

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



RENATA KOZAN

**VPLIV SESTAVE OVOJNICE NA LASTNOSTI MIKROKAPSUL S SAMO-
MIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM**

**EFFECT OF SHELL COMPOSITION ON THE CHARACTERISTICS OF
MICROCAPSULES WITH SELF-MICROEMULSIFYING CORE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom asist. dr. Alenke Zvonar.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin in somentorici 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 vso razumevanje in podporo v času dela v laboratoriju in celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Alenke Zvonar.

Renata Kozan

Ljubljana, april 2011

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar

KAZALO

KAZALO	I
POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 SAMO-MIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI (SMES).....	2
1.1.1 SESTAVA SMES.....	3
1.1.2 MEHANIZEM SAMO-MIKROEMULGIRANJA	3
1.2 MIKROKAPSULE.....	5
1.2.1 MIKROKAPSULIRANJE	5
1.2.1.1 ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R.....	7
1.2.2 JEDRA MIKROKAPSUL.....	9
1.3 MATERIALI, KI SE UPORABLJAJO ZA KAPSULIRANJE	9
1.3.1 OGLJIKOVI HIDRATI.....	11
1.3.1.1 ŠKROB IN DERIVATI.....	11
1.3.1.2 DERIVATI CELULOZE.....	13
1.3.1.3 EKSTRAKTI IN EKSUDATI RASTLIN.....	15
1.3.1.4 MORSKI EKSTRAKTI	19
1.3.2 ŽIVALSKI IN MIKROBNI POLISAHARIDI	24
1.3.3 PROTEINI.....	27
1.3.4 LIPIDI.....	28
1.3.5 BIORAZGRADLJIVI SINTEZNI POLIMERI	29
1.3.6 NEBIORAZGRADLJIVI SINTEZNI POLIMERI	30
1.3.7 OSTALO	30
1.4 POLNILA IN TVORCI POR	31
1.4.1 LAKTOZA	31
1.4.2 MANITOL.....	32
1.4.3 SORBITOL.....	32
1.4.4 TREHALOZA	33
2 NAMEN DELA	34
3 MATERIALI IN METODE	36
3.1 MATERIALI	36
3.2 METODE	41
3.2.1 NAPRAVE IN PRIPOMOČKI, KI SMO JIH UPORABILI PRI IZDELAVI IN VREDNOTENJU MIKROSFER IN MIKROKAPSUL	41

KAZALO

3.2.2 PRIPRAVA RAZTOPINE OGRODNIH POLIMEROV ZA IZDELAVO REFERENČNIH MIKROSFER.....	43
3.2.3 PRIPRAVA ZUNANJE FAZE Z OGRODNIM POLIMEROM ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL	44
3.2.4 PRIPRAVA JEDRNE FAZE	45
3.2.5 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PREMREŽEVANJE.....	45
3.2.6 PRIPRAVA MEDIJA ZA TEST RAZTAPLJANJA	46
3.2.7 PRIPRAVA MOBILNIH FAZ ZA HPLC	46
3.2.8 TEHNOLOGIJA IZDELAVE REFERENČNIH MIKROSFER IN MIKROKAPSUL	46
3.2.9 SUŠENJE MIKROSFER IN MIKROKAPSUL	48
3.2.10 DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE	48
3.2.11 DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE	50
3.2.12 SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL.....	50
3.2.12.1 KINETIKA SPROŠČANJA.....	51
3.2.13 MORFOLOŠKO VREDNOTENJE MIKROSFER IN MIKROKAPSUL	52
3.2.14 HPLC ANALIZA	53
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	55
4.1 VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER.....	55
4.2 VPLIV DODATKA RAZLIČNIH POLNIL NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER.....	61
4.3 VPLIV POSTOPKA UTRJEVANJA MIKROKAPSUL NA UČINKOVITOST VGRADNJE SMES S FUROSEMIDOM V POLIMERNO OGRODJE MIKROKAPSUL	67
4.4 VPLIV DODANIH POLNIL IN HITOSANSKE OBLOGE NA UČINKOVITOST VGRADNJE SMES S FUROSEMIDOM V POLIMERNO OGRODJE MIKROKAPSUL	69
4.5 VPLIV DODATKA POLNIL IN HITOSANSKE OBLOGE NA SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL	72
4.6 VREDNOTENJE MORFOLOŠKIH LASTNOSTI MIKROSFER IN MIKROKAPSUL	83
5 SKLEP	86
6 LITERATURA	89

POVZETEK

Z razvojem novih peroralnih farmacevtskih oblik lahko povečamo biološko uporabnost učinkovin, ki zaradi slabe vodotopnosti in slabe permeabilnosti niso najustreznejši kandidati za peroralno aplikacijo. Z vgradnjo zdravilne učinkovine v samo-mikroemulgirajoči sistem (SMES) izboljšamo njeno biološko uporabnost s pomočjo več različnih mehanizmov. SMES so po definiciji izotropne zmesi lipidov, emulgatorja, enega ali več koemulgatorjev oz. sotopil, ki v stiku z vodnim medijem že ob rahlem stresanju hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa O/V. Z vgradnjo SMES v trdno farmacevtsko obliko, kot so mikrokapsule, dobimo sistem, ki združuje prednosti na lipidih osnovanih sistemov in trdnih farmacevtskih oblik.

Mikrokapsule so majhni delci, običajno veliki med 1 in 1000 μm , z definiranim jedrom in ovojnico. Zdravilna učinkovina, ki jo mikrokapsuliramo, se običajno nahaja v jedrni fazi, ovojnica pa je največkrat sestavljena iz različnih naravnih ali sinteznih polimerov, ki omogočajo prirejeno sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine.

Z uporabo enkapsulatorja Inotech IE-50 R smo z metodo ko-ekstruzije curka tekočine pod vplivom vibrirajoče membrane izdelali mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom, ki je vsebovalo modelno učinkovino furosemid. Za izdelavo slednjih smo uporabili 2 % raztopino pektina in alginata v različnih razmerjih. Z dodatkom različnih hidrofilnih polnil ter aplikacijo dodatne obloge in s spreminjanjem postopka utrjevanja mikrokapsul smo želeli izdelati mikrokapsule s čvrsto ovojnico in visoko vsebnostjo jedrne faze.

Najprej smo s pomočjo rezultatov nabrekanja in erozije polimernega ogrodja izbrali najprimernejše razmerje pektina in alginata za izdelavo mikrokapsul. Mikrokapsule, katerih ovojnico smo izdelali iz 2 % raztopine pektina in alginata v razmerju 3/1, smo nato utrjevali po enostopenjskem oz. dvostopenjskem postopku in jih posušili v zvrtničenih plasteh zraka. Z določanjem učinkovitosti vgradnje SMES s furosemidom smo dokazali, da 15 min enostopenjsko utrjevanje mikrokapsul v 1 % raztopini LV-hitosana z 0,5 M CaCl_2 daje najboljše rezultate. Z namenom preprečitve iztekanja jedra med sušenjem mikrokapsul smo v raztopino polimerov, ki tvorijo ovojnico mikrokapsul, dodali različna polnila, ki med procesom sušenja zapolnijo nastale pore v polimernem ogrodju mikrokapsul in s tem

POVZETEK

izboljšajo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom. Za najboljše polnilo se je izkazala laktoza, saj je bila učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsulah, ki so vsebovale 10 % omenjenega polnila, 74 %.

Z raziskovalnim delom smo dokazali, da ob dodatku polnil povečamo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule, da lahko z izbranimi polimeri vplivamo na obliko, velikost mikrokapsul in na sproščanje učinkovine iz mikrokapsul. Z različnimi postopki utrjevanja in različnimi hitosanskimi oblogami prav tako lahko povečamo učinkovitost vgradnje ZU v mikrokapsule in samo čvrstost mikrokapsul.

Dokazali smo, da je mogoče izdelati mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom z visoko učinkovitostjo vgradnje, ki se med procesom sušenja bistveno ne spremeni. V prihodnosti bi bilo potrebno doseči boljšo ponovljivost pri izdelavi mikrokapsul z enkapsulatorjem Inotech IE-50 R, tako da bi vse izdelane mikrokapsule vsebovale enako količino jedrne faze. Testirali bi lahko tudi adhezivne sposobnosti hitosana, s čimer bi vplivali na podaljšano zadrževanje FO v želodcu in s tem na nadzorovano sproščanje učinkovine ter večjo biološko uporabnost. Mikrokapsule s samo-mikroemulgirajočim jedrom tako predstavljajo obetaven sistem za peroralno dostavo ZU z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi.

SEZNAM OKRAJŠAV

A - alginat

AUC - površina pod krivuljo

BCS - biofarmacevtski klasifikacijski sistem

BU - biološka uporabnost

CAP - celulozni acetat ftalat

CD - ciklodekstrini

CMC - karboksimetilceluloza

DE - stopnja esterifikacije (*degree of esterification*)

DS - stopnja substitucije (*degree of substitution*)

EC - etilceluloza

GIT - gastrointestinalni trakt

GRAS status - status varne snovi (*generally recognised as safe*)

HM - visoko metoksiliran (*high metoxilated*)

HPC - hidroksipropilceluloza

HPMC - hidroksipropilmetilceluloza

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*high performance liquid chromatography*)

HV - visoko viskozen (*high viscosity*)

KMK - kritična micelarna koncentracija

LBG - semenska sluz rožičevca (*locust bean gum*)

LM - nizko metoksiliran (*low metoxilated*)

LV - nizko viskozen (*low viscosity*)

MC - metilceluloza

SEZNAM OKRAJŠAV

MV - srednje viskozen (*middle viscosity*)

P - pektin

PAS - površinsko aktivna snov

PEG - polietilenglikol

P.O. - peroralna aplikacija

PVA - polivinilacetat

SDV-TG - srednjedolgoverižni trigliceridi

SMES - samo-mikroemulgirajoči sistemi

UČ. VGR. - učinkovitost vgradnje

ZU - zdravilna učinkovina

1 UVOD

Peroralna aplikacija zdravil je najbolj zaželjena, predvsem zaradi enostavnega načina jemanja, dobre sprejemljivosti s strani pacienta, učinkovitejše in varnejše uporabe zdravil in že dobro poznanih tehnik izdelave farmacevtskih oblik. Vedno več raziskav je namenjenih načrtovanju peroralnih farmacevtskih oblik, katerih sproščanje je prirejeno, glede na čas in mesto dostave. Pri tem je potrebno poudariti, da je pri per os oblikah težko napovedati *in vivo* profil sproščanja, zlasti zaradi variabilnih pogojev v gastrointestinalnem traktu (1). Iz farmacevtskega stališča bi bile karakteristike idealne peroralne oblike s prirejenim sproščanjem primerljive s karakteristikam intravenske infuzije, ki dostavlja zahtevano količino učinkovine in vzpostavlja plazemske koncentracije učinkovine v stacionarnem stanju (2). Prirejeno sproščanje, kamor štejemo podaljšano, zakasnelo in pulzirajoče sproščanje, omogoča zmanjšanje števila dnevnih odmerkov in pripomore k manjšemu nihanju plazemskih koncentracij učinkovine, vse to pa prispeva k manj izraženim neželenim stranskim učinkom in učinkovitejši terapiji. Takojšnje sproščanje (*angl. immediate release*) je neprirejeno sproščanje, kjer želimo doseči čimhitrejšo sprostitvev učinkovine in takojšnji učinek (3).

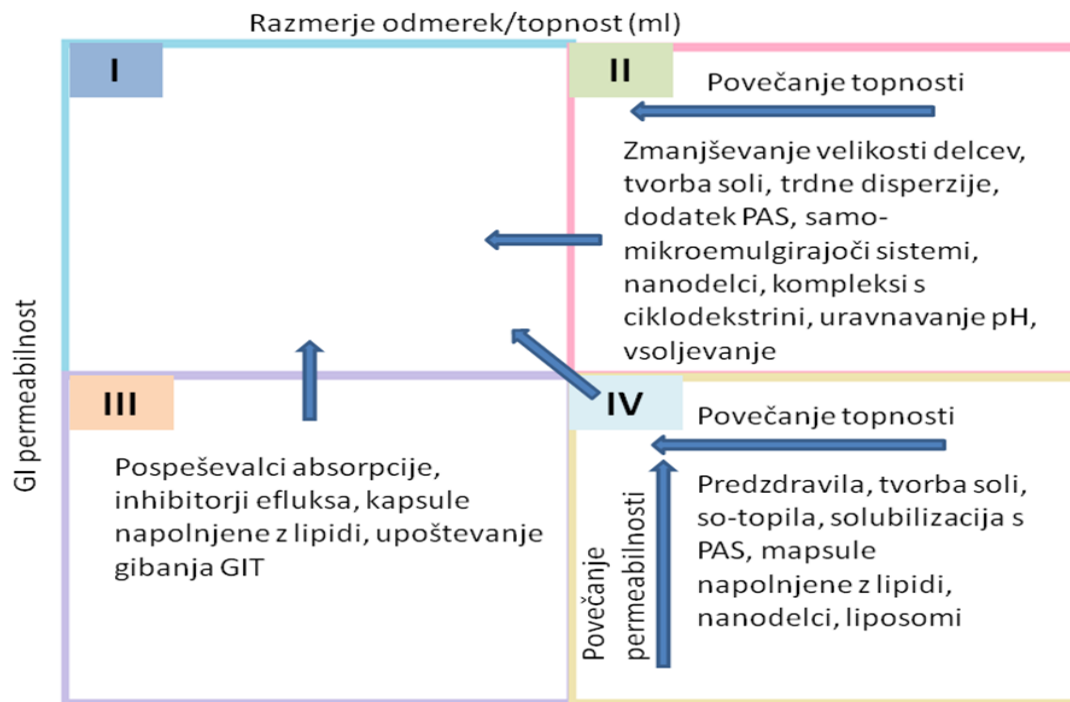
Z razvojem novih peroralnih farmacevtskih oblik omogočamo dostop na trg učinkovinam, ki sicer niso najbolj ustrezni kandidati za peroralno aplikacijo, saj so bodisi slabo topne, bodisi slabo prehajajo biološke membrane. Glede na biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS) delimo zdravilne učinkovine v štiri razrede. Možnosti za izboljšanje biološke uporabnosti zdravilnih učinkovin s slabimi biofarmacevtskimi lastnostmi so prikazane na sliki 1:

- razred I: dobro topne učinkovine, ki dobro prehajajo membrano prebavnega trakta,
- razred II: slabo topne učinkovine, ki dobro prehajajo membrano prebavnega trakta,
- razred III: dobro topne učinkovine, ki slabo prehajajo membrano prebavnega trakta,
- razred IV: slabo topne učinkovine, ki slabo prehajajo membrano prebavnega trakta.

Biološko uporabnost (BU) slabo vodotopnih učinkovin lahko povečamo s pripravo farmacevtske oblike, kjer je učinkovina že v raztopljeni obliki. S tem se izognemo fazi raztapljanja učinkovine v prebavnem traktu in povečamo njeno BU. Razvoj na lipidih

osnovanih sistemov omogoča, da je verjetnost obarjanja učinkovine še manjša, saj učinkovine z ustreznim porazdelitvenim koeficientom večinoma ostanejo raztopljene v lipidnih kapljicah tudi po dispergiranju sistema v vodnem mediju prebavnega trakta (4).

Možna rešitev za prirejeno dostavo oziroma sproščanje, povečanje topnosti in povečanje BU učinkovine, je v izdelavi farmacevtskih oblik iz hidrofilnega ogrodja, ki nadzoruje sproščanje, in lipidnega jedra, ki omogoča, da je učinkovina v raztopljeni obliki (npr. mikrokapsule).



Slika 1: Možnosti za izboljšanje biološke uporabnosti zdravilnih učinkovin z neugodnimi biofarmacevtskimi lastnostmi (povzeto po (5)).

1.1 SAMO-MIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI (SMES)

Po definiciji so SMES izotropne zmesi naravnih ali sinteznih lipidov, trdnih ali tekočih površinsko aktivnih snovi (PAS), enega ali več hidrofilnih topil ali pomožne PAS in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem (npr. prebavnimi sokovi) ob rahlem stresanju spontano tvorijo mikroemulzije tipa O/V. SMES lahko polnimo v mehke želatinaste kapsule, mikrokapsule s hidrofilnim ogrodjem, lahko pa jih tudi pretvorimo v granule in pelete (4).

1.1.1 SESTAVA SMES

Proces samo-mikroemulgiranja je specifičen za točno določene kombinacije in razmerje med lipidi in PAS ter koncentracijo PAS, zato imajo le sistemi s točno določeno vsebnostjo osnovnih sestavin zadovoljiv učinek (6).

Lipidi predstavljajo najpomembnejšo komponento SMES, saj zagotavljajo raztapljanje velike količine lipofilnih učinkovin, omogočajo proces samo-mikroemulgiranja in povečajo absorpcijo iz prebavnega trakta. Pogosteje uporabljamo trigliceride s srednje dolgimi verigami (sdv-TG), ki jih pridobivajo iz kokosovega olja in nove polsintezne derivate sdv-TG (poliglikozilirani gliceridi). Od dolgoverižnih trigliceridov se razlikujejo v tem, da imajo boljšo sposobnost raztapljanja, samo-mikroemulgiranja in so bolj kemično stabilni (4).

PAS ali emulgatorji so amfifilne snovi, ki se razporedijo na medfazno površino in zmanjšajo medfazno napetost, ter s tem omogočajo raztapljanje in solubilizacijo lipofilnih učinkovin. Kot emulgatorji se najpogosteje uporabljajo neionske PAS z relativno visokimi HLB vrednostmi, kot so na primer glikozilirani etoksilirani gliceridi in polisorbati. Neionske PAS so bolj varne od ionskih, saj v manjši meri povzročajo spremembe v permeabilnosti črevesne stene. Za nastanek SMES so običajno potrebne koncentracije emulgatorja med 30–60 %, vendar je zaradi njihove potencialne toksičnosti priporočljivo izbrati čim nižje koncentracije (4, 6).

Z dodatkom sotopil povečamo topnost učinkovin v lipofilni podlagi. Kot sotopila so za peroralno uporabo primerna etanol, propilen glikol, polietilen glikol. Topila lahko hitro izhlapijo ali prehajajo v ovojnico, kar lahko povzroči obarjanje učinkovine, zato uporaba sotopil v nekaterih primerih ni najbolj zaželjena (6).

1.1.2 MEHANIZEM SAMO-MIKROEMULGIRANJA

Mikroemulzije nastanejo spontano ob stiku SMES z vodnim medijem gastrointestinalnega trakta (GIT), kot prikazuje slika 2. Za nastanek je pomembno tudi peristaltično gibanje želodca in črevesja, ki povzroči mešanje SMES z vodnim medijem. Učinkovina je pri prehodu GIT ves čas v raztopljenem stanju ujeta v oljnih kapljicah, ki imajo veliko medfazno površino za absorpcijo, ali pa se nahaja v koloidnih disperzijah mešanih

micelov. Ker natančen mehanizem samo-mikroemulgiranja še ni poznan, obstajajo tri teorije, ki opisujejo nastanek mikroemulzij:

- o teorija mešanega filma;

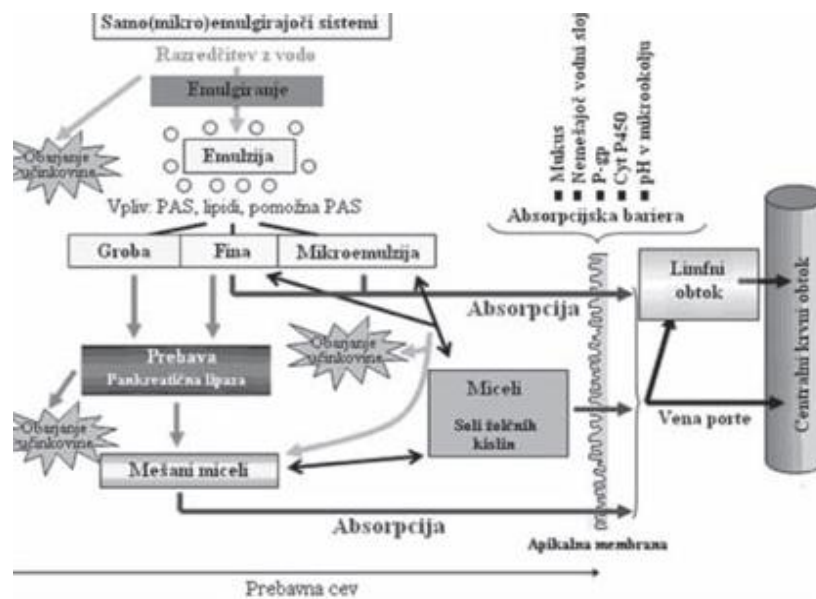
Emulgatorji in koemulgatorji omogočajo, da se medfazna napetost močno zniža in s tem omogočijo spontano dispergiranje. S penetracijo vode preko medfaze se voda solubilizira znotraj oljne faze in z rahlim stresanjem nastanejo emulzijske kapljice.

- o solubilizacijska teorija;

Teorija predpostavlja, da so mikroemulzije nabrekli miceli. O/V mikroemulzije nastanejo s solubilizacijo oljne faze v navadnih micelih, V/O mikroemulzije pa s solubilizacijo vodne faze v reverzних micelih pri koncentracijah emulgatorja, ki so višje od kritične micelarne koncentracije (KMK) (7).

- o termodinamska teorija;

Po zakonih termodinamike mora biti za nastanek termodinamsko stabilne mikroemulzije prosta energija nastanka sistema negativna. Medfazna površina se ob nastanku mikroemulzije močno poveča, saj nastane večje število zelo majhnih kapljic, vendar iz istega razloga istočasno močno naraste tudi entropija sistema (8). Za sam proces sta zelo pomembni nizka medfazna napetost olje/voda in prekinitev medfazne površine, ki jo povzroči penetracija vode v oljno fazo ali pa difuzija sotopila in SMES v vodno fazo.



Slika 2: Nastanek SMES po peroralni aplikaciji (povzeto po (9)).

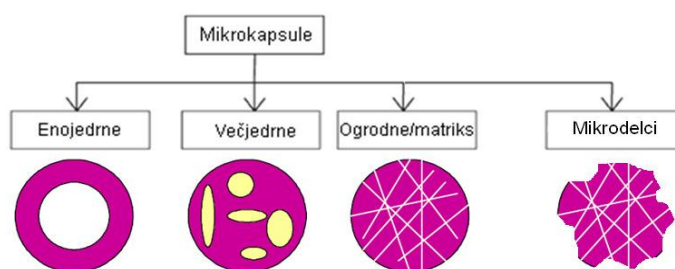
V farmacevtski industriji so bolj zaželjene trdne farmacevtske oblike zaradi preprostejše uporabe in rokovanja z njimi. Sočasno z naraščanjem zanimanja za SMES narašča tudi potreba po novih pristopih za pretvorbo tekočih SMES v trdno agregatno stanje. V tem primeru lahko uporabimo postopek mikrokapsuliranja ZU vgrajenih v jedru, ki ga sestavlja SMES, obdaja pa polimerna ovojnica, ki nadzoruje sproščanje.

1.2 MIKROKAPSULE

Mikrokapsule so delci, veliki od 1 μm do nekaj mm. Sestavljene so iz substance, ki jo mikrokapsuliramo, in nosilne substance. Glede na notranjo strukturo in obliko ločimo (slika 3):

- o mikrokapsule v ožjem pomenu besede ali filmski tip mikrokapsul, kjer je jedro (substancia, ki jo mikrokapsuliramo) obdano z oblogo,
- o mikrosfere ali ogrodni tip mikrokapsul so okrogli delci, kjer sta substancia, ki jo mikrokapsuliramo, in nosilna substancia razporejeni po celotnem volumnu,
- o mikrodelci so nepravilnih oblik, substancia, ki jo mikrokapsuliramo, in nosilna substancia pa sta tako kot pri mikrosferah razporejeni po celotnem volumnu.

Kot jedra se uporabljajo snovi, ki so lahko v trdnem ali tekočem agregatnem stanju, substance za oblaganje pa so najpogosteje različni polimeri, ki so lahko naravni, polsintezni ali sintezni (10).



Slika 3: Shematski prikaz mikrokapsul in mikrosfer.

1.2.1 MIKROKAPSULIRANJE

Mikrokapsuliranje je postopek, ki omogoča, da fizično ločimo jedrno fazo od okolja, tako da jo obdamo z ovojnico, ki se z jedrno fazo ne meša. Mikrokapsuliranje uporabljamo za

UVOD

doseganje nadzorovanega sproščanja ZU, ciljane terapije, prekrivanje neprijetnega vonja in okusa, za zaščito ZU pred vplivi okolja in za izboljšanje BU. Prednosti mikrokapsuliranja se kažejo tudi v tem, da lahko z uporabo mikrokapsul, ki so večnotne FO, zmanjšamo verjetnost za nastanek sprostitve celotne učinkovine naenkrat (*angl. dose-dumping*), dosežemo enakomernejšo porazdelitev ZU vzdolž GIT, zmanjšamo lokalno toksičnost, združujemo nekompatibilne ZU ter lahko zagotovimo različne hitrosti sproščanja ZU iz iste FO (10, 11).

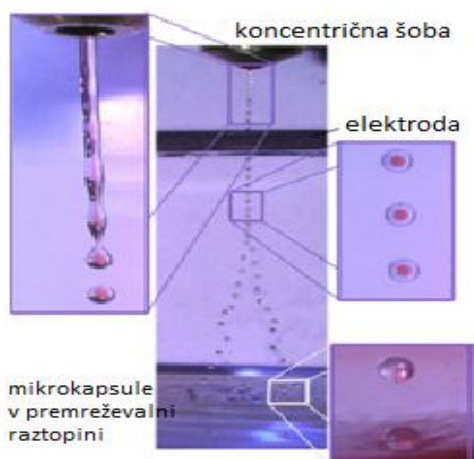
Metode izdelave mikrokapsul delimo na:

- kemijske; medpovršinska polimerizacija, polimerizacija in situ, emulzijska polimerizacija,
- fizikalno–kemijske; koacervacija, oblaganje plast na plast, sol–gel oblaganje, tehnologije s superkritičnimi plini, ohlajevanje dispergirane taline, metode odparevanja topila,
- fizikalno–mehanske; sušenje z razprševanjem, oblaganje v zvrtničnih plasteh, centrifugalne tehnike, mikrokapsuliranje v vakuumu, elektrostatično mikrokapsuliranje, mikrokapsuliranje v bobnih, metoda ekstruzije (11, 12, 13).

Za kapsuliranje tekočin se pogosto uporabljajo predvsem fizikalno–mehanske metode s koe-kstruzijo curka, kot so: metoda z vibrirajočo membrano, »Air Jet« in »Jet Cutter« (11, 14).

Metoda z vibrirajočo membrano: Zunanjo in notranjo fazo potiskata tlačilka ali kompresor skozi koncentrično šobo pri čemer ustvarita laminaren tok tekočine. Vibrirajoča membrana omogoča razbitje nastalega curka v drobne kapljice, ki nato padajo skozi električno polje v raztopino premreževala (slika 4). V električnem polju se površina kapljic nabije in elektrostatski odboj prepreči njihovo zlepljanje. S to metodo dobimo mikrokapsule v velikosti 100–5000 μm . Možna je tudi izdelava v aseptičnih pogojih (15).

Na omenjeni metodi temelji Enkapsulator Inotech IE-50R, ki smo ga uporabljali v diplomski nalogi.

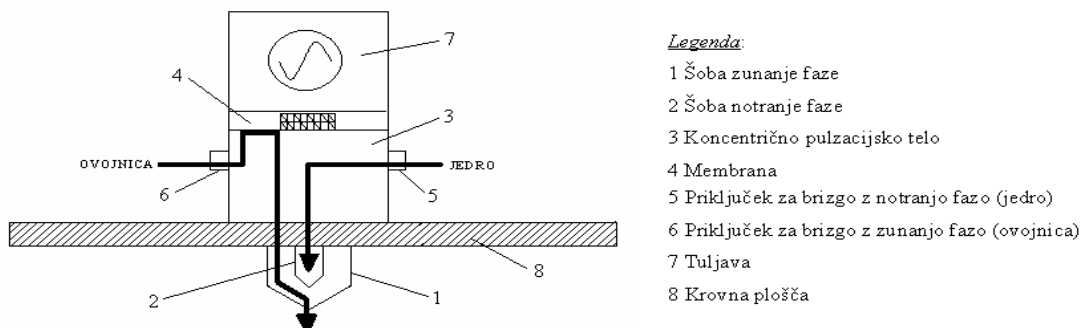


Slika 4: Tvorba kapljic z metodo vibrirajoče membrane (15).

1.2.1.1 ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R

Mikrokapsule smo izdelali na enkapsulatorju Inotech IE-50 R (slika 6, 7), ki omogoča izdelavo mikrokapsul in kapsuliranje hidrofilnih in hidrofobnih učinkovin s pomočjo sistema koncentričnih šob (dvokanalna šoba). Naprava nam omogoča visoko produktivnost ob milih pogojih mikrokapsuliranja in izdelavo mikrokapsul v velikostnem razredu od 10 μm do 1000 μm in več. Sestavni deli enote s koncentrično šobo so (slika 5):

- koncentrična šoba: sestavljena je iz dveh šob (skozi eno teče zunanja faza, skozi drugo pa notranja faza);
- koncentrična pulzacijska glava s pulzacijskim telesom in membrano (16).



Slika 5: Shematski prikaz sistema koncentrične šobe (16).

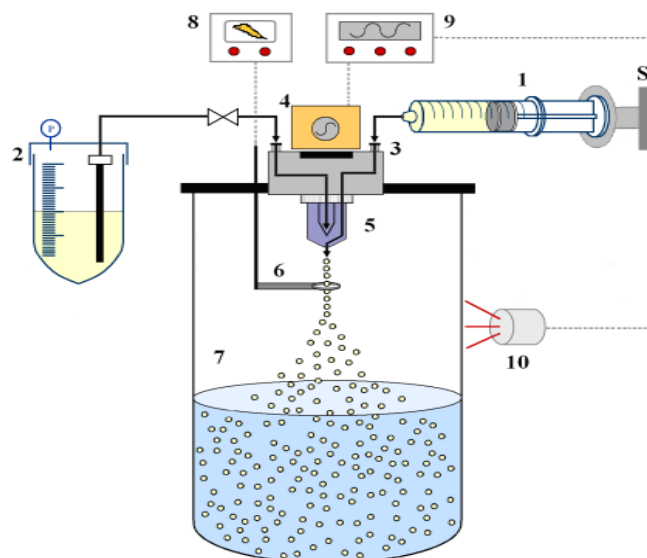
Premeri šob se gibljejo od 100 do 1000 μm , pri čemer je premer notranje šobe vedno manjši od premera zunanje. Kot pri sistemu z eno šobo je tudi pri sistemu koncentričnih šob premer izdelanih kapsul odvisen od premera šobe. V splošnem velja, da je premer kapsul dvakrat večji od premera šobe, premer jedra kapsule pa variira od 1 do 2,5–kratnika premera notranje šobe.

Snov, ki jo kapsuliramo (celice, mikroorganizmi, učinkovine, hidrofilne in hidrofobne tekočine), ter material za izdelavo ovojnice (polimer) se nahajata v ločenih injekcijskih brizgah ali tlačnih posodah. Obe tekočini v smeri koncentrične šobe potiskata tlačilki ali kompresor s stisnjenim zrakom. Tekočini potujeta skozi koncentrično šobo in se ob izhodu s pomočjo nihanja membrane ločita v koncentrične in enako velike kapljice. Te padejo skozi električno polje med šobo in elektrodo. Kot posledica se tvori površinski naboj, elektrostatične odbojne sile pa preprečijo zlepljanje kapljic med seboj med letom in ob padcu v raztopino premreževala.

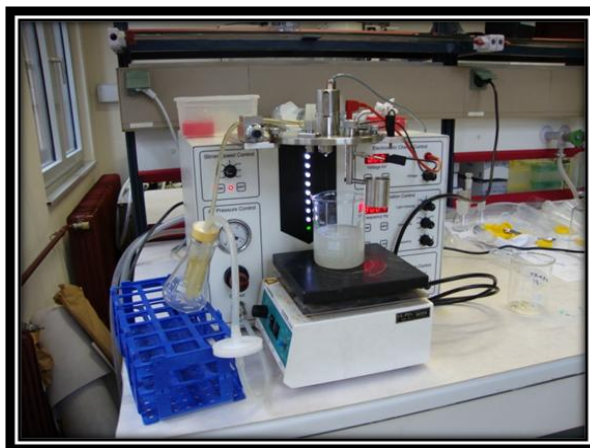
V kolikor kot polimer uporabimo pektin ali alginat, mikrokapsule premrežujemo v raztopinah soli, ki vsebujejo večvalentne katione. Mikrokapsule, ki nastanejo na začetku in na koncu izdelave, lovimo v ločeno posodo in jih zavržemo (16).

Legenda:

- 1 Injekcijska brizga, v kateri je material, ki tvori zunanjo fazo
- 2 Tlačna posoda, v kateri je material, ki tvori notranjo fazo
- 3 Koncentrično pulzacijsko telo
- 4 Vibracijski sistem
- 5 Koncentrična šoba
- 6 Elektroda
- 7 Raztopina premreževala
- 8 Elektrostatični generator
- 9 Napetostni generator
- 10 Stroboskop



Slika 6: Shematski prikaz enkapsulatorja Inotech IE-50 R (16).



Slika 7: Izdelava mikrokapsul na enkapsulatorju Inotech IE-50 R.

1.2.2 JEDRA MIKROKAPSUL

Ker je uporaba mikrokapsul zelo razširjena, je velik tudi nabor snovi, ki jih lahko mikrokapsuliramo. V farmaciji običajno uporabljamo trdna ali tekoča jedra. Trdno jedro predstavlja nosilni sistem z aglomerirano ali adsorbirano zdravilno učinkovino, jedro pa potem še obdamo z ovojnico. Tekoča jedra uporabljamo takrat, ko je učinkovina raztopljena ali suspendirana v nekem topilu, emulziji, SMES (11). Poleg klasičnih zdravilnih učinkovin lahko enkapsuliramo tudi kompleksnejše makromolekule, kot so proteini, peptidi, lipidi, encimi, hormoni in biomaterial, ki obsega žive celice, viruse, vaccine (12, 17).

1.3 MATERIALI, KI SE UPORABLJAJO ZA KAPSULIRANJE

Pri razvoju novih FO se vedno večja pozornost usmerja v izbor ustreznih pomožnih snovi (18). Ogradje mikrokapsul ima več vlog in je ključnega pomena pri načrtovanju mikrokapsul. Ponavadi je namenjeno zadrževanju in ščitenju jedrne faze, v kateri je učinkovina in omogoča prirejeno sproščanje učinkovine iz jedrne faze. Vpliva tudi na izbiro postopka mikrokapsuliranja ter na nastanek čvrstih mikrokapsul. Kljub temu da je nabor materialov velik, jih ima le nekaj GRAS status (*angl. Generally Recognized As Save*), ki zagotavlja, da je njihova uporaba varna in se uporabljajo tudi v prehranske namene. Treba je poudariti, da so v prehranski industriji varnostni predpisi strožji kot pa v farmacevtski industriji, saj se materiali uporabljajo v večjih količinah. Odvisno od namena

UVOD

mikrokapsuliranja se lahko kot ogrodni material uporabljajo različne naravne snovi, ki so prikazane v preglednici I (19, 20).

Preglednica I: Naravni materiali, ki se v prehranski industriji uporabljajo za kapsuliranje (20).

izvor	ogljikovi hidrati	proteini	lipidi
rastlinski	- škrob in derivati (maltodekstrini, dekstrini, ciklodekstrini, polidekstroza) - derivati celuloze - rastlinski eksudati (arabski gumi, karaja gumi, gumi iz puščavskega grma meskita) - rastlinski ekstrakti (galaktomanani, vodotopni sojini polisaharidi) - polisaharidi	- gluten - soja	- maščobne kisline, alkoholi - gliceridi - voski - fosfolipidi
morski	- karagenan - alginat		
živalski/mikrobni	- ksantan - gelan - dekstran - hitosan	- kazein - proteini sirotke - želatina	- maščobne kisline, alkoholi - gliceridi - voski - fosfolipidi

Poleg naravnih materialov za kapsuliranje uporabljamo tudi naslednje sintezne polimere:

- biorazgradljivi sintezni polimeri (polimlečna kislina, poliglikolna kislina, kopolimer mlečne in glikolne kisline),
- nebiorazgradljivi sintezni polimeri (derivati poliakrilne kisline, polivinil piroolidon, polivinil alkohol, polivinil glikol) (12, 13, 19, 20).

1.3.1 OGLJIKOVI HIDRATI

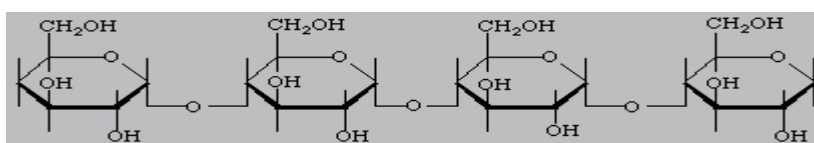
Ogljikovi hidrati sestavljajo kar 90 % suhe snovi v naravi in okoli 90 % se jih nahaja v obliki polisaharidov. To so homo- ali kopolimeri sladkornih enot in njihovih derivatov. Nekateri naravni polisaharidi vsebujejo tudi ostanke peptidnih verig, ki pa se jih pri predelavi odstrani. Zaradi svoje razširjenosti in preproste uporabe imajo v farmacevtski in prehranski industriji velik pomen (20).

1.3.1.1 ŠKROB IN DERIVATI

Škrob

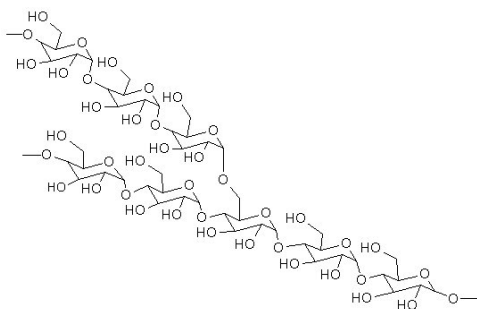
Škrob je naravni polisaharid in je zmes dveh različnih sestavljenih sladkorjev tj. amiloze in amilopektina, ki imata oba kot osnovni gradnik α -D-glukozo (glukopiranoza). Oba sta kompleksni makromolekuli, ki med seboj tvorita inter- in intramolekularne vezi (vodikove vezi) ter tako urejeno strukturo.

Vodotopna amiloza, ki je prikazana na sliki 8, sestavlja približno 20 % mase škrobnega zrna in se nahaja v njegovem osrednjem delu. Zgrajena je iz nekaj sto do več tisoč enot glukoze, ki so preko α -glikozidne vezi povezane v nerazvejane verige, te pa so urejene v α -heliks (3D) vijačnico. Pod vplivom encima α -amilaza se amiloza razgradi do disaharida maltoze in naprej do monosaharida glukoze (21).



Slika 8: Amiloza (21).

Amilopektin (slika 9) je glavna sestavina škrobnega zrna, saj sestavlja 80 % njegove mase. Tvori koncentrično naložene plasti v škrobnem zrnju. Zgrajen je iz 600–500000 molekul glukoze, ki se povezujejo v razvejane α -vijačnice. Verige se razvejajo na vsakih 25 molekul glukoze. Zaradi razvejane oblike je amilopektin slabo vodotopen, zato škrobna zrnca v vodi le nabreknejo, pri tem se tvori škrobov klej (21).

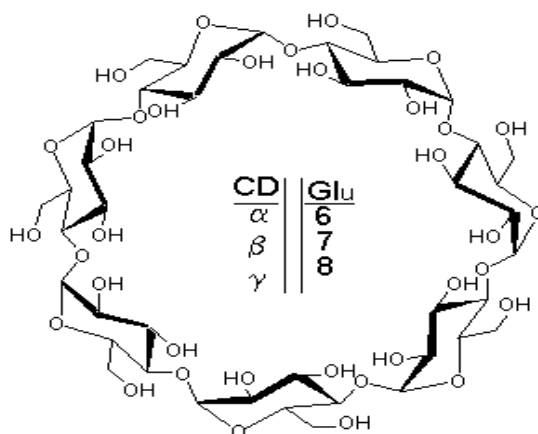


Slika 9: Amilopektin (21).

Škrob se v farmaciji uporablja predvsem pri izdelavi peroralnih farmacevtskih oblik in sicer kot vezivo, polnilo in razgrajevalo (22).

Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) so nehigroskopni makrociklični oligosaharidi. Osnovne gradbene enote CD so molekule D-glukoze v konformaciji stola. Vodikovi atomi na C3 in C5 ter nevezni elektronski pari kisika v α -(1,4)-o-glikozidnih vezeh dajejo notranjosti molekule hidrofoben značaj. Navzven obrnjene hidroksilne skupine so odgovorne za hidrofilen značaj zunanosti CD. Glede na število D-glukoznih enot, ki so med sabo povezane z α -(1,4) vezmi, ločimo α -CD, β -CD in γ -CD, s šestimi, sedmimi in osmimi glukoznimi enotami (slika 10) (23).



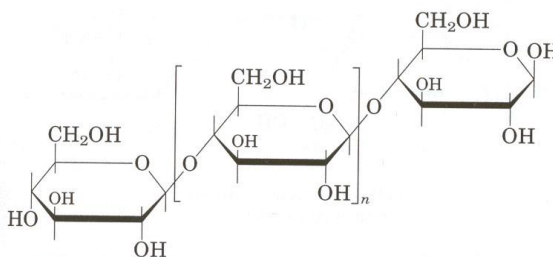
Slika 10: Struktura ciklodekstrinov (23).

V farmacevtski industriji se vse več uporablja ciklodekstrine, ki jih lahko pripravimo s kemijsko ali z encimsko reakcijo. Zanimivi so predvsem dobro topni predstavniki, ki povečajo topnost ZU, in netopni derivati, ki so primerni za doseganje nadzorovanega

sproščanja ZU (24). Ciklodekstrini se uporabljajo tudi za povečanje stabilnosti učinkovin, prekrivanja neprijetnega okusa snovi ter za pretvorbo tekočega materiala v trdno agregatno stanje. V primeru peroralne uporabe so se β -ciklodekstrini izkazali kot netoksični, sicer pa izkazujejo nefrotoksičen učinek (22).

1.3.1.2 DERIVATI CELULOZE

Celuloza (slika 11) je polimer iz β -D-glukočnih enot, ki so povezane z β -(1,4)-glikozidnimi vezmi. V nasprotju s škrobom, kjer so vse hidroksilne skupine usmerjene na eno stran molekule, so pri celulozi hidroksilne skupine obrnjene na obe strani, kar vodi v nastanek linearne verige. Je netopna v vodi in bolj kristalinična od škroba. V veliki meri se nahaja v naravi, saj sestavlja celično steno rastlin (20).



Slika 11: Osnovna struktura celuloze (25).

Metilceluloza (MC)

Metilceluloza je derivat celuloze, ki ima 27–32 % hidroksilnih skupin zaetrenih z metilno skupino. Stopnja substitucije vpliva tako na fizikalne lastnosti MC kot tudi na njeno topnost. Kljub temu da je MC manj hidrofozna kot EC, je njuna uporaba podobna (22).

Etilceluloza (EC)

Etilceluloza je derivat celuloze, kjer so hidroksilne skupine zaetrene z etilnimi skupinami. Odporna je na kisle pogoje, občutljiva pa na alkalne. Uporablja se kot hidrofozen ogrodni material za izdelavo peroralnih farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. Sproščanje ZU iz EC ogrodja je nadzorovano z difuzijo. EC se uporablja tudi za izboljšanje stabilnosti ZU ter prekrivanja neprijetnega okusa le-teh, visokoviskozna EC pa se največ uporablja v procesu mikrokapsuliranja (10, 22).

Hidroksipropilceluloza (HPC)

HPC je neionski polihidroksipropilni eter celuloze, ki je topen v mrzli vodi. Zaradi prisotnosti hidrofilnih (hidroksilnih) in hidrofobnih (propilnih) skupin je HPC netopna in ne tvori gela pod temperaturo 45 °C. V farmaciji se uporablja kot material za obloge oz. ovojnice, ki nadzirajo sproščanje ZU, sredstvo za emulgiranje, suspendiranje, vezivo ter sredstvo za povečanje viskoznosti in gostote (20, 22).

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

Po sestavi je podobna MC. Zaetrena je s hidroksipropilnimi in metilnimi skupinami. Topna je v večini polarnih topil. V vodi nabreka in tvori viskozno, neionsko, koloidno raztopino. Pri segrevanju in ohlajanju reverzibilno prehaja iz sol v gel stanje. Tako MC kot HPMC imata psevdoplastične ne-tiksotropne lastnosti (20).

Celulozni acetat ftalat (CAP)

Celulozni acetat ftalat je celuloza, ki ima polovico hidroksilnih skupin acetiliranih, približno četrtnina pa je esterificirana s ftalno kislino. CAP se uporablja za filmsko oblaganje ali kot ogrodni material pri izdelavi kapsul in tablet. Obstoje v kislem, v alkalnem in nevtralnem pa se dokaj hitro raztopi, zato se uporablja predvsem za gastrorezistentne farmacevtske oblike. V kombinaciji s plastifikatorjem (npr. acetilirani monogliceridi, glicerol, propilenglikol,...) se zelo poveča obstojnost v vodnem mediju (22).

Karboksimetilceluloza (CMC)

CMC nastane pri reakciji celuloze z alkalijami in klorocetno kislino. Je anionski linearni polielektrolit, topen tako v mrzli kot v vroči vodi. Kot je značilno za polielektrolite, je njihova konformacija odvisna od koncentracije, ionske moči in pH. Verige so najbolj raztegnjene pri nizki koncentraciji, nizki ionski moči in visokih pH vrednostih. V prisotnosti dvo- in trivalentnih kationov pa pride do obarjanja. Lastnosti nastale raztopine so v veliki meri odvisne od molekulske mase in stopnje substitucije. Če je CMC nizko substituirana, je raztopina tiksotropna, če pa so stranske skupine substituirane, ima

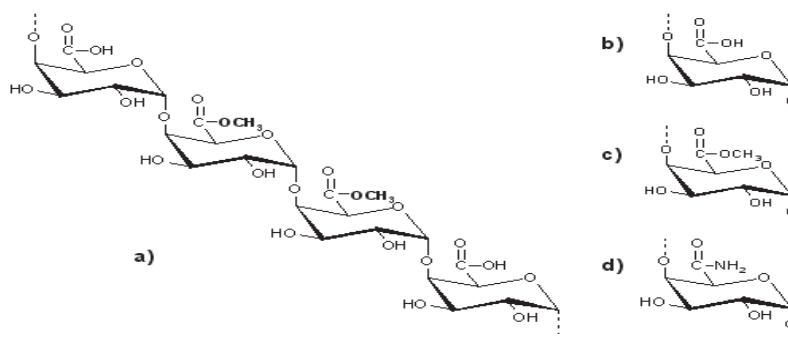
raztopina psevdoplastične lastnosti. Pri nizkem pH lahko pride do tvorbe laktona med karboksilno in hidroksilno skupino (20).

1.3.1.3 EKSTRAKTI IN EKSUDATI RASTLIN

Pektin

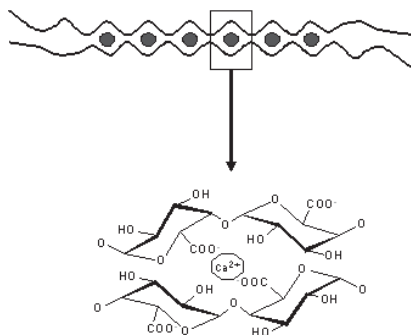
Uporaba pektina na področju farmacevtske tehnologije v zadnjih letih narašča, predvsem zaradi njegove razgradljivosti, preproste uporabe in netoksičnosti. Uporablja se tako za ciljano dostavo v GIT kot za izdelavo ogrodnih tablet in mikrokapsul. Znano je tudi, da pektin v odmerkih 6 g/dan znižuje stopnjo holesterola v krvi. Uporablja se tudi kot profilaksa pri zastrupitvi s toksičnimi kationi, skrajša čas strjevanja krvi ter je šibko protimikrobno sredstvo. Ker lahko deloma omeji obseg absorpcije zaužite hrane, se uporablja tudi kot pomoč pri hujšanju (26).

Je polisaharid sestavljen iz linearno povezanih enot α -(1,4)-D-galakturonske kisline (slika 12). Karboksilne skupine pektina lahko tvorijo ester z metanolom ali karboksamid z amsko skupino. Pektini se razlikujejo v stopnji zaestritve (*angl. Degree of esterification - DE*). Poznamo visoko (HM), 60–75 %, in nizko (LM), 20–40 %, zaestrene pektine. Na karboksilne skupine pa se lahko pripnejo tudi sladkorji (ramnoza, arabinoza, galaktoza, ksiloza). Od stopnje zaestrenosti pektina je odvisna njegova pKa vrednost; HM-pektini imajo nižjo pKa ($\sim 3,55$) kot LM-pektini ($\sim 4,10$). Po literaturnih podatkih je pektin najbolj stabilen pri pH = 4 (26).



Slika 12: (a) Ponavljajoči se segmenti molekul pektina z različnimi funkcionalnimi skupinami (b) prosta karboksilna kislina, (c) ester, (d) amid v pektinski verigi (26).

LM-pektin tvori gel v prisotnosti divalentnih kalcijevih ionov, ki se povežejo z negativno nabitimi karboksilnimi skupinami pektina. Do tvorbe gela pride zaradi nastanka strukture, ki je v literaturi opisana kot »model škatle za jajca« (slika 13), le ta je sestavljena iz praznih prostorov, ki jih tvorijo urejene strukture galakturonanov, verige monomerov D-galakturonske kisline pa so z elektrostatskimi in ionskimi vezmi povezane preko karboksilnih skupin.



Slika 13: Shematski prikaz geliranja LM-pektina, struktura »škatle za jajca« (26).

Amidirane skupine povečajo sposobnosti geliranja LM-pektinov. Amidirani pektini ne tvorijo gelske rešetke v obliki »škatle za jajca«, ker amidne skupine vzdolž verige povečajo povezavo preko vodikovih vezi. Kljub temu da dodatek sladkorja ni nujen za tvorbo gela, je določena koncentracija (10–20 %) zaželjena, ker zmanjša sinerezo in poveča čvrstost gela. V prisotnosti sladkorja je za nastanek gela potrebna manjša koncentracija kalcijevih ionov. Višje koncentracije sladkorjev (60 %) pa so nezaželjene zaradi vpletanja v gelsko mrežo in zmanjšanja jakosti in števila vodikovih vezi med molekulami pektina (26).

Geliranje HM-pektinov je odvisno od pH (gelira pri $\text{pH} < 3$) in prisotnosti sladkorjev. HM-pektin vsebuje malo karboksilnih skupin, zato so za nastanek gela pomembnejše hidrofobne interakcije in vodikove vezi.

Gel se tvori zaradi povezav med prostimi karboksilnimi skupinami pektina in hidroksilnimi skupinami sosednjih molekul. V nevtralnih pogojih so nezaestrene karboksilne skupine ionizirane in dajejo molekuli negativen naboj. V stiku z ostalimi hidroksilnimi skupinami privlačijo molekule vode. Ob dodatku kisline se karboksilne skupine pretvorijo v neionizirano obliko. Zmanjšanje števila negativnih nabojev zmanjša privlačne sile med

UVOD

pektinom in vodnimi molekulami ter zmanjša odboj med pektinom samim. Dodatek sladkorja zmanjša hidratacijo pektina, ker tekmuje s pektinom za molekule vode, pri tem se tvori termoreverzibilen gel. Pektin je topen v vroči vodi (26).

Pektin v vodi hitro hidratira in gelira. Ker je pektin naravnega izvora, se kakovost različnih proizvodnih serij pektina razlikuje. Prav tako se med izolacijo iz rastlin in med shranjevanjem spreminja tudi sama struktura.

V želodcu prisotni encimi pektina ne razgradijo, ko pa le-ta preide v tanko črevo pod vplivom alkalnega medija poteče hitro nabrekanje pektina (26).

Pri nizkih koncentracijah ima lastnosti Newton-ske raztopine, pri višjih pa psevdoplastične lastnosti (20).

Arabski gumi

Arabski gumi je nevtralna oziroma rahlo kislina, sestavljena iz oligosaharida arabinogalaktana, polisaharidov in glikoproteinov. Glavno verigo sestavljajo β -(1,3) povezane D-galaktopiranozil enote. Na glavno verigo so z (1,6) vezjo vezane stranske verige, sestavljene iz dveh do petih β -(1,3)-D-galaktopiranozinskih enot. Tako glavna kot stranske verige so sestavljene iz α -L-arabinofuranozil, α -L-ramnopiranozil, β -D-glukuronopiranozil in 4-o-metil- β -D-glukuronopiranozil enot. Arabski gumi se uporablja kot sterični stabilizator emulzij, saj obda oljne kapljice s čvrstim filmom. Viskoznost raztopine pa je v veliki meri odvisna od vrste gumija, pH in ionske moči disperznega medija. Največja viskoznost je dosežena med pH 6 in 7. Do 40 % m/m koncentracije tvori Newton-sko raztopino (20).

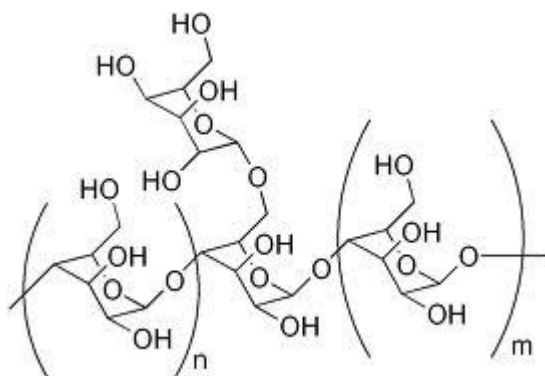
Tragakant

Tragakant je sestavljen iz razvejanih, heterogenih polisaharidov. Nahaja se v obliki magnezijevih ali kalijevih soli. Sestavljata ga dva dela: v vodi dobro topen tragakantin in basorin, ki je sestavljen iz tragakantne kisline, ki v vodi nabreka. Vsebnost tragakantina je odvisna od vira pridobivanja. Basorin je sestavljen iz D-galaktozinskih enot, povezanih z (1,4) vezjo, na koncu verige pa je z (1,3) vezjo vezana D-ksiloza. Tragakantin je nevtralen in je sferične strukture ter sestavlja jedro, ki vsebuje D-galaktozne enote povezane z (1,6)

in (1,3) vezjo, nanje pa je preko (1,2), (1,3) in (1,5) vezi pripeta L-arabinoza. Tragakant je zelo odporen na kisel medij. Uporablja se tudi kot emulgator in po eni strani zmanjša medfazno napetost emulzij O/V, po drugi strani pa poveča viskoznost vodne faze. Pri nizkih koncentracijah ima psevdoplastične lastnosti (20). V farmacevtski industriji se uporablja kot sredstvo za povečevanje viskoznosti in sredstvo za dispergiranje (22).

Galaktomanan (semenska sluz rožičevca) (*angl. Locust been gum - LBG*)

Sestavljen je iz (1,4) linearno povezanih β -D-manopiranozilnih enot, ki so z (1,6) vezjo dodatno prečno povezane z α -D-galaktopiranoznimi enotami (slika 14). Obstajajo tri različne vrste LBG, ki se razlikujejo po razmerju med D-manozil in D-galaktozil enotami, kar se odraža v vodotopnosti. Pri sobni temperaturi je topnost zanemarljiva, pri 60 °C se začne raztapljati v vodi, pri segrevanju do 80 °C pa popolnoma hidratira in tvori psevdoplastičen gel (20).



Slika 14: Strukturna formula galaktomanana (27).

Karaja gumi

Karaja gumi ima kompleksno strukturo in je delno acetiliran polisaharid, pridobljen kot magnezijeva in kalcijeva sol. Osnovno verigo sestavljajo α -D-galakturonska kislina in ostanki α -D-ramnoze. Na osnovno verigo so preko (1,2) vezi vezane β -D-enote guluronske kisline, preko (1,3) vezi pa galakturonske kisline. Karaja gumi ima negativen naboj in v primerjavi z ostalimi eksudati najmanjšo topnost (10 % v mrzli in 30 % v vroči vodi) (20).

Gumi iz puščavskega grma meskita

Osnovno verigo gumija sestavljajo z (1,3) vezjo povezani ostanki β -D-galaktoze, z (1,6) vezjo povezane stranske verige L-arabinoze, L-ramnoze, β -D-glukuronata in 4-o-metil- β -D-glukuronata. Vsebuje tudi nekaj proteinov. Topnost gumija je primerljiva s topnostjo arabskega gumija. Ima dobre lastnosti za tvorbo filma (20).

1.3.1.4 MORSKI EKSTRAKTI

Alginat

Alginat (alginska kislina) je naravni polisaharid, ki se v glavnem nahaja v različnih vrstah rjavih morskih alg v obliki kalcijevih, natrijevih, stroncijevih, barijevih in magnezijevih soli. Kemijsko je to linearen nerazvejan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot, β -D-manuronske (M) in α -L-guluronske (G) kisline, povezanih z (1,4)-glikozidno vezjo. Kislini tvorita homogene poli-M in poli-G odseke, ki so ločeni s predeli, kjer se monomerni enoti izmenjujeta. Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave (razmerja med monomernimi enotami in dolžine posameznih blokov). Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna, medtem ko je topnost njenih soli v vodi odvisna tako od pH medija, kot od vrste v mediju prisotnih kationov (28).

Z zmanjševanjem velikosti delcev alginata do mejne vrednosti 80–100 μ m se hitrost sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet z alginatom upočasnjuje, prav tako se zmanjša tudi začetno hitro sproščanje (tj. burst učinek). Manjši delci učinkovitejše tvorijo ogrodje in v le-tem pustijo manj prostih prostorov, poleg tega tudi hitreje hidratirajo, kar vodi v hitrejši nastanek hidrogela, ki predstavlja difuzijsko bariero in posledično upočasnjuje sproščanje vgrajene učinkovine (28).

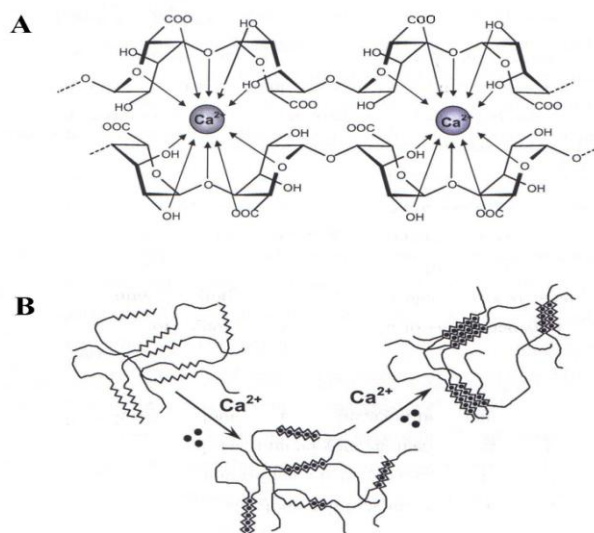
Sproščanje učinkovine iz alginatnega ogrodja je odvisno tudi od kemijske sestave natrijevega alginata. V kislem hitreje nabreka alginat z večjim deležem manuronskih enot, v alkalnem pa je sproščanje bolj zadržano v primeru alginata z večjim deležem guluronskih enot (28).

Viskoznost raztopine alginata, ki je odvisna od molekulske mase in sestave polimera, prav tako vpliva na sproščanje učinkovine iz alginatnega matriksa. Alginati z različno stopnjo

viskoznosti v različnih pH medijih različno nabrekajo, v kislem je sproščanje počasnejše iz gelov nizko viskozne alginata, v nevtralnem pa ravno obratno (28).

Alginat tvori dve vrsti gela. Z zniževanjem pH raztopine preide raztopina alginata iz sol v gel stanje in nastane t.i. kislinski gel, stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Zniževanje pH medija mora potekati počasi, saj se ob hitri spremembi pH alginska kislina obori. Druge vrste gel pa je ionotropni gel, ki nastane z interakcijo večvalentnih kationov (Ca^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+}) in polimernih verig. Pri ionotropnem geliranju poteka izmenjava natrijevih ionov s solmi guluronskih kislin z npr. Ca^{2+} ioni, ki povežejo odseke guluronskih kislin in povzročijo njihovo preureditev v urejeno tridimenzionalno strukturo, ki je dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi in spominja na »škatlo za jajca« (slika 15). V tej 3D strukturi interakcije niso le elektrostatske narave, temveč tudi koordinativne, z večvalentnim kationom kot kelatnim centrom. Za razliko od kislinskega gela so v tem primeru za tvorbo gela odgovorni le poliguluronski odseki, ki imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v hidrosilnih in karboksilnih skupinah večjo afiniteto do večvalentnih kationov (28).

V prebavnem traktu se alginat razgradi v debelem črevesju pod vplivom encimov, ki jih izločajo tam prisotne bakterije (28). Odvisno od koncentracije alginata raztopine izkazujejo bodisi Newton-ske bodisi psevdoplastične lastnosti (20).



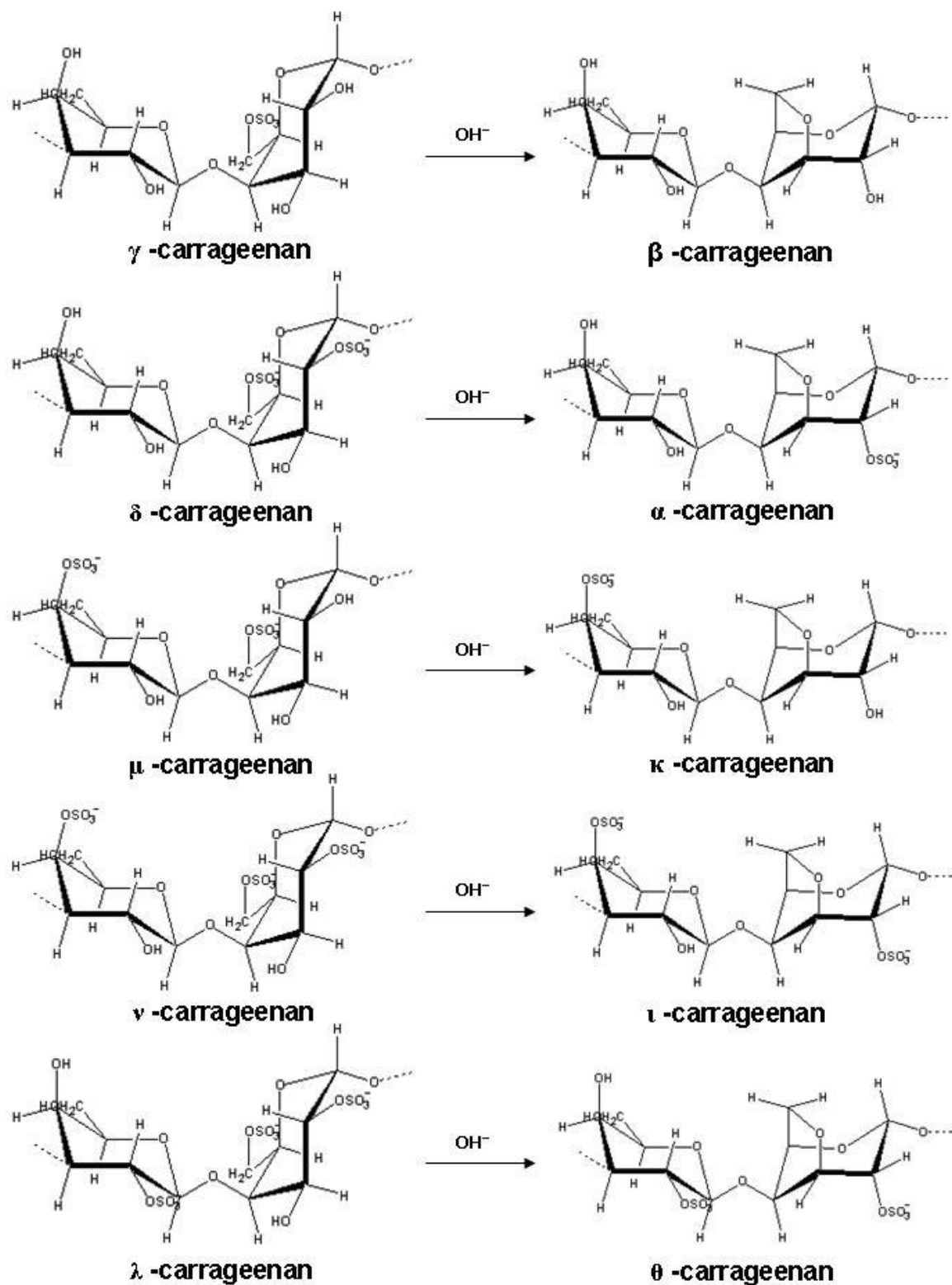
Slika 15: Shematski prikaz nastanka ionotropnega gela z modelom »škatle za jajca«; A - kelacija dvovalentnega kationa, B - stranska povezava alginatnih verig (29).

Vodotopne učinkovine se iz alginatnega hidrofilnega ogrodja sproščajo z difuzijo raztopljenih učinkovine skozi pore nabrekajočega ogrodja, slabo topne pa z erozijo površine le-tega. Dejavniki, ki vplivajo na način sproščanja so: lastnosti medija za sproščanje (pH, ionska sestava, ionska moč medija), lastnosti alginatnega ogrodja (vrsta in količina iona za premreževanje, koncentracija in molekulska masa alginata) in lastnosti učinkovine (topnost, molekulska masa). Hidrofilen polimer v vodnem mediju nabreka, kar vodi v nastanek viskozne koloidne plasti na površini nabrekajočega polimera. Ta plast nadzoruje tako vstop vode v ogrodje kot tudi izplavljanje raztopljenih snovi iz ogrodja (28).

Sposobnost geliranja in nabrekanja omogočata široko uporabnost alginata v farmaciji. Uporabimo ga lahko kot ogrodni material, polimer za oblaganje farmacevtskih oblik ali za izdelavo mikrokapsul. Uporablja se tudi v oblogah za vlažno celjenje ran, raztopinah za okularno in peroralno aplikacijo ter v biotehnologiji. Po literaturnih podatkih ima alginat tudi bioadhezivne in mukoadhezivne lastnosti, vendar si nekateri podatki nasprotujejo (28).

Karagenani

Karagenani so hidrofilni, visokomolekularni, linearni heteropolisaharidi, ki jih ekstrahirajo iz rdečih morskih alg *Rhodophyceae*, posebno iz vrst *Chondrus*, *Euclima* in *Gigartina*. Za zagotavljanje kakovosti gojijo alge v nadzorovanih pogojih, zato je zagotovljena tudi homogenost naravnega materiala. Karagenani so sestavljeni iz kalijeveh, natrijevih, kalcijevih, magnezijevih in amonijevih sulfatnih estrov galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze. Sladkorne enote so med seboj povezane z menjajočimi se (1,3)- α in (1,4)- β glikozidnimi vezmi. Posamezni karagenani se med seboj razlikujejo po številu in položaju esterskih sulfatnih skupin, kar vpliva na njihove splošne lastnosti. Delimo jih v tri skupine (κ , λ , λ); lastnosti so prikazane v preglednici II in na sliki 16. Karagenani se razlikujejo po vodotopnosti, sposobnosti tvorjenja gela, geliranja v prisotnosti dvovalentnih ionov ter stabilnosti v medijih z različnimi pH vrednostmi. V farmacevtski industriji se uporabljajo kot emulgatorji, stabilizatorji in sredstvo za povečanje viskoznosti. Zaradi dobrih adhezivnih lastnosti se lahko uporabljajo tudi pri oralni ali bukalni aplikaciji. Uporabljajo se tudi v mikrokapsulaciji proteinov in pri pripravi farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. Študije kažejo, da karagenani zavirajo razvoj herpes simplex virusa, humanega citomegalovirusa in papiloma virusa (21, 22).



Slika 16: Strukturne formule karagenanov (γ -, β -, δ -, α -, μ -, κ -, ν -, ι -, λ -, θ - karagenan) (29).

Preglednica II: Lastnosti karagenanov (20, 22).

lastnosti	Kapa - κ	Jota - ι	Lambda - λ
topnost v vroči vodi	nad 70 °C	nad 70 °C	topen
topnost v mrzli vodi	Na-soli topne, Ca-, K-amonijeve soli imajo omejeno topnost in nabrekanje	Na-soli topne, Ca-soli dajejo tiksotropne disperzije	topen v obliki soli, viskozne, psevdoplastične lastnosti
sposobnost geliranja	termoreverzibilen gel, močnejši v prisotnosti K	termoreverzibilen gel, močnejši v prisotnosti Ca	ne gelira
tip gela	krhek, sinereza, ni odpornosti na zmrzovanje	elastičen, ni sinereze, odpornost na zmrzovanje	/
sposobnost regeliranja	ne	da	/
pH stabilnost	stabilen pri nevtralnem pH, pri pH pod 3,5 hidrolizira, gel ostane stabilen	stabilen pri nevtralnem pH, pri pH pod 3,5 hidrolizira, gel ostane stabilen	hidroliza pri pH pod 4,3
odpornost na prisotnost soli	slaba	dobra	dobra
viskoznost	nizka	visoka	srednja/visoka
uporaba	geli, kapsuliranje	kreme, suspenzije, losjoni	kreme, losjoni

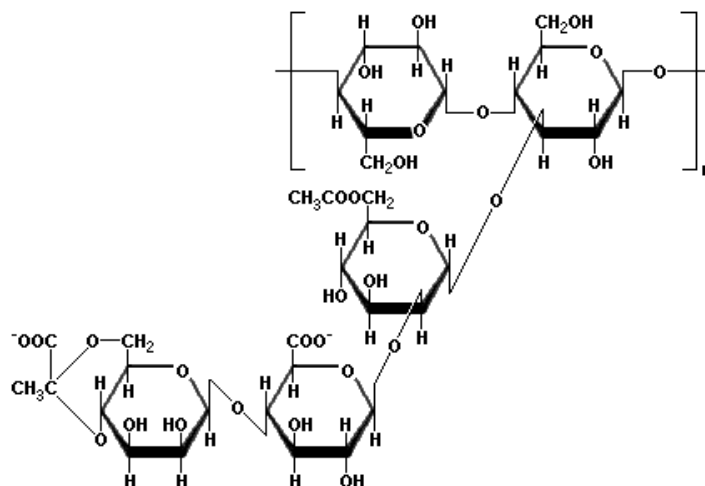
Vodotopni sojini polisaharidi

Veriga sojinih polisaharidov je sestavljena iz različnih sladkorjev (galaktoza, arabinoza, galakturonska kislina) in je v sredini negativno nabita. Nanjo so pripete stranske verige nevtralnih sladkorjev. Topni so v mrzli in vroči vodi; tvorijo relativno nizko viskozne raztopine in ne gelirajo. Imajo adhezivne lastnosti in s tvorbo filma okoli oljnih kapljic preprečijo njihovo oksidacijo. Uporabljajo se lahko tudi kot emulgatorji (20).

1.3.2 ŽIVALSKI IN MIKROBNI POLISAHARIDI

Ksantan

Ksantan (slika 17) je visokomolekularni anionski polisaharid. Nahaja se v obliki natrijevih, kalijevih in kalcijevih soli. Glavna veriga je sestavljena iz β -(1,4)-D-glukopiranozil enot, kjer ima vsaka druga enota stransko verigo iz trisaharida vezano na C3 mesto. Trisaharid je sestavljen iz ene D-glukuronozil enote med dvema D-manozil enotama. Približno 40–50 % terminalne manozil enote ima vezan piruvat na mestih 4 in 6. Neterminalna manozilna enota pa je 6-acetilirana. Ksantan hitro hidratira v hladni vodi, raztopina ima psevdoplastične lastnosti. Dodatek soli raztopini ksantana poveča viskoznost. Tvori tudi sinergistične interakcije z LBG (20).



Slika 17: Ksantan (31).

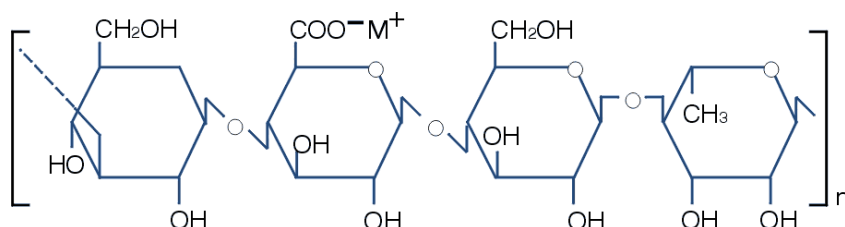
Dekstran

Dekstran je linearni nevtralni polimer sestavljen iz α -D-glukoz, povezanih z α -(1,6)-glikozidnimi vezmi, ki so razvejani z α -(1,3) vejami (20).

Gelan

Gelan je polisaharid z visoko molekulsko maso, v katerem se ponavljajo verige tetrasaharidov (dve D-glukozi, L-ramnoza, D-glukuronska kislina), ki so povezane z α -(1,3)-glikozidno vezjo, kot prikazuje slika 18. Glukuronska kislina gelira in tvori soli s Ca^{2+} , Mg^{2+} ioni (19). Topnost gelana je odvisna od DS in koncentracije prisotnih ionov v

raztopini. Nizko acilirani gelan je bolj občutljiv na prisotnost ionov, zato je potrebno odstraniti ione za hidratacijo. Segrevanje do 90 °C omogoči popolno hidratacijo gelana, ki je stabilen tudi pri temperaturi do 120 °C. Viskoznost narašča s stopnjo aciliranja. Nizko acilirani gelani tvorijo čvrste, ne-elastične, krhke gele, medtem ko visoko acilirani mehke, elastične in upogljive (20).



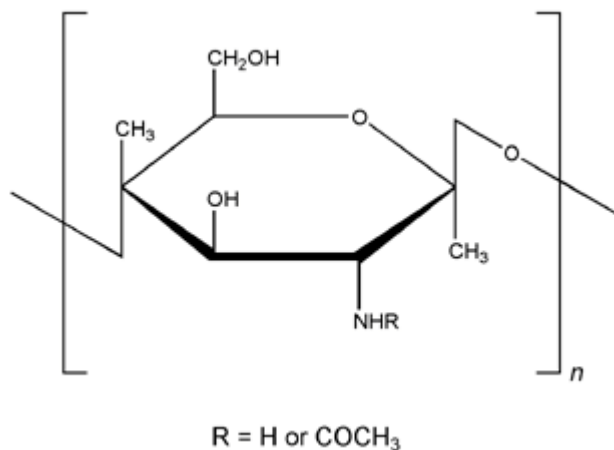
Slika 18: Gelan (32).

Hitosan

Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv kationski polimer, ki ga pridobivajo iz polisaharida hitina. V zadnjih letih mu posvečajo vedno več pozornosti v razvoju novih dostavnih sistemov, zlasti zaradi njegovih bioadhezivnih lastnosti ter sposobnosti pospeševanja absorpcije učinkovin skozi različne sluznice. Poleg tega naj bi hitosan nižal krvno koncentracijo holesterola in trigliceridov ter deloval protimikrobno. Pospešuje tudi celjenje ran, tako da se veže na fibroblaste in spodbuja proliferacijo keratinocitov ter s tem obnavljanje pokožnice. Hitosan se adsorbira na površino bakterij, pri čemer povzroči spremembe v strukturi celične stene ter v prepustnosti celične membrane, kar oboje vodi v smrt bakterij. Uporablja se tudi kot pomoč pri hujšanju; v prebavnem traktu naj bi hitosan tvoril gel, ki veže lipide in ostala hranila ter s tem zmanjša njihovo absorpcijo (33).

Kemijsko je hitosan kopolimer β -(1-4) povezanih enot glukoamina in N-acetilglukoamina, kot kaže strukturna formula na sliki 19. Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem polimera hitina, ki je sestavljen iz N-acetilglukoaminskih enot. Najdemo ga v oklepih rakov, pri nekaterih insektih in v gobah (33).

UVOD



Slika 19: Kemijska struktura hitosana (34).

Hitosan je topen le v kislinskih raztopinah, pri alkalnem in nevtralnem pH pa je netopen. Industrijsko proizvajajo hitosan z različno molekulsko maso, viskoznostjo in stopnjo deacetiliranja. Z anorganskimi in organskimi kislinami (1–3 % očetna, mlečna, klorovodikova kislina) tvori soli. Viskoznost disperzij hitosana narašča z nižanjem temperature, z večanjem koncentracije hitosana in z večanjem stopnje deacetiliranja (33).

Hitosan se uporablja tudi za povečanje permeabilnosti sluznic, s tem da vpliva na strukturne elemente tesnih stikov. Sposoben je zamenjati katione v tesnih stikih, katerih notranjost je visoko hidratirana in vsebuje stalen negativen naboj. Na pospeševanje absorpcije s hitosanom vplivata stopnja deacetiliranja ter molekulska masa polimera. Hitosan izkazuje tudi dobre bioadhezivne lastnosti, ki so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, ki je prisotna v glikoproteinih na površini sluznice (33).

Bioadhezivni sistemi za dostavo učinkovin izboljšajo BU vgrajenih učinkovin, saj podaljšajo čas zadrževanja farmacevtske oblike na mestu adhezije in omogočajo tesnejši stik s sluznico in s tem večjo absorpcijo.

1.3.3 PROTEINI

Želatina

Želatina je homogena zmes proteinov visoke molekulske mase, pridobljene z delno kislino ali alkalno hidrolizo živalskega kolagena (10). Sestavljena je iz aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi in tvorijo dolgo linearno verigo z molekulske maso med 15 000 in 250 000 g/mol (22). Najpomembnejše aminokisliline so glicin, prolin, hidroksiprolin, pozitivno nabiti lizin in arginin ter negativno nabita glutamat in aspartat. Želatina je lahko pozitivno ali negativno nabita, odvisno od postopka priprave. Pod 37 °C tvori gel pri koncentraciji večji od 1 %. V farmaciji se uporablja kot material za oblaganje, sredstvo za geliranje, suspendiranje, vezivo pri izdelavi tablet in sredstvo za povečevanje viskoznosti. Najpogosteje pa se uporablja za izdelavo trdih ali mehkih želatinskih kapsul. Želatina je v mrzli vodi slabo topna, v želodčni tekočini pa hitro nabreka in sprosti učinkovino iz farmacevtske oblike. Izdelujejo tudi mehke želatinske kapsule, kjer raztopini želatine dodajo plastifikator (glicerol, sorbitol). Veliko se uporablja tudi za mikrokapsulacijo učinkovin. Za premreženje je potrebno dodati premreževalo glutaraldehid ali ostala premreževala, saj je želatina v vodi topna in brez premreževala ne bi mogla zadržati sproščanja. Slaba stran uporabe glutaraldehida pa je prav v zaostanku letga. V zadnjem času se želatina vse več nadomešča s polimeri rastlinskega izvora zaradi potencialne nevarnosti za BSE bolezen (19, 22).

Gluten

Gluten ima kompleksno sestavo in je sestavljen iz dveh snovi; gliadina in glutenina. Gliadin je monomerni protein glutena z manjšo molekulske maso, je topen v vodi in agregira ob dodatku soli ter znižuje medfazno napetost, polimer glutenin pa ima zelo nizko topnost v vodi. Oba vsebujeta veliko prolinov in glutaminov. Gluten ima nizko topnost zaradi nizke vsebnosti ioniziranih aminokislin (20).

Kazein

Kazein je najpogostejši fosfoprotein, ki se v obliki sferičnih micelov nahaja v mleku. Poznamo štiri različne vrste kazeinov, ki se razlikujejo v naboju, hidrofilitnosti in vsebnosti kovin. Je zelo termostabilen protein, netopen pri izoelektrični točki 4,5, raztaplja pa se pri

UVOD

pH nad 5,5. Topnost in tvorba filma je odvisna od pH raztopine. Ima površinsko aktivne lastnosti, zato se uporablja kot emulgator (20).

Proteini sirotke

So globularni proteini, ki vsebujejo α -laktoalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuline, serumski albumin in ostale manjše proteine. Topni so v ionskem okolju in netopni pri izoelektrični točki ~ 5 in nizki ionski moči. Denaturirajo pri temperaturi $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri spremembi temperature tvorijo ireverzibilne gele in so površinsko aktivna snov (PAS), ki okoli oljnih kapljic tvori homogen film. Od dodatku predhodno segrete raztopine Ca^{2+} ionov gelirajo tudi v mrzli vodi (20).

1.3.4 LIPIDI

Maščobne kisline in alkoholi

Nasičene maščobne kisline imajo strukturno formulo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, nenasičene pa imajo prisotno dvojno ali trojno vez in se lahko nahajajo v dveh oblikah – cis ali trans. Lastnosti so odvisne od števila ogljikovih atomov. Maščobni alkoholi imajo namesto karboksilne skupine hidroksilno in se uporabljajo kot neionski emulgatorji, saj imajo emulgirajoče lastnosti (20).

Gliceridi

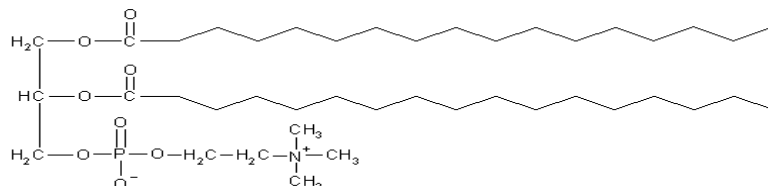
V to skupino spadajo trigliceridi, triacilgliceridi, digliceridi in monogliceridi. Ena, dve ali tri maščobne kisline so z estrskimi vezmi vezane na osnovno molekulo glicerola. Najpogosteje maščobne kisline vsebujejo 16, 18 ali 20 ogljikovih atomov. V vodi niso topni, mono- in digliceridi pa imajo emulgirajoče lastnosti (20).

Voski

Voski (čebelji vosek, vosek kandelije, karnauba vosek) so estri maščobnih kislin in višjih maščobnih alkoholov. So netopni v vodi in se talijo pri $62\text{--}64\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20).

Fosfolipidi

Fosfolipidi (slika 20) vsebujejo dve verigi maščobnih kislin. Tretja, prosta hidroksilna skupina glicerola je preko fosforjeve kisline povezana z holinom ali etanolaminom. So amfifilni in imajo emulgirajoče lastnosti, saj v določeni koncentraciji spontano tvorijo liposome (20).



Slika 20: Strukturna formula fosfolipidov (35).

1.3.5 BIORAZGRADLJIVI SINTEZNI POLIMERI

Biorazgradljivi sistemi se po določenem času v organizmu oziroma biološkem okolju razgradijo, ne glede na način aplikacije (parenteralna, peroralna). Najpogosteje se uporabljajo za dostavo proteinov oziroma za ciljno dostavo, lahko pa se uporabljajo tudi lokalno. Razgradnja polimerov je lahko kemijska, kjer pride do cepitve kemijskih vezi znotraj polimera, encimska, bakterijska ali fizikalna z erozijo ogrodja, kjer sta prisotna tudi difuzija in raztapljanje (19).

Polimlečna kislina

Sestavljena je iz monomerov mlečne kisline, ki je naravni metabolit v organizmu in s tem je povečana varnost uporabe polimlečne kisline. Mlečna kislina se nahaja v obliki L in D enantiomere. Z razgradnjo polimlečne kisline pride do nastanka mlečne kisline in s tem do povečanja lokalne kislosti, kar lahko vodi v draženje na mestu aplikacije in na zmanjšanje stabilnosti same učinkovine. Pripravki s polimlečno kislino so bolj stabilni od farmacevtskih oblik s poliglikolno kislino (19).

1.3.6 NEBIORAZGRADLJIVI SINTEZNI POLIMERI

Eudragiti

Eudragiti so derivati akrilne, metakrilne kisline in njenih estrov. Lahko so kationski (Eudragit E) ali anionski polimeri (Eudragit L, L 55, S) in se uporabljajo za zadržano oz. prirejeno sproščanje. Kationski polimeri so topni v kislem, anionski pa v alkalnem in se zato uporabljajo kot gastrozistentni polimeri (19).

Karbopoli

Karbopoli so derivati poliakrilne kisline, ki so prečno premreženi. Med sabo se razlikujejo glede na prisotno premreževalo, način in gostoto premreženja. So anionski polimeri ker imajo ohranjeno prosto karboksilno skupino in se ne uporabljajo kot acidorezistentni polimeri. So hidrofilni, zato močno nabrekajo in povečajo svoj volumen do 1000-krat. Uporabljajo se predvsem za peroralne farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem, dodatna prednost pa je njihova bioadhezivnost (19).

Polivinilpirolidon (PVP)

Kopolimer 1-etenil-2-pirolidon je sintetični polimer, ki je dobro topen v vodi in organskih topilih. Viskoznost je odvisna od molekulske mase in koncentracije. Ker ima odlično sposobnost tvorbe filma, se v veliki meri uporablja kot material za oblaganje (20).

1.3.7 OSTALO

Parafin

Parafin je oljnata zmes nasičenih ogljikovodikov (C_nH_{2n+2}) z več kot 18 ogljikovimi atomi, ki se pridobiva iz nafte. Je rumenkasto bele barve, brez vonja in okusa in ima visok indeks viskoznosti. V farmaciji se uporablja predvsem za izdelavo farmacevtskih oblik za dermalno uporabo, prav tako pa se uporablja tudi za oblaganje pri izdelavi tablet in kapsul, ker lahko s parafinsko oblogo tudi nadziramo sproščanje (20, 22).

Šelak

Natančna strukturna formula šelaka je zaenkrat še neznan. Je topen v alkalnem mediju in organskih topilih. Sestavljen naj bi bil iz mreže estrov hidroksi maščobnih kislin in seskviterpenskih kislin z molekulsko maso nad 1000 g/mol (20).

Pri izdelavi mikrokapsul v odvisnosti od namena lahko uporabimo različne pomožne snovi, kot je prikazano v preglednici III (11, 19).

Preglednica III: Pomožne snovi, ki jih uporabljamo pri izdelavi mikrokapsul (19).

PAS	modifikatorji sproščanja	polnila	mehčala	razgrajevala	stabilizatorji	barvila, arome
PVA, poloksameri, estri sorbitana, lecitin,...	polimeri	laktoza, saharoza, glukoza	PEG, triacetin	premrežena CMC, škrob	antioksidanti, konzervansi	

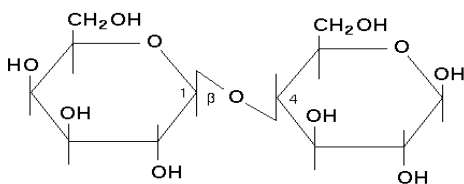
1.4 POLNILA IN TVORCI POR

Polnila so sredstva za dopolnjevanje mase ali volumna, če je učinkovine premalo. Tvorci por (*angl. pore formers*) so neaktivne, v vodi topne pomožne snovi, ki jih uporabljamo za pospeševanje sproščanja učinkovine iz hidrofilnega ogrodja (36). Že med izdelavo vgradimo tvorce por v hidrofilno ogrodje, kjer imajo lahko tudi vlogo polnila, saj zapolnijo prazne prostore v ogrodju iz polimera. Ko pride farmacevtska oblika v stik z vodnim medijem (želodčno vsebino), polimer počasi nabreka, hidratira, medtem pa se tvorca por dokaj hitro raztopijo in omogočijo več prostora za sproščanje učinkovine iz ogrodja z difuzijo. Nastanek pore je odvisen od velikosti, topnosti in vsebnosti tvorcev por v polimernem ogrodju.

1.4.1 LAKTOZA

Laktoza oz. mlečni sladkor je najpogosteje uporabljeno polnilo. Nahaja se v obliki belega, kristaliničnega praška. Je nehigroskopna, relativno inertna, biološko kompatibilna, ima

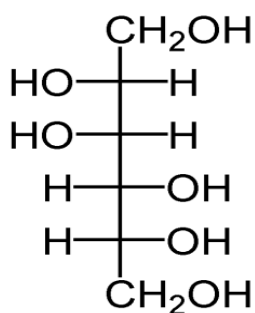
dober okus in se v vodi hitro raztopi. Kemijsko (slika 21) je laktoza disaharid glukoze in galaktoze (β -D-galaktopiranozil-(1-4)- α -D-glukopiranoza); odvisno od pogojev obarjanja se lahko nahaja v kristalni obliki α in β . Uporablja se predvsem α -monohidrat, ki ob segrevanju preide v brezvodno obliko. Amorfna laktoza je fizikalno nestabilna in prehaja v α -obliko. Najpogosteje pa se uporablja kot polnilo in kot tvorec por pri izdelavi ogrodnih tablet in kapsul. Na voljo so različne oblike laktoze, ki se razlikujejo po fizikalnih lastnostih (velikost delcev, pretočne lastnosti) (22, 37).



Slika 21: Struktura laktoze (38).

1.4.2 MANITOL

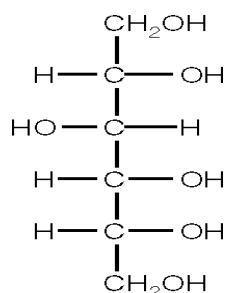
Manitol je poliol (slika 22), izomer sorbitola. Je bel, kristaliničen prašek brez vonja, sladkega okusa, a je manj sladek od navadnega sladkorja. Je dobro topen v vodi in nehigroskopnen. Uporablja se predvsem pri direktnem tabletiranju, granuliranju, pri sušenju z razprševanjem, kot polnilo in kot pomožna snov pri izdelavi žvečljivih tablet zaradi hladilnega in antikariogenega učinka. Prednost uporabe manitola pri granuliranju je v tem, da se hitro posuši. Iz terapevtskega stališča se manitol uporablja kot osmotski diuretik (22, 37).



Slika 22: Struktura manitola (39).

1.4.3 SORBITOL

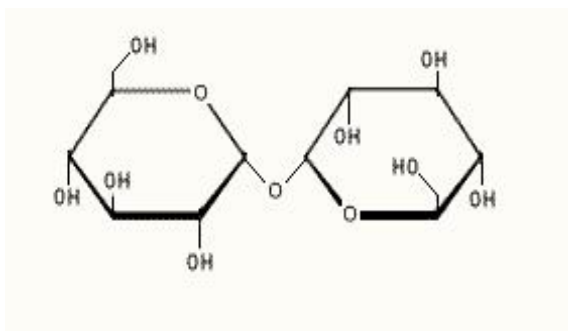
Sorbitol (slika 23) se uporablja kot polnilo pri izdelavi tablet z direktnim tabletiranjem ali vlažnim granuliranjem, kot plastifikator pri mikrokapsuliranju in kot pomožna snov pri izdelavi žvečljivih tablet zaradi sladkega okusa in občutka hlajenja. Nahaja se v obliki belega, skoraj brezbarvnega kristaliničnega, higroskopnega praška. Na voljo je v različnih polimorfni oblikah in ima 50–60 % sladkosti saharoze (22).



Slika 23: Struktura sorbitola (40).

1.4.4 TREHALOZA

Trehaloza se nahaja v obliki belega, skoraj brezbarvnega praška s sladkim okusom (45 % sladkosti saharoze). Sestavljena je iz dveh glukoznih enot, povezanih z (1,1)- α vezjo, zato se imenuje α -D-glukopiranozil-(1-1)- α -D-glukopiranozid. Najpogosteje je v obliki dihidrata (slika 24), ki ne reagira z amino skupinami proteinov in je nereducirajoči sladkor. Za razliko od ostalih disaharidov je relativno stabilna tudi pri nizkih pH vrednostih. V farmacevtski industriji se uporablja predvsem kot pomožna snov za prekrivanje okusa, kot krioprotektant pri liofiliziranju in kot polnilo (22).



Slika 24: Trehaloza (41).

2 NAMEN DELA

Diplomska naloga je nadaljevanje predhodnih raziskav na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Njen namen je optimizirati ovojnico, postopek izdelave in utrjevanja mikrokapsul s SMES jedrom, ki vsebuje furosemid kot modelno učinkovino. Ovojnica mikrokapsul je sestavljena iz hidrofilnih polimerov pektina in alginata ter različnih polnil. Za izdelavo mikrokapsul bomo uporabili enkapsulator Inotech IE-50 R, ki omogoča izdelavo mikrokapsul z metodo koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane. Uporabili bomo sistem koncentričnih šob z velikostjo 500 μm /750 μm . Kot notranjo fazo (jedro) bomo uporabili SMES s furosemidom, kot zunanjo fazo (ovojnica) pa vodno raztopino pektina in alginata z ali brez dodatka različnih polnil.

Jedro fazo mikrokapsul predstavlja SMES (Mygliol 812[®], emulgator Labrasol[®], koemulgator Plurol oleique[®]) z modelno učinkovino furosemid. Viskoznost SMES jedra povečamo z aerosilom. Z dodatkom CaCl_2 v jedro fazo pa sprožimo premreževanje od znotraj navzven, s čimer zagotovimo nastanek čvrstejšje ovojnice.

Najprej bomo izdelali referenčne mikrosfere, katerih ogrodje bo vsebovalo različna razmerja pektina in alginata. Z vrednotenjem nabrekanja in erozije polimernega ogrodja mikrosfer v pufrih s pH 3 in pH 6,8 bomo določali najprimernejše razmerje polimerov za izdelavo mikrokapsul. Profile nabrekanja in erozije referenčnih mikrosfer bomo določali tudi po dodatku 10 % m/m različnih polnil (laktoza, manitol, sorbitol, trehaloza) v raztopino polimera.

Med procesom izdelave in sušenja mikrokapsul običajno prihaja do iztekanja jedrne faze, kar ima za posledico slabo učinkovitost vgradnje jedrne faze in neustrezno čvrstost mikrokapsul s SMES jedrom. Z namenom izboljšanja omenjenih lastnosti bomo optimizirali postopek utrjevanja ovojnice mikrokapsul. Proučevali bomo tudi vpliv dodatka polnil v ovojnico mikrokapsul na učinkovitost vgradnje in čvrstost le-teh. Da bi še dodatno izboljšali omenjene lastnosti, bomo mikrokapsule obdali tudi z oblogo iz različnih vrst hitosanov.

Izdelane mikrokapsule bomo ovrednotili glede na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul. Proučevali bomo tudi vpliv sestave

NAMEN DELA

ovojnice mikrokapsul (in postopek utrjevanja) na profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul ter ovrednotili kinetiko sproščanja.

Med samo izdelavo mikrokapsul ter procesom sproščanja furosemida iz mikrokapsul bomo spremljali tudi morfološke lastnosti mikrosfer in mikrokapsul.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Jedrna faza:

Plurol oleique[®]

Plurol oleique[®] (Gattefossé, Saint-Priest, Francija) je viskozna tekočina temno rumene barve z značilnim vonjem. Kemijsko je diester poliglicerola-6 in oleinske kisline. Je dobro topen v organskih topilih kot sta kloroform in diklorometan ter v rastlinskih in mineralnih oljih. V etanolu je zmerno topen, medtem ko ga v vodi lahko dispergiramo. Uporabljamo ga kot emulgator ali koemulgator v dermalnih in peroralnih farmacevtskih pripravkih (42).

Labrasol[®]

Labrasol[®] (Gattefossé, Saint-Priest, Francija), katerega oficinalno ime je makroglicerol kaprilokaproilat, je viskozna tekočina blede rumene barve. Kemijsko je zmes mono-, di- in trigliceridov oktanojske in dekanajske kisline ter mono- in diestrov makrogola z oktanojsko in dekanajske kisline. Dobro topen je v diklorometanu, lahko pa ga tudi dispergiramo v vroči vodi. Uporabljamo ga kot solubilizator težko topnih učinkovin v pripravkih za peroralno uporabo, kot pospeševalec penetracije v dermalnih pripravkih in kot emulgator v mikroemulzijah (42, 43).

Miglyol 812[®]

Miglyol 812[®] (Sasol GmbH, Nemčija) je rahlo rumena, oljnata tekočina brez vonja in okusa. Kemijsko je zmes trigliceridov s srednje dolgimi verigami. Pridobivajo ga s hidrolizo kokosovega olja, ekstrahiranega iz trde, posušene frakcije endosperma *Cocos nucifera* (L.) ali *Elaeis guineensis* (Jacq.). V vodi je slabo topen, meša pa se z etanolom, diklorometanom, maščobnimi olji in kratkoverižnimi ogljikovodiki. Je nedražeč in netoksičen, zato ga lahko uporabljamo tako v dermalnih kot tudi v farmacevtskih oblikah za peroralno in parenteralno uporabo (22, 44).

Aerosil 200

Aerosil 200 (Degussa AG, Nemčija) je koloidni silicijev dioksid (SiO_2) z velikostjo delcev okrog 15 nm in specifično površino $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$. Je lahek, bel prašek, brez vonja in okusa. V farmaciji ga uporabljamo kot adsorbent, antiadheziv, stabilizator emulzij, razgrajevalo in zgoščevalo (22).

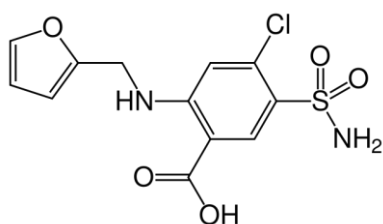
Kalcijev klorid, brezvoden

Brezvoden kalcijev klorid (RIEDEL de Haën, Nemčija) je bel, kristaliničen in zelo higroskopen prašek s temperaturo tališča $772 \text{ }^\circ\text{C}$. Je dobro topen v vodi in etanolu. Komercialni izdelek vsebuje približno 94–97 % CaCl_2 , glavno nečistoto pa predstavlja $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (45).

Furosemid

Furosemid (Lek d.d., Slovenija) je derivat antranilne kisline (4-kloro-2-(furan-2-ilmetilamino)-5-sulfamoilbenzojska kislina) (slika 25) in učinkuje kot diuretik Henleyeve zanke. Glede na ATC klasifikacijo ga uvrščamo v C03C - Diuretiki vhodnega kraka Henleyeve zanke. Deluje tako, da inhibira $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ črpalko in s tem pospešuje izločanje natrijevih, kloridnih, kalijevih, kalcijevih, magnezijevih in bikarbonatnih ionov ter s tem poveča izločanje vode, zato ga imenujemo tudi saluretik. Uporablja se pri zdravljenju edemov in pri uravnavanju krvnega tlaka. Peroralno se uporablja v odmerkih 20–80 mg/dan, njegov učinek pa traja do 6 ali 8 ur. Pri prekomerni uporabi diuretikov lahko pride do porušanja elektrolitskega ravnotežja, predvsem do hipokaliemije (46, 47).

Po BCS spada v IV. skupino, t.i. molekule s slabo topnostjo in slabo permeabilnostjo. Zaradi omenjenih lastnosti ima biološko uporabnost med 43 % in 69 %. Porazdelitveni koeficient učinkovine je 2,03, molekulska masa pa 330,745 g/mol. Absorbira se predvsem v zgornjem delu tankega črevesa ter ima šibko kisle lastnosti ($\text{pK}_a = 3,9$) zaradi proste karboksilne skupine. Razpolovni čas učinkovine je do 100 min (46, 47). Hraniti ga moramo zaščitene pred svetlobo ter oksidanti, kislinami in kovinami (44).



Slika 25: Struktura furosemida (47).

Uporaba furosemida kot modelne učinkovine za vgraditev v SMES jedro mikrokapsul je primerna s stališča slabe topnosti in slabe permeabilnosti učinkovine same. Odprtje tesnih stikov in s tem povečano permeabilnost furosemida pa omogoči tudi hitosan, s katerim je obložena ovojnica mikrokapsul.

Zunanja faza:

Pektin

Pektin (CP Kelco, Danska) je naravni polisaharid. Nahaja se v obliki svetlo rjavega praška brez vonja in okusa. Oznaka LM pomeni, da je pektin nizko esterificiran (20–40 %) z metoksi skupino. Pektin pridobivajo iz jabolčne kaše po stiskanju sokov in iz lupine agrumov. V farmacevtski industriji se pektin veliko uporablja pri izdelavi dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem, saj s tvorbo hidrofilnega ogrodja lahko nadzira sproščanje (26). Uporabili smo nizko metoksiliran in amidiran pektin.

Alginat

Natrijev alginat (Sigma, Nemčija) je naravni polisaharid, ki se nahaja v obliki belega ali blede rumenorjavega prahu brez vonja in okusa. V vodnem mediju se počasi raztaplja in tvori viskozno raztopino. V organskih topilih, etanolu in v kislinskih vodnih raztopinah pa je skoraj netopen (44). Alginat se uporablja tako v prehranski kot tudi v farmacevtski industriji kot gelirno sredstvo, za povečanje viskoznosti, stabilnosti in pri izdelavi sistemov s prirejenim sproščanjem (28).

Nizko viskozen hitosan (*angl. Low viscosity - LV*)

LV-hitosan (Fluka, Nemčija) je bel ali kremno bel prašek brez vonja. Topen je v kislem vodnem mediju (1–3 % očetna kislina). Njegova topnost je odvisna od stopnje N-acetilacije. Oznaka LV pomeni, da je raztopina hitosana nizko viskozna oz. ima majhno molekulsko maso. Njegova uporaba v farmaciji vedno bolj narašča, zaradi netoksičnosti, biokompatibilnosti in zmožnosti pospeševanja absorpcije (33).

Srednje viskozen hitosan (*angl. Middle viscosity - MV*)

MV-hitosan (Fluka, Nemčija) je srednje viskozen in ima srednje veliko molekulsko maso. Nahaja se v obliki belih ali kremno belih delcev premera približno 5 mm. V kislem mediju je slabše topen kot LV-hitosan, zato ga je potrebno segrevati.

Visoko viskozen hitosan (*angl. High viscosity - HV*)

HV-hitosan (Fluka, Nemčija) je visoko viskozen in ima veliko molekulsko maso. Nahaja se v obliki belih ali kremno belih zrn, ploščic. V kislem mediju je slabše topen kot LV-, MV-hitosan, zato je raztopino potrebno segrevati, da se popolnoma raztopi.

Laktoza

Laktoza monohidrat (Lek, Slovenija) je bel ali skoraj bel nehigroskopen kristaliničen prašek, ki je lahko topen v vodi, vendar se počasi raztaplja. V farmaciji se uporablja kot polnilo, tvorec por in vezivo (22).

Manitol

Manitol (Merck, KGaA, Nemčija) je bel, kristaliničen prašek brez vonja in sladkega okusa. Je dobro topen v vodi in nehigroskopen. V farmaciji se uporablja kot snov za razredčevanje, polnilo, tvorec por in kot pomožna snov pri izdelavi žvečljivih tablet (22).

Sorbitol

Sorbitol (Lek, d.d.) se nahaja v obliki belega, skoraj brezbarvnega kristaliničnega, higroskopnega praška. Na voljo je v različnih polimorfni oblikah in ima 50–60 %

sladkosti saharoze. V farmaciji se uporablja kot polnilo, tvorec por, plastifikator, za razredčevanje in kot pomožna snov pri izdelavi žvečljivih tablet (22).

Trehaloza

Trehaloza dihidrat (Calbiochem, USA) se nahaja v obliki belega, skoraj brezbarvnega praška s sladkim okusom (45 % sladkosti saharoze). Dihidrat vsebuje 9,7 % vode. V farmaciji se uporablja predvsem kot pomožna snov za prekrivanje okusa, pomožna snov za liofilizacijo, stabilizator in kot polnilo (22).

Priprava raztopin za premreževanje:

Kalcijev klorid, dihidrat

Kalcijev klorid, dihidrat (Merck KGaA, Nemčija) je bel, kristaliničen prašek, ki je dobro topen v etanolu in vodi. Komercialni izdelek vsebuje 73–80 % CaCl_2 (45).

Ocetna kislina, brezvodna

Ocetna kislina (Merck, KGaA, Nemčija) je bistra, brezbarvna, hlapna tekočina z ostrim vonjem, ki se meša z vodo, alkoholom in etrom. Na področju farmacije jo večinoma uporabljamo za uravnavanje pH (22).

Sestavine mobilnih faz:

Fosforjeva kislina

Fosforjeva kislina (Merck KGaA, Nemčija), kemijsko jo imenujemo tudi ortofosforjeva kislina, je brezbarvna, viskozna tekočina brez okusa. Koncentrirana fosforjeva kislina (85 %) je zelo korozivna in škodljiva (22).

Acetonitril

Acetonitril (Merck KGaA, Nemčija) je lahko vnetljivo in hlapljivo organsko topilo. Je brez barve in ima značilen vonj. V primeru zaužitja, vdihavanja in pri stiku s kožo je toksičen. V veliki meri ga uporabljamo pri pripravi mobilnih faz (44).

Etanol

Etanol je bistra, brezbarvna, hlapljiva tekočina z značilnim vonjem in ostrim okusom. Kot topilo uporabljamo 96 % etanol (22).

Priprava pufrov:

Klorovodikova kislina, koncentrirana

Klorovodikova kislina (Merck KGaA, Nemčija) je bistra, brezbarvna, kadeča se vodna raztopina vodikovega klorida z ostrim vonjem. Koncentrirana HCl je zelo korozivna in v primeru stika s kožo povzroča poškodbe. Pri pripravi pufrov uporabljamo 37 % raztopino HCl (22).

Natrijev hidrogenfosfat monohidrat

Natrijev hidrogenfosfat (Merck KGaA, Nemčija) se nahaja v obliki ortorombskih brezbarvnih ali belih kristalov in je brez vonja. Pri sobni temperaturi veže vodo in tvori dihidrat (22).

Natrijev hidroksid

Natrijev hidroksid (Merck KGaA, Nemčija) se nahaja v obliki grudic, ploščic, palčic ali kroglic bele barve. Če ga hranimo v dobro zaprtih vsebnikih velja, da komercialni izdelek vsebuje 97–98 % NaOH. Je zelo koroziven in ob stiku s kožo povzroča razjede (22).

3.2 METODE

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

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

Preglednica IV: Naprave in pripomočki, ki smo jih uporabili pri diplomskem delu.

Pripomoček	Model in proizvajalec
Analitska tehtnica	AG245, Mettler Toledo, Švica
Brizge (60 mL)	OMNIFIX [®] 60 ml, Braun, Švica
Brizge (5 mL)	ICO (Plus2 5 mL, Novico, Italija)
Centrifugirke (50 ml)	TPP, Certified ISO 9001, Švica
Enkapsulator	Encapsulator IE-50, Inotech, Švica
Filtri za filtracijo raztopin	Minisart RC 0,45 µm, Santorius, Nemčija
Grelec	Rotamix 550 MMH, Tehnica Železniki, Slovenija
HPLC aparatura	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Nemčija
Kolona	Gemini 150*2 mm; 5 mikron
Magnetno mešalo 1	Rotamix 550 MMH, Tehnica Železniki, Slovenija
Magnetno mešalo 2	Big squid, IKA [®] -WERKE, Nemčija
Magnetno mešalo 3	HI 190M, HANNA instruments, Portugalska
Mrežaste kroglice	ChaChult, Hamburg, Nemčija

Naprava za test raztapljanja	Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA
pH meter	MA235, Mettler Toledo, Slovenija
Tehtnica	Exacta 2200 EB, Tehtnica Železniki, Slovenija
Vrtinčno slojni sušilnik	Strea-1, NIRO-Aeromatic, Švica
Transparentni papir	Ciat, Carta Ciat-Lucido, Italija
Optični mikroskop	Olympus SZX 12 optični mikroskop, nad katerim je bil nameščen digitalni fotoaparatus (3CCD Color Video Camera, Power HAD, Sony, Japonska)
Sušilnik	SP-45, Kambič, Slovenija

3.2.2 PRIPRAVA RAZTOPINE OGRODNIH POLIMEROV ZA IZDELAVO REFERENČNIH MIKROSFER

Priprava raztopine alginata/pektina

Za izdelavo ovojnice smo pripravili 2 % raztopino alginata/pektina. Raztopino smo pripravili tako, da smo k 98 g prečiščene vode dodali 2 g alginata/pektina in jo mešali na magnetnem mešalu 24 ur, da je nastala homogena raztopina. Morebitno vodo, ki je med mešanjem izhlapela, smo naslednji dan dodali v raztopino, do popolne mase.

Priprava raztopine ogrodnega polimera, ki niso vsebovale polnila

Za izdelavo referenčnih mikrosfer smo raztopine alginata in pektina zmešali v različnih razmerjih, kot je predstavljeno v preglednici V in jih pustili mešati 1 h.

Preglednica V: Raztopine z različnimi razmerji polimerov pektina/alginata.

Raztopina	Dodatek raztopine pektina (g)	Dodatek raztopine alginata (g)
P/A=100/0	100	0
P/A=75/25	75	25
P/A=50/50	50	50
P/A=25/75	25	75
P/A=0/100	0	100

Priprava raztopine ogrodnega polimera, ki so vsebovale 10 % polnila

Za izdelavo ovojnice smo pripravili 2 % raztopino alginata/pektina z dodatkom 10 % polnila (laktoza, manitol, sorbitol, trehaloza). Raztopino smo pripravili tako, da smo k 88 g prečiščene vode dodali 10 g polnila in jo mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da se je ves sladkor raztopil. Po potrebi smo tudi segrevali. Nato smo dodali še 2 g alginata/pektina in vse skupaj mešali na magnetnem mešalu še 24 ur. Morebitno vodo, ki je med mešanjem izhlapela, smo naslednji dan dodali v raztopino do popolne mase.

3.2.3 PRIPRAVA ZUNANJE FAZE Z OGRODNIM POLIMEROM ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL

Priprava raztopine ogrodnega polimera, ki niso vsebovale polnila

Postopek priprave je enak kot je opisan pri izdelavi referenčnih mikrosfer, ki niso vsebovale polnila.

Priprava raztopine alginata/pektina z 10 % polnila

Postopek priprave je enak kot je opisan pri izdelavi referenčnih mikrosfer, ki so vsebovale polnilo.

3.2.4 PRIPRAVA JEDRNE FAZE

Za pripravo jedrne faze smo uporabili SMES s sestavo Labrasol[®]/Plurol oleique[®]/Miglyol 812[®]. SMES je plod predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo. Za pripravo SMES smo zmešali emulgator Labrasol[®] in koemulgator Plurol oleique[®] v razmerju 4/1 in dodali toliko Miglyola 812[®], da je bil njegov delež v zmesi 12 %, delež emulgatorja in koemulgatorja skupaj pa 88 %. Najprej smo natehtali 17,6 g Plurola oleique[®] zaradi velike viskoznosti, dodali še 70,4 g Labrasola[®] in 12 g Miglyola 812[®]. Zmes smo mešali z magnetnim mešalom do nastanka bistre, rumeno–oker obarvane tekočine. V tako pripravljen SMES smo nato dodali kalcijev klorid k koncentraciji 0,5 mg kalcijevega klorida/g SMES ter pustili mešati 24 ur. Na ta način smo v 100 g SMES dodali 50 mg CaCl₂. Tako pripravljeni jedrni fazi (91 g) smo dodali še zdravilno učinkovino furosemid v koncentraciji 5 % m/m (5 g) ter aerosil za zgostitev jedrne faze v koncentraciji 4 % m/m (4 g) ter nastalo zmes mešali še 24 ur.

3.2.5 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PREMREŽEVANJE

1 % raztopina LV-hitosana v 1 % očetni kislini

Natehtali smo 1 g LV-hitosana ter dodali 99 g 1 % očetne kisline in mešali 24 ur da se je hitosan popolnoma raztopil. 1 % očetno kislino smo pripravili tako, da smo 10 ml 100 % očetne kisline odpipetirali v bučko in dodali prečiščeno vodo do 1 L. Pomembno je, da že pred dodatkom očetne kisline v bučko dodamo nekaj vode.

1 % raztopina LV-,MV-,HV- hitosana v 1 % očetni kislini z 0,5 M CaCl₂

1 L raztopino smo pripravili tako, da smo najprej natehtali 73,51 g CaCl₂, dodali 916,49 g 1 % očetne kisline in mešali, dokler se ni kalcijev klorid raztopil. Potem smo dodali še 10 g LV-, MV-, HV-hitosana ter mešali 24 ur, dokler se ni hitosan raztopil. Pri višjih viskoznostih MV-, HV-hitosana je bilo potrebno še dodatno segrevanje, da se je hitosan popolnoma raztopil. Morebitno vodo, ki je med mešanjem in segrevanjem izhlapela, smo naslednji dan dodali v raztopino do popolne mase.

3.2.6 PRIPRAVA MEDIJA ZA TEST RAZTAPLJANJA

Vodna raztopina HCl s pH 3

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

Fosfatni pufer s pH 6,8

V ločenih bučkah smo pripravili 0,2 M NaOH in 0,2 M raztopino $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Raztopino NaOH smo pripravili v 1 L bučko tako, da smo natehtali 8 g NaOH, bučko dopolnili do oznake s prečiščeno vodo in večkrat premešali. Raztopino $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ smo pripravili v 2 L merilni bučki tako, da smo natehtali 56,79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 560 ml 0,2 M raztopine NaOH ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljenemu pufru smo nato še s pH-metrom uravnali pH in po potrebi dodali HCl po kapljicah. pH vrednost je lahko odstopala za 0,05 enote.

3.2.7 PRIPRAVA MOBILNIH FAZ ZA HPLC

Acetonitril 98 %

Vodno raztopino acetonitrila smo pripravili tako, da smo v litrsko bučko odmerili 980 ml (98 %) acetonitrila in dodali 20 ml bidestilirane vode.

Vodna raztopina fosforjeve kisline (85 %)

Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo v 1 L bidestilirane vode dodali 2 ml (85 % H_3PO_4).

3.2.8 TEHNOLOGIJA IZDELAVE REFERENČNIH MIKROSFER IN MIKROKAPSUL

Mikrosfere in mikrokapsule smo izdelali s kapljalno metodo na enkapsulatorju Inotech IE-50 R, kot je prikazano na sliki 7. Ker mikrokapsule vsebujejo jedro, smo za izdelavo

potrebovali koncentrični šobi velikosti 500 μm in 750 μm , za izdelavo mikrosfer pa le enokanalno šobo velikosti 1500 μm .

Kot raztopino ogrodnih polimerov za izdelavo referenčnih mikrosfer (ne vsebujejo jedrne faze) smo uporabili 2 % raztopine natrijevega alginata in pektina v različnih razmerjih (P/A= 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100) ter izbrano razmerje 75/25 oz. 3/1 ob dodatku 10 % m/m različnih polnil.

Pri izdelavi MK smo kot notranjo, jedrno fazo uporabili SMES s furosemidom, kot zunanjo fazo pa 2 % raztopino pektina in alginata v razmerju 3/1 z 10 % izbranega polnila.

Zunanjo fazo smo dovajali s pomočjo 60 ml brizge, SMES pa smo pod tlakom dovajali iz 50 ml centrifugirke s konusom. Pred zagonom naprave smo na kontrolni plošči naravnali frekvenco nihanja membrane na 3000 Hz, amplitudo na 7 in relativno hitrost zunanje faze na 130. Vkllopili smo pretok zunanje faze tako, da smo najprej vkllopili kompresor, nato pa na enkapsulatorju naravnali tlak, ki je potiskal notranjo fazo z željeno hitrostjo in sicer 5 kapljic v 20 sekundah. Ko je kapljanje notranje faze postalo enakomerno, smo vkllopili pretok zunanje faze.

Neustrezne mikrokapsule/mikrosfere, ki so nastajale na začetku in na koncu procesa izdelave vsake serije, smo lovili v čašo za odpad. Izdelane mikrokapsule smo utrjevali po različnih postopkih. Pri dvostopenjskem postopku A smo neutrjene mikrokapsule 15 min utrjevali v 0,5 M raztopini CaCl_2 in jih nato še 5 min utrjevali v 1 % raztopini LV-hitosana, pri B postopku pa smo čas utrjevanja v CaCl_2 podaljšali na 20 min tako da smo 15 min utrjevali mikrokapsule v 0,5 M raztopini CaCl_2 , nato pa še 5 min v 0,5 M raztopini CaCl_2 z 1 % raztopino LV-hitosana. Pri enostopenjskem postopku pa smo mikrokapsule utrjevali samo 15 min v 0,5 M raztopini CaCl_2 in 1 % raztopini LV-hitosana. Tako utrjene mikrokapsule/mikrosfere smo filtrirali z odsesavanjem in jih nato sprali s 100 mL prečiščene vode.

3.2.9 SUŠENJE MIKROSFER IN MIKROKAPSUL



Izdelane in dobro odcejene mikrosfere/mikrokapsule smo sušili v vrtničnoslojnjem sušilniku s temperaturo vhodnega zraka 55 °C in temperaturo izhodnega zraka 53 °C (slika 26). V kolikor se mikrosfere/mikrokapsule niso predhodno posušile, je bil povprečni čas sušenja 15 min. Tako izdelane in posušene mikrosfere/mikrokapsule smo shranili v eksikator.

Slika 26: Sušenje mikrokapsul/mikrosfer v vrtničnoslojnjem sušilniku.

3.2.10 DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE

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 vsebnike v obliki kroglice s premerom 4 cm in jih položili v medij za nabrekanje (900 mL vodne raztopine HCl s pH 3, fosfatni pufer s pH 6,8). Ob ustreznih časovnih intervalih, ki so bili odvisni od medija za nabrekanje in so predstavljeni v preglednici VI, smo mrežaste vsebnike z mikrosferami odvzeli iz posode z medijem, jih odcedili, odvečno vodo narahlo popivnali s papirnato brisačko in vsebino vsebnika ponovno stehtali. Test smo izvajali v treh paralelkah. Nabrekanje smo nato izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{Enačba I: } S (\%) = \frac{m(t) - m(\text{suhe, ki so nabrekale})}{m(\text{suhe, ki so nabrekale})} * 100$$

pri čemer predstavlja S (%) nabrekanje izraženo v odstotkih, $m(t)$ maso nabreklih mikrosfer po določenem času, $m(\text{suhe, ki so nabrekale})$ pa maso posušeni mikrosfer, ki so nabrekale. Mikrosfere smo sušili v sušilniku 16 h pri 55 °C.

Erozijo smo določali sočasno s spremljanjem nabrekanja. Mikrosfere, ki smo jih ob določenih časovnih intervalih odvzeli iz medija za nabrekanje, smo najprej stehtali, nato pa smo jih sušili do konstantne mase (16 ur pri 55°C) in jih ponovno stehtali.

Erozijo smo izračunali po naslednji enačbi:

MATERIALI IN METODE

$$\text{Enačba II: } E (\%) = \frac{m(s) - m(\text{suhe, ki so nabrekale})}{m(s)}$$

pri čemer predstavlja E (%) stopnjo erozije izraženo v odstotkih, $m(\text{suhe, ki so nabrekale})$ maso suhih mikrosfer, ki so nabrekle, $m(s)$ pa maso suhih mikrosfer, ki niso nabrekale.

Preglednica VI: Časovni intervali vzorčenja v mediju s pH 3 in pH 6,8.

časovni interval:	pH 3	pH 6,8
15 min	◆	■
30 min	◆	■
45 min		■
1 h	◆	■
2 h		■
4 h	◆	■
8 h	◆	
16 h	◆	

Na sliki 27 je prikazano nabrekanje mikrosfer v dveh različnih medijih, vidna pa je tudi motnost medija s pH 6,8 zaradi popolnega razpada mikrosfer.



Slika 27: Nabrekanje mikrosfer v mrežastih kroglicah v mediju s pH 3 in pH 6,8.

3.2.11 DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE

Že med izdelavo, ko so kapljice kapljale iz enkapsulatorja, smo vzorčili 3–krat po 5 mikrokapsul in jih raztopili v 50 ml topila (etanol/prečiščena voda = 1/1). Naslednji vzorec smo vzeli po utrjevanju in sicer 3–krat 15 mikrokapsul, potem pa še po sušenju 3–krat 15 mikrokapsul. Že izdelane mikrokapsule smo zmečkali s stekleno palčko in dodali 50 ml topila ter pustili 24 ur, da se je furosemid sprostil iz mikrokapsul. Tako pripravljene vzorce smo naslednji dan prefiltrirali v vialo skozi 0,45 µm filter in izmerili koncentracijo furosemida z metodo HPLC.

Z naslednjo enačbo smo izračunali odstotek furosemida v utrjenih mikrokapsulah.

Enačba III:

$$UČ. VGR. (\%) = \frac{\text{koncentracija furosemida v utrjenih mikrokapsulah}}{\text{koncentracija furosemida v neutrjenih mikrokapsulah}} * 100$$

Določali smo tudi vpliv sušenja na učinkovitost vgradnje furosemida v mikrokapsule. V tem primeru smo odstotek vgrajenega furosemida izračunali po naslednji enačbi.

Enačba IV:

$$UČ. VGR. (\%) = \frac{\text{koncentracija furosemida v suhih mikrokapsulah}}{\text{koncentracija furosemida v neutrjenih mikrokapsulah}} * 100$$

Kjer je masa furosemida v neutrjenih mikrokapsulah vsota vseh treh odvzetih vzorcev.

3.2.12 SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL

Ugotavljali smo količino furosemida, ki se med 8-urnim testom raztapljanja sprosti iz suhih mikrokapsul. Test smo izvajali na USP aparaturi 2, z veslastim mešalom (Dissolution Tester, Van Kel) pri 50 obratih/min in 37 °C v 900 ml pufra (slika 28).



Slika 28: Sproščanje mikrokapsul z USP aparaturo 2.

Uporabili smo fosfatni pufer s pH 6,8 in raztopino HCl s pH 3. Po vklopu aparature smo počakali približno 1 uro, da so se vzpostavili konstantni pogoji za delo. Za vsako serijo mikrokapsul smo naredili tri paralelke pri vsakem pH. V mediju za sproščanje smo dispergirali 100 mikrokapsul. Ob predhodno določenih časovnih intervalih (15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) smo vzorčili 10 ml medija, ki smo ga potem prefiltrirali skozi 0,45 μm filter in določili koncentracijo sproščene furosemida iz mikrokapsul s pomočjo HPLC metode.

Odstotek sproščene učinkovine smo izračunali po naslednji enačbi.

Enačba V:

$$\% \text{ ohranjene vsebnosti ZU} = \frac{\text{koncentracija furosemida po določenem času sproščanja}}{\text{koncentracija furosemida po 8h sproščanja v pH 6,8}} * 100$$

3.2.12.1 KINETIKA SPROŠČANJA

Z namenom določitve kinetike sproščanja smo izračunali ujemanje rezultatov testa raztapljanja v mediju s pH 3 z naslednjimi enačbami: kinetiko 0. reda (*enačba VI*), kinetiko 1. reda (*enačba VII*), Higuchijevo kinetiko (*enačba VIII*), kinetiko po Korsmejer-Peppasu (*enačba IX*) ter Hixon-Crowellovo kinetiko (*enačba X*).

Enačba VI: 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 VII: kinetika 1. reda $\ln(1 - F) = -k_1t$

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

Enačba VIII: Higuchijeva kinetika $F = k_H t^{1/2}$

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

Enačba IX: kinetika po Korsmeyer-Peppasu $F = k_{KP} t^n$ oz. $\ln(F) = n \cdot \ln(t) + \ln(k_{HP})$

kjer F pomeni delež sproščene učinkovine po času t, k_{KP} Korsmeyer-Peppasovo konstanto, ki upošteva strukturne in geometrijske lastnosti farmacevtske oblike, n Korsmeyer-Peppasov difuzijski eksponent, t pa čas.

Enačba X: 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 Determinacijske koeficiente korelacije.

3.2.13 MORFOLOŠKO VREDNOTENJE MIKROSFER IN MIKROKAPSUL

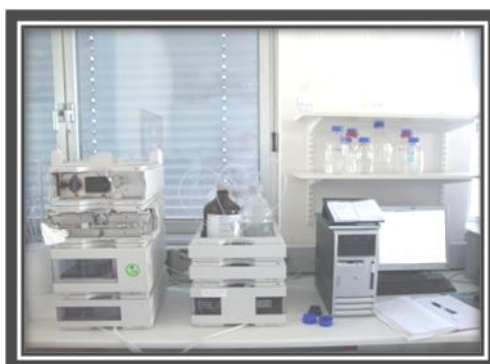
Med samo izdelavo, nabrekanjem mikrosfer, in med sproščanjem ZU iz mikrokapsul smo izdelane mikrosfere in mikrokapsule opazovali pod optičnim mikroskopom Olympus SZX 12 (slika 29). Iz dobljenih slik smo lahko primerjali velikosti, spremembo velikosti, vsebnost jedrne faze ter samo obliko in strukturo izdelanih mikrosfer in mikrokapsul.



Slika 29: Slikanje z optičnim mikroskopom Olympus SZX 12.

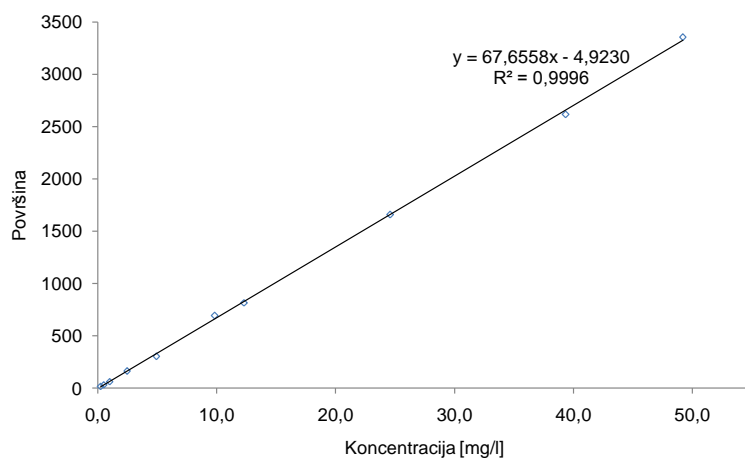
3.2.14 HPLC ANALIZA

Vsebnost furosemida smo vrednotili z gradientno HPLC analizo (sliki 30, 31), kjer smo uporabili kolono Gemini C-18 (5 μm , 150 x 2 mm; BIA Separations d.o.o., Slovenija). Kot mobilno fazo A smo uporabili 0,85 % v/v vodne raztopine fosforjeve kisline, mobilna faza B pa je bil 98 % v/v acetonitril. Pretok mobilne faze smo uravnali na 1 ml/min, temperatura kolone pa je bila 50 °C. Od 0 do 2 min je bil pretok acetonitrila uravnan na 30–36 %, do 2,5 min pa se je povišal na 46 % in je nespremenjen ostal do konca meritve. Retencijski čas furosemida je okoli 1,7 min. Vsaka meritev se je ustavila po 3 minutah. Koncentracijo furosemida smo spremljali z UV detektorjem, ki je bil nastavljen na valovno dolžino 274 nm.



Slika 30: HPLC aparatura.

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 31) 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 (48).



Slika 31: Umeritvena premica za furosemid.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultat predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo je optimizacija jedrne faze in izbor polimerov za ovojnico mikrokapsul (pektin, alginat). Koncentracija polimera v zunanji, vodni fazi, ki je osnova za nastanek polimerne ovojnice mikrokapsul, vpliva na čvrstost in poroznost ovojnice. Izkazalo se je, da 2 % polimerna raztopina pri razmerju pektina in alginata 3/1 daje najlepše oblikovane mikrokapsule. Z dodatkom CaCl_2 v SMES omejimo neželjeno mešanje jedrne in zunanje faze, saj na ta način sprožimo proces premreževanja polimera v ovojnici s Ca^{2+} ioni od znotraj navzven, tj. takoj ko obe fazi prideta v stik. Na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje vpliva tudi sestava ovojnice mikrokapsul. Z dodatkom laktoze v ustrezni količini v raztopino ogrodnega polimera smo zmanjšali iztekanje jedrne faze. Dodatek polnila je vplival tudi na sproščanje ZU iz polimernega matriksa (49).

V diplomski nalogi smo želeli dodatno optimizirati ovojnico za zagotovitev še večje učinkovitosti vgradnje SMES z modelno učinkovino v polimerno ogrodje mikrokapsul. V ta namen smo proučevali vpliv različnih razmerij med pektinom in alginatom v polimerni ovojnici mikrokapsul na nabrekanje in erozijo le-teh. Z namenom preprečevanja iztekanja jedrne faze med postopkom sušenja mikrokapsul smo v ovojnico z najprimernejšim razmerjem različnih polimerov dodali različna polnila ter tako izdelane mikrokapsule utrjevali po različnih postopkih. Za aplikacijo zunanje hitosanske obloge mikrokapsul smo uporabili hitosane z različno molekulsko maso. Proučevali smo tudi vpliv sestave ovojnice na sproščanje zdravilne učinkovine iz mikrokapsul, le-te pa smo tudi ustrezno morfološko ovrednotili.

4.1 VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER

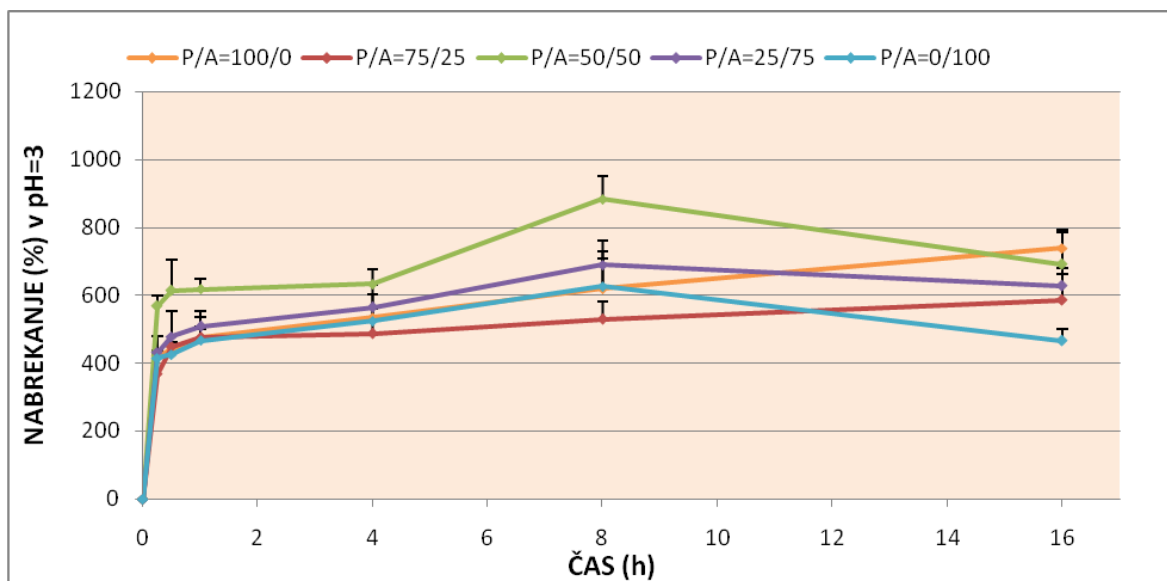
Nabrekanje je lastnost hidrogela, ki nam pove, kakšno količino hidratacijskega medija je hidrogel sposoben vezati. Količina vezanega medija je odvisna od strukture hidrogela, gostote njegovega premreženja, vpliva postopka sušenja, lastnosti mikrosfer ter od medija v katerem hidrogel nabreka. Za hidrofilne polimere je značilno, da v stiku z vodo vežejo

vodo in nabrekajo ter tvorijo gelsko plast, ki nadzoruje prodiranje vode v ogrodje in s tem raztapljanje ter sproščanje učinkovine iz ogrodja skozi pore gela (49).

Nabrekanje in erozijo referenčnih mikrosfer z ogrodjem iz pektina in alginata v različnih razmerjih (P/A=100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100) ter z ovojnico iz LV-hitosana smo proučevali v vodnem mediju s pH 3 in pH 6,8 (slike 32 in 35–37).

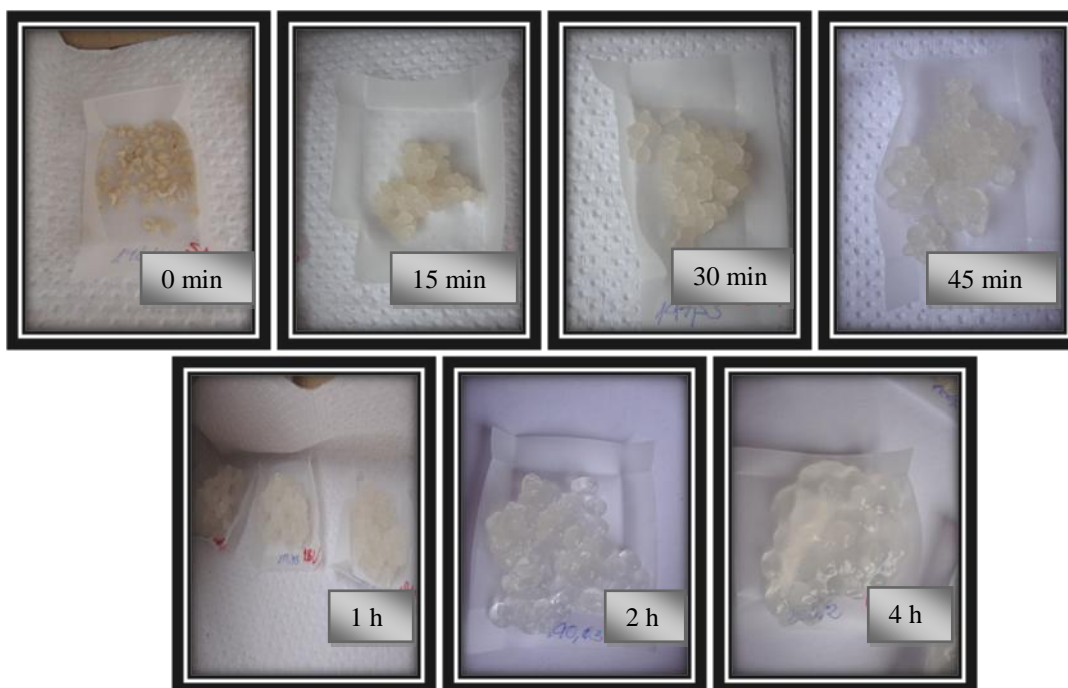
Iz slike 32 je razvidno, da v mediju s pH 3 najhitreje in najmočneje nabrekajo mikrosfere z ogrodjem pektin/alginat = 1/1, po eni uri je stopnja nabrekanja okoli 600 %, medtem ko vse ostale mikrosfere nabrekajo do stopnje 500 %. Ker je pektin stabilen pri nizkih pH vrednostih, mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina nabrekajo počasneje, a po 16 urnem nabrekanju dosežejo večjo stopnjo kot mikrosfere, ki imajo v polimerni obojnici večjo vsebnost alginata. Iz oblike krivulj je tako razvidno, da nabrekanje mikrosfer z večjo vsebnostjo alginata doseže plato oz. maksimum po 8 urah nabrekanja, medtem ko nabrekanje mikrosfer z večjim deležem pektina narašča vse do 16 ure. Iz dobljenih rezultatov bi lahko sklepali, da alginat v kislem mediju veže vodo in posledično hitreje nabreka kot pektin. Alginska kislina ima zaradi svoje sestave (ostanki guluronske (pKa 3,65) in manuronske (pKa 3,38) kisline) pri različnih vrednostih pH medija različno topnost.

V literaturi (Silva et al., 2009; Sriamornsak and Kennedy, 2008) poročajo, da ima pektin v kislem večjo stopnjo nabrekanja kot alginat, kar potrjuje tudi naše končne rezultate. Razlog naj bi bil v tem, da manjše premreženje med verigami polimera vodi v šibkejše sile med verigami in s tem k večji sposobnosti za privzem vode in posledično nabrekanje mikrosfer (50, 51).



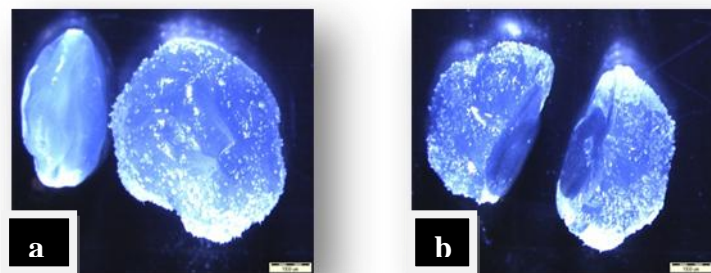
Slika 32: Vpliv razmerja pektin/alginat na nabrekanje mikrosfer v pufru s pH 3; n = 3.

Na sliki 33 so prikazane nabrekle mikrosfere v nevtralnem mediju v različnih časovnih intervalih.



Slika 33: Izgled mikrosfer po 0, 15, 30, 45 min, 1h, 2h in 4h nabrekanja v nevtralnem mediju.

Slika 34a prikazuje razliko v morfologiji mikrosfer, ki so nabrekale v kislem (levo) ali nevtralnem (desno) mediju. Z optičnim mikroskopom smo slikali tudi prerez nabrekle mikrosfere v nevtralnem mediju (slika 34b), kjer se dobro loči srednji del gelske plasti od zunanje, ki je bolj hidratirana in nabrekla.



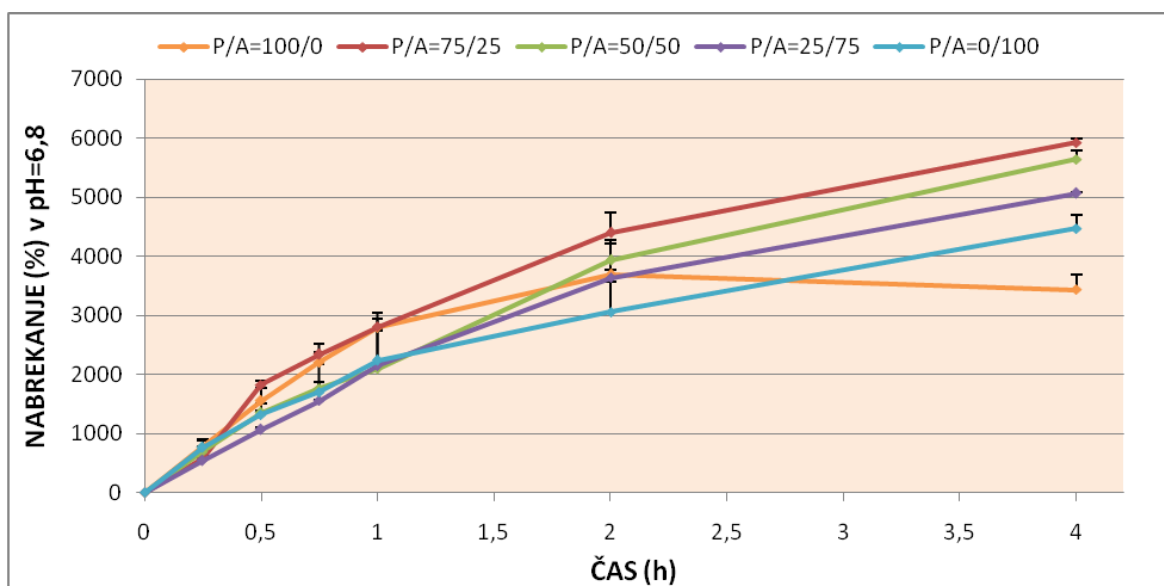
Slika 34: a) Izgled mikrosfere po 8 urah nabrekanja v kislem (levo) oz. nevtralnem (desno) mediju, ter b) prečni prerez mikrosfere po 8 urah nabrekanja v nevtralnem mediju.

V nevtralnem mediju s pH 6,8 vse mikrosfere nabrekajo hitreje in močneje kot v kislem pH, kar prikazuje slika 35. Polimera pektin in alginat sta anionska polimera in zadržujeta sproščanje samo v kislem mediju. Nabrekanje Ca-alginata in Ca-pektinata v nevtralnem mediju je posledica izmenjave Ca^{2+} ionov z Na^+ ioni iz medija za nabrekanje. Ko pride do izmenjave, se Na^+ ioni vežejo na negativno nabite COO^- skupine manuronske in galakturonske kisline. Posledično se poveča elektrostatski odboj med negativno nabitimi COO^- skupinami, kar omogoča razrahljanje strukture, prodiranje vode v ogrodje in posledično nabrekanje le-tega. Izmenjani Ca^{2+} ioni se oborijo v obliki netopnega Ca-fosfata. V kasnejši fazi nabrekanja povzroči difuzija Ca^{2+} ionov iz poligalakturonskih odsekov razrahljanje t.i. strukture »škatle za jajca«, kar olajša dodatno prodiranje medija v ogrodje mikrosfer. Ko je doseženo ravnotežje, se začne močno hidratirana struktura razpletati, kar se odraža v zmanjšanju mase mikrosfere in končno v popolnem razpadu le-teh (49).

Mikrosfere z večjo vsebnostjo alginata nabrekajo počasneje kot tiste z večjo vsebnostjo pektina, kar je vidno predvsem v začetni fazi do ~ 2 ure. Po 4 urah nabrekanja v mediju s pH 6,8 pride do spremembe le pri mikrosferah, ki v ovojnici vsebujejo 100 % pektina, saj se stopnja nabrekanja po 2 urah nabrekanja bistveno ne spremeni. Po dobljenih rezultatih

najmočnejše nabrekajo mikrosfere z razmerjem polimerov pektin/alginat = 75/25, saj dosežejo 6000 % stopnjo nabrekanja.

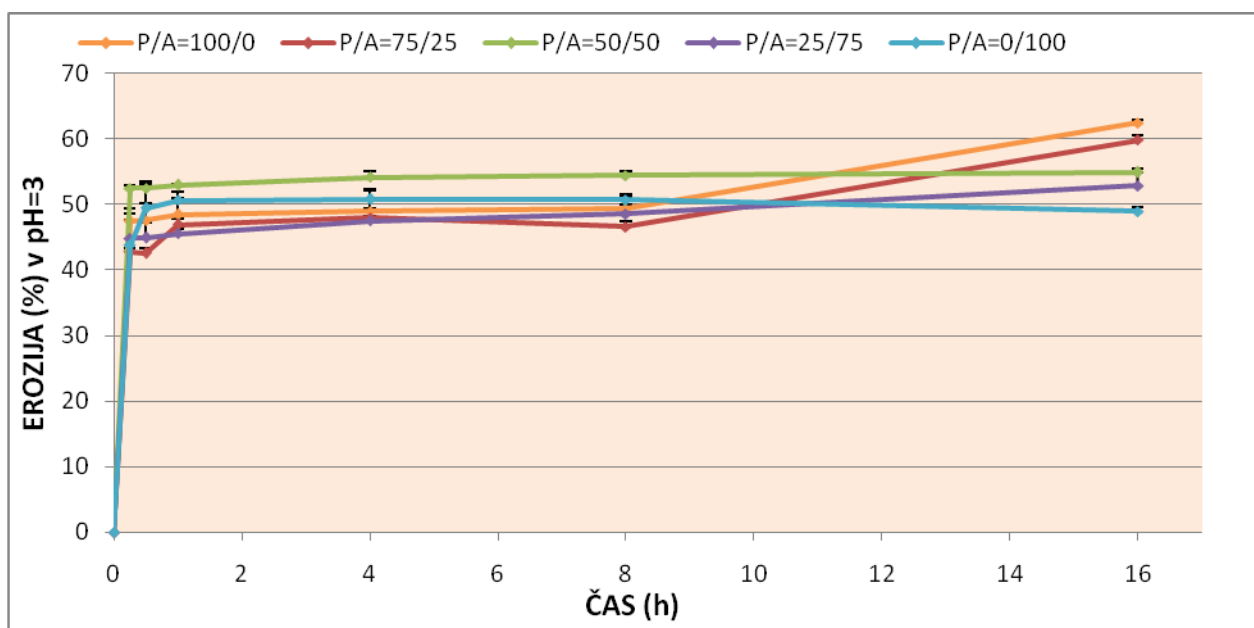
V literaturi (Pillay and Fassihi, 1999) navajajo, da je pektin stabilen v vodnih raztopinah s pH ~ 4, pri višjem pH pa pride do razgradnje sfer kot posledica erozije matriksa. Mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina pri pH 1,5 nabrekajo hitreje, kot mikrosfere z večjo vsebnostjo alginata, v mediju s pH 4 in pH 6 pa že pride do sprememb, saj močnejše nabrekajo mikrosfere, ki vsebujejo pektin in alginat v določenem razmerju (52).



Slika 35: Vpliv razmerja pektin/alginat na nabrekanje mikrosfer v mediju pH 6,8; n = 3.

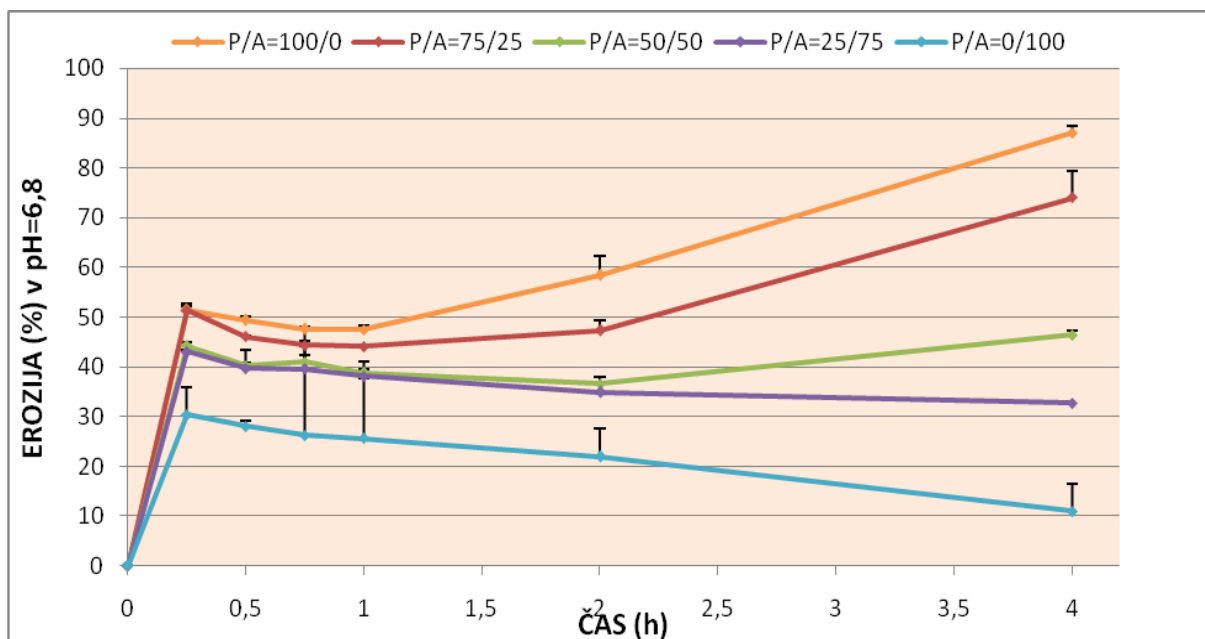
Erozija je lastnost hidrogelov, ki nam pove, kakšen delež matriksa je erodiral med nabrekanjem hidrogela. Prav tako kot nabrekanje je tudi erozija odvisna od strukture hidrogela, gostote premreženja, vpliva sušenja ter vpliva medija za nabrekanje. Polimerna struktura ne more nabrekati v nedogled; ko se zaradi hidratacije dovolj razrahlja, začne erodirati. Po literaturnih podatkih je pektin stabilen v kislem mediju (pH ~ 3,4), pri višjih pH pa poteka erozijsko pogojena razgradnja mikrosfer (52). Iz slike 36 je razvidno, da v pH 3 prvih 10 ur najhitreje in najbolj erodirajo mikrosfere z ovojnico iz pektina in alginata v razmerju 1/1, ki so v kislem pH tudi najmočnejše nabrekale. V stopnji erozije preostalih mikrosfer ni bistvenih razlik. Iz oblike krivulj pa lahko opazimo, da mikrosfere z večjim deležem alginata dosežejo plato že po 1 uri, medtem ko je pri mikrosferah, ki vsebujejo večjo vsebnost pektina, opazen prevoj krivulje pri 8 urah. Po 16 urah inkubiranja mikrosfer

v kislem mediju pa vrednosti stopnje erozije padajo z naraščanjem odstotka alginata v polimerni ovojnici mikrosfer.



Slika 36: Vpliv razmerja pektin/alginat na erozijo ogrodja mikrosfer v mediju s pH 3; n = 3.

V nevtralnem mediju s pH 6,8 (slika 37) je erozija mikrosfer v začetni fazi nabrekanja manjša kot v kislem pH. To lahko razložimo s tem, da se v kislem pH raztaplja tudi hitosanska obloga mikrosfer, kar doprinese k večji stopnji erozije. Pri pH nad 6,5 je hitosanska obloga netopna, kar omejuje izplavljanje vodotopnih komponent mikrosfer v zunanji medij. Po 1 uri pa začne erozija mikrosfer z večjo vsebnostjo pektina naraščati. Večji obseg erozije v mediju s pH 6,8 je posledica ionske izmenjave Ca^{2+} ionov z Na^+ ioni iz fosfatnega pufra ter posledičnega razrahljanja in razpada polimerne rešetke. Najbolj erodirajo mikrosfere iz polimernega ogrodja pektin/alginat = 100/0, nato pa sledijo ostale mikrosfere z manjšim deležom pektina. Erozijska mikrosfer v nevtralnem mediju s pH 6,8 je primerljiva z nabrekanjem mikrosfer v enakem mediju.



Slika 37: Vpliv razmerja pektin/alginat na erozijo ogrodja mikrosfer v mediju s pH 6,8; n = 3.

Na osnovi dobljenih rezultatov nabrekanja in erozije smo se glede na željen profil sproščanja učinkovine iz mikrokapsul odločili za razmerje pektin/alginat = 75/25 oziroma 3/1. V kislem mediju mikrosfere s to sestavo nabrekajo počasneje, kar pomeni da se tvori majhna gelska plast, v nevtralnem mediju pa ravno obratno.

4.2 VPLIV DODATKA RAZLIČNIH POLNIL NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER

V polimerno raztopino pektina in alginata v razmerju 3/1 smo ločeno dodali 10 % laktoze, 10 % manitola, 10 % sorbitola in 10 % trehaloze ter ugotavljali, kako dodatek teh pomožnih snovi vpliva na nabrekanje in erozijo mikrosfer v mediju s pH 3 in pH 6,8. Dobljeni rezultati so prikazani na slikah 38, 40, 42 in 43.

Iz slike 38 je razvidno, da mikrosfere, katerih ogrodje vsebuje polnila, v mediju s pH 3 nabrekajo bistveno močnejše kot mikrosfere, ki ne vsebujejo nobenega polnila. Dobljeni rezultati so v skladu z literaturnimi podatki, po katerih imajo lahko dodane majhne hidrofilne molekule, kot so sladkorji, vlogo tvorca por. Med nabrekanjem mikrosfer z dodanimi vodotopnimi polnili zaradi raztapljanja le-teh nastajajo pore v polimernem

ogrodju. Nastale pore olajšajo privzem vodnega medija v ogrodje mikrosfer in s tem nabrekanje le-teh. Mikrosfere z dodano laktozo nabrekajo bistveno manj od mikrosfer z ostalimi polnili. Ker je nasičena topnost (merilo topnosti snovi) laktoze v vodi primerljiva z nasičeno topnostjo manitola (preglednica VII), bi manjše nabrekanje lahko bilo posledica počasnejšega raztapljanja laktoze v primerjavi z ostalimi sladkorji, saj smo kot polnilo uporabili laktozo monohidrat. Za hidratne oblike je značilno, da vežejo vodo v manjšem obsegu kot brezvodne oblike. Posledica počasnejšega raztapljanja laktoze je počasnejši nastanek por v polimernem ogrodju in posledično počasnejše prodiranje vodnega medija v ogrodje mikrosfer. To hipotezo potrjuje tudi oblika krivulje iz katere je razvidno, da mikrosfere po 16 urah nabrekanja dosežejo enako stopnjo nabrekanja kot ostale mikrosfere, ki so plato dosegle že po 4 urah nabrekanja v kislem mediju.

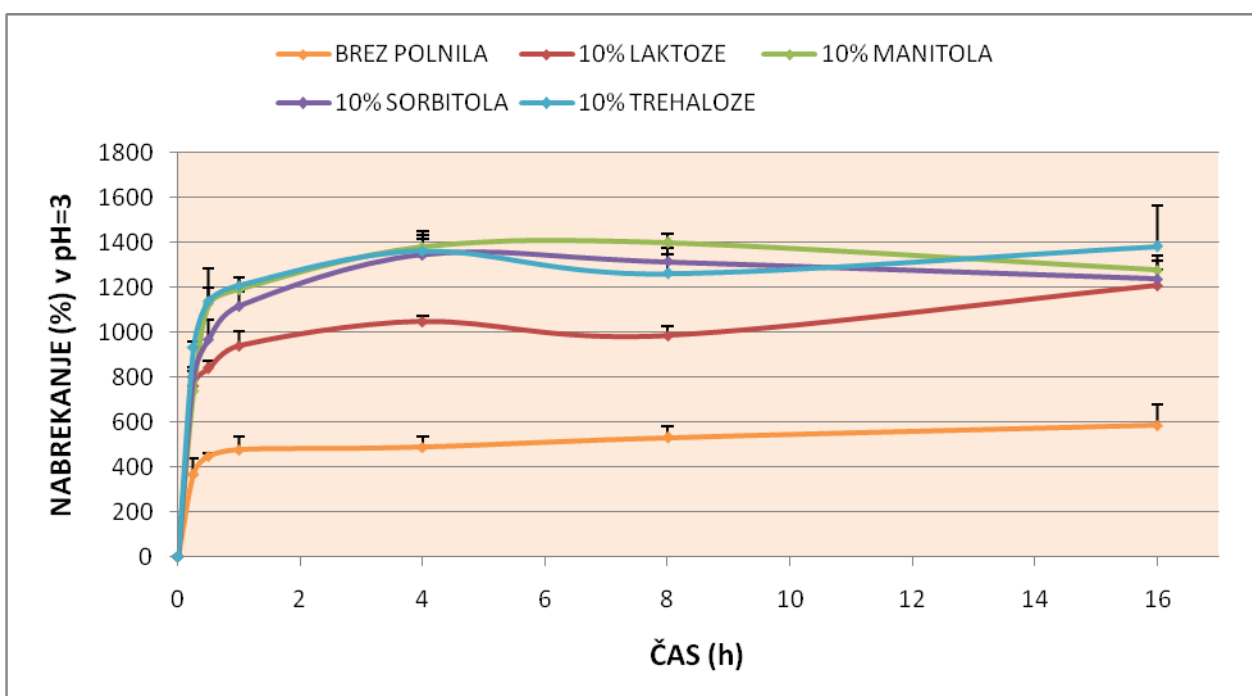
Glede na literaturne podatke ima trehaloza večjo nasičeno topnost kot manitol, vendar mikrosfere, ki vsebujejo trehalozo nabrekajo enako hitro kot tiste, ki vsebujejo manitol. Razlog bi lahko bil v tem, da je po literaturnih podatkih trehaloza stabilna pri nizkih pH vrednostih (22). Mikrosfere, ki vsebujejo 10 % manitola oz. 10 % sorbitola izkazujejo enake profile nabrekanja v kislem. Kljub temu da sta oba poliola in sta kemijsko izomera, kar pomeni da se razlikujeta le v usmerjenosti ene hidroksilne skupine, imata bistveno različno nasičeno topnost, ki pa po naših podatkih ne vpliva na nabrekanje mikrosfer. Po literaturnih podatkih je manitol bistveno manj higroskopen kot sorbitol (22).

Preglednica VII: Nasičena topnost in molekulska masa polnil (21, 22).

Polnila (brezvodne oblike):	nasičena topnost: (g v 100 ml vode pri 20 °C)	molekulska masa: (g/mol)
laktoza	21,6	342,30
manitol	18,2	182,17
sorbitol	200	182,17
trehaloza	68,9	378,33

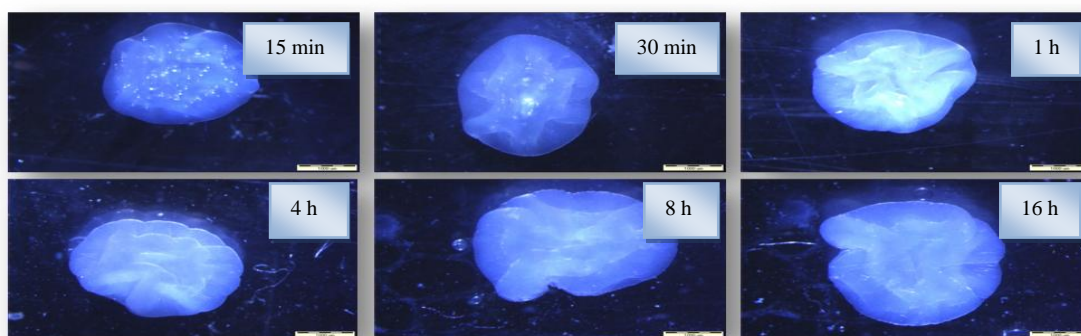
Hitrost nabrekanja je bila pri vseh testiranih mikrosferah v kislem mediju najbolj intenzivna znotraj prve ure. Podoben pojav sta pri delcih iz hitosana in pektina opazila tudi Chang in Lin (53). V kislem mediju se raztaplja tudi hitosanska obloga, kar v začetni fazi poveča stopnjo nabrekanja.

Hidrofilna polimera se v kislem pretvorita v netopno pektinsko/alginsko kislino, ki nabreka. Med skupinami hitosana pa pride do odbojnih sil med aaminskimi skupinami, do kompleksnih interakcij med poliuronati in hitosanom, nastanka vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij. Te povezave skupaj z elastičnostjo samega polimernega ogrodja verjetno omejujejo nadaljnje nabrekanje mikrokapsul (53).



Slika 38: Vpliv dodanih polnil na nabrekanje mikrosfer z ogrodjem iz pektina in alginata v razmerju 3/1 v mediju s pH 3; n = 3.

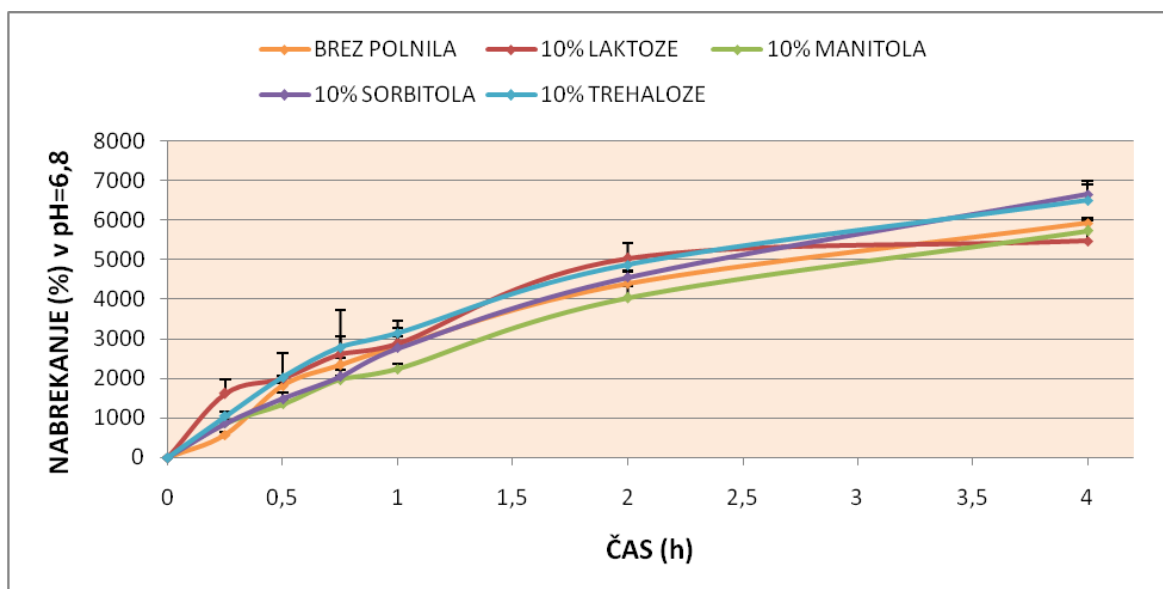
Slika 39 prikazuje spremembo velikosti mikrosfere z dodatkom 10 % trehaloze med nabrekanjem v kislem mediju.



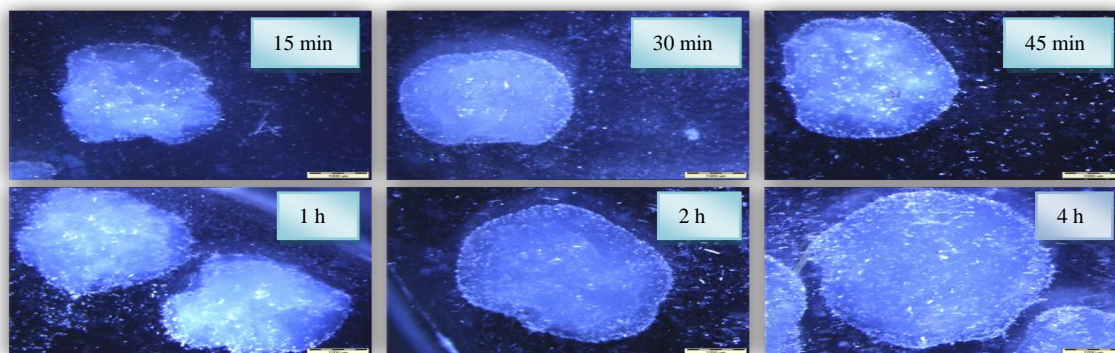
Slika 39: Mikrosfera (10 % trehaloze) med nabrekanjem v pH 3, slikana z elektronskim mikroskopom v določenih časovnih točkah.

V fosfatnem pufru s pH 6,8 so profili nabrekanja primerljivi. Med Na^+ ioni, ki se nahajajo v pufru, in Ca^{2+} ioni iz Ca-alginata in Ca-pektinata pride do izmenjave, kar poveča nabrekanje ogrodja. Profili nabrekanja v nevtralnem mediju so prikazani na sliki 40.

Med nabrekanjem v nevtralnem mediju se bistveno poveča tudi velikost mikrosfer, kar je razvidno iz slike 41.



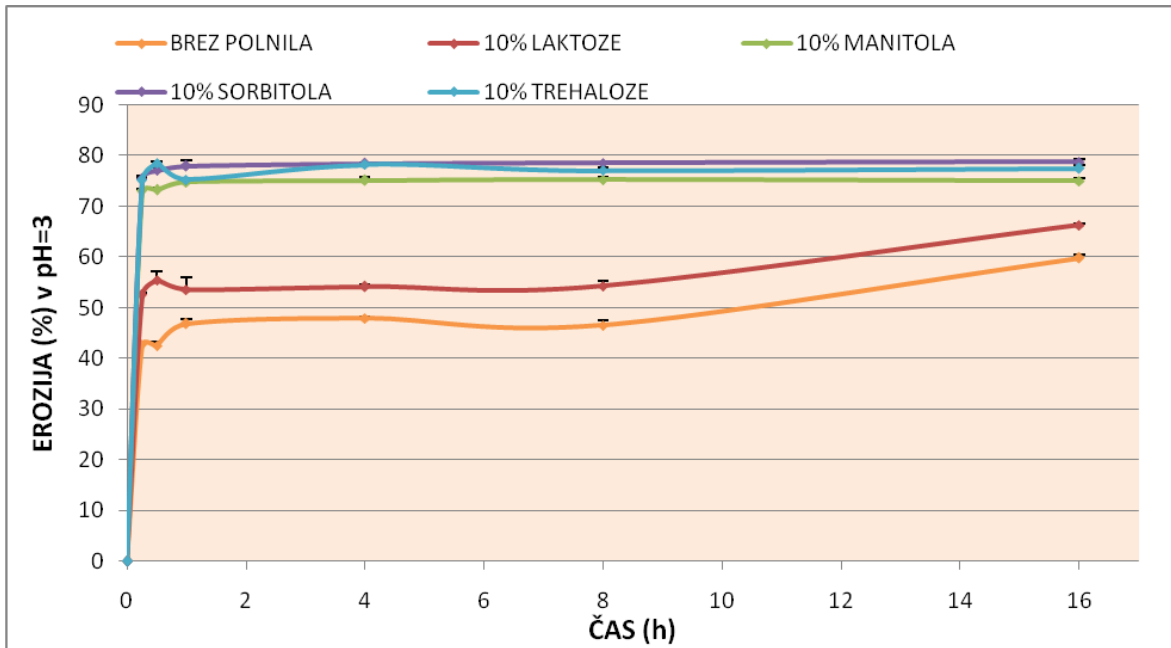
Slika 40: Vpliv dodanih polnil na nabrekanje mikrosfer z ogrodjem iz pektina in alginata v razmerju 3/1 v mediju s pH 6,8; n = 3.



Slika 41: Mikrosfera (10 % trehaloze) med nabrekanjem v pH 6,8, slikana z elektronskim mikroskopom v določenih časovnih točkah.

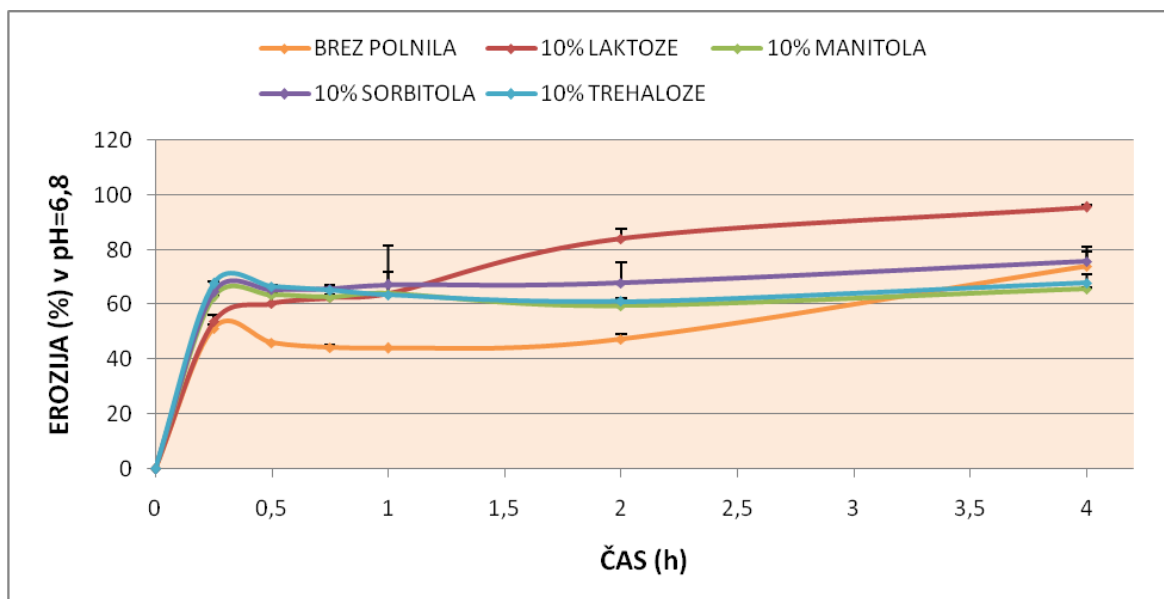
Sočasno z vplivom dodanih polnil na nabrekanje ogrodja mikrosfer smo proučevali tudi njihov vpliv na erozijo le-tega (sliki 42, 43).

Z ozirom na to da so uporabljena polnila dobro vodotopna, smo pričakovali, da bo erozija mikrosfer s polnili bistveno večja kot erozija mikrosfer brez polnil. V kislem najmanj erodira ovojnica brez polnil in sicer do 60 % po 16 urah, temu sledijo mikrosfere z dodatkom 10 % laktoze (do 65 %), najbolj pa erodirajo mikrosfere z 10 % manitola, 10 % sorbitola in z 10 % trehaloze in sicer dosežejo 80 % stopnjo erodiranja. Iz oblike krivulje na sliki 42 je razvidno tudi, da imajo dodana polnila večji vpliv na erozijo mikrosfer v prvi uri inkubiranja v kislem mediju, nato pa se njihov vpliv zmanjša.



Slika 42: Vpliv dodanih polnil na erozijo mikrosfer z ogrodjem iz pektina in alginata v razmerju 3/1 v mediju s pH 3; n = 3.

V nevtralnem mediju v času pol ure najmočnejše erodirajo mikrosfere z 10 % manitola, 10 % sorbitola in 10 % trehaloze, kot prikazuje slika 43. Po 1 uri erozije mikrosfer v mediju s pH 6,8 je stopnja erozije vseh mikrosfer, ki vsebujejo polnila, enaka (~ 70 %). Že po 2 urah pa mikrosfere z 10 % laktoze dosežejo skoraj 90 % erozijo. Najmanj pa erodirajo mikrosfere brez polnila, ki po 2 urah dosežejo 50 % stopnjo erozije. Mikrosfere, ki vsebujejo 10 % manitola, 10 % sorbitola in 10 % trehaloze, imajo tako v kislem mediju kot v nevtralnem mediju podoben profil erozije. Do 1 ure so vsi profili mikrokapsul, ki vsebujejo polnila, primerljivi, potem pa začne stopnja erozije mikrokapsul, ki v ogrodju vsebujejo 10 % laktoze naraščati.



Slika 43: Vpliv dodanih polnil na erozijo mikrosfer z ogrodjem iz pektina in alginata v razmerju 3/1 v mediju s pH 6,8; n = 3.

4.3 VPLIV POSTOPKA UTRJEVANJA MIKROKAPSUL NA UČINKOVITOST VGRADNJE SMES S FUROSEMIDOM V POLIMERNO OGRODJE MIKROKAPSUL

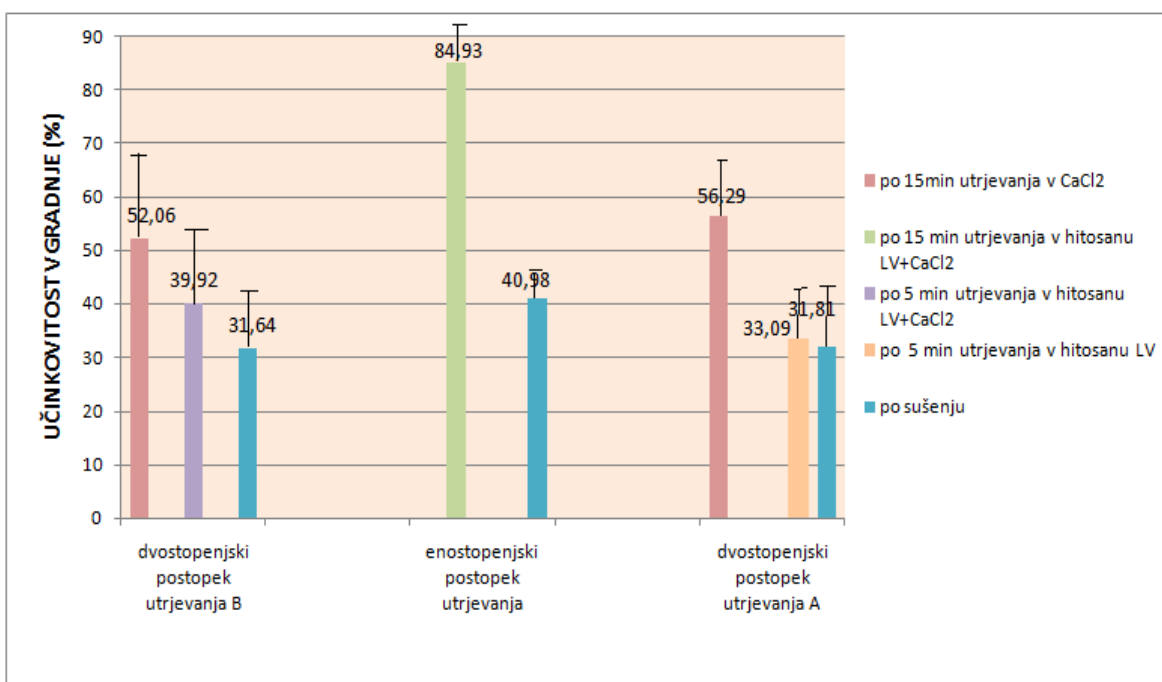
Na osnovi predhodnih rezultatov smo kot najprimernejše polimerno ogrodje za mikrokapsuliranje SMES s furosemidom izbrali raztopino pektina in alginata v razmerju 3/1, kot dodatno zunanjo oblogo za mikrokapsule pa LV–hitosan.

Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje (brez dodanih polnil) mikrokapsul smo določali med posameznimi fazami postopka utrjevanja mikrokapsul ter na koncu izdelave le-teh. V SMES jedro smo dodali CaCl_2 , ki povzroči premreženje ovojnice mikrokapsul od znotraj navzven, kar omeji mešanje jedrne faze z ovojnico, in s tem se zmanjša obseg iztekanja jedra (54).

Z različnimi načini utrjevanja smo želeli poiskati optimalni postopek utrjevanja, ki bi zagotavljal visoko učinkovitost vgradnje jedrne faze. Pri dvostopenjskem postopku utrjevanja mikrokapsul smo le-te najprej 15 min inkubirali v 0,5 M CaCl_2 . Utrjene mikrokapsule smo sprali ter jih z namenom nastanka dodatne hitosanske ovojnice za 5 min

prenesli bodisi v 1 % raztopino LV-hitosana (A), bodisi v 1 % raztopino LV-hitosana, ki je vsebovala tudi 0,5 M CaCl_2 (B). Pri enostopenjskem postopku utrjevanja pa smo mikrokapsule 15 min inkubirali v 1 % raztopini LV-hitosana, ki je vsebovala tudi 0,5 M CaCl_2 .

Iz slike 44 je razvidno, da način utrjevanja mikrokapsul močno vpliva na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul. Med utrjevanjem in sušenjem se učinkovitost vgradnje zmanjšuje, saj pride do iztekanja SMES s furosemidom iz samega matriksa.



Slika 44: Vpliv različnih postopkov utrjevanja mikrokapsul na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul; $n = 3$.

Kot je razvidno iz slike 44, je po prvem dvostopenjskem postopku A odstotek vgradnje SMES s furosemidom le ~ 32 %. Ker smo želeli povečati učinkovitost vgradnje, smo podaljšali čas utrjevanja mikrokapsul v CaCl_2 na 20 min (dvostopenjski postopek B). Učinkovitost vgradnje se v tem primeru ni bistveno izboljšala, zato sklepamo, da se med daljšim inkubiranjem v raztopini premreževala bistveno poveča iztekanje SMES s furosemidom iz matriksa. Sklepamo, da za čvrstost ovojnice potrebujemo nek optimalen čas utrjevanja. Najvišjo učinkovitost vgradnje smo dosegli z enostopenjskim postopkom

utrjevanja mikrokapsul, pri katerem smo mikrokapsule 15 min inkubirali v 1 % raztopini LV-hitosana z 0,5 M CaCl_2 . Učinkovitost vgradnje je bila v tem primeru ~ 85 %.

Tudi v tem primeru je med procesom sušenja mikrokapsul prišlo do obsežnega iztekanja jedrne faze in posledično do močnega padca učinkovitosti vgradnje (le-ta je bila po sušenju le še ~ 41 %).

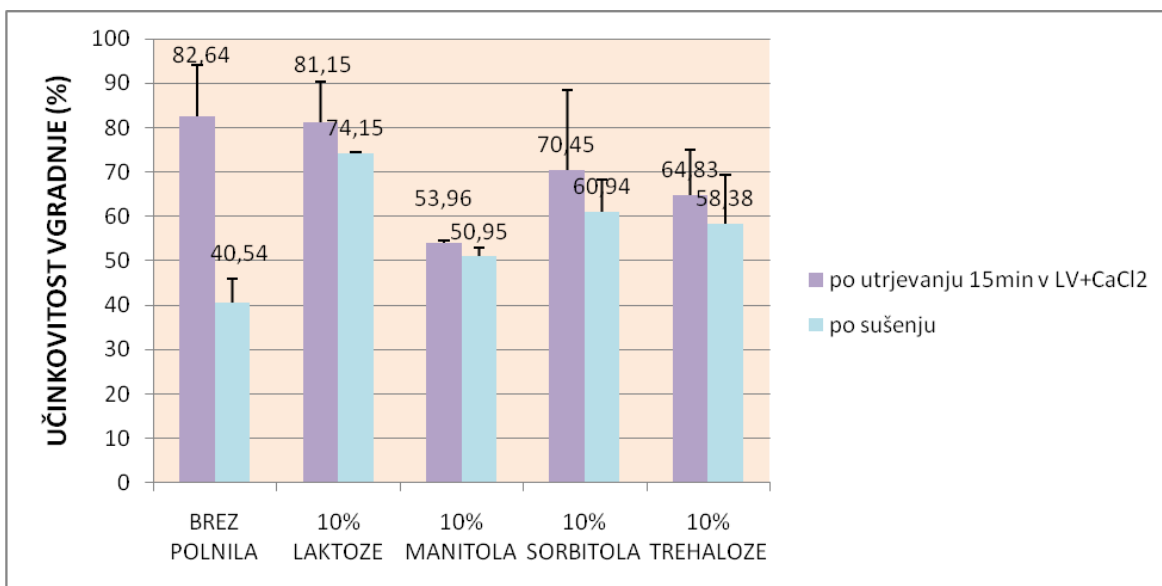
Pillay in sodelavci (1999) poročajo o tem, da je bila učinkovitost vgradnje šibko kisle učinkovine v matriks večja, če je bil pH raztopine za premreževanje nižji. To pa se je v našem primeru zgodilo, ko smo 0,5 M raztopini CaCl_2 dodali LV-hitosan, ki je raztopljen v 1 % očetni kislini. Povečanje odstotka vgradnje je posledica slabe topnosti učinkovine (furosemida) v kislem mediju, ker ima pKa 3,9 (52).

4.4 VPLIV DODANIH POLNIL IN HITOSANSKE OBLOGE NA UČINKOVITOST VGRADNJE SMES S FUROSEMIDOM V POLIMERNO OGRODJE MIKROKAPSUL

Predpostavili smo, da lahko iztekanje jedrne faze med procesom sušenja mikrokapsul omejimo na dva načina in sicer z dodatkom polnil v polimerno ogrodje mikrokapsul ter z nastankom dodatne hitosanske ovojnice na površini mikrokapsul.

V diplomskem delu smo želeli proučiti, katero polnilo zagotavlja izdelavo mikrokapsul z največjo učinkovitostjo vgradnje. Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom je močno odvisna od sestave ovojnice; to je zlasti opazno med procesom sušenja mikrokapsul, ko voda izhlapeva in se v ogrodju tvorijo pore, skozi katere lahko izteka jedrna faza. Predpostavili 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 omejila iztekanje jedra iz mikrokapsul.

V ta namen smo v 2 % vodno raztopino ogrodnega polimera dodali 10 % laktoze, manitola, sorbitola ali trehaloze. Vpliv dodatka polnil na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul, obloženo z LV-hitosanom, je prikazan na sliki 45.



Slika 45: Vpliv dodatka različnih polnil na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul iz pektina in alginata v razmerju 3/1; n = 3.

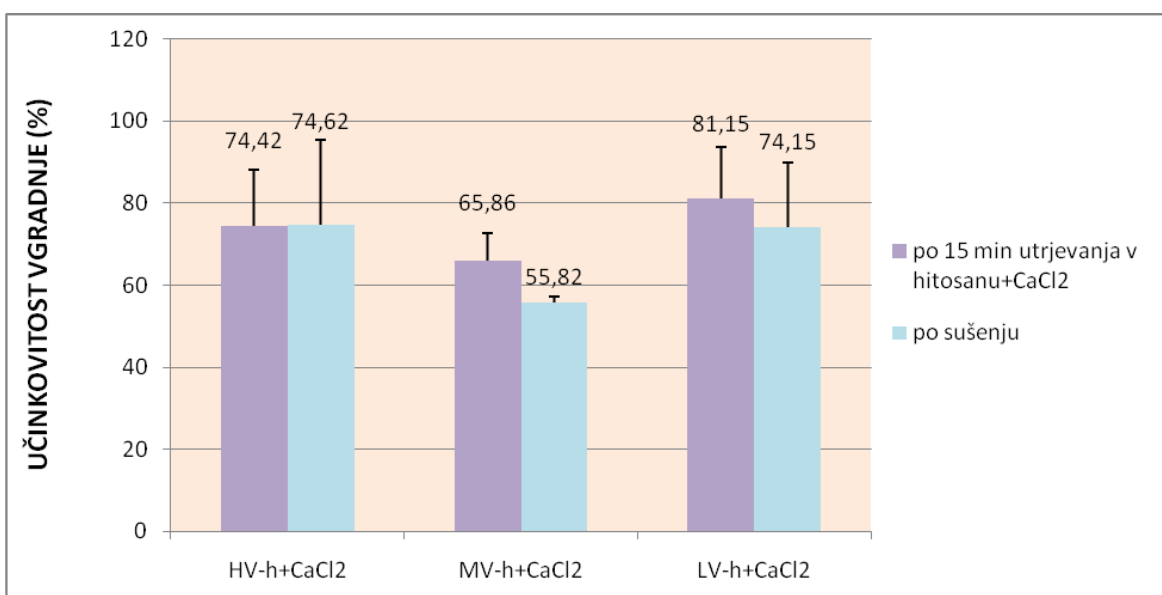
V skladu z našimi pričakovanji dodatek polnil bistveno vpliva na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul, in sicer zlasti v fazi sušenja. Medtem ko se je pri mikrokapsulah z ogrodjem brez dodanih polnil učinkovitost vgradnje med sušenjem zmanjšala iz 82,64 % na 40,54 %, je v prisotnosti 10 % laktoze le-ta tudi po sušenju še vedno 74,15 %. Predvidevamo, da se polnila med sušenjem mikrokapsul oborijo v prostih prostorih polimernega ogrodja in tako zmanjšajo njegovo poroznost ter s tem zmanjšajo iztekanje SMES s furosemidom. Prav tako polnila interagirajo z vodnimi molekulami in zmanjšajo njihovo mobilnost. Posledično se zato upočasnijo mešanje med vodno fazo ovojnice in lipidnim jedrom, kar omogoča večjo učinkovitost vgradnje.

Pozorni moramo biti, da dodamo ustrezno koncentracijo polnila, saj je v primeru prevelike ali premajhne količine učinkovitost vgradnje nižja (48).

Molekule polnila in polimera se povežejo med sabo in tvorijo bolj ali manj urejeno strukturo. Povezane so s šibkimi orientacijskimi vezmi, ne pa z močnimi sekundarnimi vezmi, saj ne vplivajo na mehanske lastnosti polimera (55). Majhne koncentracije polnil (10 %) se vrinejo v prazne prostore v alginatni in pektinski verigi. Kot najboljše polnilo se je izkazala laktoza, ki je po kemijski sestavi disaharid, sledil je sorbitol, trehaloza in manitol.

V nadaljevanju smo proučevali vpliv vrste hitosana v zunanji oblogi mikrokapsul na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule. Mikrokapsule smo inkubirali v raztopinah hitosana z različno viskoznostjo, in sicer smo uporabili nizko viskozen hitosan (*angl. low viscosity – LV*), srednje viskozen hitosan (*angl. middle viscosity – MV*) in visoko viskozen hitosan (*angl. high viscosity – HV*). Vpliv različnih raztopin hitosana na čvrstost nastale obloge in učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule, ki so se razlikovale po viskoznosti, pred in po sušenju mikrokapsul s hitosansko oblogo je prikazan na sliki 46.

Iz slike 46 je razvidno da najvišjo učinkovitost vgradnje zagotavlja aplikacija obloge iz nizko viskoznega LV-hitosana, ki smo ga pred tem uporabili tudi za oblaganje mikrosfer z različnimi razmerji pektina in alginata. Ker je hitosan kationski polimer, tvori z anionskima polimeroma ionske vezi, kar še poveča čvrstost strukture ovojnice. Tudi sama izdelava mikrokapsul je lažja in hitrejša z uporabo hitosana nizke viskoznosti. MV- in HV- hitosana se namreč počasi raztapljata v 1 % očetni kislini, poleg tega pa je nastala raztopina tudi zelo viskozna, kar otežuje spiranje mikrokapsul in tudi njihovo sušenje.



Slika 46: Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul pri oblaganju mikrokapsul z raztopino hitosana z različno viskoznostjo; n = 3.

4.5 VPLIV DODATKA POLNIL IN HITOSANSKE OBLOGE NA SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL

Sproščanje zdravilne učinkovine iz hidrofilnega polimernega ogrodja je odvisno od različnih dejavnikov, ki so prikazani v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Vpliv različnih dejavnikov na sproščanje učinkovine iz hidrofilnega polimernega ogrodja (56, 57).

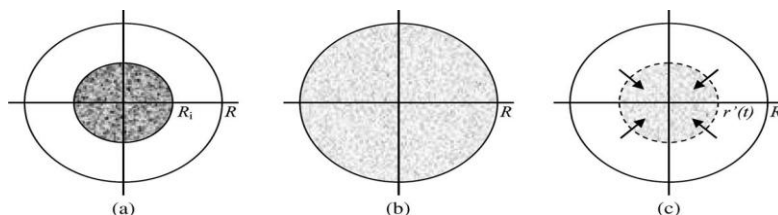
Polimerno ogrodje	medij za sproščanje	lastnosti učinkovine
sestava polimera (molekulska masa)	pH	topnost
struktura polimera (volumen)	temperatura	stabilnost
nabrekanje polimera	ionska moč	naboj
erozija polimera	prisotnost encimov	interakcije s polimerom

Ločimo različne načine sproščanja učinkovine iz polimernega ogrodja, na katere vplivajo predvsem zgoraj omenjene lastnosti oz. pogoji:

- *sproščanje nadzorovano z difuzijo (rezervoarni in ogrodni sistem)*

Rezervoarni sistem predstavlja filmski tip mikrokapsul. V jedru mikrokapsul je lahko učinkovina v raztopljeni ali v dispergirani obliki. Ogrodni tip opisuje primer sproščanja učinkovine iz ogrodnega tipa mikrokapsul, kjer je zdravilna učinkovina razporejena po celotnem volumnu.

V našem primeru se zdravilna učinkovina nahaja raztopljena v lipidnem jedru, kot je prikazano na sliki 47c.



Slika 47: Shematični prikaz rezervoarnega in ogrodnega tipa mikrosfer (58).

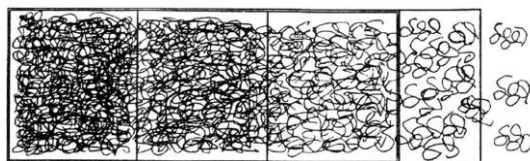
Fickov zakon opisuje proces sproščanja učinkovine, ki je nadzorovano z difuzijo v primeru, ko je relaksacijski čas polimera mnogo večji od difuzijskega časa učinkovine. V primeru sproščanja po ne-Fickovem modelu pa sta časa primerljiva.

Peppas et al. so razvili model, ki opisuje difuzijsko nadzorovano sproščanje učinkovine (upoštevamo le do 60 % končno sproščene učinkovine) ter upošteva tudi strukturno in geometrijsko obliko farmacevtske oblike.

○ *sproščanje nadzorovano z nabrekanjem*

Sproščanje nadzorovano z nabrekanjem je značilno predvsem za hidrofilne polimere, ki v stiku z vodo nabrekajo, pri tem pa poteka difuzija učinkovine skozi pore polimernega ogrodja. V tem primeru je sproščanje učinkovine hitrejše kot nabrekanje polimera. Nabrekanje polimera poteka toliko časa, dokler ni doseženo termodinamsko ravnovesje. V primeru da je sproščanje nadzorovano z raztapljanjem polimera (slika 48), sproščanje opisujemo z ničto kinetiko, v primeru sočasne difuzije učinkovine in raztapljanja polimera pa je potrebna prilagoditev formule.

Sproščanja nadzorovano z nabrekanjem najbolj opiše Korsmeyer-Peppasov model, ki upošteva geometrijo farmacevtske oblike ter samo nabrekanje polimera. Sproščanje odvisno od difuzije opisuje Fickov model, sproščanje ki pa je odvisno od relaksacijskega časa polimera, pa »Case II transport«.

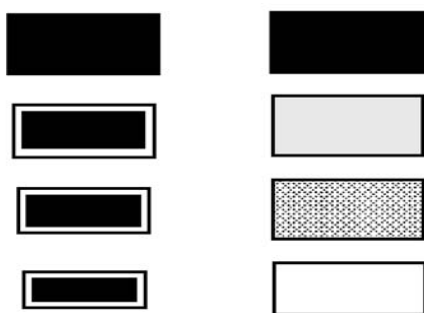


Slika 48: Shematični prikaz raztapljanja polimera (58).

○ *sproščanje nadzorovano z erozijo*

Ločimo dva tipa erozije, kot prikazuje slika 49, in sicer: erozijo ogrodja na površini in erozijo celotnega ogrodja t.i. »bulk erozijo«. Pri eroziji ogrodja na površini, se premer mikrosfer počasi zmanjšuje, pri eroziji, ki poteka skozi celotno ogrodje pa premer mikrosfere ostane nespremenjen, voda pa erodira v sredico farmacevtske oblike (58).

Erozijsko nadzorovano sproščanje opisujemo s kinetiko ničtega reda in kinetiko psevdoprvega reda. Pomembna pa je tudi sama struktura in geometrija farmacevtske oblike, iz katere se sprošča zdravilna učinkovina. Različne geometrijske oblike imajo različne koeficiente, ki jih uporabimo za izračun (56, 57, 58).



Slika 49: Shematični prikaz ogrodnega tipa erozije in erozije ogrodja v notranjosti (58).

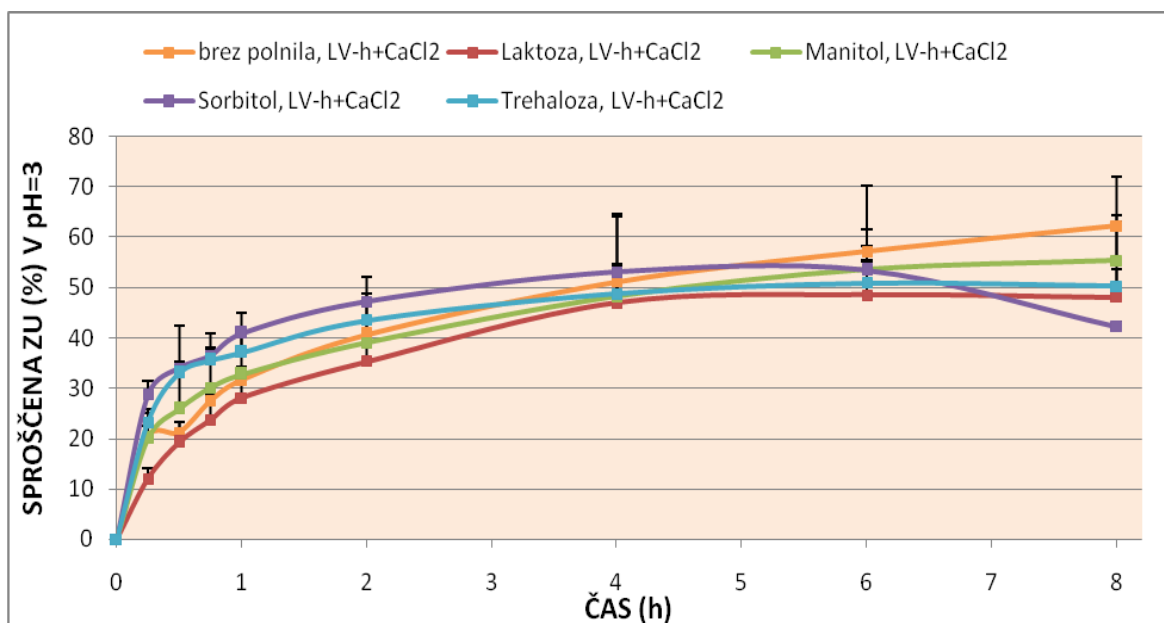
Proučevali smo vpliv polnil (laktoze, manitola, sorbitola, trehaloze) na sproščanje učinkovine iz mikrokapsul v mediju s pH 3 in pH 6,8; rezultate prikazujeta sliki 50 in 51.

V literaturi navajajo, da se učinkovina najhitreje sprošča iz mikrokapsul z večjo vsebnostjo pektina. Večja vsebnost pektina je povezana z nastankom tanjše gelske plasti na površini mikrokapsul med inkubiranjem le-teh v mediju za sproščanje, saj pektin v prvih urah sproščanja manj nabreka in s tem omogoča hitrejše sproščanje učinkovine. To potrjujejo tudi naši rezultati nabrekanja. Na hitrejše sproščanje pa vpliva tudi velikost delcev polimerov, ki tvorijo ogrodje. Alginatni gel pa je nasprotno bolj čvrst in tako upočasni sproščanje. V literaturi opisujejo, da je najhitrejše sproščanje iz mikrokapsul, kjer sta pektin in alginat v razmerju 80/20 (59).

Hitreje kot nabreka polimer, več gelske plasti tvori in s tem otežuje sproščanje učinkovine skozi gelsko plast, saj podaljša razdaljo, ki jo mora učinkovina prepotovati. Mikrokapsule

brez polnila manj nabrekajo kot mikrokapsule z laktozo, posledično nastane na površini mikrokapsule tanjša gelska plast, ki ovira prodiranje medija v notranjost ogrodja in difuzijo SMES s furosemidom iz notranjosti mikrokapsul v medij za nabrekanje. Ker je nastala gelska plast na površini mikrokapsule tanjša, je sproščanje učinkovine iz mikrokapsul brez polnila hitrejše kot iz mikrokapsul, ki vsebujejo laktozo.

V polimernem ogrodju mikrokapsul ima dodana laktoza vlogo tvorca por (60). Profili sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul z različnimi polnili se bistveno ne razlikujejo, lahko pa pri vseh opazimo dve stopnji oz. fazi. Predvidevamo, da med prvo fazo sproščanja nastanejo pore, ker pride voda v stik s polnilom, polnilo se raztopi in nastanejo pore zapolnjene z vodo. Ko pride učinkovina v stik z vodo, se skozi pore sprošča z difuzijo v ionizirani ali neionizirani obliki. Po določenem času se pore zopet zaprejo, kot posledica velikega nabrekanja polimera, in začne se druga faza sproščanja, ki je posledica porazdeljevanja in difuzije nedisociirane oblike. Difuzija skozi pore tukaj nima več vpliva na sproščanje (36, 52). Difuzija je odvisna od poroznosti polimera, razporejenosti por ter prepletenosti polimernih verig (61). Glede na dobljene rezultate sklepamo, da na sproščanje vpliva nasičena topnost polnil, ter sama velikost molekule polnil. Vrednosti so prikazane v preglednici VII.

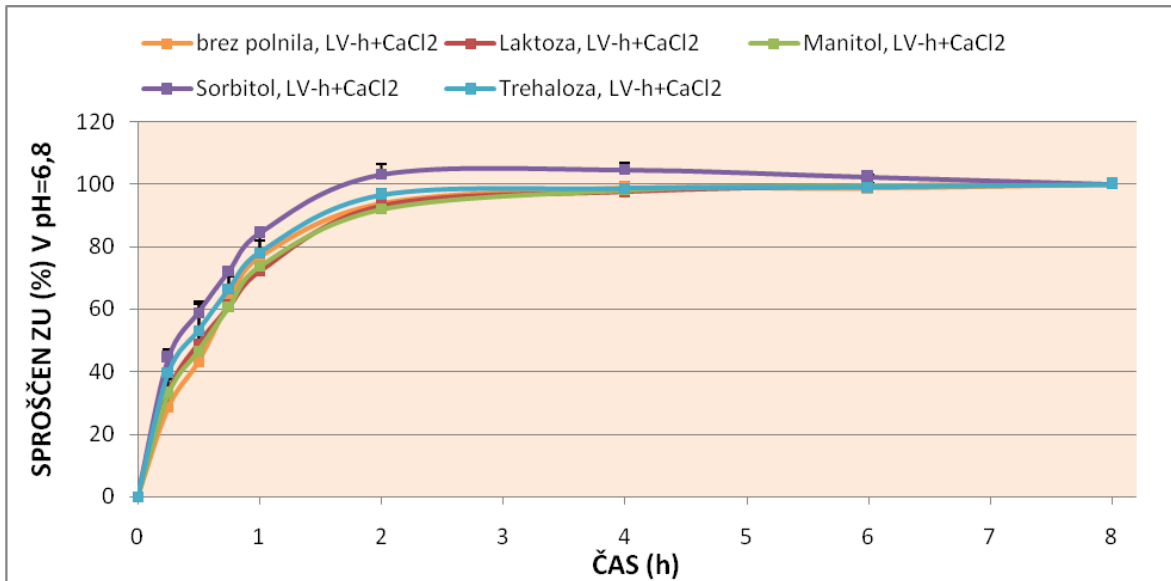


Slika 50: Vpliv polnil na profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul v mediju s pH 3; n = 3.

Med 8-urnim sproščanjem se je iz vseh mikrokapsul v mediju s pH 3 sprostilo manj kot 70 % učinkovine, ker mikrokapsule v tem mediju nabrekajo a ne razpadejo popolnoma (slika 50). Profila sproščanja furosemida iz mikrokapsul, ki v ogrodju vsebujejo laktozo ali manitol, sta primerljiva, saj imata polnili podobno nasičeno topnost. Sledijo mikrosfere s trehalozo in sorbitolom, ki imata še višjo nasičeno topnost. Višja je nasičena topnost, hitreje se polnila raztopijo in posledično nastanejo prosti prostori, ki omogočajo prehod učinkovine iz jedra mikrokapsul v medij za sproščanje. Profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul z 10 % sorbitola je tako najhitrejši, medtem ko je sproščanje najpočasnejše iz mikrokapsul z 10 % laktoze, ki ima nižjo nasičeno topnost. Rezultati sproščanja furosemida iz mikrokapsul so skladni z rezultati nabrekanja referenčnih mikrosfer. Večji je odstotek nabrekanja mikrosfer, ki v polimernem ogrodju vsebujejo 10 % ustreznega polnila, manjše je sproščanje učinkovine iz mikrokapsul, ki vsebujejo enako polnilo.

Sklepamo, da na odstotek sproščene učinkovine iz mikrokapsule, ki v polimernem ogrodju vsebuje hidrofilno polnilo, vpliva tudi velikost delcev polnila. Manjše pore tvori polnilo, počasneje se sprošča učinkovina iz polimernega ogrodja.

V nevtralnem mediju (slika 51) dodatek polnil nima bistvenega vpliva na odstotek sproščene učinkovine iz mikrokapsul. Vsa učinkovina se je sprostila že po 2 urah inkubiranja v fosfatnem pufu. Med 8-urnim časom sproščanja so mikrokapsule popolnoma razpadle, kar pomeni, da se je iz njih sprostilo 100 % učinkovine. Na sliki 51 je viden vpliv hitrejšega raztapljanja sorbitola in trehaloze, saj hitreje pride do 100 % sproščene učinkovine, kot pri ostalih dodanih polnilih.



Slika 51: Vpliv polnil na profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul v mediju s pH 6,8; n = 3.

Pri pH 6,8 furosemid ionizira in je zato dobro topen, pri pH 3 pa se nahaja v neionizirani oz. slabo topni obliki. Pri sproščanju furosemida iz mikrokapsul v vodni raztopini HCl lahko zato opazimo večje razlike med preizkušenimi mikrokapsulami kot v fosfatnem pufru, kjer so profili sproščanja furosemida iz mikrokapsul med seboj bolj podobni.

Ker smo želeli podrobneje določiti mehanizme sproščanja, smo izračunali ujemanje eksperimentalnih rezultatov testa raztapljanja z enačbami, ki opisujejo različne kinetike sproščanj: 0. red (*enačba VII*), 1. red (*enačba VIII*), Higucijeva kinetika (*enačba IX*), kinetika po Korsmejer-Peppasu (*enačba X*), ki upošteva več vplivov, ter kinetika po Hixon-Crowellu (*enačba XI*), ki upošteva zmanjšanje površine mikrokapsul med sproščanjem.

Pri računanju difuzijskega eksponenta sproščanja n v Korsmejer-Peppasovi enačbi uporabimo samo začetni del krivulje (do 60 % sproščene učinkovine). Glede na vrednosti ki jih zavzema n , lahko napovemo sproščanje ZU iz ogrodja. Difuzijski koeficient n je odvisen predvsem od geometrije FO. V primeru Fickovega sproščanja (t.i. 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 mehanizmu sproščanja vpliva povečana plastičnost viskozne bariere – t.i. polimernega gela, ki se relaksira (*ang. » Super Case II transport«*) (62).

Za izračun ujemanja smo uporabili eksperimentalne podatke iz testa raztapljanja v mediju s pH 3 (preglednica IX).

Preglednica IX: Determinacijski koeficienti korelacije in konstante sproščanja ZU iz mikrokapsul brez ali s polnili v vodni raztopini HCl s pH 3 za različne preizkušane enačbe kinetik sproščanja.

	0. red		1. red		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixon-Crowell	
Formulacija	R ²	k	R ²	k	R ²	k	R ²	n	R ²	k
brez polnila	0,814	0,101	0,972	0,452	0,966	0,122	0,835	0,731	0,950	0,104
10 % laktoze	0,737	0,107	0,889	0,543	0,866	0,134	0,995	0,525	0,909	0,142
10 % manitola	0,730	0,095	0,985	0,478	0,925	0,120	0,998	0,515	0,968	0,106
10 % sorbitola	0,339	0,078	0,492	0,348	0,426	0,118	/	/	0,456	0,145
10 % trehaloze	0,524	0,081	0,883	0,485	0,742	0,108	/	/	0,865	0,129

Kot je razvidno iz preglednice IX, so se rezultati testa sproščanja furosemida iz mikrokapsul v mediju s pH 3, ki v ovojnici vsebujejo 10 % laktoze in 10 % manitola najboljše ujemali s kinetiko sproščanja po Korsmeyer-Peppasu, kar nam pokaže vrednost

R^2 . Vrednost n je znašala med 0,43 in 0,85, kar nakazuje na sproščanje, na katerega vpliva tako difuzija skozi polimerno ogrodje kot tudi relaksacija le-tega. Vrednosti Korsmeyer-Peppasovega eksponenta n pri mikrokapsulah z 10 % sorbitola in 10 % trehaloze nismo mogli izračunati, saj se je v tem primeru ZU prehitro sprostila iz mikrokapsul; v pol ure se je sprostilo že več kot 60 % končno sproščene ZU.

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

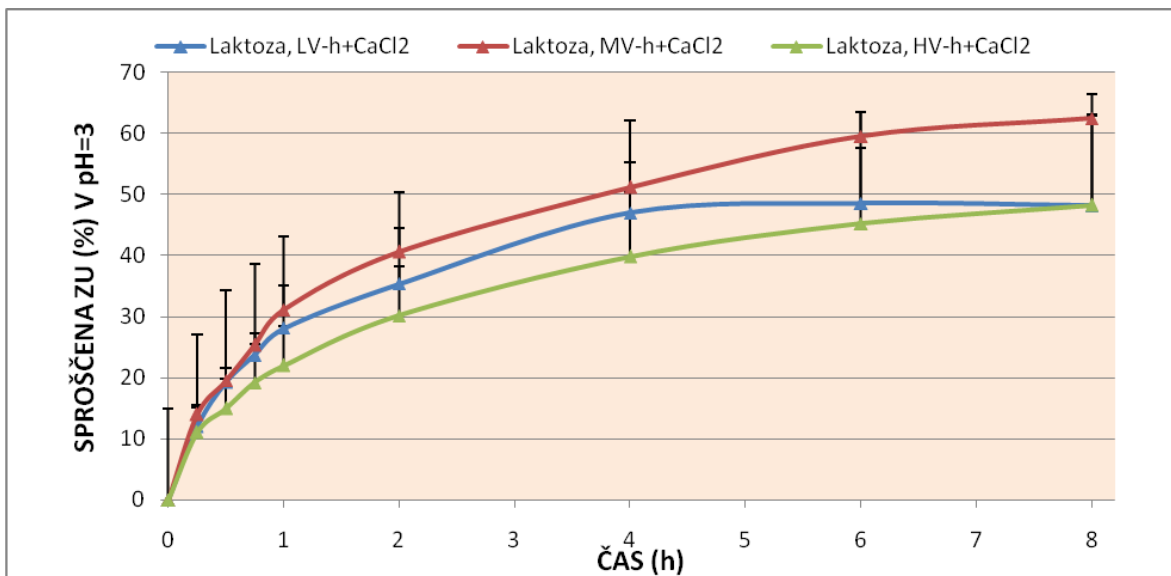
Sproščanje furosemida iz mikrokapsul, ki v ovojnici ne vsebujejo polnila, najbolje opiše kinetika 1. reda, kar pomeni da je sproščanje zdravilne učinkovine odvisno le od koncentracije zdravilne učinkovine.

Nadaljevali smo s proučevanjem vpliva vrste hitosanske ovojnice mikrokapsul na profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul. Rezultati sproščanja furosemida iz mikrokapsul v mediju s pH 3 in pH 6,8 so prikazani na slikah 52 in 53.

Mikrokapsule so obložene z dodatno hitosansko ovojnico. Slednji je kationski polimer, ki v kislem mediju protonira in se raztaplja. Število prostih protoniranih amino skupin tako vpliva na raztapljanje hitosana in s tem na sproščanje učinkovine iz mikrokapsul. Topnost hitosana je tako odvisna od stopnje deacetiliranja, molekulske mase hitosana, ki je povezana z viskoznostjo hitosana, in medija za sproščanje (pH, ionska moč, temperatura). Konstanta ionizacije (pKa) hitosana se giblje med 6,51 in 6,39; molekulska masa pa variira med 1370 Da in 60 kDa. Stopnja deacetilacije ima velik vpliv na pKa vrednost (63).

Pod hitosansko oblogo ležeča ovojnica mikrokapsul je sestavljena iz pektina in alginata, ki sta anionska polimera in nabrekata v nevtralnem in alkalnem mediju. Iz slike 52 je razvidno, da razlike med profilom sproščanja furosemida iz mikrokapsul obloženih s hitosanom različnih viskoznosti, niso velike, kljub temu pa je opazen določen trend. Furosemid se tako najhitreje sprošča iz mikrokapsul obloženih z MV-hitosanom, najpočasneje pa iz mikrokapsul s HV-hitosanom. Predvidevamo, da MV-hitosan ne tvori

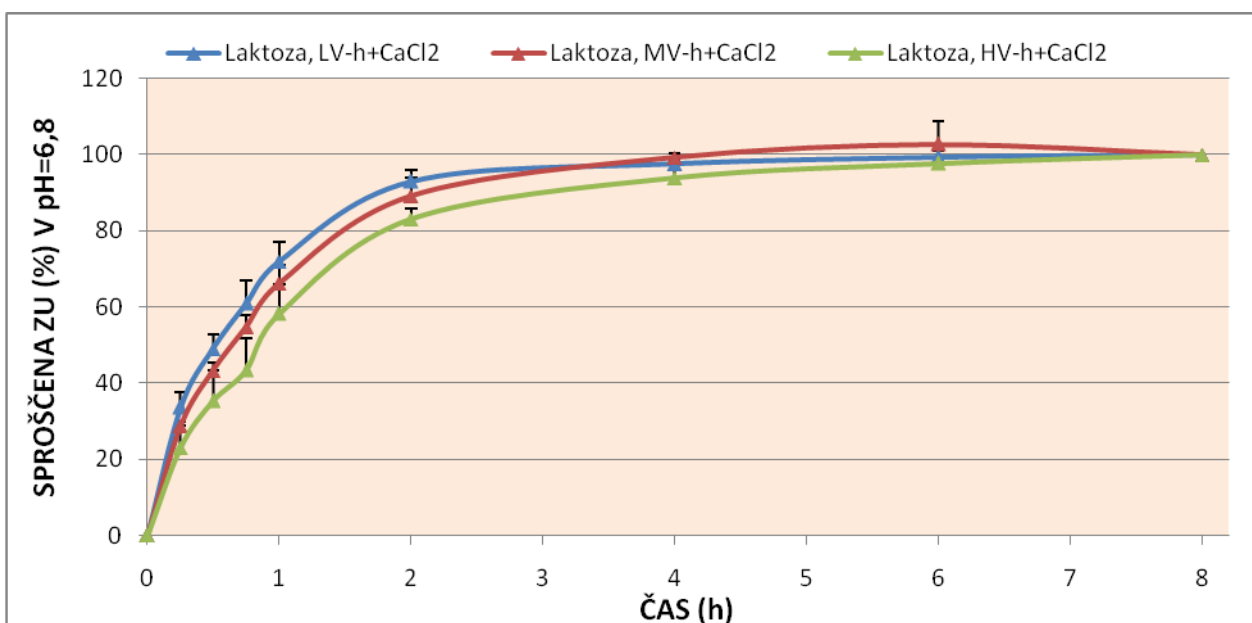
kompaktne obloge okoli mikrokapsul. To teorijo potrjujejo tudi rezultati učinkovitosti vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule, ki je najmanjša pri MV-hitosan, ki tvori slabo oblogo za mikrokapsule in prepušča veliko učinkovine. HV-hitosan tvori zelo viskozno raztopino in pri oblaganju tvori čvrsto ovojnico. V kislem mediju se iz površine počasi raztaplja in omogoča počasen dostop vodnega medija do jedrne faze.



Slika 52: Vpliv hitosanske obloge na profil sproščanja furosemidu iz mikrokapsul v mediju s pH 3; n = 3.

Puttipatkhachorb in sodelavci navajajo da se iz sfer prevlečenih z visoko viskoznim hitosanom učinkovina sprošča počasneje, kar je v skladu z našimi rezultati. Mehanizem sproščanja (nad 20 %) poteka s Fickovo difuzijo, po kinetiki ničtega reda. Po literaturnih podatkih (Puttipatkhachorb et al., 2001) naj bi imel MV-hitosan molekulska masa 50 000–60 000 g/mol in stopnjo deacetilacije med 82–100 %, HV-hitosan pa molekulska masa 800 000–1 000 000 (oz. 6 000 000–8 000 000) g/mol in 80–85 % (oz. 100 %) stopnjo deacetilacije. V omenjeni raziskavi se je proučevala učinkovina najhitreje sproščala iz LV-hitosana z 100 % stopnjo deacetilacije. Sfere prevlečene s HV-hitosanom pa se počasi raztopijo in erodirajo v majhne delčke, kar lahko v vodi traja tudi 24 ur. Sproščanje učinkovine je počasnejše v primeru hitosana z večjo stopnjo deacetilacije, ker tak hitosan tvori gostejši in bolj viskozen film okoli nabreklih sfer, kar otežuje sproščanje (64).

V skladu s pričakovanji se v fosfatnem pufru s pH 6,8 profili sproščanja furosemida iz mikro kapsul bistveno ne razlikujejo (slika 53). Hitosan je kationski polimer, ki je v nevtralnem in alkalnem mediju netopen, zato omogoča doseganje zadržanega sproščanja. Iz rezultatov je razvidno, da se v našem primeru učinkovina najhitreje sprošča iz mikro kapsul, ki so obdane z ovojnico iz LV-hitosana. Najpočasneje pa se furosemid sprošča iz mikro kapsul, obloženih z HV-hitosanom, ker slednji tvori okoli mikro kapsule viskozen gel, ki ovira vdor fosfatnega medija v notranjo plast ovojnice mikro kapsul, ki je sestavljena iz hidrofилnih anionskih polimerov, ki v nevtralnem nabrekajo.



Slika 53: Vpliv hitosanske obloge na profil sproščanja furosemida iz mikro kapsul v mediju s pH 6,8; n = 3.

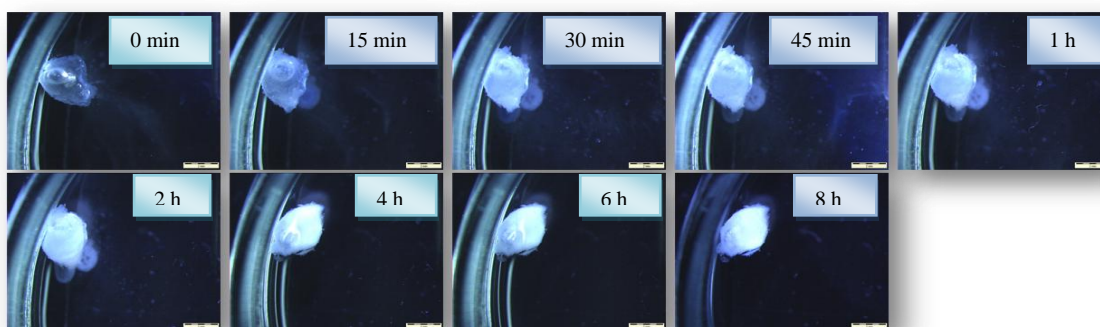
Za lažjo obrazložitev rezultatov smo proučevali kinetiko sproščanja furosemida iz mikro kapsul, obloženih s hitosanom različne viskoznosti (preglednica X).

Preglednica X: Determinacijski koeficienti korelacije in konstante sproščanja ZU iz mikrokapsul z ovojnico iz hitosanov različne viskoznosti v vodni raztopini HCl s pH 3 za različne preizkušane enačbe kinetik sproščanja.

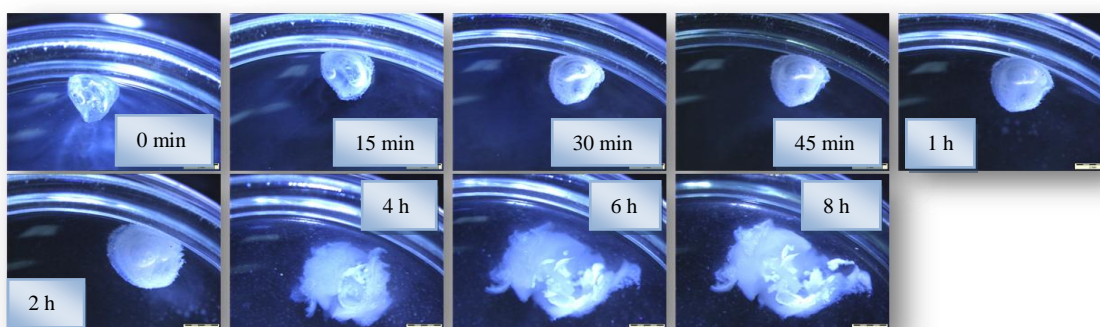
Formulacija	0. red		1. red		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixon-Crowell	
	R ²	k	R ²	k	R ²	k	R ²	n	R ²	k
LV-hitosan	0,737	0,107	0,889	0,543	0,866	0,134	0,995	0,525	0,909	0,142
MV-hitosan	0,833	0,109	0,990	0,491	0,963	0,129	0,990	0,726	0,976	0,110
HV-hitosan	0,851	0,109	0,994	0,456	0,971	0,129	0,995	0,791	0,971	0,109

Iz preglednice X je razvidno, da sproščanje furosemida iz mikrokapsul, obloženih s hitosansko ovojnico različnih viskoznosti, zopet najbolj opiše Korsmeyer-Peppas model, kjer R² doseže najvišje vrednosti. Korsmeyer-Peppasov difuzijski eksponent n ima pri mikrokapsulah obloženih z LV-, MV-, in HV-hitosanom vrednost 0,525, 0,726 oz. 0,791; slednje nakazuje na ne-Fickovo kinetiko sproščanja, kjer je sproščanje odvisno tako od difuzije zdravilne učinkovine skozi polimer, kot tudi od relaksacije polimera. Sproščanje učinkovine iz mikrokapsul obloženih s hitosansko oblogo iz LV-hitosana, je po vrednostih koeficienta n najbolj primerljivo s sproščanjem, ki ga nadzoruje difuzija polimera. To potrjuje rezultate, da je ovojnica, ki jo tvori LV-hitosan bolj čvrsta in se v kislem mediju počasi raztaplja. Dokaj visoke vrednosti R² pa so dosežene tudi po Hixon-Crowellovi kinetiki in kinetiki 1. reda.

Sliki 54 in 55 prikazujeta morfološke lastnosti mikrokapsul med 8 urnim spremljanjem sproščanja furosemida iz mikrokapsul z optičnim mikroskopom v medijih s kislim in nevtralnimi pH.



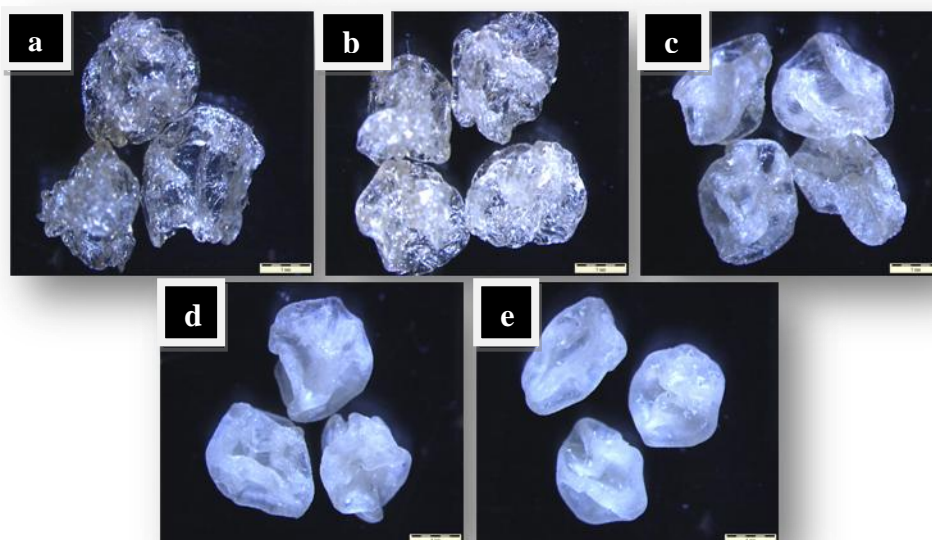
Slika 54: Z optičnim mikroskopom slikana mikrokapsula med sproščanjem furosemida iz mikrokapsul v pH 3.



Slika 55: Z optičnim mikroskopom slikana mikrokapsula med sproščanjem furosemida iz mikrokapsul v pH 6,8.

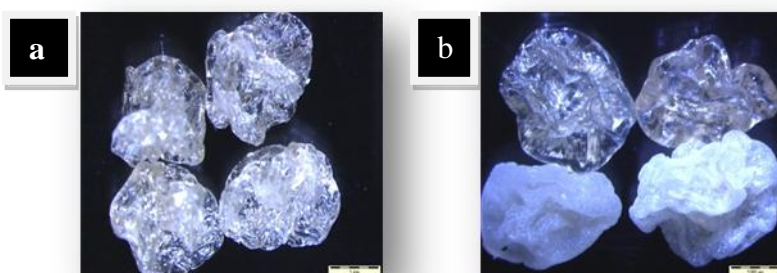
4.6 VREDNOTENJE MORFOLOŠKIH LASTNOSTI MIKROSFER IN MIKROKAPSUL

Morfologija mikrosfer se je spreminjala z večanjem vsebnosti pektina. Mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina so bile lepše oblikovane in bolj belkaste oziroma motne kot tiste z večjo vsebnostjo alginata, kar je razvidno tudi na sliki 56. V literaturi poročajo, da se velikost mikrosfer povečuje z večjo vsebnostjo pektina, kar pa v našem primeru ni najbolj vidno (60). Razlog tiči v tem, da so mikrosfere na sliki 51 že bile sušene 16 ur v sušilniku, kjer so izgubile vso vodo.



Slika 56: Morfologija mikrosfer, sušenih v sušilniku z različnimi razmerji polimerov: a) P/A=0/100, b) P/A=25/75, c) P/A=50/50, d) P/A=75/25, e) P/A=100/0.

Z dodatkom polnila se velikost mikrosfer poveča. Ob dodatku disaharidov (laktoza, trehaloza) pa pride tudi do obarvanja mikrosfer z belo barvo, kot je vidno na sliki 57. Disaharidi imajo večjo molekulsko maso kot polioli (manitol, sorbitol), zato bolj zapolnijo prostore v polimernem ogrodju.



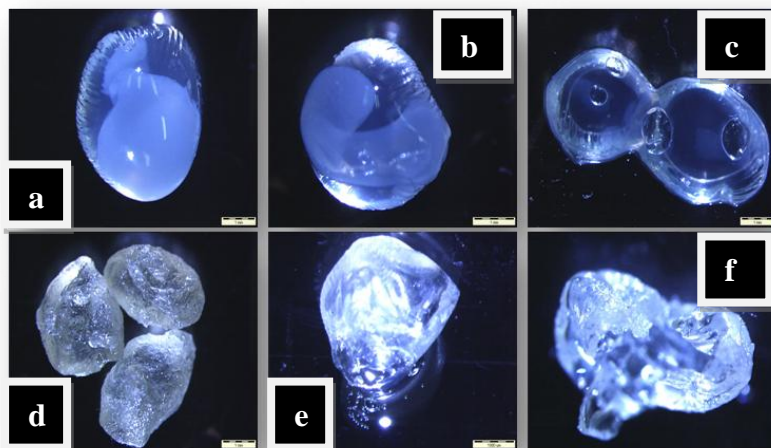
Slika 57: Mikroskopski posnetek: a) mikrosfere brez polnila, b) mikrosfere s polnili (levo zgoraj – 10 % sorbitola, desno zgoraj – 10 % manitola, levo spodaj – 10 % trehaloze, desno spodaj – 10 % laktoze).

Primerjava velikosti mikrokapsule in mikrosfere je prikazana na sliki 58. Mikrokapsule z večjo vsebnostjo pektina so manj čvrste, a bolj stabilne od alginatnih mikrokapsul (65).



Slika 58: Primerjava mikrokapsule (zgoraj) in mikrosfere (spodaj) (z 10 % laktoze).

Med samo izdelavo mikrokapsul in med sušenjem se mikrokapsulam zmanjša volumen za dvakrat. Na sliki 59 so slikane mikrokapsule tik po premreževanju ter po sušenju. Slikali pa smo tudi prerez mikrokapsul, kjer je lepo vidno jedro in iztek jedra iz same mikrokapsule.



Slika 59: a, b) Nesušene mikrokapsule, c) prerez nesušene mikrokapsule, d) sušene mikrokapsule, e, f) prerez sušenih mikrokapsul.

5 SKLEP

Namen našega dela je optimizacija ovojnice mikrokapsul, ki kot jedro vsebujejo SMES z modelno učinkovino furosemid, zunanjo fazo pa tvori ovojnica iz 2 % raztopine polimerov pektina in alginata v razmerju 3/1 z dodatkom polnil, obložena s hitosansko oblogo. V diplomskem delu smo proučevali vpliv razmerij med polimeroma, dodatkov različnih polnil, različnih postopkov utrjevanja mikrokapsul in aplikacijo dodatne hitosanske obloge na erozijo in nabrekanje polimernega ogrodja, sproščanje zdravilne učinkovine iz mikrokapsul, učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v le-te in morfološke lastnosti izdelanih mikrokapsul. Ugotovili smo naslednje:

- Ker je pektin stabilen pri nizkih pH vrednostih, v začetnem delu mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina nabrekajo počasneje, a po 16-urnem nabrekanju dosežejo večjo stopnjo kot mikrosfere, z večjim deležem alginata. Med 16-urnim proučevanjem nabrekanja referenčnih mikrosfer (mikrosfere, ki ne vsebujejo jedrne faze) smo ugotovili, da v kislem mediju (pH 3) najmanj nabreka ogrodje pektina in alginata v razmerju 3/1, v nevtralnem mediju (pH 6,8) pa mikrosfere s to sestavo nabrekajo najhitreje. V mediju s pH 3 hitreje erodirajo mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina. V nevtralnem mediju s pH 6,8 pa vse mikrosfere nabrekajo hitreje kot v kislem mediju. Hitreje in močnejše nabrekajo mikrosfere z večjo vsebnostjo pektina.
- Polimerne mikrosfere z dodanimi polnili v pH 3 bistveno bolj nabrekajo kot tiste brez dodanih polnil. Hidrofilna polnila (laktoza, manitol, sorbitol, trehaloza) vežejo medij, v katerem nabrekajo, nato pa se v njem raztopijo in omogočajo nastanek por v ogrodju, kar olajša privzem medija v notranjost polimernega ogrodja. Mikrosfere z laktozo nabrekajo bistveno manj kot mikrosfere z ostalimi polnili. Razlog je v počasnejšem raztapljanju laktoze, ki ima manjšo nasičeno topnost kot ostala polnila.
- Postopek utrjevanja izdelanih mikrokapsul vpliva na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul. Največjo vsebnost jedrne faze smo tako dosegli z enostopenjskim premreževanjem (15 min v 1 % raztopini LV-hitosana s 0,5 M CaCl₂); učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom je bila v

tem primeru 85 %, po sušenju pa zaradi izgub med sušenjem dobimo učinkovitost vgradnje le 41 %.

- Dodatek polnil v polimerno ogrodje mikrokapsul ugodno vpliva na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom. Vpliv je najbolj opazen v fazi sušenja; mikrokapsule, ki ne vsebujejo polnila, imajo učinkovitost vgradnje po sušenju le še 41 %, z dodatkom laktoze pa kar 75 %. Slednje si razlagamo tako, da polnila zapolnijo proste prostore v polimernem ogrodju, ki nastaja med sušenjem mikrokapsul. S tem preprečijo, da bi jedrna faza z učinkovino med sušenjem iztekala iz polimernega ogrodja.
- Pri proučevanju vpliva vrste hitosanske obloge na čvrstost ovojnice mikrokapsul, ki vpliva tudi na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule, smo dokazali da LV-hitosan tvori najboljšo oblogo in doseže najvišje rezultate učinkovitosti vgradnje (75 %).
- Profili sproščanja furosemida iz mikrokapsul z različnimi polnili v zunanji fazi se bistveno ne razlikujejo. Pri vseh sta opazni dve fazi. V začetni fazi sproščanja se v ogrodju tvorijo pore. V stiku vode s polnilom, se le to raztopi in nastanejo pore zapolnjene z vodo. Učinkovina se sprošča z difuzijo. Po približno 2 urah pa predvidevamo, da se pore zopet zaprejo in sproščanje se upočasni. Med 8-urnim sproščanjem v pH 3 se je iz vseh mikrokapsul sprostilo manj kot 70 % učinkovine, ker mikrokapsule v tem mediju nabrekajo a ne razpadejo popolnoma. V nevtralnem pa dodatek polnil nima bistvenega vpliva na odstotek sproščene učinkovine iz mikrokapsul.
- V kislem mediju se furosemid najhitreje sprošča iz mikrokapsul obloženih s srednje viskoznim hitosanom, kar je najverjetneje posledica fleksibilnosti verig MV-hitosana, najpočasnejše pa je sproščanje iz HV-hitosana. V nevtralnem so profili sproščanja primerljivi, saj hitosan v nevtralnem ni topen, poleg tega vse mikrokapsule v tem mediju hitro razpadejo. Kot najprimernejša obloga za utrjevanje mikrokapsul se je zopet izkazala obloga iz LV-hitosana.
- Pri proučevanju morfoloških lastnosti izdelanih mikrokapsul smo ugotovili, da so bile najbolj sferične in najmanj nagubane mikrokapsule z večjo vsebnostjo pektina. S slikanjem prečnega prereza smo dokazali homogenost tekočega jedra. Ob dodatku disaharidov (laktoza, trehaloza) pride do belega obarvanja mikrokapsul.

SKLEP

Mikrokapsule z najustrežnejšimi morfološki lastnostmi ter ponovljivo in visoko učinkovitostjo vgradnje (do 80 %) smo izdelali iz 2 % raztopine pektina in alginata v razmerju 3/1, ki je kot polnilo vsebovala 10 % laktoze. Ovojnica izdelanih mikrokapsul pa je bila utrjena z enostopenjskim postopkom in obložena z LV-hitosanom.

6 LITERATURA

1. Garg S, Sharma S. Gastroretentive Drug Delivery Systems. *Drug Delivery*; 160-166.
2. Moes A.J. Gastric Retention Systems for Oral Drg Delivery. *Drug Delivery*; 157-159.
3. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. *Farmaceutski vestnik* 2008; št. 6, l. 59; 293-300.
4. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativni pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm. Vest.* 2008; 59: 263-268.
5. <http://www.scribd.com/doc/7347249/SPROANJE-IN-IVIVC>; dostopno 22.4.2010
6. G.R. Neslihan, S. Benita. Self-emulsifying drug delivery systems (SEEDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173-182.
7. Tenjarla S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug* 1999; 16(5): 461-521.
8. Rozman B, Bogataj M. Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo. *Farm Vestn* 2006; 57: 189-195.
9. J.S. Garrigue. Les systemes autoemulsionnants pour l`administration orale de principes actifs lipophiles: influence de la formulation sur les aspects biopharmaceutiques. These Faculte de pharamacie de Chatenay-Malabry, de l`Universite de Paris de XI 2002.
10. Vaje iz Farmaceutske tehnologije II., skripta. Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko. 2002.
11. Benita S. Microencapsulation. Methods and Industrial Application. 2nd Ed. Taylor & Francis. 2006.
12. Park K, Yeo Y. Microencapsulation technology. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007:2315-2327.
13. <http://www.swri.org/4org/d01/microenc/microen/default.htm>; dostopno 24.6.2010
14. Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinzen CH, Rainov NG. Alginate Encapsulation of Genetically Engineered Mammalian Cells: Comparison of Production Devices, Methods and Microcapsule Characteristics. *J Microcapsulation* 2003; 20:303-331.

15. Heinzen Ch. Use of prilling and co-extrusion technology for food & drink applications. Inotech Encapsulation AG.
16. Instruction Manual for Inotech Encapsulator Research IE 50 R. 2002 Inotech Encapsulation AG. Dottikon. Switzerland.
17. Poncelet D. Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications. Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science. Springer Netherlands 2006: 23 – 34.
18. Kos Kerec M. Uporaba hitosana v farmaciji. Farm Vestn 2006; 57: 287 – 291.
19. Uchegbu F. I. Schätzlein G. A. Polymers in Drug Delivery. Taylor & Francis Group 2006.
20. Zuidam N. J. Nedović V.A. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Materials for Encapsulation. Springes Science and Bussines Media, LLC 2010: 31-97.
21. <http://www.minet.si/gradivo/seminarske/54868Output.pdf>; dostopno 24.6.2010
22. Rowe R C, Sheskey P J, Owen S C. Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Ed. 2006.
23. Jindrich Jindrich: Cyclodextrins. Cyclodextrin Chemistry Research Projects <http://portal.jindrich.org/projects/cyclodextrins.html>; dostopno 10.9.2010
24. Marcus E. Brewster, Thorsteinn Loftsson: Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews 59. 2007: 645-666.
25. <http://www.google.si/images?q=cellulose&oe=utf-8&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a&um=1&ie=UTF-8&source=og&sa=N&hl=sl&tab=wi&biw=1366&bih=585>; dostopno 10.9.2010
26. Sriamornsak P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Use: A Rewiew.207 – 228.
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Galactomannan>; dostopno 27.3.2011
28. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. Farmaceutski vestnik 2008; št. 6, l. 59; 293-300.
29. Morch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. A study of the structure-function relationship in native and structurally engineering alginates. Thesis for the degree of doctor ingenior. Thronnheim. February 2008.
30. <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/238331>; dostopno 27.3.2011

LITERATURA

31. <http://www.google.si/images?hl=sl&biw=1366&bih=585&gbv=2&tbs=isch%3A1&sa=1&q=ksantan&aq=f&aqi=&aql=&oq=>; dostopno 27.3.2011
32. <http://www.google.si/images?q=gellan&oe=utf-8&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a&um=1&ie=UTF-8&source=og&sa=N&hl=sl&tab=wi&biw=1366&bih=585>; dostopno 27.3.2011
33. Kos Kerec M. Uporaba hitosana v farmaciji. Farmaceutski vestnik 2006; 1.57; 287-291.
34. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chitosan2.jpg>; dostopno 27.6.2010
35. <http://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipids>; dostopno 27.3.2011
36. Gunder W. Lippold B. H. Lippold B. C. Release of drugs from ethyl cellulose microcapsules (diffusion pellets) with pore formers and pore fusion. European Journal of Pharmaceutical Sciences 3.1995: 203-214.
37. Formularium Slovenicum 2.2; 2005.
38. <http://atylmann.webpark.pl/laktoza.gif>; dostopno 17.6.2010
39. <http://www.benbest.com/cryonics/Mannitol.jpg>; dostopno 17.6.2010
40. <http://www.pharm.uu.nl/vak/pdocanal/ondmat/titratie/sorbitol.gif>; dostopno 17.6.2010
41. <http://hdlighthouse.org/research/localimages/trehalose.jpg>; dostopno 17.6.2010
42. Proizvajalčeva specifikacija, Gattefossé, Francija.
43. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia. 6th Ed. Council of Europe. Strasbourg 2007.
44. Makuc Peternej L. Izdelava in vrednotenje mikrokapsul s samimikroemulgirajočim jedrom. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2008.
45. The Merck Index. 13th Ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station. NJ. USA 2001.
46. Williams D.A. Lemke L.T. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6th Ed. Williams & Williams. 2008. 731-732.
47. <http://en.wikipedia.org/wiki/Furosemide> dostopno 17.6.2010
48. Bolko K. Optimizacija ovojnice mikrokapsul s samo-mikroemulgirajočim jedrom. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2010.

49. Zvonar A. Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samo-mikroemulgirajočim jedrom. Doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana 2010.
50. Da Silva MA, Bierhlaz ACK, Kieckbusch TG. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*. 77. 2009; 736-742.
51. 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.
52. Pillay V, Fassihi R. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. Comparison to the pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled release*. 59. 1999: 229-242.
53. 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.
54. Homar M, Šuligoj D, Gašperlin M. Preparation of microcapsules with self microemulsifying core by vibrating nozzle method. *J Microencapsulation*. 24.2007; 72-81.
55. Bajik J, Makai Z. Study of the effect of lactose on the structure of sodium alginate films. *Carbohydrate polymers* 77 (2009): 530-535.
56. Fu Y, Kao J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Informa UK*. 2010: 1742-5247.
57. Lin C, Metters A T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews* 58 (2006): 1379-1408.
58. Arifin J D, Lee L Y. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 58 (2006): 1274-1325.
59. Jaya S, Durance T. D, Wang R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristic of microcapsules. *Journal of Microencapsulation*. 26(2). 2009:143-153.
60. 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

LITERATURA

- tablet (OPT) utilizing (SBE)7m- β -CD as both solubilizer and osmotic agent. *J Controlled Release* 1999, 60:311-319.
61. Ramos-Espinoza R. Villafuerte-Robles L. Influence of admixed lactose on pelanserin hydrochloride release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 74. 1999:65-71.
62. Sriamornsak P., Sungthongjeen. Modification of theophylline release with alginate gel formed in hard capsules. *AAPS PharmSciTech*. 2007; 8(3): 51.
63. Zhao Wang Q. Chen Guang X. Liu N. Protonation constant of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*. 65. 2006: 194,201.
64. Puttipipatkachorb S. Nunthanid J. Yamamoto K. Peck G.E. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *Journal of Controlled Release*. 75.2001: 143-153.
65. Madziva. H. Kailasapathy K. Phillips M. Alginate.pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *Journal of Microencapsulation*. 22(4).2005:343-351.

