

# **Pellets med ulike kryssbindere coatet med biopolymerer for tykktarmspesifikk frisetting**

*Mastergradsoppgave i galenisk farmasi*

**Terje Skøien**



Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Våren 2008

## Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden mars 2007 til mai 2008.

En stor takk rettes til min veileder, førsteamanuensis Marianne Hiorth for god veiledning, fruktbare diskusjoner samt prioritering og engasjement for prosjektet.

Takk rettes også til min veileder professor Sverre Arne Sande for gode råd og innspill samt god veiledning.

Takk til ingeniør Helge Gundersen for veiledning og hjelp under laboratoriearbeidet.

En stor takk rettes til min kone, Helene, for tålmodighet og støtte under hele farmasi-studiet. Takk for at du alltid er der.

En takk går også til mine foreldre for god støtte under hele farmasistudiet.

Til slutt vil jeg spesielt takke Tore for fruktbart samarbeid under hele studiet, i tillegg til Ida, Kristine og Sverre. Studiet kunne fort blitt grått uten dere!

Blindern, mai 2008

Terje Skøien

# Innhold

<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>8</b>
1.1 BAKGRUNN.....	8
1.2 MÅLSETTING.....	9
<b>2. TEORI</b> .....	<b>10</b>
2.1 MÅLSTYRT FRISSETTING TIL TYKKTARMEN .....	10
2.1.1 <i>Hvorfor målstyrt frisetting til tykktarmen?</i> .....	10
2.1.2 <i>Fysiologiske og anatomiske forhold i gastrointestinaltrakten</i> .....	11
2.1.3 <i>Hvordan oppnå målstyrt frisetting til tykktarmen?</i> .....	12
2.2 PELLETS .....	14
2.2.1 <i>Generelt</i> .....	14
2.2.2 <i>Fremstilling av pellets</i> .....	15
2.2.3 <i>Farmasøytiske fordeler ved bruk av pellets</i> .....	15
2.3 COATING.....	16
2.3.1 <i>Hvorfor coate?</i> .....	16
2.3.2 <i>Coatingmetoder</i> .....	16
2.3.3 <i>Coatingformuleringer</i> .....	17
2.3.4 <i>Frisettingsmekanismer for coatede formuleringer</i> .....	17
2.4 PEKTIN.....	18
2.4.1 <i>Opprinnelse og struktur</i> .....	18
2.4.2 <i>pK<sub>a</sub>-verdi og løselighet</i> .....	19
2.4.3 <i>Hvorfor egner pektin seg for målstyring til tykktarmen?</i> .....	19
2.5 ALGINAT .....	20
2.5.1 <i>Opprinnelse og struktur</i> .....	20
2.5.2 <i>pK<sub>a</sub>-verdi og løselighet</i> .....	21
2.5.3 <i>Hvorfor egner alginat seg for målstyring til tykktarmen?</i> .....	22
2.6 KITOSAN.....	23
2.6.1 <i>Opprinnelse og struktur</i> .....	23
2.6.2 <i>pK<sub>a</sub>-verdi og løselighet</i> .....	24
2.6.3 <i>Hvorfor egner kitosan seg for målstyring til tykktarmen?</i> .....	24
2.7 KRYSSBINDING OG GELDANNELSE .....	25
2.8 MULTIVARIAT DATAANALYSE .....	28
2.8.1 <i>Generelt</i> .....	28
2.8.2 <i>Partial Least Square – PLS</i> .....	28
<b>3. MATERIALE</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIALER.....	31
3.2 LØSNINGER .....	31
3.2.1 <i>0,1 M saltsyre</i> .....	31

3.2.2	<i>0,2 M natriumfosfat</i>	31
3.2.3	<i>2 M saltsyre</i>	31
3.2.4	<i>2 M natriumhydroksid</i>	32
3.3	UTSTYR	32
3.3.1	<i>Fremstilling av pellets</i>	32
3.3.2	<i>Coating av pellets</i>	32
3.3.3	<i>Frisetting av pellets</i>	32
3.3.4	<i>Karakterisering av pellets</i>	33
<b>4.</b>	<b>METODE</b>	<b>34</b>
4.1	FREMSTILLING AV PELLETS	34
4.1.1	<i>Fremstilling av granulater til pellets</i>	34
4.1.2	<i>Pelletsfremstilling</i>	35
4.1.3	<i>Sikting</i>	35
4.2	COATING AV PELLETS	35
4.2.1	<i>Spraycoating</i>	35
4.2.2	<i>Immersjonscoating</i>	35
4.2.3	<i>Bestemmelse av innkapslingseffektivitet</i>	36
4.3	STUDIER AV PELLETERNES SVELLINGSEGENSKAPER	37
4.4	BESTEMMELSE AV BRUDDSTYRKE	38
4.5	SEM-BILDER	38
4.6	FRISSETTING	38
4.7	EKSPERIMENTELT DESIGN	39
4.7.1	<i>Valg av stoffer og konsentrasjoner</i>	40
4.7.2	<i>Begrensninger</i>	41
4.7.3	<i>Ekspperimentelt design</i>	41
<b>5.</b>	<b>RESULTAT &amp; DISKUSJON</b>	<b>43</b>
5.1	FREMSTILLING AV PELLETS	43
5.1.1	<i>Pellets med 10 % kalsium i kjernen</i>	43
5.1.2	<i>Pellets med 10 % kitosan i kjernen</i>	44
5.1.3	<i>Pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen</i>	44
5.2	PELLETJKJERNENES BRUDDSTYRKE	46
5.3	SEM-BILDER AV PELLETKJERNENE	47
5.4	DE UCOATEDE PELLETKJERNENES FRISSETTING	48
5.5	SPRAYCOATING	50
5.5.1	<i>SEM-bilder av spraycoatede pellets</i>	51
5.5.2	<i>Frisetting fra spraycoatede pellets</i>	52
5.5.3	<i>Evaluerer av spraycoating</i>	55
5.6	IMMERSJONSCOATING	55
5.6.1	<i>Innkapslingseffektivitet</i>	55
5.6.2	<i>Pelletenes svellingsegenskaper</i>	56

5.6.3	<i>SEM-bilder av immersjonscoatede pellets</i> .....	63
5.6.4	<i>Effekt av immersjonscoating med pektin</i> .....	65
5.6.5	<i>Sammenligning av immersjonscoating med pektin og alginat</i> .....	69
5.6.6	<i>Sammenligning av frisetting i fosfatbuffer for de to pellettypene</i> .....	74
5.6.7	<i>Evaluering av coatingmetoder</i> .....	76
<b>6.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>77</b>
	<b>KILDELISTE</b> .....	<b>78</b>
	<b>VEDLEGG</b> .....	<b>86</b>
	VEDLEGG 1 .....	87
	VEDLEGG 2 .....	88
	VEDLEGG 3 .....	91

# Sammendrag

Målstyrt frisetting til tykktarmen kan forbedre behandlingen av lokale lidelser i tarmen samt enkelte systemiske lidelser. Doseringen kan reduseres og bivirkninger vil dermed også antagelig bli redusert. Pellets har flere fordeler fremfor tabletter, hovedsakelig at de har en mer forutsigbar fordeling og transittid i tarmen. En mulighet for å oppnå målstyrt frisetting i tykktarmen er å coate pellets. Coatinglaget må være intakt til den når tykktarmen for så å bli løst opp eller brutt ned der. Naturlige polymerer som pektin og alginat brytes ned av bakterielle enzymer som kun finnes i tykktarmen, men de er vannløselige og fungerer derfor dårlig alene i en formulering. For å unngå at de løses opp og at virkestoffet frisettes før tykktarmen kan de komplekseres med motsatt ladde ioner. Både kitosan og kalsium har gitt gode resultater når de har blitt benyttet som motioner. Komplekset vil beskytte formuleringen og kun slippe ut små mengder virkestoff før det ankommer tykktarmen. I tykktarmen blir formuleringen brutt ned og virkestoffet frisatt.

Tre forskjellige pelletkjerner ble produsert, med 10 % kalsium og/eller 10 % kitosan i kjernen. Pelletene med 10 % kitosan i kjernen var for svake til å tåle coatingprosessen. De andre to pellettypene ble coatet med to forskjellige biopolymerer; pektin og alginat. Pektin og alginat ble kompleksert med kitosan eller kalsium ( $\text{CaCl}_2$ ). To forskjellige coatingmetoder ble undersøkt; spraycoating og immersjonscoating. Spraycoating viste seg å være uegnet fordi pelletene aggregerte samt at spraydysen gikk tett. Frisetting av modellsubstansen riboflavin fra pelletene ble testet i 1 time i 0,1 M HCl etterfulgt av 4 timer i fosfatbuffer pH 6,8. Samtlige coatingkomplekser senket frisettingen sammenlignet med de respektive ucoatede pelletkjernene. Pelletene som var blitt immersjonscoatet reduserte frisettingen mer enn pelletene som hadde blitt spraycoatet. Coatinglaget som ga den laveste frisettingen både i 0,1 M HCl og fosfatbuffer pH 6,8 bestod av en kombinasjon av 1 % alginat og 0,1 % kitosan og ble påført ved immersjonscoating på pellets med 10 % kalsium i kjernen.

Multivariat dataanalyse ble benyttet for å undersøke hvilke faktorer som hadde størst effekt på mengde frisatt virkestoff. Den statistiske evalueringen viste at pellets med 10 % kalsium i kjernen frisatte mindre virkestoff enn pellets med 10 % kalsium + 10

## Sammendrag

% kitosan i kjernen etter fire timer i frisettingsmedium som etterlignet miljøet i mage og tynntarm. Det ble også funnet at alginat hadde en lavere frisetting enn pektin, uavhengig av motion. Type motion hadde større betydning for frisettingen fra pektinkomplekset enn frisettingen fra alginatkomplekset. Årsaken er at alginat, i motsetning til pektin mest sannsynlig danner et kompleks med kitosanet i kjernen til pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan. Av motionene ga kitosan generelt lavere frisetting enn kalsium, uten at det ble funnet signifikante forskjeller i de to kitosankonsentrasjonene som ble undersøkt.

# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Det er mange fordeler knyttet til tykktarmspesifikk frigjøring av virkestoff. Ved lokal behandling vil det være mulig å oppnå en høyere konsentrasjon av virkestoffet lokalt samtidig som det blir lavere systemisk konsentrasjon. Doseringen kan dermed reduseres, noe som fører til færre bivirkninger. Ved ønske om systemisk behandling kan man beskytte labile virkestoffer ved målstyring til tykktarmen, som proteiner og peptider, slik at de unngår det fiendtlige og nedbrytende miljøet i magen og tynntarmen [1]. Det er i tillegg en del virkestoffer som har dårlig absorpsjon i tynntarmen. Disse kan teoretisk få bedre opptak i tykktarmen som følge av den lange transittiden der [2].

For å oppnå tykktarmsspesifikk frisetting har ulike metoder vært undersøkt. Konvensjonelle orale doseringsformer er ineffektive til dette formål fordi den aktive komponenten degraderes eller absorberes i øvre gastrointestinaltrakt (GI). De mest lovende resultatene er oppnådd ved coating eller inkorporering av ulike biopolymerer i formuleringene. Disse stoffene blir først brutt ned når de ankommer tykktarmen [3].

Coating med pektin [4, 5] og alginat [6, 7] er mye undersøkt for å oppnå tykktarmspesifikk frisetting [4, 5]. Disse polymerene er i utgangspunktet vannløselige, men hvis de kombineres med divalente kationer, som kalsium, vil det dannes komplekser og løseligheten reduseres [8, 9]. En videre senkning av vannløseligheten kan oppnås ved å kombinere pektin [10] og alginat [11] med kitosan. I kombinasjon med kitosan vil de danne et kompleks som i liten grad løses i det sure miljøet i magen og i tynntarmen. Disse polymerkompleksene degraderes i tykktarmen av enzymer som skiller ut av bakterier som naturlig finnes der. Virkestoffet vil som følge av dette da bli frisatt [12].



### 1.2 Målsetting

Hovedmålet med oppgaven var å finne den formuleringen som ga lavest frisetting i et miljø som etterlignet mage og tynntarm og som dermed er best egnet for tykktarmspesifikk frisetting.

Målet med oppgaven var å produsere tre ulike typer pellets som inneholdt 10 % kalsium, 10 % kitosan eller 10 % kalsium og 10 % kitosan (heretter kalt 10 % kalsium + 10 % kitosan) i kjernen. Pelletene skulle bli coatet ved to forskjellige metoder; spraycoating og immersjonscoating. Det skulle i disse prosessene bli påført forskjellige polymerer og motioner. Polymerene som ble undersøkt var pektin og alginat. Kalsium og kitosan ble brukt som motioner. Konsentrasjonen av både pektin og kitosan ble variert i noen av forsøkene. Det skulle deretter utføres frisettingsforsøk i et miljø som etterlignet mage og tynntarm for å studere effekten av de ulike variablene. Pelletene skulle i tillegg karakteriseres med hensyn til form, størrelse og svelling.

## 2. Teori

### 2.1 Målstyrt frisetting til tykktarmen

#### 2.1.1 Hvorfor målstyrt frisetting til tykktarmen?

Målstyring av legemidler til spesifikke organer som for eksempel tykktarmen har mange fordeler. Først og fremst kan doseringen senkes og dette fører ofte til færre bivirkninger [3].

De fleste tykktarmssykdommer behandles mer effektivt når virkestoffet leveres lokalt, som *Crohn`s sykdom*, ulcerøs kolitt, forstoppelse, tykktarmskreft, *spastic colon* og *irritable bowel syndrome*. Markmidler og diagnostiske stoffer vil også være mer effektive hvis de plasseres direkte i det affekteerte området. Som en konsekvens av dette kan doseringen reduseres. I tilfeller hvor det er ønskelig med forsinket absorpsjon, som for eksempel på natten eller om morgenen, vil en også kunne ha utbytte av målstyring til tykktarmen. Sykdommer hvor dette vil være en fordel er angina, astma og artritt [3]. Proteiner og peptider, som insulin og vaksiner, brytes i mindre grad ned i tykktarmen enn tynntarmen fordi det er lavere enzymaktivitet. Flere studier har blitt utført for å se om en kan benytte oral administrasjon for slike stoffer [13, 14].

Selv om oral levering av legemidler er den mest brukte administrasjonsveien er det ikke en problemfri måte å administrere legemidler på. GI inneholder flere barrierer som vanskeliggjør absorpsjonen. Surfaktanter som gallesalter, enzymatisk aktivitet og varierende pH kan ødelegge eller kompleksere virkestoffet. Disse parametrene kan i tillegg variere, både inter- og intraindividuell. Det kan føre til uakseptable variasjoner i opptaket selv for stabile molekyler [15].

Målstyring til tykktarmen er interessant både på grunn av tykktarmens begrensede enzymatiske aktivitet og den lange transittiden. Dette kan utnyttes ved at virkestoffet holdes intakt i tykktarmen over en mye lengre tidsperiode enn det som er mulig i

tynntarmen. Det er i tillegg mindre intensitet og variasjoner i den enzymatiske aktiviteten i tykktarmen enn i magen og tynntarmen [15].

De fleste virkestoff absorberes dårligere i tykktarmen enn i tynntarmen, med noen kjente unntak [3]. Spesielt for peptider og proteiner er permeabiliteten utilstrekkelig til at nødvendig mengde virkestoff kan absorberes. Inkorporering av absorpsjonsøkende stoffer, eller *enhancere* i formuleringen kan bedre dette. Flere studier viser at *enhancere* kan øke absorpsjonen dramatisk [16, 17]. Det er også vist at disse virker spesielt godt i tykktarmen [18-20]. Problemet med slike stoffer er at de gjør tarmepitelet mer permeabelt for flere stoffer enn bare virkestoffet. Usikkerheten rundt varigheten til økningen av tarmepitelets permeabilitet og konsekvensen av dette, gjør at flere studier må utføres før *enhancere* kan benyttes i formuleringer [15].

Det er flere ulemper knyttet til å levere virkestoff til tykktarmen. Bakterielle enzymer, toksiner og sammenpressing av *feces* er hindre som må tas hensyn til. Likevel mener mange at disse hindrene lettere kan overvinnes enn de hindringene som finnes i magen og tynntarmen [15]. Rektal administrasjon er en alternativ behandlingsform, men denne er lite foretrukket. Det er i tillegg sjeldent at denne administrasjonsveien lykkes med å få virkestoffet høyere opp enn *ascending colon* [3, 21].

### 2.1.2 Fysiologiske og anatomiske forhold i gastrointestinaltrakten

GI-trakten kan deles inn i mage, tynntarm og tykktarm. Tykktarmen kan igjen deles inn i colon, rektum og analkanalen. For målstyring til tykktarmen er det spesielt to hensyn som er viktige, pH-verdien i de forskjellige delene av tarmen samt passasjetiden. Dette er oppsummert i tabell 1 [3].

Som det går frem av tabellen har tykktarmen mye mindre overflate enn tynntarmen. Det er fordi tykktarmen mangler *villi*, som er små utvekster som mangedobler overflaten og dermed absorpsjonsevnen til tynntarmen. I tillegg er viskositeten til tarminnholdet høyere i tykktarmen, noe som gjør virkestoffets diffusjon inn til tarmoverflaten vanskeligere [3]. Det er også redusert permeabilitet for polare substanser i tykktarmen på grunn av *tight junctions*. Det vil si at epitelcellene ligger veldig tett slik at stoffer må absorberes gjennom de lipofile cellene. I tillegg til disse faktorene er det flere fysiologiske forhold som hemmer absorpsjonen fra tykktarmen.

Disse blir omtalt i en artikkel av Mrsny [15]. Til tross for flere ugunstige faktorer, som binding til *feces* eller det anioniske *mucus*-laget på tarmveggen, har det vist seg at flere virkestoff har god absorpsjon fra tykktarmen både med og uten enhancere [15, 22]

Tabell 1 Oversikt over fysiologiske forhold gjennom gastrointestinaltrakten.

Område	Lengde	Overflate	Passasjetid	pH	Mikroflora
<b>Magesekk</b>	0,65 m		1-10 timer (avhengig av matinntak)	1,5-2 (fastende)  3-5 (ikke fastende)	$>10^4$ CFU/ml
<b>Tynntarm</b>	5-8 m	150-200 m <sup>2</sup>	3-4 timer	5-7,5	$>10^4$ CFU/ml
<b>Tykktarm</b>	1,5 m	0,13 m <sup>2</sup>	20-30 timer	6,0-7,6	$10^{11}$ - $10^{12}$ CFU/ml

### 2.1.3 Hvordan oppnå målstyrt frisetting til tykktarmen?

Flere fremgangsmåter for å levere virkestoff spesifikt til tykktarmen, utover rektal administrasjon, er blitt undersøkt [21]. Foreløpig er følgende metoder prøvd for oral levering:

- Prodrugs

Prodrugs er molekyler som må gjennom en biotransformasjon for å bli farmakologisk aktive [3]. Et prodrug består av en aktiv komponent som ved hjelp av en spesifikk binding er bundet sammen med en inaktiv komponent. Det er bindingen mellom aktiv og inaktiv komponent som fungerer som målstyringsenhet. Enzymer som produseres av bakterier i tykktarmen bryter ned bindingen og den aktive komponenten frigjøres. Et eksempel er Sulphasalazine (SAS) som blant annet brukes i behandlingen av Crohn`s sykdom og ulcerøs kolitt. SAS består av 5-aminosalisylysyre (5-ASA) (aktiv del) bundet sammen med sulfapyridin (SP) (inaktiv del) vha en azo-binding. Kun en liten del blir brutt ned eller absorbert før legemidlet når tykktarmen. I

tykktarmen spaltes azo-bindingen slik at den aktive delen frigjøres og kan virke [3].

- Coating med pH-sensitive polymerer

Som beskrevet i tabell 1 øker pH-verdien nedover i GI-trakten. For å utnytte dette kan man coate formuleringer med pH-avhengige polymerer som er uløselig i lav pH, men løselig ved nøytral eller alkalisk pH. Virkestoffet vil da frigis i nedre del av tynntarmen eller i tykktarmen. Det er to hovedproblemer knyttet til denne tilnærmingen. For det første er pH-verdien i siste del av tynntarmen høyere enn i tykktarmen og for det andre er pH-verdien i tarmen ustabil [3, 23]. Den influeres av matinntak, sykdommer og tilstedeværelsen av fettsyrer, karbondioksid og andre fermenterende produkter. Dette fører til at virkestoffets frigivelsessted varierer, både intra- og interindividuellt [3].

- Tidsavhengige formuleringer

Formuleringer med tidsavhengig målstyring har en ytre coating som er magesyre-resistent. Under dette coatinglaget er formuleringen designet til å tåle en viss tid i tarmen før den brytes ned og frigjør virkestoffet. Lengden på denne fasen bestemmes ut fra transittiden gjennom GI (se tabell 1). Et problem med denne teknologien er at formuleringer midlertidig kan sette seg fast i overgangen mellom tynntarmen og tykktarmen. Dette vil føre til en for tidlig frigivelse av virkestoffet [3]. I tillegg kan transittiden gjennom GI variere slik at lokaliseringen til virkestoffets frisetting kan variere [8].

- Bakterielt nedbrytbare systemer

- Bakterielt nedbrytbare coatinger

Enkelte polymerer og bindinger brytes ned av enzymer produsert av bakterier som kun finnes i tykktarmen. Azo-bindinger, som er nevnt over, samt en del polysakkarider er eksempler på stoffer som spaltes av disse enzymene. De kan dermed brukes i coatinger for å hindre nedbryning og/eller absorpsjon i mage og tynntarm. I og med at det er bakterielle enzymer som kun er tilstede i tykktarmen som er ansvarlige for spaltingen fører dette til en selektiv målstyring av virkestoffet. Det er vist at hydrofilisiteten til polymeren er viktig siden vann må kunne trenge inn for at polymeren skal svulle. Hydrofilisiteten må ikke være for høy fordi den da også vil frigi virkestoff før den når

tykktarmen. Siden denne teknologien baserer seg på forhold som er spesifikke for tykktarmen er den ansett som den mest lovende [3, 24].

- Biodegraderbar matriks- og hydrogelsystemer

En annen mulighet er å blande virkestoffet med en enzymatisk degraderbar eller svellende polymer. Produktet kalles enten monolitt eller multipartikulær fast doseringsform, hvor virkestoffet blandet sammen med polymeren. Problemet med monolittproduktet er størrelsen som tilsvarer en vanlig tablett. Monolitt doseringsformen er avhengig av magetømmingshastigheten siden de er for store til å slippe ut av en lukket *pylorus*, som er porten mellom magen og tynntarmen. I tillegg kan det midlertidig sette seg fast i overgangen mellom tynntarmen og tykktarmen, og dermed frigi en del av virkestoffet for tidlig. Dette kan bedres ved å benytte multipartikulære doseringsformer, som pellets, da disse er mindre og dermed ikke har de samme problemene [3]. Et eksempel på et slikt multipartikulært system er pektin som er blitt kryssbundet med  $\text{CaCl}_2$  [25]. Hovedproblemet med slike matrikser og hydrogelsystemer er at kun en begrenset mengde virkestoff kan inkorporeres fordi en stor mengde av formuleringen må bestå av polymeren [3].

- Trykkstyrte formuleringer

I tarmen går det regelmessig peristaltiske bølger og disse er sterkere i tykktarmen enn i tynntarmen. Sammen med absorpsjonen av vann fører dette til et økt lumbinalt trykk i tykktarmen og dette utnyttes i denne formuleringstypen. Formuleringen er designet slik at den ødelegges så snart trykket overgår en viss grense og virkestoffet vil da frigjøres [26, 27]. Et problem ved dette prinsippet er at reproduserbarheten og varigheten av høytrykkfasen er usikker [28].

## 2.2 Pellets

### 2.2.1 Generelt

Pellets er små sfæriske enheter som fremstilles ved en agglomerasjonsprosess. I produksjonsprosessen fuktes pulveret slik at det blir en frittflytende, støvfri masse, før

det ekstruderes og sfæroniseres. Ferdigproduserte pellets ligger normalt i størrelsesområdet 0,7-2,0 mm [29].

### 2.2.2 Fremstilling av pellets

Pellets kan fremstilles på flere ulike måter. De to mest vanlige måtene er ved ekstrudering og påfølgende sfæronisering og ved spraygranulering, hvor en væske med oppløst virkestoff og hjelpestoff sprøytes på en *non-pareil* kule [29].

Ved ekstrudering og sfæronisering blandes først de forskjellige bestanddelene til en homogen blanding før det blir tilsatt granuleringsvæske. Pulveret aggregerer da til en fuktig masse. Granuleringsvæsken må være flyktig slik at den lar seg fjerne ved tørking og den må ikke være toksisk [30]. Massen kalles nå granulat og dette blir overført til en ekstruder. Det finnes flere ulike typer ekstrudere, men likt for dem alle er at det utøves et trykk mot granulatet slik at det flyter gjennom små hull. Det dannes dermed små sylindere som samles opp. Det er dette som er ekstrudatet og det har samme diameter som hullene granulatet ble presset gjennom [31]. Ekstrudatet overføres så til en roterende friksjonsplate hvor sylindrene brytes opp og sfæroniseres til små pellets med en diameter omtrent tilsvarende ekstrudatets [32]. Pelletene må deretter tørke slik at granuleringsvæsken fordampes, før de er klare til bruk.

### 2.2.3 Farmasøytiske fordeler ved bruk av pellets

Pellets er et såkalt multipartikulært doseringssystem siden en dose består av flere pellets. Disse fylles oftest i en kapsel for å lette administrasjonen [33]. Fordelen med å bruke et multipartikulært doseringssystem (MUPS) er at det er en pålitelig formulering som har alle fordelene til en single unit (SU)-formulering, dvs en konvensjonell tablett, samtidig som den er fri for en del av SU-formuleringens begrensende faktorer som store variasjoner rundt magetømmingshastigheten og enhet til enhet variasjon [34, 35]. Et generelt akseptert syn er at multipartikulære systemer fungerer bedre *in vivo* enn en SU-formulering siden de spres ut over et stort område i tarmen og dermed skaper mindre irritasjon, har en lengre transittid og gir en mer reproduserbar frisetting av virkestoffet [35].

Årsaken til at magetømmingshastigheten varierer i mye større grad med SU-formuleringer er blant annet at *pylorus* er  $12 \pm 7$  mm. Pelletene vil dermed slippe igjennom uten opphold, mens tabletter kan få et midlertidig stopp. Det gjør at virkestoffet kan bli frisatt for tidlig [36, 37]. I tillegg har både Adkin et al. og Hebden et al. vist at større tabletter beveger seg raskere gjennom første halvdel (proksimale og midtre del) av tykktarmen samt har et høyere standardavvik på hastigheten, enn mindre tabletter og pellets [38, 39]. Pellets er derfor foretrukket fremfor tabletter da de har en mer reproducerbar transittid gjennom GI. De beveger seg i tillegg saktere gjennom første del av tykktarmen hvor det er ønskelig at virkestoffet skal frigjøres [3].

Det er også mulig å produsere avanserte frigivelsesmønstre med multipartikulære systemer ved at pellets med forskjellige størrelser og/eller egenskaper blandes i en doseringsenhet. Forskjellige virkestoff som ikke er kompatible med hverandre kan i tillegg blandes i en multipartikulær formulering, i motsetning til en SU-formulering, så lenge virkestoffene produseres i forskjellige pellets. [40].

## 2.3 Coating

### 2.3.1 Hvorfor coate?

Det er ulike årsaker til at en velger å coate en formulering. De vanligste grunnene er for å beskytte virkestoffet, for eksempel fra lys eller fuktighet samt for å lette svelging eller maskere eventuell vond smak. Fargede coatinger kan også brukes for å maskere fargenyanser eller som et ledd i markedsføringen. Coatinglaget kan i tillegg forsterke formuleringer og eliminere støv og krysskontaminering slik at produksjons- og pakkeprosessen blir enklere. I tillegg kan coating benyttes for å oppnå kontrollert frisetting [41].

### 2.3.2 Coatingmetoder

De tre vanligste coatingprinsippene er filmcoating, sukkerdrasjering og presscoating. Sukkerdrasjering er den eldste teknikken, mens filmcoating nå er det vanligste coatingprinsippet [41]. Presscoating benyttes for eksempel hvis noen av stoffene



som brukes ikke tåler fuktighet eller har dårlig løselighet [42]. En annen metode er immersjonscoating, hvor formuleringen blir senket ned i coatingmediet [43].

Immersjonscoating skiller seg ut fra de andre metodene siden coatinglaget blir påført ved at den adherer til formuleringen fra en væske, ved en kjemisk kryssbindingsreaksjon mens de andre coatinglagene presses eller sprayes på. For å få immersjonsprosessen til å fungere må det benyttes stoffer med motsatt ladning, for eksempel  $\text{Ca}^{2+}$  i pelletkjernen og en anionisk polymer som pektin i immersjonsvæsken. Kalsiumsaltet i kjernen vil bli løst opp av væsken og diffundere til overflaten, hvor det kryssbinder pektin, som er løst i væsken, slik at det blir dannet et kalsium-pektinkompleks på overflaten av pelleten [43].

### 2.3.3 Coatingformuleringer

Det finnes en rekke forskjellige polymerer som egner seg som coating, både naturlige og syntetiske. En ulempe med syntetiske polymerer er at de må gjennom detaljerte toksikologiske studier før de kan tas i bruk. Det vil derfor i denne oppgaven bli fokusert på de naturlige polymerene. Disse har sitt opphav fra et stort mangfold av kilder som alger (alginat), planter (pektin), mikroorganismer (dextran) og dyr (kitosan). I tillegg til å være substrater for bakteriene i tykktarmen har de også andre ønskede egenskaper som filmdannende, svellende, stabile, rimelige, ikke-toksiske og geldannende samt at de er biokompatible og biodegraderbare. De kan også lett modifiseres kjemisk og biokjemisk, med forbehold om at de eventuelt må gjennom omfattende toksikologistudier [44].

### 2.3.4 Frisettingsmekanismer for coatede formuleringer

Frisetting av virkestoff fra coatede formuleringer kan beskrives ved to mekanismer, poremekanismen og løselighetsbarrieremekanismen [45]. Når coatinglaget eksponeres for frisettingsmediet vil polymernetverket absorbere vann slik at det dannes en gel rundt formuleringen [46].

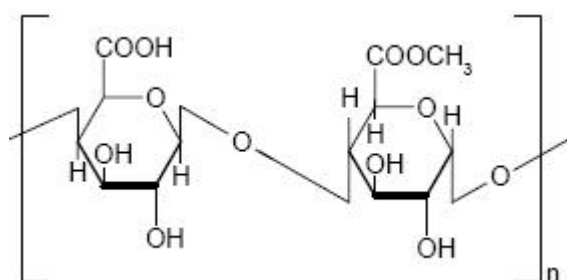
I poremekanismen dannes det porer i coatinglaget slik at virkestoffet kan diffundere ut gjennom coatinglaget. Frisettingshastigheten bestemmes hovedsakelig av porestørrelsen og størrelsen på virkestoffet. I løselighetsbarrieremekanismen løses

virkestoffet opp av det absorberte vannet, inne i polymernettverket. Herfra diffunderer stoffet ut gjennom gelen. I praksis skjer sannsynligvis frisettingen som følge av en kombinasjon av begge mekanismene hvor den ene dominerer [45]. Faktorer som er med på å avgjøre permeabilitetshastigheten er tykkelsen på den hydrerte gelen, om den eroderer, virkestoffets ioniseringsgrad samt graden av kryssbinding og andre interaksjoner i polymeren [47]. Permeabiliteten er også avhengig av hvor hydrofil filmen er. En hydrofil film vil fuktes og frisettes raskere enn en mer hydrofob film [48].

## 2.4 Pektin

### 2.4.1 Opprinnelse og struktur

Pektin er en familie komplekse polysakkarider som finnes i den primære celleveggen til planter. Kommersielt isoleres de oftest fra sitrusskall, epler eller skallet til belgfrukter. Hovedstrukturen er lineær og består av  $\alpha$ -(1-4)- D-galakturonsyre som i varierende grad er esterifisert med metylgrupper (Figur 2.1). Galakturonsyrekjeden er tilfeldig avbrutt av små mengder (1-2)- L-rhamnose, som på grunn av (1-2)-bindingen forårsaker en knekk i kjeden. Kjeden inneholder også en liten mengde nøytrale glykaner [49]. Det gjør at pektin er et heteropolysakkarid [50].



Figur 2.1 Strukturformel for pektin [51].

D-galakturonsyreenhetene har karboksylgrupper, hvor en del av dem naturlig er metylestere. Graden av metoksylering (DM), som omtales som prosent, har stor innvirkning på egenskapene til pektinet. DM 50 % deler kommersielt pektin inn i høymetoksyliert (HM) DM>50 % og lavmetoksyliert (LM) DM<50 % pektin [51]. Kjeden

av galakturonsyreenheter blir nå og da brutt av rhamnose-rike regioner som kan være høysubstituert med nøytrale sukkerrike sidekjedder [52].

### 2.4.2 $pK_a$ -verdi og løselighet

Pektin er negativt ladet ved nøytral pH og  $pK_a$ -verdien er ca 3,5 [53], og influeres av metoksyleringsgrad [47].

Vandige pektinløsninger har relativ høy viskositet allerede ved konsentrasjoner på 1-2 %. Viskositeten påvirkes av metoksyleringsgrad, ionestyrke, pH og temperatur i tillegg til at den er proporsjonal med molekylmassen til pektinet [54].

Metoksyleringsgraden har stor innflytelse på løseligheten og dermed pektins evne til å danne gel, siden det er direkte proporsjonalt med løseligheten. I tillegg danner LM og HM-pektin geler på forskjellige måter og det er kun LM-pektin som kan danne gel med kalsium. Det skyldes at LM-pektin danner en passende åpning mellom D-galakturonsyreenhetene slik at kalsium kommer til og kryssbinder med de elektronegative gruppene på molekylene [51].

Høymetoksyliert pektin danner gel ved hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner. Det er et særtrekk HM-pektin har i forhold til de fleste andre naturlige polymerer. Tilsetning av sukker øker de hydrofobe bindingene fordi vannaktiviteten i løsningen senkes. I tillegg til tilsetningen av sukker må pH ligge rundt 3 for at geldanning skal skje fordi de hydrofobe kreftene innad i molekylet da er store nok til å danne bindinger [55]. Lavmetoksyliert pektin er avhengig av en kontrollert mengde kalsiumioner for geldannelse og trenger verken sukker eller syre. Lavmetoksyliert pektin har mange av de samme egenskapene som alginat [51].

### 2.4.3 Hvorfor egner pektin seg for målstyring til tykktarmen?

Pektin er et naturlig polysakkarid og ansees som trygt. Det degraderes så og si fullstendig av de bakterielle enzymene i tykktarmen [51].

Løseligheten i vann er god, noe som er et problem i utviklingen av tykktarmsspesifikk målstyringsformuleringer. Dersom det benyttes alene vil det svulle når det kommer i kontakt med vandige væsker i GI. Virkestoffet vil dermed diffundere ut av

formuleringen. En måte å begrense svellingen på er å kryssbinde pektinet med et kation, for eksempel kalsium [51].

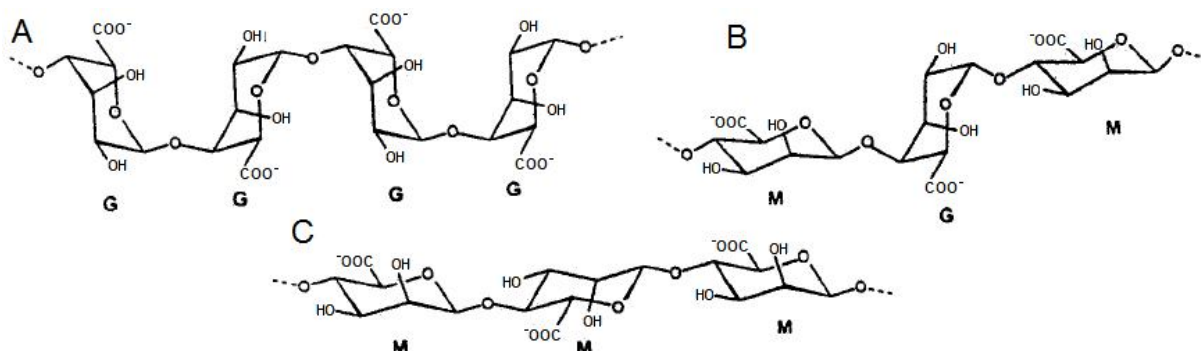
Dersom pektin benyttes som coating er det vanlig å tilsette en mykgjører, for å unngå sprekkdannelser. Mykgjørere bedrer strekkbarheten og senker elastisiteten og spenningen i polymeren ved å senke glasstransisjonstemperaturen. Om en mykgjører er egnet til en spesifikk polymer avhenger av dens evne til å reagere og påvirke polymerkjedene. Glyserol er en mykgjører som egner seg godt til pektin [29].

## 2.5 Alginat

### 2.5.1 Opprinnelse og struktur

Kommersielt alginat utvinnes fra spesielle brunalger, hvor alginatinnholdet er opp mot 40 % av tørrvekten. Det forekommer som et blandet salt av varierende kationer som finnes i sjøvann [56].

Det er et vannløselig lineært polysakkarid som hovedsakelig består av alternerte homopolymeriske blokker av (1-4)- $\alpha$ -L-guluron (G)- og  $\beta$ -D-mannuron (M) syreenheter. Disse to syreenhetene er isomerer, slik at eneste forskjellen er konfigurasjonen i C-5 posisjon. Enhetene har derfor forskjellig form, noe som fører til at geometrien i G-blokkregionene er forskjellige fra M-blokkregionene og regionene med alternerende enheter (MG-regioner) (figur 2.2). G-blokkene er vridde, mens M-blokkene har form som et utstrakt bånd [56].



Figur 2.2 De forskjellige alginatblokkene: A= guluronsyreblokk, B= alternierende blokk, C= mannuronsyreblokk [7].

## 2.5.2 pK<sub>a</sub>-verdi og løselighet

G-blokkene er stivere enn M- og MG-blokkene som følge av måten monosakkaridenhetene er koblet sammen på. De har også bedre løselighet ved lavere pH [57]. pK<sub>a</sub>-verdiene for M- og G-enhetene er henholdsvis 3,38 og 3,65 [58].

Alginat kan foredles i en rekke forskjellige molekylvekter ( $M_w$ , 50-100000 kDa) og vandige løsninger har en ikke-Newtonske karakteristikk, dvs. at viskositeten minker med økende skjærkrefter. Viskositeten avhenger av alginatkonsentrasjonen samt  $M_w$ -distribusjonen. Alginat danner gel ved å kryssbinde divalente kationer [57]. Geldannelsen eller kryssbindingen skjer som følge av at kationene passer inn i det diamantformede hullet som dannes når to G-blokker ordnes side om side. Kationet danner Van der Waals-bindinger med de elektronegative gruppene rundt bindingssetet [51, 56]. Hvor lett et alginat danner gel avhenger derfor av mengden G-blokker i alginatet [59]. Stivheten til gelen avhenger av M/G-forholdet og støkiometrien til alginat og det chelaterende kationet [57]. Det har også blitt foreslått at også MG-blokker kan danne assosiasjoner med GG-blokker i alginatgeler [60].

Det er vist at forskjellige kationer danner geler med ulik stivhet. Det har sammenheng med hvilke kationer som har best affinitet for chelateringssetet:  $Pb^{2+} > Cu^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$  [59].

På grunn av høy toksisitet er det kun et fåtall av disse som kan benyttes. Det er  $Ca^{2+}$  som benyttes mest. Alginat danner i tillegg sterke komplekser med polykationer som kitosan eller polypeptider. Disse kompleksene løses ikke opp av  $Ca^{2+}$ -chelatorer eller

antigelingskationer som  $\text{Na}^+$  eller  $\text{Mg}^{2+}$ , slik som geler basert på ionene nevnt over kan. Polykationer er derfor godt egnet til å stabilisere alginatgeler [59].

### 2.5.3 Hvorfor egner alginat seg for målstyring til tykktarmen?

Alginat brukes mye i næringsmiddelindustrien som fortykningsmiddel, emulgator og stabilisator. Det er av amerikanske *Food and Drug Administration* (FDA) inkludert i en gruppe stoffer som generelt er regnet for å være trygge å spise, den såkalte *GRAS*-listen. Alginat er biodegraderbart når det gis oralt. Det har heller ikke vist å utløse noen immunrespons [56].

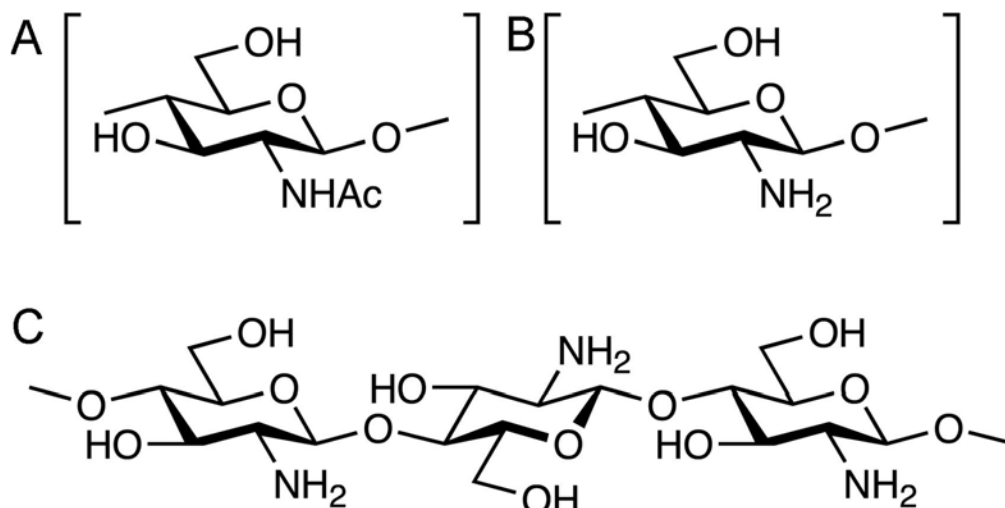
Studier har vist at polymerer med høy ladningstetthet har gode mucoadhesive egenskaper. Det er også vist at polyanioner er mer effektive enn polykationer eller uioniske polymerer. Siden alginat er en anionisk polymer med karboksyl-endegrupper har det gode mucoadhesive egenskaper. Det er vist at alginat er mer mucoadhesivt enn blant andre kitosan og polymelkesyre [61, 62]. Mucoadhesjonen kan gi formuleringene en lengre transittid og dermed potensielt øke biotilgjengeligheten [56].

Frigivelsen av makromolekyler fra alginatperler i lav pH er signifikant redusert i forhold til ved høyere pH. Dette skyldes at alginatets porestruktur, som i utgangspunktet er relativt stor, krymper ved lav pH (i magen). Det dannes et syreskall utenpå formuleringen, som gjør at det innkapslede virkestoffet vanskeligere slipper ut. Når formuleringen utsettes for høyere pH, lenger ned i GI blir syreskallet til et løselig viskøst lag. Den raske svellingen av alginat ved høyere pH kan forårsake en plutselig frigivelse. Modifikasjoner i de fysikalsk-kjemiske egenskapene er derfor nødvendig for å skape en forlenget frigivelse. Et eksempel er å kryssbinde alginat med et divalent kation. Alginat-kation kompleksset blir tettere og får mindre porer enn  $\text{Na}^+$ -alginat. Det blir mindre reaktivt med andre kationer som finnes i GI, noe som vil gjøre formuleringen mer stabil [56].

## 2.6 Kitosan

### 2.6.1 Opprinnelse og struktur

Kitosan finnes i liten grad naturlig, men er en bestanddel i enkelte sopparter. Det fremstilles for det meste fra kitin som er et lineært monopolysakkarid bestående av  $\beta$ -(1-4)-bundet N-acetyl-D-glukosamin (Figur 2.3A). Kitin er naturens mest utbredte polysakkarid, etter cellulose og opprenses fra skaldyrskall. Kitosan fremstilles ved å deacetylere kitin slik at det blir et heteropolysakkarid bestående av tilfeldig distribuerte  $\beta$ -(1-4)-bundet D-glukosamin (deacetylerede enheter) i kjeden av  $\beta$ -(1-4)-bundet N-acetyl-D-glukosamin (acetylerede enheter) (Figur 2.3B og C) [56].



Figur 2.3 A: kitinmonomer, B: kitosanmonomer, C: en sekvens 100 % deacetyleret kitosan [63].

Begrepet kitosan brukes for å beskrive flere polymerer med ulike molekylvekter (10-1000 kDa) og grader av deacetylering (40-98 % DD eller Dda). Grad av deacetylering oppgis i prosent og benyttes som hovedklassifisering av kitosan [56, 64]. Ved økt grad av deacetylering øker viskositeten til kitosan fordi konformasjon til molekylet endres. Ved høy deacetylering er molekylet ladet og har en utstrakt konformasjon med flere fleksible kjeder, mens ved lavere deacetyleringsgrad inntar molekylet en stav- eller spirallignende form som følge av den lave ladningen.[65]

### 2.6.2 pK<sub>a</sub>-verdi og løselighet

Kitosan er en svak base, hvor D-glukosaminenhetene har en pK<sub>a</sub> på 6,2-7,0 [64] og influeres av acetyleringsgrad [47].

I surt miljø er amingruppene protonerte slik at stoffet blir et løselig, kationisk polysakkarid med høy ladningstetthet (en ladning for hver deacetylerede D-glukosaminenhet). Kitosansalter er løselige i vann og løseligheten avhenger av deacetyleringsgraden og pH i løsningen. Kitosan med lav deacetyleringsgrad ( $\leq 40\%$ ) er løselige opp til pH 9, mens høy-deacetylerede kitosaner ( $\geq 85\%$ ) kun er løselige opp til pH 6,5. Tilsetning av salt til løsningen interfererer med løseligheten. Jo høyere ionestyrken er, jo lavere blir kitosans løseligheten, da ladingnøytralisering skjer. Økning av deacetyleringsgraden øker viskositeten pga antall hydrogenbindinger i kitosankjedene. Ved lav pH dissosierer hydrogenbindingene pga protonering av amingruppene i kitosankjedene, noe som fører til raskere svelling [64].

### 2.6.3 Hvorfor egner kitosan seg for målstyring til tykktarmen?

Kitosan er mye brukt i matindustrien og har i tillegg blitt markedsført som en fettbinder i ikke-medisinske produkter som kolesterolsenkende- og slankeprodukter [56]. Det er undersøkt biomedisinsk og ble funnet å være svært biokompatibelt [66]. Kitosan degraderes av humane enzymer, spesielt lysozymer og regnes som biodegraderbart. Monografien ble inkludert i den europeiske farmakope i 2002 [56].

Enzymene i øvre GI kan ikke bryte ned kitosan. Kitosan brytes derimot ned i tykktarmen av en gruppe bakterielle enzymer som spesifikt bryter ned glykosidbindingene som binder monomerene sammen [51].

Kitosan har vist mukoadhesive egenskaper *in vitro*, da det adherer til negativt ladede overflater. Det er dermed mulig at det kan bli oppnådd en forlenget residenstid i GI. Det har vist seg å være mest mukoadhesivt i sure løsninger, når kitosanet er protonert samt ved lav kryssbinding, når det er flest frie, ladede grupper [56].

Ulike studier har vist at kitosan har *enhancer*-effekt ved at det kan åpne *tight junctions* i epitelet [67, 68]. Det kan dermed øke paracellulært opptak av stoffer.



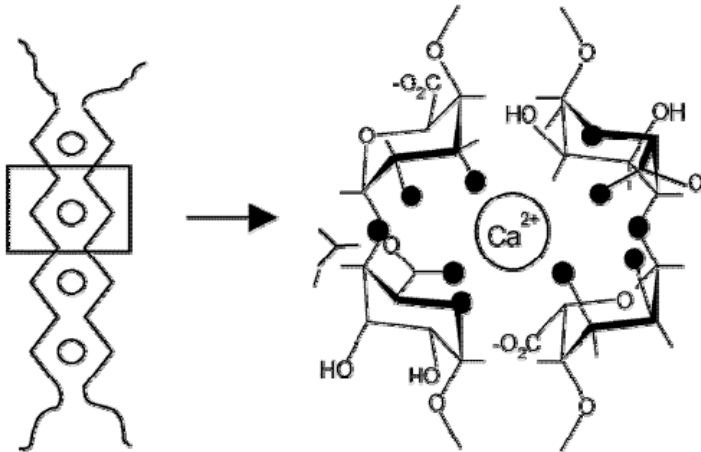
Dette gjelder spesielt hydrofile stoffer da lipofile stoffer hovedsakelig går transcellulært [56].

For å unngå at kitosan løses opp av magesyren må det beskyttes frem til det ankommer tynntarmen. Det kan gjøres ved å ha et syreressistent lag utenpå formuleringen, som løser seg opp i tynntarmen. Et annet alternativ er å kryssbinde kitosan [56]. Når kitosan kommer i kontakt med polyanioner som pektin, alginat og tripolyfosfat (TPP) danner det et kompleks som er lite vannløselig [56, 69]. Kryssbundete kitosanperler kan dermed produseres med virkestoff inkorporert eller det kan dannes en kryssbundet kitosangel rundt en kjerne. Kitosan danner et mer stabilt nettverk når det blir kryssbundet og får dermed bedre kjemiske og mekaniske egenskaper [56]. I tykktarmen frisettes virkestoffet ved at kitosan enten brytes ned av enzymer eller ved at bakteriell fermentasjon har redusert pH-verdien til et nivå der kitosan er løselig [44].

## 2.7 Kryssbinding og geldannelse

En gel karakteriseres som et kontinuerlig tredimensjonalt nettverk av fast materiale, ofte polymerer, omgitt av et flytende medium. På molekylnivå består en polymergel av tre elementer: Bindingssteder hvor polymermolekyler er bundet sammen, polymersegmenter mellom disse setene som er relativt mobile og vann som er fanget inne i nettverket [70].

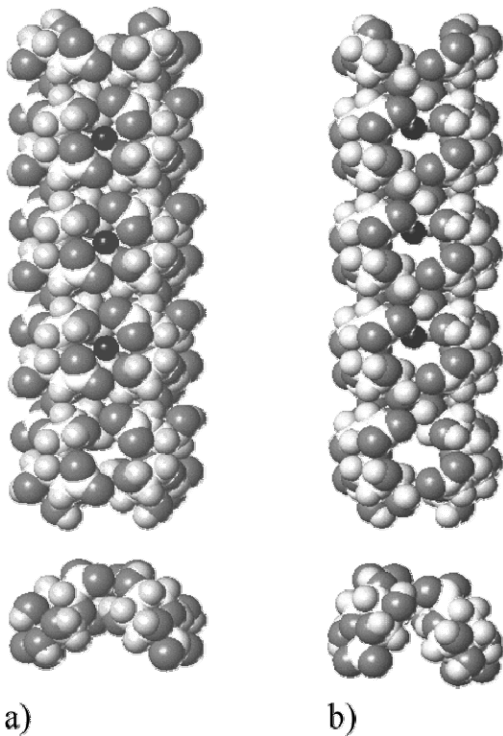
"Egg-box"-modellen ble først beskrevet av Grant et al. [71] og beskriver interaksjonen mellom kationer og bindingsstedet, som dannes i den bølgede polymerkjeden til G-blokkene i alginat (Figur 2.4). Hulrommet som dannes har riktig størrelse for å binde kalsium-ioner [72]. I tillegg så fører den bølgede strukturen til at flere oksygenatomer blottlegges. Disse kan danne bindinger til kationer [73]. Ved at  $\text{Ca}^{2+}$  bindes parres to polymerkjeder slik at det dannes dimerer. Disse danner nye koblinger til andre kjeder og det dannes en gel [72]. Alginatgeler kan holde på 99-99,5 % fuktighet [56].



Figur 2.4 Skjematisk illustrasjon av egg-box modellen hvor kalsium ligger i guluronkjedens bindingssteder. Svarte sirkler representerer oksygenatomer som er involvert i koordineringen av kalsium-ionet [72].

Polyguluronsyre (alginat) og polygalakturonsyre (pektin) er speilbilder av hverandre hvis man ser bort fra hydroksylgruppen i C-3. Posisjonen til denne gruppen har stor innvirkning på stivheten til kjeden. Undersøkelser har vist at polyguluronenheter og polygalakturonenheter binder kalsium sterkere enn polymannuronenheter (alginat) [74]. Det kan forklares ved at polymannuronkjeder danner lineære konformasjoner, som ikke har noen egnede bindingssteder [73]. Figur 2.5 viser *van der waals*-fremstilling av egg-box-modeller. Her kommer det tydelig frem at posisjonen til hydroksylgruppen i C-3 har mye å si for konfigureringen i kryssbindingskompleksene [72].

Den sterkeste bindingen skjer sannsynligvis der hvor oksygenatomene i karbohydratet har passende avstand og geometri slik at kalsium får bedre affinitet enn vann i bindingsstedet. På grunnlag av dette ble det sett at aksial-ekvatorial-aksial sekvensen til hydroksylgrupper på ringer av seks karboner var et veldig effektivt mønster for kalsiumbinding. Guluronsyre har dette mønsteret [73]. På grunn av likheten mellom alginatkjedens guluronenheter og pektins galakturonenheter, ble egg-box-modellen også overført til bindingsstedene i pektingeler [72].



Figur 2.5 van der Waals fremstilling av den beregnede egg-box modeller for (a) guluronsyre- og (b) galakturonsyrekjedene. Mørke kuler representerer kalsiumioner [72].

Det er nevnt i punkt 2.5.2 at flere forskjellige divalente kationer har blitt undersøkt for kryssbinding. Kalsium er det mest brukte [43, 75], men Dupuis et al. [76] viste i en studie at sink-pektin senket frisettingen mer enn kalsium-pektin. Forklaringen kan være at sink dannet et sterkere nettverk enn kalsium, noe som førte til mindre svelling og mindre væskeinntrengning i formuleringen [76].

Analyse av konformasjonen til sakkarideneheter indikerer at i tillegg til type glykosidbinding, som hovedsakelig bestemmer den tilgjengelige plassen i konformasjonen, så har også posisjonen til de sekundære hydroksylgruppene innflytelse på molekylets konformasjon. I aksial posisjon kan det destabilisere bølgekonformasjonen og favorisere den utstrakte konformasjonen. Denne effekten sees i polyguluronsyre som har en høy stivhet sammenlignet med dens kvasispeilbilde, polygalakturonsyre. Det har vist seg at polysakkarider med  $\alpha$ -(1-4)-binding har høy interaksjon med  $\text{Ca}^{2+}$  pga tilstedeværelsen av veldefinerte chelaterings seter langs kjeden, i motsetning til  $\beta$ -(1-4)-lenkede polysakkarider som har en svak kalsiuminteraksjon uten gode bindings seter [73].

Også kitosan er brukt for å kryssbinde alginat [77] og pektin [78]. Når en polymer brukes for å kryssbinde en annen kalles resultatet polyelektrolyttkomplekser (PEC).

Det er økt interesse for å studere kitosan som kryssbindende stoff. Flere faktorer påvirker egenskapene til kitosan-alginatkomplekset. Blant disse er strukturen til alginatet samt molekylvekten og deacetyleringsgraden til kitosan [56]. Det er vist at interaksjonene mellom alginat og kitosan ble økt ved å senke andelen kitosan som hadde en vekt under 20,000 Da. I tillegg hjalp det å øke pH fra 4 til 6 [77]. Pektins viktigste faktorer i PEC-dannelsen er pH og esterifiseringsgrad. DM 36 dannet raskest gel [78].

## 2.8 Multivariat dataanalyse

### 2.8.1 Generelt

Multivariat dataanalyse er en metode for å evaluere resultater eller data, hvor det er mulig å analysere flere variabler samtidig. Det lages modeller som prøver å beskrive responsene i datasettet vha variablene som er variert. Det er spesielt nyttig for å oppdage interaksjoner mellom to eller flere variabler. Selve modelleringen deles opp i kalibrering og validering. Kalibrering vil si at det lages en modell som beskriver sammenhengene i datasettet, også kalt regresjon. En modell skal forklare systematisk variasjon og luke ut mest mulig støy. For å se hvor god modellen er må den valideres. Da predikeres nye responser ved å teste modellen på et nytt datasett. Dersom modellen beskriver mye støy vil den predikere responsen dårlig [79].

Det finnes flere forskjellige analysemetoder. Hvilken som er mest fornuftig å bruke avhenger av hvordan en har designet forsøket. Siden forsøkene i denne oppgaven ikke bygger på et såkalt faktorielt design, benyttes PLS og det vil derfor bli fokusert på denne metoden.

### 2.8.2 Partial Least Square – PLS

I PLS blir responsen (Y) satt i sammenheng med variablene (X) og det lages en modell som beskriver denne sammenhengen. Modellen lages ved at de variablene som er variert projiseres ned på et mindre antall underliggende variabler som beskriver sammenhengen. Disse kalles prinsipalkomponenter, PC. PC 1 legges i

retningen med mest variasjon i forhold til responsen. PC 2 ligger vinkelrett på PC 1 og i den retningen med nest mest variasjon, osv. De første PCene som genereres er sannsynligvis strukturdeler, mens de videre PCene vil forklare mer og mer støy. Det er derfor viktig å finne riktig antall PCer som skal benyttes. Ved å plote prinsipalkomponentene mot hverandre er det mulig å studere grupperinger av prøvene og responsene, avsløre uteliggere det vil si prøver som skiller seg ut fra de andre, og undersøke om variasjoner i en variabel faktisk gir forandringer i responsen. Hvis det undersøkes mot en respons benyttes PLS1, mens hvis det undersøkes mot flere responser så benyttes PLS2 [79].

De mest brukte plottene i PLS er (Figur 2.6):

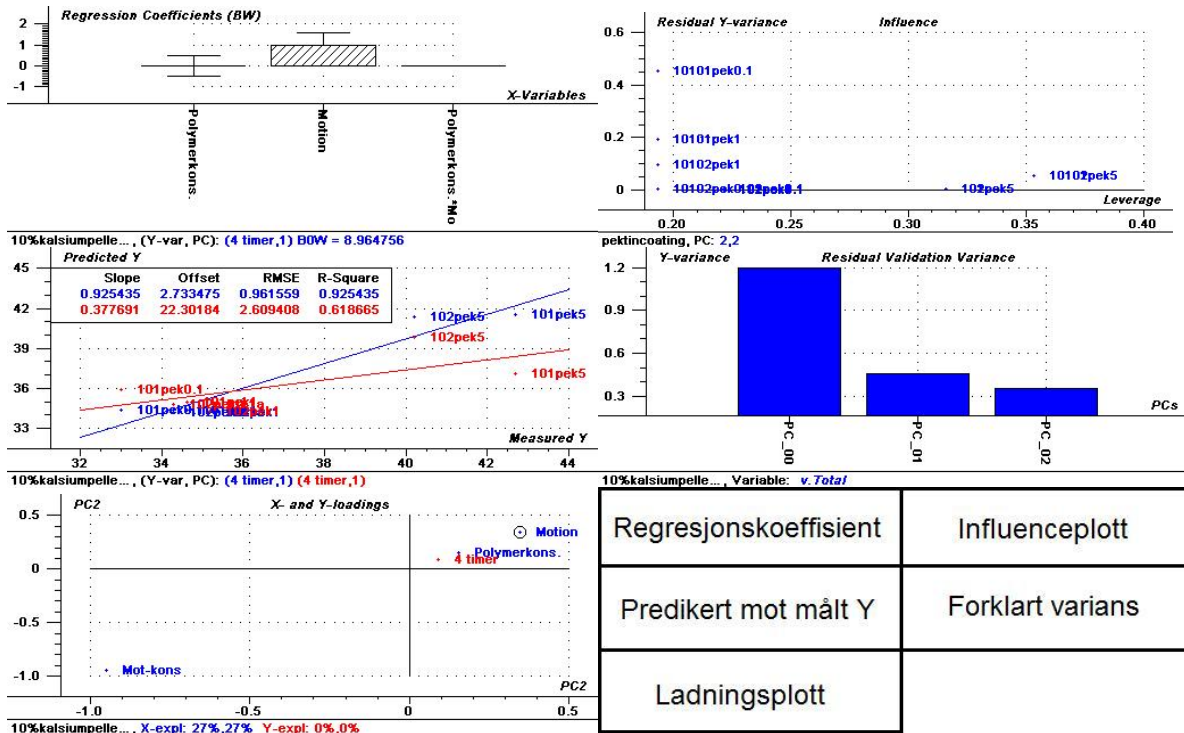
Regresjonskoeffisient – Viser hvilke variabler som har størst betydning for responsen. Ved valideringen ser en også hvilke av disse som har signifikant ( $p < 0,05$ ) påvirkning. Det vil si at det er  $< 5\%$  sannsynlighet for at det er tilfeldig.

Influenceplott – *Leverage* plottes mot residualverdi. Prøver med høy *leverage* påvirker modellen mye, mens prøver med høy residualverdi passer dårlig inn i modellen. Prøver som ligger høyt på begge kan være outliere.

Predikert mot målt Y – Viser hvor godt modellen kan beskrive resultatene. Ved å kryssvalidere så ser en her hvor god modellen er til å predikere nye responser. Det er også mulig å se grupperinger i prøvene som har samme innvirkning på responsen

Forklart varians plott – Viser hvor mange prinsipalkomponenter det er fornuftig å benytte ved å studere hvor mye av den validerte variansen som forklares ved hver prinsipalkomponent.

Ladningsplott – Variabler med stor systematisk variasjon har høy ladning, dvs. at de er langt fra origo. Variabler som sannsynligvis har liten betydning ligger nærme origo. Ladningsplottet viser i tillegg om variabler er korrelerte. Variabler som ligger nær hverandre er positivt korrelerte, mens variabler som ligger diagonalt på hver sin side av origo er negativt korrelerte.



Figur 2.6 Eksempler på de viktigste plottene som benyttes ved PLS analyse

Regresjonskoeffisient	Influenceplott
Predikert mot målt Y	Forklart varians
Ladningsplott	

### 3. Materiale

#### 3.1 Materialer

<b>Materiale:</b>	<b>Distributør:</b>
Alginat, Protanal © LF 10/60 Natriumalginat	FMC Biopolymer (USA)
Destillert vann	
Etanol 96 %	Arcus (Norge)
Glyserol	NMD (Norge)
Kalsiumacetat monohydrat	Sigma-Aldrich (Tyskland)
Kalsiumklorid dihydrat	Merck (Tyskland)
Kitosan, Chitoclear fg 95 (Dda 95 %)	Primex (Island)
Kitosan, Seacure CL213 (Dda 89 %)	Pronova, Biomedical AS (Norge)
Mikrokrystallinsk cellulose, Avicel PH-101	FMC Biopolymer (Irland)
Natriumhydroksid	Merck (Tyskland)
Pektin, Classic CU 701 (36 % DE)	Herbstreith & Fox KG (Tyskland)
Riboflavin	Merck (Tyskland)
Saltsyre, dampende 37 %	Merck (Tyskland)
Tri-natriumfosfat-dodecahydrat	VWR International (Belgia)

#### 3.2 Løsninger

##### 3.2.1 0,1 M saltsyre

50,61 g konsentrert HCl ble innveid og tilsatt destillert vann til 5 liter.

##### 3.2.2 0,2 M natriumfosfat

152 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$  ble innveid og løst i destillert vann til 2 liter.

##### 3.2.3 2 M saltsyre

202,44 g konsentrert HCl ble innveid og tilsatt destillert vann til 1 liter.

### **3.2.4 2 M natriumhydroksid**

80 g NaOH ble innveid og løst i destillert vann til 1 liter.

## **3.3 Utstyr**

### **3.3.1 Fremstilling av pellets**

Vekt, Mettler PM 3000, Sveits.

Kenwood electronic major blandemaskin, England.

NICA ekstruder, modell E140, Nica-system, Sverige.

NICA spheronizer, modell S320, Nica-system, Sverige.

Ristemaskin, Firtsch, Tyskland.

### **3.3.2 Coating av pellets**

Spraycoater, MLF 01, Wector corporation, USA.

Magnetrører med termostat, Heidolph MR3001K, Tyskland.

Analysevekt, Mettler AE 200, Sveits.

Vekt, Mettler PE 3600, Sveits.

### **3.3.3 Frisetting av pellets**

Frisettingsbad, Sotax AT7, Sotax AG, Sveits.

Spektrofotometer, Shimadzu UV-160A, Japan.

Sentrifuge, MSE Super-minor, England.



### **3.3.4 Karakterisering av pellets**

**Bruddstyrke:**

TA-XT2 teksturmåler, Stable Micro Systems, England.

**Aspect-ratio og svellingsstudier:**

Mikroskop, Leica MZ16 med Leica DFC 320 kamera.

## 4. Metode

### 4.1 Fremstilling av pellets

#### 4.1.1 Fremstilling av granulat til pellets

Riboflavin ble benyttet som modellsubstans. Det er et tungtløselig stoff med en vannløselighet på  $8,25 \times 10^{-5}$  g/ml (0,219 mM) [80]. Sammensetningen til pelletene var:

1. 89 % MCC, 1 % riboflavin, 10 % kalsiumacetat,
2. 89 % MCC, 1 % riboflavin, 10 % kitosan
3. 79 % MCC, 1 % riboflavin, 10 % kalsiumacetat, 10 % kitosan

Innholdsstoffene ble blandet volumetrisk med pistill i morter, før de ble blandet i 10 minutter ved hastighet 2 i Kenwood mikser. Passende mengde destillert vann ble så tilsatt ved hastighet 1,2 i løpet av 2 minutter. Blandingen ble grovt blandet med kortblad før den til slutt ble rørt i 1 minutt ved hastighet 1,2. Granulatet ble deretter overført til en plastpose og oppbevart i minst et døgn for å få jevn fuktighet. Det ble produsert batcher av 300 gram tørrstoff.

Mengden granuleringsvæske ble bestemt ved prøving og feiling der kvaliteten til pelletene, med tanke på rundhet og størrelsesfordeling var avgjørende. Vannmengden som ga flest pellets innenfor størrelsesområde 0,7-1 mm med best *aspect ratio*, med en øvre grense på 1,2 ble brukt. 100 pellets ble benyttet for å beregne gjennomsnittlig *aspect ratio*. Mengden granuleringsvæske er oppgitt som vektprosent av totalvekten, etter ligningen:

X % granuleringsvæske =

$$((g \text{ granuleringsvæske}) / ((g \text{ tørrstoff}) + (g \text{ granuleringsvæske}))) * 100$$

### **4.1.2 Pelletsfremstilling**

Ekstruderen ble satt på laveste hastighet i 10 minutter for at den skulle bli varm før det fuktete granulatet ble overført. Granulatet ble ekstrudert gjennom sikt 1,2 mm. Dette forgikk ved feederhastighet 105 rpm og agiatorhastighet 100 rpm.

Ekstrudatet ble deretter sfæronisert i 5 minutter ved hastighet ca 800 rpm. Begge prosessene ble utført batchvis. Pelletene ble overført til en egnet beholder og tørket i ca 2 døgn ved romtemperatur.

### **4.1.3 Sikting**

Etter tørking ble pelletene siktet i et siktetårn som bestod av siktene; 0,7 mm, 1 mm og 1,7 mm. Siktetårnet stod på ristemaskinen i 15 minutter hvor pelletene ble ristet i intervaller. Størrelsesfordelingen ble bestemt og pelletene i størrelsesområdet 0,7-1,0 mm ble brukt videre i produksjonen.

## **4.2 Coating av pellets**

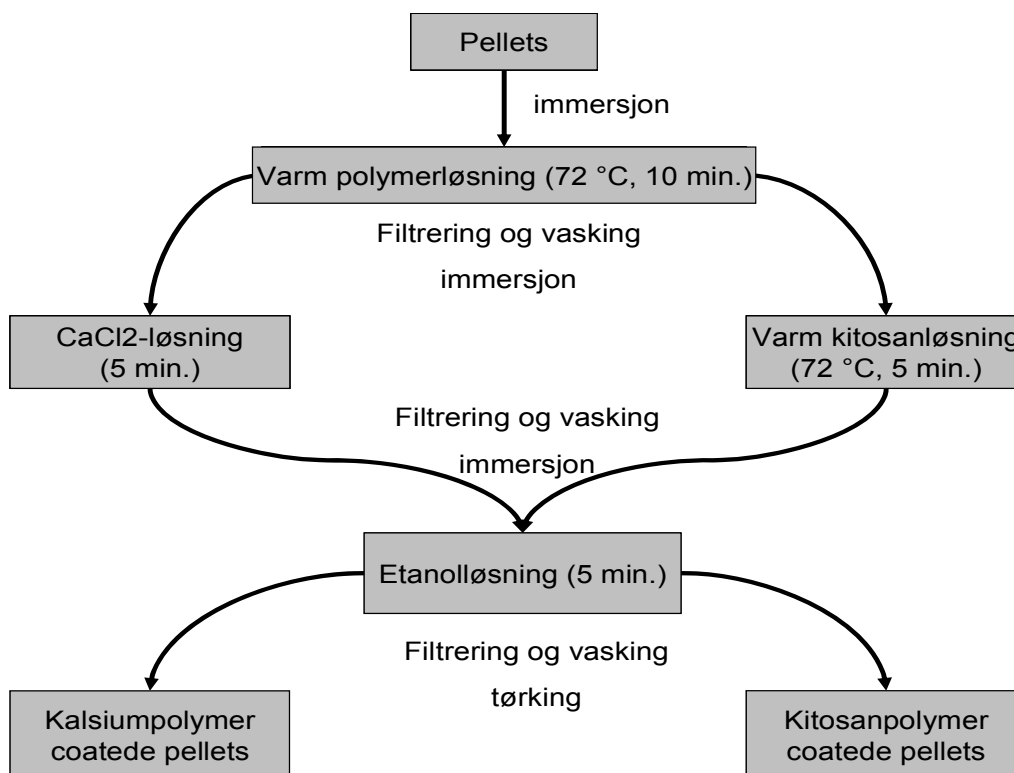
### **4.2.1 Spraycoating**

Følgende parametere ble benyttet på samtlige polymerer og pellets: temperatur 70 °C, nozzle air 6.5 og Airflow 160. Pumpehastigheten og tørketiden måtte derimot varieres med de ulike pellettypene og polymerene. Dette skyldes at pelletene trengte ulike tørketider. Det ble benyttet en polymerkonsentrasjon på 0,5 % og det ble etterstrebet å pumpe løsningen kontinuerlig. Der dette ikke var mulig måtte det legges inn intervaller med pauser.

### **4.2.2 Immersjonscoating**

Immersjonscoatingen ble utført med utgangspunkt i metode av Sriamornsak et al. [43], og er illustrert i figur 4.1. 7,5 g pellets ble satt til 450 g polymerløsning (1 eller 2 % w/w) som var  $72 \pm 1$  °C. Dette stod på kraftig røring i 10 minutter. Rørehastigheten var 500 rpm og 850 rpm på henholdsvis 1 % w/w og 2 % w/w pektin og 500 rpm for 1

% w/w alginat. Polymerløsningen med pellets ble så fortynnet med 150 ml rensert vann som holdt  $72 \pm 1$  °C, før det ble filtrert og vasket med romtemperert, rensert vann. De coatede pelletene ble deretter enten satt til 450 g 10 % CaCl<sub>2</sub>-løsning eller til 450 g kitosanløsning (0,1 eller 1 %). CaCl<sub>2</sub>-løsningen hadde romtemperatur mens kitosanløsningen holdt  $72 \pm 1$  °C for å oppnå en lavere viskositet. I disse løsningene stod pelletene på røring i 5 minutter på rørehastighet 500 rpm. Pelletene ble så filtrert og vasket med romtemperert, rensert vann før de ble satt til 150 ml 96 % etanol. Denne løsningen hadde romtemperatur og det ble benyttet en rørehastighet på 350 rpm. Her stod pelletene i 5 minutter før de ble filtrert og vasket med romtemperert 96 % etanol. Pelletene ble til slutt tørket i egnet beholder i romtemperatur i 2-4 døgn. De coatede pelletene ble oppbevart mørkt for å beskytte riboflavinet mot lys.



Figur 4.1 Flytskjema over immersjonscoatingprosessen av pellets. Basert på illustrasjon av [10].

### 4.2.3 Bestemmelse av innkapslingseffektivitet

Immersjonscoatingprosessen førte til at en del virkestoff migrerte ut av pelletene mens de var i immersjonsløsningene. For å finne ut hvor mye virkestoff som forsvant i løpet av prosessen ble de immersjonscoatede pelletene sammenlignet med ucoatede pellets.

200 pellets ble løst i 200 ml 0,1 M HCl. Det ble gjort to paralleller for 10 % kalsiumpellets og to paralleller for pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen samt en gang for de samme pellettypene etter immersjonscoating. Pelletene ble knust i løsningen ved hjelp av ultralyd og glasstav. Etter ca et døgn ble det tatt ut prøver av løsningene. Disse ble sentrifugert før det ble målt absorbans ved hjelp av spektrofotometer. Bølgelengde 444 nm ble benyttet da dette er riboflavins absorpsjonsmaksimum. Gjennomsnittlig absorbans ble beregnet og virkestofftapet ble uttrykt i prosent. Følgende ligning ble benyttet:

$$((\text{absorbans etter coating} / \text{absorbans før coating}) * 100) = \text{Innkapslingsgrad i \%}$$

### 4.3 Studier av pelletenes svellingsegenskaper

Tørre coatede pellets ble plassert i petriskål hvor det ble tilsatt 0,1 M HCl til tre pellets og 0,125 M fosfatbuffer pH 6,8 til tre pellets. Det ble valgt å ikke utføre kontinuerlige svellingsstudier i syre og base da dette ble ansett som problematisk. Væskene holdt romtemperatur. Pelletene ble plassert under en lupe og det ble tatt bilder før tilsetningen av væske og etter 60 minutter i begge miljøene. Arealet ble beregnet ut fra bildene som ble tatt. Kjernens og coatinglagets svelling ble beregnet og gjennomsnittet av de tre replikatene ble benyttet som sammenligning. Det var ikke mulig å skille mellom det uhydrerte coatinglaget og selve pelletkjernen på 0-bildene. Coatinglaget er derfor regnet med som areal på disse målingene. Det var derfor heller ikke mulig å måle coatingtykkelsen i 0-prøven. For kjernens svelling ble pelletsarealet målt før ( $A_{\text{pellet-0}}$ ) og etter ( $A_{\text{kjerne-60}}$ ) en time i svellingsmedium. Polymersvellingen ble beregnet ved at den svellede kjernens areal ( $A_{\text{kjerne-60}}$ ) ble trukket fra totalarealet som bestod av kjernen og coatinglaget ( $A_{\text{total-60}}$ ). Forklart ved ligningene under:

$$\text{Grad av kjernesvelling (i \%)} = ((A_{\text{kjerne-60}} - A_{\text{pellet-0}}) / A_{\text{pellet-0}}) \times 100$$

$$\text{Grad av polymersvelling (i mm}^2\text{)} = (A_{\text{total-60}} - A_{\text{kjerne-60}})$$

## 4.4 Bestemmelse av bruddstyrke

50 pellets av hver av de tre pelletkjernetypene ble knust med en teksturmåler. Metoden som ble benyttet er beskrevet i "SOP for determination of hardness and tensile strength of pellets" og er vedlagt som vedlegg 2. Før pelletene ble testet ble de sikret å holde en fuktighet på 22,5 % ved at de lå i eksikator i ca 1 døgn over en mettet kalsiumacetat-løsning. Stempelet til teksturmåleren ble beveget med en fart på 1 mm/s ned på pelleten. Resultatet fra teksturmåleren kom ut som knusestyrken (cs). For å finne bruddstyrken (ts) ble det tatt hensyn til den opprinnelige pellethøyden (d). Det ble estimert en gjennomsnittlig pellethøyde til 0,85 mm. Bruddstyrken ble kalkulert ut fra ligningen [81]:

$$ts = (4 * cs) / (\pi * d^2)$$

## 4.5 SEM-bilder

Det ble tatt scanning-elektronmikroskop (SEM)-bilder av noen utvalgte pellets og coatingkombinasjoner. Preparatene ble festet til aluminiums-stubs med dobbelsidig carboncoated tape, og belagt med Au/Pd (40/60) i en Polaron Sputter Coater, model E 5000. De ble deretter mikroskopert i et Jeol scanning elektron mikroskop (SEM), model JSM 6400, Acc.volt 5kV. Arbeidet ble utført ved Elektronmikroskopisk laboratorium for biologiske fag, Institutt for molekylær biovitenskap (IMBV), UiO.

## 4.6 Frisetting

Paddleapparatet som ble brukt under frisettingsforsøkene bestod av et vannbad med flere frisettingskar. Hvert kar rommet 1 liter væske og hadde en tilhørende *paddle* med motor. Vannbadet ble tildekket under forsøket for å unngå at riboflavin ble nedbrutt som følge av lyseksponering. I hvert forsøk ble det testet tre paralleller av hver pellettype. Vannbadet holdt en temperatur på  $37 \pm 0,5$  °C og det ble benyttet en rørehastighet på 100 rpm.

Det ble veid inn 0,5 gram pellets, enten de var coatet eller ikke, da det ble antatt at coatinglaget utgjorde en liten vektendring. I tillegg ble pelletene knust etter endt

frisettingsstudie og absorbanse av løsningene målt etter 24 timer. Frisettingen ble i hvert enkelt tilfelle sett i forhold til 24-timersprøven som ble regnet som 100 %. Variasjoner i virkestoffmengden i de ulike pelletene ble på den måten tatt høyde for.

Pelletene ble lagt i frisettingskar med 750 ml 0,1 M HCl-løsning (pH= ca. 1) i en time under omrøring. pH ble deretter endret til 6,8 ved å tilsette 250 ml 0,2 M fosfatbuffer ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) pH 6,8. Små mengder 2 M HCl eller 2 M NaOH ble eventuelt tilsatt for finjustering av pH. 1 time i pH 1 etterfulgt av 4 timer i pH 6,8 med nevnte karinnstillinger vil heretter bli omtalt som standardbetingelser.

3 ml væske ble tatt ut fra hvert frisettingskar etter 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 og 300 minutter. Prøvene ble deretter sentrifugert i 10 minutter før totalt mengde virkestoff frisatt ble bestemt ved å måle lysabsorbansen. Det ble korrigert for konsentrasjonsendringen etter en time. Etter 300 minutter ble pelletene i frisettingskarene knust med en glasstav. Standardbetingelser ble opprettholdt natten over slik at alt virkestoff skulle være frisatt før det ble tatt ut prøver morgenen etter. Disse prøveresultatene ble brukt som mål på totalmengde virkestoff i pelletene og de tidligere prøvene ble uttrykt som prosent i forhold til dette.

Som en del av metodevalideringen ble det produsert en standardkurve for å se at responsen var lineær med riboflavinkonsentrasjonen.

## 4.7 Eksperimentelt design

Det ble i utgangspunktet satt opp et design hvor frisettingen fra tre forskjellige pellettyper skulle bli sammenlignet; pellets med 10 % kalsium og/eller 10 % kitosan i kjernen. Disse skulle i tillegg coats ved hjelp av spraycoating og immersjonscoating for å sammenligne og finne den beste av disse prosessene.

Pelletene skulle bli coatet med 1 % eller 2 % pektin, i tillegg til enten 5 % CaCl eller kitosan i konsentrasjonene 0,1 % eller 1 %. De coatede pelletene skulle deretter testes for frisetting for å finne den beste kombinasjonen av pellet, polymer og motion.

### 4.7.1 Valg av stoffer og konsentrasjoner

Pektin har vært mye undersøkt ved avdelingen, og det var ønskelig å undersøke det ytterligere, samt å undersøke egnetheten av pektin ved spraycoating. DM 36 hadde tidligere vist best resultater med tanke på å redusere frisetting i et miljø som etterlignet mage og tynntarm og denne ble derfor valgt [10, 82].

Det var ønskelig å undersøke og sammenligne pektin med en ekstra polymertype. Alginat har vært undersøkt i flere studier og har vist lovende resultater [75, 83]. I en studie av Ampol Mitrevej et al. ble det sammenlignet coatinger av alginat og pektin, med kitosan som motion, hvor alginat senket frisettingen mer enn pektin [69]. Det ble derfor besluttet å forsøke å coate pelletene med alginat. Det ble valgt å utelate 1 % kitosan som motion og kun benytte 0,1 % kitosan og  $\text{CaCl}_2$ . Dette ble gjort for å redusere antall forsøk og på bakgrunn av tidligere studier av Hiorth et al., hvor kitosankonsentrasjonen på 0,1 % senket frisettingen mest [10]. Denne studien omfattet kun pektin men det er mulig at dette resultatet også vil gjelde for alginat. Årsaken til at dette resultatet ble oppnådd ble forklart ved at en kitosanløsning på 1 % ble for viskøs slik at det ble dannet kitosanaggregater i coatinglaget, hvor pektin ikke vil kunne kryssbindes og slik at coatinglaget blir svakere. Dette ble sett i sammenheng med at tørketiden til pellets coatet med 0,1 % kitosan var lang. Polymerkjedene fikk dermed lengre tid til å rearrangere seg og dermed danne et tettere nettverk. Pasparakis et al. har tidligere vist at alginatperler coatet med kitosan frigir signifikant mer virkestoff enn perler som inneholder kompleksert alginat-kitosan [84]. Det skyldes at polymerkjedene må være viklet inn i hverandre for å oppnå optimal interaksjon, noe som fører til et tettere nettverk og dermed mindre svelling. Det var ønskelig å benytte 2 % alginatløsning ved immersjonscoatingen siden Sriamornsak et al. har vist at det senket frisettingen mer enn 1 % løsning, men etter at forforsøk viste at 2 % ble for viskøs for metoden ble det besluttet å benytte 1 % alginatløsning [9].

Kitosan har også tidligere vært undersøkt ved avdelingen, men kun i coatinglaget, for å kryssbinde pektin. Det har vist å danne et godt kompleks med pektin sammenlignet med kalsium [10, 82]. I tillegg var det ønskelig å studere om kitosan inkorporert i kjernen ville bedre egenskapene til pelleten. Dda 89 har vist best resultater i coatinglaget og det ble derfor besluttet å benytte den i to konsentrasjoner som



tidligere har vist gode resultater; 0,1 % og 1 %. I kjernen ble det valgt å benytte kitosan med Dda 95. Kalsium ble også valgt ut som kryssbindende stoff, både i kjernen og som coating. I kjernen ble det benyttet 10 % kalsiumacetat mens det som coating ble benyttet 5 % kalsiumklorid. Begge stoffer ble valgt på grunnlag av gode resultater fra tidligere studier ved avdelingen [10].

### 4.7.2 Begrensninger

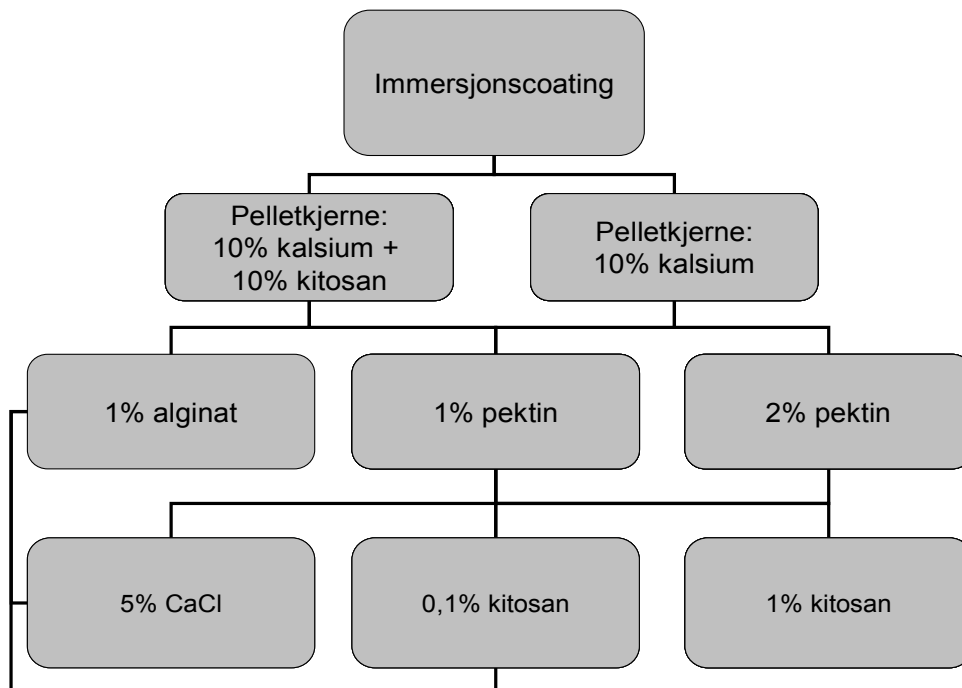
Det var ønskelig å sammenligne coating i *fluid bed* med immersjonscoating, men spraycoating i *fluid bed* var vanskelig å utføre, blant annet på grunn av at den høye viskositeten til pektinløsningen tettet spraydysen. Spraycoating ble av den grunn utelatt av hoveddesignet.

På bakgrunn av at det ikke var forsøkt å inkorporere kitosan i kjernen tidligere ble det gjort et forforsøk hvor de tre pellettypene ble forsøkt immersjonscoatet. Det viste seg da at pellettypen som inneholdt 10 % kitosan i kjernen disintegreerte. Det ble derfor besluttet å utelate denne pellettypen fra forsøksdesignet.

### 4.7.3 Eksperimentelt design

På grunnlag av begrensningene ble det bestemt å konsentrere forsøkene rundt immersjonscoating, og kun på pelletene med 10 % kalsium i kjernen og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Det ble først laget et fullt design som senere delvis ble utvidet med alginat . Det endelige designet er vist i figur 4.2

Det ble kun utført tre forsøk i *fluid bed*; coating med 0,5 % pektin på pelletene med 10 % kalsium i kjernen samt pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen og i tillegg et lag med 10 % kalsiumklorid på sistnevnte pellettype.



Figur 4.2 Forsøksdesign for immersjonscoating som inkluderer alginat

Kategorivariabler som blir benyttet kodes som høye og lave verdier når det modelleres på dem. Det betyr at hvis det blir signifikant positivt utslag for en kategorivariabel for en gitt respons, har kategorivariabelen som er kodet med høy verdi positiv korrelasjon med responsen og *vice versa*. I det eksperimentelle designet i figur 4.3 er det tre kategorivariabler. Disse er vist i tabell 2.

Tabell 2 Oversikt over koding av kategorivariablene

Kategorivariabler	Lav koding	Høy koding
Pellettype	10 % kalsium + 10 % kitosan	10 % kalsium
Polymertype	Pektin	Alginat
Motiontype	Kitosan	Kalsium

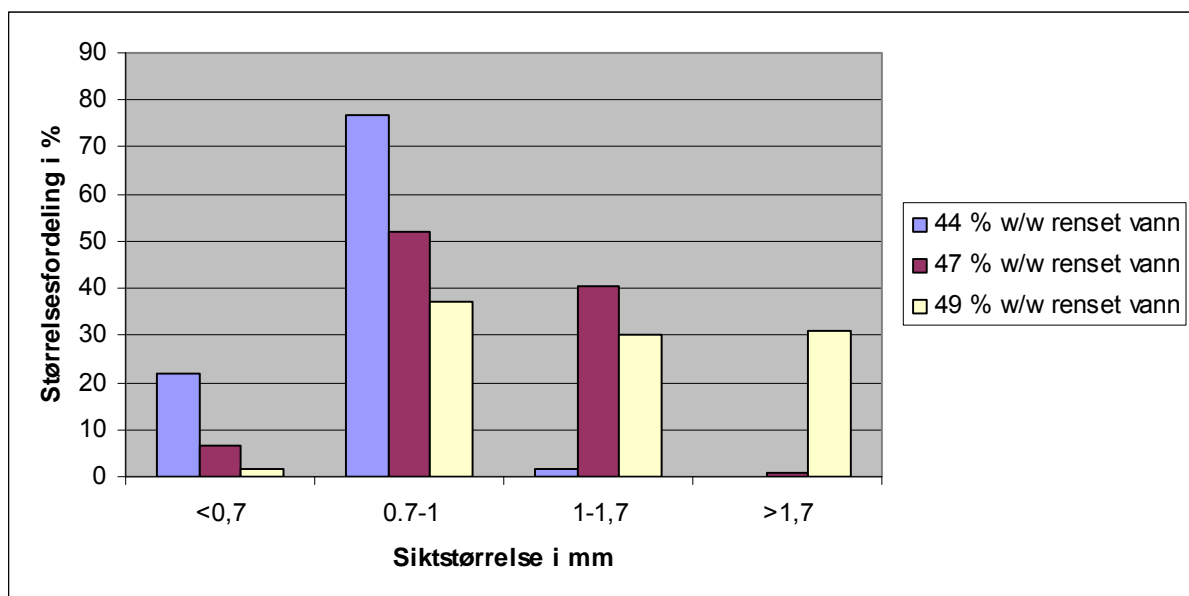
## 5. Resultat & Diskusjon

### 5.1 Fremstilling av pellets

#### 5.1.1 Pellets med 10 % kalsium i kjernen

Ved tillaging av pellets er det viktig å finne mengden granuleringsvæske som fukter pulveret slik at pelletene som produseres har riktig størrelse og en tilfredsstillende *aspect ratio*. Det ble i denne studien satt en øvre *aspect ratio*-grense på 1,2. Det er kjent at mengden granuleringsvæske som tilsettes har signifikant innvirkning på størrelsesdistribusjonen til de produserte pelletene. Når væskemengden øker så øker størrelsen på pelletene [43].

Væskemengden som ga flest pellets i størrelsesområdet 0,7- 1,0 mm for pelletene som inneholdt 10 % kalsium i kjernen var 47 % w/w granuleringsvæske (figur 5.1). Disse hadde gjennomsnittlig *aspect ratio* på  $1,13 \pm 0,09$ .



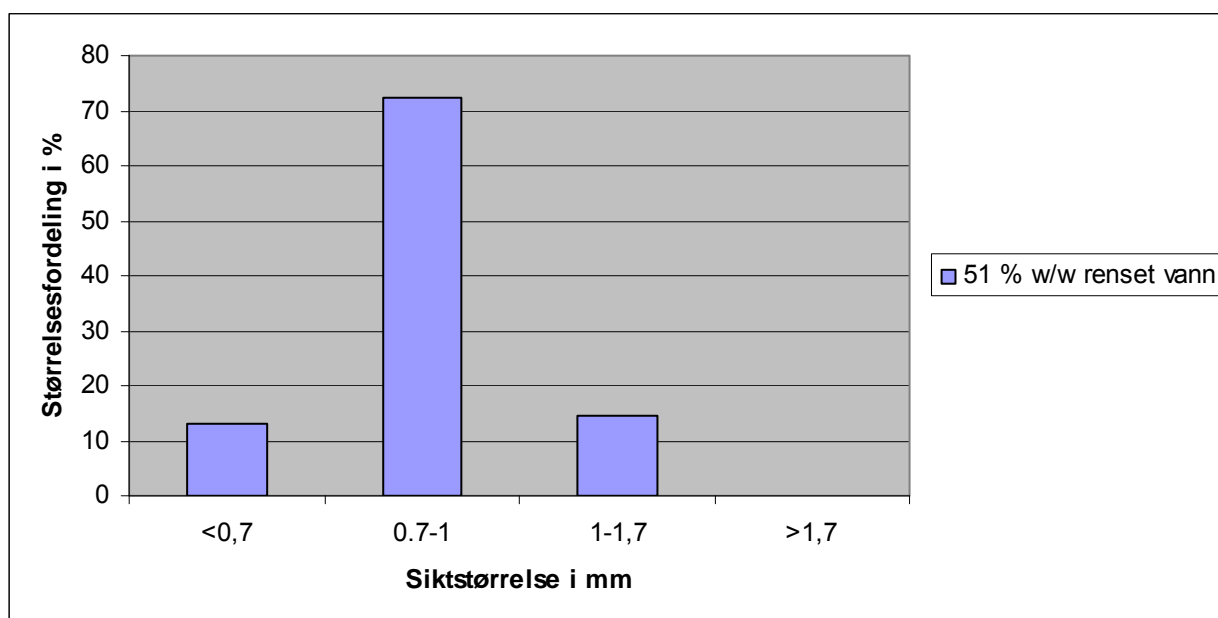
Figur 5.1 Størrelsesfordeling i vektprosent for pelletsbatcher som inneholdt 10 % kalsium i kjernen, tilsatt ulike mengder renset vann ved fremstilling.

Figur 5.1 viser at en økning i granuleringsvæske ga større pellets. Det ble dannet flest pellets i størrelsesområdet 0,7-1,0 ved bruk av 47 % w/w granuleringsvæske

men disse pelletene hadde en høyere aspect ratio ( $>1,2$ ) samt at de hadde en mer ujevn overflate enn pelletene fuktet med 47 % w/w granuleringsvæske. Pelletene fuktet med 47 % w/w granuleringsvæske ble derfor benyttet.

### 5.1.2 Pellets med 10 % kitosan i kjernen

Mengden granuleringsvæske som ble benyttet ved produksjon av 10 % kitosanpellets, ble på bakgrunn av erfaring titrert opp til passende utseende og konsistens i kenwood mikseren. 51 % w/w granuleringsvæske ga et tilfredsstillende fuktet granulat og dette ga også fine pellets med en *aspect ratio* på  $1,15 \pm 0,08$  hvor hovedfraksjonen hadde ønsket størrelse (figur 5.2).



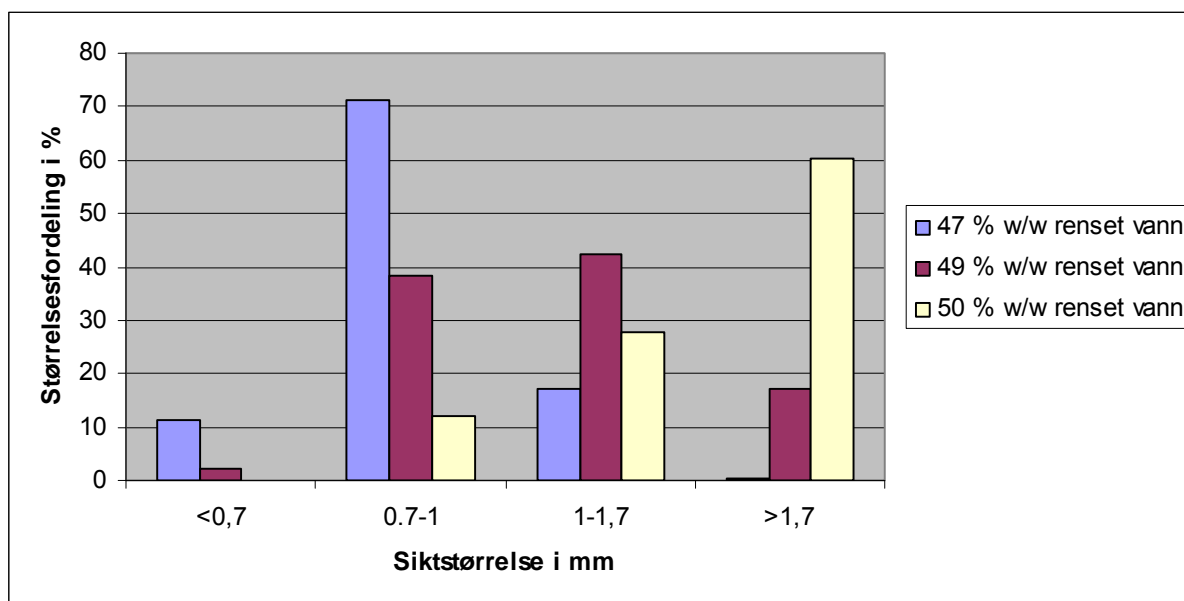
Figur 5.2 Størrelsesfordeling i vektprosent for pelletsbatcher som inneholdt 10 % kitosan i kjernen.

Siden disse pelletene hadde de ønskede egenskapene ble det benyttet 51 % w/w granuleringsvæske for å fukte pulveret. Andre mengder granuleringsvæske ble ikke undersøkt.

### 5.1.3 Pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen

For å finne riktig mengde med granuleringsvæske for pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen ble det tatt utgangspunkt i mengden granuleringsvæske som ble benyttet til pelletene som kun inneholdt enten 10 % kalsium eller 10 % kitosan i

kjernen. Det ble forventet at mengden granuleringsvæske som skulle til for å få et tilfredsstillende fuktet pulver lå mellom disse to. Først ble det forsøkt med 50 % w/w. Da ikke dette ga ønsket resultat ble det forsøkt med 49 % w/w rensset vann før akseptable pellets ble produsert ved 47 % w/w rensset vann (figur 5.3). Pelletene som ble dannet hadde en jevn, rund overflate med en *aspect ratio* på  $1,18 \pm 0,11$ . Det ble ansett som tilfredsstillende og det ble derfor besluttet å benytte 47 % w/w rensset vann.



Figur 5.3 Størrelsesfordeling i vektprosent for pelletsbatcher som inneholdt 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen tilsatt ulike mengder rensset vann ved fremstilling.

Det var tidligere produsert samme type pellets ved hjelp av den samme apparaturen. Det ble benyttet samme MCC-batch ved begge tilfellene, og i studien utført av Hiorth et al. ble det benyttet 54 % w/w rensset vann for å produsere akseptable pellets med 10 % kalsium i kjernen [10]. Det relativt lille avviket fra 54 % til 47 % w/w kan sannsynligvis forklares av forskjeller i luftfuktighet og fuktigheten til de anvendte stoffene. MCC var hovedkomponenten i pelletene og utgjorde fra 79 til 89 % w/w av tørrstoffet. I tillegg ble det benyttet en ny batch med kalsiumacetat. Avvikende vannmengde i forhold til den tidligere studien har sannsynligvis sitt opphav i fuktighetsforskjeller i disse to stoffene. Luftfuktigheten under produksjon ble ikke logført.

## 5.2 Pelletkjernenes bruddstyrke

Bruddstyrken til de tre pellettypene uten coating ble målt. Under målingen var det 21,7 °C og en luftfuktighet på 22,4 % Rf. Resultatet med standardavvik er gjengitt i tabell 3.

Tabell 3 Resultater etter målinger av pelletenes bruddstyrke, med standardavvik.

Pellettype	Bruddstyrke i N/mm <sup>2</sup>	Standardavvik
10 % kalsium	28,0	± 3,5
10 % kitosan	23,0	± 3,7
10 % kalsium + 10 % kitosan	26,9	± 3,2

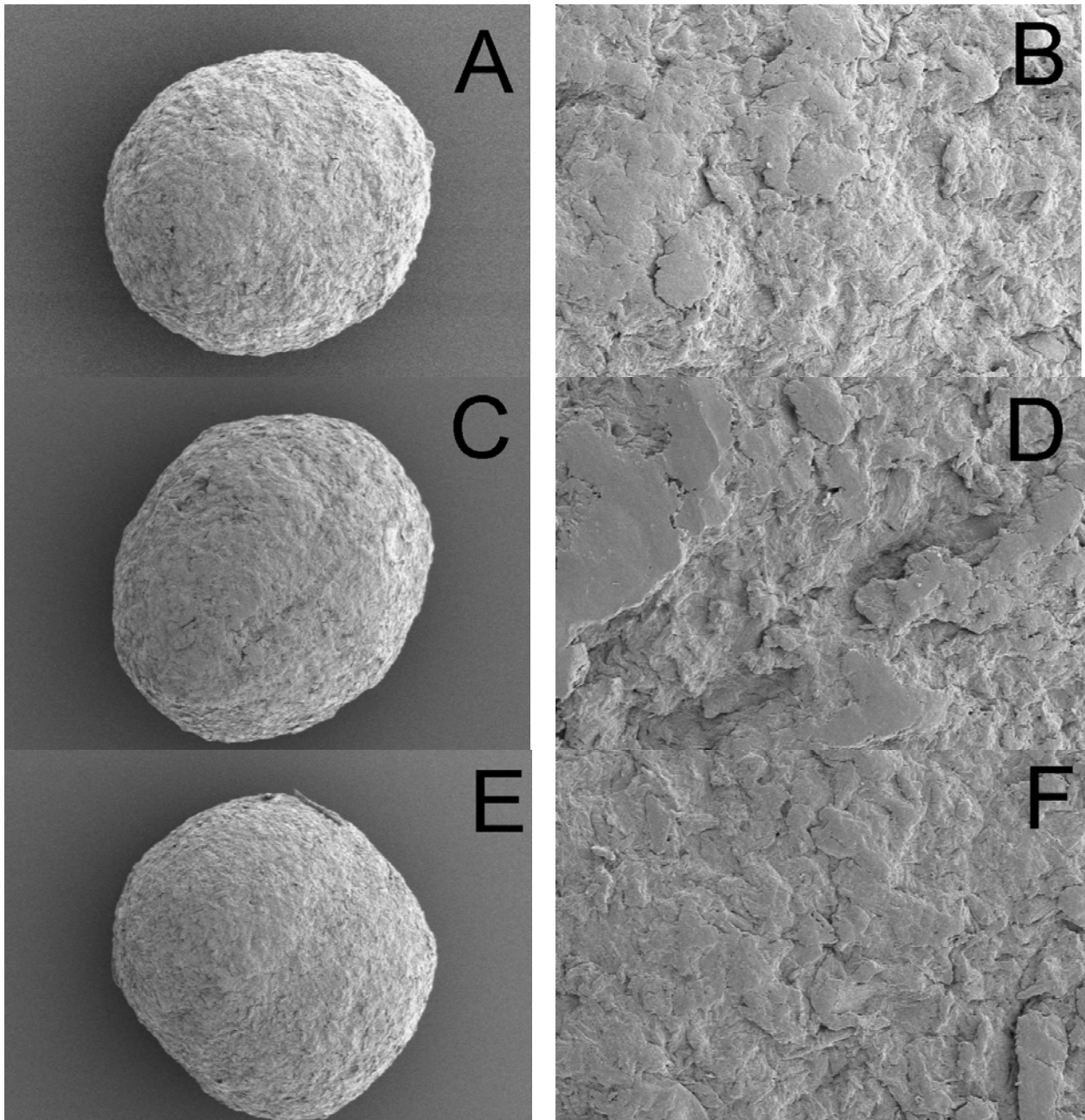
Etter å ha utført parvise t-tester på bruddstyrkeresultatene viste det seg at pelletene med 10 % kalsium i kjernen og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen hadde en signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere bruddstyrke enn pelletene med 10 % kitosan i kjernen. Det var ikke signifikant forskjell ( $p > 0,05$ ) mellom pelletene med 10 % kalsium i kjernen og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Forskjellen i bruddstyrke forklarer sannsynligvis hvorfor pelletene med 10 % kitosan i kjernen disintegreerte i immersjonscoatingprosessen, mens de andre pellettypene holdt seg intakt gjennom hele coatingprosessen. MCC-pellets har generelt en høy bruddstyrke sammenlignet med pellets produsert av andre stoffer på grunn av de sterke bindingsegenskapene til MCC. MCC-pelletene krymper under tørking slik at porositeten reduseres [85]. Dette er viktig siden porositeten har direkte sammenheng med bruddstyrken [86]. Dette fører til at pellets produsert av MCC har en lavere frisetting sammenlignet med pellets produsert av andre typer hjelpestoffer siden nettverket fanger virkestoffet inne i pelleten [69]. Det er også funnet at det hovedsakelig er mengdeforholdet MCC i MCC-pellets som bestemmer bruddstyrken, og ikke variasjoner i produksjonsvariabler [87].

Siden det ikke var signifikante forskjeller mellom de to pellettypene med høyest bruddstyrke kan kun trenden tolkes, og den tyder på at pelletene med 10 % kalsium i kjernen hadde høyest bruddstyrke. Sammen med at pelletene med 10 % kitosan i kjernen er signifikant svakest kan det dermed virke som om kitosan gjør pelletene svakere eller at kalsium gjør dem sterkere eventuelt at resultatet er en kombinasjon

av disse parametrene. Det er i tidligere studier konkludert med at det hovedsakelig er MCC-nettverket som bestemmer bruddstyrken, og dermed mengdeforholdet av MCC [85, 87], noe som skulle tilsi at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen skulle hatt den laveste bruddstyrken. Det er også sett at pelletenes bruddstyrke går ned hvis mengdeforholdet av kitosan økes [86]. Det er derfor ikke usannsynlig at pelletene med kitosan har en lavere bruddstyrke enn pellettypen uten. SEM-bildene av pelletkjernene i figur 5.4 viser at det så ut til at det var liten variasjon i overflatestrukturen blant de forskjellige pelletkjernene.

### 5.3 SEM-bilder av pelletkjernene

Det ble tatt SEM-bilder av de tre forskjellige pellettypene som hadde ulik kjernesammensetning. Bilder av hele pellets (75x forstørrelse) og overflatestrukturen (500x forstørrelse) er vist i figur 5.4. Det var ikke mulig å se noen store forskjeller i strukturen i overflaten til pelletene, men pelleten produsert med 10 % kalsium i kjernen (E-F) så ut til å ha en litt jevnere overflate enn pelletene med 10 % kitosan i kjernen (A-B) og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen (C-D). Det var på grunnlag av bildene ikke mulig å forutsi hvilke pellets som ville ha den laveste frisettingshastigheten.



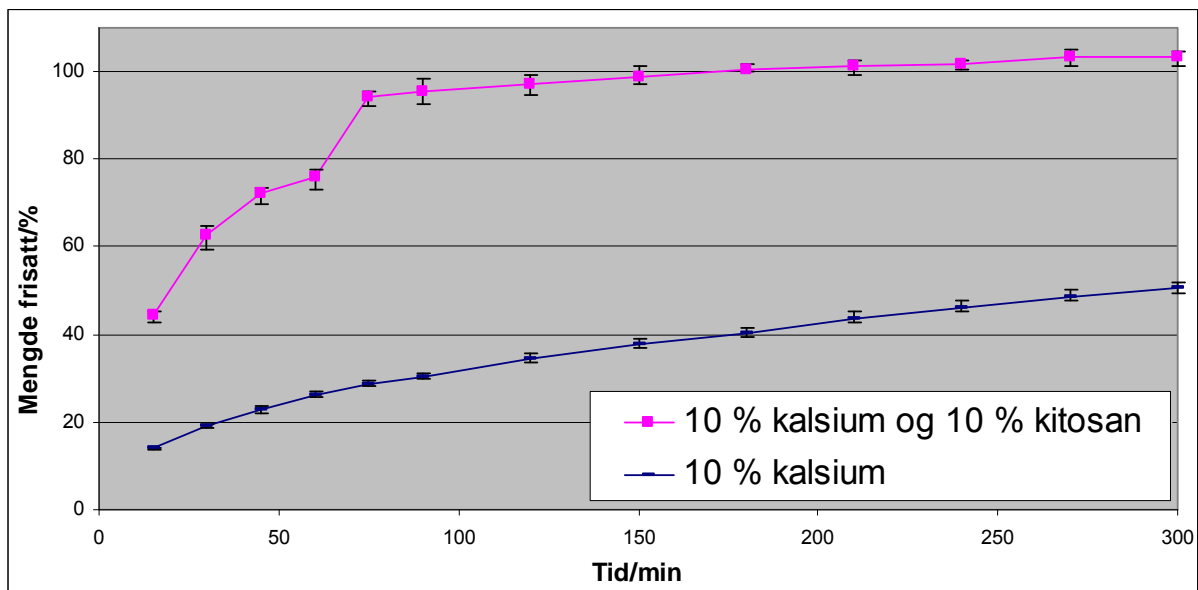
Figur 5.4 SEM-bilder av pelletkjerner med 75x forstørrelse (A, C og E) og 500x forstørrelse (B, D og F). A og B: 10 % kitosan, C og D: 10 % kalsium + 10 % kitosan, E og F: 10 % kalsium.

## 5.4 De ucoatede pelletkjernenes frisetting

Figur 5.5 viser frisettingen av modellsubstansen fra de ucoatede pelletene med 10 % kalsium i kjernen og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Pelletkjernene som inneholdt 10 % kitosan ble ikke testet siden de ble fjernet fra det



eksperimentelle designet. Figuren viser at det var store forskjeller i pelletkjernenes frisetting i standard betingelser.



Figur 5.5 Frisettingsprofilen for ucoatede pellets med 10 % kalsium i kjernen og ucoatede pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, med usikkerhetsgrenser (min/maks) under standardbetingelser

Pelletene som inneholdt 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen frisatte over 44 % virkestoff i løpet av de 15 første minuttene under standard betingelser, mens pelletene med 10 % kalsium i kjernen kun frisatte 14 %. Denne store forskjellen skyldes trolig forskjellen de to pellettypene viser i tendensen til svelling. Det ble i svellingsstudiene (punkt 5.6.2) funnet at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen svullet signifikant mer i syre enn pelletene med 10 % kalsium i kjernen. Det skyldes sannsynligvis at kitosan er en svak base som blir protonert i syre. Det får en høy ladningstetthet og vil bli vannløselig. Det fører dermed til at pelleten sveller og løser seg opp.

Det andre som er karakteristisk for kurvene er forskjellene i overgangen mellom syre og fosfatbuffer pH 6,8. Pelletene med 10 % kalsium i kjernen hadde en jevn frisettingskurve uavhengig av frisettingsmedium, mens pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen fikk en kraftig knekk i overgangen, hvor frisettingskurven går fra 76 % ved 60 minutter til over 94 % ved 75 minutter. Det tyder på at kalsium i motsetning til kitosan ikke påvirkes av mediets pH. Grunnen til at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen slapp ut så mye virkestoff i overgangen fra syre til

fosfatbuffer pH 6,8 kan være at den svellede pelleten krymper. Kitosanet blir delvis deprotonert når det kommer over i fosfatbufferen ( $pK_a$  6,2-7,0). Pelleten krymper fordi kitosanet blir mindre hydrofilt og den høye konsentrasjonen av virkestoff som er løst i væsken inne i pelleten blir presset ut. Det blir dermed en plutselig økning i frisettingen, før den igjen stabiliserer seg.

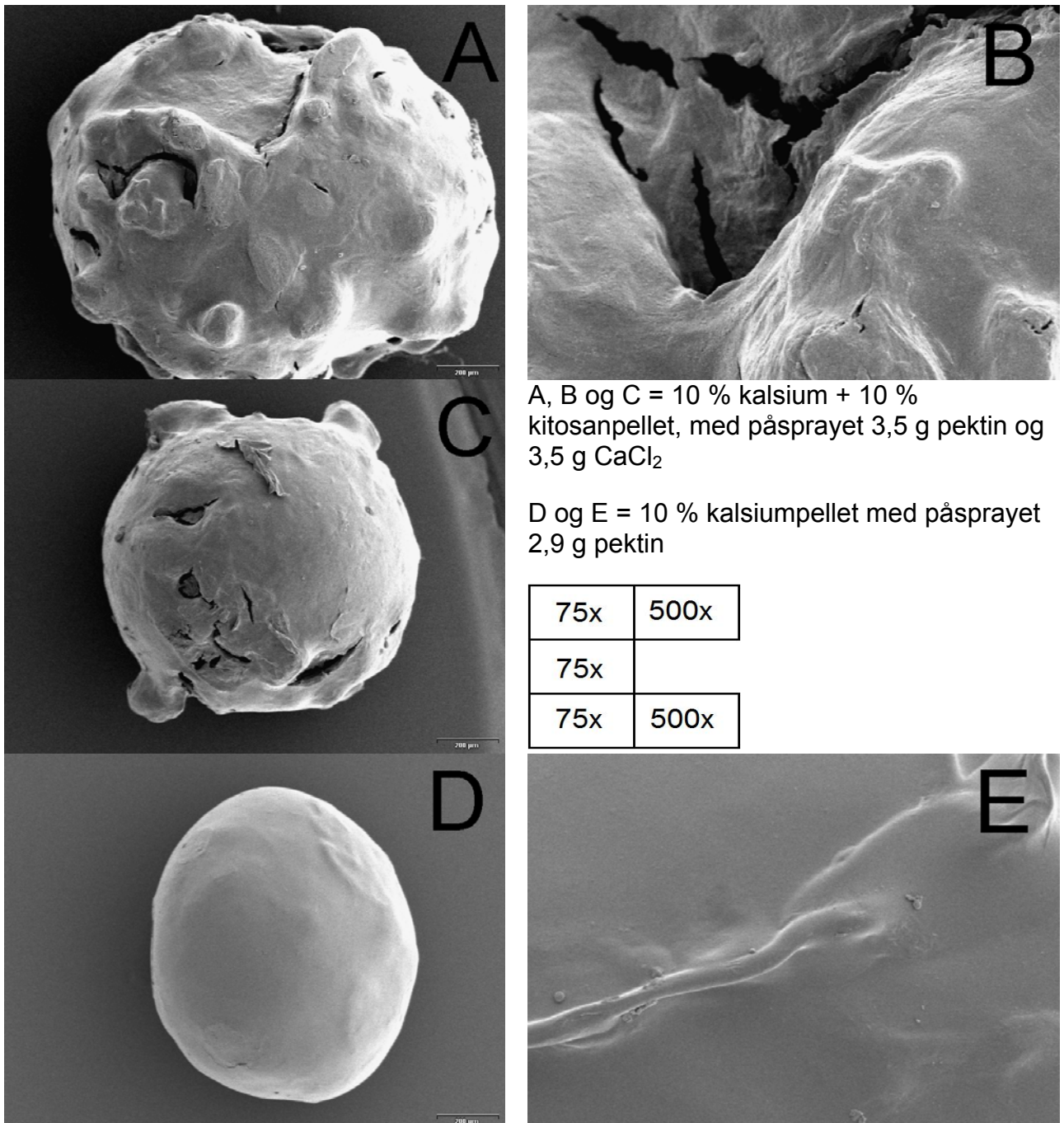
De ucoatede pelletene hadde overraskende lav frisetting sammenlignet med studier utført av Hiorth et al [10]. Deres studier ble utført med mange av de samme råvarene samt at pelletene ble produsert ved bruk av det samme utstyret. Disse pelletene viste en frisetting på hele 80 % fra de ucoatede pelletene etter fem timer i standard betingelser. En del av forklaringen kan være holdbarheten til de av råvarene som er de samme (MCC og riboflavin) samt forskjeller i råvaren som avviker (kalsiumacetat). Det ble benyttet pellets i størrelsesintervallet 0,7-1,7 mm i Hiorth et al. sine studier mens det her ble benyttet 0,7-1,0 mm store pellets. Større pellets skulle tilsi lengre diffusjonsvei for virkestoffet og dermed mindre virkestoff som ble frisatt i løpet av fem timer. Det burde dermed blitt frisatt en høyere mengde virkestoff i denne studien. Det støttes også opp av en sammenlignbar studie utført av Sriamornsak et al. hvor de sammenlignet små (0,7-1,0 mm) og store (1,2-1,7 mm) pellets [43]. De konkluderte med at de store pelletene frisatte virkestoffet signifikant senere enn de små grunnet lengre diffusjonsvei. Årsaken til den observerte lave frisettingen kan ikke fullt ut forklares, men en del av forklaringen kan skyldes forskjell i bruddstyrken. Hiorth et al. har ikke oppgitt pelletenes bruddstyrke, men hvis pelletene hadde en lavere bruddstyrke vil de mest sannsynlig få en raskere frisetting som følge av dette [10, 88].

### 5.5 Spraycoating

To forskjellige typer pellets ble sprayet med pektin i en *fluid bed* spraycoater. Pektinkonsentrasjonen kunne ikke være høyere enn 0,5 %. Ved høyere konsentrasjon gikk spraydysen tett. I tillegg ble det i noen tilfeller lagt inn tørkeintervaller for å unngå at pelletene skulle aggregere med hverandre og feste seg til spraycoateren. Dette førte til en lang prosessetid for å oppnå et heldekkende polymerlag utenpå kjernen.

### 5.5.1 SEM-bilder av spraycoatede pellets

Figur 5.6 viser bilder av de spraycoatede pelletene. Bilde A-C viser spraycoatede pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. I tillegg til pektin er det også sprayet et lag med kalsiumklorid på disse. Bilde D-E viser pellets med 10 % kalsium i kjernen som er sprayet med pektin.



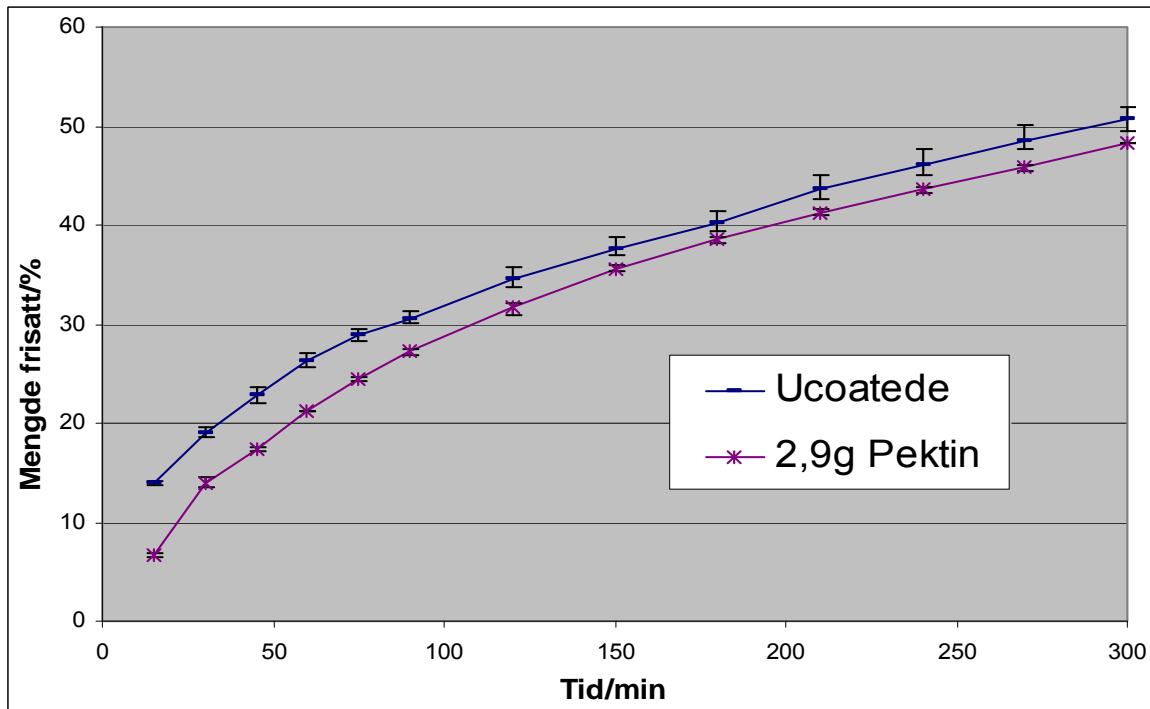
Figur 5.6 SEM-bilder av spraycoatede pellets. A-C er pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen coatet med 3,5 g pektin og 3,5 g kalsiumklorid, mens D-E er pellet med 10 % kalsium i kjernen coated med 2,9 g pektin. A,C og D er 75x forstørret, B og E er 500x forstørret.

Årsaken til at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan fikk en ujevn form skyldes sannsynligvis kjerneinnholdet og ikke det ekstra laget med kalsiumklorid. Det ble observert at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan svullet under sprayingen. Det førte sannsynligvis til at pelletene delvis sprakk opp under sprayingen og coatingen la seg i sprekke slik at det ble dannet en glatt overflate til tross for den ujevne formen. Pelletene med 10 % kalsium i kjernen (D-E) er til sammenligning runde med en jevn og glatt overflate. Det ble ikke observert at disse svullet under coatingprosessen. Sammenlignet med SEM-bildene av de ucoatede pelletene (Figur 5.4) er det tydelig at det har kommet på et lag med coating utenpå kjernen slik at pelletene har fått en glattere overflate.

### 5.5.2 Frisetting fra spraycoatede pellets

#### *Spraycoating av pellets med 10 % kalsium i kjernen*

Figur 5.7 viser at de coatede pelletene frisatte 48,3 % av virkestoffet i løpet av fem timer under standard betingelser sammenlignet med 50,7 % for batchen som ikke var coatet. Forskjellen i frisettingshastighet er svært liten og skyldes trolig at pektinlaget er for tynt eller at det ikke er heldekkende. Det var ikke mulig å spraye på mer pektin utover dette fordi pelletene aggregerte mer og mer, jo lengre prosesstiden varte. Pelletene aggregerte både til hverandre og til innerveggene av spraycoateren.



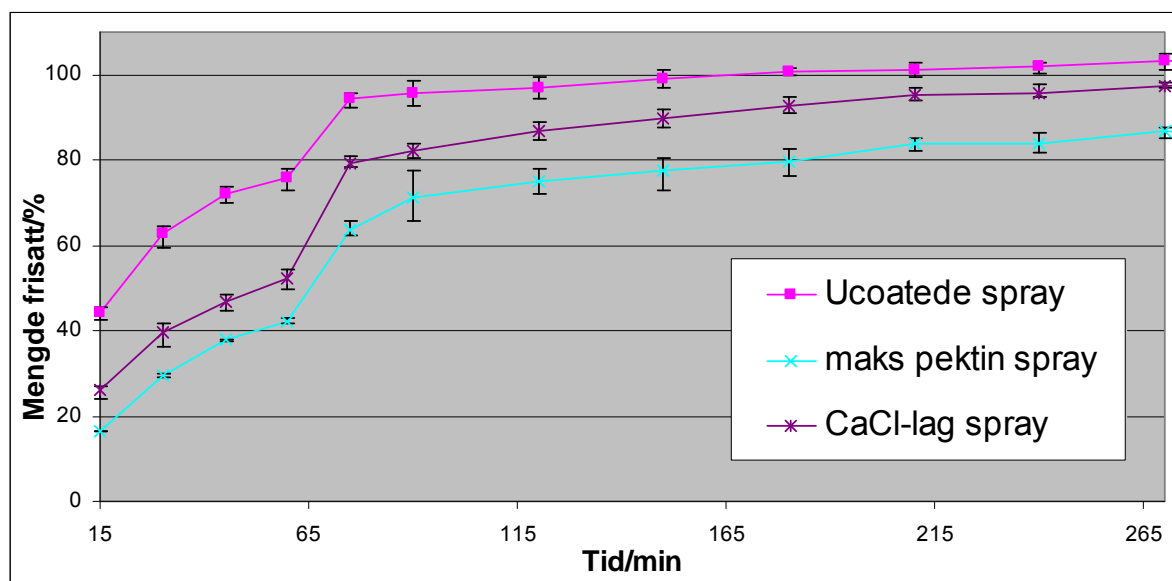
Figur 5.7 Frisettingsprofilen under standardbetingelser for ucoatede og spraycoatede pellets som inneholdt 10 % kalsium i kjernen med usikkerhetsgrenser (min/maks)

For å undersøke om coatingprosessen i seg selv førte til raskere frisetting ble det forsøkt å utsette ucoatede pellets for samme påkjenning som de coatede pelletene fikk. Dette ble gjort ved å kjøre ucoatede pellets i *fluid bed* i ca to timer uten å aktivere sprayen. Frisettingsforsøk (ikke illustrert) viste at de ucoatede pelletene tålte påkjenningen de fikk i *fluid bed* og frisettingshastigheten var uendret. Den tøffe behandlingen de coatede pelletene får under spraycoatingen kan dermed ikke forklare hvorfor det ikke blir oppnådd en større reduksjon i frisettingshastigheten.

#### *Spraycoating av pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen*

Figur 5.8 viser frisettingsresultatene fra spraycoatede pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen sammenlignet med ucoatede pellets. Det var enklere å spraye disse pelletene enn 10 % kalsiumpelletene. Som det går frem av figur 5.8 var det større forskjell i mengde frisatt virkestoff etter fem timer i standard betingelser (86,7 % mot 103 %), enn det som ble oppnådd ved spraying av 10 % kalsiumpellets (Figur 5.7). Årsaken var sannsynligvis forskjellen i coatingmengden som ble sprayet på pelletene. Det viste seg at det var mulig å spraye til et visst punkt før pelletene startet å aggregere. Da dette inntraff var det sprayet ca 3,5 g pektin på 15 g pellets. Dette var 0,4 g mer enn det som var mulig å få på 10 % kalsiumpelletene. Det kan indikere

at pelletene med 10 % kalsium i kjernen ikke ble helt dekket av pektin. Selv om det lille utvalget som ble studert i SEM viste en fin og jevn overflate med et uniformt coatinglag så kan dette ha vært veldig tynt (Figur 5.6). Det vil da være steder hvor virkestoffet frigis i like stor grad som ucoatede pellets, og det vil sannsynligvis til en viss grad oppveie for de coatede områdene. Det kan være en mulig forklaring på at nedgangen i frisettingshastighet er mindre for pelletene med 10 % kalsium i kjernen.



Figur 5.8 Frisettingsprofilen under standardbetingelser for ucoatede og spraycoatede pellets som inneholdt 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, med usikkerhetsgrenser (min/maks)

Pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen kunne bli sprayet kontinuerlig uten tørkeintervaller. Årsaken til at disse pelletene tørket fortere enn 10 % kalsiumpelletene er ukjent, men det kan komme av at pelletene med kitosan + kalsium svullet under sprayingen. Det ble under svellingsforsøkene, som er beskrevet i punkt 5.6.2, observert at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen svullet signifikant mer i syre enn pelletene med 10 % kalsium i kjernen. Siden  $pK_a$  for pektin er ca 3,5 er det grunn til å tro at påsprayingen vil få pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen til å svulle. De vil da absorbere litt væske samtidig som overflaten øker. Vannet i pektinløsningen kan dermed fordampe fortere samt trekke inn i kjernen. Denne effekten forsvant antageligvis når hele pelleten var dekket av pektin. Pelletene ble da klissete og begynte å aggregere.

Etter at det var blitt sprayet ca 3,5 g pektin på pelletene ble det forsøkt å spraye et lag med  $CaCl_2$  utenpå. Det ble forsøkt for å se om coatinglaget ble tettere hvis

pektinet også ble kryssbundet fra utsiden av coatinglaget. Tanken var å etterligne immersjonscoatingen og for å se om det ville senke frisettingen ytterligere. Det ble benyttet en vandig løsning med 10 %  $\text{CaCl}_2$ . Dette førte til at pelletene aggregerte med hverandre i stor grad. Det skyldes mest sannsynlig at  $\text{CaCl}_2$  kryssbinder pektinet, noe som igjen kan føre til at pelletene kryssbinder til hverandre og at det dermed dannes store aggregater. Årsaken til at disse pelletene ga høyere frisetting enn de som hadde maks pektin kan være at coatinglaget ble mindre fleksibelt og dermed tålte påkjenningene i spraycoateren dårligere. Det kan ha ført til at det ble slått sprekker i pektinlaget og at det delvis falt av. Det underbygges av at det ble funnet litt støv i spraycoateren etter endt spraying med  $\text{CaCl}_2$ .

### 5.5.3 Evaluering av spraycoating

Spraycoating ble forsøkt siden prosessen har flere positive sider, blant annet med tanke på oppskaleringspotensiale og sannsynligvis bedre innkapslingseffektivitet enn immersjonscoating. Innkapslingseffektiviteten ble ikke målt for de spraycoatede pelletene, men var trolig minimal sammenlignet med immersjonscoatingen.

Det var overraskende vanskelig å coate pelletene ved bruk av *fluid bed*. De største utfordringene før det blir en brukbar coatingmetode er (a) å kunne øke konsentrasjonen på coatingløsningen slik at prosestetiden kan reduseres og (b) å optimalisere prosessvariablene slik at aggregering minimaliseres. Å redusere aggregering er en essensiell utfordring siden coatinghastigheten ikke kan økes før tørkingen forbedres.

## 5.6 Immersjonscoating

### 5.6.1 Innkapslingseffektivitet

Fra tidligere studier er det kjent at en del av virkestoffet migrerer ut ved immersjonscoating [43, 75]. Resultatet fra undersøkelsen er vist i tabell 4.

Tabell 4 Oversikt over sammenligningsgrunnlaget og resultatet av innkapslingseffektivitetsundersøkelsen

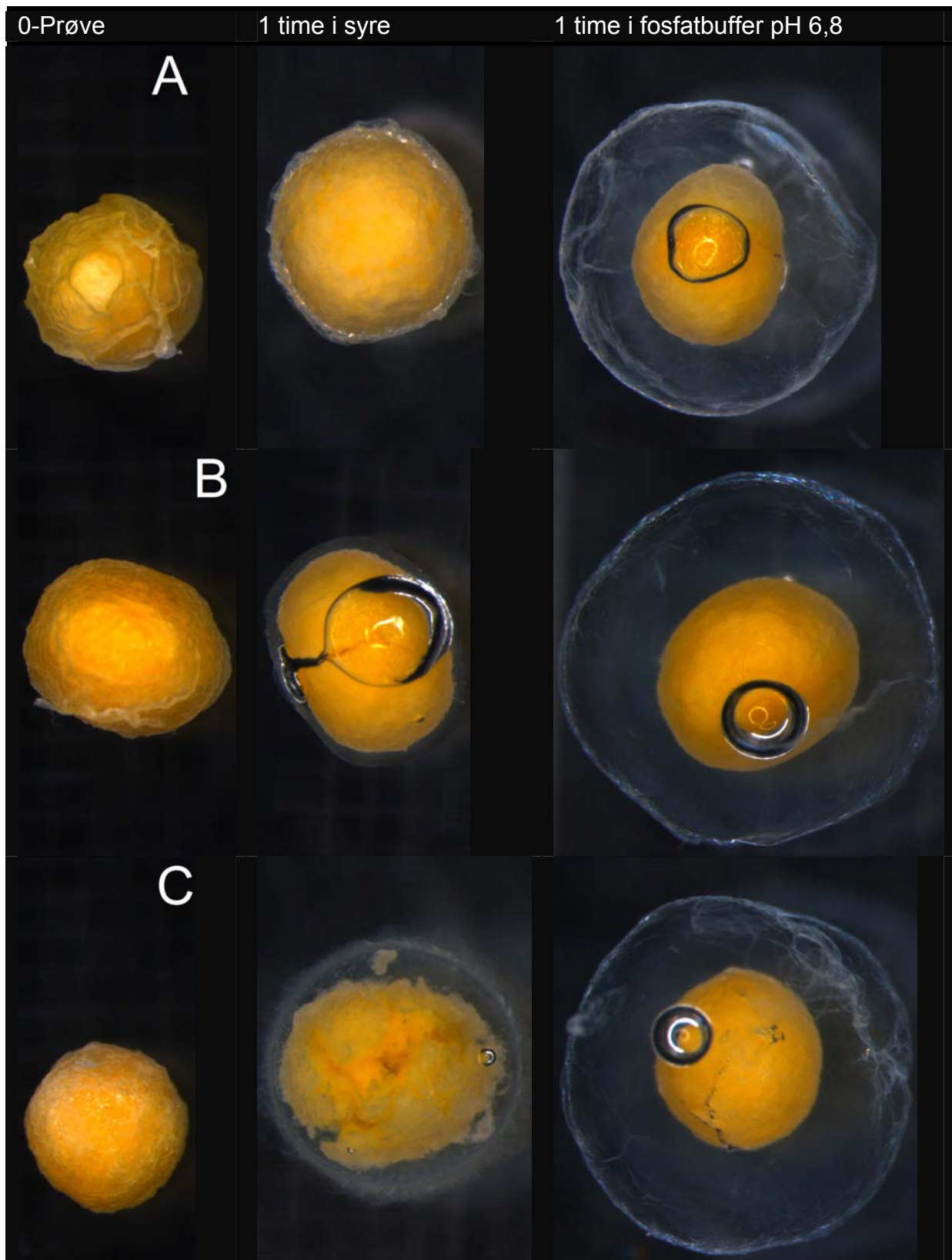
Før innkapsling:			
	Gjennomsnitt	Maks	Min
10 % kalsium	0,19	0,20	0,18
10 % + 10 %	0,18	0,18	0,17
Etter innkapsling			
10 % kalsium	0,13	(med 2 % pektin og 5 % CaCl <sub>2</sub> )	
10 % + 10 %	0,13	(med 2 % pektin og 5 % CaCl <sub>2</sub> )	
Dette gir innkapslingsgrad på:			
10 % kalsium	67,0 %		
10 % + 10 %	72,7 %		

Resultatene er svært like for de to pellettypene og siden undersøkelsen ble foretatt med begrenset mengde replikater er det ikke grunnlag til å skille mellom dem. Innkapslingseffektiviteten ligger på ca 70 %. Det vil si at ca 30 % av virkestoffet forsvinner ut i løsningen i løpet av immersjonscoatingprosessen. For å kunne sammenligne dette resultatet med andre studier må virkestoff med samme løselighet som riboflavin, det vil si tungtløselig, være brukt. Det er funnet en annen studie hvor det er benyttet riboflavin med sammenlignbart forsøksoppsett, hvor innkapslingseffektiviteten var  $58,1 \pm 4,5$  % [89]. I den nevnte studien er det brukt pellets med størrelse 0,7-1,7, noe som skulle tilsi lengre diffusjonsvei og høyere innkapslingseffektivitet. Årsaken til avviket er usikkert men kan skyldes forskjell i pelletenes porositet samt coatingløsningenes viskositet.

### 5.6.2 Pelletenes svellingsegenskaper

Det ble på et utvalg pellets undersøkt hvor mye pelletkjernen og coatinglaget svellet etter en time i 0,1 M HCl samt en time i fosfatbuffer pH 6,8. Noen eksempler er vist i figur 5.9. Det ble ikke foretatt en kontinuerlig svellingsstudie og alle bildene er derfor uavhengige og av individuelle pellets.





Figur 5.9 Bilder av pellets før svelling samt etter 1 time i 0,1 M HCl og etter 1 time i fosfatbuffer pH 6,8. A =10+10-pellet med 1 % alginat og 0,1 % kitosan, B = 10%kalsium-pellet med 1 % pektin og 0,1 % kitosan, C =10+10-pellet med 1 % pektin og 0,1 % kitosan.

Figur 5.9 viser at samtlige coatinger viste en pH-avhengig svelling, hvor de svellet mer i fosfatbuffer pH 6,8 enn i syre, pH 1. Det er i tidligere studier vist at dette skyldes både anionene (alginat [84, 90] og pektin [91]) og kationene (kitosan [92] og  $\text{Ca}^{2+}$  [43, 77]). Årsaken til den observerte forskjellen mellom svelling av alginatcoatinger i syre og fosfatbuffer pH 6,8 er mest sannsynlig at den hydrerte coatingen sveller mindre i syre (pH <4) på grunn av at syregruppene protoneres og blir mindre hydrofile [90]. Siden  $\text{pK}_a$ -verdiene til alginat og pektin er tilnærmet like (ca 3,5) er det trolig at det samme skjer med pektincoatingene. Dette kan dermed forklare hvorfor polymerkompleksene svellet mindre i syre enn i fosfatbuffer pH 6,8.

Det er også vist at svelling av polymer-kitosankomplekser i fosfatbuffer pH 6,8 delvis kan forklares ved  $\text{pK}_a$ -verdien til kitosan [84].  $\text{pK}_a$ -verdien gjør at kitosanet blir deprotonert og mer hydrofobt i fosfatbuffer pH 6,8 slik at bindingene mellom polymerene og kitosan delvis løsner.

Macleod et al. har tidligere vist at det ikke dannes PEC ved pH 1,3 og at det er en lineær sammenheng mellom svellingen og andelen fritt pektin i polymerkomplekset [47]. Siden coatinglagene generelt svellet mer i fosfatbuffer pH 6,8 enn i syre pH 1 må det bety at det har blitt dannet et sterkt PEC under immersjonscoatingprosessen som holdt coatingkomplekset sammen også i syre.

Svellingsforsøkene viste også tilfeller hvor coatingen løsnet fra pelleten. Dette skjedde ved noen tilfeller for coatinglagene med pektin, både ved bruk av kitosan og kalsium som motion. Coatinglaget har i disse tilfellene sannsynligvis begrenset effekt og vil raskt bli fjernet fra pelletene i GI når pelleten kommer over i en pH som nærmer seg  $\text{pK}_a$ -verdien til pektin ( $\text{pK}_a$  ca 3,5).

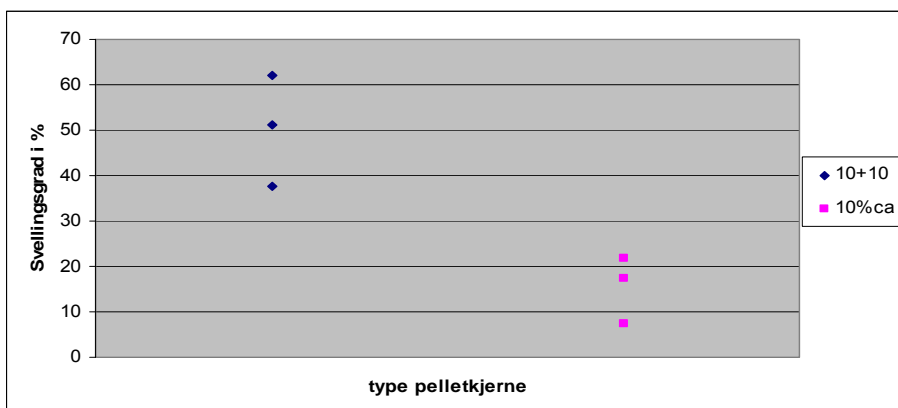
Resultatene fra svellingsforsøkene er vist i tabell 5. Det ble modellert på disse med PLS1 for å identifisere eventuelle forskjeller. Siden pelletene som inneholdt 10 % kitosan ikke ble coatet var de ikke med i forsøket.

Tabell 5 Oversikt over utvalget av coatede pellets som ble testet for svelling samt resultatene. Kit = kitosan,  $\text{CaCl}_2$  = kalsiumklorid, buffer = fosfatbuffer pH 6,8, syre = 0,1 M HCl.

Pelletssammensetning			Resultater				
Kjerne	Polymer	Motion	Svellingsmedium	Pelletareal 0 min, i $\text{mm}^2$	Kjerneareal 60 min, i $\text{mm}^2$	Coating-svelling i $\text{mm}^2$ , 60 min	kjerneøkning i %
10 % kalsium + 10 % kitosan	1 % alginat	0,1 % kit	Buffer	0,87	0,96	3,19	10,66
			Syre	1,01	1,38	1,61	37,65
10 % kalsium	1 % alginat	0,1 % kit	Buffer	1,11	1,14	3,99	3,20
			Syre	1,32	1,42	1,80	7,28
10 % kalsium + 10 % kitosan	1 % alginat	5 % $\text{CaCl}_2$	Buffer	0,87	1,06	3,34	21,63
			Syre	0,80	1,20	1,33	51,04
10 % kalsium	1 % pektin	0,1 % kit	Buffer	1,06	1,23	4,77	17,30
			Syre	0,88	1,03	1,56	17,31
10 % kalsium	2 % pektin	0,1 % kit	Buffer	0,96	1,08	4,70	12,68
			Syre	0,85	1,04	1,69	21,62
10 % kalsium + 10 % kitosan	1 % pektin	0,1 % kit	Buffer	0,85	0,87	4,10	1,99
			Syre	0,90	1,47	2,37	62,00

### Pelletkjernesenes svelling

Det ble analysert på kjernesenes svelling i enten syre eller fosfatbuffer pH 6,8 ved å modellere på kjerneøkningen i % etter en time. Resultatet viste at det ikke var noe korrelasjon mellom kjernesammensetningen og svellingsgrad i fosfatbuffer pH 6,8 (resultater ikke vist). Det ble derimot funnet korrelasjon mellom kjernesammensetningen og svellingsgraden i syre. T-test viste at korrelasjonen var signifikant ( $p < 0,05$ ). Korrelasjonen er vist i figur 5.10 som et scatterplott.



Figur 5.10 Korrelasjonen mellom kjernesammensetningen og kjernesenes svellingsgrad etter en time i syre, vist ved scatterplott (10+10 = pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, 10%ca = pellets med 10 % kalsium i kjernen)

At pelletene med 10 % kalsium i kjernen får de laveste verdiene betyr at disse pelletene svellet minst. Når en formulering sveller er det to hovedfaktorer som påvirker frisettingen i motsatte retninger. For det første blir diffusjonslengden økt slik at virkestoffet må diffundere lengre for å komme ut av formuleringen. For det andre er svelling ensbetydende med en høyere væskestrøm gjennom formuleringen, noe som gjør at frisettingen øker. Hvilken av disse to faktorene som har størst innflytelse kan variere [93, 94], men i hydrerte coatinger øker vanligvis frisettingen ved økt svelling på grunn av at væskestrømmen har størst innflytelse på frisettingen [95]. Bilde C i figur 5.9 viser i tillegg at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen delvis disintegreerte i syre. De får dermed i tillegg en mye større overflate.

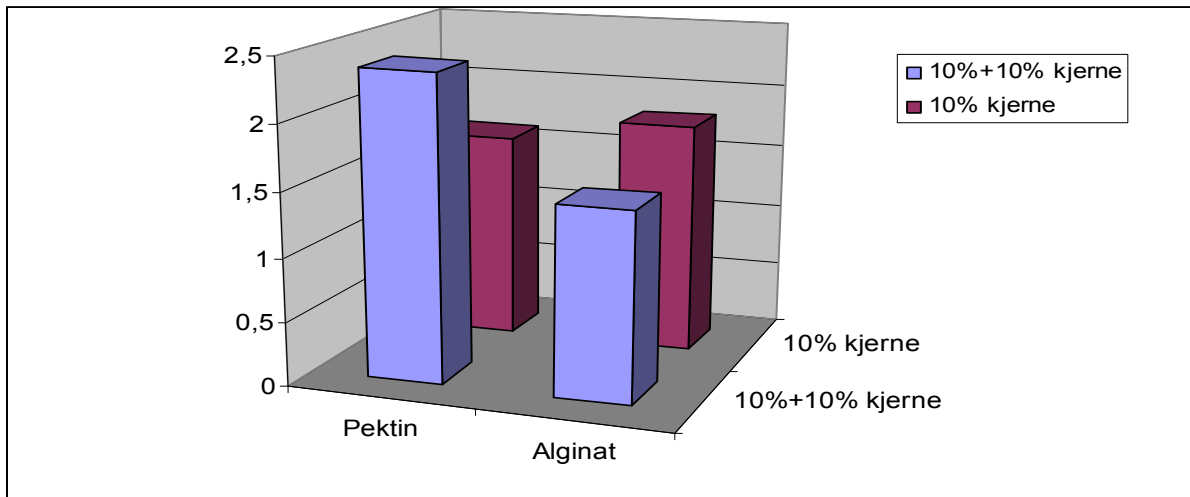
### *Coatinglagets svelling*

Det ble analysert på coatinglagets svelling etter en time i både syre og fosfatbuffer pH 6,8 ved å modellere på coatingsvelling i mm<sup>2</sup>. Verken polymertype eller pellettype viste signifikant korrelasjon med coatinglagets svellingsgrad i syre, men interaksjonen viste en sterk trend, uten å være signifikant (figur ikke vist). For å se hva interaksjonen innebar ble variablene plottet mot hverandre i et 3-D stolpediagram (figur 5.11) etter følgende tabell:

*Tabell 6 Verdiene som ble benyttet for stolpediagram i figur 5.11 (\* = gjennomsnitt av to typer motion).*

	10 % +10 % kjerne	10 % kjerne
Pektin	2,37	1,62*
Alginat	1,47*	1,80

Stolpediagrammet viser pelletkjernenes påvirkning på de to forskjellige coating-polymerenes svelling. Stolpene som representerer pelletkjernene med 10 % kalsium + 10 % kitosan viste større variasjon overfor coatingens polymertype enn det kjernene med 10 % kalsium gjorde. Tre av stolpene i diagrammet er relativt jevne, mens stolpen som representerer kombinasjonen pektincoating på pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen skiller seg ut med en uttalt svelling.

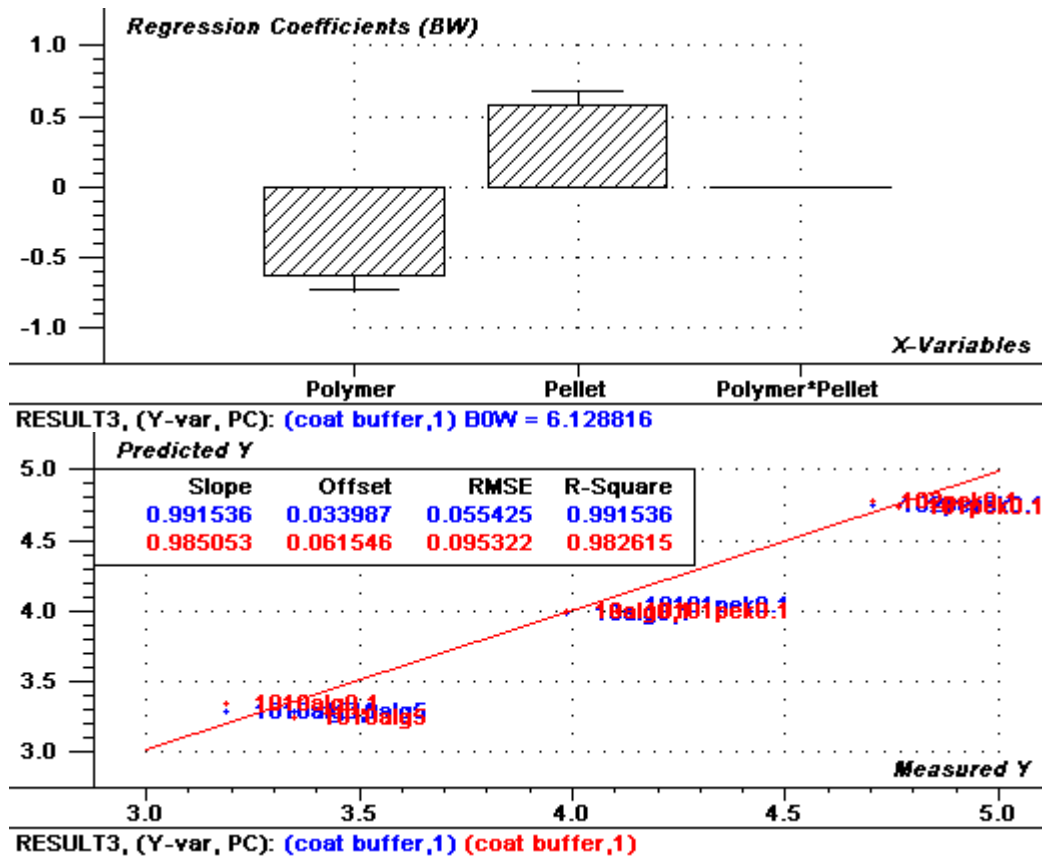


Figur 5.11 3-D stolpediagram av variabelene som viste interaksjon ved coatinglagets svelling i syre.

Det er utført for få forsøk til å vite om trenden er tilfeldig, men det kan indikere at pelletkjernene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen har en induserende svellingseffekt på pektincoatingen, i syre, og at det dermed er en dårlig kombinasjon, eller at pelletene med 10 % kalsium i kjernen hemmer pektinets svelling.

Svellingsgraden til coatinglaget i fosfatbuffer pH 6,8 viste signifikant korrelasjon ( $p < 0,05$ ) med både polymertype og pellettype, som vist i figur 5.12. Designet er kodet slik at negativ polymertrend betyr at coatinglagene med pektin svellet mer enn de med alginat og positiv pellettrend betyr at pelletkjernene med 10 % kalsium hadde et coatinglag som svellet mer enn coatinglaget til kjernene som inneholdt 10 % kalsium + 10 % kitosan (koding punkt 4.7.3). Årsaken til at coatinglagene med pektin svellet mer enn coatinglagene med alginat skyldes sannsynligvis at alginat er mindre løselig ved pH 6.8 samt at alginat danner et tettere kompleks med kitosan enn det pektin gjør. Dette er videre diskutert under "Sammenligning av immersjonscoating med pektin og alginat på pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen".

Årsaken til at coatinglaget på pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen svellet mindre enn coatinglaget på kjernene med 10 % kalsium i kjernen var sannsynligvis at kitosanet i kjernen interagererte med coatinglaget. Dette førte til en ytterligere forsterking av coatingnettverket.

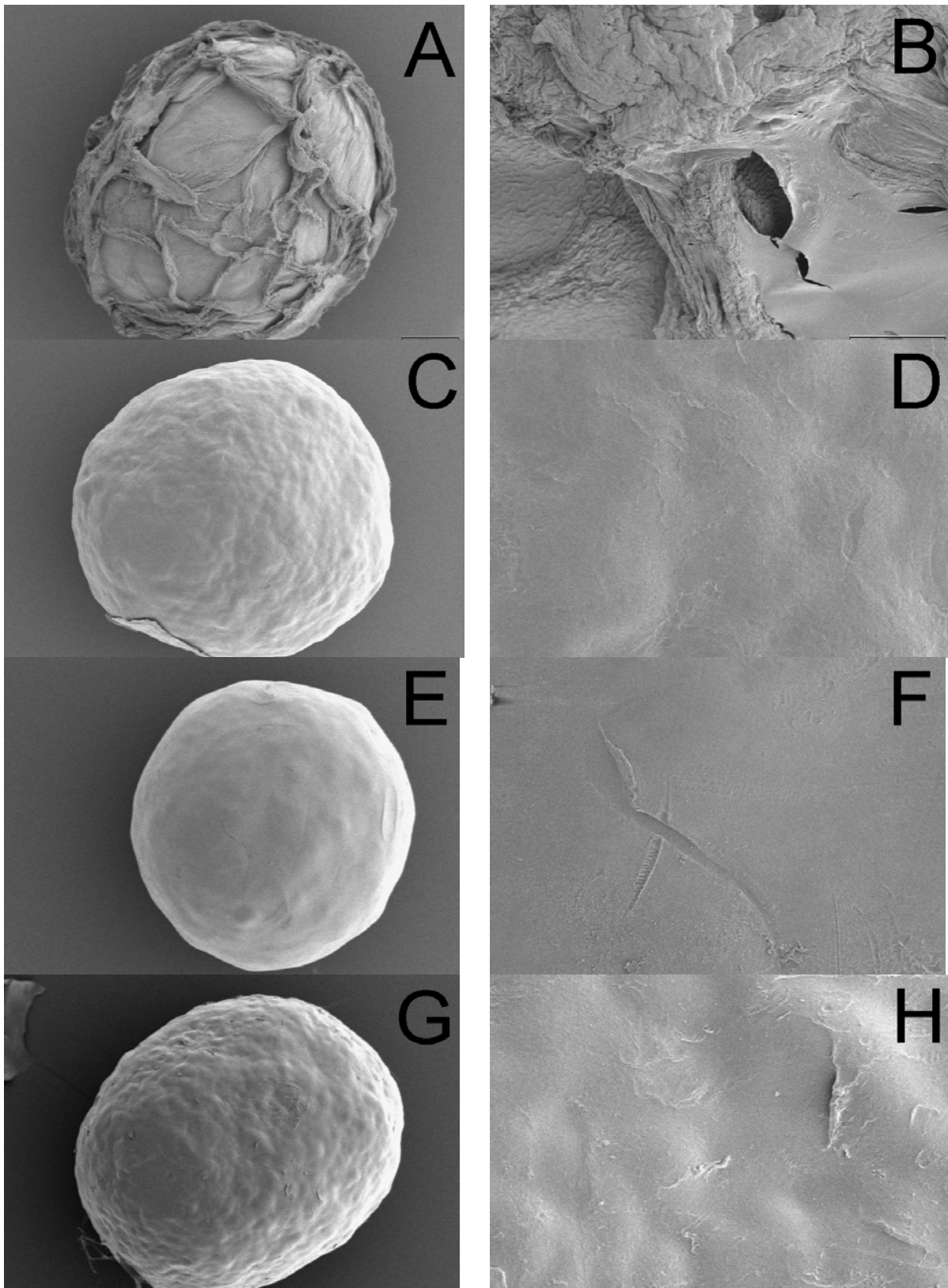


Figur 5.12 "Regresjonskoeffisienter" og "Predikert mot målt Y" fra PLS1-analyse av coatinglagets svelling i fosfatbuffer pH6,8.

En studie utført av Pasparakis et al. viste at kitosancoatede kalsium-alginatperler svellet ca fire ganger mindre enn ucoatede kalsium-alginatperler i fosfatbuffer pH 7,4 [84]. I denne studien var det ikke mulig å studere eventuelle forskjeller på motionene fordi utvalget av pellets til svellingstudien var for lite, men en slik effekt vil sannsynligvis påvirke frisettingen. Grunnen til den store forskjellen ble forklart med at det ble dannet et tettere coatinglag når alginat komplekserte med kitosan. Det ble da dannet PEC rundt kalsium-alginatperlene som forhindret vannet å penetrere i like stor grad som i kalsium-alginatperlene uten kitosancoating.

### 5.6.3 SEM-bilder av immersjonscoatede pellets

Det ble tatt SEM-bilder av noen utvalgte immersjonscoatede pellets. Figur 5.13 viser noen av disse bildene. Bilde A (75x) og B (500x) viser hvordan coatinglaget med alginat krøller seg når den tørker på pelleten etter at den er kryssbundet med kitosan på pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Dette står i sterk kontrast til bilde E og F hvor alginat er kryssbundet med  $\text{CaCl}_2$  på samme pellettype. Pelleten på bildene E-F har en jevnere coating uten folder. Dette kan skyldes at alginat enten danner et tynnere coatinglag med  $\text{CaCl}_2$ , eller at coatinglaget er mer elastisk under tørkingen slik at det trekker seg bedre og jevnere sammen enn det som er tilfelle med kitosan. Bildene C-D og G-H viser pektincoating på de to forskjellige pellettypene. Pektinet hadde forskjellig konsentrasjon men begge er kryssbundet med kitosan. Resultatet ble to relativt like overflater som er mer ruglete enn alginatcoatingen på E-F. Om det skyldes at coatinglaget er tynnere slik at strukturen til kjernen er synlig igjennom eller at pektincoatingen danner en slik overflate er ukjent.

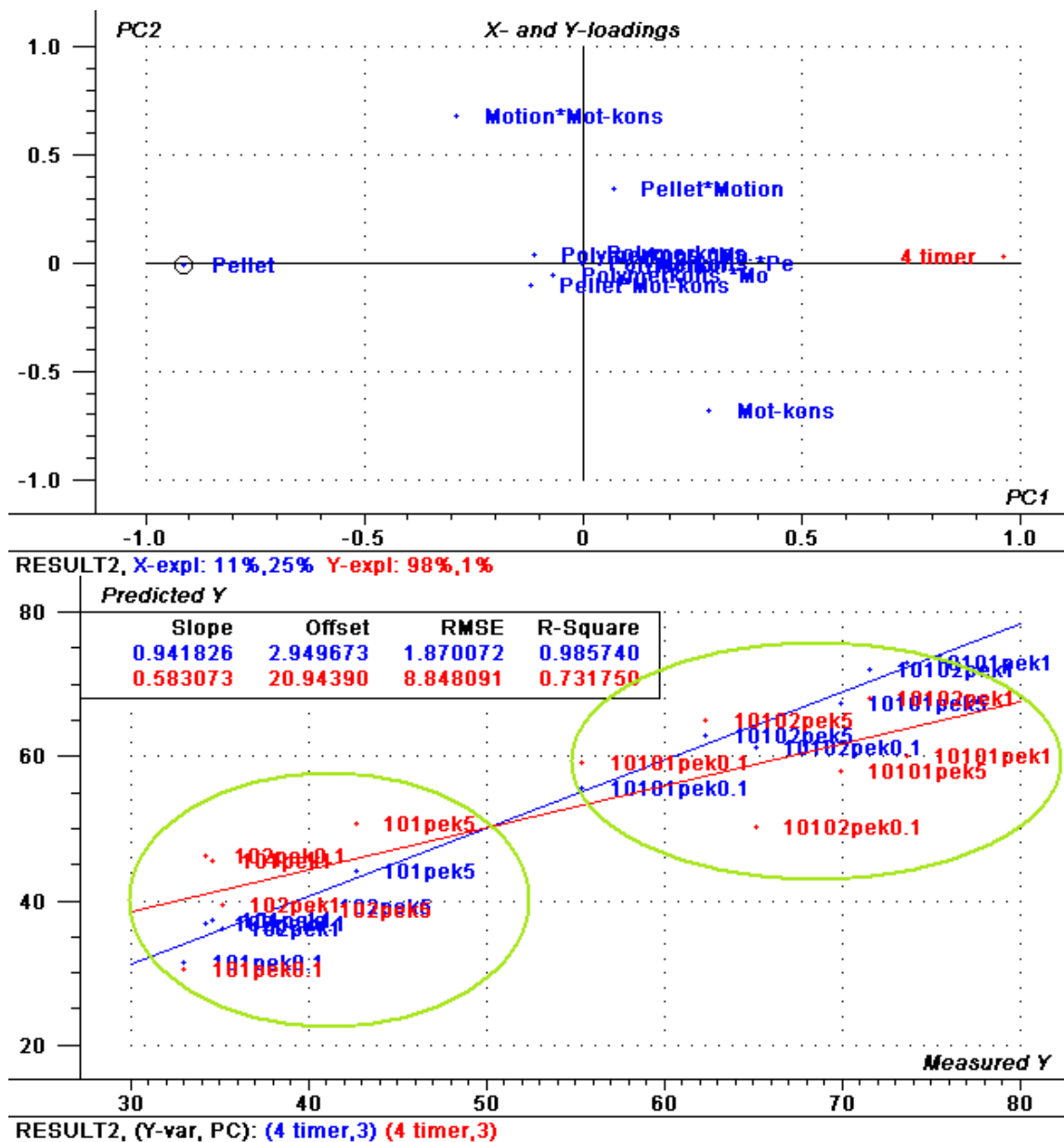


Figur 5.13 SEM-bilder av forskjellige immersjonscoatede pellets. A-B er 10+10 med 1% alg, og 0,1% kit, C og D = 10+10 med 1 % pektin og 0,1% kit, E og F = 10+10 med 1% alg og 5 % CaCl<sub>2</sub>, G og H = 10% Ca med 2% pektin og 0,1% kit (10+10 = pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, 10% Ca = 10 % kalsium i kjernen, 1% alg = 1 % alginat, 0,1% kit = 0,1 % kitosan, 1% alg = 1 % alginat). A, C, E og G er tatt med 75x forstørrelse og B, D, F og H er tatt med 500x forstørrelse.



### 5.6.4 Effekt av immersjonscoating med pektin

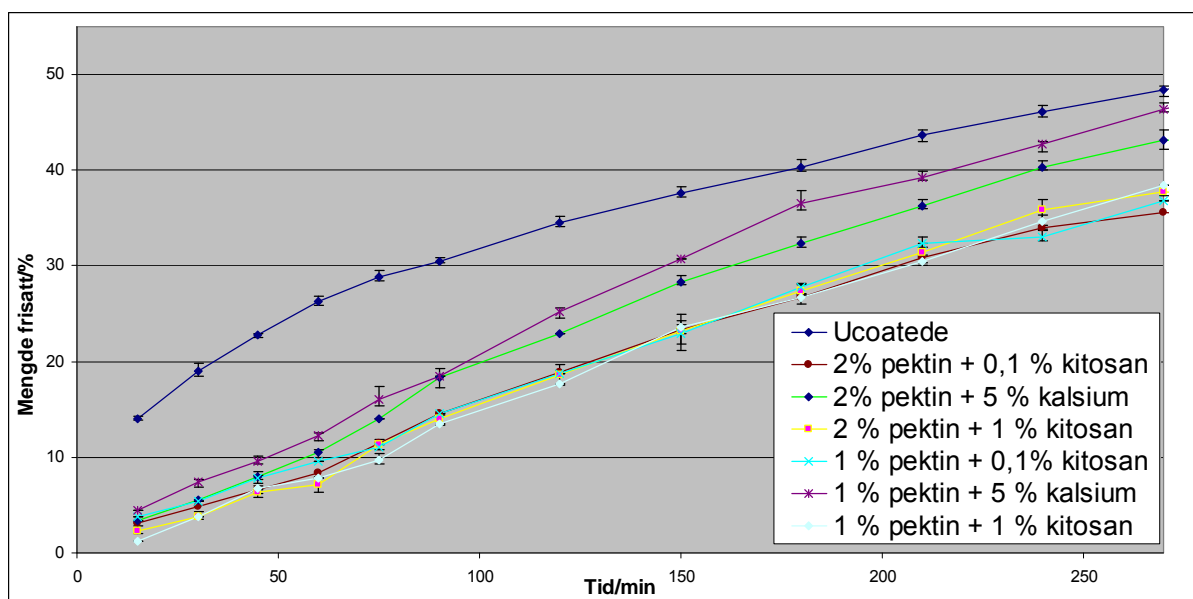
Immersjonscoating ble utført på pelletene med 10 % kalsium i kjernen samt pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Det ble utført en PLS1 analyse med frisetting etter 4 timer som respons for å tolke resultatene, men som figur 5.14 viser ble det dannet to grupperinger (grønne ringer) på grunnlag av de to pellettypene i "predikert mot målt Y"-plottet. Det var derfor vanskelig å se effektene av de andre faktorene som ble undersøkt. På grunnlag av dette ble det valgt å se på resultatene til pellettypene hver for seg.



Figur 5.14 "Predikert mot målt Y" og "X- og Y-loading" fra PLS 1 av begge pellettypene med frisetting etter 4 timer under standardbetingelser som respons.

### Immersjonscoating av pellets med 10 % kalsium i kjernen

Ucoatede pellets frisatte ca 51 % virkestoff i løpet av 5 timer under standardbetingelser. De coatede pelletene frisatte til sammenligning mellom 31 % og 50 % avhengig av coatingsammensetning. Figur 5.15 viser frisettingsprofilen til de ucoatede pelletene sammen med de undersøkte coatingsammensetningene. Mengde virkestoff som ble frisatt fra pelletene etter 5 timer ved standardbetingelser ble redusert ved å coate pelletene.

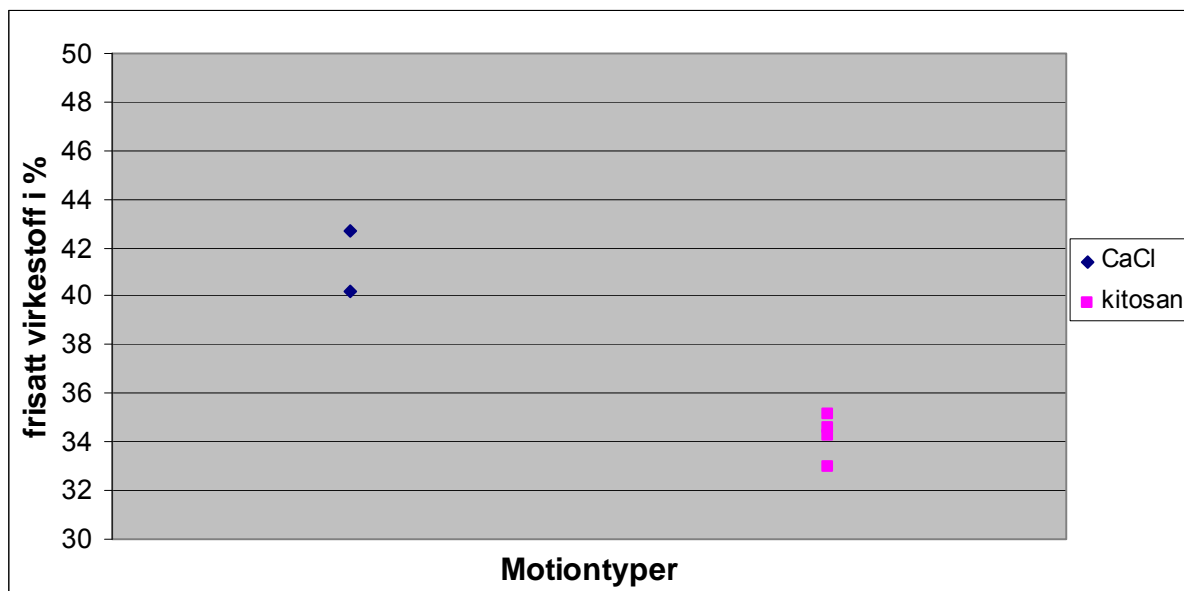


Figur 5.15 Frisettingsprofilen til ucoatede og immersjonscoatede 10 % kalsiumpellets med usikkerhetsgrenser (min/maks) under standard betingelser

Det ble foretatt en PLS1 analyse av samtlige coatingkombinasjoner på pellets med 10 % kalsium i kjernen hvor det ble undersøkt om polymerkonsentrasjon eller type motion hadde korrelasjon med frisettingen etter 4 timer (resultater ikke vist). Det ble kun funnet signifikant korrelasjon ( $p < 0,05$ ) mellom type motion og mengde virkestoff frisatt. Resultatet er gjengitt som scatterplot i figur 5.16. Siden  $\text{CaCl}_2$ -konsentrasjonen ikke ble variert var det ikke mulig å analysere effekten av konsentrasjonsvariasjonen for kitosan.

De plottede punktene som representerer kitosan som motion ligger lavere enn de med kalsiumklorid. Det viser at formuleringene med kitosan som motion hadde lavere frisetting enn formuleringene med kalsiumklorid. Det samsvarer med grupperingene som kan sees i figur 5.15 hvor pelletene med kitosan som motion hadde lavere frisetting enn pelletene med kalsium som motion. Det ble ikke dannet noen undergrupperinger i figur 5.16. Det vil si at de to hovedgruppene inneholder både 1 %

og 2 % pektin og kitosangrupperingen inneholder 0,1 % og 1 % kitosan. Det var dermed ikke mulig å se noe forskjell i frisetting på grunnlag av pektin- eller kitosankonsentrasjon.



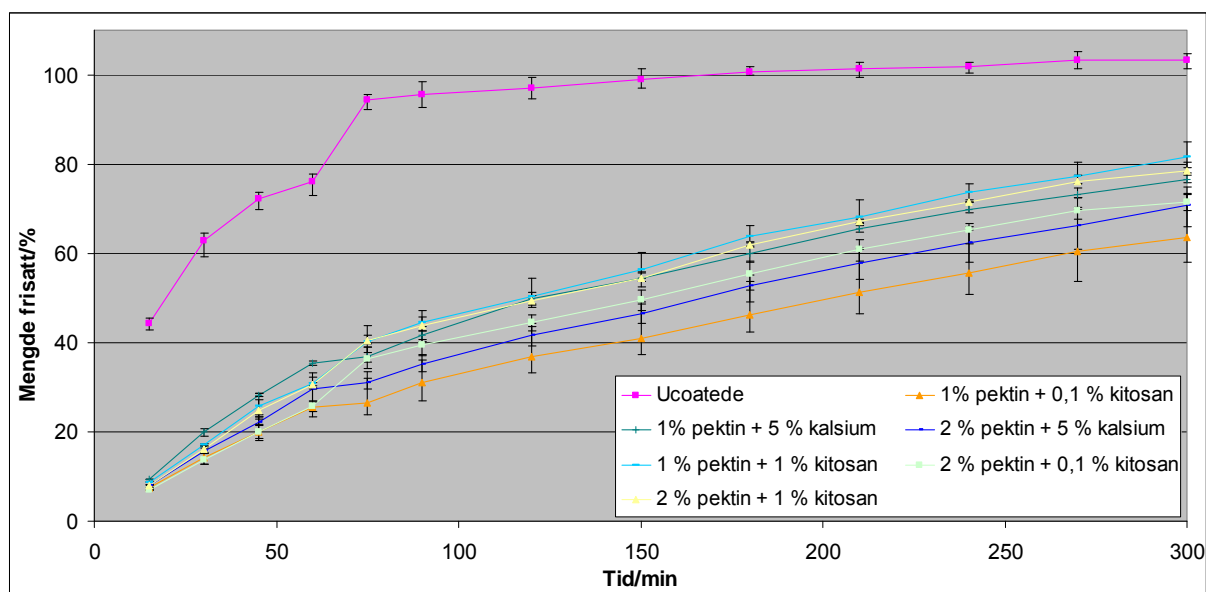
Figur 5.16 Scatterplott av korrelasjonen mellom type motion og mengde frisatt virkestoff etter 4 timer under standardbetingelser.

Figur 5.15 viser at frisettingen gikk fra å ligne 1.-ordenskinetikk for ucoatede pellets til å bli tilnærmet lineær når pelletene ble coated. Denne effekten var mest tydelig for pelletene med kitosan som motion hvor frisettingen så ut til å følge 0.-ordenskinetikk. Det er vanskeligere å se om pelletene med kalsiumklorid som motion fulgte 0.-ordenskinetikk, men hvis det var tilfelle var det kun stigningstallet til kurvene som ble påvirket av coatingsammensetningen. Sriamornsak et al. har tidligere vist at pellets med pektin-kalsiumcoating fikk 0.-ordens frisetting som var uavhengig av de ulike pH-verdiene i GI [43].

#### *Immersjonscoating av pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen*

Figur 5.17 viser frisettingsprofilen til de ucoatede og coatede pelletene som bestod av 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. De ucoatede pelletene disintegreerte i løpet av de første tre timene og frisatte 76 % virkestoff etter en time. Alt virkestoffet (100 %) var frisatt før det var gått 3 timer. Samtlige coatingkombinasjoner forhindret disintegrasjon av kjernen og reduserte og kontrollerte frisettingen, men i varierende grad. I løpet av den første timen frisatte de coatede pelletene mellom 25 % og 35 %

og etter fem timer under standardbetingelser frisatte de mellom 54 % og 82 % av virkestoffet.



Figur 5.17 Frisettingsprofilen til ucoatede og immersjonscoatede 10 % kalsium + 10 % kitosanpellets, med usikkerhetsgrenser (min/maks) under standard betingelser.

Det ble foretatt en PLS1 analyse for å se om det var mulig å finne noe sammenheng mellom frisettingen etter fire timer i standard betingelser og pelletenes polymerkonsentrasjon eller motiontype, men det ble ikke funnet signifikant korrelasjon (resultat ikke vist). Interaksjonen ble også undersøkt men heller ikke her ble det funnet korrelasjon. Det gjenspeiler figur 5.17 hvor samtlige av frisettingsprofilene ligger relativt tett uten generelle grupperinger med hensyn til polymerkonsentrasjon eller motion. Pelletene som ble coatet med 1 % pektin og 0,1 % kitosan fikk den laveste frisettingen.

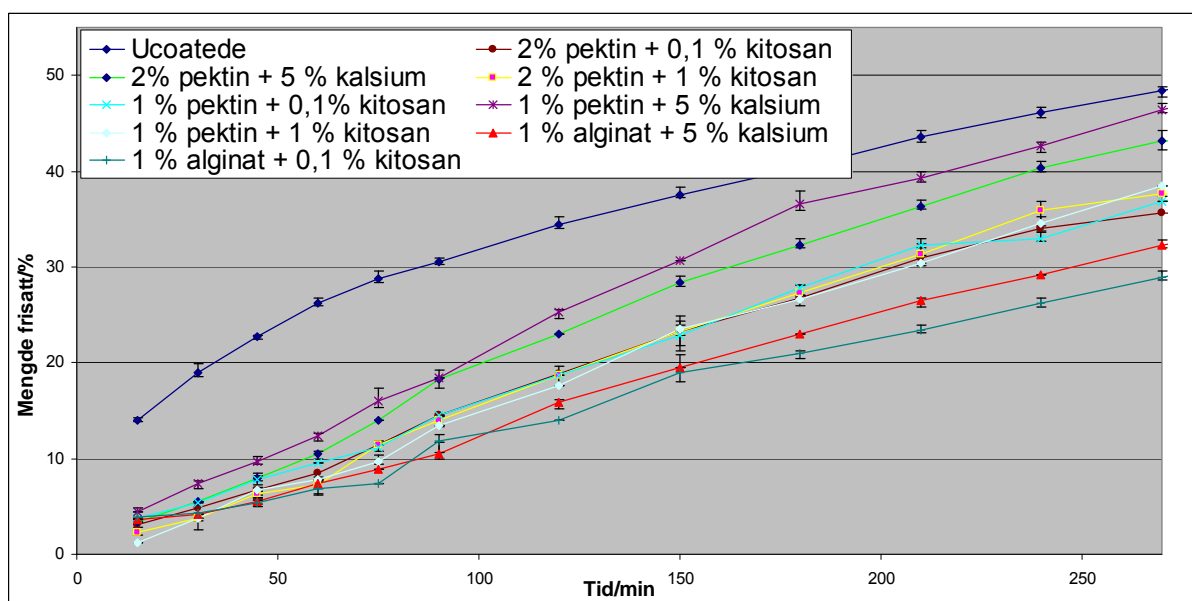
Det ble dannet en knekk i samtlige av frisettingskurvene i overgangen mellom syre og fosfatbuffer pH 6,8, siden frisettingshastigheten for disse var høyere i syre enn i buffer. Frisettingen var tilnærmet lineær både før og etter denne knekken men med høyere stigningstall i syre enn i buffer. Denne frisettingsprofilen følger til dels profilen til de ucoatede pelletene, men coatingen har redusert frisettingen i syre kraftig. Årsaken til at disse pelletene har en lavere frisetting i fosfatbuffer pH 6,8 skyldes sannsynligvis  $pK_a$ -verdien til kitosan (6,2-7,0). Kitosanet i kjernen vil delvis bli deprotonert når pelleten kommer over i fosfatbuffer pH 6,8 slik at kjernen blir mindre hydrofil. Vann vil da ha vanskeligere for å trenge inn i kjernen og frisettingen vil gå ned.

### 5.6.5 Sammenligning av immersjonscoating med pektin og alginat

Coating med alginat ble foretatt på de to ulike pelletkjernene. Det ble coatet med 1 % alginat i kombinasjon med 5 % kalsium som motion eller 0,1 % kitosan som motion (se Figur 4.2 for design)

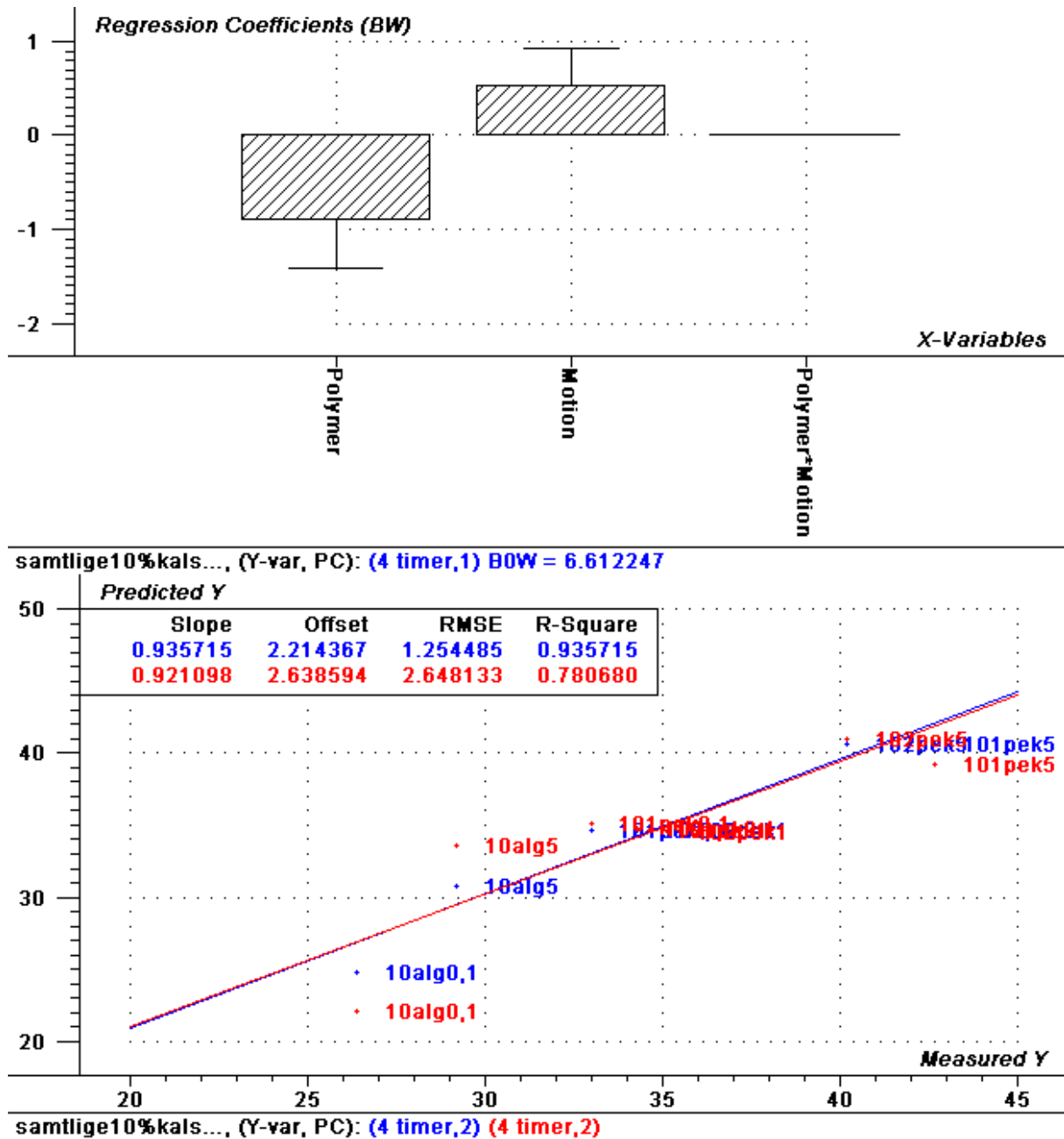
#### *Sammenligning av immersjonscoating med pektin og alginat på pellets med 10 % kalsium i kjernen*

Resultatene av samtlige frisettingsforsøk under standardbetingelser fra pelletene som inneholdt 10 % kalsium i kjernen er plottet i figur 5.18. Figuren viser at frisettingskurven ble mer lineær ved bruk av alginat i coatinglaget og det ser ut som om det blir tilnærmet 0.-ordens frisetting. Det går også frem av figuren at pelletene som ble coatet med alginat ga den laveste frisettingen, uavhengig av motion.



Figur 5.18 Frisettingskurvene til ucoatede og immersjonscoatede 10 % kalsiumpellets med samtlige coatingkombinasjoner, med usikkerhetsgrenser (min/maks) under standardbetingelser

Det ble utført en PLS1 analyse på samtlige pellets med 10 % kalsium i kjernen med frisatt virkestoff etter 4 timer som respons, for å se om trendene i figur 5.18 var signifikante og for å se om det var korrelasjon mellom andre variabler og reduksjonen i frisettingen. Resultatene av analysen er gjengitt i figur 5.19.



Figur 5.19 "Regresjonskoeffisienter" og "Predikert mot målt Y" fra PLS1-analyse av samtlige coatingkombinasjoner på pellets med 10 % kalsium i kjernen. Responsen var % frisatt modellsubstans etter 4 timer under standardbetingelser.

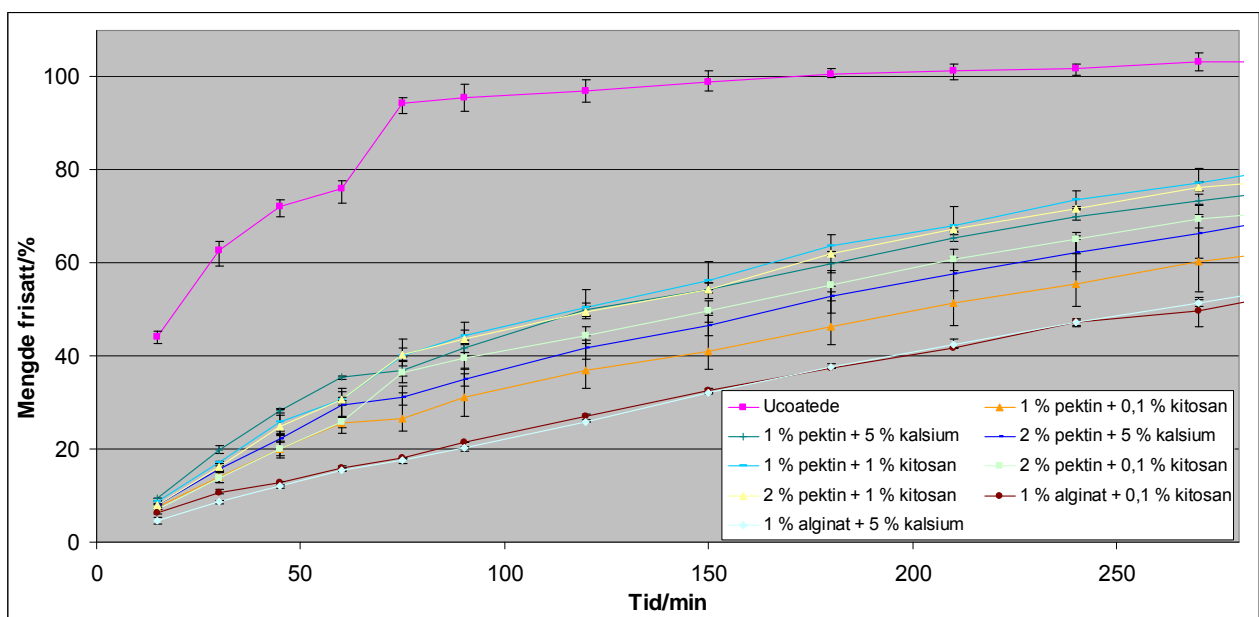
På bakgrunn av analysen og grupperingene i figur 5.19 kan det slås fast at alginatkompleksene senket frisettingen signifikant mer enn pektinkompleksene (se tabell 2 for koding). Det kan forklares med løseligheten, siden pektin er mer løselig enn alginat i fosfatbuffer pH 6,8 [69], noe som også kommer frem i svellingsforsøket i punkt 5.6.2. Pektincoatingen svullet signifikant mer enn alginatcoatingen, og hadde dermed en økt væskestrøm gjennom coatinglaget slik at frisettingen økte. Mitrevej et

al. viste også at alginat-kitosankomplekset senket frisettingen mer enn pektin-kitosankomplekset [69].

Type motion ble også signifikant, noe som betyr at det ble frisatt mindre virkestoff når både alginat og pektin ble kompleksert med kitosan i forhold til kalsium. Det er ikke publisert noen studier som har sammenlignet løselighetsforskjellen eller frisettingen fra disse fire kompleksene direkte, men det er tidligere funnet at kitosan-pektin senker frisettingen mer enn kalsium-pektin [10]. Det er også vist at kitosan-kompleksert alginat har signifikant lavere frisetting enn kalsiumkompleksert alginat [84, 96, 97]. Dette stemmer godt overens med trendene i dette forsøket.

### Sammenligning av immersjonscoating med pektin og alginat på pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen

Samtlige coatingsammensetninger på pelletene som inneholder 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen er samlet i figur 5.20. Figuren viser at begge coatinglagene med alginat, uavhengig av motion, ga den laveste frisettingen.

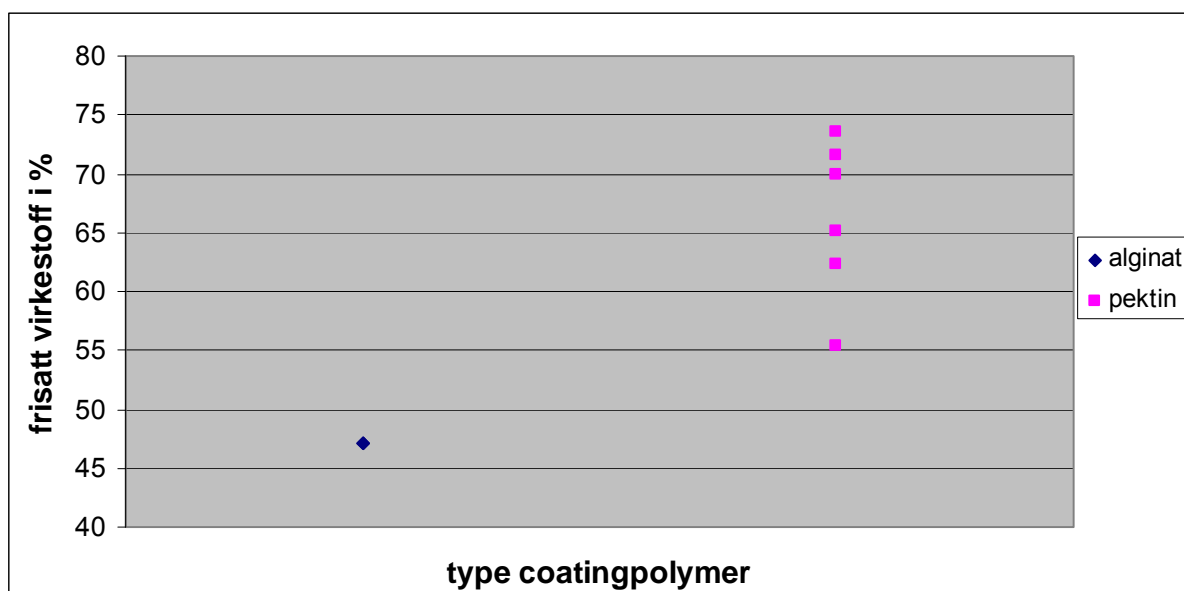


Figur 5.20 Frisettingsprofilen til ucoatede 10 % kalsium + 10 % kitosanpellets sammenlignet med samtlige immersjonscoatede, med usikkerhetsgrenser (min/maks) under standardbetingelser

Det er svært interessant at coatinglaget med alginat førte til at frisettingen så ut til å følge 0.-ordenskinetik, uavhengig av om pelleten var i syre eller fosfatbuffer pH 6,8, mens pelletene som var coatet med pektin fikk en knekk i overgangen fra syre til

fosfatbuffer pH 6,8. Dette fenomenet er diskutert under punkt 5.6.4. Resultatet kan tyde på at coatinglagene med alginat fullstendig styrer vannpenetreringen inn og ut av pelletene, i motsetning til coatinglagene med pektin som ikke fullt ut styrer vannpenetreringen.

Det ble foretatt en PLS1 modellering av resultatene i figur 5.20 hvor det ble undersøkt om polymertype, motionstype eller interaksjonen hadde korrelasjon med mengde frisatt virkestoff (i %) etter fire timer (ikke vist). Polymertype ble signifikant ( $p < 0,05$ ) og korrelasjonen er vist ved scatterplott i figur 5.21. Det ble ikke funnet korrelasjon mellom type motion og mengde frisatt virkestoff etter fire timer. Det reflekterer også resultatet i Figur 5.20 hvor samtlige motioner ligger i en relativt tett gruppe uten å vise noe spesielt mønster.



Figur 5.21 Scatterplott av polymertype mot frisettingen av virkestoff etter 4 timer under standard betingelser fra pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen.

Figur 5.21 viser at pelletene coatet med alginat ga en lavere frisetting enn pelletene coatet med pektin. At denne effekten ble signifikant var ikke overraskende etter frisettingsresultatene i figur 5.20. Det gjenspeiler sammen med resultatene i figur 5.19, resultatene fra svellingsundersøkelsen hvor coatinglagene med alginat svullet signifikant mindre i fosfatbuffer pH 6,8 enn coatinglagene med pektin (Figur 5.12). Årsaken til at coatinglagene med alginat svullet mindre kan være at alginat danner et tettere og mindre løselig kompleks sammenlignet med coatinglagene med pektin. Det er kjent at alginat har lavere løselighet enn pektin, men i hvor stor grad dette kan overføres til komplekserte coatinger er usikkert [69], men det er også i tidligere



studier ment at løseligheten er forklaringen på at frisettingen fra pektin-kitosankomplekset er høyere enn fra alginat-kitosankomplekset i syre, da begge polymerene protoneres slik at coatinglaget blir løsere, men pga alginatets dårligere løselighet blir alginat-kitosanolaget mer hydrofobt og får dermed en mindre vannpenetrering og svelling [98].

En annen forklaring kan være at alginat danner et tettere kompleks med motionene enn det pektin gjør. *Egg-box*-modellens anvendelse for pektin har aldri vært rapportert ved direkte strukturinformasjon. Arbeidet utført av Braccini et al. indikerer at til tross for strukturelle likheter mellom polyguluron- og polygalakturonkjeder, kan ikke egenskapene til alginat direkte overføres til pektin [72]. Dette understrekes av de store forskjellene i formen til de to chelateringsmodellene i figur 2.5. Selv om *egg-box*-modellen ser ut til å gjelde for alginat kan den ikke overføres til pektinets bindingssteder. Modeller indikerte derimot at pektingeler hadde sterkere interne hydrogenbindinger enn det som var tilfelle for alginatgeler. Hydrogenbindinger og van der Waals-bindinger er uspesifikke og svakere, og supplerer  $\text{Ca}^{2+}$ -polymerbindingen [72].

Det er derimot vanskelig å se noen klare sammenhenger mellom frisettingskurvene i figur 5.20 hvor pelletene coatet med pektin har høyest frisetting i syre, og coatinglagenes svellingsgrad i syre og fosfatbuffer pH 6,8, hvor både alginat- og pektincoatingene sveller signifikant mer i fosfatbuffer pH 6,8 enn i syre. Dette gjelder også til en viss grad alginat som hadde lik frisetting i syre og fosfatbuffer pH 6,8. Hvis svellingsgraden til coatinglagene var direkte korrelert med frisettingen skulle frisettingen vært høyest i fosfatbufferen pH 6,8. Det betyr at det sannsynligvis var andre faktorer som hadde stor innvirkning på frisettingen fra de coatede pelletene, men det må poengteres at svellingstudiene ikke ble gjort kontinuerlig. Det er dermed mulig at resultatene fra svellingsundersøkelsene hadde blitt annerledes hvis svellingen i fosfatbuffer pH 6,8 hadde blitt studert etter først en time i syre.

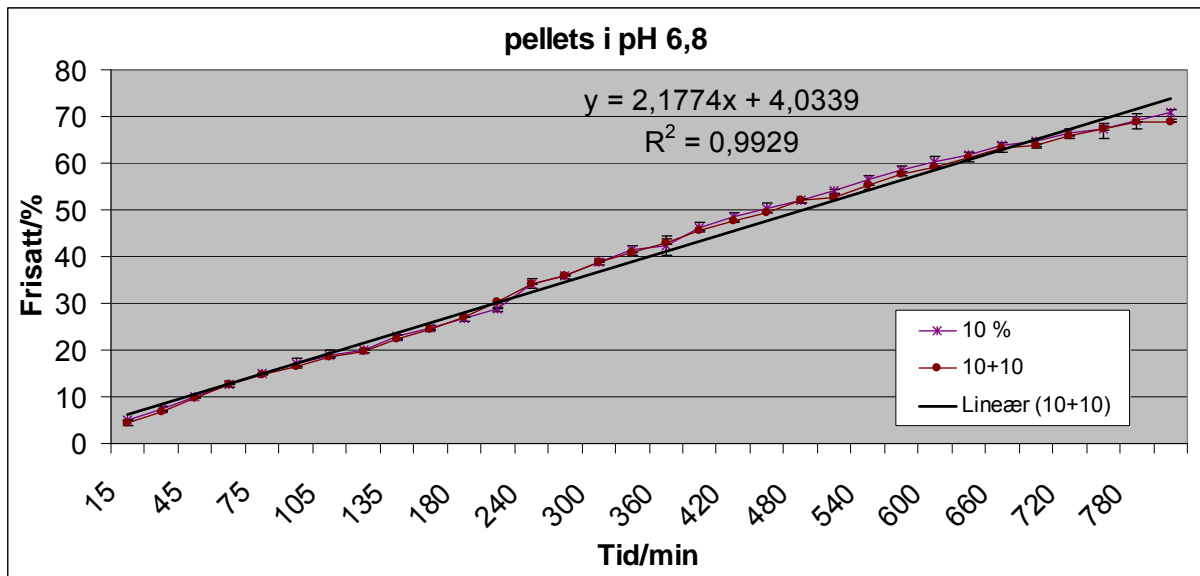
Det er interessant at pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen coatet med de to ulike alginatkompleksene (kalsium og kitosan) gir en tilnærmet lik frisetting under standard betingelser (Figur 5.20). Dette er i kontrast til pelletene med 10 % kalsium i kjernen coatet med alginat som viste signifikant forskjell i frisetting etter 4 timer under standard betingelser avhengig av om alginatet var kryssbundet med

kitosan eller kalsium (Figur 5.18). Årsaken til dette er sannsynligvis at alginat kryssbinder kitosanet som befinner seg i kjernen til pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan. Resultatet blir at det ikke er mulig å se forskjell om alginat har kryssbundet med coatet kitosan eller med kitosanet som er i kjernen. Frisettingsresultatene fra alginatcoating av pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen underbygger dermed resultatene fra alginatcoatingen av pelletene med 10 % kalsium i kjernen hvor det ble vist at også alginat danner et tettere kompleks med kitosan enn med kalsium.

Det ser ut til at coatinglagene med alginat, ifølge figur 5.18 og figur 5.20 ga en tilnærmet lineær frisetting uavhengig av kjernetype, mens coatinglagene med pektin kun hadde tilnærmet lineær frisetting for pelletene med 10 % kalsium i kjernen. Det gjenspeiler resultatene i svellingsforsøkene som er vist i figur 5.11, hvor coatingkompleksene med alginat var mindre ømfintlig for pelletkjernetype enn det coatingkompleksene med pektin var.

### **5.6.6 Sammenligning av frisetting i fosfatbuffer for de to pellettypene**

Figur 5.15 og figur 5.17 viser at både pelletene med 10 % kalsium i kjernen og pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen som ble coatet med 2 % pektin og 0,1 % kitosan hadde tilnærmet 0.-ordens frisetting i fosfatbuffer pH 6,8. Det ble derfor besluttet å foreta et frisettingsforsøk hvor disse to pelletkombinasjonene ble sammenlignet over lang tid. Det ble gjort for å se hvilken pellettype som hadde lavest frisettingshastighet og hvilken som hadde 0.-ordens frisetting lengst. Forsøket foregikk under samme betingelser som fosfatbufferdelen av standardbetingelsene. Resultatet av forsøket er vist i figur 5.23.



Figur 5.22 Frisettingsprofilen til pellets med 10 % kalsium i kjernen og pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, i fosfatbuffer pH 6,8 med usikkerhetsgrenser (min/maks)

Resultatene var svært overraskende (Figur 5.22). For det første var det veldig liten forskjell i frisettingen til de to pellettypene. De fulgte hverandre gjennom hele forsøket. Det var derfor sannsynlig at det er den første timen i pH 1 som kun gir forskjellige utgangspunkt når pelletene går fra surt miljø til pH 6,8. Dette kan skyldes at kitosan er en svak base med  $pK_a$ -verdi 6,2-7,0 [64].  $NH_2$ -gruppene blir dermed protonert i syre og kitosanet i kjernen til pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan som ikke var kryssbundet ble løselig og svelte, noe som førte til at pelleten disintegrerte. I pH 6,8 vil ikke dette skje i like stor grad. Kjernen med 10 % kalsium + 10 % kitosan forble dermed integert og frisettingen var mer avhengig av coatinglaget, som i dette tilfelle var lik for begge pelletene.

Det andre som var uventet med dette forsøket var at pelletene opprettholdt 0.-ordenskinetikk overraskende lenge. Den lineære trendlinjen, som er basert på frisettingskurven til pelletene med 10 % kalsium i kjernen, viser en  $R^2$  på 0,9929, hvor 1,0 er en rett linje. Forsøket varte i 13 timer og på den tiden ble det frisatt ca 70 % virkestoff fra pelletene, og enda kan det se ut som om frisettingen var lineær. Sriamornsak et al. har også vist 0.-ordens frisetting for coatede MCC-pellets inntil 75-80 % av virkestoffet var frisatt. Det ble vist for flere medier, men pelletene frisatte virkestoffet innen 6 timer i de testede mediene [43]. Årsaken til den sene frisettingen

har tidligere vært diskutert, hvor det ble foreslått at det skyldes forskjell i pelletenes bruddstyrke.

### 5.6.7 Evaluering av coatingmetoder

Det er i denne studien blitt vist at immersjonscoating gir lavere frisetting under standard betingelser enn spraycoating. Det skyldes sannsynligvis hovedsakelig problemene med spraycoatingprosessen som er nevnt under 5.5.3, men det er også andre momenter som kan ha innvirkning på forskjellen.

Det kan tenkes at immersjonscoating kryssbinder polymerene bedre enn det spraycoating gjør siden polymerkjedene må vikles inn i hverandre for å kunne danne bindinger. Dette illustreres av resultatene fra en studie av Pasparakis et al. hvor alginatperler som var spraycoatet med kitosan hadde en signifikant høyere frisetting enn perler som bestod av kompleksert alginat-kitosan [84]. Det ble forklart ved at polymerene hadde fått mindre mulighet for å interagere når kitosan ble sprayet på. Sannsynligvis skyldes det at polymerene tørker fast til formuleringen i en *fluid bed*, før neste polymerdråpe treffer samme stedet. Polymerkjedene har begrenset mulighet til å interagere når de ikke er fullstendig hydrerte, slik som er tilfelle i immersjonscoatingprosessen. Det er derfor sannsynlig at det vil bli et tettere coatinglag ved å immersjonscoate. På grunn av problemer med spraycoateprosessen var det ikke mulig å undersøke det tilstrekkelig.

## 6. Konklusjon

Denne studien har vist at det er mulig å produsere 0,7-1,0 mm store MCC-pellets med en akseptabel aspect ratio (<1,2) som inneholder 10 % kalsiumacetat og/ eller 10 % kitosan i kjernen. Studien har også vist at frisettingen kan senkes ved å coate pelletene, både ved immersjonscoating og spraycoating.

Pelletene med 10 % kitosan i kjernen kunne ikke bli immersjonscoated, fordi de disintegreerte i løpet av produksjonsprosessen. Immersjonscoating viste seg å være den prosessen som ga lavest frisetting i 0,1 M HCl etterfulgt av fosfatbuffer pH 6.8. Flere av produksjonsvariablene i spraycoatingprosessen var vanskelige å optimalisere. Blant annet måtte polymerkonsentrasjon holdes på et veldig lavt nivå og dette ga en lang sprayetid.

Immersjonscoating ga lavest frisetting under standard betingelser og pelletene med 10 % kalsium i kjernen hadde lavere frisetting enn pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen. Ved å immersjonscoate med alginat ble det oppnådd 0.-ordens kinetikk og det var denne polymeren som ga den laveste frisettingen under standard betingelser. Av de undersøkte coatingkombinasjonene ga 1 % alginat kryssbundet med 0,1 % kitosan den laveste frisettingen for pelletene med 10 % kalsium i kjernen. Alginat ga også den laveste frisettingen for pelletene med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen uten at det var mulig å skille mellom motionene, 0,1 % kitosan og 5 % kalsium.

Svellingstudiene viste at det var en viss sammenheng mellom svelling av både pelletskjernen og coatinglaget, og mengde frisatt virkestoff. Coatinglagene med pektin svullet mer enn de med alginat, samt at coatingene som var kompleksert med kalsium svullet mer enn de som var kompleksert med kitosan. Det var derimot ikke mulig å se noe direkte sammenheng mellom svellingsgraden i syre og fosfatbuffer pH 6,8 og frisettingen i disse mediene.

Den laveste frisettingen som ble oppnådd var 29 % etter fem timer under standard betingelser. Det ble oppnådd ved å coate pellets med 10 % kalsium i kjernen med 1 % alginat + 0,1 % kitosan.

## Kildeliste

1. Ashford, M. and J.T. Fell, *Targeting drugs to the colon: Delivery systems for oral administration*. Journal of Drug Targeting, 1994. **2**: p. 241-258.
2. Friend, D., *Colon-specific drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 1991. **7**: p. 149-199.
3. Kinget, R., et al., *Colonic drug targeting*. Journal of Drug Targeting, 1998. **6**(2): p. 129-149.
4. Rubinstein, A., *Natural polysaccharides as targeting tools of drugs to the human colon*. Drug Development Research, 2000. **50**(3-4): p. 435-439.
5. Chourasia, M.K. and S.K. Jain, *Polysaccharides for Colon Targeted Drug Delivery*. Drug Delivery, 2004. **11**(2): p. 129-148.
6. Murata, Y., et al., *Properties of calcium-induced gel beads prepared with alginate and hydrolysates*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2004. **52**(5): p. 605-7.
7. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2002. **28**(6): p. 621-630.
8. Hovgaard, L. and H. Brondsted, *Current applications of polysaccharides in colon targeting*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1996. **13**(3-4): p. 185-223.
9. Sriamornsak, P. and R.A. Kennedy, *Development of polysaccharide gel-coated pellets for oral administration. 2. Calcium alginate*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **29**(2): p. 139-147.
10. Hiorth, M., et al., *Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **308**(1-2): p. 25-32.
11. Gaserod, O., A. Sannes, and G. Skjak-Braek, *Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability*. Biomaterials, 1999. **20**(8): p. 773-783.
12. Macleod, G.S., et al., *Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropyl methylcellulose film coated tablets*. International journal of pharmaceutics, 1999. **187**(2): p. 251-257.
13. Bourgeois, S., R. Harvey, and E. Fattal, *Polymer colon drug delivery systems and their application to peptides, proteins, and nucleic acids*. American journal of drug delivery, 2005. **3**(3): p. 171-204.

14. Bai, J.P.F., *Colonic delivery of peptide and protein drugs: Consideration of intracellular proteolytic enzymes*. S. T P. Pharma sciences, 1995. **5**(1): p. 30-35.
15. MRSNY, R.J., *The colon as a site for drug delivery*. Journal of Controlled Release, 1992. **22**(1): p. 15-34.
16. Zheng, Y., et al., *Permeability and absorption of leuprolide from various intestinal regions in rabbits and rats*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **185**(1): p. 83-92.
17. Sutton, S.C., et al., *Enhanced bioavailability of cefoxitin using palmitoylcarnitine. II. Use of directly compressed tablet formulations in the rat and dog*. Pharmaceutical Research, 1993. **10**(10): p. 1516-20.
18. Fetih, G., et al., *Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu<sup>1,7</sup>]-eel calcitonin in rats*. Journal of Controlled Release, 2005. **106**(3): p. 287-297.
19. Motlekar, N.A., et al., *Modulation of gastrointestinal permeability of low-molecular-weight heparin by L-arginine: In-vivo and in-vitro evaluation*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006. **58**(5): p. 591-598.
20. Motlekar, N.A., et al., *Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels*. Journal of Drug Targeting, 2005. **13**(10): p. 573-583.
21. Rubinstein, A., *Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1995. **12**(2-3): p. 101-149.
22. Fix, J.A., *Oral controlled release technology for peptides: Status and future prospects*. Journal of pharmaceutical sciences, 1996. **13**(12): p. 1760-1764.
23. Fell, J.T., *Targeting of drugs and delivery systems to specific sites in the gastrointestinal tract*. Journal of Anatomy, 1996. **189**(3): p. 517-519.
24. Rubinstein, A., *Colonic drug delivery*. Drug Discovery Today: Technologies, 2005. **2**(1): p. 33-37.
25. Munjeri, O., J.H. Collett, and J.T. Fell, *Amidated pectin hydrogel beads for colonic drug delivery - An in vitro study*. Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents, 1997. **4**(3): p. 207-211.
26. Muraoka, M., et al., *Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers*. Journal of Controlled Release, 1998. **52**(1-2): p. 119-129.
27. Yang, L., J.S. Chu, and J.A. Fix, *Colon-specific drug delivery: New approaches and in vitro/in vivo evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **235**(1-2): p. 1-15.

28. Leopold, C.S., *Coated dosage forms for colon-specific drug delivery*. Pharmaceutical Science and Technology Today, 1999. **2**(5): p. 197-204.
29. Tang, E.S.K., L.W. Chan, and P.W.S. Heng, *Coating of multiparticulates for sustained release*. American Journal of Drug Delivery, 2005. **3**(1): p. 17-28.
30. Summers, M. and M. Aulton, *Granulation*, in *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, M. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Leicester. p. 364-378.
31. Thoma, K. and I. Ziegler, *Investigations on the influence of the type of extruder for pelletization by extrusion-spheronization. I. Extrusion behavior of formulations*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998. **24**(5): p. 401-411.
32. Trivedi, N.R., et al., *Pharmaceutical approaches to preparing pelletized dosage forms using the extrusion-spheronization process*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2007. **24**(1): p. 1-40.
33. Bodmeier, R., *Tableting of coated pellets*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. **43**(1): p. 1-8.
34. Sande, S.A., *Pectin-based oral drug delivery to the colon*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2005. **2**(3): p. 441-450.
35. Ali Asghar, L.F. and S. Chandran, *Multiparticulate formulation approach to colon specific drug delivery: Current perspectives*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2006. **9**(3): p. 327-338.
36. Bardonnnet, P.L., et al., *Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of Helicobacter pylori*. Journal of Controlled Release, 2006. **111**(1-2): p. 1-18.
37. Sugito, K., et al., *Gastrointestinal transit of non-disintegrating solid formulations in humans*. International Journal of Pharmaceutics, 1990. **60**(2): p. 89-97.
38. Adkin, D.A., et al., *Colonic transit of different sized tablets in healthy subjects*. Journal of Controlled Release, 1993. **23**(2): p. 147-156.
39. Hebden, J.M., et al., *Night-time quiescence and morning activation in the human colon: Effect on transit of dispersed and large single unit formulations*. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1999. **11**(12): p. 1379-1385.
40. Ghebre-Sellassie, I., *Pellets: A general overview*, in *Pharmaceutical Pelletization Technology*, M. Dekker, Editor. 1989, Informa Healthcare: New York. p. 1-13.
41. Hogan, J., *Coating of tablets and multiparticulates*, in *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, M. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Leicester. p. 441-448.



42. Waterman, K.C. and M.B. Fergione, *Press-coating of immediate release powders onto coated controlled release tablets with adhesives*. Journal of Controlled Release, 2003. **89**(3): p. 387-395.
43. Sriamornsak, P., et al., *Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate*. Journal of Controlled Release, 1997. **47**(3): p. 221-232.
44. Sinha, V.R., et al., *Polysaccharides in colon-specific drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **224**(1-2): p. 19-38.
45. Zentner, G.M., J.R. Cardinal, and S.W. Kim, *Progestin permeation through polymer membranes II: diffusion studies on hydrogel membranes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1978. **67**(10): p. 1352-1355.
46. Ofori-Kwakye, K. and J.T. Fell, *Biphasic drug release from film-coated tablets*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **220**(2): p. 431-440.
47. Macleod, G.S., J.H. Collett, and J.T. Fell, *The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release*. Journal of Controlled Release, 1999a. **58**(3): p. 303-310.
48. Banker, G.S., *Film coating theory and practice*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1966. **55**(1): p. 81-89.
49. Ramesh, H.P.F. and R.N. Tharanathan, *Carbohydrates--the renewable raw materials of high biotechnological value*. Critical Reviews in Biotechnology, 2003. **23**(2): p. 149-73.
50. Sriamornsak, P., *Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **8**(3): p. 221-227.
51. Jain, A., Y. Gupta, and S.K. Jain, *Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences, 2007. **10**(1): p. 86-128.
52. Daas, P.J., et al., *Nonesterified galacturonic acid sequence homology of pectins*. Biopolymers, 2001. **58**(1): p. 1-8.
53. Vandamme, T.F., et al., *The use of polysaccharides to target drugs to the colon*. Carbohydrate Polymers, 2002. **48**(3): p. 219-231.
54. Sakai, T., et al., *Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications*. Advances in Applied Microbiology, 1993. **39**: p. 213-294.
55. Oakenfull, D.G., *The chemistry of high-methoxyl pectins*, in *The chemistry and technology of pectin*, R.H. Walter, Editor. 1991, Academic Press, Inc: San Diego, California. p. 87-108.

56. George, M. and T.E. Abraham, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 1-14.
57. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromolecular Bioscience, 2006. **6**(8): p. 623-33.
58. Gu, F., B. Amsden, and R.J. Neufeld, *Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads*. Journal of Controlled Release, 2004. **96**(3): p. 463-472.
59. Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek, *Alginate as immobilization matrix for cells*. Trends in Biotechnology, 1990. **8**(3): p. 71-78.
60. Donati, I., et al., *New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels*. Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 1031-40.
61. Chang, H.S., et al., *Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1985. **74**(4): p. 399-405.
62. Chickering, D.E. and E. Mathiowitz, *Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa*. Journal of Controlled Release, 1995. **34**(3): p. 251-261.
63. Kurita, K., *Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans*. Marine Biotechnology, 2006. **8**(3): p. 203-26.
64. Hejazi, R. and M. Amiji, *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2003. **89**(2): p. 151-165.
65. Bhise, K.S., et al., *Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling, erosion, and drug release from chitosan matrices*. AAPS PharmSciTech, 2007. **8**(2): p. Article 44.
66. Muzzarelli, R., et al., *Biological activity of chitosan. Ultrastructural study*. Biomaterials, 1988. **9**(3): p. 247-252.
67. Illum, L., N.F. Farraj, and S.S. Davis, *Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs*. Pharmaceutical Research, 1994. **11**(8): p. 1186-1189.
68. Kotze, A.F., et al., *Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: In vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **159**(2): p. 243-253.
69. Mitrevej, A., et al., *Multiunit controlled-release diclofenac sodium capsules using complex of chitosan with sodium alginate or pectin*. Pharmaceutical Development and Technology, 2001. **6**(3): p. 385-392.

70. Thakur, B.R., R.K. Singh, and A.K. Handa, *Chemistry and uses of pectin--a review*. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1997. **37**(1): p. 47-73.
71. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*. FEBS Letters, 1973. **32**: p. 195-198.
72. Braccini, I. and S. Perez, *Molecular basis of C(2+)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited*. Biomacromolecules, 2001. **2**(4): p. 1089-96.
73. Braccini, I., R.P. Grasso, and S. Perez, *Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation*. Carbohydrate Research, 1999. **317**(1-4): p. 119-30.
74. Dheu-Andries, M.L. and S. Pérez, *Geometrical features of calcium—carbohydrate interactions*. Carbohydrate Research, 1983. **124**(3-4): p. 315-324.
75. Sriamornsak, P., M.A. Burton, and R.A. Kennedy, *Development of polysaccharide gel coated pellets for oral administration. 1. Physico-mechanical properties*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **326**(1-2): p. 80-88.
76. Dupuis, G., et al., *Colonic drug delivery: influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type*. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2006. **32**(7): p. 847-55.
77. Gaserod, O., O. Smidsrod, and G. Skjak-Braek, *Microcapsules of alginate-chitosan--I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan*. Biomaterials, 1998. **19**(20): p. 1815-1825.
78. Marudova, M., A.J. MacDougall, and S.G. Ring, *Pectin-chitosan interactions and gel formation*. Carbohydrate Research, 2004. **339**(11): p. 1933-9.
79. Esbensen, K., et al., *Multivariate modeling - multivariate regression*, in *Multivariate analysis - in practice*. 1998, CAMO ASA: Oslo. p. 75-100.
80. Coffman, R.E. and D.O. Kildsig, *Effect of nicotinamide and urea on the solubility of riboflavin in various solvents*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. **85**(9): p. 951-4.
81. Tho, I., S.A. Sande, and P. Kleinebudde, *Disintegrating pellets from a water-insoluble pectin derivative produced by extrusion/spheronization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **56**(3): p. 371-380.
82. Hiorth, M., I. Tho, and S.A. Sande, *The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method*. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2003. **56**(2): p. 175-182.

83. Levy, M.C. and F. Edwards-Levy, *Coating alginate beads with cross-linked biopolymers: A novel method based on a transacylation reaction*. Journal of Microencapsulation, 1996. **13**(2): p. 169-183.
84. Pasparakis, G. and N. Bouropoulos, *Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **323**(1-2): p. 34-42.
85. Thommes, M. and P. Kleinebudde, *Use of kappa-carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronisation. I. Influence of type and fraction of filler*. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2006. **63**(1): p. 59-67.
86. Santos, H., et al., *Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion-spheronisation: influence of formulation variables*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **246**(1-2): p. 153-69.
87. Kleinebudde, P., et al., *Importance of the fraction of microcrystalline cellulose and spheronization speed on the properties of extruded pellets made from binary mixtures*. Pharmaceutical Development & Technology, 1999. **4**(3): p. 397-404.
88. Alderborn, G., *Tablets and compaction*, in *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, M. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Leicester. p. 397-439.
89. Heikkila, J., *A multivariate evaluation of the immersion coating and drug release from pellets coated with calcium pectinate and calcium pectinate in combination with chitosan*. 2002, University of Oslo: Oslo.
90. Ouwerx, C., et al., *Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations*. Polymer Gels and Networks, 1998. **6**(5): p. 393-408.
91. Sriamornsak, P. and R.A. Kennedy, *Development of polysaccharide gel-coated pellets for oral administration: Swelling and release behavior of calcium pectinate gel*. AAPS PharmSciTech, 2007. **8**(3): p. Article 79.
92. Takka, S. and F. Acarturk, *Calcium alginate microparticles for oral administration: I: Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency*. Journal of Microencapsulation, 1999. **16**(3): p. 275-90.
93. Korsmeyer, R.W., et al., *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 1983. **15**: p. 25-35.
94. Peppas, N. and J. Sahlin, *A simple equation for description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation*. International Journal of Pharmaceutics, 1989. **57**: p. 169-172.
95. Yasuda, H. and C.E. Lamaze, *Permselectivity of solutes in homogeneous water-swollen polymer membranes*. Journal of Macromolecular Science, Part B, 1971. **5**(1): p. 111 - 134.

96. Bhopatkar, D., A. Anal, and W. Stevens, *Ionotropic alginate beads for controlled intestinal protein delivery: effect of chitosan and barium counter-ions on entrapment and release*. Journal of Microencapsulation, 2005. **22**(1): p. 91-100.
97. Sezer, A. and J. Akbuga, *Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads*. Journal of Microencapsulation, 1999. **16**(2): p. 195-203.
98. Shu, X.Z., K.J. Zhu, and W. Song, *Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **212**(1): p. 19-28.

## Vedlegg

Vedlegg 1: Matrise over faktorene som ble variert i forsøkene, med resultater

Vedlegg 2: "SOP for determination of hardness and tensile strength of pellets"

Vedlegg 3: PLS1 analysene i kronologisk rekkefølge

## Vedlegg 1

	Poly	Poly-kons	Pellet	Motion	Mot-kons	4 timer	buffer %	syre %	coat buffer	coat syre
10alg0,1	Alginat		10	kitosan	0,1	26,41	3,20	7,28	3,99	1,80
10alg5	Alginat		10	CaCl		29,21				
102pek0.1	Pektin	2	10	kitosan	0,1	34,28	12,68	21,62	4,70	1,69
102pek5	Pektin	2	10	CaCl		40,21				
102pek1	Pektin	2	10	kitosan	1	35,17				
101pek0.1	Pektin	1	10	kitosan	0,1	33,00	17,30	17,31	4,77	1,56
101pek5	Pektin	1	10	CaCl		42,68				
101pek1	Pektin	1	10	kitosan	1	34,61				
1010alg0,1	Alginat		10+10	kitosan	0,1	47,17	10,66	37,65	3,19	1,61
1010alg5	Alginat		10+10	CaCl		47,18	21,63	51,04	3,34	1,33
10101pek0.1	Pektin	1	10+10	kitosan	0,1	55,36	1,99	62,00	4,10	2,37
10101pek5	Pektin	1	10+10	CaCl		69,90				
10102pek5	Pektin	2	10+10	CaCl		62,31				
10101pek1	Pektin	1	10+10	kitosan	1	73,63				
10102pek0.1	Pektin	2	10+10	kitosan	0,1	65,12				
10102pek1	Pektin	2	10+10	kitosan	1	71,53				

## Forklaringer:

Tabelltekst	Forklaring
Poly	Polymertype
Polykons	polymerkonsentrasjon
Pellet	Pellettype
Motion	type motion
Mot-kons	kitosans konsentrasjon som motion
4 timer	Resultatene ble målt etter 4 timer
buffer %	kjernens svelling i buffer
syre %	kjernens svelling i syre
coat buffer	coatinglagets svelling i buffer (i mm <sup>2</sup> )
coat syre	coatinglagets svelling i syre (i mm <sup>2</sup> )

## Vedlegg 2

I. Tho, July 2002

# SOP for determination of hardness and tensile strength of pellets

**Product:** Pellets (spherical particles, aspect ratio < 1.2)

**Accessory:** 7 mm cylinder probe (from the work shop)

**Get started:** Calibrate the force by selecting T.A and CALffIRATE FORCE from the menu and follow the instructions.

Open a new PROJECT (and name it). Open a new GRAPH WINDOW and set the TA-SETTINGS as listed below. Selecting the RUN A TEST or QUICK TEST RUN runs a test.

### TA-XT2 Settings:

Mode:	Measure Force in Compression
Option:	Return To Start
Pre- Test Speed:	1.0 mm/s
Test Speed:	0.5 mm/s
Post-Test Speed:	1.0 mm/s
Strain:	50%
Trigger Type:	Auto - 0.05 N
Data Acquisition Rate:	200pps
Units:	Force: Newton                      Distance: % Strain

### Probe Calibration:

Before carrying out compression tests in strain one must calibrate the probe to acknowledge the bed surface. Lower the probe, so that it is close to the bed surface. Click on T.A. (in the menu bar) then CALffIRA



TE PROBE and specify the distance that you want the probe to return to after sample compression for each test - e.g. 5 mm is suitable.

**Sample Preparation:**

The hardness is dependent on the size, the shape and the moisture content. The pellets are therefore conditioned at 22.5 % relative humidity (in a container above a saturated solution of calcium acetate) prior to testing.

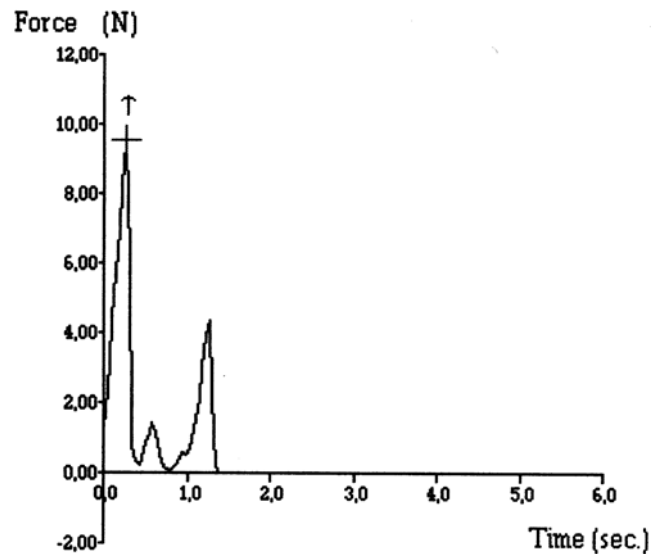
Pellets are spread out on a glass plate, placed in the gap between the plate and the probe, one at the time, and crushed in separate tests.

**Test Set-Up:** The probe is moved with a speed of 1mm/s down on the pellet. The pellet height (d) is determined as a trigger force of 0.05 N. Following this, the strain is 50 % of the pellet height while measuring the force as the crushing strength (cs). The tensile strength (ts) can be calculated for each individual pellet according to the equation:

$$ts = (4 * cs) / (1t * d^2)$$

Due to large variations, at least 50 pellets should be measured individually.

### Typical Texture Expert™ plots:



### Observations:

Once the trigger force is attained the graph proceeds to plot the effect on the pellet under compression. The first peak force is taken as the crushing strength of the pellets. This is determined by the use of a macro (see below).

**Macro:** Macros can be created by selecting new MACRO DEFINITION WINDOW. Select the following functions:

*Clear Graph Results*

*Redraw*

*Go to Min. time*

*Search Forwards*

*Drop Anchor 1*

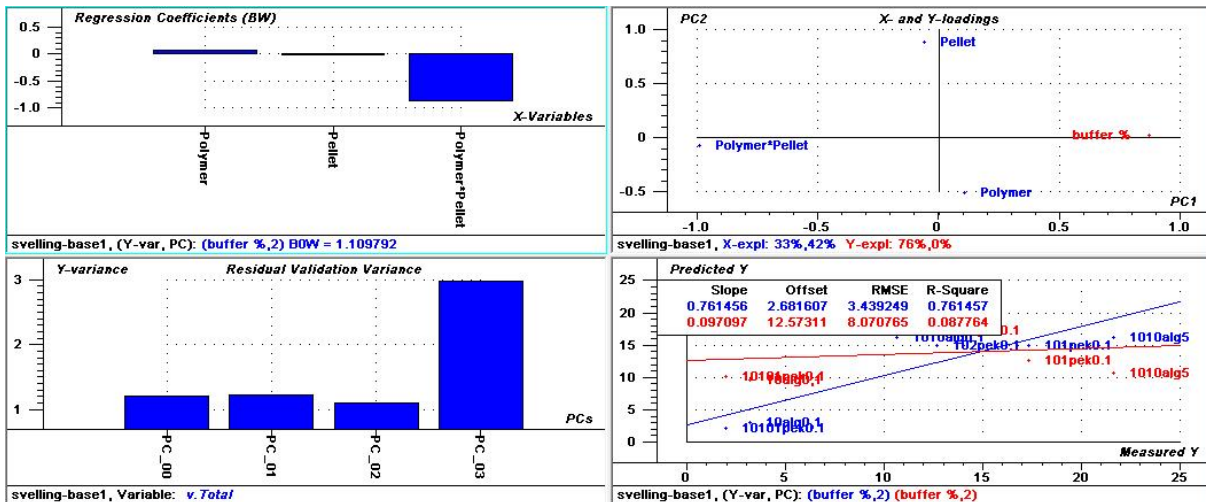
*Peak Force +*

*Drop Anchor 2*

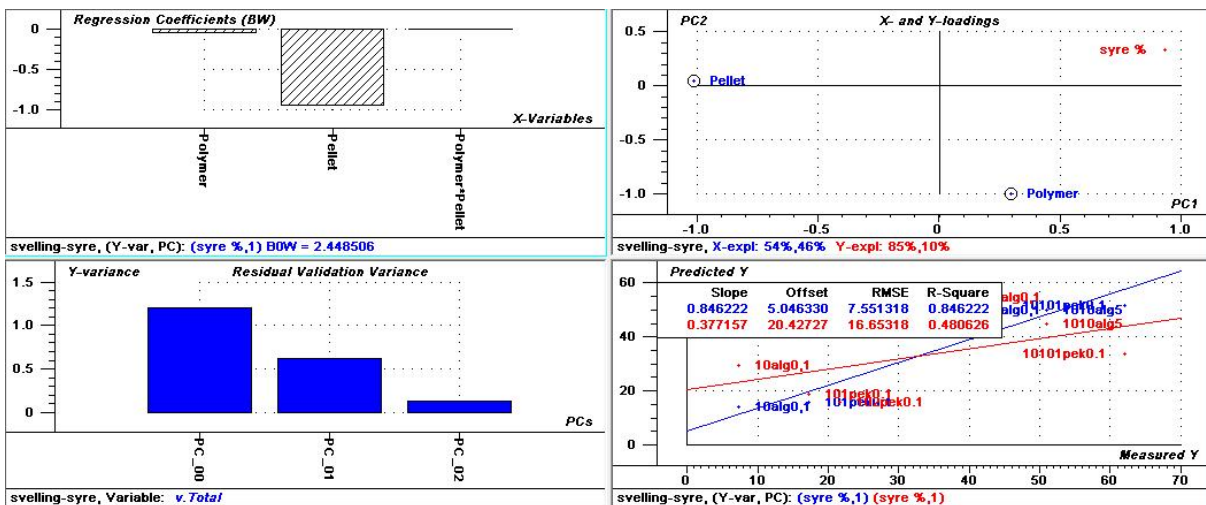
*Mark Force*

**Note:** Sometimes the pellets are not crushed, only deformed (mostly seen with MCCC pellets). If this is the case the force will increase continuously through the whole test and there will not be a first peak. For this particular pellet it is not possible to determine a crushing strength. Testing of more than 50 pellets is then required.

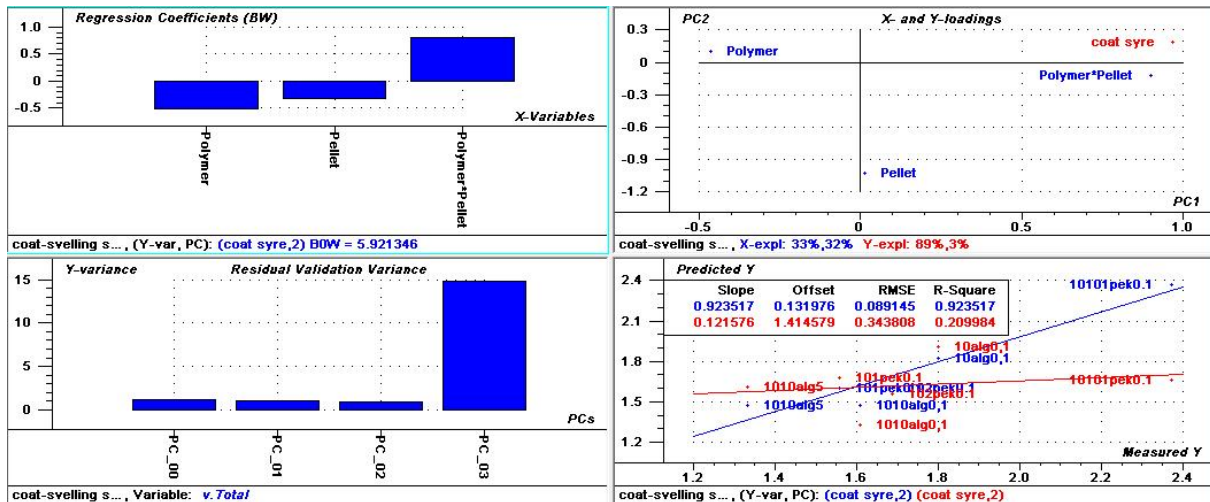
### Vedlegg 3



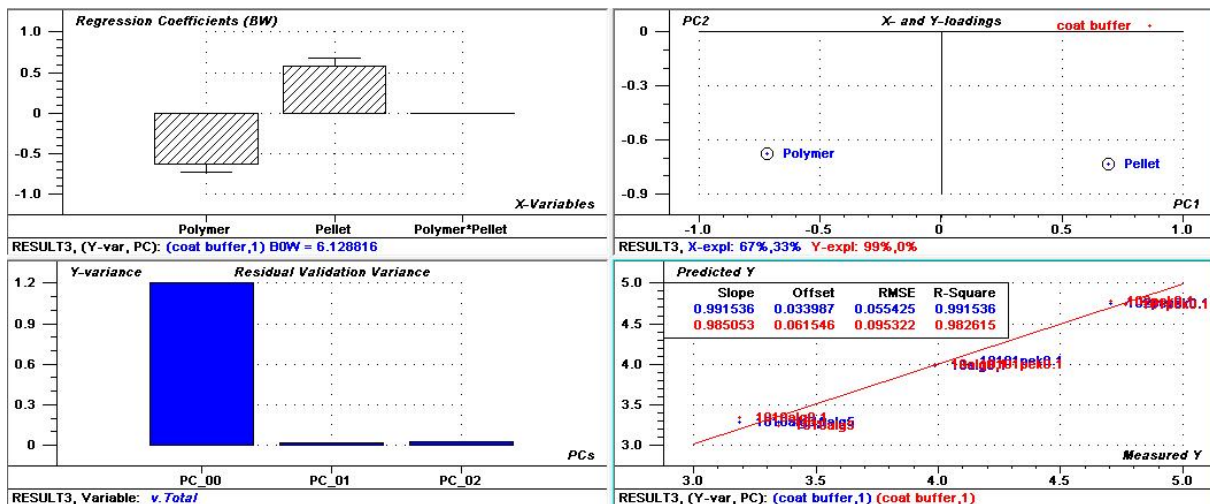
PLS1 analyse av pelletskjernenes svellingsgrad etter 1 time i fosfatbuffer pH 6,8 som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



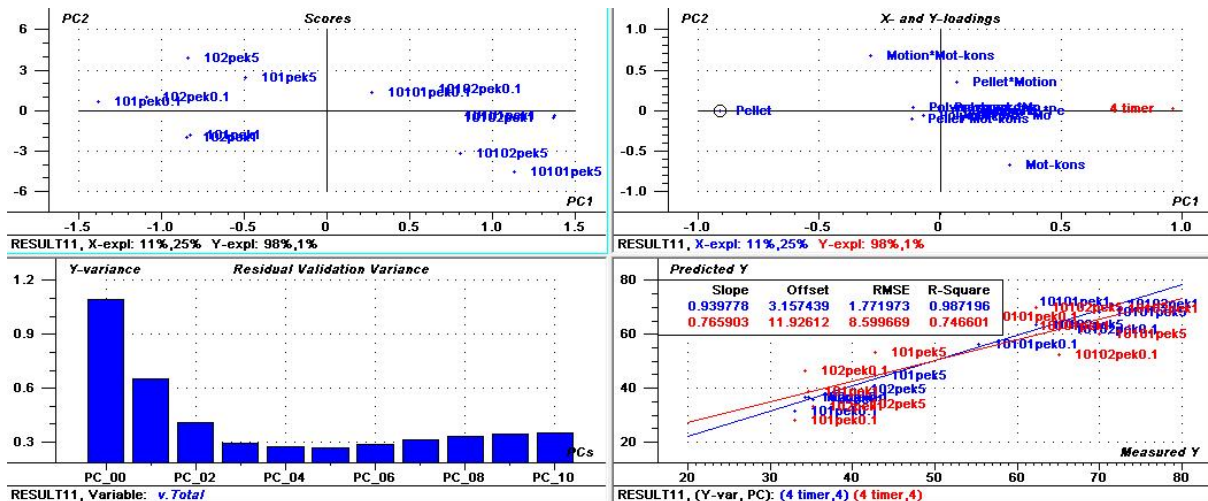
PLS1 analyse av pelletskjernenes svellingsgrad etter 1 time i syre som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



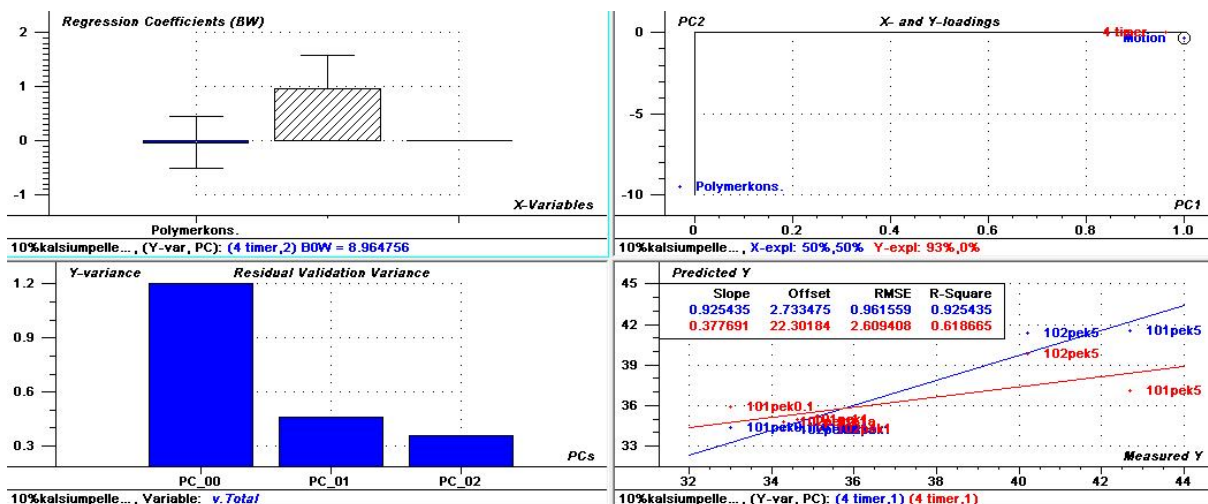
PLS1 analyse av coatinglagets svellingsgrad etter 1 time i syre som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



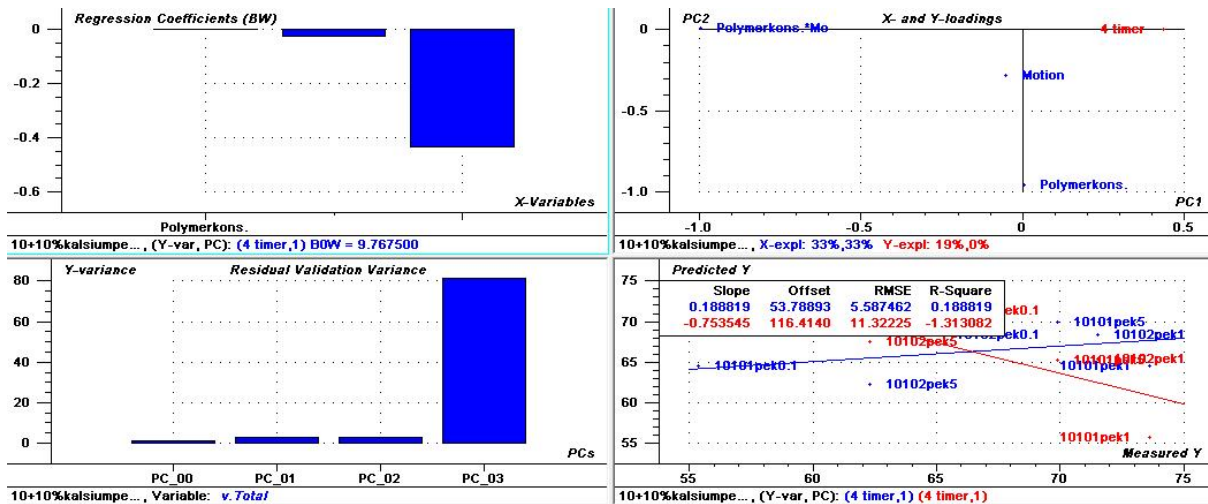
PLS1 analyse av coatinglagets svellingsgrad etter 1 time i fosfatbuffer pH 6,8 som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



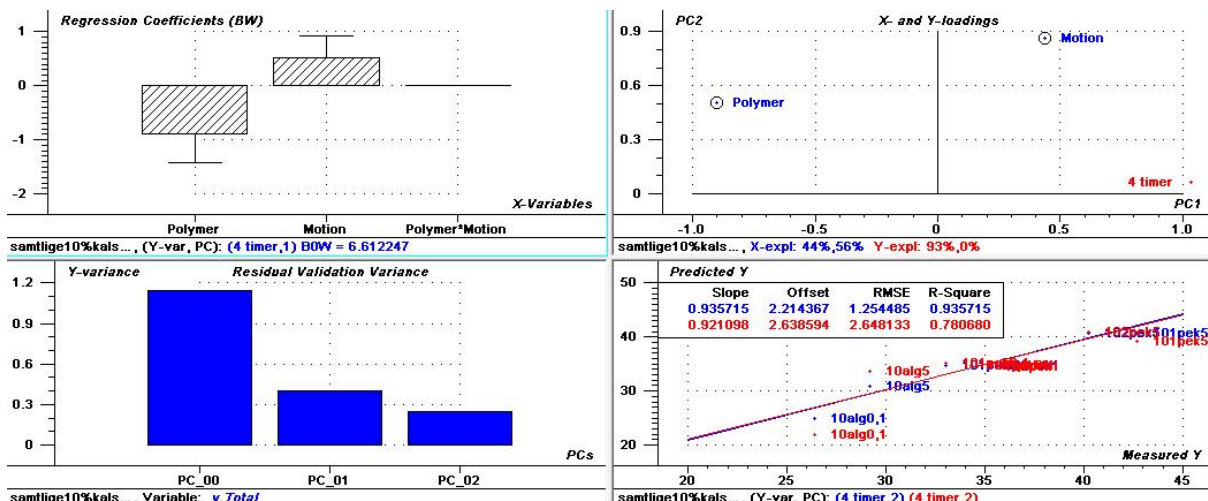
PLS1 analyse av samtlige pellets med pektincoating, med frisetting etter 4 timer i standard betingelser som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



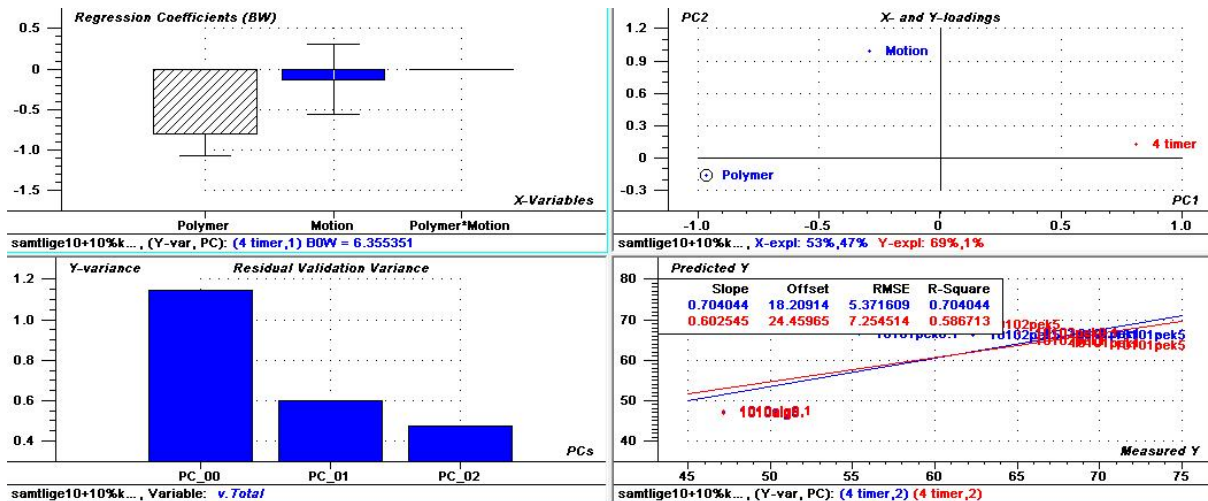
PLS1 analyse av pellets med 10 % kalsium i kjernen coatet med pektin, med frisetting etter 4 timer i standard betingelser som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



PLS1 analyse av pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen coatet med pektin, med frisetting etter 4 timer i standard betingelser som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



PLS1 analyse av samtlige coatede pellets med 10 % kalsium i kjernen, med frisetting etter 4 timer i standard betingelser som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.



PLS1 analyse av samtlige coatede pellets med 10 % kalsium + 10 % kitosan i kjernen, med frisetting etter 4 timer i standard betingelser som respons, med regresjonskoeffisient plott, loadingplot, forklart varians-plott og predikert mot målt Y plott.