

Kontrollert frisetting fra mucoadhesive pektin-kitosan kombinasjonsfilmer

Mastergradsoppgave i galenisk farmasi

Åse Storfjell-Olven



Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

våren 2009

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden mars 2008 til mai 2009.

En stor takk går først og fremst til min veileder Sverre Arne Sande for god hjelp gjennom hele hovedfaget.

En stor takk også til medveileder Ellen Hagesæther for praktiske tips og gode råd i oppstarten av hovedfaget.

En spesielt stor takk til avdelingsingeniør Helge Gundersen og avdelingsingeniør Tove Larsen for utrettelig hjelp med alt på laboratoriet. Og for alltid å ha tid til å hjelpe.

Jeg vil også takke mannen min Thomas, for all hjelp og støtte. Takk for at du alltid er der for meg!

En stor takk går også til mine foreldre for oppmuntring og støtte gjennom hele studietiden.

Til slutt vil jeg takke alle jentene på lesesalen for en flott tid og godt samarbeid.

Blindern, mai 2009

Åse Storfjell-Olven

Sammendrag

I denne oppgaven ble frie pektin-kitosan kombinasjonsfilmer laget ved støping. Filmene bestod av 25 % pektin og 75 % kitosan. Dette forholdet mellom pektin og kitosan er tidligere vist å være det forholdet som ga best mucoadhesjon. Det ble laget blanke filmer (bestående av bare pektin og kitosan) og filmer med inkorporert modellsubstans. Tre modellsubstanser ble utvalgt; paracetamol (uladet), lidokain (positivt ladet) og ibuprofen (negativt ladet). Effekten ladningen til de inkorporerte modellsubstanser hadde på pektin-kitosan kombinasjonsfilmene ble studert med frisettingsstudier, undersøkelse av mekaniske egenskaper, mucoadhesjonsmålinger og termal analyse. Frisettings og mucoadhesjon målingene ble foretatt i et miljø som etterlignet forholdene i tynntarmen best mulig.

Filmenes mekaniske egenskaper viste seg ikke å ha betydning for oppnåelse av god mucoadhesjon eller kontrollert frisetting. Ibuprofen utviste en markant lavere frisettingshastighet ut av pektin-kitosan kombinasjonsfilmen sammenlignet med de andre modellsubstansene. Ioniske interaksjoner mellom ibuprofen og kitosan ble antatt å være årsaken til denne observasjonen. Det var ingen forskjell i de mucoadhesive egenskapene til de ulike filmtypene støpt i denne oppgaven.

Innhold

FORORD	1
SAMMENDRAG	3
INNHOOLD	5
1. INNLEDNING	7
1.1 BAKGRUNN	7
1.2 MÅLSETTING	7
2. FORKORTELSER.....	9
3. TEORI.....	11
3.1 POLYMERER.....	11
3.2 PEKTIN-KITOSAN KOMBINASJONSFILMER.....	15
3.3 POLYMERKARAKTERISERING.....	16
3.4 MUCOADHESJON I TYNN TARM.....	21
3.5 MODELLSUBSTANSENE.....	26
4. UTSTYR, MATERIALER OG LØSNINGER.....	29
4.1 UTSTYR.....	29
4.2 MATERIALER.....	30
4.3 LØSNINGER	31
5. METODER	33
5.1 METODEUTVIKLING.....	33
5.2 POLYMERKARAKTERISERING.....	43

Innhold

5.3	FILMER.....	46
6.	RESULTATER	59
6.1	METODEUTVIKLING.....	59
6.2	POLYMERKARAKTERISERING.....	67
6.3	FILMER.....	71
7.	DISKUSJON	89
7.1	FORSØKENE.....	89
7.2	FILMSTØPING.....	95
7.3	EFFEKT AV LADNING PÅ FRISETTING	99
7.4	EFFEKT AV LADNING PÅ MUCOADHESJON	103
8.	KONKLUSJON	107
9.	KILDER	109
	VEDLEGG.....	117

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Utgangspunktet for denne oppgaven var resultatene fra E. Hagesæther sin doktoravhandling [1]. I sitt arbeid viste E. Hagesæther at pektin- kitosan kombinasjonsfilmer med 25 % pektin og 75 % kitosan var det forholdet som ga best mucoadhesjon [2]. Denne kombinasjonen svellet mest og man antok dermed at det skyldes en åpen filmstruktur. Denne kombinasjonen ga dermed også en raskere diffusjon av paracetamol gjennom filmen, enn kombinasjoner med høyere pektinninnhold [2, 3]. Type pektin benyttet HM/LM hadde ingen betydning for diffusjonshastigheten [2]. I denne oppgaven ble det derfor valgt å støpe frie filmer bestående av 25 % HM-pektin og 75 % kitosan.

Fysiologisk pH i tynntarmen varierer fra 5-7,5 fra duodenum til ileum [4]. I denne oppgaven er derfor frisettingshastigheten testet ved pH 6,8. Hvis ikke annet står spesifisert gjelder det samme når det er henvist til frisettingsforsøk beskrevet i litteraturen.

Det er tidligere vist at diffusjon av det negativt ladet virkestoffet erytrocin gjennom pektin-kitosan kombinasjonsfilmer gir en lag-tid. En tilsvarende lag-tid ble ikke observert for paracetamol [3]. Det ble antatt denne lag-tiden skyldtes ioniske interaksjoner mellom negativt ladet virkestoff og positiv ladet kitosan [3].

1.2 Målsetting

Basert på problemet at de pektin-kitosan kombinasjonsfilmene med best mucoadhesjon også var de filmene som ga hurtigst diffusjon av paracetamol gjennom

filmene [2], ble det i denne oppgaven tatt sikte på å bestemme hvordan ladning til modellsubstansene påvirket egenskapene til pektin-kitosan kombinasjonsfilmer. Lagtiden observert for erytrocin [3] gir grunn til å tro at ioniske interaksjoner mellom et negativt ladet virkestoff og positivt ladet kitosan kan utnyttes for å oppnå en kontrollert frisetting.

Hovedmålet med denne oppgaven var å se på hvordan ladning til ulike modellsubstansene inkorporert i pektin-kitosan kombinasjonsfilmer påvirket egenskapene til filmene.

Det langsiktige målet med denne oppgaven er utvikling av et nytt generelt formuleringsprinsipp, hvor en pektin-kitosan hydrokolloidmatriks med inkorporerte ”nanokapsler” med egnet ladning utgjør selve legemiddelformen. Med dette er det ønskelig å oppnå en god mucoadhesjon og kontrollert frisetting. I tillegg vil formuleringen være tilnærmet uavhengig av egenskapene til et virkestoff, da virkestoff kan inkorporeres i ladede ”nanokapsler”.

2. Forkortelser

DM	Metoksyleringsgrad (degree of methylation)
HM	Høy metoksyliert
LM	Lav metoksyliert
RGI	Rhamnogalakturonan I
RGII	Rhamnogalakturonan II
PEC	Poly elektrolytt kompleks
Dda	Deacetyleringsgrad (degree of deacetylation)
DSC	Differential Scanning Calorimeter
rpm	Rotasjoner per minutt
RH	Relativ luftfuktighet (relative humidity)
IQR	Inter kvartil område (inter quartile range)

3. Teori

3.1 Polymerer

Polymerer er stoffer med høy molekylvekt, som består av repeterende enheter av monomere. Egenskapene til en polymer avgjøres av blant annet størrelse (molekylvekt), romlig utforming, kjemisk struktur til monomere og monomernes sammensetning. Sammenlignet med enkle kjemiske forbindelser har en polymer langt flere faktorer som påvirker egenskapene. Karakterisering av polymerer blir dermed viktig for å kunne avgjøre hvilke egenskaper de innehar, og dermed hvilke bruksområder de er velegnet for [5]. Polymerer benyttes i utstrakt grad innen farmasien, blant annet som hjelpestoff i formuleringer [5] og som coatingmateriale [6].

3.1.1 Pektin

Generelt

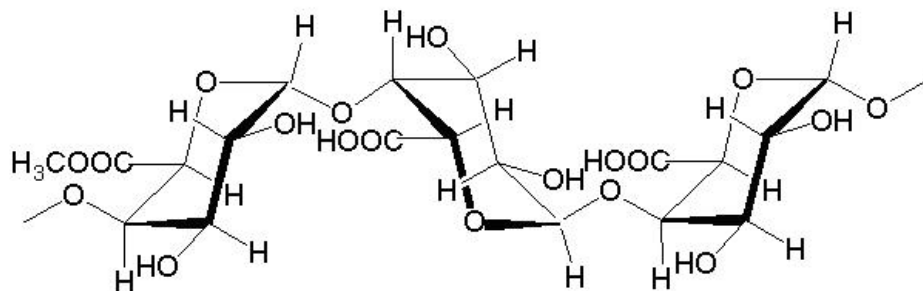
Pektin er et naturlig forekommende anionisk polysakkarid, som finnes i celleveggen til høyere planter [7, 8]. Her er pektin med på å regulere ione og vanntransport, porestørrelsen til cellevegger og er involvert i forsvarsmekanismer planter har mot patogene og ytre påkjenninger [9]. Pektin er også viktig for fasthet og struktur til plantevev. Kommersielt tilgjengelig pektin utvinnes i hovedsak fra eplerester og sitrusfrukter [7]. Pektin brukes i stor grad som fortykningsmiddel og gel danner i matindustrien [7, 10]. Pektin er ikke toksisk og regnes som et sikkert tilsetningsstoff, uten begrensninger på daglig inntak [7, 8]. Pektin har også vist positive helsegevinster i seg selv. Blant effektene som er vist er; kolesterolsenking, antioksidant effekt,

anticancer effekt, stabilisering av blodglukose og som motgift ved forgiftning av toksiske kationer [1, 7, 11].

Struktur

Pektinstrukturen kan grovt deles i to hovedområder:

1. Glatte områder: Består av 1,4 koblede α -D-galakturonsyreenheter av varierende lengde [9, 12]. I tillegg til at lengden på de glatte segmentene kan variere [12] kan galakturonsyreenhetene være substituert i ulik grad [9]. Karboksylsyrergruppene kan være estrifisert med metanol, og posisjon o2 eller o3 kan være estrifisert med acetyl [9]. Både grad av metylestrifisering DM [7, 13, 14] og acetylestrifisering har stor innvirkning på pektins egenskaper [7, 12]. DM benyttes ofte til å klassifisere pektin i to klasser. LM med DM på under 50 % og HM med DM på over 50 % [7].

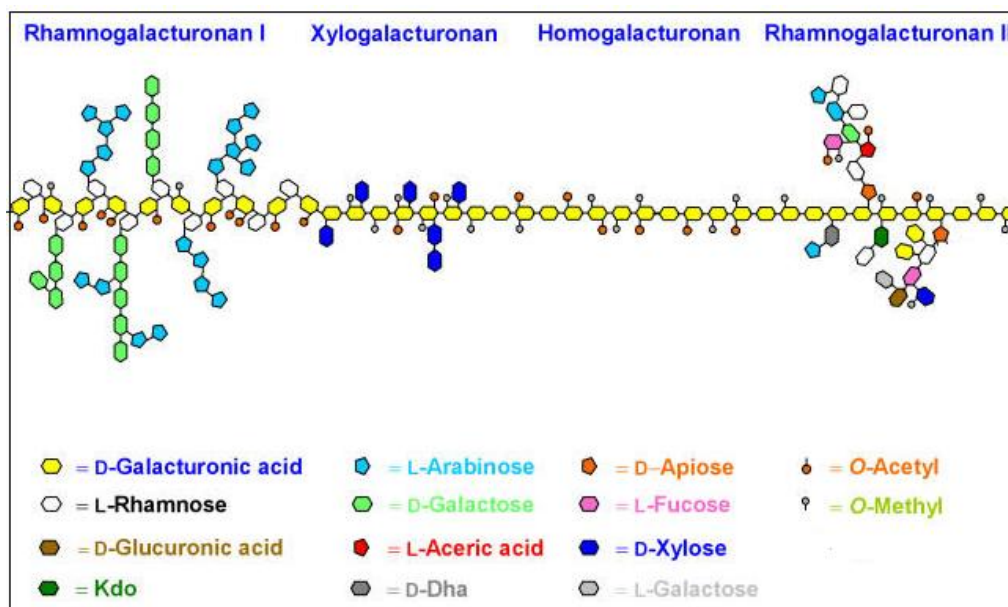


Figur 1 Hovedkomponenten i pektin: α (1 \rightarrow 4) bundet galakturonsyreenheter. Figuren er hentet fra hjemmesiden til Polymer Research Group ved UiO. [15]

2. Hårete områder bestående av to hovedstrukturer.
 - a. Rhamnogalakturonan I (RGI) består av repeterende enheter av alternerende α -(1-2)-koblet rhamnose og α -(1-4)-koblet galakturonsyre [7, 9, 12]. Dette utgjør ryggraden til RGI [9]. Til rhamnose enhetene er det ofte koblet sidekjeder bestående av arabinan, galaktan eller arabinogalaktan [7]. Variasjonen i RGI skapes i hovedsak av sidekjedene, hvor forgrenet de er,

hvilke enheter de består av og bindingsmønster. Sidekjedenes distribusjon, rhamnose: galakturonsyre forhold og grad av acetyl og metylestrifisering gir også opphav til variasjon [9].

- b. Rhamnogalakturonan II (RGII) ryggraden til denne strukturen består av ca 9 α -(1-4)-bundet-galakturonsyreenheter [9], så navnet er noe missledende [12]. Koblet til ryggraden er en rekke komplekse sidekjedener [12], med tilstedeværelsen av sjeldne sukker [9]. Variasjonen i RGII skapes av ryggradens lengde og fordeling/distribusjon av sukker i sidekjedene [9].



Figur 2 Hovedstruktur til pektin. RGI og RGII representerer de hårete områdene, mens området mellom utgjør det glatte området. Figuren er hentet fra Danish Institute of Agricultural Sciences [16].

Strukturen til pektin er svært kompleks, og en fullstendig struktur forståelse foreligger fremdeles ikke [17].

Pektin og mucoadhesjon

Pektin ble før generelt betraktet som en dårlig mucoadhesiv polymer. I senere tid er det imidlertid vist at å beskrive pektin generelt som et dårlig mucoadhesivt middel er

en noe upresis definisjon [18]. Pektin beskrives i dag som en polymer med generelle mucoadhesive egenskaper [10, 19]. Pektins mucoadhesive egenskaper er avhengig av substitueringsgrad og molekylvekt [10]. Det er vist at pektin med DM rundt 35 % interagerer spesifikt med mucin, og at en reduserende grad av substituering på pektin gir økt interaksjon mellom pektin og mucin. Dette indikerer at frie karboksylsyregrupper på pektin gir et viktig bidrag til pektins mucoadhesive egenskaper [18].

3.1.2 Kitosan

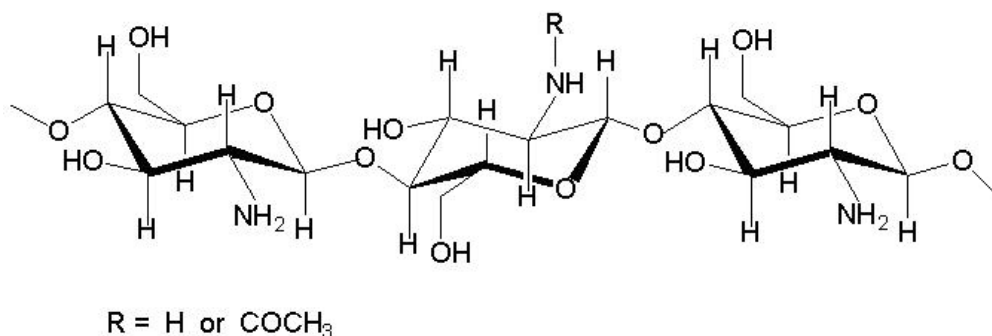
Generelt

Kitosan utvinnes fra kitin, i hovedsak ved alkalisk (eller enzymatisk [20]) deacetylering [21]. Kitin er et av naturens hyppigst forekommende polysakkarider, bare cellulose er mer vanlig [21-24]. Kommersielt tilgjengelig kitosan utvinnes i hovedsak fra reke, hummer og krabbeskall [8, 21, 25]. Kitosan har flere gunstige egenskaper: ikke toksisk, biokompatibel, biodegraderbar og bioadhesiv [19, 21, 22, 26]. I tillegg har kitosan vist ulike farmakologiske egenskaper: kolesterolsenkende, sår helende, bakteriostatisk [26] og antiulcer aktivitet [21]. I dag brukes kitosan i blant annet kosmetiske formuleringer, lavkalori dietter og i utstrakt grad innen farmasien [26-28].

Struktur

Kitosan er en lineær [8], kationisk kopolymer [13, 22] bestående av (1→4)-2-amino-2-deoksy-β-D-glukan og (1→4)-2-acetamino-2-deoksy-β-D-glukan [26, 27, 29]. Dda reflekterer balansen mellom disse [29], og benyttes til å klassifisere kitosan [8].

Molekylvekt og hvordan de repeterende enhetene er fordelt innad i polymeren er sammen med Dda avgjørende for kitosan sine egenskaper [24, 29]. Kitosan er løselig i surt miljø, og ved pH 4,5 og nedover er kitosan fullstendig protonert [27].



Figur 3 Kitosan struktur, de to repeterende enhetene (1→4)-2-amino-2-deoksy-β-D-glukan og (1→4)-2-acetamino-2-deoksy-β-D-glukan vises. Figuren er hentet fra hjemmesiden til The Polymer Research Group ved UiO [30].

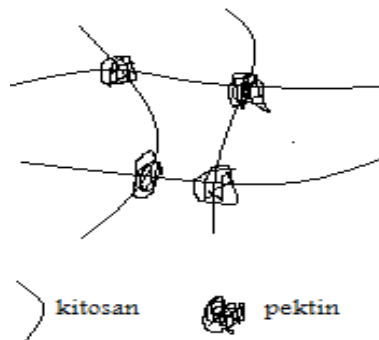
Kitosan og mucoadhesjon

Kitosan er betraktet som en mucoadhesiv polymer [2, 19, 21, 22, 26, 31], og har vist gode mucoadhesive egenskaper in vitro [32, 33]. Det er vist at mucoadhesjon til svellet kitosan opprettholdes ved repetert kontakt mellom kitosan og substratet [32], noe som indikerer at det i tillegg til adhesjon på grunn av hydrering også er andre krefter som er viktige for adhesjon [24, 34]. De mucoadhesive egenskapene til kitosan er pH avhengige [28]. Kitosan har en pKa på rundt 6,5-7 [35], og er uløselig ved nøytral og basisk pH, som det er i store deler av tynntarm og tykktarm [28, 34]. Hydrogenbindinger er viktige ved nøytral og basisk pH, mens ved lav pH vil ioniske bindinger mellom de positivt ladede amingruppene og de negativt ladede sialinsyre gruppene på mucin være viktige [24, 28, 34]. Molekylvekten til kommersielt tilgjengelig kitosan ligger vanligvis mellom 10-1000kDa [24]. Økt molekylvekt på kitosan er vist å gi økt mucoadhesjon [32].

3.2 Pektin-kitosan kombinasjonsfilmer

Rask frisetting ved bruk av kitosan eller pektin alene som mucoadhesive formuleringer er en utfordring, og bruk av pektin-kitosan kombinasjoner benyttes ofte isteden [2]. I pH området mellom 3 og 7 vil både pektin (polyanion) og kitosan

(polykation) være ladet. Elektrostatiske interaksjoner mellom polymerene vil dermed finne sted, og et poly elektrolytt kompleks (PEC) vil dannes [3, 13, 36]. Det er de negativt ladede karboksylsyregruppene til pektin og de positivt ladede aminogruppene til kitosan som ionisk interagerer. Ved lavere pH verdier (under 2) vil pektin være uladet og effekten av elektrostatiske interaksjoner blir mindre [3]. Assosiasjon mellom pektin og kitosan vil da sannsynligvis finne sted ved hjelp av hydrogenbindinger [37]. Kitosan har en pKa verdi mellom 6,5-7 [35], og vil ved pH 6,8 være positivt ladet. Pektin med en pKa på 2,9-3,3 [35] vil være negativt ladet. Ioniske interaksjoner mellom kitosan og pektin kan dermed finne sted ved pH 6,8 [3]. Ulike forhold mellom de to polymerene vil gi ulike egenskaper til blandingen [2]. Det er foreslått at pektin fungerer som en kryssbinder i pektin-kitosan systemet [23, 35] som illustrert i Figur 4.



Figur 4 Skisse av hvordan pektin og kitosan er foreslått å assosiere med hverandre ved pH 6,8 [23, 35].

3.3 Polymerkarakterisering

3.3.1 Molekylvektbestemmelse

Molekylvekten til en polymer er en fundamental karakteristikk, som er viktig for polymerens egenskaper. Polymerer har en polydispers molekylvekt. Det vil si hver

polymer har et ulikt antall monomere, som gir en molekylvektfordeling [38]. Tre måter å bestemme molekylvekten til en polymer på er godt kjent:

1. Nummer gjennomsnittsmolekylvekt M_n korresponderer til mål på polymer kjedelengde. M_n kan måles med teknikker som "teller" molekyler, f.eks. membranometri.
2. Vekt gjennomsnittsmolekylvekt M_w korresponderer til mål av størrelsen på polymerkjeden og kan måles med blant annet lys spredning.
3. Viskositets gjennomsnittsmolekylvekt M_v finnes ved viskositetsmålinger. [38]

I en molekylvektfordeling til et heterogent molekylvekt system vil $M_n < M_v < M_w$. Forholdet M_w / M_n uttrykker polydispersiteten til en polymer, og sier noe om hvilket område molekylvektfordelingen sprer seg over [5, 38].

Viskosimetri

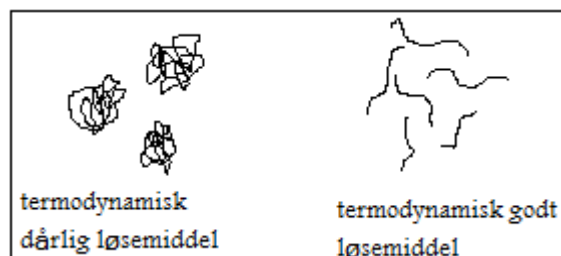
Viskositeten til en polymerløsning er direkte relatert til den relative størrelsen og formen til polymermolekylene i det aktuelle løsemiddelet. Viskosimetri er en av de mest brukte metodene til molekylvektbestemmelse. Metoden er enkel, og krever lite utstyr [38]. Metoden baserer seg på å måle den relative viskositeten (η_r), og polymerkonsentrasjonen til en serie fortynnede polymerløsninger. Disse målingene gjøres med et kapillær som holder en konstant temperatur, gjerne ved hjelp av vannbad, og kan bare benyttes til væsker med newtons flyt (fortynnede polymerløsninger utviser tilnærmet newtonsk flyt) [38]. Tiden polymerløsningen bruker på å passere mellom to punkter under påvirkning av bare tyngdekraften benyttes til videre beregninger [5].

Definisjoner og formler

Relativ viskositet til en polymer er forholdet mellom viskositeten til polymerløsningen og rent løsemiddel ($\eta_{rel} = \eta / \eta_s$). Fra dette beregnes den spesifikke viskositeten ($\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s$) til polymeren. η_{sp} beskriver hvor mye viskositeten til en

løsnings øker ved tilsats av en polymer. Både η_{rel} og η_{sp} er avhengig av polymerkonsentrasjonen. Det er imidlertid ikke egenviskositeten (η) til en polymer. Egenviskositeten finnes ved å dele den spesifikke viskositeten på polymerkonsentrasjonen og ekstrapolere til en konsentrasjon lik null: $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$

[38]. Egenviskositeten er et mål på en polymers evne til å øke viskositeten i en løsning. Det vil si at når polymerkonsentrasjonen går mot null er den reduserte viskositeten tilnærmet lik egenviskositeten [39]. Når den reduserte viskositeten plottes mot polymerkonsentrasjon kan den tilnærmede lineære regresjonslinjen beskrives av Huggins ligning: $\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2 c$, hvor k' er Hugginskonstanten. Skjæringspunktet til den rette linjen er $[\eta]$ og stigningstallet er $k'[\eta]^2$. Hugginskonstanten benyttes til å si noe om hvordan en polymer oppfører seg i et løsemiddel og dermed hvor godt løsemiddelet er for den aktuelle polymeren [39]. I et termodynamisk godt løsemiddel vil polymere være utstrakte, mens i et dårlig løsemiddel vil polymerkjedene være sammenkveilede og kan aggregere (Figur 5) [5].



Figur 5 Skisse av hvordan en polymer vil oppføre seg i et termodynamisk dårlig og et termodynamisk godt løsemiddel.

Egenviskositeten til en polymer i et bestemt løsemiddel kan relateres til M_v ved hjelp av Mark-Houwink ligningen: $[\eta] = kM_v^a$ hvor k og a er empiriske konstanter som varierer med polymer, løsemiddel og temperatur egenviskositetsmålingene er utført ved [38].

3.3.2 Mekaniske egenskaper

Avhengig av hvilket formål de frie filmene er tiltenkt, vil ulike mekaniske egenskaper være ønskelige [6, 40]. De mekaniske egenskapene til en film vil endres etter fukting [40]. Vann fra fuktemediet kan virke som mykgjører i filmen, eller filmkomponenter kan også lekke ut i mediet [40]. Testing av mekaniske egenskaper ved ulike fuktebetingelser er derfor gunstig. I denne oppgaven ble to ulike metoder for å kontrollere mekaniske egenskaper ble benyttet; tensile-test og puncture-test.

Tensile-test

I denne metoden blir en kraft (N) mot avstand (mm) kurve tatt opp. Denne kurven kan benyttes til å si noe om filmens evne til å motstå deformering når en kraft pålegges. Samt til å si noe om elastisiteten til filmen, det vil si hvor mye den strekker seg før den ryker, når en kraft pålegges[1]. Filmens evne til å motstå deformering kan også benyttes som et mål på kohesiviteten innad i filmen [41].

Puncture-test

I denne metoden blir også en kraft (N) mot avstand (mm) kurve tatt opp. Motstand mot deformering og elastisitet kan finnes ut fra kurven [1]. Kraften som trengs for å øke avstanden en filmbit strekker seg vil øke med økende avstand, fram til filmen ryker [40].

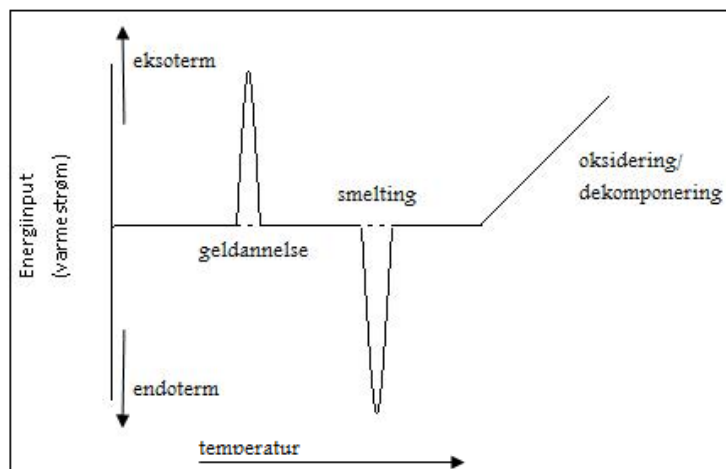
3.3.3 Termal analyse

Svært mange fysiske endringer finner sted ved oppvarming eller nedkjøling av polymere. Endoterme reaksjoner kan finne sted når varme kommer inn i prøven, som følge av oppbrytning av ordnede strukturer, f.eks. smelting av en gel. Eksoterme reaksjoner kan finne sted når varme slippes ut av prøven. Som kan komme av dannelse av ordnede strukturer, f.eks. gel dannelse. Metoder som benyttes til å

overvåke termale hendelser som følge av tid eller temperaturendringer, kalles termal analyse [38]. Termal analyse kan gi kvalitative og kvantitative data om fysiske eller kjemiske hendelse som involverer termale endringer [38, 42].

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC er en vanlig metode å analysere polymergeler med [38]. I DSC måles mengde energi som er nødvendig for å holde en prøve ved samme temperatur som en blank referanse. Hvis ingen fysiske eller kjemiske reaksjoner finner sted i prøven, vil energimengden inn til prøven holdes konstant. Hvis derimot en reaksjon finner sted vil energimengden inn til prøven, som kreves for å opprettholde en lik temperatur mellom prøven og referansen, endres [42]. Ved endoterme reaksjoner, som smelting må prøven tilføres mer energi i forhold til referansen. Mens ved eksoterme reaksjoner trenger prøven tilførsel av mindre energi i forhold til referansen [38].



Figur 6 Skisse av hvordan et DSC termogram kan se ut.

3.4 Mucoadhesjon i tynntarm

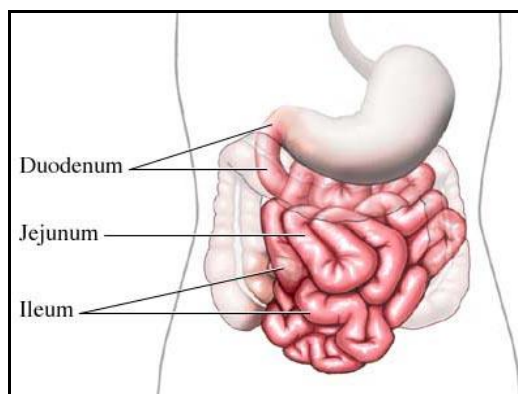
3.4.1 Hvorfor mucoadhesjon

Bioadhesjon beskriver overflate interaksjonen mellom ett stoff og et biologisk substrat [43, 44]. Hvis det biologiske substratet er mucin, eller en membran dekket av mucus kalles det mucoadhesjon [31, 43, 45, 46]. Mucus dekker store deler av GI-trakten [47], og består av 95 % vann. De resterende 5 % består av elektrolytter, proteiner, lipider og glykoproteiner [48]. Mucin er det viktigste glykoproteinet [49], og ansvarlig for gel egenskapene til mucuslaget [48]. Mucoadhesjon i tynntarm er svært interessant da det blant annet kan gi økt biotilgjengelighet grunnet økt retensjonstid samt lengre og nærmere kontakt mellom formuleringen og stedet for absorpsjon. Mucoadhesjon kan også gi mulighet for reduksjon i doseringsfrekvens og i mengde virkestoff nødvendig for å oppnå ønsket effekt [50]. Oppnåelse av mucoadhesjon i tynntarmen er en svært utfordrende oppgave [1].

3.4.2 Tynntarmen

Fysiologi

Tynntarmen strekker seg fra magesekken til tykktarmen og kan deles i tre deler.

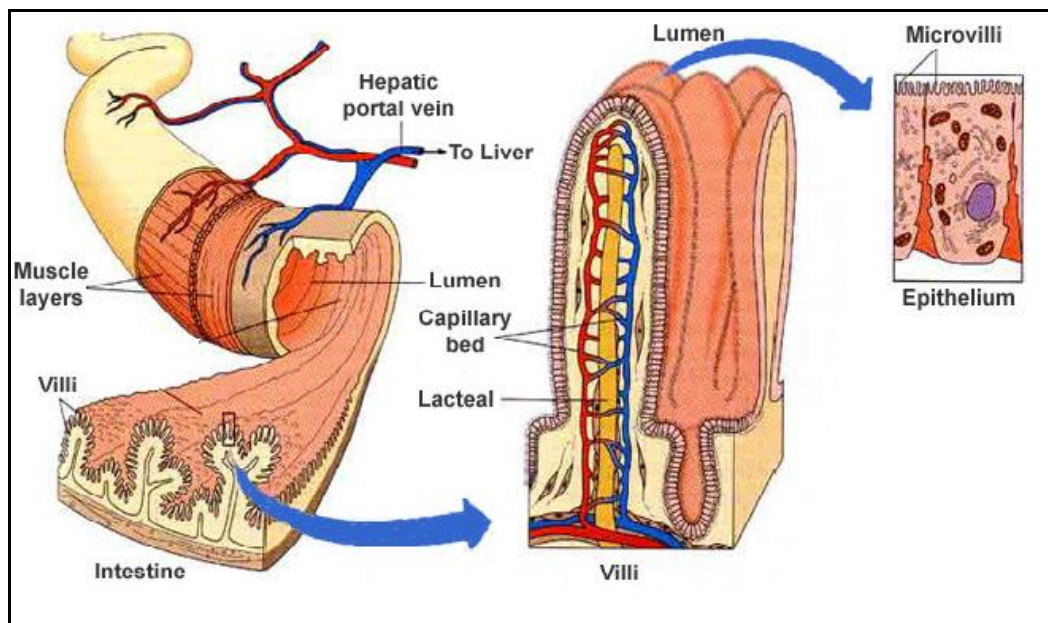


Figur 7 Tynntarmens tre hoveddeler: duodenum, jejunum og ileum. Figuren er hentet fra Integris digestive health center [51].

Duodenum er den første delen etter magesekken, her ligger pH på 5-7. Hovedfunksjonen er å nøytralisere magesyre og fortsette fordøyelsen fra magen. Fordøyelsesenzymer fra bukspyttkjertelen og galle fra lever entrer tynntarmen i duodenum. Neste segment er jejunum, her er pH på 6-7. Det er her all absorpsjon i hovedsak finner sted. Det siste segmentet er ileum, som kobler tynntarmen sammen med tykktarmen. Her ligger pH mellom 6-7,5 [4].

Overflate

I tillegg til tynntarmens lengde på ca seks meter, økes overflaten ytterligere ved tilstedeværelse av sirkulære folder i mucosa og submucosa, villi i mucosa og microvilli på epitelet. Mucosa dekker lumen av tynntarmen, og består av tre lag: epitel, lamina propria og musclauris mucosae. Submucosa er løst bindevev som støtter mucosa. Det store overflatearealet gjør tynntarmen til et velegnet sted for absorpsjon [4].



Figur 8 Tynntarmoverflaten; de sirkulære foldene, villi og microvilli øker overflatearealet dramatisk. Figuren er hentet fra University of Colorado. [52]

3.4.3 Mucoadhesjon mekanismer

Mucoadhesjon er en svært kompleks prosess og kan ikke beskrives med en enkel mekanisme. Mange ulike teorier for hvilke mekanismer som finner sted er foreslått [31, 34, 48, 53]. Fire hovedteorier som forklarer interaksjoner mellom et mucoadhesivt materiale og mucus er foreslått [34]:

1. Elektronteorien: Antar det skjer en overføring av elektroner mellom mucus og det mucoadhesive materialet, som igjen fører til dannelse av et dobbeltlag med elektronisk ladning ved overflaten til de to komponentene. Dette igjen vil resultere i tiltrekkende krefter innad i dobbeltlaget [31, 34, 48].
2. Adsorpsjonsteorien: Antar at for at adsorpsjon skal finne sted må det oppstå bindinger mellom mucus og det mucoadhesive materialet [31]. Hydrogenbindinger og van der Waals bindinger antas å være de viktigste for at mucoadhesjon skal finne sted [31, 34, 48].
3. Fukteteorien: Bruker overflatespenningen til mucus og det mucoadhesive materialet til å forklare evnen det mucoadhesive materialet har til å spre seg over mucus. Denne spredningen antas å være essensiell for at adhesjon skal finne sted [31, 34, 48, 54, 55].
4. Diffusjonsteorien: Antar at hvis det mucoadhesive materialet penetrerer tilstrekkelig langt inn i mucus vil fysiske og kjemiske interaksjoner finne sted som vil føre til mucoadhesjon [34, 48]. Denne prosessen er drevet av diffusjonsgradienter og grad av penetrering er avhengig av kjedelengde og fleksibiliteten til kjedene i det mucoadhesive materialet [31].

Ingen av disse teoriene alene er nok for å beskrive mucoadhesjon, det antas mucoadhesjon skjer ved en kombinasjon av de ulike teoriene [34]. Det er også foreslått at mucoadhesjon kan deles i to faser. Først en kontakt/fukte fase, etterfulgt av en fase hvor de adhesive interaksjonene finner sted [31, 34].

3.4.4 Polymeregenskaper og mucoadhesjon

Bakgrunn

Med tanke på de potensielle fordelene som kan oppnås med mucoadhesjon er kartlegging, og utvikling av nye mucoadhesive materialer et fagfelt det forskes mye på [10, 32, 55, 56]. God mucoadhesjon avhenger av det mucoadhesive materialet samt hvor i kroppen mucoadhesjon ønskes [45]. Kartlegging av strukturelementer på materialer regnet som gode mucoadhesive stoffer (polyakrylater, kitosan [32-34], xantangummi, karboksymetylcellulose, metakrylsyre [55]) er derfor sentrale for å kartlegge og utvikle nye mucoadhesive materialer [32]. Det er selvfølgelig også svært viktig at mucoadhesive materialer er biokompatible og ikke toksiske [34]. Hydrofile polymerer med mange hydrofile funksjonelle grupper som har mulighet til å danne hydrogenbindinger (karboksyl, hydroksyl, amid og sulfatgrupper) har vanligvis gode mucoadhesive egenskaper [45].

Ønskede polymer egenskaper

Svelling

Denne faktoren er i stor grad påvirket av det aktuelle mediet, da pH og ionestyrke avgjør hvor raskt og i hvilken grad en polymer vil svulle. Økt ionisering vil øke frastøtningen mellom kjedene og dermed sveller polymeren mer [32, 45]. Evnen til å svulle er avgjørende for mucoadhesjon da det involverer fukting, utkveiling og spredning av polymeren over mucus. Som igjen muliggjør dannelse av bindinger som kan føre til adhesjon [34]. Det er viktig at polymeren ikke sveller for mye og blir overhydrert, da det kan føre til nedsatt mucoadhesjon [34].

Evne til å danne bindinger

Tilstedeværelse av mange ioniserbare grupper er viktig for mucoadhesjon [56]. Dannelse av kovalente (disulfid) og non-kovalente bindinger (ioniske, hydrogen og van der Waals) er gunstig for god mucoadhesjon [32, 34]. Dannelse av

hydrogenbindinger er vist å spille en avgjørende rolle for gode mucoadhesive egenskaper [45].

Molekylvekt

Det er vist at høy molekylvekt bidrar til god mucoadhesjon [32]. Økt kjedelengde, noe som innebærer økt molekylvekt, er også vesentlig for god mucoadhesjon [56].

Romlig utforming

Stor fleksibilitet [32] og bevegelighet til polymerkjedene er viktig for at kjedene skal penetrere inn i mucus [45]. Et polymernettverk bør være ”åpent”, så de individuelle kjedene har mulighet til å penetrere dypt inn i mucus [2, 34]. Romlige utforming til mucus er også viktig. Mucus i ekspandert form vil favorisere god mucoadhesjon [45].

3.4.5 In vitro testing av mucoadhesjon

For å avgjøre om en polymer (eller annet materiale) er velegnet for mucoadhesjon et bestemt sted i kroppen, bør test forholdene mimikere in vivo forhold så godt som mulig [57]. Tynntarmen har et svært ugjestmildt miljø, som er vanskelig å simulere [1]. Det finnes mange ulike in vitro tester for å bestemme mucoadhesive egenskaper [2, 10, 57]. To vanlige in vitro tester er:

1. Tensile strength/teksturmåler. Metoder baserer seg på å måle kraften som trengs for å separere to overflater etter at mucoadhesive bindinger er oppnådd med en bestemt kontakttid og kraft.
2. Sher strength: Metoden bestemmer kraften som trengs for at en adhesiv polymer skal gli langs et mucuslag [10].

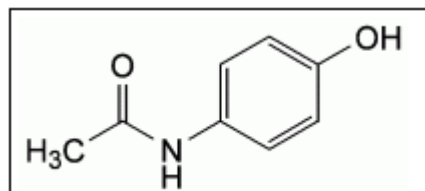
Testparameterne som benyttes har stor innvirkning på resultatene [50, 58]. Hvilken relevans in vitro tester har in vivo, er imidlertid uklart [33, 55].

3.5 Modellsubstansene

For å kontrollere hvordan ladning til en inkorporert modellsubstans påvirket pektin-kitosan kombinasjonsfilmene var det ønskelig å inkorporere tre substanser, med henholdsvis positivt, negativt og ingen ladning ved frisettingsstudiene. En relativ lik molekylvekt var også ønskelig. Dette da diffusjonskoeffisienten i Ficks lov reduseres når størrelsen til det diffunderende molekylet øker [59]. Ficks lov $J = \frac{DAK}{h} \times \Delta C$

hvor J er diffusjonshastigheten, D er diffusjonskoeffisienten, A er arealet av membranen, K er fordelingskoeffisienten oktanol/vann, h er membranens tykkelse og ΔC er forskjellen i konsentrasjon over membranen [49]. Diffusjon av paracetamol gjennom frie filmer har tidligere blitt testet [2, 3]. Dermed ble paracetamol beholdt som uladet modellsubstans og de andre modellsubstansene ble valgt ut fra egenskapene til paracetamol.

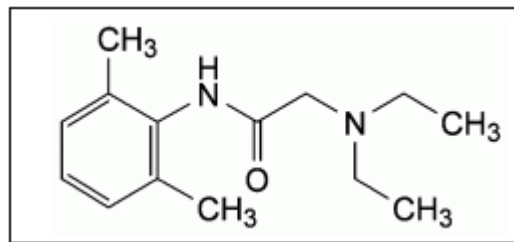
3.5.1 Paracetamol



Figur 9 Strukturformel paracetamol, hentet fra den europeiske farmakopè. [60]

- Molekylvekt: 151,2 Da [60]
- Løselighet ved pH 6,8: 20,3 mg/ml [61]
- Oppløsningshastighet ved pH 6,8: 2,62mg/(min*cm²) [61]
- pKa-verdi: 9-9,5 [61] (uladet ved pH 6,8)

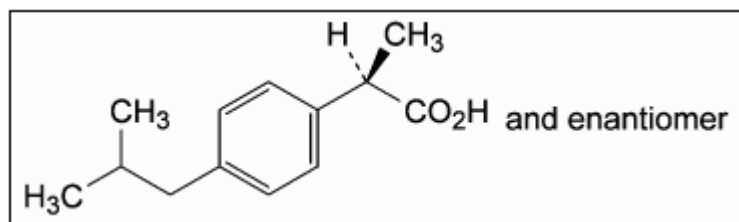
3.5.2 Lidokain



Figur 10 Strukturformel lidokain, hentet fra den europeiske farmakopè. [62]

- Molekylvekt: 234,3 [62]
- Løselighet ved pH 7,4: 10,43mg/ml [63]
- Oppløsningshastighet ved pH 2: 2,03mg/min*cm² [64]
- pKa-verdi: 7,16 [65] (positivt ladet ved pH 6,8)

3.5.3 Ibuprofen



Figur 11 Strukturformel ibuprofen, hentet fra den europeiske farmakopè. [66]

- Molekylvekt: 228,3Da [67]
- Løselighet ved pH 6,8: 3,89 mg/ml [61]
- Oppløsningshastighet ved pH 6,8: 0,3537mg/(min*cm²) [61]
- pKa-verdi: 4,4 [61] (negativt ladet ved pH 6,8)

4. Utstyr, materialer og løsninger

4.1 Utstyr

4.1.1 Generelt utstyr

Grovvekt, Metler PM3000	Metler Instruments, Sveits
Finvekt, Satrorius ME235S	Lab Instruments, Tyskland
Måling av filmtykkelse: Haake PK100 serienr: 197002360/003 med tilhørende Haake viscotester VT550 serienr: 197003599/007	Haake, Tyskland
HM 34 Humidity & temperature meter serienr: 404908	Vaisala, Finland

4.1.2 Utstyr til metodeutvikling

Sentrifuge: centra-MP4, serienr: OM2438	International Equipment Company, USA
Til manuelle UV målinger: UV-visible recording spechtophotometer UV-160A	Shimadzu, Japan
Frysetørker: Freeze dryer ALPHA-2-4, serienr: 10249 med kontroller LDC-1M	Martin Christ GmbH, Tyskland
Vakumpumpe Edwards RV8, serienr: 06639039	Edwards, England
Dialysemembran Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 8.000, batch nr: 722-06683-000	Spectrum laboratories, USA
Hetofrig metanolbad type CB10, serienr: 9002097	Heto Birkerød, Danmark
Solvaflex pumpe slanger, standard tubing med indre diameter 0,110 tommer, fiolett til hvit	Elkay, England
Pumpe IPS16	Ismatec SA, Sveits
Dataprogram: tablett dissolution system	Pharmacia, Sverige
Til kontroll av absorbanser: UV-2101 PC UV-VIS Scanning Spectrophotometer serienr: A121 31030362 med tilhørende programvare	Shimadzu, Japan

4.1.3 Utstyr til polymerkarakterisering og filmer

Kapillær til pektin: Kapillar-Viskosimeter type nr: 516 13	Schott, Tyskland
Kapillær til kitosan: Kapillar-Viskosimeter type nr: 516 10	Schott, Tyskland
Vannbad: Bath Thermostat CT050/2 serienr: 141821	Schott Geräte, Tyskland
Viskositetsmåler: Viscosity Measuring Unit AVS 310, serienr: 108631	Schott Geräte, Tyskland
Frisettingskar dissolutest	Prolabo
UV-apparat til frisetting	
Pharmacia LKB-Ultrospec III	Pharmacia, Sverige
Gjennomstrømmingscelle Sotax dissotest CE6	Sotax, Sveits
Solvaflex pumpe-slanger, standard tubing med indre diameter 0,110-tommer, fiolett til hvit	Elkay, England
Pumpe IPS16	Ismatec SA, Sveits
Dataprogram benyttet: tablett dissolution system	Pharmacia, Sverige
Teksturmåler: TA-XT2i Texture Analyser med tilhørende utstyr til mucoadhesjon, tensile test og puncture test	Stable Micro Systems, England
Differential Scanning Calorimeter DSC822e med tilhørende STARe dataprogram	Mettler Toledo GmbH, Sveits
Nedkjøling av gass til DSC: EK90/MT fryser	Thermo, Tyskland
Forsegling av DSC prøver: Crucible Sealing Press, serienr: 2323	Mettler Toledo GmbH, Sveits

4.2 Materialer

kaliumdihydrogenphosphat, batch: A837073 707 KH ₂ PO ₄	Merck, Tyskland
Ibuprofen sodium salt, batch: 027K2111	Sigma-Aldrich, Tyskland
Paracetamol, batch: 07M006/1	Apotekproduksjon, Norge
Lidocain-Hydrochlorid, batch: 7K009839	AppliChem, Tyskland
Sodiumhydroxide batch: 70800 42407C04	Sigma-Aldrich, Tyskland
Mucin from porcine stomach, Type II (bound sialic acids 1%) batch: 018K0079	Sigma-Aldrich, Tyskland
Chitosan, medium molecular weight, batch: 07322TE (molekylvektsområde: 190000- 310000Da, 80% deacetyleret)	Sigma-Aldrich, Tyskland

GENU pectin, batch: GR81611 (HM 70,2% metylestrifisert)	CP Kelco, USA
Glycerol, bathc:K38348392 805	Merck, Tyskland
Methanol, batch: K38629709 827	Merck, Tyskland
Rykende saltsyre 37 %, batch: K33616217 432	Merck, Tyskland
Natriumheksametafosfat batch: 1. 3282-250	KEBO Lab AB, Sverige
Kaliumacetat bathc: K34400520 510	Vaisala, Finland

4.3 Løsninger

Under er det beskrevet hvordan de ulike løsningene ble laget. Hvis ikke noe annet står spesifisert i teksten, er det metodene beskrevet under som ble benyttet.

1. **0,1M HCl pH 1:** 9,87g 37 % saltsyre ble løst i destillert vann, så det til sammen ble en liter løsning. Deretter ble pH justert til 1 ved hjelp av 1M NaOH (punkt 5) eller 2M HCl (punkt 2).
2. **2 M HCl:** 160,5g destillert vann ble utveid i en erlendmeyerkolbe og plassert på magnetrører. Deretter ble 39.6g 37 % saltsyre ble tilsatt.
3. **1 % (w/w) HM-pektinløsning:** 0,75g HM pektin ble utveid, deretter ble 75g 0,1M HCl (punkt 1) utveid. HM-pektin ble deretter strødd sakte over 0,1M HCl under omrøring på magnetrører. Deretter ble løsningen dekket til med aluminiumsfolie for å hindre fordamping og satt på magnetrører over natten. Dagen etter ble en visuell kontroll av at alt var løst foretatt.
4. **1 % (w/w) kitosanløsning:** 2,25g kitosan ble utveid, deretter ble 225g 0,1M HCl (punkt 1) utveid. Kitosan ble strødd sakte over 0,1M HCl under omrøring på magnetrører. Deretter ble løsningen dekket til med aluminiumsfolie og plassert på magnetrører over natten. Neste dag ble en visuell kontroll på at alt var løst foretatt.
5. **1M NaOH:** 80g NaOH kuler ble utveid, og overført til en to liters målekolbe. Målekolben ble deretter fylt med om lag 1,5 liter destillert vann. NaOH kulene ble så overført til målekolben, som ble satt på magnetrører med lokk på. En visuell kontroll av at alt var løst ble foretatt. Deretter ble destillert vann fylt opp til to liters merket.

6. **Fosfatbuffer pH 6,8:** 94,04g kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) ble utveid og løst i 309 ml 1M NaOH (punkt 5). Blandingen ble satt på magnetrører til alt var løst, vurdert visuelt. Deretter ble blandingen overført til en 10 liters dunk. Destillert vann ble så fylt opp til 10 liters merket. Deretter ble pH kontrollert ved hjelp av et pH-meter, og justert med 1M NaOH (punkt 5) eller 2M HCl (punkt 2) til 6,8.
7. **Natriumheksametafosfat 1 %:** 20 g natriumheksametafosfat ble utveid. En to liters målekolbe ble så fylt med ca 1,8liter destillert vann. Natriumheksametafosfat ble overført til målekolben og satt på magnetrører til alt var løst, så ble det fylt opp med destillert vann så det til sammen ble to liter løsning. Deretter ble pH justert til $4,5 \pm 0,5$ med 37 % saltsyre.
8. **3 % (w/w) mucinløsning:** 3,00g mucin ble utveid, deretter ble 97g fosfatbuffer pH 6,8 (punkt 6) utveid i et begerglass. Mucin ble strødd over og blandingen ble plassert på magnetrører og dekket til med aluminiumsfolie. Blandingen fikk stå i en time før den ble brukt, og en visuell kontroll på at alt var løst ble foretatt før løsningen ble brukt.
9. **0,5g/ml ibuprofen i metanolløsning:** 1,00g ibuprofen ble utveid og strødd over 2 ml metanol under konstant omrøring på magnetrører. En visuell kontroll av at alt var løst ble deretter foretatt.
10. **1mg/ml stamløsning:** 100mg av aktuell modellsubstans ble utveid og overført til en 100ml målekolbe. Ca 80 ml fosfatbuffer (punkt 6) ble tilsatt, og det ble kontrollert visuelt at all modellsubstans ble løst. Deretter det fylt opp til 100ml merket med fosfatbuffer (punkt 6).

5. Metoder

5.1 Metodeutvikling

5.1.1 Pektin

Bestemmelse av sentrifugeringstiden til pektin

Hensikt

Metoder beskrevet for opprensning av pektin er tidkrevende og sentrifugeringstider på 2*3timer [18] og 12 timer [37] har blitt beskrevet. Derfor ble metoden for opprensning av pektin effektivisert og standardisert. Utrenningstid og turbiditetsmålinger ble benyttet som mål på henholdsvis eventuelt tap av lange polymerkjeder og reduksjon i forurensning.

Sentrifugering

En 200 ml 1,5 % (w/v) HM-pektinløsning med destillert vann som løsemiddel ble laget, og stod på magnetrører over natten. 10 ml usentrifugert pektinløsningen ble satt til side for utrenningstid og turbiditetsmålinger. Resten av pektinløsningen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert på 4600 rpm i 60 minutter. Etter 60 minutter ble nye 10 ml tatt av pektinløsningen fra påtegnet merke midt på sentrifugerøret, som sørget for at prøvene ble tatt ut fra omtrent samme sted hver gang. Sentrifugerøret ble satt tilbake i sentrifugen og sentrifugert ved 4600rpm i 120 minutter. Etter endt sentrifugering ble igjen 10 ml tatt ut fra påtegnet merke.

Turbiditetsmålinger

Spektrofotometeret ble nullstilt mot kvartskyvetter med luft. Et spekter (200-800nm) ble tatt opp for løsningene fra de ulike sentrifugeringstidene. Spektrene ble brukt som

ble benyttet som mål på eventuelt tap av de lengste polymerkjedene og reduksjon i forurensning.

Sentrifugering

En 500g 0,2 % (w/w) kitosanløsning med 0,1M HCl pH 1 som løsemiddel ble laget. Neste dag ble 250 ml overført til et sentrifugeringsrør og sentrifugert på 4600rpm i en, to og tre timer. Prøve av usentrifugert kitosanløsning, samt prøver fra de ulike sentrifugeringstidene ble tatt ut på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.1.1.

Turbiditetsmålinger

Som mål på forurensning tilstedet ble et UV-spekter (200-800nm) av de ulike løsningene tatt opp og absorbansen til ved 300, 400, 500, 600 og 800nm ble notert.

Utrenningstidmålinger

Målingene ble foretatt på samme måte, og ved de samme betingelsene som beskrevet i avsnitt 5.1.1. Men apparatet for de automatiske målingene var i ustand under forsøket så utrenningstidmålingene ble gjort manuelt. En peleus pipetteballong ble benyttet til å trekke løsningene forbi målepunktene, og en stoppeklokke ble benyttet til å finne tiden løsningene trengte på å passere mellom punktene, tre målinger per prøve ble utført.

5.1.3 Filmfremstilling

Bruk av frie filmer er en svært utbredt (og enkel) metode for å teste egenskaper til polymerfilmer [2, 6, 8]. Det ble derfor av praktiske årsaker besluttet å benytte frie filmer i denne oppgaven. Det var ønskelig å utarbeide en metode for filmstøping som ga filmer med god kvalitet og som kunne benyttes videre til filmkarakteriseringen.

Innledende forsøk

Hensikt

Metoden for filmstøping beskrevet av E. Hagesæther et al. [2] ble benyttet som utgangspunkt for filmstøping. Innledningsvis ble filmer med innhold av paracetamol (uladet), salisylsyre (negativt ladet) samt blanke filmer støpt. Dette for å finne ut om metoden fungerte for filmer med inkorporert modellsubstans.

Forsøkene

Blank film

En 1 % (w/w) HM-pektinløsning og en 1 % (w/w) kitosanløsning ble laget. Neste dag ble løsningene blandet sammen på magnetrører. 0,90g glyserol (tilsvarende 30 % av tørr polymermengde) ble tilsatt blandingen. Deretter stod blandingen på magnetrører i ca tre timer før den ble overført til en 22,5*22,5cm petriskål, og satt til henstand på laboratoriebenken for tørking. Temperatur og luftfuktighet ble notert.

Filmer med inkorporert virkestoff

To filmer ble lagd på samme måte som beskrevet i forrige avsnitt. Men samtidig som glyserol ble tilsatt ble også 0,50g paracetamol tilsatt den ene blandingen, og 0,50g salisylsyre tilsatt den andre. En visuell kontroll på at alt var løst ble foretatt før filmstøping. Filmene ble deretter satt til tørking på laboratoriebenken, temperatur og luftfuktighet notert.

Forbedring av filmstøpingsprosessen

Hensikt

På bakgrunn av resultatene fra de innledende forsøkene ble nå ulike tilnærminger forsøkt for å forkorte tørketiden og redusere utkrystallisering i salisylsyrefilmen. Til disse forsøkene ble det bare benyttet salisylsyrefilmer. Tre ulike tilnærminger ble utprøvd:

1. 100 g 0,1M HCl pH 1 ble fjernet per film, mens alle de andre mengdene ble holdt konstant. Hver polymerløsning fikk dermed en konsentrasjon på ca 1 % (w/w). På denne nye filmløsningen ble to ulike tilnærminger forsøkt:
2. Ulike tørkebetingelser ble utprøvd.
3. pH ved filmstøping ble forsøkt hevet. Tanken var at økt pH ville deprotonere salisylsyren og at de negative ladningene vil frastøte hverandre og dermed gjøre utkrystallisering vanskeligere.

Forsøkene

En 1 % (w/w) HM-pektinløsning og en 1 % (w/w) kitosanløsning ble laget. Neste dag ble 0,90g glyserol og 0,50g salisylsyre tilsatt. Blandingen stod deretter på magnetrører i tre timer. Det ble visuelt kontrollert at alt var løst før blandingen ble overført til runde petriskåler med en diameter på 9cm. Små petriskåler ble benyttet da dette forsøket ble utført for å få indikasjoner på hvilke filmstøping og tørkebetingelser som var optimale. De ulike tørkebetingelsene utprøvd var: 1. romtemperatur laboriebenn, 2. 30 °C varmeskap og 3. 22 °C ”granulatskap”.

Inkorporering av modellsubstansene

Bakgrunn

På bakgrunn av resultatene fra de innledende forsøkene ble modellsubstansene beskrevet i avsnitt 3.5 utvalgt.

Innledende forsøk

Fire 75g 1 % (w/w) HM-pektinløsninger, og fire 225g 1 % (w/w) kitosanløsninger ble laget. Neste dag ble en og en HM-pektinløsning blandet sammen med en og en kitosanløsning. Deretter ble 0,90g glyserol tilsatt hver av de fire løsningene. Deretter ble 0,50g av de ulike modellsubstansene (avsnitt 3.5) strødd over hver sin løsning, under stadig omrøring på magnetrører. En løsning ble ikke tilsatt modellsubstans.

Løsningene stod på magnetrører i tre timer før hver av løsningene ble overført til 22,5*22,5cm petriskål og plassert i ”granulatskap” til tørking.

Ibuprofen

På bakgrunn av resultatene til de innledende forsøkene ble det klart at ibuprofen var det eneste virkestoffet som ikke dannet akseptable filmer med metoden beskrevet over. Derfor ble ibuprofen løst i metanol før tilsats til pektin, kitosan og glyserol blandingen. Hvor mye ibuprofen det var mulig å løse i minst mulig metanol ble kontrollert, og jamfør resultatene (avsnitt 6.1.3) ble en 0,5mg/ml ibuprofen i metanol løsning laget. 1 ml av denne løsningen ble sakte tilsatt blandingen under omrøring. Før filmstøping ble en visuell kontroll på at alt var løst foretatt.

5.1.4 Filmkarakterisering

Frisetting

Bakgrunn

Da det ikke ble funnet noen beskrevet metode for å teste frisetting ut av frie filmer ble en metode for dette utarbeidet. Studier funnet hadde bare testet diffusjon gjennom filmer [2, 3, 8]. En metode som simulerte forholdene i tynntarmen best mulig var ønskelig.

Rotating basket

En paracetamol filmbit ble benyttet til dette forsøket, det ble ikke ansett som nødvendig med flere paralleller da hensikten var å utarbeide en metode. Metoden er beskrevet i den europeiske farmakope [69].

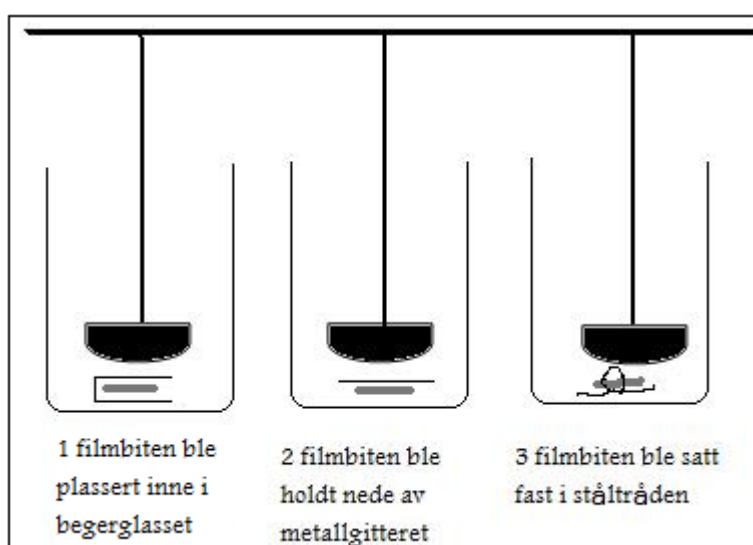
Modifisert paddle metode

Bakgrunn

På bakgrunn av resultatene fra rotating basket metoden, ble en modifisert paddle metode forsøkt. Den vanlige paddle metoden (beskrevet i den europeiske farmakope[69]) ble vurdert som uegnet, da den ikke tillot kontroll av filmbitens plassering i frisettingsbeholderen. Salisylsyrefilmer ble benyttet til forsøket.

Forsøket

Forsøket ble utført ved 37 °C, og med seks paralleller. Hver filmbit ble plassert i et frisettingsbeholder med en liter fosfatbuffer pH 6,8. Ulike modifiseringer utprøvd vises i Figur 13. Det ble tatt ut prøver etter 5,10,30,45, 60 og 90 minutter, og deretter hver time i til sammen 4 timer, og en 24 timers prøve. Prøvene ble analysert på spektrofotometer med fosfatbuffer pH 6,8 som blindprøve.



Figur 13 Skisse av de ulike modifiserte paddle metodene som ble utprøvd.

Paddle med metallgitter

Hensikt

På bakgrunn av resultatene fra modifisert paddle metode ble det besluttet å gå videre med metode 2 (Figur 13), med flere paralleller.

Forsøket

Paracetamolfilmer ble benyttet til dette forsøket. Forsøket ble utført ved 37 °C og med fire paralleller. Det ble tatt ut prøver etter 5, 15, 30, 45, 60 og 90 minutter. Deretter ble det tatt en prøve i timen i til sammen tre timer og en 24 timers prøve. Prøvene ble målt på spektrofotometer mot fosfatbuffer pH 6,8 som blindprøve.

Gjennomstrømmingscelle

På bakgrunn av resultatene fra paddle med metallgitter ble nå en ny tilnærming med gjennomstrømmingscelle forsøkt.

Innledende forsøk med manuelle målinger

Til dette forsøket ble både ibuprofen og paracetamolfilmer benyttet. Forsøket ble utført ved 37 °C og seks filmbiter ble plassert i hver sin gjennomstrømmingscelle koblet mot et frisettingsbeger fylt med en liter fosfatbuffer pH 6,8. Det ble tatt ut prøver fra hvert frisettingsbeger etter 5, 15, 30, 45, 60, 90 minutter og deretter hver time i til sammen 4 timer, pluss en 24 timers prøve. Prøvene ble analysert på spektrofotometer mot fosfatbuffer pH 6,8 som blindprøve.

Innledende forsøk med automatiske målinger

På grunn av resultatene fra de innledende forsøkene med gjennomstrømmingscelle ble gjennomstrømmingscelle med automatiske målinger forsøkt. Paracetamolfilmer ble benyttet og seks paralleller ble lagd. Forsøket ble utført ved 37 °C, fosfatbuffer pH 6,8 ble fylt i hele systemet og spektrofotometeret ble nullstilt. En pc ble koblet på systemet og stilt inn til å ta målinger hvert femte minutt i til sammen tre timer.

Metodevalidering av gjennomstrømningscelle

Hensikt

For å sikre at valgt frisettingsmetode var velegnet for å se effekt av modellsubstansenes ladning på frisettingshastighet ut av filmene, ble metoden validert.

Blanke filmer

Seks paralleller med blanke filmer ble laget, filmvekt og filmtykkelse ble notert. Metode benyttet er beskrevet i avsnitt 5.3.2 under "*frisetting*". Dataprogrammet ble innstilt på å måle absorbanser ved 231, 243 og 264nm hvert femte minutt i til sammen fire timer.

Fordamping fra de ulike filmtypene ved tørking

For å finne årsaken til det dårlige samsvaret mellom teoretisk beregnede mengder og standardkurvene, (avsnitt 6.3.2 under "*frisetting*") ble noen forsøk utført for å se om det var noe galt med de teoretiske beregningene.

Forsøket

Små petriskåler med diameter 9cm ble benyttet til dette forsøket. Mengde polymerløsning som ble benyttet i hver petriskål ble funnet i forhold til arealet på petriskålene sammenlignet med arealet til petriskålene benyttet ved filmfremstilling (avsnitt 5.3.1):

- Areal petriskål benyttet ved filmfremstilling: $506,25\text{cm}^2$
- Areal petriskål benyttet i dette forsøket: $63,62\text{cm}^2$
- Total polymerløsning benyttet til filmfremstilling: 300g
- Modellsubstans pr. petriskål ved filmfremstilling: 500mg
- Beregnet mengde polymerløsning pr. petriskål til dette forsøket:
 $300\text{g}/506,25\text{cm}^2 * 63,62\text{cm}^2 = 37,7\text{g}$ polymerløsning.

- Beregnet mengde virkestoff pr. petriskål til dette forsøket:
 $500\text{mg}/506,25\text{cm}^2 * 63,62\text{cm}^2 = 62,83\text{mg}$ virkestoff.

En 375g 1 % (w/w) kitosanløsning og en 125g 1 % (w/w) HM-pektinløsning ble laget (total polymerløsning var 500g). Dagen etter ble løsningene blandet sammen og 1,50g glyserol ble tilsatt. Deretter ble 113,3g av løsningen overført til fire 200 ml begerglass. 62,83mg paracetamol ble tilsatt den ene løsningen, 62,83mg lidokain ble tilsatt en annen løsning og en løsning ble ikke tilsatt modellsubstans. Den siste løsningen ble tilsatt 0,125ml av 0,5mg/ml ibuprofen i metanol løsning. Alle løsningene stod så tre timer på magnetrører. 12 petriskåler ble veid og merket, deretter ble 37,7g av de ulike løsningene overført til hver sin petriskål. Petriskålene ble så satt til tørking i ”granulatskapet” (avsnitt 5.3.1). Når alle filmene var tørre ble de ulike petriskålene veid igjen.

Fordamping av 0,1M HCl ved tørking

Dette forsøket ble utført som en forlengelse av ”fordamping av de ulike filmtypene ved tørking.”

Forsøket

Vekten av en tom petriskål ble notert. Deretter ble 40,10603g 0,1M HCl pH 1 veid ut i petriskålen. Petriskålen ble deretter satt til tørking i ”granulatskapet” (se avsnitt 5.3.1). Når alt var tørket ble petriskålen veid på nytt.

5.2 Polymerkarakterisering

5.2.1 Pektin

Opprensing

Hensikt

Pektin har en forventet stor batch til batch variasjon [18]. For å minimere bidrag fra dette på resultatene ble pektin rensset før bruk.

Fremgangsmåte

En 1000g 1,5 % (w/w) HM-pektinløsning ble laget. Neste dag ble løsningen sentrifugert på 4600 rpm i 60 minutter. Etter endt sentrifugering ble løsningen dekantert over til nye sentrifugerør, og satt på 4600 rpm i nye 60 minutter. Under den andre sentrifugeringen ble fire dialyseslanger (like lange som en 1000 ml målesylinder) lagt til vanning i en stålskål. En knute ble knytt nederst på hver av slangene. Den ferdigsentrifugerte pektinløsningen ble så dekantert over i de fire dialyseslangene. Hver slange ble knytt godt igjen i toppen og overført til hver sin 1000 ml målesylinder. Målesylinderne ble fylt med destillert vann og satt i kjøleskap, hvor de stod gjennom hele dialysetiden for å hindre vekst. Vannet i målesylinderne ble skiftet hver morgen og kveld til sammen syv ganger. For å få høy diffusjonsgradient var det ønskelig med hyppig vannskifte. Etter endt dialyse ble innholdet overført til fire 1000 ml rundkolber. Rundkolbene ble frosset ned under omrøring på metanol bad. De ble deretter hengt på frysetørker i minst 48 timer. Det frysetørkede pulveret ble så overført til plastbokser som ble oppbevart i kjøleskap.

Molekylvektbestemmelse av pektin

Hensikt

Molekylvekten til en polymer er viktig for hvilke egenskaper polymeren innehar [38]. Molekylvektbestemmelse av HM-pektin ble derfor utført. For å unngå aggregering ved molekylvektmålingene ble 1 % natriumheksametafosfat benyttet som løsemiddel [18].

Forsøk

En 50,0g 0,5 % (w/w) HM-pektinløsning ble laget med natriumheksametafosfat 1 % som løsemiddel. Neste dag ble utrenningstidmålinger foretatt med et Micro-Ostwald viskosimeter med tilhørende vannbad. Vannbadet ble innstilt på 25 °C og til å ta tre målinger per prøve. Måling av prøvene og vasking mellom målingene ble utført som beskrevet i avsnitt 5.1.1.

Prøveløsninger

Først ble utrenningstiden til ren natriumheksametafosfat 1 % målt. Deretter ble ulike fortyninger av pektinløsningen laget. Basert på annen litteratur og at forholdet mellom utrenningstid til rent løsemiddel og den mest konsentrerte polymerløsningen skal ligge mellom tre og fire [70] ble konsentrasjonene 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,15 % og 0,1 % (w/w) laget.

Bestemmelse av Huggins konstant for HM pektin i 0,1M HCl

Hensikt

Hugginskonstanten sier noe om hvordan en polymer oppfører seg i et løsemiddel [39]. Det var derfor ønskelig å bestemme Hugginskonstanten til HM-pektin i 0,1M HCl pH 1, da det var løsemiddelet som ble benyttet ved filmstøping (avsnitt 5.3.1).

Forsøket

En 25,0g 1 % (w/w) HM-pektin løsning ble laget. Neste dag ble konsentrasjonene 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,15 % og 0,1 % (w/w) lagd fra denne løsningen. Rent løsemiddel 0,1M HCl pH 1 og de ulike konsentrasjonene ble målt på som beskrevet i avsnitt 5.1.1.

5.2.2 Kitosan*Bestemmelse av Hugginskonstant til kitosan i 0,1M HCl***Hensikt**

Det var ønskelig å vite noe om hvordan kitosan oppførte seg i 0,1M HCl pH 1, som var løsemiddelet benyttet ved filmstøping (se avsnitt 5.1.3).

Forsøket (vår)

En 500g 0,2 % (w/w) kitosanløsning ble laget med 0,1M HCl pH 1 som løsemiddel. Neste dag ble fortynningen 0,10 %, 0,075 % og 0,05 % (w/w) laget. Disse fortynningene, den ufortynnede kitosanløsningen og rent løsemiddel ble deretter analysert med et Micro-Ostwald viskosimeter med tilhørende vannbad. Vannbadet ble innstilt på 25 °C. Da apparatet som foretok de automatiske målingene var i ustand under forsøket ble metoden beskrevet i avsnitt 5.1.2 benyttet.

Forsøket (høst)

Forsøket ble gjentatt på høsten, samme prosedyre som beskrevet i 5.1.1 ble benyttet. En 50g 1 % (w/w) kitosanløsning ble laget med 0,1M HCl pH 1 som løsemiddel. Neste dag ble fortynningene 0,15 %, 0,10 %, 0,075 % og 0,05 % (w/w) laget, og analysert som beskrevet i avsnitt 5.1.1.

5.3 Filmer

5.3.1 Filmfremstilling

Metoden som beskrives her utgjør en film. En 1 % (w/w) HM-pektinløsning (avsnitt 4.3, punkt 3) og en 1 % (w/w) kitosan løsning (avsnitt 4.3, punkt 4) ble laget. Neste dag ble de blandet sammen og 0,90g glyserol tilsatt (tilsvarende 30 % tørr polymermengde). Blandingen stod så tre timer på magnetrører. Det som er beskrevet til nå utgjorde en blank film.

Det ble i denne oppgaven benyttet ibuprofen natrium, lidokain hydroklorid og paracetamol (avsnitt 4.2). For filmer med inkorporert modellsubstans var fremgangsmåten noe annerledes for ibuprofen enn for paracetamol og lidokain:

- Ibuprofenfilmer: På grunn av ibuprofen sin lave løselighet ved pH 1 (0,058mg/ml [61]) ble ibuprofen først løst i metanol, som beskrevet i avsnitt 4.3, punkt 9. Deretter ble 1ml av denne løsningen overført dråpevis til blandingen beskrevet over.
- Lidokain og paracetamolfilmer: 0,50g aktuell modellsubstans ble utveid og strødd sakte over blandingen beskrevet over.

Etter tre timer på magnetrører ble en visuell kontroll på at alt var løst foretatt, deretter ble blandingen helt ut i en 22,5*22,5 cm petriskål. Petriskålen ble plassert i ”granulatskap” med vifte. Hver petriskål ble vatret opp for å få så jevne filmer som mulig. Tørketiden var 48 timer. Tørre filmer ble fjernet fra petriskålen med skalpell og pinsett. Filmen ble deretter lagt i eksikator med 22,5 % RH, hvor de lå i minst 48 timer før de ble benyttet i noen forsøk. Dette for å sikre likt fuktinnhold i alle filmene.

5.3.2 Filmkarakterisering

Mekaniske egenskaper

Hensikt

Filmer støpt i denne oppgaven var tenkt benyttet som en legemiddelform i seg selv. Bestemmelse av mekaniske egenskaper er relevant for å få en tidlig indikasjon på hvilke egenskaper filmen innehar, samt muligheten til å optimalisere filmens egenskaper. Det var ønskelig å finne ut om mekaniske egenskaper til filmene ble påvirket av ladning til de inkorporerte modellsubstansene. Til dette ble tensile-test og puncture-test benyttet. Det var også ønskelig å finne ut hvordan disse metodene korrelerte med hverandre.

Tensile-test

Innledende forsøk

Denne metoden er beskrevet i litteraturen [6, 71], og kun noen enkle innledende forsøk for å kontrollere parameterne ble utført med blanke filmer. Kraften på teksturmåleren ble kalibrert. Deretter ble en filmbit festet på teksturmåleren, som vist i Figur 14, teksturmåleren ble startet og de optimale parametrene ble bestemt.



Figur 14 Tensile-test oppsett. Bildet er hentet fra Texture Technologies hjemmeside [72].

Hovedforsøk

På bakgrunn av resultatene fra de innledende forsøkene ble følgende parametere benyttet under hovedforsøkene:

Tabell 1 Teksturmåler parametre for tensile-test.

Test Mode and Options:	measure force in tension, hold until reset
Parameters:	Pre test speed 1mm/s
	Test speed 0,03 mm/s
	Post test speed 1mm/s
	Rupture test distance 1mm
	Distance 100mm
	Force 2N
	Time 60s
	Count 5
Trigger:	auto
	force 0,07N
	stop plot at final
Break:	detect return
	level
	sensitivity 0,1N
Units:	force N
	distance mm

10 paralleller per filmtypen ble analysert. Film biter på 1,2*4,5cm ble skåret ut, filmvekt og tykkelse ble notert. Kraften til teksturmåleren ble kalibrert og parametrene fra Tabell 1 ble lastet inn. Dobbeltsidig tape ble festet på begge sidene av den nedre og øvre griperen til teksturmåleren. En filmbit ble så plassert mellom griperne ved hjelp av pinsett og klemt fast (Figur 14).

Puncture-test

Innledende forsøk

Denne metoden er også beskrevet i litteraturen [40, 73]. En blank filmbit ble benyttet for å kontrollere at parameterne var i orden. En filmstørrelse på 2,5*2,5cm ble valgt ut fra diameteren (1,4cm) til hullet.

Hovedforsøk tørre filmer

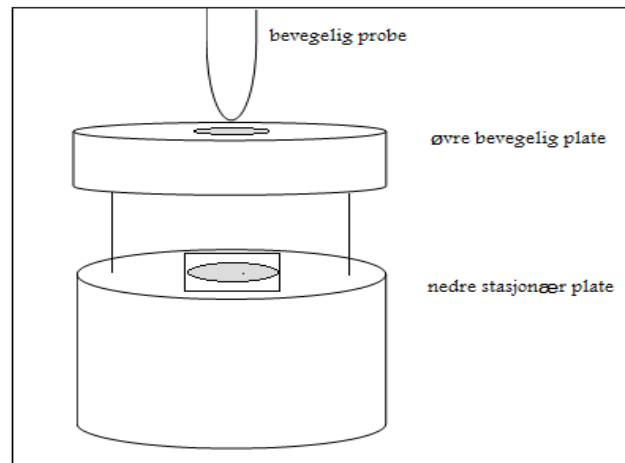
10 filmbiter av hver filmtypen ble skåret ut, filmvekt og tykkelse ble deretter notert.

Teksturmåleren ble så innstilt på parametrene beskrevet i Tabell 2

Tabell 2 Teksturmåler parametere for puncture-test

Test mode and options	measure force in compression, hold until reset.
Parameters	Pre test speed 1mm/s
	Test speed 0,05mm/s
	Post test speed 1mm/s
	Rupture test distance 1mm
	Test distance 50mm
	Force 2N
	Time 60sek
	Count 5
Trigger	auto
	force 0,05N
Break	detect return level
	sensitivity 0,1N
Units	force N
	distance mm

Kraften til teksturmåleren ble kalibrert før målingene. En filmbit ble plassert så godt som mulig midt over hullet ved hjelp av pinsett. Den bevegelige plastplaten ble så plassert over filmbiten og skrudd fast som vist i Figur 15.



Figur 15 Skisse av puncture-test oppsettet. Filmbiten (firkant i skissen) ble plassert over hullet, den bevegelige øvre platen senket ned og skrudd fast. Deretter ble den bevegelige proben senket ned med bestemt hastighet, og "hullet" ut filmen.

Hovedforsøk etter t-50 i fosfatbuffer

Tiden for 50 % frisatt modellsubstans ble beregnet ut fra frisettingsresultatene (avsnitt 6.3.2). For de blanke filmene ble gjennomsnittet av de ulike t-50 tidene til de andre modellsubstansene benyttet.

Tabell 3 T-50 for de ulike filmtypene, basert på gjennomsnitt fra frisettingsmålingene (n=6).

Modellsubstans	t-50 (minutter)
Paracetamol	5,7
Lidokain	17,2
Ibuprofen	37,7
Blank	20, 2

10 paralleller per filmtype ble målt. Vekt og tykkelse til filmene ble notert. Deretter ble hver filmbit lagt i ca 20 ml fosfatbuffer pH 6,8 i små glassbeholdere med lokk, for å hindre fordamping. Etter filmtypens t-50 (Tabell 3) ble filmbiten tatt ut med pinsett

og plassert på teksturmåleren (Figur 15). Parameterne (som for tørre filmer) ble stilt inn før målingene ble foretatt.

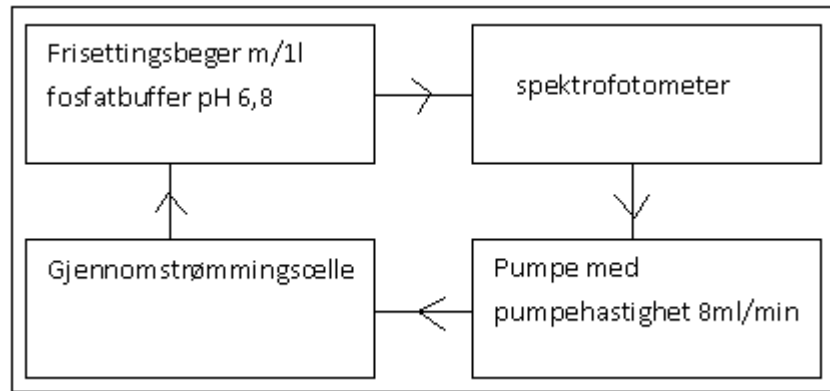
Hovedforsøk etter 24 timer i fosfatbuffer

10 paralleller av hver filmtypen ble laget, filmvekt og tykkelse ble notert. Alle filmbitene ble plassert i ca 20 ml fosfatbuffer pH 6,8 i små glassbeholdere med lokk. Etter 12 timer ble fosfatbufferen i alle glassene skiftet, for å hindre at en mettet løsning skulle dannes. En mettet løsning kunne teoretisk sett redusert diffusjon av modellsubstans ut av filmene. Etter totalt 24 timer i fosfatbuffer pH 6,8 ble hver filmbit analysert med parameterne fra Tabell 2.

Frisetting

Gjennomstrømmingscelle

Dagen før et frisettingsforsøk ble foretatt ble destillert vann kjørt gjennom hele systemet. Neste dag ble spektrofotometeret slått på først, for å sikre gjennomvarm lampe. Ved hvert frisettingsforsøk ble det kjørt seks paralleller. Seks filmbiter med aktuell modellsubstans ble utskjært med skalpell. Vekt, areal og tykkelse ble notert. Frisettingsapparatet ble innstilt på 37 °C. Seks frisettingsbeger ble fylt med en liter fosfatbuffer pH 6,8 og koblet opp mot hver sin gjennomstrømmingscelle (Figur 16). En paddle ble plassert i hvert frisettingsbeger, og hastigheten satt til 100rpm. Ved frisetting fra ibuprofenfilmer ble 500 ml fosfatbuffer pH 6,8 benyttet i hvert frisettingsbeger.



Figur 16 Skisse av frisettingsoppsettet. Strekene mellom boksene indikerer plastslanger og retningen på væskestrømmen er vist med pilene.

Systemet ble så nullstilt mot fosfatbuffer pH 6,8 og PC-programmet ble innstilt på ønsket bølgelengde: 231nm for lidokain, 243nm for paracetamol og 264nm for ibuprofen. Og til å foreta en måling hvert femte minutt i totalt fire timer. Deretter ble filmbitene fra aktuell filmtypen plassert i hver sin gjennomstrømningscelle, og forsøket startet. Etter bruk ble det kjørt destillert vann gjennom systemet i minst en time, deretter ble luft pumpet gjennom systemet så det ble stående tørt til neste forsøk.

Standardkurver

Tillaging av løsningene

En stamløsning med konsentrasjon 1mg/ml med aktuell modellsubstans i fosfatbuffer pH 6,8 ble lagd (avsnitt 4.3, punkt 10). Ut i fra denne stamløsningen ble konsentrasjoner som dekket teoretisk beregnet konsentrasjonsområde så laget. Konsentrasjonene for paracetamol og lidokain var; 2, 4, 6, 8, 10 og 15µg/ml. For ibuprofen var konsentrasjonene 10, 12, 14, 16, 18 og 20µg/ml. (Da det ble brukt 500ml fosfatbuffer under frisettingen av ibuprofenfilmene.)

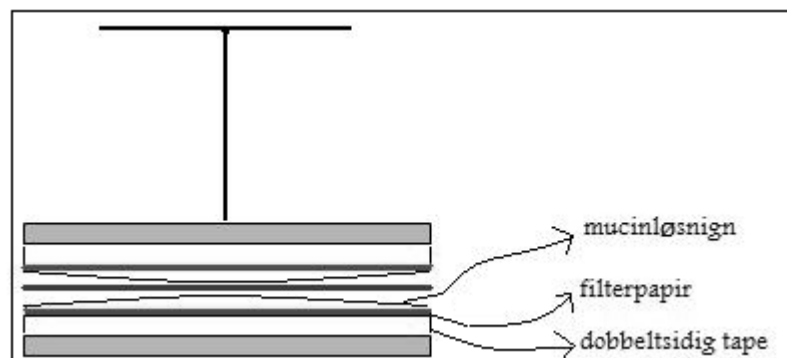
Mucoadhesjon

Hensikt

In vitro metoden benyttet for testing av mucoadhesive egenskaper var beskrevet av E. Hagesæther et al. [2]. Noen enkle innledende forsøk for å kontrollere parameterne ble utført.

Innledende forsøk

Fem blanke filmbiter på 1,25*1,25cm ble utskjært, deretter ble filmvekt og tykkelse notert. Teksturmåleren ble så innstilt på parameterne benyttet av E. Hagesæther et al. [2]. Dobbeltsidig tape ble festet på den bevegelige og den stasjonære platen. Filterpapir med et par dråper mucinløsning (avsnitt 4.3, punkt 8) ble deretter festet til den dobbeltsidige tapen (Figur 17) En filmbit ble så plassert mellom platene, og teksturmåleren startet.



Figur 17 Skisse av oppsett for in vitro testing av mucoadhesjon.

Hovedforsøket

Bakgrunn

Alle filmtypene ble testet mot mucinløsning (avsnitt 4.3, punkt 8) og mot fosfatbuffer pH 6,8. 10 paralleller av hver film ble testet mot fosfatbuffer og mot mucin. Filmbiter på 1,25*1,25 cm ble skåret ut, deretter ble filmvekt og tykkelse ble målt. Alle filmene ble analysert i tilfeldig rekkefølge.

Teksturmåler oppsett

Teksturmåleren ble innstil på parametrene i Tabell 4. Dobbeltsidig tape ble festet på begge platene. Et filterpapir med fosfatbuffer pH 6,8 eller mucinløsning ble så festet med den glatte siden inn mot den dobbeltsidige tapen (Figur 17). Straks etter ble en filmbit plassert ved hjelp av pinsett på den nedre stasjonære delen. Deretter ble teksturmåleren startet. Etter endt måling ble alt fjernet fra platene, og prosedyren ble gjentatt for alle prøvene.

Tabell 4 Teksturmåler parametre for mucoadhesjonsmålinger

Pre test speed:	1mm/sp
Test speed:	0,01 mm/s
Post test spees:	1 mm/s
Rupt. Test dist:	1,0mm
Distance:	3mm
Force	2N (203g)
Timer:	100 sek

Termal analyse

Differential Scanning Caliometer

Hensikt

DSC ble utført for og finne informasjon om interaksjoner mellom de ulike komponentene i filmene.

Prøveopparbeidelse

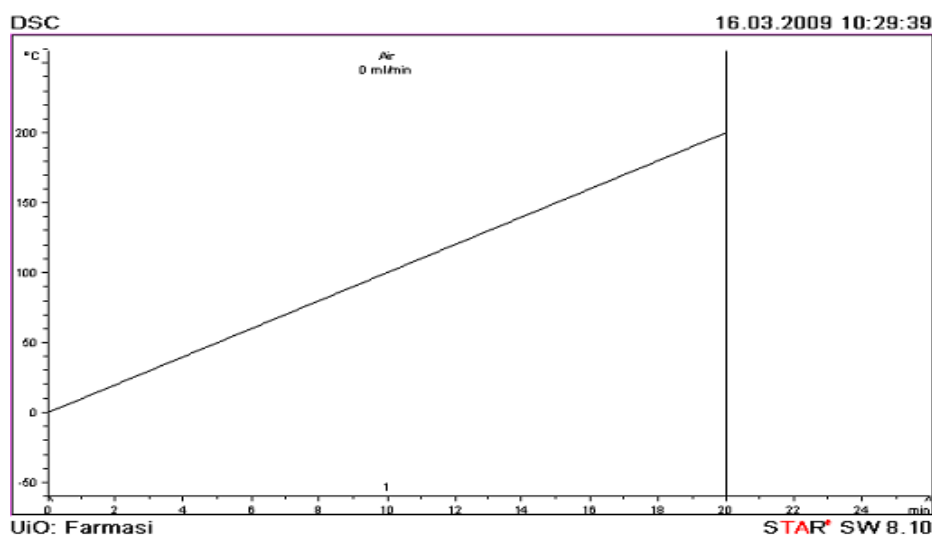
Følgende stoffer og kombinasjoner av stoffer ble analysert med DSC.

1	lidokain	9	paracetamol-pektin
2	paracetamol	10	paracetamol-kitosan
3	ibuprofen	11	ibuprofen-pektin
4	pektin	12	pektin-kiosan
5	kitosan	13	pektin-kitosan-glyserol
6	glyserol	14	lidokain-pektin-kitosan-glyserol
7	lidokain-pektin	15	paracetamol-pektin-kitosan-glyserol
8	lidokain-kitosan	16	ibuprofen-pektin-kitosan-glyserol

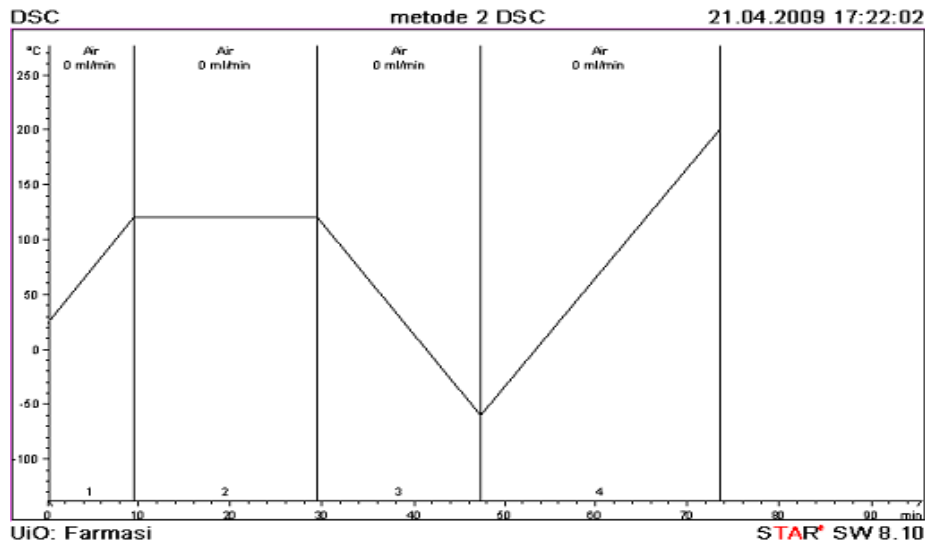
For prøve 1-6 var ingen prøveoppbeidelse nødvendig. Til kombinasjonene 13-16 ble filmer (se avsnitt 5.3.1) benyttet. Kombinasjonene 7-12 ble laget på samme måte som øvrige filmer benyttet i denne oppgaven (avsnitt 5.3.1).

Forsøket

Før oppstart ble DSCen kalibrert mot en indiumstandard. En prøve ble laget ved å veie ut 1-4mg av aktuelt stoff i små metallbeholdere. Deretter ble et tilhørende metallokk uthullet, plassert over beholderen og forseglet ved hjelp av en *crucible sealing press* (avsnitt 4.1.3). En tom metallbeholder ble benyttet som referanse ved alle målingene. Initialt ble prøvene 1-16 målt med metode 1 (Figur 18). For også å se termogrammer for vannfrie prøver ble prøvene 1-6 målt med metode 2 (Figur 19). Oppvarmingshastigheten ved begge metodene var 10 °C/minutt.



Figur 18 Skisse av metode 1.



Figur 19 Skisse av metode 2.

5.3.3 Statistisk analyse

ANOVA og Tukeys metode

Resultatene i denne oppgaven (kapittel 6) ble analysert med ANOVA for å bestemme om det var statistisk signifikante forskjeller tilstedet. Tukeys metode ble benyttet samtidig, da Tukeys metode avgjør hvilke gjennomsnitt som var signifikant ulike andre gjennomsnitt. Til ANOVA med Tukeys metode ble dataprogrammet minitab, versjon 15.01 benyttet.

Toutvalgs t-test

Resultatene for spesifikk maks kraft (avsnitt 6.3.2), ble analysert på en annen måte. For spesifikk AUC ble ingen beregninger utført da det fremkom svært tydelig av histogrammet (se 6.3.2, Figur 46) at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom de ulike filmtypene. Gjennomsnittet til film testet mot mucinløsning ble fratrukket gjennomsnittet til film testet mot fosfatbuffer pH 6,8. Deretter ble standardfeilen til den differansen funnet (se avsnitt 6.3.2, Tabell 14). Disse tallene ble så benyttet til å

kalkulere en t-testobservator for en t-outvalgs t-test, etter formelen vist under.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{SFD_1^2 + SFD_2^2}}$$

Hvor x_1 er differansen av gjennomsnittet til lidokainfilmene testet mot mucin fratrukket gjennomsnittet til lidokainfilmene testet mot buffer. x_2 er differansen av gjennomsnittet til aktuell filmtype (1-3) testet mot mucin fratrukket gjennomsnittet til lidokainfilmene testet mot buffer. SFD_1 er standardfeilen til differansen for lidokainfilmene, SFD_2 er standardfeilen til differansen for aktuell filmtype (1-3).

Hypotesene som ble testet var:

1. H_0 : lidokain = ibuprofen, mot H_a : lidokain \neq ibuprofen, k frihetsgrader 17
2. H_0 : lidokain = paracetamol, mot H_a : lidokain \neq paracetamol, k frihetsgrader 17
3. H_0 : lidokain = blank, mot H_a : lidokain \neq b, k frihetsgrader 19

Antall frihetsgrader ble satt til den minste av n_1-1 og n_2-1 . Deretter ble p-verdien ble avlest i t-fordelingstabell. Det ble på forhånd bestemt at H_0 kunne forkastes på signifikansnivå 0,05.

6. Resultater

6.1 Metodeutvikling

6.1.1 Pektin

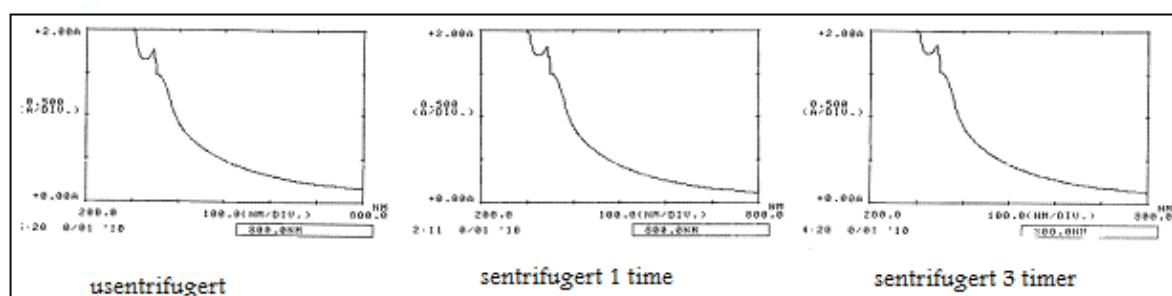
Bestemmelse av sentrifugeringstiden til HM pektin

Sentrifugering

Det var ikke mulig ved visuell observasjon å si om det var blitt større mengde bunnfall etter tre timers sentrifugering sammenlignet med en time.

Turbiditetsmålinger

Spektrene for de ulike sentrifugeringstidene var tilnærmet like (Figur 20). Avstand fra grunnlinjen og opp til absorbans ble måt fire ulike steder, det var da mulig å se en liten nedgang i absorbans for de sentrifugerte løsningene sammenlignet med de usentrifugert.



Figur 20 UV-spekter (200-800nm) for HM-pektin usentrifugert, sentrifugert 1 time og sentrifugert 3 timer.

Tabell 5 Absorbanser for ulike bølgelengder (nm) for usentrifugert, sentrifugert 1 time og sentrifugert 3 timer (avlest manuelt av spektrene vist i Figur 20).

	400nm	500nm	600nm	700nm
usentrifugert	0,42	0,25	0,15	0,1
sentrifugert 1 time	0,40	0,23	0,12	0,08
sentrifugert 3 timer	0,40	0,23	0,12	0,08

Utrenningstid målinger

En nedgang i utrenningstidene med økt sentrifugeringslengde ble ikke sett. Hvis det hadde blitt observert kunne det indikert tap av de lengste polymerkjedene. Dette ville gitt en lavere utrenningstid, da viskositeten til en polymerløsning blant annet er avhengig av størrelsen til polymerkjedene [38].

Tabell 6 Utrenningstid for HM pektin. Utrenningstiden vises som gjennomsnitt av n=4 målinger.

Sentrifugeringslengde	Utrenningstid (sek.)	Min/maks verdier (sek.)
Usentrifugert	325,80	325,20 / 326,19
1 time	441,40	441,08 / 441,71
3 timer	463,69	462,46 / 464,21

Det var ikke mulig å se noen nedgang i responsene for forurensning (utrenningstid og absorbansmålinger) mellom én og tre timers sentrifugering. Det var derfor ingen grunn til å benytte den lengste sentrifugeringstiden. Til opprensning av pektin ble det derfor bestemt å bruke 2*1 time som sentrifugeringstid. På bakgrunn av disse resultatene ble metode for opprensning av pektin bestemt og er beskrevet i sin helhet i avsnitt 5.2.1.

6.1.2 Kitosan

Bestemmelse av eventuell rensemetode for kitosan

Sentrifugering

Det var ikke mulig ved visuell observasjon og se bunnfall etter sentrifugering slik det ble gjort for HM-pektin (avsnitt 6.1.1). Det var heller ikke mulig ved visuell sammenligning av usentrifugert og sentrifugerte prøver og se noen reduksjon i partikler/rusk tilstede.

Turbiditetsmålinger

Det ble ikke funnet noen forskjeller i absorpsjonsmålingene av kitosanløsningene med ulike sentrifugeringstider.

Tabell 7 Absorpsjonsmålinger for kitosanløsninger med ulike sentrifugeringslengder.

Sentrifugeringstid	300nm	400nm	500nm	600nm	800nm
usentrifugert	0,131	0,058	0,047	0,044	0,048
1 time	0,132	0,058	0,046	0,044	0,047
2 timer	0,139	0,056	0,044	0,04	0,046
3 timer	0,131	0,055	0,044	0,042	0,047

Utrenningstidmålinger

Tabell 8 Utrenningstid til kitosan. Vist her som gjennomsnitt basert på n=3 målinger. Apparatfeil gjorde at målingene ble gjort manuelt (avsnitt 5.1.2).

Sentrifugeringslengde	Utrenningstid (sek.)	Min/maks verdier (sek.)
Usentrifugert	300,20	300,0 / 300,6
1 time	303,13	302,2 / 304,0
2 timer	306,80	306,0 / 307,4
3 timer	302,40	301,0 / 305,0

En nedgang i utrenningstidene for kitosan ble ikke observert for de ulike sentrifugeringstidene. Dette indikerer at kitosan tåler tre timers sentrifugering. Det var imidlertid ikke mulig å måle noen form for reduksjon i eventuelle forurensninger

tilstede. Det ble dermed besluttet å fortsette å benytte kitosan som mottatt fra leverandøren, dette er i samråd med annen litteratur på området [3, 19, 22, 36, 37, 74].

6.1.3 Filmfremstilling

Innledende forsøk

Initialt var det mange problemer som oppstod i forbindelse med filmfremstillingen:

- Lang tørketid på 5-7 dager.
- Vekst i filmene, som følge av den lange tørketiden.
- Ukontrollerbare betingelser som varierte med været (temperatur og luftfuktighet) gjorde det vanskelig å standardisere tørkebetingelsene.
- Missfarging (gulaktig) av paracetamolfilmene.
- Utfelling av lange nålformede krystaller på salisylsyrefilmene. Krystallene la seg på toppen av filmen, og da filmen ble fjernet fra petriskålen etter tørking drysset store mengder salisylsyre av.

Den lange tørketiden ble identifisert som hovedproblemet og det ble besluttet å optimalisere tørkebetingelsene. Dette for å oppnå en tørketid på rundt 48 timer, som er mer i samsvar med annen litteratur [71]. Paracetamolfilmene hadde en relativt god kvalitet, det eneste synlige var en noe mer gulaktig farge enn blanke filmer.

Salisylsyrefilmene var av uakseptabel kvalitet. For å få et ”*worst-case*” scenario ble salisylsyrefilmer benyttet til forsøkene for å forbedre filmstøpingsprosessen.

Forbedring av filmstøpingsprosessen

1. Da redusert mengde 0,1M HCl (avsnitt 4.3, punkt 1) ga gode resultater ble det besluttet å bruke den reduserte mengden for videre filmstøping.
2. Filmene tørket i romtemperatur hadde en kortere tørketid grunnet redusert mengde løsemiddel, men variasjonen i tørketiden var fremdeles stor (fra 2-

5dager). Filmene plassert i ”granulatskapet” tørket raskest, på litt under 48 timer. ”Granulatskapet” ble dermed valgt som tørkested for videre filmstøping.

3. Økt pH (3-4) ved filmstøping førte til redusert utfelling av salisylsyre. Men pH i området hvor PEC dannes [37] førte til filmer med uakseptabel i kvalitet (svært porøse og uhomogene). Økt pH ble derfor ikke benyttet for videre filmstøping.

Da ingen av tiltakene over klarte å gi akseptable salisylsyrefilmer ble det besluttet å finne en annen negativt ladet modellsubstans. Modellsubstansene som ble valgt er beskrevet i avsnitt 3.5.

Inkorporering av modellsubstansene

Innledende forsøk

Blanke, lidokain og paracetamolfilmer var alle av fin kvalitet. Ibuprofenfilmene ble langt bedre enn salisylsyrefilmene og det var ingen problemer med utkrystallisering. Men ibuprofenfilmene hadde fremdeles ikke god nok kvalitet. Problemet var at ibuprofen ikke ble løst før filmstøping (vurdert med visuell observasjon), dermed ble resultatet en film med tydelig synlige aggregater av varierende størrelse.

Ibuprofen

Den høyeste konsentrasjonen ibuprofen det var mulig å løse i metanol var 0,5mg/ml. Med denne tilnærmingen ble ibuprofen helt løst før filmstøping, vurdert med visuell observasjon. Resultatet av denne filmstøpingen ble en film med jevnt fordelt ibuprofen. Kun fine små partikler av svært liten størrelse, jevnt fordelt i filmen var synlige etter tørking. Disse filmene var av akseptabel kvalitet og kunne benyttes til filmkarakterisering. Den endelige metoden for filmfremstilling av alle filmtypene er beskrevet i avsnitt 5.3.1.

6.1.4 Filmkarakterisering

Frisetting

Rotating basket

Visuell kontroll av filmbiten var ikke mulig med denne metoden. Dette var en stor ulempe da hvordan filmen ble liggende i kurven kan tenke seg å påvirke frisettingsprofilene.

Modifisert paddle metode

Forsøket

1. Det ble antatt at denne metoden kunne gi en kunstig lav frisettingsprofil, da det kunne tenkes at virkestoffet ble værende en periode i glassrøret. Visuell observasjon viste at filmen klistret seg inntil glassveggen inne i begerglasset. Det at enkelte områder i filmen ikke kom i direkte kontakt med frisettingsmediet kan påvirke frisettingen.
2. Metallgitteret som holdt filmbiten løst nede ble vurdert som den best egnede metoden. Metallgitteret lå og fløt rett under paddelen, og kontrollerte filmbitens bevegelser. Alle deler av filmen kom i god kontakt med frisettingsmediet, samtidig som filmens bevegelse ble godt kontrollert.
3. Det var vanskelig å kontrollere filmbitens bevegelse og det var problematisk å feste den ordentlig i ståltråden. Det ble observert at filmbiten ”strakk” seg opp mot paddelen, og lett kunne løsne fra ståltråden.

Paddle med metallgitter

Ved endt forsøk ble det observert en brunfarge på alle filmbitene i et mønster tilsvarende metallgitteret benyttet. Små brunfargede partikler flytende på toppen av hvert frisettingsbeger ble også sett. På bakgrunn av det uegnede metallgitteret ble

denne metoden vurdert som uegnet, og det ble besluttet å hindre kontakt med metall under hele frisettingen da det så ut til å påvirke filmene.

Frisetting med gjennomstrømmingscelle

Innledende forsøk med manuelle målinger

Frisetting med gjennomstrømmingscelle ga svært kontrollerbare betingelser. Visuell observasjon viste at filmene oppførte seg svært likt, de fleste ble ”stående” i retning med væskestrømmen. Ved 24 timers målingen hadde alle paracetamolfilmene en rødbrun farge og i alle frisettingsbegrener med paracetamolfilmer var det tydelige små rødbrune partikler som fløt rundt. Ibuprofenfilmene var helt blanke/hvite. Den raske frisettingen ut av filmene, gjør at en metode som tillot mange målinger var ønskelig. Gjennomstrømmingscelle med automatiske målinger ble derfor forsøkt. Da ingen missfarging ble sett for ibuprofen, og for paracetamol først ved 24 timers målingen ble det besluttet å forsøke den samme metoden igjen.

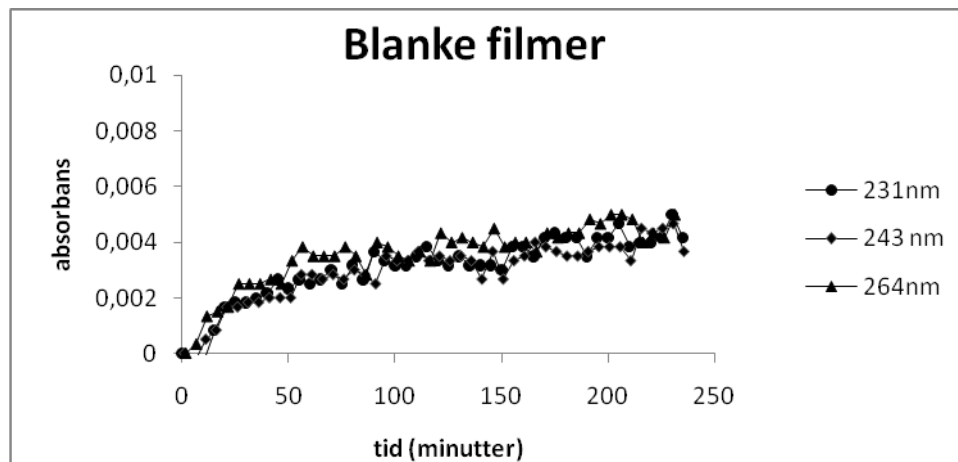
Innledende forsøk med automatiske målinger

Resultatet fra denne metoden var svært gode og ingen missfarging ble observert. Dette ble tilslutt metoden som viste seg mest egnet til å teste frisetting ut av filmene. Metoden er beskrevet i sin helhet i avsnitt 5.3.2.

Metodevalidering-frisetting

Blanke filmer

Som vist i Figur 21 ble det observert en liten økning i absorbans over tid for alle bølgelengdene. Absorbansen var svært lav, og det ble konkludert med at ingen av filmkomponentene (pektin, kitosan eller glyserol) interfererte med frisettingsmålingene.



Figur 21 "Frisettingsprofilene" til blanke filmene, kurvene viser gjennomsnittet av $n=6$ målinger foretatt ved hver bølgelengde.

Fordampning fra de ulike filmtypene ved tørking

Det var det ingen forskjell i resterende vekt etter tørking ved standard tørkebetingelser (se avsnitt 5.3.1) for de ulike filmtypene. Inkorporering av modellsubstans så derfor ikke ut til å påvirke fuktinnholdet i filmene ved disse tørkebetingelsene. Ulikt fuktinnhold kunne påvirket samsvaret mellom mengder funnet fra standardkurvene og teoretisk beregnede mengder (se avsnitt 6.3.2 under "frisetting").

Tabell 9 Fordampning fra de ulike filmene under tørking

	paracetamol	lidokain	ibuprofen	blank
vekt før støping (g)	37,73	37,78	37,79	25,85
vekt etter tørking (g)	0,57	0,57	0,56	0,38
% igjen etter tørking	1,51 %	1,52 %	1,49 %	1,48 %

Fordampning av 0,1M HCl ved oppgitte tørkebetingelser

I beregningene utført ble det antatt at 100ml 0,1M HCl pH 1 veide 100g.

$$\frac{36,5g/mol \times 0,1mol}{1000g} \times \text{utveid mengde } 0,1M \text{ HCl} = g \text{ HCl tilstede}$$

$$\frac{36,5g/mol \times 0,1mol}{1000g} \times 40,10603g = 0,1464g$$

Etter tørking var det 0,00216g igjen, dette utgjør 1,5 % av mengde HCl tilstedet før tørking. Det ble derfor antatt at tilnærmet all HCl fordampet ved tørkebetingelsene i denne oppgaven (se avsnitt 5.3.1).

6.2 Polymerkarakterisering

6.2.1 Pektin

Molekylvektbestemmelse av pektin

Utrenningstidene til de ulike fortyningene av HM-pektin i 1 % natriumheksametafosfat ble brukt til å bestemme Hugginskonstanten, og til å estimere størrelsesordenen av molekylvekten til HM-pektin benyttet.

Tabell 10 Utrenningstider HM pektin. Utrenningstidene vist er gjennomsnitt basert på n=3 målinger, konsentrasjonen er oppgitt i w/w %.

konsentrasjon	utrenningstid(sek.)	min/maks (sek.)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/C
(NaPO ₃) ₆	33,7	33,66 / 33,72			
0,30	129,583	129,50 / 129,69	3,846	2,846	9,487
0,25	106,39	106,35 / 106,45	3,158	2,158	8,630
0,20	87,253	87,24 / 87,27	2,590	1,590	7,948
0,15	73,113	73,10 / 73,12	2,170	1,170	7,800
0,10	55,287	55,28 / 55,29	1,641	0,641	6,409

Hugginskonstanten ble beregnet etter formelen $\eta_{sp}/c = [\eta] + k[\eta]^2 c$ til 0,505. Dette er theta betingelser, som vil si det er like mye frastøtning som tiltrekning i systemet [39].

1 % natriumheksametafosfat er derfor et egnet løsemiddel til å foreta

molekylvektberegninger i, noe som er i samsvar med annen litteratur [3, 18].

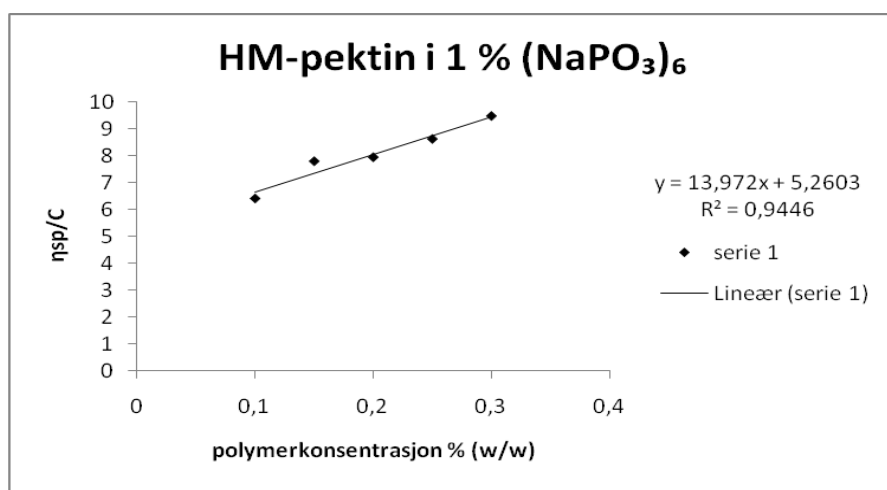
Molekylvekten ble deretter beregnet etter Mark-Houwink ligningen: $[\eta] = kM_v^a$. De

empiriske konstantene a og k ble satt til henholdsvis 1 og $4,7 \cdot 10^{-5}$ [75].

Molekylvekten ble funnet å være $1,1 \cdot 10^5$ Da, noe som er i samsvar med annen

litteratur [35]. Enheten til egenviskositeten er oppgitt i volum per vekt [38]. Som

beskrevet i avsnitt 5.2.1 ble det her benyttet vekt per vekt prosent. Antagelsen om at 1 ml polymerløsning veier 1g er derfor gjort for beregningene over.



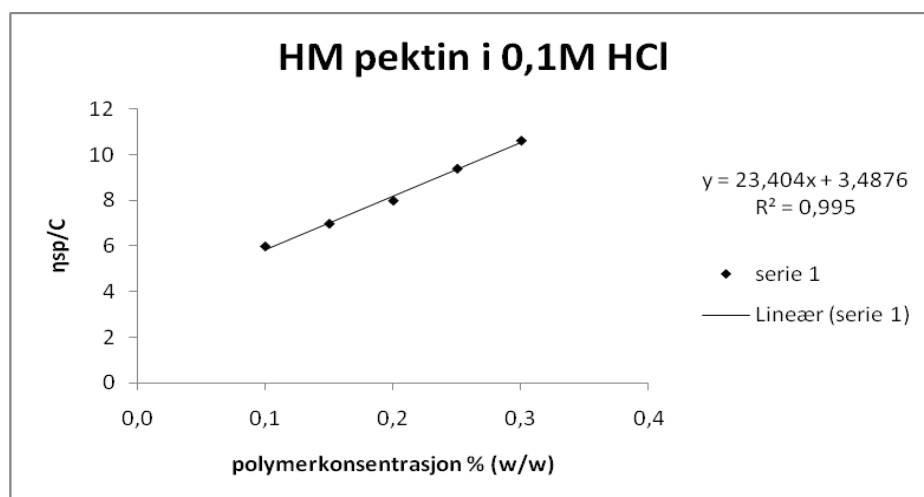
Figur 22 Redusert viskositet plottet mot polymerkonsentrasjon. (Tallene er hentet fra Tabell 10.)

Bestemmelse av Hugginskonstanten til HM pektin i 0,1M HCl

Tabell 11 Utrenningstider for HM pektin. Utrenningstidene er vist som gjennomsnitt av n=4 målinger. Konsentrasjonen er oppgitt i w/w %.

konsentrasjon	utrenningstid (sek.)	Min / maks (sek.)	η _r	η _{sp}	η _{sp} /C
0,1M HCl	32,115	32,10 / 32,14			
0,30	134,228	134,05 / 134,48	4,180	3,180	10,599
0,25	107,345	107,23 / 107,42	3,343	2,343	9,370
0,20	83,268	83,22 / 83,36	2,593	1,593	7,964
0,15	65,610	65,53 / 65,61	2,043	1,043	6,953
0,10	51,243	51,13 / 51,54	1,596	0,596	5,956

Hugginskonstanten ble beregnet (som beskrevet i forrige avsnitt) til 1,924. En høy Hugginskonstant indikerer dårlige termodynamiske forhold i det aktuelle løsemiddelet [39]. Det kan antas at pektin aggregerer som følge av stor intramolekylær tiltrekning mellom pektinkjedene, som følge av blant annet redusert frastøtning på grunn av protonering av galakturonsyreenhetene (avsnitt 3.1.1).



Figur 23 Redusert viskositet plottet mot polymerkonsentrasjon. (Tallene er hentet fra Tabell 11.)

6.2.2 Kitosan

Bestemmelse av Hugginskonstanten til kitosan i 0,1M HCl

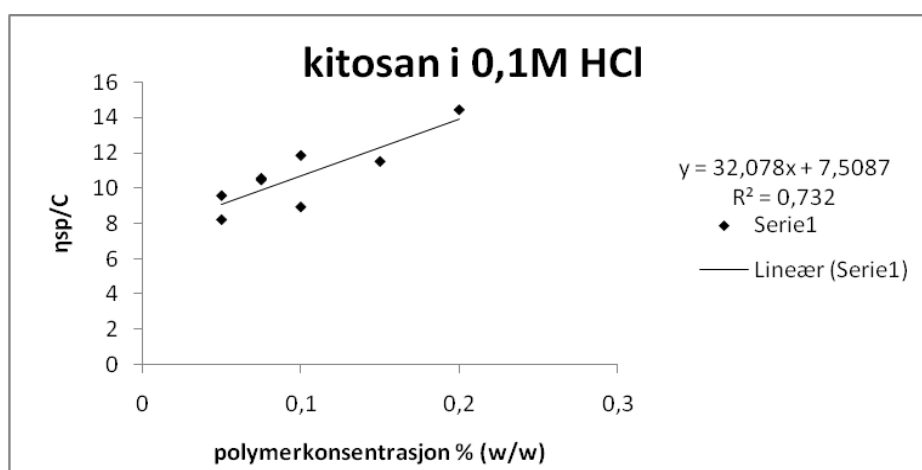
Kitosan benyttet i denne oppgaven hadde en molekylvekt mellom 190000-310000Da og en Dda på 80 % (Informasjon oppgitt fra produsent, se avsnitt 4.2).

Forsøket (vår og høst)

Ved pH under 4,5 er kitosan et polykation og fullstendig protonert [27, 76]. Basert på dette ble det antatt 0,1M HCl pH 1 var et godt løsemiddel for kitosan. Da apparatet var i ustand på våren ble forsøket utført igjen på høsten. Resultatene er vist som gjennomsnitt fra de to forsøkene. Hugginskonstanten ble beregnet til 0,57, som beskrevet i avsnitt 6.2.1. Dette er theta betingelser [39], som viste at 0,1M HCl pH 1 var et termodynamisk godt løsemiddel for kitosan.

Tabell 12 Utrenningstider for kitosan. Utrenningstidene merket * er gjort på våren. De vises her som gjennomsnitt fra n=3 målinger på våren og n=4 målinger på høsten. Målingene gjort på våren ble utført manuelt. Konsentrasjonen er oppgitt i w/w %.

Konsentrasjon	Utrenningstid (sek.)	min / maks (sek.)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/C
0,2	300,20	300,0 / 300,6	3,889	2,889	14,443
0,15	212,35*	211,94 / 213,08	2,730	1,730	11,530
0,1	146,40*	146,40 / 146,40	1,896	0,896	8,964
0,1	170,15	169,95 / 170,48	2,187	1,187	11,871
0,0750	137,93*	137,40 / 138,20	1,787	0,787	10,489
0,0750	139,56	139,42 / 139,88	1,794	0,794	10,584
0,05	114,27*	114,00 / 114,40	1,480	0,480	9,603
0,05	109,88	109,85 / 109,95	1,412	0,412	8,248



Figur 24 Redusert viskositet plottet mot kitosan konsentrasjon.

Av Figur 24 sees det at målingene gjort for 0,1 % (w/w) er svært ulike for de to forsøkene. Dette bidrar til korrelasjonen (r^2) på 0,732 til regresjonslinja. Dette er ikke en svært god r^2 , men det gode samsvaret mellom resultat og teoretiske antagelser gjorde at en tredje måling ikke ble foretatt.

6.3 Filmer

6.3.1 Filmfremstilling

Filmene fremstilt etter metoden beskrevet i avsnitt 5.3.1 hadde god kvalitet. Forhold under tørking førte imidlertid til en noe varierende filmtykkelse i hver film (se avsnitt 6.3.3). Der filmtykkelsen ble antatt å ha betydning på resultatene ble det forsøkt å korrigere for ulik tykkelse i resultatene. Tørketiden var på rundt 48 timer, og det ble aldri observert vekst i filmene. Filmene var noe sprøe og sprakk lett opp i kantene ved utskjæring til forsøk. Ibuprofenfilmene var de eneste filmene hvor små partikler var synlige, det ble antatt å være uløst ibuprofen.

6.3.2 Filmkarakterisering

Mekaniske egenskaper

Respons

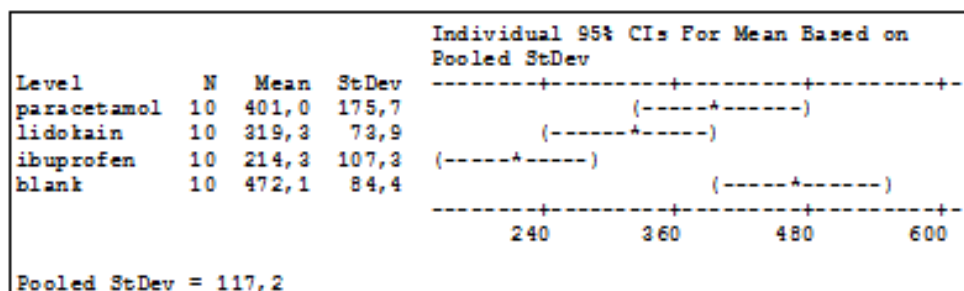
Som respons ble $F/t \cdot b$ benyttet for tensile-test og $F/t \cdot d$ benyttet for puncture-test. F var maks kraft (N), t var filmtykkelse (mm), b var filmbredden til filmene (1,2cm) og d var diameteren til hullet (1,4cm). Denne responsen viste seg å være den mest egnede (se avsnitt 7.1 under "*mekaniske egenskaper*") og muliggjorde en direkte sammenligning av resultatene fra tensile-test og puncture-test. Dette målet for respons er beskrevet av T. Bussemer et al. [40]. På grunn av den store spredningen på resultatene var det ikke mulig å ekskludere noen observasjoner som uteliggere etter $1,5 \cdot \text{IQR}$ prinsippet (hvis en observasjon befinner seg $1,5 \cdot \text{IQR}$ over den tredje kvartilen eller under den første kvartilen kan observasjonen merkes mulig uteligger [77]).

Tensile-test

Innledende forsøk

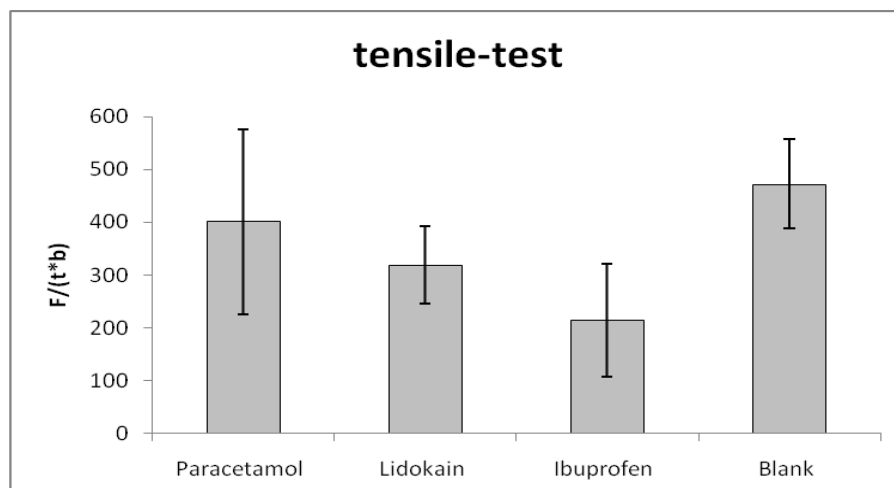
Ved utskjæring av filmbitene var sprøheten til filmene et problem. Selv svært små uregelmessigheter i kantene førte til for tidlig brudd i filmene, bare filmbiter med helt fine kanter var brukbare til analysen. Av praktiske årsaker ble filmbiter på 1,2*4,5cm benyttet, da de var enkle å feste til teksturmåleren (Figur 14).

Hovedforsøk



Figur 25 ANOVA med Tukeys metode for tensile-test resultatene.

Som Figur 25 viser hadde paracetamol og blanke filmer en signifikant høyere mekanisk styrke enn ibuprofenfilmene.

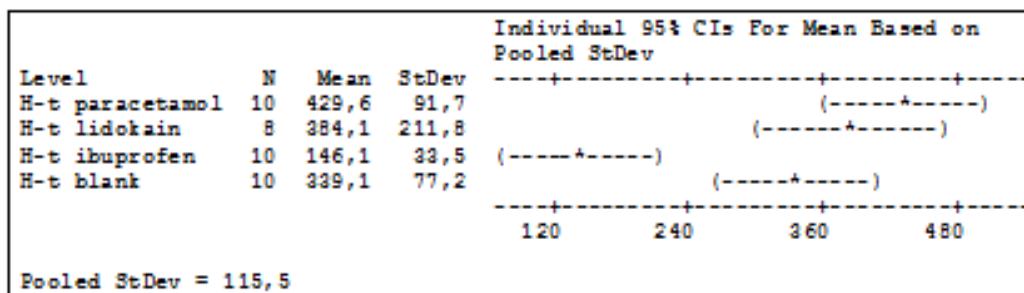


Figur 26 $F/(t*b)$ for tørre filmer med tensile-test. Gjennomsnittet av $n=10$ målinger vises, feilfeltet viser standardavviket.

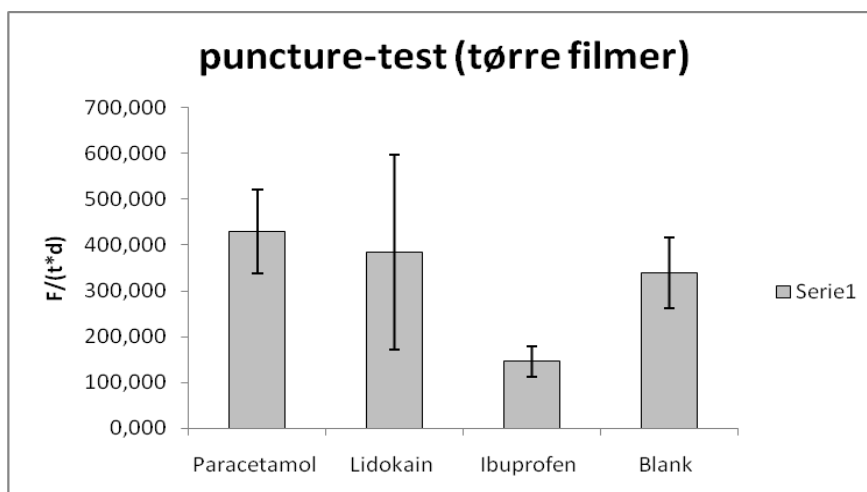
Puncture-test

Tørre filmer

Rent praktisk var puncture-testen langt enklere å benytte enn tensile-test. Dette på grunn av lavere sensitivitet for små sprekker langs filmkantene. Som det sees av Figur 27 hadde tørre ibuprofenfilmer også her den laveste mekaniske styrken.



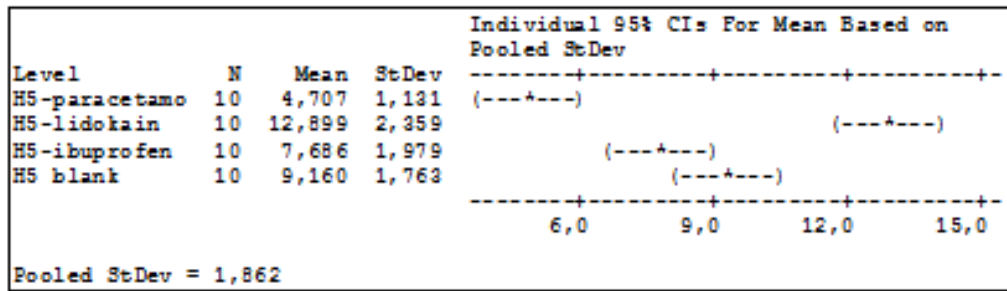
Figur 27 ANOVA med Tukeys metode for puncture-test på tørre filmer



Figur 28 $F/(t*d)$ for tørre filmer med puncture-test. Gjennomsnittet av $n=10$ målinger vises og feilfeltet viser standardavviket.

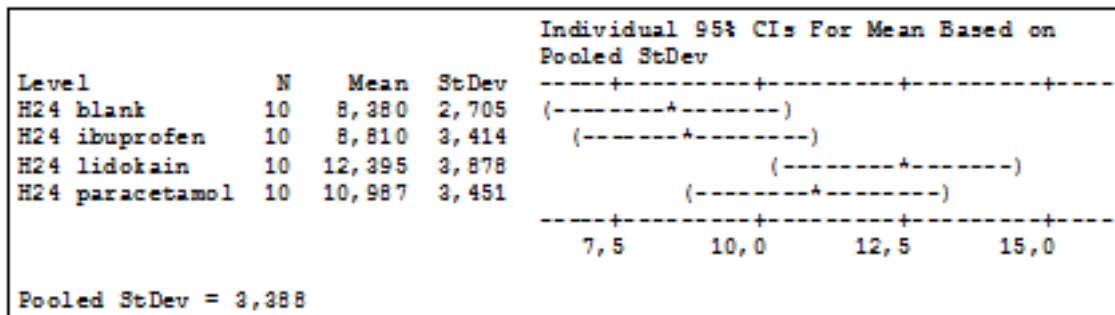
Filmer etter t-50 og 24 timer i fosfatbuffer

Etter t-50 i fosfatbuffer hadde paracetamolfilmene den laveste og lidokainfilmene den høyeste mekaniske styrken (se Figur 29).

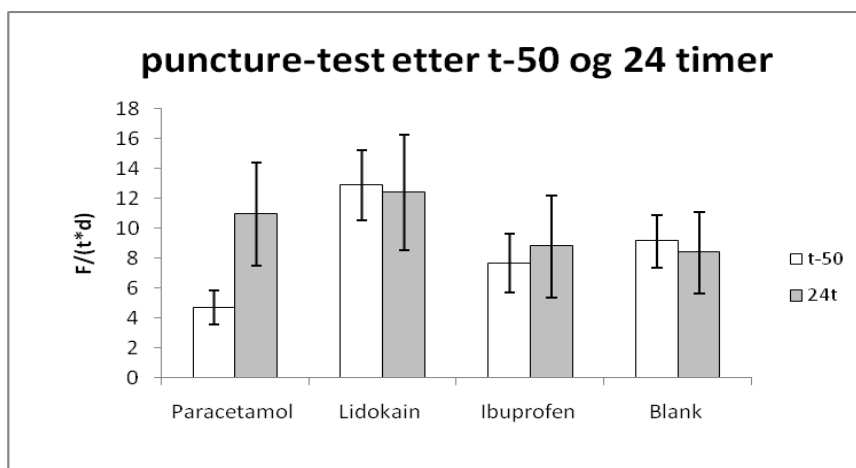


Figur 29 ANOVA med Tukeys metode for puncture-test på filmer etter t-50 i fosfatbuffer

Etter 24 timer i fosfatbuffer var det ingen signifikant forskjell i responsen mellom de ulike filmtypene (Figur 30). Den mekaniske styrken ble redusert betraktelig etter t-50 og 24timer i fosfatbuffer pH 6,8 sammenlignet med tørre filmer.



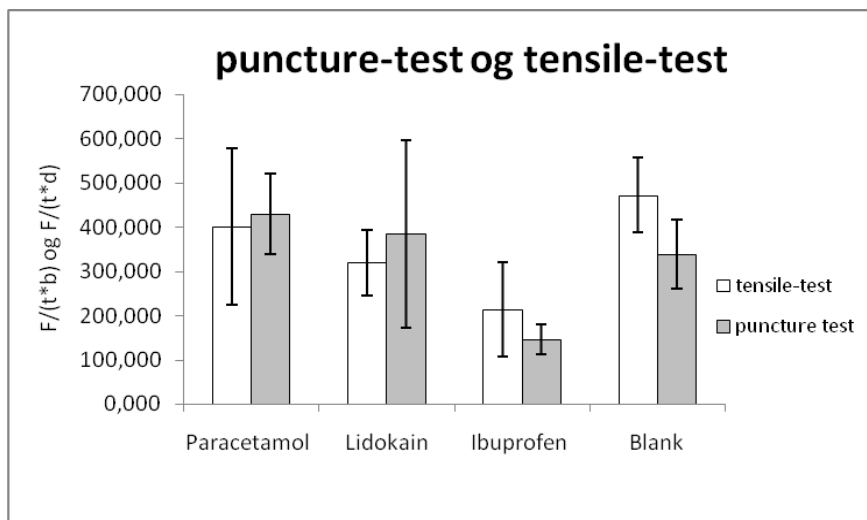
Figur 30 ANOVA med Tukeys test for puncture-test på filmer etter 24 timer i fosfatbuffer.



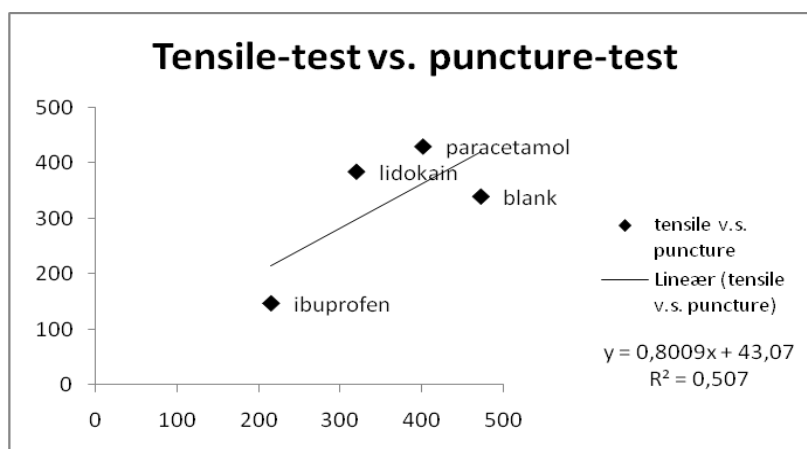
Figur 31 Puncture-test for fuktetidene t-50 og 24timer. Gjennomsnittet av n=10 målinger vises og feilfeltet viser standardavviket

Tensile-test vs. puncture-test

Som det sees av Figur 33 var det en korrelasjon (r^2) mellom metodene på 0,507. Dette er ikke en svært god korrelasjon. Men indikerer at metodene ga en viss grad av tilsvarende informasjon.



Figur 32 Gjennomsnitt av $n=10$ målinger vises, feilfeltet viser standardavviket. Sammenligningen ble utført med tørre filmer

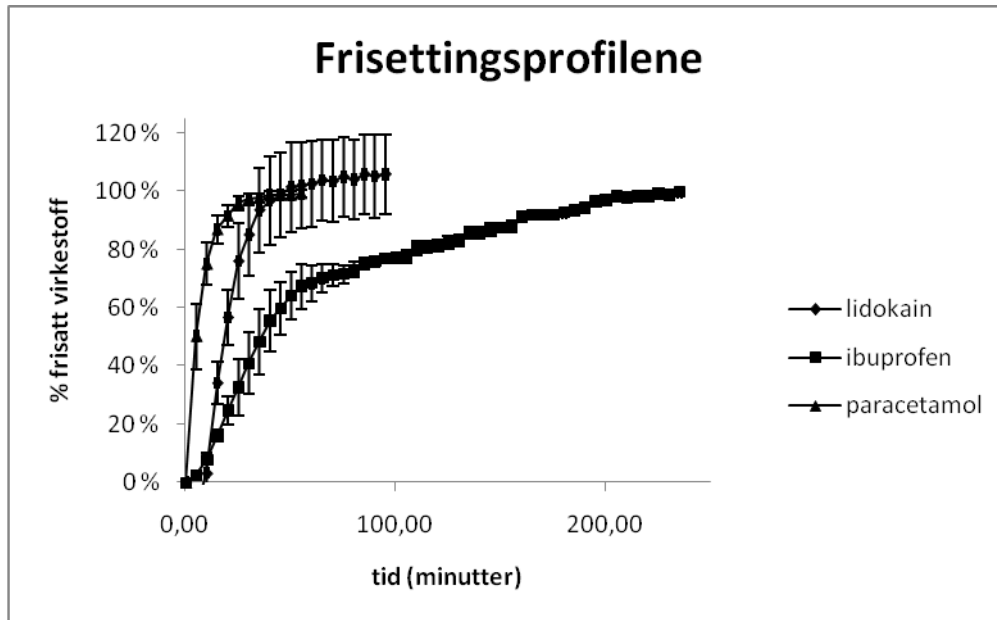


Figur 33 Korrelasjon mellom $F/(t*d)$ for puncture-test og $F/(t*b)$ for tensile-test. Tallene er gjennomsnitt basert på $n=10$ målinger

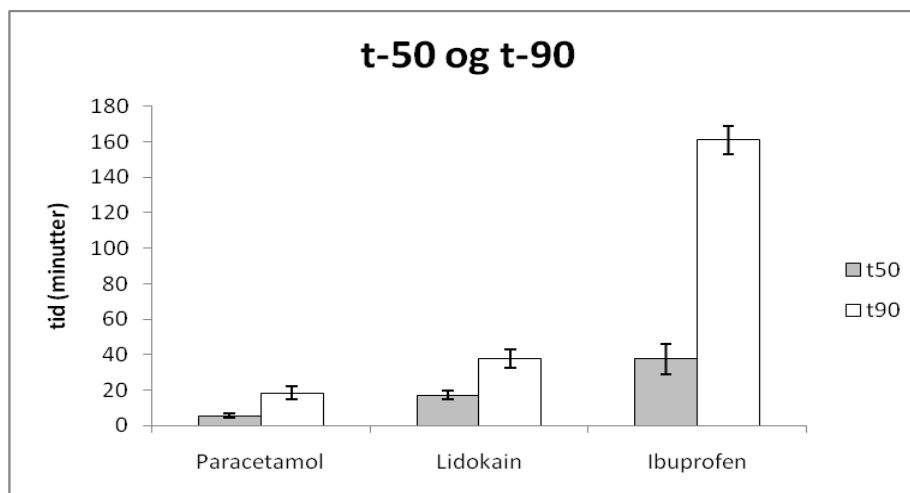
Frisetting

T-50 og t-90 ble benyttet som mål på frisettingshastigheten. De fullstendige frisettingsprofilene kan sees i vedlegg 4 (Figur 34 viser bare de relevante delene for

hver frisettingsprofil). Den høyeste absorbansen for hver parallell ble satt til den parallellens 100 % verdi, gjennomsnittet av de verdiene utgjør 100 % verdiene for de ulike filmtypene.



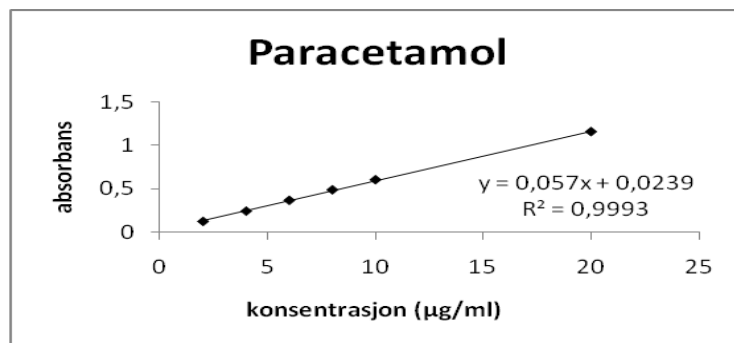
Figur 34 Frisettingsprofilene for lidokain, ibuprofen og paracetamol. Hver kurve er gjennomsnitt av n=6 målinger, feilfeltet som vises er standardavviket til målingene.



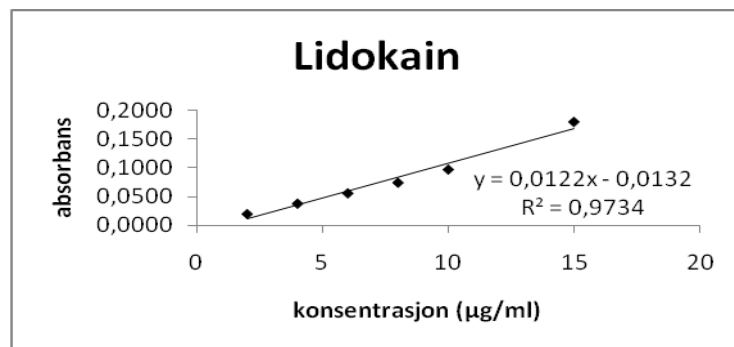
Figur 35 t50 og t90 til paracetamol, lidokain og ibuprofen. Gjennomsnittet av n=6 målinger vises, standardavviket vises som feilfelt.

Tabell 13 Teoretisk beregnede mengde mot mengdene funnet ut fra standardkurvene (seks paralleller for hver modellsubstans).

Paracetamol						
Mengde fra standardkurve (mg)	1,58	2,79	1,06	1,35	0,56	1,51
Teoretisk beregnet mengde (mg)	4,85	7,05	3,88	4,14	3,54	6,08
Lidokain						
Mengde fra standardkurve (mg)	4,62	15,56	6,18	6,18	5,53	26,25
Teoretisk beregnet mengde (mg)	7,12	6,92	7,69	6,26	8,14	8,32
Ibuprofen						
Mengde fra standardkurve (mg)	10,43	9,94	11,67	10,93	11,67	9,69
Teoretisk beregnet mengde (mg)	10,53	11,24	12,55	9,61	11,12	12,29

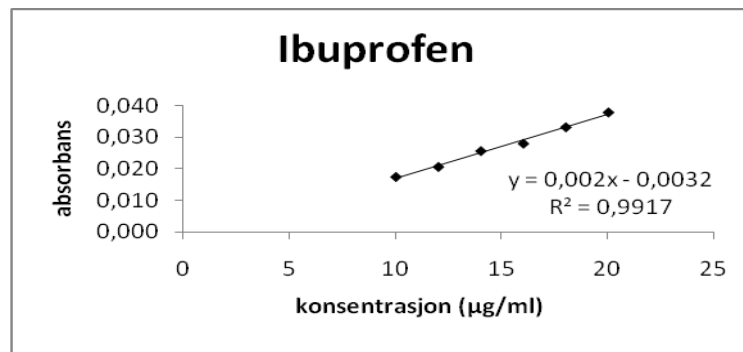


Figur 37 Standardkurve vises som gjennomsnitt av n=6 målinger.



Figur 38 Standardkurve vises som gjennomsnitt av n=6 målinger.

Figur 38 viser at standardkurven for lidokain ”knekker” etter 10µg/ml. Den maksimale teoretiske konsentrasjonen lidokain pr. frisettingsbeger ble satt til 7,901µg/ml. Da det er under ”knekken” ble standardkurven vurdert som akseptabel.



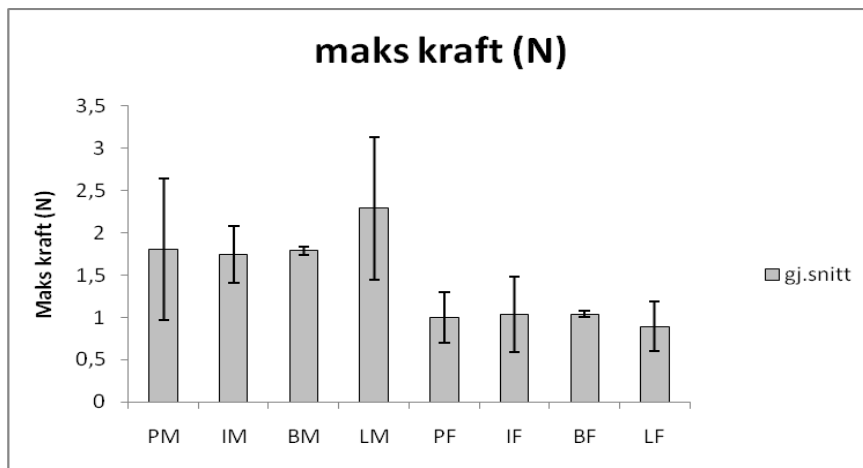
Figur 39 Standardkurve vises som gjennomsnitt av $n=6$ målinger.

Mucoadhesjon

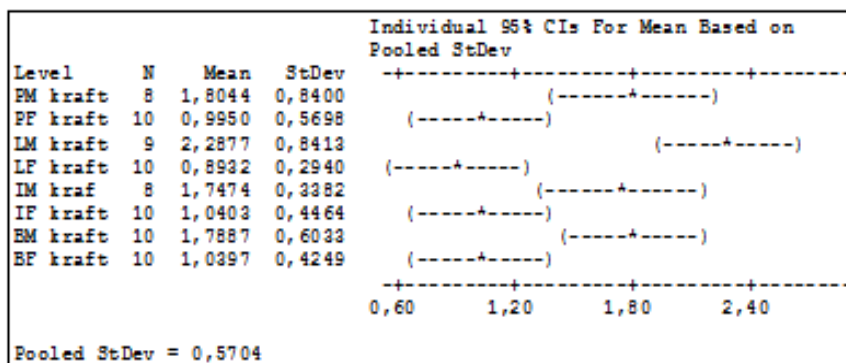
Respons

Maks kraft (N) og areal (AUC, N*mm) ble benyttet som mål på mucoadhesjon i denne oppgaven. Areal under kurven estimerte arbeidet som krevdes for å rive løs filmen fra underlaget. Maks kraft estimerte den maksimale kraften nødvendig for å rive løs filmen fra underlaget [18]. Verdiene som ble funnet ved å teste filmene mot fosfatbuffer pH 6,8 kalles uspesifikk adhesjon. Og verdiene funnet ved å teste filmene mot mucin kalles generell adhesjon. Til å estimere mucininteraksjon trekkes den uspesifikke adhesjonen fra den generelle adhesjonen [2]. Alle observasjoner som falt $1,5 \cdot \text{IQR}$ over tredje kvartil eller under første kvartil ble ekskludert som uteliggere.

Hovedforsøk

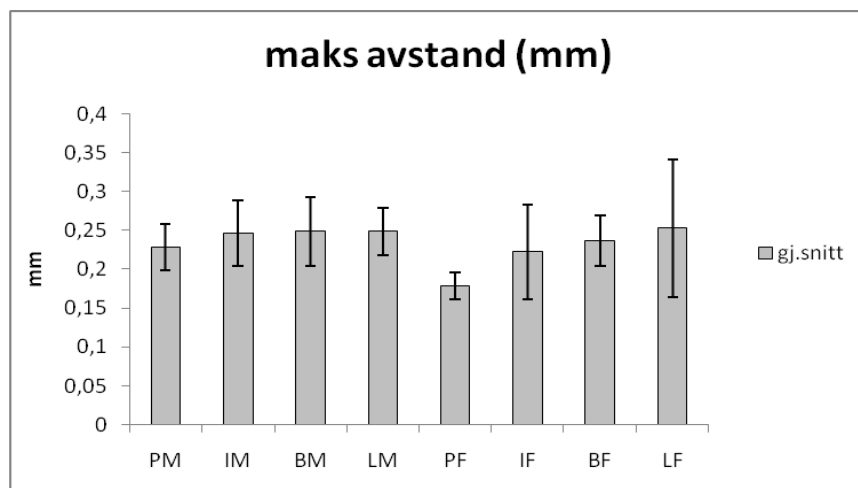


Figur 40 Maks kraft (N) vist som gjennomsnittet av n=10 målinger, feilfeltet viser standardavviket. P=paracetamol, I=ibuprofen, L=lidokain, B=blank. M indikerer at det er testet mot mucin, F indikerer at det er testet mot fosfatbuffer.

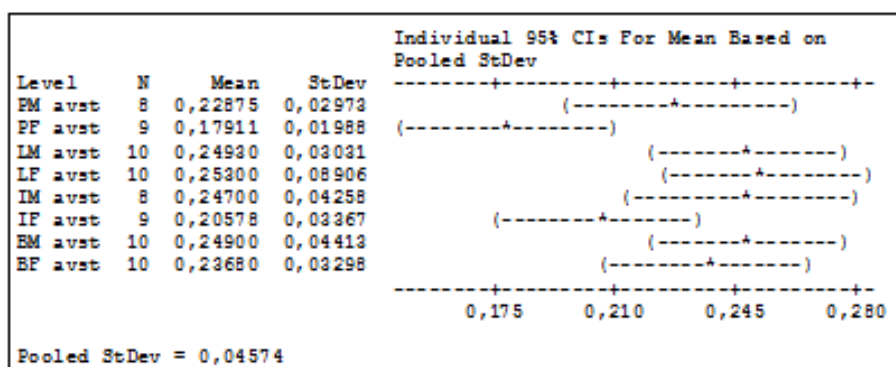


Figur 41 ANOVA med Tukeys metode for maks kraft.

For lidokain og blanke filmer var det signifikant forskjell mellom generell og uspesifikk maks kraft nødvendig for å separere film fra substrat. Det var ikke mulig å skille mellom de ulike filmtypene for verken den generelle eller uspesifikke maks kraften.

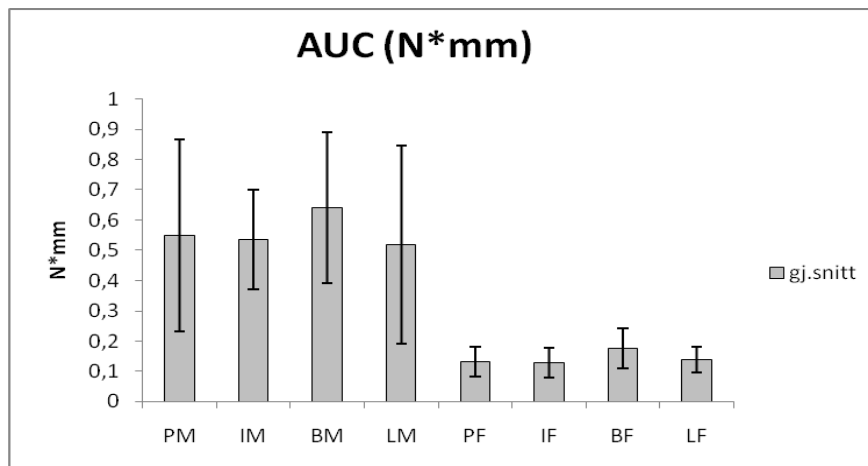


Figur 42 Maks avstand (mm) vist som gjennomsnittet av $n=10$ målinger, feilfeltet viser standardavviket. P=paracetamol, I=ibuprofen, L=lidokain, B=blank. M indikerer at det er testet mot mucin, F indikerer det er testet mot fosfatbuffer

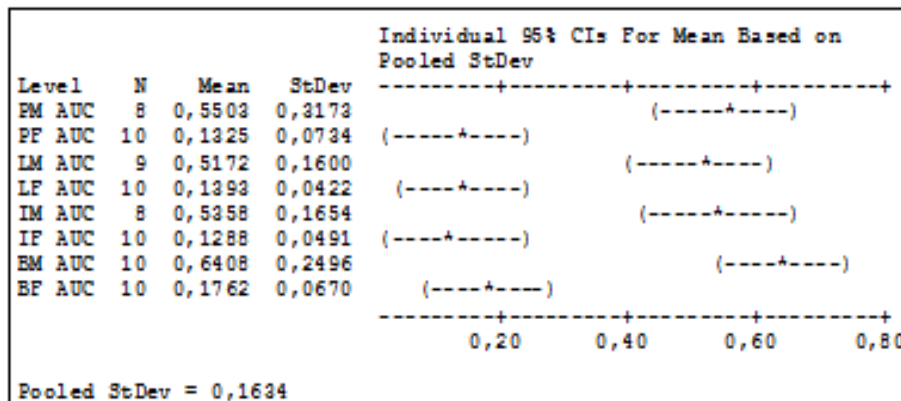


Figur 43 ANOVA med Tukeys metode for maks avstand

Maks avstand kan indikere hvor mye filmene eller mucin/fosfatbuffer løsningene ble strukket før de ble separert. Det var ikke mulig å se noen forskjeller mellom de ulike filmtypene.

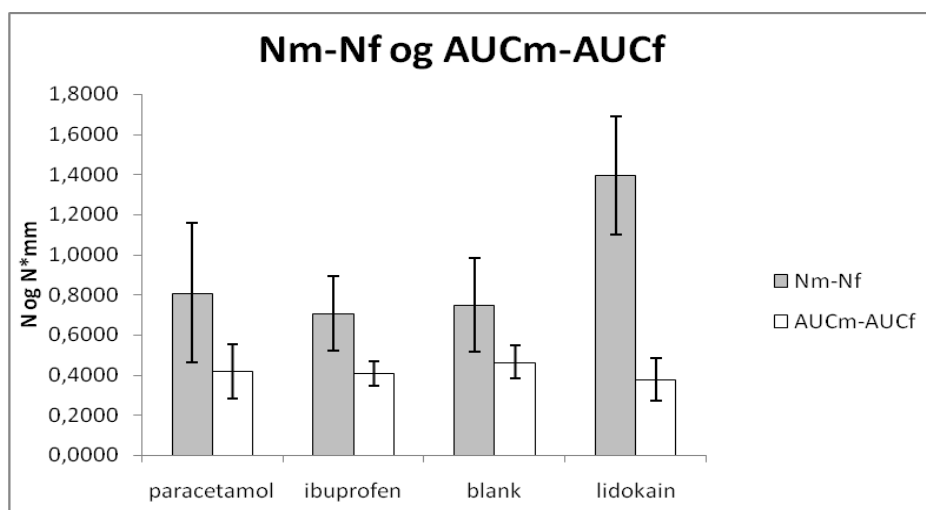


Figur 44 Maks AUC (N*mm) vist som gjennomsnittet av n= 10 målinger, feilfeltet som oppgis er standardavviket. P=paracetamol, I=ibuprofen, L=lidokain, B=blank. M indikerer at det er testet mot mucin, F indikerer det er testet mot fosfatbuffer.



Figur 45 ANOVA med Tukeys metode for AUC.

For AUC var alle testet mot mucinløsning signifikant høyere enn filmer testet mot fosfatbuffer pH 6,8. Det var imidlertid ikke mulig å skille mellom de ulike filmtypene.



Figur 46 Spesifikk maks kraft (N) og AUC for de ulike filmtypene, tallene som vises er basert på differansen mellom de generelle og uspesifikke målingene (alle målingene er gjennomsnitt av $n=10$ målinger). Feilfeltet som vises er standardfeilen til differansen.

De spesifikke verdiene ble analysert som beskrevet i avsnitt 5.3.2, side 56. Da lidokain var den eneste filmtypen som skilte seg ut (se Figur 46), ble hypotesene 1-3 testet med en toutvalgs t-test, som beskrevet i avsnitt 5.3.2. Tallene som ble plassert inn i formelen (beskrevet i avsnitt 5.3.2) ble hentet fra Tabell 14.

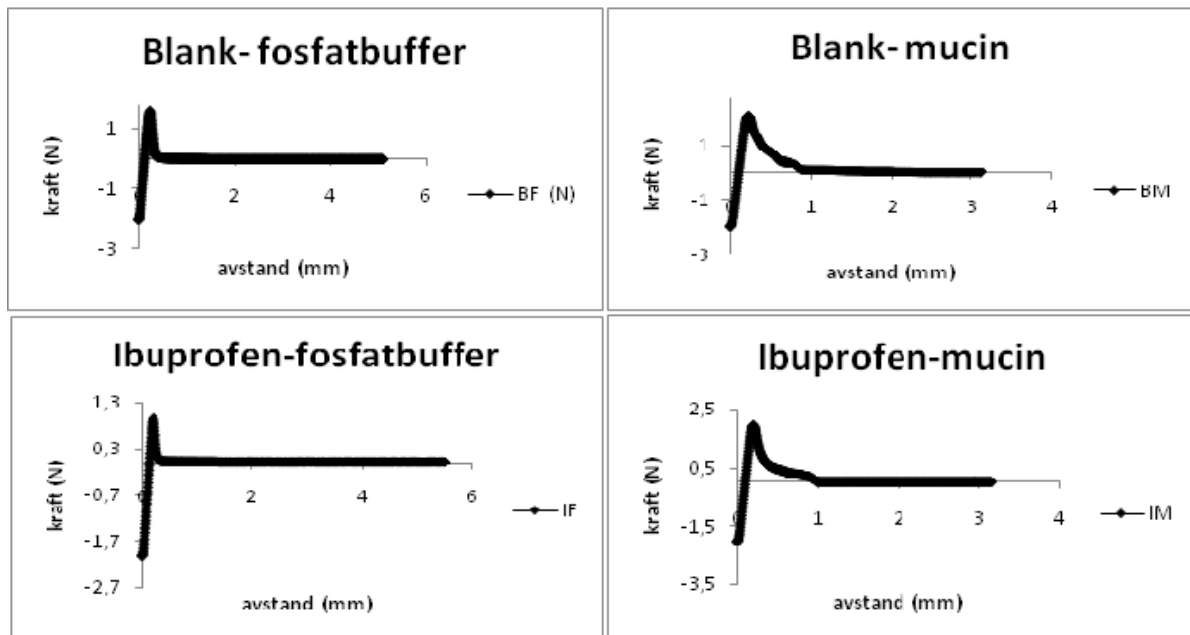
Tabell 14 Tallene som ble plassert i formelen beskrevet i avsnitt 5.3.2, for de ulike hypotesene (1-3) som ble testet.

	x_1	x_2	SFD ₁	SFD ₂
1 Lidokain mot ibuprofen	1,3945	0,7071	0,2954	0,1850
2 Lidokain mot paracetamol	1,3945	0,8094	0,2954	0,3474
3 Lidokain mot blank	1,3945	0,7490	0,2954	0,2334

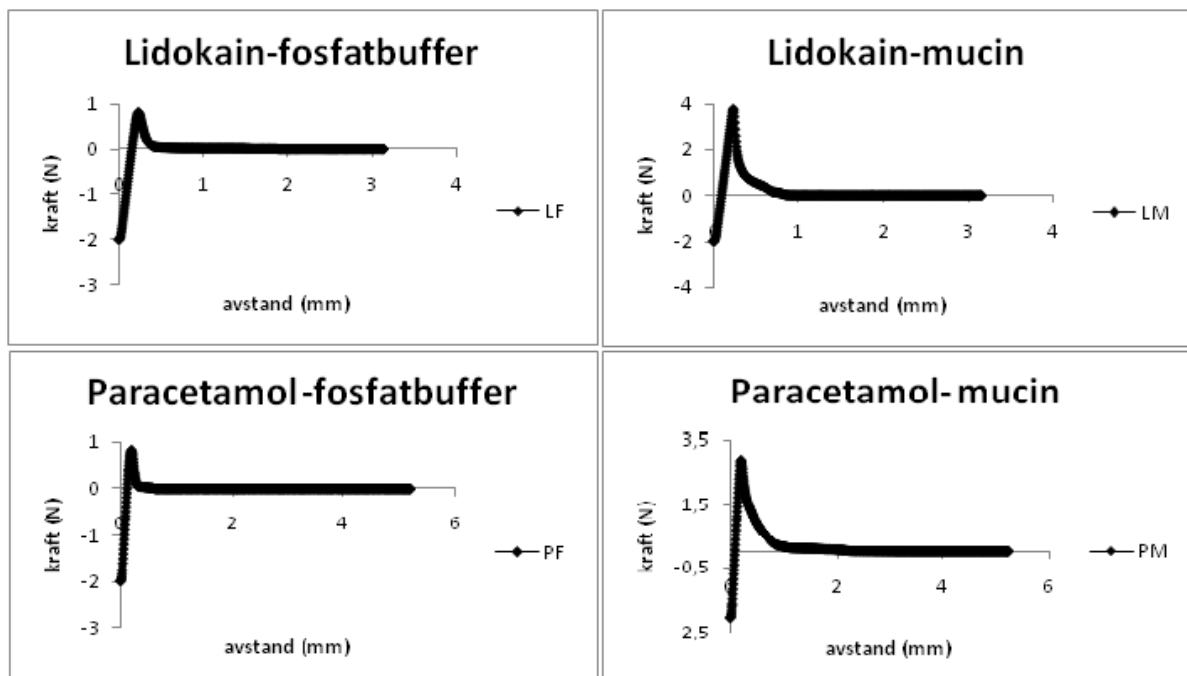
Under vises p-verdiene for de ulike hypotesene:

1. $p > 0,05$
2. $p < 0,15$
3. $p < 0,10$

Ut fra det valgte signifikansnivået på 0,05 (se avsnitt 5.3.2) var det ikke mulig å forkaste H_0 . Ingen signifikante forskjeller mellom filmtypene ble dermed observert for noen av responsene.



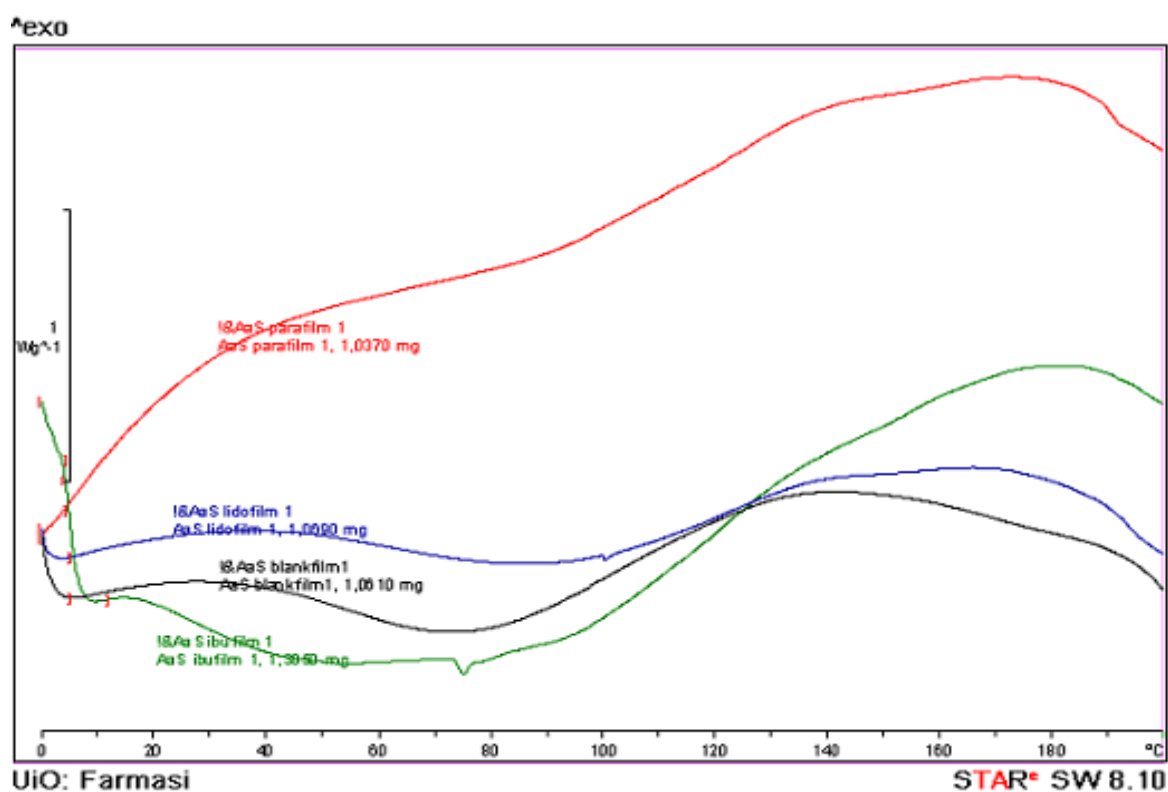
Figur 47 Typiske profiler for blanke og ibuprofenfilmer. En representativ kurve ble valgt ut fra de 10 parallellene kjørt for hver serie.



Figur 48 Typiske profiler for paracetamol og lidokainfilmer. En representativ kurve ble valgt ut fra de 10 parallellene kjørt for hver serie.

Differential Scanning Calorimetry

De ulike termogrammene vises i vedlegg 5-8. Termogrammene av prøvene 7-16 (se avsnitt 5.3.2 under ”termal analyse”) ble ikke tatt med da de bare viste ”rette linjer”. Det var ikke mulig å konkludere med annet enn at det ikke var mulig å se noen endringer, som ikke er entydig med at det ikke har skjedd noen endringer. Men som heller ikke beviser at det har skjedd noe. Som vist i Figur 49 skilte paracetamolfilmen seg fra de andre filmene. Den lille endoterme reaksjonen observert for ibuprofenfilmen stemmer overens med smeltepunkt for ibuprofen (75-78 °C [78]). Årsaken til dette kan være at det bare er i ibuprofenfilmer det fremdeles finnes uløst virkestoff tilstede i tørre filmer. Det stemmer overens med visuelobservasjon under filmstøping (avsnitt 6.1.3).



Figur 49 Termogram til de ulike filmtypene analysert med metode 1.

6.3.3 Tilleggsforsøk

I forbindelse med spørsmål som dukket opp i diskusjons og resultat delen ble noen tilleggsforsøk utført avslutningsvis (forsøkene er ikke beskrevet i kapittel 5 metoder).

Kryssbinding

Det var ønskelig å finne ut mer om når den foreslåtte kryssbindingen mellom pektin og kitosan fant sted.

Forsøket

En filmbit av hver type ble plassert i 0,1M HCl pH 1. Etter 5 minutter var alle filmene fullstendig oppløste, vurdert visuelt. Dette indikerer at sterke interaksjoner mellom pektin og kitosan først fant sted når filmen kom i kontakt med fosfatbuffer pH 6,8. I litteraturen er hydrofobe interaksjoner mellom pektin og kitosan ved sure betingelser foreslått [3].

Deretter ble en blank filmbit plassert i en liter fosfatbuffer pH 6,8. Filmen var intakt i over 24 timer. Dette er i samsvar med observasjoner gjort under metodeutviklingen. Hvor filmene var intakte ved 24 timers målingen ved frisetting (avsnitt 5.1.4).

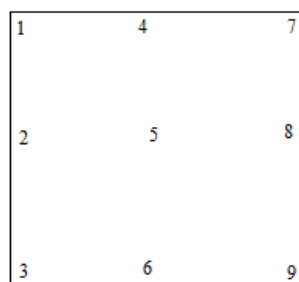
Filmtykkelse

Hensikt

På bakgrunn av det dårlige samsvaret mellom teoretisk beregnede mengder og faktiske mengder funnet i film bitene ble en teori om løsemiddelmigrasjon foreslått (se avsnitt 7.2). Variasjon i filmtykkelse ble derfor kontrollert.

Forsøket

En filmbit av hver filmtype ble målt på punkter skissert under.



Figur 50 punktene 1-9 indikerer hvor filmtykkelsen ble målt på filmen.

Resultater

Som det sees av Tabell 15 ble det observert en variasjon i filmtykkelsen.

Tabell 15 Oversikt over filmtykkelser målt ved punkt 1-9 (vist i Figur 50) alle tallene er oppgitt i mm (P=paracetamol, L=lidokain, I=ibuprofen og B=blank).

punkt	P	L	I	B	punkt	P	L	I	B
1	0,06	0,03	0,035	0,05	6	0,07	0,05	0,05	0,035
2	0,08	0,04	0,045	0,07	7	-	0,12	0,12	0,03
3	0,11	0,08	0,06	0,035	8	0,15	0,095	0,09	0,04
4	0,05	-	0,07	-	9	0,09	0,115	0,07	0,04
5	0,08	0,045	0,08	0,07					

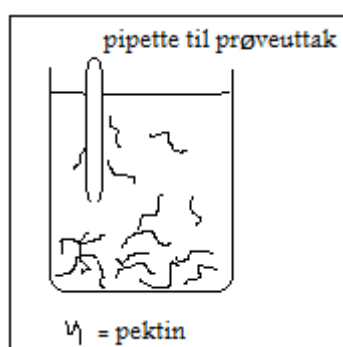
7. Diskusjon

7.1 Forsøkene

Bestemmelse av sentrifugeringstiden til pektin

Økt utrenningstid

En lik eller redusert utrenningstid var forventet for de ulike sentrifugeringstidene. En økt utrenningstid ble imidlertid observert for økende sentrifugeringslengde (avsnitt 6.1.1, Tabell 6). En mulig forklaring på dette kan være dannelse av sjikt, eller at det ved prøveuttak (avsnitt 5.1.1) ikke ble tatt ut et homogent område, at det tilfeldigvis ble tatt ut et område med noe større/mindre polymerkonsentrasjoner enn andre områder ved de ulike prøveuttakene.



Figur 51 Skisse av hvordan prøveuttak til utrenningstid og absorbansmålinger ble foretatt.

Når ingen reduksjon i utrenningstid ble observert, var det ingen tegn på at pektin var blitt ødelagt av sentrifugeringen. Sentrifugeringstiden for opprensning av pektin ble satt til 2*60 minutter (avsnitt 5.2.1).

Frisetting

Paracetamol degradering

I etterkant av utvikling av egnet frisettingsmetode (avsnitt 5.1.4) ble missfargingen, ”metallgittermønsteret” og de rødbrune partiklene observert (avsnitt 6.1.4) knyttet til paracetamolfilmene. Det skjedde ved tillaging av standardkurver, hvor en stamløsning med paracetamol ved en feil ble stående i tre dager. En kraftig rødbrun farge (tilsvarende fargen sett under metodeutviklingen) ble sett på hele løsningen.

Initialt ble missfargingen, ”metallgittermønsteret” og de rødbrune partiklene knyttet opp mot pektin i filmene. Pektin kryssbindes av divalente kationer [7, 79] og en reaksjon mellom pektin og toverdug jern ble foreslått som årsaken (avsnitt 6.1.4). Det ble antatt jern påvirket nettverksstrukturen til pektin-kitosan kombinasjonsfilmene og at dette kunne interferere med frisettingsforsøkene. Puddle med metallgitter metoden ble derfor vurdert som uegnet på grunn av tilstedeværelse av jern (avsnitt 6.1.4).

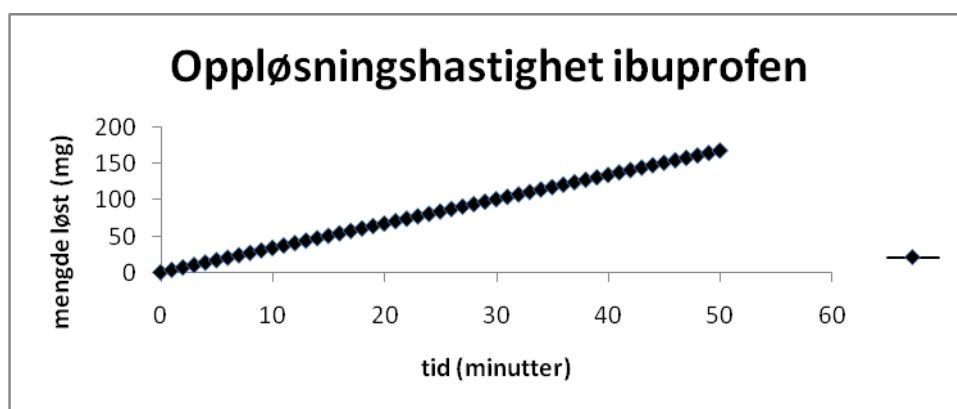
Da missfarging, ”metallgittermønster” og små rødbrune partikler ble knyttet til paracetamolfilmer ble degradering av paracetamol foreslått som en mulig forklaring. Under hovedforsøket ble ingen endringer observert. En mulig degradering antas derfor å være avhengig av tiden paracetamol befant seg i fosfatbuffer, da det bare ble observert to ganger under metodeutviklingen (avsnitt 5.1.4). Jern er beskrevet som en katalysator [80], og muligheten for at jern katalyserte en eventuell nedbygning av paracetamol er tilstedet.

Selv om det i etterkant kan se ut som beslutningen om å eliminere jern fra frisettingsapparatet ble tatt på feil grunnlag, virker det likevel som en riktig beslutning. Da jern kunne ha påvirket paracetamolfilmene, noe som ville vanskeliggjort sammenligning av frisettingsprofilene til de ulike modellsubstansene.

Metodevalidering

Ibuprofen viste en signifikant lavere frisettingshastighet enn de andre filmtypene. Det ble kontrollert at dette ikke skyldes en lav oppløsningshastighet og løselighet. Basert på Shaw et al. [61] artikkel ble en beregning av oppløsningshastigheten til ibuprofen foretatt. Ibuprofenpartikler var synlige ved filmstøping, basert på dette ble diameteren på ibuprofenpartiklene satt til 100 μ m i beregningene. Reduksjon i partikkelstørrelse over tid ble ikke tatt hensyn til i beregningene.

Av Figur 52 sees det at den teoretisk maksimale mengden ibuprofen tilstedet per filmbit (12,55mg jamfør Tabell 13) var løst innen 5 minutter. Ibuprofen har også den laveste løseligheten av modellsubstansen (avsnitt 3.5). Likevel skal 1945 mg ibuprofen være mulig å løse i 500 ml fosfatbuffer [61], dette er langt mer enn den maksimale teoretiske mengden tilstedet (Tabell 13). På bakgrunn av dette ble det konkludert med at frisettingsprofilen for ibuprofen ikke var en følge av lav oppløsningshastighet eller løselighet.



Figur 52 Teoretisk beregnet oppløsningshastighet for ibuprofen ved pH 6,8. Basert på L.R.Shaw et al. [61] artikkel hvor en IDR på 0,3537mg/min*cm² ble funnet i fosfatbuffer pH 6,8.

Frisettingsprofilene

Frisettingsprofilen til lidokain (Figur 34) hadde den største spredningen. Av vedlegg 4 sees det at parallell 4 og 6 skiller seg ut fra de andre målingene. Årsaken til den høye absorbansen observert for de parallellene ble ikke klarlagt.

Frisetting av ibuprofen ble målt ved 264nm [81]. Det viste seg i etterkant at dette var et noe uheldig valg, og at en annen bølgelengde kunne vært valgt for å få en høyere absorbans (se vedlegg 1 hvor alternativ bølgelengde er markert). Lave absorbansverdier gjorde at frisetting fra ibuprofenfilmer ble målt i halv mengde fosfatbuffer (avsnitt 6.3.2). Mulige svakheter med frissettingsmetoden ble imidlertid kontrollert og vurdert. På bakgrunn av resultatene fra metodeavlidningen (avsnitt 6.1.4) og beregningene utført her ble det konkludert med at frissettingsprofilene for de ulike filmtypene viser modellsubstansenes frisetting. Og metoden ble vurdert som velegnet til hovedformålet med denne oppgaven, å se effekten modellsubstansenes ladning hadde på frissettingshastighet.

Som vist i vedlegg 4 faller absorbansen for alle parallellene med paracetamol etter om lag 55 minutter. På daværende tidspunkt ble dette antatt å være på grunn av en apparaturfeil. Det ble ikke observert noe uvanlig underveis eller etter endt forsøk som kunne indikert at en degradering hadde funnet sted. Nedgangen i absorbans skjedde etter at frissettingsprofilen var flatet ut. Det ble derfor vurdert at fallet i absorbansen ikke hadde betydning for frissettingsprofilen for paracetamol. Selv om en mulighet til absorbansfallet kan være den foreslåtte degraderingen av paracetamol.

Standardkurver

Det var et dårlig samsvar mellom teoretisk beregnede mengder modellsubstans tilstedet pr. filmbit og mengder modellsubstans funnet ut fra standardkurvene (avsnitt 6.3.2, Tabell 13). Ulike teoretiske beregninger av modellsubstans tilstedet pr. filmbit ble utprøvd. De forutsatte alle en jevn fordeling av modellsubstansen i filmene. Det kan i ettertid virke som dette ikke var tilfelle (se avsnitt 7.2 under *”løsemiddelmigrasjon”*), og at det kan ha vært årsaken til det dårlige samsvaret observert. Metodevalideringen (avsnitt 6.3.2) har imidlertid vist at frissettingsprofilene var av aktuell modellsubstans og at ingen andre komponenter i filmen har innvirkning på frisettingen. For denne oppgaven var det sammenligning av frissettingsprofilene og

effekt av ladning som var viktig, ikke absolutte mengder stoff. Det ble konkludert med at frisettingsmetoden benyttet i denne oppgaven var velegnet for formålet; å se effekt av ladning til de ulike modellsubstansene på frisettingshastigheten ut av filmene.

Mekaniske egenskaper

Ulike mål på respons ble forsøkt: maks kraft, maks avstand, maks kraft/filmtykkelse, maks kraft/filmvekt, maks kraft/filmtykkelse², maks avstand/filmtykkelse, maks avstand/ filmvekt, maks avstand/filmtykkelse². Da ingen av responsene klarte å redusere variasjonen i noen grad, ble responsen til T. Bussemer et al. [40] beholdt (se avsnitt 6.3.2). Fordelen med den responsen over de andre var at den i tillegg muliggjorde en direkte sammenligning av responsene for de to metodene som ble benyttet.

Mucoadhesjon

Ved adhesivt brudd vil filmen være intakt og sitte igjen på en av platene. Mens ved et kohesivt brudd vil filmen være ødelagt og gjenfinnes på både den øvre og nedre platen. Brudd mellom et substrat og mucin vil skje i det svakeste leddet. Et kohesivt brudd indikerer at kreftene innad i filmen er svakere enn krefter mellom film og mucin [31]. Filmene testet i denne oppgaven undergikk adhesive brudd (visuelt kontrollert).

En god korrelasjon mellom responsene (maks kraft, AUC og maks avstand) var ventet [2]. Det var imidlertid ikke tilfelle, derfor ble alle responsene presentert. E. Hagesæther et al. har slått fast at pektin-kitosan kombinasjonsfilmer tilsvarende blanke filmer i denne oppgaven har god mucoadhesjon [2]. Hovedfokuset i denne oppgaven var derfor ikke å avgjøre om filmene hadde god mucoadhesjon eller ikke (da dette allerede var gjort [2]). Men å se på forskjell i mucoadhesjon mellom de ulike

filmtypene, for å se hvordan ladning til inkorporert modellsubstans påvirket mucoadhesjon.

Testparametere

In vitro metoden benyttet i denne oppgaven (avsnitt 5.3.2) er tidligere beskrevet [2, 18]. Parameterne benyttet ble hentet fra den beskrevne metoden, som igjen er optimalisert ut fra ulike tensile-tester beskrevet i litteraturen [18].

En offisiell in vitro metode for å vurdere mucoadhesjon finnes ikke [46]. Tross viktigheten av in vitro metoder til blant annet screeningsforsøk og ved formuleringsstadiet [55]. Flere ulike in vitro metoder er beskrevet [10].

Testparameterne har stor innvirkning på responsen [10, 50] (kontakt kraft, kontakt tid, pH, svelling og prehydreringstid [46] er vist å være særlig viktige). Når ulike laboratorier benytter ulike parametre og metoder, blir sammenligning av resultater mellom ulike laboratorier vanskelig [82].

I denne oppgaven var det tiltenkt å utvikle en formulering for mucoadhesjon i tynntarmen, hvor store mengder vann er tilstedet [1]. Volum tilgjengelig for prehydrering er viktig, da et for stort volum vil kunne føre til at polymerene geler og mister sine mucoadhesive egenskaper [10, 31]. Et lite volum kan få polymeren til å svelle og dermed gi økt fleksibilitet av polymerkjedene som igjen vil føre til økt mucoadhesjon [10, 31, 41, 50]. Tiltak for å sikre overhydrering må derfor gjøres i en eventuell formulering for å sikre opprettholdelse av mucoadhesive egenskaper.

Da pektin-kitosan kombinasjonsfilmene benyttet i denne oppgaven er vist å være mucoadhesive [2] var hovedmålet å se på effekt av ladning til inkorporert modellsubstans. Mucoadhesjon ble derfor valgt å testes på tørre filmer, hvor ikke noe modellsubstans har lukket ut av filmen. Det syntes rimelig for best å se modellsubstansenes innvirkning på pektin-kitosan kombinasjonsfilmens mucoadhesive egenskaper.

Hvorvidt forsøk utført in vitro gjenspeiler in vivo forhold er diskutert flere steder i litteraturen [18, 33, 56, 82]. Det ble i denne oppgaven forsøkt å gjenspeile in vivo tynntarms forhold så godt som mulig. Hvilken in vivo relevans resultatene (avsnitt 6.3.2) funnet i denne oppgaven har, er imidlertid uvisst.

7.2 Filmstøping

Pektin-kitosan assosiasjon ved filmstøping

Polymerkonformasjon

Løsemiddelet benyttet ved filmstøping var 0,1M HCl pH 1. I dette løsemiddelet hadde pektin en k' (hugginskonstant) på 1,924 (avsnitt 6.2.1), mens kitosan hadde 0,57 (avsnitt 6.2.2). En polymer har høyere k' i et termodynamisk dårlig løsemiddel enn i et godt. En høy k' indikerer at polymer-polymer interaksjonene er større enn polymer-løsemiddel interaksjonene [39], som kan føre til aggregering. Kitosan er kationisk [21] og har en pK_a på 6,5-7,0 [35]. I surt miljø vil kitosan være en polyelektrolytt med positive ladninger på kitosan kjedene [76], som vil frastøte hverandre og slik hindre aggregering. Basert på dette ble det antatt at kitosan befant seg i en utstrakt form, mens pektin var mer sammenkrøllet ved filmstøping.

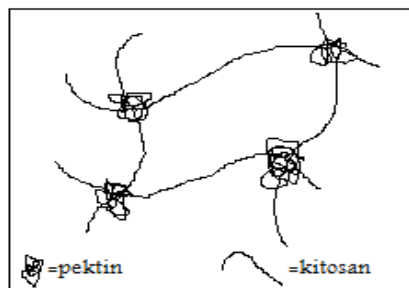
Pektin-kitosan assosiasjon

Interaksjoner mellom pektin og kitosan ved pH under 2 er antatt å finne sted med hydrogenbindinger [13, 37]. Ved tilleggsforsøket kryssbinding (se avsnitt 6.3.3) ble det vist at en blank filmbit umiddelbart løste seg i 0,1M HCl, pH 1. Denne observasjonen indikerer at eventuelle bindinger mellom pektin og kitosan ved pH 1 ikke var sterke nok til å hindre oppløsning av pektin-kitosan nettverket når nettverket kom i kontakt med et større væskevolum. Det betyr imidlertid ikke at en assosiasjon mellom polymerene ikke var tilstedet. På bakgrunn av de mange resultatene fra litteraturen som har vist assosiasjon mellom pektin og kitosan ved lave pH verdier [3,

8, 20, 37] virker det rimelig å anta at en assosiasjon mellom pektin og kitosan fant sted ved filmstøping.

Pektin-kitosan assosiasjon under tørkeprosessen

På et eller annet tidspunkt under tørkeprosessen, etter hvert som løsemiddelet fordamper, vil polymerkonsentrasjonene overskride sine overlappkonsentrasjoner. Og polymerene vil tvinges til å assosiere seg med hverandre. Metoksyloppgrupene på pektin induserer en endring i vannmolekyler som omgir dem og senker entropien til vann. For å minimere en slik endring vil metoksyloppgrupene i pektin assosiere for å minimere sin kontaktflate mot vann (I denne oppgaven 0,1 M HCl) [7]. At flere pektinkjeder legger seg i samme område virker dermed rimelig. Der et pektinaggregat assosierer seg med kitosan vil en nøytralisering av de positive ladningene på kitosankjedene antagelig finne sted. Antagelsen om at en ny kitosankjede da vil plassere seg i dette området virker rimelig, da det her vil være mindre frasetning fra en underliggende kitosankjede.



*Figur 53 Foreslått assosiering mellom pektin og kitosan i tørre filmer.
Basert på teorien foreslått av M.Hiorth [35].*

Det synes rimelig å anta at pektin og kitosan assosierer seg likt som de antatt er assosiert ved høyere pH [35]. Men ikke via ioniske interaksjoner, da pektin er uladet ved lav pH [37], og assosiasjonene ikke var sterke nok til å holde filmen da den kom i kontakt med 0,1M HCl pH 1 (avsnitt 6.3.3).

Tørre filmer

Resultatene fra den termale analysen (avsnitt 6.3.2, Figur 49) viste en liten endoterm reaksjon sammenfallende med smeltepunktet til ibuprofen på 75-78 °C [78] for ibuprofenfilmen. En slik endoterm reaksjon ble ikke observert for de andre filmtypene. Dette kan indikere at i alle filmer, bortsett fra ibuprofenfilmene, var modellsubstansene fullstendig løst. Den endoterme reaksjonen for ibuprofenfilmene kan indikere smelting av uløst ibuprofen. Dette er i samsvar med visuell observasjon under filmstøping (avsnitt 6.3.1).

Tørre ibuprofenfilmer hadde signifikant dårligere mekaniske egenskaper enn de andre tørre filmtypene (se avsnitt 6.3.2 under "*mekaniske egenskaper*"). Etter at filmene hadde ligget 24 timer i fosfatbuffer var det imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom den mekaniske styrken til de ulike filmtypene. Dette kan indikere at uløst ibuprofen innførte "svake punkter" i pektin-kitosan filmene hvor polymerene ikke fikk assosiert pga tilstedeværelsen av ibuprofenpartikler. Dette kan være årsaken til den lavere mekaniske styrken observert. Da ibuprofenfilmene etter sin t-50 i fosfatbuffer hadde lik mekanisk styrke som blanke filmer (avsnitt 6.3.2, Figur 29), kan det antas at ibuprofenpartiklene tilstede ved filmstøping ikke påvirket pektin-kitosan nettverket når det ble hydrert. Men bare gjør seg gjeldende for tørre filmer. Det at mekaniske filmegenskaper endres ved hydrering er vist tidligere [40].

Løsemiddel migrasjon

Migrasjon av oppløst materiale er et fenomen som kan oppstå under tørkeprosesser, som følge av bevegelse av løsemiddelet. Løsemiddel vil bevege seg mot overflaten av systemet, og oppløst materiale kan følge med. Dette kan føre til lokal variasjon i konsentrasjonene til de oppløste stoffene [83].

Visuell observasjon ved filmstøping (avsnitt 6.3.1), resultatene fra termal analyse (avsnitt 6.3.2) og løseligheten til modellsubstansene (avsnitt 3.5) indikerer at

ibuprofen var den eneste modellsubstansen som ikke var fullstendig løst ved filmstøping.

Pektin og kitosan er store makromolekyler, og vil ikke påvirkes av løsemiddelmigrasjon. Synlige ibuprofen partikler vil heller ikke det, da de blir for tunge. Fullstendig oppløst lidokain og paracetamol kan imidlertid vandre med løsemiddelet under tørkeprosessen [83].

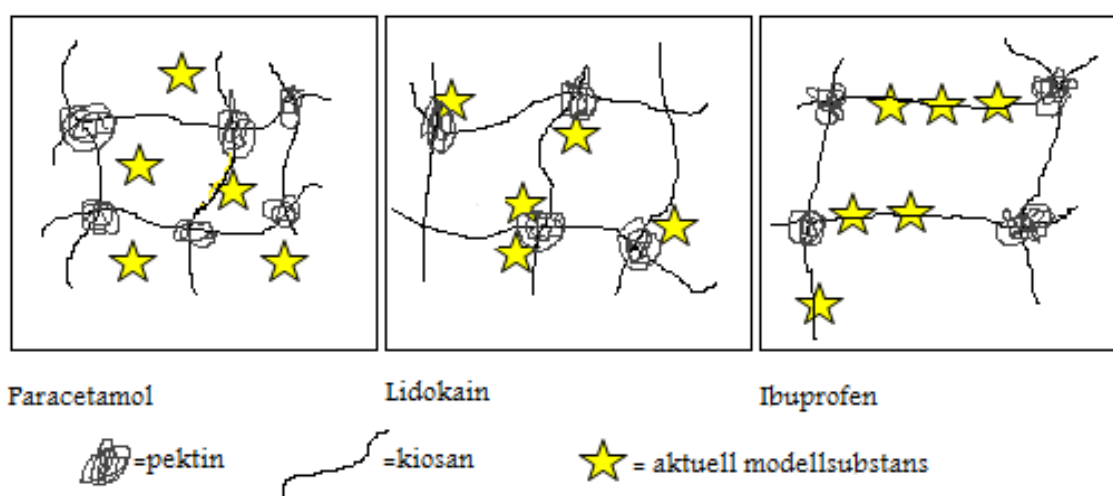
Mange forklaringer på den ulike filmtykkelsen observert (se avsnitt 6.3.3) i hver film kan tenkes. Ikke fullstendig vatrede forhold og turbulent luftstrøm kan være mulige forklaringer. Uavhengig av hva den ulike tykkelsen skyldes er det rimelig å anta at løsemiddelet ble påvirket av ytre faktorer og beveget seg, ikke bare rett opp mot filmoverflaten men også horisontalt i filmene. Det virker også rimelig å anta at det da var lidokain og paracetamol som ble mest utsatt for dette, da de forelå fullstendig oppløst i filmene. Uhomogene fordeling av modellsubstansene innad i pektin-kitosan kombinasjonsfilmene kan være med å forklare det dårlige samsvaret mellom standardkurver og teoretisk beregnede mengder (se avsnitt 6.3.2, Tabell 13).

Uløst ibuprofen reduserte de mekaniske egenskapene til tørre ibuprofenfilmer (avsnitt 6.3.2). Men utviste like mekaniske egenskaper som blanke filmer etter sin t-50 i fosfatbuffer pH 6,8 (avsnitt 6.3.2, Figur 29) og alle filmtypene hadde like mekaniske egenskaper etter 24 timer (avsnitt 6.3.2, Figur 30). Metode for filmstøping vil påvirke filmenes mekaniske egenskaper [71]. Hvis metoden for filmstøping benyttet i denne oppgaven (avsnitt 5.3.1) skal benyttes videre, kan det se ut som det er fordelaktig hvis modellsubstansen ikke blir fullstendig løst ved filmstøping. Da det kan se ut til å redusere påvirkning av en eventuell løsemiddelmigrasjon, og kan bidra til produksjon av mer homogene filmer. Uløst modellsubstans påvirket verken frisetting eller mucoadhesjon negativt.

7.3 Effekt av ladning på frisetting

Pektin-kitosan nettverk

Pektin-kitosan kombinasjoner og interaksjoner mellom de to polymerene er studert i utstrakt grad i litteraturen [2, 3, 8, 13, 20, 23, 25, 36, 37, 79, 84]. Det er imidlertid ikke fullstendig enighet om hvordan et pektin-kitosan nettverk ser ut. Marudova et al. har vist at kitosan kan fungere som en kryssbinder i konsentrerte pektinløsninger ved pH 5,6 [20]. Kitosan er også vist å kryssbinde seg selv [26]. I denne oppgaven er det valgt å anta forklaringen foreslått av M.Hiorth [35] er korrekt. På bakgrunn av denne teorien, og ladningene til de ulike modellsubstansene ved pH 6,8 (se avsnitt 3.5) ble en modell for modellsubstansenes plassering i pektin-kitosan nettverket foreslått (Figur 54). Pektin-kitosan nettet ble antatt å holdes sammen av ioniske interaksjoner mellom pektin og kitosan [3].



Figur 54 Skisse av modellsubstansenes antatte plassering innad i pektin-kitosan nettverket ved pH 6,8.

Frisettingsprofilene

Paracetamol

Paracetamol hadde raskest frisettingshastigheten, vurdert ut fra t-50 og t-90 (se avsnitt 6.3.2, Figur 35). Det ble antatt å være som følge av at ingen ioniske interaksjoner

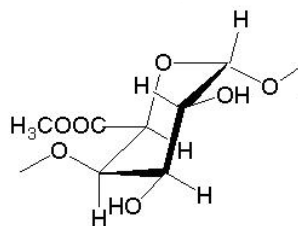
mellom paracetamol og pektin eller kitosan fant sted. Dette er i samsvar med annen litteratur, hvor paracetamol er vist å diffundere raskt gjennom pektin-kitosan kombinasjonsfilmer [2, 3]. Eventuelle andre interaksjoner mellom paracetamol og pektin/kitosan var ikke sterke nok til å redusere frisettingshastigheten.

Lidokain

Lidokain hadde en signifikant lavere frisettingshastighet enn paracetamol, men en signifikant raskere frisettingshastighet enn ibuprofen (se avsnitt 6.3.2, Figur 35). Det ble antatt dette kunne skyldes ioniske interaksjoner mellom negativt ladete galakturonsyreenheter på pektin og positive ladninger på lidokain. Ionisk interaksjon mellom lidokain og pektin skulle, basert på at ibuprofen sin frisettingskurve, (som også ble antatt å skyldes ionisk interaksjon mellom ibuprofen og kitosan (avsnitt 6.3.2, Figur 34) gitt en langt lavere frisetting enn observert.

Ladningskapasitet for HM-pektin

Årsaken til at lidokain ikke ble like godt retardert i filmen som ibuprofen ble foreslått å skyldes "ladningskapasiteten" til HM-pektin benyttet. En forenklet beregning for ladningskapasiteten ble foretatt. Til beregningen ble det antatt at pektin benyttet bestod av bare polygalakturonsyreenheter fullstendig forestret med metanol (pektin har egentlig en langt mer kompleks struktur [7]).



Figur 55 Galakturonsyreenhet

Basert på dette og mengde pektin per film (0,75g, se avsnitt 5.3.1) ble antall mol galakturonsyre beregnet til 0,0036 mol pr. film. Pektin benyttet i denne oppgaven hadde en DM på 70,2 % (se avsnitt 4.2). Det kan dermed antas at 29,8 % av

100

galakturonsyreenhetene hadde frie karboksylsyregrupper som kunne danne ionebinding med lidokain. 29,8 % av 0,0036 mol tilsvarer 0,0011 mol ledige syregrupper tilstedet per film. Basert på molekylvekten til lidokain og mengde modellsubstans tilsatt per film (0,5g, se avsnitt 5.3.1) ble antall mol lidokain per film beregnet til 0,0017 mol. Hvis antagelsen om hvordan pektin og kitosan nettverket ser ut ved pH 6,8 forutsettes riktig, vil i tillegg en andel galakturonsyreenheter inngå i ionebinding med kitosan [3]. Basert på disse beregningene sees det at pektin-kitosan kombinasjonsfilmene lagd i denne oppgaven ikke har ”kapasitet” til å ionisk retardere all positivt ladet modellsubstans per film. Noe som kan forklare lidokains raske frisetting sammenlignet med ibuprofen.

Lidokain hadde den høyeste molekylvekten av modellsubstansene (se avsnitt 3.5), og av Ficks lov dermed en forventet lavere diffusjonshastighet grunnet størrelsen [59]. Dette kan også være en mulig forklaring på den reduserte frisettingshastigheten sammenlignet med paracetamol (se avsnitt 6.3.2, Figur 35).

Ibuprofen

Ved pH 6,8 er ibuprofen negativt ladet. Av Figur 54 vises det hvordan ibuprofen ble antatt å plassere seg i pektin-kitosan nettverket. Ionisk interaksjon mellom ibuprofen og kitosan ble antatt å være årsaken til den signifikant lavere frisettingshastigheten for ibuprofen sammenlignet med de andre modellsubstansene. Ionisk interaksjon mellom negativt ladet erytrocin og kitosan er tidligere beskrevet [3], så antagelsen om ionisk interaksjon mellom kitosan og ibuprofen virker rimelig. Som det sees av Figur 34 (avsnitt 6.3.2) var frisettingsprofilen til ibuprofen todelt. Etter ca en time knakk kurven og frisettingshastigheten ble redusert ytterligere. Beregninger tilsvarende de foretatt for pektin og lidokain ble derfor foretatt for ibuprofen og kitosan.

Ladningskapasitet for kitosan

For beregningene ble det antatt at kitosan bestod av kun glukosamin enheter. (Kitosan består av repeterende N-acetylglukosamin og glukosamin enheter [22].)



Figur 56 Glukosaminenhet.

0,014mol kitosan ble beregnet å være tilstede pr. film, av disse består 80 % dvs. 0,011mol av glukosamin enheter, som kan inngå i ionebinding med ibuprofen. Antall mol ibuprofen tilstedet i en film ble beregnet til 0,0022mol. Dermed er det plass til all ibuprofen. Den observerte ”knekken” i frisettingskurven kan dermed ikke antas å være som følge av en initial rask frisetting av ubundet ibuprofen, etterfulgt av en redusert frisetting av ionisk bundet ibuprofen. Årsaken til den observerte knekken ble ikke funnet.

Resultatene indikerer at støkiometri mellom modellsubstans og reagerende polymer bør beregnes eksakt i en fremtidig formulering. På den måten kan en ”overmetting” av filmen med modellsubstans tenkes og initialt frisette en del modellsubstans svært raskt, etterfulgt av en forsinket frisetting av resterende modellsubstans som blir holdt tilbake i filmen av ioniske interaksjoner.

Modellsubstansenes innvirkning på pektin-kitosan nettverket

Mekaniske egenskaper kan relateres til nettverkstruktur [26] og kan dermed benyttes til å gjøre antagelser om pektin-kitosan nettverket. Mangel på korrelasjon mellom høy mekanisk styrke (antatt tett nettverk) og lav frisettingshastighet indikerer at frisettingsprofilene observert ikke skyldes eventuelle ulikheter innad i pektin-kitosan nettverk for de ulike filmtypene. Dette indikerer at frisettingen observert er et resultat av modellsubstansenes evne til å binde seg til pektin-kitosan nettverket, og ikke en ulik nettverksstruktur. Dette er et prinsipp som har vært oversett i lengre tid, da det flere steder i litteraturen beskrives at et tett nettverk er nødvendig for å oppnå en lav

frisettingshastighet [19, 26]. Det kan konkluderes med at modellsubstansenes ladning hadde en stor påvirkning på frisettingshastigheten ut av kombinasjonsfilmene, og liten innvirkning på pektin-kitosan nettverket.

7.4 Effekt av ladning på mucoadhesjon

Som nevnt i avsnitt 6.3.2 ble det ikke vist en god korrelasjon mellom de ulike responsene for mucoadhesjon. Det var heller ikke mulig å bevise noen signifikante forskjeller mellom de ulike filmtypenes mucoadhesive egenskaper. Det ble derfor konkludert med at inkorporert modellsubstans ikke påvirket mucoadhesjon. Blanke filmer er allerede vist å ha god mucoadhesjon [2], da alle filmene i denne oppgaven utviste like mucoadhesive egenskaper kan det konkluderes med at alle filmtypene i denne oppgaven hadde en god mucoadhesjon.

Pektin-kitosan nettverk

Ladning på inkorporerte modellsubstanser påvirket ikke mucoadhesjon, dette var overraskende da det på forhånd var antatt at modellsubstansenes ladning kunne endre filmenes mucoadhesive egenskapene, sammenlignet med blanke filmer.

Effekt av inkorporert positiv ladet modellsubstans

Basert på at lidokain assosierer seg med pektin (avsnitt 7.3, Figur 54). Ble det initialt foreslått at en slik assosiasjon enten kunne føre til at lidokain utkonkurrerte kitosan, og slik hindret/ reduserte kryssbinding mellom pektin og kitosan. Eller at lidokain ikke forstyrret kryssbindingen mellom pektin og kitosan, men bant seg til ledige galakturonsyreenheter på pektin og nøytraliserte den negative ladningen der.

Utkonkurrering av kitosan

Hvis lidokain utkonkurrerte kitosan i kryssbindingssonene med pektin (avsnitt 7.3, Figur 54), kan det tenkes at det resulterende nettverket ville hatt en mer åpen og

fleksibel struktur grunnet færre kryssbindinger. Åpne [45] og fleksible polymernettverk er vist å være viktig for god mucoadhesjon [31] og kunne gitt lidokainfilmene bedre mucoadhesive egenskaper sammenlignet med de andre filmtypene. Denne teorien burde gitt lidokainfilmene dårligere mekaniske egenskaper sammenlignet med blanke filmer (på grunn av færre kryssbindinger), det ble imidlertid ikke observert (avsnitt 6.3.2). Muligheten for at lidokain selv kunne fungert som kryssbinder virker lite trolig. Da en kryssbinder må ha minst to reaktive funksjonelle grupper som tillater dannelse av bindinger mellom polymerkjeder [26]. Lidokain burde da også hatt en langt lavere frisettingshastighet enn den observerte (se avsnitt 6.3.2 Figur 34).

Nøytralisering av galakturonsyreenheter på pektin

Basert på visuell observasjon ved filmstøping (se avsnitt 6.3.1), løseligheten til lidokain og resultatene fra den termale analysen (se avsnitt 6.3.2) ble det også antatt at lidokain var fullstendig løst ved filmstøping. Lidokain har en pKa på 7,16 [65], og var positivt ladet også ved filmstøping. En frastøtning fra positivt ladete kitosankjeder kan være en av årsakene til lidokains assosiering med pektin. Antagelsen om at lidokain plasserer seg i kryssbindingssonene uten å påvirke kryssbindingen vil ikke endre lidokainfilmens mekaniske egenskaper, men føre til en film med mindre negativ ladning, sammenlignet med blanke filmer. En mindre negativ ladning kunne tenkes å hindre frastøtning mellom lidokainfilmen og negativt ladet mucin [85] og slik føre til en nærmere kontakt mellom polymer og mucin, som er vist å være viktig for oppnåelse av god mucoadhesjon [18]. Og slik gitt lidokainfilmene en bedre mucoadhesjon. Dette ble ikke observert i denne oppgaven (se avsnitt 6.3.2).

Effekt av inkorporert negativt ladet modellsubstans

Det ble antatt at ibuprofenfilmene sin ioniske assosiasjon med glukosamineneheterene på kitosan kunne føre til en redusert mucoadhesjon grunnet nøytralisering av mange

positive grupper som kan tenkes å reagere ionisk med negativt ladet mucin [85]. Dette ble imidlertid ikke observert (se avsnitt 6.3.2).

Effekt av inkorporert uladet modells substans

Det ble på forhånd antatt at paracetamol ikke ville endre de mucoadhesive egenskapene til de ulike filmtypene. Da paracetamol ikke var antatt å binde seg til pektin-kitosan nettverket, men bare fordele seg tilfeldig rundt i det. Dette var i overensstemmelse med resultatene funnet i denne oppgaven.

Mekanismer for mucoadhesjon

Resultatene funnet i denne oppgaven (se avsnitt 6.3.2) kan indikere at interaksjoner mellom ledige karboksylsyrer på pektin/ ledige aminogrupeer på kitosan og mucin ikke er av avgjørende betydning for oppnåelse av god mucoadhesjon ved pH 6,8.

Dette er motstridende med noe litteratur på området som beskriver at tilstedeværelse av mange ioniserbare grupper er viktig for mucoadhesjon [56]. Hydrogenbinding (mellom ledige karboksylsyrer på pektin [18]) er også vist å være viktig for oppnåelse av god mucoadhesjon ved nøytral og basisk pH [18, 24, 28, 34].

Annen litteratur har vist at HM-pektin har bedre mucoadhesjon enn LM-pektin på grunn av større molekylvekt, som ble vist viktigere for god mucoadhesjon enn ledige karboksylsyrergrupper [10]. Dette er i samsvar med resultatene funnet i denne oppgaven, som indikerer at et åpent og fleksibelt nettverk er mer viktig enn ledige funksjonelle grupper. Viktigheten av et åpent og fleksibelt nettverk for oppnåelse av god mucoadhesjon ble også vist av E. Hagesæther et al. [2].

Det ble i denne oppgaven benyttet kitosan med en Dda på 80 %. Benyttelse av kitosan med en høy Dda vil være med og opprettholde en fleksibel og åpen nettverkstruktur [3], noe som er viktig for å opprettholde en god mucoadhesjon [31, 34]. Kitosan med høy Dda vil ha høy andel positive ladninger som vil frastøte hverandre og sikre et åpent nettverk. Viktigheten av en åpen nettverksstruktur ble vist i denne oppgaven.

Benyttelse av kitosan med en høy Dda vil også gi en film med stor ladningskapasitet til negativt ladede modellsubstanser/ nanopartikler med inkorporert virkestoff.

Frisetting og mucoadhesjon

Det ble vist i denne oppgaven at lav frisettingshastighet ikke samtidig reduserte mucoadhesive egenskaper. Årsaken til dette ble antatt å være at negativ ladet modellsubstansen ionisk assosierte med kitosan, som utgjør ”rammen” i pektin-kitosan nettverket. Dermed ble det antatt at den negativt ladete modellsubstansen ikke påvirket åpenheten eller fleksibiliteten til pektin-kitosan nettverket, men bare bandt seg til det. Dermed ble den gode mucoadhesjonen observert for blanke filmer [2] opprettholdt for filmene med inkorporert negativ modellsubstans. Disse resultatene og antagelsene var ønskelige, og er gunstige for en videre utvikling av en formulering med kontrollert frisetting og mucoadhesive egenskaper.

8. Konklusjon

Bakgrunnen for denne oppgaven var E. Hagesæther sitt arbeid hvor hun viste at en god mucoadhesjon var forbundet med en åpen nettverksstruktur, som igjen var forbundet med rask frisetting av virkestoff. Dette er svært ugunstig da oppnåelse av mucoadhesjon i tynntarm uten mulighet for å retardere frisettingen til et virkestoff synes meningsløst.

Resultatene funnet i denne oppgaven indikerer at det ved ioniske interaksjoner mellom negativt ladet modellsubstans og kitosan kan være mulig å oppnå en redusert frisettingshastighet og samtidig opprettholde en god mucoadhesjon. Årsaken til dette ble antatt å være at negativt ladet modellsubstans ikke påvirket den åpne og fleksible pektin-kitosan strukturen blanke filmer ble antatt å ha. Filmene med inkorporert negativt ladet modellsubstans hadde signifikant lavere mekaniske egenskaper sammenlignet med de andre filmtypene (for tørre filmer). Men dette påvirket verken frisetting eller mucoadhesjon negativt.

Det ble konkludert med at ladning på modellsubstansene hadde stor betydning for frisettingshastighet, men ikke påvirket mucoadhesive egenskaper. Resultatene funnet indikerer at utvikling av en pektin-kitosan kombinasjonsfilm med negativt ladede nanokapsler kan føre frem til et formuleringsprinsipp med kontrollert frisetting og god mucoadhesjon. Mengde nanokapsler per film bør tilpasses etter om det ønskes en modifisert frisetting hele tiden eller en støtdose etterfulgt av modifisert frisetting. Det kan se ut som det er mulig å oppnå ved inkorporering av en stor mengde nanokapsler, så filmen "overmettes" og det ikke er nok kitosan til å reagere ionisk med alle nanokapslene. De som ikke inngår i en ionebinding kan da antas og frisettes svært raskt, mens de som er ionisk bundet vil bli retardert og frisettes sakte ut av filmen.

9. Kilder

1. Hagesaether, E., *Mucoadhesive properties of pectin Effect of type of pectin and drug delivery system*, in *Pharmacy*. 2008, University of Oslo: Oslo. p. 72.
2. Hagesaether, E. M.H., S. A. Sande, *Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan. An in vitro and ex vivo study*. *European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2009. **71**(2): p. 325-331.
3. 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*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003. **56**(2): p. 175-81.
4. Vincent, H.L. Lee, J.J.Y., *Oral Drug Delivery*, in *Drug Targeting and Delivery for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, A.W.L. Anya M. Hillery, James Swarbrick, Editor. 2001, Taylor & Francis: London. p. 146-183.
5. A.T. Florence, D.A., *Polymers and Macromolecules*, in *Physicochemical Principles of Pharmacy*, D.A. A.T. Florence, Editor. 1998, Pharmaceutical Press: London. p. 308-370.
6. Johnson, K., et al., *Effect of triacetin and polyethylene glycol 400 on some physical properties of hydroxypropyl methylcellulose free films*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991. **73**(3): p. 197-208.
7. Thakur Br Fau - Singh, R.K., A.K. Singh Rk Fau - Handa, and A.K. Handa, *Chemistry and uses of pectin--a review*. 1997(1040-8398 (Print)).
8. Ghaffari, A., et al., *Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit((R)) RS intended for sigmoidal drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007. **67**(1): p. 175-186.
9. Henk A. Schols, A.G.J.V., *The chemical structure of pectins*, in *Pectins and their manipulation*, J.P.K. Graham B. Seymour, Editor. 2002, Blackwell Publishing: Oxford. p. 1-98.
10. Thirawong, N., et al., *Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an in vitro evaluation using texture analyzer*. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2007. **67**(1): p. 132-40.
11. Salman, H., et al., *Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008. **62**(9): p. 579-582.
12. Willats, W.G.T., J.P. Knox, and J.D. Mikkelsen, *Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel*. *Trends in Food Science & Technology*, 2006. **17**(3): p. 97-104.
13. Nordby, M.H., et al., *Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. Rheology*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(2): p. 337-43.

14. Kjøniksen, A.-L., M. Hiorth, and B. Nyström, *Temperature-induced association and gelation of aqueous solutions of pectin. A dynamic light scattering study*. European Polymer Journal, 2004. **40**(11): p. 2427-2435.
15. Universitetet i Oslo. *Pectin- The Polymer Research Group*. [cited 2009 19.03]; Available from: <http://www.kjemi.uio.no/Polymerkjemi/Research/Pectin.htm>.
16. Danish Institute of Agricultural Sciences, B.G. *Biosynthesis of cell wall polysaccharides*. 2007 [cited 2009 19.03]; Available from: <http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>.
17. Ridley, B.L., M.A. O'Neill, and D. Mohnen, *Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling*. Phytochemistry, 2001. **57**(6): p. 929-967.
18. Hagesaether, E. and S.A. Sande, *In Vitro Measurements of Mucoadhesive Properties of Six Types of Pectin*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2007. **33**(4): p. 417 - 425.
19. Bigucci, F., et al., *Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009. **00061**(00001): p. 41-47.
20. Marudova, M., A.J. MacDougall, and S.G. Ring, *Pectin-chitosan interactions and gel formation*. Carbohydr Res, 2004. **339**(11): p. 1933-9.
21. Felt, O., P. Buri, and R. Gurny, *Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998. **24**(11): p. 979 - 993.
22. Chang, K.L.B. and J. Lin, *Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles*. Carbohydrate Polymers, 2000. **43**(2): p. 163-169.
23. Hoagland, P.D. and N. Parris, *Chitosan/Pectin Laminated Films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(7): p. 1915-1919.
24. 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.
25. Meshali, M.M. and K.E. Gabr, *Effect of interpolymer complex formation of chitosan with pectin or acacia on the release behaviour of chlorpromazine HCl*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **89**(3): p. 177-181.
26. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2004. **57**(1): p. 19-34.
27. Berth, G. and H. Dautzenberg, *The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution*. Carbohydrate Polymers, 2002. **47**(1): p. 39-51.

28. Rossi, S., et al., *Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **10**(4): p. 251-257.
29. Sorlier, P., et al., *Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan*. Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.
30. Universitetet i Oslo. *Chitosan- The Polymer Research Group*. [cited 2009 19.03]; Available from: <http://www.kjemi.uio.no/Polymerkjemi/Research/Chitosan.htm>.
31. Smart, J.D., *The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(11): p. 1556-1568.
32. Lehr, C.-M., et al., *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **78**(1-3): p. 43-48.
33. Säkkinen, M., et al., *Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine?: An evaluation based on gamma scintigraphy*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **307**(2): p. 285-291.
34. Dodou, D., P. Breedveld, and P.A. Wieringa, *Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2005. **60**(1): p. 1-16.
35. Hiorth, M., *Characterization of pectin and chitosan interactions in film formation and drug delivery systems*, in *Department of pharmaceutics 2005*, University of Oslo: Oslo. p. 53.
36. Hiorth, M., et al., *Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan*. Int J Pharm, 2006. **308**(1-2): p. 25-32.
37. Hiorth, M., et al., *Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan*. European Polymer Journal, 2005. **41**(8): p. 1718-1728.
38. Qi Wang, S.W.C., *Understanding the physical properties of food polysaccharides*, in *Food Carbohydrates*, S.W. Cui, Editor. 2005, Taylor & Francis group: Boca Raton. p. 162-214.
39. Ma, X. and M. Pawlik, *Intrinsic viscosities and Huggins constants of guar gum in alkali metal chloride solutions*. Carbohydrate Polymers, 2007. **70**(1): p. 15-24.
40. Bussemer, T., N.A. Peppas, and R. Bodmeier, *Time-Dependent Mechanical Properties of Polymeric Coatings Used in Rupturable Pulsatile Release Dosage Forms*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2003. **00029**(00006): p. 623-631.
41. Hagesaether, E. and S.A. Sande, *Effect of Pectin Type and Plasticizer on In Vitro Mucoadhesion of Free Films*. Pharmaceutical Development and Technology, 2008. **13**(2): p. 105 - 114.

42. J.Wells, *Pharmaceutical preformulation: the physiochemical properties of drug substances*, in *Pharmaceutics the science of dosage form design*, M.E.Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone. p. 114-138.
43. Clive G. Wilson, Y.P.Z., P. Kurmala, L.S. Rao, B.Dhillon, *Ophthalmic Drug Delivery*, in *Drug Delivery and Targeting for Pharmacist and Pharmaceutical Scientists*, A.W.L. Anya M. Hillery, James Swarbrick, Editor. 2001, Taylor & Francis: London. p. 330-354.
44. E.E.Hassan, J.M.G., *A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Boadhesive Bond Strength*. *Pharmaceutical Research*, 1990. **7**(5): p. 491-495.
45. Leung, S.-H.S. and J.R. Robinson, *Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II*. *Journal of Controlled Release*, 1990. **12**(3): p. 187-194.
46. Munasur, A.P., T. Govender, and I. Mackraj, *Using an Experimental Design to Identify and Quantify the Effects of Environment Related Test Parameters on the In Vitro Mucoadhesivity Testing of a Propanolol Buccal Tablet*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2007. **33**(7): p. 709-717.
47. Vincent H.L.Lee, J.J.Y., *Oral Drug Delivery*, in *Drug Targeting and Delivery for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, A.W.L. Anya M. Hillery, James Swarbrick, Editor. 2001, Taylor & Francis: London. p. 146-183.
48. Peppas, N.A. and P.A. Buri, *Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues*. *Journal of Controlled Release*, 1985. **2**: p. 257-275.
49. Hillery, A.M., *Drug Delivery: The basic Concepts*, in *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, A.W.L. Anya M. Hillery, James Swarbrick, Editor. 2001, Taylor & Francis: London. p. 1-48.
50. Hagesaether, E., R. Bye, and S.A. Sande, *Ex vivo mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads*. *Int J Pharm*, 2008. **347**(1-2): p. 9-15.
51. center, I.d.h. *Integris digestive health center- learn more about double balloon endoscopy*. [cited 2009 19.03]; Available from: <http://www.integris-health.com/INTEGRIS/en-US/Specialties/A-F/Digestive/Technology/doubleBalloonMore.htm>.
52. Colorado, U.o. *Human Physiology- University of Colorado*. [cited 2009 19.03]; Available from: <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/villi.jpg>.
53. Ponchel, G., et al., *Bioadhesive analysis of controlled-release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems*. *Journal of Controlled Release*, 1987. **5**(2): p. 129-141.
54. Mikos, A.G. and N.A. Peppas, *Measurement of the surface tension of mucin solutions*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989. **53**(1): p. 1-5.
55. Caramella, C., Maria Cristina Bonferoni, Silvia Rossi, Franca Ferrari, *Rheological and Tensile Tests for the Assessment of Polymer-Mucin*

- Interactions*. European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics, 1994. **40**(4): p. 213-217.
56. J.D. Smart, I.W.K., H.E.C. Worthington, *An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1984. **36**(3): p. 295-299.
57. Chary, R.B.R., G. Vani, and Y.M. Rao, *In Vitro and In Vivo Adhesion Testing of Mucoadhesive Drug Delivery Systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999. **25**(5): p. 685 - 690.
58. Hägerström, H. and K. Edsman, *Limitations of the rheological mucoadhesion method: The effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**(5): p. 349-357.
59. Aulton, M., *Dissolution and solubility*, in *Pharmaceutics the science of dosage form design*, M. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Leicester. p. 15-40.
60. EuropeanPharmacopea6.3. *paracetamol*. 2009 [cited 2009 26.03]; Available from: http://online6.edqm.eu/ep603/#doc_1_of_3.
61. Shaw, L., et al., *The Effect of Selected Water-Soluble Excipients on the Dissolution of Paracetamol and Ibuprofen*. 2005. **00031**(00006): p. 515-526.
62. EuropeanPharmacopea6.3. *Lidocaine*. 2009 [cited 2009 28.04.09]; Available from: http://online6.edqm.eu/ep604/#doc_3_of_146.
63. Pedersen, B.T., et al., *In Vitro Assessment of Lidocaine Release from Aqueous and Oil Solutions and from Preformed and in Situ Formed Aqueous and Oil Suspensions. Parenteral Depots for Intra-Articular Administration*. Drug Delivery, 2008. **15**(1): p. 23 - 30.
64. Corre, P.L., et al., *In vitro controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D, L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres*. Journal of Microencapsulation, 1997. **14**(2): p. 243 - 255.
65. Sjöberg, H., et al., *Ionization conditions for iontophoretic drug delivery. A revised pKa of lidocaine hydrochloride in aqueous solution at 25°C established by precision conductometry*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **141**(1-2): p. 63-70.
66. EuropeanPharmacopea6.3. *Ibuprofen*. 2009 [cited 2009 28.04]; Available from: http://online6.edqm.eu/ep604/#doc_3_of_37.
67. Sigma-Aldrich. *Ibuprofen sodium*. 2009 [cited 2009 26.03]; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=I1892|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.
68. corporation, D.j.i. *Micro-Ostwald viscosimeter*. 2009 [cited 2009 29.04]; Available from: <http://images.google.no/imgres?imgurl=http://www.dongjins.com/product/image/Micro-Ostwald%2520viscometer-L.jpg&imgrefurl=http://www.dongjins.com/P-viscometer-a3->

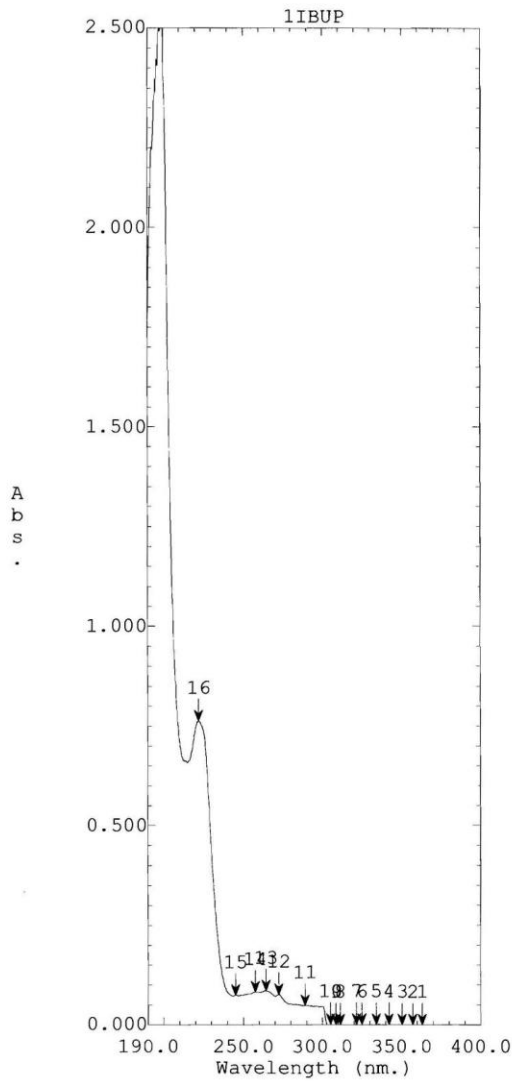
- [2.htm&usg=__b9pb6VTs8hvGjGeHbWi45OOqBco=&h=400&w=420&sz=18&hl=no&start=5&um=1&tbnid=efCPleeZ9yDn3M:&tbnh=119&tbnw=125&prev=/images%3Fq%3Dmicro%2Bostwald%26hl%3Dno%26sa%3DG%26um%3D1.](#)
69. European Pharmacopoeia 6.3. *Dissolution test for solid dosage forms*. 2009 [cited 2009 01.04]; Available from: http://online6.edqm.eu/ep603/#doc_1_of_12.
 70. e.Hagesaether, *Formuleringsfaktorer for pektin og kitosan kombinasjonsfilmer*. 2002, Oslo: Universitetet i Oslo. 101.
 71. Bonacucina, G., et al., *Effect of plasticizers on properties of pregelatinised starch acetate (Amprac 01) free films*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **313**(1-2): p. 72-77.
 72. Texture Technologies. *Film testing*. 2008 [cited 2009 06.05]; Available from: http://www.texturetechnologies.com/Film_Testing.html.
 73. Jones, D.S., A.D. Woolfson, and A.F. Brown, *Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **151**(2): p. 223-233.
 74. Wong, T.W. and S. Nurjaya, *Drug release property of chitosan-pectinate beads and its changes under the influence of microwave*. Eur J Pharm Biopharm, 2007.
 75. P.E.Christensen, *Methods of grading pectin in relation to the molecular weight (intrinsic viscosity) of pectin*. Food research, 1954. **19**: p. 163-171.
 76. M.Rinaudo, M.M.a.P.L.D., *characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion*. International Journal of Biological Macromolecules, 1993. **15**: p. 281-285.
 77. D.S.Moore, G.P.M., *Introduction to the practice of statistics*. 4. ed. 2003, New York: W.H.Freeman and Company. 817.
 78. Micromedex. *Martindale-the complete drug reference*. 2009 [cited 2009 01.05.09]; Available from: http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/C9BD_A3/DUPLICATIONSHIELDSYNC/06F945/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/5/ND_P/Main/PFPUI/xclxLz2XCCVIX/PFActionId/hcs.common.RetrievedDocumentCommon/DocId/12840-k/ContentSetId/30/SearchTerm/ibuprofen%20/SearchOption/BeginWith.
 79. Kang De Yao, J.L., Guo Xiang Cheng, Xiao Dai Lu, Hai Li Tu, Jose A. Lopes. Da Silva, *Swelling behavior of Pectin/Chitosan Complex films*. Journal of applied polymer science, 1996. **60**(2): p. 279-283.
 80. Store Norske Leksikon. *katalysator*. 2009 [cited 2009 08.05]; Available from: <http://www.storenorskeleksikon.no/katalysator>.
 81. S.Pedersen-Bjergaard, K.E.R., *legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.

-
82. Laulicht, B., et al., *Are in vivo gastric bioadhesive forces accurately reflected by in vitro experiments?* *Journal of Controlled Release*, 2009. **134**(2): p. 103-110.
 83. M.E.Aulton, *Drying*, in *Pharmaceutics the science of dosage form design*, M.E.Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Leicester. p. 379-397.
 84. Chang, R., *General chemistry, the essential concepts*. third ed. 2003: MacGraw-Hill companies
 85. X. Yang, J.R.R., *Bioadhesion in Mucosal Drug Delivery*, in *Biorelated polymers and Gels*. 1998. p. 135-184.

Vedlegg

- 1 UV-spekter ibuprofen
- 2 UV-spekter lidokain
- 3 UV-spekter paracetamol
- 4 Frisettingsprofiler for paracetamol, lidokain og ibuprofen
- 5 Termogram glyserol (metode 2) og ibuprofen (metode 1 og 2)
- 6 Termogram kitosan (metode 1 og 2) og lidokain (metode 1)
- 7 Termogram lidokain (metode 2) og paracetamol (metode 1 og 2)
- 8 Termogram pektin (metode 1 og 2)

Vedlegg 1: UV-spekter ibuprofen



Peak Pick		
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	363.20	0.000
2	357.20	-0.000
3	350.40	0.001
4	342.00	0.001
5	334.00	0.001
6	324.80	0.001
7	321.60	0.001
8	311.40	-0.000
9	308.60	-0.000
10	305.20	0.001
11	289.00	0.048
12	272.40	0.076
13	264.40	0.085
14	257.60	0.082
15	245.00	0.074
16	222.00	0.763
17	198.80	2.555

File Name: 1IBUP

Created: 13:36 02/17/09

Data: Original

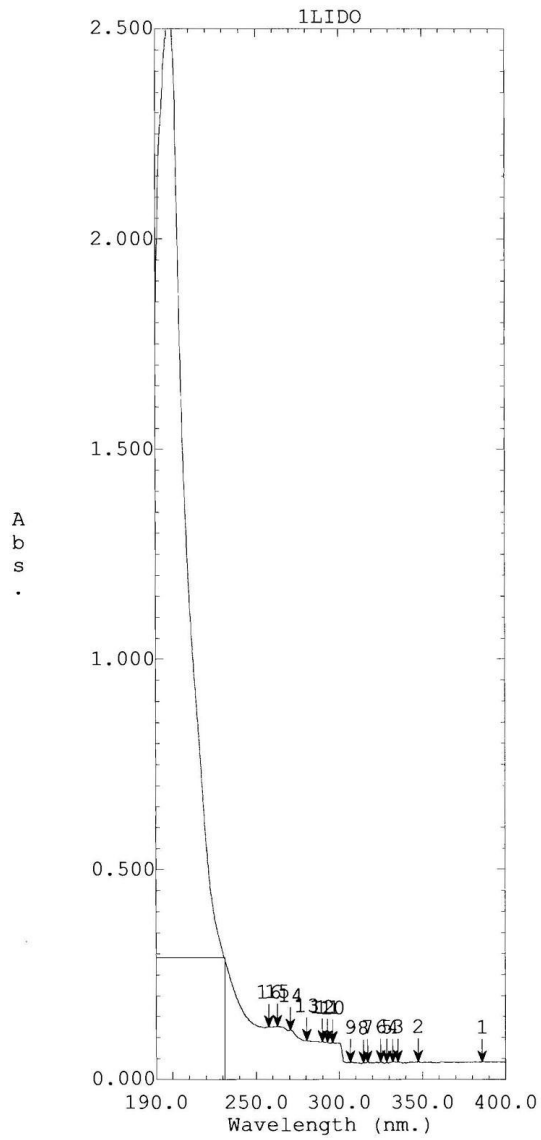
Measuring Mode: Abs.

Scan Speed: Fast

Slit Width: 1.0

Sampling Interval: 0.2

Vedlegg 2: UV-spekter lidokain



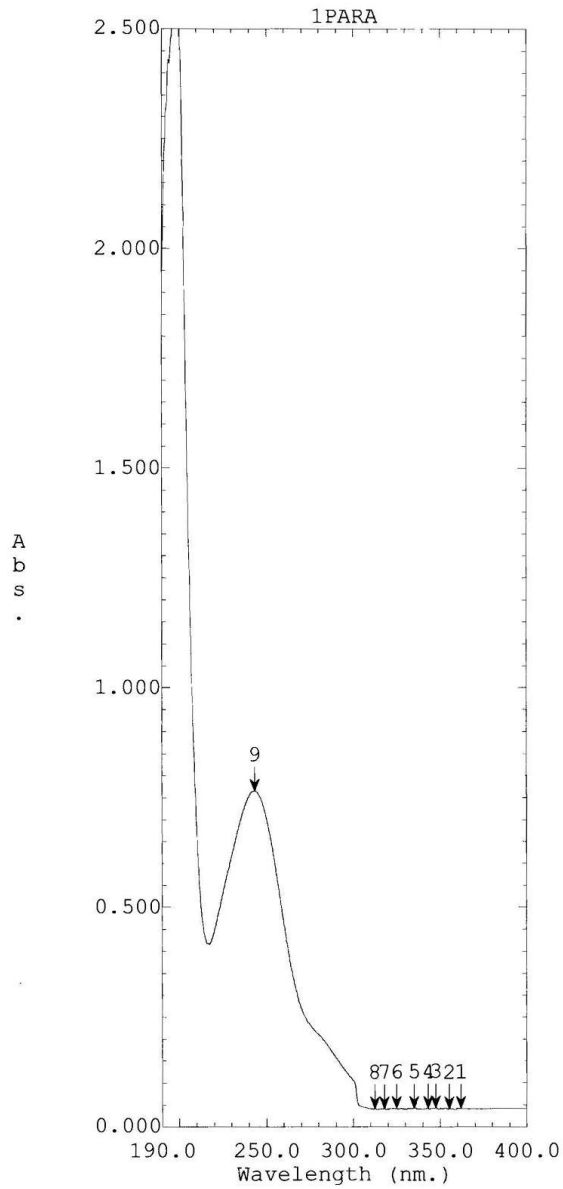
Peak Pick		
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	386.00	0.041
2	347.60	0.042
3	335.20	0.042
4	332.20	0.041
5	328.40	0.041
6	325.00	0.042
7	317.20	0.041
8	314.60	0.039
9	306.80	0.041
10	296.00	0.087
11	292.80	0.088
12	289.80	0.089
13	280.40	0.092
14	270.60	0.118
15	262.80	0.126
16	257.60	0.126
17	199.40	2.592

File Name: 1LIDO

Created: 13:42 02/17/09
 Data: Original

Measuring Mode: Abs.
 Scan Speed: Fast
 Slit Width: 1.0
 Sampling Interval: 0.2

Vedlegg 3: UV-spekter paracetamol

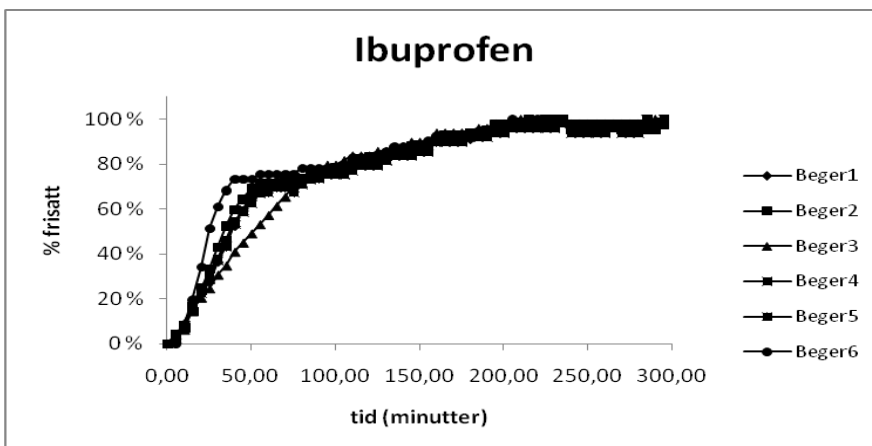
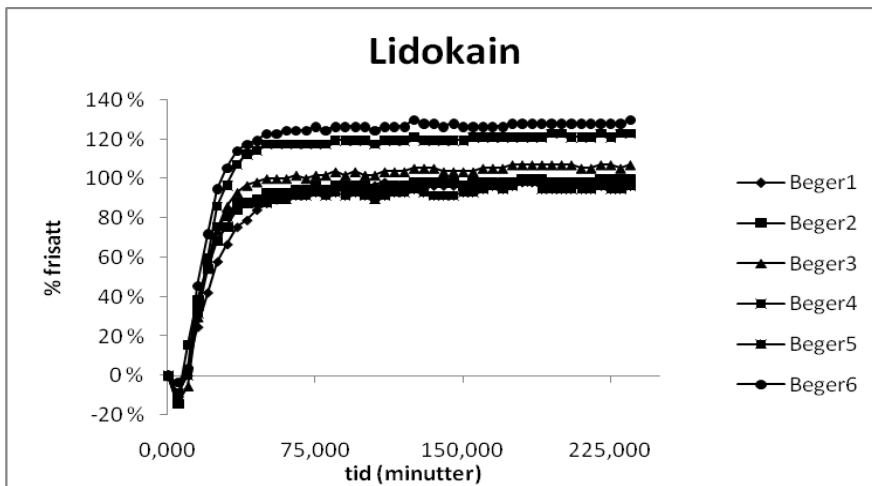
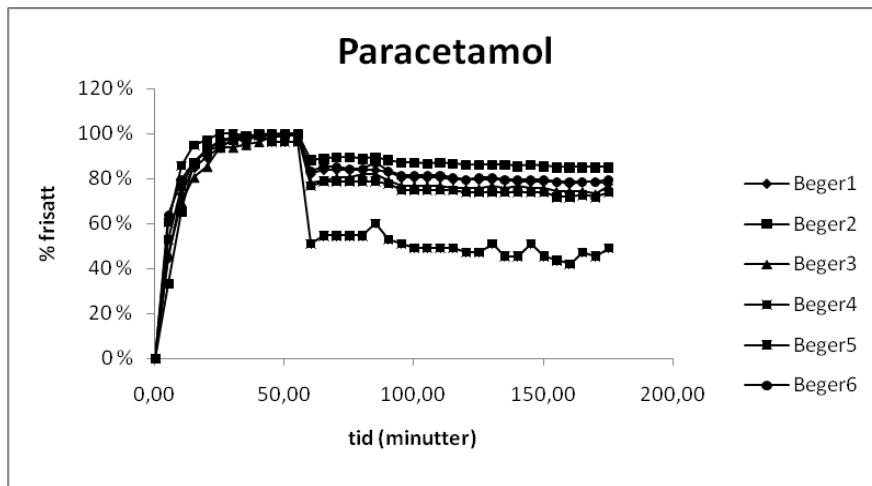


Peak Pick		
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	362.00	0.042
2	355.40	0.041
3	347.60	0.043
4	343.00	0.042
5	335.00	0.042
6	324.80	0.042
7	318.00	0.041
8	312.40	0.041
9	243.40	0.765
10	198.40	2.612

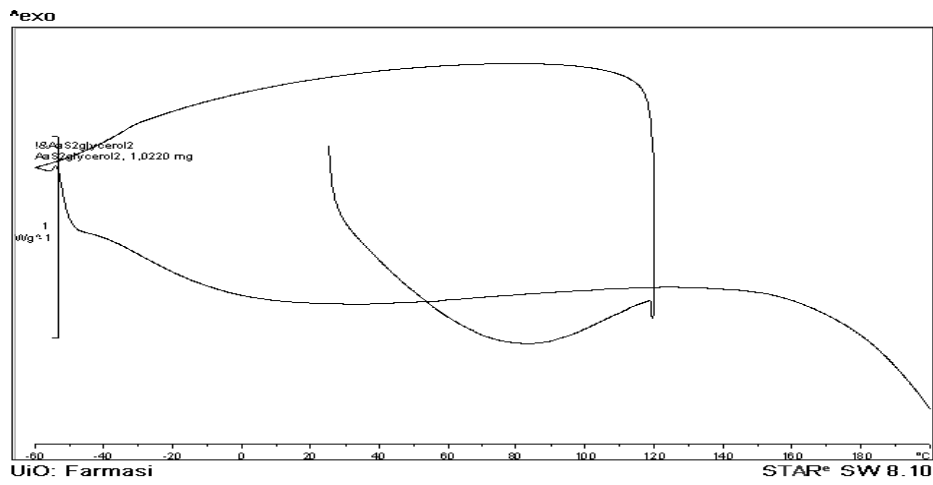
File Name: 1PARA

Created: 13:47 02/17/09
 Data: Original

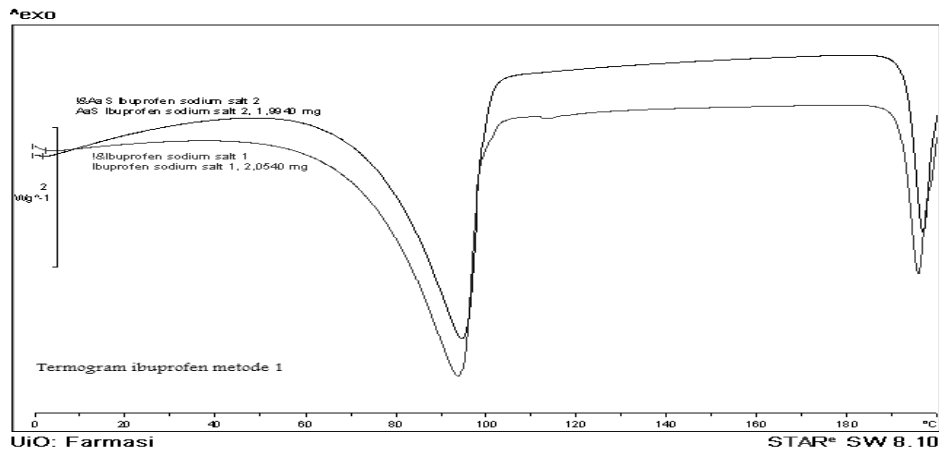
Measuring Mode: Abs.
 Scan Speed: Fast
 Slit Width: 1.0
 Sampling Interval: 0.2

Vedlegg 4: Frisettingsprofilene for paracetamol, lidokain og ibuprofen

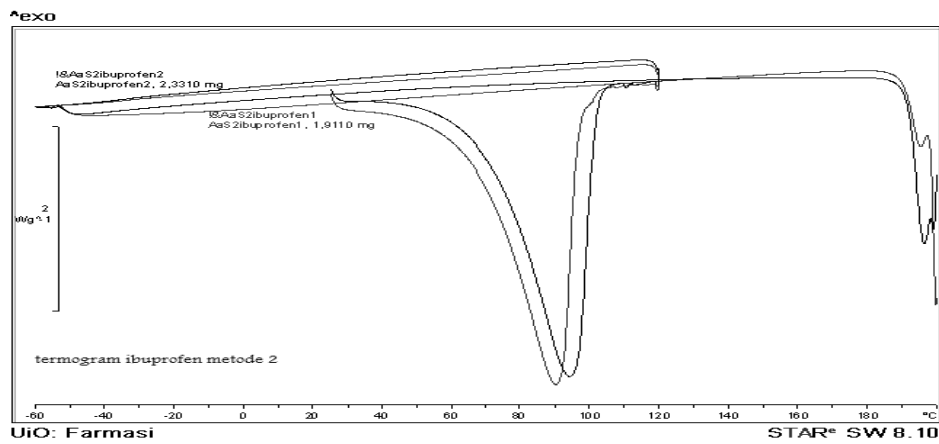
Vedlegg 5: Termogram for glyserol (metode 2) og ibuprofen (metode 1 og 2)



Glyserol (metode 2)

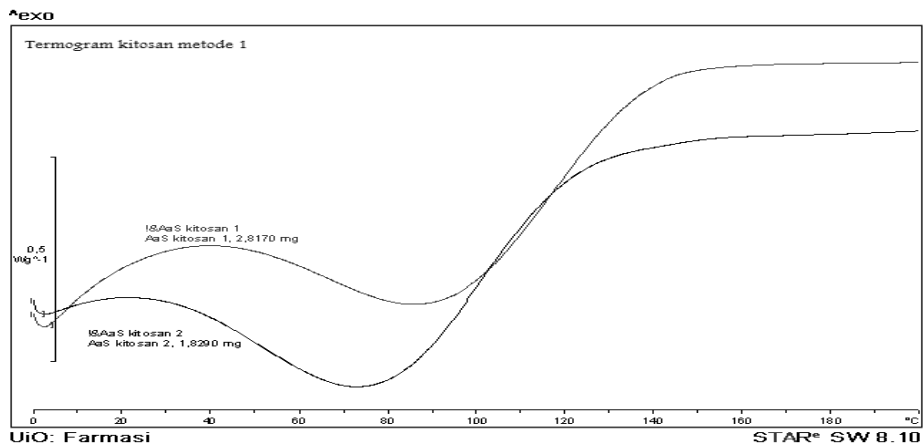


Ibuprofen (metode 1)

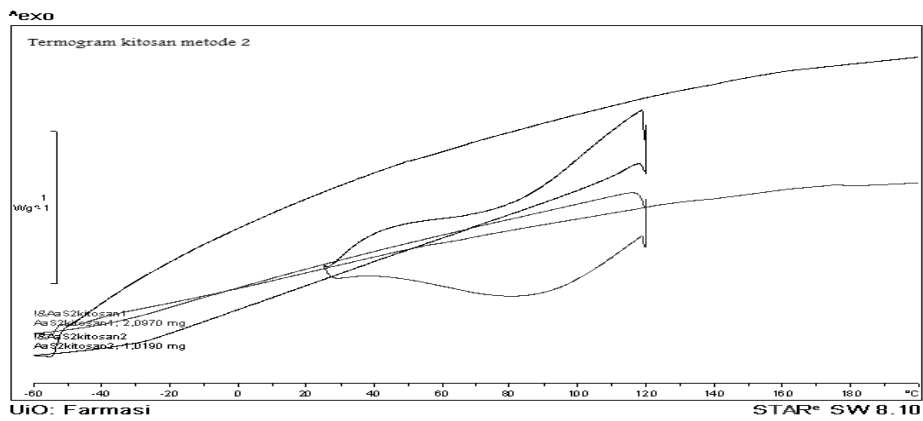


Ibuprofen (metode 2)

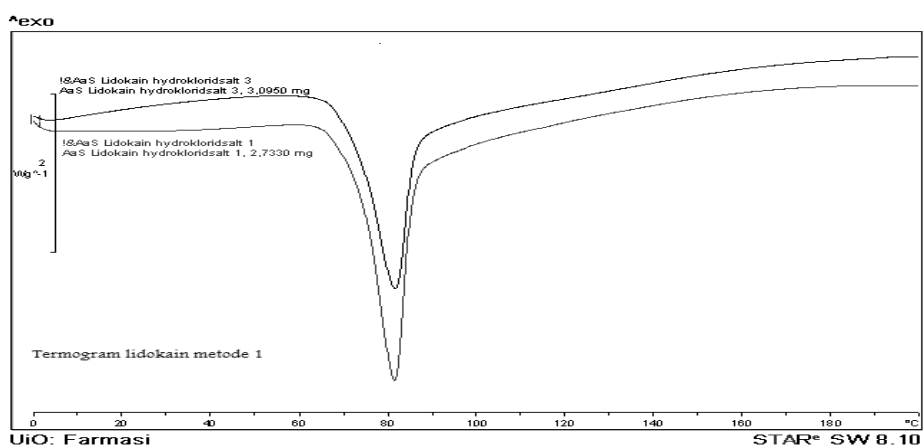
Vedlegg 6: Termogram kitosan (metode 1 og 2) og lidokain (metode 1)



Kitosan metode 1

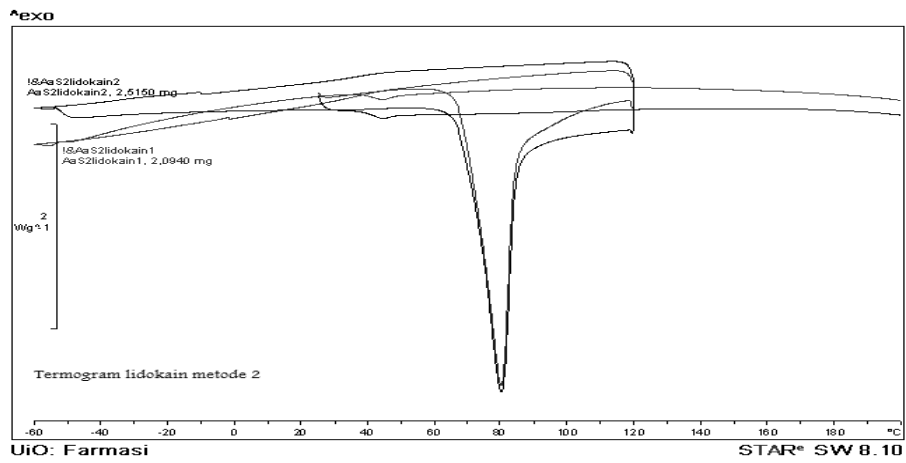


Kitosan metode 2

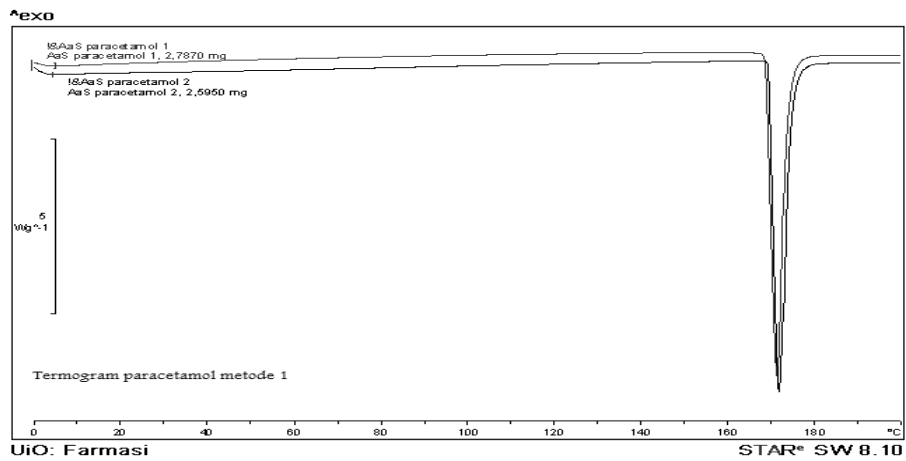


lidokain metode 1

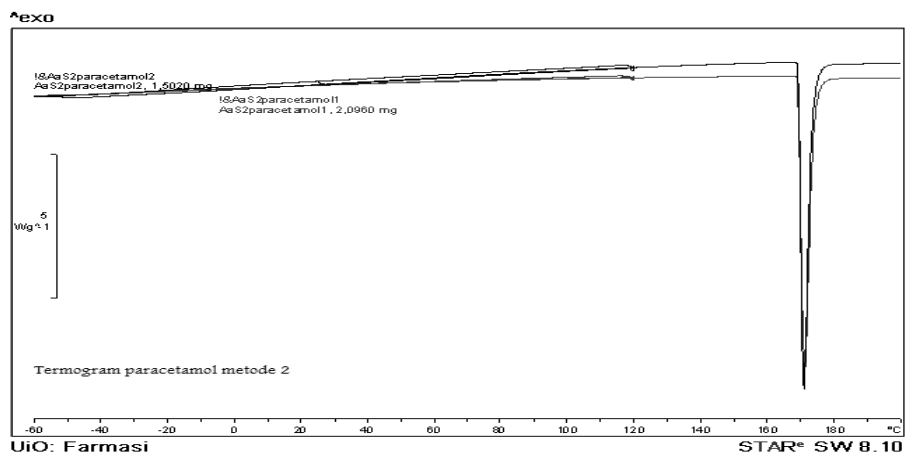
Vedlegg 7: Termogram lidokain (metode 2) og paracetamol (metode 1 og 2)



Lidokain metode 2

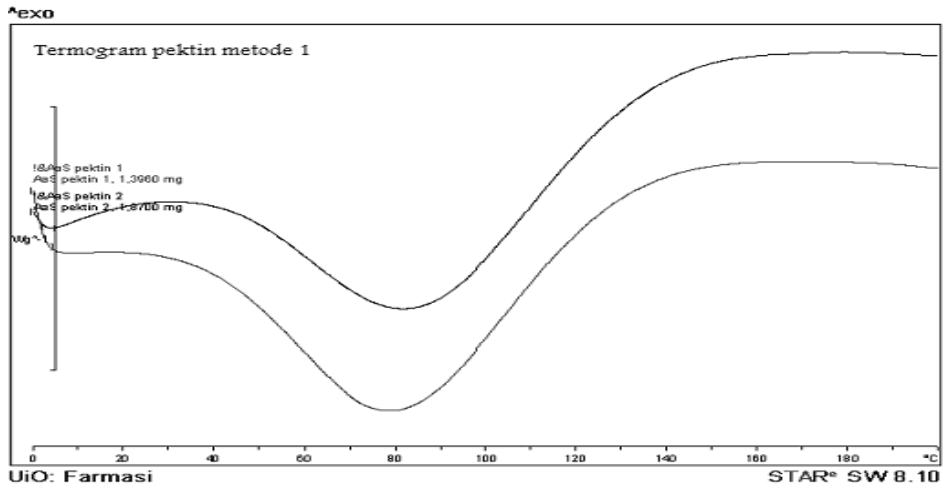


Paracetamol metode 1

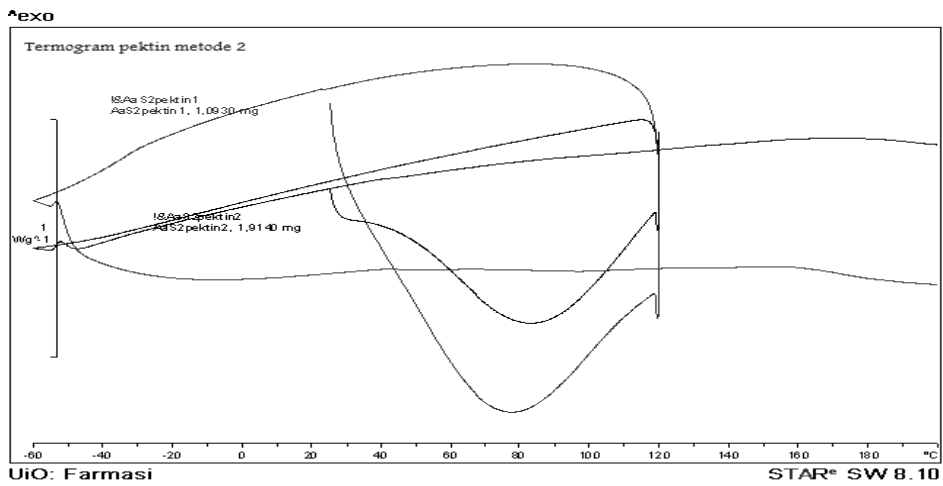


Paracetamol metode 2

Vedlegg 8: Termogram pektin (metode 1 og 2)



Pektin metode 1



Pektin metode 2