

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



TADEJA KOVAČIČ

**VREDNOTENJE ALGINATNIH MIKROSFER IZDELANIH Z  
METODO IONOTROPNEGA GELIRANJA**

**EVALUATION OF ALGINATE MICROSPHERES PREPARED BY  
IONOTROPIC GELATION METHOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin in doc. dr. Saši Baumgartner za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi delavni mentorici Alenki Zvonar mag. farm. ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvala tudi moji družini in prijateljem za vso podporo in razumevanje v času dela v laboratoriju in celotnega študija.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin.**

Ljubljana, maj 2009

Predsednik diplomske komisije: zasl. prof. dr. Aleš Krbavčič

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

**KAZALO VSEBINE**

|  |            |
|--|------------|
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>  | <b>I</b>   |
| <b>POVZETEK.....</b>   | <b>III</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>1. UVOD .....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 MIKROSFERE .....   | 2          |
| 1.1.1 OGRODNA SNOV MIKROSFER .....   | 3          |
| 1.2 HIDROGELI.....   | 11         |
| 1.2.1 LASTNOSTI HIDROGELOV.....  | 11         |
| 1.3 MIKROKAPSULIRANJE .....  | 12         |
| 1.3.1 POMEN MIKROKAPSULIRANJA .....  | 13         |
| 1.3.2 METODE ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL .....   | 13         |
| 1.3.3 VREDNOTENJE MIKROKAPSUL .....  | 18         |
| 1.4 ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R.....  | 19         |
| 1.4.1 TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROSFER.....  | 20         |
| 1.4.2 SPLOŠNA PRAVILA IZDELAVE MIKROSFER .....   | 21         |
| 1.4.3 TEŽAVE PRI IZDELAVI MIKROSFER .....  | 22         |
| <b>2. NAMEN DELA .....</b>   | <b>23</b>  |
| <b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>  | <b>24</b>  |
| 3.1 MATERIALI .....  | 24         |
| 3.2 METODE.....  | 27         |
| 3.2.1 NAPRAVE IN PRIPOMOČKI, KI SMO JIH UPORABILI PRI IZDELAVI IN<br>VREDNOTENJU MIKROSFER ..... | 27         |
| 3.2.2 PRIPRAVA ALGINATNEGA MATRIKSA .....  | 28         |
| 3.2.3 PRIPRAVA ALGINATNEGA MATRIKSA S FUROSEMIDOM .....  | 28         |
| 3.2.4 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PREMREŽEVANJE .....   | 28         |
| 3.2.5 PRIPRAVA MEDIJA ZA TEST RAZTAPLJANJA .....   | 30         |
| 3.2.6 TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROSFER S FUROSEMIDOM KOT<br>MODELNO UČINKOVINO .....               | 30         |
| 3.2.7 TEST RAZTAPLJANJA.....   | 31         |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.8 DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE .....  | 33        |
| 3.2.9 ANALITIKA UČINKOVINE .....   | 34        |
| <b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1 VREDNOTENJE NABREKANJA IN EROZIJE ALGINATNIH MIKROSFER.....                        | 36        |
| 4.1.1 VPLIV DODANIH POMOŽNIH SNOVI (LAKTOZA IN NATRIJEV KLORID)                        | 36        |
| 4.1.2 VPLIV pH MEDIJA .....  | 42        |
| 4.2 VREDNOTENJE SPROŠČANJA FUROSEMIDA IZ ALGINATNIH MIKROSFER<br>.....                 | 50        |
| 4.2.1 VPLIV DODANIH POMOŽNIH SNOVI (LAKTOZA IN NATRIJEV KLORID)<br>NA SPROŠČANJE ..... | 50        |
| 4.2.2 VPLIV pH MEDIJA IN PREMREŽEVALNIH KATIONOV NA SPROŠČANJE.                        | 53        |
| <b>5. SKLEPI .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>   | <b>60</b> |

## POVZETEK

Mikrosfere so majhni, trdni in okrogli delci, običajno veliki od  $10^{-6}$  m do  $10^{-3}$  m. Zdravilna učinkovina, ki jo mikrokapsuliramo, je enakomerno razporejena po celotnem volumnu ogrodne snovi mikrosfer. Ogrodno snov največkrat predstavljajo naravni ali sintezni polimeri, ki omogočajo nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine, hkrati pa le-to ščitijo pred vplivi okolja.

Namen eksperimentalnega dela diplomske naloge je bil izdelati čvrste in mehansko odporne mikrosfere. Mikrosfere smo izdelali z enkapsulatorjem Inotech IE-50 R in sicer z metodo vibrirajoče membrane. Uporabili smo princip kapljalne metode, ki temelji na enakomernem trganju kapljic od šobe, hitrost nastajanja kapljic pa je bistveno počasnejša kot pri razprševanju laminarnega curka. Pri delu smo uporabili enokanalno koncentrično šobo s premerom 500  $\mu\text{m}$ .

Na začetku izdelave mikrosfer smo najprej določili nastavitve enkapsulatorja pri katerih nastanejo čvrste in mehansko odporne mikrosfere. Nato smo izdelali dve seriji mikrosfer, pri čemer so mikrosfere prve serije vsebovale samo 1,5% natrijevega alginata, drugi seriji pa smo dodali tudi pomožne snovi (5% laktoze in 1% NaCl). Ker se je izkazalo, da pomožne snovi povečajo nabrekanje in sproščanje modelne učinkovine iz alginatnega ogrodja, smo nadaljne raziskave naredili na ogrodju z dodano laktozo in NaCl. Tako smo pri konstantni sestavi ogrodne snovi (1,5% vodna raztopina natrijevega alginata s 5% laktoze in 1% NaCl) spremljali vpliv koncentracije in vrste polivalentnih kationov (0,3M  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,3M  $\text{Al}^{3+}$ , 0,3M  $\text{Cu}^{2+}$ , 0,3M  $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  in 0,3M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni + 1% hitosan), ki so povzročili takojšnje premreženje alginatnih verig, na nabrekanje in erozijo mikrosfer v treh različnih medijih (vodna raztopina HCl s pH = 3, prečiščena voda s pH = 5,5 in fosfatni pufer s pH = 6,8).

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo s testom raztapljanja in UV/VIS spektrofotometrično določali količino sproščenega furosemida iz mikrosfer, ki smo ga predhodno enakomerno suspendirali v celoten volumen ogrodne snovi. Sproščanje furosemida smo prav tako kot nabrekanje in erozijo izvajali v vodni raztopini HCl, prečiščeni vodi in fosfatnem pufru.

Ugotovili smo, da s spreminjanjem različnih parametrov (medij, dodatek pomožnih snovi in vrsta premreževalnega iona) vplivamo na nabrekanje, erozijo alginatnih mikrosfer ter na sproščanje učinkovine iz le-teh. Dodatek pomožnih snovi (laktoza in NaCl) poveča

poroznost ogrodja in s tem posledično nabrekanje in sproščanje furosemida, prav tako fosfatni pufer, v katerem alginat razpade in se po določenem času popolnoma raztopi. Med nabrekanjem, erozijo in sproščanjem učinkovine v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi pa ni bistvene razlike. Razlike v eroziji so tako majhne, da nimajo velikega vpliva na sproščanje učinkovine. Različni premreževalni kationi vplivajo tako na nabrekanje in erozijo, kot tudi na delež sproščene učinkovine. V kislem mediju in prečiščeni vodi izkazujejo podoben trend, medtem ko fosfatni pufer poveča hitrost sproščanja in delež sproščene furosemida. Povečana koncentracija premreževalnega iona zadrži nabrekanje in sproščanje učinkovine, prav tako ioni, ki imajo večjo afiniteto do alginatnih verig in tisti, ki premrežujejo alginat na različnih mestih. Tudi dodatna hitosanska ovojnica zadrži difuzijo učinkovine v okolico, medtem ko trivalentni kationi za razliko od dvovalentnih, tvorijo triplastno premreženje, kar ima za posledico nastanek zelo čvrstega gela, ki manj nabreka, poleg tega pa prav tako zadrži sproščanje učinkovine.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da ima največji vpliv na nabrekanje in sproščanje furosemida iz alginatnega ogrodja pH medij, znotraj tega pa tudi valenca, vrsta in koncentracija premreževalnega iona.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

|            |  |
|------------|--|
| BCS        | biofarmaceutski klasifikacijski sistem       |
| d          | premer                                       |
| E          | erozija                                      |
| G          | $\alpha$ -L-guluronska kislina               |
| GI         | gastrointestinalni                           |
| GIT        | gastrointestinalni trakt                     |
| M          | $\beta$ -D-manuronske kisline                |
| PLGA       | kopolimer polimlečne in poliglikolne kisline |
| S          | nabrekanje                                   |
| $S_{\max}$ | maksimalna topnost zdravilne učinkovine      |
| t          | čas  |

## 1. UVOD

Peroralne farmacevtske oblike so zaradi enostavne uporabe, varnosti in učinkovitosti še vedno najbolj zaželeni obliki aplikacije zdravila. Na tržišču se pojavljajo vedno nove zdravilne učinkovine, ki zaradi najrazličnejših razlogov niso primerne za vgradnjo v že obstoječe farmacevtske oblike, zato je razvoj novih oblik, kot so pelete, mikrosfere in mikrokapsule nujno potreben.

Po biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu (BCS) lahko razdelimo zdravilne učinkovine glede na biofarmacevtske lastnosti v štiri razrede:

razred I: dobro topne učinkovine, ki dobro prehajajo membrane;

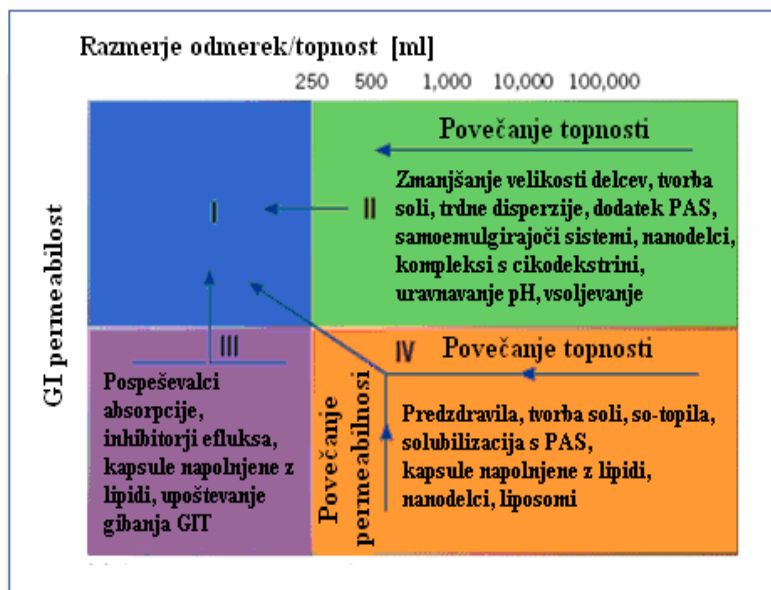
razred II: slabo topne učinkovine, ki dobro prehajajo membrane;

razred III: dobro topne učinkovine, ki slabo prehajajo membrane;

razred IV: slabo topne učinkovine, ki slabo prehajajo membrane (1).

Najnovejše raziskave so pokazale, da skoraj 40% novo odkritih potencialnih zdravilnih učinkovin zaradi nizke topnosti v vodnem mediju (manj kot 1  $\mu\text{g/mL}$ ) in/ali slabega prehoda skozi membrane po BCS spada v II, III ali celo IV razred. Zaradi omenjenih lastnosti je peroralni vnos le-teh velik izziv za razvoj novih postopkov izdelave, s katerimi lahko obidemo slabe lastnosti učinkovin kot sta slaba topnost in majhen obseg absorpcije iz GIT. Topnost zdravilnih učinkovin lahko izboljšamo s fizikalno modifikacijo, kar pomeni, da npr. zmanjšamo velikost delcev. Pomagamo si lahko tudi s kemijsko modifikacijo zdravilne učinkovine npr. tvorbo soli, estrov ali pa z razvojem ustrezne farmacevtske oblike, s čimer se ukvarja področje farmacevtske tehnologije. Prehajanje zdravilnih učinkovin skozi sluznico izboljšamo z dodatkom pospeševalcev absorpcije ali inhibitorjev efluksa (v primeru, da predstavljajo njihov substrat). Poleg teh dveh pristopov si lahko tudi tu pomagamo z razvijanjem ustrezne farmacevtske oblike (*slika 1*). Za povečanje hitrosti raztapljanja učinkovine *in vitro* lahko tako uporabimo npr. mikrometrski dostavne sisteme, kot so mikrosfere, mikrokapsule in mikropelete. Splošno je znano, da povečana hitrost raztapljanja sama po sebi ne vodi tudi v povečano biološko uporabnost. Izdelava mikrododelcev s hidrofiličnimi polimeri pa v večini poleg povečanja hitrosti raztapljanja v vodi poveča tudi biološko uporabnost, kar je razlog, da se kot ogrodni sistemi za izdelavo mikrododelcev pogosto uporabljajo hidrogeli (2).





*Slika 1: Možnosti za izboljšanje biološke uporabnosti zdravilnih učinkovin s slabimi biofarmaceutskimi lastnostmi (1).*

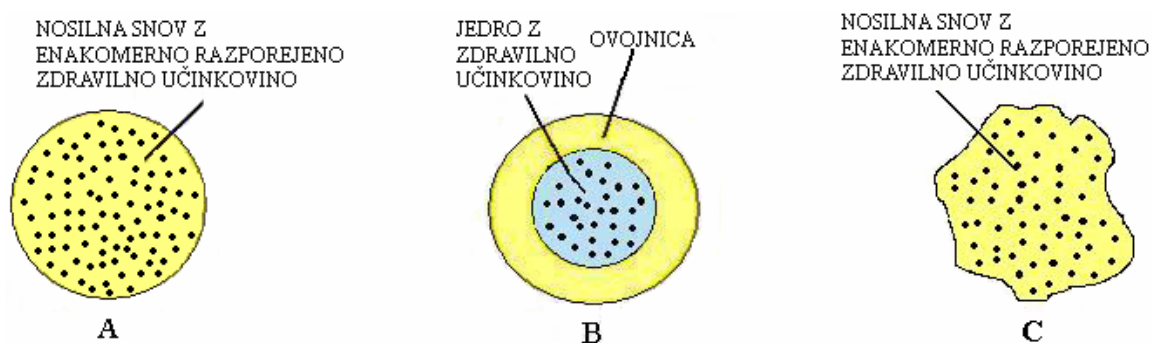
## 1.1 MIKROSFERE

Pojem mikrosfere se v literaturi ne pojavlja vedno povsem dosledno. V uporabi so izrazi, kot so mikrodelci, mikrosfere in mikrokapsule, med katerimi je včasih zelo težko točno ločiti za katero farmacevtsko obliko pravzaprav gre, čeprav so vsi izrazi po definiciji jasno ločeni. Kljub nedoslednosti v poimenovanju pa v grobem velja, da se izraz mikrokapsule uporablja za vse tri oblike delcev (mikrosfere, mikrokapsule in mikrodelce), kar označuje delce mikrometrskih velikosti, sestavljenih iz snovi, ki jo mikrokapsuliramo in ogrodne snovi, ne glede na notranjo zgradbo in obliko delcev.

Tako glede na obliko in notranjo zgradbo ločimo tri vrste mikrodelcev (*slika 2*):

- *mikrosfere oz. ogrodni tip mikrokapsul*: majhni, trdni delci okroglih oblik, katerih velikost se giblje med  $10^{-6}$  m in  $10^{-3}$  m, kjer sta mikrokapsulirana in ogrodna snov enakomerno razporejeni po celotnem volumnu mikrodelca;
- *mikrokapsule v ožjem pomenu besede oz. filmski tip mikrokapsul*: majhni, trdni delci okroglih oblik, katerih velikost se giblje med  $10^{-6}$  m in  $10^{-3}$  m, kjer sta ovojnica in jedro z mikrokapsulirano snovjo povsem ločena;

- *mikrodelce*: majhni delci nepravilnih oblik, katerih velikost se giblje med  $10^{-6}$  m in  $10^{-3}$  m, kjer sta mikrokapsulirana in ogrodna snov enakomerno razporejeni po celotnem volumnu mikrodelca (3, 4).



**Slika 2:** Shematski prikaz mikrosfere (A), mikrokapsule (B) in mikrodelca (C).

### 1.1.1 OGRODNA SNOV MIKROSFER

Uspešnost postopka mikrokapsuliranja in nastanek čvrstih mikrosfer sta v veliki meri odvisna od izbire ustrezne ogrodne snovi, zato so lastnosti slednje ključnega pomena. Ogrodje je običajno polprepustno, tako da omogoča nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine, hkrati pa zdravilno učinkovino, ki je enakomerno razporejena po celotnem ogrodju, varuje pred vplivi okolja (5). Najpogosteje uporabljene snovi so naravni in sintezni polimeri (preglednica I), poleg njih pa tudi različni proteini, voski in lipidi (6). Sintezni polimeri so kemijsko stabilni, poleg tega pa lahko njihovo zgradbo in strukturo prilagajamo glede na potrebe. Ne glede na to pa je v farmacevtski industriji še vedno v ospredju uporaba naravnih polimerov, ker so le-ti biokompatibilni in nizko ali pa celo netoksični (7).

**Preglednica I:** Polimeri, ki gradijo ogrodje mikrosfer (6).

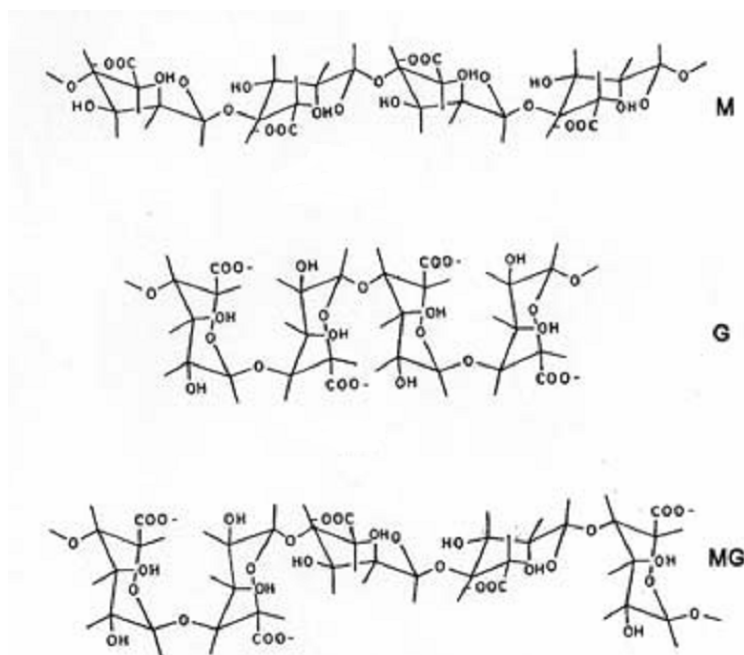
| NARAVNI POLIMERI |              | SINTEZNI POLIMERI    |  |
|------------------|--------------|----------------------|--|
| PROTEINI         | POLISAHARIDI | BIORAZGRADLJIVI      | NEBIORAZGRADLJIVI                        |
| želatina         | alginat      | polimlečna kislina   | metil metakrilat                         |
| albumin          | karagenani   | poliglikolna kislina | hidroksietil metakrilat-metil metakrilat |
|                  | gelan        | kopolimeri (PLGA)    |  |
|                  | pektin       |                      |  |

V nadaljevanju sta podrobneje predstavljena dva polimera in sicer natrijev alginat in hitosan, ki smo ju v diplomski nalogi uporabili kot ogrodno snov za izdelavo mikrosfer.

### *Alginska kislina in alginati*

Alginska kislina je naravni polisaharid, ki se v glavnem nahaja v različnih vrstah rjavih alg (*Phaeophyta*), večinoma v celičnih stenah in intercelularnih prostorih v obliki kalcijevih, magnezijevih, barijevih, natrijevih, stroncijevih in kalijevih soli (8, 9, 10, 11). Količina alginata lahko dosega tudi do 40% vsebnosti alg in variira znotraj posameznih vrst in med različnimi deli rastlin. V industriji se alginat zaradi sposobnosti zadrževanja vode uporablja kot gelirno sredstvo ter sredstvo za povečanje viskoznosti in stabilnosti sistema. V farmaciji se alginska kislina ter natrijev in magnezijev alginat uporabljajo skupaj z antacidi in H<sub>2</sub>-receptorskimi antagonisti za zdravljenje gastroezofagalnega refluxa, medtem ko se kalcijev in natrijev alginat v obliki hemostatskih gaz uporabljata za zaustavljanje krvavitev in pospeševanje celjenja ran (10, 12).

Alginska kislina je kemijsko gledano linearni polimer, sestavljen iz dveh monomernih enot, ki ju predstavljata uronski kislini  $\alpha$ -L-guluronska kislina (G) in  $\beta$ -D-manuronska kislina (M), povezani z  $\alpha$  ali  $\beta$ -(1,4) glikozidno vezjo (8, 13, 14). Kislini sestavljata homogene poli-G in poli-M bloke, ki so med seboj ločeni s predeli, kjer se G in M monomerni enoti izmenjujeta (*slika 3*) (10, 11, 13).



**Slika 3:** *Strutura polimanuronskega (M) in poliguluronskega (G) bloka alginata ter bloka, kjer se manuronska in guluronska kislina izmenjujeta (MG) (8).*

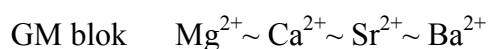
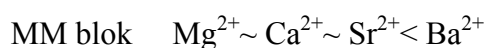
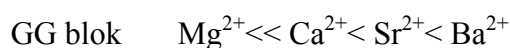
### Fizikalne lastnosti alginata

Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave makromolekule, pri čemer je pomembno razmerje med monomernimi enotami in dolžinami posameznih blokov. Slednje je odvisno od vrste organizma in dela alge, iz katerega se alginat pridobiva, pa tudi od rastišča in letnega časa žetve (8). V primeru, da ima makromolekula pravo kemično sestavo in molekulsko maso, je alginat primeren za industrijsko uporabo (10).

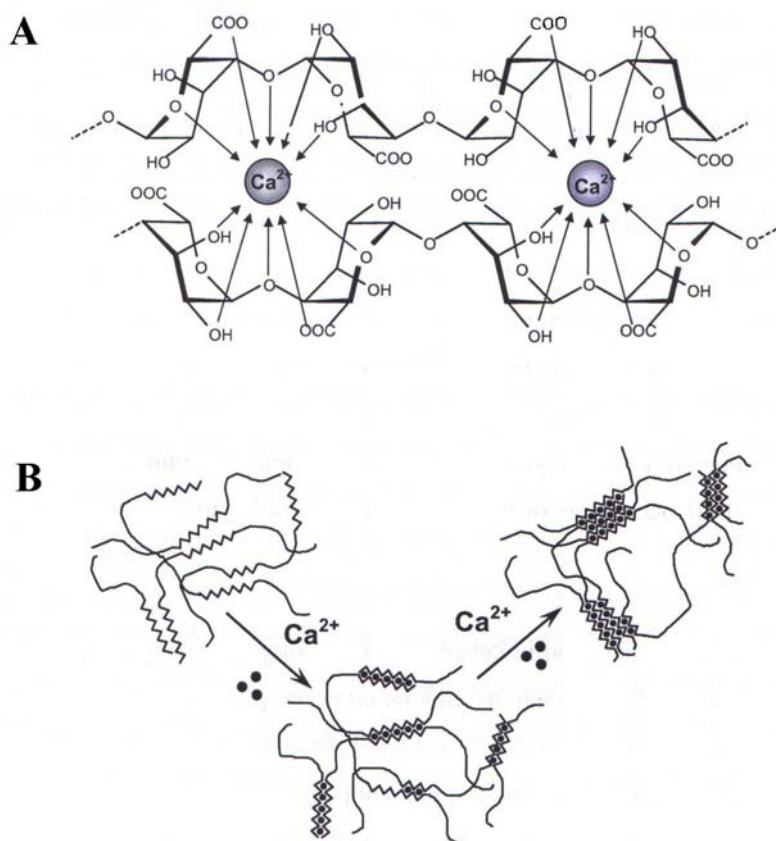
V nadaljevanju so predstavljene lastnosti alginata, ki so pomembne za razvoj novih farmacevtskih oblik:

- *premreževanje*

Večina alginatov se danes uporablja v obliki ionotropnih gelov. To pomeni, da so polimerne molekule alginata premrežene z najrazličnejšimi večvalentnimi kationi, kot so  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  in  $\text{Sr}^{2+}$  (10). Ostali divalentni kationi, kot so  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  in  $\text{Mn}^{2+}$  prav tako premrežijo alginatni gel, vendar se jih zaradi njihove toksičnosti uporablja v manjših koncentracijah (11). Vezava ionov na polimer in njihova afiniteta sta odvisni predvsem od sestave alginske kisline. Afiniteta alginata do zemljoalkalijskih kovin raste v naslednjem vrstnem redu:  $\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ , vendar pa je to odvisno od strukture polimera. Nadaljne raziskave so pokazale, da selektivnost narašča z večjo vsebnostjo G monomernih enot, medtem ko pri višji vsebnosti G in M enot to ni izraženo (10, 11).



Visoka selektivnost med podobnimi ioni kaže, da povezave med alginatom in omenjenimi ioni niso samo elektrostatske. Ta mehanizem je pojasnjen s t.i. modelom »škafle za jajca« (slika 4), kjer biaksialno povezani G bloki predstavljajo ogrodje, vmes pa so prostori, kamor se ujamejo dvovalentni kationi kot jajca v »škafli za jajca« (10, 11).



**Slika 4:** Shematski prikaz nastanka ionotropnega gela z modelom »škatle za jajca« (8, 10)  
– A predstavlja kelacijo dvovalentnega kationa, B pa stransko povezavo alginatnih verig.

- *viskoznost*

Viskoznost alginatnih raztopin je odvisna predvsem od molekulske mase ter koncentracije raztopine alginata. Poleg tega pa na viskoznost vpliva tudi raznolikost intrinzične fleksibilnosti posameznih blokov polimerne verige, pri čemer igra pomembno vlogo naboj funkcionalnih skupin. V primeru, da je alginatna veriga nabita pretežno negativno, se bo viskoznost raztopine povečala zaradi težnje molekule v naključno zvito obliko. Raziskave so pokazale, da je intrinzična viskoznost alginatnih raztopin linearno odvisna od števila in jakosti ionskih sil v raztopini. Prav tako pa se viskoznost raztopin povečuje z naraščanjem molekulske mase polimera, vendar smo pri uporabi le-teh omejeni, kajti raztopine s preveliko viskoznostjo je, v primeru zahteve po sterilnem materialu, težko sterilno filtrirati (10).

- *topnost*

Natrijev alginat in večina soli alginske kisline z enovalentnimi kationi ( $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) je dobro topnih v vodi in tvorijo viskozne koloidne raztopine s psevdoplastičnimi lastnostmi. Ob stiku z dvovalentnimi kovinskimi kationi ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ , razen  $Mg^{2+}$ ) pa nastane elastičen gel, ki je v vodi netopen. Pomemben parameter, ki vpliva na topnost polimera v vodi, je pH. Ta ima vpliv na elektrostatski naboj na uronskih kislinah. Alginska kislina ima polianionski značaj in je v protonirani obliki praktično netopna v vodi, tvori pa gele ali precipitate. V vodotopno sol se pretvori pri dvigu pH vrednosti medija nad 3, popolna nevtralizacija pa nastopi pri vrednosti  $pH = 4$ . Določeni sta  $pK_a$  vrednosti dveh monomernih enot in sicer 3,38 za M in 3,65 za G monomer v 0,1M NaCl. V primeru večjega števila G monomerov se tudi vrednost  $pK_a$  polimera povečuje (10).

### Alginatni geli

Alginska kislina se v vodi nahaja v neionizirani obliki in je v njej netopna, medtem ko je topnost njenih soli odvisna od vrste prisotnih kationov ter vrednosti pH medija (8). Alginatni gel je, tako kot večina ostalih biokompatibilnih gelov, neprekinjena, v vodi nabrekla mreža polimera. Posamezni deli mreže so med seboj povezani z nekovalentnimi vezmi. Lastnosti alginatnega gela so odvisne od parametrov, kot so kemična sestava, zaporedje in molekulska masa. Alginat tvori dve vrsti gelov in sicer ionotropni in kislinski gel.

### *Ionotropni gel*

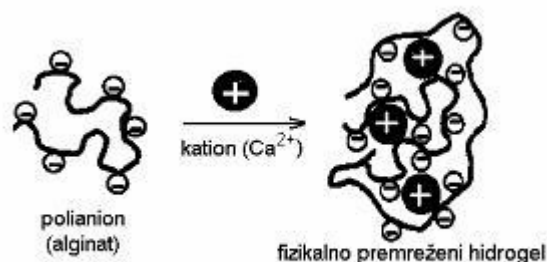
Nastane z interakcijo večvalentnih kationov (najpogosteje so to  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ) in polimernih verig alginata. Pri tvorbi te vrste gela so izjema soli  $Mg^{2+}$  ionov, ki v vodi tvorijo viskozne koloidne raztopine; enako se zgodi tudi v prisotnosti monovalentnih ionov, zato ti ioni niso primerni za tvorbo gela. Pri postopku ionotropnega geliranja pride do izmenjave natrijevih ionov iz soli guluronskih kislin z večvalentnimi ioni npr.  $Ca^{2+}$ , ki povežejo posamezne bloke guluronskih kislin in s tem povzročijo njihovo preureditev v urejeno tridimenzionalno strukturo, ki je še dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi. Ta oblika navidezno spominja na model »škafle za jajca« (slika 4). V tem primeru so za tvorbo gela pomembni le poliguluronski bloki makromolekule, ki imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v karboksilnih in hidroksilnih skupinah večjo afiniteto do

večvalentnih kationov. Poleg elektrostatskih interakcij so v strukturi ionotropnega gela prisotne tudi koordinacijske interakcije, v katerih večvalentni kationi predstavljajo kelatne centre (8).

Lastnosti ionotropnega gela so odvisne tako od lastnosti alginata kot tudi od lastnosti premreževalnega kationa. Kemijska sestava alginata vpliva na stabilnost, odpornost na erozijo in poroznost alginatnega gela. Višji kot je delež G enot, bolj stabilen, odporen na erozijo in porozen je gel in obratno, višji kot je delež M enot, bolj elastičen, manj odporen na erozijo in manj porozen je gel. Tako kot kemijska sestava, tudi molekulska masa in zaporedje monomernih enot vplivata na lastnosti gela. Pod določeno molekulsko maso je sposobnost geliranja omejena, medtem ko je nad molekulsko maso  $2,4 \cdot 10^5$  Da jakost gela odvisna prav od slednje. Afiniteta do premreževanja je odvisna od števila in dolžine G blokov. Alginat z daljšimi in številčnejšimi G bloki ima večjo afiniteto do premreževanja, kar pomeni, da afiniteta do premreževanja narašča v naslednjem vrstnem redu:  $MM < MG < GG$ .

Število MM, GG in GM blokov pa vpliva tudi na jakost gela in sicer narašča v naslednjem zaporedju:  $MG < MM < GG$ , kar lahko razložimo s povezavami med monomernimi G in M enotami. GG bloki se povezujejo z  $\alpha$ -(1,4) glikozidno vezjo in tvorijo zaprto in manj fleksibilno strukturo, medtem ko se MM bloki povezujejo z  $\beta$ -(1,4) glikozidno vezjo, pri čemer dobi veriga strukturo podobno ravnemu traku, ki ji omogoča večjo fleksibilnost. Pri GM povezavi pa polimerna veriga izgubi običajno linearno strukturo in spremeni svojo smer v GM stiku, kar zmanjša togost bloka (8).

Poleg lastnosti alginata pa na lastnosti gela vplivajo tudi lastnosti premreževalnega kationa. Pri monovalentnih kationih geliranje ne poteče, medtem ko afiniteta dvovalentnih kationov do alginata pada v naslednjem vrstnem redu:  $Cd^{2+} > Ba^{2+} > Cu^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ . Pri tem je pomembno to, da ioni z večjo afiniteto tvorijo bolj čvrst gel z grobo in nagubano površino; premreževanje s trivalentnimi kationi pa poteče v treh plasteh. Poleg valence na lastnost premreževalnega kationa vpliva tudi velikost oz. premer iona. Ioni z večjim premerom zapolnijo večji prostor med alginatnimi verigami, tako nastane stabilnejši gel, vendar pa le-ta manj nabreka (8). Velikost premreževalnih kationov pada v naslednjem vrstnem redu:  $Ca^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Al^{3+}$ .



**Slika 5:** Nastanek hidrogela s premreževanjem: alginska kislina s kalcijevim kloridom (15).

### *Kislinski gel*

Nastane v primeru zniževanja pH raztopine alginata pod pKa guluronske (pKa = 3,65) in manuronske (pKa = 3,38) kisline. Pod takimi pogoji preide raztopina alginata iz sol stanja v gel stanje, t.i. kislinski gel pa je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Poleg končne vrednosti pH raztopine je pomembna tudi hitrost zniževanja pH-ja. V kolikor je le-ta previsoka, se alginska kislina izobori, zato je za nastanek kislinskega gela potrebno pH nižati počasi. Glavni gradniki tega gela so poliguluronski odseki, vendar pa k tvorbi gela nekoliko prispevajo tudi polimanuronski deli. Višji kot je delež guluronskih odsekov, močnejši gel nastane (8).

### Prednosti uporabe alginatov pri izdelavi mikrosfer:

- alginati so netoksični, biorazgradljivi in imajo zaščitni učinek na sluznico zgornjega prebavnega trakta;
- posušene mikrosfere lahko ponovno nabrekajo, zato jih lahko uporabljamo v sistemih za nadzorovano sproščanje;
- sposobnost nabrekanja je odvisna od pH okolja, zato lahko kapsuliramo zdravilne učinkovine občutljive na želodčno kislino (16, 17).

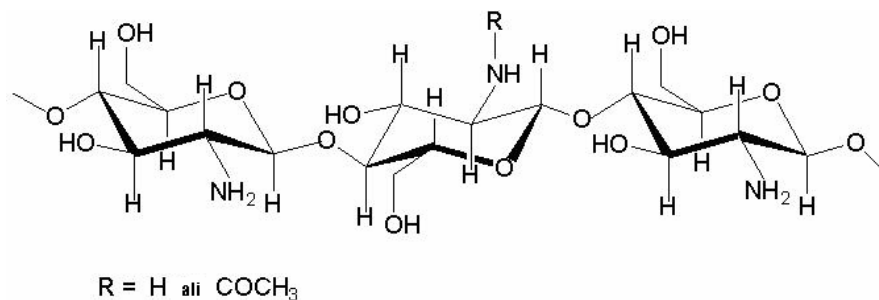
### **Hitosan**

Hitosan je kemijsko gledano linearni kopolimer enot glukozamina in N-acetilglukozamina, povezan z  $\beta$ -(1,4) glikozidnimi vezmi (slika 6).

Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem polisaharida hitina, ki je sestavljen iz N-acetilglukozaminskih enot. Ima visoko molekularno maso ( $10^4$  do  $10^6$  g/mol); slednja je odvisna od deacetilacije. V naravi najdemo hitin v oklepih rakov, školjk in drugih

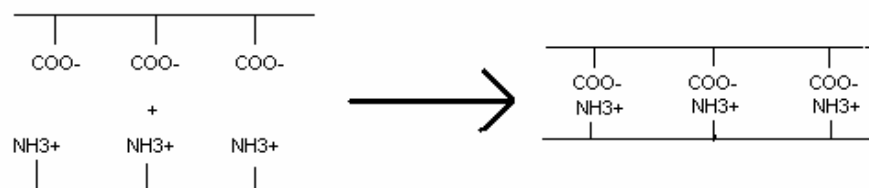


lupinarjev, nahaja pa se tudi v nekaterih insektih in gobah. Pri fizioloških pogojih in v alkalnih vodnih raztopinah je hitosan zaradi proste aminske skupine popolnoma netopen. V kislih raztopinah pa se aminske skupine glukozamina protonirajo, zato se hitosan v njih lahko raztopi. Zaradi omenjenih lastnosti za pripravo raztopine hitosana običajno uporabljamo od 1% do 3% raztopino očetne kisline (lahko tudi HCl) (18). Veriga hitosana je tako pozitivno nabita, zato se lahko povezuje z mnogimi polianioni, kot so pektin, heparin, alginat, karboksimetilceluloza, ksantan idr (*slika 7*) (7, 19).



*Slika 6: Struktura hitosana (20).*

Hitosan odlikujejo mnoge prednosti, kar povečuje njegovo uporabo na področju farmacije, predvsem pri razvoju mikro in nanotehnologije. Številne proste aminske skupine sodelujejo pri premreževanju polimera, obenem pa omogočajo tvorbo kompleksov med hitosanom in anionskimi polimeri ter adhezijo na črevesno sluznico. Izdelamo lahko farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem (19, 21).



*Slika 7: Shema nastanka kompleksa med anionskim in kationskim polimerom (21).*

## 1.2 HIDROGELI

Hidrogeli so polimerne verige, ki tvorijo koherentno tridimenzionalno rešetko, v kateri je imobilizirana tekoča faza. V vodnem okolju nabrekajo, ne da bi se pri tem raztopili, vodo pa so v svoji strukturi sposobni tudi zadržati (22, 23, 24). V grobem jih opišemo kot dvokomponentne sisteme, pri čemer je prva komponenta hidrofilna, netopna, tridimenzionalna mreža polimera, druga komponenta pa je voda. Hidrofilno naravo hidrogelov omogočajo polarne funkcionalne skupine, kot so -COOH, -OH, -CONH-, -CONH<sub>2</sub>, -HSO<sub>3</sub>, ki so razporejene vzdolž polimernih verig. Netopnost v vodi je posledica kemijskih (ireverzibilni hidrogeli) in fizikalnih (reverzibilni hidrogeli) premreženj med polimernimi verigami (24, 25). Povezava med polimernimi verigami je pri kemijskih premreženjih kovalentne narave, pri fizikalnih pa so verige med seboj povezane s šibkimi van der Waalsovimi, ionskimi, hidrofobnimi ali vodikovimi vezmi (24).

Zaradi imobiliziranja tekoče faze v koherentni tridimenzionalni rešetki polimera imajo hidrogeli tudi določene lastnosti tekočin. Glede na lastnosti ujete vode v hidrogelu ločimo dve vrsti vod in sicer vezano in prosto. Vezana voda je tista, ki se z močnimi interakcijami veže na hidrofilne funkcionalne skupine polimernih molekul, prosta pa tista, ki jo hidrogel zaradi spremembe v osmolarnosti znotraj in zunaj gela dodatno vsrka vase. Vmesne prostore med polimernimi verigami tako zapolni prosta voda, v kateri lahko molekule prosto difundirajo, prav tako pa je na razpolago za raztapljanje hidrofilnih snovi. Na raztapljanje in difuzijo snovi skozi hidrogel vplivata delež vode v hidrogelu in razmerje med vezano in prosto vodo. Običajno velja pravilo, da se s povečevanjem deleža vezane vode zmanjšuje delež vode, ki je na razpolago za raztapljanje zdravilne učinkovine in za njeno difuzijo skozi gel (15).

### 1.2.1 LASTNOSTI HIDROGELOV

Izbira monomernih enot in povezave med izbranimi enotami določajo končne lastnosti hidrogelov, ki se odražajo v stopnji hidratacije t.i. stopnji nabrekanja, mehanskih lastnostih, permeabilnosti in biokompatibilnosti. Med vsemi naštetimi lastnostmi je najpomembnejša lastnost, zaradi katere hidrokele uporabljamo v farmacevtski tehnologiji, nabrekanje, ki predstavlja razmerje med maso vezanega hidratacijskega medija ter maso suhega hidrogela (*enačba 3*) (25).

Vsebnost absorbirane vode ali vodne raztopine, ki predstavlja hidratacijski medij, je odvisna predvsem od narave monomernih enot ter vrste in jakosti premreženja. Večja kot je stopnja premreženja in močnejše kot so sile, manj vode se bo absorbiralo in posledično bo stopnja nabrekanja nižja. Stopnja nabrekanja nekaterih hidrogelov je odvisna tudi od temperature hidratacijskega medija, kar pomeni, da je za določeno stopnjo nabrekanja potrebna točno določena temperatura. Takšne hidrokele imenujemo toplotno odvisni hidrogeli. Obstajajo tudi hidrogeli, ki so občutljivi na pH hidratacijskega medija in se nahajajo v nevtralni ali ionski obliki. To pomeni, da je za določeno stopnjo nabrekanja potreben optimalni pH, ki je odvisen tako od ionizacije funkcionalnih skupin kot tudi ionskih sil, ki so odvisne od pH okolja (22).

Druga pomembna lastnost hidrogelov so njihove mehanske lastnosti. V to skupino spadata elastičnost in viskoelastičnost. Obe lastnosti temeljita na časovno odvisnem/neodvisnem vračanju posameznih enot in celotne strukture v osnovno stanje.

Količina vode, ki je imobilizirana v polimernem matriksu hidrogela, vpliva na difuzibilne in permeabilnostne lastnosti hidrogela, poleg tega pa ima tudi velik vpliv na biokompatibilnost in mehanske lastnosti hidrogela. Večja količina v hidrogel absorbirane vode je povezana z manjšo mehansko odpornostjo le-tega, kar se odraža v znižani temperaturi steklastega prehoda sistema (temperatura pri kateri viskozni sistem preide v trdno in krhko steklasto stanje). Na to lastnost lahko vplivamo s postopkom kopolimerizacije s hidrofobnimi monomernimi enotami in prečnim premreževanjem polimernih verig, s čimer zmanjšamo absorptivno lastnost hidrogela (22, 25).

### **1.3 MIKROKAPSULIRANJE**

Mikrokapsuliranje je postopek izdelave delcev mikrometrskih velikosti sestavljenih iz zdravilne učinkovine in ogrodne snovi. Postopek se je začel uporabljati v 30-ih letih 20. stoletja in sicer je bil najprej namenjen izdelavi mikrokapsul v papirni industriji, ki so se uporabljale za izdelavo brezsajnega kopirnega papirja (3). V 70-ih letih prejšnjega stoletja pa se je izdelava mikrokapsul pojavila tudi v farmaciji, najprej za dostavo cepiv in protitumornih učinkovin, kasneje pa še v pripravkih za zdravljenje očesnih obolenj in v peroralnih farmacevtskih oblikah (26). Danes je področje mikrokapsuliranja precej razširjeno in se poleg farmacije uporablja tudi v biotehnologiji, kozmetični ter prehrabeni industriji, elektroniki, fotografiji, grafiki itd (3).

### 1.3.1 POMEN MIKROKAPSULIRANJA

Postopek mikrokapsuliranja omogoča fizično ločitev imobilizirane snovi od preostalega okolja tako, da imobilizirano snov obdamo z ovojnico (27). Kapsuliramo lahko najrazličnejše sisteme, od majhnih molekul pa vse do velikih, kot so zdravilne učinkovine, DNK, peptidi, pa tudi emulzije, trdni delci in žive celice (28). Tehnologija izdelave mikrodelcev je v farmaciji vedno bolj pogosta, ker postopek omogoča:

- združevanje več med seboj nekompatibilnih komponent v enem sistemu;
- zaščito zdravilne učinkovine;
- povečanje topnosti slabo topnih zdravilnih učinkovin;
- doseganje nadzorovanega sproščanja zdravilnih učinkovin;
- prekritje neprijetnega vonja in okusa zdravilnih učinkovin;
- spremembo agregatnega stanja (tekoče v trdno);
- povečanje mase ali volumna;
- zmanjšanje draženja želodčne sluznice;
- izboljšanje porazdelitve po GIT;
- povečanje biološke uporabnosti peptidnih učinkovin;
- doseganje dispergiranja hidrofobnih zdravilnih učinkovin v vodnem mediju;
- pripravo gastrorezistentnih in bioadhezivnih farmacevtskih oblik;
- vgradnjo celic (3, 7, 28, 29).

### 1.3.2 METODE ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL

Pomen mikrosfer in mikrokapsul na različnih področjih je vedno večji, zato so do danes razvili več različnih metod mikrokapsuliranja. Metode se med seboj sicer razlikujejo, vendar pa lahko v grobem pri vsaki metodi ločimo tri glavne korake, ki si vedno sledijo v istem vrstnem redu:

1. korak: vgradnja zdravilne učinkovine v sistem, ki je lahko v obliki raztopine, suspenzije ali emulzije in bo kasneje predstavljal ogrodje (matriks) mikrosfere oz. jedro mikrokapsule;

2. korak: izdelava mikrosfer oz. mikrokapsul;

- Kadar izhajamo iz tekočega matriksa, slednjega v tej fazi dispergiramo v zraku (s postopkom kapljanja ali razprševanja) ali v drugi tekočini (postopek emulgiranja ali mikroemulgiranja).

- Kadar izhajamo iz trdnega matriksa pa na gibajoče delce le-tega razpršujemo raztopino (oblaganje s *fluid bed* postopkom, aglomeriranje).

3. korak: stabilizacija izdelanih mikrosfer oz. mikrokapsul s fizikalnimi (sušenje, strjevanje), kemijskimi (polimerizacija) ali fizikalno-kemijskimi (geliranje, koacervacija) postopki (28).

Metode za izdelavo mikrokapsul delimo v štiri skupine:

1. Kemijske:

- polimerizacija na fazni meji oz. fazna polimerizacija;

Uporablja se za kapsuliranje tekočin, pri čemer uporabljamo dva različna monomera. Prvi monomer je raztopljen v notranji, drugi pa v zunanji fazi pripravljene emulzije. Reakcija poteka na stični površini obeh faz. Polimer, ki pri tem nastane, mora biti v obeh fazah netopen, saj samo tako lahko obda kapljice notranje faze (3, 4, 30).

- »in situ« polimerizacija;

Uporablja se za kapsuliranje trdnih ali tekočih jeder. Monomer in katalizator se lahko nahajata tako zunaj kot znotraj jedrnega materiala. Reakcija poteka na površini trdnih delcev ali kapljic, polimer, ki nastane, pa je netopen in obda jedro (3, 4, 30).

2. Fizikano kemijske:

- metoda koacervacije oz. metoda ločitve faz;

Koacervacija je pojav, ki ga zasledimo pri koloidnih raztopinah. Gre za ravnotežje med dvema fazama in sicer med prvo fazo, ki vsebuje visoko koncentracijo koloidno raztopljenega polimera, ter drugo fazo, v kateri je koncentracija koloidnega polimera nizka, v primeru, da raztopina koloida miruje. Če pa raztopino koloida premešamo, se s koloidom bogata faza v obliki kapljic dispergira v fazi, ki vsebuje nizko koncentracijo koloida.

Mikrokapsuliranje s koacervacijo poteka tako, da jedrno substanco suspendiramo ali emulgiramo v raztopini polimera in nato zmanjšujemo topnost polimera do stopnje koacervacije, koacervatne kapljice pa obdajo jedra (4).

- metoda z odstranjevanjem topila;

Metoda z odstranjevanjem topila se uporablja v primeru emulzij, kjer je v notranji fazi raztopljen polimer ter dispergirana zdravilna učinkovina skupaj s pomožnimi snovmi, ki v zunanji fazi niso topne. Topilo notranje faze nato odstranimo (najpogosteje z odparevanjem), pri čemer se vse komponente notranje faze med seboj povežejo v mikrosfere suspendirane v zunanji fazi. Sledijo izolacija, spiranje in sušenje mikrokapsul (4).

- metoda z ohlajevanjem dispergirane taline;

Polimer najprej raztalimo in mu dodamo zdravilno učinkovino. Nato mešanico suspendiramo v ustreznem ne-topilu, s katerim se talina polimera ne meša. Vse skupaj med stalnim mešanjem segrejemo približno 5°C nad tališče polimera. Nato nastalo disperzijo ponovno ohladimo pod tališče in pustimo, da se kapljice, ki pri tem nastanejo, strdijo (3).

### 3. Mehanske:

- mikrokapsuliranje v dražirnih bobnih (*»pan coating«*);

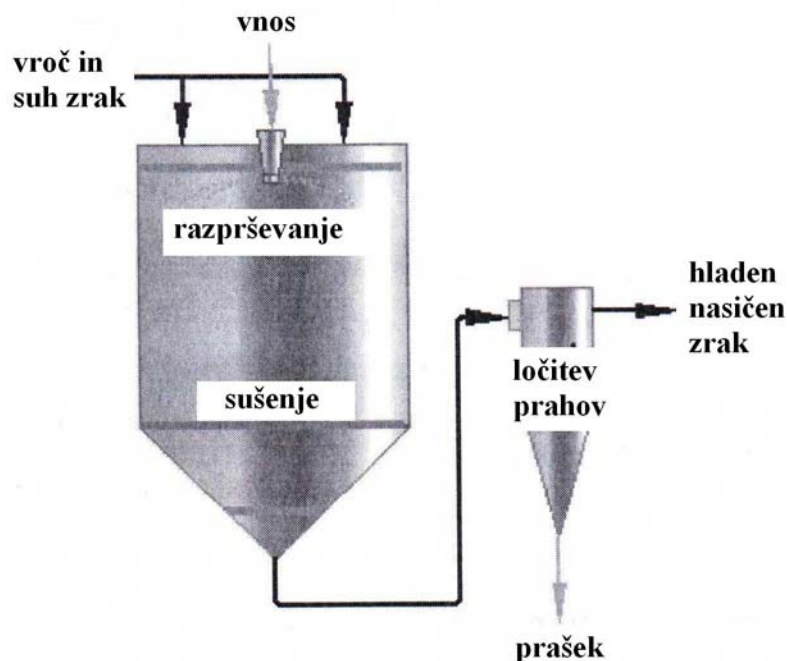
Metoda je primerna za mikrokapsuliranje večjih delcev. Jedra, ki jih želimo obdati z ovojnico, damo v vrteči se boben in nato nanje dovajamo raztopino za oblaganje (3).

- sušenje z razprševanjem;

Jedra, ki jih želimo mikrokapsulirati, dispergiramo v raztopini snovi za oblaganje. Disperzijo nato razpršujemo s tokom toplega zraka, ki odpari topilo in tvori mikrokapsule (3, 4).

- mikrokapsuliranje z razprševanjem (*fluid bed*);

Metoda se uporablja za oblaganje nehlapnih jeder, katere zračni tok vzdržuje v lebdečem stanju. Mikrokapsule nastanejo tako, da skozi šobo razpršujemo raztopino snovi za oblogo, ki obda jedro, medtem ko topel zrak odpari topilo (*slika 8*) (4).

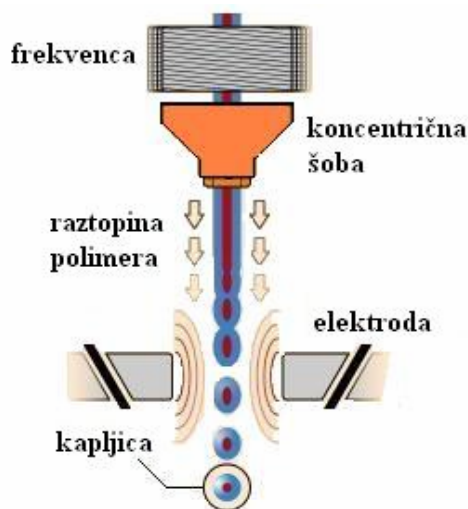


*Slika 8: Shematski prikaz sistema za razprševanje.*

4. postopki mikrokapsuliranja v večjem obsegu (omogočajo proizvodnjo v večjem obsegu, mikrokapsuliranje živih celic in biomolekul):

- metoda z vibrirajočo membrano (»vibrating nozzle«);

Izdelava mikrokapsul z metodo vibrirajoče membrane temelji na razbitju laminarnega toka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane. Mikrokapsule izdelamo tako, da injekcijsko brizgo napolnimo z raztopino polimera, ki predstavlja ogrodno snov, drugo pa z lipofino fazo v kateri je raztopljena ali suspendirana zdravilna učinkovina, ki predstavlja jedro. Tlačilka ali kompresor na stisnjen zrak potiska obe fazi skozi dvokanalno koncentrično šobo določenega premera. Pri tem se ustvari laminarni curek sestavljen iz obeh faz, pri čemer zunanja faza obliva notranjo. Membrana, ki vibrira, razbije laminarni curek v kapljice, ki nato potujejo skozi električno polje, pri čemer se le-te nabijejo. Naboj na kapljicah prepreči njihovo zlepljanje, ko le-te padajo v raztopino za premreževanje. Mikrokapsule pustimo določen čas v raztopini za premreževanje, da se proces premreženja v celoti zaključi. S spreminjanjem procesnih spremenljivk (velikost šobe, hitrost pretoka raztopine polimera, amplitude, frekvence) in lastnosti polimera lahko pripravimo mikrokapsule različnih velikosti (*slika 9*) (31, 45).



**Slika 9:** Shematski prikaz izdelave mikrokapsul z metodo vibrirajoče membrane (45).

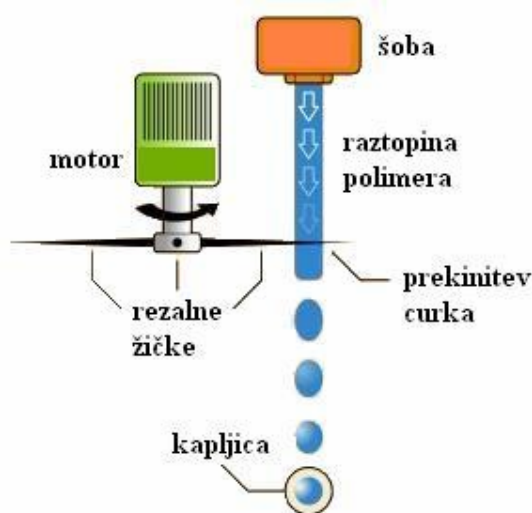
- metoda s koaksialnim tokom raztopine polimera in plina (»AirJet«);

Naprava je sestavljena iz dveh cevi z istim osiščem. Skozi notranjo cev s pomočjo brizge in tlačilke dovajamo raztopino polimera in tvorimo laminarni tok, skozi zunanjo cev pa teče dušik pod tlakom. Mikrokapsule se tvorijo na distalnem koncu cevi, kjer tok tekočine prekine dušik, ki ga pod tlakom dovajamo skozi zunanjo cev. Mikrokapsule lovimo v raztopino za premreževanje. Velikost mikrokapsul je odvisna predvsem od hitrosti pretoka dušika (33).

- metoda s sekalom curka (»JetCutter«);

Metoda s sekalom curka je nova, enostavna in učinkovita tehnologija za izdelavo sferičnih kapljic, ki se v farmaciji uporablja za kapsuliranje zdravilnih učinkovin, vitaminov, dišav itd. Izdelava mikrokapsul temelji na razbitju laminarnega toka raztopine polimera s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami, ki prekinjajo tok. Zračni tlak tlačilke potiska raztopino polimera skozi šobo. Pri tem se tvorijo delci cilindrične oblike, ki pa se zaradi površinske napetosti oblikujejo v sferično obliko. S spreminjanjem procesnih spremenljivk (hitrost vrtenja kolesja, število rezalnih žičk, hitrost pretoka raztopine polimera skozi šobo, premer šobe) dosežemo optimalne pogoje za izdelavo (slika 10) (33, 45).





*Slika 10: Shematski prikaz izdelave mikrokapsul z metodo »JetCutter« (45).*

### 1.3.3 VREDNOTENJE MIKROKAPSUL

Mikrokapsule, ki se uporabljajo v farmaciji, morajo ustrezati točno določenim zahtevam, vendar pa je bila večina metod, ki se uporabljajo za vrednotenje mikrokapsul, razvita za kontrolo drugih farmacevtskih oblik. Najpogosteje vrednotimo naslednje lastnosti:

- *vsebnost učinkovine v mikrokapsulah*

Določamo jo z ustrezno kvantitativno analizo metodo (npr. UV/VIS spektrofotometrija, HPLC).

- *sproščanje učinkovine iz mikrokapsul*

Tako kot za vse farmacevtske oblike, je tudi za mikrokapsule zelo pomembna kinetika sproščanja zdravilne učinkovine. Mehanizem in kinetika sproščanj učinkovine iz mikrosfer sta odvisna predvsem od strukture mikrokapsul in od lastnosti učinkovine.

- *velikost mikrokapsul*

Določamo jo lahko s sejalno analizo, z optično ali elektronsko mikroskopijo ali z elektronskim števcem (»Coulter Counter«).

- *fizikalne lastnosti mikrokapsul*

Določamo lastnosti površine mikrokapsul, obliko in sprijetost mikrokapsul, debelino obloge, prisotnost por in razpok v oblogi, gostoto mikrokapsul ter pretočne lastnosti (34).

## 1.4 ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R

Mikrosfere smo izdelali s pomočjo enkapsulatorja Inotech IE-50 R (*slika 11*), ki je polavtomatska naprava za kapsuliranje zdravilnih učinkovin ter rastlinskih, živalskih in mikrobnih celic pa tudi drugih biomolekul. Izdelava mikrosfer temelji na metodi vibrirajoče membrane, ki laminarni tok tekočine razbije na enakomerno velike kapljice.



*Slika 11: Enkapsulator Inotech IE-50 R.*

Naprava nam omogoča:

- izdelavo mikrosfer in mikrokapsul v aseptičnih pogojih;
- ponovljivost med posameznimi serijami mikrosfer zaradi nastavljivih parametrov, kot so relativna hitrost pretoka, velikost šobe, hitrost mešanja, frekvenca, amplituda in napetost;
- ozko distribucijo porazdelitve velikosti mikrosfer;
- izdelavo mikrosfer v velikostnem razredu od  $10^{-5}$  m do  $10^{-3}$   $\mu\text{m}$  in več;
- takojšnjo kontrolo procesa s pomočjo stroboskopske luči;
- visoko produktivnost (50 do 3000 mikrosfer na sekundo) v milih pogojih mikrokapsuliranja (31).

Glavni enoti enkapsulatorja sta reakcijska posoda in kontrolna enota.

### *Reakcijska posoda*

Reakcijska posoda je priključena na kontrolno ploščo in predstavlja enoto, kjer v raztopino za premreževanje, ki jo mešamo na magnetnem mešalu, zbiramo nastajajoče mikrosfere. Ta sistem je lahko tudi zaprt in omogoča avtoklaviranje, s tem pa zagotavlja ustrezno okolje za aseptično izdelavo mikrosfer.

### *Kontrolna enota*

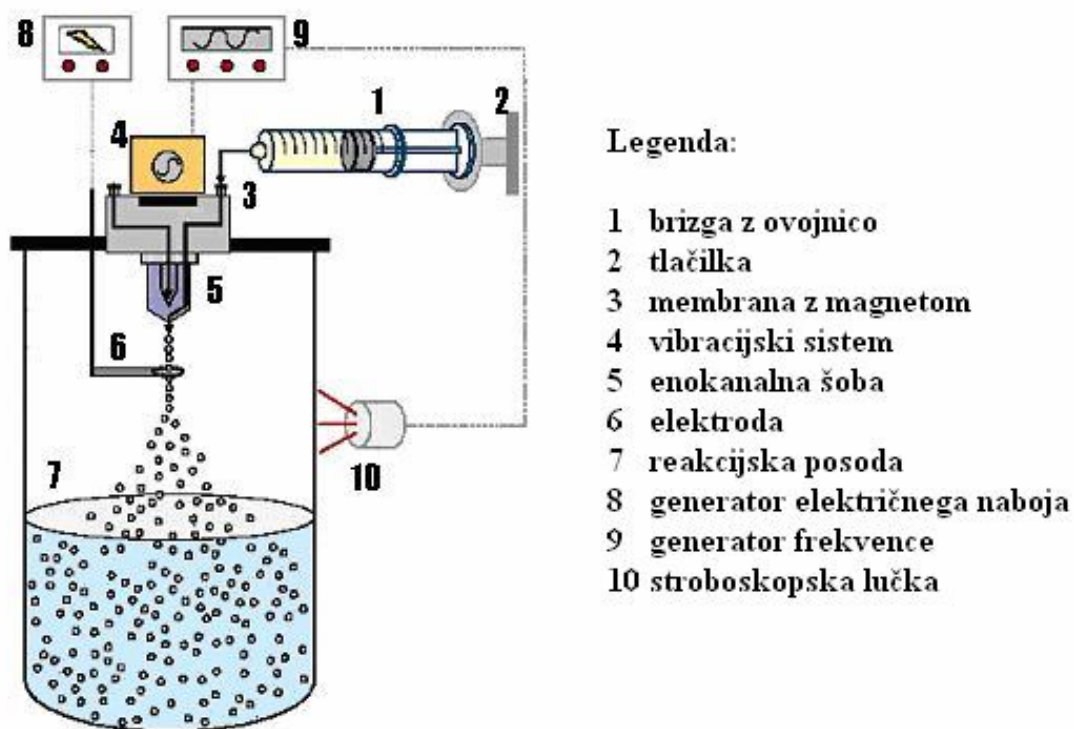
Kontrolna enota je tisti del enkapsulatorja, ki združuje vse sisteme za nastavitve različnih parametrov za izdelavo mikrosfer:

- *vibracijska enota za nadzor amplitude in frekvence elektromagneta membrane*: frekvenco nihanja membrane lahko ponastavljamo v dveh območjih in sicer v nizkem in visokem območju. V nizkem območju se vrednosti gibljejo med 50 in 440 Hz, medtem ko v visokem med 430 in 7000 Hz. Nastavitev amplitude je relativna z razponom od 1 do 7;
- *enota za kontrolo električne napetosti*: električna napetost povzroči električni naboj na površini mikrosfer in s tem prepreči zlepljanje delcev v reakcijski posodi. V praksi se uporablja območje napetosti med 400 in 1800 V;
- *enota za nastavitve in kontrolo relativne hitrosti tlačilke za brizgo*: relativno hitrost pretoka matriksa lahko nastavimo med 0 in 1000, dejanska hitrost pa je odvisna od premera šobe ter viskoznosti samega matriksa. Tipka z napisom TURBO omogoča hitro dosežen laminaren pretok, zato jo je potrebno pritisniti na začetku izdelave vsake posamezne serije mikrosfer;
- *enota za kontrolo magnetnega mešala*: hitrost mešanja mešala lahko nastavimo od 1 do 7, izbira hitrosti pa je odvisna od volumna raztopine za premreževanje in volumna matriksa, ki ga kapsuliramo;
- *stroboskopska luč* (31).

## **1.4.1 TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROSFER**

Matriks z raztopljen ali suspendirano zdravilno učinkovino napolnimo v brizgo in ga nato z zračno tlačilko v laminarnem toku potiskamo skozi enokanalno koncentrično šobo določene velikosti. Na izhodu se raztopina/suspenzija učinkovine v matriksu pod vplivom vibriranja membrane razbije na koncentrične in enako velike kapljice. Kapljice nato padajo

skozi električno polje med šobo in elektrodo, pri čemer se njihova površina nabije, to pa preprečuje zlepljanje kapljic. V zadnji stopnji kapljice padejo v raztopino za premreževanje, kjer se sloj matriksa premreži, tako da dobimo končno obliko mikrosfer. Nastajanje mikrosfer lahko ves čas opazujemo s pomočjo stroboskopske luči (slika 12) (31).



*Slika 12: Shematski prikaz izdelave mikrosfer z enkapsulatorjem Inotech IE-50 R (35).*

#### 1.4.2 SPLOŠNA PRAVILA IZDELAVE MIKROSFER

- Velikost mikrosfer je odvisna od velikosti šobe in je praviloma dva krat večja od njenega premera.
- Pri uporabi nižjih frekvenc dobimo večje mikrosfere in obratno.
- Pri izdelavi manjših mikrosfer potrebujemo manjšo električno napetost.
- V primeru bolj viskoznega matriksa potrebujemo za doseg kontinuiranega toka polimera nižje frekvence in večjo hitrost (31).

### 1.4.3 TEŽAVE PRI IZDELAVI MIKROSFER

Glavne težave s katerimi se srečamo pri izdelavi mikrosfer so naslednje:

- *nestabilen tok matriksa*: nastane zaradi zamašene šobe, prenizke hitrosti curka ali previsoke frekvence ali amplitude;
- *nestabilna veriga kapljic*: nastane zaradi premajhne ali prevelike hitrosti curka, prenizke ali previsoke frekvence ali amplitude, lahko pa tudi zaradi nečiste šobe;
- *nehomogena porazdelitev velikosti mikrosfer*: nastane zaradi prevelike hitrosti curka, previsoke frekvence, prevelike napetosti in ne-Newtonskega obnašanja matriksa (31)

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučevanje vpliva večvalentnih kationov, kot so  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  in kombinacije  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ter kombinacije  $\text{Ca}^{2+}$  ionov in hitosanske ovojnice na lastnosti alginatnih mikrosfer, ki jih bomo izdelali z metodo vibrirajoče membrane, pri tem bomo uporabili enokanalno šobo s premerom 500  $\mu\text{m}$ , pri kateri se od šobe enakomerno trgajo kapljice. Kot modelno učinkovino bomo uporabili furosemid, diuretik Henlejeve zanke, ki ga po BCS uvrščamo med učinkovine razreda IV. Zdravilno učinkovino bomo v alginatni matriks mikrosfer homogeno suspendirali.

Alginat je naraven polisaharid, ki ga pridobivamo iz različnih vrst rjavih alg. Je linearen polimer, sestavljen iz homogenih odsekov  $\beta$ -D-manuronske in  $\alpha$ -L-guluronske kisline in odsekov, kjer se kislini med seboj izmenjujeta. Njegova lastnost je tvorba dveh vrst gelov; v kislem nastane t.i. kislinski gel, v prisotnosti večvalentnih kationov pa ionotropni. Od izbire vrste in koncentracije večvalentnih kationov ter časa premreževanja je odvisna tudi jakost premreženja alginata, kar vpliva na nabrekanje in erozijo mikrosfer ter posledično tudi na hitrost sproščanja vgrajene učinkovine. Izdelane mikrosfere bomo zato ovrednotili glede na nabrekanje in erozijo ter sproščanje modelne učinkovine *in vitro* v vodni raztopini HCl s  $\text{pH} = 3$ , prečiščeni vodi s  $\text{pH} = 5,5$  in fosfatnem pufru s  $\text{pH} = 6,8$  po preskusu raztapljanja za trdne farmacevtske oblike na USP aparaturi 2 z veslastim mešalom.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

*Alginska kislina, natrijeva sol* (Sigma, Nemčija)

Natrijev alginat je bel ali blede rumenorjav prah brez vonja in okusa. V vodnem mediju se počasi raztaplja, pri tem pa tvori viskozno koloidno raztopino. V etanolu, etru, kloroformu, ter ostalih organskih topilih, v katerih je etanola več kot 30% (m/m), in vodnih raztopinah kislin s pH pod 3 je alginska kislina skoraj netopen (36). V industriji se alginat zaradi sposobnosti zadrževanja vode uporablja kot gelirno sredstvo ter sredstvo za povečanje viskoznosti in stabilnosti (13, 14).

*Hitosan* (Fluka, Nemčija)

Hitosan je bel ali kremno bel prah brez vonja. Je polsintezni polisaharid s kemijskim imenom poli- $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoza in ga pridobivajo z delnim deacetiliranjem hitina, ki je skoraj v celoti sestavljen iz  $\beta$ -(1,4) vezanih N-acetilglukozaminskih enot (37). Za razliko od alginata je topen v kislem vodnem mediju, njegova topnost pa je odvisna od stopnje N-acetilacije. Tako lahko hitosan z vsaj 60% stopnjo deacetilacije pretvorimo v topno obliko že z majhno količino kisline. V farmacevtski tehnologiji ga zaradi njegove biokompatibilnosti in nizke toksičnosti uporabljamo za izdelavo pripravkov s prirejenim sproščanjem (38).

*Kalcijev klorid, brezvodni* (RIDEL de Haën, Nemčija)

Brezvodni kalcijev klorid je bel kristaliničen (kubični kristali) in zelo higroskopen prah s temperaturo tališča 772°C. V vodi in etanolu je dobro topen. Komercialno dostopen izdelek vsebuje približno 94% do 97%  $\text{CaCl}_2$ , glavno nečistoto pa predstavlja  $\text{Ca(OH)}_2$  (36).

*Kalcijev klorid, dihidrat* (Merck KGaA, Nemčija)

Kalcijev klorid, dihidrat je bel kristaliničen prah, ki je dobro topen v vodi in etanolu. Je manj higroskopen kot brezvodni kalcijev klorid. Komercialni izdelek vsebuje od 73% do 80%  $\text{CaCl}_2$  (39).

*Aluminijev klorid, brezvodni* (Merck KGaA, Nemčija)

Brezvoden aluminijev klorid je rumenkast prah, ki eksplozivno reagira z vodo, pri čemer se sprosti velika količina toplote. Ima nizko tališče in sublimira že pri 178°C. Pridobivanje poteka s preprihovanjem klora skozi ogljik in aluminijev oksid pri temperaturi okoli 800°C. Topen je v številnih organskih topilih, kot so benzen, nitrobenzen, kloroform itd (36).

*Cinkov sulfat, heptahidrat* (RIDEL de Haën, Nemčija)

Cinkov sulfat vsebuje med 99% in 104% ekvivalenta  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Običajno je bel kristaliničen prah, lahko pa se nahaja tudi v obliki brezbarvnih transparentnih kristalov. V vodi je dobro topen, medtem ko se v alkoholu ne raztaplja (36).

*Bakrov klorid, dihidrat* (Merck KGaA, Nemčija)

Bakrov klorid se lahko nahaja v brezvodni obliki ali obliki dihidrata, ki ga sestavljajo zeleni do modrozeleni ortorombični kristali. Topen je v vodi, metanolu, etanolu, acetonu itd., dodatek HCl ali  $NH_4Cl$  topnost zmanjšata, medtem ko jo dodatek NaCl poveča (36).

*Ocetna kislina, koncentrirana* (Merck KGaA, Nemčija)

Ocetna kislina je bistra, brezbarvna, hlapna tekočina z ostrim vonjem, ki se meša z vodo, alkoholom in etrom. Na področju farmacije jo večinoma uporabljamo za uravnavanje pH-ja (37, 40).

*Laktoza* (Lek, Slovenija)

Laktoza je bel ali skoraj bel kristaliničen prah, ki je lahko topen v vodi, vendar se počasi raztaplja. V etanolu je netopna. Na tržišču je prisotna v obliki monohidrata O-β-D-galaktopiranozil-(1,4)-α-D-glukopiranoze (40).

*Fosforna kislina* (Merck KGaA, Nemčija)

Fosforna kislina je brezbarvna, viskozna tekočina. Koncentrirana fosforna kislina (85%) je zelo korozivna in škodljiva (37).



*Klorovodikova kislina* (Merck KGaA, Nemčija)

Klorovodikova kislina je bistra, brezbarvna, kadeča se vodna raztopina vodikovega klorida z ostrim vonjem. Koncentrirana HCl je korozivna in v primeru zaužitja ali stika z očmi ali kožo povzroča poškodbe (37).

*Natrijev (di)hidrogenfosfat, brezvodni* (Merck KGaA, Nemčija)

Natrijev dihidrogenfosfat je brez vonja in je v obliki ortorombičnih brezbarvnih ali belih kristalov. Pri sobni temperaturi veže vodo, pri čemer nastane dihidrat (36, 37).

*Natrijev hidroksid* (Merck KGaA, Nemčija)

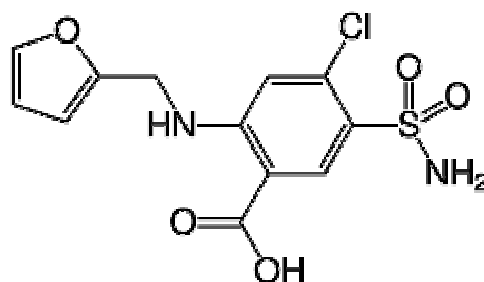
Natrijev hidroksid se nahaja v obliki grudic, ploščic, paličic ali kroglic bele ali skoraj bele barve. Če ga hranimo v dobro zaprtih vsebnikih velja, da komercialni izdelek vsebuje med 97% in 98% NaOH. Je zelo koroziven in ob stiku s kožo povzroča razjede (36, 37).

*Etanol* (Lek d.d., Slovenija)

Etanol je bistra, brezbarvna, hlapljiva tekočina z značilnim vonjem in ostrim okusom. 96% etanol uporabljamo kot topilo (37).

*Furosemid*

Furosemid (*slika 13*) je diuretik Henlejeve zanke. Z inhibicijo Na/K/2Cl kottransporterja inhibira transport NaCl v debelem delu Henlejeve zanke, poleg tega pa inhibira tudi karboanhidrazo (41). Je saluretik, saj pospešuje izločanje natrijevih, kloridnih, kalijevih, kalcijevih, magnezijevih in bikarbonatnih ionov. Uporablja se pri zdravljenju edemov zaradi žilnih, jetrnih ali ledvičnih bolezni in pri uravnavanju krvnega tlaka. Njegov diuretični efekt se pojavi v približno 30 minutah in traja do 6 ur (42). Večinoma se absorbira v želodcu in zgornjem delu tankega črevesa; verjetno zaradi njegovih šibko kislih lastnosti ( $pK_a = 3,9$ ). Ozko absorpcijsko okno furosemida vodi v slabo biološko uporabnost ( $49\% \pm 17\%$ ) (43). Kemijsko je derivat antranilne oz. o-aminobenzojske kisline. Po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu spada v četrto skupino. To pomeni, da je v vodnem mediju slabo topna zdravilna učinkovina, ki slabo prehaja biološke membrane (35). Porazdelitveni koeficient furosemida ima vrednost 2,03. Hraniti ga moramo zaščitene pred svetlobo ter oksidanti, kislinami in kovinami (44).



*Slika 13: Strukturna formula furosemida (39).*

## 3.2 METODE

### 3.2.1 NAPRAVE IN PRIPOMOČKI, KI SMO JIH UPORABILI PRI IZDELAVI IN VREDNOTENJU MIKROSFER

Naprave in pripomočki, ki smo jih uporabljali pri izdelavi in vrednotenju mikrosfer, so zbrani in na kratko predstavljeni v preglednici II.

**Preglednica II:** Naprave in pripomočki, ki smo jih uporabili pri izdelavi in vrednotenju mikrosfer.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Magnetno mešalo 1             | Rotamix 550 MMH, Tehnica Železniki, Slovenija |
| Magnetno mešalo 2             | Big squid, IKA <sup>®</sup> -WERKE, Nemčija   |
| Magnetno mešalo 3             | HI 190M, HANNA instruments, Portugalska       |
| Tehnica                       | Exacta 2200 EB, Tehnica Železniki, Slovenija  |
| Analitska tehtnica            | AG245, Mettler Toledo, Švica                  |
| Enkapsulator                  | Encapsulator IE-50, Inotech, Švica            |
| Grelec                        | Rotamix 550 MMH, Tehnica Železniki, Slovenija |
| Transparentni papir           | Ciat, Carta Ciat-Lucido, Italija              |
| Top-spray komora              | Strea-1, NIRO-Aeromatic, Švica                |
| Naprava za test raztapljanja  | Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA     |
| pH meter                      | MA235, Mettler Toledo, Švica                  |
| Brizge (60 mL)                | OMNIFIX <sup>®</sup> 60 ml, Braun, Švica      |
| Brizge (5 mL)                 | ICO (Plus2) 5 mL, Novico, Italija             |
| Filtri za filtracijo raztopin | Minisant RC 0,45 µm, Santorius, Nemčija       |
| Filtri za filtracijo raztopin | Celulozni acetat, 0,2 µm, Sartorius, Nemčija  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| Mrežaste kroglice   | ChaChult, Hamburg, Nemčija                      |
| Spektrofotometer    | Hewlett Packard 8453 spectrophotometer, Nemčija |
| Ultrazvočna kadička | Sonis 4, Iskra, Slovenija                       |

### 3.2.2 PRIPRAVA ALGINATNEGA MATRIKSA

Za izdelavo ovojnice mikrosfer smo uporabili 1,5% raztopino natrijevega alginata z ali brez dodatka 5% laktoze in 1% NaCl. Raztopino smo pripravili tako, da smo k 92,5 g prečiščene vode dodali 5 g laktoze in 1 g NaCl ter vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da sta se laktoza in NaCl raztopila. Nato smo dodali še 1,5 g natrijevega alginata in pustili pokrito mešati 24 ur, da je nastala homogena raztopina brez zračnih mehurčkov.

V primeru, da smo pripravljali alginatni matriks brez laktoze in NaCl, smo k 98,5 g prečiščene vodi dodali 1,5 g natrijevega alginata in prav tako pustili mešati na magnetnem mešalu 24 ur.

### 3.2.3 PRIPRAVA ALGINATNEGA MATRIKSA S FUROSEMIDOM

Alginatne mikrosfere s furosemidom smo pripravili tako, da smo k 99,5 g 1,5% alginatnega matriksa, ki smo ga pripravili po zgoraj opisanem postopku, dodali 0,5 g furosemida in vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da je nastala homogena suspenzija.

### 3.2.4 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PREMREŽEVANJE

#### *0,3 M raztopina CaCl<sub>2</sub>*

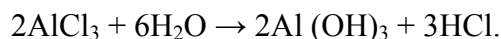
Raztopino smo pripravili tako, da smo k 965,7 g prečiščene vode dodali 34,3 g CaCl<sub>2</sub> (97% m/m) ter vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da smo dobili bistro raztopino.

#### *0,5 M raztopina CaCl<sub>2</sub>*

Raztopino smo pripravili tako, da smo k 942,8 g prečiščene vode dodali 57,2 g CaCl<sub>2</sub> (97% m/m) ter vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da smo dobili bistro raztopino.

*0,3 M raztopina AlCl<sub>3</sub>*

AlCl<sub>3</sub> je močno higroskopen prah, ki v stiku z vodo burno eksotermno reagira, zato bi bilo bolj primerno, če bi uporabili AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, vendar pa le-tega nismo imeli na razpolago, tako da smo vodno raztopino pripravili z brezvodnim AlCl<sub>3</sub>. AlCl<sub>3</sub> je močna Lewisova kislina, ki v prisotnosti vode delno hidrolizira, pri tem pa nastajajo hlapci HCl:



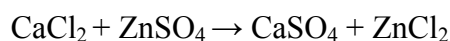
Ustrezno maso aluminijevega klorida (40 g) smo zato natehtali (v digestoriju) en dan pred pripravo raztopine in ga pustili čez noč v digestoriju, da se je ustrezno navlažil; na ta način smo se izognili burni reakciji z vodo pri pripravi raztopine. Naslednji dan smo raztopino pripravili tako, da smo k 960 g prečiščene vode dodali pripravljeno natehto AlCl<sub>3</sub> ter vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da smo dobili bistro raztopino.

*0,3 M raztopina CuCl<sub>2</sub>*

Raztopino smo pripravili tako, da smo k 959,7 g prečiščene vode dodali 40,3 g CuCl<sub>2</sub> ter vse skupaj mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da smo dobili bistro raztopino.

*0,15 M raztopina ZnCl<sub>2</sub> in 0,15 M raztopina CaCl<sub>2</sub>*

V ločenih čašah smo pripravili po 150 mL 0,3M raztopine CaCl<sub>2</sub> in 0,15M raztopine ZnSO<sub>4</sub>. Raztopino CaCl<sub>2</sub> smo pripravili tako, da smo 265,7 g prečiščene vode dodali 34,3 g CaCl<sub>2</sub> (97% m/m), raztopino ZnSO<sub>4</sub> pa tako, da smo 292,5 g prečiščene vode dodali 6,5 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Obe raztopini smo pustili mešati na magnetnem mešalu dokler nista nastali bistri raztopini. Nato smo med mešanjem na magnetnem mešalu v raztopino CaCl<sub>2</sub> počasi dolivali raztopino ZnSO<sub>4</sub>. Pri tem je potekla naslednja reakcija:



V reakciji je nastala bela oborina CaSO<sub>4</sub>, ki je v vodi slabo topna. Po pol ure mešanja smo oborino odfiltrirali. V 300 mL končne raztopine je po reakciji ostalo 0,15M raztopina CaCl<sub>2</sub> (presežek, ki v reakciji ni zreagirala) in 0,15M raztopina ZnCl<sub>2</sub>. Končno raztopino smo nato uporabili za premreževanje predhodno narejenih mikrosfer.

*Raztopina hitosana (1%)*

Raztopino hitosana smo pripravili v obliki 1% raztopine hitosana v 1% očetni kislini tako, da smo k 99 g 1% očetne kisline dodali 1 g hitosana. Na magnetnem mešalu smo ga pustili mešati 24 ur do nastanka homogene raztopine.

**3.2.5 PRIPRAVA MEDIJA ZA TEST RAZTAPLJANJA***Vodna raztopina HCl s pH = 3*

Za pripravo 1 L raztopine smo 1 L vode dodali 0,08 mL HCl (37% m/m,  $\rho = 1,19$  kg/L). pH raztopine smo nato izmerili s pH-metrom in ga po potrebi še uravnali.

*Fosfatni pufer s pH = 6,8*

V ločenih bučkah smo pripravili raztopini 0,2M NaOH in 0,2M raztopino  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Raztopino NaOH smo pripravili v 1 L merilni bučki tako, da smo 8 g NaOH raztopili v prečiščeni vodi in nato bučko z vodo dopolnili do oznake.

Raztopino  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  smo pripravili v 2 L merilni bučki tako, da smo 62,4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  natehtali v bučko, raztopili v prečiščeni vodi in z vodo dopolnili do oznake.

Fosfatni pufer s pH = 6,8 smo nato pripravili tako, da smo v 5 L merilni bučki zmešali 1250 mL 0,2M raztopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 560 mL 0,2 M raztopine NaOH ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljenemu pufri smo nato še s pH-metrom izmerili pH in ga po potrebi uravnali.

**3.2.6 TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROSFER S FUROSEMIDOM KOT MODELNO UČINKOVINO**

Mikrosfere smo izdelali s kapljalno metodo s pomočjo enokanalne šobe velikosti 500  $\mu\text{m}$  na enkapsulatorju Inotech IE-50 R. Zaradi visoke viskoznosti in nizkega pretoka matriksa se pri tej metodi od šobe enakomerno trgajo kapljice.

Kot matriks smo uporabili 1,5% raztopino natrijevega alginata z dodatkom 1% NaCl in 5% laktoze, v katerem je bilo suspendirane 0,5% modelne učinkovine. Alginatni matriks s homogeno suspendiranim furosemidom smo dovajali s pomočjo 60 mL brizge. Pred zagonom naprave smo na kontrolni plošči naravnali frekvenco vibriranja membrane na

3000 Hz, amplitudo na 3, napetost na 0,8 kV in relativno hitrost pretoka matriksa na 220. Proces izdelave mikrosfer je prikazan na sliki 12.

Nastajajoče mikrosfere smo lovili v 100 mL raztopine za premreževanje (0,3M CaCl<sub>2</sub>, 0,5M CaCl<sub>2</sub>, 0,3M AlCl<sub>3</sub>, 0,3M CuCl<sub>2</sub>, 0,3M CaCl<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub> in 0,3M CaCl<sub>2</sub> + 1% hitosan), ki smo jo ves čas izdelave zmerno mešali na magnetnem mešalu. Neustrezne mikrosfere, ki so nastajale na začetku in na koncu procesa izdelave vsake serije, smo lovili v čašo za odpad.

Izdelane mikrosfere smo ob stalnem mešanju inkubirali v raztopini za premreževanje 15 minut. V primeru, da smo mikrosfere premreževali v raztopini 0,3M CaCl<sub>2</sub> z dodatkom 1% hitosana, smo jih, tako kot vse ostale, najprej inkubirali 15 min v raztopini za premreževanje, nato pa še 5 min v 1% raztopini hitosana v 1% očetni kislini. Tako premrežene mikrosfere smo filtrirali z odsesavanjem in jih nato sprali s 150 mL prečiščene vode. Sprane in odcejene mikrosfere smo posušili v vrtinčnoslojnim sušilniku.

### 3.2.7 TEST RAZTAPLJANJA

S testom raztapljanja smo določali količino furosemida, ki se je v določenem časovnem intervalu sprostila iz suhih mikrosfer. Test smo izvajali na USP aparaturi 2 z veslastim mešalom (Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA) (*slika 14*) pri 50-ih obratih/minuto in konstantni temperaturi 37°C.

Ustrezno zatehto mikrosfer s furosemidom smo dispergirali v 900 mL medija za raztapljanje (vodna raztopina HCl s pH = 3, prečiščena voda s pH = 5,5 in fosfatni pufer s pH = 6,8), ki smo jo določili tako, da smo upoštevali maksimalno topnost furosemida v posameznem pH-ju, ki ni smela bila presežena ( $S_{\max (pH = 3)} = 29 \text{ mg/L}$ ;  $S_{\max (pH = 5,5)} = 35 \text{ mg/L}$ ;  $S_{\max (pH = 6,8)} = 64 \text{ mg/L}$ ; vrednosti so bile določene eksperimentalno). Tako smo za sproščanje zdravilne učinkovine v vodni raztopini HCl uporabili približno 13 mg furosemida, v prečiščeni vodi 15 mg ter v fosfatnem pufru kar 25 mg. Ob predhodno določenih časovnih intervalih (*preglednica III*) smo nato odvzeli 10 mL vzorca, ga filtrirali skozi filter Minisant RC 0,45 μm (Santorius, Nemčija). Odvzetega medija nismo nadomeščali.

Tudi časovne intervale vzorčenja smo izbrali v odvisnosti od vrednosti pH medija za raztapljanje, saj pH močno vpliva na raztapljanje alginatnega matriksa. V preglednici III so prikazani intervali vzorčenja pri vseh treh medijih.

**Preglednica III:** Časovni intervali vzorčenja v mediju s pH = 3, pH = 5,5 in pH = 6,8.

| časovni interval | medij raztapljanja |          |          |
|------------------|--------------------|----------|----------|
|                  | pH = 3             | pH = 5,5 | pH = 6,8 |
| 15 min           | x                  | x        | x        |
| 30 min           |                    |          | x        |
| 45 min           |                    |          | x        |
| 1 ura            | x                  | x        | x        |
| 4 ure            | x                  | x        | x        |
| 8 ur             | x                  | x        |          |
| 16 ur            | x                  | x        |          |
| 24 ur            | x                  | x        |          |

Ugotovili smo tudi, da pride med poskusom do izhlapevanja medija, kar smo preverjali z meritvami volumna medija po končanem poskusu. Privzeli smo, da je izhlapevanje enakomerno in znaša 2 mL/h, ter to upoštevali pri izračunu (*enačba 1*). Za vsako serijo suhih mikrosfer smo izvedli test v treh paralelkah.

**Enačba 1**  $V_n = V_0 - (n * V_v) - (t_n * v_i)$

pri čemer predstavlja  $V_n$  dejanski volumen medija v času vzorčenja,  $V_0$  začetni volumen medija (900 mL),  $n$  število vzorcev,  $V_v$  volumen odvzetega vzorca,  $t_n$  čas ob odvzemu  $n$ -tega vzorca in  $v_i$  hitrost izhlapevanja medija (2 mL/h).

Odvzete vzorce smo nato analizirali spektrofotometrično (Hewlett Packard 8453 spectrophotometer, Nemčija) in iz umeritvene premice izračunali koncentracijo furosemida ob določenem času. Z upoštevanjem volumna medija in količine furosemida, ki smo ga suspendirali v mikrosfere, smo izračunali delež (%) sproščenega furosemida (*enačba 2*).

**Enačba 2**  $\%_{(sproscene\ U)} = \left( \frac{m_{(sproscene\ U)} * V_v}{m_{(celotne\ U)}} \right) * 100$

pri čemer predstavlja  $\%_{(sproscene\ U)}$  delež sproščenega furosemida,  $m_{(sproscene\ U)}$  maso sproščenega furosemida v času  $t$ ,  $V_v$  volumen odvzetega vzorca in  $m_{(celotne\ U)}$  celotno maso furosemida, ki smo ga vgradili v mikrosfere in sproščali v 900 mL medija.

**a****b**

*Slika 14: Aparatura za raztapljanje (a), veslo (b) (16).*

### 3.2.8 DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE

Nabrekanje je lastnost hidrogela, ki nam pove, kakšno količino hidratacijskega medija je hidrogel sposoben vezati. Količina vezanega medija je odvisna od strukture hidrogela, uspešnosti premreženja ter vpliva sušenja na mikrosfere in medija v katerem hidrogel nabreka. Nabrekanje in erozijo alginatnih mikrosfer smo določali s pomočjo aparature za raztapljanje z vesli pri 50-ih obratih/minuto in temperaturi 37°C. Približno 500 mg suhih mikrosfer smo točno natehtali v mrežaste kroglice premera ~ 4 cm in jih dali v medij za nabrekanje (900 mL vodne raztopine HCl s pH = 3, prečiščena voda s pH = 5,5 ter fosfatni pufer s pH = 6,8). Ob ustreznih časovnih intervalih, ki so bili odvisni od medija za nabrekanje in so predstavljeni v preglednici III, smo mrežaste kroglice z mikrosferami vzeli ven, jih odcedili, odvečno vodo narahlo popivnali s papirnato brisačko in vsebino kroglice ponovno stehali. Test smo izvajali v treh paralelkah. Nabrekanje smo nato izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{Enačba 3} \quad S (\%) = \left( \frac{m_{(t)} - m_{(\text{suhe, ki so nabrekale})}}{m_{(\text{suhe, ki so nabrekale})}} \right) * 100$$

pri čemer predstavlja S (%) nabrekanje izraženo v odstotkih,  $m_{(t)}$  maso nabreklih mikrosfer,  $m_{(0)}$  pa začetno maso mikrosfer, ki so nabrekale.



Erozija je lastnost hidrogelov, ki nam pove, kakšen delež matriksa je erodiral med nabrekanjem hidrogela. Prav tako kot nabrekanje, je tudi erozija odvisna od strukture hidrogela, gostote premreženja, vpliva sušenja ter medija nabrekanja. Erozijsko smo določali sočasno s spremljanjem nabrekanja. Mikrosfere, ki smo jih ob določenih časovnih intervalih odvzeli iz medija za nabrekanje, smo najprej stehtali, nato pa smo jih sušili do konstantne mase (16 ur pri 55°C) in jih ponovno stehtali.

Parameter  $m_{0(z a E)}$  za erozijo smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{Enačba 4} \quad m_{0(z a E)} = \left( \frac{m_{(0)} * m_{(suhe\ povpr)}}{m_{(0)(suhe\ povpr)}} \right)$$

pri čemer predstavlja  $m_{(0)}$  začetno maso mikrosfer, ki so nabrekale,  $m_{(suhe\ povpr)}$  povprečno končno maso ponovno sušenih mikrosfer, ter  $m_{(0)(suhe\ povpr)}$  povprečno začetno maso mikrosfer, ki so nabrekale. S pomočjo izračunanega parametra  $m_{0(z a E)}$  smo nato izračunali erozijo po enačbi 5:

$$\text{Enačba 5} \quad E (\%) = \left( \frac{m_{0(z a E)} - m_{(suhe, ki so nabrekale)}}{m_{0(z a E)}} \right) * 100$$

pri čemer predstavlja  $E (\%)$  erozijo izraženo v odstotkih,  $m_{(suhe, ki so nabrekale)}$  pa maso ponovno posušenih mikrosfer, ki so predhodno nabrekale.

### 3.2.9 ANALITIKA UČINKOVINE

Kot analizno metodo za določanje učinkovine smo uporabili UV/VIS spektrofotometrijo. Furosemid ima tri značilne absorpcijske maksimume in sicer pri valovnih dolžinah  $\lambda = 230$  nm in  $\lambda = 278$  nm ter še enaga manjšega pri približno  $\lambda = 340$  nm, zato je to učinkovino mogoče analizirati z UV/VIS spektrofotometrijo. Območje merjenja absorbance je med 0,2 in 0,8, saj to območje podaja linearni odnos med absorbanco in koncentracijo učinkovine. Koncentracijo učinkovine v raztopini preračuna računalnik na podlagi absorbance in umeritvene premice, ki jo predhodno posnamemo z vsaj petimi standardnimi raztopinami. Za merjenje absorbance smo uporabili kiveto (1,0 cm) iz kvarčnega stekla, študije pa smo izvajali v treh paralelkah.

Z UV/VIS spektrofotometrijo smo določili sproščeno koncentracijo furosemida iz alginatnih mikrosfer spremreženih z 0,3M  $Ca^{2+}$ , 0,5M  $Ca^{2+}$ , 0,3M  $Al^{3+}$ , 0,3M  $Ca^{2+}/Zn^{2+}$ ,

0,3M  $\text{Cu}^{2+}$  in 0,3M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni in hitosansko ovojnico v vseh treh medijih sproščanja (pH = 3, pH = 5,5, pH = 6,8).

Osnovno standardno raztopino za analizo zvorca z UV/VIS spektrofotometrično smo pripravili tako, da smo v 250 mL merilno bučko natehtali 7,3 mg furosemida, ga raztopili v nekaj mililitrih etanola, nato pa z medijem za raztapljanje dopolnili do oznake. Bistro raztopino smo prefiltrirali skozi membranski filter. Prefiltrirani raztopini smo izmerili absorbanco, nato pa osnovno raztopino redčili toliko časa, da smo dobili 5 razredčenih raztopin z absorbanco med 0,2 in 0,8.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pokazali, da je s kalcijem premreženi alginat z dodanimi različnimi pomožnimi snovmi primerno ogrodje za izdelavo mikrosfer z metodo vibrirajoče membrane. Namen našega dela je bil proučiti vpliv polivalentnih kationov na premreženje in s tem učvrstitev alginatnih mikrosfer. V ta namen smo proučevali vpliv različnih premreževal na nabrekanje in erozijo ogrodja mikrosfer ter na sproščanje vgrajene modelne učinkovine furosemida v treh različnih medijih (vodna raztopina HCl s pH = 3, prečiščena voda s pH = 5,5 ter fosfatni pufer s pH = 6,8).

### 4.1 VREDNOTENJE NABREKANJA IN EROZIJE ALGINATNIH MIKROSFER

V literaturi zasledimo podatke, da na nabrekanje in erozijo alginatnega ogrodja vplivata tako vrsta kationov, s katerimi je alginatni matriks premrežen, kot tudi njihova koncentracija v raztopini za premreževanje (46). Poleg tega sta nabrekanje in erozija ogrodja odvisna tudi od dodatka pomožnih snovi in medija, v katerem alginatne mikrosfere nabrekajo (9, 46). Da bi ugotovili, kako različni polivalentni kationi in dodane pomožne snovi (laktoza in NaCl) vplivajo na nabrekanje in erozijo ogrodja mikrosfer, smo izdelali več serij le-teh, ki so se med seboj razlikovale tako v vrsti premreževalnega kationa, kot tudi v koncentraciji slednjega v raztopini za premreževanje ter dodanih pomožnih snoveh.

#### 4.1.1 VPLIV DODANIH POMOŽNIH SNOVI (LAKTOZA IN NATRIJEV KLORID)

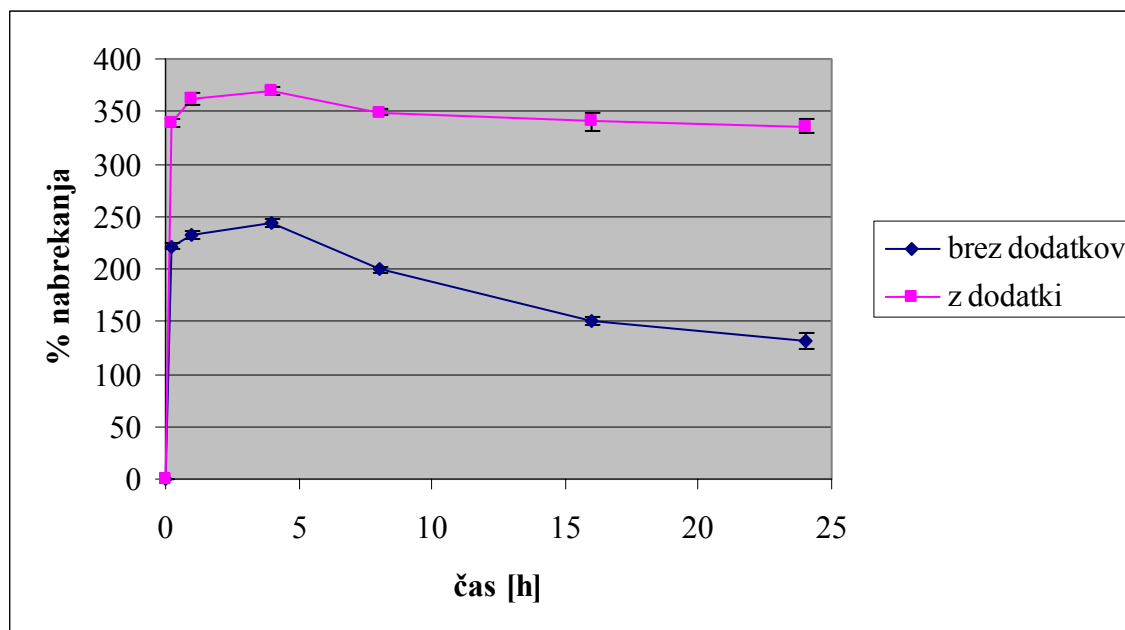
Na osnovi predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo se je kot primeren matriks za kapsuliranje tekočih sistemov izkazal 1,5% natrijev alginat z dodatkom 5% laktoze in 1% NaCl premrežen z 0,3M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. V diplomskem delu nas je zanimalo, kako dodatek teh pomožnih snovi vpliva na nabrekanje in erozijo v vodni raztopini HCl (*sliki 16 in 17*), prečiščeni vodi (*sliki 18 in 19*) ter fosfatnem pufru (*sliki 20 in 21*).

Mikrosfere z dodano laktozo in NaCl v vodni raztopini HCl s pH = 3 bistveno bolj nabrekajo (približno 150%) kot tiste brez dodanih pomožnih snovi. Laktoza in NaCl

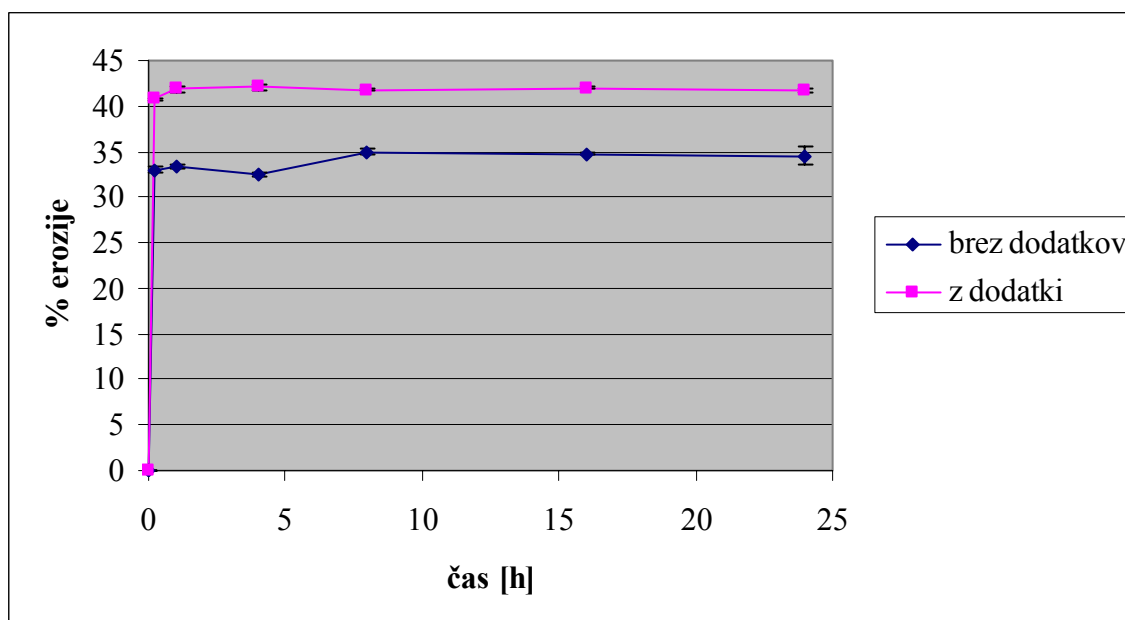
pritegneta medij v katerem nabrekata in se v njem raztopita. K formulacijam ju dodajamo z namenom, da s svojim raztapljanjem omogočata nastanek por v ogrodju, kar olajša privzem medija v notranjost formulacije in s tem vplivata na nabrekanje le-te. Dodatek laktoze in NaCl povzroča poroznost mikroser. Večje nabrekanje mikroser z dodatki je verjetno povezano tudi s prisotnostjo NaCl, saj je znano, da se Na<sup>+</sup> ioni iz NaCl izmenjujejo s Ca<sup>2+</sup> ioni v strukturi Ca-alginata in tako olajšajo nabrekanje ogrodja.

Glede na to, da imajo pomožne snovi velik vpliv na nabrekanje, smo v nadaljni raziskavi proučevali tudi vpliv le-teh na erozijo. Kar sta tako laktoza kot NaCl dobro vodotopna, smo pričakovali, da bo erozija mikroser s pomožnimi snovmi bistveno večja kot erozija mikroser iz samega Ca-alginata. V nasprotju z našimi pričakovanji se stopnji erozije razlikujeta le za slabih 10% (*slika 17*). Prav tako lahko opazimo, da je vpliv različnih medijev na erozijo manjši kot na nabrekanje. Na osnovi tega sklepamo, da laktoza in NaCl olajšata privzem medija s tvorbo por oz. vplivom na poroznost ogrodja, vendar pa hitro nabrekanje slednjega in posledični nastanek čvrstega gela preprečita izplavljanje dodanih pomožnih snovi v medij za nabrekanje.

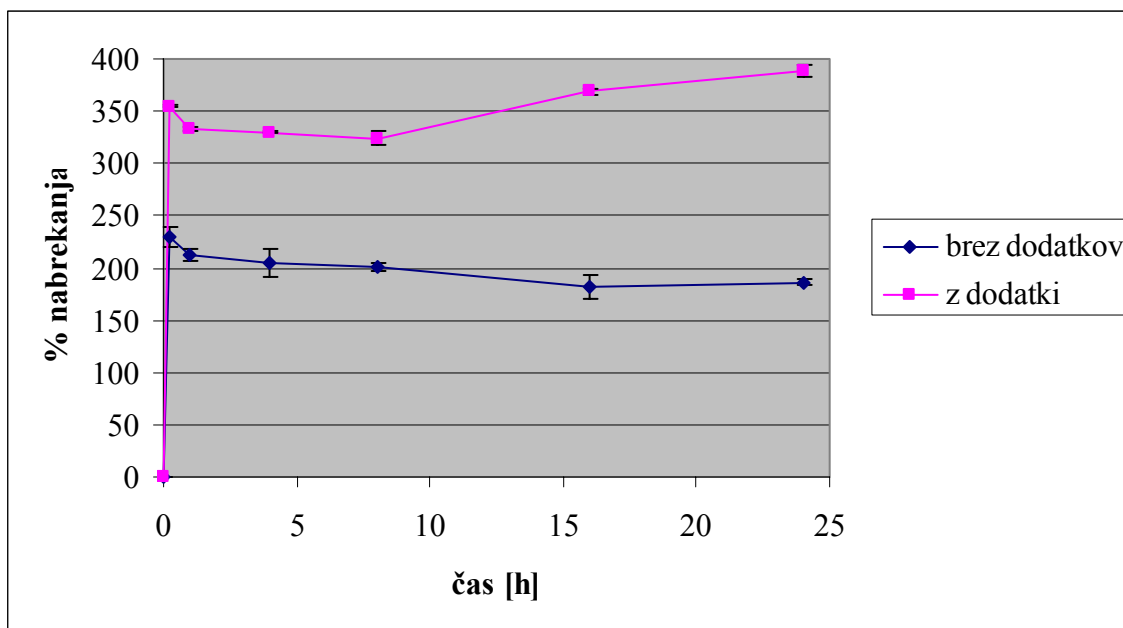
Podobne rezultate smo dobili tudi v primeru nabrekanja in erozije mikroser v prečiščeni vodi (*sliki 18 in 19*), le da je nabrekanje v tem mediju med mikroserami z dodanimi pomožnimi snovmi in tistimi iz samega Ca-alginata večje (skoraj 200%), razlika v eroziji pa ostaja enaka (približno 10%).



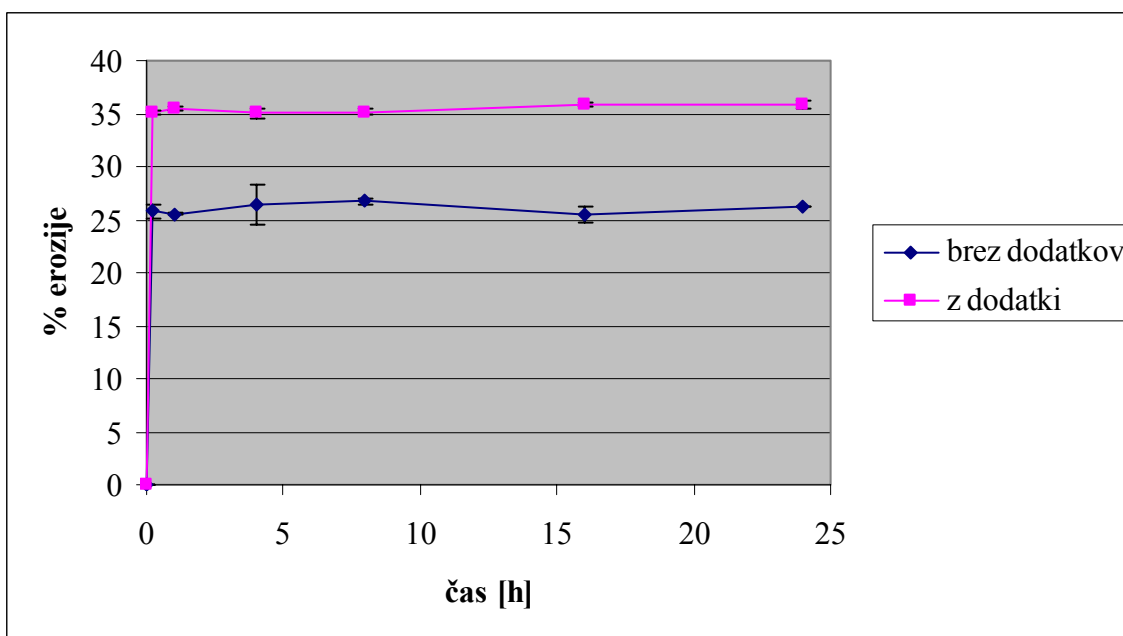
**Slika 16:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na nabrekanje alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v vodni raztopini HCl s  $pH = 3$ ;  $n = 3$ .



**Slika 17:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na erozijo alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v vodni raztopini HCl s  $pH = 3$ ;  $n = 3$ .



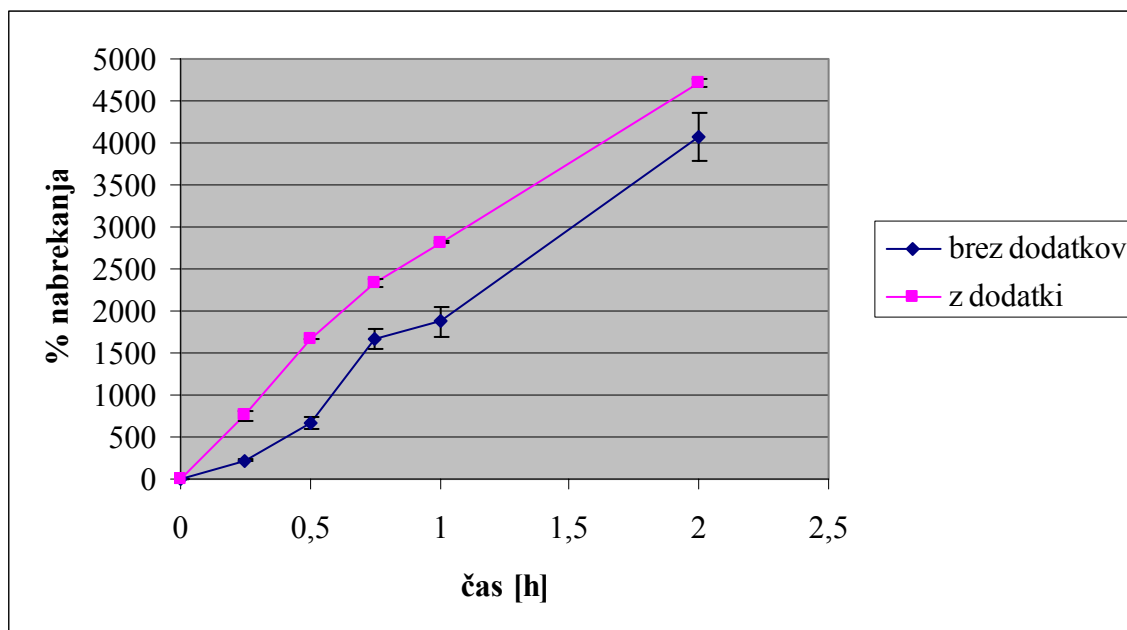
*Slika 18: Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na nabrekanje alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v prečiščeni vodi s  $pH = 5,5$ ;  $n = 3$ .*



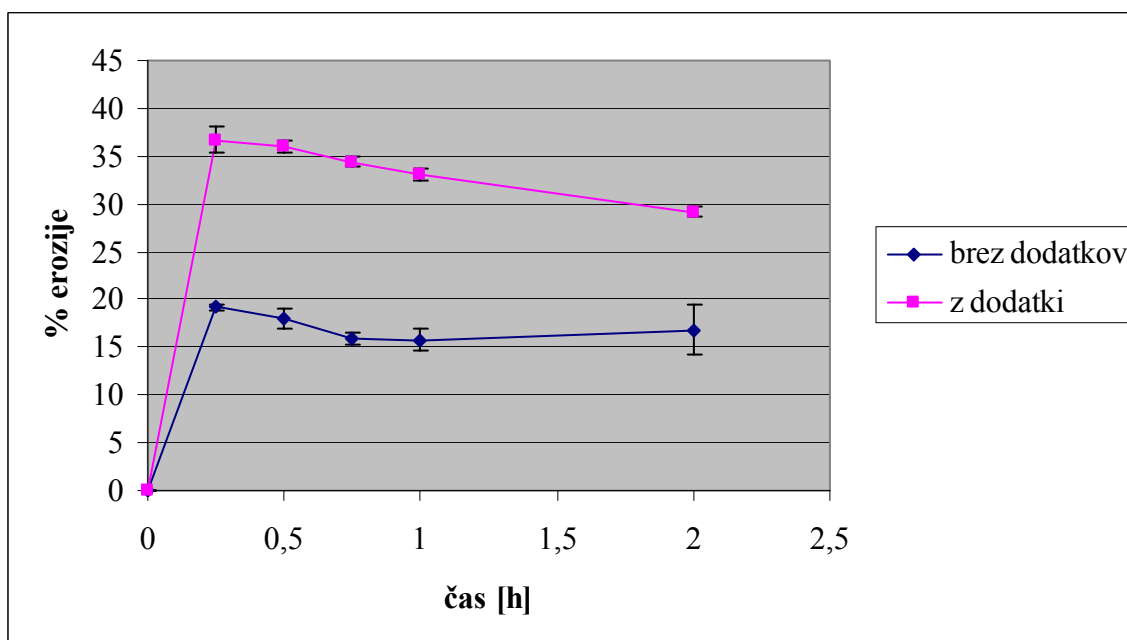
*Slika 19: Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na erozijo alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v prečiščeni vodi s  $pH = 5,5$ ;  $n = 3$ .*

Nabrekanje mikrosfer iz Ca-alginata je v fosfatnem pufru s pH = 6,8 povezano z dodatno izmenjavo Na<sup>+</sup> ionov iz fosfatnega pufra in Ca<sup>2+</sup> ioni, ki premrežujejo alginatne verige, kar poveča nabrekanje ogrodja. Polona Smrdel in sodelavci (47) so dokazali, da dodatek netopnih pomožnih snovi, zaradi nizke afinitete slednjih do medija, zmanjša hitrost in privzem medija v alginatno ogrodje ter posledično zmanjša stopnjo nabrekanja. Z ozirom na te ugotovitve smo pričakovali, da bosta dodatek laktoze in NaCl, ki sta vodotopna, povečala nabrekanje mikrosfer. Kot je prikazano na sliki 20, mikrosfere z dodano laktozo in NaCl resnično bolj nabrekajo (stopnja nabrekanja je večja za dobrih 500%) kot tiste, katerim pomožnih snovi nismo dodali. Če primerjamo sliko 20 s slikama 16 in 18 opazimo, da je nabrekanje mikrosfer v fosfatnem pufru kar 10 krat večje kot tisto v prečiščeni vodi in vodni raztopini HCl. To lahko razložimo z dodatno izmenjavo Na<sup>+</sup> ionov iz pufra in Ca<sup>2+</sup> ionov alginata, kot smo že opisali (46, 47). Povečano nabrekanje v fosfatnem pufru pa je lahko tudi na račun alginatnih -COOH skupin, ki s Ca<sup>2+</sup> ioni niso premrežene. Le-te namreč pri pH = 6,8 ionizirajo, zato se med sabo odbijajo, kar daje dodatno možnost za večanje hidratacijskega ovoja oz. večje nabrekanje.

Ne glede na to, da je nabrekanje v fosfatnem pufru tako veliko, pa se razlika v eroziji mikrosfer z dodanimi pomožnimi snovmi in brez njih, tako kot v prečiščeni vodi in vodni raztopini HCl, bistveno ne razlikuje (približno 15%). Erozijska mikrosfer z dodanimi pomožnimi snovmi pa je v fosfatnem pufru nekoliko nižja kot v ostalih dveh medijih in sicer za 5% glede na erozijo v prečiščeni vodi in 10% v vodni raztopini HCl. Dobljene rezultate lahko potrdimo z domnevo, da izmenjava Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> ionov med pufrom in alginatnimi verigami poveča privzem medija v notranjost, medtem ko odplavljanja alginatnega ogrodja ne poveča in pospeši.



**Slika 20:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na nabrekanje alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v fosfatnem pufru s  $pH = 6,8$ ;  $n = 3$ .



**Slika 21:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na erozijo alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v fosfatnem pufru s  $pH = 6,8$ ;  $n = 3$ .



#### 4.1.2 VPLIV pH MEDIJA

V nadaljevanju smo proučevali vpliv spremembe medija na nabrekanje in erozijo alginatnih mikrosfer, katerih ogrodje smo premrežili z različnimi kationi. Alginska kislina ima zaradi svoje sestave (ostanki guluronske ( $pK_a = 3,65$ ) in manuronske ( $pK_a = 3,38$ ) kisline) pri različnih vrednostih pH medija različno topnost. Poleg tega pa tudi različni polivalentni kationi nimajo enake afinitete do alginatnih verig, tako da vezi med alginatnimi verigami in premreževalnimi polivalentnimi kationi nimajo enake jakosti. Tako pH medija kot tudi vrsta premreževalnega polivalentnega kationa vplivata na nabrekanje alginatnih mikrosfer, kar se odraža v količini privzetega medija, v katerem alginatne mikrosfere nabrekajo.

Vpliv različnih polivalentnih kationov na nabrekanje alginatnih mikrosfer v treh različnih medijih (vodna raztopina HCl, prečiščena voda in fosfatni pufer) prikazujejo slike 22, 24 in 26. Med nabrekanjem mikrosfer v vodni raztopini HCl (*slika 22*) in prečiščeni vodi (*slika 24*) ni bistvene razlike, medtem ko je nabrekanje v fosfatnem pufru (*slika 26*) na račun izmenjave  $Na^+$  ionov iz medija in  $Ca^{2+}$  ionov Ca-alginata in ionizacije nepremreženih karboksilnih skupin kar 10 krat večje. Premrežen alginatni matriks v vodni raztopini HCl ni topen, v prečiščeni vodi se njegova topnost nekoliko poveča, v fosfatnem pufru pa se po določenem času popolnoma raztopi. To je tudi razlog, da smo nabrekanje alginatnih mikrosfer v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi spremljali 24 ur, v fosfatnem pufru pa so mikrosfere zaradi raztapljanja v mediju že po 2 urah povsem izgubile svojo obliko, saj je hidratacija  $-COO^-Na^+$  in  $-COO^-$  skupin tako velika, da mikrosfer ne moremo več stehati, po 8-ih urah pa ogrodje popolnoma razpade.

Vpliv različnih medijev na erozijo je manjši in razlike niso tako očitne kot pri nabrekanju (*slike 23, 25 in 27*). Tako kot pri nabrekanju smo tudi za erozijo dobili podobne rezultate v primeru vodne raztopine HCl (*slika 23*) in prečiščene vode (*slika 25*), medtem ko je bilo odstopanje v primeru fosfatnega pufru (*slika 27*) precej večje.

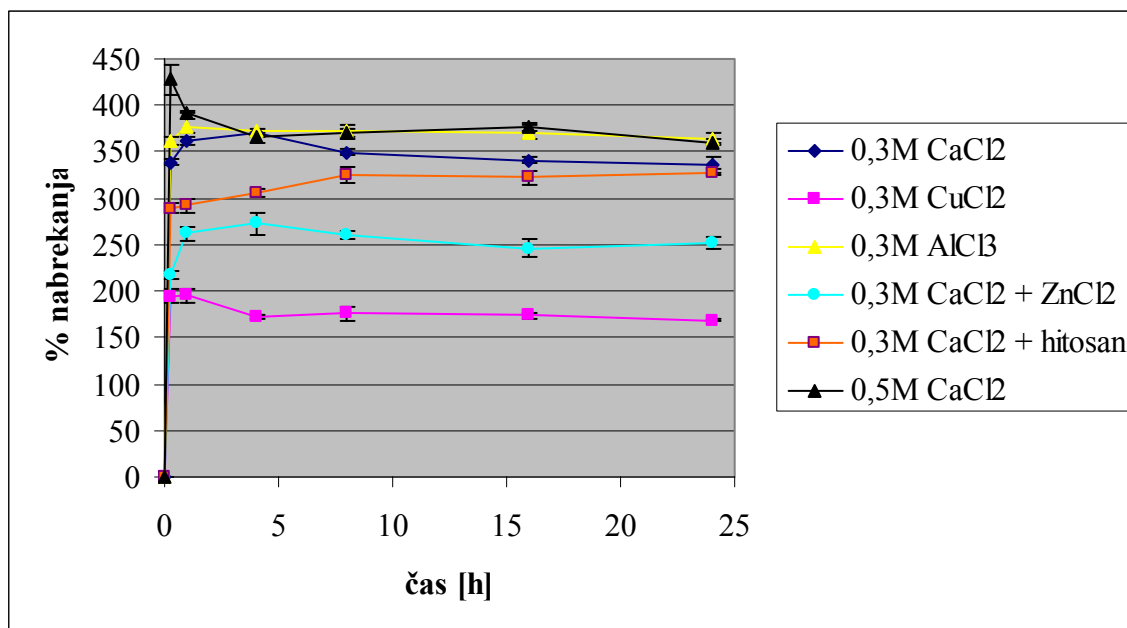
Različni kationi imajo precej velik vpliv na nabrekanje alginatnega ogrodja, saj je pri  $pH = 3$  (*slika 22*) razlika v nabrekanju med mikrosferami premreženimi z  $Cu^{2+}$  ioni, ki so najmanj nabrekale in tistimi, ki so premrežene z  $0,5M Ca^{2+}$  ioni in so nabrekale najbolj, kar 150%. Med mikrosferami premreženimi z  $0,3M Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  in hitosansko ovojnico ter kombinacijo  $Ca^{2+}$  in  $Zn^{2+}$  ionov so razlike manjše. Mikrosfere premrežene z  $Cu^{2+}$  ioni zaradi večje afinitete kationov do alginata (največjo afiniteto imajo  $Cu^{2+}$  ioni, nekoliko

manjšo  $\text{Ca}^{2+}$ , še manjšo pa  $\text{Zn}^{2+}$  in  $\text{Al}^{3+}$  ioni) (8) nabrekajo manj kot mikrosfere premrežene s  $\text{Ca}^{2+}$  ioni. Prav tako mikrosfere premrežene s trivalentnim kationom ( $\text{Al}^{3+}$ ) nabrekanjo bolj kot tiste, ki so premrežene z dvovalentnimi ioni, saj  $\text{Al}^{3+}$  ioni premrežijo alginatni matriks v treh plasteh (8), nastali gel pa je organoleptično šibkejši in manj gost, kot tisti v primeru premreženja z dvovalentnimi kationi, čeprav literaturni podatki navajajo ravno nasprotno (48). To je tudi razlog za močno nabrekanje mikrosfer premreženih z  $\text{Al}^{3+}$  ioni. Če primerjamo nabrekanje mikrosfer premreženih z 0,5M in 0,3M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, so nas rezultati presenetili, saj smo pričakovali, da bodo mikrosfere premrežene z nižjo koncentracijo kationa nabrekale bolj kot tiste premrežene z višjo. Podoben trend lahko opazimo tudi pri eroziji (*slika 23*), čeprav smo pričakovali, da bo alginatno ogrodje premreženo z višjo koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov tvorilo bolj čvrst gel in bo erozija posledično manjša. Poleg tega pa je pri manjši koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  ionov več prostih, nepremreženih karboksilnih skupin, ki niso ionizirane, zaradi česar je tudi nabrekanje manjše. Mikrosfere premrežene samo s  $\text{Ca}^{2+}$  ioni nabrekajo bolj kot tiste, ki smo jih premrežili s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov, kar lahko razložimo z dejstvom, da  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ioni premrežujejo na različnih mestih in s tem tvorijo bolj čvrst gel. Po drugi strani pa so  $\text{Ca}^{2+}$  ioni nekoliko večji ter imajo večjo afiniteto do alginata kot  $\text{Zn}^{2+}$  ioni, ampak v tem primeru ima premreževanje na različnih mestih očitno večji vpliv na nabrekanje, saj so rezultati pokazali, da mikrosfere premrežene s kombinacijo ionov nabrekajo manj.

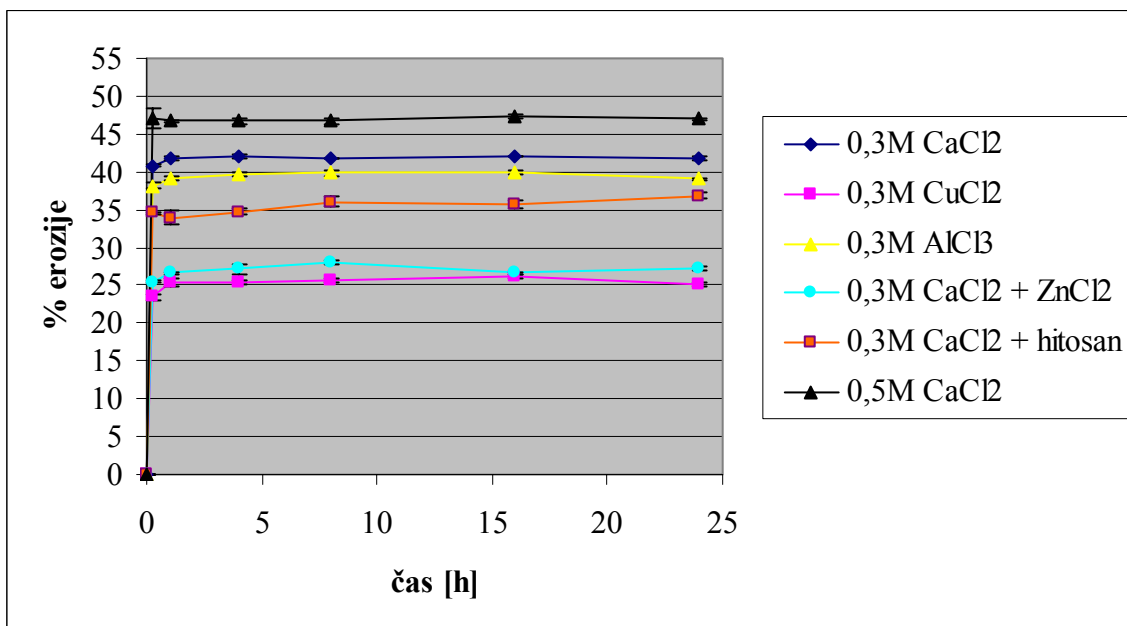
Rezultati nabrekanja v prečiščeni vodi (*slika 24*) se od tistih v vodni raztopini HCl nekoliko razlikujejo. Največje odstopnje opazimo pri mikrosferah premreženih z  $\text{Al}^{3+}$  ioni in 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni, ki so v  $\text{pH} = 3$  nabrekale enako, medtem ko v prečiščeni vodi mikrosfere premrežene s trivalentnim kationom nabrekajo precej bolj (približno 200%). V prečiščeni vodi zasledimo tudi razliko v nabrekanju alginatnega ogrodja premreženega z 0,3M in 0,5M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, saj v tem primeru mikrosfere premrežene z nižjo koncentracijo nabrekajo bolj, kar se ujema z našim predvidevanjem o tvorbi manj čvrstega gela. Podobne rezultate pa dobimo tako v prečiščeni vodi kot tudi v vodni raztopini HCl v primeru mikrosfer premreženih s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov in tistih, premreženih s samimi  $\text{Cu}^{2+}$  ioni, saj imajo zaradi tvorbe čvrstega gela, velikosti ionov ter velike afinitete do alginata manjše nabrekanje kot mikrosfere premrežene s preostalimi kationi. Med medijema s  $\text{pH} = 3$  in  $\text{pH} = 5,5$  pa lahko opazimo tudi razliko pri mikrosferah premreženih s  $\text{Ca}^{2+}$  ioni in dodatno hitosansko ovojnico, saj le te v prečiščeni vodi nabrekajo bolj kot v vodni raztopini HCl.

V mediju s  $\text{pH} = 3$  izkazuje največjo erozijo (dobrih 45%) mikrosfere premrežene z 0,5M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, najmanj (približno 25%) pa erodirajo mikrosfere premrežene z  $\text{Cu}^{2+}$  ioni in kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov. Erozijska mikrosfer premreženih z ostalimi kationi ( $0,3\text{M Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  s hitosansko ovojnico) se giblje med 35% in 42%. Če primerjamo sliki 22 in 23, ki prikazujeta nabrekanje in erozijo v vodni raztopini HCl, lahko opazimo, da imajo tako največje nabrekanje kot tudi erozijo alginatne mikrosfere s premrežene z 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni. V mediju s  $\text{pH} = 3$  tako premrežene mikrosfere najbolj nabrekajo, hkrati pa dopuščajo erodiranje alginatnega ogrodja v medij. Podobno si lahko razlagamo tudi povezavo med nabrekanjem in erozijo mikrosfer premreženih s trivalentnim kationom, medtem ko alginatne mikrosfere z dodatno hitosansko ovojnico nabrekajo malce manj kot mikrosfere premrežene z 0,3M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni, hkrati pa imajo tudi manjšo erozijo. Iz tega lahko sklepamo, da dodaten hitosanski ovoj, verjetno zaradi prisotnosti laktoze in NaCl, ne prepreči popolnoma privzema medija v notranjost ogrodja, vendar pa ga delno zadrži, hkrati pa ojača alginatni matriks, kar povzroči nastanek bolj čvrstega gela in s tem prepreči erodiranje le-tega v medij za nabrekanje.

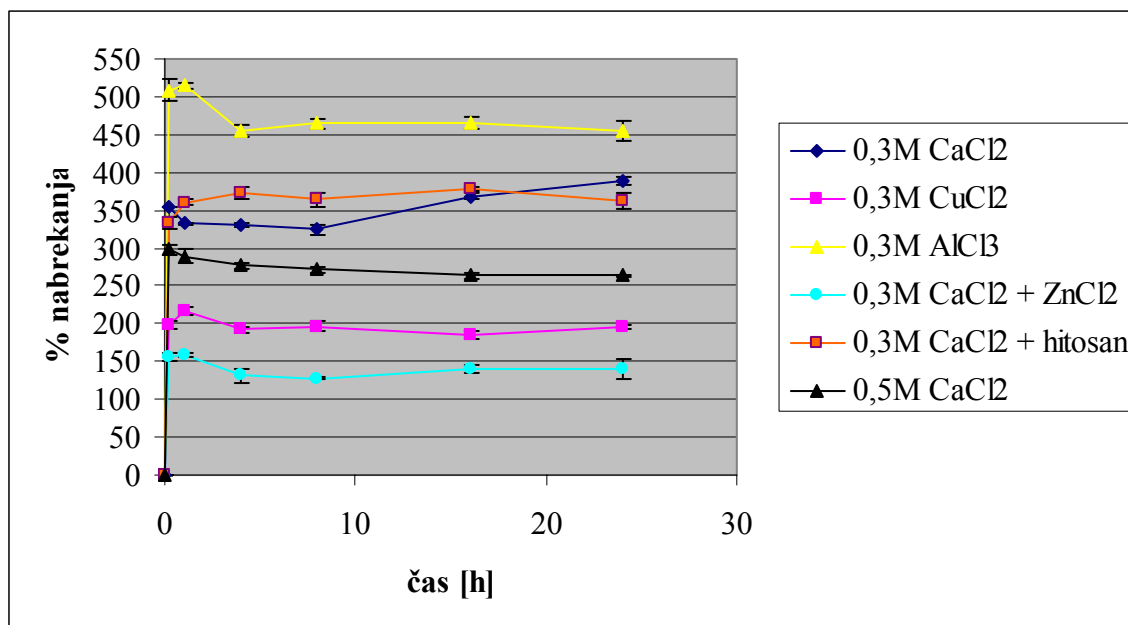
Stopnja erozije v prečiščeni vodi (*slika 25*), se od tiste v vodni raztopini HCl malenkostno razlikuje. Mikrosfere premrežene s trivalentnim kationom imajo zaradi že prej opisanih lastnosti nastalega gela največjo erozijo, hkrati pa tudi nabrekanje. Tudi mikrosfere z dodatno hitosansko ovojnico izkazujejo enake rezultate v obeh omenjenih medijih. Hitosanska ovojnica zadrži erozijo ogrodnega matriksa, saj verjetno tvori kompleks z alginatom, čeprav smo pričakovali, da se bo hitosan, ki je topen v kislem mediju, pri  $\text{pH} = 3$  raztopil in s tem močno vplivala na erozijo mikrosfer. Glede na najmanjšo stopnjo nabrekanja v prečiščeni vodi, ki jo izkazujejo mikrosfere premrežene s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov smo pričakovali, da bo erozijska omenjenih mikrosfer najmanjša, vendar pa so v mediju s  $\text{pH} = 5,5$  najmanj erodirale mikrosfere premrežene z  $\text{Cu}^{2+}$  ioni. Vzrok najmanjše erozije Cu-alginata je verjetno v največji afiniteti  $\text{Cu}^{2+}$  ionov do alginatnih verig. Mikrosfere premrežene s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov imajo tako manjšo erozijo kot tiste iz samega Ca-alginata, saj kombinacija  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov povzroči nastanek bolj čvrstega gela, ki zadrži erodiranje matriksa. Rezultati erozije mikrosfer premreženih z 0,3M in 0,5M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov se ujemajo z rezultati nabrekanja v mediju z isto  $\text{pH}$  vrednostjo, saj Ca-alginat premrežen z višjo koncentracijo ionov tako manj nabreka kot tudi erodira, kot tisti premrežen z nižjo koncentracijo.



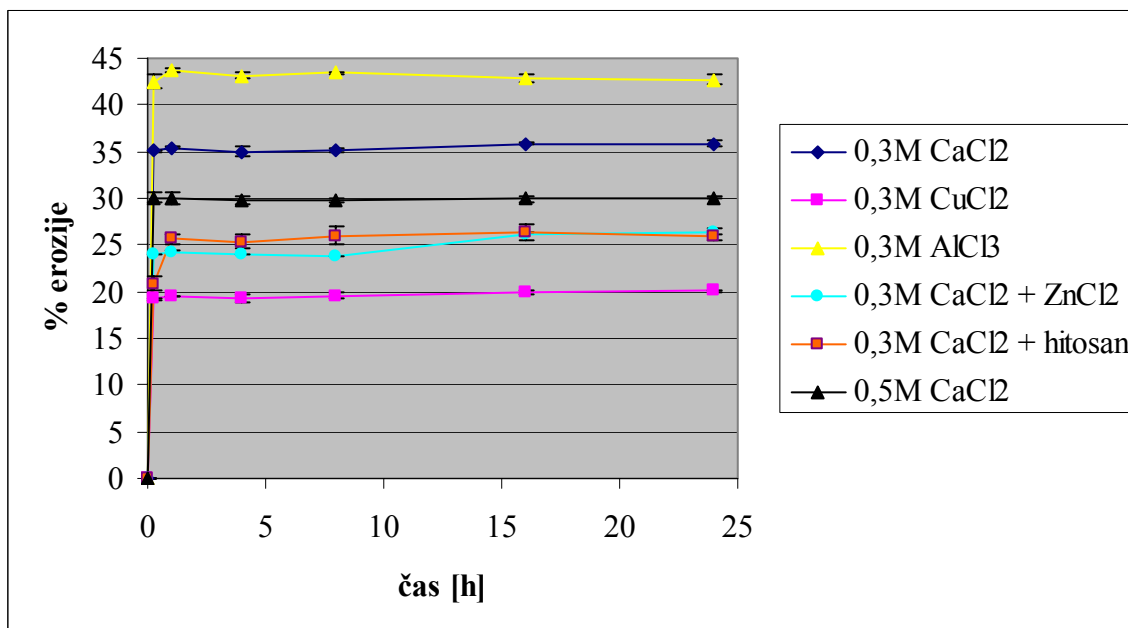
*Slika 22: Vpliv različnih premreževalnih kationov na nabrekanje alginatnih mikrosfer v vodni raztopini HCl s pH = 3; n = 3.*



*Slika 23: Vpliv različnih premreževalnih kationov na erozijo alginatnih mikrosfer v vodni raztopini HCl s pH = 3; n = 3.*



*Slika 24: Vpliv različnih premreževalnih kationov na nabrekanje alginatnih mikrosfer v prečiščeni vodi s pH = 5,5; n = 3.*



*Slika 25: Vpliv različnih premreževalnih kationov na erozijo alginatnih mikrosfer v prečiščeni vodi s pH = 5,5; n = 3.*

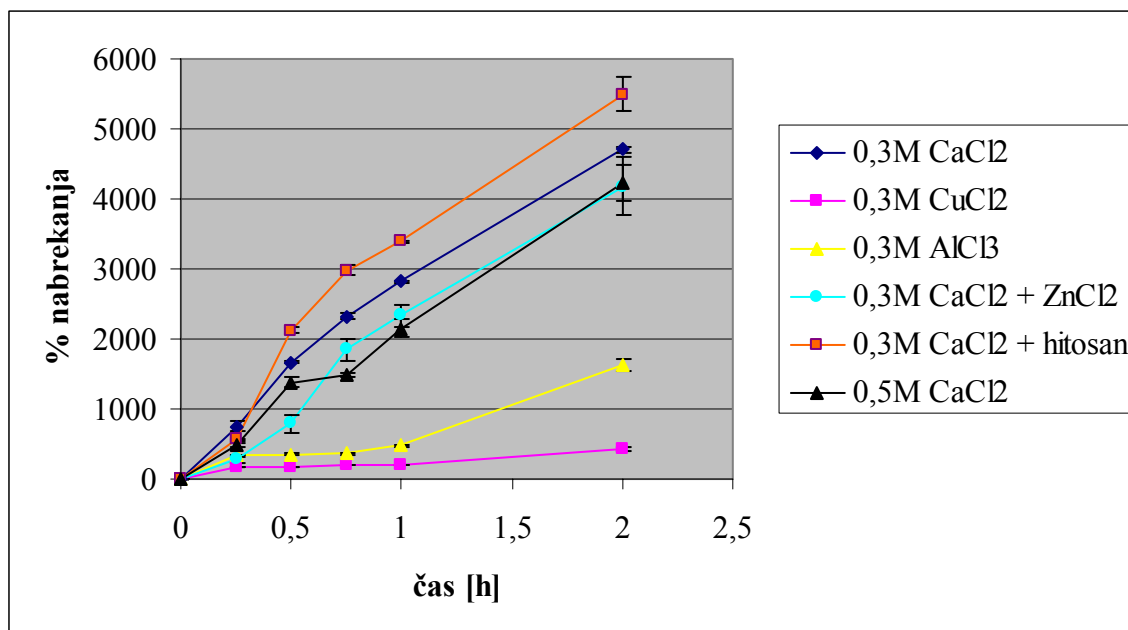
Alginatni matriks zaradi svoje značilne sestave in pKa vrednosti, ki jo imajo ostanki guluronske in manuronske kisline, najbolj nabreka v fosfatnem pufru s pH = 6,8. Na<sup>+</sup> ioni iz fosfatnega pufra se v začetni stopnji nabrekanja izmenjujejo s polivalentnimi kationi, ki povezujejo -COO<sup>-</sup> skupine pretežno v polimanuronskih blokih, v kasnejši stopnji pa pride tudi do izmenjave med Na<sup>+</sup> ioni in polivalentnimi kationi iz poliguluronskih blokov, kajti avto-kooperativna povezava je v poliguluronskih blokih močnejša kot v polimanuronskih, zato pride do izmenjave nekoliko kasneje. Tako nastane negativen elektrostatski naboj med -COO<sup>-</sup> skupinami, ki povzroči razrahljanje polimerne verige ter posledično nabrekanje alginatnega gela. Ca<sup>2+</sup> ioni tvorijo s fosfatnim pufrom netopen kalcijev fosfat, ki ostane suspendiran v mediju. V zadnji stopnji, ki predstavlja točko, v kateri alginatni matriks sprejme največjo količino medija za nabrekanje in se nato začne v njem raztapljati, difundirajo v medij tudi tisti dvovalentni kationi, ki sodelujejo v modelu »jajčnih škatel« (46, 47, 49).

Rezultati nabrekanja alginatnih mikrosfer v fosfatnem pufru s pH = 6,8 (*slika 26*) so precej drugačni od tistih v prečiščeni vodi in vodni raztopini HCl. Nabrekanje mikrosfer premreženih s katerimi koli ioni je v tem mediju kar 10 krat večje (izjema so mikrosfere premrežene z Cu<sup>2+</sup> in Al<sup>3+</sup> ioni) kot nabrekanje v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi; glavni vzrok za takšno odstopanje je predvsem zgoraj opisana izmenjava Na<sup>+</sup> ionov iz pufra in polivalentnih kationov, s katerimi je premreženo alginatno ogrodje, poleg tega pa se le-to v bazičnem mediju tudi raztaplja. Največje nabrekanje (dobrih 5000%) v mediju s pH = 6,8 izkazujejo mikrosfere premrežene s Ca<sup>2+</sup> ioni in dodatno hitosansko ovojnico. Kot smo že opisali, predstavlja hitosanska ovojnica bariero, ki ne prepreči privzema medija v notranjost ogrodja, prepreči pa erodiranje matriksa, saj je hitosan v alkalnem mediju netopen poleg tega pa tvori komplekse z alginatom. V primerjavi z nabrekanjem v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi v tem mediju nekoliko bolj nabrekajo tudi mikrosfere premrežene s kombinacijo Ca<sup>2+</sup> in Zn<sup>2+</sup> ionov, medtem ko je nabrekanje alginatnega ogrodja premreženega z Cu<sup>2+</sup> ioni, iz istega razloga kot v ostalih medijih, tudi v fosfatnem pufru najmanjše (približno 500%). Nasprotno rezultate od nabrekanja v medijih s pH = 3 in pH = 5,5 smo v fosfatnem pufru dobili še v primeru mikrosfer premreženih z Al<sup>3+</sup> ioni. V mediju s pH = 6,8 so omenjene mikrosfere nabrekale bistveno manj kot v ostalih dveh medijih. Razlika v nabrekanju mikrosfer premreženih z različnima koncentracijama Ca<sup>2+</sup>

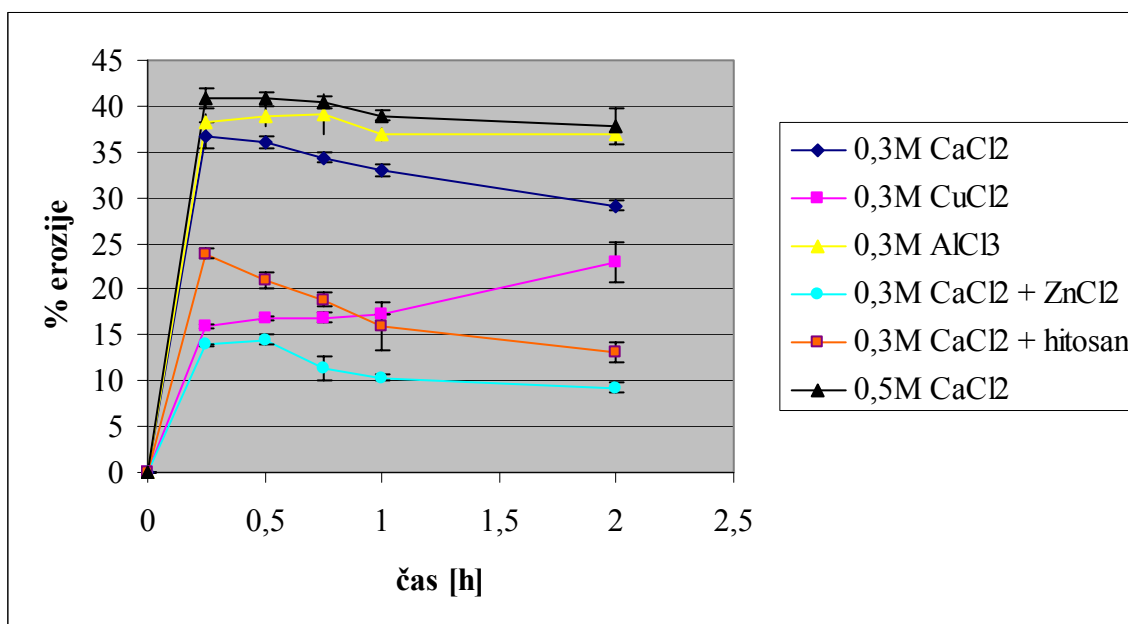
ionov je v fosfatnem pufru podobna kot v prečiščeni vodi, medtem ko v vodni raztopini HCl dobimo ravno nasprotno vrednosti.

Vpliv fosfatnega pufra na erozijo (*slika 27*) ni tako velik kot vpliv na nabrekanje. Razlika med mikrosferami, ki erodirajo najbolj (slabih 40%) in tistimi, ki najmanj (približno 10 %), je sicer v tem mediju malenkostno večja kot v ostalih dveh, vendar v primerjavi z razliko v nabrekanju komaj opazna. Najmanj erodirajo mikrosfere spremrežene s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov, čeprav je nabrekanje le-teh precej veliko in smo pričakovali, da bodo najmanj nabrekale mikrosfere iz Cu-alginata, saj so le-te v bazičnem mediju najmanj nabrekale, poleg tega pa so v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi tudi najmanj erodirale. Podoben preobrat opazimo tudi pri mikrosferah premreženih s trivalentnim kationom, ki imajo v  $\text{pH} = 6,8$  zelo zadržano nabrekanje, medtem ko je erozija skoraj največja. Tako kot v vodni raztopini HCl imajo tudi v fosfatnem pufru mikrosfere premrežene z 0,5M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov večje nabrekanje kot tiste premrežene z nekoliko nižjo koncentracijo omenjenega iona (0,3M), medtem ko je nabrekanje mikrosfer premreženih z nižjo koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov večje.

V fosfatnem pufru so najbolj nabrekale mikrosfere z dodatno hitosansko ovojnico, medtem ko je bila erozija slednjih zelo majhna; manjša kot v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi, kar se popolnoma ujema z dejstvom, da je hitosan v bazičnem mediju netopen in tako prepreči izplavljanje matriksa v medij. Na enak način lahko razložimo primerjavo med mikrosferami iz Ca-alginata in tistimi s hitosansko ovojnico, kajti tudi v tem primeru mikrosfere z ovojnico erodirajo manj kot tiste brez le-te.



*Slika 26: Vpliv različnih premreževalnih kationov na nabrekanje alginatnih mikrosfer v fosfatnem pufru s  $pH = 6,8$ ;  $n = 3$ .*



*Slika 27: Vpliv različnih premreževalnih kationov na erozijo alginatnih mikrosfer v fosfatnem pufru s  $pH = 6,8$ ;  $n = 3$ .*



## 4.2 VREDNOTENJE SPROŠČANJA FUROSEMIDA IZ ALGINATNIH MIKROSFER

Preskuse sproščanja smo naredili z namenom, da bi proučili vpliv različnih premreževalnih kationov na sproščanje furosemida iz alginatnih mikrosfer v različnih medijih. V alginatni matriks mikrosfer premreženih z različnimi kationi smo suspendirali slabo topno in slabo permeabilno zdravilno učinkovino furosemid in nato spremljali sproščanje le-te v različnih medijih. Podobno kot pri vrednotenju nabrekanja in erozije, smo tudi v tem primeru poleg vpliva medija in premreževalnih kationov spremljali tudi vpliv pomožnih snovi (laktoza in NaCl) na sproščanje vgrajene modelne učinkovine.

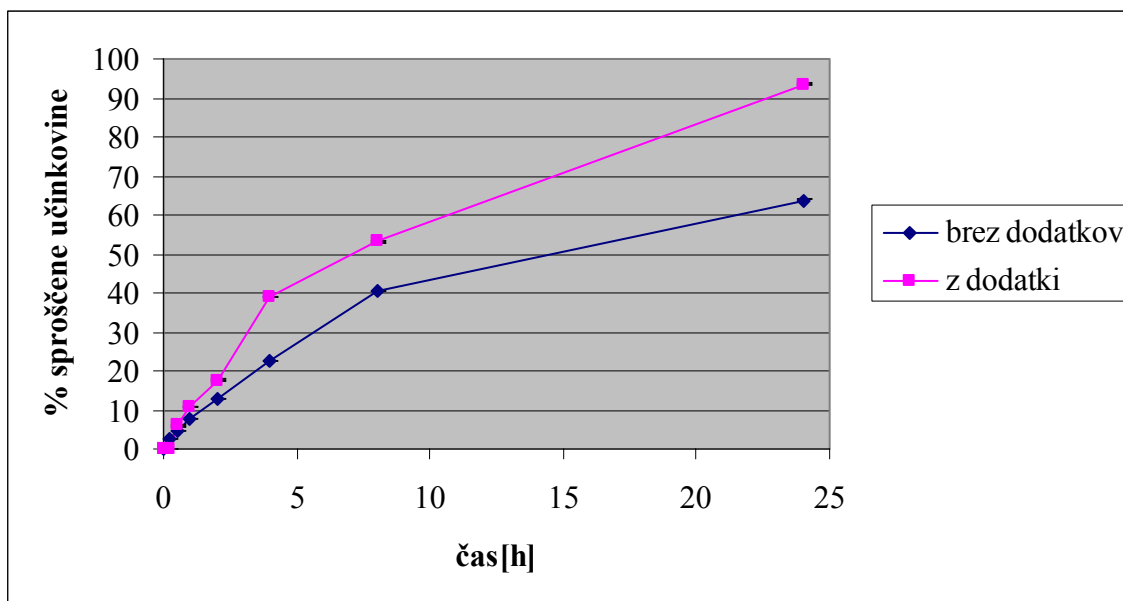
### 4.2.1 VPLIV DODANIH POMOŽNIH SNOVI (LAKTOZA IN NATRIJEV KLORID) NA SPROŠČANJE

Vpliv dodanih pomožnih snovi na sproščanje furosemida iz alginatnih mikrosfer smo proučevali s primerjavo dveh serij mikrosfer; prva serija je poleg 1,5% natrijevega alginata in 0,5% zdravilne učinkovine vsebovala tudi 5% laktoze in 1% NaCl, medtem ko drugi seriji laktoze in NaCl nismo dodali. Sproščanje učinkovine je potekalo v treh različnih medijih, kar prikazujejo slike 28-30.

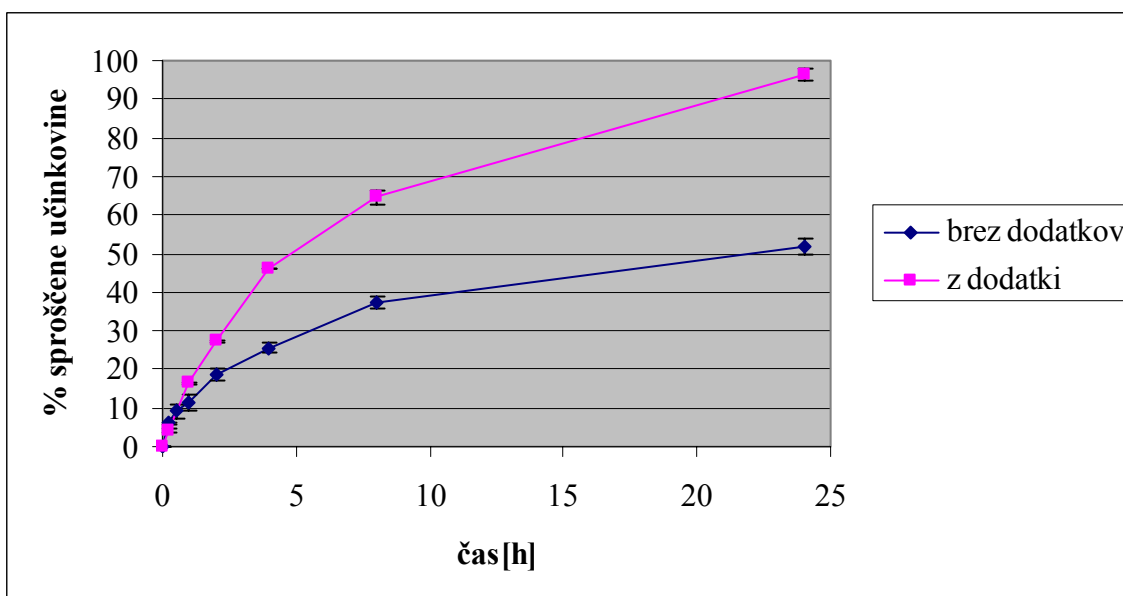
Iz slik lahko razberemo, da tako pH medija kot tudi dodani pomožni snovi laktoza in NaCl vplivajo na delež sproščene zdravilne učinkovine iz alginatnih mikrosfer. Glede na to, da sta bila nabrekanje in erozija mikrosfer v vseh medijih večja v primeru alginatnega ogrodja z dodanimi pomožnimi snovmi, smo pričakovali, da bo tudi sproščanje učinkovine iz Ca-alginata z dodano laktozo in NaCl potekalo hitreje in v večjem obsegu kot iz tistih, katerim pomožnih snovi nismo dodali. Delež sproščene učinkovine je bil po naših pričakovanjih v vseh treh medijih večji v primeru mikrosfer z dodanimi pomožnimi snovmi, le hitrost sproščanja se je od medija do medija razlikovala. V vseh treh medijih se je iz mikrosfer z dodatki po 24-ih urah (v fosfatnem pufru že po 4-ih urah) sprostilo skoraj 100% učinkovine, medtem ko se je v pH = 3 (*slika 28*) iz mikrosfer iz samega Ca-alginata v istem časovnem intervalu sprostilo le 55% furosemida, v pH = 5,5 (*slika 29*) dobrih 40% ter v fosfatnem pufru (*slika 30*) skoraj 100%. Nabrekanje in delež sproščene učinkovine v kislem mediju in prečiščeni vodi dajeta podobne rezultate, delež sproščenega

furosemida v fosfatnem pufru iz mikrosfer brez dodanih pomožnih snovi pa je bistveno večji, medtem ko je v primeru dodane laktoze in NaCl enak (skoraj 100%). V fosfatnem pufru pa se bistveno razlikuje hitrost sproščanja učinkovine, saj se je iz mikrosfer z dodatki po 4 urah sprostito skoraj 100% furosemida, medtem ko se je v mediju s pH = 3 sprostito le 30%, v prečiščeni vodi pa slabih 50%; dobljeni podatki potrjujejo, da je sproščanje v prečiščeni vodi in vodni raztopini HCl bistveno počasnejše. Takšno odstopanje je verjetno posledica razlik predvsem v nabrekanju alginatnega ogrodja. Erozijska mikrosfer, tako z dodanimi pomožnimi snovmi kot tudi brez njih, se od medija do medija bistveno ne razlikuje, zato predpostavljamo, da tudi na delež sproščene učinkovine nima večjega vpliva. Nasprotno od tega lahko v literaturi zasledimo podatke, da je sproščanje slabo vodotopnih učinkovin iz hidrofilnih ogrodij odvisno predvsem od erozije le-teh (48, 50, 51).

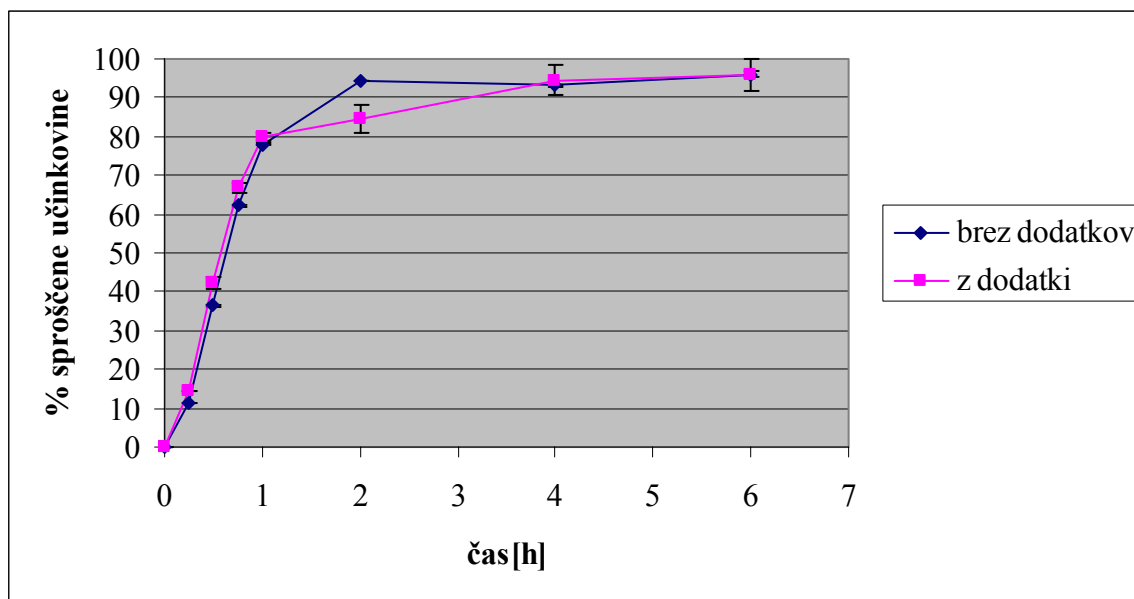
V primeru alginatnih mikrosfer s pomožnimi snovmi je sproščanje furosemida najhitrejše v fosfatnem pufru, v katerem so mikrosfere tudi najbolj nabrekale. Večja hitrost in obseg sproščene furosemida iz mikrosfer z dodanimi pomožnimi snovmi je verjetno posledica delnega raztapljanja le-teh v mediju ter posledičnega nastanka por v ogrodju mikrosfer. Slednje olajšajo privzem medija v ogrodje, s čimer povečajo nabrekanje le-tega, posledično pa se tako lahko sprosti več vgrajene učinkovine.



**Slika 28:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na delež sproščenega furosemda (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v vodni raztopini HCl s  $pH = 3$ ;  $n = 3$ .



**Slika 29:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na delež sproščenega furosemda (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3M Ca^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v prečiščeni vodi s  $pH = 5,5$ ;  $n = 3$ .



**Slika 30:** Vpliv dodanih pomožnih snovi (5% laktoze in 1% NaCl) na delež sproščenega furosemida (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z 0,3M  $Ca^{2+}$  ioni v fosfatnem pufru s  $pH = 6,8$ ;  $n = 3$ .

#### 4.2.2 VPLIV pH MEDIJA IN PREMREŽEVALNIH KATIONOV NA SPROŠČANJE

Vpliv pH medija na sproščanje vgrajene učinkovine smo proučevali na mikrosferah, ki smo jih izdelali tako, da smo v alginatnem matriksu, kateremu smo predhodno dodali laktozo in NaCl, suspendirali 0,5% modelne učinkovine (furosemid), nato pa mikrosfere premrežili z različnimi kationi. Slike 31-33 prikazujejo vpliv pH medija in premreževalnih kationov na delež sproščenega furosemida v odvisnosti od časa.

Če primerjamo vpliv pH medija na delež sproščenega furosemida iz alginatnega ogrodja z njegovim vplivom na nabrekanje praznih mikrosfer vidimo, da rezultati slednjih izkazujejo podoben trend. Modelna učinkovina se najhitreje in v največjem obsegu sprosti iz alginatnega ogrodja v fosfatnem pufru (*slika 33*), medtem ko sta hitrost in delež sproščenega furosemida v medijih s  $pH = 3$  (*slika 31*) in  $pH = 5,5$  (*slika 32*) manjša, med njima pa ni bistvene razlike. To se povsem ujema z rezultati nabrekanja, kjer je alginatno ogrodje najbolj nabrekalo v fosfatnem pufru, v preostalih dveh medijih pa precej manj. Nasprotno pa je bila erozija alginatnega ogrodja v vseh medijih precej podobna, zato sklepamo, da na sproščanje furosemida erozija nima bistvenega vpliva.

Kot smo že omenili, smo proučevali tudi vpliv premreževalnih ionov na sproščanje furosemda v različnih medijih. Največji vpliv premreževalnega iona smo opazili v vodni raztopini HCl, medtem ko je razlika v količini sproščene učinkovine iz alginatnih mikrosfer premreženih z različnimi ioni v fosfatnem pufru minimalna (izjema so  $\text{Cu}^{2+}$  ioni).

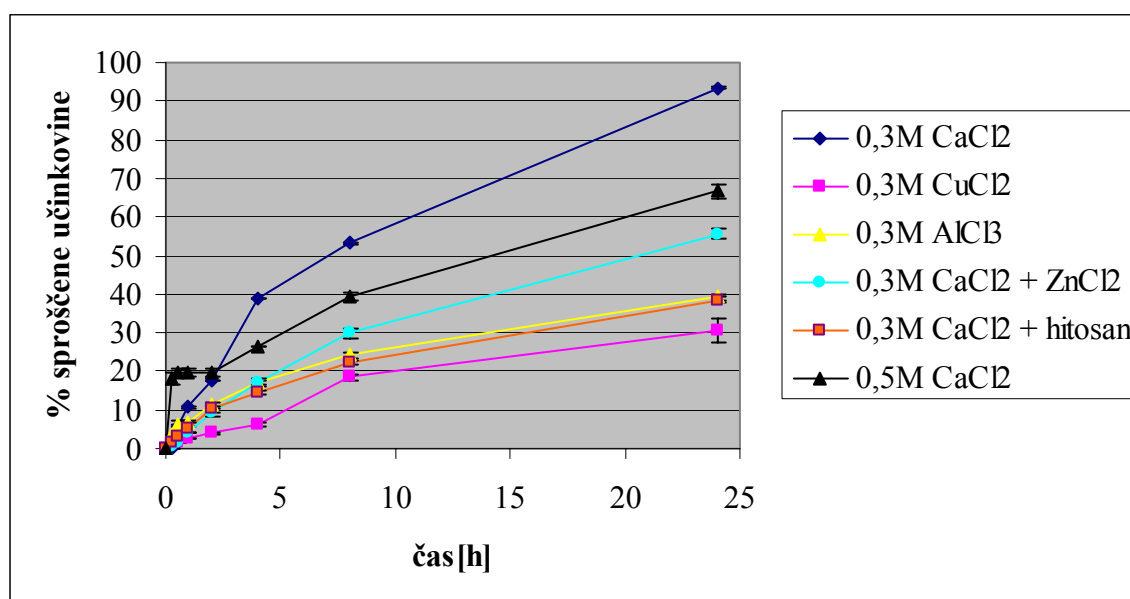
V vodni raztopini HCl se furosemid v 24-ih urah najhitreje in v največjem obsegu sprosti iz mikrosfer premreženih z 0,3M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni in sicer dobrih 90%, nekoliko manj kot 70% se ga sprosti iz mikrosfer premreženih z 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni, še manj, dobrih 50% pa iz tistih, premreženih s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov in slabih 40% iz mikrosfer s hitosansko ovojnico. To se ujema z našimi pričakovanji in literaturnimi podatki, ki navajajo, da večja koncentracija premreževalnega kationa tvori bolj čvrst gel in s tem posledično zadrži sproščanje furosemda, medtem ko tudi  $\text{Zn}^{2+}$  ioni pripomorejo k bolj čvrstemu gelu s premreženjem na drugih mestih kot sami  $\text{Ca}^{2+}$  ioni. Dodatna hitosanska ovojnica sicer omogoča privzem medija v notranjost alginatnega ogrodja, vendar pa prepreči njegovo erozijo hkrati pa tudi oteži difuzijo učinkovine v okolico, zato je tudi delež sproščene furosemda iz mikrosfer z dodatno hitosansko ovojnico manjši kot iz samega Ca-alginata. Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri nabrekanju in eroziji v kislem mediju pa smo pričakovali, da bo sproščanje furosemda iz mikrosfer, premreženih z večjo koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov hitrejše in v večjem obsegu, saj so le-te bolj nabrekale kot tudi erodirale od tistih premreženih z nižjo koncentracijo iona. Do 2 ure je bilo sproščanje iz mikrosfer premreženih z 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni res hitrejše, potem pa se je upočasnilo. Podoben trend sproščanja kot iz mikrosfer z dodatno hitosansko ovojnico zasledimo tudi pri mikrosferah premreženih s trivalentnim  $\text{Al}^{3+}$  kationom, iz katerih se v 24-ih urah sprosti slabih 40% učinkovine. V primeru sproščanja iz alginatnega ogrodja premreženega z  $\text{Al}^{3+}$  ioni so tudi Das in sodelavci (48, 51) dokazali, da je sproščanje iz le-teh zadržano, kar je posledica zmožnosti tvorjenja tridimenzionalne strukture  $\text{Al}^{3+}$  ionov z Na-alginatom v notranjosti mikrosfer. V naših poskusih pa smo Na-alginatu dodali tudi pomožno snov NaCl, ki tako še dodatno vpliva na izmenjavo kationov med seboj. Posledica slednjega je premreženje celotnega ogrodja in nastanek čvrstih mikrosfer, ki organoleptično izgledajo povsem drugače, vendar pa privzamejo le malo medija. Vse to je vzrok, da sta tako nabrekanje kot tudi sproščanje iz takšnega ogrodja zadržana.

V vodni raztopini HCl zasledimo najbolj zadržano sproščanje iz mikrosfer, premreženih z  $\text{Cu}^{2+}$  ioni, iz katerih se po enakem času kot iz ostalih mikrosfer sprostijo le 30% učinkovine. Tako majhen delež sproščenega furosemida lahko razložimo z največjo afiniteto  $\text{Cu}^{2+}$  ionov do alginatnih verig in s tem tvorbo najbolj čvrstega gela. Poleg tega pa sta tudi nabrekanje in erozija ogrodja manjša kot pri mikrosferah premreženih z  $\text{Al}^{3+}$  ioni.

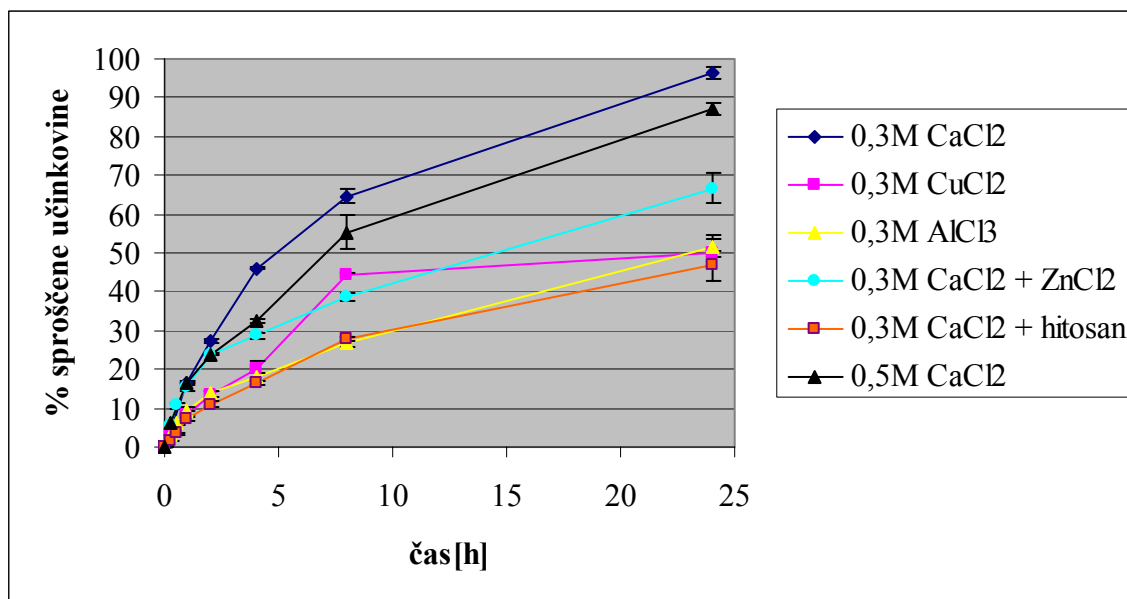
V literaturi sproščanje furosemida iz alginatnega ogrodja pogosto razlagajo tudi z vplivom velikosti premreževalnega iona na poroznost ogrodja (48, 51). Das in sodelavci so ugotovili, da je sproščanje furosemida iz Ba-alginata počasnejše kot iz Ca-alginata, kar so razložili s povečano velikostjo  $\text{Ba}^{2+}$  ionov, ki tako vplivajo na zmanjšano poroznost alginatnega ogrodja in posledično otežen privzem medija v notranjost le-tega. V fosfatnem pufri bi imela izmenjava  $\text{Ba}^{2+}$  in  $\text{Na}^+$  ionov iz medija ter odstranjevanje  $\text{Ba}^{2+}$  ionov v obliki netopnega Ba-fosfata za posledico oteženo nabrekanje in zadržano sproščanje vgrajenega furosemida. Podobno bi lahko razložili vpliv velikosti premreževalnih kationov, ki smo jih uporabili v našem raziskovalnem delu, kjer njihova velikost pada v naslednjem vrstnem redu:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Al}^{3+}$ , pri čemer večji ioni zapolnijo pore in zadržijo privzem medija ter sproščanje učinkovine, hkrati pa ovirajo izmenjavo z  $\text{Na}^+$  ioni (48, 50). Vendar pa dodatek NaCl, ki smo ga dodali Na-alginatu, omogoča nastanek por, kar vpliv velikosti ionov na sproščanje furosemida izniči. Glede na vse dobljene rezultate pa lahko rečemo, da erozija, ne glede na to, da literaturni podatki navajajo, da je sproščanje slabo vodotopnih učinkovin iz hidrofilnih ogrodiv odvisno predvsem od le-te, nima velikega vpliva (48, 50, 51).

Popolnoma enak trend sproščanja furosemida kot v vodni raztopini HCl zasledimo v prečiščeni vodi, le da je v tem mediju največja sproščena koncentracija po 24-ih urah sproščanja nekoliko višja, ne glede na to, s katerimi ioni smo premrežili alginatno ogrodje. Tako se je iz mikrosfer, premreženih z 0,3M koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v omenjenem časovnem intervalu sprostil 95% furosemida, iz mikrosfer premreženih z 0,5M  $\text{Ca}^{2+}$  ioni dobrih 90%, iz tistih s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov skoraj 70%, ter vseh ostalih (mikrosfere premrežene z  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  in dodatno hitosansko ovojnico) približno 50%. Dobljeni rezultati se popolnoma ujemajo s tistimi, ki smo jih dobili v vodni raztopini HCl. V fosfatnem pufri s  $\text{pH} = 6,8$  so rezultati nekoliko drugačni. Količina sproščenega furosemida je po 6-ih urah sproščanja iz vseh mikrosfer skoraj 100% (izjema so mikrosfere premrežene z  $\text{Cu}^{2+}$  ioni, ki imajo poleg izjemno upočasnjenega sproščanja glede na sproščanje v ostalih medijih tudi zelo slabo ponovljivost, ki je lahko posledica

nehomogenega premreženja), medtem ko se hitrost sproščanja nekoliko razlikuje. Najhitreje se je učinkovina sprostil iz mikrosfer premreženih z  $0,5\text{M Ca}^{2+}$  ioni in sicer se je po 1 uri sproščanja v medij sprostil 90% učinkovine, iz  $0,3\text{M}$  koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ionov 80%, iz mikrosfer s hitosansko ovojnico 70%, iz tistih s kombinacijo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  ionov dobrih 40%, nekoliko manj iz Al-alginata, ter samo 5% iz mikrosfer premreženih z  $\text{Cu}^{2+}$  ioni. Delež sproščenega furosemida iz mikrosfer premreženih z vsemi kationi, je v tem mediju tako visok zaradi razpada alginatnega ogrodja, ki se po določenem času popolnoma raztopi. Hitosanska ovojnica v fosfatnem pufru zmanjša raztapljanje alginata in s tem prepreči sproščanje furosemida v medij, kar potrjuje tudi rezultat erozije, zato smo pričakovali, da bo sproščanje iz mikrosfer z dodatno hitosansko ovojnico počasnejše. Dobljeni rezultati so to tudi potrdili. Sproščanje iz mikrosfer premreženih z  $\text{Al}^{3+}$  ioni je bilo, ne glede na to, da so močno erodirale ter nekoliko manj nabrekale, precej zadržano.

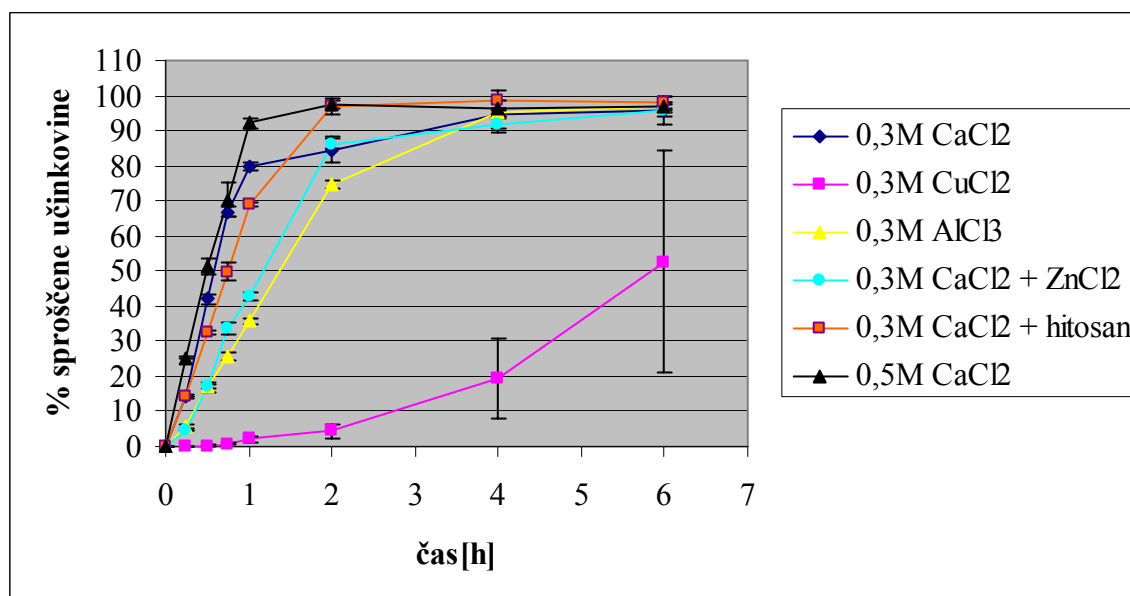


*Slika 31: Vpliv različnih kationov na delež sproščenega furosemida (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z  $0,3\text{M Ca}^{2+}$  ioni v odvisnosti od časa v vodni raztopini HCl s  $\text{pH} = 3$ ;  $n = 3$ .*



*Slika 32: Vpliv različnih kationov na delež sproščenega furosevida (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z 0,3M Ca<sup>2+</sup> ioni v odvisnosti od časa v prečiščeni vodi s pH = 5,5;*

*n = 3.*



*Slika 33: Vpliv različnih kationov na delež sproščenega furosevida (%) iz alginatnih mikrosfer premreženih z 0,3M Ca<sup>2+</sup> ioni v odvisnosti od časa v fosfatnem pufru s pH = 6,8;*

*n = 3.*



## 5. SKLEPI

Namen diplomskega dela je bila izdelava čvrstih in mehansko odpornih mikrosfer iz alginatnega ogrodja in proučevanje vpliva pH medija, pomožnih snovi (laktoza in NaCl) ter premreževalnih kationov na nabrekanje in erozijo le-teh, poleg tega pa tudi vpliv omenjenih parametrov na sproščanje furosemida kot modelne učinkovine.

Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

### VREDNOTENJE NABREKANJA IN EROZIJE

- Dodane pomožne snovi (laktoza in NaCl) vplivajo tako na nabrekanje kot erozijo alginatnih mikrosfer; povečajo poroznost, zato je nabrekanje v primeru mikrosfer z dodano laktozo in NaCl večje kot tistih in samega Ca-alginata. Podobno smo ugotovili tudi za erozijo, saj imajo mikrosfere brez dodatkov za približno 10% nižjo erozijo od tistih z dodano laktozo in NaCl.
- Poleg pomožnih snovi ima na nabrekanje in erozijo matriksa mikrosfer velik vpliv tudi medij, v katerem alginatne mikrosfere nabrekajo. Nabrekanje mikrosfer je v fosfatnem pufri kar 10 krat večje od tistega v prečiščeni vodi, medtem ko v nabrekanju v prečiščeni vodi in vodni raztopini HCl ni bistvene razlike. Vpliv pH medija na erozijo ni tako izrazit.
- Tretji parameter, za katerega smo dokazali, da tudi vpliva na nabrekanje, je vrsta premreževalnega kationa, njegova valenca, koncentracija in afiniteta le-tega do alginatnih verig. Nekoliko manjši vpliv kot na nabrekanje imajo omenjeni parametri na erozijo. Večja koncentracija premreževalnega iona tvori bolj čvrst gel zaradi česar alginatno ogrodje manj nabreka. Enak učinek dosežemo z ioni z višjo valenco ( $Al^{3+}$ ) ter tistimi, ki imajo večjo afiniteto do alginata ( $Cu^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ).

### VREDNOTENJE SPROŠČANJA FUROSEMIDA

- Sproščanje furosemida, je tako kot nabrekanje in erozija, odvisno dodanih pomožnih snovi, pH medija in premreževalnih kationov.
- Laktoza in NaCl povečata delež sproščene učinkovine na račun povečane poroznosti alginatnega ogrodja.

- Sproščanje furosemida iz alginatnega ogrodja je v fosfatnem pufru hitrejše in delež sproščene učinkovine je večji kot v vodni raztopini HCl in prečiščeni vodi.
- Tako kot na nabrekanje in erozijo, tudi na sproščanje učinkovine vplivajo vrsta, valenca in koncentracija premreževalnega kationa ter afiniteta le-tega do alginatnega matriksa. Sproščanje iz alginatnega ogrodja z bolj čvrsto strukturo, je tako kot nabrekanje, zakasnjeno.
- Ne glede na to, da literaturni podatki navajajo, da ima erozija največji vpliv na sproščanje furosemida iz alginatnih mikrosfer pa smo dokazali, da na sproščanje učinkovine iz alginatnega ogrodja precej bolj vpliva nabrekanje le-tega kot pa njegova erozija.

## 6. LITERATURA

1. <http://www.scribd.com/doc/7347249/SPROANJE-IN-IVIVC>
2. Wong SM, Kellaway IW. Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water soluble drug by formation of surfactant-containing microparticles. *Int. J Pharm.* 2006; 317 (1): 61-68.
3. Park K, Yeo Y. Microencapsulation technology. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007: 2315-2327.
4. Vaje iz farmacevtske tehnologije. Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002, 20-25.
5. Jackson SJ, Lee K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*; 24(4): 289-297.
6. <http://www.swri.org/4org/d01/microenc/microen/default.htm>
7. Wang W, Liu X, Xie Y, Zhang H, Yu W, Xiong Y, Xie W, Ma X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J. Mater Chem* 2006; 16: 3252-3267.
8. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A: Alginat v dostavnih sistemih. *Farm. Vest.* 2008; 59: 293-301.
9. Sriamornsak P, Thirawong N, Korkerd K. Swelling, Erosion and Release Behaviour of Alginate-based Matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66: 435-450.
10. Mørch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. A study of the structure-function relationship in native and structurally engineering alginates. Thesis for the degree of doktor ingeniør. Thronheim, February 2008.
11. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31: 267-285.
12. Kovač V, Krbavčič A: Alginatna vlakna in alginatne obloge kot sanitetni in obvezilni material. *Farm. Vest.* 1999; 50: 41-52.
13. Webber RE, Shull KR, Strain Dependence of the Viscoelastic Properties of Alginate Hydrogels. *Macromolecules* 2004; 37: 6153-6160.
14. Roppa BS, Bhattacharya S. Alginate gels: Characterization of textural attributes. *Journal of Food Engineering* 2008; 85: 123-131.

15. Abramović Z, Kristl J. Inteligentni hidrogeli za dostavo zdravilnih učinkovin. *Farm. Vest.* 2004; 55: 555-563.
16. 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.
17. Bombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31: 267-285.
18. Agnihotri AS, Mallikarjuna NN, Aminabhavi MT. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2004; 100: 5-28.
19. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 603-632.
20. <http://www.kjemi.uio.no/Polymerkjemi/Research/Chitosan.htm>
21. Kerec KM. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm. Vest.* 2006; 57: 287-291.
22. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H: Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 27-46.
23. Coviello T, Matricardi P, Marianecci C, Alhaique F. Polysaccharide Hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* 2007; 119: 5-24.
24. Satish CS, Satish KP, Shivakumar HG. Hydrogels as Controlled Drug Delivery Systems. Synthesis, Crosslinking, Water and Drug Transport Mechanism. *Indian J. Pharm. Sci* 2006; 68 (2): 133-140.
25. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Informa Healthcare New York 2007; 3: 2021-2039.
26. Kumar R, Majeti NV. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *J. Pharm Pharmaceut Sci* 2000; 3(2): 234-258.
27. Gugerli R. Polyelectrolyte-complex and covalent-complex microcapsules for encapsulation of mammalian cells: potential and limitations. Thèse N° 2720. Présentée à la faculté sciences de base. Section de chimie et génie chimique. École polytechnique fédérale de Lausanne. Lausanne 2003.
28. Poncelet D. *Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications. Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science.* Springer Netherlands 2006: 23-34.

29. Serraton M, Newton M, Booth S, Clarke A. Controlled drug release from pellets containing water-insoluble drugs dissolved in a self-emulsifying system. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 65: 94-98.
30. Poncelet D. *Microencapsulation: Fundamentals, Methods and Application*, Enitaa, Rue de la Geraudiere BP 8225, 44322 Nantes Cedex 3, France
31. *Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE 50R*. 2002 Inotech Encapsulation AG. Dottikon. Switzerland.
32. [http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.antech.ie/products/copley/dis6000.jpg&imgrefurl=http://www.antech.ie/dis6000.shtml&usq=\\_\\_In8sdku3p2Kvl2axolFiCudQH0=&h=330&w=327&sz=21&hl=sl&start=7&um=1&tbnid=zeTMCHflj6r4oM:&tbnh=119&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Ddissolution%2Btest%26um%3D1%26hl%3Dsl%26client%3Dfirefox-a%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:sl:official%26hs%3Dz32%26sa%3DN](http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.antech.ie/products/copley/dis6000.jpg&imgrefurl=http://www.antech.ie/dis6000.shtml&usq=__In8sdku3p2Kvl2axolFiCudQH0=&h=330&w=327&sz=21&hl=sl&start=7&um=1&tbnid=zeTMCHflj6r4oM:&tbnh=119&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Ddissolution%2Btest%26um%3D1%26hl%3Dsl%26client%3Dfirefox-a%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:sl:official%26hs%3Dz32%26sa%3DN)
33. Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinez 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.
34. Bogataj M, Kristl A, Mrhar A, Kozjek F. Postopki priprave in kontrole mikrokapsul. *Farmacevtski vestnik* 1988; 39: 239-252.
35. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J. Samo(mikro)emulirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm. Vest.* 2008; 59: 263-268.
36. *The Merck Index*. 13<sup>th</sup> Ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station. NJ. USA 2001.
37. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4<sup>th</sup> Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association. London, Washington 2003.
38. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 603-632.
39. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Furosemide.svg>
40. *European Pharmacopoeia*. 6<sup>th</sup> Ed. Council of Europe. Strasbourg 2007.
41. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, 2003: *Pharmacology*, 5<sup>th</sup> edition.
42. Williams DA, Lemke TL. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 5<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins. Baltimore 2002: 525-526.

43. Klausner EA, Lavy E, Stepensky D, Cserepes E, Barta M, Friedman M, Hoffman A. Furosemide Pharmacokinetics and Pharmacodynamics following Gastroretentive Dosage Form Administration to Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 43: 711-720.
44. <http://www.statkit.com/files/pdfs/Furosemide-USP.pdf>
45. [http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.gate2tech.com/IMG/jpg/Jet\\_Cutter.jpg&imgrefurl=http://www.gate2tech.com/article.php3%3Fid\\_article%3D10&usq=oeWoljWv9sUqYMdu7x4DF5h1Kbk=&h=300&w=317&sz=33&hl=sl&start=5&um=1&tbnid=yb1twGtbRaaLgM:&tbnh=112&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Djet%2Bcutter%26hl%3Dsl%26lr%3D%26sa%3DN%26um%3D1](http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.gate2tech.com/IMG/jpg/Jet_Cutter.jpg&imgrefurl=http://www.gate2tech.com/article.php3%3Fid_article%3D10&usq=oeWoljWv9sUqYMdu7x4DF5h1Kbk=&h=300&w=317&sz=33&hl=sl&start=5&um=1&tbnid=yb1twGtbRaaLgM:&tbnh=112&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Djet%2Bcutter%26hl%3Dsl%26lr%3D%26sa%3DN%26um%3D1)
46. Bajpai SK, Shubhra S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *Reactive & Functional Polymers* 2004; 59: 129-140.
47. Smrdel P, Bogataj M, Zega A, Planinšek O, Mrhar A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation, *Journal of Microencapsulation* 2008; 25 (2): 90-105.
48. Das MK, Senapati PC. Furosemide-loaded Alginate Microspheres Prepared by Ionic Cross-linking Technique: Morphology and Release Characteristics. *Indian J. Pharm. Sci* 2008; 70 (1): 77-84.
49. Chan L. W, Ching AL, Liew CV, Sia Heng PW. Mechanistic study on hydration and drug release behaviour of sodium alginate compacts, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2007; 33: 667-676.
50. Efentakis M, Koutlis A. Release of Furosemide from Multiple-Unit and Single-Unit Preparations Containing Different Viscosity Grades of Sodium Alginate. *Pharmaceutical Development and Technology* 2001; 6 (1): 91-98.
51. Das MK, Senapati PC. Evaluation of Furosemide-Loaded Alginate Microspheres Prepared by Ionotropic External Gelation Technique. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2007; 64 (3): 235-262.