

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KURE

**VPLIV RAZMERJA ALGINAT - PEKTIN NA LASTNOSTI OVOJNICE  
MIKROKAPSUL S SAMO-MIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM**

**CHARACTERISTICS OF MICROCAPSULES WITH SELF-  
MICROEMULSIFYING CORE: THE INFLUENCE OF ALGINATE – PECTIN  
RATIO IN THE SHELL PHASE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

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

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin in somentorici doc. dr. Alenki Zvonar za pomoč in strokovno vodenje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za praktične nasvete in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Hvala vsem, ki so mi v času študija in pri nastajanju te diplome stali ob strani, še zlasti mojim domačim, Matjažu in prijateljem.

### **Izjava**

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

Ljubljana, junij 2012

Katja Kure

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član diplomske komisije: asist. dr. Rok Frlan

## KAZALO

**KAZALO**

|  |            |
|--|------------|
| <b>KAZALO</b> .....  | <b>I</b>   |
| <b>POVZETEK</b> .....  | <b>III</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....   | <b>VI</b>  |
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>   |
| 1.1. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI .....                                   | 1          |
| 1.2. SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI (S(M)ES) .....                      | 3          |
| 1.2.1. SESTAVA S(M)ES .....  | 3          |
| 1.2.2. MEHANIZEM NASTANKA (MIKRO)EMULZIJE .....                          | 4          |
| 1.3. MIKROKAPSULE .....  | 5          |
| 1.3.1. OVOJNICA MIKROKAPSUL.....   | 6          |
| 1.3.1.1. POLIMERI.....   | 6          |
| 1.3.1.2. POLNILA IN TVORCI POR.....                                      | 11         |
| 1.4. METODE IZDELAVE MIKROKAPSUL.....                                    | 13         |
| 1.4.1. METODE EKSTRUZIJE CURKA .....                                     | 14         |
| 1.5. ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R.....                                   | 16         |
| 1.5.1. TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROKAPSUL .....                            | 18         |
| <b>2. NAMEN DELA</b> .....   | <b>20</b>  |
| <b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....                                      | <b>21</b>  |
| 3.1. MATERIALI .....   | 21         |
| 3.2. METODE .....  | 26         |
| 3.2.1. NAPRAVE IN PRIPOMOČKI ZA IZDELAVO IN VREDNOTENJE MIKROKAPSUL..... | 26         |
| 3.2.2. OPTIMIZACIJA SESTAVE SMES IN PRIPRAVA JEDRNE FAZE.....            | 27         |
| 3.2.3. PRIPRAVA RAZTOPINE ZA OVOJNICO.....                               | 28         |
| 3.2.4. PRIPRAVA RAZTOPINE ZA UTRJEVANJE MIKROKAPSUL.....                 | 29         |

## KAZALO

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.5.    | TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROKAPSUL S SAMOMIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM .....                     | 29        |
| 3.2.6.    | SUŠENJE MIKROKAPSUL.....   | 30        |
| 3.2.7.    | TEHNOLOGIJA IZDELAVE REFERENČNIH MIKROSFER.....  | 31        |
| 3.2.8.    | DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE FUROSEMIDA .....  | 31        |
| 3.2.9.    | DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE MIKROSFER .....  | 32        |
| 3.2.10.   | SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL.....  | 34        |
| 3.2.11.   | PRIPRAVA MEDIJEV S pH 3 IN pH 6,8.....   | 36        |
| 3.2.12.   | HPLC ANALITIKA FUROSEMIDA .....  | 36        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1.      | IZBIRA OPTIMALNE JEDRNE FAZE .....   | 38        |
| 4.2.      | DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE IN VSEBNOSTI ZDRAVILNE UČINKOVINE V<br>MIKROKAPSULAH..... | 40        |
| 4.3.      | VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER .....         | 43        |
| 4.4.      | VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL.....                 | 48        |
| <b>5.</b> | <b>SKLEP.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURA.....</b>   | <b>57</b> |

## POVZETEK

Večina na novo odkritih zdravilnih učinkovin je problematičnih zaradi slabe vodotopnosti in permeabilnosti. Z vgradnjo učinkovin v samomikroemulgirajoči sistem (SMES) lahko bistveno povečamo njihovo biološko uporabnost. SMES so izotropne zmesi lipidov, površinsko aktivnih snovi, enega ali več sotopil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem že ob rahlem mešanju hitro tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi. SMES so ponavadi v tekočem agregatnem stanju, lahko pa jih vgradimo tudi v trdne farmacevtske oblike, kot so mikrokapsule.

Mikrokapsule so majhni, trdni in okrogli delci velikosti od 1 do 1000  $\mu\text{m}$  z definiranim jedrom in ovojnico. Zdravilna učinkovina se ponavadi nahaja v jedrni fazi, ovojnico pa sestavljajo naravni ali sintezni polimeri. Z ustrezno izbiro polimerov lahko dosežemo tudi prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine iz mikrokapsul.

V diplomski nalogi smo želeli izdelati mikrokapsule s samomikroemulgirajočim jedrom in ovojnico iz kalcijevega alginata/pektinata. Mikrokapsule smo izdelali z uporabo enkapsulatorja Inotech IE-50 R z metodo koestružije curka z vibrirajočo membrano. Kot jedrno fazo smo uporabili SMES s furosemidom kot modelno učinkovino, za izdelavo ovojnice pa 2 % raztopine alginata in pektina v različnih razmerjih. Raztopinam za izdelavo ovojnice smo dodali tudi 5 % laktoze in 1 % natrijevega klorida v vlogi polnil, s čimer smo želeli zmanjšati iztekanje jedrne faze in povečati njen delež v izdelanih mikrokapsulah. NaCl ima še dodatno vlogo, da zmanjša mašenje šobe enkapsulatorja, kar je povezano s prehitrim premreženjem polimera s kalcijevimi ioni iz jedra mikrokapsul. Izdelane mikrokapsule smo premreževali v raztopini kalcijevih ionov, nato pa smo jih še dodatno učvrstili s hitosansko oblogo.

Najprej smo določili topnost furosemida v SMES z različno vsebnostjo emulgatorjev in oljne faze. Ugotovili smo, da topnost narašča z višanjem deleža oljne faze v SMES. S pomočjo dobljenih rezultatov in področja nastanka mikroemulzije po redčenju sistemov z vodno fazo smo se za izdelavo mikrokapsul odločili uporabiti SMES s sestavo 88 % emulgatorjev in 12 % oljne faze.

*POVZETEK*

V diplomski nalogi smo najvišjo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom (60 % v nesušeni mikrokapsulah) zagotovili s sestavo ovojnice P/A=75/25, brez dodanega natrijevega klorida. Učinkovitost vgradnje se med sušenjem mikrokapsul na zraku in v zvrtničenih plasteh ne razlikuje signifikantno. Za nadaljnje delo smo se odločili uporabiti mikrokapsule, sušene v zvrtničenih plasteh, saj je takšen način sušenja hitrejši in enostavnejši od sušenja na zraku.

Z namenom preučevanja vpliva razmerja med pektinom in alginatom na nabrekanje in erozijo smo v nadaljevanju izdelali referenčne mikrosfere, sestava njihovega ogrodja je bila identična s sestavo ovojnice mikrokapsul. Dokazali smo, da tako v mediju s pH 3 kot v mediju s pH 6,8 najhitreje in najmočnejše nabrekajo mikrosfere s sestavo ovojnice P/A=100/0, z višanjem deleža kalcijevega alginata v matriksu pa stopnja nabrekanja pada. Erozijska polimernega ogrodja je primerljiva z rezultati nabrekanja: v obeh medijih so najbolj erodirale mikrosfere z matriksom iz pektina, najmanj pa mikrosfere z alginatnim matriksom. Dodatek NaCl v kislem mediju ni imel signifikantnega vpliva na stopnjo nabrekanja, v nevtralnem mediju pa se je nabrekanje povečalo samo pri formulaciji s sestavo P/A=75/25. Pri tej formulaciji smo opazili tudi večjo stopnjo erozije v obeh medijih v primerjavi z mikrosferami brez dodanega NaCl.

Z raziskovalnim delom smo dokazali, da lahko s spreminjanjem sestave ovojnice vplivamo tudi na profil sproščanja učinkovine iz mikrokapsul. Furosemid se je v največjem obsegu sprostil iz mikrokapsul s sestavo ovojnice P/A=75/25. Z namenom podrobnejše preučitve mehanizmov sproščanja smo izračunali ujemanje rezultatov testa sproščanja furosemida z različnimi kinetikami sproščanja. Dokazali smo, da pri mikrokapsulah s sestavo ovojnice P/A=100/0 in 75/25 poteka sproščanje, nadzorovano z difuzijo, medtem ko na sproščanje furosemida iz mikrokapsul s 50 % alginata vplivata tako difuzija kot tudi relaksacija polimernega ogrodja.

Dodatek NaCl v raztopino za pripravo ovojnice je povečal obseg sproščene zdravilne učinkovine samo pri mikrokapsulah s pektinsko ovojnico, pri drugih formulacijah pa vpliv NaCl na sproščanje furosemida ni bil signifikanten. Prav tako NaCl ni vplival na kinetiko sproščanja učinkovine iz naše farmacevtske oblike.

*POVZETEK*

V diplomski nalogi smo dokazali, da je mogoče izdelati mikrokapsule s samomikroemulgirajočim jedrom z visoko učinkovitostjo vgradnje. Mikrokapsule predstavljajo perspektiven sistem za dostavo zdravilnih učinkovin z neugodnimi biofarmaceutskimi lastnostmi, saj združujejo tako prednosti SMES kot tudi trdnih večenočnih farmacevtskih oblik.

## SEZNAM OKRAJŠAV

A = alginat

BCS = biofarmacevtski klasifikacijski sistem

BU = biološka uporabnost

HLB = hidrofilno-lipofilno ravnotežje

HM = visoko zaestren (*high metoxilated*)

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

LM = nizko zaestren (*low metoxilated*)

O/V = olje v vodi

P = pektin

PAS = površinsko aktivna snov

SES = samoemulgirajoči sistem

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

ZU = zdravilna učinkovina



## UVOD

## 1. UVOD

Razvoj novih učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik je ključnega pomena za uvajanje novih zdravilnih učinkovin na tržišče (1). Zaradi enostavne aplikacije, varnosti in neinvazivnosti je namreč predvsem v terapiji kroničnih obolenj peroralno zdravljenje še vedno najbolj cenjeno (2). Po trenutnih ocenah kar od 40 do 70 % na novo odkritih zdravilnih učinkovin ni dovolj vodotopnih, da bi lahko zagotavljale ustrezno in ponovljivo absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta (2).

Po biofarmacevtskem klasifikacijskem sistemu (angl. Biopharmaceutical Classification System - BCS) na biološko uporabnost učinkovine najbolj vplivata njena vodotopnost in permeabilnost skozi biološke membrane. BCS zdravilne učinkovine glede na biofarmacevtske lastnosti razdeli v štiri razrede (3), prikazane v preglednici I.

**Preglednica I:** Biofarmacevtski klasifikacijski sistem.

| Razred po BCS | Topnost učinkovine | Permeabilnost učinkovine |
|---------------|--------------------|--------------------------|
| I.            | visoka             | visoka                   |
| II.           | nizka              | visoka                   |
| III.          | visoka             | nizka                    |
| IV.           | nizka              | nizka                    |

Učinkovine, ki spadajo v IV. razred BCS, predstavljajo pri razvoju farmacevtske oblike z ustrezno biološko uporabnostjo največji izziv. Njihovo topnost in/ali prehajanje skozi membrane lahko izboljšamo npr. s tvorbo soli, izdelavo predzdravil, zmanjševanjem velikosti delcev, tvorbo kompleksov s ciklodekstrini, uporabo sotopil, solubilizacijo s PAS ter vgradnjo v sisteme, osnovane na lipidih (3).

### 1.1. NA LIPIDIH OSNOVANI SISTEMI

Prednost na lipidih osnovanih sistemov je v tem, da lahko dostavijo učinkovino v telo v raztopljenem stanju, s čimer se izognemo fazi raztapljanja. Lipidni sistemi obsegajo tako enostavne oljne raztopine kot tudi bolj kompleksne zmesi olj, emulgatorjev, koemulgatorjev in sotopil (4).

## UVOD

Pouton je leta 2000 oblikoval klasifikacijski sistem na lipidih osnovanih sistemov, ki razdeli lipidne formulacije v 4 razrede (5):

- **razred I** predstavljajo enostavne oljne raztopine, sestavljene iz trigliceridov in/ali mešanih gliceridov. Biološka uporabnost ZU iz oljnih raztopin je večinoma dobra, saj se trigliceridi hitro metabolizirajo do prostih maščobnih kislin in 2-mono-gliceridov in ti produkti tvorijo skupaj z žolčnimi solmi in lecitinom koloidno disperzijo mešanih micelov. V slednje se vključijo tudi hidrofobne ZU in ti miceli predstavljajo rezervoar učinkovine, iz katerih nato le-ta prehaja v sistemski krvni obtok s pasivnim (transcelularnim) transportom. Te raztopine so primerne za zelo lipofilne učinkovine, njihova prednost pa je biokompatibilnost, preprost način priprave in enostavno polnjenje v kapsule (5, 4);
- **razred II** obsega zmesi olj in lipofilnih emulgatorjev, ki v vodnem mediju tvorijo emulzijo tipa olje v vodi (O/V). Predstavnike tega razreda imenujemo tudi samoemulgirajoči sistemi (SES) (4);
- z dodatkom hidrofilnih emulgatorjev in sotopil, kot so etanol, propilen glikol in polietilen glikol dobimo samo(mikro)emulgirajoče sisteme (S(M)ES), ki jih uvrščamo v **razred III**. Razred III se lahko dalje deli na bolj lipofilen podrazred IIIA in na bolj hidrofilen podrazred IIIB. V podrazredu IIIA so SES z vodotopnimi PAS, ki ob stiku z vodno fazo tvorijo disperzijo z velikostjo kapljic pod 300 nm, v podrazredu IIIB pa so SMES z vodotopnimi površinsko aktivnimi snovmi (PAS), ki ob stiku z vodnim medijem tvorijo transparentne mikroemulzije z velikostjo kapljic pod 100 oz. 50 nm (6);
- **razred IV** vsebuje zmes hidrofilnih emulgatorjev in sotopil, ki po razredčenju z vodo tvorijo raztopine micelov. Ti sistemi imajo veliko solubilizacijsko kapaciteto za ZU s porazdelitvenim koeficientom od 2 do 4, njihova slabost pa je, da se lahko vgrajene učinkovine med dispergiranjem sistema hitro in v velikem obsegu oborijo (4).

## 1.2. SAMO(MIKRO)EMULGIRAJOČI SISTEMI (S(M)ES)

S(M)ES uvrščamo v podrazred IIIB na osnovi klasifikacijskega sistema na lipidih osnovanih sistemov. To so bistre, transparentne in izotropne zmesi naravnih ali sinteznih lipidov, trdnih ali tekočih površinsko aktivnih snovi, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo emulzije ali mikroemulzije tipa O/V (1). Iz SES (samoemulgirajočih sistemov) po redčenju nastanejo emulzije z velikostjo kapljic med 100 in 300 nm, iz SMES pa mikroemulzije z ozko porazdelitvijo kapljic, katerih velikost je manjša od 100 oz 50 nm (7).

S(M)ES tvorijo (mikro)emulzije že pod vplivom peristaltičnega gibanja želodca in črevesja in v prisotnosti prebavnih sokov. Ker so S(M)ES brezvodni sistemi, je njihova prednost tudi možnost polnjenja v želatinske ali druge hidrofilne kapsule, kar pri klasičnih (mikro)emulzijah ni mogoče (1).

### 1.2.1. SESTAVA S(M)ES

Proces samoemulgiranja je specifičen za točno določene kombinacije lipida in PAS, koncentracije PAS in razmerje med lipidom in PAS, zato le točno definirane kombinacije osnovnih sestavin vodijo do učinkovitih S(M)ES (1).

#### *Olja*

Olja predstavljajo najpomembnejšo sestavino S(M)ES. Zagotavljajo solubilizacijo lipofilnih učinkovin, ščitijo učinkovino pred kemijsko in encimsko razgradnjo ter povečajo absorpcijo učinkovine iz prebavnega trakta.

Običajno posegamo po dolgo in srednjeveržnih trigliceridih in mešanih gliceridih z različno stopnjo nasičenosti, ki imajo dobro sposobnost raztapljanja in samo(mikro)emulgiranja, njihovi razgradni produkti pa so enaki fiziološkim (1, 7).

*UVOD****Površinsko aktivne snovi***

Površinsko aktivne snovi oz. emulgatorji so amfifilne snovi, ki se razporedijo na medfazo olje – voda, s čimer zmanjšajo medfazno napetost in omogočijo nastanek stabilne emulzije. Predstavljajo tudi mehansko oviro za koalescenco kapljic (7, 8).

Najpogosteje se uporabljajo neionski emulgatorji z relativno visoko HLB vrednostjo, kot so npr. glikozilirani etoksilirani gliceridi ter polisorbati. Pri izbiri primerne emulgatorja igra največjo vlogo varnost, zato imajo kljub omejeni sposobnosti samo(mikro)emulgiranja naravne PAS prednost pred sintezni (1). Neionske PAS so manj toksične od ionskih, njihova uporaba pa vpliva na reverzibilne spremembe v permeabilnosti črevesne stene (7, 9).

Za tvorbo stabilnih S(M)ES je potrebna optimalna zmes emulgatorjev z nizkimi in visokimi HLB vrednostmi. V S(M)ES so potrebne koncentracije emulgatorja od 30 do 60 %. Pomembno je, da izberemo čim nižje deleže PAS, saj s tem zmanjšamo draženje prebavnega trakta. Za hiter nastanek (mikro)emulzije tipa O/V in dobro porazdelitev le-te po prebavnem traktu je ključno, da v S(M)ES vključimo hidrofilen emulgator z relativno visoko HLB vrednostjo (1).

***Sotopila***

Izdelava optimalnih S(M)ES pogosto zahteva uporabo visokih koncentracij emulgatorjev, zato se poslužujemo dodajanja sotopil in koemulgatorjev. Organska topila, kot so etanol, propilenglikol in polietilenglikol, lahko raztopijo večje količine hidrofilnih emulgatorjev in učinkovine v lipidni fazi, prav tako pa so primerna za peroralno uporabo (1).

Slabost omenjenih topil je izhlapevanje iz pripravka ali prehajanje v ovojnico mehkih in trdnih želatinskih kapsul, kar lahko povzroči obarjanje učinkovine. Razvoj S(M)ES gre tako v smeri sistemov brez alkoholov in drugih hlapnih topil (1, 7).

**1.2.2. MEHANIZEM NASTANKA (MIKRO)EMULZIJE**

Iz S(M)ES se ob stiku z vodnim medijem prebavnih sokov in pod vplivom peristaltičnega gibanja črevesja in želodca tvorijo (mikro)emulzije tipa O/V. Samo(mikro)emulgiranje je spontan proces, ker je prosta energija, ki je potrebna za tvorbo (mikro)emulzije, negativna

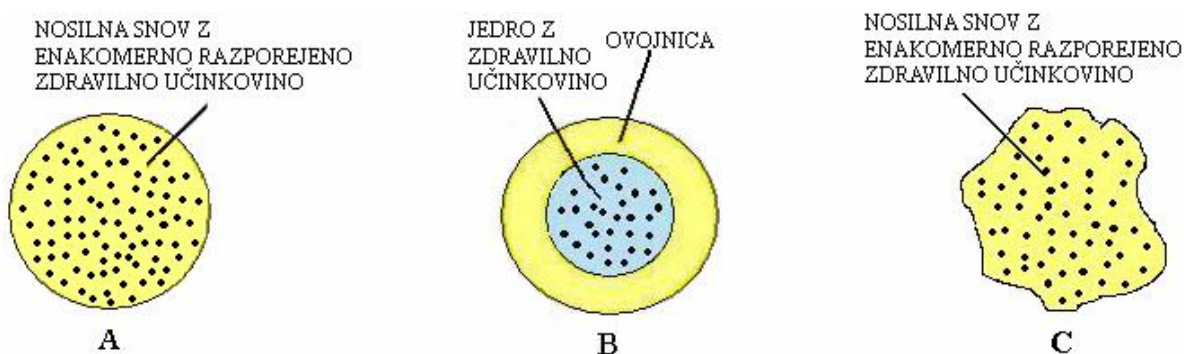
## UVOD

ali zelo nizko pozitivna. Za samo(mikro)emulgirajoči proces je pomembna nizka medfazna napetost med oljno in vodno fazo ter prekinitvev medfaze, ki jo povzroči penetracija vode v oljno fazo ali sotopila iz S(M)ES v vodno fazo. Nastale mikroemulzije so termodinamsko stabilni sistemi (1, 7).

### 1.3. MIKROKAPSULE

Mikrokapsule so majhni, trdni in okrogli delci velikosti od 1 do 1000  $\mu\text{m}$ . Glede na obliko in notranjo zgradbo ločimo (slika 1):

- *mikrokapsule filmskega tipa*, kjer jedro vsebuje mikrokapsulirano snov in je obdano z ovojnico;
- *mikrosfere oz. ogrodni tip mikrokapsul* so okrogli delci, kjer sta mikrokapsulirana snov in ogrodni material razporejena po celotnem volumnu delca;
- *mikrodelci* so nepravilnih oblik, mikrokapsulirana snov in ogrodni material pa sta kot pri mikrokapsulah razporejeni po celotnem volumnu (10, 11).



**Slika 1:** Shematski prikaz mikrosfere (A), mikrokapsule (B) in mikrodelca (C).

V literaturi se izrazi za vse tri oblike pogosto ne uporabljajo dosledno. Izraz mikrokapsule se velikokrat uporablja za vse tri oblike delcev (mikrokapsule, mikrosfere in mikrodelce) ter označuje delce mikrometrskih velikosti, sestavljene iz snovi, ki jo mikrokapsuliramo in ogrodne snovi, ne glede na notranjo strukturo in obliko delcev. V farmaciji predstavljajo mikrokapsule nosilni sistem, ki je sestavljen iz trdnega ali tekočega jedra z učinkovino in ovojnice, ki je najpogosteje iz različnih polimerov (10).

### 1.3.1. OVOJNICA MIKROKAPSUL

Za izdelavo mikrokapsul s trdno in čvrsto ovojnico je ključnega pomena izbira ustreznega materiala za ovojnico oz. ogrodje mikrokapsul. Za uspešen postopek mikrokapsuliranja štejeemo proces, kjer uspemo izdelati polprepustno ovojnico, ki varuje učinkovino pred vplivi okolja in zagotavlja ustrezno mehansko stabilnost sistema. Z izbiro ustreznega polimera lahko dosežemo tudi nadzorovano sproščanje učinkovine iz jedra (12). Primerni materiali za ovojnico so različni proteini (albumin, želatina), gumiji (alginati, pektini, arabski gumi), sladkorji in derivati sladkorja (fruktoza, glukoza, oligosaharidi), škrob in njegovi derivati, lipidi, pa tudi sintezni polimeri, kot so polovinilpirolidon, polimlečna kislina, poliglikolna kislina... (11, 13). Prednost sinteznih polimerov je kemijska stabilnost in možnost prilagajanja njihove strukture glede na naše potrebe. Kljub temu pa se v farmaciji še vedno večinoma uporabljajo naravni polimeri, saj so biokompatibilni, biorazgradljivi in netoksični (14).

V nadaljevanju so podrobneje predstavljeni polimeri in polnila, ki smo jih uporabili za izdelavo ovojnice mikrokapsul.

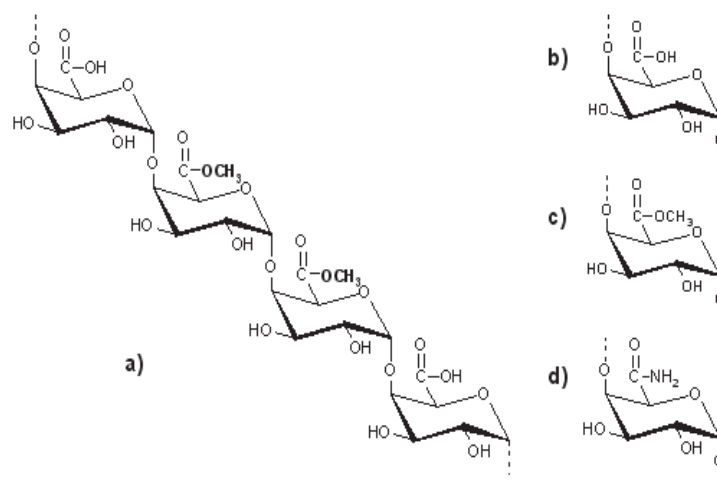
#### 1.3.1.1. POLIMERI

##### *Pektin*

Pektin je naravni polisaharid, ki se nahaja v celični steni rastlin. Danes ga pridobivamo predvsem z ekstrakcijo iz jabolk in agrumov. Uporaba pektina je zelo razširjena v farmacevtski, kozmetični in prehrabeni industriji. Kljub temu, da je bil pektin odkrit že pred več kot 200 leti, njegova struktura še vedno ni popolnoma poznana. Strukturo pektina zelo težko določimo, saj se spreminja med izolacijo iz rastlin, shranjevanjem in med obdelavo rastlinskega materiala.

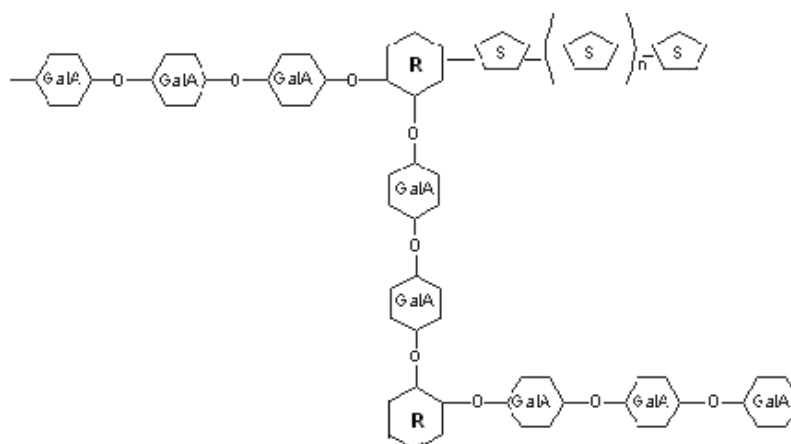
V osnovi je pektin linearen polimer, sestavljen iz D-galakturonske kisline in metilnih estrov D-galakturonske kisline, med seboj pa so te enote povezane z  $\alpha$ -(1,4) glikozidnimi vezmi. Galakturonska kislina ima prisotne karboksilne skupine, ki so v lahko proste, zaestrene, ali pa v obliki amida (slika 2) (15).

## UVOD



**Slika 2:** a) Segment molekule pektina in funkcionalne skupine: b) karboksilna; c) esterska; d) amidna v pektinski verigi (15).

Linearno strukturo pektina na določenih mestih prekinjajo z (1,2)-povezavami vezane ramnoze in nekateri drugi nevtralni sladkorji, kot so arabinoza, galaktoza in ksiloza (slika 3) (15, 16).



**Slika 3:** Shematski prikaz vključevanja ramnoze in drugih sladkorjev v linearno verigo pektina; S = nevtralni sladkor, R = ramnoza, GalA = galakturonska kislina (15).

Pektini se med sabo razlikujejo v stopnji zaestrenosti. To je razmerje med številom zaestrenih karboksilnih skupin in številom vseh karboksilnih skupin v verigi. Glede na stopnjo zaestritve delimo pektine v dve skupini, v visoko zaestrene (angl.: high methoxyl –

*UVOD*

HM) in nizko zaestrene pektine (angl.: low methoxyl – LM). Visoko zaestreni pektini imajo zaestrenih od 60 do 75 % D-galakturonskih kislin in v prisotnosti sladkorjev in pH vrednosti okoli 3 tvorijo termično reverzibilne gele. Nizko zaestreni pektini imajo med 20 in 40 % zaestrenih karboksilnih skupin, gelirajo pa v prisotnosti kalcijevih ali drugih dvovalentnih ionov. Tvorba gelov je pri nizko zaestrenih pektinih neodvisna od prisotnosti sladkorjev, prav tako pa so manj občutljivi na spremembe pH (15, 17).

Pri visoko zaestrenih pektinih temelji nastanek gela na vzpostavitvi vodikovih vezi in hidrofobnih interakcijah. V nevtralni ali rahlo kisli disperziji pektina je večina karboksilnih skupin v ionizirani obliki, kar prispeva k negativnemu naboju molekule in odboju med verigami. Z dodatkom kisline ionizirane karboksilne skupine preidejo v neionizirano obliko, ki ima večjo sposobnost tvorbe vodikovih vezi, zmanjša pa se tudi afiniteta pektina do vode. Manjšo hidratacijo molekul pektina dosežemo tudi z dodatkom sladkorjev, ki tekmujejo za vezavo vode. Rezultat je povezovanje polisaharidnih verig pektina med seboj in tvorba gela (15).

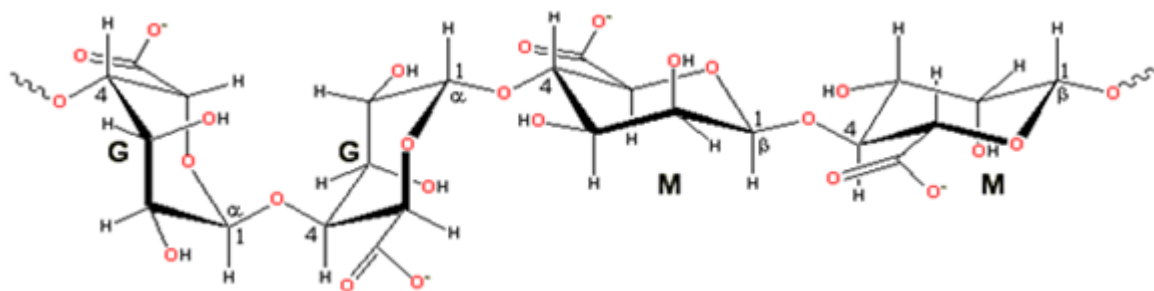
Mehanizem geliranja LM-pektinov je drugačen kot pri HM-pektinih. Tukaj nastane gel kot rezultat ionskega povezovanja karboksilnih skupin dveh verig s pomočjo kalcijevih mostičkov, znanega tudi kot »model škatle za jajca«. Prisotnost amidnih skupin v verigi poveča zmožnost geliranja LM-pektinov. Na območju amidnih skupin pride do nastanka dodatnih vodikovih vezi, zato nastanek gela v tem primeru ne moremo razložiti z uporabo prej opisanega modela (15).

***Alginska kislina***

Alginska kislina je naravni polisaharid, ki se nahaja v celični steni rjavih morskih alg v obliki soli z dvovalentnimi ioni. Je linearen kopolimer  $\beta$ -D-manuronske kisline (M) in  $\alpha$ -L-guluronske kisline (G), ki sta med sabo povezani z  $\alpha$  ali  $\beta$ -(1,4) glikozidno vezjo (18). M in G enote se med seboj povezujejo, tako nastanejo poli-M in poli-G bloki, ki so med seboj ločeni s predeli, kjer se G in M monomerni enoti izmenjujeta (slika 4) (19, 20, 21).

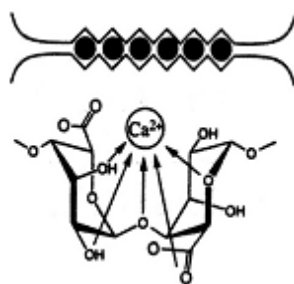


## UVOD



**Slika 4:** *Struktura alginata; GG, GM, MM sekvenca (25).*

Alginska kislina se v vodi nahaja v neionizirani obliki in je netopna, topnost njenih soli pa je odvisna od pH in od vrste prisotnih kationov. Soli alginske kisline z enovalentnimi ioni so vodotopne in v vodi tvorijo viskozne koloidne raztopine s psevdoplastičnimi lastnostmi. V prisotnosti dvovalentnih kovinskih ionov (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ) pa nastane ionotropen gel. Kalcijevi ioni prečno povežejo odseke guluronskih kislin in s tem povzročijo njihovo preureditev v urejeno tridimenzionalno strukturo, ki je dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi in ima obliko škatle za jajca (slika 5). Za tvorbo gela so pomembni le poli-G bloki alginske kisline, saj imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v hidroksilnih in karboksilnih skupinah večjo afiniteto do večvalentnih kationov kot poli-M ali MG odseki (22).



**Slika 5:** *Shematski prikaz strukture škatle za jajca.*

Razmerje med manuronskimi in guluronskimi kisljinami se med različnimi vrstami alg lahko razlikuje, pomembno pa je, ker vpliva na tridimenzionalno strukturo polimera in posledično na sposobnost geliranja alginata. Alginati z večjim deležem G enot tvorijo bolj stabilne, na erozijo odporne, neelastične gele, medtem ko alginati z večjim deležem M enot tvorijo gele, ki so šibkejši, vendar tudi bolj elastični. Alginati z večjim deležem poli-G

*UVOD*

blokov imajo večjo afiniteto do premreževanja, zato lažje in močnejše gelirajo kot alginati z večjim deležem poli-M blokov (22).

Pri zniževanju pH raztopine alginata pod pKa manuronske ( $pK_a=3,38$ ) in pKa guluronske kisline ( $pK_a=3,65$ ) preide raztopina alginata iz sol v gel stanje. Kislinski gel, ki ob tem nastane, je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Pomembno je, da zniževanje pH-ja poteka počasi, saj se drugače lahko alginska kislina izobori. K tvorbi gela največ prispevajo poli-G odseki, nekoliko pa tudi poli-M odseki (22).

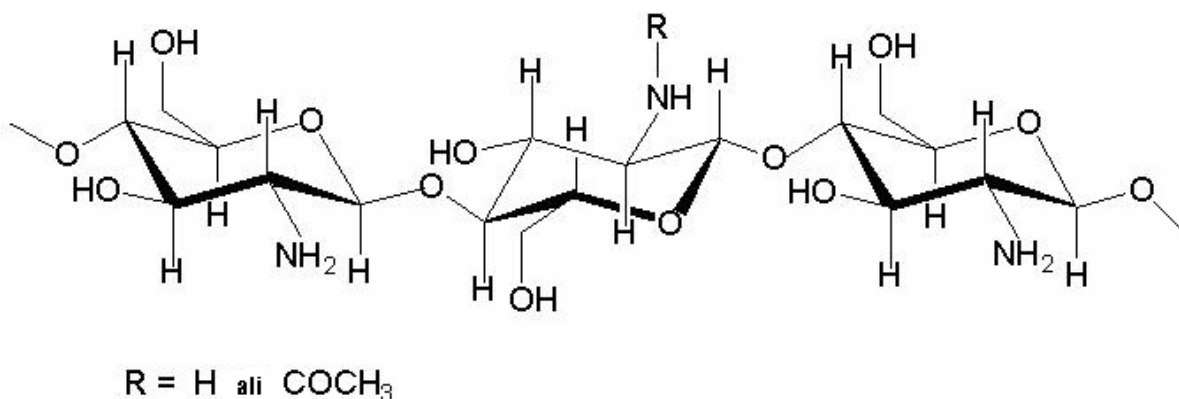
Alginati so netoksični in biorazgradljivi naravni materiali, ki se zaradi sposobnosti geliranja in nabrekanja široko uporabljajo tako v farmaciji, kot tudi v kozmetični, živilski in tekstilni industriji. V farmaciji se alginat uporablja v sistemih s prirejenim sproščanjem, npr. kot ogrodni polimer pri izdelavi večletnih ogrodnih sistemov ali enoletnih ogrodnih tablet, pri izdelavi mikrokapsul ali kot polimer za oblaganje farmacevtskih oblik. Pogosta je tudi uporaba alginata v oblogah za vlažno celjenje ran in zaustavljanje krvavitvev (22, 20, 23).

***Hitosan***

Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv kationski polisaharid. Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem polisaharida hitina, ki ga najdemo v oklepih rakov, nekaterih insektih in gobah. Kemijsko je hitosan kopolimer glukozamina in N-acetilglukozamina, povezan z  $\beta$ -(1,4) glikozidnimi vezmi (slika 6) (26).

Hitosan je v nevtralnem in alkalnem pH zaradi proste aminske skupine netopen, v kisljih raztopinah pa se aminske skupine glukozamina protonirajo in hitosan se lahko raztopi (24). V kislem mediju se pozitivno nabite molekule hitosana povezujejo v komplekse s pektinom, alginatom in drugimi polianioni, kar pogosto izkoriščamo v razvoju sistemov s prirejenim sproščanjem (25). Na tržišču so hitosani z različno molekulsko maso, viskoznostjo in stopnjo deacetiliranja. Na topnost hitosana vpliva tudi stopnja deacetiliranja: hitosan s 40 % stopnjo deacetiliranja je vodotopen do pH 9, pri 85 % stopnji deacetiliranja pa le še do pH 6,5 (26).

## UVOD



**Slika 6:** *Struktura hitosana.*

Hitosan ima dobre bioadhezivne lastnosti zaradi tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami hitosana in negativno nabito sialično kislino, ki je prisotna v glikoproteinih na površini sluznice. Lahko se adherira tako na trda kot na mehka tkiva, vendar pa je sposobnost bioadhezije omejena s topnostjo posameznih derivatov hitosana. V farmaciji se sposobnost bioadhezije hitosana pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov, najpogosteje mikro- in nanodelcev ter liposomov. Omogoča daljši čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije in tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico. V razvoju novih dostavnih sistemov se izkorišča tudi lastnost hitosana, da je dober pospeševalec absorpcije, kar skupaj z bioadhezijo vodi v večjo biološko uporabnost vgrajene učinkovine (26).

Hitosan se uporablja tudi v sistemih za vlažno celjenje ran. Pospešuje celjenje ran, tako da se veže na fibroblaste in spodbuja proliferacijo keratinocitov in s tem obnavljanje povrhnjice. Deluje tudi protimikrobno, saj se adsorbira na površino bakterij, s tem povzroči spremembe v strukturi celične stene in v propustnosti celične membrane, posledica tega pa je smrt bakterij. Hitosan se uporablja tudi v nekaterih pripravkih za hujšanje. Izkorišča se njegova lastnost, da v prebavnem traktu tvori gel, ki veže lipide in druga hranila ter s tem zmanjša njihovo absorpcijo (26).

### 1.3.1.2. POLNILA IN TVORCI POR

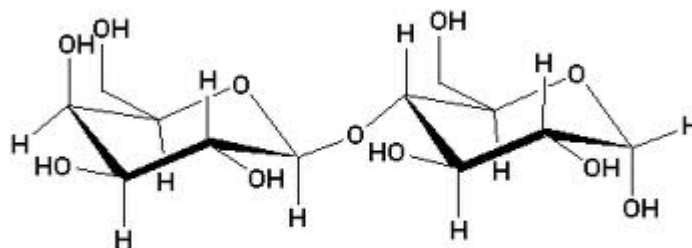
Polnila so snovi za dopolnjevanje mase ali volumna, če je količina zdravilne učinkovine premajhna. Tvorci por so v vodi topne in neaktivne pomožne snovi, ki se uporabljajo za

## UVOD

pospeševanje sproščanja učinkovine iz ogrodja (27). Tvorci por imajo lahko v hidrofilnem ogrodju tudi vlogo polnila, saj zapolnijo prazne prostore v polimernem ogrodju. Ko pride farmacevtska oblika v stik z vodnim medijem (želodčno vsebino), polimer počasi nabreka in hidratira, tvorci por pa se dokaj hitro raztopijo in omogočijo več prostora za sproščanje učinkovine z difuzijo. Najpogosteje uporabljena polnila so laktoza, karboksimetil celuloza, hidroksipropilmetil celuloza, manitol, sorbitol... (27).

**Laktoza**

Laktoza oz. mlečni sladkor je bel ali skoraj bel kristaliničen prah brez vonja in rahlo sladkega okusa. Kemijsko je disaharid glukoze in galaktoze, ki sta povezani z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo ( $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1,4)- $\alpha$ -D-glukopiranoza) (slika 7).



**Slika 7:** *Struktura laktoze.*

Laktoza je stroškovno lahko dostopno polnilo, njene prednosti pa so še nehigroskopska, biološka kompatibilnost, relativna inertnost in hitro raztapljanje v vodi (28). V trdni obliki se laktoza pojavlja kot  $\alpha$ -laktoza monohidrat, brezvodna  $\alpha$ -laktoza, brezvodna  $\beta$ -laktoza in amorfna laktoza. Različne oblike se razlikujejo po fizikalnih lastnostih. Laktoza se najpogosteje uporablja kot polnilo in kot tvorec por pri izdelavi kapsul in ogrodnih tablet. Na tržišču so na voljo različne oblike laktoze, ki se razlikujejo v porazdelitvi velikosti delcev, pretočnih lastnostih in kompresibilnosti (29).

*UVOD****Natrijev klorid***

Natrijev klorid se nahaja v obliki belega kristaliničnega praška ali brezbarvnih kristalov. Je dobro topen v vodi in slanega okusa. V farmaciji so ga včasih dodajali kot drsilo in polnilo v kapsule in tablete, v današnjem času pa so ga v ta namen večinoma nadomestili drugi materiali. Natrijev klorid je zelo pomemben za regulacijo osmotskega tlaka, zato se pogosto uporablja v parenteralnih raztopinah in v farmacevtskih oblikah za oko. V tabletah z nadzorovanim sproščanjem se uporablja kot tvorec por, v tehnologiji mikrokapsuliranja pa omogoča kontrolo sproščanja zdravilne učinkovine iz mikrokapsul (29).

**1.4. METODE IZDELAVE MIKROKAPSUL**

Mikrokapsuliranje je postopek izdelave delcev mikrometrskih velikosti, sestavljenih iz zdravilne učinkovine in ogrodne snovi. Postopek se je začel uporabljati v 30. letih prejšnjega stoletja, ko so to tehnologijo pričeli uporabljati v proizvodnji arom in vitaminov, v komercialno rabo pa so jo uvedli z izdelavo brezsajnega kopirnega papirja. Danes se tehnologija mikrokapsuliranja široko uporablja v farmaciji, biotehnologiji, kmetijstvu, prehranski in kozmetični industriji. Mikrokapsuliranje nam omogoča zaščito vgrajene učinkovine pred vplivi okolja, prekrivanje neprijetnega okusa in vonja zdravilne učinkovine, nadzorovano sproščanje učinkovine iz mikrokapsul, izboljšanje dispergiranja slabo topnih učinkovin v vodnem mediju, ločitev reaktivnih sestavin zmesi, spremembo agregatnega stanja in možnost izboljšanja biološke uporabnosti peptidov in proteinov (10, 30, 13).

Mikrokapsule pridobivajo vedno večji pomen na številnih področjih, zato se je do danes razvilo veliko število različnih metod mikrokapsuliranja. Ne glede na mehanizem nastanka mikrokapsul lahko vsako od metod razdelimo v tri osnovne korake:

- učinkovino najprej vgradimo v sistem, ki bo kasneje tvoril ogrodje ali jedro mikrokapsule. Ta sistem je lahko v obliki raztopine, suspenzije ali pa emulzije;
- nato sledi oblikovanje oz. izdelava mikrokapsul. Kadar imamo matriks v tekoči obliki, ga dispergiramo v zraku, v drugi tekočini ali pa v superkritičnem fluidu. Pri uporabi matriksa v trdnem stanju pa na gibajoče delce matriksa razpršujemo raztopino za oblaganje;

## UVOD

- po izdelavi mikrokapsul je le-te potrebno še utrditi oz. stabilizirati. Pri tem uporabimo kemijske (polimerizacija), fizikalno-kemijske (koacervacija, geliranje) ali fizikalne postopke (sušenje, obarjanje, strjevanje) (13).

Metode za izdelavo mikrokapsul lahko v grobem razdelimo na kemijske, fizikalno-kemijske in fizikalno-mehanske metode (preglednica II). V nadaljevanju so podrobneje predstavljene metode ekstruzije curka, ki smo jih tudi uporabili pri našem delu.

**Preglednica II:** Razdelitev metod mikrokapsuliranja.

| Metode             |  |
|--------------------|--|
| Kemijske           | Medfazna polimerizacija<br>In situ polimerizacija  |
| Fizikalno-kemijske | Koacervacija (enostavna, kompleksna)<br>Tehnologije s superkritičnimi fluidi<br>Metoda odparevanja topila<br>Ohlajevanje dispergirane taline<br>Oblaganje plast-na-plast |
| Fizikalno-mehanske | Metode ekstruzije curka<br>Sušenje z razprševanjem<br>Mikrokapsuliranje z razprševanjem<br>Mikrokapsuliranje v bobnih  |

### 1.4.1. METODE EKSTRUZIJE CURKA

Metode ekstruzije curka tekočine temeljijo na razbitju laminarnega toka tekočine v enako velike kapljice z uporabo različnih tehnik. Z enostavnimi metodami ekstruzije črpamo raztopino polimera skozi enojno šobo, pri tem nastanejo mikrosfere. Za izdelavo mikrokapsul pa uporabimo metode koekstruzije curka. Pri teh metodah uporabljamo koncentrične šobe, kjer fazo z jedrnim materialom črpamo skozi notranjo, fazo z ogrodnim

## UVOD

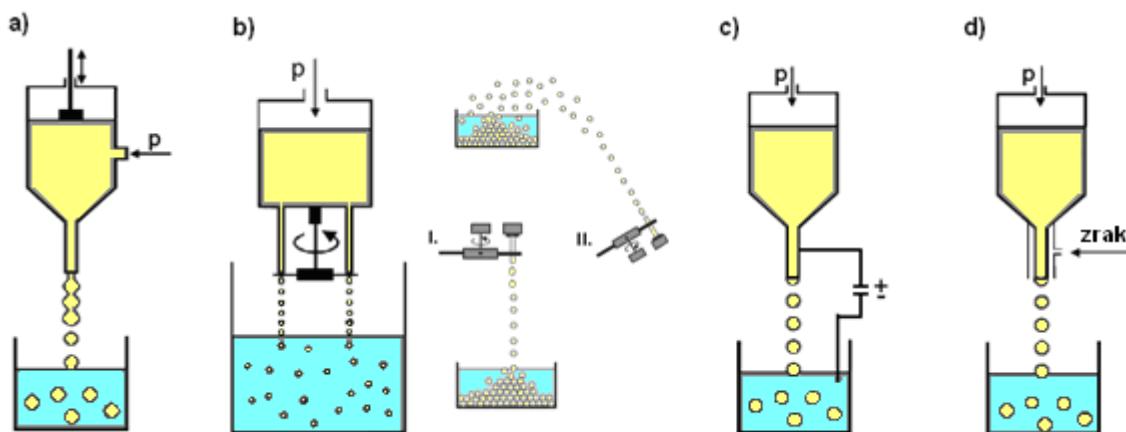
materialom pa skozi zunanjo šobo. Pri potiskanju tekočine skozi šobo se pod vplivom tlaka tvori laminaren curek, ki ga z uporabo različnih tehnik razbijemo v drobne kapljice. Nastanejo neutrjene mikrokapsule, ki jih nato utrdimo s termičnim ali kemijskim premreževanjem, ohlajanjem, odparevanjem topila in drugimi primernimi postopki (13).

Pri **metodi z vibrirajočo membrano** (slika 8a) tlačilka ali kompresor na stisnjen zrak potiskata tekočino skozi šobo. Nad šobo enkapsulatorja se nahaja membrana, ki vibrira z določeno frekvenco in amplitudo. Pod vplivom slednje se laminaren tok tekočine razbije v enakomerno velike kapljice. Nastale mikrokapsule nato potujejo skozi električno polje, kjer se njihova površina nabije in povzroči odbojne sile med njimi. S tem se prepreči zlepljanje mikrokapsul med padanjem v raztopino premreževala. Prednost tega postopka je ozka porazdelitev velikosti nastalih mikrokapsul, omogoča pa tudi delo v aseptičnih pogojih. Potrebno je biti pozoren na viskoznost tekočine, ki ne sme biti previsoka, saj lahko pride do mašenja šob (13, 31).

**Metoda »jet cutter«** omogoča uporabo tudi visoko viskoznih raztopin. Ima večjo kapaciteto proizvodnje kot metoda z vibrirajočo membrano, zato se pogosto uporablja tudi v industriji. Laminaren tok tekočine razbijemo s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami. Pri tem nastanejo delci cilindrične oblike, ki pa se zaradi površinske napetosti oblikujejo v sferične mikrokapsule. Te je potrebno nato še utrditi v raztopini za utrjevanje. Glede na obliko krivulje leta nastalih mikrokapsul proti raztopini za utrjevanje ločimo *navaden postopek*, kjer mikrokapsule padajo navpično navzdol in *postopek z mehkim pristankom*, kjer mikrokapsule usmerimo diagonalno navzgor, s čimer močno zmanjšamo njihovo hitrost ob padcu v raztopino za premreževanje (slika 8b) (13).

**Metoda elektrostatske ekstruzije** temelji na razbitju curka tekočine pod vplivom delovanja elektrostatskih sil (slika 8c). Z izbiro procesnih parametrov lahko vplivamo na velikost mikrokapsul ter na naboj na njihovi površini. S to metodo lahko izdelamo mikrokapsule zelo majhnih velikosti, vendar pa metoda zaenkrat še ni dovolj produktivna za uporabo v industriji (13).

## UVOD



**Slika 8:** Shematska slika naprav za mikrokapsuliranje z metodo z vibrirajočo membrano (a), »jet cutter«; normalen postopek - I. in postopek z mehkim pristankom kapsul - II. (b), elektrostatsko ekstruzijo (c) in koaksialnim tokom zraka (d).

Pri **metodi s koaksialnim tokom zraka** (slika 8d) dovajamo raztopino ogrodnega materiala skozi notranjo šobo, skozi zunanjo šobo pa pod tlakom vpihujemo zrak ali dušik. Tok zraka na izhodu koncentrične šobe prekinja tok tekočine, pri tem se tvorijo mikrokapsule, ki jih je nato potrebno še učvrstiti (13).

## 1.5. ENKAPSULATOR INOTECH IE-50 R

Za izdelavo mikrokapsul smo uporabili enkapsulator Inotech IE-50 R (slika 9), ki je polavtomatska naprava za inkapsuliranje zdravilnih učinkovin ter živalskih, rastlinskih in mikrobnih celic ali drugih biomolekul. Izdelava mikrokapsul temelji na metodi koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane.

Z napravo lahko izdelamo mikrokapsule velikosti od 10  $\mu\text{m}$  do 1000  $\mu\text{m}$  in več. Omogočena je izdelava mikrokapsul v milih pogojih z visoko produktivnostjo, s kontrolo različnih nastavljivih parametrov pa lahko dosežemo ozko porazdelitev velikosti mikrokapsul in dobro ponovljivost med posameznimi serijami (32).



## UVOD



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

Glavni enoti enkapsulatorja sta reakcijska posoda in kontrolna enota. Na *kontrolni enoti* lahko nastavimo različne parametre izdelave mikrokapsul:

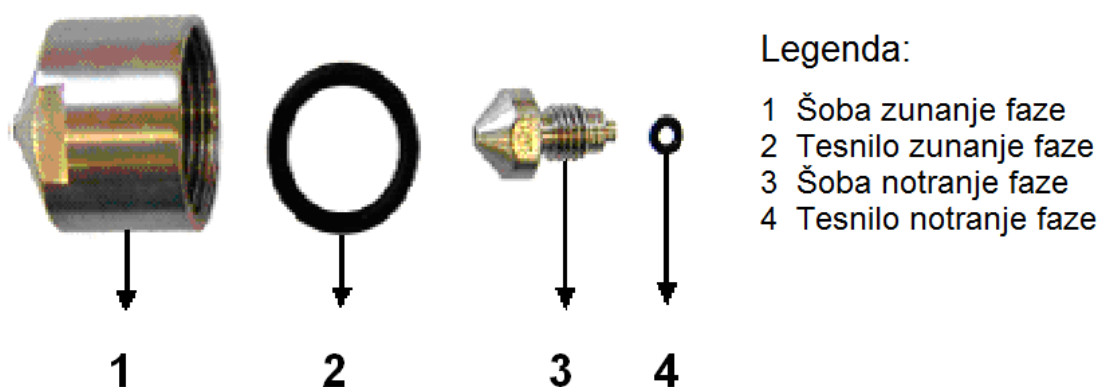
- frekvenca nihanja membrane: membrana lahko niha v nizkem območju (med 50 in 440 Hz) ali v visokem območju (med 430 in 7000 Hz);
- amplituda: nastavev je relativna z razponom od 1 do 7;
- električna napetost: z električno napetostjo dosežemo, da postane površina mikrokapsul nabita in s tem preprečimo zlepljanje delcev v reakcijski posodi. Uporablja se območje napetosti med 400 in 1800 V;
- relativna hitrost tlačilke za brizgo: relativno hitrost pretoka lahko nastavimo od 0 do 1000, dejanska hitrost pa je odvisna tudi od premera šobe in viskoznosti raztopine;
- regulator tlaka: z vrednostjo tlaka kontroliramo hitrost pretoka raztopine za enkapsuliranje, nastavimo lahko vrednosti med 0,4 in 1 bar;
- hitrost mešala;
- jakost stroboskopske luči.

Na kontrolno ploščo je priključena *reakcijska posoda*. V njej je raztopina za premreževanje, ki jo mešamo na magnetnem mešalu. V reakcijsko posodo zbiramo

## UVOD

nastajajoče mikrokapsule. Ta sistem lahko po potrebi tudi zapremo in avtoklaviramo ter s tem zagotovimo ustrezno okolje za aseptično izdelavo mikrokapsul (32).

Enkapsulator Inotech IE-50 R omogoča izdelavo mikrokapsul s sistemom koncentričnih šob (dvokanalna šoba). Glavna sestavna dela *enote s koncentrično šobo* sta koncentrična pulzirajoča glava z magnetom in membrano ter koncentrična šoba iz nerjavnega jekla, sestavljena iz dveh šob (slika 10). Premeri šob se gibljejo med 100 in 1000  $\mu\text{m}$ , premer notranje šobe je manjši od premera zunanje šobe. Kadar izdelujemo mikrosfere, uporabimo samo šobo zunanje faze (32).

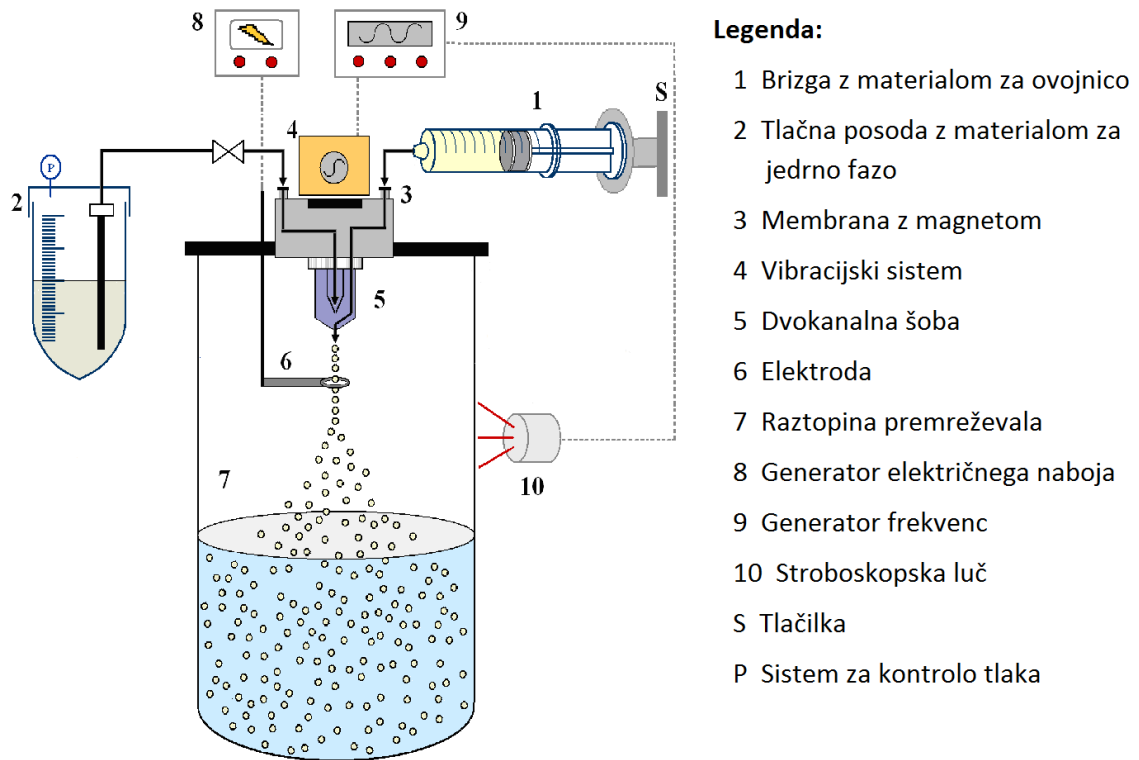


**Slika 10:** Sistem koncentrične šobe iz nerjavnega jekla.

### 1.5.1. TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROKAPSUL

Snov, ki jo inkapsuliramo in material za ovojnico napolnimo v ločeni brizgi ali tlačni posodi. Kompressor na stisnjen zrak ali tlačilki nato potiskata obe tekočini proti koncentrični šobi. Tekočini tvorita laminaren tok, ki potuje skozi šobi. Na izhodu iz šobe se pod vplivom nihanja membrane razbije na koncentrične in enako velike kapljice. Kapljice nato padajo skozi električno polje med šobo in elektrodo. Pri tem se njihova površina nabije, kar prepreči zlepljanje kapljic. V zadnji stopnji padejo kapljice v raztopino za premreževanje. Nastajanje mikrokapsul lahko ves čas opazujemo s pomočjo stroboskopske luči (slika 11) (33).

## UVOD



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

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je izdelava mikrokapsul s trdno ovojnico in samomikroemulgirajočim jedrom, ki vsebujejo furosemid kot modelno zdravilno učinkovino. Mikrokapsule bomo izdelali s pomočjo enkapsulatorja Inotech IE-50 R z metodo koekstruzije curka tekočine z vibrirajočo membrano. Pri delu bomo uporabili sistem koncentričnih šob 500  $\mu\text{m}$ /750  $\mu\text{m}$ . Pri tem bomo zunanjo fazo dovajali s pomočjo injekcijske brizge, notranjo pa s pomočjo kompresorja s stisnjenim zrakom.

Najprej bomo pripravili SMES, ki bo sestavljen iz lipofilne faze Miglyol 812<sup>®</sup>, emulgatorja Labrasol<sup>®</sup> in koemulgatorja Plurol oleique<sup>®</sup>. Določili bomo topnost furosemida v SMES z različno vsebnostjo emulgatorjev in oljne faze. Na podlagi rezultatov in področja nastanka mikroemulzije po redčenju SMES z vodno fazo bomo izbrali sistem z optimalno sestavo z vidika solubilizacijske kapacitete za vgradnjo furosemida.

Nato bomo pripravili raztopine za izdelavo ovojnice mikrokapsul. Z namenom preučevanja vpliva različnega razmerja med alginatom in pektinom v ovojnici mikrokapsul na lastnosti le-teh bomo 2 % raztopino alginata in 2 % raztopino pektina zmešali v različnih razmerjih. V vodno raztopino polimera bomo dodali 5 % laktoze in 1 % NaCl, ki bosta imela vlogo polnila, ki bo omejilo iztekanje jedrne faze med izdelavo in sušenjem mikrokapsul. NaCl ima še dodatno vlogo, in sicer omejitvev mašenja šobe enkapsulatorja, saj prepreči prekomerno premreženje ovojnice mikrokapsul na medfazi jedro-ovojnica ob toku obeh faz skozi šobo. Izdelane mikrokapsule bomo dodatno učvrstili z oblogo iz hitosana in jih posušili v vrtinčnoslojnim sušilniku oz. na zraku. Določili jim bomo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom in spremljali sproščanje furosemida v različnih medijih.

Izdelali bomo tudi referenčne mikrosfere, ki ne vsebujejo SMES z ZU v jedru, sestava njihovega ogrodja pa bo identična s sestavo ovojnice izdelanih mikrokapsul. Mikrosfere bomo izdelali z namenom proučevanja nabrekanja in erozije polimernega ogrodja in posledično vpliva na mehanizem sproščanja ZU iz mikrokapsul.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

##### *Plurol oleiqe*<sup>®</sup>

Plurol oleiqe<sup>®</sup> (Gattefossé, Saint-Priest, Francija) je viskozna tekočina temno rumene barve z značilnim vonjem. Je dobro topen v kloroformu, metilenkloridu ter v rastlinskih in mineralnih oljih. V etanolu je zmerno topen, medtem ko ga v vodi lahko dispergiramo. Ima HLB vrednost 6. Kemično je diester poliglicerola-6 in oleinske kisline. Uporabljamo ga kot emulgator, koemulgator ali pospeševalec penetracije v farmacevtskih pripravkih za dermalno uporabo. V peroralnih oblikah povečuje biološko uporabnost učinkovine (34).

##### *Labrasol*<sup>®</sup>

Labrasol<sup>®</sup> (Gattefossé, Saint-Priest, Francija) je viskozna tekočina blede rumene barve, ki jo lahko dispergiramo v vroči vodi in je dobro topna v metilenkloridu. Kemično je zmes mono-, di- in trigliceridov oktanojske in dekanajske kisline ter mono- in diestrov makrogola z oktanojsko in dekanajske kisline. Ima HLB vrednost 14.

Uporabljamo ga kot solubilizator za težko topne učinkovine v pripravkih za peroralno uporabo, kot pospeševalec penetracije v dermalnih pripravkih in emulgator v mikroemulzijah. Primeren je za pripravo SMES (34, 35). Je inhibitor P-glikoproteina na apikalni membrani celic intestinalne sluznice, ki deluje kot od ATP odvisna efluks črpalka za mnoge zdravilne učinkovine (4).

##### *Miglyol 812*<sup>®</sup>

Miglyol 812<sup>®</sup> (Sasol GmbH, Nemčija) je rahlo rumena, oljnata tekočina brez vonja in okusa. V vodi je slabo topen, meša pa se z alkoholom, metilenkloridom, maščobnimi olji in lahкими ogljikovodiki. Kemično je zmes trigliceridov s srednje dolgimi verigami C8 in C10. Pridobivajo ga s hidrolizo kokosovega olja, ekstrahiranega iz trde, posušene frakcije endosperma *Cocos nucifera* (L.) ali *Elaeis guineensis* (Jacq.). Je netoksičen in nedražeč, zato se lahko uporablja tako v peroralnih in dermalnih kot tudi parenteralnih farmacevtskih oblikah. Po zaužitju se hitro metabolizira in se ne skladišči v obliki telesne maščobe (36).

*MATERIALI IN METODE****Pektin***

Pektin (CP Kelco, Danska) je rumenorjav prah brez vonja. Je naravni polisaharid, ki je po kemijski strukturi metilni ester poligalakturonske kisline. Pridobivajo ga večinoma iz zaostale jabolčne kaše po stiskanju sokov in iz lupine agrumov. Sposobnost tvorbe gela pri pektinih je odvisna od velikosti molekule in stopnje zaestritve.

Na področju farmacije ima pektin velik pomen pri pripravi dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem (15, 17).

***Alginska kislina, natrijeva sol***

Natrijev alginat (Sigma, Nemčija) je bel ali blede rumenorjav prah brez vonja in okusa. Kemijsko je natrijeva sol alginske kisline, ki je mešanica poliuronskih kislin  $[(C_6H_8O_6)_n]$ . Sestavljena je iz D-manuronske in L-manuronske kisline in jo pridobivajo predvsem iz alg skupine Phaeophyceae (rjave alge). Počasi se raztaplja v vodi, pri čemer tvori viskozno koloidno raztopino. V vodnih raztopinah kislin s pH pod 3 je skoraj netopen, prav tako tudi v etanolu, etru, kloroformu ter ostalih organskih topilih, v katerih je etanola več kot 30 % (m/m) (37).

***Hitosan***

Hitosan (Fluka, Nemčija) je bel ali kremno bel prašek brez vonja. Je naravni polisaharid s kemijskim imenom poli- $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoza. Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem hitina, ki je skoraj v celoti sestavljen iz  $\beta$ -(1,4) vezanih N-acetilglukozaminskih enot (29). Topen je v kislem vodnem mediju, njegova topnost pa je odvisna od stopnje N-acetilacije. Tako lahko hitosan z vsaj 60 % stopnjo deacetilacije pretvorimo v topno obliko že z majhno količino kisline (38).

***Aerosil 200***

Aerosil 200 (Degussa AG, Nemčija) je amorfni brezvodni koloidni silicijev dioksid ( $SiO_2$ ) z velikostjo delcev okrog 15 nm in specifično površino  $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$ . Je lahek, modro-bel prašek, brez vonja in okusa.

V farmaciji ga uporabljamo kot adsorbent, antiadheziv, stabilizator emulzij, razgrajevalo tablet in zgoščevalo (39).

*MATERIALI IN METODE****Kalcijev klorid, brezvoden***

Brezvodni kalcijev klorid (Merck KGaA, Nemčija) je bel prašek v obliki kubičnih kristalov. Je zelo higroskopen in dobro topen v vodi in etanolu. Komercialni izdelek vsebuje približno 94 do 97 %  $\text{CaCl}_2$ , glavno nečistoto pa predstavlja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Uporablja se kot sušilno sredstvo v desikatorjih, v terapiji pa kot nadomestilo za elektrolite (37).

***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 %  $\text{CaCl}_2$  (37).

***Natrijev klorid***

Natrijev klorid (Merck KGaA, Nemčija) je lahko v obliki belega kristaliničnega praška, brezbarvnih kristalov ali belih kroglic. Je dobro topen v vodi in netopen v etanolu (35).

***Ocetna kislina, koncentrirana***

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 (35, 29).

***Laktoza***

Laktoza (Lek d.d., Slovenija) je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek. Je lahko topna v vodi, vendar se počasi raztaplja. V etanolu je netopna. Je disaharid naravnega izvora, sestavljen iz glukoze in galaktoze. Evropska farmakopeja opisuje monohidratno obliko kot monohidrat O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glukopiranoze. Lahko vsebuje različne oblike amorfne laktoze (35, 29).

***Fosforna kislina***

Fosforna kislina (Merck KGaA, Nemčija) je brezbarvna, viskozna tekočina brez okusa. Koncentrirana fosforna kislina (85 %) je zelo korozivna in nevarna ob vdihavanju ali zaužitju. Kemijsko jo imenujemo ortofosforna kislina (29).

*MATERIALI IN METODE****Acetonitril***

Acetonitril (Merck KGaA, Nemčija) je lahko vnetljivo in hlapljivo organsko topilo. Je brez barve in ima značilen, močan vonj. V primeru zaužitja, vdihavanja in pri kontaktu s kožo je toksičen. V veliki meri ga uporabljamo pri pripravi mobilnih faz (40).

***Klorovodikova kislina***

Klorovodikova kislina (Merck KGaA, Nemčija) je bistra, brezbarvna, kadeča se 37 % vodna raztopina vodikovega klorida z ostrim vonjem. Koncentrirana HCl je korozivna in v primeru zaužitja ali stika z očmi ali kožo povzroča poškodbe (29).

***Natrijev dihidrogenfosfat***

Natrijev dihidrogenfosfat (Merck KGaA, Nemčija) je brez vonja in je v obliki ortorombičnih brezbarvnih ali belih kristalov. Pri sobni temperaturi veže vodo, pri čemer nastane dihidrat (37, 29).

***Natrijev hidroksid***

Natrijev hidroksid (Merck KGaA, Nemčija) se nahaja v obliki granul, ploščic, paličic ali kroglic bele ali skoraj bele barve. Če ga hranimo v dobro zaprtih vsebnikih velja, da komercialni izdelek vsebuje med 97 % in 98 % NaOH. Je zelo koroziven in ob stiku s kožo povzroča razjede (29, 37).

***Etanol***

Etanol je bistra, brezbarvna, hlapljiva tekočina z značilnim vonjem in ostrim okusom. 96 % etanol uporabljamo kot topilo (29).

***Furosemid***

Furosemid (Lek d.d., Slovenija) je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek. Topen je v metanolu in acetonu, manj pa v vodi in etanolu. Hraniti ga moramo zaščitene pred svetlobo. Kemijsko je derivat antranilne kisline (slika 12) (41, 42).

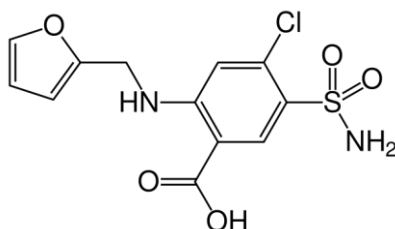
Furosemid je diuretik Henlejeve zanke. Deluje tako, da inhibira  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  črpalko. Je saluretik, saj pospešuje izločanje natrijevih, kloridnih, kalijevih, kalcijevih, magnezijevih in bikarbonatnih ionov. Uporablja se pri zdravljenju edemov zaradi žilnih, jetrnih ali



*MATERIALI IN METODE*

ledvičnih boleznih in pri uravnavanju krvnega tlaka. Njegov diuretični efekt se pojavi v približno 30 minutah in traja do 6 ur. Večinoma se absorbira v želodcu in zgornjem delu tankega črevesa; verjetno zaradi njegovih šibko kislih lastnosti ( $pK_a=3,9$ ). Ozko absorpcijsko okno furosemida vodi v slabo biološko uporabnost ( $49 \% \pm 17 \%$ ) (43).

Po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu spada v četrto skupino, kar pomeni, da je v vodnem mediju slabo topna učinkovina, ki slabo prehaja membrano prebavnega trakta (42, 44).



**Slika 12:** *Struktura furosemida.*

## 3.2. METODE

### 3.2.1. NAPRAVE IN PRIPOMOČKI ZA IZDELAVO IN VREDNOTENJE MIKROKAPSUL

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

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

| Pripomoček                   | Model in proizvajalec                                |
|------------------------------|--|
| Tehtnica                     | Exacta 2200 EB, Tehtnica Železniki, Slovenija        |
| Analitska tehtnica           | AG245, Mettler Toledo, Švica                         |
| Magnetno mešalo 1            | Rotamix 550 MMH, Tehtnica Železniki, Slovenija       |
| Magnetno mešalo 2            | Big squid, IKA®-WERKE, Nemčija                       |
| Magnetno mešalo 3            | HI 190M, HANNA instruments, Portugalska              |
| Enkapsulator                 | Encapsulator IE-50 R, Inotech, Švica                 |
| Grelnik                      | Rotamix 550 MMH, Tehtnica Železniki, Slovenija       |
| Transparentni papir          | Ciat, Carta Ciat-Lucido, Italija                     |
| Naprava za test raztapljanja | Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA            |
| pH meter                     | MA235, Mettler Toledo, Švica                         |
| Brizge (5 ml)                | Novico S. p. A Ascoli Piceno, Italija                |
| Brizge (60 ml)               | OMNIFIX® 60 ml, Braun, Švica                         |
| Centrifugirke (50 ml)        | TPP, Certified ISO 9001, Švica                       |
| Centrifuga                   | CENTRIC 322A, Tehtnica, Slovenija                    |
| Vrtinčnoslojni sušilnik      | Strea-1, NIRO-Aeromatic, Švica                       |
| HPLC aparatura               | Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Nemčija   |
| Kolona                       | Gemini 150*2 mm; 5 µm, B.I.A. Separations, Slovenija |
| Mrežasti vsebniki            | ChaChult, Hamburg, Nemčija                           |

### 3.2.2. OPTIMIZACIJA SESTAVE SMES IN PRIPRAVA JEDRNE FAZE

#### *Priprava SMES*

Kot jedrno fazo smo pripravili samomikroemulgirajoči sistem (SMES) z Labrasolom<sup>®</sup> in Plurol oleique<sup>®</sup> kot emulgatorsko fazo in Miglyolom 812<sup>®</sup> kot oljno fazo. Ta sistem je bil predhodno razvit na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo (45). Izbrane SMES smo pripravili tako, da smo s pomočjo magnetnega mešala najprej homogeno zmešali emulgator Labrasol<sup>®</sup> in koemulgator Plurol oleique<sup>®</sup> v razmerju 4:1 in nato dodali toliko oljne faze Miglyola 812<sup>®</sup>, da je bil njegov delež v zmesi 0, 10, 12, 20 oz. 30 %. Zmes smo mešali do nastanka bistre, rumeno-okker obarvane tekočine.

#### *Določitev topnosti furosemida in solubilizacijske kapacitete razredčenih SMES*

K vsakemu od SMES smo dodali prebitek furosemida in vzorce mešali 48 h pri temperaturi 25 °C. Nasičene sisteme smo pustili mirovati 24 ur pri temperaturi 25 °C. Supernatant smo nato prelili v centrifugirko in ga centrifugirali 20 minut pri 3600 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Filtrat smo nato 4000-krat redčili s 50 % v/v etanolom. Koncentracijo furosemida v tako pripravljenih vzorcih smo določili s HPLC metodo.

Vrednotili smo tudi, koliko furosemida ostane raztopljenega po dispergiranju SMES v mediju s pH=3. V ta namen smo filtrate SMES (z 0, 10, 12, 20 in 30 % oljne faze), nasičenih s furosemidom, 500-krat redčili z medijem s pH=3. Koncentracijo furosemida smo nato ponovno določali s HPLC metodo.

#### *Priprava jedrne faze*

Kot jedrno fazo za izdelavo mikrokapsul smo uporabili SMES s sestavo 88 % emulgatorske faze in 12 % oljne faze. V izbrani SMES smo dodali kalcijev klorid, tako da je bila njegova koncentracija 0,5 mg kalcijevega klorida/1 g SMES. Vse skupaj smo pustili mešati 24 ur. Tako pripravljeni jedrni fazi smo nato dodali še zdravilno učinkovino (furosemid) v 5 % m/m razmerju in aerosil v 4 % m/m razmerju ter jo pustili mešati 24 ur na magnetnem mešalu.

### 3.2.3. PRIPRAVA RAZTOPINE ZA OVOJNICO

#### *Priprava raztopine pektina in alginata*

Za pripravo ovojnice smo uporabili 2 % raztopino alginata/pektina z dodatkom 5 % laktoze. Raztopino smo pripravili tako, da smo k 93 g prečiščene vode dodali 5 g laktoze in zmes mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da se je vsa laktoza raztopila. K tako pripravljeni raztopini smo nato dodali še 2 g alginata/pektina in pustili mešati 24 ur, da je nastala homogena koloidna raztopina.

Raztopine alginata in pektina brez dodanega natrijevega klorida smo nato zmešali v različnih razmerjih, kot je prikazano v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Raztopine z različnimi razmerji polimerov pektina in alginata, ki predstavljajo zunanjo fazo v postopku izdelave mikrokapsul.

| 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                            |

Pripravili smo tudi 2 % raztopino alginata/pektina z dodatkom 5 % laktoze in 1 % natrijevega klorida. Raztopino smo pripravili tako, da smo k 92 g prečiščene vode dodali 5 g laktoze in 1 g natrijevega klorida in zmes mešali na magnetnem mešalu toliko časa, da sta se laktoza in natrijev klorid raztopila. K tako pripravljeni raztopini smo dodali še 2 g alginata/pektina in pustili mešati 24 ur, da je nastala homogena koloidna raztopina.

Raztopine alginata in pektina z natrijevim kloridom smo zmešali v različnih razmerjih, kot je prikazano v preglednici V.

*MATERIALI IN METODE*

**Preglednica V:** Raztopine z različnimi razmerji polimerov pektina in alginata z dodanim 1 % NaCl, ki predstavljajo zunanjo fazo v postopku izdelave mikrokapsul.

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

### 3.2.4. PRIPRAVA RAZTOPINE ZA UTRJEVANJE MIKROKAPSUL

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

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

#### *Priprava raztopine hitosana*

Izdelane mikrokapsule smo dodatno učvrstili z ovojnico iz hitosana. V ta namen smo pripravili 1 % raztopino hitosana v 1 % raztopini očetne kisline: k 99 g 1 % očetne kisline smo dodali 1 g hitosana. Na magnetnem mešalu smo pustili mešati 24 ur do nastanka homogene raztopine.

### 3.2.5. TEHNOLOGIJA IZDELAVE MIKROKAPSUL S SAMOMIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM

Mikrokapsule, ki so v samomikroemulgirajčem jedru vsebovale furosemid, smo izdelali z metodo koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane na enkapsulatorju Inotech IE-50 R. Pri tem smo uporabili koncentrične šobe velikosti 500 µm/750 µm.

SMES s furosemidom je predstavljal notranjo fazo (jedro) mikrokapsul, zunanjo fazo pa je predstavljala vodna raztopina alginata in pektina (preglednica IV) s 5 % laktoze kot polnilom, z ali brez dodanega 1 % NaCl v vlogi polnila in za zmanjšanje mašenja šobe enkapsulatorja.

*MATERIALI IN METODE*

Zunanjo fazo smo v komoro nad šobo dovajali s pomočjo 60 ml brizge, notranjo pa pod tlakom 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 pretoka zunanje faze na 130. Pretok SMES-a smo uravnali tako, da smo najprej vklopili kompresor, nato pa na enkapsulatorju naravnali tlak, ki je potiskal notranjo fazo z želeno hitrostjo skozi šobo (15 kapljic na minuto). Ko je kapljanje notranje faze postalo enakomerno, smo vklopili pretok zunanje faze.

Nastajajoče mikrokapsule smo lovili v 100 ml raztopine za premreževanje (0,5 M CaCl<sub>2</sub>), ki smo jo ves čas izdelave zmerno mešali na magnetnem mešalu. Neustrezne mikrokapsule, ki so nastajale na začetku in koncu procesa izdelave vsake serije, smo lovili v čašo za odpad. Izdelane mikrokapsule smo še 15 minut brez mešanja dodatno inkubirali v raztopini premreževala, nato pa smo jih prenesli v 1 % raztopino hitosana (v 1 % očetni kislini), kjer smo jih inkubirali nadaljnjih 5 minut. Izdelane mikrokapsule smo odnučali in jih sprali s 100 ml prečiščene vode.

**3.2.6. SUŠENJE MIKROKAPSUL**

Utrjene in dobro odcejene mikrokapsule smo sušili v vrtninoslojnjem sušilniku (slika 13) s temperaturo vhodnega zraka 55 °C in temperaturo izhodnega zraka 50 °C oz. na zraku na transparentnem papirju, ki ne odpušča vlaken.



**Slika 13:** Sušenje mikrokapsul v vrtninoslojnjem sušilniku.

### **3.2.7. TEHNOLOGIJA IZDELAVE REFERENČNIH MIKROSFER**

Referenčne mikrosfer brez SMES z ZU v jedru smo izdelali z namenom proučevanja nabrekanja in erozije polimernega ogrodja, ki sicer predstavlja ovojnico mikrokapsul s SMES jedrom. Izdelali smo jih pod enakimi pogoji kot mikrokapsule, le da smo za njihovo pripravo uporabili enokanalno šobo velikosti 1000  $\mu\text{m}$ . Izdelane mikrosfere smo posušili v vrtinčoslojnjem sušilniku s temperaturo vhodnega zraka 55 °C in temperaturo izhodnega zraka 50 °C.

### **3.2.8. DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE FUROSEMIDA**

Učinkovitost vgradnje furosemida smo proučevali tako, da smo pri izdelavi vsake serije mikrokapsul na začetku, sredini in na koncu procesa izdelave v erlenmajerico ulovili po 5 kapljic nepremreženih mikrokapsul, preden so padle v raztopino premreževala. Dodali smo jim 50 ml 50 % v/v etanola, pomešali, da se je ves furosemid raztopil in pokrili s parafilmom. Čez 24 ur smo vzorec filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter ter vzorce analizirali s HPLC metodo. Masa furosemida, ki smo jo tako določili, nam je predstavljala 100 % učinkovine v mikrokapsulah. Učinkovitost vgradnje smo izračunali tako, da smo vsebnost ZU pred premreževanjem primerjali z vsebnostjo ZU v mikrokapsulah po procesu premreževanja, inkubiranja v hitosanu in sušenja. V drugo erlenmajerico smo tako vzorčili 15 premreženih mikrokapsul, jih zmečkali s stekleno palčko ter jim dodali 50 ml 50 % v/v etanola, pomešali in pokrili s parafilmom. Zmečkane mikrokapsule smo pustili nabrekati 24 ur, kar je zadoščalo, da se je sprostila vsa zdravilna učinkovina. Tako pripravljene vzorce smo filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter in izmerili koncentracijo furosemida s HPLC metodo.

Vzorčili smo naslednje vzorce:

- neposušene premrežene mikrokapsule, ki jih nismo inkubirali v hitosanu,
- neposušene premrežene mikrokapsule, inkubirane v hitosanu,
- premrežene mikrokapsule, sušene v vrtinčoslojnjem sušilniku,

*MATERIALI IN METODE*

- premrežene mikrokapsule, sušene na zraku.

Za vsako serijo mikrokapsul smo učinkovitost vgradnje določali v treh paralelkah. Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom smo izračunali s pomočjo enačbe 1:

**Enačba 1:**

$$\text{Učinkovitost vgradnje (\%)} = \frac{\text{masa furosevida v premreženih mikrokapsulah}}{\text{masa furosevida v nepremreženih mikrokapsulah}} * 100$$

### 3.2.9. DOLOČANJE NABREKANJA IN EROZIJE MIKROSFER

Nabrekanje in erozijo referenčnih mikrosfer smo določali s pomočjo USP aparature 2 za raztapljanje (z veslastim mešalom) pri 50 obratih/minuto in temperaturi 37 °C. Približno 300 mg suhih mikrosfer smo točno natehtali v mrežaste vsebnike v obliki kroglice premera ~ 4 cm (slika 14) in jih inkubirali v mediju za nabrekanje (900 ml vodne raztopine HCl s pH 3 oz. fosfatni pufer s pH 6,8).



**Slika 14:** Mrežasti vsebniki za določanje nabrekanja in erozije.

Ob ustreznih časovnih intervalih, ki so bili odvisni od medija za nabrekanje in so predstavljeni v preglednici VI, smo iz medija za nabrekanje odvzeli po 3 mrežaste



## MATERIALI IN METODE

vsebnike z mikrosferami, jih odcedili in odvečno vodo narahlo popivnali s papirnato brisačko. Nabrekle mikrosfere smo nato iz mrežastega vsebnika prenesli na papir, ki ne odpušča delcev in jih stehali. Papirčke z mikrosferami smo sušili do konstantne mase (16 ur pri 55 °C) in jih ponovno stehali.

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

| Časovni interval | Medij raztapljanja |        |
|------------------|--------------------|--------|
|                  | pH=3               | pH=6,8 |
| 15 min           | •                  | •      |
| 30 min           |                    | •      |
| 45 min           |                    | •      |
| 1 ura            | •                  | •      |
| 2 uri            |                    | •      |
| 4ure             | •                  | •      |
| 8 ur             | •                  |        |
| 16 ur            | •                  |        |
| 24 ur            | •                  |        |

Nabrekanje smo nato izračunali po naslednji enačbi:

**Enačba 2:**

$$S (\%) = \frac{m(t) - m(suhe)}{m(suhe)} * 100$$

pri čemer predstavlja S (%) nabrekanje, izraženo v odstotkih, m(t) maso nabreklih mikrosfer v času t, m(suhe) pa maso posušenih mikrosfer, ki so nabrekale.

Erozijo smo vrednotili sočasno s spremljanjem nabrekanja mikrosfer. Parameter  $m_0$ (za E) smo izračunali po naslednji enačbi:

**Enačba 3:**

$$m_0(\text{za } E) = \frac{m_0 * m(\text{suhe povp po } t = 0)}{m_0(\text{suhe povp po } t = 0)}$$

pri čemer predstavlja  $m_0$  začetno maso mikrosfer, ki so nabrekale,  $m(\text{suhe povp po } t=0)$  povprečno končno maso ponovno sušenih mikrosfer, ki niso nabrekale, ter  $m_0(\text{suhe povp po } t=0)$  povprečno začetno maso mikrosfer, ki niso nabrekale.

S pomočjo izračunanega parametra  $m_0(\text{za } E)$  smo nato izračunali erozijo po enačbi 4:

**Enačba 4:**

$$E (\%) = \frac{m_0(\text{za } E) - m(\text{suhe})}{m_0(\text{za } E)} * 100$$

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

### 3.2.10. SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL

Proučevali smo količino furosemida, ki se med 24-urnim testom raztapljanja sprosti iz mikrokapsul, sušenih v zvrtničenih plasteh. Za test smo uporabili USP aparaturo 2 z veslastim mešalom (Dissolution Tester, Van Kel, VK 7000, ZDA) pri 50 obratih/minuto in konstantni temperaturi 37 °C. Test smo izvajali v dveh različnih medijih za sproščanje: v fosfatnem pufru s pH 6,8 in vodni raztopini HCl s pH 3. Po vklopu aparature smo počakali toliko časa, da so se vzpostavili konstantni pogoji za delo.

V 900 ml medija za sproščanje smo dispergirali 100 mikrokapsul. Ob posameznih časovnih intervalih (15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h) smo vzorčili 10 ml vzorca in ga filtrirali skozi filter z velikostjo por 10 µm. Vzorce smo analizirali s HPLC metodo in s pomočjo umeritvene krivulje izračunali koncentracijo furosemida v posameznem vzorcu. Za vsako serijo suhih mikrokapsul smo izvedli sproščanje v treh paralelkih.

Z namenom določitve kinetike sproščanja smo izračunali ujemanje rezultatov testov raztapljanja v mediju s pH 3 z naslednjimi enačbami:

*MATERIALI IN METODE*

- kinetiko 0. reda (enačba 5),
- kinetiko 1. reda (enačba 6),
- Higuchijevo kinetiko (enačba 7),
- kinetiko po Korsmejer-Peppasu (enačba 8) in
- Hixon-Crowellovo kinetiko (enačba 9).

**Enačba 5:** 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 6:** kinetika 1. reda

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

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

**Enačba 7:** 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 8:** kinetika po Korsmejer-Peppasu

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

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

**Enačba 9:** Hixon-Crowellova kinetika

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

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

*MATERIALI IN METODE*

Podatke smo obdelali v programu MS Office Excel 2007 in izračunali determinacijske koeficiente korelacije.

**3.2.11. PRIPRAVA MEDIJEV S pH 3 IN pH 6,8*****Vodna raztopina HCl s pH 3***

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

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

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

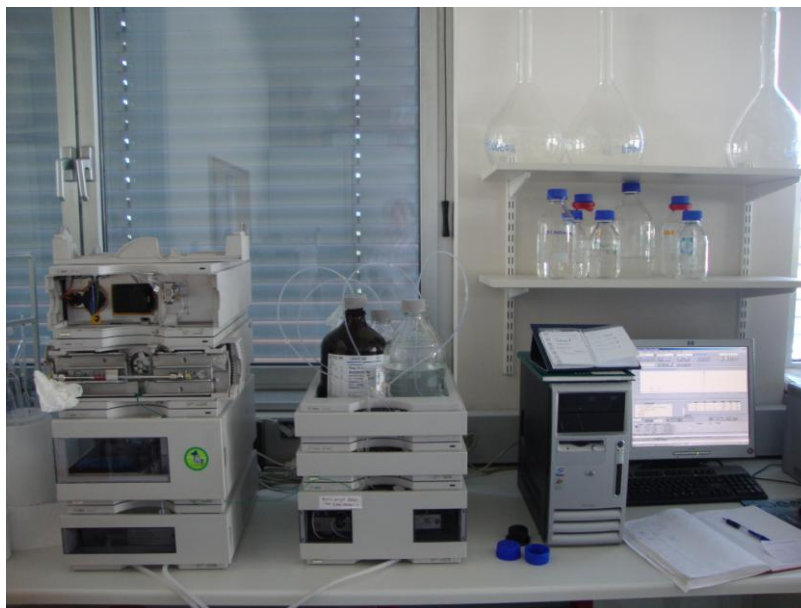
Raztopino  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  smo pripravili v 2 l merilni bučki tako, da smo 62,4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  natehtali v bučko, raztopili v prečiščeni vodi in bučko z vodo dopolnili do oznake.

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

**3.2.12. HPLC ANALITIKA FUROSEMIDA**

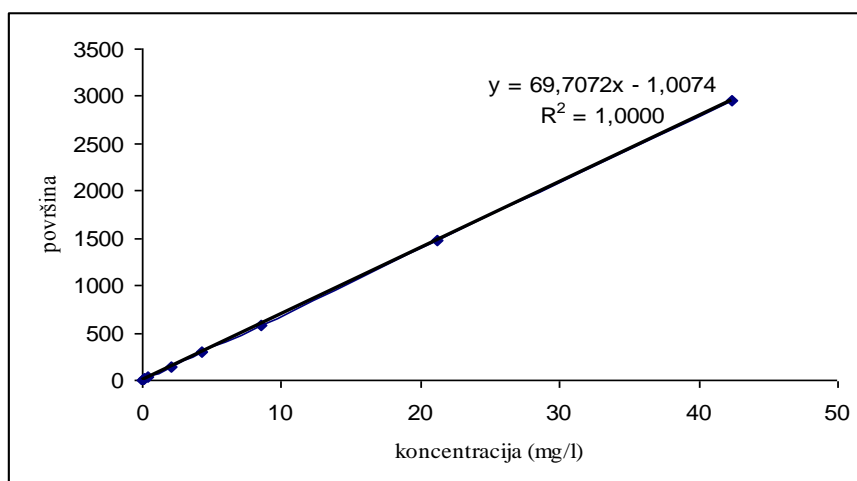
Količino furosemida v vzorcih smo določili z gradientno HPLC analizo (slika 15). Kolono (Gemini 150\*2 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), smo gredli na 50 °C. Kot mobilno fazo A smo uporabili 0,2 % v/v vodno raztopino fosforne kisline, mobilno fazo B pa je predstavljal 98 % v/v acetonitril. Pretok mobilne faze smo naravnali na 1 ml/min. Injicirali smo 20  $\mu\text{L}$  vzorca, čas vsake analize pa je trajal 3 min. 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. Koncentracijo furosemida smo spremljali z UV detektorjem, ki je bil nastavljen na valovno dolžino 274 nm.

## MATERIALI IN METODE



**Slika 15:** HPLC aparatura.

Znano zatehto učinkovine smo raztopili v 100 ml 50 % v/v etanola. Osnovno raztopino smo nato še večkrat redčili in vzorce analizirali s HPLC. S temi podatki smo narisali umeritveno premico (slika 16) in izračunali enačbo:  $A = 69,7072 \cdot c - 1,0074$  (A - površina pod krivuljo, c - koncentracija, izražena v mg/l). S pomočjo umeritvene krivulje smo nato iz dobljenih površin pod vrhovi izračunali koncentracije furosemidu v posameznih vzorcih.

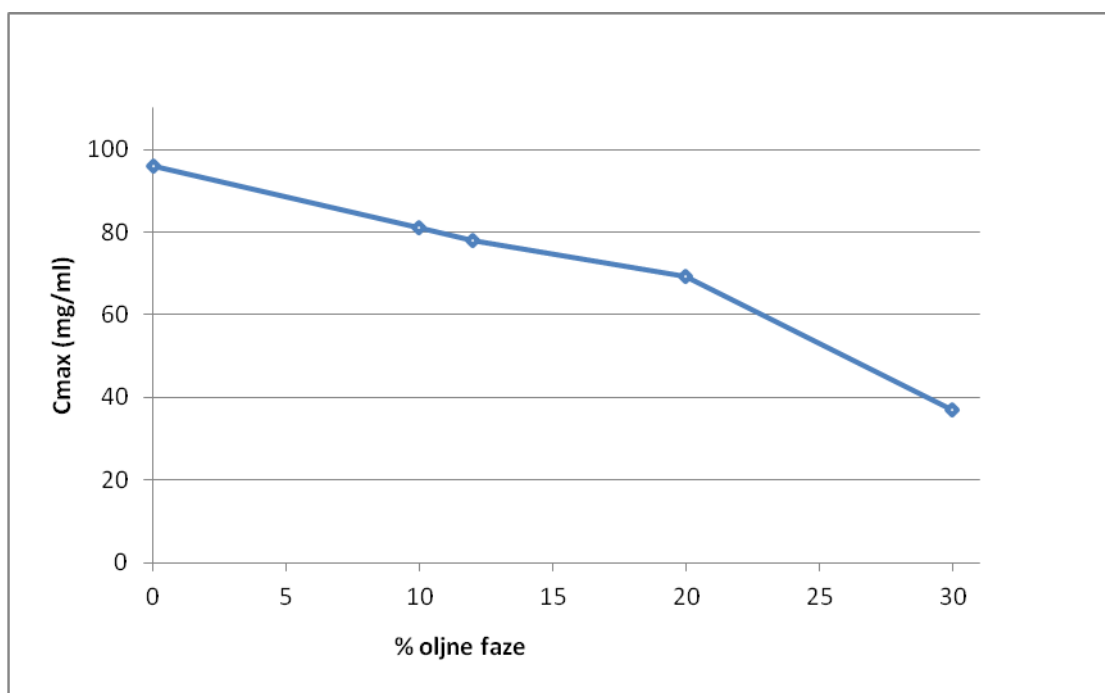


**Slika 16:** Umeritvena premica za furosemid.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. IZBIRA OPTIMALNE JEDRNE FAZE

V diplomski nalogi smo želeli izbrati optimalen SMES za izdelavo mikrokapsul. V ta namen smo določili topnost furosemida v različnih SMES, ki so bili sestavljeni iz emulgatorja Labrasola<sup>®</sup>, koemulgatorja Plurol oleiqe<sup>®</sup> in oljne faze Miglyol 812<sup>®</sup>. Delež oljne faze v sistemu smo spreminjali od 0 do 30 % m/m, razmerje med emulgatorjem in koemulgatorjem pa je bilo konstantno, in sicer 4:1. Optimalno sestavo SMES smo določili na osnovi solubilizacijske kapacitete posameznega sistema za furosemid in obsega področja nastanka mikroemulzije po redčitvi sistema z vodno fazo. Na sliki 17 je prikazana topnost furosemida (v mg/ml) v sistemih z različno vsebnostjo oljne faze.

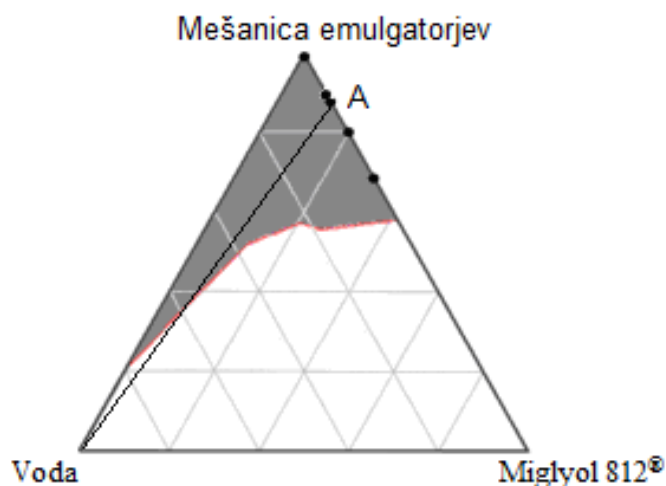


**Slika 17:** Topnost furosemida v SMES v odvisnosti od deleža oljne faze Miglyol 812<sup>®</sup>.

Najvišjo topnost furosemida (95,95 mg/ml) smo določili v sistemu brez dodane oljne faze, torej v zmesi emulgatorjev. Topnost furosemida v SMES se z naraščanjem deleža oljne faze zmanjšuje, vendar ne linearno (slika 17).

## REZULTATI IN RAZPRAVA

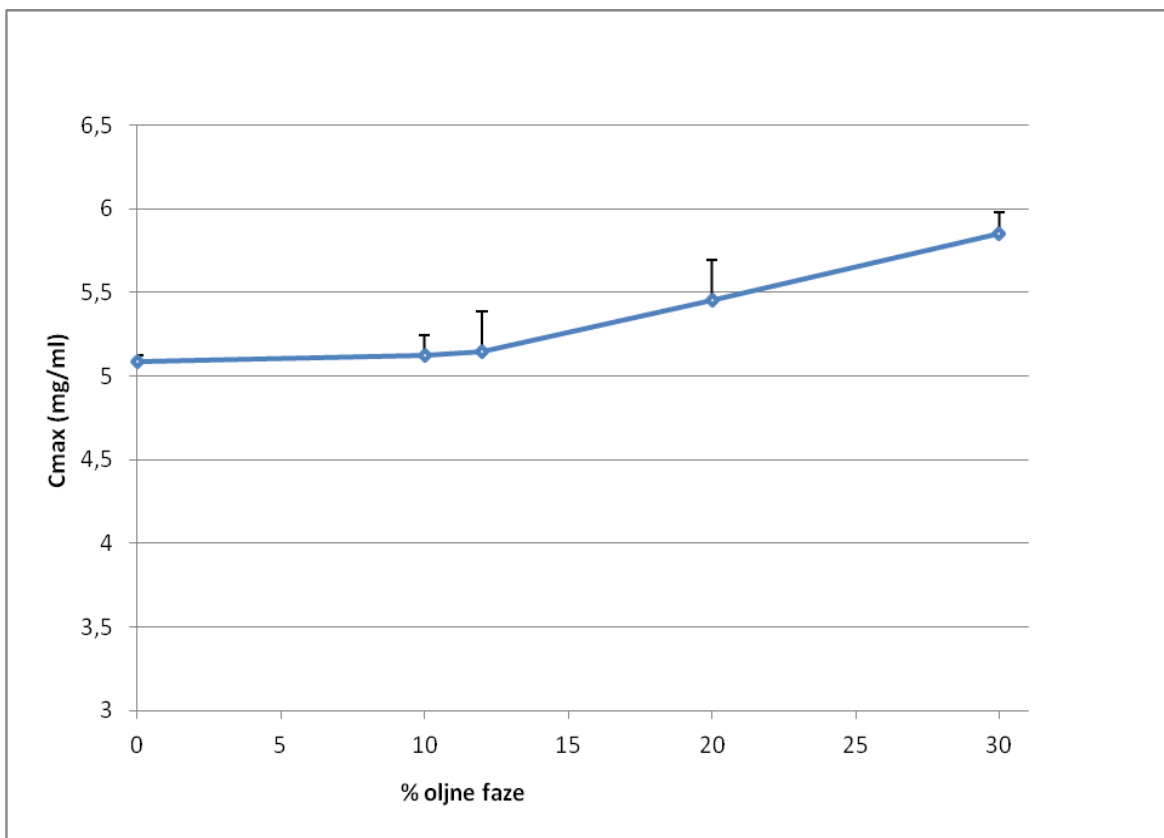
Za izdelavo mikrokapsul smo izbrali SMES s sestavo 88 % emulgatorjev in 12 % oljne faze. V sistemu s to sestavo ima furosemid še vedno dovolj visoko topnost, ~80 mg/ml, poleg tega pa ta SMES v prisotnosti vodne faze tvori mikroemulzije tipa O/V do ~60 % vsebnosti vodne faze, kot je razvidno iz faznega diagrama (slika 18).



**Slika 18:** Fazni diagram sistema Labrasol®/Plurol oleique®/Miglyol 812®/voda, sivo območje - mikroemulzije, belo območje - nestabilne emulzije, A – razredčitvena linija, na kateri leži izbran SMES.

Zanimalo nas je tudi, v kakšnem obsegu izbrani SMES preprečijo obarjanje učinkovine med dispergiranjem sistema z vodno fazo. V ta namen smo sisteme, nasičene s furosemidom, redčili s HCl s pH 3 (0,5 ml SMES/250 ml HCl). Slika 19 prikazuje topnost furosemida po redčenju SMES z različnim deležem oljne faze z vodno fazo. Solubilizacijska kapaciteta razredčenih SMES za furosemid narašča z višanjem vsebnosti oljne faze (slika 19). Po redčenju SMES s sestavo 12 % oljne faze in 88 % emulgatorja smo določili topnost furosemida 5,15 mg/ml. Med procesom dispergiranja se je sicer oborilo veliko furosemida, vendar je topnost slednjega tudi po redčenju SMES z vodno fazo še vedno 206-krat višja, kot je topnost furosemida v vodi (0,025 mg/ml) (46).

## REZULTATI IN RAZPRAVA



Slika 19: Topnost furosemida v SMES, redčenih z vodno raztopino HCl s pH 3.

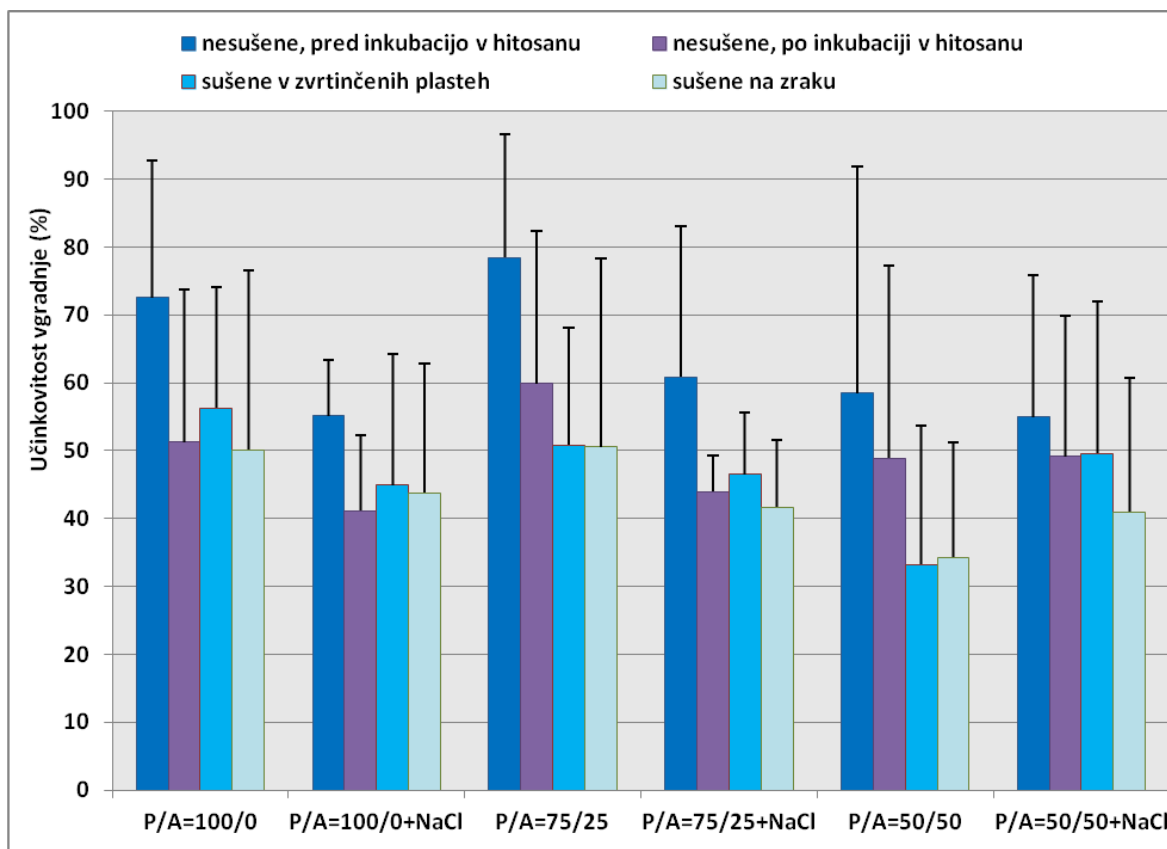
## 4.2. DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRADNJE IN VSEBNOSTI ZDRAVILNE UČINKOVINE V MIKROKAPSULAH

Učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul je odvisna od obsega iztekanja jedrne faze med postopkom oblikovanja, utrjevanja in sušenja mikrokapsul. Iztekanje jedrne faze se pojavi zaradi spontanega mešanja jedrne faze (SMES) z zunanjo vodno fazo (raztopino polimera). V diplomski nalogi smo želeli preučiti, ali lahko s spreminjanjem sestave ovojnice dosežemo večjo učinkovitost vgradnje furosemida v mikrokapsule. V ta namen smo SMES s furosemidom mikrokapsulirali v polimerno ogrodje; kot zunanjo fazo smo uporabili 2 % vodno raztopino polimera s P/A v razmerju 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 in 0/100. V raztopino polimera smo dodali tudi 1 % NaCl; slednji naj bi omejil mašenje šobe enkapsulatorja in s tem pripomogel k zvišanju učinkovitosti vgradnje furosemida. Ovojnico izdelanih mikrokapsul smo utrdili v 0,5 M



## REZULTATI IN RAZPRAVA

raztopini  $\text{CaCl}_2$ , nato pa smo jih prenesli v 1 % raztopino hitosana, s čimer smo jih obložili z dodatno plastjo hitosana, ki poveča čvrstost mikrokapsul in zmanjša iztekanje jedra med procesom sušenja le-teh. Rezultati učinkovitosti vgradnje so prikazani na sliki 20.



**Slika 20:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v polimerno ogrodje mikrokapsul.

Iz slike 20 je razvidno, da se učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom med postopkom utrjevanja in sušenja mikrokapsul zmanjšuje, saj pride do iztekanja jedrne faze iz polimernega matriksa. Pri vseh mikrokapsulah brez dodanega NaCl je bila učinkovitost vgradnje pred stopnjo oblaganja mikrokapsul s hitosanom med 65 in 80 %, po inkubiranju mikrokapsul v raztopini hitosana pa se učinkovitost vgradnje zniža na 50 do 60 %. Utrjevanje izdelanih mikrokapsul s hitosanom je kljub temu smiselno, saj nastala ovojnica poveča čvrstost mikrokapsul, kar pripomore k manjšemu iztekanju SMES z zdravilno učinkovino med postopkom sušenja le-teh.

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

Najboljše rezultate učinkovitosti vgradnje SMES smo dosegli pri sestavi ovojnice P/A=75/25. Pri mikrokapsulah s to sestavo je bila učinkovitost vgradnje ~ 60 % v nesusenih in ~ 50 % v sušenih mikrokapsulah, vsebnost furosemida pa je bila 39,25 mg/1 g mikrokapsul. Pričakovali smo, da se bo z višanjem deleža alginata v ovojnici zviševala tudi učinkovitost vgradnje, saj tvori alginat v prisotnosti kalcijevih ionov močnejši gel v primerjavi s pektinom. Vendar smo pri mikrokapsulah s sestavo ovojnice P/A=50/50 opazili mašenje šobe enkapsulatorja, kar je verjetno zmanjšalo učinkovitost vgradnje SMES. Zaradi mašenja šobe tudi ni bilo mogoče izdelati mikrokapsul s P/A razmerjem 25/75 in 0/100.

Iz slike 20 je razvidno, da je dodatek NaCl v polimerno raztopino za pripravo ovojnice povzročil znižanje učinkovitosti vgradnje, z izjemo mikrokapsul s sestavo P/A=50/50, kjer se učinkovitost vgradnje z dodatkom NaCl ni spremenila. Razlog za znižanje učinkovitosti vgradnje je v tem, da natrijevi ioni iz NaCl izpodrivajo kalcijeve ione, ki so odgovorni za premreženje polimera. Posledično se tvori šibkejši gel, ki slabše zadržuje SMES jedro (25). Pri sestavi ovojnice P/A=50/50 je zaradi mašenja šobe enkapsulatorja učinkovitost vgradnje v vsakem primeru nizka, zato dodatek NaCl nanjo nima signifikantnega vpliva. To je v nasprotju z našimi pričakovanji, da bo natrijev klorid zmanjšal mašenje šobe enkapsulatorja in posledično povečal učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom. Premreževanje mikrokapsul namreč poteka tako »od zunaj navznoter«, ko mikrokapsule padejo v raztopino premreževala in tudi »od znotraj navzven«, ko se polimer premreži s kalcijevimi ioni iz CaCl<sub>2</sub>, ki je dodan v raztopino za pripravo jedrne faze. Slednji način premreževanja je odgovoren za mašenje šobe enkapsulatorja, kar lahko zmanjšamo z dodatkom NaCl, ki izpodriva kalcijeve ione in prepreči premreženje polimera takoj ob izhodu iz šobe.

Sušenje je eden izmed ključnih korakov, ki vpliva na vsebnost učinkovine v mikrokapsulah in na njihove morfološke lastnosti (47). Vsebnost furosemida v nesusenih utrjenih mikrokapsulah (takoj po izdelavi) smo primerjali z njegovo vsebnostjo v mikrokapsulah, ki smo jih posušili na zraku oz. v zvrtničenih plasteh zraka.

Iz slike 20 je razvidno, da med postopkom sušenja v zvrtničenih plasteh nismo dosegli bistveno boljše učinkovitosti vgradnje v primerjavi s sušenjem na zraku. Najmanjšo izgubo zdravilne učinkovine v primerjavi z nesusenimi mikrokapsulami smo opazili pri sestavi

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

ovojnice P/A=100/0. To je v nasprotju z našimi pričakovanji, da bodo mikrokapsule, sušene na zraku, izkazovale veliko nižjo učinkovitost vgradnje zdravilne učinkovine kot mikrokapsule, sušene v zvrtničenih plasteh. Sušenje na zraku namreč poteka bistveno dlje časa kot sušenje v zvrtničenih plasteh zraka. Poleg tega so se mikrokapsule med sušenjem na zraku prilepile na transparentni papir, na katerem smo jih sušili. Vzrok za to je slabo zadrževanje jedrne faze, ki med postopkom sušenja izteče iz mikrokapsul. Mikrokapsule, sušene v zvrtničenih plasteh zraka, med procesom sušenja nenehno krožijo po komori, zato je verjetnost, da bi se jedro pomaknilo proti robu mikrokapsule in izteklo, manjša.

Med procesom sušenja mikrokapsul se v polimernem ogrodju tvorijo pore, skozi katere lahko izteka jedrna faza. V prisotnosti NaCl je bilo iztekanje jedrne faze manj izrazito, saj le-ta med sušenjem mikrokapsul kristalizira in skupaj z laktozo zapolni nastale pore. Vendar pa je pri tem treba upoštevati, da dodatek NaCl vpliva tudi na zmanjšanje učinkovitosti vgradnje SMES s furosemidom v nesusene mikrokapsule.

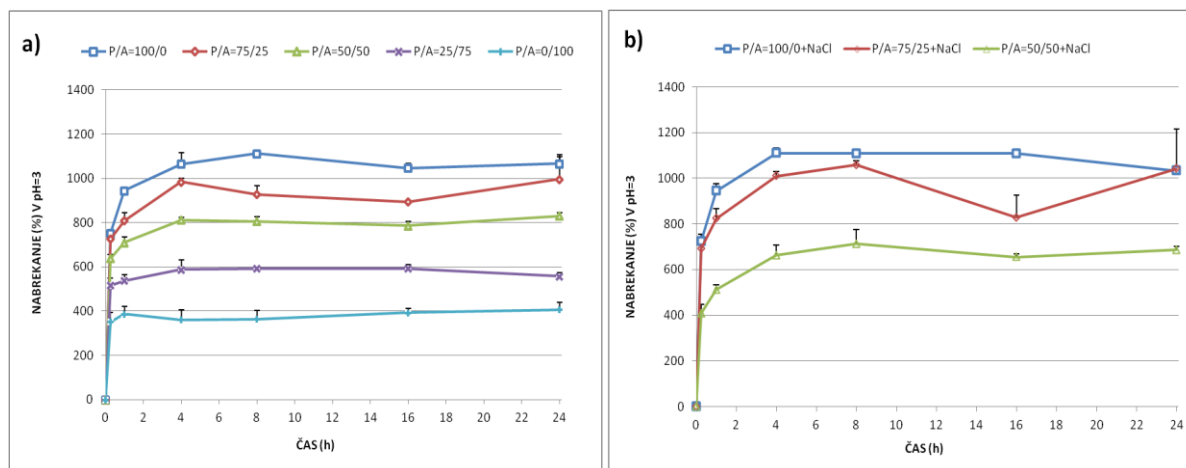
Upošteva se pridobljene rezultate in dejstvo, da je sušenje v zvrtničenih plasteh enostavnejše in hitrejše od sušenja na zraku, prav tako pa omogoča prenos v industrijsko merilo, smo se odločili, da je za sušenje mikrokapsul s SMES v jedru primernejše sušenje v zvrtničenih plasteh zraka.

### **4.3. VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA NABREKANJE IN EROZIJO REFERENČNIH MIKROSFER**

Nabrekanje je lastnost hidrogela, ki nam pove, kolikšno količino hidratacijskega medija je hidrogel sposoben vezati (48). Količina vezanega medija je odvisna od strukture hidrogela, stopnje premreženosti, postopka sušenja in medija, v katerem hidrogel nabreka. Za hidrofilne naravne polimere, med katere spadata tudi pektin in alginat, je značilno, da ob stiku z vodo nabrekajo. Pri tem se ustvari gelska plast, ki uravnava prodiranje vode v ogrodje in s tem raztapljanje in sproščanje vgrajene učinkovine (49). Za preučevanje nabrekanja in erozije smo pripravili referenčne mikrosfere z ogrođjem iz pektina in alginata v različnih razmerjih (P/A=100/0, 75/25, 50/50, 25/75 in 0/100). Preučevali smo tudi vpliv dodatka NaCl v raztopino polimera na nabrekanje in erozijo izdelanih mikrosfer;

## REZULTATI IN RAZPRAVA

v tem primeru smo v ogrodno raztopino s sestavo P/A=100/0, 75/25 in 50/50 dodali 1 % NaCl. Kot medij za nabrekanje smo uporabili vodno raztopino HCl s pH 3 ter fosfatni pufer s pH 6,8. Vpliv razmerja P/A na nabrekanje mikrosfer (z ali brez dodatka NaCl) v mediju s pH 3 je prikazan na sliki 21.



**Slika 21:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na nabrekanje mikrosfer v mediju s pH 3, (a) mikrosfere brez NaCl (b) mikrosfere z dodanim NaCl.

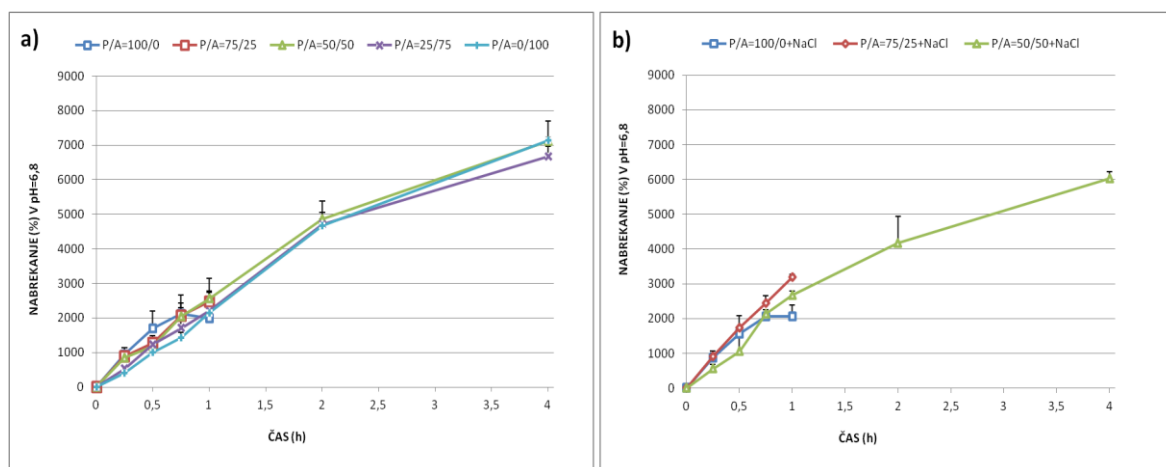
Iz slike 21a je razvidno, da v mediju s pH 3 najhitreje in najmočnejše nabrekajo mikrosfere s sestavo P/A=100/0, najmanj pa mikrosfere brez dodanega pektina. Vse mikrosfere so najhitreje nabrekale v prvi uri poskusa, po 4 – 8 urah pa je bil dosežen plato. V literaturi (50) navajajo, da izkazuje pektin v kislem večjo stopnjo nabrekanja kot alginat, kar potrjujejo tudi rezultati našega eksperimentalnega dela. Razlog je v tem, da tvori alginat v prisotnosti kalcijevih ionov močnejši gel kot pektin. Slabše premreženje verig pektina v primerjavi z alginatom vodi v šibkejše sile med verigami, posledica tega pa je lažji privzem vode in močnejše nabrekanje mikrosfer z večjim deležem pektina.

V nevtralnem mediju s pH 6,8 so vse mikrosfere nabrekale hitreje in močnejše kot v kislem mediju s pH 3, kar prikazuje slika 22. pKa pektina oz. alginata je 3-4, zato so v mediju s pH 3 karboksilne skupine manuronske, guluronske (pri alginatu) in galakturonske (pri pektinu) kisline večinoma v neionizirani obliki, kar vodi v posledično manjše nabrekanje kot v mediju z višjim pH (50). Močno nabrekanje v fosfatnem pufru je tudi posledica izmenjave kalcijevih ionov z natrijevimi iz medija za nabrekanje. V začetni fazi se natrijevi

## REZULTATI IN RAZPRAVA

ioni izmenjajo s kalcijevimi ioni, vezanimi na karboksilne skupine manuronskih oz. galakturonskih kislin. Natrijevi ioni se vežejo na negativno nabite karboksilne skupine galakturonske in manuronske kisline. Tako nastane elektrostatični odboj med negativno nabitimi karboksilnimi skupinami, kar olajša nabrekanje ogrodja mikrosfer. Prosti kalcijevi ioni se izoborijo v obliki trdnega kalcijevega fosfata, ki ostane suspendiran v mediju. V drugi stopnji nabrekanja povzroči difuzija kalcijevih ionov iz poliguluronatnih oz. poligalakturonatnih blokov razrahljanje strukture »škafle za jajca«. Posledično je olajšano prodiranje vode v strukturo mikrosfer, kar sčasoma povzroči razpad polimernega ogrodja (22).

Mikrosfere z večjim deležem pektina so v nevtralnem mediju nabrekale močnejše kot mikrosfere z večjim deležem alginata. Najmočnejše nabrekanje je bilo razvidno pri mikrosferah s sestavo P/A=100/0 in 75/25, ki so po dveh urah nabrekanja tudi popolnoma razpadle (slika 22a).



**Slika 22:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na nabrekanje mikrosfer v pufru s pH 6,8, (a) mikrosfere brez NaCl in (b) mikrosfere z dodatnim NaCl.

Pričakovali smo, da bo dodatek NaCl v polimerno ogrodje povzročil močnejše nabrekanje mikrosfer. Kadar polimeru dodamo natrijeve ione, namreč pride do izmenjave med vezanimi kalcijevimi ioni in natrijevimi ioni v ogrodju mikrosfer. Posledica tega je slabše premreženje alginatnega oz. pektinatnega ogrodja, kar povzroči večji privzem vode in s tem nabrekanje polimera (50). Iz slike 21b je razvidno, da v našem primeru dodatek natrijevega klorida ni povečal stopnje nabrekanja v kislem mediju s pH 3 pri nobeni od

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

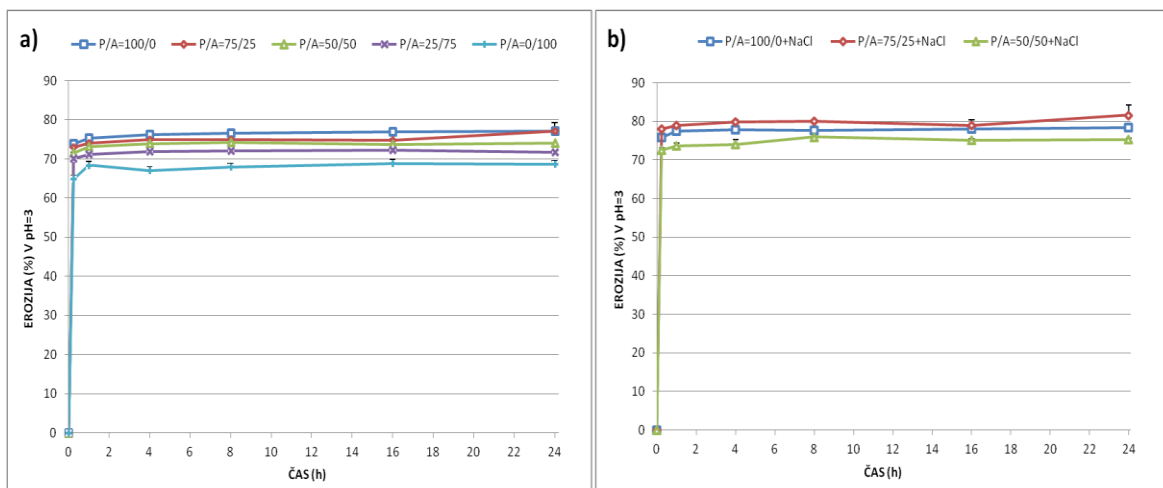
formulacij. Enako kot v prejšnjem primeru so najbolj nabrekale mikrosfere z ogrodjem iz kalcijevega pektinata, sledile pa so mikrosfere s sestavo  $P/A=75/25$  in  $P/A=50/50$ .

V nevtralnem mediju (slika 22b) je dodatek NaCl v polimerno ogrodje povečal stopnjo nabrekanja samo pri mikrosferah s sestavo  $P/A=75/25$ , kjer je nabrekanje po 1 h inkubacije kar za 700 % višje v primerjavi z mikrosferami, ki jim NaCl nismo dodali. Pri mikrosferah s pektinskim ogrodjem vpliv NaCl na nabrekanje ni bil signifikanten, medtem ko se je pri mikrosferah s sestavo  $P/A=50/50$  nabrekanje z dodatkom NaCl celo nekoliko zmanjšalo.

Erozija je lastnost hidrogelov, ki nam pove, kakšen delež matriksa je erodiral med nabrekanjem hidrogela. Prav tako kot nabrekanje je tudi erozija odvisna od strukture hidrogela, gostote premreženja, vpliva sušenja ter medija nabrekanja (48). Do erozije polimerne strukture pride, ko se začno polimerne verige izplavljati v medij za nabrekanje. Vpliv sestave ovojnice na stopnjo erozije je prikazan na slikah 23 (medij s pH 3) in 24 (medij s pH 6,8). Kot je razvidno iz obeh slik, je erozija najmočnejša v prvi uri testa nabrekanja, najbolj pa erodirajo mikrosfere z ovojnico iz kalcijevega pektinata. V kislem mediju lahko to hitro izgubo mase delno razložimo z erozijo hitosanske ovojnice, medtem ko je v mediju s pH 6,8 hitosan slabše topen in zato ne erodira tako hitro. V tem primeru je vzrok za hiter potek erozije verjetno močno nabrekanje mikrosfer, ki povzroči izgubo kalcijevih ionov (25).

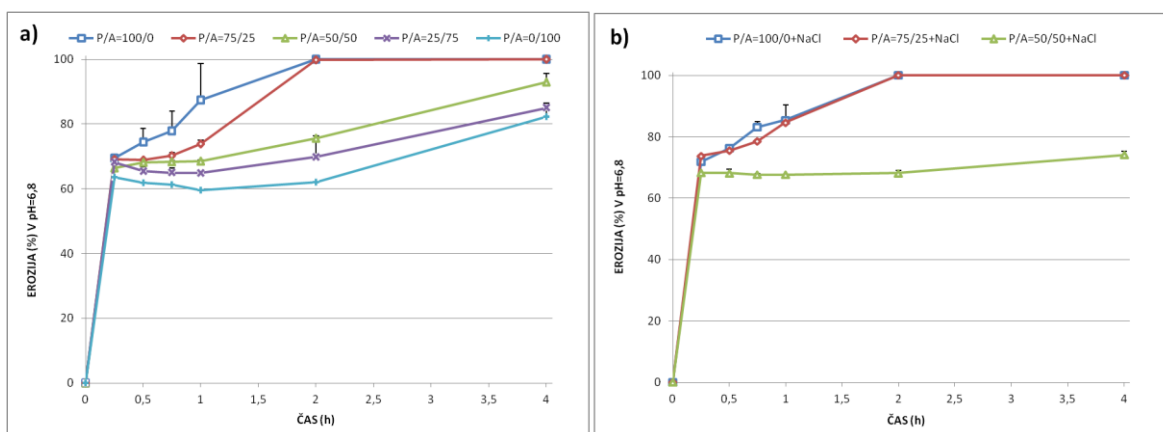
Iz slike 23a je razvidno, da v kislem mediju najmočnejše in najhitreje erodirajo mikrosfere z ogrodjem iz pektina, ki so v vodni raztopini HCl s pH 3 tudi najhitreje nabrekale. Stopnja erozije se znižuje z zmanjševanjem deleža pektina v matriksu mikrosfer, kar je primerljivo z rezultati nabrekanja v istem mediju.

## REZULTATI IN RAZPRAVA



**Slika 23:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na erozijo v mediju s pH 3, (a) mikrosfere brez NaCl in (b) mikrosfere z dodanim NaCl.

V nevtralnem mediju s pH 6,8 (slika 24a) je erozija mikrosfer večja v primerjavi s kislim medijem. Razlog za to je prej omenjena ionska izmenjava kalcijevih ionov z natrijevimi ioni iz pufra, ki vodi v razrahljanje in razpad gelske strukture. Najbolj so erodirale mikrosfere s sestavo P/A=100/0 in P/A=75/25, ki so po dveh urah testa nabrekanja popolnoma razpadle. Tudi v tem mediju stopnja erozije pada z višanjem deleža alginata v polimernem ogrodju mikrosfer.



**Slika 24:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na erozijo v pufri s pH 6,8, (a) mikrosfere brez NaCl in (b) mikrosfere z dodanim NaCl.

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

Dodatek NaCl je v obeh medijih povečal erozijo polimernega ogrodja mikrosfer samo pri formulaciji s sestavo P/A=75/25 (sliki 23b in 24b). Pri mikrosferah z ogrodjem iz kalcijevega pektinata vpliv NaCl na erozijo ogrodja ni bil signifikanten v nobenem od medijev za nabrekanje, medtem ko se je pri mikrosferah s 50 % pektina erozija v nevtralnem mediju celo zmanjšala. To je v nasprotju z našimi pričakovanji, da bo erozija mikrosfer z dodanim natrijevim kloridom bistveno večja kot erozija mikrosfer, kjer NaCl nismo dodali. Natrijev klorid je namreč dobro vodotopen in se lahko med nabrekanjem mikrosfer izplavlja v medij za nabrekanje, kar povzroči zmanjšanje mase mikrosfer in erozijo le-teh.

#### **4.4. VPLIV RAZMERJA PEKTIN/ALGINAT NA SPROŠČANJE FUROSEMIDA IZ MIKROKAPSUL**

Profil sproščanja učinkovine je odvisen vrste različnih dejavnikov: od strukturnih lastnosti polimernega ogrodja, v katerega je vgrajena zdravilna učinkovina, fizikalno-kemijskih lastnosti medija za sproščanje in pa od lastnosti učinkovine, kot so topnost, stabilnost, naboj ali interakcije s polimernim ogrodjem mikrokapsul (49).

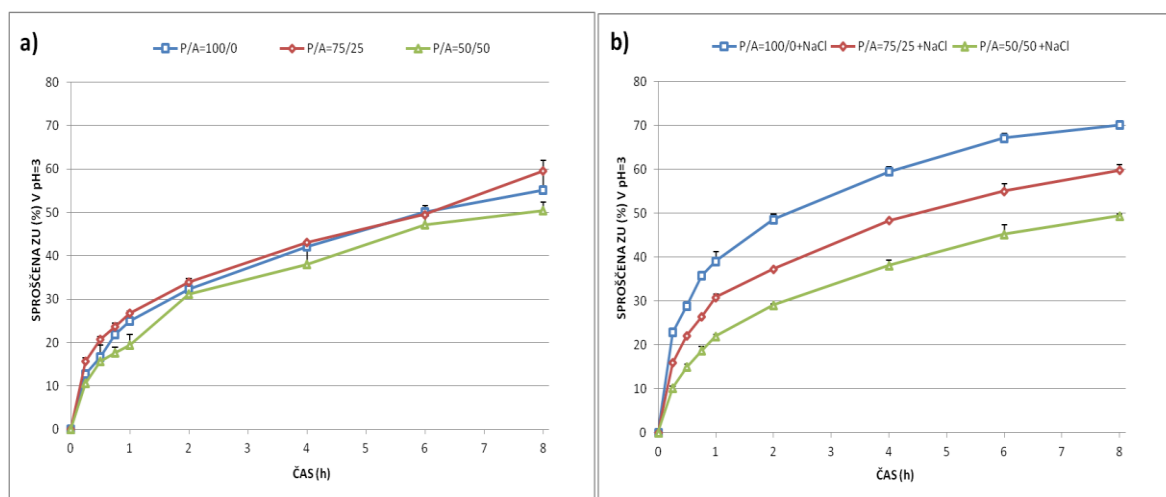
Sproščanje furosemida iz mikrokapsul s sestavo ovojnice A/P=100/0, 75/25 in 50/50 smo spremljali v raztopini HCl s pH 3 ter v fosfatnem pufru s pH 6,8. Rezultate testa sproščanja prikazujeta sliki 25 in 26. V kislem mediju je furosemid slabo topen, saj je njegov pKa 3,9 in je zato večinoma v neionizirani obliki. V nevtralnem mediju pa se furosemid ionizira, zato se njegova topnost poveča. Iz medija s pH 6,8 poteka sproščanje učinkovine zelo hitro, zato smo za razlago kinetike sproščanja furosemida uporabili rezultate testa sproščanja iz medija s pH 3 (25).

Med testom sproščanja se je v mediju s pH 3 iz vseh mikrokapsul sprostilo manj kot 60 % vgrajene učinkovine, kar je razvidno iz slike 25a. Mikrokapsule v tem mediju sicer nabrekajo, vendar ne razpadejo popolnoma. Največ furosemida se je po štirih urah testa sproščanja sprostilo iz mikrokapsul s sestavo ovojnice P/A=75/25, hkrati pa je bilo sproščanje iz mikrokapsul s to sestavo tudi najhitrejše. Sledile so mikrokapsule s sestavo P/A=100/0 in P/A=50/50, a razlike niso signifikantne.



## REZULTATI IN RAZPRAVA

V mediju s pH 3 so najhitreje in najmočnejše nabrekale referenčne mikrosfere z ovojnico iz kalcijevega pektinata. Z večjim nabrekanjem hidrogela se otežuje sproščanje učinkovine skozi gelsko plast, saj je razdalja, ki jo mora učinkovina prepotovati, večja (16). To je najverjetneje tudi razlog, da se je iz mikrokapsul s pektinsko ovojnico sprostilo manj furosevida kot iz mikrokapsul s sestavo P/A=75/25. Mikrosfere s sestavo P/A=50/50 pa so v kislem mediju najmanj nabrekale, zato bi lahko pričakovali, da se bo največ furosevida sprostilo ravno iz mikrokapsul s 50 % alginata. Vendar pa je znano, da tvori alginat močnejši gel kot pektin, zato se z večanjem deleža alginata v ovojnici mikrokapsul zmanjšuje oz. upočasni difuzija skozi nabrekli matriks (18).

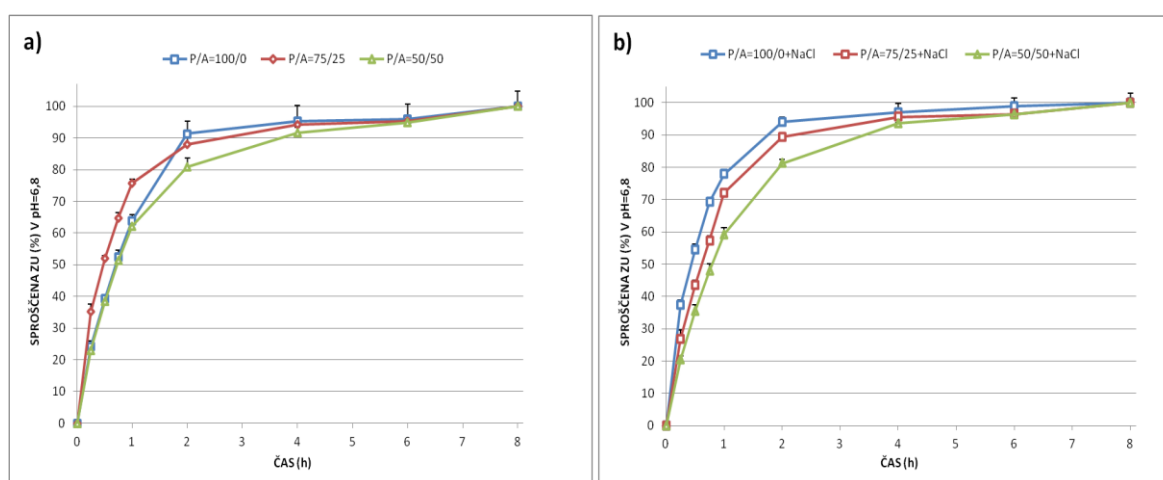


**Slika 25:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na sproščanje furosevida iz mikrokapsul v mediju s pH 3, (a) mikrokapsule brez NaCl in (b) mikrokapsule z dodanim NaCl.

V nevtralnem mediju s pH 6,8 (slika 26a) je bilo sproščanje furosevida bistveno hitrejše kot v kislem mediju. Velika večina zdravilne učinkovine se je iz mikrokapsul sprostila že po 2 urah, po osmih urah testa sproščanja so vse mikrokapsule popolnoma razpadle, kar pomeni, da se je iz njih sprostilo 100 % učinkovine. V prvi uri testa se je furosemid najhitreje sproščal iz mikrokapsul s sestavo ovojnice P/A=75/25, po dveh urah pa med mikrokapsulami s sestavo P/A=100/0 in P/A=75/25 ni bilo več bistvene razlike. Furosemid se je najpočasneje sproščal iz mikrokapsul z največjim deležem alginata (P/A=50/50), kjer je izmed vseh proučevanih formulacij nastal najmočnejši gel, ki upočasni difuzijo furosevida skozi ovojnico mikrokapsul.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Primerjali smo profila sproščanja ZU iz mikrokapsul brez NaCl in z dodanim NaCl v medijih s pH 3 (slika 25b) in pH 6,8 (slika 26b). Signifikantna razlika je bila v obeh medijih opazna le pri mikrokapsulah s sestavo ovojnice P/A=100/0, v kislem mediju se je pri tej formulaciji odstotek sproščene učinkovine povečal kar za 10 % v primerjavi z mikrokapsulami brez dodanega NaCl. Dodatek NaCl v polimerno raztopino s sestavo P/A=75/25 in 50/50 v nobenem od medijev za sproščanje ni povzročil sprememb v profilu sproščanja furosemda.



**Slika 26:** Vpliv razmerja pektin/alginat (P/A) na sproščanje furosemda iz mikrokapsul v mediju s pH 6,8, (a) mikrokapsule brez NaCl in (b) mikrokapsule z dodanim NaCl.

Mehanizem sproščanja iz polimernega matriksa lahko v večini primerov opišemo s pomočjo treh procesov: difuzije, nabrekanja in erozije.

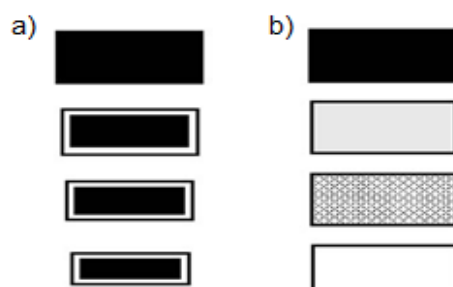
Sproščanje nadzorovano z difuzijo se glede na strukturo farmacevtske oblike deli na sproščanje iz rezervoarnih in ogrodnih sistemov. Rezervoarni sistem predstavlja filmski tip mikrokapsul, kjer je učinkovina dispergirana ali raztopljena v jedru. Ogrodni sistem pa predstavlja mikrokapsule, kjer je učinkovina porazdeljena po celotnem volumnu delca (51). Sproščanje učinkovine z difuzijo lahko opišemo z drugim Fickovim zakonom (48). Takšen način sproščanja dobro ponazarja Higuchijev matematični model (52).

Sproščanje nadzorovano z nabrekanjem je značilno za hidrofilne polimere, kjer lahko voda prodre v strukturo ogrodja in povzroči nabrekanje polimera. Hidrogeli pri tem preidejo iz steklastega stanja, kjer je vgrajena učinkovina nemobilna v strukturi polimera, v bolj

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

elastično stanje, kjer lahko molekule učinkovine hitreje difundirajo. Takšna oblika sproščanja je opisana s Korsmeyer-Peppasovim matematičnim modelom. Poleg geometrije farmacevtske oblike njihov model upošteva tudi nabrekanje polimera. Kadar je sproščanje nadzorovano z difuzijo, se v tem primeru uporablja Fickov model, kadar pa je odvisno od relaksacijskega časa polimera, pa govorimo o »Case II transportu«. Pri tem modelu sproščanja je pomemben difuzijski eksponent  $n$ , ki je za sferične oblike  $\leq 0,43$  pri difuziji in  $0,85$  pri »Case-II transportu«. 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. Pri vrednosti  $n > 0,85$  pa na mehanizem sproščanja vpliva povečana plastičnost viskozne bariere, t.i. polimernega gela, ki se relaksira (»Super Case II transport«). Pri računanju difuzijskega eksponenta  $n$  v Korsmeyer-Peppasovi enačbi uporabimo samo začetni del krivulje (do 60 % sproščene učinkovine) (51).

Sproščanje nadzorovano z erozijo obsega dva različna načina sproščanja, površinsko erozijo in erozijo celotnega ogrodja, t.i. »bulk erozijo«. Pri eroziji celotnega ogrodja prodira voda v sredico mikrokapsul, pri tem pa ostaja njihov premer vseskozi enak. Pri površinski eroziji se premer mikrokapsul zmanjšuje, saj poteka erozija le na zunanjem delu mikrokapsul (slika 27). Erozijsko nadzorovano sproščanje opisujemo s kinetiko 0. reda ali pa s Hixon-Crowellovo kinetiko, ki upošteva zmanjšanje površine mikrokapsul med sproščanjem (51).



**Slika 27:** Shematični prikaz površinske erozije (a) in erozije celotnega ogrodja (b) (51).

Z namenom, da bi podrobneje preučili mehanizme sproščanja, smo izračunali ujemanje eksperimentalnih rezultatov testa sproščanja furosemida v mediju s pH 3 z enačbami, ki

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

opisujejo različne kinetike sproščanja: 0. red (enačba 5), 1. red (enačba 6), Higucijeva kinetika (enačba 7), kinetika po Korsmejer-Peppasu (enačba 8), ter kinetika po Hixon-Crowellu (enačba 9). Sproščanje furosemida iz vseh mikrokapsul je v mediju s pH = 6,8 potekalo zelo hitro, zato preučevanje kinetike sproščanja v tem mediju ni bilo smiselno.

Preglednica VII prikazuje ujemanje rezultatov testa sproščanja z različnimi matematičnimi modeli. Iz preglednice je razvidno, da se rezultati testa sproščanja furosemida iz vseh mikrokapsul najboljše ujemajo s kinetiko sproščanja po Korsmejer-Peppasu, kar je razvidno iz vrednosti  $R^2$ , ki mora biti čim bližje 1. Dokaj visoke vrednosti  $R^2$  pa so dosežene tudi pri Higuchijevi kinetiki.

**Preglednica VII:** Determinacijski koeficienti korelacije in konstante sproščanja ZU iz mikrokapsul z različno sestavo ovojnice v vodni raztopini HCl s pH 3 za različne preizkušene enačbe kinetik sproščanja.

| Formulacija    | 0.red |       | 1.red |        | Higuchi |       | Korsmejer-Peppas |       |       | Hixon-Crowell |        |
|----------------|-------|-------|-------|--------|---------|-------|------------------|-------|-------|---------------|--------|
|                | $R^2$ | k     | $R^2$ | k      | $R^2$   | k     | $R^2$            | k     | $n$   | $R^2$         | k      |
| P/A=100/0      | 0,870 | 0,059 | 0,937 | -0,090 | 0,988   | 0,191 | 0,994            | 0,236 | 0,423 | 0,917         | -0,026 |
| P/A=100/0+NaCl | 0,767 | 0,069 | 0,940 | -0,096 | 0,988   | 0,191 | 0,991            | 0,237 | 0,440 | 0,919         | -0,027 |
| P/A=75/25      | 0,866 | 0,060 | 0,943 | -0,095 | 0,981   | 0,192 | 0,997            | 0,264 | 0,370 | 0,919         | -0,027 |
| P/A=75/25+NaCl | 0,866 | 0,062 | 0,943 | -0,102 | 0,981   | 0,192 | 0,997            | 0,259 | 0,370 | 0,922         | -,029  |
| P/A=50/50      | 0,882 | 0,056 | 0,934 | -,082  | 0,989   | 0,180 | 0,991            | 0,205 | 0,453 | 0,918         | -0,024 |
| P/A=50/50+NaCl | 0,882 | 0,059 | 0,937 | -0,087 | 0,989   | 0,180 | 0,991            | 0,205 | 0,453 | 0,921         | -0,025 |

Vrednost  $n$  pri Korsmejer-Peppasovi kinetiki je pri mikrokapsulah s sestavo ovojnice P/A=100/0, P/A=100/0+NaCl, P/A=75/25 in P/A=75/25+NaCl manjša od 0,43, kar

*REZULTATI IN RAZPRAVA*

pomeni, da gre za sproščanje, nadzorovano z difuzijo. Pri mikrokapsulah s 50 % pektina pa je vrednost  $n$  med 0,43 in 0,85, kar nakazuje na sproščanje, na katerega vpliva tako difuzija skozi polimerno ogrodje kot tudi relaksacija le-tega. To je v skladu z literaturnimi podatki (53, 54), ki navajajo, da je sproščanje učinkovine iz alginatnega matriksa nadzorovano z erozijo polimernega ogrodja in difuzijo skozi pore nabrekli matriksa (25). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da dodatek NaCl v raztopino za pripravo ovojnice mikrokapsul ne vpliva na kinetiko sproščanja učinkovine. Rezultati matematičnih modelov sproščanja učinkovine iz mikrokapsul so v skladu z eksperimentalnimi študijami nabrekanja in erozije referenčnih mikrosfer.

## 5. SKLEP

Namen diplomskega dela je bil izdelava mikrokapsul, ki kot jedrno fazo vsebujejo SMES s furosemidom kot modelno učinkovino. Zunanjo fazo predstavlja ovojnica iz 2 % raztopine polimerov pektina in alginata v različnih razmerjih, z dodatkom laktoze v vlogi polnila, z ali brez NaCl. Mikrokapsule smo dodatno obložili s hitosansko ovojnico. V diplomskem delu smo najprej ovrednotili jedrno fazo in izbrali SMES, ki je izkazoval najboljšo solubilizacijsko kapaciteto za furosemid. Nato smo proučevali vpliv razmerja med alginatom in pektinom (v ovojnici mikrokapsul) na lastnosti izdelanih mikrokapsul. V ta namen smo spremljali njegov vpliv na učinkovitost vgradnje SMES v polimerno ogrodje in na sproščanje učinkovine iz le-tega. S ciljem boljšega vpogleda v ta proces smo izvedli tudi študije nabrekanja in erozije referenčnih mikrosfer.

- Izdelali smo SMES iz mešanice Labrasola<sup>®</sup> in Plurola oleique<sup>®</sup> v razmerju 4:1, ki smo mu dodali različne deleže Miglyola 812<sup>®</sup>. Ugotovili smo, da se topnost furosemida zmanjšuje z večanjem deleža lipofilne faze v SMES. Za izdelavo mikrokapsul smo s pomočjo faznega diagrama in dobljenih rezultatov izbrali SMES s sestavo 88 % emulgatorjev in 12 % oljne faze. Po redčitvi izbranega SMES z vodno fazo se sicer obori veliko ZU, vendar ostane topnost slednje še vedno 206-krat višja kot v vodi.
- Sestava ovojnice vpliva na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom v mikrokapsule. Najvišjo učinkovitost vgradnje smo zagotovili pri mikrokapsulah s sestavo ovojnice P/A=75/25, brez dodanega natrijevega klorida. Dodatek NaCl v raztopino za pripravo ovojnice je znižal učinkovitost vgradnje pri formulacijah P/A=100/0 in 75/25, medtem ko pri mikrokapsulah s sestavo P/A=50/50 ni bilo signifikantnega vpliva na učinkovitost vgradnje.
- Pri preučevanju vpliva postopka sušenja na učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom smo ugotovili, da med sušenjem na zraku in v zvrtničenih plasteh zraka ni signifikantne razlike. Za nadaljnjo izdelavo mikrokapsul smo zaradi enostavnosti in hitrejšega časa sušenja izbrali postopek sušenja mikrokapsul v

*SKLEP*

zvrtničenih plasteh zraka. Ugotovili smo, da je dodatek natrijevega klorida zmanjšal iztekanje jedrne faze med procesom sušenja mikrokapsul.

- Med testom nabrekanja in erozije referenčnih mikrosfer smo ugotovili, da tako v kislem kot v nevtralnem mediju najbolj nabreka ogrodje iz pektina, z višanjem deleža alginata v ogrodju mikrosfer pa stopnja nabrekanja pada. V nevtralnem mediju vse mikrosfere nabrekajo hitreje in močnejše kot v kislem mediju, mikrosfere s sestavo P/A=100/0 in 75/25 so po dveh urah testa nabrekanja v mediju s pH 6,8 popolnoma razpadle.
- Mikrosfere, ki bolj nabrekajo, tudi hitreje erodirajo. V obeh medijih je bila erozija najmočnejša v prvi uri testa nabrekanja, pri čemer je bil razpad v pH 6,8 bolj intenziven. Najbolj so erodirale mikrosfere s pektinskim ogrodjem.
- Dodatek NaCl v polimerno ogrodje mikrosfer v mediju s pH 3 ni povečal stopnje nabrekanja pri nobeni od formulacij, medtem ko se je stopnja erozije v tem mediju povečala pri mikrosferah s sestavo P/A=75/25. V mediju s pH 6,8 sta se nabrekanje in erozija povečala samo pri mikrosferah s sestavo P/A=75/25, mikrosfere s 50 % pektina pa so v tem mediju nabrekale in erodirale celo manj kot mikrosfere brez dodanega NaCl.
- V medijih z enakim pH kot nabrekanje in erozijo smo spremljali tudi sproščanje furosemida iz mikrokapsul. V nevtralnem mediju je sproščanje furosemida bistveno hitrejše in v večjem obsegu kot v kislem mediju. V obeh medijih se največ učinkovine sprosti iz mikrokapsul s sestavo ovojnice P/A=75/25. Primerjava z rezultati nabrekanja referenčnih mikrosfer kaže, da je z večjim nabrekanjem hidrogela razdalja, ki jo mora ZU prepotovati, večja. Ker ogrodje s sestavo P/A=75/25 manj nabreka kot ogrodje iz pektina, se lahko iz P/A=75/25 mikrokapsul sprosti več učinkovine kot iz mikrokapsul s sestavo P/A=100/0. Mikrosfere s sestavo P/A=50/50 manj nabrekajo kot tiste z večjim deležem pektina, zato bi lahko pričakovali, da se bo iz mikrokapsul s to formulacijo sprostil največ furosemida, vendar pa tvori alginat močnejši gel kot pektin, kar zmanjšuje difuzijo učinkovine skozi nabrekli matriks in posledično zniža delež sproščene učinkovine v okoliški medij.

*SKLEP*

- Pri preučevanju kinetike sproščanja učinkovine smo ugotovili, da se iz mikrokapsul s sestavo ovojnice  $P/A=100/0$  in  $75/25$  učinkovina sprošča z difuzijo, pri mikrokapsulah s 50 % pektina pa je sproščanje nadzorovano tako z difuzijo kot z relaksacijo polimernega ogrodja.
- Vpliv NaCl na profil sproščanja učinkovine je v obeh medijih opazen le pri mikrokapsulah s sestavo  $P/A=100/0$ , kjer se je v kislem mediju sproščanje povečalo za 10 %. Dodatek natrijevega klorida v ovojnico ne vpliva na kinetiko sproščanja furosemida iz mikrokapsul.
- Za nadaljnje proučevanje so se kot najustreznejše izkazale mikrokapsule s sestavo ovojnice  $P/A=75/25$ , brez dodanega NaCl. Ta formulacija je dosegla najvišjo učinkovitost vgradnje SMES s furosemidom, prav tako pa se je iz mikrokapsul s to sestavo sprostil največ zdravilne učinkovine.



## 6. LITERATURA

1. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2008; 59 (5): 263-268.
2. Hauss DJ. *Oral Lipid-Based Formulations*, Informa Healthcare Inc., New York, 2007.
3. Amidon GL, Lennernas VP, Shah A. Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.
4. Pouton CW, Porter CJH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliver Rev* 2008; 60: 625-637.
5. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11, Suppl. 2: 93-98.
6. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev*, 2008; 60: 673 – 691.
7. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 173-182.
8. Kommuru TR, Gurley B, Khan MA, Reddy IK. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of Q10: Formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm* 2001; 212: 233-246.
9. Constantindines PP. Lipid Microemulsions for improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. *Pharm Res* 1995; 12: 1561-1572.
10. Park K, Yeo Y. Microencapsulation technology. In: Swarbric A. (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007: 2315-2327.

## LITERATURA

11. Vaje iz farmacevtske tehnologije. Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002, 20-25.
12. Jackson SJ, Lee K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensm Wiss Technol*; 24: 289-297.
13. Zvonar A, Gašperlin M. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farm Vestn* 2011; 62 (3): 131-138.
14. Wang W, Liu X, Xie Y et al. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J Mater Chem* 2006; 16: 3252-3267.
15. Sriamornsak P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. *Silpakorn Univ Int J* 2003; 3: 206-228.
16. Sriamornsak P, Thirawong N, Weerapol Y, Nunthanid J, Sungthongjeen S. Swelling and erosion of pectin matrix tablets and their impact on drug release behaviour. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 211-219.
17. Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC. An overview on pectins. *TFPJ* 2006; June-July Issue: 44-51.
18. Jaya S, Durance TD, Wang R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *J Microencapsul* 2009; 26 (2): 143-153.
19. Mørch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. A study of the structure-function relationship in native and structurally engineering alginates. Thesis for the degree of doktor ingeniør. Throndeim, February 2008.
20. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliver Rev* 1998; 31: 267-285.
21. Webber RE, Shull KR. Strain Dependence of the Viscoelastic Properties of Alginate Hydrogels. *Macromolekules* 2004; 37: 6153-6160.
22. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A: Alginat v dostavnih sistemih. *Farm Vestn* 2008; 59: 293-301.
23. Kovač V, Krbavčič A: Alginatna vlakna in alginatne obloge kot sanitetni in obvezilni material. *Farm Vestn*. 1999; 50: 41-52.
24. Agnihotri AS, Mallikarjuna NN, Aminabhavi MT. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 2004; 100: 5-28.

*LITERATURA*

25. Zvonar A. Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2010.
26. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vestn* 2006; 57: 287-291.
27. Gunder W, Lippold BH, Lippold BC. Release of drugs from ethyl cellulose microcapsules (diffusion pellets) with pore formers and pore fusion. *J Pharm Sci* 1995, 3: 203-214.
28. Bevc B. Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2010.
29. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn EM. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>th</sup> Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, London, Washington 2009.
30. Kumar R, Majeti NV. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *J Pharm Sci* 2000; 3 (2): 234-258.
31. Pluess-Wenzinger R, Widmer F, Heinzen C, Brandenberger H. Method and device for capsulating microbial, plant and animal cells or biological and chemical substances. EP1062032. Inotech AG 2000.
32. *Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE 50R*. Inotech Encapsulation AG, Dottikon, Switzerland 2002.
33. Šuligoj D. Izdelava mikrokapsul na osnovi samomikroemulgirajočih sistemov z metodo vibrirajoče membrane. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2005.
34. Proizvajalčeva specifikacija, Gattefossé, Francija.
35. *European Pharmacopoeia*. *European Pharmacopoeia*. 7<sup>th</sup> Ed. Council of Europe, Strasbourg 2010.
36. Proizvajalčeva specifikacija, Sasol GmbH, Nemčija.
37. *The Merck Index*. 13<sup>th</sup> Ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, NJ, USA 2001.
38. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 603-632.
39. Proizvajalčeva specifikacija, dosegljivo na [www.aerosil.com](http://www.aerosil.com), datum dostopa 17.1.2012.

## LITERATURA

40. Varnostni list, dosegljiv na [http://www.merck-chemicals.com/slovenia/acetonitrile/MDA\\_CHEM-100029/p\\_HJCb.s1Ld8gAAAEWp.AfVhTI?attachments=MSDS](http://www.merck-chemicals.com/slovenia/acetonitrile/MDA_CHEM-100029/p_HJCb.s1Ld8gAAAEWp.AfVhTI?attachments=MSDS), datum dostopa 17.1.2012.
41. Sean C. Sweetman, ed. Martindale: The Complete Drug Reference (36th edition). Pharmaceutical Press, London 2009.
42. Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins, Baltimore 2002: 525-526.
43. Klausner EA, Lavy E, Stepensky D, Cserepes E, Barta M, Friedman M, Hoffman A. Furosemide Pharmacokinetics and Pharmacodynamics following Gastroretentive Dosage Form Administration to Healthy Volunteers. J Clin Pharmacol 2003; 43: 711-720.
44. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology, 5<sup>th</sup> edition. Churchill Livingstone, 2003.
45. Gašperlin M, Špiclin P. Caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions: physicochemical and phase behaviour properties. Sci Pharm 2001; 69: 157–158.
46. Beyers H, Malan SF, van der Watt JG, de Villiers MM. Structure-solubility relationship and thermal decomposition of furosemide. Drug Dev Ind Pharm 2000; 26(10): 1077-1083.
47. Zvonar A, Berginc K, Kristl A, Gašperlin M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide. Int J Pharm 2010; 388 (1-2): 151-158.
48. Arifin JD, Lee YL. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. Adv Drug Deliver Rev 2006; 58: 1274-1325.
49. Fu Y, Kao J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. Informa UK. 2010; 7(4): 429-444.
50. Sriamornsak P, Kennedy RA. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. Int J Pharm 2008; 385: 205-213.
51. Lin C, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modelling. Adv Drug Deliver Rev 2006; 58: 1379-1408.

*LITERATURA*

52. Siepmann J, Peppas NA. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *Int J Pharm* 2011; 418: 6-12.
53. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliver Rev* 1998, 31: 267-285.
54. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 621-630.