne in gelirne sposobnosti alginata.

Večji delež guluronskih kislin vpliva na tvorbo močnega, a krhkega neelastičnega gela, ki ohrani integriteto precej časa. Pri premreževanju s Ca²⁺ ioni niso podvrženi velikemu nabrekanju ali krčenju, zaradi česar zavirajo rast kapsuliranih celic. Nasprotno pa alginati bogati z manuronsko kislino dajejo šibke, bolj elastične in porozne gele. Premreževanje s Ca²⁺ ioni povzroči precejšnje nabrekanje oz. krčenje, a so zato primernejši za kapsuliranje živih celic. Običajno razmerje vsebnosti manuronske in guluronske kisline (M/G) je od 0,4 do 1,9. (29)

Prednosti uporabe alginatov pri izdelavi mikrokapsul:

- alginati so netoksični, biorazgradljivi in imajo zaščitni učinek na sluznico zgornjega prebavnega trakta;
- posušene mikrokapsule lahko ponovno nabreknejo, zato jih lahko uporabljamo v sistemih za nadzorovano sproščanje;
- ker je sposobnost nabrekanja odvisna od pH okolja, lahko kapsuliramo učinkovine občutljive na želodčno kislino.

Na difuzijo skozi gel vpliva poroznost gela, topnost in velikost molekulske mase učinkovine. Velika poroznost gela in majhna molekulska masa učinkovine vplivajo na hitro sproščanje iz gela. Za izdelavo sistemov z nadzorovanim sproščanjem so bolj primerne makromolekule oz. nizko molekularne učinkovine, ki so vezane na makromolekule. Za izdelavo mikrokapsul z ustreznimi lastnostmi je potrebna skrbna izbira alginata, pogojev geliranja in pomožnih snovi. (30, 31)

Uporaba alginatov je zelo razširjena tako v farmacevtski kot prehrabeni industriji. V prehrabeni industriji se uporabljajo kot zgoščevala in stabilizatorji za različne vrste izdelkov. V farmaciji se alginska kislina in natrijev ter magnezijev alginat uporabljajo skupaj z antacidi ali H₂-receptorskimi antagonisti za zdravljenje gastroezofagealnega refluksa. Kalcijev in natrijev alginat se v obliki hemostatskih gaz uporablja za zaustavljanje krvavitev in pospeševanje celjenja ran. V farmacevtski industriji alginsko kislino in alginat uporabljamo kot zgoščevala oz. premreževala (stabilizacija emulzij, suspenzij...) in razgrajevala (v tabletah). Lastnost alginatov, da se hidratiran natrijev alginat v želodčnem soku pretvori v netopno alginsko kislino, ki se nato pretvori nazaj v topno pri višjih pH vrednosti (tanko črevo), izkoriščamo pri oblikovanju sistemov z nadzorovanim sproščanjem. (17, 26, 31)

1.6 *Enkapsulator Inotech IE-50 R*

Enkapsulator Inotech IE-50 R je polavtomatizirana aparatura za kapsuliranje živalskih, rastlinskih in mikrobnih celic, biomolekul ter učinkovin. (19)

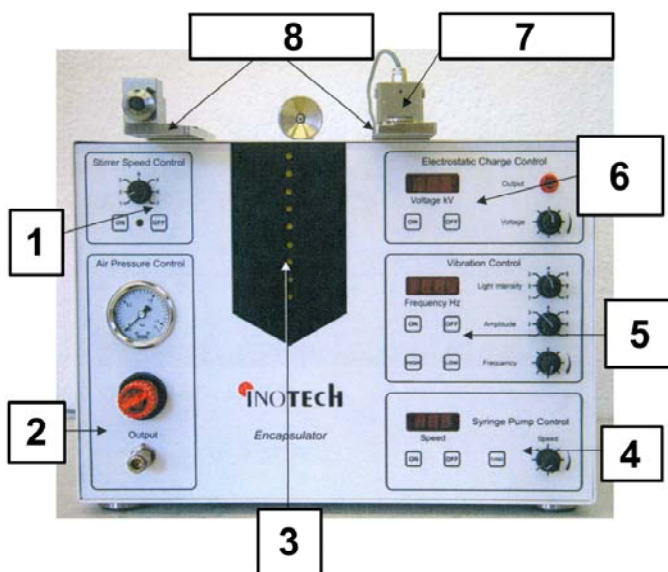
Aparatura omogoča:

- izdelavo mikrokapsul v sterilnih pogojih (sterilizacija oz. avtoklaviranje vseh delov instrumenta);
- ponovljivost pogojev izdelave mikrokapsul med serijami (nastavljivi parametri: frekvenca, amplituda, napetost, hitrost toka curka, hitrost mešala);
- pri enkapsuliranju biološkega materiala visok odstotek preživelih celic zaradi milih pogojev kapsuliranja;
- ozko porazdelitev velikosti mikrokapsul (ob uporabi raztopine čistega alginata je standardna deviacija velikosti približno 5%);
- velik velikostni razpon izdelanih mikrokapsul (od 100 μ m do 1000 μ m in več);
- takojšno kontrolo procesa s pomočjo stroboskopske luči;
- visoko produktivnost (možna izdelava 50-3000 mikrokapsul na sekundo, odvisno od velikosti mikrokapsul in viskoznosti polimerne raztopine. (19)

Sistemi, ki omogočajo kontrolirano proizvodnjo mikrokapsul in nastavitve različnih parametrov so na kontrolni enoti instrumenta (Slika 7). To so enota za nastavitev in kontrolo relativne hitrosti tlačilke za brizgo, enota za kontrolo frekvence in amplitude elektromagneta membrane (vibracijska enota), enota za kontrolo električnega naboja, regulator tlaka, enota za kontrolo hitrosti magnetnega mešala in stroboskop. Reakcijska posoda je priključena kontrolni enoti.

Raztopino za pripravo mikrokapsul lahko dovajamo s pomočjo brizge ali pa iz posode pod tlakom. Pri uporabi brizge hitrost curka uravnamo s pomočjo enote za nastavitev relativne hitrosti na kontrolni enoti. Hitrost lahko spreminjamo od vrednosti 0 do 1000, dejanska hitrost curka pa je odvisna od premera uporabljene šobe, volumna brizge in viskoznosti raztopine. Kadar dovajamo raztopino iz posode, je hitrost pretoka kontrolirana s tlakom, pri čemer je hitrost curka odvisna od uporabljene šobe in viskoznosti raztopine.

Frekvenco nihanja membrane lahko nastavljamo v nižjem (50-440 Hz) oz. višjem (440-7000 Hz) frekvenčnem območju. Nastavitev amplitude je relativna in ima razpon od 1 do 7. Nastavitve električne napetosti se uporabljajo z namenom preprečevanja zlepljanja mikrokapsul. Uporabljamo lahko napetosti med 400 in 1800 V.



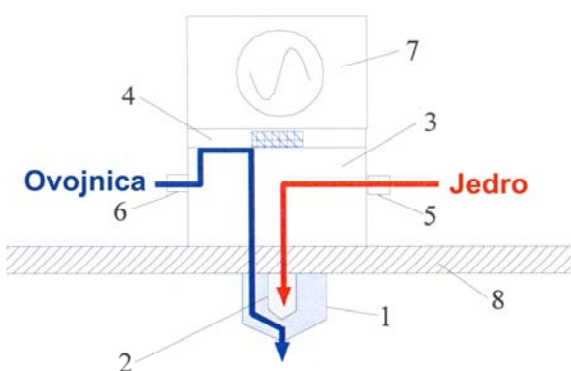
- 1 – enota za kontrolo hitrosti magnetnega mešala
- 2 – regulator tlaka
- 3 – stroboskopska luč
- 4 – enota za kontrolo relativne hitrosti tlačilke za brizgo
- 5 – enota za kontrolo frekvence in amplitude elektromagnetne membrane
- 6 – enota za kontrolo električnega naboja
- 7 – elektromagnetna tuljava
- 8 – plošča za pritrditev reakcijske posode

Slika 7: Kontrolna enota enkapsulatorja.

Enkapsulator Inotech IE-50 R omogoča izdelavo mikrokapsul in kapsuliranje tekočih hidrofilnih in hidrofobnih učinkovin s pomočjo koncentričnega sistema šob (dvokanalna šoba). Koncentrični sistem šob z ustrezno pulzacijsko glavo predstavlja dodatno opremo sistema z enojno šobo. Enota s koncentrično šobo je pritrjena na krovno ploščo.

Sestavni deli enote s koncentrično šobo so (slika 8):

- koncentrična šoba, sestavljena iz šobe, skozi katero teče zunanja faza in šobe, skozi katero teče notranja faza;
- koncentrična pulzacijska glava s pulzacijskim telesom in membrano.



- 1 Šoba zunanje faze
- 2 Šoba notranje faze
- 3 Koncentrično pulzacijsko telo
- 4 Membrana
- 5 Priključek za jedro fazo
- 6 Priključek za ovojno fazo
- 7 Tuljava
- 8 Krovna plošča

Slika 8: Shematski prikaz koncentrične šobe.

Koncentrična šoba je bistvena za izdelavo homogenih in okroglih mikrokapsul. Notranja in zunanja šoba skupaj omogočata tvorbo laminarnega curka.

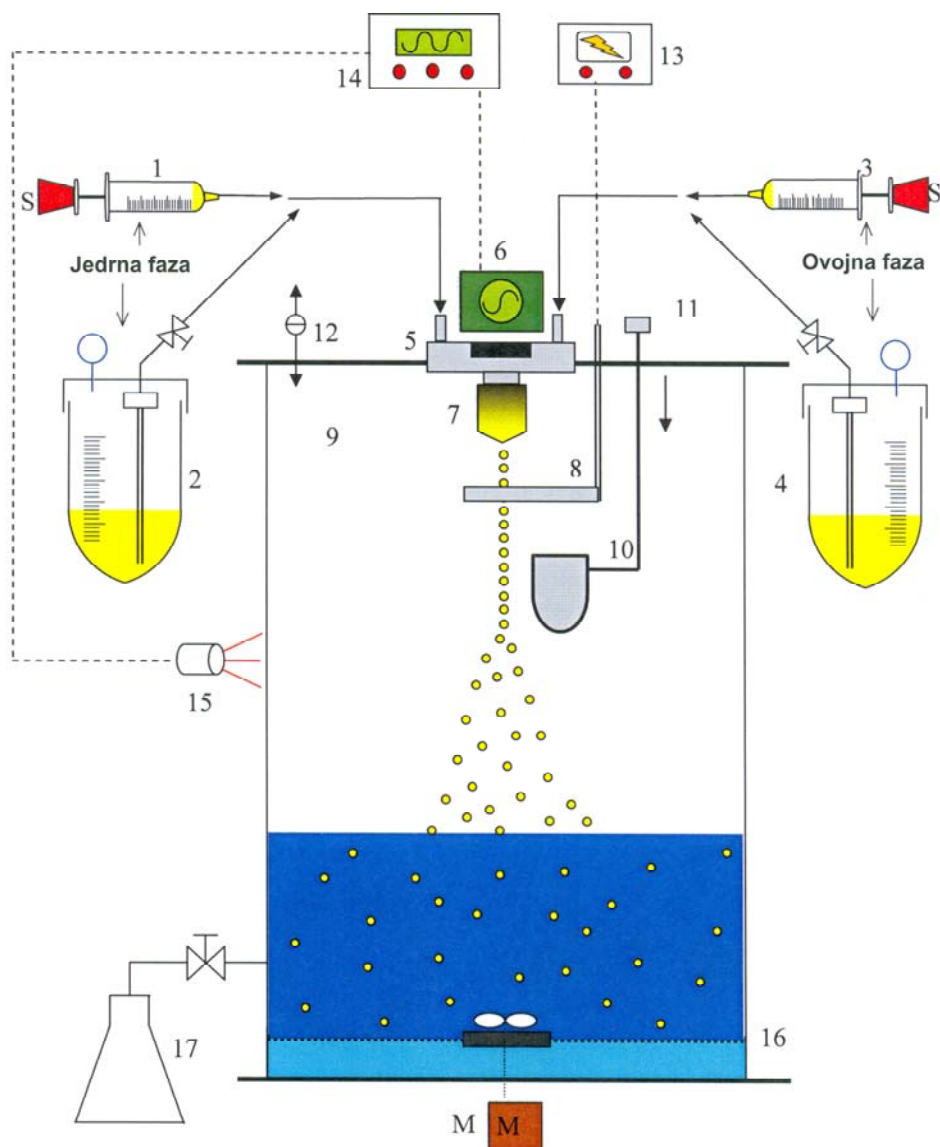
Premeri odprtih segajo od 100 do 1000 μm . Tako kot pri uporabi sistema z enojno šobo, je pri uporabi dvokanalne šobe premer kapsul odvisen od premera uporabljene šobe. V splošnem je premer kapsul dvakrat večji od premera zunanje šobe. Premer jedra kapsule pa lahko variira od 1 do 2,5 krat premera notranje šobe.

1.6.1 Princip delovanja

Snov, ki jo kapsuliramo (jedro) in material za ovojnico (polimer) napolnimo v ločeni injekcijski brizgi ali tlačni posodi. Obe tekočini potiskamo v smeri koncentrične šobe z injekcijsko brizgo ali s stisnjanim zrakom. Tekočini stečeta skozi koncentrično šobo, ki je izdelana iz posebno natančno brušenega safirja. Ob izhodu se s pomočjo nihanja membrane oblikujejo okrogle, enako velike kapljice, ki nato potujejo skozi električno polje, ki ga ustvari posebna elektroda pod koncentrično šobo. Pri prehodu skozi električno polje dobijo kapljice površinski naboj, ki preprečuje zlepljanje kapljic pred padcem v premreževalno raztopino. Premreževanje mikrokapsul poteka v premreževalni raztopini (v primeru natrijevega alginata je to lahko Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+}). Priporočena hitrost mešanja je tista, pri kateri je opazen rahel vrtinec tekočine. Pri višjih hitrostih mešanja se inducirajo močne strižne sile, ki deformirajo mikrokapsule. Na sliki 9 je prikazana shema enkapsulatorja Inotech IE-50R.

Po uporabi je potrebno instrument in vse njegove dele dobro očistiti. Šobi se lahko spere s prečiščeno vodo in etanolom ter ju spihamo z zrakom, da preprečimo zamašitev odprtih.

Lahko ju očistimo z 0,01 N NaOH nikoli pa s HCl, saj pride do tvorbe oborine v kislem. Šobe ne smemo dajati v ultrazvočno kadičko, ker se lahko poškodujejo diski na šobah. (19)



Slika 9: Shematski prikaz enkapsulatorja Inotech IE-50R.

- | | | |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1 Brizga (jedro) | 8 Elektroda | 15 Stroboskopska luč |
| 2 Tlačna posoda (jedro) | 9 Reakcijska posoda | 16 Filtracijska mreža |
| 3 Brizga (ovojnica) | 10 Posoda za prestrezanje | 17 Zbiralna posoda |
| 4 Tlačna posoda (ovojnica) | 11 Filter za tekočine | M Magnetno mešalo |
| 5 Membrana z magnetom | 12 Zračni filter | S Tlačilka |
| 6 Vibracijski sistem | 13 Generator električnega naboja | |
| 7 Koncentrična šoba | 14 Generator frekvenc | |

1.6.2 Splošna pravila izdelave

- Velikost izdelanih mikrokapsul je odvisna od premera šobe. Velja, da je velikost kapsul približno enaka dvakratni vrednosti premera šobe;
- višja hitrost pretoka polimerne raztopine daje večje mikrokapsule in obratno;
- uporaba višjih frekvenc daje manjše kapsule in obratno;
- čim večja je viskoznost uporabljene raztopine, tem večja hitrost pretoka je potrebna za doseg kontinuiranega laminarnega curka tekočine;
- pri izdelavi manjših kapsul je potrebna nižja električna napetost;
- nižje frekvence so potrebne pri uporabi raztopin z višjo viskoznostjo;
- pri uporabi raztopin z višjo viskoznostjo se tvorijo večje kapsule;
- viskoznost alginata narašča z njegovo koncentracijo. (19)

1.6.3 Težave pri izdelavi in možni vzroki

Nestabilen tok raztopine:

- hitrost curka je prenizka;
- frekvenca je previsoka;
- amplituda je previsoka;
- šoba ni očiščena.

Nestabilna veriga kapljic:

- hitrost curka je previsoka ali prenizka;
- amplituda je prenizka ali previsoka;
- frekvenca je previsoka ali prenizka;
- šoba ni očiščena.

Nehomogena distribucija velikosti kapljic:

- hitrost curka je previsoka;
- frekvenca je previsoka;
- električna napetost je previsoka;
- raztopina se ne obnaša kot newtonska.(19)

Najpomembnejši vpliv na izdelavo mikrokapsul imata premer koncentrične šobe in viskoznosti raztopin notranje in zunanje faze.

2 Namen dela

Namen našega dela je izdelati mikrokapsule s samomikroemulgirajočim sistemom. Mikrokapsule bomo izdelali s pomočjo enkapsulatorja. Ovojnica bo sestavljena iz alginata in laktoze, jedro mikrokapsule pa bo imelo samomikroemulgirajoče lastnosti in bo vsebovalo suspendirano zdravilno učinkovino.

Najprej se bomo osredotočili na iskanje optimalne koncentracije alginata in laktoze za izdelavo mikrokapsul s čvrsto alginatno ovojnico, ki omogoča zadrževanje jedra s samomikroemulgirajočimi lastnostmi. Istočasno bomo ovrednotili vpliv viskoznosti in gostote ovojne ter jedrne faze na izdelavo mikrokapsul.

V naslednji stopnji bomo ovrednotili vpliv različnih zdravilnih učinkovin na jedrno fazo (viskoznost in gostota jedrne faze) ter vpliv jedrne faze na stabilnost zdravilnih učinkovin. Za določitev vsebnosti zdravilne učinkovine v mikrokapsulah bomo izdelali umeritevno premico in s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije ovrednotili izdelane mikrokapsule glede na uspešnost vgradnje zdravilne učinkovine.

Zadnja stopnja bo predstavlja preverjanje sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul. Za primerjavo sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul bomo pripravili ogrodni tip mikrokapsule z zdravilno učinkovino, a brez SMES-a.

3 Materiali in metode

Preglednica III: Materiali in kemikalije.

Surovina, kemikalija	Trgovsko ime	Proizvajalec	Država
Trigliceridi s srednje dolgo verigo	Miglyol 812 [®]	Cognis GMBH	Nemčija
Makrogolglicerol kaprilokaproat	Labrasol [®]	Gattefossé	Francija
Diester poliglicerola-6 in oleinske kisline	Plurol Oleique [®]	Gattefossé	Francija
Alginska kislina, natrijeva sol (viskoznost 2% raztopine (25 °C) je 250 mPa·s)		Sigma	Nemčija
Alginska kislina, natrijeva sol (viskoznost 2% raztopine (25 °C) je ≥ 2,000 Pa·s)		Sigma	Nemčija
Alginska kislina, natrijeva sol (viskoznost 1% raztopine (20 °C) je 20-70 mPa·s)	Protanal LF 10/60	FMC	Norveška
Alginska kislina, natrijeva sol (viskoznost 1% raztopine (20 °C) je 70-150 mPa·s)	Protanal LF 120M	FMC	Norveška
CaCl ₂ x2H ₂ O		Merck	Nemčija
CaCl ₂		Merck	Nemčija
Laktoza, sušena z razprševanjem		Fonterra excipients	Nemčija
Citronska kislina		Merck	Nemčija
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		Merck	Nemčija
Na-lavrilsulfat	Texapon [®]	Cognis GMBH	Nemčija
MeOH		Merck	Nemčija
Demineralizirana voda		Lek	Slovenija
Polisorbat 80		Croda	USA

Preglednica IV: Naprave in pripomočki za izdelavo ter vrednotenje mikrokapsul.

Naprave, pripomočki	Tip	Proizvajalec	Država
Analitska tehtnica	XP 205	Mettler Toledo	Švica
Tehtnica	L 2200 P	Sartorius laboratory	Nemčija
Enkapsulator	Inotech IE-50R	Inotech	Švica
Brizge	Luer Lok [™]	BD Plastipam [™]	Irska
Centrifuga	Laborzartrifugen 2-15	Sigma	Nemčija
UV/VIS spektrofotometer	Safir ²	Tecan	Švica
Aparatura za merjenje gostote	Tensiometer K100	Krüss	Nemčija
Viskozimeter	Vibro viscometer SV-10	AND	Japonska
Naprava za raztapljanje	Varian 705 DS	Varian	USA
Aparatura za DSC	DSC1 Stare System	Mettler Toledo	Anglija
Aparatura za določanje velikosti delcev	Mastersizer	Malvern	Anglija

3.1 Uporabljene zdravilne učinkovine

- NDS1: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki vplivajo na raven holesterola v krvi in se uporablja pri zdravljenju hiperlipidemije. Topnost NDS1 v vodi je 0,01 mg/ml, temperatura tališča je 160 °C.

Preglednica V: Velikost delcev [µm] NDS1

	Velikost [µm]
d (0,9)	17,31
d (0,5)	8,4
d (0,1)	0,38

- NDS2: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki vplivajo na vrednost krvnega tlaka in se uporablja pri zdravljenju hipertenzije. Topnost NDS2 v vodi je 0,001 mg/ml, temperatura tališča je 160 °C.

Preglednica VI: Velikost delcev [µm] NDS2

	Velikost [µm]
d (0,9)	16,0
d (0,5)	4,0

- NDS3: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki zaviralno delujejo na imunski sistem in se uporablja za preprečevanje zavrnitve presajenih organov. Topnost NDS3 v vodi je 0,0026 mg/ml, temperatura tališča je 185 °C.
- NDS4: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki vplivajo na raven krvnega sladkorja in se uporablja pri bolnikih s sladkorno boleznijo. Topnost NDS4 v vodi (pH=7,8) je 0,02 mg/ml, temperatura tališča je 210 °C.
- NDS5: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo pri zdravljenju srčne odpovedi. Topnost NDS5 v vodi (pH=5) je 0,001 mg/ml, temperatura tališča je 240 °C.
- NDS6: spada v skupino zdravilnih učinkovin, ki vplivajo na vrednost krvnega tlaka in se uporablja pri zdravljenju hipertenzije. Topnost NDS6 v vodi je 0,91 mg/ml, temperatura tališča je 250 °C.

Vse zdravilne učinkovine smo ovrednotili glede na kompatibilnost z alginatnim gelom in stabilnost v SMES-u. Velikost delcev NDS1 (Preglednica V) in NDS2 (Preglednica VI) je bila določena z metodo laserske difrakcije z aparaturo Mastersizer, proizvajalca Malvern. NDS1 in NDS2 smo uporabili za izdelavo mikrokapsul. Za izdelane mikrokapsule z NDS1 smo izvedli test sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul.

3.2 Priprava raztopine alginata s pomožnimi snovmi

Za ovojno fazo smo pripravili vodne raztopine alginata nizke viskoznosti (Sigma) v različnih koncentracijah [m/m]; 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0% in vodne raztopine alginata z 5,0%, 7,5%, 10%, 15% dodatkom laktoze. Ker vodna raztopina alginata ni mikrobiološko stabilna, smo jo pripravili vedno neposredno pred izdelavo mikrokapsul.

3.3 Priprava samomikroemulgirajočega sistema (SMES) in nasičenje SMES-a s CaCl_2

Za jedrno fazo smo uporabili samomikroemulgirajoči sistem (SMES), ki je plod raziskovanj na Katedri za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo. SMES je sestavljen iz 80% emulgatorja (Labrasol[®]) in koemulgatorja (Plurol Oleique[®]) in 20% lipofilne faze (Miglyol 812[®]). Razmerje med emulgatorjem in koemulgatorjem je 4:1. (32)

Sestava SMES:

Labrasol [®]	64 g
Plurol Oleique [®]	16 g
Miglyol 812 [®]	20 g
Σ	= 100 g

Najprej smo v čaši združili emulgator in koemulgator, mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da smo dobili homogeno zmes in nato dodali lipofilno fazo. SMES je bistra, rahlo rumenkasta viskozna tekočina.

SMES smo nasitili z brezvodnim CaCl_2 tako, da smo 1 g brezvodnega CaCl_2 in 50 g SMES mešali 24 ur.

Nato smo zmes centrifugirali 15 min pri 5000 obratih/min in odstranili neraztopljeni CaCl_2 . SMES je mikrobiološko stabilen, tako da smo ga lahko shranjevali dlje časa pri sobnih pogojih.

3.4 Določanje gostot raztopinam ovojne in jedrne faze z zdravilno učinkovino

Za določanje gostote smo uporabili tenziometer K100, proizvajalca Krüss. Za posamezno meritev smo pripravili po 100 ml vzorca. Zanimala nas je povezava med gostoto posameznih faz in izdelavo mikrokapsul, natančneje vpliv na položaj jedra v mikrokapsuli. Pripravili smo vodne raztopine alginata nizke viskoznosti (Sigma) v koncentracijah [m/m] 1%, 1,5%, 2,0%, 2,5% in 3,0%. Prav tako smo pripravili vodne raztopine alginata z laktozo katerih sestava je podana v Preglednici VII.

Preglednica VII: Sestava vzorcev ovojne faze za merjenje gostot.

Alginat [m/m]	Laktoza [m/m]
1,5	5
1,5	10
2,0	5
2,0	10
2,5	5
2,5	10
2,5	15
3,0	5

Pripravili smo tudi suspenzijo jedrne faze z ZU (NDS1=260 mg/ml in NDS2=206 mg/ml), ki smo jo uporabili pri izdelavi mikrokapsul. Zanimal nas je vpliv dodane ZU na parametre izdelave in lastnosti mikrokapsul.

SMES je mikrobiološko stabilen in smo ga shranjevali pri sobnih pogojih, a smo se želeli prepričati, da pri shranjevanju ne prihaja do sprememb gostote. Vzorec SMES-a (40 ml) smo hranili pri sobnih pogojih in spremljali gostoto 9 dni. Za vodno raztopino alginata gostote s časom nismo spremljali, ker smo za izdelavo mikrokapsul vedno pripravili svežo raztopino alginata.

3.5 Določanje viskoznosti raztopinam ovojne in jedrne faze z zdravilno učinkovino

Viskoznost smo določili z oscilacijskim viskozimetrom Vibro viscometer SV-10, proizvajalca AND. Za posamezno meritev smo potrebovali približno 35 ml vzorca, ki smo ga termostatirali na temperaturo 23 °C. Z merjenjem viskoznosti smo skušali ugotoviti, če obstaja povezava med koncentracijo alginata, njegovo viskoznostjo in parametri izdelave ter lastnostmi mikrokapsul. Ker je alginat naravni material, pridobljen iz več vrst rjavih alg, se alginati različnih proizvajalcev med seboj razlikujejo po kemijskih in fizikalnih lastnostih. Za primerjavo smo vzeli po dva različna alginata proizvajalcev Sigma in FMC (Preglednica VIII, IX). Na podlagi pridobljenih podatkov smo se odločili za najprimernejši alginat za izdelavo mikrokapsul.

Preglednica VIII: Sestava vzorcev raztopin alginata za merjenje viskoznosti.

SIGMA (nizka viskoznost)		SIGMA (visoka viskoznost)	
Koncentracija [m/m]	Laktoza [m/m]	Koncentracija [m/m]	Laktoza [m/m]
3,0	/	2,0	/
2,5	15 in 10	1,5	/
2,0	/	1,0	/

Preglednica IX: Sestava vzorcev raztopin alginata za merjenje viskoznosti.

PROTANAL LF 10/60		PROTANAL LF 120M	
Koncentracija [m/m]	Laktoza [m/m]	Koncentracija [m/m]	Laktoza [m/m]
3,0	/	3,0	/
2,5	10	2,5	10
2,0	/	2,0	/

Želeli smo preveriti, če se ob dodatku ZU k jedrni fazi poveča njena viskoznost in če ta sprememba vpliva na izdelavo mikrokapsul. V ta namen smo pripravili suspenzije jedrne faze z ZU (NDS1=260 mg/ml in NDS2=206 mg/ml), jih termostatirali na temperaturo 23 °C in izmerili viskoznost.

3.6 Ovrednotenje premreževalnih sposobnosti SMES-a s CaCl_2

Za jedrno fazo smo uporabljali SMES, ki vsebuje 80% emulgatorja in koemulgatorja, kar močno pospeši mešanje jedrne in ovojne faze. Da bi zmanjšali tendenco po mešanju, smo SMES-u dodali CaCl_2 . Ta je vir Ca^{2+} ionov, ki omogočijo urejanje alginatnih verig v elastični gel že ob prvem stiku med jedrno in ovojno fazo, še preden pade kapljica v premreževalno raztopino CaCl_2 . Premreževalno sposobnost SMES-a s CaCl_2 smo ovrednotili s pomočjo merjenja viskoznosti vodne raztopine alginata ob dodatku različnih raztopin SMES s CaCl_2 . Viskoznost smo merili z oscilacijskim viskozimetrom Vibro viscometer SV-10, proizvajalca AND. Na podlagi pridobljenih podatkov smo se odločili za najprimernejši SMES s CaCl_2 za izdelavo mikrokapsul.

Pripravili smo nasičen SMES z brezvodnim CaCl_2 in s $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. K 50 g SMES-a smo dodali po 1 g CaCl_2 (brezvodni oz. dihidrat), mešali 24 ur na magnetnem mešalu in nato centrifugirali 15 min pri 5000 obratov/min. SMES s CaCl_2 smo pripravili tudi z dodatkom 0,5 M raztopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, v koncentraciji 0,05% [m/m]. En vzorec smo pripravili z dodatkom vode v koncentraciji 0,05% [m/m]. Pripravili smo po 2 vzorca in enega hranili pri sobni temperaturi, drugega v hladilniku (Preglednica X). Viskoznost smo merili prvi, drugi in osmi dan po pripravi vzorcev.

Preglednica X: Sestava vzorcev in shranjevanje za ovrednotenje premreževalnih sposobnosti SMES s CaCl_2 .

Vzorec	Sestava	Shranjevanje
A1	SMES + CaCl_2 (brezvodni), nasičena raztopina	Sobna temperatura
B1	SMES + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nasičena raztopina	Sobna temperatura
C1	SMES + 0,5M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)	Sobna temperatura
D1	H_2O + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)	Sobna temperatura
A2	SMES + CaCl_2 (brezvodni), nasičena raztopina	Hladilnik
B2	SMES + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nasičena raztopina	Hladilnik
C2	SMES + 0,5M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)	Hladilnik
D2	H_2O + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)	Hladilnik

Zanimal nas je tudi vpliv na viskoznost 2,5% raztopine alginata nizke viskoznosti (Sigma) ob dodatku samega SMES-a in ob dodatku vode. V ta namen smo pripravili naslednje vzorce (Preglednica XI):

Preglednica XI: Sestava vzorcev alginata s SMES-om in vodo.

Vzorec	Sestava
1	2,5% Alginat
2	2,5% Alginat + SMES
3	2,5% Alginat + voda

3.6.1 Priprava vzorcev alginata in SMES-a s CaCl_2 za merjenje viskoznosti

Za merjenje viskoznosti smo pripravili vsakokrat svežo 2,5% raztopino alginata nizke viskoznosti (Sigma). Priprava vzorcev SMES-a s CaCl_2 je opisana v poglavju 3.6. Vzorce smo shranjevali pri pogojih, ki so navedeni v Preglednici X. Vse vzorce smo dobro premešali, vzorce hranjene v hladilniku smo segreli na sobno temperaturo. Vzorec alginata za merjenje viskoznosti smo pripravili tako, da smo natehtali 40,0 g vodne raztopine alginata in ji po kapljicah dodajali 5 ml SMES oz. vode s CaCl_2 . Vseskozi smo zmes mešali pri največji hitrosti na magnetnem mešalu, da smo dosegli čimbolj homogeno porazdelitev Ca^{2+} . Po dodatku vseh 5 ml smo mešali še dodatnih 5 min. Vzorec smo termostatirali na temperaturo 23 °C in izmerili viskoznost. Viskoznost smo merili prvi, drugi in osmi dan po pripravi vzorcev.

Na enak način smo pripravili vzorec alginata s SMES-om in vzorec alginata z vodo (Preglednica XI), jih termostatirali na temperaturo 23 °C in izmerili viskoznost.

3.7 Stabilnost zdravilnih učinkovin v SMES-u

Za ovrednotenje stabilnosti ZU v SMES-u smo pripravili vzorec iz SMES-a (30 ml) in učinkovine (Preglednica XII).

Preglednica XII: Sestava vzorcev ZU in SMES-a za ovrednotenje stabilnosti.

Učinkovina	Masa [mg]	Koncentracija [mg/ml]
NDS1	750	25
NDS2	75	2,5
NDS3	90	3
NDS4	9	0,3
NDS5	15	0,5
NDS6	30	1

Vse ZU so se v SMES-u popolnoma raztopile. Pripravili smo 6 vzorcev po 5 ml, jih zaprli v vialo in starali 1 mesec pri 25, 40 in 50 °C. Vzorce smo ovrednotili glede na vsebnost in skupne sorodne snovi s HPLC metodo v Lekovem razvojnem centru.

3.8 DSC meritve alginatnih gelov z zdravilno učinkovino

Pripravili smo 2,0% vodno raztopino alginata nizke viskoznosti (Sigma). Za premreževanje smo uporabili 0,5 M raztopino $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, čas premreževanja je bil 15 minut. Mikrosfere smo izdelali z enkapsulatorjem Inotech IE-50R, pri čemer smo uporabili samo zunanjo šobo premera 750 μm . Izdelali smo mikrosfere brez ZU in mikrosfere z 20% ZU. Mikrosfere smo sušili 2 dni na sobnih pogojih. Za DSC meritve smo uporabili aparaturo DSC1 Stare System, proizvajalca Mettler Toledo. Termograme smo posneli v razponu 20-280 °C (oz. 20 °C nad tališčem ZU) v koraku 10 °C na min v odprtih lončkih.

3.9 Tehnologija izdelave mikrokapsul s šobo 500/750 μm

Izdelane mikrokapsule so sestavljene iz jedra in ovojnice; jedro tvori SMES z ZU, ovojnico gradi premrežen natrijev alginat s CaCl_2 . Mikrokapsule smo izdelali po metodi kapljanja, čeprav je enkapsulator Inotech IE-50R namenjen za izdelavo z laminarnim curkom. Metodo kapljanja smo uporabili zaradi lažjega spremljanja in spreminjanja parametrov izdelave. Prav tako smo lahko izdelali večje mikrokapsule, katere smo lažje posušili in ovrednotili. Uporabili smo koncentrično šobo notranjega premera 500 μm in zunanjega 750 μm . Pri metodi kapljanja ne prihaja do razpršitve laminarnega toka tekočine s pomočjo nihanja membrane.

Od šobe se enakomerno trgajo kapljice, hitrost nastajanja mikrokapsul je odvisna od relativnih hitrosti pretoka obeh faz in je počasnejša kot pri metodi laminarnega curka.

Jedrno fazo s suspendirano zdravilno učinkovino smo napolnili v injekcijsko brizgo, ovojno fazo pa v posodo, ki je povezana z izvorom stisnjenega zraka. V primeru prisotnosti zračnih mehurčkov smo počakali nekaj časa, da so ti izginili. Najprej smo vklopili pretok ovojne faze in s spreminjanjem tlaka uravnavali pretok do zelenega kapljanja. Šele nato smo vklopili pretok jedrne faze in počakali kar nekaj časa, da sta se pretoka uravnala. Relativna hitrost jedrne faze je bila 17 enot (nastavitev na aparaturi), za pretok ovojne faze smo uporabili tlak 0,5 bar (nastavitev na aparaturi). Tvorbo kapljic smo opazovali s pomočjo stroboskopske luči. Drugih parametrov na kontrolni plošči enkapsulatorja (frekvenca, amplituda, električna napetost) nismo uporabljali, saj imajo ti bistveno večji vpliv pri izdelavi z metodo laminarnega curka, kot pri metodi kapljanja. Shematski prikaz enkapsulatorja je prikazan na Sliki 9.

Za premreževanje smo uporabili 0,5 M raztopino $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, čas premreževanja je bil 5 minut. Med premreževanjem mikrokapsul nismo mešali, saj je to dodatno pospešilo iztekanje jedrne faze. Za posamezno serijo smo potrebovali približno 50 ml premreževalne raztopine. Med premreževanjem so se mikrokapsule posedle na dno čaše, premreževalno raztopino smo odlili ter mikrokapsule sušili na sobnih pogojih najmanj 2 dni.

Izdelali smo štiri različne vzorce mikrokapsul z ZU (Preglednica XIII) pri enakih pogojih izdelave (Preglednica XIV).

Preglednica XIII: Sestava jedrne in ovojne faze za izdelavo mikrokapsul.

Vzorec	Sestava jedrne faze	Sestava ovojnice
E	SMES (nasičen z brezvodnim CaCl_2) + NDS1 (260 mg/ml) – suspenzija	2,5% raztopina alginata nizke viskoznosti (Sigma) + 15% laktoze
F	SMES (nasičen z brezvodnim CaCl_2) + NDS1 (130 mg/ml) – raztopina	2,5% raztopina alginata nizke viskoznosti (Sigma) + 15% laktoze
G	SMES (nasičen z brezvodnim CaCl_2) in 0,5x rečen s SMES-om brez CaCl_2 + NDS1 (260 mg/ml) – suspenzija	2,5% raztopina alginata nizke viskoznosti (Sigma) + 15% laktoze
H	SMES (nasičen z brezvodnim CaCl_2) + NDS2 (206 mg/ml) – suspenzija	2,5% raztopina alginata nizke viskoznosti (Sigma) + 15% laktoze

Preglednica XIV: Pogoji izdelave mikrokapsul.

Parameter	Nastavitev/izbira
Tlak ovojne faze	0,5 bar
Relativna hitrost jedrne faze	17
Premreževalna raztopina	0,5 M CaCl ₂ ·2H ₂ O
Čas premreževanja	5 min
Pogoji sušenja	Sobni pogoji, 2 dni

3.10 Določitev vsebnosti zdravilne učinkovine v mikrokapsulah

Za določitev ZU v mikrokapsulah smo najprej pripravili umeritveno premico. Za določevanje NDS1 smo izdelali umeritveno premico v topilu MeOH:H₂O (6:4), za NDS2 smo uporabili 100% raztopino MeOH. Posameznim vzorcem mikrokapsul smo določili vsebnost zdravilne učinkovine s pomočjo UV/VIS spektrofotometra proizvajalca Tecan, povezan z programsko opremo Magellan. Pri merjenju absorbanc smo uporabili UV/VIS merilno ploščico, volumen merjenega vzorca je 250 µl. Vsebnost ZU v 1 g mikrokapsul smo izračunali po formuli:

$$\text{vsebnost (mgZU / 1g mikrokapsul)} = \frac{A - n}{k} \cdot f \cdot V \cdot \frac{1000}{\text{masa}}$$

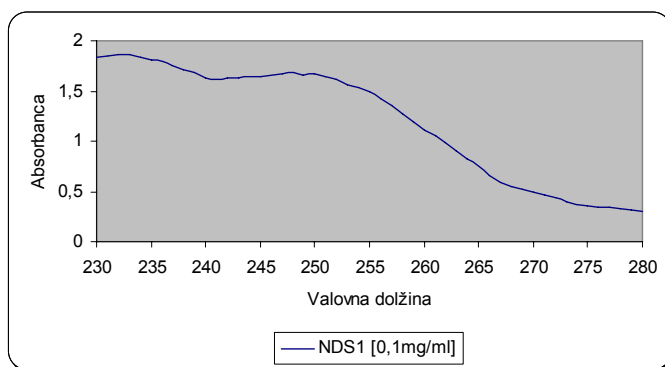
- A – absorbanca vzorca
- n, k – parametra umeritvene premice
- f – faktor redčenja
- V – volumen topila
- masa – natehta mikrokapsul

Pri izračunu je potrebno upoštevati absorbanco medija, v katerem smo dispergirali mikrokapsule in izdelali umeritveno krivuljo. Z meritvami smo pokazali, da absorbanca medija praktično ne vpliva na določeno vsebnost ZU, zato smo pri vseh izračunih vsebnosti ZU absorbanco medija zanemarili.

3.10.1 Izdelava umeritvene premice za določanje NDS1

Za izdelavo smo pripravili topilo MeOH:H₂O v razmerju 6:4. V SMES-u smo raztopili NDS1 v koncentraciji 130 mg/ml. Osnovno raztopino smo pripravili iz znane količine NDS1, raztopljenega v SMES-u in MeOH:H₂O (6:4).

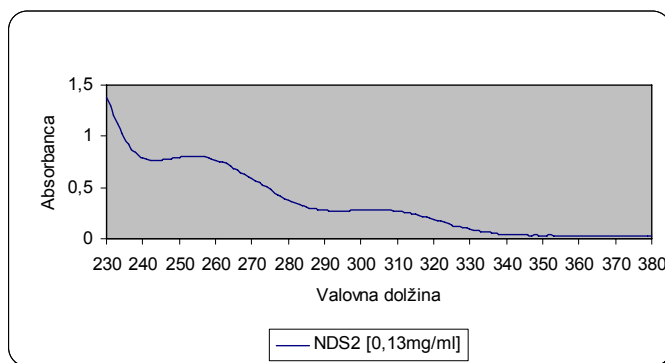
Iz te smo z redčenjem pripravili ostale raztopine različnih koncentracij. Na enak način smo pripravili slepe raztopine za ozadje, kjer smo v začetnem topilu raztopili SMES brez NDS1. Za potrditev umeritvene premice smo pripravili testni vzorec NDS1 v SMES-u, s koncentracijo v območju umeritvene premice. Absorbanco smo merili v intervalu valovnih dolžin 230-280 nm. Absorpcijski maksimum NDS1, v raztopini MeOH: H₂O (6:4), je pri valovni dolžini 248 nm.



Slika 10: Absorpcijski spekter NDS1 v raztopini MeOH:H₂O (6:4).

3.10.2 Izdelava umeritvene premice za določanje NDS2

Za izdelavo umeritvene premice smo uporabili 100% MeOH. Najprej smo pripravili suspenzijo NDS2 v SMES-u (206 mg/ml). Osnovno raztopino smo pripravili iz NDS2 suspendiranega v SMES-u in MeOH. Iz te smo z redčenjem pripravili ostale raztopine različnih koncentracij. Na enak način smo pripravili slepe raztopine za ozadje, kjer smo v MeOH raztopili SMES brez NDS2. Absorbanco smo merili v intervalu valovnih dolžin 230-380 nm. NDS2 ima 2 absorpcijska maksimuma (255 nm in 304 nm). Zaradi večjega odziva smo upoštevali absorpcijski maksimum pri 255 nm.



Slika 11: Absorpcijski spekter NDS2 v 100% MeOH.

3.10.3 Priprava vzorca mikrokapsul za določanje vsebnosti zdravilne učinkovine

Znano količino mikrokapsul smo dispergirali v znani volumen topila. Kapsule z NDS1 smo dispergirali v zmes MeOH:H₂O (6:4), kapsule z NDS2 pa v 100% MeOH. Počakali smo 10 minut, da so se mikrokapsule namočile in jih nato sonificirali z UZ 2 h, da smo dosegli popolno izluženje ZU iz mikrokapsul. Po ustreznem redčenju smo izmerili absorbanco.

3.11 Test sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul

Za test sproščanja ZU iz mikrokapsul smo uporabili napravo za raztapljanje Varian 705 DS, proizvajalca Varian.

Test sproščanja za mikrokapsule z NDS1 smo izvedli v 200 ml fosfatnega pufru (pH=7) z 1% Na-lavrilsulfata. Za primerjavo smo izdelali ogrodni tip mikrokapsule iz alginata in NDS1. Razmerje med alginatom in NDS1 je približno takšno kot smo ga predhodno določili v izdelanih mikrokapsulah, to je 9:1.

Test sproščanja za izdelane mikrokapsule smo izvedli v 2 paralelkah, za ogrodni tip mikrokapsul pa v 3. Vzorci so bili termostaitani na 37 °C, hitrost mešal je bila 100 obratov/min. Vzorčili smo ob času 15min, 30min, 1 h, 2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h in 24 h.

Odvzeli smo po 1 ml vzorca, ga filtrirali skozi 0,45 µm filter tako, da smo nekaj začetnih kapljic filtrata zavrgli in izmerili absorbanco s pomočjo UV/VIS spektrofotometra, proizvajalca Tecan, povezan z programsko opremo Magellan ter izračunali količino sproščene ZU po formuli:

$$\text{masa ZU (mg)} = \frac{A_t - n}{k} \cdot f \cdot (200 - (n - 1))$$

- A_t – absorbanca vzorca ob času vzorčenja
- n, k – parametra umeritvene premice
- f – faktor redčenja
- n – zaporedno število vzorčenja

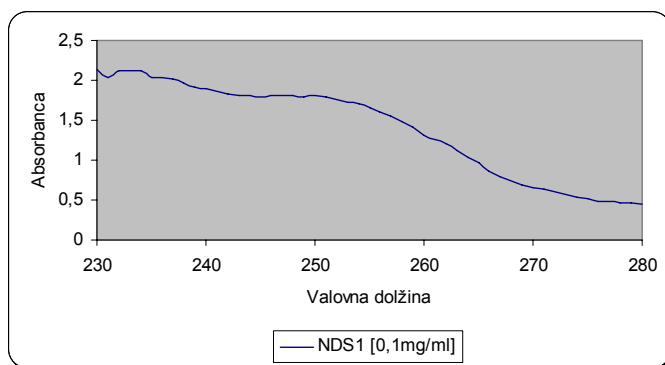
NDS2 je zelo slabo vodotopna ZU. Poskušali smo izdelati umeritveno premico v različnih medijih: v fosfatnem pufru (pH=7) z 1% Na-lavrilsulfata in v 2,0% polisorbatu 80. NDS2 je v obeh medijih topna v koncentraciji pod 0,01 mg/ml, kar onemogoča natančno spremljanje hitrosti raztapljanja, zato hitrosti raztapljanja za NDS2 nismo določili.

3.11.1 Izdelava umeritvene premice v mediju za sproščanje NDS1 iz mikrokapsul

Pripravili smo fosfatni pufer (pH=7) z 1% Na-lavrilsulfata. Za izdelavo 100 ml fosfatnega pufra smo uporabili 19,0 ml 0,1 M citronske kisline in 81 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Osnovno raztopino z znano koncentracijo ZU, smo pripravili iz suspenzije SMES-a z ZU (NDS1=260 mg/ml), ki smo jo raztopili v mediju za sproščanje. Iz osnovne raztopine smo z redčenjem pripravili raztopine različnih koncentracij. Na enak način smo pripravili slepe vzorce tako, da smo v osnovni raztopini raztopili samo SMES.

Umeritveno premico smo izdelali s pomočjo UV/VIS spektrofotometra, proizvajalca Tecan, povezano z programsko opremo Magellan. Absorpcijski spekter smo posneli v območju valovnih dolžin 230-280 nm. Absorpcijski maksimum NDS1 je pri valovni dolžini 250 nm.



Slika 12: Absorpcijski spekter NDS1 v raztopini fosfatnega pufra (pH=7) in 1% Na-lavrilsulfata.

4 Rezultati in razprava

4.1 Priprava raztopine alginata s pomožnimi snovmi

V začetni fazi izdelave diplomske naloge smo se osredotočili na iskanje najbolj optimalnih pogojev za izdelavo čvrstih mikrokapsul, ki so sposobne zadržati jedro s samomikroemulgirajočimi lastnostmi. Mikrokapsule smo izdelali iz različnih koncentracij [m/m] vodnih raztopin alginata; 1,5%, 2,0%, 2,5% in 3,0%. Z večanjem koncentracije alginata nastajajo bolj čvrste mikrokapsule, ker je premreževanje alginatnih verig obsežnejše. Nastale mikrokapsule so odpornejše na mehanske vplive okolja ter bolje zadržujejo jedrno fazo. Zaželeno je, da je koncentracija alginata čim višja, vendar se z večanjem koncentracije povečuje viskoznost alginatne raztopine, kar lahko oteži izdelavo mikrokapsul. Višja viskoznost zahteva večji tlak za enak pretok alginatne faze hkrati pa nastajajo mikrokapsule neenakomernih velikosti z repki. Nepravilna oblika mikrokapsul povzroči, da alginatna ovojnica ne obdaja jedrne faze enakomerno, kar lahko povzroči iztekanje jedra med sušenjem.

Za izdelavo mikrokapsul je potrebno preprečiti mešanje jedrne in ovojne faze že v sami šobi. Pretok alginatne ovojne raztopine mora biti takšen, da sproti odnaša jedrno fazo, ne sme pa biti prevelik, ker se drugače jedro ne vgradi v mikrokapsulo. Ker je jedrna faza nasičena s CaCl_2 , poteče premreževanje alginatnih verig že v sami šobi, kar v primeru prepočasnega pretoka (normalno pri preveliki viskoznosti alginatne raztopine) lahko povzroči zamašitev šobe in zaustavitev procesa. Pretoka faz morata biti optimalna, drugače se proces enkapsuliranja ustavi.

Optimalno sestavo ovojne faze smo določili na podlagi uspešnosti enkapsuliranja. Za uspešno mikrokapsuliranje smo šteli: da se kapljice enakomerno trgajo od zunanje šobe; da se po padcu kapljice v premreževalno raztopino oblikuje mikrokapsula; da ne nastane mikrokapsula z repkom in da je po padcu kapljice v premreževalno raztopino motnost raztopine čim manjša. Pripravili smo vodne raztopine natrijevega alginata različnih proizvajalcev v različnih koncentracijah in ovrednotili uspešnost enkapsuliranja (Preglednica XV). Za jedrno fazo smo uporabili SMES. Pogoji enkapsuliranja so navedeni v Preglednici XIV.

Preglednica XV: Sestava vzorcev in določitev uspešnosti enkapsuliranja.

Vrsta alginata	Koncentracija alginata [m/m]	Enakomerno trganje kapljic	Nastanek mikrokapsule	Nastanek mikrokapsule z repki	Motnost premreževalne raztopine	Uspešnost enkapsuliranja
Sigma (visoka viskoznost)	2,0	NE	NE	/	/	Neuspešno
Sigma (nizka viskoznost)	2,0	DA	NE	/	/	Neuspešno
	2,5	DA	DA	NE	Zelo motno	Uspešno
	3,0	NE	DA	DA	Zelo motno	Manj uspešno
Protanal LF 10/60	2,0	DA	NE	/	/	Neuspešno
	2,5	DA	DA	NE	Zelo motno	Uspešno
	3,0	NE	DA	DA	Zelo motno	Manj uspešno
Protanal LF 120M	2,0	DA	DA/NE	NE	Zelo motno	Manj uspešno
	2,5	NE	DA	DA	Zelo motno	Manj uspešno
	3,0	NE	NE	/	/	Neuspešno

V našem primeru smo za najbolj optimalno izbrali 2,5% vodno raztopino alginata nizke viskoznosti (Sigma) (Preglednica XV).

Med premreževanjem alginata s CaCl_2 nastane elastičen gel s porozno strukturo. Porozna struktura v prebavnem traktu omogoči iztekanje SMES z ZU in s tem nastanek mikroemulzije. Za samo izdelavo mikrokapsul pa je porozna struktura neugodna, ker skozi pore lahko izteka jedrna faza. Da bi zapolnili pore, smo v vodni raztopini alginata raztopili laktozo. Pri tem smo omejeni s topnostjo laktoze v vodi. Koncentracijo [m/m] laktoze smo povečevali od 5%, 7,5%, 10% do 15% (Preglednica XVI). Povečevanje koncentracije laktoze poveča tudi gostoto alginatne raztopine, kar je ugodno, saj s tem zmanjšamo razliko v gostoti jedrne in ovojne faze, to pa izboljša proces izdelave mikrokapsul. Povečana gostota alginatne raztopine na pretok nima bistvenega vpliva.

Iztekanje jedrne faze smo ovrednotili glede na zamotnitev premreževalne raztopine, manjše iztekanje povzroči manjšo zamotnitev in obratno. Najmanjše iztekanje jedrne faze smo opazili pri 15% dodatku laktoze, tako da smo za nadaljnjo izdelavo uporabljali 15% raztopino laktoze v alginatu (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Sestava vzorcev in določitev motnosti premreževalne raztopine.

Koncentracija alginata nizka viskoznost (Sigma) [m/m]	Koncentracija laktoze [m/m]	Motnost premreževalne raztopine
2,5	5	Zelo motno
2,5	7,5	Zelo motno
2,5	10	Zelo motno
2,5	15	Motno

Čeprav je vsebnost laktoze zelo visoka, to v celoti ne prepreči iztekanje jedrne faze. Smiselno je, da se nadaljnje raziskave usmerijo v iskanje pomožnih snovi, ki bi bolj učinkovito zadrževale jedrno fazo in hkrati preprečevale mešanje jedrne in ovojne faze.

Ker vodna raztopina alginata ni mikrobiološko stabilna, smo jo vedno pripravili neposredno pred izdelavo mikrokapsul. Za ovojno fazo smo uporabljali 2,5% raztopino alginata nizke viskoznosti (Sigma) s 15% laktoze.

4.2 Določanje gostot raztopinam ovojne in jedrne faze z zdravilno učinkovino

Gostoto (ρ) smo določali s pomočjo tenziometra K100, proizvajalca Krüss. Poznavanje gostot jedrne in ovojne faze je pomembno za samo izdelavo mikrokapsul. Da mikrokapsula zadrži jedro in da je mehansko bolj odporna, je zaželeno, da je jedro čim bolj na sredini in je tako enakomerno obdano z alginatno ovojnico. To dosežemo s tem, da sta gostoti ovojne in jedrne faze enaki oz. primerljivi.

Izmerili smo gostote vodnih raztopin alginata brez in z dodatkom laktoze (Preglednica XVII). Na podlagi rezultatov gostot in uspešnosti pri izdelavi mikrokapsul (Preglednica XV) smo se odločili za najbolj optimalno kombinacijo alginata in laktoze za izdelavo mikrokapsul z ZU. Izbrali smo 2,5% raztopino natrijevega alginata nizke viskoznosti (Sigma) s 15% laktoze, katere gostota je 1,078 mg/ml.

Meritve gostot so potrdile naša pričakovanja, da se z večanjem koncentracije alginata gostota ne povečuje, močno pa se poveča viskoznost vodnih raztopin alginata (Poglavje 4.3).

Iz Preglednic XVII in XVIII je razvidno, da povečevanje koncentracije laktoze vodi do povečanja gostote vodne raztopine alginata.

Preglednica XVII: Gostote [g/ml] vodnih raztopin alginata in vodnih raztopin alginata z dodatkom laktoze.

Laktoza [m/m]	Alginat nizke viskoznosti (Sigma) [m/m]				
	1	1,5	2,0	2,5	3,0
0	1,002	1,006	1,007	1,009	1,016
5	/	1,024	1,026	1,030	1,031
10	/	1,044	1,048	1,049	/
15	/	/	/	1,078	/

Preglednica XVIII: Povečanje gostote [%] ob dodatku laktoze glede na osnovno raztopino alginata.

Laktoza [m/m]	Alginat nizke viskoznosti (Sigma) [m/m]			
	1,5	2,0	2,5	3,0
5	1,79	1,9	2,08	1,48
10	3,77	4,07	3,96	/
15	/	/	6,84	/

Najmanjše povečanje gostote alginatne raztopine je pri dodatku 5% laktoze, največje pa pri 15% dodatku, kar je tudi pričakovano. Želeli smo pripraviti ovojno fazo, ki bo imela gostoto primerljivo z gostoto jedrne faze. Za izdelavo smo zato uporabljali 2,5% alginat s 15% laktoze.

Preglednica XIX: Gostote SMES in jedrne faze z ZU.

Vzorec	ρ [g/ml]	Povečanje ρ [%]
SMES	1,023	/
Jedrna faza	1,023	/
Jedrna faza + NDS1 [260 mg/ml]	1,068	4,4
Jedrna faza + NDS2 [206 mg/ml]	1,062	3,8

Jedrna faza predstavlja SMES, ki je nasičen z brezvodnim CaCl_2 . Ugotovili smo, da nasičenje SMES s CaCl_2 ne spremeni gostote, jo pa spremeni dodatek ZU.

Predvidevali smo, da če bo gostota ovojne faze večja ali enaka jedrni fazi, bomo lahko izdelali mikrokapsule z jedri, ki se bodo zadrževala na sredini mikrokapsule. Gostota jedrne faze (Preglednica XIX) z ZU je bila v obeh primerih manjša od ovojne faze (1,069 mg/ml oz. 1,062 mg/ml), a smo kljub temu imeli velike težave pri izdelavi. Jedra so se zadrževala na spodnji strani mikrokapsule, kar je privedlo do iztekanja jedrne faze, še preden je premreževanje alginatnih verig poteklo v tolikšni meri, da bi zadržalo jedro fazo v mikrokapsuli. Na strani, kjer se je zadrževala jedrna faza, je ta po padcu v premreževalno raztopino takoj prešla skozi alginatni sloj in premreževanje alginatnih verig ni poteklo. Na začetku smo sklepali, da je za to kriv prevelik pretok jedrne faze, a se hipoteza ni izkazala za pravilno.

S pomočjo stroboskopske luči smo spremljali izdelavo mikrokapsul in zaključili, da se pri odtrganju kapljice od zunanje šobe zaradi površinske napetosti jedro potisne na spodnjo stran. Takšen položaj jedra poslabša proces izdelave mikrokapsul, v primeru zadostnega premreževanja alginatnih verig in nastanka ovojnice pa lahko povzroči močnejše iztekanje jedra med sušenjem.

Ker je SMES mikrobiološko stabilen, smo ga shranjevali pri sobnih pogojih. Preverili in ugotovili smo, da se njegova gostota ne spreminja s časom shranjevanja (Preglednica XX).

Preglednica XX: Gostota SMES-a v odvisnosti od časa shranjevanja v hladilniku (4-8 °C).

Čas [dan]	ρ [g/ml]
1	1,023
2	1,025
6	1,027
8	1,024
9	1,024

Za alginatno raztopino spreminjanja gostote s časom nismo preverjali, ker smo raztopino alginata pripravili vedno isti dan kot smo izdelali mikrokapsule.

4.3 Določanje viskoznosti raztopinam ovojne in jedrne faze z zdravilno učinkovino

Na izdelavo mikrokapsul močno vpliva velikost koncentrične šobe in viskoznost ovojne ter jedrne faze oz. pretok faz. Poskušali smo ovrednotiti povezavo med koncentracijo raztopine alginata, njegovo viskoznostjo in parametri izdelave mikrokapsul.

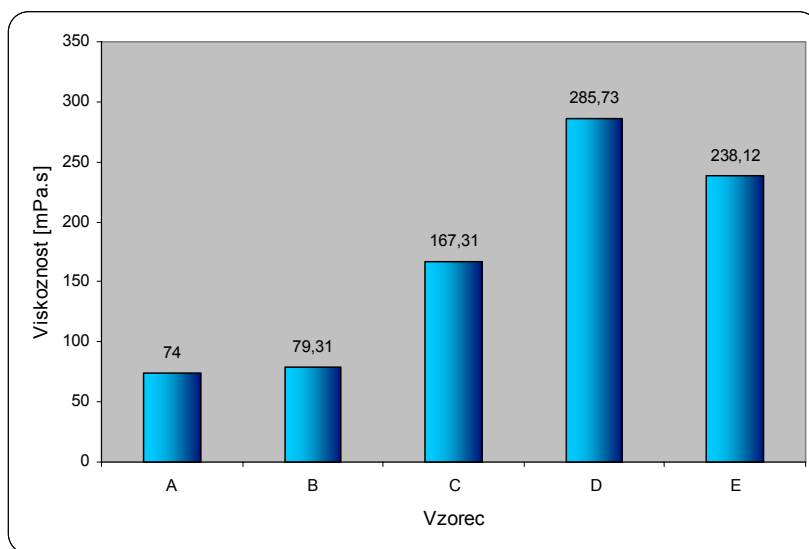
Prav tako smo ovrednotili viskoznost SMES, jedrne faze in jedrne faze z ZU. Jedrno fazo predstavlja SMES nasičen z brezvodnim CaCl_2 .

Preglednica XXI: Viskoznost SMES-a in jedrne faze z ZU.

Vzorec	η [mPa.s]	T [°C]	Povečanje η [%]
A SMES	74,00	23,77	/
B Jedrna faza	79,13	23,95	/
C Jedrna faza + NDS1 (130 mg/ml) – raztopina	167,31	23,43	111,45
D Jedrna faza + NDS1 (260 mg/ml) – suspenzija	285,73	23,95	261,09
E Jedrna faza + NDS2 (206 mg/ml) – suspenzija	238,12	23,17	200,92

Razlika v viskoznosti med SMES in jedrno fazo je zelo majhna in ne vpliva na izdelavo mikrokapsul (Preglednica XXI, Slika 13). Po dodatku ZU pa se viskoznost jedrne faze bistveno spremeni. Večja viskoznost jedrne faze pomeni manjši pretok pri isti relativni hitrosti, kar je bilo pri naši izdelavi mikrokapsul zaželeno, ker smo imeli velike težave pri uravnavanju pretoka notranje faze. V primeru, da smo uporabili notranjo šobo manjšega premera (150 μm) se je ta takoj zamašila. Prevelik pretok jedrne faze povzroči večje mešanje faz in neuspešnost enkapsuliranja.

Pričakovali smo, da bo pri uporabi suspenzije ZU namesto raztopljenega ZU iztekanje jedrne faze manjše, saj se bodo delci učinkovine ujeli v pore alginatnega gela in tako preprečili iztekanje. Vendar tega s prostim očesom nismo mogli opaziti, je pa opazna razlika v vsebnosti ZU, če uporabimo jedrno fazo z raztopljenim oz. suspendirano ZU (poglavje 4.7.1.).



Slika 13: Viskoznost SMES-a in jedrne faze z ZU (Sestava vzorcev je podana v Preglednici XXI).

Vpliv viskoznosti ovojne faze na izdelavo mikrokapsul je veliko večji v primerjavi z jedrno fazo. Pri izdelavi težimo k uporabi čim večjih koncentracij alginata, ker nam to omogoči izdelavo mikrokapsul z bolj čvrsto ovojnico. Vendar se z večanjem koncentracije alginata povečuje viskoznost alginatnih raztopin.

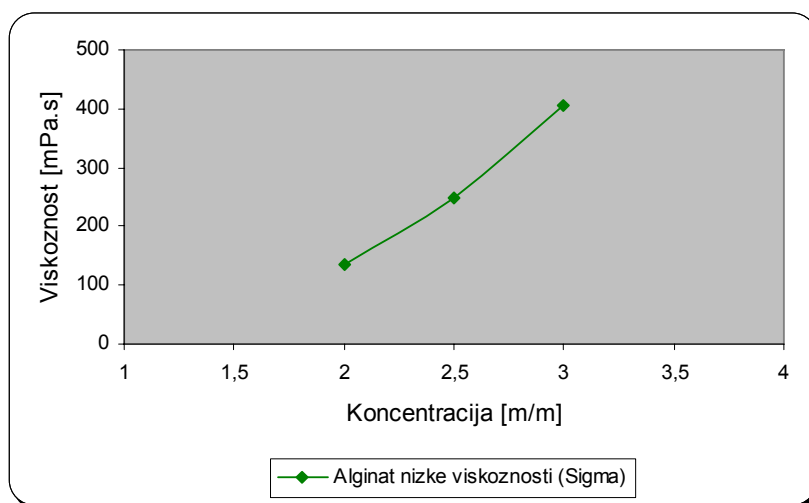
Alginat je naravni material pridobljen iz rjavih alg in alginati različnih proizvajalcev se med seboj razlikujejo po fizikalnih in kemijskih lastnostih. Proučevali smo po dva različna alginata od dveh proizvajalcev; Sigma in FMC. Velike razlike so razvidne v koncentraciji in viskoznosti raztopin alginata (Preglednica XXII), kar je pomemben faktor pri izdelavi mikrokapsul.

Preglednica XXII: Viskoznosti [mPa·s] alginatov proizvajalca Sigma.

SIGMA (nizka viskoznost)				SIGMA (visoka viskoznost)			
Alginat [m/m]	Laktoza [m/m]	η [mPa·s]	T[°C]	Alginat [m/m]	Laktoza [m/m]	η [mPa·s]	T[°C]
3,0	/	406,67	23,23	2,0	/	601,95	22,78
2,5	/	249,32	23,36	1,5	/	311,25	23,18
2,5	15	277,12	23,67	1,0	/	117,49	23,30
2,0	/	134,36	23,20				
2,0	10	166,33	23,72				

Iz Preglednice XXII je razvidno, da je pri 2% alginatu nizke viskoznosti (Sigma) viskoznost za 348% večja kot pri 2% alginatu nizke viskoznosti (Sigma), oz. večja za 48% kot pri 3% alginatu nizke viskoznosti (Sigma).

Dodatek 15% laktoze k 2,5 % alginatu nizke viskoznosti (Sigma) poveča viskoznost za 11%, medtem, ko se gostota poveča za 6,9%.



Slika 14: Odvisnost viskoznosti alginata nizke viskoznosti (Sigma) od koncentracije alginata.

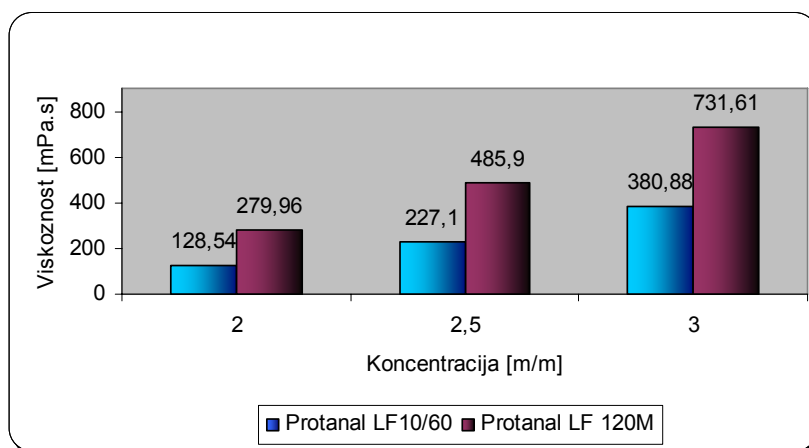
Slika 14 prikazuje, kako se viskoznost alginatne raztopine zelo poveča ob majhnem povečanju koncentracije alginata. Veliko povečanje viskoznosti omejuje uporabo visokih koncentracij alginatov pri izdelavi mikrokapsul.

Viskoznosti različnih koncentracij alginatov proizvajalca FMC so podane v Preglednici XXIII).

Preglednica XXIII: Viskoznosti [mPa·s] alginatov proizvajalca FMC.

PROTANAL LF 10/60				PROTANAL LF 120M			
Alginat [m/m]	Laktoza [m/m]	η [mPa·s]	T[°C]	Alginat [m/m]	Laktoza [m/m]	η [mPa·s]	T[°C]
3,0	/	380,88	22,45	3,0	/	731,61	23,11
2,5	/	227,10	23,39	2,5	/	485,90	23,70
2,5	10	280,10	22,54	2,5	10	504,27	23,02
2,0	/	128,54	23,41	2,0	/	279,96	23,30

Slika 15 prikazuje razliko v viskoznosti različnih alginatov proizvajalca FMC. Pri enaki koncentraciji alginatne raztopine je povečanje viskoznosti za Protanal LF 120M, vedno večje. To je za našo izdelavo mikrokapsul neugodno, ker želimo imeti dokaj nizko viskoznost in čim večjo koncentracijo alginatne raztopine.



Slika 15: Razlika v viskoznosti alginata Protanal LF 10/60 in Protanal LF120M.

Mikrokapsule smo poskušali izdelati iz vseh štirih alginatov. Za jedrno fazo smo uporabili SMES brez ZU. Na koncu smo izbrali najbolj optimalen alginat z laktozo za izdelavo mikrokapsul z ZU. Pri izbiri smo se oprli na pridobljene podatke o viskoznosti in koncentraciji raztopin alginatov ter na uspešnost izdelave mikrokapsul. Sposobnost zadrževanja jedrne faze smo ovrednotili glede na zamotnitev premreževalne raztopine. Manj se je premreževalna raztopina po padcu kapljice zamotnila, manjše je bilo iztekanje jedrne faze ter obratno.

Pri uporabi 2% raztopine alginata visoke viskoznosti (Sigma) kapsul nismo mogli izdelati, saj je bila viskoznost prevelika in nismo mogli uravnati pretoka, kar je privedlo do zamašitve šob in ustavitve procesa.

Iz alginata nizke viskoznosti (Sigma) smo izdelali 1,5%, 2,0%, 2,5% in 3,0% raztopino in 2,5% raztopino z 10% in 15% dodatkom [m/m] laktoze. Pri izdelavi mikrokapsul s koncentracijami alginata 1,5% in 2,0% kapsul nismo mogli izdelati. Težava ni bila v pretoku alginata, ampak v tem, da se je kapsula po padcu v premreževalno raztopino razlila namesto, da bi poteklo premreževanje alginatnih verig in tvorba ovojnice. Pri višjih koncentracijah 2,5% in 3,0% pa je koncentracija alginata dovolj velika, da je začetno premreževanje verig zadostno za tvorbo ovojnice, ki obdrži obliko kapljice in omogoči nastanek čvrstejšje ovojnice. Izkazalo se je, da 3,0% alginat ni najbolj primeren zaradi visoke viskoznosti, saj je težje uravnati pretok, kar povzroči mešanje faz v šobi in pri uporabi SMES-a nasičenega s CaCl_2 tudi zamašitev šobe.

Nastajajo mikrokapsule z repki, ki povečajo nestabilnost mikrokapsul in iztekanje jedrne faze pri sušenju. K 2,5% raztopini alginata smo dodali 10% in 15% laktoze. Kapsule smo lahko izdelali v obeh primerih, a smo pri 15% dodatku opazili manjše iztekanje jedrne faze (manjša zamotnitev premreževalne raztopine).

Pri izdelavi mikrokapsul iz 2,5% raztopine alginata Protanal LF 120M in 5% laktoze smo imeli podobne težave kot pri izdelavi iz 3,0% alginata nizke viskoznosti (Sigma).

Pri uporabi 2,0% raztopine alginata Protanal 10/60 in 10% laktoze nismo uspeli izdelati mikrokapsul, težave so bile podobne kot pri 1,5% in 2,0% raztopini alginata nizke viskoznosti (Sigma). Pri uporabi 3% raztopine alginata LF10/60 z 5% in 10% laktoze smo kapsule izdelali, a je prihajalo do podobnih težav kot pri drugih alginatih večje koncentracije. Najboljše mikrokapsule iz alginata LF10/60 smo lahko izdelali pri 2,0% in 2,5% raztopini alginata z 10% laktoze.

Glede na koncentracijo, viskoznost in zmožnost izdelave smo postavili okvirne vrednosti, v katerih lahko mikrokapsule izdelamo in imajo te čvrstejšo ovojnico in bolje zadržujejo jedrno fazo: viskoznost naj bo približno od 220-300 mPa·s, koncentracija alginata pa od 2,5% do 3,0%. Za izdelavo mikrokapsul z ZU smo izbrali alginat nizke viskoznosti (Sigma) v koncentraciji [m/m] 2,5% s 15% laktoze.

Za boljšo izdelavo mikrokapsul bi bilo dobro, da bi tudi jedrna faza bila v posodi, ki je povezana z izvorom stisnjenega zraka. Jedrna faza povzroči otrditev gume v brizgi in s časom postane ta neuporabna, to pa privede do neenakomernosti pretoka. Pri izdelavi mikrokapsul z ZU smo uporabili SMES nasičen s CaCl_2 , ki omogoči premreževanje alginatnih verig v šobi in velikokrat ob nepravilnem pretoku povzroči zamašitev šobe in ustavitev procesa. Šobo je potrebno očistiti in posušiti, kar proces izdelave podaljša. Prisotnost CaCl_2 izboljša proces enkapsuliranja, a je pomembno, da sta pri tem oba pretoka, jedrne in ovojne faze, čim bolj konstantna.

4.4 Ovrednotenje premreževalnih sposobnosti SMES-a s CaCl_2

SMES je sestavljen iz 80% emulgatorja in koemulgatorja, ki omogočata ob stiku z vodo nastanek mikroemulzije. Za ovojno fazo smo uporabili vodno raztopino alginata in ob stiku s SMES lahko pride do mešanja faz, kar vodi v neuspešnost enkapsuliranja. Zato smo SMES-u dodali CaCl_2 , ki že v šobi omogoči takojšno premreževanje alginatnih verig in s tem nastanek pregrade, ki onemogoči mešanje obeh faz.

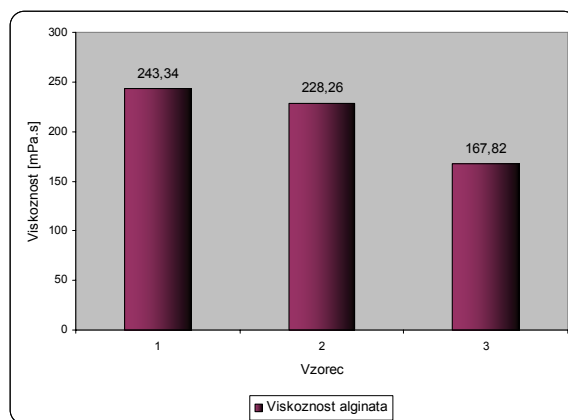
SMES-u smo dodali brezvodni CaCl_2 ali CaCl_2 dihidrat, priprava vzorcev A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2 je opisana v poglavju 3.6. (Preglednica X). Tako pripravljen SMES smo dodali alginatni raztopini in izmerili njegovo viskoznost, postopek priprave vzorca raztopine alginata s SMES-om za merjenje viskoznosti je opisan v poglavju 3.6.1. Na podlagi spremembe viskoznosti alginatne raztopine smo sklepali, v kolikšni meri poteče premreževanje alginatnih verig oz. kateri vzorec vsebuje največ Ca^{2+} ionov. Vzorce SMES-a smo shranjevali v hladilniku in pri sobni temperaturi ter spremljali spremembo viskoznosti 8 dni. Tako smo preverili, če različno shranjevanje SMES-a s CaCl_2 vpliva na njegovo sposobnost premreževanja in če se ta s časom spreminja. Pri vzorcih shranjenih v hladilniku ni bilo opaznih izpadlih kristalov CaCl_2 .

Najprej smo izmerili viskoznost 2,5% raztopine alginta nizke viskoznosti (Sigma) in viskoznost po dodatku SMES-a in po dodatku vode (Preglednica XXIV, Slika 16). Postopek priprave vzorcev je opisan v Poglavju 3.6.1.

Pri interpretaciji rezultatov je potrebno upoštevati temperaturni vpliv na viskoznost. Potrebna je pazljivost pri primerjavi viskoznosti vzorcev, ker temperatura merjenja pri vseh vzorcih ni popolnoma enaka.

**Preglednica XXIV: Sprememba viskoznosti
2,5% raztopine alginata ob dodatku SMES-a in
vode.**

	Vzorec	η [mPa.s]	T [°C]
1	Alginat	243,34	23,78
2	Alginat + SMES	228,26	24,65
3	Alginat + voda	167,82	24,76



Slika 16: Sprememba viskoznosti alginata ob dodatku SMES-a in vode (vzorci 1, 2, 3 glej Preglednico XI).

Viskoznost raztopine alginata se po dodatku SMES-a zmanjša. Sklepamo, da SMES vpliva na strukturo alginata (se vrine med alginatne verige) in s tem zmanjša njegovo viskoznost. To lahko prenesemo na dogajanje v šobi pri izdelavi mikrokapsul. Po padcu kapljice v premreževalno raztopino mora poteči hitro in intenzivno premreževanje alginatnih verig, da nastane mikrokapsula. Ravno v tej fazi SMES verjetno ovira premreževanje alginatnih verig in nastanek trdne ovojnice, kar smo opazili kot izlitje jedrne faze v premreževalno raztopino. Po padcu kapljice v premreževalno raztopino je ta obdržala svojo obliko nekaj sekund, nato pa je jedrna faza predrla nastajajočo ovojnico in kapljica se je razlila. To težavo smo deloma odpravili z nasičenjem SMES-a s CaCl_2 .

Iz Preglednice XXV je razvidno, da se ob dodatku SMES-a nasičenega z brezvodnim CaCl_2 (Preglednica X) k 2,5% raztopini alginata močno poveča viskoznost in to različno glede na mesto shranjevanja. Povečanje viskoznosti je večje za vzorec, ki je hranjen pri sobni temperaturi (A1) kot za vzorec, ki je hranjen v hladilniku (A2). Lahko, da se pri shranjevanju vzorcev v hladilniku CaCl_2 adherira na steklo in je tako na voljo manj CaCl_2 za premreževanje alginatnih verig.

Povečanje viskoznosti 2,5% alginatne raztopine ob dodatku A1 se s časom spreminja od 206% do 303%. Ob dodatku A2 k 2,5 % raztopini alginata se viskoznost s časom poveča od 167% do 209%. Takšno nihanje je lahko tudi posledica nehomogene porazdelitve CaCl_2 , ker je zaradi velike količine dodanega CaCl_2 in naraščajoče viskoznosti nemogoče zagotoviti njegovo homogeno porazdelitev. Zato mislimo, da je povečevanje viskoznosti s časom posledica napake pri pripravi vzorcev in ne posledica drugih dejavnikov. Vendar ne moremo zagotovo trditi, da se zmožnost premreževanja SMES-a s CaCl_2 s časom ne spreminja.

Preglednica XXV: Viskoznosti vzorcev A1 in A2.

Čas [dan]	η [mPa·s] 2,5% alginata	T [°C]	A1 (sobna temperatura)		A2 (hladilnik)	
			η [mPa·s] vzorca	T [°C]	η [mPa·s] vzorca	T [°C]
1	243,34	23,78	743,46	25,52	648,62	24,20
2	237,12	24,65	725,50	24,10	657,82	24,42
8	236,82	23,73	954,15	23,16	731,40	24,81

Vzorca B1 in B2 (Preglednica X) smo pripravili z nasičenjem SMES-a s $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pripravili smo jih po enakem postopku kot vzorca A1 in A2, le da smo namesto brezvodnega CaCl_2 uporabili CaCl_2 dihidrat. Iz Preglednice XXVI je razvidno, da vzorca B1 in B2 po dodatku k 2,5% raztopini alginata, ne povečata njene viskoznosti v takšni meri kot jo vzorca A1 in A2. Iz tega sklepamo, da se je v SMES-u raztopilo manj $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in poteče premreževanje alginatnih verig v manjšem obsegu. Vzorec B1 (sobna temperatura) poveča viskoznost alginatne raztopine od 7 do 22%, B2 (hladilnik) pa od 3% do 10%. Glede na povečanje viskoznosti lahko sklepamo, da shranjevanje v hladilniku zmanjša razpoložljivost CaCl_2 . Sposobnost premreževanja SMES-a s CaCl_2 se s časom ne spreminja.

Preglednica XXVI: Viskoznosti vzorcev B1 in B2.

Čas [dan]	η [mPa·s] 2,5% alginata	T [°C]	B1 (sobna temperatura)		B2 (hladilnik)	
			η [mPa·s] vzorca	T [°C]	η [mPa·s] vzorca	T [°C]
1	243,34	23,78	297,08	24,56	251,39	25,35
2	237,12	24,65	255,63	24,21	251,24	25,46
8	236,82	23,73	252,52	24,63	260,57	23,65

Vzorca C1 in C2 (Preglednica X) sta pripravljena iz 0,5 M raztopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in SMES-a. Koncentracija [m/m] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je 0,05%. Dodatek SMES-a zmanjša viskoznost alginatne raztopine (Preglednica XXIV, Slika 16), prisotna količina CaCl_2 v SMES-u (vzorec C1, C2) pa ni dovolj velika, da bi omogočila premreževanje alginatnih verig v takšnem obsegu, da se viskoznost alginatne raztopine poveča za toliko več, kot jo SMES zmanjša (Preglednica XXVII). V primeru, da bi povečevali količino dodane 0,5 M raztopine CaCl_2 k SMES-u, bi s tem vnesli v raztopino alginata vodo, ki bi zmanjšala koncentracijo alginata, kar bi povzročilo padec viskoznosti. Tako pripravljen SMES ni smiseln za izdelavo mikrokapsul, ker ne bi omogočil tvorbo pregrade med ovojno in jedrno fazo v šobi. Zmožnost premreževanja se s časom ne spreminja.

Preglednica XXVII: Viskoznosti vzorcev C1 in C2.

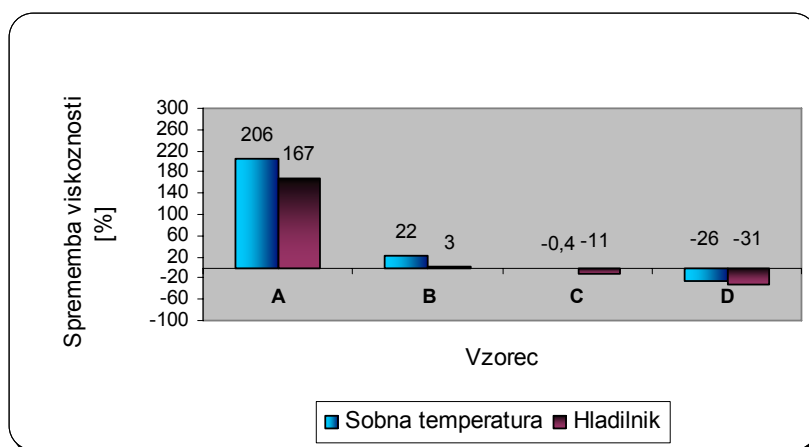
Čas [dan]	η [mPa·s] 2,5% alginata	T [°C]	C1 (sobna temperatura)		C2 (hladilnik)	
			η [mPa·s] vzorca	T [°C]	η [mPa·s] vzorca	T [°C]
1	243,34	23,78	242,39	25,03	217,66	24,92
2	237,12	24,65	233,47	25,39	234,35	25,66
8	236,82	23,73	233,65	24,34	247,54	23,79

Vzorca D1 in D2 (Preglednica X) sta pripravljena iz vode in $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Koncentracija [m/m] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je 0,05%. Dodatek vode s $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ močno zmanjša viskoznost alginatne raztopine, saj voda zmanjša koncentracijo alginata in posledično viskoznost (Preglednica XXIV). Dodatek samo vode k alginatni raztopini zmanjša viskoznost za 31% (Preglednica XXIV), voda s $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (vzorec D1) pa za 26% (Preglednica XXVIII). Prisoten CaCl_2 v vzorcih D1 in D2 omogoči premreževanje alginatnih verig, a ne v takšni meri, da poveča viskoznost za toliko kot jo zmanjša dodatek vode. Med vzorcema, ki sta shranjena pri sobni temperaturi (D1) oz. v hladilniku (D2) ni razlik v sposobnosti premreževanja SMES s CaCl_2 . Ta se tudi s časom ne spreminja.

Preglednica XXVIII: Viskoznosti vzorcev D1 in D2.

Čas [dan]	η [mPa·s] 2,5% alginata	T [°C]	D1 (sobna temperatura)		D2 (hladilnik)	
			η [mPa·s] vzorca	T [°C]	η [mPa·s] vzorca	T [°C]
1	243,34	23,78	180,87	25,18	167,47	25,06
2	237,12	24,65	179,50	24,10	176,92	24,82
8	236,82	23,73	173,72	23,61	174,10	24,05

Način shranjevanja vzorec vpliva na sposobnost premreževanja alginatnih verig. Vzorca A2 in B2, ki sta bila shranjena v hladilniku, manj povečata viskoznost alginatne raztopine, glede na vzorca A1 in B1 shranjena pri sobni temperaturi. Vzorca C2 in D2, hranjena v hladilniku, povzročita večje zmanjšanje viskoznosti alginatne raztopine, kar je posledica manjše razpoložljivosti CaCl_2 za premreževanje (Slika 17).



Slika 17: Sprememba viskoznosti vzorcev A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2 glede na pogoje shranjevanja (Sestava vzorcev je podana v Preglednici X).

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo za najprimernejšo jedrno fazo izbrali SMES nasičen z brezvodnim CaCl_2 , ki smo ga shranjevali pri sobni temperaturi. Vzorca A1 in A2 sta najbolj povečala viskoznost alginatne raztopine. Sposobnost premreževanja se s časom za vzorce B1, B2, C1, C2, D1 in D2 ni spreminjala. Da se sposobnost premreževanja s časom za vzorca A1 in A2 ni spremenila, ne moremo zagotovo trditi, zaradi napake pri pripravi vzorcev. Se je pa pri vseh vzorcih, hranjenih v hladilniku, zmanjšala sposobnost premreževanja.

Dodatek CaCl_2 v SMES zelo izboljša mikrokapsuliranje, ker omogočimo začetek tvorbe alginatne ovojnice že v šobi, nadaljuje pa se po padcu kapljice v premreževalno raztopino CaCl_2 . Pri izdelavi je potreben večji pretok alginatne faze, da se ta ne zadržuje predolgo v šobi, ker to povzroči zamašitev šob in zaustavitev enkapsuliranja.

4.5 Stabilnost zdravilnih učinkovin v SMES-u

Pripravili smo vzorce ZU v SMES-u (Poglavje 3.7, Preglednica XII). Določili smo vsebnost ZU in sorodne snovi po shranjevanju 1 mesec pri 25, 40 in 50 °C (Preglednica XXIX).

Preglednica XXIX: Stabilnost ZU v SMES-u.

ZU	Vsebnost ZU [mg/ml] t=0	Skupne sorodne snovi [%] po 1 mescu shranjevanja			Stabilnost
		25 °C	40 °C	50 °C	
NDS1	25	0,12	0,18	0,66	Mejna
NDS2	2,5	0,52	1,0	1,49	Mejna
NDS3	3	5,9	9,64	12,3	Mejna
NDS4	0,3	1,35	48,6	78,2	Ni stabilna
NDS5	0,5	1,10	1,60	2,67	Mejna
NDS6	1,0	0,65	1,22	1,81	Dobro stabilna

Pri izdelavi mikrokapsul smo uporabili NDS1 in NDS2, ki sta mejno stabilni v SMES-u, a to ni vplivalo na izdelavo mikrokapsul.

4.6 DSC meritve alginatnih gelov z zdravilno učinkovino

DSC meritve smo izvedli za NDS1, NDS2, NDS4, NDS5 in NDS6. Na podlagi DSC meritev alginatnih gelov z ZU lahko sklepamo na možne prisotne interakcije med alginatno ovojnico in ZU. Posneli smo termograme ZU in termogram praznih kapsul (alginat) in nato glede na te termograme primerjali analize alginatov z ZU. Na podlagi termogramov za NDS1 in NDS2 sklepamo, da ni prisotnih interakcij, saj se termogram alginata bistveno ne spremeni, opazna pa so tudi tališča ZU. Za NDS5 sklepamo, da ni prisotnih interakcij, ki bi vplivale na izdelavo mikrokapsul. Interakcije med ZU in alginatno ovojnico so opazne pri NDS4 in NDS6, kjer se termogram alginata spremeni, prav tako ni jasno opaznih tališč za ZU. Termogrami so priloženi v Prilogi.

4.7 Določitev vsebnosti zdravilne učinkovine v mikrokapsulah

4.7.1 Izdelava umeritvene premice in določitev vsebnosti NDS1 v mikrokapsulah

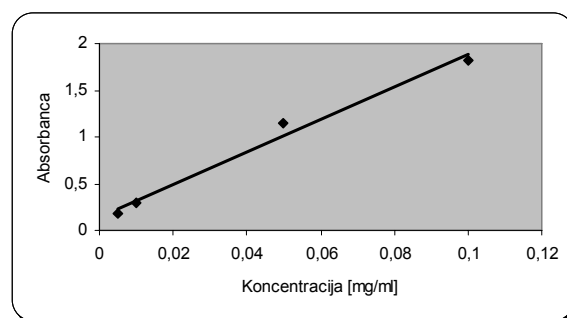
Umeritveno premico za NDS1 smo izdelali v zmesi MeOH:H₂O (6:4), absorpcijski maksimum je pri 248 nm.

Preglednica XXX: Absorbance NDS1 in ozadja pri 248 nm.

Koncentracija [mg/ml]	A (NDS1+ozadje)	A (ozadje)	A (NDS1)
0,005	0,1848	0,077	0,1078
0,01	0,2969	0,082	0,2149
0,05	1,1491	0,1094	1,0397
0,1	1,8212	0,1387	1,6825

$$y = 17,37x + 0,1465$$

$$R^2 = 0,9861$$



Slika 18: Umeritvena premica za NDS1.

Za določanje vsebnosti NDS1 smo uporabili umeritveno premico ($y = 17,37x + 0,1465$), ki upošteva absorbance NDS1 in ozadja. Vsebnost ZU smo izračunali tudi tako, da smo absorbance ozadja odštevali, a je razlika v vsebnosti minimalna. Mikrokapsule smo sušili na foliji 2 dni in nato določili vsebnost ZU.

Izdelali smo mikrokapsule (vzorec E, Preglednica XIII), kjer smo za jedrno fazo uporabili SMES nasičen s CaCl₂ in s suspenzijo NDS1 v koncentraciji 260 mg/ml ter določili vsebnost NDS1. Izdelane mikrokapsule so bile bele barve in okrogle oblike.

Izračun vsebnosti ZU v 1 g mikrokapsul (vzorec E):

$$\text{masa} = 321,26 \text{ mg}$$

$$V(\text{MeOH}) = 25 \text{ ml}$$

$$f = 100$$

$$A = 0,3957$$

$$n = 0,1465$$

$$k = 17,37$$

$$m(\text{ZU} / 1\text{g}) = \frac{0,3957 - 0,1465}{17,37} \cdot 100 \cdot 25 \cdot \frac{1000}{321,26} = 111,6 \text{ mg} / 1\text{g}$$

Mikrokapsule (vzorec F, Preglednica XIII) smo izdelali tudi iz jedrne faze, ki je vsebovala SMES nasičen s CaCl_2 in raztopljen NDS1 v koncentraciji 130 mg/ml ter določili vsebnost NDS1. Izdelane mikrokapsule so bile okrogle oblike in rahlo motne po videzu.

Izračun vsebnosti ZU v 1 g mikrokapsul (vzorec F):

$$\begin{aligned} \text{masa} &= 416,10 \text{ mg} \\ V(\text{MeOH}) &= 10 \text{ ml} \end{aligned} \quad m(\text{ZU} / 1\text{g}) = \frac{0,5807 - 0,1465}{17,37} \cdot 100 \cdot 5,6 \cdot \frac{1000}{416,10} = 33,6 \text{ mg} / 1\text{g}$$

$$f = 100$$

$$A = 0,5807$$

$$n = 0,1465$$

$$k = 17,37$$

Razlika med vzorcema E in F je le v uporabljeni jedrni fazi pri izdelavi. Pri izdelavi vzorca E smo v jedrni fazi uporabili enkrat večjo količino NDS1 kot pri vzorcu F. Pričakovali smo, da bomo posledično določili 1x večjo vsebnost NDS1 v vzorcu E kot v vzorcu F. Določili smo, da vsebnost NDS1 v vzorcu E znaša 11,2%, v vzorcu F pa 3,4%. To pomeni, da je v vzorcu E 3x več NDS1 kot v vzorcu F in ne le 1x več kot smo pričakovali. Zato sklepamo, da na iztekanje jedrne faze prav tako vpliva količina ZU v jedrni fazi. Če je ZU prisotna v jedrni fazi v suspenziji (vzorec E), se lahko delci ZU ujamejo v pore alginatnega gela in tako zmanjšajo nadaljnje iztekanje jedrne faze.

Pri izdelavi mikrokapsul smo imeli težave zaradi mašenja šob, ker je poteklo premreževanje alginatnih verig že v šobi. Zato smo SMES nasičen s CaCl_2 0,5x redčili s SMES-om, ki ne vsebuje CaCl_2 , koncentracijo NDS1 smo pri tem ohranili (260 mg/ml). Izdelali smo mikrokapsule (vzorec G, Preglednica XIII) in določili vsebnost NDS1. Izdelane mikrokapsule so bile bele barve in okrogle oblike.

Izračun vsebnosti ZU v 1g mikrokapsul (vzorec G):

$$\begin{aligned} \text{masa} &= 69,61 \text{ mg} \\ V(\text{MeOH}) &= 10 \text{ ml} \end{aligned} \quad m(\text{ZU} / 1\text{g}) = \frac{0,5438 - 0,1465}{17,37} \cdot 20 \cdot 10 \cdot \frac{1000}{69,61} = 65,7 \text{ mg} / 1\text{g}$$

$$f = 20$$

$$A = 0,5438$$

$$n = 0,1465$$

$$k = 17,37$$

Pri izdelavi smo imeli manj težav z mašenjem šob, a uporaba tako pripravljene jedrne faze zmanjša vsebnost NDS1 v mikrokapsulah. V vzorcu G smo določili, da vsebuje 6,6% NDS1, kar je skoraj polovico manj kot pri vzorcu E. Tako pripravljena jedrna faza je vsebovala manj CaCl_2 , začetno premreževanje alginatnih verig ni tako intenzivno in iztekanje jedrne faze je poteklo v večjem obsegu.

4.7.2 Izdelava umeritvene premice in določitev vsebnosti NDS2 v mikrokapsulah

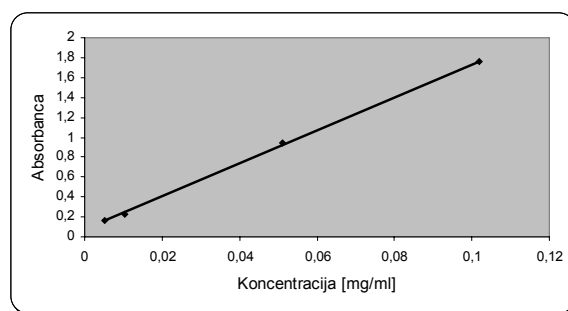
Umeritevno premico za NDS2 smo zaradi slabe topnosti izdelali v 100% metanolu, absorpcijski maksimum je pri 255 nm.

Preglednica XXXI: Absorbance NDS2 in ozadja pri 255 nm.

Koncentracija [mg/ml]	A (NDS2+ozadje)	A (ozadje)	A (NDS2)
0,005	0,1668	0,0714	0,0954
0,01	0,2294	0,0722	0,1572
0,05	0,9422	0,0695	0,8727
0,1	1,7586	0,0779	1,680

$$y = 16,569x + 0,0766$$

$$R^2 = 0,9996$$



Slika 19: Umeritvena premica za NDS2.

Za določanje vsebnosti ZU smo uporabili umeritevno premico ($y = 16,569x + 0,0766$), ki upošteva absorbance NDS2 in ozadja. Vsebnost ZU smo izračunali tudi tako, da smo absorbance ozadja odštevali, a je razlika v vsebnosti minimalna.

Izdelali smo mikrokapsule (vzorec H, Preglednica XIII), kjer smo za jedrno fazo uporabili SMES, nasičen s CaCl_2 , s suspenzijo NDS2 v koncentraciji 206 mg/ml in določili vsebnost NDS2. Izdelane mikrokapsule (Slika 20, 21) so bile bele barve in okrogle oblike, a so imele repke. Očitno prisotnost NDS2 v jedrni fazi spremni njene lastnosti in nastajajo mikrokapsule z repki.

Izračun vsebnosti ZU v 1g mikrokapsul (vzorec H):

masa = 626,37 mg

V(MeOH) = 25 ml

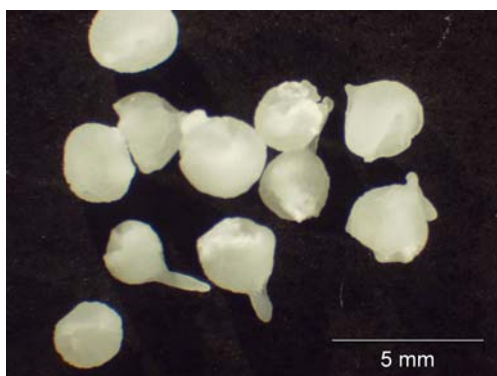
f = 25

A = 0,6095

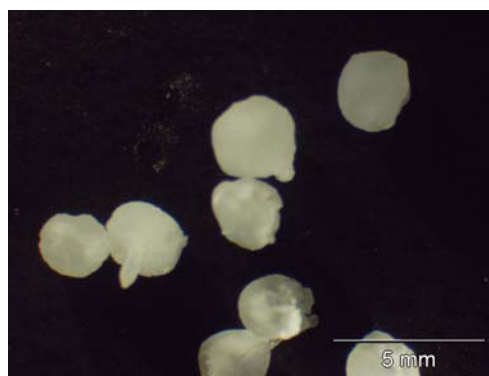
n = 0,0766

k = 16,569

$$m(\text{ZU} / 1\text{g}) = \frac{0,6095 - 0,0766}{16,569} \cdot 25 \cdot 25 \cdot \frac{1000}{626,37} = 32,0\text{mg} / 1\text{g}$$



Slika 20: Posušene mikrokapsule z NDS2 (vzorec H, Preglednica XIII)



Slika 21: Posušene mikrokapsule z NDS2 (vzorec H, Preglednica XIII)

Mikrokapsule smo sušili na foliji 2 dni. Po sušenju je bila folija mastna zaradi iztekanja SMES. Opazili smo tudi prisotnost kristalčkov in sklepamo, da gre za kristalčke NDS2.

Očitno je iztekanje jedrne faze iz mikrokapsul veliko bolj intenzivno kot pri mikrokapsulah z NDS1. Prav tako smo v mikrokapsulah določili za dve tretjini manjšo vsebnost NDS2 v primerjavi z mikrokapsulami, ki vsebujejo NDS1. Mikrokapsule z NDS1 in NDS2 smo izdelali pod enakimi pogoji. Razlika je le v uporabljeni suspenziji učinkovine za jedrno fazo. Določili smo tudi za 20,8% večjo vsebnost ZU v mikrokapsulah z NDS1, v primerjavi z mikrokapsulami z NDS2. Zaradi tega sklepamo, da na iztekanje jedrne faze verjetno vpliva tudi velikost delcev ZU (Preglednici V, VI).

4.8 Izdelava umeritvene premice v mediju za sproščanje NDS1 iz mikrokapsul

Umeritveno premico za NDS1 smo izdelali v fosfatnem pufru (pH=7) in 1% Na-lavrilsulfata, absorpcijski maksimum je pri 250 nm.

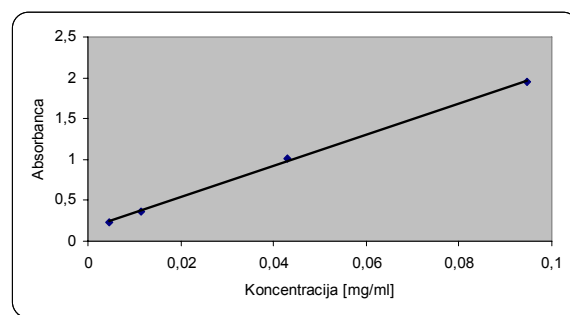
Za izračun sproščene ZU iz mikrokapsul smo uporabili umeritveno premico ($y = 19,212x + 0,1497$), ki upošteva absorbance NDS1 in ozadja. Razlika v količini sproščene ZU iz mikrokapsul, ob upoštevanju absorbance ozadja, je zanemarljiva.

Preglednica XXXII: Absorbance NDS1 in ozadja pri 250 nm.

Koncentracija [mg/ml]	A (NDS1+ozadje)	A (ozadje)	A (NDS1)
0,0047	0,23	0,146	0,084
0,011	0,359	0,144	0,215
0,047	1,011	0,139	0,871
0,11	1,955	0,149	1,805

$$y = 19,212x + 0,1497$$

$$R^2 = 0,9991$$



Slika 22: Umeritvena premica za NDS1.

4.9 Test sproščanja NDS1 iz mikrokapsul

Test sproščanja smo izvedli v fosfatnem pufru (pH=7) z 1% Na-lavrilsulfata. Uporabili smo napravo za raztapljanje Varian 705DS. Količino sproščene ZU smo določili s pomočjo UV/VIS spektrofotometra in umeritvene premice, ki smo jo predhodno izdelali.

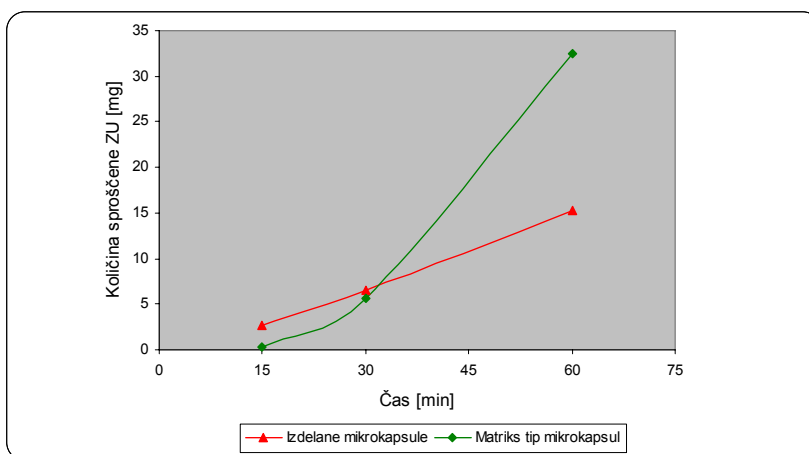
Za primerjavo sproščanja NDS1 iz izdelanih mikrokapsul smo pripravili ogrodni tip mikrokapsule iz alginata in NDS1. Test raztapljanja mikrokapsule smo izvedli v 2 paralelkih, za ogrodni tip mikrokapsul pa v 3.

Količina NDS1 v posamezni paralelki (izdelane mikrokapsule in ogrodne mikrokapsule) je približno 75mg. Določili smo največjo topnost NDS1 v mediju za sproščanje, ki znaša 0,25mg/ml.

Pričakovali smo, da bo sproščanje ZU iz izdelanih mikrokapsul na začetku hitrejše kot iz ogrodnega tipa mikrokapsul. SMES, ki sestavlja jedro mikrokapsul, v vodi tvori mikroemulzijo in tako naj bi omogočil hitrejše raztapljanje ZU.

Iz slike 23 ugotovimo, da sproščanje ZU v začetni fazi (30 min) poteče v večjem obsegu pri izdelanih mikrokapsulah, kot pri ogrodnem tipu mikrokapsul. Večje raztapljanje omogoči SMES, ki ga uporabljamo za jedro mikrokapsule.

Ko mikrokapsule v mediju nabreknejo, začne SMES skupaj z raztopljeno ZU prodirati v okolico in tvori mikroemulzijske kapljice, kar je razlog za hitro sproščanje v začetnih minutah. Od 30 minut dalje pa je hitrost sproščanja ZU večja iz ogrodnega tipa mikrokapsul (Slika 24), saj se te verjetno hitreje razgrajujejo, ker alginat ni bil izpostavljen vplivu premreževala z obeh strani. Razgrajevanje in odpiranje mikrokapsul je ključnega pomena za raztapljanje delcev ZU, ki ne morejo difundirati skozi pore v mikrokapsuli.

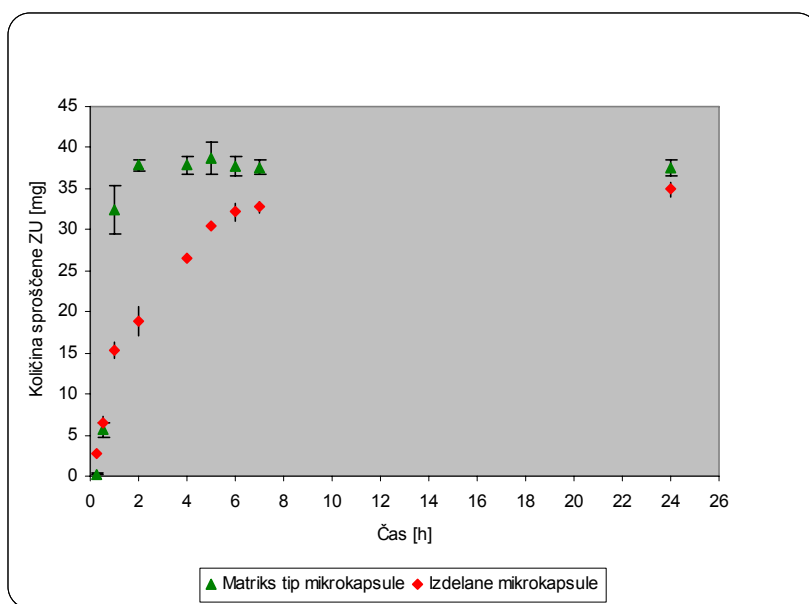


Slika 23: Test sproščanja NDS1 v prvi uri.

Čeprav v splošnem nizka, je količina sproščene ZU iz izdelanih mikrokapsul v prvih 15 min za 89,7% večja kot za ogrodni tip mikrokapsule. Tako ugotavljamo, da vgradnja slabo vodotopne ZU v SMES in izdelava mikrokapsul v začetnih časih izboljšata hitrost raztapljanja slabo vodotopne ZU.

V 30 min je količina sproščene ZU iz izdelanih mikrokapsul večja le še za 13,1%, v približno 31 min pa sta količini enaki. Če bi za topilo uporabili vodo, kjer je NDS1 zelo slabo topen, bi bila razlika v količini sproščene ZU še večja.

Dodatek 1% Na-lavrilsulfata zelo izboljša topnost NDS1, a hkrati tudi omogoči razpad mikrokapsul in s tem hitrejšo sprostitvev ZU. Ogrodni tip mikrokapsule so po 40 min raztapljanja popolnoma razpadle, kar se tudi odraža v profilu raztapljanja, saj po 120 min dosežemo največjo koncentracijo raztopljene učinkovine. Delci so se enakomerno porazdelili po volumnu medija za raztapljanje in tako je ZU pridobila večjo površino za raztapljanje. Izdelane mikrokapsule pa niso razpadle v celoti in so se kljub mešanju zadrževale na dnu posode zaradi česar je bilo raztapljanje ZU počasnejše, kar prikazuje tudi manjši naklon profila raztapljanja (Slika 24).



Slika 24: Test sproščanja NDS1 iz mikrokapsul v fosfatnem pufru (pH=7) z 1% Na-lavrilsulfata.

5 Sklep

Ovrednotili smo viskoznost ovojnih in jedrnih faz ter postavili okvirne vrednosti, pri katerih smo uspešnejše izdelali mikrokapsule. Mikrokapsuliranje je bilo uspešnejše, ko smo uporabili ovojno fazo z viskoznostjo od 220 do 300 mPa·s.

S poznavanjem gostot ovojne in jedrne faze smo poskušali optimirati položaj jedra v mikrokapsuli. Pri izdelavi smo uporabili ovojno in jedrno fazo z približno enakimi gostotami. Predvidevali smo, da bomo tako lahko izdelali mikrokapsule, ki bodo imela jedra na sredini. Vendar so se jedra kljub temu zadrževala na spodnji strani, kar je močno vplivalo na uspešnost mikrokapsuliranja.

DSC meritve alginatnih gelov z zdravilnimi učinkovinami smo uporabili za določitev intreakcij med posamezno zdravilno učinkovino in alginatno ovojnico.

Pri vrednotenju stabilnosti zdravilnih učinkovin v SMES-u smo ugotovili, da ima SMES velik vpliv na stabilnost učinkovin, zato je pri odločitvi za uporabo SMES-a za izdelavo mikrokapsul potrebno upoštevati stabilnost in kompatibilnost ZU s SMES-om.

Z enkapsulatorjem Inotech IE-50R smo izdelali mikrokapsule s samomikroemulgirajočimi lastnostmi. Za ovojno fazo smo uporabili 2,5% vodno raztopino natrijevega alginata s 15% laktoze. Z optimizacijo koncentracije alginata in laktoze smo uspeli izdelati mikrokapsule, ki so zadržale jedrno fazo. Čeprav je vsebnost laktoze zelo visoka, to v celoti ne prepreči iztekanje jedrne faze. Smiselno je, da se nadaljnje raziskave usmerijo v iskanje pomožnih snovi, ki bi bolj učinkovito zadrževale jedrno fazo in hkrati preprečevale mešanje jedrne in ovojne faze.

Jedrno fazo je sestavljal samomikroemulgirajoči sistem (SMES) nasičen z brezvodnimi CaCl_2 in suspendirano zdravilno učinkovino. Z dodatkom CaCl_2 smo omogočili takojšnje premreževanje alginatnih verig in s tem omejili mešanje ovojne in jedrne faze. Po padcu kapljice v premreževalno raztopino smo tako dosegli zadrževanje jedrne faze v mikrokapsuli in nastanek čvrstejšje alginatne ovojnice.

V mikrokapsule z NDS1 smo uspeli vgraditi 11,2% NDS1, v mikrokapsule z NDS2 pa 3,2% NDS2. Glede na to, da smo mikrokapsule izdelali pod enakimi pogoji, sklepamo, da na zadrževanje ZU v jedru vpliva velikost delcev ZU.

Za mikrokapsule z NDS1 smo izvedli test sproščanja ZU iz mikrokapsul. Za primerjavo smo izdelali ogrodni tip mikrokapsule iz alginata in NDS1. Ugotovili smo, da se je v prvih 15 min iz izdelanih mikrokapsul sprostilo 89,7% več NDS1 v primerjavi z ogrodnim tipom mikrokapsul. Kasneje se je sproščanje NDS1 iz mikrokapsul upočasnilo, saj so le-te počasneje razpadale v primerjavi z ogrodnim tipom mikrokapsul.

6 Literatura

1. Pouton CW: Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical sciences* 2006; 29: 278-287.
2. Neslihan GURSOY R, Benita S: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173-182.
3. Constantinides PP: Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical Research* 1995; 12 (11): 1561-1572.
4. Pouton CW: Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical sciences* 2000; 11: 93-98.
5. Pouton CW: Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 25: 47-58.
6. Kommuru TR, Gurley B, Khan MA, Reddy IK: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of Q₁₀: Formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 212: 233-246.
7. Baumgartner S, Gašperlin M, Ahlin P, Kristl J: Vaje iz farmacevtske tehnologije I. Katedra za farmacevtsko tehnologijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003.
8. Swarbrick J, Boylan JC: *Encyclopedia of pharmaceutical technology; Microemulsions*, Marcel Dekker, New York, 1994: 375-421.
9. Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO: Improved drug delivery using microemulsions: Rationale. Recent progress and new horizons. *Critical ReviewsTM In Therapeutic Drug Carrier Systems* 2001; 18 (1): 77-140.
10. Lawrence MJ, Rees GD: Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 45: 89-121.
11. Sirotti C, Coceani N, Colombo I, Grassi M, Lapasin R: Drug release from microemulsions: a peculiar case. In: *The 28th international symposium on controlled release of bioactive materials. San Diego 2001, Proceedings Book: #5139.*

12. Tenjarala S: Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications: Critical ReviewsTM In Therapeutic Drug Carrier Systems 1999; 16 (6): 461-521.
13. Trotta M, Gasco MR, Morel S: Release of drugs from oil-water microemulsions. Journal of Controlled Release 1989; 10: 237-243.
14. Vaje iz farmacevtske tehnologije. Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002: 20-25.
15. Swabrik J, Boylan JC: Encyclopedia of pharmaceutical technology: Microsphere technology and applications, Marcel Dekker, New York, 1994:1-23.
16. Bogataj M, Kristl A, Mrhar A, Kozjek F: Postopki priprave in kontrole mikrokapsul. Farmaceutski vestnik 1988; 39:239-252.
17. Bruneton J: Pharmacognosy Phytochemistry: Medicinal Plants, 2nd Ed, Lavosier Publishing Paris, 1999: 48-52.
18. Koch S, Scwinger C, Kressler J, Heinzen C, Rainov NG: Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: Comparison of production devices methods and microcapsule characteristics. Journal of Microencapsulation 2003; 20 (3): 303-331.
19. Instruction manual for the Inotech Encapsulator Research IE-50 R. 2002 Inotech Encapsulation AG, Dottikon, Switzerland.
20. Koch S, Scwinger C, Rainov NG, Kressler J, Jahnz U, Wittlich P: High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology. Journal of Microencapsulation 2002; 19 (3); 273-280.
21. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL: Development and optimization of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. International Journal of Pharmaceutics 2003; 259:57-68.
22. Loughlin JO, Lysaght M: Release of albumin from alginate microspheres. 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials 2001, San Diego, USA.
23. Bos GW, Crommelin DJA, Hennik WE, Verrijck R, Franssen O, Bezemer JM: Hidrogels for the controlled release of pharmaceutical proteins. Biopharm Europe 2001; 64-74.
24. Morch YA: Novel alginate microcapsules for cell therapy: A study of the structure-function relationship in native and structurally engineered alginates. Thesis. Norwegian University of Science and Technology, 2008.

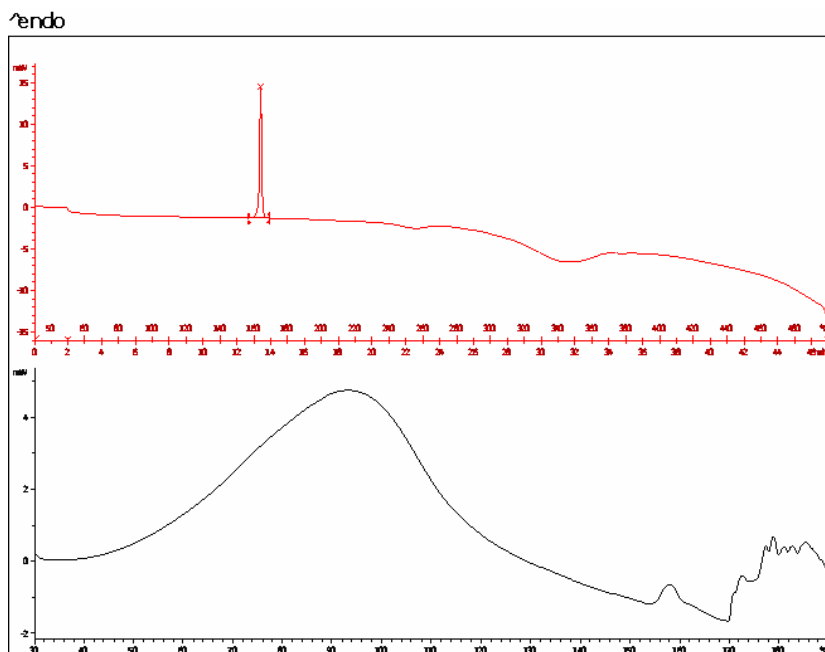
25. The Merck Index. 13thEd. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station. NJ. USA 2001
26. Kovač V, Krbavčič A: Alginatna vlakna in alginatne obloge kot sanitetni in obvezilni materiali. Farmaceutski vestnik 1999; 50: 41-52.
27. Kikuchi A, Kawabuchi M, Sugihara M, Sakurai Y, Okano T: Pulsed dextran release from calcium-alginate beads. Journal of Controlled Release 1997; 47 (1): 21-29.
28. Aslani P, Kennedy RA: Studies on-diffusion in alginate gels.I: Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. Journal of Controlled Release 1996; 42: 75-82.
29. Krajnc A: Vpliv procesnih spremenljivk na izdelavo mikrokapsul z lipofilnim jedrom na komercialnem enkapsulatorju IE-50R. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2004.
30. Bhardway TR, Kanwar M, Lal R, Gupta P: Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. Drug Development and Industrial Pharmacy 2000; 26 (10): 1025-1038.
31. Bombotz WR, Wee SF: Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 1998; 31: 267-285.
32. Homar M: Uporaba novih tehnologij za izdelavo mikrodolcev težko topnih zdravilnih učinkovin. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2007.

7 Priloga: DSC termogrami zdravilnih učinkovin in alginatnih gelov z zdravilnimi učinkovinami

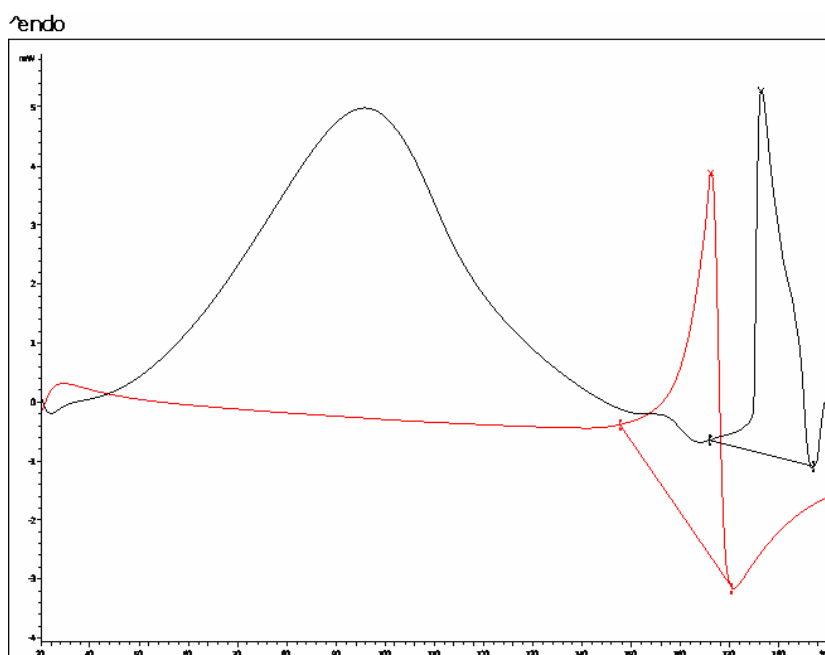
Rdeča krivulja – termogram ZU

Črna krivulja – termogram alginatnega gela z ZU

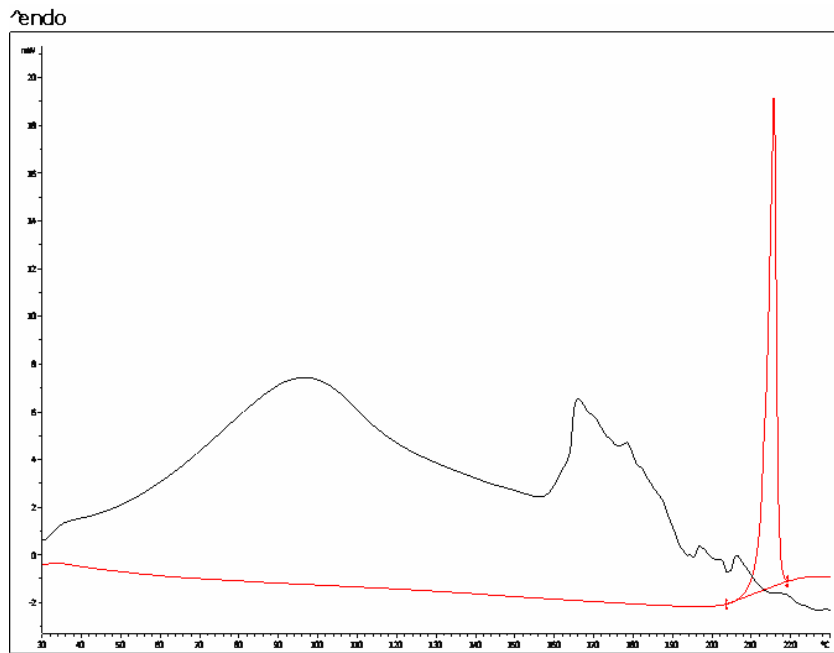
1. NDS1



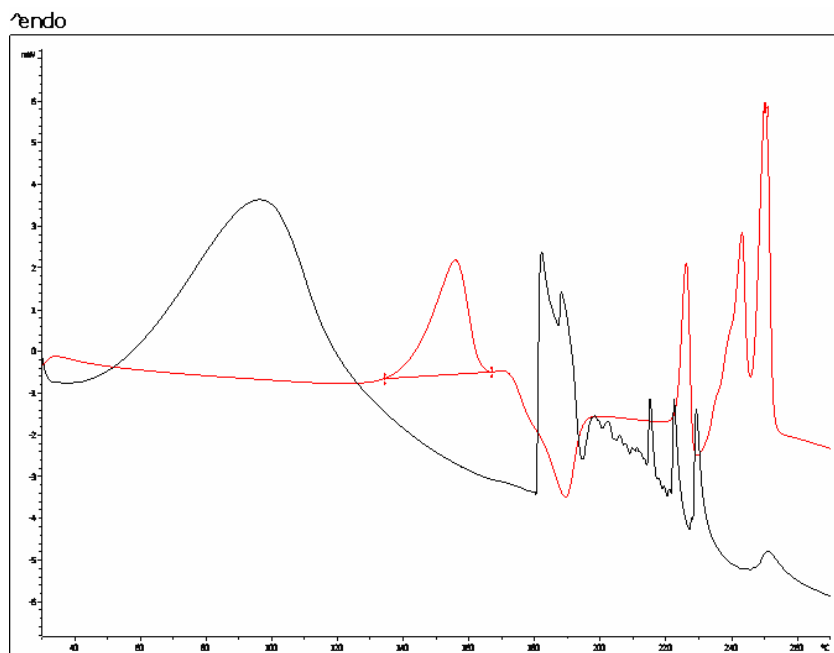
2. NDS2



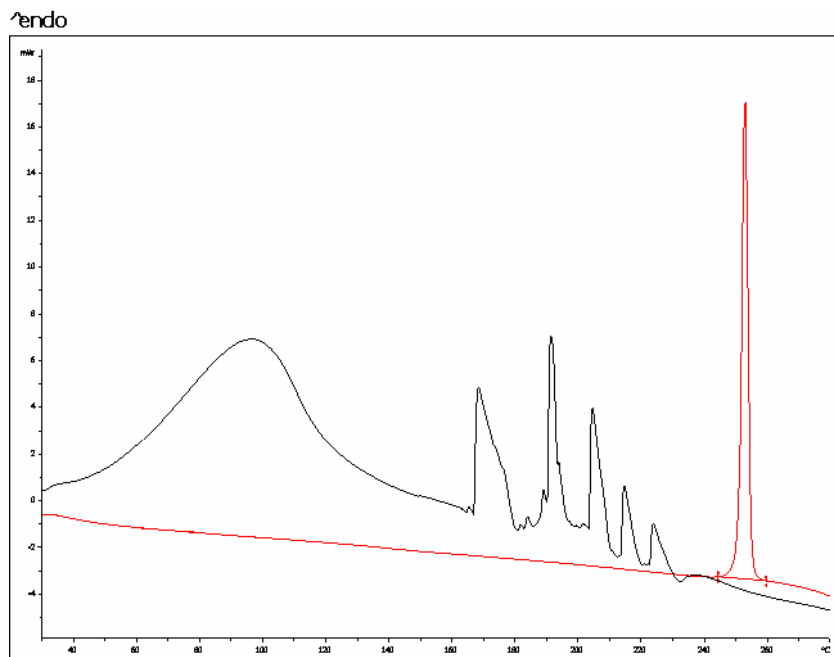
3. NDS4



4. NDS5



5. NDS6



6. Alginat

