

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



KATARINA BOLKO

**OPTIMIZACIJA OVOJNICE MIKROKAPSUL S SAMO-  
MIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM**  
**SHELL OPTIMISATION OF MICROCAPSULES WITH SELF-  
MICROEMULSIFYING CORE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

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 delovni mentorici asist. dr. Alenki Zvonar za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvala tudi moji družini in prijateljem za vse razumevanje in podporo v času celotnega študija.

### **Izjava**

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

Katarina Bolko

Ljubljana, september 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Član diplomske komisije: doc. dr. Bojan Doljak

## KAZALO

KAZALO.....	I
POVZETEK .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1. UVOD .....	1
1.1. Na lipidih osnovani sistemi.....	2
1.2. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi.....	4
1.3. Tehnološki pristopi za izdelavo trdnih farmacevtskih oblik s S(M)ES .....	5
1.4. Mikrokapsule in mikrokapsuliranje .....	7
1.4.1. Ovojnica mikrokapsul .....	8
1.4.2. Mikrokapsuliranje .....	12
1.4.3. Metode ekstruzije curka .....	14
2. NAMEN DELA.....	18
3. MATERIALI IN METODE .....	19
3.1. Materiali .....	19
3.2. Metode .....	22
3.2.1. Naprave in pripomočki za izdelavo in vrednotenje mikrokapsul.....	22
3.2.2. Priprava jedrne faze.....	23
3.2.3. Priprava raztopine za ovojnico .....	23
3.2.4. Tehnologija izdelave mikrokapsul s furosemidom kot modelno učinkovino ....	24
3.2.5. Tehnologija izdelave referenčnih mikrosfer (brez SMES v jedru) .....	25
3.2.6. HPLC analitika furosemida.....	26
3.2.7. Določanje učinkovitosti vgradnje ter vsebnosti furosemida v mikrokapsulah ..	27
3.2.8. Priprava medijev s pH = 3 in pH = 6,8 .....	28
3.2.9. Določanje nabrekanja in erozije mikrosfer .....	28
3.2.10. Sproščanje furosemida iz mikrokapsul .....	30
3.2.11. Spremljanje stabilnosti furosemida v mikrokapsulah s SMES jedrom .....	31
3.2.12. Morfološke lastnosti mikrokapsul.....	31
3.2.13. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) .....	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	33
4.1. Vpliv sestave ovojnice na učinkovitost vgradnje ter vsebnost SMES s furosemidom v mikrokapsulah.....	33

---

4.2. Nabrekanje in erozija mikrosfer.....	36
4.3. Vpliv laktoze na sproščanje furosemida iz mikrokapsul .....	40
4.5. Morfološke značilnosti .....	44
4.5.1. Oblika in velikost mikrokapsul in mikrosfer pod optičnim mikroskopom .....	44
4.5.2. Površina mikrodelcev pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).....	46
4.6. Določanje interakcij sestavin mikrokapsul s termično analizo.....	48
4.7. Stabilnost furosemida v mikrokapsulah.....	51
5. SKLEP.....	54
6. LITERATURA.....	56

## POVZETEK

V farmaciji narašča število v vodi slabo topnih in slabo permeabilnih zdravilnih učinkovin. Eden izmed novejših tehnoloških pristopov za izboljšanje njihove biološke uporabnosti so na lipidih osnovani sistemi, kot so npr. samo(mikro)emulgirajoči sistemi (S(M)ES). Slednji so po definiciji izotropne zmesi lipidov, PAS, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa O/V. S(M)ES so običajno v tekočem agregatnem stanju, ker so v farmacevtski industriji bolj zaželeno trdne farmacevtske oblike, sočasno z naraščanjem zanimanja za S(M)ES narašča tudi potreba po novih pristopih za pretvorbo tekočih oblik v trdno agregatno stanje.

V diplomski nalogi smo želeli izdelati mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom in ovojnico iz Ca-alginata/pektinata, ki bi bile primerne za peroralno dostavo slabo vodotopnih učinkovin z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi. Za izdelavo omenjenih mikrokapsul smo uporabili metodo ko-ekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane, pri čemer smo kot jedrno fazo uporabili SMES s furosemidom kot modelno učinkovino, kot ovojnico pa 2 % vodno raztopino pektina in alginata v razmerju 3:1. Ovojnico izdelanih mikrokapsul smo premreževali s Ca-ioni, nato pa smo jo še dodatno učvrstili s hitosansko oblogo. Tako izdelane mikrokapsule smo nato sušili v zvrtničenih plasteh zraka. Tako med postopkom izdelave kot tudi sušenja mikrokapsul lahko prihaja do iztekanje jedrne faze, kar ima za posledico nizko učinkovitost vgradnje. Z namenom, da bi omejili iztekanje jedra in tako izboljšali učinkovitosti vgradnje SMES v mikrokapsule, smo v vodno raztopino polimera, ki je osnova za nastanek ovojnice mikrokapsul, dodajali polnila (5 - 20 % laktoze ali 5 % aerosila). Predpostavljali smo, da bodo slednja med procesom izdelave mikrokapsul imobilizirala molekule vode in tako omejila mešanje med samo-mikroemulgirajočim jedrom in vodno raztopino ogrodnega polimera. Hidrofilna polnila naj bi se med procesom sušenja mikrokapsul oborila in zapolnila nastajajoče pore v polimerni ovojnici mikrokapsul ter tako omejila iztekanje jedra.

V diplomski nalogi smo najvišjo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule (~ 75 %) zagotovili z dodatkom 10 % laktoze v vodno raztopino ogrodnih polimerov; mikrokapsule s to sestavo so visoko učinkovitost vgradnje ohranile tudi med

procesom sušenja mikrokapsul. Mikrokapsule z večjo vsebnostjo laktoze so izkazovale nižjo učinkovitost vgradnje, ki se je med postopkom sušenja še nekoliko znižala. Najnižjo učinkovitost vgradnje smo določili pri mikrokapsulah s 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub>. Po osmih tednih staranja pri sobni temperaturi so največ prvotno vgrajenega jedra zadržale mikrokapsule z 10 % laktoze (~ 90 %), mikrokapsule z 20 % laktoze pa so že po enem tednu izgubile ~ 40 % vgrajenega jedra z ZU.

Pri preučevanju morfoloških lastnosti izdelanih mikrokapsul smo opazili, da so bile najlepše oblikovane tiste z 10 % laktoze, slika prečnega prereza pa je potrdila homogeno tekoče jedro. Vsi izdelani mikrodelci so imeli nagubano in grobo površino s področji kristaliničnosti. Na podlagi DSC termogramov smo sklepali, da gre za kristale laktoze. DSC termogram mikrokapsul s 5-20 % laktoze prav tako ni pokazal obarjanja vgrajenega furosemida iz SMES jedra mikrokapsul.

Z namenom proučevanja vpliva dodane laktoze na nabrekanje in erozijo ogrodja mikrokapsul smo v nadaljevanju izdelali referenčne mikrosfere (brez SMES v jedru) z enako sestavo. Tako v mediju s pH = 3 kot tudi v mediju s pH = 6,8 so bolj in hitreje nabrekale mikrokapsule z večjo vsebnostjo laktoze, pri katerih smo določili tudi večji obseg erozije. Izkazalo se je, da lahko z dodatkom različnih količin laktoze v ovojnico mikrokapsul vplivamo tudi na profil sproščanja furosemida iz le-teh. V mediju s pH = 3 se je furosemid sprostil v največjem obsegu iz mikrokapsul s 5 % (~ 65 % v 4 h) oz. 20 % (~ 67 % v 4 h) laktoze. V mediju s pH = 6.8 se je iz vseh mikrokapsul sprostilo 90 - 100 % vgrajenega furosemida že po 2 h sproščanja.

V diplomski nalogi smo dokazali, da je mogoče izdelati mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom z visoko učinkovitostjo vgradnje, ki se med procesom sušenja bistveno ne spremeni. Mikrokapsule z najustreznejšimi morfološkimi lastnostmi ter ponovljivo in visoko učinkovitost vgradnje (do 80 %) smo izdelali iz zmesi pektina in alginata in v razmerju 3:1, ki je kot polnilo vsebovala 5-10 % laktoze. Izdelane mikrokapsule bi lahko v nadaljnjih raziskavah še dodatno izboljšali z optimizacijo hitosanske obloge. Mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom tako predstavljajo obetaven sistem za peroralno dostavo ZU z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi.

## SEZNAM OKRAJŠAV

BKS = biofarmaceutski klasifikacijski sistem

BU = biološka uporabnost

FO = farmacevtska oblika

GIT = gastrointestinalni trakt

HLB = hidrofilno-lipofilno ravnotežje

HM = visoko zaestren

LM = nizko zaestren

MK = mikrokapsule

O/V = olje v vodi

PAS = površinsko aktivna snov

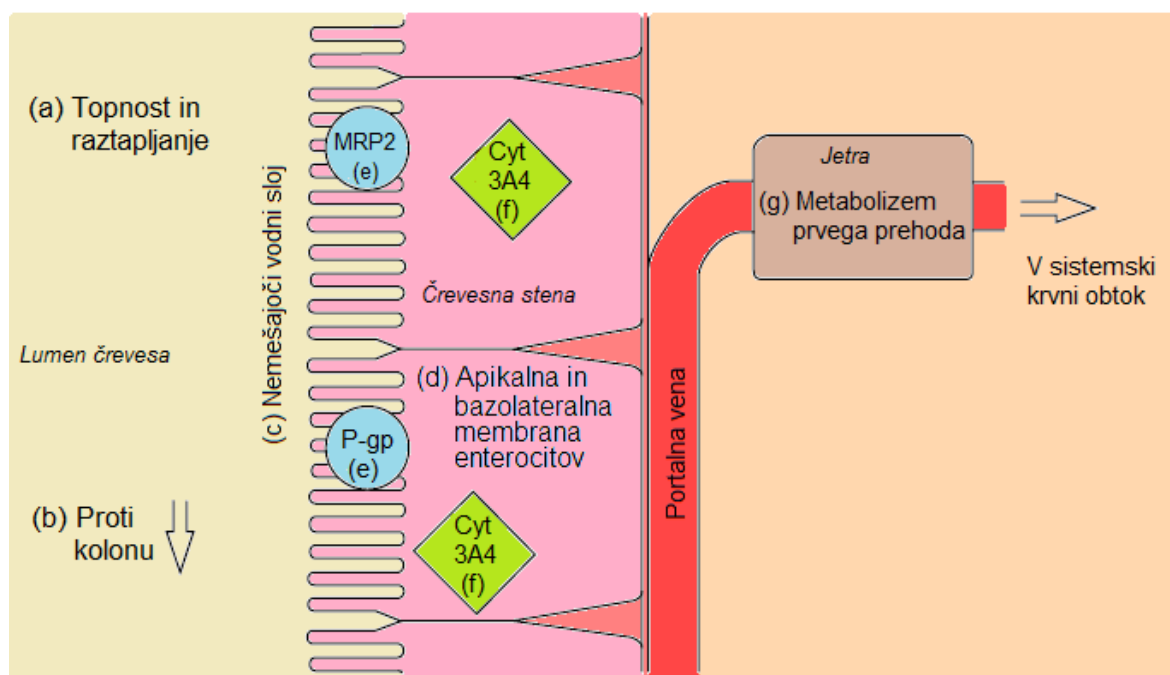
SES = samoemulgirajoči sistem

S(M)ES = samo(mikro)emulgirajoči sistem

ZU = zdravilna učinkovina

## 1. UVOD

Po trenutnih ocenah kar 40 do 70 % novoodkritih zdravilnih učinkovin ni dovolj vodotopnih, da bi jim lahko zagotovili ustrezno in ponovljivo absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta po peroralni aplikaciji. Zaradi priročnosti, neinvazivnosti ter enostavnosti aplikacije so predvsem v terapiji kroničnih obolenj peroralne farmacevtske oblike še vedno najbolj cenjene (1). Razvoj učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik je zato ključnega pomena za uvajanje novih ZU na tržišče. Da bi dosegli zadovoljivo BU učinkovin po peroralnem vnosu se moramo izogniti nekaterim omejujočim dejavnikom, kot so neustrezna stabilnost in topnost učinkovin v prebavnih sokovih, nezadostno prehajanje skozi biološke membrane, predsistemski metabolizem v lumnu prebavnega trakta in/ali v jetrih ter morebitna prisotnost »absorpcijskega okna« (Slika 1) (2).



**Slika 1:** Pregrade, ki jih mora premagati lipofilna učinkovina pri absorpciji iz prebavnega trakta: (a) raztapljanje in solubilizacija v prebavnih sokovih, (b) ozko absorpcijsko okno, (c) nemešajoči vodni sloj, (d) prehod preko membran enterocitov, (e) efluks črpalke, (f) predsistemski metabolizem v enterocitih, (g) metabolizem prvega prehoda v jetrih.

Po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BKS), ki ga je Amidon predstavil l. 1995, na biološko uporabnost zdravilne učinkovine najpomembneje vplivata njena vodotopnost



in permeabilnost skozi biološke membrane. Preglednica I prikazuje razdelitev zdravilnih učinkovin po BKS v štiri razrede (3).

**Preglednica I.** Biofarmaceutski klasifikacijski sistem.

Razred po BKS	Topnost	Permeabilnost
<b>I.</b>	Visoka	Visoka
<b>II.</b>	Nizka	Visoka
<b>III.</b>	Visoka	Nizka
<b>IV.</b>	Nizka	Nizka

Največji izziv pri razvoju farmacevtske oblike z ustrežno BU predstavljajo prav učinkovine IV. razreda. Da bi izboljšali njihovo topnost in/ali prehajanje skozi membrane, si lahko pomagamo na različne načine, npr. z izdelavo predzdravil, s tvorbo soli ali kompleksov s ciklodekstrini, pretvorbo v amorfnu obliko, uporabo sotopil, solubilizacijo s PAS ter vgradnjo v sisteme, osnovane na lipidih (3).

### 1.1. Na lipidih osnovani sistemi

Na lipidih osnovani sistemi (ang. lipid based formulations) obsegajo tako enostavne oljne raztopine kot kompleksne zmesi olj, emulgatorjev, koemulgatorjev ter sotopil. Vgradnja nevodotopne učinkovine v lipidni vehikel izboljša njeno BU po več različnih mehanizmih:

- učinkovina je lahko v nosilnem sistemu raztopljena, s čimer se izognemo fazi raztapljanja učinkovin v prebavnem traktu (4);
- zmanjša se verjetnost obarjanja, saj učinkovine z ustreznim porazdelitvenim koeficientom večinoma ostanejo raztopljene v lipidnih kapljicah tudi po dispergiranju sistema v vodnem mediju prebavnega trakta (4);
- lipidne kapljice omogočijo tudi hitrejšo in bolj enakomerno porazdelitev ZU v GIT, s čimer se lahko zmanjša draženje sluznice zaradi stika ZU s črevesno steno (5);
- prisotnost lipidov v GIT spodbudi izločanje žolčnih soli, fosfolipidov in holesterola, ki pod vplivom peristaltičnega gibanja prebavnega trakta olajšajo tvorbo emulzije - s tem se olajša solubilizacija učinkovine vnešene z na lipidih osnovanimi sistemi (6);

- lipidi lahko stimulirajo limfatični transport močno lipofilnih ZU s stimulacijo tvorbe lipoproteinov; z absorbcijo učinkovine v limfatični sistem se izognemo metabolizmu prvega prehoda skozi jetra (5, 6);
- inhibicija predsistemskega metabolizma in aktivnosti efluksnih transporterjev: nekateri lipidi lahko zmanjšajo aktivnost intestinalnih efluksnih transporterjev, kot je npr. P-gp ter membranskih encimov, kot je CyP450 (7);
- različne kombinacije lipidov ter PAS lahko izboljšajo permeabilnost GI epitelija (6);
- z vgradnjo v oljne kapljice deloma zaščitimo ZU tudi pred encimsko in kemično razgradnjo (4).

Pouton je l. 2000 uvedel klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov, po katerem le-te z ozirom na sestavo delimo v 4 razrede (4):

- V **razred I** so uvrščene enostavne oljne raztopine (ti. neemulgirajoči sistemi), ki so sestavljene iz trigliceridov in/ali mešanih gliceridov. V GIT običajno ne pride do njihovega spontanega dispergiranja, zato je za absorbcijo potrebna prebava glicerida. Te raztopine so primerne za zelo lipofilne ZU, njihova prednost pa je relativna varnost ter enostavno polnjenje v kapsule (8).
- **Razred II** dodatno vsebuje še lipofilno površinsko aktivno snov (PAS), ki olajša emulgiranje in poveča solubilizacijsko kapaciteto sistema. Predstavnike tega razreda poimenujemo tudi samo-emulgirajoči sistemi (SES). V vodnem mediju spontano tvorijo emulzijo tipa O/V (9).
- Z dodatkom vodotopnih komponent, kot so hidrofilne PAS in hidrofilna sotpila, nastanejo samo(mikro)emulgirajoči sistemi (S(M)ES), ki jih uvrščamo v **razred III**. Slednjega delimo na bolj lipofilen podrazred IIIA in bolj hidrofilen podrazred IIIB. V podrazredu IIIA so SES z vodotopnimi PAS, ki ob stiku z vodnim medijem tvorijo rahlo motno disperzijo, v podrazredu IIIB pa so SMES z vodotopnimi PAS, ki ob stiku z vodnim medijem tvorijo transparentne mikroemulzije. Prednost teh sistemov je, da za absorbcijo ZU ni potrebna prebava sistema, vendar pa se z naraščanjem koncentracije hidrofilnih PAS veča tudi tveganje za obarjanje ZU med dispergiranjem formulacije *in vivo* (8).

- V zadnjem, najbolj hidrofilnem, **razredu IV**, so sistemi, ki vsebujejo le vodotopne PAS in sotpila in po razredčenju z vodo tvorijo raztopine micelov. Prednost teh formulacij je velika solubilizacijska kapaciteta za mnoge ZU. Ob tem pa obstaja veliko tveganje, da se bodo ZU med dispergiranjem oborile (9).

## 1.2. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi

Samoemulgirajoče sisteme so prvotno razvili v industriji pesticidov. Zaradi močno lipofilne narave številnih herbicidov ni možna priprava njihovih koncentriranih vodnih raztopin. Koncentrati herbicidov so nujni za enostavnejši prevoz, zato so razvili raztopine teh snovi v organskih topilih z dodatkom emulgatorjev, ki ob mešanju z vodo tvorijo emulzijo (10).

S(M)ES, ki jih uvrščamo v podrazred IIIb lipidnega klasifikacijskega sistema, so po definiciji izotropne zmesi lipidov, PAS, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa O/V (Slika 2) (3). Medtem ko nastanejo iz samoemulgirajočih sistemov (SES) po redčenju emulzije z velikostjo kapljic med 100 in 300 nm, je velikost kapljic mikroemulzij, ki nastanejo iz samo-mikroemulgirajočih sistemov (SMES), manjša od 100 oz 50 nm, porazdelitev njihove velikosti pa ozka (11).



**Slika 2:** Levo mikroemulzija – SMES po dodatku vode, desno SMES.

V primerjavi s klasičnimi (mikro)emulzijami so S(M)ES brezvodne formulacije, kar omogoča njihovo polnjenje v želatinske ali druge hidrofilne kapsule (12). Pod vplivom

peristaltičnega gibanja želodca in črevesja v prisotnosti prebavnih sokov S(M)ES tvorijo (mikro)emulzije. Učinkovina je v nastali emulziji raztopljena, zato se izognemo procesu raztapljanja. V primerjavi z enostavnimi lipidnimi raztopinami lahko z vgradnjo zdravilne učinkovine v S(M)ES pogosto dosežemo enakomernejšo in bolj ponovljivo BU (13).

### 1.3. Tehnološki pristopi za izdelavo trdnih farmacevtskih oblik s S(M)ES

Večina sestavin S(M)ES je pri sobni temperaturi običajno v tekočem agregatnem stanju, zato so S(M)ES običajno tekoči sistemi. V farmacevtski industriji so bolj zaželeno trdne farmacevtske oblike, zato sočasno z naraščanjem zanimanja za S(M)ES narašča tudi potreba po novih pristopih za pretvorbo tekočih S(M)ES v trdno agregatno stanje. Zaradi prednosti trdnih farmacevtskih oblik so tako raziskovalci razvili več načinov pretvorbe tekočih S(M)ES v trdno agregatno stanje. V praksi se najpogosteje omenjajo naslednji tehnološki pristopi:

- *Polnjenje S(M)ES v mehke želatinske kapsule* je najpogostejši in najenostavnejši način kapsuliranja S(M)ES. ZU vgradimo v S(M)ES ter le-te napolnimo v kapsule. Pri tem moramo zagotoviti kompatibilnost jedrne faze s sestavinami ovojnice (14).
- *Sušenje z razprševanjem*: pripravimo mešanico lipidov, emulgatorjev, ZU in trdnih nosilcev ter jo solubiliziramo v izbranem topilu. Pri razprševanju hlapna faza izpari, preostanejo nam suhi delci matriks tipa, ki jih lahko nato stisnemo v tablete ali polnimo v kapsule (14).
- *Adsorpcija na trdne nosilce* je enostaven postopek, pri katerem v mešalniku zmešamo S(M)ES s trdnimi nosilci. Na ta način dobimo trdno disperzijo z dobro enakomernostjo vsebnosti. Primer ustreznih trdnih nosilcev so visoko premreženi polimeri, kot je polivinilpolipirrolidon, ki ustvarjajo ugodno okolje za ohranitev ZU v raztopljeni obliki in upočasnjujejo njeno obarjanje (14, 15).
- *Granuliranje s talinami*: mikronizirane delce ZU lahko dispergiramo v talini veziva in jo po kapljicah dodajamo ostalim pomožnim snovem v hitrovrtečem mešalniku, v katerem vzdržujemo povišano temperaturo, dokler ne nastanejo zrnca. Prednost te metode je, da ni potrebno dodajanje topil (vode ali organskih

topil), s čimer se izognemo fazi sušenja in težavam z zaostalimi organskimi topili (16).

- *Iztiskanje talin/iztiskanje s krogličenje* omogoča visoko učinkovitost vgradnje ZU. Poglavitna prednost je odsotnost organskih topil ter kratek čas trajanja tega postopka, zato ga v farmaciji pogosto uporabljamo za izdelavo pelet enakomernih velikosti. ZU zmešamo s pomožnimi snovmi, omočimo in mešamo v hitrovrtečem mešalniku. Homogeno zmes nato iztiskamo skozi ekstrudor pri povišani temperaturi. Nastali iztiskanec, ki je v obliki špagetov, nato krogličimo na sferonizatorju. Posušene sfere presejemo skozi sito želene velikosti, lahko jih tudi oblagamo (14, 17).
- *Tehnologije s superkritičnimi fluidi* uporabljamo za izdelavo trdne disperzije delcev ZU z lipidi. Superkritični fluidi se nad kritično temperaturo in tlakom nahajajo v obliki ene faze. V odvisnosti od temperature in tlaka se tudi spreminjajo njihova viskoznost, difuzivnost, dielektrična konstanta in polarnost. Najpogosteje kot plin uporabljamo superkritični CO<sub>2</sub>. Postopek je primeren za ZU z visoko jakostjo ter nizkim terapevtskim odmerkom (5, 16).
- *Mikrokapsuliranje* se je izkazalo za obetaven način pretvorbe S(M)ES v trdno farmacevtsko obliko. ZU je navadno vgrajena v jedro, ki ga zaščitimo s polimerno ovojnico. Uporaba metode mikrokapsuliranja z vibrirajočo membrano omogoča mile pogoje izdelave mikrokapsul relativno ter enostaven prenos proizvodnje v industrijsko merilo. V kolikor je potrebno lahko proces izvajamo tudi v aseptičnih pogojih (18, 19).

Po literaturnih virih lahko iz S(M)ES oblikujemo naslednje trdne farmacevtske oblike:

- Suhe emulzije v obliki praškov (20)
- samo-emulgirajoče kapsule (21)
- samo-emulgirajoče tablete s prirejenim sproščanjem (22)
- samo-emulgirajoče mikrokapsule s prirejenim sproščanjem (18)
- samo-emulgirajoči nanodelci (23)

- samo-emulgirajoče svečke (24)
- samo-emulgirajoči vsadki (25).

#### 1.4. Mikrokapsule in mikrokapsuliranje

Mikrokapsuliranje so razvili s posnemanjem procesov v naravi, kjer lahko najdemo veliko različnih primerov »kapsuliranja« kot zaščite obdanega materiala pred vplivi okolja. Najenostavnejši primer na makroskopskem nivoju predstavljata ptičje jajce in seme, na nanometrskem pa celica s svojo vsebino. V petdesetih letih prejšnjega stoletja so mikrokapsuliranje prenesli v papirno industrijo za pripravo mikrokapsul pri izdelavi brezsajnega kopirnega papirja. Danes se ta tehnologija široko uporablja tudi na drugih področjih, kot so prehrabena industrija, kozmetologija, biotehnologija, medicina in farmacija. V slednji mikrokapsuliranje pridobiva na pomenu (26, 27).

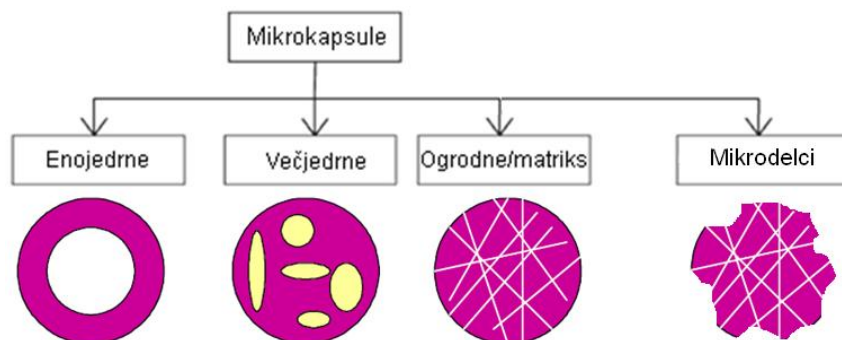
Poleg zaščite vgrajene učinkovine pred vplivi okolja nam ta tehnologija omogoča tudi njeno nadzorovano sproščanje, prekrivanje neprijetnega okusa in vonja, spremembo agregatnega stanja (iz tekočega v trdno), ločitev reaktivnih sestavin zmesi, izboljšanje dispergiranja v vodnem mediju netopnih zdravilnih učinkovin in pripravo bioadhezivnih oblik. Z mikrokapsuliranjem lahko tudi izboljšamo biološko uporabnost peptidov in proteinov ter dosežemo ciljano terapijo. Kljub številnim prednostim je z ekonomskega vidika to draga tehnologija, zato je njeno uporabo potrebno tehtno utemeljiti (28, 29).

Mikrokapsule so produkt mikrokapsuliranja, s katerim zelo drobne kapljice ali trdne delce obdamo oz. obložimo s kontinuiranim filmom iz polimera, lipida ali drugih ustreznih snovi. Mikrokapsule so po definiciji majhni, trdni delci okroglih oblik, veliki med 1 in 1000-2000  $\mu\text{m}$ , ki so sestavljeni iz jedra in ovojnice, ki ščiti vsebino jedra pred vplivi okolja. Jedro je lahko trdno, tekoče ali plinasto. Hidrofilna jedra običajno zaščitimo z hidrofobno ovojnico, hidrofobna jedra pa obložimo s hidrofilno ovojnico (30).

Mikrokapsule glede na morfološke značilnosti delimo na (slika 3):

- *mikrokapsule filmskega tipa oz. monojedrne/večjedrne mikrokapsule*: v njihovi strukturi jasno razločimo jedro oz. jedra, ki ga/jih obdaja ovojnica
- *mikrosfere oz. ogrodni tip mikrokapsul*: zanje je značilno, da sta mikrokapsulirana snov in ogrodni material (matriks) enakomerno razporejena po celotnem volumnu delca.

- *Mikrodelci*: od mikrosfer se ločijo le po tem, da so nepravilnih oblik (30).



**Slika 3:** Morfološke lastnosti mikrokapsul; ZU se lahko nahaja v jedru delca (mono- oz. večjedrne mikrokapsule) ali pa je enakomerno dispergirana po celotnem volumnu delca (ogrodni tip mikrokapsul oz. mikrodelci).

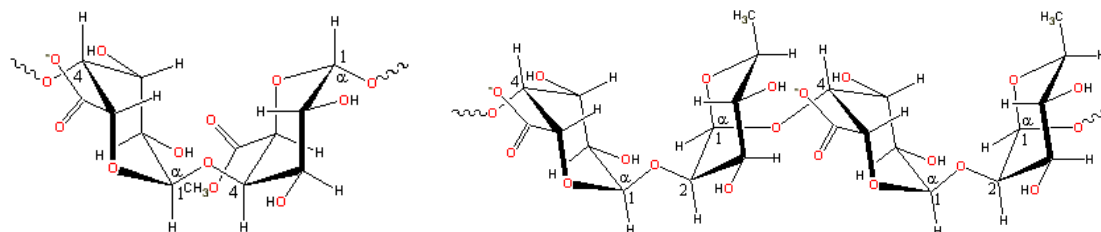
V literaturi je uporaba teh izrazov precej nedosledna. Izraz *mikrodelci* se tako običajno uporablja bolj splošno, kot nadpomenka mikrokapsul in mikrosfer. Prav tako tudi izraz *mikrokapsule* pogosto označuje samo delce mikrometrskih velikosti, sestavljenih iz enkapsulirane snovi in ogrodnega materiala, ne glede na notranjo strukturo in obliko delcev.

#### 1.4.1. Ovojnica mikrokapsul

Ključno vlogo pri uspešnosti izdelave mikrokapsul s trdno in čvrsto ovojnico ima izbira ustreznega materiala za ovojnico oz. ogrodje mikrokapsul. Na področju farmacije je običajno naš cilj izdelati polprepustno ovojnico, ki omogoča nadzorovano sproščanje učinkovine iz jedra ter jo obenem ščiti pred okoljskimi vplivi. Primerni gradniki ovojnice in matriksa mikrokapsul so različni proteini, voski, lipidi ter mnogi naravni in sintezni polimeri. V primerjavi z naravnimi so sintezni polimeri kemijsko stabilnejši, njihovo zgradbo in strukturo pa lahko prilagajamo glede na potrebe. Kljub tem dejstvom so v farmaciji naravni polimeri, kot so npr. poliuronati in hitosan, še vedno aktualni, saj so biokompatibilni, biorazgradljivi in netoksični, izkazujejo pa tudi bioadhezivne lastnosti. Zaradi teh značilnosti so zelo primerni za izdelavo dostavnih sistemov (31).

Glavni razlog za uporabo **poliuronatov** je njihova sposobnost vezave dvovalentnih ionov (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ), ki ima za posledico tvorbo hidrogela. Značilna predstavnika poliuronatov sta pektin in alginat.

Struktura **pektina** še ni popolnoma poznana in jo je težko definirati, ker se lahko spremeni tako med izolacijo iz rastlin, shranjevanjem kot obdelavo rastlinskega materiala. V osnovi je pektin linearen polimer, ki ga sestavlja veriga iz D-galakturonske kisline in metilnih estrov D-galakturonske kisline med seboj povezanimi z  $\alpha$ -(1,4) glikozidnimi vezmi. To t.i. »gladko regijo« (ang. smooth region) prekinjajo z  $\alpha$ -(1,2)-povezavami vezane stranske verige ostankov drugih nevtralnih sladkorjev, kot so D-ksiloza, D-glukoza, L-ramnoza, L-arabinoza in D-galaktoza. Slednje imenujemo tudi »razvejane regije« (ang. hairy region), za katere je značilno, da ne gelirajo (Slika 4) (32).



**Slika 4:** Struktura pektina.

Pektini se med seboj razlikujejo v stopnji esterifikacije in stopnji amidacije. Stopnja esterifikacije pomeni razmerje med številom zaestrenih karboksilnih skupin in številom vseh karboksilnih skupin D-galakturonskih kislin v verigi. Glede na to razmerje delimo pektine v dve skupini in sicer ločimo visoko zaestrene (angl.: high methoxyl – HM) in nizko zaestrene (angl.: low methoxyl – LM) pektine. Med visoko zaestrene pektine uvrščamo pektine, ki imajo zaestrenih 60 – 75 % D-galakturonskih kislin. Slednji tvorijo gele, ki so termično reverzibilni v prisotnosti sladkorjev in pH-ju okoli 3. Nizko zaestreni pektini imajo 20 – 40 % zaestrenih karboksilnih skupin in gelirajo v prisotnosti kalcijevih ali drugih dvovalentnih ionov (33).

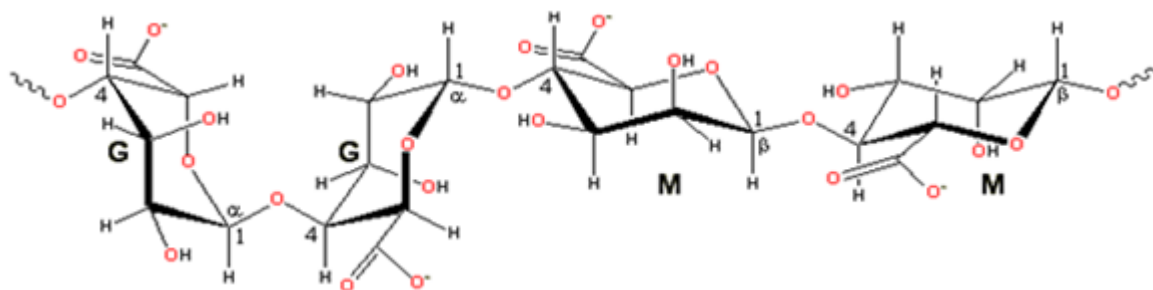
Geliranje HM-pektinov temelji na tvorbi vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij. V vodni disperziji pektina je večina karboksilnih skupin v ionizirani obliki, kar prispeva k negativnemu naboju molekule pektina in odboju med verigami. Ker ionizirana oblika bolj



privlači molekule vode kot neionizirana, je tvorba gela v tem okolju onemogočena. Da bi spodbudili geliranje, si pomagamo z dodatkom kisline ali sladkorjev. S kislino pretvorimo ionizirane karboksilne kisline v neionizirano obliko. Slednja ima manjšo afiniteto do vode, zato lahko tvori vodikove vezi. Hidratacijo molekul pektina zmanjša tudi dodatek sladkorjev, ki tekmujejo za vezavo vode. Rezultat je povezovanje polisaharidnih verig pektina med seboj in nastanek gela (34).

LM-pektini gelirajo na drugačen način. Gel nastane kot rezultat ionskega povezovanja karboksilnih skupin dveh verig s pomočjo kalcijevih mostičkov, znanega kot model jajčne posode. Prisotnost amidnih skupin v molekuli LM-pektina zveča sposobnost tvorbe gela. Pri tem pride na območjih z amidnimi skupinami do še dodatnega nastanka vodikovih vezi, zato se v tem primeru pri razlagi nastanka gela ne moremo poslužiti preprostega modela škatle za jajca (35).

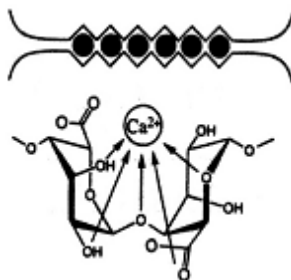
**Alginska kislina** je kemijsko linearen nerazvejan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot,  $\alpha$ -L-guluronske kisline (G) in  $\beta$ -D-manuronske kisline (M), povezanih z 1,4 glikozidno vezjo. Kislini sestavljata homogene poli-G in poli-M odseke, ki so med seboj ločeni s predeli, kjer se monomerni enoti izmenjujeta (Slika 5) (36).



**Slika 5:** Struktura alginata; GG, GM, MM sekvenca.

Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave (G/M razmerja). Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna, topnost njenih soli pa je odvisna od vrste prisotnih kationov ter pH-ja. Način geliranja alginata razlikujemo glede na to, ali gelira v kislem ali v prisotnosti večvalentnih ionov. Kislini gel nastane z zniževanjem pH raztopine pod  $pK_a$  guluronske in manuronske kisline pri določenih pogojih. Pri mikrokapsuliranju pa nas bolj zanima ionotropno geliranje alginata. Ionski oz. ionotropni gel nastane z interakcijo večvalentnih kationov, kot so  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , in polimernih verig alginata. Izjema so alginatne soli  $Mg^{2+}$  ionov, ki tako kot soli

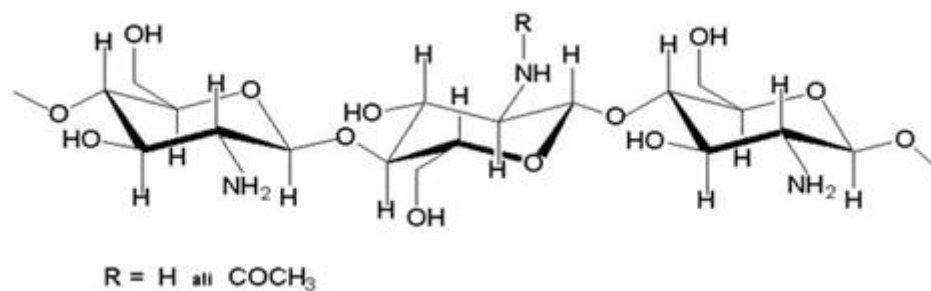
monovalentnih ionov v vodi tvorijo viskozne koloidne raztopine. Bistveni proces pri ionotropnem geliranju je izmenjava  $\text{Na}^+$  ionov iz soli guluronskih kislin s prej omenjenimi večvalentnimi ioni, ki povežejo odseke guluronskih kislin in s tem povzročijo njihovo preureditev v urejeno tridimenzionalno strukturo, ki po obliki spominja na škatlo za jajca (Slika 6) (36).



**Slika 6:** Shematski prikaz strukture škatle za jajca.

To strukturo še dodatno stabilizirajo vodikove vezi. Interakcije niso le elektrostatske narave, temveč tudi koordinativne z večvalentnim kationom kot kelatnim centrom. Pri ionotropnem geliranju sodelujejo le poliguluronski odseki makromolekule, ki imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v karboksilnih in hidroksilnih skupinah večjo afiniteto do večvalentnih kationov. Afiniteta dvovalentnih kationov do alginata pada v naslednjem vrstnem redu  $\text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ . Ioni z večjo afiniteto tvorijo bolj čvrst gel z grobo in nagubano površino. Kemijska sestava alginata tudi vpliva na stabilnost, odpornost na erozijo in poroznost gela. Večjo afiniteto do premrežitve izkazujejo alginati z daljšimi in številčnejšimi G sekvencami, jakost gela pa narašča v naslednjem zaporedju:  $\text{MG} < \text{MM} < \text{GG}$  (36).

**Hitosan** je biokompatibilen, biorazgradljiv in netoksičen kationski polisaharid. Kemijsko je kopolimer  $\beta$ -(1,4) povezanih enot glukozamina in N-acetilglukozamina (Slika 7). Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem polisaharida hitina, ki ga najdemo v oklepih rakov, pri nekaterih insektih in gobah. Topen je v kisljih raztopinah, v alkalnem in nevtralnem pH pa je netopen. Poznamo hitosane z različno molekulsko maso, viskoznostjo in stopnjo deacetiliranja. Hitosan odlikujejo mnoge prednosti, kar povečuje njegovo uporabo na področju farmacije, predvsem pri razvoju mikro in nanotehnologije. V primerjavi s sintezniimi polikationi je tudi cenovno ugoden (30, 31).



**Slika 7:** Struktura hitosana.

Pri izdelavi sistemov s prirejenim sproščanjem izkoriščamo njegovo sposobnost povezovanja z polianioni. Hitosanska veriga je v kislem pozitivno nabita, zato lahko tvori komplekse z alginatom, pektinom in drugimi polianioni, v prisotnosti večvalentnih anionov (npr. tripolifosfat) pa premrežene strukture. Zaradi dobrih bioadhezijskih lastnosti lahko izboljša permeabilnost različnih sluznic in tako izboljša BU učinkovin (37).

#### 1.4.2. Mikrokapsuliranje

Prvi primer mikrokapsuliranja sega v leto 1931, ko sta Bungenburg de Jong in Kaas pripravila želatinske mikrosfere z metodo koacervacije (38). Danes poznamo že celo paleto različnih postopkov, ki lahko temeljijo na popolnoma fizikalnih fenomenih, reakciji polimerizacije ali kombinaciji omenjenih procesov. Tako lahko metode mikrokapsuliranja v grobem delimo na kemijske, fizikalno-kemijske ter fizikalno-mehanske (preglednica II).

**Preglednica II:** Razdelitev metod mikrokapsuliranja.

Metode	Primeri
<b>Kemijske</b>	Polimerizacija (enostavna, <i>in situ</i> , emulzijska)
<b>Fizikalne/fizikalno-kemijske</b>	Koacervacija (enostavna, kompleksna, z ločevanjem faz)
	Oblaganje (sol-gel, plast na plast)
	Metoda odparevanja topila
	Ohlajevanje dispergirane taline
	Tehnologije s superkritičnimi fluidi
<b>Fizikalno-mehanske</b>	Sušenje z razprševanjem
	Oblaganje v zvrtničnih plasteh
	Centrifugalne tehnike
	Mikrokapsuliranje v bobnih
	Mikrokapsuliranje v vakuumu
	Elektrostatično mikrokapsuliranje
	Metode (ko-)ekstruzije curka

Ne glede na uporabljen metodo izdelave mikrokapsul so vsem postopkom skupni trije osnovni koraki:

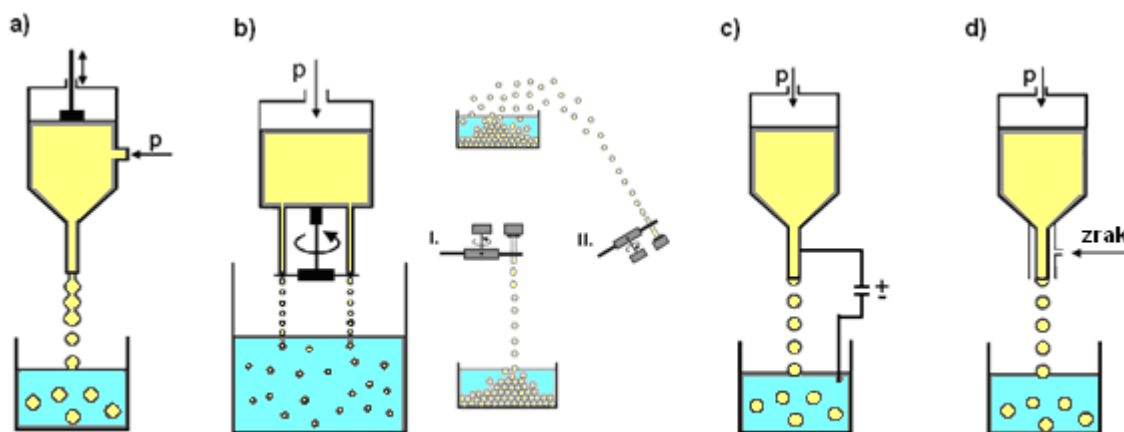
- Zdravilno učinkovino najprej vgradimo v sistem, ki bo kasneje tvoril bodisi ogrodje (matriks) bodisi jedro mikrokapsule. Omenjeni sistem je lahko v obliki raztopine, emulzije ali suspenzije. Ta korak obsega procese, kot so mešanje, dispergiranje, sušenje, drobljenje, in/ali sejanje.
- Sledi oblikovanje (izdelava) mikrokapsul. Kateri procesi so za to primerni je odvisno od agregatnega stanja uporabljenega matriksa. Tekoči matriks dispergiramo v zraku (s postopkom kapljanja ali razprševanja) ali v drugi tekočini (postopek emulgiranja ali mikroemulgiranja). Pri uporabi trdnega matriksa na gibajoče delce le-tega razpršujemo raztopino (oblaganje v zvrtničnih plasteh, oblaganje v dražirnih bobnih, aglomeriranje).
- Izdelane mikrokapsule še utrdimo/stabiliziramo, pri čemer uporabimo kemijske (polimerizacija), fizikalno-kemijske (geliranje, koacervacija) ali fizikalne postopke

(obarjanje, izhlapevanje, strjevanje), ki vodijo v nastanek trdne farmacevtske oblike (39).

#### 1.4.3. Metode ekstruzije curka

Izdelava mikrokapsul z metodami ekstruzije curka temelji na principu razbitja laminarnega curka tekočine v enako velike kapljice z uporabo različnih tehnik. Mikrosfere izdelamo z metodami enostavne ekstruzije, pri katerih črpamo raztopino polimera skozi enojno šobo. Za izdelavo mikrokapsul z bolj definirano ovojnico pa se poslužimo metod ko-ekstruzije curka. Pri slednjih uporabimo koncentrično šobo, pri čemer fazo z jedrnim materialom črpamo skozi notranjo, fazo z ogrodnim materialom pa skozi zunanjo šobo. Pri potiskanju tekočine skozi šobo se pod vplivom tlaka ustvari laminaren curek, ki ga nato z različnimi postopki razbijemo v drobne kapljice. Ovojnico tako nastalih mikrokapsul je potrebno še utrditi, kar lahko naredimo s termičnim/kemijskim premreževanjem, ohlajanjem, odparevanjem topila ali drugimi primernimi tehnikami.

Pri **metodi z vibrirajočo membrano** ustvarimo laminaren tok s pomočjo tlačilke ali kompresorja na stisnjen zrak, ki potiska fazo skozi šobo. Pod vplivom nihanja membrane, ki se nahaja nad šobo, se curek razbije v enakomerno velike kapljice (Slika 8a). Nastale kapljice oz. mikrokapsule potujejo skozi električno polje. Površina mikrokapsul se pri tem nabije in povzroči odbojne sile med njimi, kar prepreči njihovo zlepljanje med padanjem v raztopino premreževala. Metoda omogoča nastanek mikrokapsul z ozko porazdelitvijo velikosti ter delo v aseptičnih pogojih. Slabost metode je omejenost z viskoznostjo tekočine, ki ne sme biti previsoka, saj lahko pride do mašenja šob (40).



**Slika 8:** Shematska slika naprav za mikrokapsuliranje z metodo z vibrirajočo membrano (a), »JetCutter«; normalen postopek - I. in postopek z mehkim pristankom kapsul - II.(b), elektrostatska ekstruzija (c) in ko-aksialni tok zraka (d).

»*Jett cutter*« metoda ima med vsemi metodami ekstruzije curka največjo kapaciteto proizvodnje in se zato največ uporablja v industrijskem merilu. Omogoča tudi uporabo visoko viskoznih tekočin. Laminaren tok razbijemo s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami, ki prekinjajo curek. Nastali delci so cilindrične oblike, a se zaradi površinske napetosti oblikujejo v sferične mikrokapsule, ki jih je potrebno še utrditi. Obstajata dve možni obliki krivulje leta nastalih kapljic proti raztopini za utrjevanje (Slika 8b). Pri navadnem postopku »jett cutter« metode kapljice padajo navpično navzdol; pri postopku z mehkim pristankom pa jih usmerimo diagonalno navzgor, s čimer močno zmanjšamo hitrost kapljic ob padcu v raztopino za utrjevanje (41).

Metoda *elektrostatske ekstruzije* temelji na razbitju laminarnega toka s pomočjo elektrostatskih sil; pri tem nastanejo kapljice/mikrokapsule (Slika 8c). Na velikost ter na naboj na površini slednjih lahko vplivamo z uravnavanjem procesnih parametrov. Z metodo lahko izdelamo zelo majhne mikrokapsule, vendar pa je njena slabost nizka produktivnost in zato neprimernost za uporabo v industriji (42).

Pri *metodi s koaksialnim tokom zraka* raztopino ogrodnega materiala dovajamo skozi notranjo šobo, medtem ko skozi zunanjo pod tlakom dovajamo zrak ali dušik. Tok zraka prekinja tok tekočine na izhodu iz koncentrične šobe (Slika 8d). Pri tem se tvorijo kapljice/mikrokapsule, ki jih je potrebno še učvrstiti. Z uravnavanjem hitrosti pretoka

tekočine, zraka in velikosti šobe spreminjamo velikost mikrokapsul. Metoda ni primerna za industrijsko proizvodnjo (41).

### Enkapsulator Inotech IE-50 R

Za izdelavo mikrokapsul smo v diplomskem delu uporabili enkapsulator Inotech IE-50 R (Slika 9), ki je polavtomatska naprava za enkapsuliranje zdravilnih učinkovin ter rastlinskih, živalskih, mikrobnih celic ali drugih biomolekul. Izdelava mikrokapsul temelji na metodi ko-ekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane. Naprava nam omogoča visoko produktivnost ob milih pogojih mikrokapsuliranja in izdelavo mikrokapsul v velikostnem razredu od 10  $\mu\text{m}$  do 1000  $\mu\text{m}$  in več (43).



**Slika 9:** Enkapsulator Inotech IE-50 R.

Glavna elementa mikroenkapsulatorja sta kontrolna enota in reakcijska posoda. Na *kontrolni enoti* lahko nastavljamo frekvenco nihanja membrane (nizko - med 50 in 440 Hz ali visoko območje - med 430 in 7000 Hz), amplitudo (od 1 do 7), električno napetost (med 400 in 1800 V), relativno hitrost tlačilke za brizgo (od 0 do 1000), hitrost mešala in jakost stroboskopske luči. Ti nastavljivi parametri nam omogočajo ponovljivost med posameznimi serijami ter ozko distribucijo porazdelitve velikosti mikrokapsul (43).

Na kontrolno ploščo je priključena *reakcijska posoda*. V njej imamo raztopino za premreževanje, ki jo mešamo na magnetnem mešalu. Ta sistem lahko tudi zapremo in avtoklaviramo, kar zagotavlja ustrezno okolje za aseptično izdelavo mikrokapsul (43).

*Enoto s koncentrično šobo* sestavljata koncentrična pulzacijska glava z magnetom in membrano ter koncentrična šoba. Koncentrična šoba iz nerjavnega jekla je sestavljena iz notranje in zunanje šobe. Premeri šob se gibljejo med 100 in 1000  $\mu\text{m}$ , pri čemer je premer notranje šobe manjši od premera zunanje šobe. Za izdelavo mikrosfer uporabimo le šobo zunanje faze (43).

Splošna pravila izdelave mikrokapsul z enkapsulatorjem:

- Velikost mikrokapsul je odvisna od velikosti šobe in je praviloma dvakrat večja od njenega premera, premer jedra pa je lahko od 1 do 2,5 - krat večji od premera notranje šobe.
- Pri uporabi nižjih frekvenc dobimo večje mikrosfere in obratno.
- Pri izdelavi manjših mikrokapsul potrebujemo manjšo električno napetost.
- Omejeni smo z viskoznostjo tekočine, ki ne sme biti previsoka. Pri raztopinah z višjo viskoznostjo potrebujemo nižje frekvence in večjo hitrost za doseg kontinuiranega toka tekočine (43).

Glavne težave, s katerimi se srečamo pri procesu mikroenkapsuliranja so naslednje:

- *nestabilen tok tekočine*: 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 mikrokapsul*: nastane zaradi prevelike hitrosti curka, previsoke frekvence, prevelike napetosti in ne-Newtonskega obnašanja tekočin (43).



## 2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo izdelali mikrokapsule s samomikroemulgirajočim jedrom z uporabo metode koekstruzije curka s pomočjo vibrirajoče membrane. Pri delu bomo uporabili sistem kocentričnih šob z velikostjo 500  $\mu\text{m}$ /750  $\mu\text{m}$ . Kot notranjo fazo (jedro) bomo uporabili samo-mikroemulgirajoči sistem z zdravilno učinkovino, kot zunanjo fazo (ovojnica) pa vodno raztopino pektina in alginata v razmerju 3:1. Kot modelno učinkovino bomo uporabili furosemid, diuretik Henlejeve zanke, ki ga po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo v razred IV - med slabo topne in slabo permeabilne učinkovine.

Med procesom izdelave in sušenja mikrokapsul običajno prihaja do iztekanja jedrne faze, kar ima za posledico slabo učinkovitost vgrajevanja jedrne faze in/ali neustrezno čvrstost izdelanih mikrokapsul. Z namenom izboljšanja omenjenih lastnosti bomo v diplomski nalogi optimirali sestavo ovojnice mikrokapsul. V vodno raztopino ogrodnih polimerov bomo zato dodali laktozo ali koloidni  $\text{SiO}_2$ , ki imata vlogo polnila. Predvidevamo, da bo polnilo med procesom sušenja zapolnilo nastajajoče pore ter na ta način upočasnilo/preprečilo iztekanje samo-mikroemulgirajočega jedra iz mikrokapsul. Iztekanje jedra dodatno omejuje tudi hitosanska ovojnica mikrokapsul.

Izdelane mikrokapsule bomo ovrednotili glede na vsebnost modelne zdravilne učinkovine in učinkovitost mikrokapsuliranja. Proučevali bomo tudi vpliv dodatka polnil na nabrekanje in erozijo polimernega ogrodja mikrokapsul in posledično na profil sproščanja vgrajenega furosemida iz mikrokapsul. Ovrednotili bomo tudi morfološke značilnosti mikrokapsul ter spremljali njihovo stabilnost med 8-tedenskim staranjem pri sobnih pogojih.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

**Plurol oleique**<sup>®</sup> (Gattefossé, Saint-Priest, Francija) je viskozna temno rumena tekočina z značilnim vonjem. Kemično je diester poliglicerola-6 in oleinske kisline. V etanolu je zmerno topen, v vodi pa ga lahko dispergiramo. Ima HLB vrednost 6. Uporabljamo ga v farmacevtskih oblikah za dermalno uporabo kot emulgator, koemulgator oz. pospeševalec penetracije. V peroralnih oblikah povečuje biorazpoložljivost učinkovine (44).

**Labrasol**<sup>®</sup> (Gattefossé, Saint-Priest, Francija) je viskozna blede rumena tekočina. Lahko se dispergira v vroči vodi, topna je v metilenkloridu. Kemično je zmes mono-, di- in trigliceridov oktanojske in dekanajske kisline ter mono- in diestrov makrogola z oktanojsko in dekanajske kisline. Ima HLB vrednost 14. Uporablja se tako v peroralnih kot dermalnih pripravkih. Je solubilizator težko topnih učinkovin v peroralnih farmacevtskih oblikah, pospeševalec penetracije v dermalnih pripravkih in emulgator v mikroemulzijah. Primeren je za pripravo SMES (44, 45). Je inhibitor P-glikoproteina na apikalni membrani celic intestinalne sluznice, ki deluje kot od ATP odvisna efluks črpalka za mnoge zdravilne učinkovine (9).

**Miglyol 812**<sup>®</sup> (Sasol GmbH, Nemčija) je brezbarvna tekočina brez vonja. Kemično je zmes trigliceridov s srednje dolgimi verigami C8 in C10. Pridobivajo ga s hidrolizo kokosovega olja. Zelo je odporen na oksidacijo, raztaplja se v 96 % etanolu. Je netoksičen in nedražeč, zato se lahko uporablja tako v dermalnih, peroralnih kot tudi parenteralnih farmacevtskih oblikah. Pri zaužitju se hitro metabolizira, ne skladišči se v obliki telesne maščobe. Pospešuje absorpcijo, npr. antibiotikov v sirupih. Lahko se uporablja kot sredstvo za preprečevanja zlepljanja tablet, v aerosolih kot nosilec in topilo (npr. za nitroglicerol). Na otip ni masten, lahko se razmaže, zato je dober emolient za uporabo v kozmetiki (46).

**Pektin GENU**<sup>®</sup> tipa LM-104 AS-Z (CPKelco, Danska) je rumenorjav prah brez vonja. Njegova stopnja esterifikacije znaša 31 %, stopnja amidacije pa 17 %. Zaradi sposobnosti ionotropnega geliranja se veliko uporablja pri pripravi dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem (33).

**Natrijev alginat** (Sigma, Nemčija) je bel ali blede rumenorjav prah brez vonja in okusa. Je naravni polimer, pridobljen iz rjavih alg. Viskoznost 2 % raztopine pri 25°C znaša 250 mPa s. V vodnih raztopinah kislin s pH pod 3 je skoraj netopen, prav tako tudi v etanolu, etru, kloroformu, ter ostalih organskih topilih, v katerih je etanola več kot 30 % (m/m) (47).

**Nizko viskozni hitosan** (Fluka, Nemčija) je bel ali kremno bel prah brez vonja. Je naravni polisaharid, pridobljen z delnim deacetiliranjem hitina, ki je skoraj v celoti sestavljen iz  $\beta$ -(1,4) vezanih N-acetilglukozaminskih enot (48). Topen je v kislem vodnem mediju, njegova topnost pa je odvisna od stopnje N-acetilacije. Hitosan z vsaj 60 % stopnjo deacetilacije lahko pretvorimo v topno obliko že z majhno količino kisline (37).

**Aerosil 200** (Degussa AG, Nemčija) je amorfni brezvodni koloidni silicijev dioksid s specifično površino  $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$ . Je lahek, modro-bel prašek, brez vonja in okusa. V farmaciji se uporablja kot antiadheziv, razgrajevalo, izboljševalec pretočnih lastnosti, zgoščevalo. Je stabilizator poltrdnih in tekočih farmacevtskih oblik (49).

**Brezvodni kalcijev klorid** (RIDEL de Haën, Nemčija) je bel prašek v obliki kubičnih kristalov. Je zelo higroskopen in dobro topen v vodi in etanolu. Komercialno dostopen izdelek vsebuje približno 94 do 97 %  $\text{CaCl}_2$ , glavno nečistoto pa predstavlja  $\text{Ca(OH)}_2$ . Uporablja se kot sušilno sredstvo v desikatorjih, v terapiji pa kot nadomestilo za elektrolite (47).

**Dihidrat kalcijevega klorida** (Merck KGaA, Nemčija) je bel kristaliničen prašek, ki je v vodi in etanolu dobro topen. Komercialni izdelek vsebuje od 73 do 80 %  $\text{CaCl}_2$  (47).

**Koncentrirana očetna kislina** (Merck KGaA, Nemčija) je bistra, brezbarvna, hlapna tekočina z značilnim ostrim vonjem. Meša se z vodo, etanolom in etrom. V farmaciji se večinoma uporablja za uravnavanje pH (45,48).

**Laktoza** (Lek d.d., Slovenija) je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek. Je lahko topna v vodi, a se počasi raztaplja. V etanolu je netopna. Je disaharid naravnega izvora (mleko), sestavljen iz glukoze in galaktoze. Evropska farmakopeja opiše monohidratno obliko kot monohidrat *O*- $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glukopiranoze. Lahko vsebuje različne količine amorfnе laktoze (45, 48).

**Fosforna kislina** (Merck KGA, Nemčija) je brezbarvna, viskozna tekočina brez okusa. Njena molekulska masa je 98 g/mol. Kemijsko jo imenujemo ortofosforna kislina. Koncentrirana fosforna kislina (85 %) je zelo korozivna in škodljiva (48).

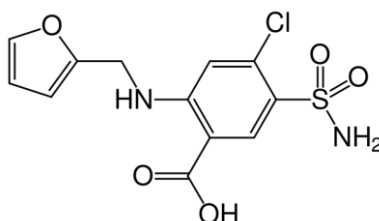
**Acetonitril** (Merck KGA, Nemčija) je brezbarvna tekočina z značilnim močnim vonjem. Je lahko vnetljivo in hlapljivo organsko topilo. V veliki meri ga uporabljamo pri pripravi mobilnih faz. V primeru vdihavanja, kontakta s kožo ali zaužitja je toksičen. Draži oči (50).

**Klorovodikova kislina** (Merck KGA, Nemčija) je bistra, brezbarvna, kadeča se 37 % vodna raztopina vodikovega klorida z ostrim vonjem. Koncentrirana HCl je korozivna in v primeru zaužitja ali stika z očmi ali kožo povzroča poškodbe (48).

**Natrijev dihidrogenfosfat** (Merck KGA, Nemčija) je brez vonja in je v obliki ortorombičnih brezbarvnih ali belih kristalov. Pri sobni temperaturi veže vodo, pri čemer nastane dihidrat (47, 48).

**Natrijev hidroksid** (Merck KGA, Nemčija) se nahaja v obliki grudic, ploščic, paličic ali kroglic bele ali skoraj bele barve. Pri hranjenju v dobro zaprtih vsebnikih velja, da komercialni izdelek vsebuje med 97 % in 98 % NaOH. Je zelo koroziven in ob stiku s kožo povzroča razjede (47, 48).

**Furosemid** (Lek d.d., Slovenija) je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek. Topen je v metanolu in acetonu, manj v vodi in etanolu. Hraniti ga moramo zaščitene pred svetlobo (51). Kemijsko je derivat antranilne kisline (Slika 10) (52).



**Slika 10:** Struktura furosemida.

Kot predstavnik diuretikov Henleyeve zanke deluje preko inhibicije Na/K/2Cl kotransporterja, inhibira pa tudi karboanhidrazo. Izkazuje saluretično delovanje, saj povzroči izločanje natrijevih, magnezijevih, kalijevih, kalcijevih, kloridnih in bikarbonatnih ionov. Učinkovit je pri zdravljenju edemov povezanih z obolenji srca, jeter

ali ledvic, uporabljamo pa ga tudi pri zdravljenju hipertenzije. Po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu ga uvrščamo v IV. skupino, kar pomeni, da je v vodnem mediju slabo topna učinkovina, ki slabo prehaja membrano prebavnega trakta (52, 53).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Naprave in pripomočki za izdelavo in vrednotenje mikrokapsul

Naprave in pripomočki, ki smo jih uporabljali pri izdelavi in vrednotenju mikrokapsul, so zbrani in kratko predstavljeni v preglednici III.

**Preglednica III:** Podatki o uporabljenih materialih in pripomočkih.

Pripomoček	Model in proizvajalec
<b>Tehtnica</b>	Exacta 2200 EB, Tehtnica Železniki, Slovenija
<b>Analitska tehtnica 1</b>	AG245, Mettler Toledo, Švica
<b>Analitska tehtnica 2</b>	XS205 Dualrange, Mettler Toledo, Švica
<b>Magnetno mešalo 1</b>	Rotamix 550 MMH, Tehtnica Železniki, Slovenija
<b>Magnetno mešalo 2</b>	RO 15 power IKAMAG <sup>®</sup> , IKA <sup>®</sup> -WERKE, Nemčija
<b>Magnetno mešalo 3</b>	HI 190M, HANNA instruments, Portugalska
<b>Grelnik 1</b>	Rotamix 550 MMH, Tehtnica Železniki, Slovenija
<b>Encapsulator</b>	Encapsulator IE-50, Inotech, Švica
<b>Centrifugirke (50mL)</b>	TPP, Certified ISO 9001, Švica
<b>Naprava za test raztapljanja</b>	Dissolution tester, Van Kel, VK 7000, ZDA
<b>PH meter</b>	MA235, Mettler Toledo, Švica
<b>Brizge (5ml)</b>	Novico S. p. A Ascoli Piceno, Italija
<b>Brizge (60ml)</b>	OMNIFIX <sup>®</sup> 60ml, Braun, Švica
<b>Vrtinčno-slojni sušilnik</b>	Strea-1, NITRO-Aeromatic, Švica
<b>HPLC aparatura</b>	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Nemčija
<b>Kolona</b>	Gemini 150*2 mm; 5 µm, B.I.A. Separations, Slovenija
<b>Sušilnik</b>	SP-45, Kambič, Slovenija
<b>Mrežasti vsebniki</b>	ChaChult, Hamburg, Nemčija
<b>DSC naprava</b>	DSC 1, Mettler Toledo, Švica
<b>TGA naprava</b>	TGA/DSC 1, Mettler Toledo, Švica

### 3.2.2. Priprava jedrne faze

Za pripravo jedrne faze smo uporabili samo-mikroemulgirajoči sistem (SMES), sestavljen iz emulgatorske zmesi Labrasola® in Plurol oleique-a® ter oljne faze Miglyol 812®, ki je bil predhodno razvit na Katedri za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo (54). SMES smo pripravili tako, da smo s pomočjo magnetnega mešala najprej homogeno zmešali emulgator Labrasol® in koemulgator Plurol oleique® v razmerju 4:1 in dodali toliko oljne faze Miglyola, da je bil njegov delež v zmesi 12 %, delež emulgatorja in koemulgatorja pa 88 %. Zmes smo nato mešali do nastanka bistre, rumeno-okker obarvane tekočine. Tako pripravljenemu SMES smo dodali toliko kalcijevega klorida, da je bila njegova koncentracija 0,5 mg CaCl<sub>2</sub>/g SMES. Vse skupaj smo pustili mešati 24 ur. Jedrni fazi smo nato dodali še zdravilno učinkovino v 5 % m/m razmerju, jo zgostili z aerosilom v 4% m/m razmerju ter jo pustili mešati 24 ur na magnetnem mešalu.

### 3.2.3. Priprava raztopine za ovojnico

Za izdelavo ovojnice smo pripravili 2 % raztopino pektina z dodatkom polnila: 5 %, 10 %, 15 % ali 20 % laktoze oz. 5 % aerosila. Najprej smo zatehtali vodo, nato smo ji dodali ustrezno količino polnila. Mešali smo na magnetnem mešalu in po potrebi tudi segrevali, da se je laktoza raztopila oz. aerosil homogeno dispergiral. Nato smo dodali pektin in mešali 24 ur do nastanka homogene raztopine. Na enak način smo pripravili tudi 2 % raztopine alginata z dodatkom 5 %, 10 %, 15 %, 20 % laktoze in 5 % aerosila, le da smo namesto 2 g pektina vsaki raztopini dodali 2 g alginata.

Raztopine alginata in pektina z istim deležem polnila smo nato zmešali v razmerju 3:1. Tako smo dobili naslednje raztopine ovojnic za izdelavo mikrokapsul:

- raztopina s 5 % laktoze, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata
- raztopina s 10 % laktoze, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata
- raztopina s 15 % laktoze, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata
- raztopina s 20 % laktoze, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata
- raztopina s 5 % aerosila, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata.

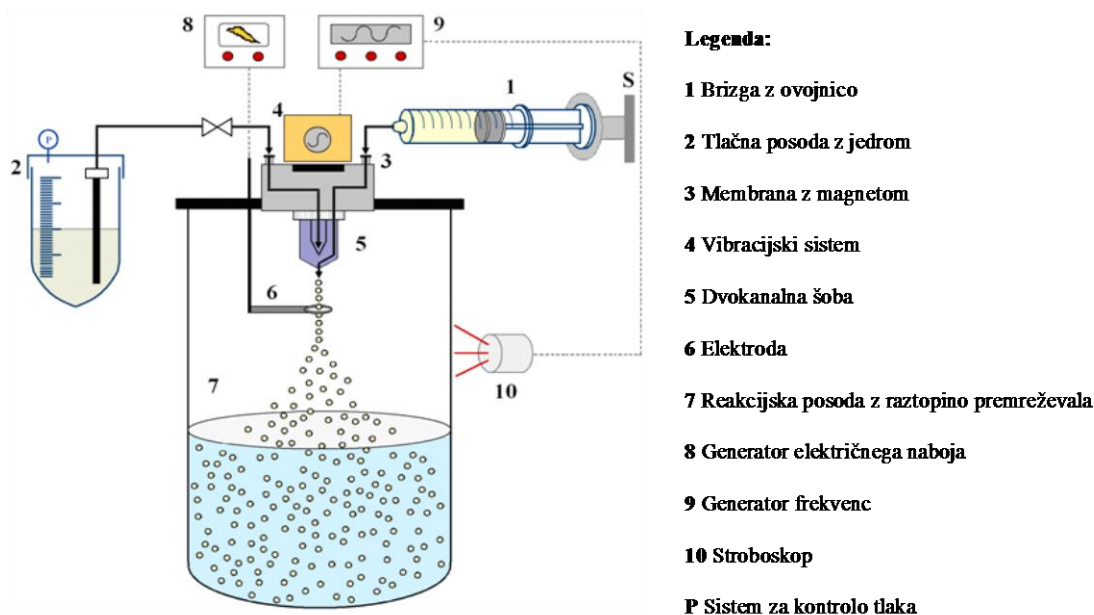
Izdelane mikrokapsule smo dodatno učvrstili z ovojnico iz hitosana. V ta namen smo pripravili 1 % raztopino hitosana v 1 % raztopini očetne kisline: k 99 g 1 % očetne kisline

dodali 1 g hitosana in mešali 24 ur na magnetnem mešalu do nastanka homogene raztopine.

#### 3.2.4. Tehnologija izdelave mikrokapsul s furosemidom kot modelno učinkovino

Mikrokapsule smo izdelali z metodo ko-ekstruzije curka s pomočjo vibrirajoče membrane na enkapsulatorju Inotech IE-50 R z uporabo koncentričnih šob velikosti 500 in 750  $\mu\text{m}$ . Zunanjo fazo smo dovajali s pomočjo 60 mL brizge, notranjo pa smo pod tlakom dovajali iz 50 mL centrifugirke s konusom. Pred zagonom naprave smo na kontrolni plošči naravnali frekvenco vibriranja membrane na 3000 Hz, amplitudo na 7 in relativno hitrost pretoka zunanje faze na 130. Pretok SMES-a smo uravnali tako, da smo najprej vklopili kompresor, nato pa na enkapsulatorju naravnali tlak, ki je potiskal notranjo fazo z želeno hitrostjo 15 kapljic/minuto.

Tlačilka oz. kompresor na stisnjen zrak potiskata obe tekočini (zunanjo in notranjo fazo) v smeri šobe. Fazi pri tem tvorita laminaren tok, ki potuje skozi šobi in se ob izhodu pod vplivom nihanja membrane razbije na kcentrične in enako velike kapljice, ki potujejo skozi električno polje med šobo in elektrodo. Pri tem pride do tvorbe površinskega naboja, ki prepreči zlepljanje kapljic, ko padejo v raztopino premreževala. S pomočjo stroboskopske luči lahko ves čas spremljamo proces izdelave (Slika 11).



**Slika 11:** Shematski prikaz izdelave mikrokapsul z enkapsulatorjem Inotech IE 50 R.

Nastajajoče mikrokapsule smo lovili v 100 mL raztopine za premreževanje (0,5 M  $\text{CaCl}_2$ ), ki smo jo ves čas izdelave zmerno mešali z magnetnim mešalom. Neustrezne mikrokapsule, ki so nastajale na začetku in na koncu procesa izdelave vsake serije, smo lovili v čašo za odpad. Izdelane mikrokapsule smo nato 15 minut brez mešanja še dodatno inkubirali v raztopini za premreževanje, nato pa še 5 min v 1% raztopini hitosana v 1 % očetni kislini. Tako premrežene mikrokapsule smo odnučali in jih nato sprali s 100 mL prečiščene vode. Sprane in odnučane mikrokapsule smo sušili v vrtinčnoslojnim sušilniku s temperaturo vhodnega zraka  $55^\circ\text{C}$  dokler nismo dosegli temperature izhodnega zraka  $53^\circ\text{C}$ .

### 3.2.5. Tehnologija izdelave referenčnih mikrosfer (brez SMES v jedru)

Referenčne mikrosfere, ki ne vsebujejo SMES jedra z ZU, smo izdelali z namenom proučevanje nabrekanja in erozije polimernega ogrodja, ki sicer predstavlja ovojnico mikrokapsul s SMES jedrom. Referenčne mikrosfere smo izdelali s pomočjo enkapsulatorja Inotech IE-50 R z uporabo enokanalne šobe velikosti  $500\ \mu\text{m}$ . Amplitudo smo naravnali na 7, relativno hitrost zunanje faze, ki smo jo dovajali s pomočjo 60 ml brizge, pa na 130. Uporabili smo raztopine za ovojnice s 5-20 % laktoze, 1,5 % pektina in 0,5 % alginata. Nastajajoče mikrosfere smo lovili v 100 ml raztopine za premreževanje



(0,5 M  $\text{CaCl}_2$ ), ki smo jo ves čas izdelave zmerno mešali z magnetnim mešalom. Neustrezne mikrosfere, ki so nastajale na začetku in koncu procesa izdelave vsake serije, smo lovili v čašo za odpad. Izdelane mikrosfere smo pustili še 15 minut brez mešanja v raztopini premreževala. Nato smo jih odnučali, prenesli v čašo z raztopino hitosana in jih tam inkubirali še 5 minut. Tako pripravljene mikrosfere smo še enkrat odnučali in jih sprali s 100 ml prečiščene vode. Mikrosfere smo nato prenesli v vrtničnoslojni sušilnik in posušili pri temperaturi vhodnega zraka  $55^\circ\text{C}$ , dokler nismo dosegli temperature izhodnega zraka  $53^\circ\text{C}$ .

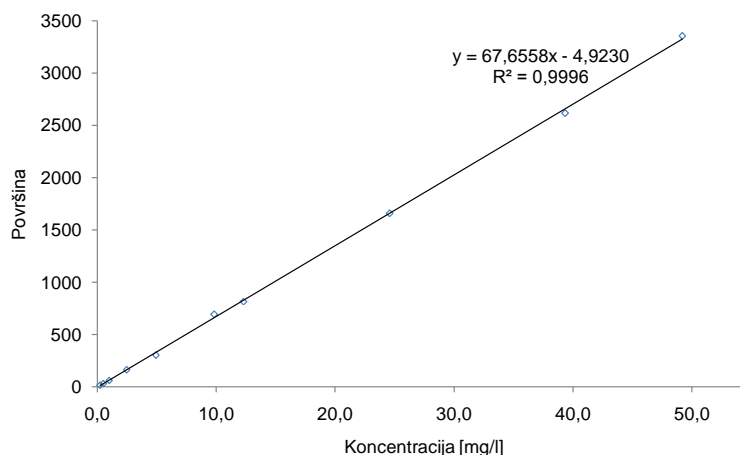
### 3.2.6. HPLC analitika furosemida

Količino furosemida v vzorcih smo določili z gradientno HPLC analizo. Kolono (Gemini  $150 \times 2$  mm;  $5 \mu\text{m}$ ) smo greli na  $50^\circ\text{C}$ . Kot mobilno fazo A smo uporabili 0,2 % v/v vodno raztopino fosforne kisline, mobilno fazo B pa je predstavljal 98 % v/v acetonitril. Pretok mobilne faze smo naravnali na 1 ml/min, valovno dolžino UV detektorja pa na 274 nm. Čas vsake analize je znašal 3 min, volumen injiciranega vzorca pa  $20 \mu\text{l}$ . Gradient mobilne faze je predstavljen v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Prikaz gradienta mobilne faze.

Čas	% mobilne faze B
0 do 2 min	30 do 36
2 do 2,5 min	36 do 46
2,5 do 3 min	46

Znano zatehto čiste učinkovine smo raztopili v 100 ml 50 % v/v etanola. Osnovno raztopino smo še večkrat redčili in vzorce analizirali s HPLC. S temi podatki smo narisali umeritveno premico (Slika 12) in izračunali enačbo:  $A = 67,6558 * c - 4,9230$  ( $A$  – površina pod krivuljo,  $c$  – koncentracija, izražena v mg/L). S pomočjo umeritvene premice smo nato iz dobljenih površin pod vrhovi izračunali koncentracije furosemida v posameznih vzorcih.



**Slika 12:** Umeritvena premica za furosemid.

### 3.2.7. Določanje učinkovitosti vgradnje ter vsebnosti furosemida v mikrokapsulah

Določali smo učinkovitost vgradnje SMES-a s furosemidom v izdelanih mikrokapsulah pred in po sušenju. Pri izdelavi vsake serije smo na začetku, sredini in koncu procesa izdelave mikrokapsul v erlenmajerice ulovili po 5 nepremreženih mikrokapsul (preden so padle v raztopino za premreževanje). Dodali smo jim 50 ml 50% (v/v) etanola, pomešali in pokrili s parafilmom. Čez 24 ur smo vzorec filtrirali čez 0,45 µm filter in izmerili koncentracijo furosemida s HPLC. Seštevek mas furosemida v vzorcih iz začetka, sredine in konca mikrokapsuliranja nam je predstavljal 100% učinkovine v mikrokapsulah. Vsebnost ZU pred premreževanjem smo primerjali z vsebnostjo po procesu premreževanja in sušenja. Slednje smo določili tako, da smo vzeli 15 premreženih (neposušanih) oz. v primeru določanja vsebnosti po sušenju 15 suhih mikrokapsul. Zmečkali/strli smo jih s stekleno palčko, jim dodali 50 ml 50% (v/v) etanola v erlenmajerico, pomešali in pokrili s parafilmom. Mikrokapsule smo pustili nabrekati 24 ur. Nato smo vsebino erlenmajerice filtrirali čez 0,45 µm filter ter vzorce analizirali s HPLC. Za vsako serijo mikrokapsul smo učinkovitost vgradnje učinkovine določali v treh paralelkah. Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v nesušene mikrokapsule smo izračunali pomočjo *enačbe 1*:

**Enačba 1:**

$$U(\%) = \left( \frac{\text{masa furosemida v premreženih mikrokapsulah}}{\text{masa furosemida v nepremreženih mikrokapsulah}} \right) * 100$$

pri čemer  $U(\%)$  predstavlja učinkovitost vgradnje v nesušene mikrokapsule, izraženo v odstotkih. Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v suhih MK pa smo izračunali po *enačbi 2*

**Enačba 2:** 
$$U'(\%) = \left( \frac{\text{masa furosemida v suhih mikrokapsulah}}{\text{masa furosemida v nepremreženih mikrokapsulah}} \right) * 100$$

$U'$  pomeni učinkovitost vgradnje v suhih mikrokapsulah, izraženo v odstotkih.

Sočasno z učinkovitostjo vgradnje smo določili tudi vsebnost furosemida v suhih mikrokapsulah, za izračun smo uporabili *enačbo 3*:

**Enačba 3:** 
$$\text{Vsebnost furosemida}(\%) = \left( \frac{\text{masa furosemida v suhih mikrokapsulah}}{\text{masa suhih mikrokapsul}} \right) * 100$$

### 3.2.8. Priprava medijev s pH = 3 in pH = 6,8

#### **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 umerili s pH-metrom in ga po potrebi še uravnali.

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

V ločenih bučkah smo pripravili raztopini 0,2 M NaOH in 0,2 M raztopino  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$ . 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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$  smo pripravili v 2 l merilni bučki tako, da smo 62,4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$  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 0,2 M raztopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$  in 560 ml 0,2 M raztopine NaOH ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljenemu pufru smo nato še s pH-metrom izmerili pH in ga po potrebi uravnali.

### 3.2.9. Določanje nabrekanja in erozije mikrosfer

Nabrekanje in erozijo mikrosfer smo določali s pomočjo aparature za raztapljanje z vesli pri 50-ih obratih/minuto in 37°C. Približno 300 mg suhih mikrosfer smo točno natehtali v

mrežaste kroglice premera ~ 4 cm in jih inkubirali v mediju za nabrekanje (900 mL vodne raztopine HCl s pH = 3 oz. fosfatnega pufru s pH = 6,8). Ob ustreznih časovnih intervalih (preglednica V) smo iz medija vzeli 1 mrežast vsebnik z nabrekli mikroferami. Mrežaste vsebnike z mikroferami smo odcedili ter odvečno vodo narahlo popivnali s papirnato brisačko. Nabrekle mikroferi smo nato iz mrežastega vsebnika prenesli na papir, ki ne odpušča delcev in jih stehali. Papirčke z mikrokapsulami smo nato sušili do konstantne mase (16 ur pri 55°C) in jih ponovno stehali. Test smo izvajali v treh paralelkah.

**Preglednica V:** Časovni intervali jemanja vzorcev v mediju s pH = 3 in pH = 6,8.

Časovni interval	pH = 3	pH = 6,8
15 min	x	x
30 min	x	x
45 min		x
1 h	x	x
2 h		x
4 h	x	x
8 h	x	
16 h	x	

Stopnjo nabrekanja smo izračunali po *enačbi 4*:

**Enačba 4:** 
$$\text{Stopnja nabrekanja (\%)} = \left( \frac{m(t) - m(r)}{m(r)} \right) * 100$$

pri čemer  $m(t)$  pomeni maso nabreklih mikrofer v času  $t$ ,  $m(r)$  maso posušenih mikrofer, ki so nabrekale,  $m(0)$  pa maso mikrokapsul pred nabrekanjem.

Sočasno s spremljanjem nabrekanja smo vrednotili tudi erozijo mikrofer, ki smo jo izračunali po *enačbi 5*:

**Enačba 5:** 
$$\% \text{ erozije} = \left( \frac{m(s) - m(r)}{m(s)} \right) * 100$$

pri čemer pomeni  $m(s)$  maso nenabreklih mikrofer posušenih do konstantne mase,  $m(r)$  pa maso posušenih mikrofer, ki so nabrekale.

### 3.2.10. Sproščanje furosemida iz mikrokapsul

Ugotavljali smo količino učinkovine, ki se med 8-urnim testom raztapljanja sprosti iz suhih mikrokapsul. Za test smo uporabili USP aparaturo 2 z veslastim mešalom (Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA) pri 50-ih obratih/minuto in konstantni temperaturi 37°C. Test smo izvajali v dveh različnih medijih za sproščanje: vodna raztopina HCl s pH = 3 in fosfatni pufer s pH = 6,8. V 900 ml medija za sproščanje smo dispergirali 100 mikrokapsul. Ob posameznih časovnih intervalih (15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) smo vzorčili 5 ml vzorca in ga filtrirali skozi filter z velikostjo por 10 µm. Koncentracijo furosemida v določenem vzorcu smo določili s pomočjo HPLC. Za vsako serijo suhih mikrokapsul smo izvedli sproščanje v treh paralelkah.

Z namenom določitve kinetike sproščanja, smo izračunali ujemanje rezultatov testa raztapljanja v mediju s pH = 3 z naslednjimi enačbami: kinetiko 0. reda (*enačba 6*), kinetiko 1. reda (*enačba 7*), Higucijevo kinetiko (*enačba 8*), kinetiko po Korsmejer-Peppasu (*enačba 9*) ter Hixon-Crowellovo kinetiko (*enačba 10*).

**Enačba 6:** kinetika 0. reda

$$F = k_0 t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t,  $k_0$  hitrostno konstanto 0. reda, t pa čas.

**Enačba 7:** kinetika 1. reda

$$\ln(1 - F) = -k_1 t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t,  $k_1$  hitrostno konstanto 1. reda, t pa čas.

**Enačba 8:** Higuchijeva kinetika

$$F = k_H t^{1/2}$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t,  $k_H$  Higucijevo konstanto, t pa čas.

**Enačba 9:** kinetika po Korsmejer-Peppasu

$$F = k_{KP} t^n$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t,  $k_{KP}$  Korsmejer-Peppasovo konstanto, n Korsmejer-Peppasov difuzijski eksponent, t pa čas.

**Enačba 10:** Hixon-Crowellova kinetika

$$(1 - F)^{1/3} = 1 - k_{HC} t$$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine v času 0 in t,  $k_{HC}$  pa Hixon-Crowellovo hitrostno konstanto sproščanja, t pa čas.

Podatke smo obdelali v programu MS Office Exel 2007 ter izračunali Pearsonove koeficiente korelacije.

### 3.2.11. Spremljanje stabilnosti furosevida v mikrokapsulah s SMES jedrom

Stabilnost furosevida v mikrokapsulah s SMES smo ovrednotili s spremljanjem vsebnosti furosevida v odvisnosti od časa. V ta namen smo ob času  $t=0$ ,  $t=1$ , 2, 3, 4 in 8 tednov naključno vzorčili 15 suhih mikrokapsul z 5-20 % laktoze. Strli smo jih s stekleno palčko in dispergirali v 50 ml raztopine etanol/prečiščena voda 50/50 (v/v). Erlenmajerice z mikrokapsulami smo pokrili s parafilmom. Čez 24 ur smo vzorce filtrirali skozi 0,45 m filter in izmerili koncentracijo furosevida s HPLC. Test smo izvajali v treh paralelkah. Rezultate smo nato primerjali z vsebnostjo furosevida v suhih mikrokapsulah ob času  $t=0$  in jih podali kot % ohranjene vsebnosti ZU (*enačba 11*).

$$\text{Enačba 11: \% ohranjene vsebnosti ZU} = \left( \frac{\text{masa furosevida v mikrokapsulah ob času } n}{\text{masa furosevida v mikrokapsulah ob času } 0} \right) * 100$$

### 3.2.12. Morfološke lastnosti mikrokapsul

Z Olympus SZX 12 optičnim mikroskopom, nad katerim je bil nameščen digitalni fotoaparatus (3CCD Color Video Camera, Power HAD, Sony, Japonska) smo opazovali velikost in obliko mikrokapsul ter morfološke značilnosti njihove površine.

Morfološke lastnosti mikrokapsul smo opazovali tudi s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa. Vzorce (mikrokapsule in mikrosfere z laktozo) smo pripravili tako, da smo jih prilepili na dvostranski lepilni trak. Pri meritvah smo uporabili povečave od 200 do 25 000 ter napetost 0,8 kV.

### 3.2.13. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

S pomočjo termične analize lahko proučujemo notranjo zgradbo mikrokapsul in interakcije med zdravilno učinkovino ter pomožnimi snovmi. Najpogosteje uporabljana metoda termične analize je diferenčna dinamična kalorimetrija. Osnova te metode je meritev temperaturne razlike med vzorcem in referenco pri segrevanju ali ohlajanju pri konstantni temperaturi. DSC nam omogoča ugotavljanje in merjenje temperature, toplotne kapacitete in entalpije oz. njihovih sprememb. Z njo lahko spremljamo polimorfizem, kinetiko reakcij

ali razpadov ter steklasti prehod. Na podlagi tega lahko preverimo čistoto in kompatibilnost sestavin farmacevtskih oblik (55, 56).

S termično analizo smo želeli opazovati interakcije med sestavinami mikrokapsul. V ta namen smo v aluminijaste lončke zatehtali 3 - 5 mg vzorca – prerezanih mikrokapsul, mikrosfer, SMES, furosemida ali laktoze. Nato smo jih segrevali od 0 do 250°C s hitrostjo 10 K/min ob hitrosti prepihanja z dušikom 50 mL/min. Za referenco smo uporabili prazne aluminijaste lončke.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Vpliv sestave ovojnice na učinkovitost vgradnje ter vsebnost SMES s furosemidom v mikrokapsulah

Učinkovitost vgradnje samo-mikroemulgirajočega jedra v ogrodje Ca-pektinata/alginata z metodo ko-ekstruzije curka je odvisna od obsega iztekanja jedrne faze med postopkom izdelave mikrokapsul. Slednje je posledica spontanega mešanja jedrne faze (SMES) z zunanjo vodno fazo (raztopino polimera). Rezultati predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pokazali, da lahko neželjeno mešanje obeh faz učinkovito omejimo z dodatkom  $\text{CaCl}_2$  v SMES. Na ta način sprožimo proces premreževanja polimera v ovojnici s  $\text{Ca}^{2+}$  ioni od znotraj navzven, tj. takoj ko obe fazi prideta v stik. Mešanje na medfazi lahko še dodatno omejimo s povečanjem viskoznosti notranje faze, zato smo jedro zgostili s koloidnim  $\text{SiO}_2$  (57).

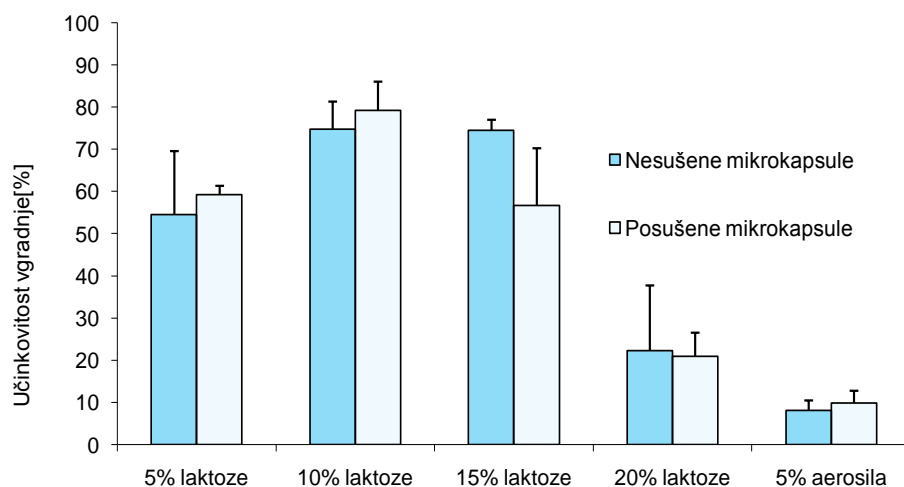
Na učinkovitost vgradnje SMES v polimerno ogrodje nadalje vpliva sestava ovojnice mikrokapsul, saj je npr. od poroznosti le-te odvisen tudi obseg iztekanja jedrne faze med postopkom sušenja mikrokapsul. Predpostavljali smo, da lahko poroznost polimernega ogrodja mikrokapsul zmanjšamo z dodatkom ustreznih polnil v raztopino ogrodnega polimera, ki se bodo med postopkom sušenja obarjala in zapolnila nastajajoče pore v polimerni ovojnici ter tako omejijo iztekanje jedra iz mikrokapsul.

Na čvrstost in poroznost ovojnice vpliva tudi koncentracija polimera v zunanji vodni fazi, ki je osnova za nastanek polimerne ovojnice mikrokapsul. Predhodno raziskovalno delo na katedri je pokazalo, da 2 % polimerna raztopina daje najlepše oblikovane mikrokapsule, ko je razmerje pektina in alginata 3:1, dodatek 5% laktoze kot polnila v ovojnico pa pripomore k višji učinkovitosti vgradnje furosevida v mikrokapsule (57, 58).

V diplomski nalogi smo želeli proučiti ali lahko z dodatkom še večje količine laktoze oz. drugega ustreznega polnila dodatno izboljšamo učinkovitost vgradnje jedrne faze, zato smo jo v vodno raztopino polimera dodali 5, 10, 15 in 20 % m/m laktoze ali 5% m/m aerosila, ki po literaturnih podatkih tudi izkazuje ugoden vpliv na morfološke lastnosti mikrokapsul (59). Če smo dodali več kot 20 % laktoze, je bila viskoznost polimerne raztopine previsoka; posledično je prihajalo do mašenja šob mikroenkapsulatorja, zato v tem primeru izdelava mikrokapsul z metodo ko-ekstruzije curka tekočine ni bila mogoča. Vpliv količine



in vrste dodanega polnila na iztekanja jedra in s tem na učinkovitost vgradnje furosemida v nesušene in suhe mikrokapsule je prikazan na sliki 13.



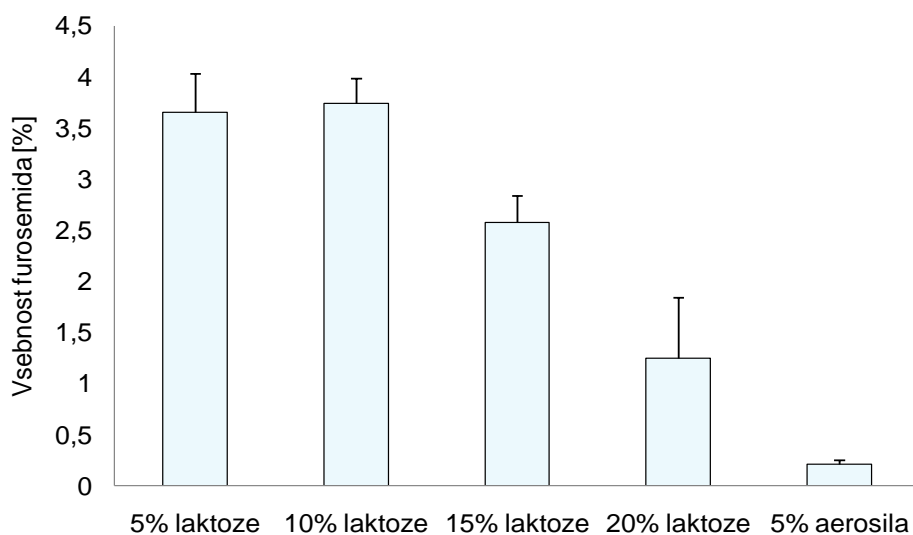
**Slika 13:** Učinkovitost vgradnje furosemida v mikrokapsule.

Iz slike 13 je razvidno, da se pri nesušeni mikrokapsuli učinkovitost vgradnje izboljša z dodatkom 10 ali 15 % laktoze (~75 %) glede na MK s 5 % laktoze (~55 %). Laktoza dodana v nižjih (5-10 %) koncentracijah verjetno interagira z vodnimi molekulami in tako zmanjša njihovo mobilnost. Posledično se zato upočasnjuje mešanje med vodno fazo ovojnice in lipidnim jedrom, kar omogoča večjo učinkovitost vgradnje (18). Nasprotno pa dodatek laktoze v še večji količini (20 %) neugodno vpliva na učinkovitost vgradnje, saj se ta zmanjša na ~20 %. Možna razlaga je, da preveč laktoze v ovojnici moti premreževanje polimera s kalcijevimi ioni, kar vodi do nastanka slabše premreženih mikrokapsul z manj kompaktno ovojnico. Neugoden vpliv na učinkovitost vgradnje smo opazili tudi pri dodatku 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub> (aerosila). V prisotnosti slednjega smo med postopkom izdelave mikrokapsul opazili intenzivno iztekanje samo-mikroemulgirajočega jedra v raztopino za premreževanje, posledica česar je nizka učinkovitost vgradnje (~7 %).

Iz slike 13 je nadalje razvidno, da dodatek 5-10 % laktoze v raztopino ogrodnega polimera učinkovito prepreči iztekanje jedrne faze tudi med postopkom sušenja mikrokapsul; učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom se po sušenju ni zmanjšala. Pri mikrokapsulah s 15 % laktoze pa smo nasprotno določili bistveno znižanje učinkovitosti vgradnje med potekom sušenja. Predvidevamo, da v nasprotju z dodatkom optimalne količine laktoze, ki

zapolni pore v polimerni ovojnici, prevelik dodatek laktoze poveča možnost za iztekanje jedra. Pri mikrokapsulah z 20 % laktoze ter 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub> je bil vpliv sušenja na učinkovitost vgradnje zanemarljiv, vendar je bila le-ta že takoj po izdelavi zelo nizka.

Pri oblikovanju mikrokapsul si poleg čim večje učinkovitosti vgradnje kapsulirane učinkovine želimo zagotoviti tudi čim večjo vsebnost le-te v mikrokapsulah. Slika 14 prikazuje vpliv sestave ovojnice na vsebnost furosemida v mikrokapsulah. Iz slike 14 je razvidno, da je bila vsebnost furosemida največja v suhih mikrokapsulah z 10 % laktoze (~3,8 %), kar se ujema z rezultati učinkovitosti vgradnje jedrne faze. Približno enako vsebnost furosemida smo dosegli tudi z izhodiščnim dodatkom 5 % laktoze (~ 3,7 %).

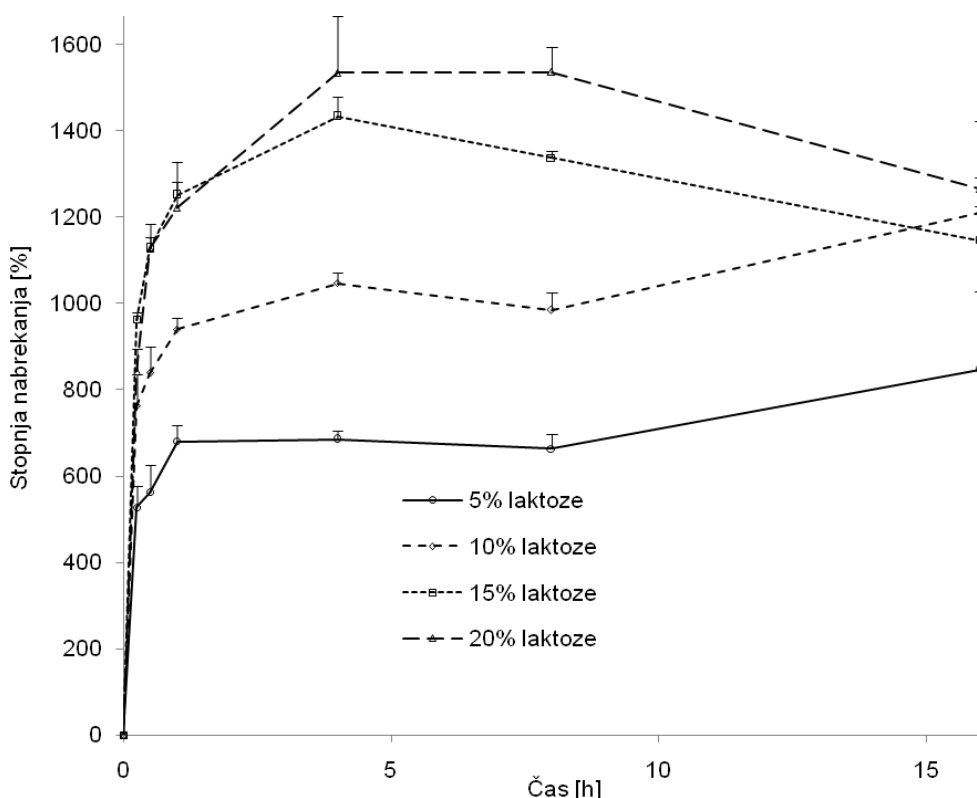


**Slika 14:** Vpliv sestave ovojnice na vsebnost furosemida v mikrokapsulah.

Z dodatkom večje količine laktoze v ovojnico pa se je vsebnost ZU zmanjšala; tako je le-ta v mikrokapsulah s 15 % laktoze znašala ~ 2,5 %, v mikrokapsulah z 20 % laktoze pa le še ~ 1,3 %. Mikrokapsule s 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub> v ovojnici, ki so imele najnižjo učinkovitost vgradnje jedrne faze, so imele v skladu s pričakovanji tudi najnižjo vsebnost furosemida; zgolj ~ 0,2 %.

## 4.2. Nabrekanje in erozija mikrosfer

Pektin in alginat spadata med hidrofilne naravne polimere, ki v stiku z vodo nabrekajo. Pri tem se ustvari sloj gela, ki uravnava prodiranje vode v ogrodje in raztapljanje vgrajene učinkovine (60). Za spremljanje nabrekanja in erozije smo pripravili referenčne mikrosfere iz pektina in alginata v razmerju 3:1 z različno vsebnostjo laktoze, ki niso vsebovale jedrne faze (t.j. SMES s furosemidom). Kot medij smo izbrali raztopino HCl v vodi s pH 3 (podoben pH kot v želodcu) ter fosfatni pufer s pH 6,8 (podoben pH kot v tankem črevesu). Slika 15 prikazuje nabrekanje mikrosfer z različnim deležem laktoze v mediju s pH 3.



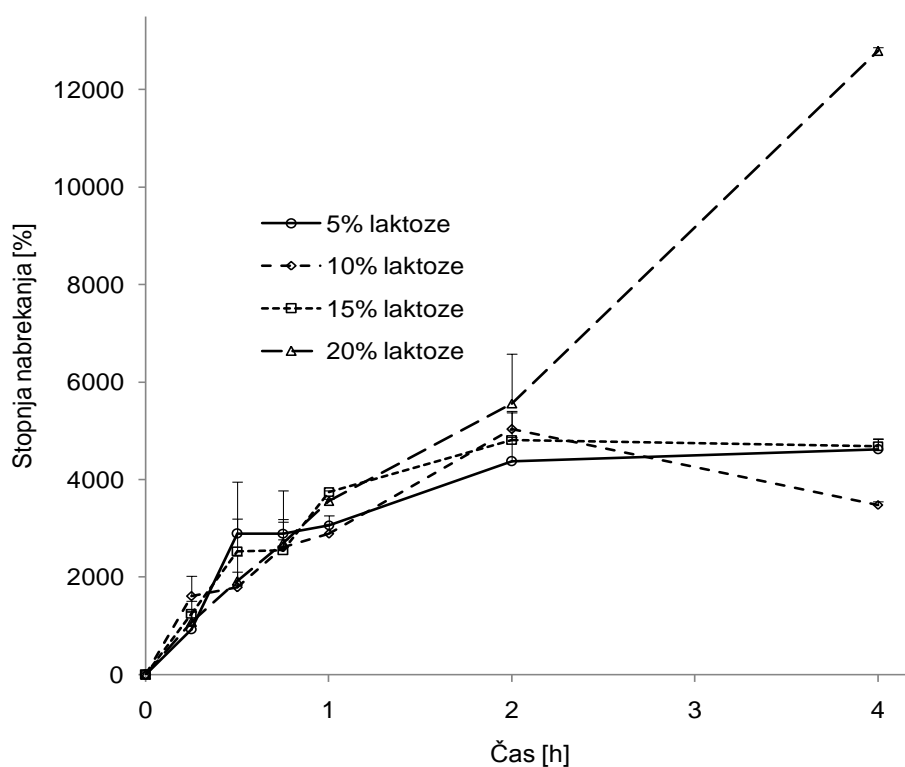
**Slika 15:** Nabrekanje mikrosfer iz pektina in alginata v razmerju 3:1 z dodanimi 5 - 20% laktoze v raztopini HCl s pH 3.

V polimernem ogrodju ima dodana laktoza vlogo tvorilca por (61). Predvidevali smo, da bo med nabrekanjem mikrosfer z večjo vsebnostjo laktoze kot posledica raztapljanja le-te, nastalo večje število oz. večje pore, kar bi olajšalo privzem medija in s tem nabrekanje mikrosfer. Rezultati so našo hipotezo potrdili, saj so v mediju s pH 3 najbolj in najhitreje nabrekale mikrosfere z 20 % laktoze. Sledile so jim mikrokapsule s 15 in 10 % laktoze.

Mikrosfere s 5 % laktoze so nabrekale najpočasneje; v primerjavi z 20 % laktoze (stopnja nabrekanja ~ 1400 %) so dosegle skoraj pol manjšo stopnjo nabrekanja (~ 800 %).

Kinetika nabrekanja je bila pri vseh preizkušanih mikrosferah v kislem mediju najbolj intenzivna znotraj prve ure. Podoben pojav sta pri delcih iz hitosana in pektina opazila tudi Chang in Lin (62). Ca-pektinat/alginat se v kislem pretvorita v netopno pektinsko/alginsko kislino, ki lahko nabreka. V kislem mediju pride tudi do odbojnih sil med  $\text{NH}_3^+$  skupinami v verigah hitosana. Po drugi strani pa lahko prihaja do kompleksih interakcij med poliuronati in hitosanom, nastanka vodikovih vezi ter hidrofobnih interakcij. Te povezave skupaj z elastičnostjo samega polimernega ogrodja verjetno omejujejo nadaljnje nabrekanje mikrokapsul (62).

V primerjavi z medijem s  $\text{pH} = 3$  so v fosfatnem pufru s  $\text{pH} = 6,8$  vse mikrosfere izkazovale višjo stopnjo nabrekanja (slika 16).



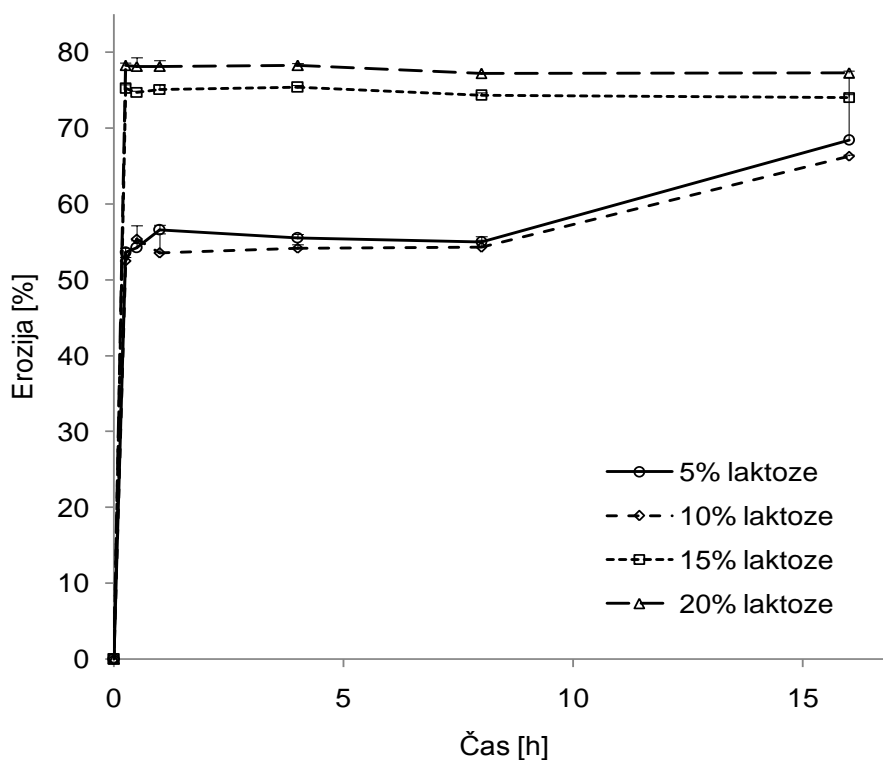
**Slika 16:** Nabrekanje mikrosfer iz pektina in alginata v razmerju 3:1 z dodanimi 5-20% laktoze v fosfatnem pufru s  $\text{pH} 6,8$ .

Kot je razvidno iz slike 16, so prvi dve uri nabrekanja v fosfatnem pufru s  $\text{pH} = 6,8$  vse mikrosfere izkazovale podoben profil nabrekanja. Po 2. uri pa lahko opazimo bistvene

razlike v stopnji nabrekanja mikrosfer z 20 % laktoze v primerjavi z ostalimi mikrosferami. Medtem ko je krivulja nabrekanja slednjih po 2 h dosegla plato (stopnja nabrekanja ~4000 %), so mikrosfere z 20 % laktoze še naprej intenzivno nabrekale in po 4 h smo določili stopnjo nabrekanja ~13000 %.

Raziskovalci povezujejo nabrekanje kalcijevega alginata in kalcijevega pektinata v fosfatnem pufru z izmenjavo  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Na}^+$  ionov (63, 64).  $\text{Na}^+$  ioni iz pufra se izmenjujejo s  $\text{Ca}^{2+}$  ioni, vezanimi na  $\text{COO}^-$  skupine polimera. Posledica so elektrostatske odbojne sile med negativno nabitimi  $\text{COO}^-$  skupinami, kar spodbudi vdor medija v nabreklo polimerno ogrodje. Izmenjani  $\text{Ca}^{2+}$  se oborijo v obliki kalcijevega fosfata.

Polimerna struktura pa ne more v nedogled nabrekati; ko se zaradi hidratacije dovolj razrahlja, začne razpadati - erodirati. Erozijska je lastnost hidrogelov, ki nam pove, kakšen delež matriksa je erodiral med nabrekanjem hidrogela. Določali smo jo sočasno s spremljanjem nabrekanja. Slika 17 prikazuje erozijo mikrosfer pri pH 3.

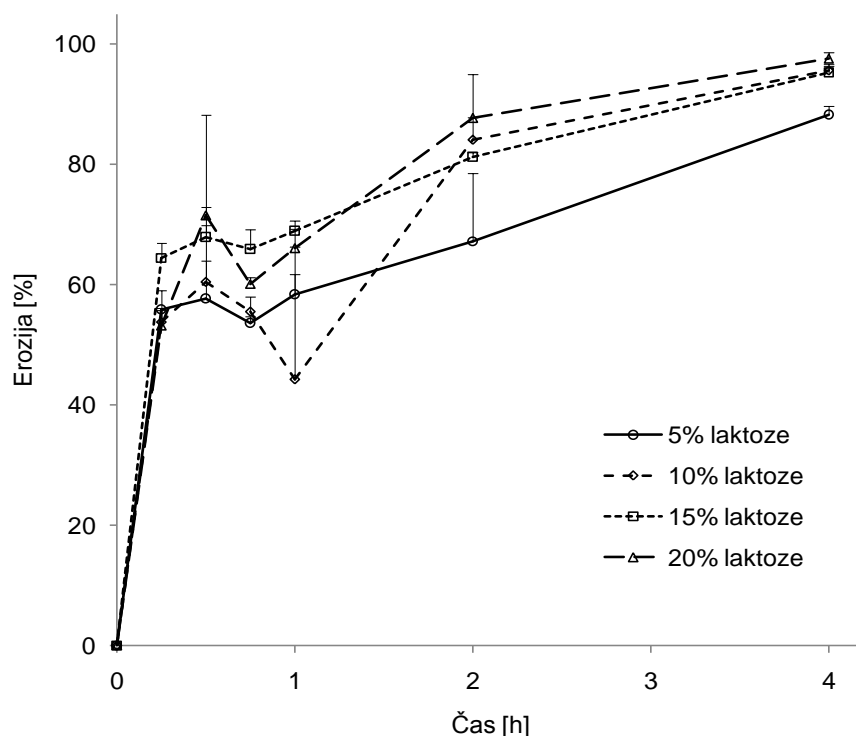


**Slika 17:** Vpliv dodatka laktoze na erozijo mikrosfer v vodni raztopini HCl s pH 3.

Mikrosfere z večjo vsebnostjo laktoze bolj intenzivno in hitreje erodirajo, kar se sklada z rezultati nabrekanja. Iz slike 17 je razvidno, da so že po 15 min mikrosfere izgubile med ~

55 % (5 % laktoze) in ~80 % (20 % laktoze) svoje mase, nato pa se vzpostavi »plato«. Velika izguba mase v začetni fazi nabrekanja mikrosfer je najverjetneje posledica hitrega raztapljanja laktoze kot majhne hidrofilne molekule ter njenega izplavljanja v medij za nabrekanje. V kislem pH se raztaplja tudi hitosanska obloga mikrosfer, kar prav tako doprinese k zmanjšanju mase le-teh. Sriamornsak in sodelavci razlagajo, da se v kislem pH kalcijev pektinat in alginat pretvorita v pektinsko/alginsko kislino (63, 65). Prav netopnost pektinske/alginske kisline je lahko vzrok, da se po začetni obsežni izgubi mase le-ta skoraj ne spreminja več.

Slika 18 prikazuje erozijo mikrosfer v pufru s pH 6,8.



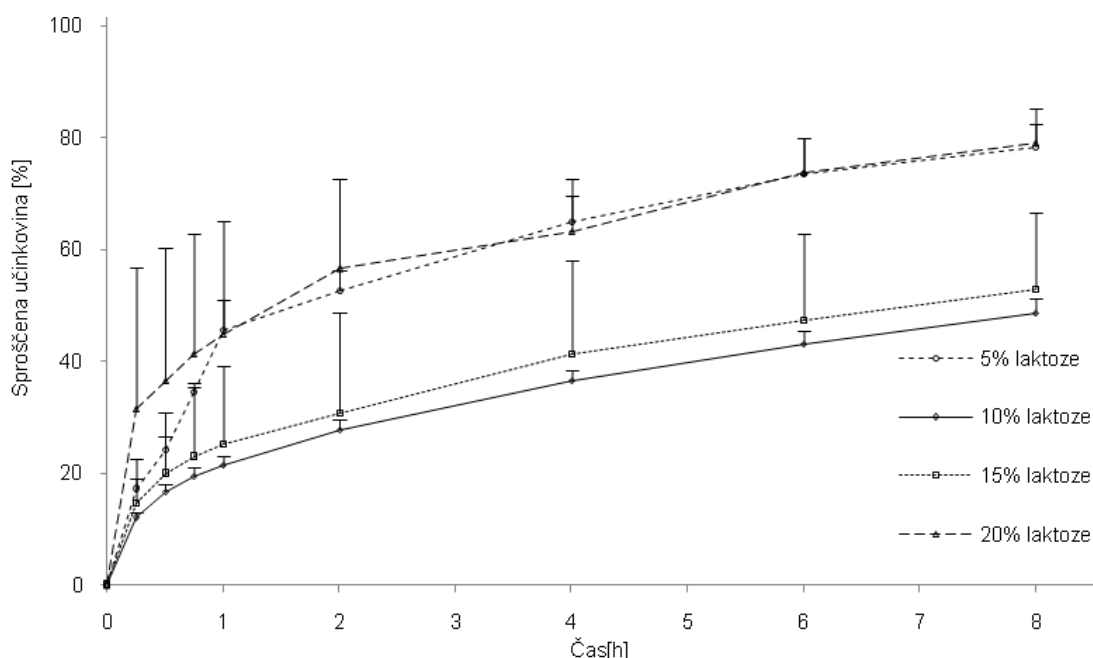
**Slika 18:** Erozija mikrosfer z različnim dodatkom laktoze v fosfatnem pufru s pH 6,8.

V začetni fazi nabrekanja v mediju s pH = 6,8 je erozija mikrosfer nižja kot v kislem pH. To lahko povežem z netopnostjo hitosanske obloge pri pH nad 6,5, kar verjetno preprečuje hitro izplavljanje vodotopnih komponent mikrosfer v zunanji medij. Po prvi uri pa začne erozija vseh mikrosfer naraščati; po 4h nabrekanja v mediju s pH = 6,8 se je masa mikrokapsul zmanjšala bolj kot po 16h nabrekanja v mediju s pH = 3. Večji obseg erozije v mediju s pH = 6,8 je posledica ionske izmenjave  $\text{Ca}^{2+}$  ionov z  $\text{Na}^+$  ioni iz fosfatnega pufra ter posledičnega razrahljanja in razpada polimerne rešetke. Vpliv deleža laktoze v

mikrosferah na erozijo le-teh je sicer podoben kot v raztopini HCl, vendar so razlike v eroziji med mikrosferami minimalne.

### 4.3. Vpliv laktoze na sproščanje furosemda iz mikrokapsul

Pri razvoju in izdelavi novih farmacevtskih oblik je profil sproščanja vanje vgrajene učinkovine zelo pomemben. Sproščanje furosemda iz mikrokapsul s 5, 10, 15 in 20 % laktoze v ovojnici smo izvedli v raztopini HCl s pH = 3 (slika 19) ter fosfatnem pufru s pH = 6,8 (slika 20).

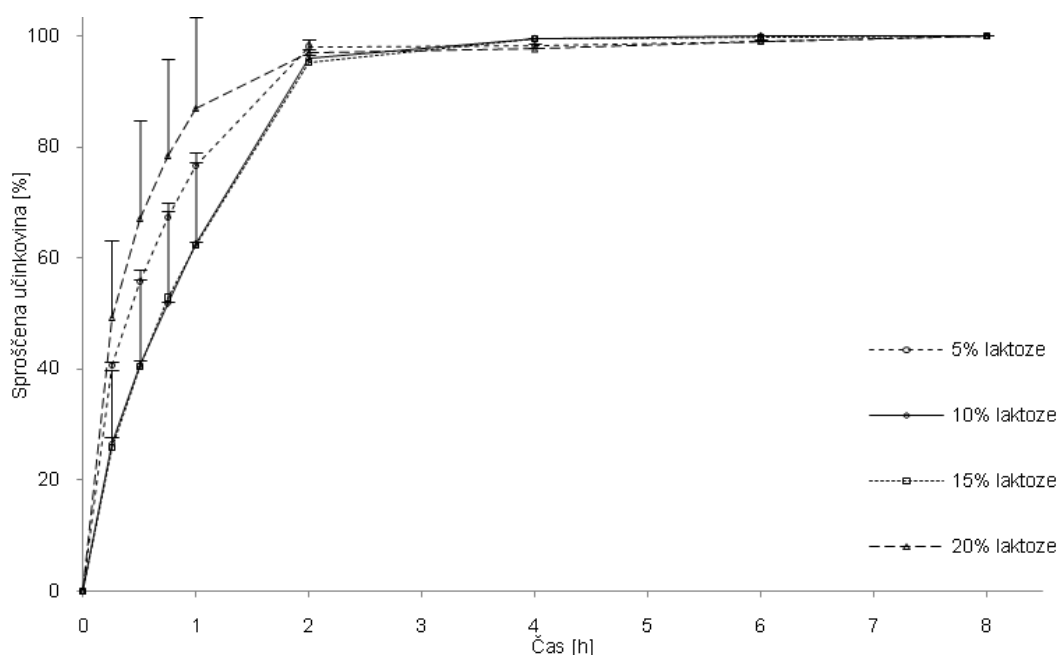


**Slika 19:** Profil sproščanja furosemda iz mikrokapsul z laktozo pri pH = 3.

Iz slike 19 je razvidno, da se obseg sproščanja ZU zmanjšuje z nižanjem vsebnosti laktoze v ovojnici mikrokapsul od 20 (~ 65 % po 4h) do 10% (~ 35 % po 4h). Obseg sproščanja iz mikrokapsul s 5 % laktoze je nepričakovano visok - enak kot pri mikrokapsulah z 20 % laktoze (~ 65 % sproščene ZU po 4h). Med testom raztapljanja prihaja do raztapljanja laktoze iz ovojnice mikrokapsul in do nastanka por, ki olajšajo prodiranje vodnega medija v notranjost mikrokapsul. Prisotnost večje količine laktoze tako verjetno povzroči nastanek večjega števila por, kar v skladu z rezultati nabrekanja in erozije polimernega ogrodja pospeši sproščanje vgrajene učinkovine iz mikrokapsul. Od te hipoteze odstopajo rezultati

sproščanja furosemida iz mikrokapsul s 5 % laktoze. Možna razlaga za nepričakovano hitro sproščanje furosemida iz teh mikrokapsul je ta, da je zaradi nizkega nabrekanja le-teh na njihovi površini nastal manj viskozen hidratiran sloj, ki je tako manj zadrževal sproščanje vgrajene ZU v notranjosti mikrokapsul.

V fosfatnem pufru s pH 6,8 je bilo sproščanje furosemida iz mikrokapsul bistveno hitrejše. Prav tako je bil bistveno višji tudi obseg sproščanja ZU in sicer se je iz vseh mikrokapsul sprostil skoraj 100 % vgrajene ZU že po dveh urah testa raztapljanja (slika 20).



**Slika 20:** Sproščanje furosemida iz mikrokapsul v fosfatnem pufru s pH = 6,8.

Pri pH 6,8 furosemid ionizira ter je zato dobro topen, pri pH 3 pa se nahaja v neionizirani oz. slabo topni obliki. Pri sproščanju v vodni raztopini HCl lahko zato opazimo večje razlike med preizkušanimi mikrokapsulami kot v fosfatnem pufru, kjer so profili sproščanja furosemida med seboj bolj podobni. V obeh medijih pa smo opazili, da je bila ponovljivost sproščanja boljša za mikrokapsule s 5 in 10 % laktoze kot za mikrokapsule s 15 in 20 % laktoze. To lahko povežemo z dejstvom, da so bile mikrokapsule s 5 in 10 % laktoze bolj sferične, manj nagubane in verjetno tudi bolj enakomerno premrežene. Višja vsebnost laktoze verjetno prispeva k manj homogenemu premreževanju in s tem k nastanku bolj heterogenih mikrokapsul, posledica česar je slabša ponovljivost rezultatov sproščanja vgrajene učinkovine. Tudi Madziva in sodelavci ter Liu in Krishnan so opazili



večji obseg sproščanja iz alginatno/pektinskih mikrokapsul v alkalnem mediju, medtem ko je pa je Yaya s sodelavci določil največji obseg sproščanja alginatno-pektinskih mikrokapsul v kislem mediju (66, 67, 68). Do razlik v rezultatih sproščanja med raziskovalci lahko prihaja tudi zaradi različne kemijske sestave komercialno dosegljivih alginatov in pektinov – razmerja guluronskih/manuronskih kislin ter številom prostih COOH skupin.

Da bi mehanizme sproščanja še podrobneje razložili, smo izračunali ujemanje eksperimentalnih rezultatov testa raztapljanja z enačbami, ki opisujejo različne kinetike sproščanj: 0. red (*enačba 6*), 1. red (*enačba 7*), Higucijeva kinetika (*enačba 8*), kinetika po Korsmejer-Peppasu (*enačba 9*), ki upošteva več vplivov ter kinetika po Hixon-Crowellu (*enačba 10*), ki upošteva zmanjšanje površine mikrokapsul med sproščanjem.

Vrednost eksponenta  $n$  v Korsmejer-Peppasovi enačbi nakazuje različne mehanizme sproščanja. V primeru Fickovega sproščanja (t.j. sproščanja odvisnega od difuzije) je  $n$  za sferične oblike  $\leq 0,43$ . Pri sproščanju, ki je odvisno od relaksacije polimera (ang. »Case II transport«), ima eksponent  $n$  vrednost 0,85 za sfere. Če vrednosti  $n$  padejo med prej omenjeni mejni vrednosti, govorimo o ne-Fickovi kinetiki sproščanja, ki je odvisna tako od difuzije skozi polimer kot tudi od relaksacije slednjega. Vrednosti  $n > 0,85$  za sfere povezujemo s posebnim primerom kinetike, kjer na mehanizem sproščanja vpliva povečana plastičnost viskozne bariere - t.j. polimernega gela, ki se relaksira (ang. »Super Case II transport«) (69).

Za izračun ujemanja smo uporabili eksperimentalne podatke iz testa raztapljanja v mediju s pH = 3 (preglednica VI). Sproščanje furosemda iz vseh mikrokapsul je v mediju s pH = 6,8 potekalo zelo hitro, zato preučevanje kinetike sproščanja v tem mediju ni bilo smiselno.

**Preglednica VI:** Pearsonovi koeficienti korelacije in konstante sproščanja ZU iz mikrokapsul z laktozo v vodni raztopini HCl s pH = 3 za različne preizkušane enačbe kinetik sproščanja.

Formulacija	0. red		1. red		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixon-Crowell	
	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	n	R <sup>2</sup>	k
<b>5% laktoze</b>	0,7903	8,301	0,9467	0,1516	0,9489	27,61	0,9529	0,5765	0,8903	0,2104
<b>10% laktoze</b>	0,8704	5,068	0,9296	0,0725	0,9873	16,35	0,9986	0,3911	0,9119	0,0992
<b>15% laktoze</b>	0,7764	5,917	0,8852	0,0996	0,9458	19,83	0,9955	0,3219	0,8526	0,1288
<b>20% laktoze</b>	0,5573	6,257	0,7706	0,1327	0,7759	22,41	0,9932	0,1517	0,7339	0,1750

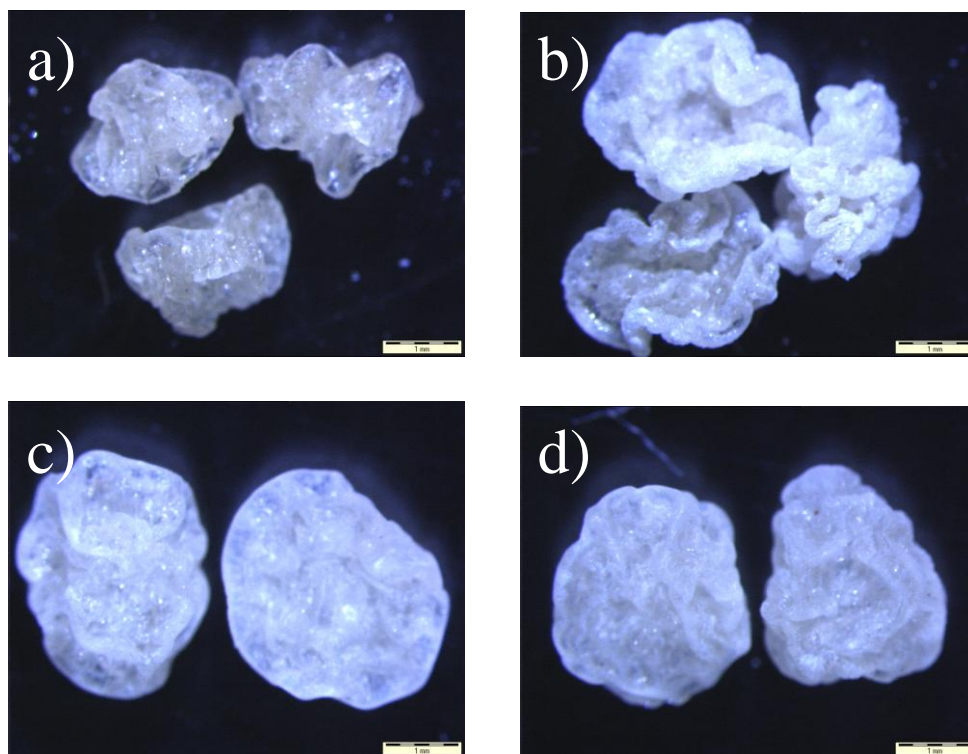
Kot je razvidno iz preglednice VI, so se rezultati testa reztapljanja v mediju s pH = 3 mikrokapsul s 5 % laktoze najboljše ujemali ( $R^2 = 0,95$ ) s kinetiko sproščanja po Korsmeyer-Peppasu. Vrednost Korsmeyer-Peppasovega eksponenta  $n$  je znašala 0,5765, kar nakazuje na ne-Fickovo difuzijo – sproščanje, na katerega vpliva tako difuzija skozi polimerno ogrodje kot tudi relaksacija le-tega. Tudi ostale preizkušane formulacije (10, 15 in 20 % laktoze) so pokazale najboljše ujemanje s Korsmeyer-Peppasovim modelom ( $R^2$  od 0,9932 do 0,9986), pri čemer je vrednost vseh eksponentov  $n < 0,43$ , kar nakazuje na difuzijsko kontrolirano sproščanje. V skladu s tem smo pri mikrokapsulah z 10 in 15 % laktoze opazili tudi dobro ujemanje s Higucijevim modelom ( $R^2 = 0,9873$  oz. 0,9458), kar pa, presenetljivo, ne velja za mikrokapsule z 20 % laktoze ( $R^2 = 0,7759$ ).

Možna razlaga opisanih rezultatov je, da pri raztapljanju mikrokapsul z 10% in več laktoze v njihovi polimerni ovojnici nastane že toliko por, da difuzija postane prevladujoč vpliv na mehanizem sproščanja – sproščanje tako ni več odvisno od relaksacije polimera.

## 4.5. Morfološke značilnosti

### 4.5.1. Oblika in velikost mikrokapsul in mikrosfer pod optičnim mikroskopom

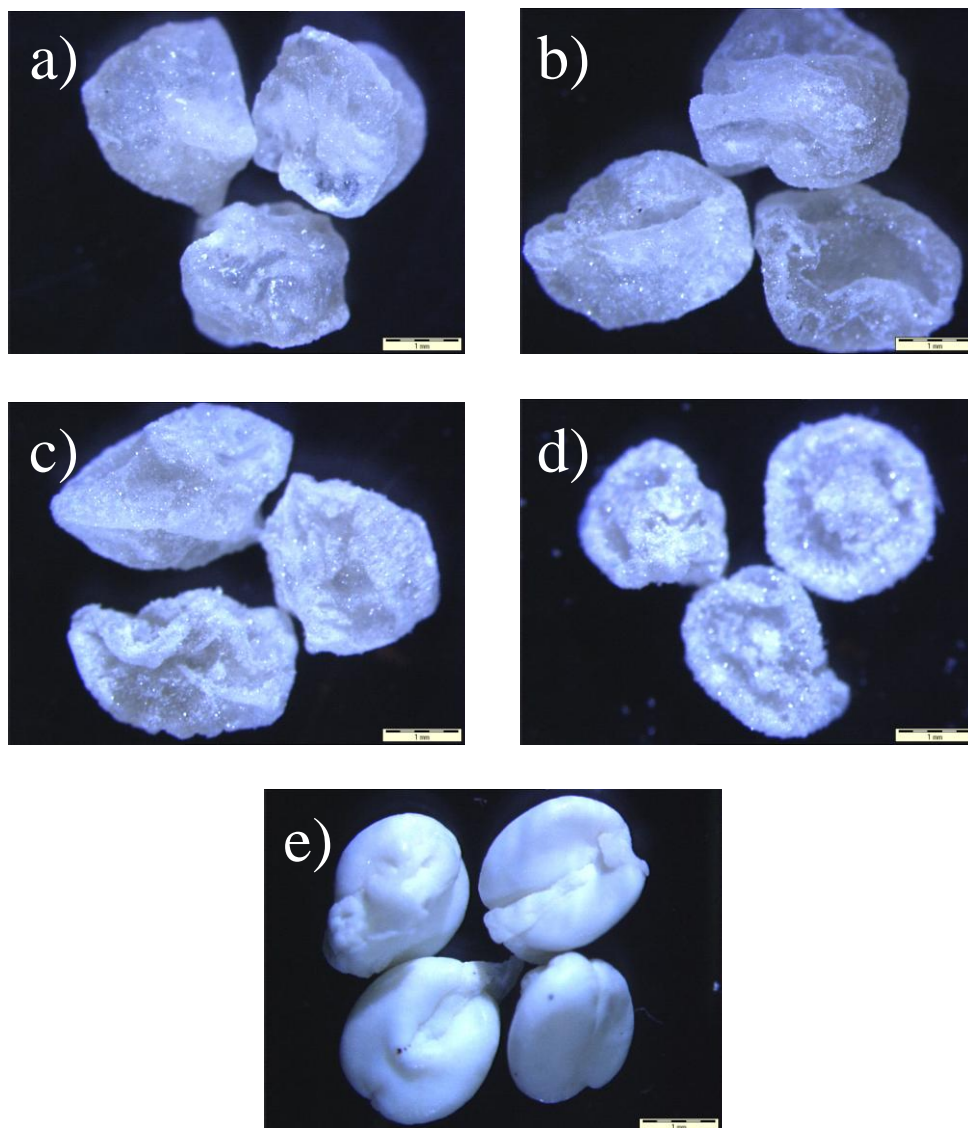
Morfološke lastnosti izdelanih mikrokapsul in mikrosfer smo proučevali s pomočjo optične mikroskopije (slika 21, slika 22).



**Slika 21:** Mikrosfere pod optičnim mikroskopom: a) mikrosfere s 5% laktoze, b) mikrosfere s 10 % laktoze, c) mikrosfere s 15 % laktoze, d) mikrosfere z 20 % laktoze.

Iz slike 21 je razvidno, da je velikost mikrosfer naraščala z naraščanjem vsebnosti laktoze v ogrodju le-teh od 5 – 20 %. Količina laktoze je vplivala tudi na obliko in strukturo mikrosfer. Iz slike 21 vidimo, da so mikrosfere z naraščajočim deležem laktoze bolj sferične oblike in imajo manj nagubano oz. hrapavo površino.

Vse izdelane mikrosfere so bile bolj jajčaste oblike kot okrogle (slika 21). Podobno obliko Ca-pektinatnih/alginatnih mikrodlecev so opazili tudi Yaya in sodelavci, ki so manj sferično obliko teh delcev razložili z vplivom strukture pektina, in sicer stranskih verig ostankov nevtralnih sladkorjev (68).

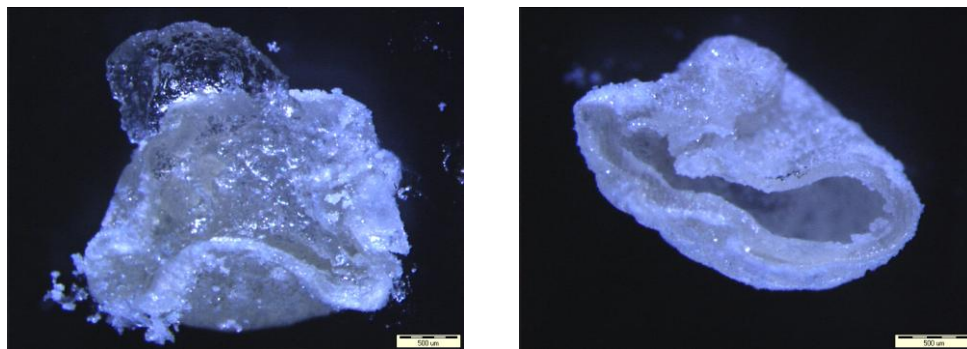


**Slika 22:** Mikrokapsule pod optičnim mikroskopom: a) mikrokapsule s 5% laktoze, b) mikrokapsule s 10 % laktoze, c) mikrokapsule s 15 % laktoze, d) mikrokapsule z 20 % laktoze, e) mikrokapsule s 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub>.

V nasprotju z mikrosferami smo največje in najlepše oblikovane mikrokapsule izdelali iz raztopine ogrodne polimera z 5 – 10 % laktoze, najmanjše in najslabše oblikovane pa z 20 % laktoze (slika 22), kar je v skladu z rezultati učinkovitosti vgradnje SMES v mikrokapsule. Mikrokapsule s 5, 10 in 15 % laktoze so bile sicer čvrste, a so po stisku med prsti sprostile lipofilno jedro. Njihova ovojnica je bila zelo nagubana. Mikrokapsule z 20 % laktoze v raztopini ogrodnih polimerov so bile drobljive med prsti, njihova oblika pa ni bila sferična, ampak bolj ploščata. Opazili smo tudi, da je bila površina mikrokapsul s koloidnim SiO<sub>2</sub> veliko bolj gladka kot pri mikrokapsulah z laktozo, vendar pa ovojnica ni

bila sposobna zadržati jedra v notranjosti mikrokapsul, ki ga zato lahko opazimo zunaj ovojnice (slika 22e).

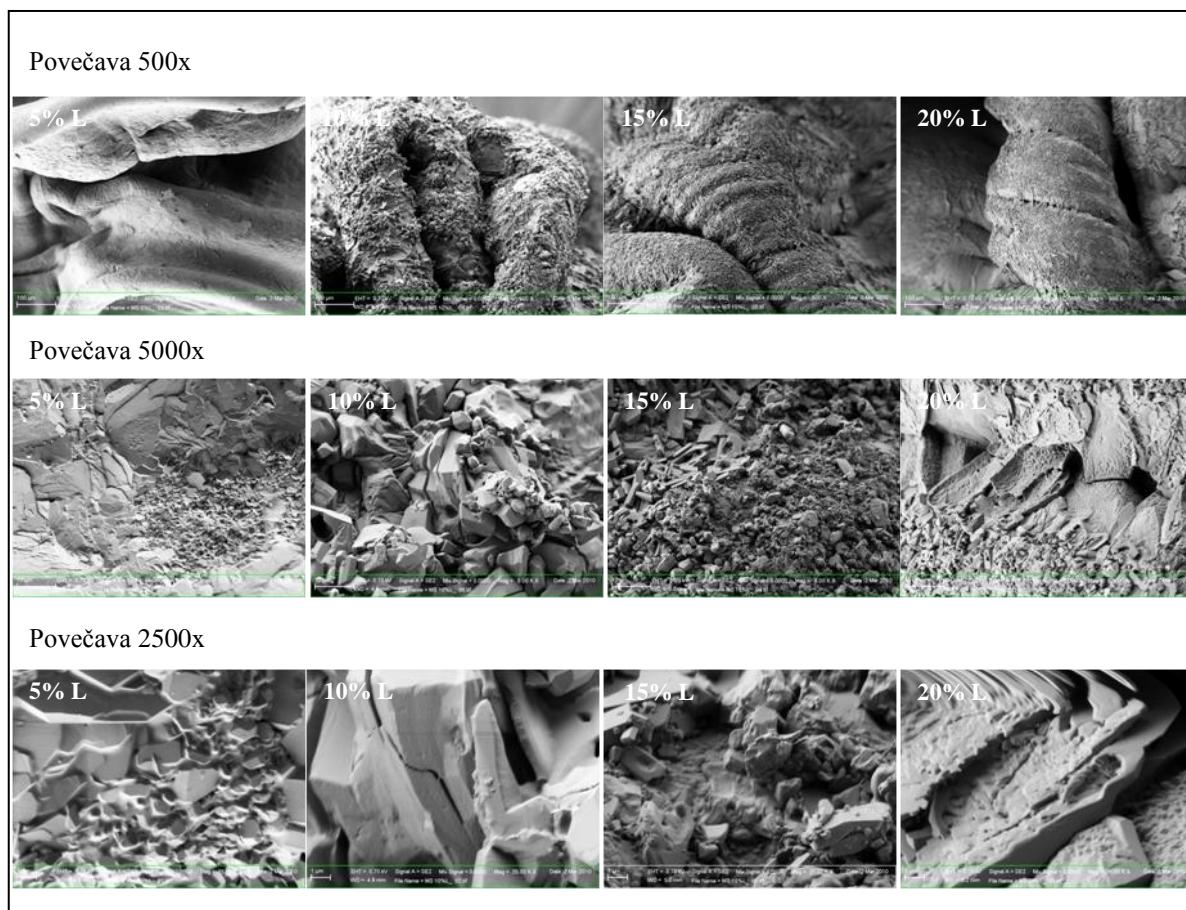
Mikrokapsule z 10 % laktoze, ki so bile največje in najlepše oblikovane, smo prerezali s skalpelom. Opazili smo, da se je v notranjosti ohranilo tekoče lipofilno jedro. Slika prečnega prereza nam tudi potrди, da gre za filmski tip mikrokapsul (Slika 23).



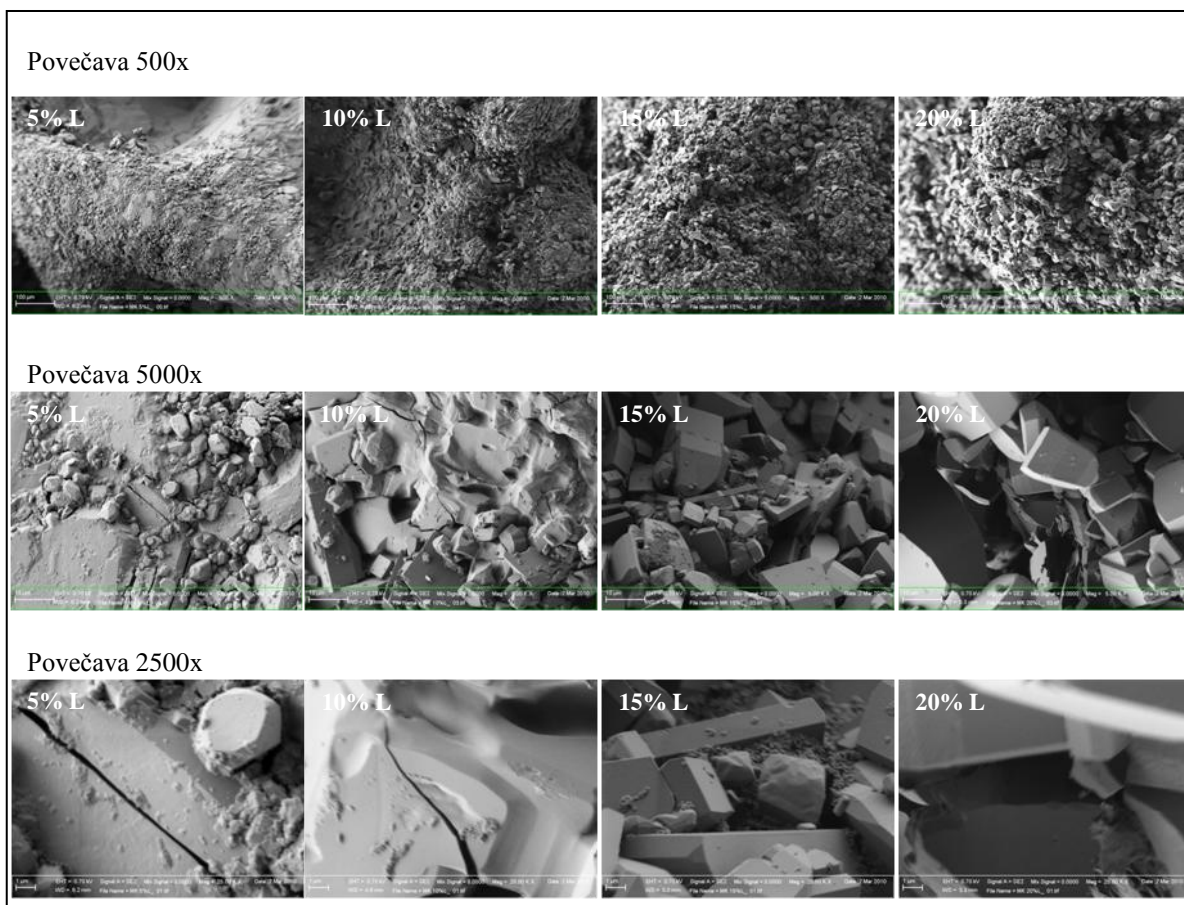
**Slika 23:** Prečni prerez mikrokapsule z 10% laktoze.

#### 4.5.2. Površina mikrodelcev pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM)

Površine mikrosfer in mikrokapsul z laktozo smo opazovali tudi s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (slika 24, slika 25). Tako pri mikrosferah kot pri mikrokapsulah je razvidna močno nagubana površina. Prav tako smo pri vseh preiskovanih vzorcih opazili izmenjajoča se gladka področja in bolj »zrnata« področja – za slednja predvidevamo, da so posledica kristalizacije laktoze v ogrodju mikrosfer/ovojnici mikrokapsul. Iz slik je prav tako razvidno, da z naraščanjem vsebnosti laktoze naraščajo področja kristaliničnosti površine opazovanih vzorcev.



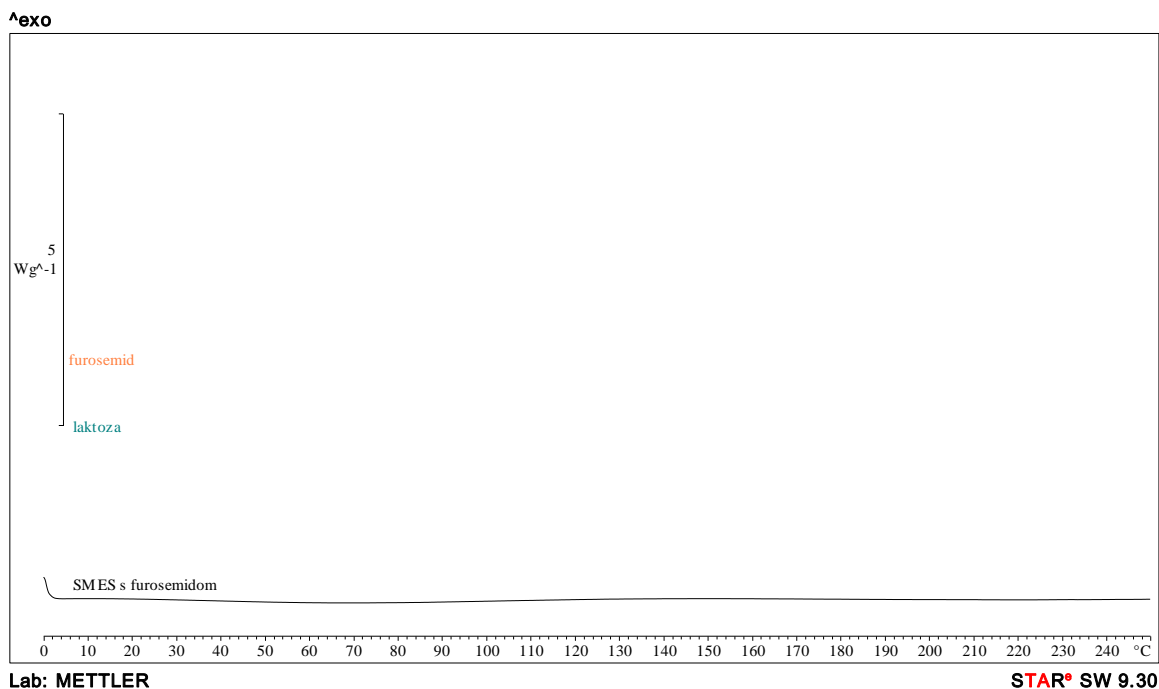
**Slika 24:** Površina mikrosfer s 5, 10, 15 in 20 % laktoze (od leve proti desni) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom z uporabljenimi različnimi povečavami.



**Slika 25:** Različne povečave površine mikrokapsul s 5, 10, 15 in 20 % laktoze (od leve proti desni) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

#### 4.6. Določanje interakcij sestavin mikrokapsul s termično analizo

Posneli smo DSC termograme praškastega furosemida, laktoze, ki smo jo uporabili kot polnilo v ovojnici mikrokapsul, SMES s furosemidom (slika 26) ter mikrosfer brez vgrajenega furosemida, ki so vsebovale različno količino laktoze (slika 27).

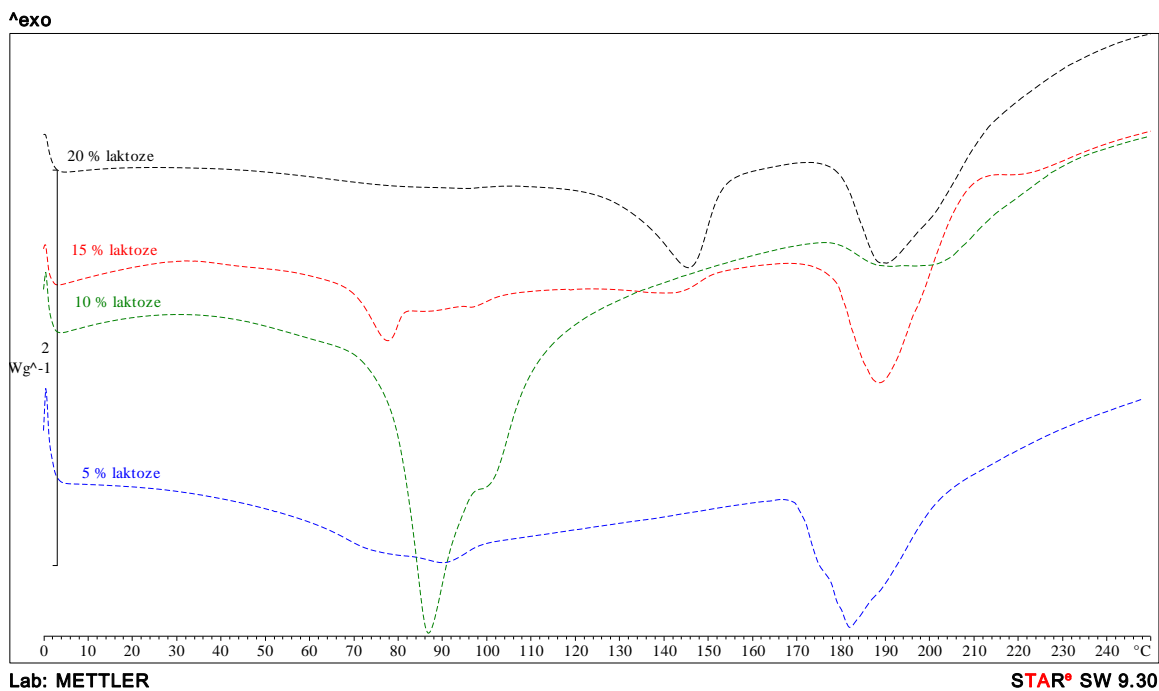


**Slika 26:** DSC termogram furosemida in laktoze ter SMES s furosemidom.

Na DSC termogramu furosemida vidimo ozek eksotermni vrh pri okoli 220°C, ki pripada razpadu kristalne strukture furosemida; to se sklada tudi z literaturnimi podatki (70). Pri analizi SMES z vgrajenim furosemidom nismo določili omenjenega eksotermnega vrha, saj je bila učinkovina popolnoma raztopljena v SMES.

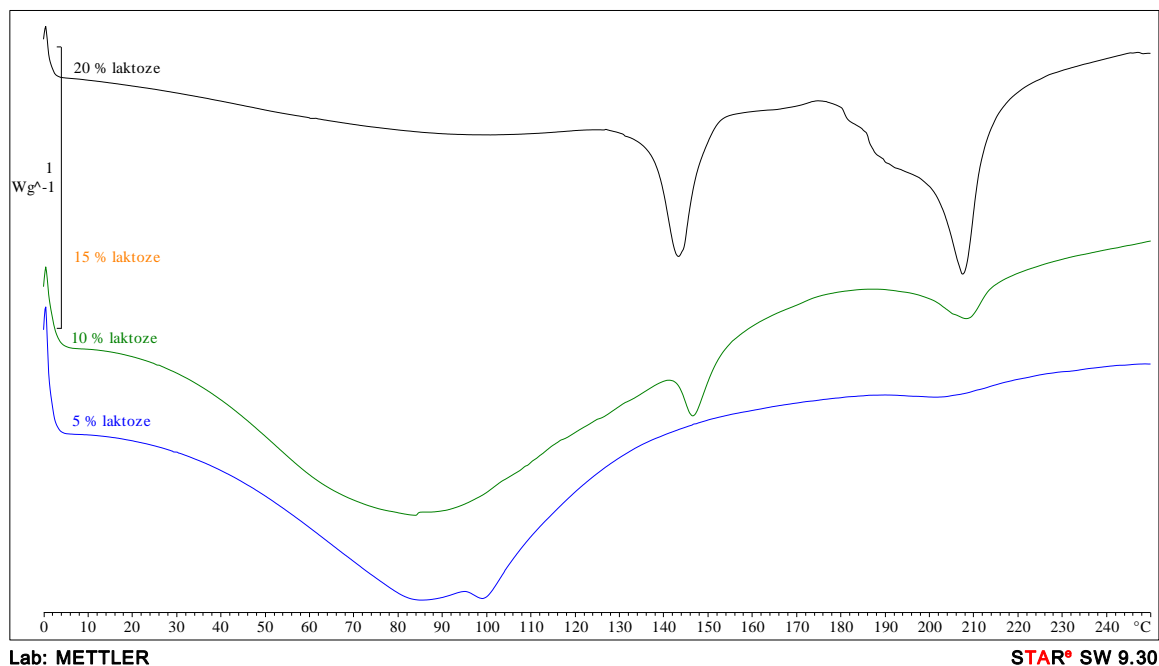
Na sliki 26 nadalje vidimo, da sta na DSC termogramu laktoze prisotna dva endotermna vrhova. Vrh pri okoli 145°C pripada dehidraciji laktoze monohidrata, kar smo potrdili tudi s termogravimetrično analizo, pri 220°C pa je opazen še talilni vrh laktoze, ki mu sledi razpad le-te.





**Slika 27:** DSC termogram mikrosfer s 5 – 20 % laktoze.

Iz slike 27 vidimo, da imajo termogrami mikrosfer z različno vsebnostjo laktoze več endotermnih vrhov. Pri temperaturah med 30 in 120°C vidimo širok endotermni vrh, ki ga lahko pripišemo izparevanju vlage iz mikrosfer. Pri mikrosferah s 5 oz. 10 % laktoze le-ta prekrije dehidracijski vrh le-te med 140 in 150°C, ki je pri mikrosferah s 15 oz. 20 % laktoze dobro viden. Na termogramih vseh mikrosfer je prav tako dobro izražen talilni vrh laktoze med 170 in 200°C. V primerjavi s čisto laktozo je slednji razširjen in premaknjen proti nižjim temperaturam, kar kaže na interakcije med laktozo in polimeri v ogrodju mikrosfer.



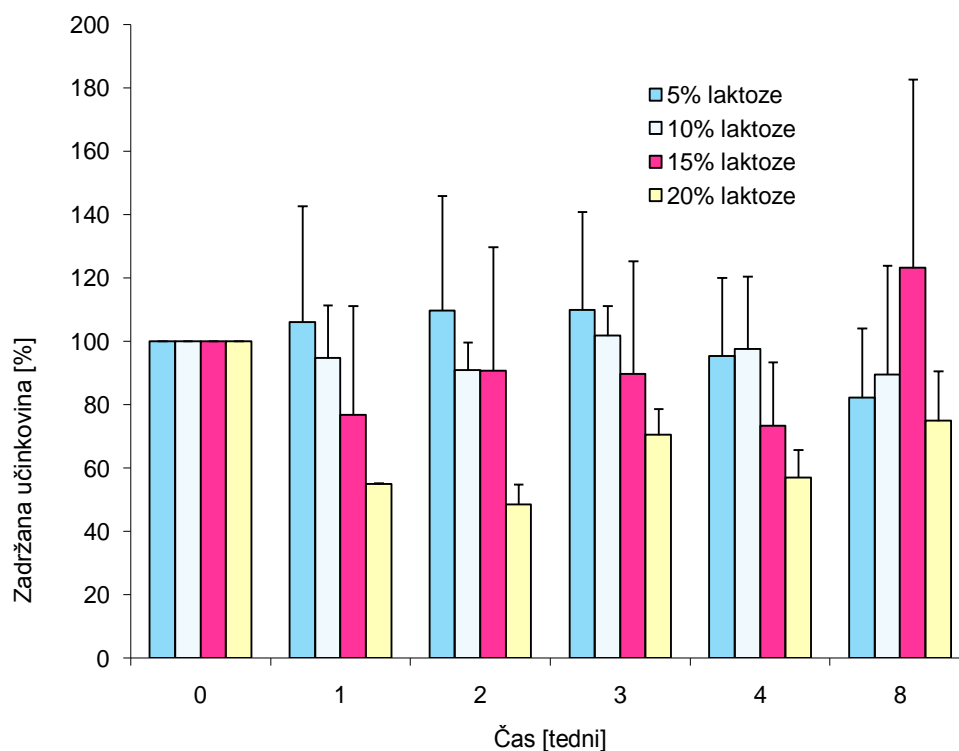
**Slika 28:** DSC termogram mikrokapsul z različno vsebnostjo laktoze.

V nadaljevanju smo posneli tudi DSC termograme mikrokapsul s samo-emulgirajočim jedrom in sicer takoj po izdelavi ter po 4 tednih shranjevanja pri sobnih pogojih (slika 28). Podobno kot pri termični analizi mikrosfer (slika 27) tudi pri termogramih mikrokapsul vidimo širok endotermni vrh pri temperaturah med 30 in 120°C, ki pripada izparevanju vlage iz ovojnice mikrokapsul. Pri mikrokapsulah z 10-20 % laktoze je prav tako dobro viden endotermni vrh dehidratacije med 140 in 150°C ter talilni vrh laktoze med 185 in 215°C. Eksotermnega vrha pri okoli 220°C, ki pripada eksotermnemu razpadu furosemida, na DSC krivuljah ni moč opaziti. Na osnovi slednjega sklepamo, da med procesom sušenja in shranjevanja mikrokapsul ne prihaja do obarjanja vgrajene učinkovine iz samo-mikroemulgirajočega jedra.

#### 4.7. Stabilnost furosemida v mikrokapsulah

Zanimalo nas je, kako vsebnost laktoze v ovojnici mikrokapsul vpliva na stabilnost kapsulirane modelne učinkovine furosemida, ki je občutljiv na svetlobo in zrak ter prisotnost oksidantov, v kislem pa hidrolizira. Stabilnost mikrokapsul s SMES jedrom smo spremljali tekom 8-tedenskega staranja mikrokapsul pri sobni temperaturi (slika 29).

Mikrokapsule smo ovrednotili kot stabilne, če med shranjevanjem ni prihajalo do iztekanja jedrne faze ter do kristalizacije vgrajene ZU iz le-te.



**Slika 29:** Odstotek zadržanega furosemda v mikrokapsulah v času osmih tednov.

V primerjavi z vsebnostjo furosemda takoj po izdelavi ( $t = 0$ ), so mikrokapsule z 10 % laktoze ohranile nad 90 % vsebnosti furosemda tudi po 8 tednih staranja mikrokapsul pri sobni temperaturi. Nekoliko slabše zadržanje jedrne faze smo opazili pri mikrokapsulah s 5 % laktoze (~ 85 % začetne vsebnosti) ter pri mikrokapsulah s 15 % laktoze. Pri slednjih smo po 8. tednih staranja sicer določili zelo visoko vsebnost ZU, ki pa je močno odstopala od vseh ostalih rezultatov. Sklepamo, da je slednje posledica heterogenosti mikrokapsul, ki vsebujejo med 15 in 20 % laktoze, kar smo opazili tudi pri testu sproščanja ter nabrekanja in erozije mikrokapsul.

Velika standardna deviacija ter nihanja v vsebnosti med posameznimi tedni kažejo na heterogenost znotraj posamezne serije ter med serijami mikrokapsul z enako vsebnostjo laktoze. Med izdelavo serije smo imeli težave z vzdrževanjem tlaka, ki potiska notranjo

fazo skozi šobo. Z bolj stabilnim pretokom notranje faze bi lahko dosegli bolj homogene vsebnosti SMES jedra znotraj sarže/med saržami mikrokapsul.

## 5. SKLEP

- V diplomski nalogi smo izdelali mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom s pomočjo enkapsulatorja Inotech IE-50 R. Kot modelno učinkovino smo uporabili furosemid. 2 % vodni raztopini pektina in alginata v razmerju 3:1, ki smo jo uporabili za izdelavo ovojnice, smo dodali 5, 10, 15 oz. 20 % laktoze ali 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub>. Nastale mikrokapsule smo nato posušili v zvrtničenih plasteh zraka in ustrezno ovrednotili.
- Ugotovili smo, da na učinkovitost vgradnje SMESA s furosemidom v mikrokapsule močno vpliva vrsta in količina pomožne snovi, ki jo dodamo polimerni ovojnici. Dodatek 10 % laktoze v vodno raztopino polimerov je izboljšal učinkovitost vgradnje zdravilne učinkovine v primerjavi z dodatkom 5 % laktoze. Z dodatkom večje količine laktoze (15 – 20 %) ali koloidnega SiO<sub>2</sub> (5 %) pa smo dosegli slabšo in manj ponovljivo učinkovitost vgradnje.
- Med sušenjem v zvrtničenih plasteh zraka pri T = 55°C so mikrokapsule s 5 – 10 % laktoze v ovojnici zadržale jedrno fazo v notranjosti in tako ohranile ustrezno učinkovitost vgradnje. Pri mikrokapsulah s 15 in 20 % laktoze pa je prišlo do iztekanja jedrne faze.
- V skladu z rezultati učinkovitosti vgradnje pred in po sušenju mikrokapsul smo največjo vsebnost zdravilne učinkovine določili mikrokapsulam z 10 % laktoze, najmanjšo pa mikrokapsulam s 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub>, ki smo ju dodali v ovojnico mikrokapsul.
- Z uporabo enokanalne šobe smo izdelali mikrosfere brez jedrne faze. Opazovali smo nabrekanje in erozijo mikrosfer z različno vsebnostjo laktoze pri pH 3 ter 6,8. Pri pH 3 opazimo večje razlike med mikrosferami – najbolj so nabrekale tiste z 20 % laktoze, najmanj pa z 5 % laktoze. Podobne rezultate smo dobili tudi v fosfatnem pufri, le da je tu bilo nabrekanje vseh vzorcev intenzivnejše.
- Mikrosfere, ki bolj nabrekajo, tudi hitreje razpadajo. V medijih z obema pH je bila erozija mikrosfer z višjo vsebnostjo laktoze večja, te mikrosfere pa so tudi razpadle prej kot mikrosfere z nižjo vsebnostjo laktoze, pri čemer je bil razpad v pH 6,8 bolj intenziven.
- V medijih z enakim pH kot nabrekanje in erozijo smo spremljali tudi sproščanje furosemida iz mikrokapsul. V mediju pH 6,8 se je iz vseh mikrokapsul že po 2h

sprostila skoraj vso učinkovino. V mediju s pH 3 pa se je furosemid najhitreje in v največjem obsegu sprostil iz mikrokapsul s 5 (~ 65 % po 4 h) in 20 % laktoze (~ 67 % po 4 h). Laktoza se kot majhna hidrofilna molekula raztopi ter skozi nastale pore omogoča sproščanje učinkovine, hkrati pa olajša tudi nabrekanje polimera v ovojnici, kar lahko predstavlja oviro za sproščanje furosemida iz mikrokapsul.

- Pri preučevanju morfoloških lastnosti izdelanih mikrokapsul smo ugotovili, da so bile najbolj sferične in najmanj nagubane mikrokapsule z dodatkom 10 % laktoze, slika prečnega prereza pa je potrdila homogeno tekoče jedro. Vse mikrokapsule in mikrosfere z dodatki laktoze so imele nagubano in grobo površino, z vrstičnim elektronskim mikroskopom pa smo opazili tudi razpoke in kristale na površini. Na podlagi DSC termogramov mikrosfer in mikrokapsul smo sklepali, da gre za kristale laktoze.
- Z DSC analizo smo ugotovili, da se furosemid vgrajen v SMES jedra mikrokapsul, ne obori. V primerjavi z mikrokapsulami s 5 - 20 % laktoze smo pri mikrokapsulah s 5 % koloidnega SiO<sub>2</sub> v raztopini ogrodnih polimerov opazili gladko površino, vendar pa tudi vidno jedro izven ovojnice.
- Po osmih tednih staranja pri sobni temperaturi so največ prvotno vgrajenega jedra zadržale mikrokapsule z 10 % laktoze (~ 90 %). Mikrokapsule z 20 % laktoze pa so že po enem tednu izgubile ~ 40 % vgrajenega jedra z ZU.
- Mikrokapsule z najustreznejšimi morfološkimi lastnostmi ter ponovljivo in visoko učinkovitostjo vgradnje (do 80 %) smo izdelali iz zmesi pektina in alginata v razmerju 3:1, ki je kot polnilo vsebovala 5 - 10 % laktoze.

## 6. LITERATURA

1. Haus D.J. (Ed.) Oral Lipid-Based Formulations, Informa Healthcare Inc., 2007.
2. Dahan A., Hoffman A. Enhanced gastrointestinal absorption of lipophilic drugs. V: Touitou E, Barry BW (Eds.). Enhancement in drug delivery, Taylor&Francis Group, 2007; 111-131.
3. Amidon G.L., Lennernas V.P., Shah A. Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.
4. Pouton C. W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11, Suppl. 2: 93-98.
5. Kattaboina S., Chandrasekhar V., Balaji S. Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 4 (4): 240-253
6. Tang J., Sun J. in He Z. Self-Emulsifying Drug Delivery systems: Strategy for Improving Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Current Drug therapy*, 2007: 2, 85-93
7. Rajesh B. V., Reddy T. K., Srikanth G., Mallikarjun V., Nivethithai P. Lipid based self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly water soluble drugs: A review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2010: Vol 2, No 3.
8. Porter C. J. H., Pouton C. W., Cuine J. F., Charman W. N., Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 673 – 691.
9. Pouton C.W., Porter C.J.H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 625-637.
10. Patel A., Shah A. Self-Emulsifying Delivery Systems for Poorly Absorbed Drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. Vol 1 Issue 2: Julij - September 2008.
11. Neslihan G.R., Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173-182.

12. Constantinides P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* 1995; 12: 1561-72.
13. Zvonar A, Gašperlin M., Kristl J. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *F Vestn* 2008, 59(5): 263-268.
14. Bo Tang, Gang Cheng, Jian-Chun, Cai-Hong Xu. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today*, 2008. Vol 13, 606-612.
15. Boltri L., Conceani N., Del Curto D., Dobetti L., Esposito P. Enhancement and modification of etoposide release from crospovidone particles loaded with oil-surfactant blends. *Pharm Dev Technol* 1997, 2(4): 373-381.
16. Planinšek O. Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin: Contemporary approaches to solid dispersions production with improved drug bioavailability. *F vestn*, 2009, 60: 169-176.
17. Homar M., Gašperlin M., Kerč J. Tehnologije s talinami. Hot melt technologies. *F vestn*, 2003, 54: 697-703
18. Homar M., Šuligoj D., Gašperlin M. Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method. *J Microencapsulation* 2007; 24 (1): 72-81.
19. Homar M., Dreu D., Kerč J., Gašperlin M. Preparation and evaluation of celecoxib-loaded microcapsules with self-microemulsifying core. *J Microencapsulation* 2009; 26 (6): 479-484.
20. Cui F. D., Wang Y., Wang J., Feng L., Ning K. Preparation of redispersible dry emulsion using Eudragit E100 as both solid carrier and unique emulsifier. *Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 2007. 307: 137-141.
21. Ito Y., Kusawake T., Prasad Y.V.R. Sugioka N., Shibata N., Takada K. Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm*, 2006. 317: 114-119.
22. Nazzal S., Khan M. A. Controlled release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: Stability assessment and optimization of some processing parameters *International Journal of Pharmaceutics* Volume 315, Issues 1-2, 6 Junij 2006: 110-121



23. Attama A. A., Nkemnele M. O. In vitro evaluation of drug release from self micro-emulsifying drug delivery systems using a biodegradable lipid from *Capra hircus*. *Int J Pharm* 2005, 304: 4-10.
24. Kim JY, Ku YS. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *Int J Pharm*, 2000: Jan 20; 194(1):81-9.
25. G.S. Chae, Lin J.S., Kim S.H., Seo K.S., Kim M.S., Lee H. B., Khang G. Enhancement of the stability of BCNU using self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) and *in vitro* antitumor activity of self-emulsified BCNU-loaded PLGA wafer. *Int. J. Pharm.* 2005, 301: 6–14.
26. Hemsley A.R., Griffiths P.C. Architecture in the microcosm: Biocolloids, self-assembly and pattern formation. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.* 2000; 358, 547-564.
27. Park K., Yeo Y. Microencapsulation technology. In: Swarbric A. (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007: 2315-2327.
28. Benita S. *Microencapsulation methods and industrial applications* 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis Group, 2006.
29. Ghosh S.W. *Functional coatings in microencapsulation: a generale perspective*. V: Ghosh S.W. (Ed.) *Funcional coatings*, Wiley-VCH Verlag, 2006.
30. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vest* 2006; 57: 287-291.
31. Wang W., Liu X., Xie Y. et al. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J Mater Chem* 2006; 16: 3252-3267.
32. Sriamornsak P., Kennedy R.A. Effect of a small molecule on difussion and swelling properties of selected polysaccharide gel beads. *Carbohydrate Polymers* 2010; 79: 219-223.
33. B. R. Sharma, Naresh L., N. C. Dhuldhoya, S.U. Merchant in U. C. Merchant. An overview on pectins. *Times Food Processing Journal*; 2006 Junij-julij: 44-51.
34. Sriamornsak P. *Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review*. Silpakorn University International Journal 2003; 3: 206-228.
35. Ovodov Y. S. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2009; 35(3): 269–284.

36. Smrdel P., Bogataj M., Mrhar A. Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. *Farm Vest* 2008; 59: 293-301.
37. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 603-632.
38. Aristippos Genadios. Protein-based films and coatings. CRC Press LLC, ZDA, 2002. Str. 341.
39. Poncelet D. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In: J.P. Blitz and V.M. Gun`ko (Eds.), *Surface chemistry in biomedical and environmental science*, Springer, Netherlands 2006: 23-34.
40. Pluess-Wenzinger R., Widmer F., Heinzen C., Brandenberger H. Method and device for capsulating microbial, plant and animal cells or biological and chemical substances. EP1062032. Inotech AG. 2000.
41. Prüsse U., Bilancetti L., Bučko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers* 2008; 62(4): 364-374.
42. Jaworek A. Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification: a brief review. *J Microencapsulation* 2008; 25(7): 443-468.
43. Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE 50R. 2002 Inotech Encapsulation AG. Dottikon. Switzwrland.
44. Proizvajalčeva specifikacija, Gattefossé, Francija.
45. European Pharmacopoeia. *European Pharmacopoeia*. 6<sup>th</sup> Ed. Council of Europe. Strasbourg 2007.
46. Proizvajalčeva specifikacija, Sasol GmbH, Nemčija.
47. The Merck Index. 13<sup>th</sup> Ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station. NJ. USA 2001.
48. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn EM. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>th</sup> Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association. London, Washington 2009.
49. Proizvajalčeva specifikacija, dosegljivo na [www.aerosil.com](http://www.aerosil.com) datum dostopa 5.3.2010
50. Varnostni list, dosegljiv na <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do> datum dostopa 5.3.2010

51. Sean C. Sweetman, ed. Martindale: The Complete Drug Reference (36th edition ed.). Pharmaceutical Press. London 2009.
52. Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins. Baltimore 2002: 525-526.
53. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, 2003: Pharmacology, 5<sup>th</sup> edition.
54. M. Gašperlin, P. Špiclin, Caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions: physicochemical and phase behaviour properties, Sci. Pharm. 2001, 69: 157–158.
55. Planinšek O., Zajc N., Srčič S. Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. Differential Scanning Calorimetry used in Pharmacy. F Vestn 2001, 52: 173-185.
56. Zajc N., Planinšek O., Srčič S. Diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature. Farm. vestn., 2001, vol. 52, no. 2: 187-195.
57. Kim JY, Ku YS. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. Int J Pharm, 2000: Jan 20; 194(1):81-9.
58. Zvonar A. Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom. Doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2010.
59. P. Smrdel, M. Bogataj, A. Zega, O. Planinšek, A. Mrhar. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. J of Microencapsulation, Marec 2008; 25(2): 90-105.
60. Sriamornsak P., Kennedy R.A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. Int J Pharm 2008, 385: 205-213.
61. Okimoto K., Ohike A., Ibuki R., Aoki O., Ohnishi N., Rajewski R., Stella V., Irie T., Uekama K. Factors affecting membrane-controlled drug release for an osmotic pump tablet (OPT) utilizing (SBE)7m- $\beta$ -CD as both solubilizer and osmotic agent. J Controlled Release 1999, 60:311-319.
62. Chang K. L. B., Lin J. swelling behaviour and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. Carbohydrate Polymers, 2000. Vol 43, 2:163-169.
63. Sriamornsak P, Kennedy RA. Development of polysaccharide gel-coated pellets for oral administration: swelling and release behaviour of calcium pectinate gel. AAPS PharmSciTech 2007, 8(3): article 79.

64. Bajpai S. K., Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions. *React. Funct. Polym.* 2004, 59:129-140.
65. Sriamornsak P, Kennedy RA. Development of polysaccharide gel coated pellets for oral administration. II. Swelling and release behavior of calcium alginate gel. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 29:139-147.
66. Madziva H., Kailasapaty K., Phillips M. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *J Microencapsulation* 2005; Vol 22, 5: 343-351.
67. Liu P., Krishnan T. R. Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. *J Pharm Pharmacol* 1999, 51:141-149.
68. Yaya S., Durance T. D., Wang R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *J Microencapsulation*, 2009, 26:2, 143-153.
69. Sriamornsak P., Sungthongjeen. Modification of theophylline release with alginate gel formed in hard capsules. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8(3): 51.
70. Elisma Spamer, Douw G. Muller, Philippus L. Wessels, Johannes P. Venter. Morphology and release characteristics. *Indian J Pharm Sci* 2008; 70:77-84. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- $\beta$ -cyclodextrin. *European J Pharm Sci* 16 (2002) 247–253.