

Formulering og karakterisering av spraytørkede kryssbundne pektinbaserte mikropartikler med inkorporert legemiddel

Mastergradsoppgave i galenisk farmasi

Mehrin Shahid



Avdeling for galenisk farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2009

Forord

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

En spesiell takk til min veileder professor Sverre Arne Sande for faglige råd og god veiledning. Takk også til Ellen Hagesæther for god hjelp i oppstart av oppgaven.

Takk til ingeniør Helge Gundersen for uvurderlig hjelp i bruk av laborieutstyr og ha svart på utallige spørsmål. Takk også til avdelingsingeniør Tove Larsen for hjelp og støtte under laboriearbeid.

Jeg vil rette en takk til professor Ragnar Bye for å bestemme ionemengde i prøvene og for andre nyttige råd og innspill.

Jeg vil også takke Khalid Hussein på GE og stipendiaten Wai Lam Yip for god hjelp til Lasentec målingene.

En takk til avdeling for farmasøytisk biovitenskap for lån av nikon mikroskopet.

Jeg vil også rette en stor takk til foreldrene mine som har støttet meg gjennom hele farmasi utdanningen. Takk for at dere alltid støtter meg. I tillegg vil jeg takke min forlovede Sikandar Hayat for å takle en ”grumpy” jente i løpet av de siste utrolig stressende månedene i oppgaven ☺.

Til slutt vil jeg takke alle hovedfagsstudenter ved avdelingen for et hyggelig og interessant år.

Blindern, mai 2009

Mehrin Shahid

Sammendrag

Mikropartikler av amidert pektin med inkorporert legemiddel ble laget ved hjelp av spraytørkingsteknikk. Det ble brukt tre forskjellige konsentrasjoner av paracetamol, 33,33 %, 23,08 % og 13,04 %. Mikroskopbilder av spraytørkede prøvene viste at partiklene var sfæriske i form. Paracetamol innhold i spraytørket pulver ble målt og ladingseffektivitet viste seg til å være høy (ca 90 %).

For å kunne velge gode kryssbindingsmidler for spraytørket pektin ble det laget kuler av amidert pektin uten virkestoff ved ionotropisk gelering. Salter som ble brukt var: AgNO_3 , ZnCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2 , NiCl_2 og CaCl_2 . Svellings- og oppløsnings egenskapene av de kryssbundne kulene ble undersøkt i fosfatbuffer pH 6,8. Kuler med Fe holdt seg lenge, mens kuler med Ag fikk verken svelling eller oppløsning selv etter et langt opphold i fosfatbuffer. Generelt hadde kulene en diameter på 1-2 mm og var stort sett runde i form.

Ag^+ , Zn^{2+} og Fe^{3+} ble valgt som kryssbindingsmiddel for spraytørket pektin.

Frisetting av paracetamol ble undersøkt fra både ikke-kryssbundet og kryssbundet pulver i fosfatbuffer pH 6,8. Det viste seg at veldig liten mengde paracetamol var tilstede i de kryssbundne pulverne. Kryssbundet pektin så generelt ut til å gi en forsinket frisetting i forhold til ikke-kryssbundet pektin.

Størrelsesmåling med FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement) ble foretatt for samtlige batcher. Størrelsen var 20-25 μm for ikke-kryssbundet og varierende for de forskjellige kryssbundne prøvene.

Ion innhold i de forskjellige kryssbundne prøvene ble målt ved atomabsorpsjon. Pulver med Ag hadde størst og pulver med Fe hadde minst ion innhold.

Innhold

1. INNLEDNING	1
1.1 BAKGRUNN	1
1.2 MÅLSETTING	2
2. FORKORTELSER.....	3
3. TEORI.....	5
3.1 TYKKTARMSPELIFIKK LEGEMIDDELFRIJØRING.....	5
3.2 HVORFOR MIKROPARTIKLER?.....	7
3.3 PEKTIN	7
3.4 SPRAYTØRKING	12
3.5 MOLEKYLVEKTBESTEMMELSE	14
3.6 STØRRELSESMÅLING	17
3.7 STATISTISK FORSØKSPLANLEGGING	19
4. MATERIALER OG UTSTYR	25
4.1 MATERIALE.....	25
4.2 UTSTYR.....	27
4.3 LØSNINGER	29
5. METODE	31
5.1 OPPRENSING AV PEKTIN	31
5.2 KARAKTERISERING AV PEKTIN	33
5.3 PEKTINKULER.....	35
5.4 KARAKTERISERING AV PEKTINKULER.....	36
5.5 SPRAYTØRKING	38

Innholdsfortegnelse

5.6	MÅLING AV MENGDE VIRKESTOFF I IKKE-KRYSSBUNDET PEKTIN	40
5.7	LYSMIKROSKOPBILDER AV IKKE-KRYSSBUNDET PEKTIN	41
5.8	KRYSSBINDING	42
5.9	BESTEMMELSE AV ION-MENGDE	45
5.10	STØRRELSESMÅLING VED LASENTEC®	46
5.11	FRISSETTINGSFORSØK	48
6.	RESULTAT	51
6.1	OPPRENSING AV AMIDERT PEKTIN	51
6.2	MOLEKYLVEKTBESTEMMELSE	53
6.3	PEKTINKULER	55
6.4	KARAKTERISERING AV PEKTINKULENE	56
6.5	SPRAYTØRKING	60
6.6	MÅLING AV MENGDE VIRKESTOFF I IKKE-KRYSSBUNDET PEKTIN	61
6.7	LYSMIKROSKOPBILDER AV IKKE-KRYSSBUNDET PEKTIN	63
6.8	KRYSSBINDING	64
6.9	BESTEMMELSE AV ION-MENGDE	69
6.10	STØRRELSESMÅLING VED LASENTEC®	71
6.11	FRISSETTINGSFORSØK	79
7.	DISKUSJON	89
7.1	MOLEKYLVEKTBESTEMMELSE	89
7.2	SPRAYTØRKING	89
7.3	LYSMIKROSKOPBILDER AV SPRAYTØRKETPEKTIN	91
7.4	KRYSSBINDING	91
7.5	LEGEMIDDEL INNHOLD ETTER KRYSSBINDING	95

Innholdsfortegnelse

7.6	FRISSETTING AV PARACETAMOL.....	97
7.7	STØRRELSESMÅLING AV PRØVENE	102
	KONKLUSJON	103
	KILDELISTE.....	105
	VEDLEGG	111

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Mange protein og polypeptid legemidler kan ikke administreres oralt på grunn av deres sensibilitet mot fordøyingsenzymer i Gastrointestinal trakten (GI-trakten) og får dårlig absorpsjon. For å øke deres biotilgjengelighet kan mucoadhesive formuleringer brukes.

Mucoadhesjon oppstår når en legemiddelformulering fester seg til mucinlaget til et biologisk vev i kroppen. En formulering med mucoadhesive egenskaper vil kunne feste seg på kroppens slimhinner. Ved å inkorporere protein og polypeptid legemidler i en slik formulering vil deres absorpsjon muligens øke ved at formuleringen holdes på den biologiske overflaten og legemidlet frisettes i nærheten av den absorptive membranen.

Pektin er et naturlig polysakkarid som er surt og vannløselig. Det er vist til å ha bioadhesive egenskaper og kan derfor brukes i mucoadhesive formuleringer [1, 2]. Pektin brytes ikke ned av kroppens egne enzymer, men bakterier i tykktarmen er i stand til å bryte det ned. En vil dermed kunne oppnå tykktarmspesifikk legemiddelfrigjøring ved å inkorporere legemiddel i pektin slik at det først frisettes i tykktarmen. Innkapsling av virkestoff i pektin kan gi mucoadhesjons- eller colon delivery system. Formuleringen vil være ulik om man ønsker det ene eller det andre.

Spraytørket pektin er små kuler og på grunn av størrelsen på disse kulene vil bioadhesiviteten til pektinet øke. Dersom et virkestoff spraytørkes sammen med en pektinløsning vil dette føre til inkorporering av virkestoffet i partiklene.

Kryssbinding av pektin vil nedsette dets løselighet i vann og vil dermed gjøre det mer egnet til å overleve den lange passasjen gjennom magen og tynntarmen. I tillegg vil det redusere frisetting av legemidlet inkorporert i partiklene.

1.2 Målsetting

Hensikten var å lage kryssbundne pektinbaserte mikropartikler med inkorporert legemiddel. Det var ønskelig å kryssbinde spraytørkede pektin partikler med forskjellige ioner og se om kryssbindingen blir bedre og i hvor stor grad frisetting av legemiddel retarderes. I tillegg var det ønskelig å undersøke virkestoff innhold i mikropartiklene og bestemme deres form og størrelse.

2. Forkortelser

ANOVA	Analysis Of Variances
c25	25 persentilen
c75	75 persentilen
Da	Dalton
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
GI	Gastrointestinal
HM	Høyt metoksyleret
IQR	Interquartile Range
IQCS	Interquartile Coefficient of Skewness
LM	Lav metoksyleret
Mw	Molekylvekt
MLR	Multiple Linear Regression
PC	Principle Component
PLS	Partiell Least Squares regression
rpm	Rotasjoner per minutt
RK	Regresjonskoeffisient
TDS	Tablet Dissolution System



3. Teori

3.1 Tykktarmspesifikk legemiddelfrigjøring

Tykktarmspesifikk legemiddelfrigjøring vil si at en formulering skal inntas oralt og at frigivelse av legemiddel skal forsinkes til tykktarmen. Tykktarmen kan brukes både for lokal og systemisk administrasjon av legemidler. I noen tilfeller kan legemidler være ustabile i mage og øvre tynntarm bl.a. på grunn av hydrolyse av for eksempel peptid og protein legemidler av proteasene i øvre tynntarmen. I tillegg til stabilitets problemer absorberes disse i veldig liten grad på grunn av deres molekylstørrelse og den høye peptidase aktiviteten i tarmen. Ved å beskytte peptid og protein legemidlene fra hydrolyse i øvre tynntarmen og få de til å frisettes i tykktarmen kan deres systemiske tilgjengelighet økes. Flere systemer kan forsøkes for å oppnå økt systemisk tilgjengelighet, bl.a. tidsaktiverte systemer, pH avhengige systemer, prodrugs og mikroflora aktiverte systemer [3].

3.1.1 Fysiologiske og mikrobiologiske forhold i human gastrointestinaltrakt (GI-trakt)

GI-trakt består av fire hovedområder: Munn, mage, tynntarm og tykktarm.

Hovedfunksjon til fordøyelsessystemet er å nedbryte store molekyler fra maten til små molekyler slik at de kan absorberes i blod eller lymfe.

Magen er en slags reservoar for maten der fragmentering gjøres ferdig og fordøyelsen begynner. Tid det tar for magetømming påvirker både hastighet og mengde av legemiddel absorpsjon fra tynntarmen fordi mat kan enten lage komplekser med legemiddel molekylene eller gjøre omgivelsene mer viskøs enn det er ved tom mage. I tynntarmen skjer det videre fordøying av maten og magesyren og pepsin nøytraliseres. Tynntarm har en stor overflate som gjør at absorpsjons effektivitet er stor.

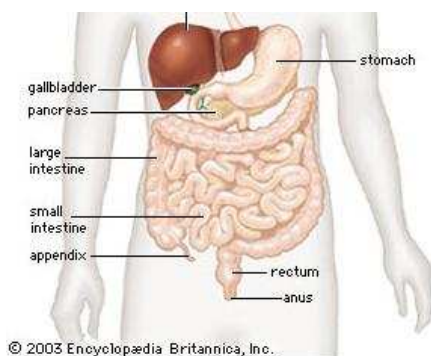
Hovedfunksjoner til tykktarmen er å absorbere vann og elektrolytter og lagre og eliminere avfallstoffer [4].

De fysiologiske endringene langs GI-trakt er nedgang i antall fordøyingsenzymmer, motilitet og væskeinnhold samt økning i pH. Tabell 1 viser oversikt over pH og residenstid i GI-trakten.

Tabell 1: Variasjoner i pH og residenstid i GI-Trakten [3]

Sted	pH	Residenstid
Mage	1-3,5	5min-2timer
Tynntarm	5-7	3-6 timer
Tykktarm	5,5-7	ca 1 time-20 timer

Den humane GI-trakten består av et komplekst økosystem av både aerobe og anaerobe mikroorganismer. Antall mikroorganismer øker nedover i tynntarmen og tykktarmen. Populasjonen av mikroorganismer er stort i tykktarmen og er minst 10^{13} CFU/g [5].



Figur 1: Gastrointestinal trakt [6]

3.2 Hvorfor mikropartikler?

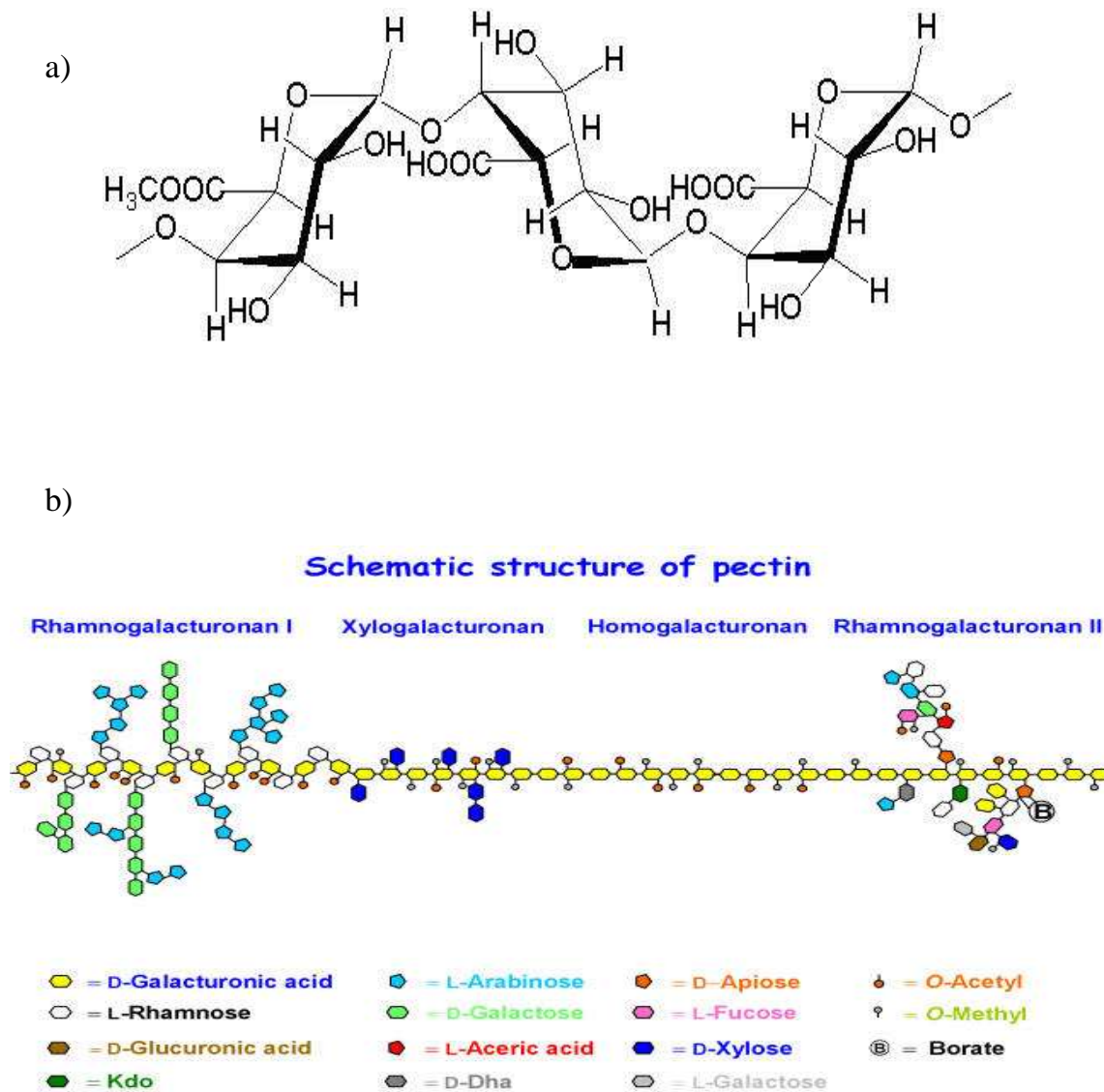
Det er viktig å bruke mikropartikulære mucoadhesive formuleringer. Etter adhesjon til mucin vil partiklene skylles vekk av de hydrodynamiske kreftene til tarmen. Dette vil rulle ut de adhesive partiklene slik at de mister kontakten med mucinlaget. Ved å bruke mikropartikler vil effekten av disse hydrodynamiske kreftene reduseres og formuleringen vil ha en lengre residensid.

Ved å redusere partikkelstørrelsen vil arealet tilgjengelig for mucoadhesjon øke og formuleringen vil dekke en mye større mucus overflate [7].

3.3 Pektin

Pektin er et kompleks som ekstraheres fra cellevegger i planter. Et pektinmolekyl består hovedsakelig av galakturonsyre enheter som lager en lineær polysakkarid kjede. Generelt deles molekylet i 3 områder [8] (se Figur 2):

1. Glatt område: Består av α -(1→4)- koblede D-galakturonsyre enheter. Disse kan være metylesterifisert på C-6 og kan ha acetylgrupper på C-2/C-3.
2. Hårete område (RGI): Består av alternerende α -(1→4) koblede D-galakturonsyre og α -(1→3) koblede L-rhamnose enheter. Dette er et høyt forgrenet område. Kan ha arabinaner, arabinogalaktaner både I og II i sidekjedene. Det kan være mange variasjoner i dette området når det gjelder sidekjedene.
3. RGII: Ryggraden består av α -(1→4) koblede D-galakturonsyre enheter. Ryggraden har 4 sidekjeder som består av sjeldne sukkerer som bl.a. DHA, KDO, aceric acid, 2-metyl-O-fucose, 2-metyl-O-xylose, apiose [9].



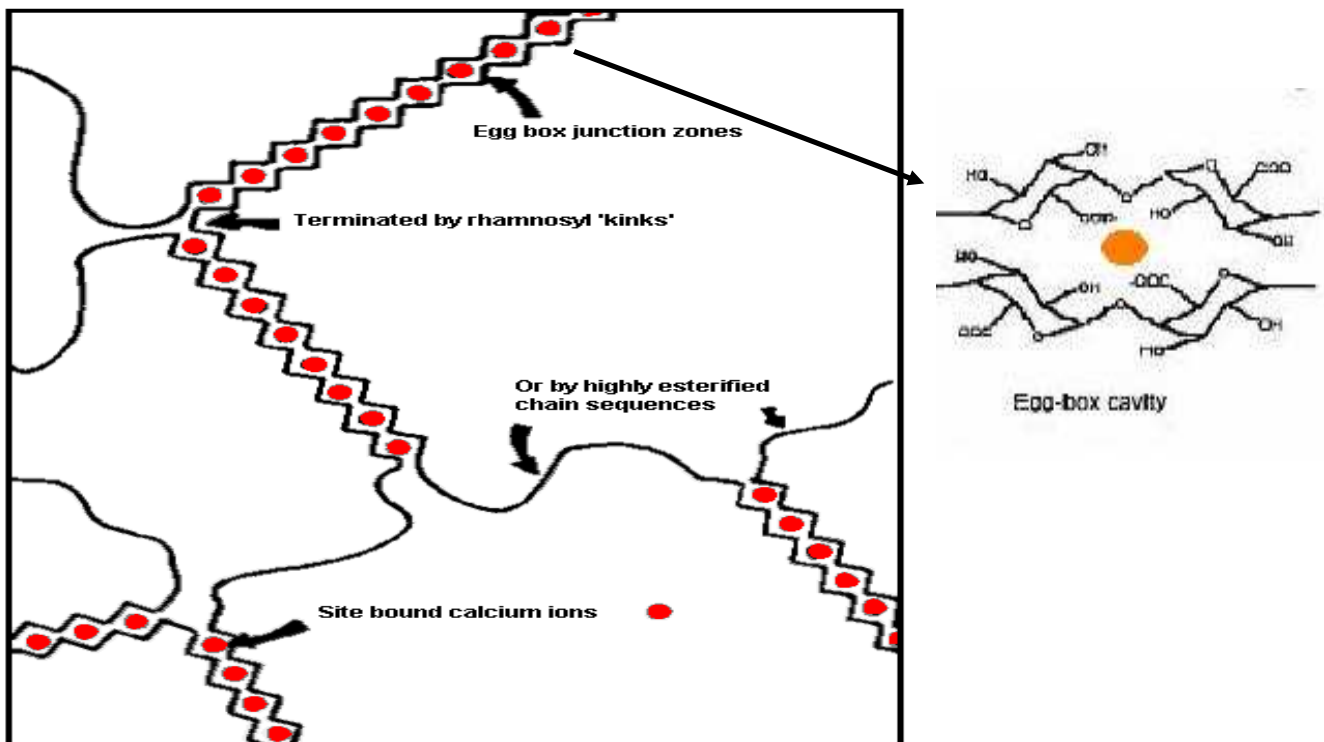
Figur 2: pektin struktur: a) pektinrygggrad (galakturonsyre enheter) b) viser de forskjellige områdene [10].

Pektin klassifiseres vanligvis av esterifiseringsgrad. Egenskaper til pektin er avhengig av denne esterifiseringsgraden. Det naturlige pektinet er høyt metoksyliert (HM). HM pektin er >50% esterifisert. Lav metoksyliert (LM) pektin oppnås ved å la HM pektin undergå deesterifisering. De-esterifisering kan oppnås ved å la HM-pektin reagere med syre i alkohol, vanligvis metanol [11]. LM pektin er <50% esterifisert.

Deesterifisering av pektin med ammoniakk gir en annen slags pektin. I dette pektinet er noen av karboksylsyre gruppene blitt amidert og kalles da amidert LM pektin. En

god egenskap av LM pektin er at det kan lage kryssbindinger med divalente kationer som for eksempel kalsium. Kryssbinding gjør at pektinet blir mer uløselig i vann og induserer ikke-kovalente assosiasjoner i karbohydratkjedene. Disse assosiasjoner er mest stabile i høy pH men er ganske stabile også i lav pH. I tillegg har de evne til å motstå hydratiseringen in- vivo i GI-trakt [12].

Kryssbinding skjer trolig ved at pektin kjedene assosieres side ved side, slik at de spesifikke sekvensene av galakturonsyre monomere lager en slags hull eller plass. I disse "hullene" kan divalente kationer sette seg og binde disse kjedene sammen ved elektrostatiske og ioniske krefter. "Egg-boks modell" er en fin modell for å kunne se for seg dette siden etter at kryssbindingen er skjedd ligner molekylet på egg-boks. Mønster på kryssbinding er avhengig av esterifisering og rhamnosyl grupper tildele i pektinkjede, se Figur 3. Dersom rhamnosyl- eller estergrupper kommer rett etter en lang rekke med karboksylsyre grupper vil kryssbinding stoppe opp og lage en "knekk" (kink) og deretter fortsette videre.



Figur 3: Skjematisk bilde for egg-boks struktur [13]

Det er funnet ut at det trengs ca 14-20 frie karboksylsyre grupper i rekkefølge for at denne egg-boks strukturen kan oppnås. Resultatet av kryssbinding er en gelingsprosess [14].

Denne gelingen av LM pektin er bl.a. avhengig av ladningsfordelingen i molekylet, molekylvekt, ionestyrke, pH og temperatur. Meningen med kryssbinding er at løseligheten til pektinet reduseres og dermed vil frisetting av legemidlet inkorporert i pektin partikler retarderes. En annen egenskap ved pektin er at det degraderes ikke av enzymer i mage og tynntarm. Det vil først degraderes i kolon av pektinolytiske enzymer som fins i tarmen [15].

3.3.1 Amidert pektin

Amidering av LM pektin påvirker dets egenskaper. For å kontrollere rheologiske og fysiske egenskapene til pektin er det ofte derivatisert til amidert pektin. Her er OCH_3 -gruppen på C-6 byttet ut med $-\text{NH}_2$ gruppe [16]. Når pektin er amidert trenger det mindre kalsium til å kunne gele enn ikke-amidert LM pektin [17].

Gelingsegenskapene vil bli sterk påvirket av antall frie karboksylsyre grupper tilgjengelige for kryssbindingen [14]. Siden amidert LM pektin (DE<50%) lager en rigid gel med divalente kationer, har det blitt brukt ved kontrollert-frisetting av legemidler og er også blitt prøvd i colon delivery system [18].

Jo mer amidert et pektin er desto mer hydrofob vil det være i forhold til LM pektin. Det kan være på grunn av amidgruppene som fører til økt dannelse av intra- og inter molekylære hydrogen bindinger. Hvis man stoler på denne hypotesen vil tilstedeværelse av amid gruppene på pektinkjeden øke muligheten for sterkere inter- og intra molekylære hydrogen bindinger, som vil gjøre pektinet mer hydrofob enn LM-pektin. Et høyt antall amidgrupper vil resultere i lavere løselighet [14].

3.3.2 Kjemiske egenskaper og stabilitet til pektin

Pektin er vannløselig og negativt ladd ved nøytral pH. pK_a for syregruppen er omtrent 3,5. pK_a er lavere med lavere DM-grad. Pektin med lavere metoksyleringsgrad har høyere vannløselighet i forhold til HM-pektin.

Viskositet til en pektinløsning vil blant annet være avhengig av M_w , grad av metoksylering (DM), pH, ionestyrke i løsningen og temperatur.

Amidert pektin er mer tolerant ovenfor pH variasjoner og mengde kalsium tilsatt.

Ved høy temperatur blir pektin depolymerisert. I syre vil pektin kunne undergå hydrolyse og deesterifisering. I basisk miljø vil pektin undergå β -eliminering hvis nabosukkeret er metoksyliert. HM-pektin degraderes raskere enn LM-pektin [19].

3.3.3 Bruk

Pektin har lenge blitt brukt i matlaging. Den brukes som stivelsesmiddel i bl.a. syltetøy og som fortykningsmiddel i mange matvarer. Innen farmasi har mange forskere prøvd å bruke pektin i "Drug delivery" systemer for å oppnå kontrollert frisetting av legemidler [20].

3.4 Spraytørking



I = Jetdyseoppsett, II = Tørkekammer, III = Display og kontrollenhet,

IV = Peristaltisk pumpe, V = Eksosutgang, VI = Syklon, VII = Oppsamlingsbeholder
[21]

Spraytørking teknikk kan brukes til å produsere tørre pulvere eller granuler fra løsninger og suspensjoner. Partikkelstørrelsen av mikropartiklene laget ved spraytørking er avhengig av dysestørrelsen. Om dysestørrelsen økes fra 1,5-2,0mm, fører det til en økning i partikkelstørrelse på omtrent 35-55 % [22]. Partikkelstørrelse mindre enn ca. 4 μm er vanskelig å oppnå på grunn av den lave evnen av syklonen til å kunne samle pulveret [23]. Prosessen involverer tre steg:

1. Atomisering: her blir løsningen atomisert gjennom en forstøver ved høy inngangstemperatur.
2. Tørking: dette skjer i et tørkekammer
3. Oppsamling av pulveret: Dette oppnås ved en syklon separator [23].

Dysen overfører væsken til små dråper. Disse dråpene tørkes i en bølge av varmluft, slik at hver dråpe tørkes til en enkel fast partikkel. En spraytørker består av tørkekammer, pumpe, eksos og oppsamlingsbeholder. Tørkekammer har en slags sykklon som forsikrer god luft sirkulering og separer ferdig tørkede partikler fra bevegende luft ved en sentrifugal virkning. Partikkel egenskaper bestemmes av dråpestørrelse. Luft kommer inni kammeret og roterer de tørkede dråpene rundt i kammeret for å øke deres residenstid og dermed tørketiden.

Spraytørkede partikler kan lett gjenkjennes og er like i utseendet. Partiklene har en hul mikrosfære. Dette fordi når dråpene kommer i luft tørkes de først på utsiden mens væsken ennå befinner seg på innsiden. Væsken deretter fordampes og dette gjør at disse partiklene har hul kjerne [24].

Fordeler ved spraytørkingsprosess:

1. Kort tørkingstid på grunn av små dråper og stor overflateareal.
2. Egnet for termolabile stoffer siden tørking skjer raskt og dråpene får ikke høy temperatur på grunn av fordampning og den korte residenstiden i tørkekammeret [25].
3. Den karakteristiske partikkelformen gir produktet høy bulktetthet og dermed rask oppløsning (stor overflate areal). Bulktettheten til spraytørket produkt avhenger av om partiklene har utblåsningshull eller ikke. Er partiklene hele blir bulktettheten lavere [22].
4. Partiklene vil ha uniform størrelse, gitt at dysen er stabil.
5. Siden partikler er sfæriske vil de gi god flyt. Dette vil være fordelaktig ved tablettproduksjon.
6. Reproduserbar, rask og lett å oppskalere. [24]

Ulemper:

Det er ikke mange ulemper ved spraytørking av løsninger. Den største ulempen er at utbytte er lav, siden en del av pulveret går ut via eksosen og noe avlegges rundt glasset i spraytørkeren. Andre ulemper kan være at det er stort utstyr og at luften må være varm nok når den går ut av tørkeren for å unngå kondensering [24]. I tillegg er metoden tidkrevende og trenger mye energi.

3.5 Molekylvektbestemmelse

Molekylvekt er en av de viktigste egenskapene for å bestemme funksjonell oppførsel til pektin. Pektin er polydispers når det gjelder molekylvekt siden molekylvekten kan variere avhengig av hvilken plante pektin er hentet fra og modningsstadiet til planten ved ekstraksjon. Nøyaktige molekylvektbestemmelser er vanskelig spesielt på grunn av de store forskjellene i strukturen og fordi det har tendens til å aggregere i løsning. Den gjennomsnittlige molekylvekten til pektin ekstrahert fra forskjellige frukt er vanligvis 10^4 - 10^5 g/mol [26].

Det fins mange ulike metoder for å kunne anslå en gjennomsnittsmolekylvekt ($\overline{M_w}$) for polymere. Den kan blant annet bestemmes ved membran osmometri, statisk lysspredning, sedimenteringsmetoder og viskometri [27].

3.5.1 Viskometri

Viskositet til en polymer løsning er direkte relatert til den relative størrelsen og formen til polymer molekyl. Viskometri er en av de mest brukte metodene for karakterisering av polysakkarid molekylvekt siden det ikke trenger mye instrumentering. Gjennom denne metoden bestemmes egenviskositet til polymeren. Egenviskositet kan relateres til molekylvekt gjennom Mark-Houwink likningen:

$$[\eta] = kM_v^\alpha$$

hvor k og α er konstanter som må oppgis for et spesifikt polymer-løsemiddel system, ved en gitt temperatur.

For polysakkarider er parametre k og α avhengige av geometrien til bindingene i polymerkjedene. Polysakkarider med utstrakte kjeder, i et godt løsemiddel, gir lave k verdier. Eksponenten α ligger på en skala fra 0.5-0.8 for en lineær tilfeldig kveilet kjede og øker med økende stivhet. Både egenviskositet og α vil være forskjellig i forskjellige løsemidler. I et godt løsemiddel vil kjeden være lett utstrakt og dermed ha høy egenviskositet og høy α . I motsetning vil både egenviskositet og α være lav i et dårlig løsningsmiddel for da vil intramolekylære interaksjoner være sterkere enn interaksjon mellom polymer og løsemiddel molekyler og polysakkaridet vil ha en kompakt konformasjon [27].

3.5.2 Betemmelse av egenviskositet

Det brukes Ostwald viscometer for bestemmelse av egenviskositet. Metoden går ut på at det lages flere løsninger av polymeren i et egnet løsemiddel, gjerne fortynnede, og tiden de bruker for å komme seg gjennom kapillæret måles. Deretter regnes det ut relativ viskositet (η_{rel}):

$$\eta_{rel} = \eta/\eta_s$$

Her er η viskositeten til polymerløsning og η_s for løsemidlet. η_{rel} kan lett regnes ut ved å dele tiden løsningen bruker for å gå gjennom kapillæret (t) på tiden løsningsmidlet bruker for å gå gjennom kapillæret (t_s), $\eta_{rel} = t/t_s$

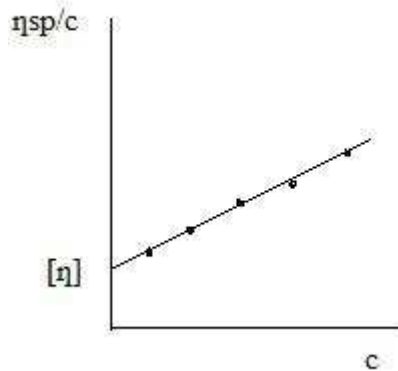
Deretter regnes det ut spesifikk viskositet (η_{sp}): $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$

Av spesifikk viskositet kan det beregnes redusert viskositet (η_{red}): $\eta_{red} = \eta_{sp}/C$, der C er konsentrasjon av polymer.

Ved fortynnede polymerløsninger kan redusert viskositet være lineært avhengig av polymerkonsentrasjon. Formelen for dette er:

$$\eta_{sp}/C = [\eta]c + K'[\eta]^2c^2$$

Denne ligningen kalles Huggins likning og K' er Huggins konstanten. Ut i fra denne likningen ser man at $[\eta]$ er $\lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$



Figur 4: Plott som brukes for å finne egenviskositet

Den lineære sammenhengen mellom polymerkonsentrasjonen og η_{sp}/c vil gi en likning $y = ax+b$. Det lages en graf med konsentrasjon (C) på x-aksen og den beregnede reduserte viskositeten på y-aksen slik det er vist i Figur 4. K' som er Hugginskonstant kan også uttrykkes som a/b^2 og gir informasjon om interaksjon mellom polymer og løsemiddel [27, 28]. Et bra løsemiddel kan gi en K' på ca. 0,4. Her er det høyest viskositet. Ved K' på ca. 0,5 er det like mye frastøtning som tiltrekning i systemet, og man har θ betingelser.

3.6 Størrelsesmåling

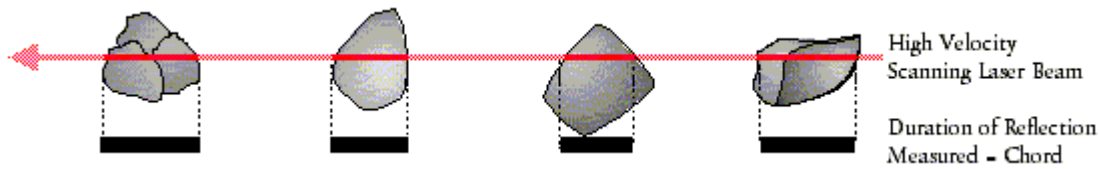
Det finnes mange forskjellige metoder for å måle partikkelstørrelse, blant annet: Laser diffraksjon, sikting, mikroskopiske metoder og Coulter counter (Electric stream sensing zone method) [29].

3.6.1 Laser diffraksjon ved Lasentec



Figur 5: Lasentec®

Lasentec® bruker en FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement) probe. Proben består blant annet av laserstråle som blir sendt gjennom et safir vindu og strålen er godt fokusert akkurat ved vindusoverflaten. Strålen blir så beveget slik at den følger en vei ved omkretsen av vinduet og beveger så raskt (2-6m/s) at partikkelbevegelse blir veldig liten i forhold. Når partiklene passerer forbi overflaten av vinduet vil laserstrålen spredes på partiklens overflate. Denne reflekteringen registreres helt til laserstrålen når den andre siden av partikkelen. Refleksjonen samles av FBRM linser og overføres til et elektronisk signal.



Figur 6: Registrering av kordlengde mens laserstrålen treffer partiklene

Programvaren vil måle den tiden refleksjonen varer og gange det med hastigheten på skanningen og slik beregne avstand. Denne avstanden kalles kordlengde.

Kordlengde er en rett linje mellom to punkter på hvilken som helst side av partikkelen (se Figur 6). FBRM måler hundretusener korder per sekund og dermed gir en robust kordfordeling [30].

3.6.2 Størrelsesmål

For å definere en størrelsesfordeling eller sammenligne pulvere som består av partikler med forskjellige diametre, kan fordelingen deles inn i forskjellige størrelsesområder.

Median (Q_2) er den midterste målingen og vil dele en størrelsesfordelingskurve i to like store deler. 25 percentil (c_{25}) er den midterste verdien i målingene på venstre siden av median. 75 percentil (c_{75}) er den midterste verdien i målingene på høyre siden av median. 25 percentil og 75 percentil kalles også Q_1 og Q_3 henholdsvis. Mean er gjennomsnittet og Mode er den størrelsen der det er målt flest partikler. IQR (Interquartile Range) er avstanden mellom Q_1 og Q_3 . $IQR = Q_3 - Q_1$ [31].

IQCS (Interquartile coefficient of skewness) er et mål på skjevhet og kan beregnes slik: $IQCS = ((c_{75} - \text{median}) - (\text{median} - c_{25})) / ((c_{75} - \text{median}) + (\text{median} - c_{25}))$.

Det kan ha alle verdier mellom -1 og +1. Hvis IQCS er null vil fordelingen være symmetrisk mellom percentilene [29].

3.7 Statistisk forsøksplanlegging

Statistisk forsøksdesign innebærer å legge opp et forsøksdesign, for deretter å modellere matematisk på resultatene ved hjelp av statistikk. Disse to operasjoner er ikke uavhengige av hverandre siden forsøksdesignet avgjør hvilke effekter som kan beregnes.

3.7.1 Forsøksdesign

Et forsøksdesign legges ut etter hva som er ønskelig for å få ut av forsøkene. Målet med dette er å få mest mulig informasjon fra minst mulig forsøk samtidig som det gjør enklere å bestemme samspillseffekter. Samspillseffekter forteller om faktorer endrer sin innflytelse på system avhengig av nivå på andre faktorer.

Faktorielt design

I et faktorielt design undersøkes det et bestemt eksperimentelt område for å se om en endring i designvariabel har effekt på responsen. Hver designvariabel studeres bare på få nivåer, vanligvis to, og varierer fra høy til lav. Faktorielt forsøk kan være av to typer:

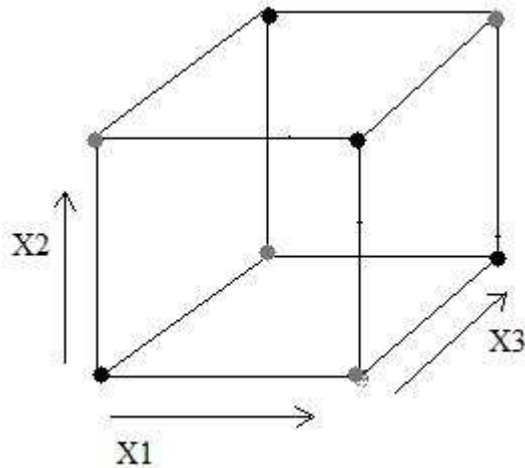
a) Fullfaktorielt forsøk

Et fullfaktorielt forsøk på to nivåer vil gi 2^n eksperimenter. n står for antall designvariabel. Dersom det er tre designvariable på 2 nivåer vil det gi $2^3 = 8$ forsøk. Fordelen med fullfaktorielt forsøk er at alle hovedeffektene og interaksjonseffekter kan undersøkes.

b) Redusert faktorforsøk

I et fullfaktorielt forsøk vil antall forsøk fort øke når det er mange designvariabler og ofte vil det ikke være lett å utføre så mange forsøk både tidsmessig og økonomisk. Ofte vil flere av de valgte variablene ikke ha noe effekt på responsene og mange av interaksjonene vil være usannsynlige. Derfor vil det hjelpe å redusere slik at

hovedeffektene kan bestemmes, men ikke for eksempel tre-faktor samspill. Et redusert faktorforsøk på 2 nivåer vil gi 2^{n-k} antall forsøk, der k er en reduseringsfaktor. Her vil man i stedet for å kombinere faktorene i alle mulige kombinasjoner kombinere bare de av faktorer og interaksjoner man antar vil påvirke effekten. Dataprogrammet tar seg av beregningen av samspill [32].



Figur 7: Fullt og redusert faktorforsøk på 2 nivåer med 3 designvariable. Ved et fullfaktorielt forsøk vil alle hjørner benyttes, mens ved redusert vil det bare brukes de grå hjørnene.

Hva som kan beregnes ut fra designet er avhengig av hvilken oppløsning design har. Oppløsning bestemmes av hvor redusert faktorforsøket er. Jo høyere oppløsning desto mer sammenblandet er effektene.

Oppløsning VI: Alle hoved- og samspillseffekter er ublandet

Oppløsning V: Alle hovedeffekter og 2-faktorsamspill er ublandet.

Oppløsning IV: Hovedeffekter er blandet sammen med 3-faktorsamspill og 2-faktorsamspill er blandet med andre 2-faktorsamspill.

Oppløsning III: Hovedeffekter er blandet sammen med 2-faktorsamspill [33].

Ulempen med redusert faktorforsøk er at når to faktorer først er sammenblandet med hverandre kan de ikke separeres matematisk. Det gjør at man ikke vet om en eventuell variasjon i respons er forårsaket av enkel variabel eller interaksjon mellom to variablene.

3.7.2 Hvordan velge design?

Flere typer design kan velges avhengig av hva man trenger å vite og hvordan man på forhånd tror at responsen henger sammen med faktorene. Design en kan velge mellom er:

1. Screening design: Undersøke mulige hovedeffekter
2. Optimaliseringsdesign: Finne de nivåene av design variablene som gir optimum respons verdi.
3. Mixture design: Brukes når nivået av alle variablene til sammen skal utgjøre noe bestemt.
4. Mixed level: Brukes når de ulike variablene skal undersøkes på ulikt antall nivåer.
5. D-optimaliserings design: Brukes når det er begrensninger på hvordan variablene kan variere.

Vil man utføre en screening eller man tror at sammenhengen er lineær, velger man et to- nivå design, tror man ikke det trenger man flere nivå. [32]

3.7.3 Multivariat modellering

MLR

I "Multiple Linear Regression" lages det en modell som predikerer variasjonen i Y fra variasjonen i X slik at det kvadrerte avviket for prøvene fra linja til sammen blir minst

mulig (minste kvadraters metode). Viktige plott i MLR er predikert verdi av prøvene plottet mot målt verdi, regresjonskoeffisienter med og uten p-verdi (som angir sannsynligheten til for at 0 er med i konfidensintervaller) og t-verdi (som angir hvor stor effekten er i forhold til standardavviket). p-verdi og t-verdi er egentlig to sider av samme sak siden p-verdien følger direkte av t-verdien. Viktige parametre er størrelsen på regresjonskoeffisienten, standardavvik fra predikert mot målt og antall forsøk. MLR brukes på designede forsøk når det er full oppløsning mellom variablene. Metoden forutsetter at X-variablene er uavhengige, at det er lite støy i X-matriks og at det er flere variabler enn prøver [34].

Prinsipalkomponentanalyse (PCA)

PCA er en bilinear modellerings metode som gir en oversikt over informasjonen i en flerdimensjonell data. Meningen med all multivariat data analyse er å dekomponere dataene slik at ikke-observerbare trender og fenomener kan detekteres. Informasjonen i de originale variablene projekteres på færre underliggende variabler som kalles Principal Component (PC). Variansen er veldig viktig. Den første PC dekker den maksimale variansen og vil gå i den retningen hvor spredningen på objektene er størst mulig. Den andre PC-en vil legge seg ortogonalt til den første og i den retningen der det fins største parten av resterende varians. PCA gir en oversikt over forhold mellom forskjellige variabler og mulighet for å oppdage mønstre, grupperinger, likheter og ulikheter mellom prøvene. Her skilles det ikke mellom responser og faktorer.

Metoden kan benyttes på alle datamatriser. Viktigste plott i PCA er:

- Loadings: To PC-er er plottet mot hverandre. Viser bidrag fra en variabel på prinsipal komponenten. PC-1 og PC-2 vil være de to retningene som forklarer mest varians i variablene. Loadings gir oversikt over intervariable sammenhenger. To variable som er plassert nær hverandre geometrisk vil kovariere positivt.
- Scoreplott: Her plottes også to PC-er mot hverandre. Vanligvis PC-1 og PC-2 siden de forklarer mest varians i tallmaterialet. Viser vekten til en prøve på

prinsipalkomponenten. Brukes for å identifisere trender og grupper, uteliggere, sammenligning av replikater osv.

- Forklart varians: Gir oversikt over hvor mye av variasjonen i datamatriksen som forklares ved det valgte antall prinsipal komponenter.

[35]

PLS

I Multivariat kalibrering relateres det to datasett, X og Y. PLS er en projeksjonsmetode hvor variasjonen i Y-variansen brukes direkte til å finne y-relevant struktur i X. Her fokuseres det både på X-variens og Y-variens siden man er mest interessert i de kovarerende områdene i disse to. Dette gir en modell som kan brukes til å tolke de ulike faktorenes effekt på Y, samt å predikere nye Y-verdier. Det er to typer av PLS. PLS1 modellerer fra en Y-variabel, mens PLS 2 modellerer flere Y-variabler samtidig [36].

Viktige plott i PLS er:

- Regresjonskoeffisienter (RK) viser hvilke X-variabler som har betydningsfull effekt på Y-variablen. Den relative størrelsen til de vektete RK-ene viser hvilken variabel som har størst betydning. For å avgjøre hvilke RK ikke bør tas med benyttes Marten's Uncertainty-test [37].
- Influenceplott benyttes til å finne uvanlige eller unormale prøver som kan ha en uheldig effekt på modellen. Dette plottet viser relativt sett hvilke prøver som har stor innflytelse på modellen og om de har stort residual som viser at de er dårlig tilpasset modellen.
- Forklart varians kan brukes til å avgjøre hvor mange PC-er modellen bør bestå av. Dette plottet viser både kalibrert forklart Y-variens og validert forklart Y-variens som funksjon av antall PC-er.

- Loadings viser bidrag fra en faktor på en PC.
- Scoreplott angir vekten til en prøve på en PC.
- Plottet som viser målt Y mot predikert Y angir modellens presisjon.

4. Materialer og utstyr

4.1 Materiale

<u>STOFF OG KJEMIKALIER</u>	<u>DISTRIBUTØR</u>
Amidert pektin: Genu pectin type LM-102 AS. Batch nr: SK81001	CP Kelco, Danmark
Natriumhexametafosfat; Batch nr: 1.3282-250	KEBO Labo AB, Sverige
Destillert vann	
Ionebyttet vann	
Paracetamol; Batch nr: 315788	Apotekproduksjon AS, Oslo
Jern(III)klortid anhydrous; Batch nr: 12321; LOT: 70600	Riedel-de Haen®, Tyskland
Nikkel (II) klorid hexahydrat; Batch nr: 72247; LOT: 1366629 51108078	Fluka Analytical, Sigma Aldrich, Frankrike
Sølvnitrat; Batch nr: 85228; LOT: 1396970 13008052	Fluka Analytical, Sigma Aldrich, England
Kalsiumklorid-2-hydrat; LOT: A835382 736	Merck, Tyskland
Sinkklorid; LOT: B0115916747	Merck, Tyskland
Magnesiumklorid hexahydrat; LOT: TA576033 037	Merck, Tyskland

<u>STOFF OG KJEMIKALIER</u>	<u>DISTRIBUTØR</u>
Kaliumdihydrogenphosphat; LOT: A837073 707	Merck, Tyskland
Natriumhydroksid; Batch nr: 71690 LOT: 70800 42407C04	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Sveits
Methanol; LOT K38629709 827	Merck, Tyskland
37 % saltsyre; LOT: K33616217 432	Merck, Tyskland
Silikonolje; Batch nr: 1.8260-500	KEBO Lab AB, Sverige
Salpetersyre 65 %; LOT: 743 K02271956	Merck, Tyskland

4.2 Utstyr

4.2.1 Til opprensing av pektin

Sentrifuge: Centra-MP4, OM 2438 fra International equipment company, USA

Shimadzu UV-160 A, Japan

Vekt: Sartorous ME235S, Lab instruments, Tyskland

Spectra/Por ® Dialysis membrane. Flat width 50mm. Spectrum Laboratories, USA.

Kapillær viskosimeter Type nr: 51613, Schott, Tyskland

Bath thermostat CT 050/2, serie nr 141821, Schott Gerate, Tyskland

Viscosity measuring Unit AVS 310, serie nr: 108631, Schott Garate, Tyskland

4.2.2 Til spraytøking

SD-06 Laboratory scale spraydryer, LabPlant

4.2.3 Til pektinkuler

Standard fin pipette fra 200-1000 uL

4.2.4 Til kryssbinding

Sikt 0,30 mm, kortblad

Freeze dryer Alpha-2-4. Serie nr: 10249 med controller LDC-1M

Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH fra Osterode med vakumpumpe: Edwards modell RV8 serie nr: 066390393. Fra Edwards England

Quantitative Filter paper 00K. Batch nr: 1998. Str: Ø110mm. Art.no. 114004.

Munktell Filter AB, Sverige

Filterpapir til frysetørker rør: Rundfilter Ø47mm. Lot EV0224-1. Batch 0969.

Fra Whatman Schleider & Schuell Microscience, Tyskland

Metanolbad: Hetofrig Serie nr: 9002097 Type CB10. Heto Birkerød, Danmark

4.2.5 Til måling av mengde virkestoff

Shimadzu UV-160 A, Japan

4.2.6 Til lysmikroskopbilder

- Til pektin kuler

Leica MZ-16 lysmikroskopet

Dataprogram: Leica application Suite versjon 2.5.0 R1, Leica Microsystems limited CMS GmbH, Sveits.

- Til spraytørketpektin:

Nikon Eclipse TE 300 DV Fluorescensmikroskop

4.2.7 Til størrelsesmåling

Lasentec D600VL (control interface for FBRM-Focused Beam Reflectance Measurement). Laser Sensor technology, Inc. USA part No 814-0140

4.2.8 Til frisettingsforsøk

Frisettingsapparat med standard gjennomstrømningsceller Sotax dissotest CE 6, Sveits.

UV-apparat: Pharmacia LKB. Ultrospec III

Pumpe: Ismatec sa, type IPS-16, Sveits

Apparatet var koblet sammen med Solwaflex pumpe-slanger med indre diameter 0,110 inch. Elkay standard tubing. LOT.no. X22905, farge:lilla og hvit.

Programmet: LKB Tablet Dissolution software fra Pharmacia LKB

4.2.9 Til bestemmelse av ionmengde

Varian atom absorpsjon spektrofotometer, Modell "SpectrAA-10".

En acetylen-luft flamme ble brukt for alle målingene.

4.3 Løsninger

4.3.1 0,1 M HCl

9,87 g 37% saltsyre ble løst i destillert vann slik at det ble 1 liter til sammen. pH ble kontrollert.

4.3.2 1,0 M NaOH

80 g NaOH kuler ble løst i destillert vann slik at det ble 2 liter til sammen.

4.3.3 Fosfatbuffer pH 6,8

94,04 g kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) og 309 mL 1,0 M NaOH ble løst i destillert vann slik at det ble 10 L til sammen. pH ble kontrollert og var 6,8.

4.3.4 Na-hexametafosfatløsning

10,0 g Na-hexametafosfat ble løst i ionebyttet vann i til 1L. pH ble justert til 4,45 med 37% HCl.

4.3.5 ZnCl₂ løsning 0,5 M

68,155 g ZnCl₂ ble løst i ionebyttet vann til 1L. Ved blakhet ble det tilsatt noen dråper sterk saltsyre til løsningen ble klar. Saltsyre ble tilsatt med forsiktighet slik at pH holdt seg over 5. pH ble kontrollert.

4.3.6 FeCl₃ løsning 0,5 M

81,1 g FeCl₃ ble løst i ionebyttet vann til 1L. Det var en rødgul, klar løsning.

4.3.7 AgNO₃ løsning 0,5 M

84,94 g AgNO₃ ble løst i ionebyttet vann til 1L. Målekolbe ble dekket med aluminiumsfolie for å beskytte løsningen mot lys.

4.3.8 CaCl₂ løsning 0,5 M

7,35 g kalsiumkloriddihydrat ble løst i ionebyttet vann til 100 mL.

4.3.9 MgCl₂ løsning 0,5 M

10,16 g magnesiumkloridhexahydrat ble løst i ionebyttet vann til 100 mL.

4.3.10 NiCl₂ løsning 0,5 M

11,89 g nikkkelkloridhexahydrat ble løst i ionebyttet vann til 100 mL.

5. Metode

5.1 Opprensing av pektin

5.1.1 Innledende forsøk – for å bestemme sentrifugetid

Det ble gjort forsøk for å finne den korteste sentrifugeringstiden som fjernet de fleste forurensningene. Metoden for opprensing av pektin var svært tidkrevende og meningen var å effektivisere denne.

Utrenningstid og turbiditetsmålinger ble brukt som mål på eventuelt tap av lange polymerkjeder og reduksjon i forurensning. Meningen var at en mer forurenset pektinløsning vil spre lyset mer på grunn av flere partikler enn en mindre forurenset pektinløsning. Tap av store molekyler vil gi en redusert viskositet og dermed nedgang i utrenningstid.

Det ble laget 1,5 % (w/v) løsning av amidert pektin i destillert vann. Løsningen ble sentrifugert i 1 time og 3 timer. Viskositet og turbiditet ble målt etter både 1 time og 3 timers sentrifugering. Sentrifugen ble stilt inn på 4600 rpm (rotasjoner per minutt).

Turbiditetsmåling

UV-spektrofotometer ble brukt for turbiditetsmåling. Spektrofotometeret ble stilt inn på 350 nm. Denne bølgelengden ble valgt på bakgrunn av UV-spekter tatt av amidert pektin løsning, og det viste seg at absorbans var høyest ved 350 nm.

I tillegg ble absorbansen til alle prøvene scannet i området 200nm-800nm.

Absorbansen ble målt rett etter sentrifugeringen både etter 1 time og 3 timers sentrifugering. Pektinløsning etter 1 times sentrifugering ble satt til side for 2 timer og deretter ble det målt absorbans en gang til for å se om henstand endrer absorbansen. I

tillegg ble det også målt UV-absorbans på pektinløsning uten sentrifugering for å kunne sammenligne absorbansene.

Måling av utrenningstid

Det ble brukt Micro-Ostwald kapillær for å måle utrenningstider til pektinløsningene både før og etter sentrifugeringene. Løsningene ble fortynnet 1:1 til totalt 4 mL med destillert vann. Viskosimetret ble stabilisert på 20°C og innstilt til 4 repetisjoner før målingene ble gjort. Det ble overført 2mL løsning til kapillæret. Løsningen tempererte seg i vannbadet før målingene ble startet. Prosedyren ble så fulgt for både den usentrifugerte prøven og prøvene sentrifugert i 1 time og 3 timer. Mellom hver prøve ble kapillæret vasket 2 ganger med destillert vann og 2 ganger med aceton for deretter tørket med nitrogen.

5.1.2 Hovedforsøk

Det ble laget 1,5 % (w/v) løsning av amidert pektin i destillert vann. Dette ble sentrifugert ved 4600 rpm i 2x60 minutter. Etter første 60 min ble supernatanten overført til nye sentrifugerør for deretter en ny sentrifugering på 60 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten overført til dialyseslange som ble lagt til bløt i destillert vann i en halv time før overføring av supernatanten. Dialyseslange bestod av en semipermeabel membran der alle molekyler med molekylvekt under 8000 D kunne fritt diffundere over membranen og ut av slangen. Slangen ble satt i destillert vann og for å holde diffusjonsgradienten over slangen ble vannet skiftet 7 ganger. Etter dialyse ble pektinløsning overført til frysetørkerkolbene og nedfrosset ved rotering i metanolbad på ca -40°C. Dette ble tørket i lavt trykk på en frysetørker i minimum 48 timer.

5.2 Karakterisering av pektin

Renset amidert pektin ble brukt til dette forsøket slik at tilstedeværelse av forurensninger ikke påvirket bestemmelsen av molekylvekt.

5.2.1 Molekylvektbestemmelse

50mL 0,5 % (w/v) amidert pektin løsning ble laget i Na-hexametafosfat løsning, siden det reduserer tendens til aggregatdannelse i forhold til rent vann [38]. Det ble benyttet et Micro-Ostwald viskosimeter med vannbad og tidsmåler. Apparatet ble innstilt på:

- 25°C
- nMeas.: 3
- Temp.cond.: 5 min

Temp.cond. som ble satt til 5 minutter betyr at kapillæret med løsningen stod i vannbadet for 5 minutter slik at den fikk rett måletemperatur. nMeas ble satt til 3, dvs at tiden løsningen trengte å renne mellom to punkter på kapillæret ble målt 3 ganger. Vannbadet ble innstilt på 25°C.

Ved hver måling ble det tilsatt 2 mL løsning til den tykkeste delen av kapillæret. Pektinkonsentrasjonene ble valgt på bakgrunn av at forholdet mellom utrenningstiden til den høyeste pektin konsentrasjonen og rent løsemiddel skal være mellom 3 og 4. Utrenningstiden til rent løsningsmiddel, Na-hexametafosfat løsning, ble målt først og deretter ble det målt utrenningstid til de forskjellige pektinkonsentrasjonene. Kapillæret ble vasket 2 ganger med destillert vann og 2 ganger med acetone og ble tørket med nitrogen mellom hver måling.

Konsentrasjoner som ble brukt er vist i Tabell 2:

Tabell 2: Konsentrasjoner brukt ved måling av utrenningstider

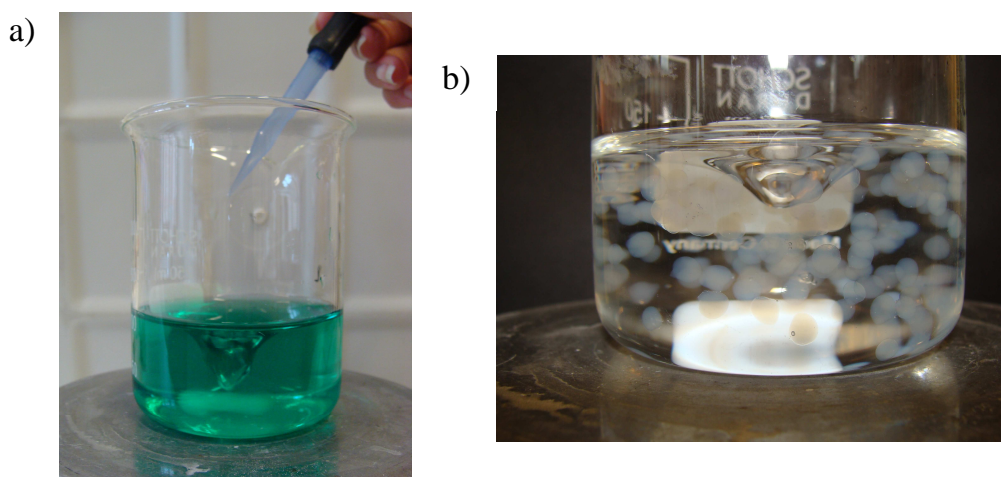
Pektin type	Konsentrasjon (w/v)			
Amidert	0,25%	0,2%	0,15%	0,10%

Konstantene som ble brukt for å beregne molekylvekt vha Mark-Houwink likningen var $K = 4,7 \cdot 10^{-5}$ og $\alpha = 1$ når konsentrasjonen er oppgitt i g/100mL [39].

5.3 Pektinkuler

Hensikten med dette var å prøve ut forskjellige kationer som kryssbindingsmiddel for amidert pektin og se hvilke kryssbinder pektin best slik at det holder ut lenge i buffer.

5.3.1 Tillaging av kulene



Figur 8: Tillaging av pektinkuler. a) metoden og utstyret, saltløsning i begerglass (NiCl_2) og pektinløsning i pipette b) pektinkuler under kryssbinding (her i AgNO_3 løsning)

En standard ionotropisk geldanningsteknikk ble brukt for tillaging av pektinkuler, se Figur 8.

3,0 % (w/v) amidert pektin løsning ble dryppet over 100 mL av forskjellige saltløsninger med konsentrasjon på 0,5 M. Saltløsninger ble laget i rensert ionebyttet vann. Det ble dryppet en dråpe per sekund under røring slik at kulene ikke gikk sammen under drypping og kryssbinding. Til drypping ble det brukt en pipette med gummikork (indre diameter var 1,0 mm). 100 dråper ble dryppet i hver saltløsning. Kulene som var laget fikk lov til å ligge i kryssbindingsløsningen i 1 time under sakte magnetrøring. Etter 1 time ble kulene filtrert fra ved hjelp av filterpapir. De kryssbundne partiklene ble deretter vasket to ganger med 50 mL ionebyttet vann for å

få vekk overskudd av positive ioner og de resterende negative ionene. Partiklene ble tørket i 24 timer på labbenk ved romtemperatur. Partiklene ble snudd en gang under tørkingsprosessen slik at de ikke ble flate på den ene siden.

Det ble brukt klorid salter av forskjellige ioner slik at det var lettere å kunne sammenligne kulene. Ioner som ble brukt var: Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ .

Siden kloridsaltet av sølv feller ut i vann ble det benyttet sølvnitrat i stedet for sølvklorid.

0,5 M $ZnCl_2$ løsning var blakket. For å få en klar løsning ble det tilsatt noen dråper 0,2 M HCl helt til pH ble 5 eller løsningen ble klar.

Sølv i $AgNO_3$ er et enverdig kation. For å forsikre at det ikke var forurensninger eller andre metaller tilstede i pektinet som fikk kryssbindingen til å skje ble pektinet renset og deretter kryssbundet med $AgNO_3$ en gang til. Kryssbindingsmetoden var den samme som med ikke-renset amidert pektin.

5.4 Karakterisering av pektinkuler

5.4.1 Oppløsning av kulene i fosfatbuffer

Hensikten var å se hvor lenge kulene holdt seg i fosfatbuffer pH 6,8 under omrøring.

Etter tørking ble de tørkede pektinkulene lagt i 100 mL fosfatbuffer pH 6,8 og dette ble holdt under sterk magnetrøring til kulene løste seg helt. Oppløsning av kuler ble bestemt ved visuell observasjon. I avsnitt 5.3.1 ble det laget 100 kuler. Her ble 95 kuler tilsatt i buffer og resten ble oppbevart for videre forsøk.

5.4.2 Mikroskopbilder

Mikroskopbilder ble tatt for å få en visuell oversikt over kulene. Hensikten var å se hvor lang tid det tok før kulene svullet og løste seg og hvordan de så ut under hele

prosessen. Det ble først tatt et bilde av en kule før den ble satt i buffer, for å se hvordan det så ut og for å kunne sammenligne kulene før og etter tilsetning i buffer. Det ble brukt en liten petriskål som ble halvfyllt med buffer og en kule ble lagt i slik at kulen var helt dekket av buffer under hele prosessen. Det ble tatt bilder etter bestemte tidsintervaller helt til kulen hadde løst seg. Tidsintervallene ble bestemt etter tiden kulene brukte på å bli oppløst i buffer under sterk røring, se avsnitt 5.4.1 og 6.4.1.

5.5 Spraytørking

5.5.1 Innledende forsøk

Hensikten med dette forsøket var å bli kjent med spraytørkeren og se om innstillingene funnet ut i [19] kunne brukes.

750mL 3,0 % (w/v) løsning av amidert pektin ble laget i destillert vann.

Konsentrasjon på 3,0 % ble brukt fordi det har vist seg å gi finest pulver tidligere [19]. Før spraytørking ble spraytørkeren vasket med vann på høy pumpehastighet for å være sikker på at det var rent. Innstillingene som ble brukt under spraytørking var:

Deblokkerings hastighet: Slow (10 ganger/minutt)

Pumpehastighet: 3 (205 mL/time)

Inntemp: 200 °C

Ut-temp: 100 °C

Viftehastighet: 30 (3,5 m/s)

Dysetørrelse: 0,5 mm

For å holde temperaturen høyt i tørkekammeret og hindre at det går ned på grunn av romtemperatur ble det pakket inn med aluminiumfolie. Løsningen ble holdt i røring med en magnetrører under hele spraytørkingsprosessen.

5.5.2 Hovedforsøk

Hensikten med dette var å spraytørke amidert pektinløsninger sammen med et virkestoff.

Metode

Det ble valgt 3 % (w/v) løsninger med amidert pektin siden tidligere erfaringer har vist at det er vanskelig å jobbe med pektinkonsentrasjoner høyere enn 3,0 % under spraytørking. Løsningene med en høyere pektinkonsentrasjon har tendens til å stivne i slangen på vei til pumpen [19]. Pektinløsningene ble tilsatt forskjellige mengder virkestoff. Virkestoffet som ble valgt var Paracetamol. Løsningene ble laget ved at pektin ble løst i destillert vann over natt på kraftig røring. Dagen etter da pektinet var løst i vann, ble det tilsatt paracetamol slik at ønsket konsentrasjon ble oppnådd. Dette sto på kraftig røring i 3-4 timer til alt var løst. Det ble laget ny pektinløsning for hver legemiddelkonsentrasjon. Da paracetamol-pektin løsninger var klare ble løsningene spraytørket i en spraytørker under konstant omrøring og oppvarming (50°C). Tørkekammeret ble pakket inn i aluminiumsfolie. Spraytørkeren ble innstilt slik det er skrevet i 5.5.1.

Paracetamol mengder og den eksakte sammensteningen av løsningene var som vist i Tabell 3.

Tabell 3: Sammensetningen av løsninger som ble benyttet for spraytørking

Mengde amidert pektin (g)	Mengde paracetamol (g)	Løsningsvolum (L)	Paracetamol mengde (%) *
30,0	15,0	1	33,33
30,0	9,0	1	23,08
30,0	4,50	1	13,04

* Prosentene er regnet ut av den totale tørrstoff mengden.

Etter at spraytørking var ferdig ble det tørkede pulveret overført til en plast beholder med lokk, merket og oppbevart i kjøleskap. Det måtte lages flere batcher av alle prøvene underveis i oppgaven med samme sammensetning som oppgitt i Tabell 3.

5.6 Måling av mengde virkestoff i ikke-kryssbundet pektin

Hensikten var å finne ut hvor mye paracetamol det egentlig var i de ikke-kryssbundne pulverne. De teoretiske mengdene var 33,33 %, 23,08 % og 13,04 %.

Først ble det laget standardkurve med paracetamol i fosfatbuffer pH 6,8.

For å lage standardkurve ble 200 mg paracetamol løst i 100 mL buffer slik at konsentrasjonen ble 2mg/mL. Det ble laget en fortynningsrekke med disse konsentrasjonene av paracetamol:

1. 0,5 µg/mL
2. 1 µg/mL
3. 2 µg/mL
4. 4 µg/mL
5. 6 µg/mL
6. 8 µg/mL

Det ble brukt et UV-apparat og absorbansen ble målt ved 243 nm. Denne absorbansen er i samsvar med det som er brukt i litteraturen [40, 41].

For måling av paracetamol mengde ble $3,1 \pm 0,10$ mg pulver veid opp og løst i 50 mL buffer til alt var løst. Hver måling ble gjort i 4 replikater. Buffer ble valgt som blindprøve under målingene. Kvartskvyetter ble skylt 3-4 ganger med vann og 1 gang med buffer mellom hver måling.

5.7 Lysmikroskopbilder av ikke-kryssbundet pektin

Hensikten var å se på størrelsen på prøvene og sammenligne de med hverandre. I tillegg var det også meningen å se hvordan partiklene så ut og hvilken form de hadde.

Til dette forsøket ble det brukt spraytørket pektin uten virkestoff fra avsnitt 5.5.1 og prøvene med forskjellige konsentrasjoner av virkestoff fra avsnitt 5.5.2.

Mikroskopering ble utført med 1000 gangers forstørrelse. Bildene ble tatt med fasekontrast, fra undersiden av prøvene. Prøvene ble suspendert i silikonolje på et objektglass og suspensjonen ble strøket utover objektglasset for å fordele partiklene. Dekkglasset ble lagt forsiktig på for å unngå luftbobler.

5.8 Kryssbinding

5.8.1 Innledende forsøk

Hensikten med forsøket var å komme frem til den konsentrasjon av saltløsninger som gir god ladingseffektivitet og størst utbytte.

Forsøk ble gjort på spraytørket pektin med virkestoff mengde på 33,33 % og salt som ble brukt var ZnCl_2 .

Tre konsentrasjoner av ZnCl_2 ble prøvd:

1. 0,2 M
2. 0,5 M
3. 1 M

Det ble laget 100 mL løsninger i ovennevnte konsentrasjoner. Løsningene ble laget i ionebyttet vann. For å få klare løsninger av sinkklorid ble 0,5 M og 0,2 M løsningene tilsatt noen dråper saltsyre. 1M løsning var klar og trengte ikke tilsetning av saltsyre. 1,0 g spraytørket amidert pektin ble siktet med 0,3mm sikt over sinkklorid løsninger som sto på røring slik at det ble en jevn suspensjon. Deretter ble dette kryssbundet under svak røring i 10 minutter. Kryssbindingstid på 10 minutter ble valgt fordi det var i samsvar med [19, 42].

Etter kryssbindingsperioden ble kryssbundet pektin filtrert fra. Filtratet ble suspendert i 100 mL ionebyttet vann og kryssbundet pektin ble igjen filtrert fra. Prosedyren ble gjentatt 2 ganger. Denne vaskeprosedyren ble gjort for å skylle vekk overflødig sinkioner.

Til slutt ble filtratet suspendert i 100 mL ionebyttet vann. Dette ble deretter nedfrosset i en rundkolbe under rotering på et bad av metanol på ca -40°C og frysetørket til produktet var tørt og i pulver form.

Måling av mengde virkestoff

Hensikten var å måle virkestoff mengde i kryssbundet amidert pektin (33,33 % virkestoff) med $ZnCl_2$ og se hvilket av de tre produktene hadde størst innhold av virkestoffet paracetamol.

3 mg kryssbundet pulver ble overført til 10 mL målekolber. Deretter ble dette løst i fosfatbuffer pH 6,8. Løsningene ble holdt under røring til alt pulver var løst. Det tok ca 3 timer.

UV- apparatet ble slått på ca 2 timer før målingene ble gjort. Apparatet ble stilt inn på 243 nm. Fosfatbuffer ble brukt som blindprøve. Alle løsningene ble holdt under røring før absorbans ble målt. Det ble tatt ut ca 5 mL av en og en løsning (mens de andre fortsatt var på røring) og ble overført til en kvartskyvette. Deretter ble det lagt inn i UV-apparatet for absorbansmåling. Kvartskyvette ble skylt 2 ganger med vann og 2 ganger med buffer for deretter tørket med papir utenpå mellom hver måling.

Forsøket ble gjort i flere paralleller. Antall paralleller for de tre produktene var:

- Pulver kryssbundet med 0,2 M sinkklorid: 4
- Pulver kryssbundet med 0,5 M sinkklorid: 6
- Pulver kryssbundet med 1 M sinkklorid: 4

5.8.2 Hovedforsøk

2,0 g spraytørket pulver med virkestoff ble veid opp og siktet 0,3mm over 200mL saltløsning. Pulver ble siktet under omrøring. Dette ble kryssbundet i 10 min. Etter kryssbinding ble det kryssbundet pulveret filtrert fra og vasket 3 ganger med 100 mL

ionebyttet vann. Deretter ble filtratet suspendert i 200 mL ionebyttet vann. Dette ble fryst ned ved -40°C under rotering i metanolbad og deretter frysetørket til produktet var tørt og i pulver form. Det ble lagt inn et filterpapir i lokket til kolbene slik at pulveret ikke forurenset frysetørkeren og for å hindre tap av stoffet.

Alle batcher med spraytørket pulver ble kryssbundet på samme måte. Salter som ble brukt var: ZnCl_2 , FeCl_3 , AgNO_3 .

Design for kryssbinding var som vist i Tabell 4:

Tabell 4: Design for kryssbinding (viser også antall replikater som ble laget av hver batch.)

	Spraytørket pulver med forskjellige mengder paracetamol		
Salttype	33 %	23 %	13 %
ZnCl_2	1	1	1
FeCl_3	3	3	3
AgNO_3	1	1	1

Til sammen ble det laget 15 prøver.

Etter frysetørking ble samtlige prøver veid inn, merket og ble lagt i kjøleskap.

5.8.3 Modellering

Siden utytte var forskjellig for de forskjellige prøvene ble det foretatt en PLS 1 modellering hvor det ble undersøkt om noen av ionetyperne eller legemiddelkonsentrasjon i de forskjellige prøvene hadde korrelasjon med utbytte etter kryssbinding (mg). Det var ønskelig å se om noen av de nevnte variablene førte til økt eller redusert utbytte. Her ble bare kryssbundne batcher brukt som sample set.

Alle dataene ble vektet $1/\text{STDev}$. Samspillsledd ble også tatt med og det ble kjørt med full kryssvalidering og usikkerhetstest ("jack knife").

5.9 Bestemmelse av ion-mengde

Hensikten med dette forsøket var å måle ion-mengde i de kryssbundne prøvene.

Ion-innhold ble bestemt i alle prøvene ved hjelp av atomabsorpsjon.

100 mg prøve ble veid inn og tilsatt 5 mL konsentrert salpetersyre i et begerglass. Begerglasset ble dekket med urglass og satt på vannbad til det sluttet å reagere og løsningen ble klar. Løsningene var gule. Innholdet ble overført til en målekolbe og ble fortynnet til 50mL med destillert vann. Begerglasset ble skylt godt slik at alt ble overført til målekolben.

Samtlige prøver ble fortynnet i ønsket mengde og ion innhold ble bestemt.

Bølgelengdene som ble brukt for Ag, Zn og Fe var henholdsvis 328,1 nm, 213,9 nm og 248,3 nm.

5.9.1 Modellering

Det ble utført en PLS 1 analyse for å se om ion typer, legemiddelkonsentrasjon eller samspill mellom disse hadde noen sammenheng med ion-mengde. MLR var litt vanskelig å bruke siden det var for mange kategorivariabler og analysen ble litt ubalansert på grunn av dem.

Alle dataene ble vektet $1/STDev$. Samspillsledd ble også tatt med og det ble kjørt med full kryssvalidering og usikkerhetstest ("jack knife").

5.10 Størrelsesmåling ved Lasentec[®]

Det ble brukt en Lasentec[®] med software og hensikten var å bestemme størrelsesfordeling på prøvene. Målingene skjer med å ha en probe i en suspensjon som er under røring. Prøven må være i røring under målingen for å hindre sedimentering av partiklene og for å ha flest mulig partikler tilgjengelig for måling.

5.10.1 Størrelsesmåling av ikke-kryssbundet pektin

200 mg ikke-kryssbundet pektin med inkorporert paracetamol ble suspendert i 100 mL metanol. Metanol ble brukt i stedet for vann fordi spraytørket pektin er lett løselig i vann. Siden meningen var å måle partikkelstørrelse var det viktig at prøven var i suspensjon. Før måling ble suspensjonen satt i et ultralydbad for å slå opp aggregater. Proben og røreverket ble deretter satt ned i suspensjonen. Suspensjonen satt på røring i 30 sekunder før målingene ble startet.

Dataprogrammet var innstilt på at en måling skulle ta 30 sekunder og det totalt skulle tas 10 målinger kontinuerlig. Størrelsen på partiklene ble målt under kraftig omrøring.

Relevante mål var c_{25} , median, c_{75} , gjennomsnitt og mode. Etter at målingene var ferdige ble IQCS og IQR beregnet. Det ble beregnet gjennomsnitt og standardavvik for hver prøve. Beregningen ble gjort med Microsoft Office Excel 2007.

5.10.2 Størrelsesmåling av kryssbundet pektin

Størrelsesmåling av kryssbundet pektin ble gjort i destillert vann. 100 mg prøve ble suspendert i 100 mL destillert vann siden kryssbundet pektin er mindre løselig i vann enn ikke-kryssbundet pektin. Resten av metoden var det samme som i avsnitt 5.10.1. Det ble brukt de samme relevante mål også.

5.10.3 Modellering

Hensikten var å få bedre oversikt over prøvene og de forskjellige størrelsesparametrene.

PCA på størrelsesmål

For å finne grupperinger, likheter og forskjeller mellom prøvene og for å få en oversikt over forhold mellom de forskjellige variablene, ble det gjennomført en PCA analyse på størrelsesmålene.

Alle variablene ble vektet $1/STDev$ før modellering og validert med full kryssvalidering.

PLS 1 med partikkelstørrelse som respons

Det ble utført en PLS 1 analyse på designvariablene for å se om noen av de hadde signifikant effekt på partikkelstørrelsen. MLR var ikke mulig å bruke siden X-variabler brukt var ikke uavhengige av hverandre.

Designvariablene som ble brukt under PLS 1 var:

- Kryssbundet (1 for ikke-kryssbundet pulver og 0 for kryssbundet pulver)
- Ion typer (Ag^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+})*
- Legemiddel konsentrasjon
- Ionmengde

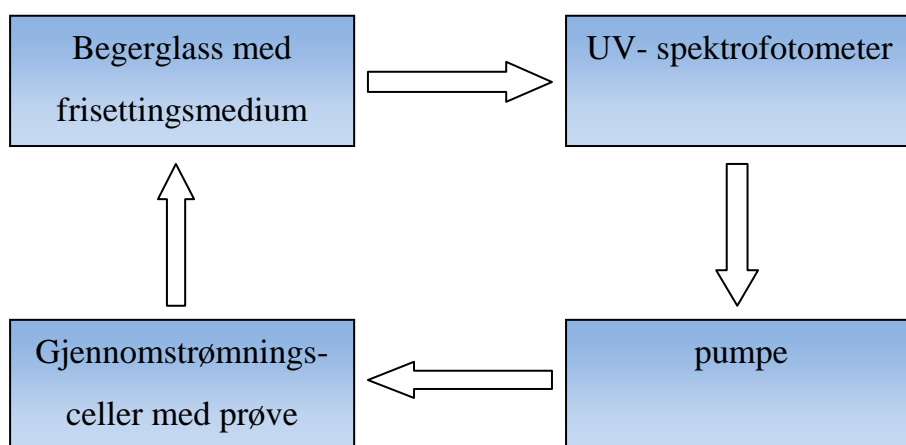
* Det ble laget en kolonne for hvert motion i datasettet i stedet for en felles kolonne for å unngå å ha for mange kategoriske variabler. I de forskjellige kolonnene for motioner ble prøver med det enkelte ionet definert som 1 og de andre som 0.

Alle dataene ble vektet $1/STDev$. Samspillsledd ble også tatt med og det ble kjørt med full kryssvalidering og usikkerhetstest ("jack knife").

5.11 Frisettingsforsøk

Hensikten var å undersøke frisetting av paracetamol gjennom ikke-kryssbundet og kryssbundet pektin. I tillegg skulle dette forsøket også gi oversikt over paracetamol innhold (ladingseffektivitet) i de kryssbundne prøvene. Det var også meningen å se om kryssbinding ga langsommere frisetting av virkestoff i forhold til ikke-kryssbundne prøvene.

Til frisettingsforsøk ble det brukt et frisettingsapparat med gjennomstrømningsceller. Apparatet bestod av 6 gjennomstrømningsceller, en pumpe, UV spektrofotometer og 6 begerglass plassert på magnetrører. Disse var koblet sammen via plastslanger. Det lå en slange i hvert begerglass som førte væske fra glasset til spektrofotometeret og gjennomstrømningscellene og deretter tilbake til karet. Apparatet var koblet slik det er vist i figuren nedenfor:



UV-spektrofotometeret var koblet til en datamaskin slik at alle målingene ble overført dit. Dataprogrammet som ble brukt var Tablet Dissolution System (TDS) versjon 2.30. Programmet styrte pumpen og spektrofotometeret under selve målingene. Via dette programmet bestemte man hvordan pumpen og UV-apparatet jobbet. Pumpen pumpet med en hastighet på 8 mL/min. Forsøksparameterne som kan innstilles er: antall prøver, omløpstid, antall målinger og bølgelengde. Dataene fra spektrofotometeret ble lagret automatisk i TDS.

5.11.1 Frisetting av paracetamol

Det ble laget en standardkurve for paracetamol. 250 mg paracetamol ble veid inn og løst i 250 mL fosfatbuffer pH 6,8. Denne løsningen ble fortynnet med buffer slik at konsentrasjonene ble: 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL og 20 µg/mL. Deretter ble det målt absorbans ved 243 nm. En kyvette med kun buffer ble brukt som referansecelle.

Frisetting fra Ikke-kryssbundet amidertpektin

10 mg prøve ble plassert i gjennomstrømningsceller og frisetting ble målt. Målingene ble gjort i 6 paralleller. Frisettingsmedium var 166 mL fosfatbuffer med pH 6,8 for å etterligne tykktarmsmiljø. Før målingene ble UV-apparatet nullstilt ved å kjøre buffer gjennom systemet. Frisetting ble målt ved 37°C og bølgelengde var 243nm. TDS programmet ble innstilt slik at frisetting skulle måles i totalt 30 min. Absorbans ble automatisk målt hvert minutt.

Dette ble gjort med alle tre spraytørkede prøvene (forskjellig paracetamol innhold).

Frisetting fra kryssbundet amidertpektin

Samme metode som frisetting fra ikke-kryssbundet pulver ble brukt. Programmet ble stilt inn slik at frisettingen ble målt i 2 timer og absorbans ble målt hvert minutt.

Totalt ble det 120 målinger.

Etter at alle målingene var gjort ble absorbans relatert til mengde paracetamol frisatt etter standardkurven ved hjelp av Excel.

6. Resultat

6.1 Opprensing av amidert pektin

6.1.1 Turbiditetsmåling

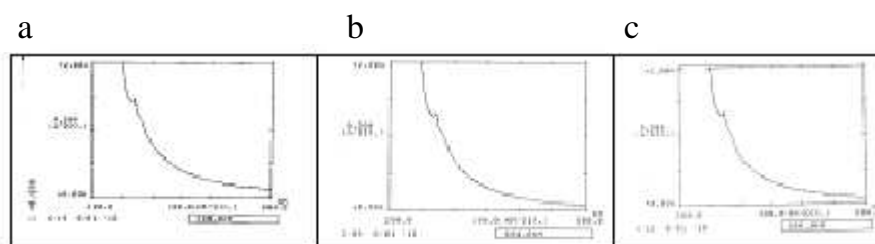
For absorbansmålingene se Tabell 5:

Tabell 5: Absorbansmålinger

	Usentrifugert	Sentrifugert i 1 time	Sentrifugert i 1 time (med 2 timers henstand)	Sentrifugert i 3 timer
Absorbans	1,307	1,191	1,225	1,222

Liten forskjell på absorbans verdiene viser at det ikke er stor forskjell på klarheten til løsningen etter 3 timer enn det var etter 1 time sentrifugering. Absorbans øker litt etter 3 timers sentrifugering og det kan skyldes at noen av polymere feller ut. Absorbansen etter sentrifugering i 1 time var mindre enn det var uten sentrifugering, noe som tyder på at pektin løsning er mindre forurenset etter sentrifugering. Det er vanskelig å si om denne forskjellen er signifikant siden det ikke ble laget noen replikater for å bekrefte dette.

Figur 9 viser spektrene som ble tatt vha UV spektrofotometer. Spektre ble brukt som mål på turbiditet til løsningene.



Figur 9: UV-spektre for amidert pektin uten sentrifugering (a) og etter sentrifugering, 1 times sentrifugering (b) og 3 timers sentrifugering (c).

Spektre tatt opp ved de ulike sentrifugeringstidene viste ingen forskjell. Spektre for usentrifugert amidert pektin viste derimot en høyere absorbans enn de sentrifugerte prøvene (se Tabell 5).

6.1.2 Måling av utrenningstider

Se Tabell 6 for utrenningstider til pektinløsning både før og etter sentrifugering.

Tabell 6: utrenningstider

Sentrifugeringstid	Utrenningstid (s)			
Uten sentrifugering	173,38	173,38	173,48	173,50
1 time	210,35	210,41	210,63	210,88
3 timer	203,77	203,96	204,05	204,03

Økt sentrifugeringstid har ikke blitt funnet til å gi nedgang i utrenningstider i forhold til uten sentrifugering. Forskjellen mellom utrenningstider på 1 times- og 3 timers sentrifugering er liten. Siden viskositet til en polymer er avhengig av bl.a. størrelsen til polymerkjedene ville en mindre utrenningstid tyde på ødeleggelse av noen av de lengre polymerkjedene. Utrenningstider er større etter sentrifugering enn det var uten sentrifugering, noe som kan skyldes økt viskositet på grunn av bedre utstrakte kjeder ved fravær av forurensninger.

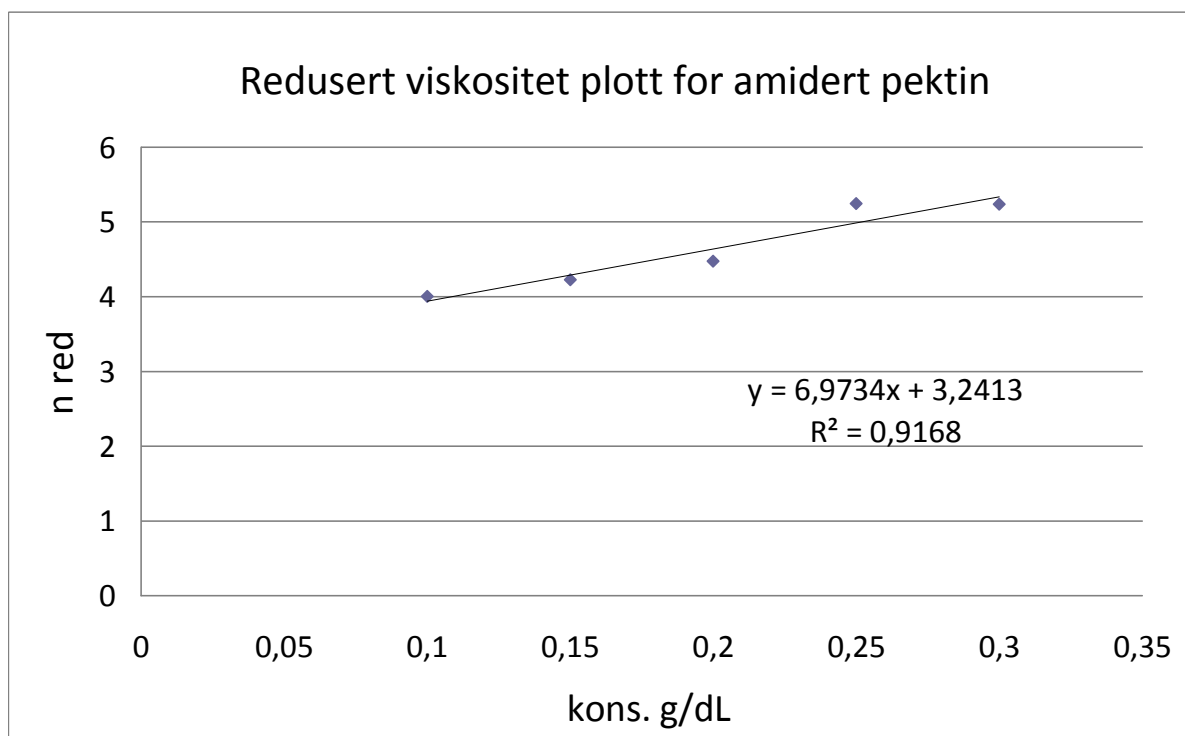
Konklusjon for dette forsøket var at det ble valgt å sentrifugere ved 1 time 2 ganger. Det ble valgt en sentrifugering på 2 timer totalt på bakgrunn av at utrenningstider var litt mindre ved sentrifugering på 3 timer og for å være sikker på at all forurensning ble fjernet. Etter 1 time ble de sentrifugerte pektinløsningene overført forsiktig til et nytt sentrifugerør for ny sentrifugering på enda 1 time.

6.2 Molekylvektbestemmelse

Pektin er et naturprodukt og kan derfor ha varierende molekylstørrelse, både innenfor og mellom batcher.

6.2.1 Amidert pektin

Viskositet til de ulike konsentrasjonene som er gitt i Tabell 2 i avsnitt 5.2.1 ble målt. Molekylvekt ble bestemt ved å plote η_s/C mot konsentrasjon (C). Konsentrasjon var i g/dL, se Figur 10.



Figur 10: Redusert viskositet plott for amidert pektin

Beregning av Molekylvekt:

$$M_w = 3,24/4,7 * 10^{-5} \approx 69000 \text{ Da.}$$

$$\text{Hugginskonstant: } 6,97/3,24^2 \approx 0,66$$

Løsningsmidlet ga en Hugginskonstant på 0,66. Dersom konstanten er 0,50 er det like mye frastøtning som tiltrekning i systemet. Hugginskonstant på 0,66 vil si at molekylet ikke var fullstendig utstrakt i løsemidlet eller at det var polymer aggregater ved de høyeste konsentrasjonene. Molekylvekten ble da muligens underestimert.

6.3 Pektinkuler

Alle saltløsningene var klare uten noen tegn på blakket unntatt ZnCl_2 løsningen. Det er fordi Zn^{2+} kan reagere med vann og lage Zn(OH)_2 . Dette er basisk og pH i løsningen øker. Dersom pH blir større enn 6 vil Zn(OH)_2 felle ut og gjøre løsningen blakk. Dette kan hindres ved å tilsette litt saltsyre helt til blakket blir borte. Det er viktig at pH ikke blir for lav for da vil pektin kunne undergå hydrolyse og deesterifiseres siden pektin ikke er stabil i syre. Kryssbindingen vil også bli dårligere ved lav pH.

0,2 M HCl ble dryppet ned i løsningen til den ble klar. Det ble tilsatt 16 dråper HCl.

Med en gang pektinløsning ble dryppet ned i saltløsningene ble dråpene kryssbundet og lignet små kuler. Kulene fikk samme fargen som saltløsning de ble dryppet i. Pektinkuler kryssbundet med FeCl_3 fikk rød farge. Kulene laget i NiCl_2 løsning fikk grønn farge. Kulene laget i AgNO_3 fikk svak grønn farge. Siden resten av saltløsningene var klare resulterte det i hvite kuler.

Da pektinløsningen ble dryppet ned i MgCl_2 ble det ikke dannet noen kuler og pektin løste seg i MgCl_2 løsningen.

Kulene generelt hadde en rund og fin form.

AgNO_3 som kryssbindingsmiddel for rensset amidert pektin

Kulene var lysegrønne og var lik de som ble laget av ikke-renset amidert pektin. Dette viste at selv om Ag^+ er et enverdig kation kan det kryssbinde amidert pektin og at forurensningene i ikke-renset amidert pektin ikke spilte så stor rolle under kryssbindingen av amidert pektin.

6.4 Karakterisering av pektinkulene

6.4.1 Oppløsning av kulene i fosfatbuffer

De tørre pektinkulene ble satt i buffer under sterk røring med magnet. Tid for svelling av kulene som står under i tabellen er blitt bestemt med det blotte øyet og er bare en vurdering. Tiden som er angitt for svelling i denne oppgaven er tidspunktet for maksimal svelling. Etter dette tidspunktet økte kulene ikke mer i størrelse og begynte og bli mindre på grunn av oppløsning. Tid for oppløsning var den tiden de brukte for å løse seg helt i bufferen.

Tabell 7 viser tid det tar for svelling og oppløsning av kulene i fosfatbuffer.

Tabell 7: Tid det tar før pektinkuler kryssbundet av forskjellige ioner er svellet og oppløst

Salt	Tid det tar før svelling	Tid det tar før oppløsning
ZnCl ₂	ca. 15 min	58 min
NiCl ₂	ca. 4 timer	10 timer 16 min
FeCl ₃	ca. 2 timer	8 timer 40 min
CaCl ₂	ca. 20 min	1 time 20 min
AgNO ₃ *		

*Laget av urensset pektin. Kulene lå under omrøring i 48 timer. Det skjedde ingen svelling og heller ingen oppløsning av kulene. De ble etter hvert om til små uløselige partikler (smuler) og falt ned i bunnen. Etter ca 1 døgn skjedde det ingen endringer i tilstanden. Da det viste seg at kulene ikke var oppløst selv etter 2 døgn magnetrøring ble forsøket avsluttet.

6.4.2 Mikroskopbilder

Resultater fra oppløsning av pektinkuler i buffer med omrøring (avsnitt 6.4.1) ble brukt for valg av tidsintervaller for mikroskopbildene. Bildene ble tatt etter gitt tidsintervall avhengig av om kulene brukte lang eller kort tid før de løste seg helt opp.

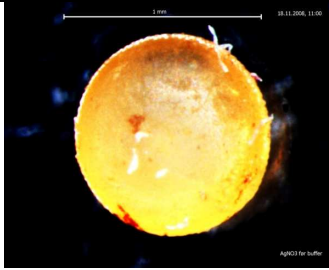

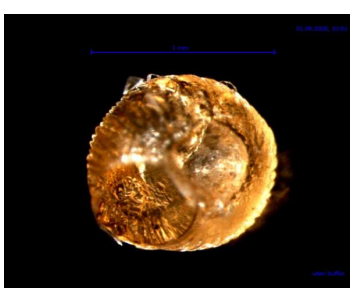
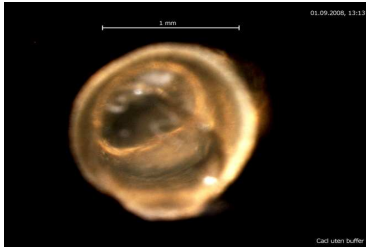
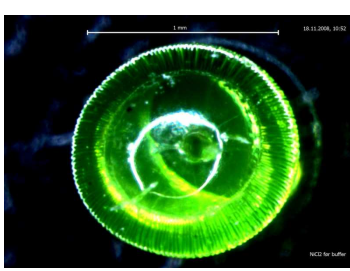
Kulene kryssbundet med $ZnCl_2$ og $CaCl_2$ løste seg raskere enn de andre og derfor ble bilder tatt etter kortere tidsintervaller slik at en bedre oversikt over deres oppførsel kunne oppnås.

Under mikroskopfotografering ble ikke kulene holdt under røring og av den grunn tok de lengre tid for å løse seg opp i fosfatbuffer enn det de brukte under avsnitt 6.4.1.

Bilder ble tatt både etter tørking og etter at de ble satt inn i fosfatbuffer for å kunne sammenligne endring i størrelse og form av kulene.

Mikroskopbilder av ferdigtørkede pektin kuler laget av amidert pektin er vist i Tabell 8 (se neste side)

Tabell 8: Mikroskopbilder av pektinkuler (tørket)

Kryssbindingsmiddel	Mikroskopbilder av tørre kuler
AgNO_3	
FeCl_3	
ZnCl_2	
CaCl_2	
NiCl_2	

Mikroskopbilder der kulene er tilsatt i buffer (ved 0 minutter) og bilder ved tidspunktet for svelling og oppløsning av kulene er å finne i vedlegg 1.

Kulenes oppførsel i buffer er forskjellig for forskjellige ioner (jfr. bilder i vedlegg 1).

Kuler laget med AgNO_3 løser seg ikke i buffer men fordeler seg i små ikke-løselige partikler. Det skjedde heller ingen svelling av kulene. Etter 37 timers opphold i buffer fikk kulen smuldret form. I bildet etter 37 timer har hele kulen blitt til små partikler (se vedlegg 1). Det ble tatt bare et bilde etter det (ved 39 timer). Siden det ikke skjedde noe mer med kulene først etter å ha blitt til smuldrer i avsnitt 6.4.1 ble det ikke tatt flere mikroskopbilder etter 39 timer.

Kuler laget med ZnCl_2 og CaCl_2 oppfører seg nesten likt (jfr. Vedlegg 1). Det ser ut som om CaCl_2 kulene er ferdig svellet etter ca 30-35 min og deretter begynner de å bli borte eller løse opp. Kulene løser seg helt etter 2 timer og 30 minutter. Kuler med sink er ferdig svellet etter ca 30 minutter og etter det begynner den å bli borte litt etter litt. Når det er gått ca 2 timer og 30 minutter har kuler løst seg helt i fosfatbuffer.

Kuler med FeCl_3 som kryssbindingsmiddel ser ut til å være mer kompakte enn de andre kulene (se Vedlegg 1). De holder mye lenger i forhold til de andre kulene og begynner ikke å svulle før det har gått ca. 2 timer. Svellingsprosessen tar lengre tid enn de andre kulene og som det er vist i bildene har kuler stadig svellet fram til det har gått 6 timer. Det er mulig at kuler sveller enda mer etter den tiden siden neste bildet ikke ble tatt etter at det hadde gått 24 timer. I bildet ved 24 timer hadde kuler begynt å løse seg på overflaten. Kuler er helt borte i bildet tatt etter 2 døgn og 21 timer. Det viser at kuler kryssbundet med sink holder seg i ca 3 døgn.

I bilder for kuler med nikkell er kuler ferdig svellet etter ca 3 timer og deretter begynner det løse seg i buffer. Kuler er helt borte etter ca 7 h. Kuler holdt seg lengre under forsøket i avsnitt 6.4.1 enn kuler med jern. Årsaken kan være hastighet på magnetrøring. For oppløsning av NiCl_2 kuler ble det brukt en annen type magnetrører enn til oppløsning av de andre kulene.

6.5 Spraytørking

6.5.1 Innledende forsøk

Innstillingene som er blitt brukt før i [19] og er beskrevet i avsnitt 5.5.1 ble brukt. Disse innstillingene fungerte fint og ble brukt videre i oppgaven.

6.5.2 Hovedforsøk

Spraytørking av amidert pektin løsninger sammen med virkestoff gikk fint.

Løsningene med 13,04 % paracetamol satte seg litt på glassveggene i spraytørkeren. Dette gjorde at det måtte skrapes litt i veggene for å kunne få all pulveret ut av sykklonen ellers var pulveret tørt. Pulveret med 33,33 % paracetamol satte seg minst i veggene og var minst elektrostatisk.

Utbytte etter spraytørking av de forskjellige løsningene er vist i Tabell 9. I denne tabellen er det oppgitt mengde spraytørket pulver og utbytte for alle batcher som ble laget av spraytørket pektin underveis i oppgaven.

Tabell 9: Utbytte etter spraytørking ($n=3$ for 33 %, $n=2$ for 23% og 13 %) med $(\text{max} - \text{min})/2$ verdier.

Mengde Paracetamol	Mengde pektin (g/L)	Mengde spraytørket pulver (g)	Prosent utbytte (%)
33,33%	30	15,36 ± 0,37	34,13 ± 0,82
23,08%	30	13,75 ± 0,43	33,78 ± 1,1
13,04%	30	11,18 ± 0,20	32,41 ± 0,58

Det var ikke så stor forskjell på utbyttet til de forskjellige pulverne. Men en kan se at pulveret med mest paracetamol konsentrasjon gir størst utbytte. Det kan skyldes at det

satte seg minst på veggene til spraytørkeren og var lett å få ut av oppsamlingsbeholderen.

6.6 Måling av mengde virkestoff i ikke-kryssbundet pektin

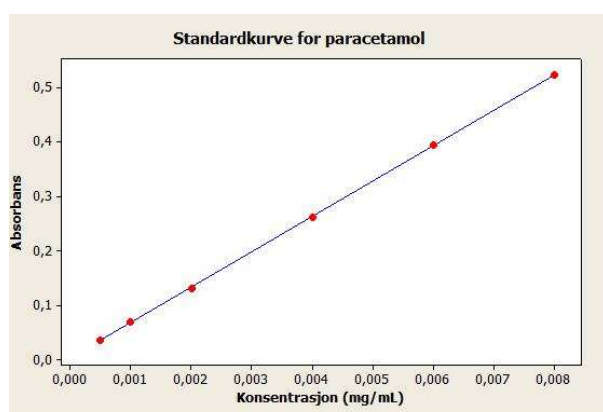
6.6.1 Standardkurve av paracetamol

Absorbans til alle konsentrasjoner i fortynningsrekken gitt i avsnitt 5.6 ble målt ved 243 nm. Nedenfor er det oppgitt en tabell over absorbansene (se Tabell 10)

Tabell 10: Standardkurve for paracetamol

Konsentrasjon (mg/mL)	Absorbans
0,0005	0,036
0,001	0,069
0,002	0,13
0,004	0,262
0,006	0,395
0,008	0,523

Disse verdiene ga en rettlinjert standardkurve:



Figur 11: Standardkurve for paracetamol

Ligning for regresjon: $y = ax + b$

$$y = 65,114x + 0,00251$$

Denne kurven ble brukt til å beregne paracetamol konsentrasjon.

6.6.2 Måling av mengde paracetamol

Alle målinger ble gjort i 4 replikater. De målte absorpsjonsverdiene var som vist i

Tabell 11. Konsentrasjonen ble regnet ut etter likningen fra standardkurven.

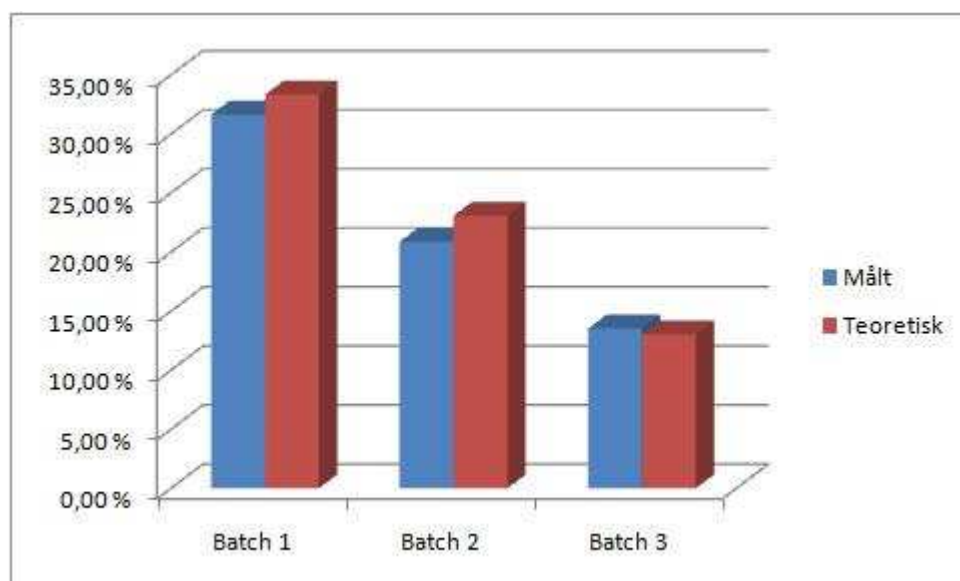
Tabell 11: Resultat for måling av paracetamol mengde i spraytørket batch med (max-min)/2 verdier for spredning. Gjennomsnitt av n=4

	Absorbans	Konsentrasjon (mg/mL)	Mengde lm (mg)	Mengde lm i %
33 %	1,239	0,0193	0,95 ± 0,08	94,98 ± 0,15
23 %	0,819	0,0125	0,627 ± 0,03	90,82 ± 3,72
13 %	0,536	0,00812	0,406 ± 0,04	104,10 ± 10,1

Av tabellene ovenfor kan man se at av 33,33 %, 23,08 % og 13,04 % virkestoff ble det funnet henholdsvis ca. 95 %, 91 % og 104 % i de ferdig spraytørkede pulverne.

Den siste batchen har høyere virkestoff innhold enn den beregnede teoretiske mengden. Figur 12 viser oversikt over de teoretiske og målte verdiene i batchene.

Figur 12: Paracetamol innhold i spraytørket pulver. x-aksen viser de forskjellige batchene, Batch 1= 33,33 %, Batch 2=23,08 % og Batch 3=13,04 %, og y-aksen viser % paracetamol innhold.



6.7 Lysmikroskopbilder av ikke-kryssbundet pektin

Silikonolje er upolar og spraytørket pektin skal være uløselig i dette. Mikroskopbilder ble fine, men det var vanskelig å si noe om formen til partiklene. De fleste partiklene hadde en lys ring rundt seg som gjorde at de så runde ut. Bilder er å finne i Vedlegg 2.

6.8 Kryssbinding

6.8.1 Innledende forsøk

Når spraytørket pektin ble siktet over en ZnCl_2 løsning ble det observert en homogen suspensjon raskere når konsentrasjon av sink var høyere.

Under filtrering, etter kryssbindingsperioden og under vasking, ble det først brukt et filterpapir med porestørrelse 0,8 mm. Det gjorde at filtreringen gikk veldig sakte og det ble umulig å kunne fullføre forsøket. Derfor ble forsøket gjort på nytt med et annet filterpapir som var grovere. Da gikk filtreringen raskere.

Frysetørring ga et fint produkt for alle ZnCl_2 konsentrasjonene. Utbyttet var lite siden noe av pulveret lå igjen i frysetørrer etter at frysetørking var ferdig. Utbytte av kryssbundet amidert pektin med de forskjellige ZnCl_2 konsentrasjonene var følgende:

Tabell 12: Utbytte etter kryssbinding med ZnCl_2

ZnCl_2 konsentrasjon	Utbytte (%)
0,2 M	6,90
0,5 M	35,8
1 M	13,35

Kryssbinding av amidert pektin ga størst utbytte ved 0,5 M ZnCl_2 .

Resultat

Resultater fra måling av virkestoffmengde i de tre pulverne er oppført i Tabell 13

Tabell 13: Virkestoffmengde (teoretisk innhold av paracetamol: 0,999 mg)

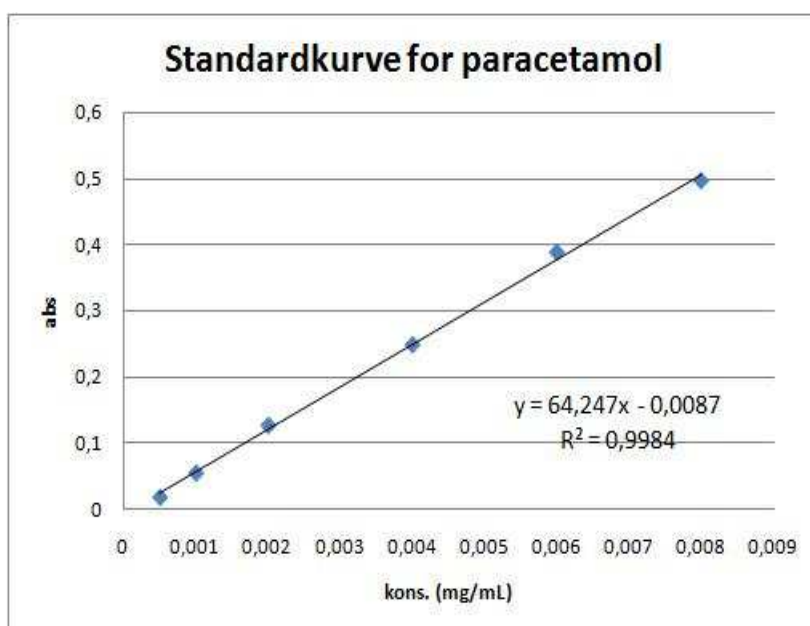
	ZnCl ₂ -konsentrasjon		
	0,2 M	0,5 M	1 M
Absorbans	0,351	0,301	0,392
Paracetamol kons. (mg/mL)	0,0056	0,0048	0,0062
Mengde Paracetamol i %	5,66	4,87	6,30

Mengde paracetamol (%) i tabellen over er beregnet fra det teoretiske paracetamol innholdet i prøvene.

Standardkurven som ble brukt til å beregne paracetamol konsentrasjon var slik:

Tabell 14: Standardkurve for paracetamol

Konsentrasjon (mg/mL)	Absorbans
0,005	0,017
0,001	0,054
0,002	0,126
0,004	0,248
0,006	0,388
0,008	0,496



Resultat for måling av virkestoff mengde viser at godt over 90 % av virkestoffet er blitt borte under kryssbindingsprosessen.

Siden det ikke var stor forskjell mellom mengde paracetamol i pulver kryssbundet med de tre $ZnCl_2$ konsentrasjonene ble det tatt utgangspunkt i utbytte og konsentrasjonen 0,5 M ble brukt videre i oppgaven. For å hindre at pulver lå igjen i frysetørker og av den grunn førte til lav utbytte av kryssbundet pulver under frysetørking, ble det besluttet å sette et filterpapir i frysetørker kolbene under hovedforsøket.

6.8.2 Kryssbinding hovedforsøk

Etter frysetørking hadde alle produktene homogent utseende og var i pulver form. Pulver kryssbundet med $ZnCl_2$ og $AgNO_3$ var hvitt mens de som ble kryssbundet med $FeCl_3$ hadde gulbrun farge. Etter utført forsøk ble hver prøve veid. Tabell 15 viser en oversikt over utbytte etter kryssbindingsforsøk.

Tabell 15: Utbytte etter kryssbinding (hovedforsøk)

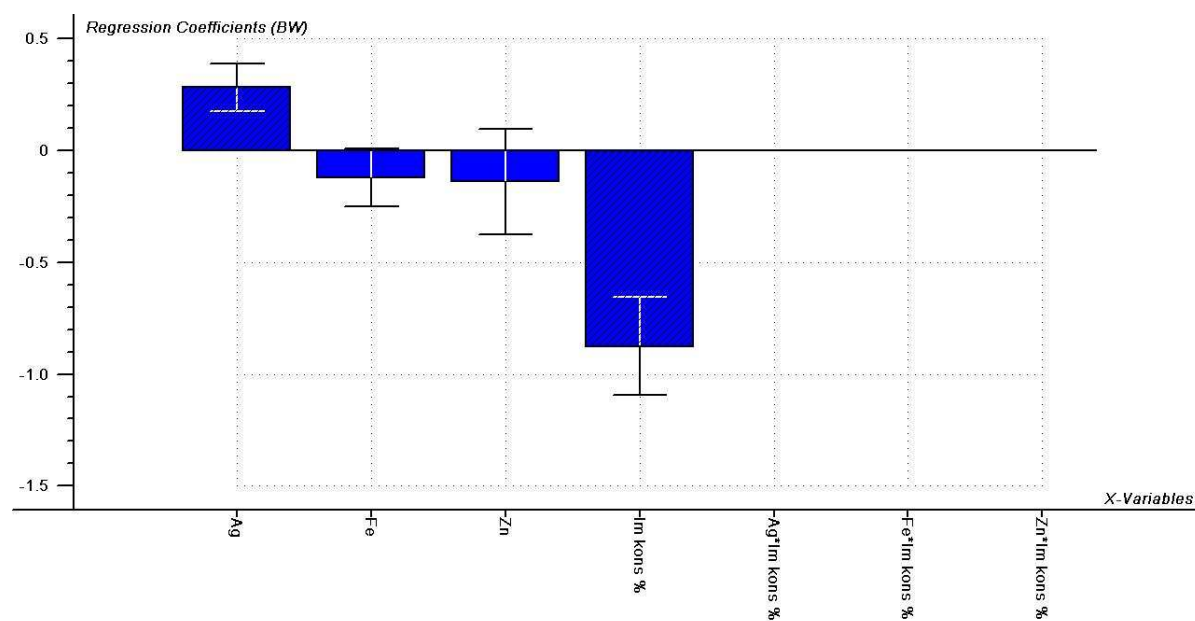
Salttype	Utbytte (%)		
	33 %	23 %	13 %
$ZnCl_2$	25,80	30,95	40,85
$FeCl_3$			
1	28,75	31,25	38,5
2	29,0	31,3	37,6
3	29,95	32,15	38,95
$AgNO_3$	32,5	37,35	43,5

Av tabellen ovenfor kommer det fram at det var størst utbytte av kryssbundet pulver i batchene med minst paracetamol mengde. Batch med størst paracetamol mengde hadde minst utbytte.

6.8.3 Modellering på utbytte etter kryssbinding

For å se om noen av variablene, motioner og legemiddelkonsentrasjon eller samspill mellom disse, hadde sammenheng med utbytte etter kryssbindingen ble det forsøkt å modellere disse variablene sammen ved hjelp av PLS1. Her ble bare de kryssbundne prøvene brukt som sample sett. Alle tre ioner og legemiddel konsentrasjon ble brukt som X. Man får da en modell med høy forklaringsgrad (92 %) med 2 PCer (se vedlegg 5)

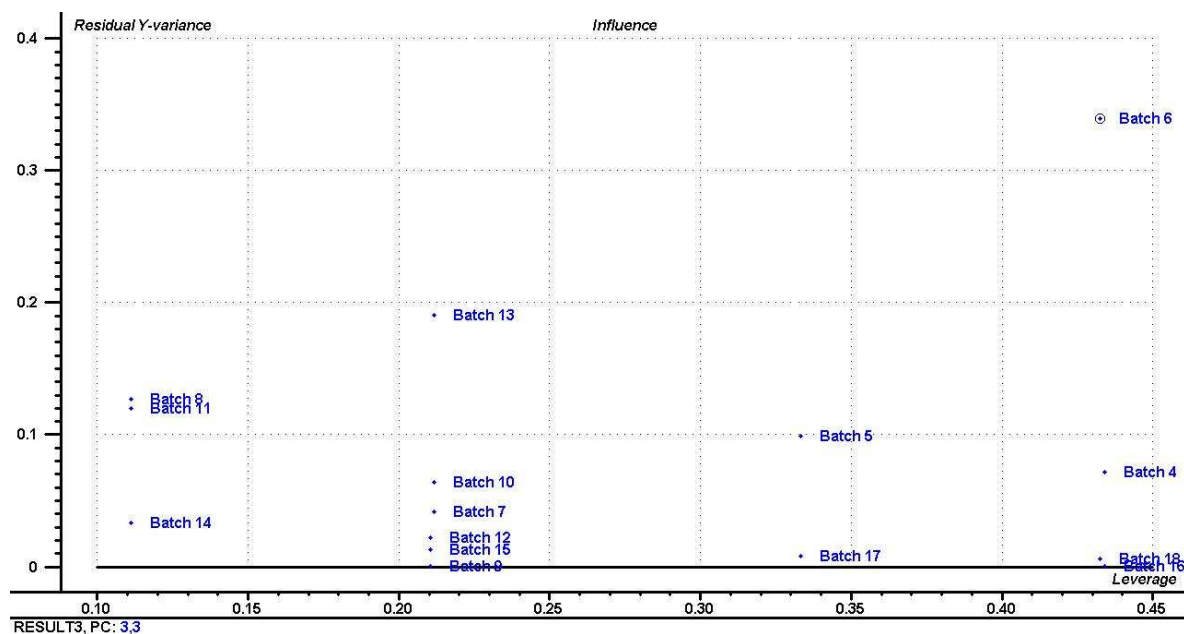
Ingen av de samspillsleddene var signifikante.



RESULT3, (Y-var, PC): (utb. Kryss,3) B0W = 9.006528

Figur 13: Signifikante regresjonskoeffisienter, med regresjonskoeffisienter for Fe og Zn, i en PLS 1 analyse på designvariable og utbytte etter kryssbinding

Resultat



Figur 14: Influenceplott for modellering av designvariable og utbytte etter kryssbing

Figur 13 viser at legemiddelkonsentrasjon og sølv er signifikante faktorer. Figur 14 viser influenceplottet for modelleringen. I dette plottet ligger Batch 6 (Zn med 13,04% paracetamol) langt ute i både x- og y retning i plottet. Det ser ut som om denne prøven er en uteligger. Hvis denne batchen tas vekk, blir både r^2 i predikert vs. målt og forklaringsgraden til modellen bedre. I tillegg blir motion Zn signifikant dersom batch 6 tas vekk fra modellen. Etter å ha tatt ut batch 6 var forklaringsgraden 96 % ved bruk av 2 PCer og r^2 var 0,95 (se vedlegg 5).

At Zn blir signifikant når Zn med den laveste legemiddelkonsentrasjon tas ut kan tyde på at en interaksjon mellom legemiddelkonsentrasjon og Zn er til stede, men som ikke er stor nok til å være signifikant. Modelleringen viser at Zn er dårligere enn Fe siden den gir mindre utbytte (større regresjonskoeffisient enn Fe).

Regresjonskoeffisient for sølv viser at dets effekt er signifikant og har en positiv effekt på utbytte etter kryssbindingen

Generelt viser modelleringen at jo høyere legemiddel konsentrasjon det er desto lavere blir utbytte. Grunnen til det er muligens at jo mer legemiddel innhold det er i partiklene desto lavere blir forholdet mellom polymer og legemiddel. Dersom legemiddelmengde økes vil partiklene ha makroporøs morfologi og i tillegg vil

partiklene få sprekker i overflaten [15, 43]. Det løsere nettverket og tilstedeværelse av sprekker i overflaten kan være grunnen til at utbyttet blir lavere for partikler med økt legemiddelkonsentrasjon. En annen mulig forklaring kan være at paracetamol løser seg raskere enn pektin og når det er mye paracetamol vil det forsvinne mye under kryssbindings- og vaskeprosessen og dermed føre til lavere utbytte.

6.9 Bestemmelse av ion-mengde

Oversikt over ion-innhold i de forskjellige prøvene er gitt i Tabell 16. Resultatet er gitt i mg per 100 mg pulver (se avsnitt 5.9).

Tabell 16: Ion-innhold i de forskjellige prøvene

Type ion	Mengde ion (mg)		
	33 %	23 %	13 %
Ag ⁺	25,0	25,0	23,6
Zn ²⁺	6,25	6,25	6,25
Fe ³⁺ 1	2,58	2,96	3,64
2	3,16	2,91	3,20
3	3,21	4,40	2,72

6.9.1 Modellering på ionemengde som respons

Det ble laget en modell på motioner, Fe, Ag og Zn, og legemiddelkonsentrasjon for å se om de hadde noe effekt på ionemengde i batchene. Det ble tatt med samspill i analysen og det viste seg at alle tre ioner hadde signifikant effekt på ionemengden.

Resultat

Verken samspill eller Legemiddel konsentrasjon hadde signifikant effekt og modellen antyder at disse påvirker ikke ionemengden i kryssbundet pektin.

Modelleringen antydte at Ag, Fe³⁺ og Zn²⁺ har signifikant forskjellig ionemengde og for å se mer på akkurat dette ble det utført en-veis ANOVA. ANOVA er en metode som beregner signifikans av effekter ved å sammenligne variasjonen som følge av en effekt med tilfeldig variasjon. ANOVA ble utført for å sammenligne alle tre ioner og deretter ble det gjort en t-test for å vise forskjellen mellom sink og jern innhold. t-testen ble utført for å bevise at ionemengde for Zn og Fe var forskjellig.

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Zn	3	18.75	6.25	0
Fe	9	28.78000045	3.197777828	0.298969484
Ag	3	73.69000053	24.56333351	0.6256341

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1039.672364	2	519.8361822	1712.323077	1.8125E-15	3.885293835
Within Groups	3.643024071	12	0.303585339			
Total	1043.315388	14				

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Zn	Fe
Mean	6.25	3.197777828
Variance	0	0.298969484
Observations	3	9
Pooled Variance	0.239175587	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	9.361576219	
P(T<=t) one-tail	1.44999E-06	
t Critical one-tail	1.812461102	
P(T<=t) two-tail	2.89997E-06	
t Critical two-tail	2.228138842	

De lave p-verdiene, $p < 0,05$, viser at disse effekter er signifikante. ANOVA-testen viser at Ag har mye større effekt enn Fe og Zn. t-test viser også at null-hypotesen kan forkastes ved $p < 0,05$ og at Zn har større effekt enn Fe på ionemengden. Det stemmer med teorien om at Zn er et to-verdig kation og vil binde seg til to karboksylsyre grupper, mens Fe er tre-verdig og vil binde seg til tre syregrupper. Det vil dermed være plass til flere Zn-ioner enn Fe-ioner i lommene til pektin og flere Zn-ioner vil være med for å kryssbinde pektin.

6.10 Størrelsesmåling ved Lasentec[®]

Størrelsesfordelingene viste større partikkelstørrelse enn det som ble observert på bildene tatt med lysmikroskopet.

Generelt var det vanskelig å lage en fin suspensjon av kryssbundne prøvene i vann. Noen av prøvene inneholdt ganske mange aggregater, noe som påvirket størrelsesfordelingene samtidig som standardavviket for noen av målingene ble ganske store. Størrelsesfordelinger for samtlige batcher er å finne i vedlegg 3.

6.10.1 Størrelsesmåling av ikke- kryssbundet pulver

Tabell 17: Størrelsesparametre for spraytørket pektin ($n = 10$)

Spraytørket pektin med paracetamol mengde i %	c 25 (μm)	Median (μm)	Mean (μm)	c 75 (μm)	IQCS (μm)
33 %	$10,67 \pm 0,16$	$21,74 \pm 0,1$	$30,86 \pm 0,1$	$41,78 \pm 0,34$	$0,29 \pm 0,008$
23 %	$19,79 \pm 0,06$	$30,67 \pm 0,01$	$29,80 \pm 0,06$	$33,7 \pm 0,11$	$-0,56 \pm 0,009$
13 %	$17,21 \pm 0,04$	$25,32 \pm 0,03$	$28,01 \pm 0,03$	$37,36 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,003$

Mean ser ut til å være like stor for de forskjellige batchene. 33 % har en høyere spredning enn de andre og 23 % ser ut til å ha høyere median enn de andre.

IQCS for batch med 23,08 % paracetamol er negativ noe som betyr at fordelingen er skjevfordelt og har hale mot venstre.

Fordelinger for 23 % viser en enorm topp ved 31,5 μm (se vedlegg 3). Denne toppen var tilstede i alle 10 målingene. Det er uklart hvorfor denne toppen er til stede.

Kanskje det var på grunn av en flekk eller noe som satt fast på safir vinduet til proben og derfor ble målt under størrelsesmålingen. Denne toppen kan muligens være grunnen til den høye medianen siden median er det punktet som deler arealet under kurven i to like deler. I tillegg kan den negative IQCS også skyldes toppen ved 31,5 μm .

6.10.2 Størrelsesmåling av kryssbundet pektin

Tabell 18: Størrelsesparametre for batch med 33,33 % paracetamol (n=10)

Salt	c 25 (μm)	Median (μm)	Mean (μm)	c 75 (μm)	IQCS (μm)
ZnCl ₂	19,63 \pm 0,13	30,44 \pm 0,13	34,58 \pm 0,23	43,83 \pm 0,44	0,11 \pm 0,02
FeCl ₃ 1	22,74 \pm 2,7	49,42 \pm 0,13	57,95 \pm 2,74	84,94 \pm 3,6	0,14 \pm 0,03
2	22,62 \pm 0,27	43,84 \pm 0,49	61,14 \pm 0,4	90,43 \pm 1,97	0,37 \pm 0,005
3	24,82 \pm 0,3	47,40 \pm 1,46	56,93 \pm 0,75	81,4 \pm 1,29	0,20 \pm 0,03
AgNO ₃	21,23 \pm 0,38	35,62 \pm 0,21	41,24 \pm 0,27	53,15 \pm 0,48	0,98 \pm 0,004

IQCS er større enn 0 for alle batcher. Alle fordelinger er høyreskjeve.

Resultat

Variasjon mellom batch kryssbundet med FeCl₃ er ikke så stor når forskjellige parametre sammenlignes.

Tabell 19: Størrelsesparametre for batch med 23,08 % paracetamol (n=10)

Salt	c 25 (µm)	Median (µm)	Mean (µm)	c 75 (µm)	IQCS (µm)
ZnCl ₂	13,96 ± 0,25	23,73 ± 0,39	28,87 ± 3,04	37,52 ± 0,39	0,17 ± 0,02
FeCl ₃ 1	13,13 ± 0,24	22,60 ± 0,18	27,33 ± 0,32	35,39 ± 0,42	0,15 ± 0,01
2	18,39 ± 0,71	37,83 ± 2,52	64,53 ± 2,30	155,2 ± 7,33	0,55 ± 0,01
3	6,1 ± 0,09	9,68 ± 0,41	11,11 ± 0,11	12,78 ± 0,34	-0,07 ± 0,07
AgNO ₃	14,11 ± 0,19	23,86 ± 0,16	31,32 ± 0,31	37,23 ± 0,41	0,16 ± 0,14

Ifølge tabellen er størrelsen på partiklene nesten like stor uansett om det er kryssbundet med jern, sink eller sølv. Replikater kryssbundet med jern viser stor variasjon.

Suspensjonen for Fe (replikat 3) hadde mange aggregater og det var ikke mulig å slå de ut selv etter å ha lagt prøven i ultralydbad. Fordelingen har derfor små tall for samtlige størrelsesmål, og den negative IQCS muligens også skyldes tilstedeværelse av aggregatene (se vedlegg 3)

Resultat

Tabell 20: Størrelsesparametre for batch med 13,04 % paracetamol (n=10)

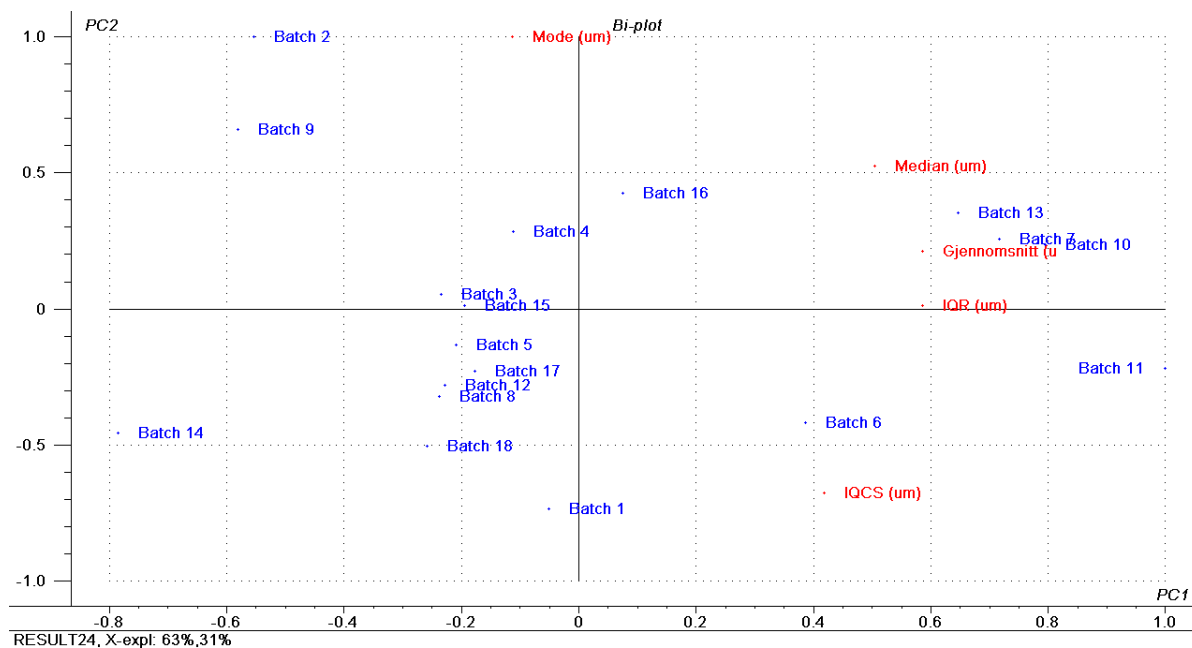
Salt	c 25 (μm)	Median (μm)	Mean (μm)	c 75 (μm)	IQCS (μm)
ZnCl ₂	14,34 \pm 0,58	29,69 \pm 2,21	47,56 \pm 3,21	64,66 \pm 8,46	0,38 \pm 0,046
FeCl ₃ 1	10,21 \pm 0,13	23,84 \pm 0,13	24,29 \pm 0,29	29,69 \pm 0,10	-0,39 \pm 0,016
2	14,02 \pm 0,10	23,17 \pm 0,34	28,80 \pm 0,42	35,39 \pm 0,30	0,14 \pm 0,007
3	16,2 \pm 0,17	26,58 \pm 0,34	29,55 \pm 0,40	39,79 \pm 0,5	0,12 \pm 0,04
AgNO ₃	10,80 \pm 2,79	19,86 \pm 3,02	25,50 \pm 2,53	33,43 \pm 2,33	0,20 \pm 0,048

Det er stor variasjon mellom replikatene kryssbundet med jern. Den ene replikaten har negativ IQCS mens de andre har positiv. Dersom de forskjellige batchene sammenlignes etter median er det ikke stor forskjell i partikkelstørrelse.

Fordelingen for Fe (replikat 1) har en mistenkelig topp ved 28,5 μm (se vedlegg 3) og denne toppen var tilstede i alle 10 målingene. Det var vanskelig å lage en fin suspensjon av prøven for Fe (replikat 3) og derfor ser fordelingen ikke helt jevnt ut (se vedlegg 3).

6.10.3 Modellering på partikkelstørrelse

PCA på størrelsesmål



Figur 15: Scoreplott og Loadingsplott av størrelsesmålene og prøvene

Her er Batch 1-3 spraytørket pulver med legemiddelkonsentrasjon på henholdsvis 33,33 %, 23,08 % og 13,33 %. Batch 3-18 er kryssbundet, der 3-6 er kryssbundet med ZnCl_2 , 7-15 er kryssbundet med FeCl_3 og 16-18 med AgNO_3 . Modellen forklares av 2 PCer (se vedlegg 5). Ut fra biplottet kan man se to hovedtrender: Gjennomsnitt og IQR ser ut til å være korrelerte langs PC1, mens Mode definerer PC2. Median og IQCS defineres av både PC1 og PC2. Dette kommer også fram av forklart varians plottet vist i vedlegg 5.

Langs PC1 kan det antydes tre grupperinger og sier altså noe om Gjennomsnitt og IQR. Batch 2, 9 og 14 ser ut til å være en gruppe. Batch 14 hadde veldig lave verdier for samtlige størrelsesmålene (antagelig på grunn av aggregatene). Batch 2 hadde lave verdier for IQR og IQCS (mest negativ) noe som forklarer dens plassering i biplottet.

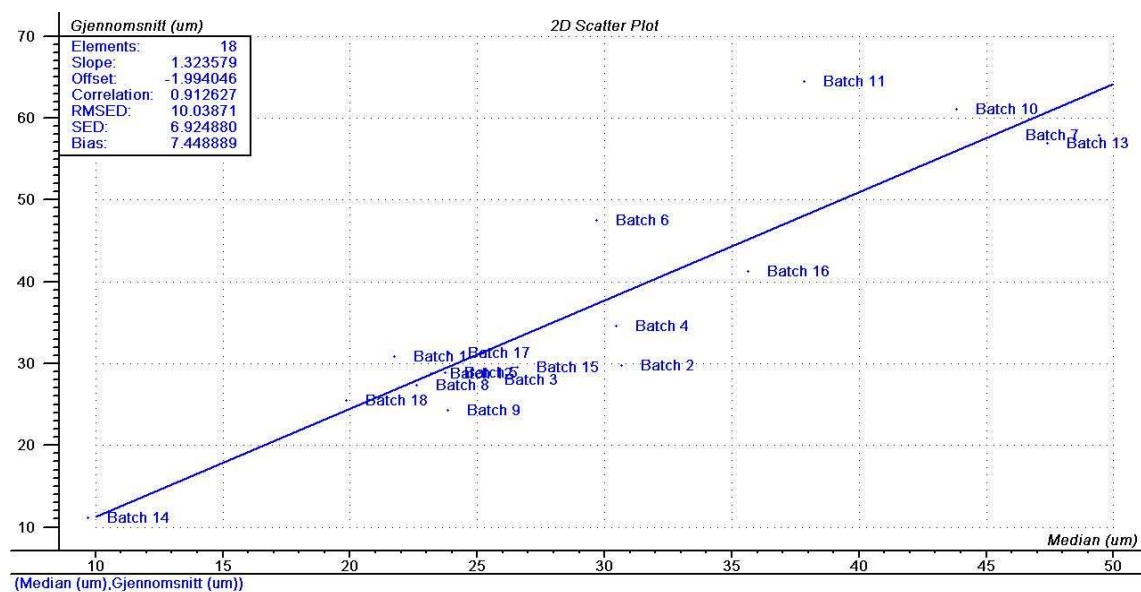
Den negative IQCS kan skyldes den høye toppen i fordelingen (se vedlegg 3 for ikke-kryssbundet batch med 23 %). Batch 9 har også en fordeling som viser en mistenkelig topp ved 31,5 μm , noe som kan skyldes dens plassering i biplottet. Unntatt disse tre batchene hadde alle andre batcher en høyreskjev størrelsesfordeling.

Langs PC2 er ikke grupperingene like tydelige annet enn at Batch 2 har høy Mode og Batch 1 har lav.

Batch 7, 10, 11 og 13 hadde høye verdier for samtlige størrelsesmålene unntatt Mode.

PLS på designvariablene og partikkelstørrelse

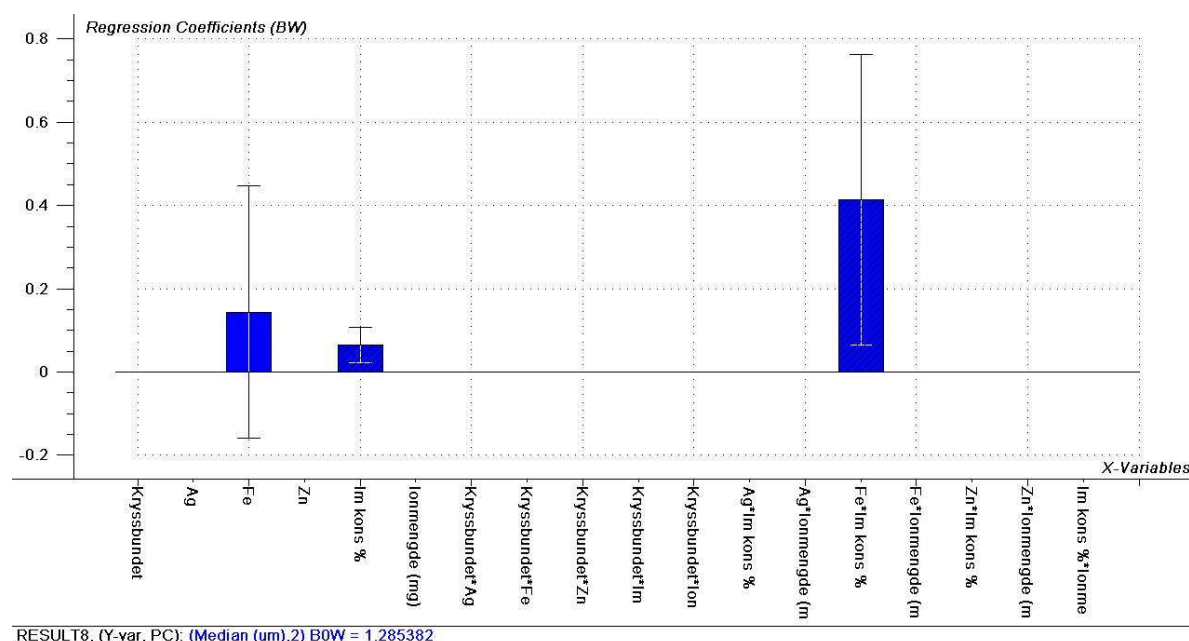
I denne PLS 1 analysen er alle designvariablene blitt valgt som X og median som Y (respons). For å finne ut om det skulle brukes median eller gjennomsnittsverdier som Y ble det laget et scatterplott. Scatterplottet i Figur 16 viser en korrelasjon på 0,91, noe som stemmer med at median og gjennomsnitt ligger nær hverandre i PCA. En korrelasjon på 0,91 er ganske høy og viser at det ville det være det samme om median eller gjennomsnitt ble brukt som Y-respons. En annen årsak til bruk av median som Y var at det er et bedre mål enn gjennomsnitt siden i skjeve fordelinger vil gjennomsnitt være forskjellig avhengig av skjevheten til en fordeling.



Figur 16: Scatterplott for median- og gjennomsnittsverdier

Resultat

Figur 17 viser de signifikante effektene, legemiddel konsentrasjon og samspill mellom Fe og legemiddel konsentrasjon. Modellen ga en forklaringsgrad på 50 % ved bruk av to PCer. Det er en lav forklaringsgrad og lite av variansen ble forklart. Predikert vs. målt viser en r^2 på 0,49 (se vedlegg 5).



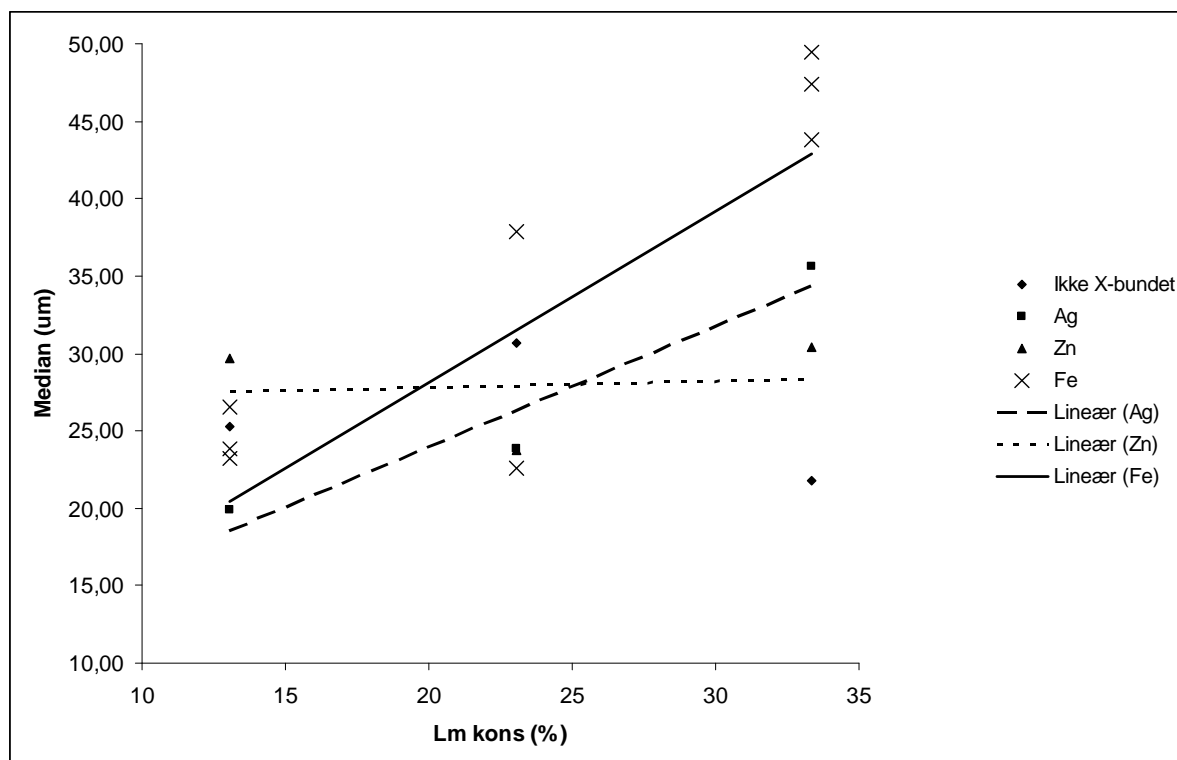
Figur 17: Signifikante regresjonskoeffisienter i en PLS 1 analyse på alle designvariable som X og Median som Y

Ut fra Figur 17 kommer det fram at økt legemiddelkonsentrasjon vil gi større partikler. Interaksjonen mellom jern og legemiddelkonsentrasjon viser seg også til å være signifikant.

For å se litt mer på samspill mellom ion typer og legemiddelkonsentrasjon ble det laget et kryssplott mellom legemiddelkonsentrasjon og median, se Figur 18. I plottet er det vist effekten av de forskjellige ionene på partikkelstørrelse og deres eventuelle effekt på legemiddelkonsentrasjon. En skrå "trend-line" viser at en interaksjon med legemiddelkonsentrasjon er tilstede. Kryssplottet viser at den brukte konsentrasjonen (0,5 M) har en effekt på partikkelstørrelse for Fe og Ag (ikke så stor som jern), mens for Zn har den ingen effekt. Trend-line til Fe i plottet har større vinkel enn Ag og er dermed signifikant. Interaksjonen mellom Ag og legemiddelkonsentrasjon er muligens til stedet men det er ikke stor nok til å gi en signifikant effekt på

partikkelstørrelsen, se også Figur 17. Sink har nesten rett linje og synes ikke å ha noe effekt på legemiddelkonsentrasjon.

Kryssplottet viser også at partikler med jern vil ha større partikkelstørrelse når legemiddelkonsentrasjon er høy. Det samme vil være tilfelle for sølv også men effekten vil ikke være stor nok til å være signifikant.

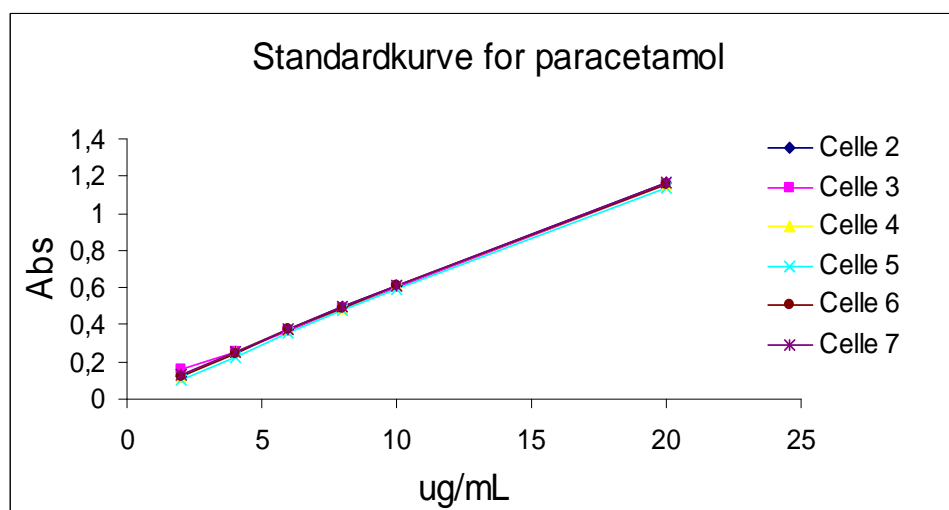


Figur 18: Kryssplott for samspill mellom legemiddelkonsentrasjon og ionetype og deres effekt på median

6.11 Frisettingsforsøk

Standardkurven for paracetamol brukt for å beregne paracetamol mengde frisatt er vist i Figur 19. Den viser at det er lite spredning mellom de ulike cellene.

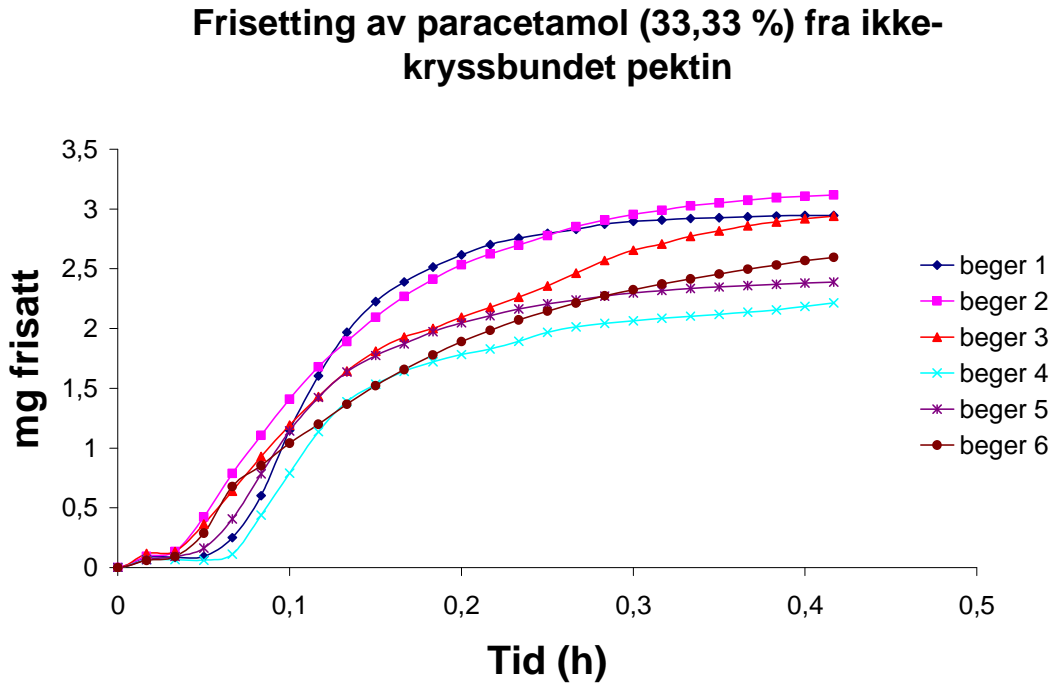
Figur 19: Standardkurve for paracetamol (frisettingsforsøk)



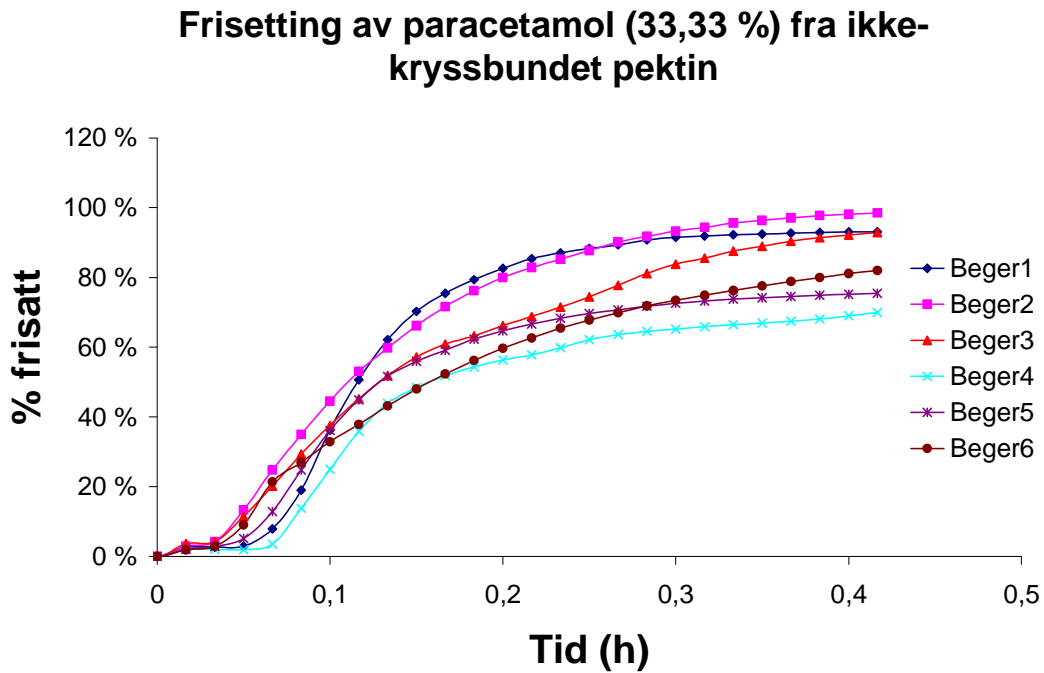
6.11.1 Frisetting fra ikke-kryssbundet pektin

Nedenfor er det vist to kurver (Figur 20 - Figur 21) for paracetamol frisetting i % og i mengde for ikke-kryssbundet amidert pektin som teoretisk inneholdt 33,33 % paracetamol. Figurene viser målingene for alle 6 paralleller. Alle kurver er justert for de 5 minuttene apparatet brukte for å fylle systemet med buffer. For å se på målinger for alle tre batcher med 6 paralleller henvises det til vedlegg 4.

Figur 20: Frisettingskurve for ikke-kryssbundet pektin med 33,33% virkestoff (mengde).

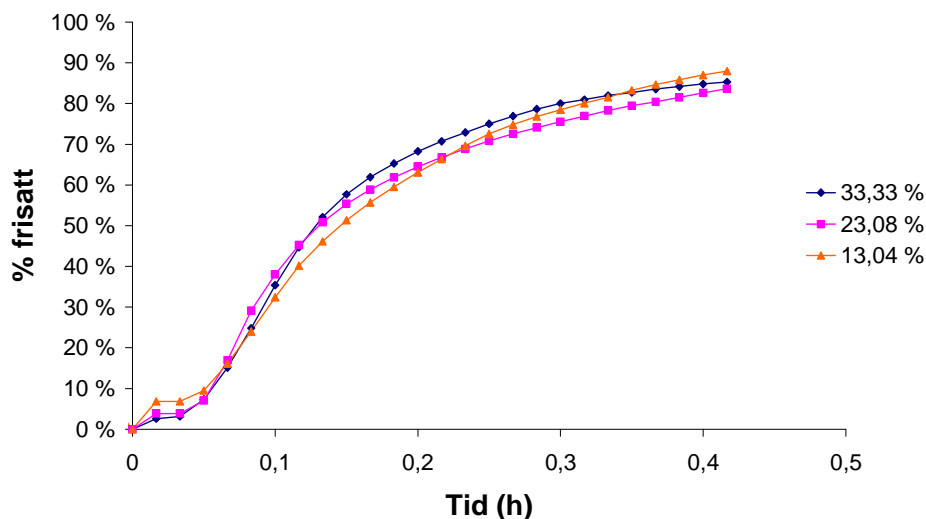


Figur 21: Frisettingskurve for ikke-kryssbundet pektin med 33,33% virkestoff (%)



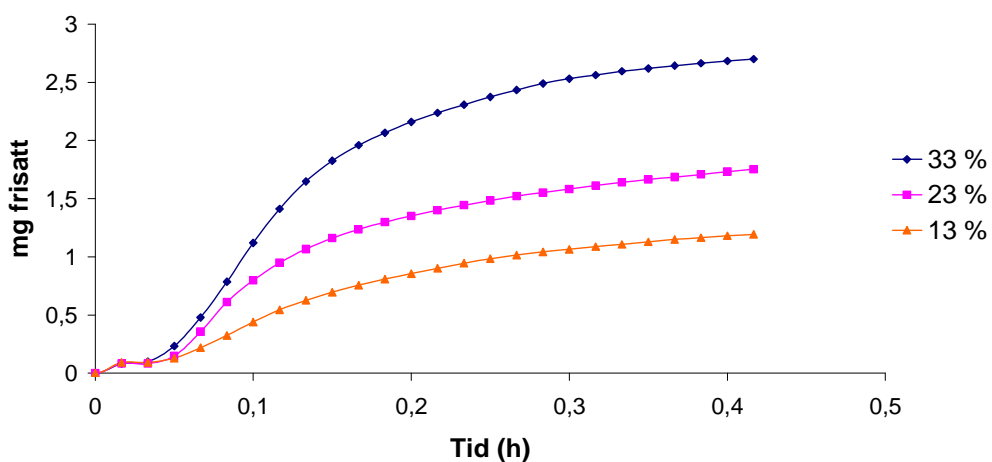
Frisettingskurver for de forskjellige batchene kan sees i figurene nedenfor. I disse er det rapportert gjennomsnittsmålinger av 6 paralleller. Paracetamol frisettingsprofiler for ikke-kryssbundet pektin er vist både i mengde og % frisatt. Kurver som viser mengde paracetamol frisatt har enhet mg.

Frisetting fra ikke-kryssbundet pektin



Figur 22: Paracetamol frisetting (%) fra ikke-kryssbundet pektin. Figur viser frisetting for pulvere med 3 forskjellige paracetamol mengder.

Frisetting fra ikke-kryssbundet pektin



Figur 23: Paracetamol frisetting (mg) fra ikke-kryssbundet pektin. Figur viser frisetting for pulvere med 3 forskjellige paracetamol mengder.

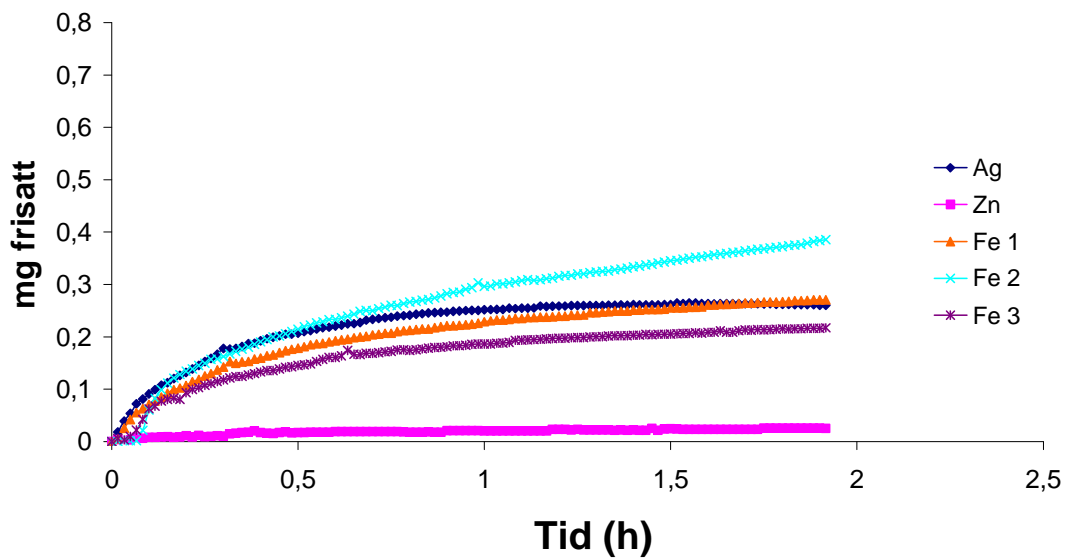
Den totale frisatte mengden fra 33 %, 23 % og 13 % batchene var henholdsvis 2,7mg, 1,75mg og 1,19mg. Disse mengdene er lavere enn det egentlige paracetamol innholdet i batchene (se avsnitt 5.6). Årsaken til at det ikke frisettes alt er den korte frisettingstiden. Dersom frisetting hadde blitt målt lengre enn 30 minutter hadde all paracetamol trolig blitt frisatt. At kurvene ovenfor har ikke flatet ut etter 30 minutters frisetting viser også at prøvene ikke er blitt tomme for paracetamol innen 30 minutter.

Ved utregning av prosent ble den målte mengden i avsnitt 6.6.2 satt til 100 %. Figur 22 viser at frisetting fra 33 %, 23 % og 13 % batcher er henholdsvis 85%, 84% og 88% noe som også viser at all paracetamol ikke er blitt frisatt. Gjennomsnittet av batch med 23,08 % paracetamol er blitt regnet ut av 5 paralleller. Årsaken er at slangene inntil celle 1 ble tette under forsøket og dermed kunne frisettingsmediet ikke komme til prøven. Generelt frisettes paracetamol raskt fra spraytørket pektin og allerede etter 10 minutter er det blitt frisatt rundt 60 % av det totale paracetamol innholdet i batchene.

6.11.2 Frisetting fra kryssbundet pektin

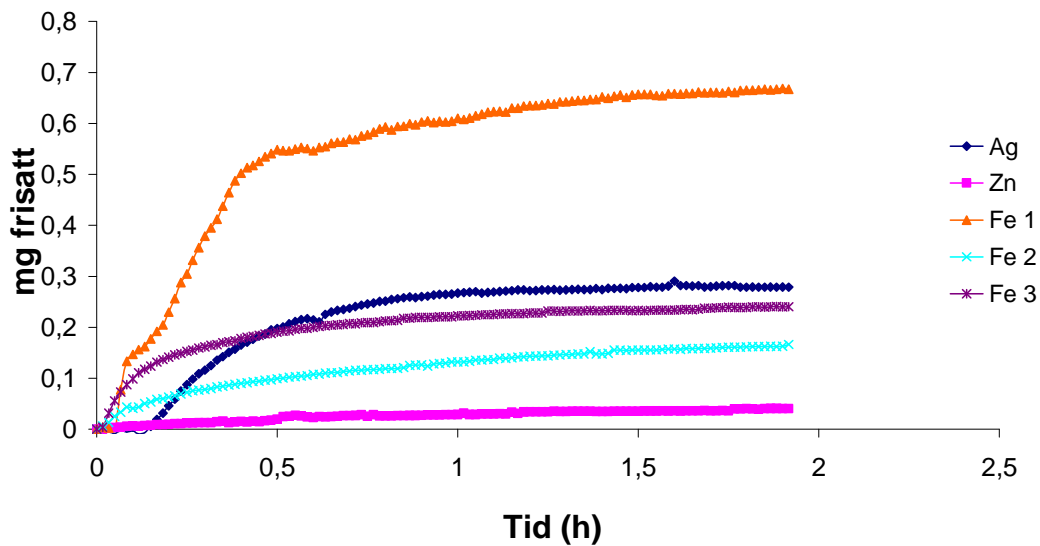
Kurver for paracetamol frisetting fra kryssbundet pektin viser også gjennomsnitt av målingene for alle paralleller. Paralleller der målingene ikke kan brukes enten på grunn av feil i utstyret eller manuell feil er ikke blitt tatt med i utregningen av gjennomsnittet. Frisettingskurver for alle 6 paralleller er å finne i vedlegg 4. I bildene nedenfor viser kurvene for Fe 1, Fe 2 og Fe 3 frisetting fra de tre forskjellige replikatene for pektin kryssbundet med FeCl_3 . Kurvene er blitt justert for de 5 minuttene apparatet brukte for å fylle systemet med buffer. Frisettingskurver fra kryssbundet pektin blir bare vist i mengde frisatt da paracetamol innhold i pulverne var veldig lav i forhold til den teoretiske mengden. Ved å oppgi kurvene med mengde (mg) på y-akse blir det lettere å se hvor mye paracetamol blir frisatt. I kurver med % frisatt ville ikke det komme frem, men disse er likevel vist i vedlegg 4.

Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin



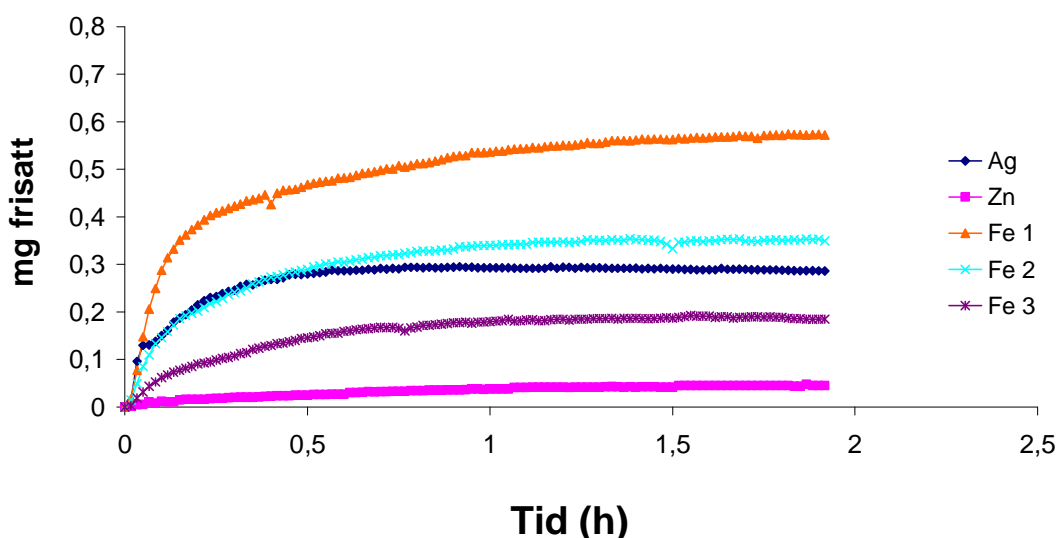
Figur 24: Paracetamol frisetting (mg) fra kryssbundet pektin med forskjellige ioner, (33,33 % paracetamol).

Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin



Figur 25: Paracetamol frisetting (mg) fra kryssbundet pektin med forskjellige ioner, (23,08 % paracetamol)

Frisetting av paracetamol (13,04 %) fra kryssbundet pektin



Figur 26: Paracetamol frisetting (mg) fra kryssbundet pektin med forskjellige ioner (13,04 % paracetamol). Kurven for Zn viser gjennomsnitt av 5 paralleller

Figurene viser at det er stor forskjell mellom frisatte mengder og dermed paracetamol innhold i de forskjellige Fe-replikatene.

Standardavvikene mellom paralleller var store og ble derfor ikke tatt med i figurene ovenfor, for mer oversikt henvises det til vedlegg 4.

For å kunne se nærmere på om kryssbundet pektin faktisk gir saktere frisetting enn ikke-kryssbundet pektin er det blitt laget en tabell. I Tabell 21 er det oppgitt % frisatt paracetamol fra både kryssbundne og ikke-kryssbundne batcher etter 15 minutter. Det ble valgt å bruke frisatt mengde etter 15 minutter fordi etter det tidspunktet begynner kurvene for kryssbundet pektin å flate ut mer eller mindre. Det så ut som om meste parten av paracetamol ble frisatt i første 15 minuttene. Ikke-kryssbundet pektin viste også høy frisetting av paracetamol i løpet av denne tiden. Det var ønskelig å sammenligne frisetting fra kryssbundet og ikke-kryssbundet pektin i det tidspunktet der meste parten av paracetamol blir frisatt.

Tabell 21: % frisatt fra de forskjellige batchene etter 15 minutter

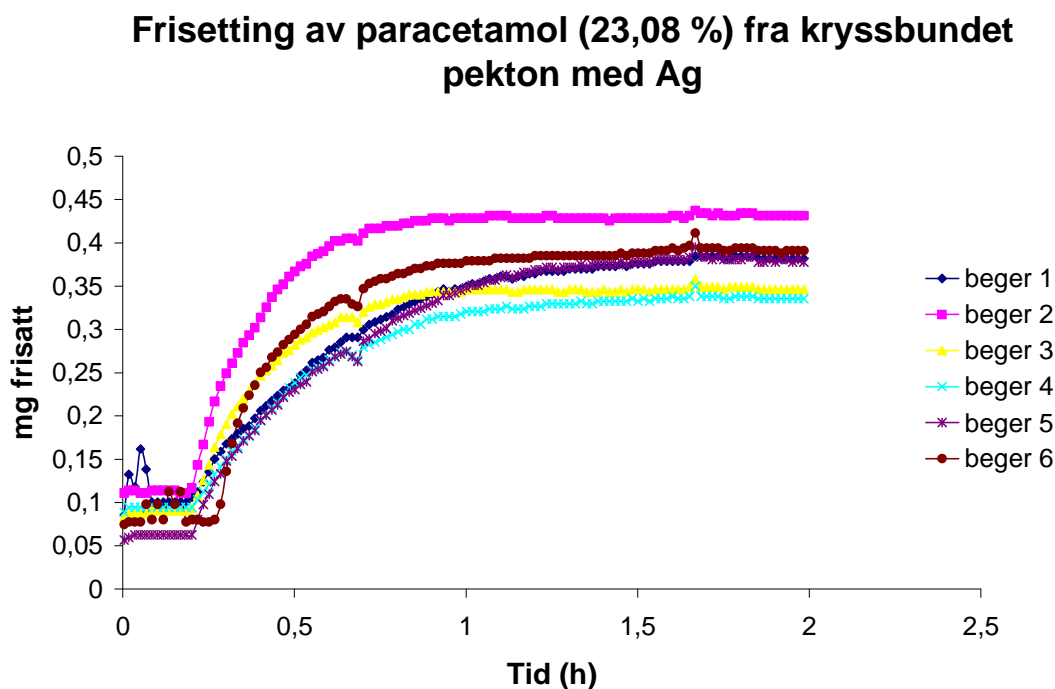
% frisatt fra de ikke-kryssbundne og kryssbundne prøvene						
	Ikke-kryssbundet	Kryssbundet				
		<i>Fe 1</i>	<i>Fe 2</i>	<i>Fe 3</i>	<i>Zn</i>	<i>Ag</i>
33 %	75	44	40	49	35	55
23 %	71	41	42	55	29	30
13 %	73	73	57	49	34	74

Av tabellen ser kryssbundet pektin ut til å generelt gi noe forsinket frisetting men det er vanskelig å si om det skyldes det lave legemiddelinholdet i de kryssbundne prøvene eller selve kryssbindingen.

Hvilket ion retarderer frisetting mest er vanskelig å vite siden det ikke er nok replikater til å kunne antyde det. For 13 % batch viser Fe (replikater 1) og Ag like stor frisetting av paracetamol som fra ikke-kryssbundet pektin. Hvis man ser bort fra Fe (13%, replikat 1) viser de to andre replikatene en frisetting på 49 og 57 %, noe som er mindre enn frisetting fra ikke-kryssbundet pektin. Frisetting fra Ag viser stor variasjon på frisatte mengder fra samtlige prøvene. Om Ag gir saktere frisetting enn Fe er vanskelig å vite siden kurven for Ag faller midt mellom Fe-replikatene (se Figur 24-Figur 26). Prøver kryssbundet med sink kan egentlig ikke sammenlignes med de to andre ionene siden forskjellen på paracetamol innhold er stor i forhold. Pulver kryssbundet med Zn inneholder minst mengde paracetamol.

Figur 25 viser at kurven for sølv ikke begynner helt på null. Årsaken er at apparatet hadde problemer med nullstillingen slik at det ble en ufullstendig innpumping av buffer i kyvettene, og lag-tid var dermed større enn 5 minutter (5 minutter er den lag-

tiden alle kurver er blitt justert for, se tidligere i avsnittet). Figur 27 viser de 6 parallellene for Ag kurven som er vist i Figur 25. Figuren er ikke justert for de 5 minuttene som apparatet bruker for å fylle systemet med buffer slik at det blir lettere å se hvordan kurven ser ut ved tid 0.



Figur 27: Frisettingskurve for Ag (n=6) uten justert for de første 5 minuttene

I Figur 27 er det lettere å se at lag-tiden i dette forsøket er større enn 5 minutter (rundt 12 minutter). I tillegg begynner ikke kurvene helt på null og ca 0,05-0,1 mg paracetamol er blitt frisatt ved 0 timer. Årsaken til at frisatte paracetamol mengder blir målt ved 0 timer kan muligens være på grunn av rester av paracetamol i slangene i apparatet. Slangene ble skylt med vann etter hvert frisettingsforsøk slik at eventuelle rester fra prøvene ble skylt vekk, men siden alle 6 paralleller fra dette forsøket viser liten mengde paracetamol frisatt ved tid 0 er det muligens på grunn av paracetamol rester i systemet

Selv om de fleste kurver er flate etter 2 timer er det veldig lite paracetamol som er blitt frisatt fra de forskjellige batchene. Tabell 22 viser mengder i % som er blitt

Resultat

frisatt fra de kryssbundne prøvene i forhold til det teoretiske innholdet av paracetamol.

Tabell 22: Mengde paracetamol frisatt fra de forskjellige kryssbundne batch

Kryssbindingsmiddel	Frisatt mengde (%)		
	33 %	23 %	13 %
AgNO ₃	7,82	12,11	21,99
FeCl ₃ *	8,74	15,56	28,38
ZnCl ₂	0,76	1,75	3,44

* Paracetamol mengder i tabellen er gjennomsnitt av alle tre replikatene.

Tabellen viser at innholdet av paracetamol i de kryssbundne prøvene er veldig liten i forhold til den teoretiske mengden.

7. Diskusjon

7.1 Molekylvektbestemmelse

Pektin har en tendens til å aggregere i vandige løsninger og fullstendig dispersjon av molekylene er vanskelig å få til. Av den grunn er bestemmelse av molekylvekt en vanskelig sak i seg selv. Pektin er i tillegg polydispers når det gjelder molekylvekt siden molekylvekten kan variere avhengig av hvilken plante pektin er hentet fra og modningsstadiet til planten ved ekstraksjon. Disse faktorene bidrar til uoverensstemmelse mellom de rapporterte verdiene av pektinets molekylvekt. Den gjennomsnittlige molekylvekten til pektin fra forskjellige frukt kilder ligger typisk mellom $10^4 \sim 10^5$ g/mol. Verdier som $4,2 \cdot 10^6$ og $1,2 \cdot 10^6$ g/mol er også blitt rapportert for pektin ekstrahert fra presserester av mosteple [26]. Molekylvekt som ble beregnet her var ca $6,9 \cdot 10^4$ g/mol og ligger i det området som er typisk for pektin.

7.2 Spraytørking

Paracetamol ble valgt som virkestoff fordi det er et velkjent stoff. Det er blitt brukt flere ganger som inkorporert virkestoff i pektin og lignende polymere [40, 44].

Legemiddelmengde i spraytørket pektin vil påvirke de morfologiske egenskapene til spraytørkede partiklene. E.Gavini et al. fant ut at mikropartikler laget av kitosan og metoclopramid hydroklorid fikk irregulær overflate og mistet den sfæriske formen dersom Im:polymer forhold ble større enn 1:2 (w/w) [45]. Dette var utgangspunkt for valg av paracetamol innhold i spraytørkede prøver i denne oppgaven.

Tabell 9 i avsnitt 6.5.2 viser at utbytte etter spraytørking var lavere for en lavere legemiddelkonsentrasjon. Forklaringen kan muligens være den lave tørrstoff mengden. I en batch med lav legemiddelmengde vil den totale tørrstoff mengden være lavere enn de andre løsningene der legemiddelmengde er større. Siden alle løsninger

ble laget i samme volum, 1L, bestod løsninger med lavere paracetamol mengde av et høyere væskevolum. For å tørke en løsning med høyere vannmengde vil det være lurt å øke temperaturen slik at produktet kan bli tørt nok og alt vann fordamper. Dersom noe vann er igjen i pulverproduktet vil det gi opphav til kapillær krefter. Disse kreftene er relatert til porestørrelsen mellom partikler og overflate spenning på grunn av hydrogenbindings egenskapene til vann. En dårlig tørkingsprosess vil resultere i broddanning på partikkel overflate gjennom krystalliseringsfenomen [46].

At pulver ikke ble tørt nok og satte seg på glassveggene i spraytørker kan være årsaken til at spraytørket pulver med mindre virkestoff (eller mindre pulver innhold) var vanskeligere å få ut og resulterte i lavere utbytte. Det kan muligens hindres ved å øke temperatur under tørkingsprosessen for prøvene med lavere legemiddelkonsentrasjon. Pilcer og kollegaer fant også ut at ved å øke temperaturen i løsninger med høyere vannmengde forbedret utbytte siden pulver ikke satte seg på glassveggene og var tørrere [47]. Det er viktig å velge den temperaturen som er så høy som mulig for å få best mulig tørkeprosess, men lav nok til å ikke ødelegge pektin siden det blir depolymerisert ved høy temperatur (se avsnitt 3.3.2).

Utbyttet etter spraytørking var lav generelt. Det samme er blitt bevist av P. Giunchedi et al. Her fikk de 41-46 % utbytte da pektin ble spraytørket med piroxicam [48]. Z. Orhan et al. fant ut at utbyttet etter spraytørking av ciprofloksacin lastet kitosan og pektin mikrosfærer var mellom 46-48 % [49] og Gavini et al. fikk 30-50 % utbytte [45]. Utbytte etter spraytørking av amidert pektin i denne oppgaven var ca. 32-34 %. Tap av små og lette partikler gjennom eksosutgangen kan være en grunn til et så lavt utbytte. Tidligere erfaringer har vist at viftehastighet har mye å si for tap av stoff i eksosen. Antagelig vil en lavere viftehastighet gi mindre tap og dermed øke utbytte, men ifølge [19, 50] vil ikke reduksjon i viftehastighet hjelpe siden en viftehastighet på 30 viste seg til å gi minst mulig tap ved bruk av pektinløsninger med konsentrasjon på 3,0 % (w/v). En lavere viftehastighet førte til mye avsetning av pektinløsning på veggene i tørkekammeret.

Ladingseffektivitet til de spraytørkede prøvene var høy. Flere av artiklene som er blitt trykt om dette emnet viser også en høy ladingseffektivitet [49, 51]. I denne oppgaven ble mengde virkestoff i spraytørket pektin målt til over 90 % (se Tabell 11). Denne effektiviteten blir drastisk redusert under kryssbinding, se avsnitt 7.5 og 7.6.2.

7.3 Lysmikroskopbilder av spraytørketpektin

Utseende for spraytørket pektin er beskrevet som en hul sfære, noen ganger med et lite hull i overflaten [24]. Bilder av spraytørket pektin viser at de fleste partiklene har hull i overflaten. De fleste partikler ser ut til å ha sfærisk form. De lyse ringene rundt partiklene kan også være årsaken til den tilsynelatende sfæriske formen (se vedlegg 2).

Mikroskopbildene var litt uklare og vanskelig å tolke. Bilder viser at partiklene har liten størrelse, noe som er bra for mucoadhesive formuleringer. Små partikler prioriteres framfor store partikler siden størrelsen vil muliggjøre deres kontakt med en større mucosa overflate [52].

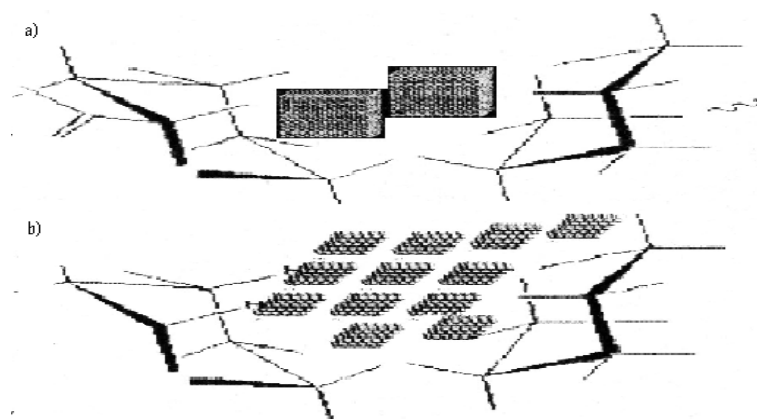
7.4 Kryssbinding

Under kryssbindingsprosess blir det dannet intermolekulære bindinger mellom negativ ladete karboksylgrupper i pektin og positiv ladete motioner.

Amidert pektin ble brukt fordi det er kjent til å vise økt sensitivitet mot geldannelse med CaCl_2 [53] og redusert diameter er blitt observert for amidert pektinkuler i forhold til de andre pektin typene [54]. Denne observasjonen er blitt forklart med redusert hydrofilisitet og hydrogenbindinger mellom amidgrupper som gir en mer kompakt form.

Under avsnitt 6.4 kan man se at noen kuler løser seg raskere enn de andre under opphold i fosfatbuffer. Den forskjellige oppførselen til kuler kryssbundet med to-

verdige kationer kan forklares med forskjeller i krystallstrukturen til saltene og de forskjellige koordinasjonstallene til ionene. Jo mer rigid og stor krystallstruktur (stor ione- radius og atom-volum) ioner har, jo dårligere vil de passe i de tre-dimensjonale lommene til polymerkjedene og dermed gi svakere kryssbinding [55], se Figur 28. Hydrering av ioner vil også påvirke volumet til ionene og dermed deres evne til å passe i pektinlommene. Et ion med lavere koordinasjonstall vil ha lavere tendens til å trekke til seg vann enn et ion med høyere koordinasjonstall. Redusert hydrering vil gi økt grad av polymer kryssbinding pga reduksjon i volumet og dermed bedre plass i ”polymer-lommer”. Hvor mange ioner som sitter i en slik lomme vil også være avhengig av frastøtning mellom de positiv ladede ionene.



Figur 28: a) Kalsiumioner (ioneradius 114 pm), b) Sinkioner (ioneradius 88 pm), en modell av polymerkjedens lommer og plassering av ionene avhengig av krystallstruktur.

Tørkingsprosessen kan være årsaken til at noen av kulene ikke er runde i form. Kuler ble snudd bare en gang under tørking. De burde ha blitt snudd flere ganger slik at den ene siden ikke fikk mer trykk enn den andre.

Kuler med Fe (III) klorid så mer kompakte ut enn de andre kulene. Overflaten var ujevn og ruglete i forhold til de andre kulene, noe som muligens kan tyde på en sterkere kryssbinding. Dette er i samsvar med [56] der det står at bruk av et høyere valens kation som Fe (III) vil resultere i en intens kryssbinding av hydrogel og resulterende kryssbinding vil redusere gelens vannopptaks kapasitet. Dette kan også

forklare den lange tiden kuler laget med Fe(III)klorid bruker før de sveller og løser seg i buffer (se avsnitt 6.4.2).

Oppløsning og svelling av kulene i buffer vil være avhengig av hvor stor affinitet ionene har til karboksylionene, krysstallstruktur til de positive ioner og hvordan de legger seg i "lommene" i pektin kjeder. Fe^{3+} er metallion som har stor affinitet til karboksylioner og vil dermed gi en sterkere kryssbinding [57], noe som stemmer med oppløsningstid på ca 3 døgn (se avsnitt 6.4.2).

Forsøk på å lage pektinkuler med magnesium var ikke vellykket. Grunnen til det kan være svake bindinger mellom pektinkjede og magnesiumioner. Magnesiumioner er kjent til å være "ikke-gelende" kationer. Bindinger mellom pektinkjede og magnesiumioner er så svake at det ikke vil bli dannet en rigid gel [58].

Pektin kuler kryssbundet med Ni^{2+} holder seg lengre enn kuler kryssbundet med jern under omrøring i fosfatbuffer (se avsnitt 6.4.1). I motsetning under avsnitt 6.4.2, der kuler ikke er under omrøring, løser nikkell-kulene seg mye raskere enn jern-kuler. Bruk av forskjellig typer av magnetrører kan muligens være årsak til dette. For de fire andre pektinkulene ble det brukt en magnetrører av samme type. Magnetrøreren der begerglass med nikkellkuler ble plassert rørte ikke med samme hastighet som den andre magnetrøreren. Siden hastigheten på omrøring var forskjellig, og saktere for nikkell-kuler, løste de seg saktere.

7.4.1 Geldannings mekanisme

Det ble valgt jern, sink og sølv for kryssbinding av spraytørket pulver. Jern viste seg til å gi en sterk kryssbinding (lang oppløsningstid), sink er kjent til å gi sakte frisetting (sammenlignet med kalsium pektinat) av pakket legemiddel [43] og sølv ble valgt fordi det var interessant å se hvordan det oppfører videre i oppgaven. En annen grunn til at Ag^+ , Zn^{2+} og Fe^{3+} ble brukt var at de har forskjellig valens og oppførte seg forskjellig da deres svelling og løselighet ble undersøkt i buffer (se avsnitt 6.4).

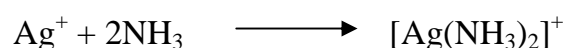
Kryssbinding av amidert pektin med Zn^{2+} vil trolig skje ved at sink binder seg til to karboksylsyre grupper og slik føre til kryssbinding på samme måte som kalsium eller de andre geldannede bivalente ioner [59-61]. I følge egg-boks teori kan et hvert polyvalent kation som kan passe inn i pektin nettverk vil ha evne til å danne kryssbindinger [62].

Fe^{3+} vil trolig binde seg til tre syregrupper siden det er et tre-verdig kation og på denne måten gi en mer rigid og kompakt struktur som det er blitt nevnt i litteraturen [56]. Resultater etter bestemmelse av ionmengde i avsnitt 6.9 viser at mengde Fe^{3+} er mindre enn mengde Zn^{2+} . Dette kan stemme med at Fe (III) vil binde seg til tre karboksylsyre ioner og er derfor tilstede i mindre mengde enn sink som vil binde seg til to karboksylsyre grupper.

I denne oppgaven har sølv kryssbundet amidert pektin. Det viser seg at sølv gir en sterk kryssbinding da det ikke løser seg i buffer og blir liggende i form av smuldrer, se avsnitt 6.4.1 og 6.4.2. Sølv skal etter teorien ikke kryssbinde pektin i det hele tatt siden det er et enverdig kation. Det er vanskelig å finne årsaken da det ikke er blitt funnet noe litteratur om det.

Sølv er et enverdig kation og vil trolig binde seg til en karboksylsyre gruppe og dermed ikke binde pektinkjeder sammen slik et flervalent kation ville gjort. Siden et sølv ion vil binde seg til en karboksylsyre gruppe vil ion innhold i kryssbundet pektin med sølv være høy. Bestemmelse av ion mengde i avsnitt 6.9 viser at mengde Ag er ca 3 ganger høyere enn Zn og ca 8 ganger høyere enn Fe innhold i de kryssbundne partiklene.

Siden binding til en enkel karboksylsyre gruppe vil ikke binde pektinkjeder sammen må andre bindinger eller mekanismer til slik at en kryssbinding kan oppstå. Det er vist at Ag^+ kan lage kompleks med to amin grupper og danne $[Ag(NH_3)_2]^+$ kompleks [63]



Amidert pektin inneholder amidgrupper. Ag kan da muligens binde seg til N i amidgruppen på nesten samme måte som gitt i reaksjonen ovenfor og lage kompleks slik at kryssbinding kan skje. I motsetning har El-Aribi og kollegaer vist at sølv vil binde seg til karbonyloksygen i amid gruppen i stedet for nitrogen [64] og dette vil da ikke være mekanismen til kryssbinding av amidert pektin. For å være sikker på at binding av sølv med N ikke er en mulig mekanisme ble det prøvd å lage pektinkuler ved å bruke Ag og LM-pektin. Dersom mekanismen for kryssbinding involverer nitrogenatomet ville det ikke være mulig å lage kuler av LM pektin. Forsøket viste at Ag^+ kan kryssbinde LM-pektin og danner gel. Dermed vil ikke teorien om sølvkompleks med N gjelde i dette tilfelle.

Andre grupper som kan tenkes til å skyldes en kryssbinding er alkohol grupper som er tilstede i amidert pektin. Disse kan heller ikke lage kompleks eller binding med sølv siden El-Aribi og kollegaer har vist at Ag^+ kan binde seg til oksygenet i alkoholer [64]. Dermed kan ikke det heller være en mulig mekanisme siden her vil det også skje binding med en enkel $-OH$ gruppe.

At sølv kryssbinder pektin er en spennende observasjon og trenger videre forskning for å finne mekanismen til kryssbindingen.

7.5 Legemiddel innhold etter kryssbinding

Under avsnittet for frisetting ble det vist at kryssbundet pulver inneholdt en veldig liten mengde paracetamol i forhold til den teoretiske mengden. Geldannings prosessen under kryssbinding kan være en mulig årsak til dette [55]. Ladingseffektivitet til kryssbundne partikler vil muligens være lav på grunn av geldannings prosess. Det er antatt at geldanningen begynner på overflaten av kule/partikkel og jobber seg videre innover mot kjernen. Etter som prosessen fortsetter vil vannet drives ut på grunn av utvikling av kryssbindinger og konsentrasjon av gelvolum. Av den grunn vil en mer kryssbundet struktur vise større vanntap. Oppløst paracetamol vil da komme ut med vannet som drives ut og føre til stor tap av paracetamol molekyler [65].

Paracetamol kan antakelig også ha blitt tapt under vaskeprosessen etter kryssbinding og under frysetørkings prosess. I følge [66] vil frysetørking av en pektin løsning resultere i partikler bestående av et porøst pektin nettverk. Årsaken er at det trolig blir dannet hulrom med løsemidlet fanget i pektinstruktur under oppløsning/svellings prosess. Når dette løsemidlet blir tørket under frysetørking vil det forlate porer i nettverket. Når spraytørket pektin med paracetamol blir siktet i kryssbindingsmiddel (saltløsning) vil noe av løsningsmidlet, som da var vann, bli fanget i pektinstruktur under kryssbindingsprosess. Under frysetørking vil dette vannet bli tørket og forlate små porer i nettverket. Antakeligvis vil disse porene føre til tap av paracetamol.

Under avsnitt for frisetting fra kryssbundet pektin (6.11.2) viser det seg at batch med Zn inneholder minst mengde paracetamol i forhold til de tre andre ionene. Grunnen til det kan trolig være at 10 minutter var for kort tid for kryssbinding med Zn og dermed førte til dårligere kryssbinding av pektin slik at paracetamol lett kan komme ut av nettverket og bli tapt.

Pillay med kollegaer [55] fant også at pektin kryssbundet med Zn^{2+} fanget mindre mengde legemiddel. De kom fram til at dette skyldtes Zn^{2+} som opptar plassen til legemidlet. De mente at på grunn av den lave atomvekten til Zn i forhold til virkestoffet brukt (i det tilfellet ibuprofen) ville Zn oppnå forrang for å fylle opp pektin matrisen. Dette vil også være tilfellet i denne oppgaven der paracetamol er blitt brukt og har en relativ større molekylvekt i forhold til kryssbindingsionene og være en mulig forklaring for den lave paracetamol mengden.

Ladingseffektivitet til kryssbundet pektin kan muligens økes ved å bruke kryssbindingsmiddel som er mettet med virkestoff. Slik vil flere virkestoff molekyler trolig bli pakket inn i pektinpartikler under kryssbindingsprosessen. El-Gibaly og kollegaer fant også ut at økning i mengde virkestoff førte til signifikant økning i ladingseffektivitet til partiklene [43]. Men jo mer legemiddel det er i forhold til pektin desto mer porøse vil partiklene være og vil ha et løsere nettverk i forhold til partikler med en lavere mengde legemiddel. I følge PLS 1 modellering i denne oppgaven under

avsnitt 6.8.3 vil dette igjen føre til et lavere utbytte etter kryssbinding (jfr. PLS 1 modellering i avsnitt 6.8.3).

Mengde legemiddel i de kryssbundne partiklene vil påvirke partikkelstørrelse. Figur 17 i avsnitt 6.10.3 viser at jo høyere legemiddel konsentrasjon det er desto større vil partiklene være. Dette er i samsvar med [43].

7.6 Frisetting av paracetamol

Frisetting av paracetamol ble målt i fosfatbuffer pH 6,8. Denne pH ble brukt for å imitere miljø i tarmen. I pH 6,8 vil karboksylsyrer grupper være ionisert. Kryssbundne partikler vil swelle på grunn av elektrostatiske frastøtning mellom negativladede COO^- - ioner. Her vil graden av kryssbinding og svelling bestemme hastighet på legemiddelfrisetting. I tillegg vil løselighet til det inkorporerte legemidlet også spille en rolle. Jo mer løselig virkestoffet er i væskene i tarmen desto raskere vil frisetting skje [67]. *In vivo* vil enzymatisk nedbrytning av partiklene også være en viktig faktor.

7.6.1 Frisetting fra spraytørket pektin

Frisetting for paracetamol fra spraytørket pektin er blitt målt over en halv time. Denne tiden er for kort siden kurvene ikke er flate ved slutten av 30 minutter. Figur 23 viser at det er blitt frisatt ca 85 %, 84 % og 88 % fra henholdsvis 33%, 23% og 13% batch. En frisettingslengde på høyere enn 30 minutter ville gi frisetting av all innholdet og kurver ville bli mer flate.

7.6.2 Frisetting fra kryssbundet pektin

Å lage en formulering som beskytter legemidlet godt gjennom de pH og enzymatiske endringer på vei til tarmen er et stort problem. Det er blitt rapportert tidligere i litteratur at geldanning med kalsium vil kunne beskytte legemiddel fra omgivelser i mage og tynntarm. Dette kan være riktig for store molekyler for eksempel protein

legemidler som ikke kan diffusere gjennom porene i partikkel matrisen, men kan frisettes ved enzymatisk frisetting [68]. Men når det gjelder små legemiddel molekyler (blant annet paracetamol) vil legemiddelmolekylene lett kunne passere gjennom porene. I sure omgivelser vil det bli dannet løselige og mer permeable pektinsyre områder i partiklene i tilstedeværelse av hydrogenioner og føre til økt permeabilitet for det inkorporerte legemidlet [43]. Siden pKa for syregrupper i pektin er ca 3,5 vil ikke alle karboksylsyre grupper være ladet i sure omgivelser i magen og partiklene vil dermed ha liten svelling. Da vil veldig liten mengde paracetamol bli frisatt før formuleringen kommer til tykktarmen [67, 69].

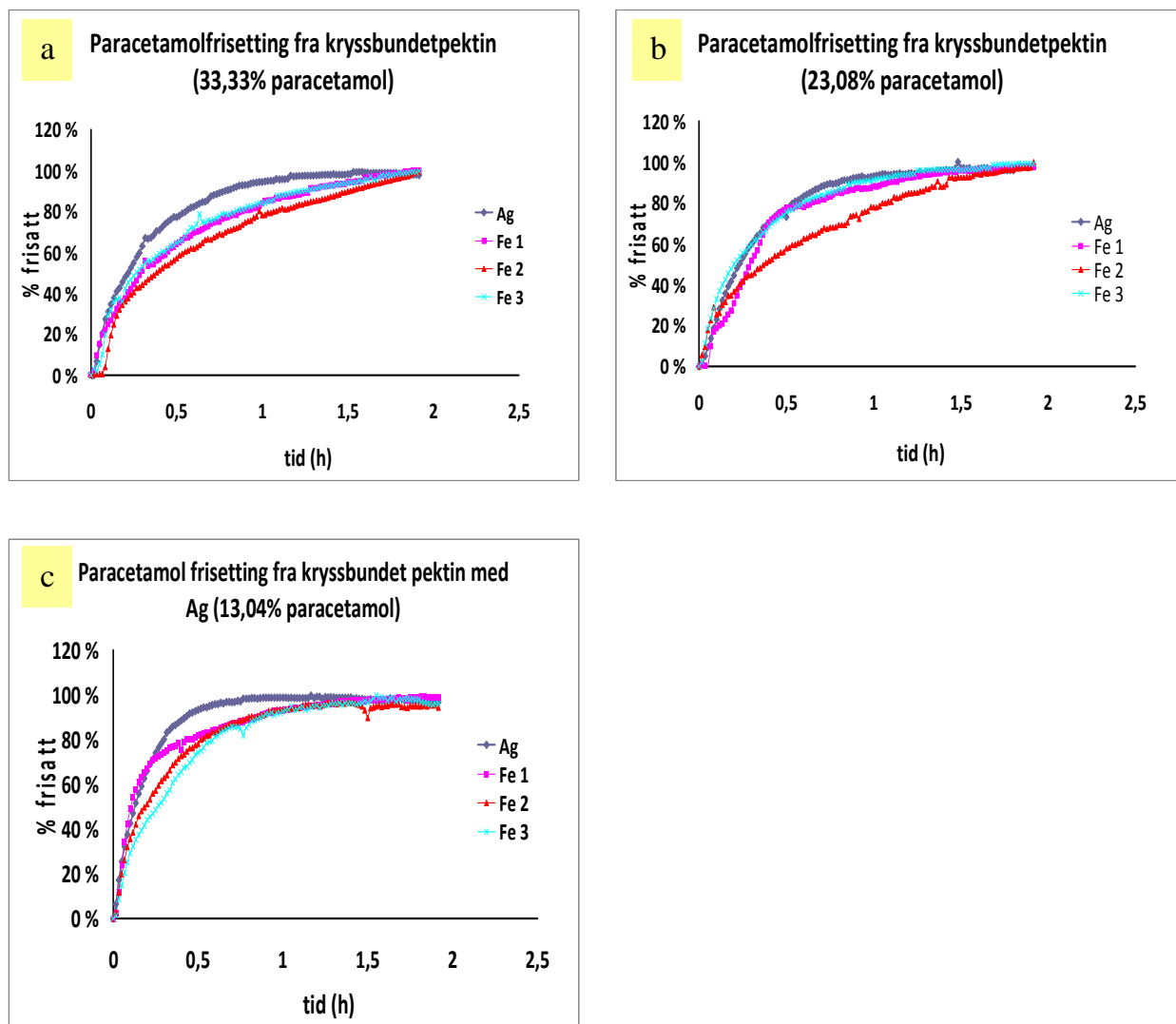
Det er litt vanskelig å si om kryssbinding av pektin gir saktere frisetting enn ikke-kryssbundet pektin. I Tabell 21 viser prøvene med Fe (replik 1) og Ag som inneholder 13% virkestoff like stor mengde frisatt etter 15 minutter som fra ikke-kryssbundet pektin. Siden frisetting fra de andre replikatene til Fe er mindre enn ikke-kryssbundet pektin kan det antas at Fe gir langsommere frisetting. Å ha en slik konklusjon for Ag vil være vanskelig siden frisetting bare er blitt målt i 1 replikat og de forskjellige sølv batchene viser stor variasjon i mengde frisatt paracetamol. Hvis en ser bort fra de to prøvene (Fe replikat 1 og Ag) for 13% kan det muligens sies at frisetting fra kryssbundet pulver generelt viste en frisetting som var langsommere enn frisetting fra ikke-kryssbundet pulver, men om det skyldes den lave virkestoff mengden i de kryssbundne prøvene eller selve kryssbindingen er vanskelig å vite.

Å sammenligne de tre ionene med hverandre er også vanskelig på grunn av den lave virkestoffmengden inkorporert. Pulver med Zn har lavest ladingseffektivitet i forhold til de andre kryssbundne prøvene og det er stor forskjell i mengde virkestoff i pulver med Zn og pulvere med Ag og Fe. Siden frisettingshastighet er avhengig av mengde virkestoff som er inkorporert vil det være vanskelig å sammenligne frisetting fra Zn sammen med Fe og Ag. Jo større pektin mengde er i forhold til mengde virkestoff, desto langsommere vil frisetting skje. Selv om pektin kryssbundet med Zn^{2+} er blitt rapportert til å gi lavere legemiddelfrisetting sammenlignet med pektin kryssbundet med et lignende kation, Ca^{2+} [43] er det vanskelig å se om den gir saktere frisetting i

forhold til Fe og Ag i denne oppgaven siden den inneholder en veldig lav mengde virkestoff.

I følge frisettingskurver for kryssbundet pektin ligger kurven for Ag alltid midt mellom Fe-replikatenes (se figurene 24-26) som gjør at det ikke er mulig å sammenligne frisetting fra Ag sammen med Fe. Det ser ut som om prøver med Fe og Ag inneholder nesten like stor mengde paracetamol og kan derfor sammenlignes med hverandre av den grunn. For å kunne se forskjell på frisetting fra Ag og Fe er det blitt laget kurver som viser mengde frisatt i % for alle tre Fe-replikatenes og Ag (se Figur 29 på neste side). I denne figuren ligger Ag-kurven over Fe-replikatenes og viser at frisetting skjer raskere for både 33%, 23% og 13% når Ag er kryssbindingsmiddel. Det var ingen statistisk signifikant forskjell til stede, men det kan se ut til at det er en tendens til langsommere frisetting fra Fe når man justerer for ulik mengde virkestoff.

Figur 29: % frisetting fra Fe og Ag (prosentene er regnet ut fra største mengde frisatt under frisettingsforsøkene). a viser frisetting fra 33%, b fra 23% og c fra 13%



Avsnitt 6.11.2 viser at de kryssbundne prøvene inneholder veldig liten mengde paracetamol i forhold til den teoretiske mengden. Grunnen til det kan være tap av paracetamol under kryssbindingsprosessen (for mer forklaring se avsnitt 7.5).

I Tabell 21 er prosentene for ikke-kryssbundet pektin beregnet ut fra den mengden paracetamol som er blitt målt i avsnitt 6.6.2, mens prosentene for de kryssbundne prøvene er blitt beregnet ut av den største mengden frisatt. Det vil egentlig ikke være helt riktig for de av kurvene som ikke blir flate etter 2 timers frisetting. Men dette var

antakelig det beste estimatet som kunne brukes siden mengde virkestoff ikke ble målt i de kryssbundne prøvene.

Frisetting for kryssbundet pulver ble bare målt i 2 timer selv om forskjellig litteratur har vist større frisettingsprofiler [40, 43]. Årsaken er at det ikke ble frisatt mer og de fleste kurver var flate ved 2 timer.

Prøver med sink som er blitt brukt i frisettingsforsøk har mye mindre paracetamol enn prøvene fra innledende forsøk (se avsnitt 6.8.1). Tabell 13 viser at paracetamol innhold var 4,87 % ved bruk av 0,5 M sinkklorid løsning som kryssbindingsmiddel. Denne forskjellen viser at reproduserbarheten ikke er bra, noe som også kommer fram av Fe-replikatene (se frisettingskurver for Fe-replikater i vedlegg 4). Ladingseffektivitet til de forskjellige Fe-prøvene er ganske forskjellig.

Frisettingskurver for Zn-prøvene var ikke helt lik kurvene for prøver med Fe og Ag. Zn kurvene var mer hakkete i forhold til de andre kurvene (jfr. vedlegg 4) noe som kan være på grunn av det ekstremt lave innholdet av paracetamol.

Noen av parallellene i de forskjellige bildene i vedlegg 4 viser seg til å frisette større mengde paracetamol i forhold til resten av parallellene. Eksempler for slike kurver er Fe 33,33 % (replikat 3), Fe 23,08 % (replikat 2 og 3). Det kan muligens være på grunn av ufullstendig vasking av slangene slik at rester av paracetamol ble liggende i noen av slangene og resulterte i høyere absorbans.

7.7 Størrelsesmåling av prøvene

Størrelsesfordeling av ikke-kryssbundne partikler målt med Lasentec var ikke i samsvar med bilder tatt med lysmikroskopet. Både median og gjennomsnitt var langt høyere enn verdier observert i lysmikroskopbildene. Grunnen kan være aggregatdannelse.

Lasentec ble ikke kalibrert før den ble tatt i bruk og dette kan kanskje være grunnen til høye verdiene. De aller minste partiklene vil ikke kunne komme med på størrelsesfordelingsgrafene ettersom Lasentec har en nedre deteksjonsgrense på 1 μm .

Tabell 17 viser at mengde legemiddel ikke har så veldig mye å si for partikkelstørrelse etter spraytørring. Giunchedi med kollegaer fant at spraytørket partikler hadde glatt overflate og en størrelse mindre enn 10 μm (dyse 0,7 mm). De fant samme resultater for både partikler med og uten legemiddel og hevdet at polymer:legemiddel forhold ikke påvirker de morfologiske egenskapene til spraytørket pektin [48]. E.Gavini et. al fant derimot at når legemiddel:polymer forhold er 1:2 (w/w) eller større vil det påvirke de morfologiske egenskapene til spraytørkede partiklene. Under dette forholdet vil partiklene laget ved spraytørring ha en sfærisk form [45].

Noen av fordelingene, spesielt for pulver kryssbundet med jern (replik 3) med 23,08 % og 13,04 % paracetamol innhold, ser ikke fine ut (se vedlegg 3). Årsaken kan være tilstedeværelse av klumper i løsningen og ikke fullstendig suspensjon av partiklene i vann. Klumper var generelt vanskelig å slå ned i samtlige prøver og derfor ble det også brukt ultralyd-bad for å slå de ned.

De fleste fordelingene har en positiv skjevhet og har derfor høyere gjennomsnittsverdier.

Konklusjon

Det er mulig å lage mikropartikler med virkestoff basert på amidert pektin ved spraytørking. Størrelsen til mikropartiklene målt med FBRM var mellom 20-30 μm . Partiklene var stort sett runde i form.

Av de seks forskjellige ioner som ble prøvd ut klarer 5 av de å kryssbinde amidert pektin. Disse var: Ag^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} . Sølv ga en sterk kryssbinding og kuler var uløselig i buffer selv etter 2 dagers sterk omrøring med magnet. Kuler kryssbundet med Fe^{3+} holdt seg lengre enn de andre ionene (unntatt Ag) i fosfatbuffer. Det var ikke mulig å kryssbinde amidert pektin med Mg^{2+} -ioner.

Kryssbinding av spraytørket pulver ga et fint pulver med partikkelstørrelse på 20-40 μm . Utbytte etter kryssbinding var ganske lav og var negativt korrelert med mengde virkestoff i partiklene.

De forskjellige PLS 1 analyser av resultater viste at partikkelstørrelse økte med økende legemiddelkonsentrasjon. Ionemengde i partiklene er ikke påvirket av legemiddelkonsentrasjon.

Frisettingsforsøket viste at kryssbinding av spraytørket pektin generelt forsinket frisetting noe, om det skyldtes den lave ladingseffektiviteten eller selve frisettingen er vanskelig å vite. Det var ikke mulig å konkludere om noen av ionene forsinket frisetting mer enn de andre på grunn av den forskjellige ladingseffektiviteten til prøvene.

Ladingseffektivitet til kryssbundet pektin viste seg å være veldig lav og selve kryssbindings prosessen er antatt til å være en mulig årsak til tap av virkestoffet.

Kildeliste

1. Lee, J.W., J.H. Park, and J.R. Robinson, *Bioadhesive-based dosage forms: the next generation*. J Pharm Sci, 2000. **89**(7): p. 850-66.
2. 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.
3. Friend, D.R., *Colon-specific drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 1991. **7**: p. 149-199.
4. Hillery, A.M., A.W. Lloyd, and J. Swarbrick, *Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists* 2001: p. 146-183.
5. Tellez, G., et al., *Digestive physiology and the role of microorganisms*. The Journal of Applied Poultry Research, 2006. **15**(1): p. 136.
6. [cited; Available from:
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1081754/human-digestive-system>.
7. Duchene, D. and G. Ponchel, *Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. **44**(1): p. 15-23.
8. Paulsen, B.S. and H. Barsett, *Bioactive Pectic Polysaccharides*. Advances in polymer science, 2005: p. 69-101.
9. Paulsen, B.S. and H. Barsett, *Bioactive pectic polysaccharides*. Advances in polymer science, 2005. **186**: p. 69-101.
10. Henrik Vibe Scheller ;Professor, d.s. *Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharides*. [cited 15.10.2008]; Available from:
<http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>.
11. Thakur, S., *Handa (1997) BR Thakur, RK Singh and AK Handa, Chemistry and uses of pectin—A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997. **31**(1): p. 47–73.
12. Liu, L., et al., *Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route*. Biomaterials, 2003. **24**(19): p. 3333-3343.
13. Institute of Chemistry, S.A.o.S. [cited 22.11.2008]; Available from:
<http://www.genialab.de/inventory/pectinate.htm>.
14. Tho, I., S. Arne Sande, and P. Kleinebudde, *Cross-linking of amidated low-methoxylated pectin with calcium during extrusion/spheronisation: Effect on particle size and shape*. Chemical Engineering Science, 2005. **60**(14): p. 3899-3907.
15. Sriamornsak, P. and J. Nunthanid, *Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery:: I. Preparation and in vitro release studies*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **160**(2): p. 207-212.
16. Schols, H.A., et al., *Pectins and their Manipulation*. 2002: Seymour, GB, Knox, JP, Eds. 1-29.

17. Munjeri, O., J.H. Collett, and J.T. Fell, *Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release*. Journal of Controlled Release, 1997. **46**(3): p. 273-278.
18. Lee, C.-M., D.-W. Kim, and H.-C.L.-Y. Lee, *Pectin microspheres for oral colon drug delivery: Preparation using spray drying method and in vitro release of Indomethacin*. Biotechnology and Bioprocess engineering, 2004. **9**: p. 191-195.
19. Sefic, B., *Spraytørket pektin: Kryssbinding, karakterisering og mucoadhesive egenskaper*, in *Farmasøytisk Institutt*. 2008, University of Oslo: Oslo.
20. Liu, L.S., M.L. Fishman, and K.B. Hicks, *Pectin in controlled drug delivery—a review*. Cellulose, 2007. **14**(1): p. 15-24.
21. Labplant. *SD-06 Laboratory Scale Spray Drier*. [cited; Available from: http://www.keison.co.uk/labplant/sd_06.htm].
22. Jessica Elversson, A.M.-F., *Particle size and density in spray drying - effects of carbohydrate properties*. Journal of pharmaceutical sciences, 2005. **94**(9): p. 2049-2060.
23. Nettey, H., et al., *Formulation and testing of vancomycin loaded albumin microspheres prepared by spray-drying*. Journal of Microencapsulation, 2006. **23**(6): p. 632-42.
24. Aulton, M. and D. M.Collett, *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. 2 ed, ed. M.E. Aulton. 2002. 388-390.
25. Jessica Elversson, A.M.-F.G.A.U.E., *Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying*. Journal of pharmaceutical sciences, 2003. **92**(4): p. 900-910.
26. Wang, Q., J. Pagan, and J. Shi, *9 Pectin from Fruits*. Functional Foods: Biochemical & Processing Aspects, 2002.
27. Cui, S.W., *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. 2005. 161-182.
28. Marriott, C., *Rheology*, in *Pharmaceutics: The science of dosage form design* M.E. Aulton, Editor. 2002. p. 41-44.
29. Staniforth, J., *Particle size analysis*, in *Pharmaceutics: The science of dosage form design* M.E. Aulton, Editor. 2002. p. 152-165.
30. Esposito, E., et al., *Pectin-Based Microspheres A Preformulatory Study*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **944**(1): p. 160-179.
31. Moore, D.S. and G.P. McCabe, *Looking at Data-Distributions*, in *Introduction to the practice of statistics*. 2003. p. 38-48.
32. Esbensen, K.H., *Introduction to Experimental design*, in *Multivariate data analysis- In practice, An introduction to multivariate data analysis and experimental design*. 1994. p. 361-446.
33. Nortvedt, R.e.a., *Forsøksplanering och optimalisering før eksperimentlisten*, in *Anvendelse av kjemometri innen forskning og industri*. 1996: Oslo. p. 81-106.
34. Esbensen, K.H., *Multivariate Calibration*, in *Multivariate data analysis - In practice*. 2006. p. 115-155.

35. Esbensen, K.H., *Principal Component Analysis (PCA) - In Practice*, in *Multivariate data analysis-In practice, An introduction to multivariate data analysis and experimental design*. 1994. p. 75-103.
36. Esbensen, K.H., *Multivariate calibration (PCR/PLS)*, in *Multivariate data analysis-In Practice, An introduction to multivariate data analysis and experimental design*. 1994. p. 115-154.
37. Esbensen, K.H., *Multivariate Data Analysis- In practice*, in *An Introduction to multivariate data analysis and experimental design*. 2006. p. 475-476.
38. Nordby, M.H., et al., *Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan*. *Rheology. Biomacromolecules*, 2003. **4**(2): p. 337-343.
39. Walter, R.H., *Analytical and graphical methods for pectin*. *The Chemistry and Technology of Pectin*, Ed by Walter RH, Academic Press, San Diego, CA, 1991: p. 189-225.
40. Aslani, P. and R.A. Kennedy, *Effect of gelation conditions and dissolution media on the release of paracetamol from alginate gel beads*. *Journal of Microencapsulation*, 1996. **13**(5): p. 601 - 614.
41. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kvalitetskontroll av farmasøytiske preparater*, in *Legemiddelanalyse*. 2004. p. 434-436
42. Lee, C.-M., et al., *Pectin microspheres for oral colon delivery: Preparation using spray drying method and in vitro release of indomethacin*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2004. **9**(3): p. 191-195.
43. El-Gibaly, I., *Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **232**(1-2): p. 199-211.
44. Fernández-Hervás, M.J. and J.T. Fell, *Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. **169**(1): p. 115-119.
45. Gavini, E., et al., *Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **68**(2): p. 245-252.
46. Pilcer, G., F. Vanderbist, and K. Amighi, *Spray-dried carrier-free dry powder tobramycin formulations with improved dispersion properties*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008.
47. Gabrielle Pilcer, F.V.K.A., *Spray-dried carrier-free dry powder tobramycin formulations with improved dispersion properties*. 2009. p. 1463-1475.
48. Giunchedi, P., et al., *Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999. **9**(1): p. 1-7.
49. Orhan, Z., et al., *The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres: their evaluation in an animal osteomyelitis model*. *Journal of Bone & Joint Surgery - British Volume*, 2006. **88**(2): p. 270-5.

50. Johansen, T., *Spraytørking av pektin - Grunnleggende faktorer*, in *Farmasøytisk institutt*. 2006, University of Oslo: Oslo.
51. Desai, K.G. and H.J. Park, *Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres*. *J Microencapsul*, 2005. **22**(4): p. 377-95.
52. Sudhakar, Y., K. Kuotsu, and A.K. Bandyopadhyay, *Buccal bioadhesive drug delivery -- A promising option for orally less efficient drugs*. *Journal of Controlled Release*, 2006. **114**(1): p. 15-40.
53. Sande, S.A., *Pectin-based oral drug delivery to the colon*. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2005. **2**(3): p. 441-450.
54. Bourgeois, S., et al., *Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of [beta]-lactamases entrapped in pectin beads*. *International journal of pharmaceutics*, 2006. **324**(1): p. 2-9.
55. Pillay, V., et al., *Novel modulation of drug delivery using binary zinc-alginate-pectinate polyspheres for zero-order kinetics over several days: Experimental design strategy to elucidate the crosslinking mechanism*. *Drug development and industrial pharmacy*, 2005. **31**(2): p. 191-207.
56. Kumar, R., et al., *Removal of As(V) from water by pectin based active hydrogels following geochemical approach*. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(3): p. 1474-1477.
57. Franco, C.R., A.P. Chagas, and R.A. Jorge, *Ion-exchange equilibria with aluminum pectinates*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002. **204**(1-3): p. 183-192.
58. Donati, I., A. Cesaro, and S. Paoletti, *Specific Interactions versus Counterion Condensation. 1. Nongelling Ions/Polyuronate Systems*. 2006. p. 281-287.
59. Dupuis, G., et al., *Colonic drug delivery: influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type*. *Drug Dev Ind Pharm*, 2006. **32**(7): p. 847-55.
60. Hagesaether, E., R. Bye, and S.A. Sande, *Ex vivo mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **347**(1-2): p. 9-15.
61. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*. *FEBS lett*, 1973. **32**(1): p. 195-198.
62. Sande, S.A., *Pectin-based oral drug delivery to the colon*. *Expert Opinion*, 2005. **2**: p. 441-450.
63. Shoeib, T., et al., *A study of complexes $Mg(NH_3)_n^{+}$ and $Ag(NH_3)_n^{+}$, where $n = 1-8$: competition between direct coordination and solvation through hydrogen bonding*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2000. **201**(1-3): p. 87-100.
64. El Aribi, H., et al., *Binding Energies of the Silver Ion to Small Oxygen-Containing Ligands: Determination by Means of Density Functional Theory and Threshold Collision-Induced Dissociation*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002. **106**(12): p. 2908-2914.

65. Aslani, P. and R.A. Kennedy, *Effect of gelation conditions and dissolution media on the release of paracetamol from alginate gel beads*. 1996, Informa Healthcare. p. 601 - 614.
66. Liu, L., et al., *Pectin and polyacrylamide composite hydrogels: Effect of pectin on structural and dynamic mechanical properties*. Homolytic and Heterolytic Reactions: Problems and Solutions, 2004: p. 121.
67. Munjeri, O., J.H. Collett, and J.T. Fell, *Amidated pectin hydrogel beads for colonic drug delivery-an in vitro study*. Drug Delivery, 1997. **4**(3): p. 207-211.
68. Sriamornsak, P., *Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads*. International journal of pharmaceutics, 1998. **169**(2): p. 213-220.
69. Pillay, V. and R. Fassihi, *In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract: II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(2): p. 243-256.

Vedlegg

Vedlegg 1: Mikroskopbilder for pektinkuler

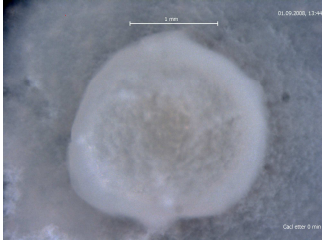
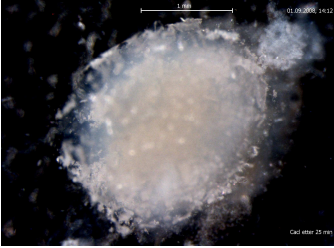
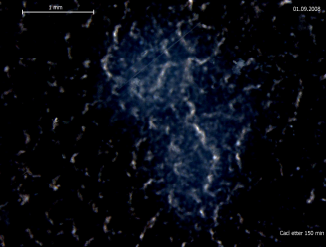
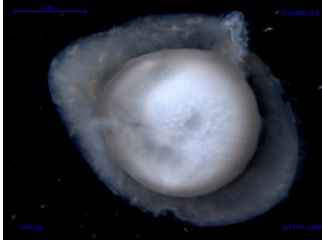

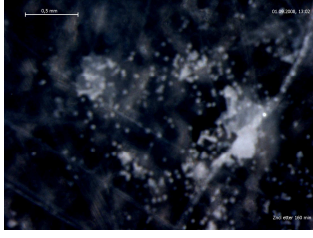
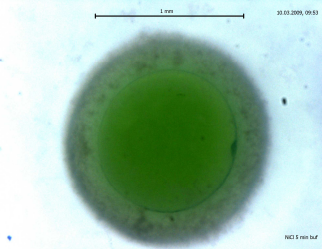
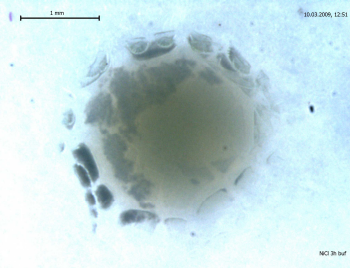
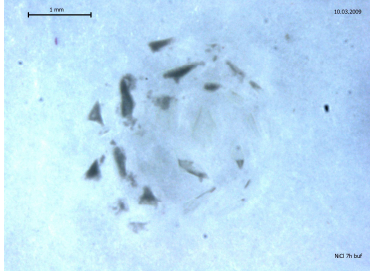
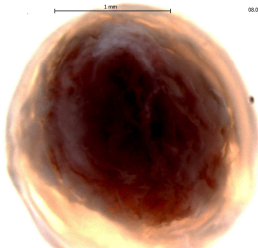
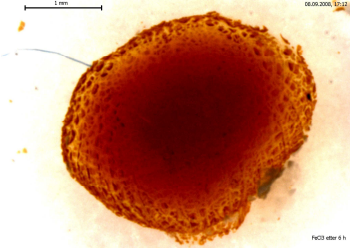
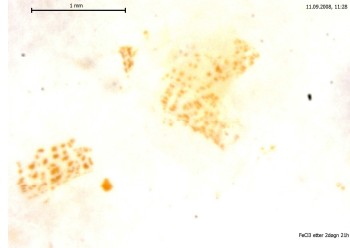
Vedlegg 2: Mikroskopbilder for ikke-kryssbundet pektin

Vedlegg 3: Størrelsesfordelinger for ikke-kryssbundet og kryssbundet pektin

Vedlegg 4: Frisettingskurver

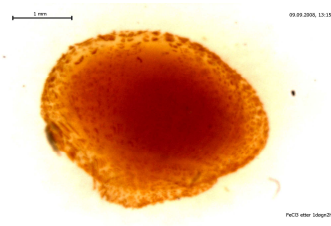
Vedlegg 5: Modellering

Vedlegg 1: Mikroskopbilder for pektinkuler fra 6.4.2 ”Mikroskopbilder”

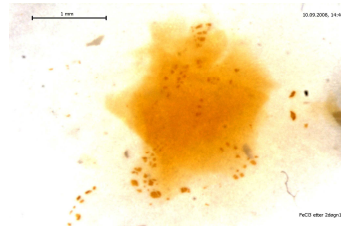
Kryssbin- dings ion	0 min	Maks svelling	Oppløsning
CaCl ₂		 <p style="text-align: center;">30 min</p>	 <p style="text-align: center;">150 min</p>
ZnCl ₂		 <p style="text-align: center;">30 min</p>	 <p style="text-align: center;">160 min</p>
NiCl ₂		 <p style="text-align: center;">3 timer</p>	 <p style="text-align: center;">7timer</p>
FeCl ₃		 <p style="text-align: center;">112 6 timer</p>	 <p style="text-align: center;">2 døgn og 21 timer</p>

Vedlegg

Flere bilder for kuler med FeCl_3 for å ha bedre oversikt over hvordan de oppfører seg:

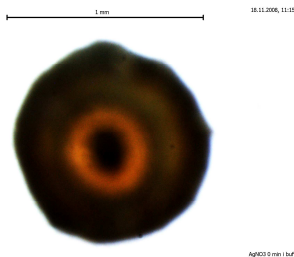


1 døgn og 2 timer

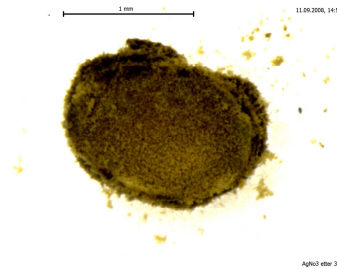


2 døgn og 1 time

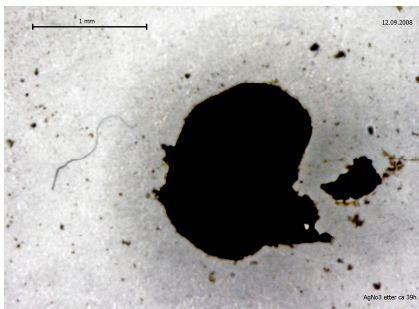
Siden AgNO_3 kuler verken viste svelling eller oppløsning oppgis mikroskopbilder nedenfor :



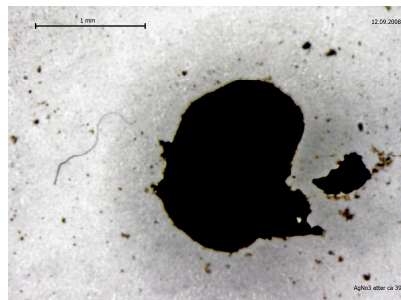
0 minutter



3 timer



37 timer (smuldrer)

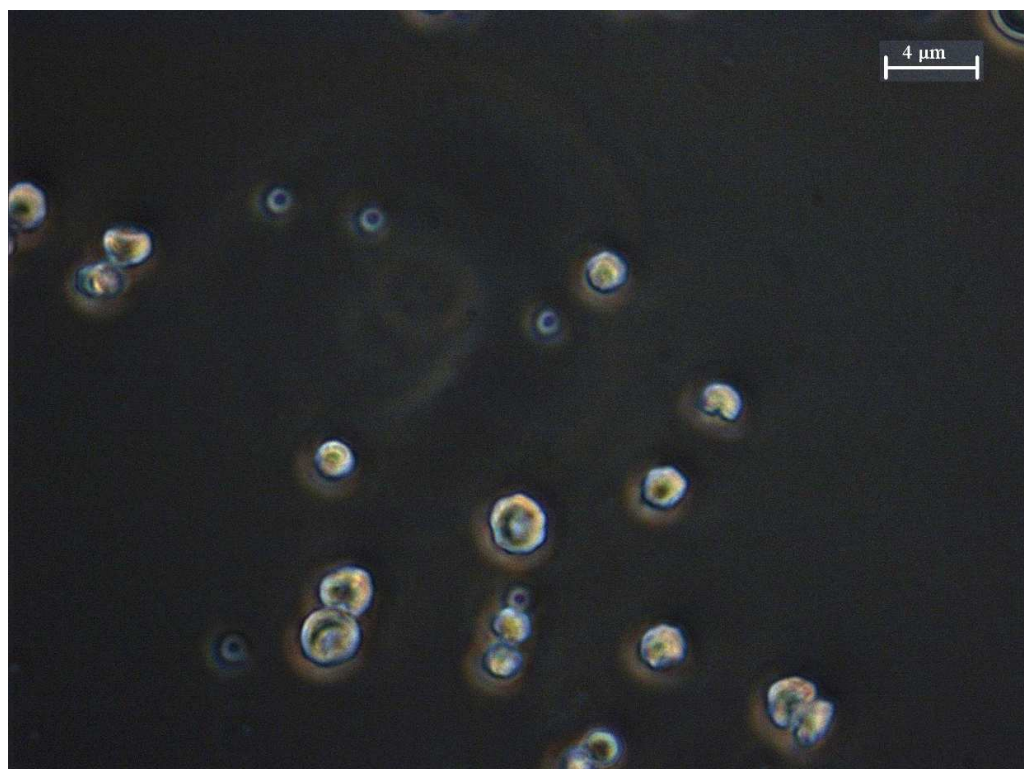
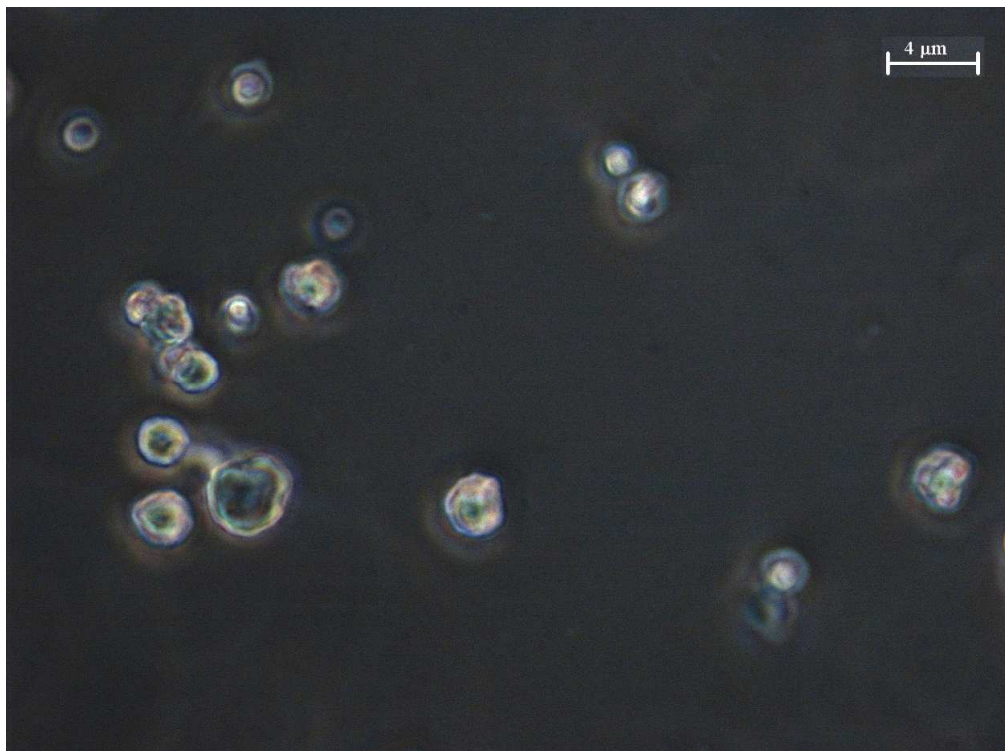


39 timer (smuldrer)

Vedlegg 2: Bilder for spraytørket pektin med og uten virkestoff fra 6.7

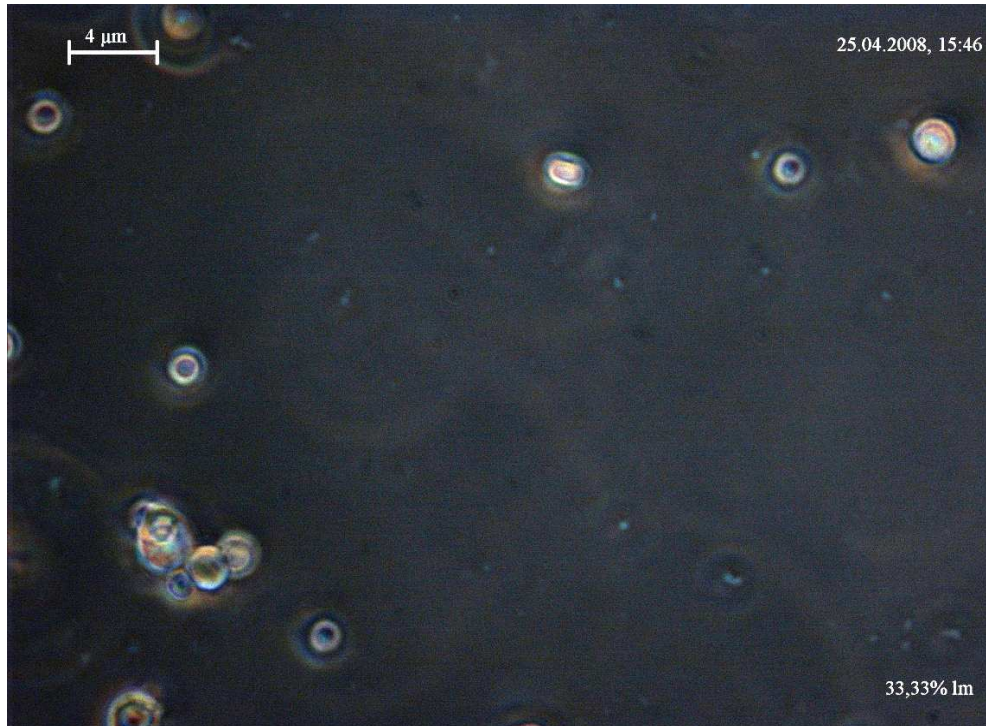
”Lysmikroskopbilder av ikke-kryssbundet pektin”

Mikroskopbilder for ikke-kryssbundet pektin uten paracetamol

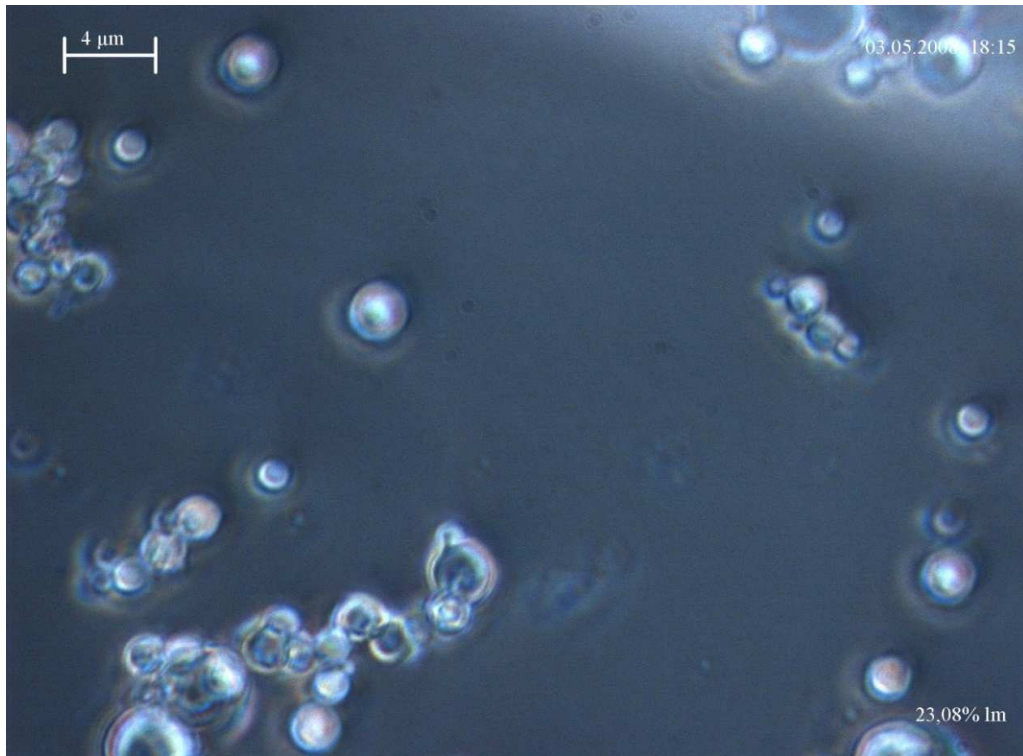


Mikroskopbilder av ikke-kryssbundet pektin med paracetamol

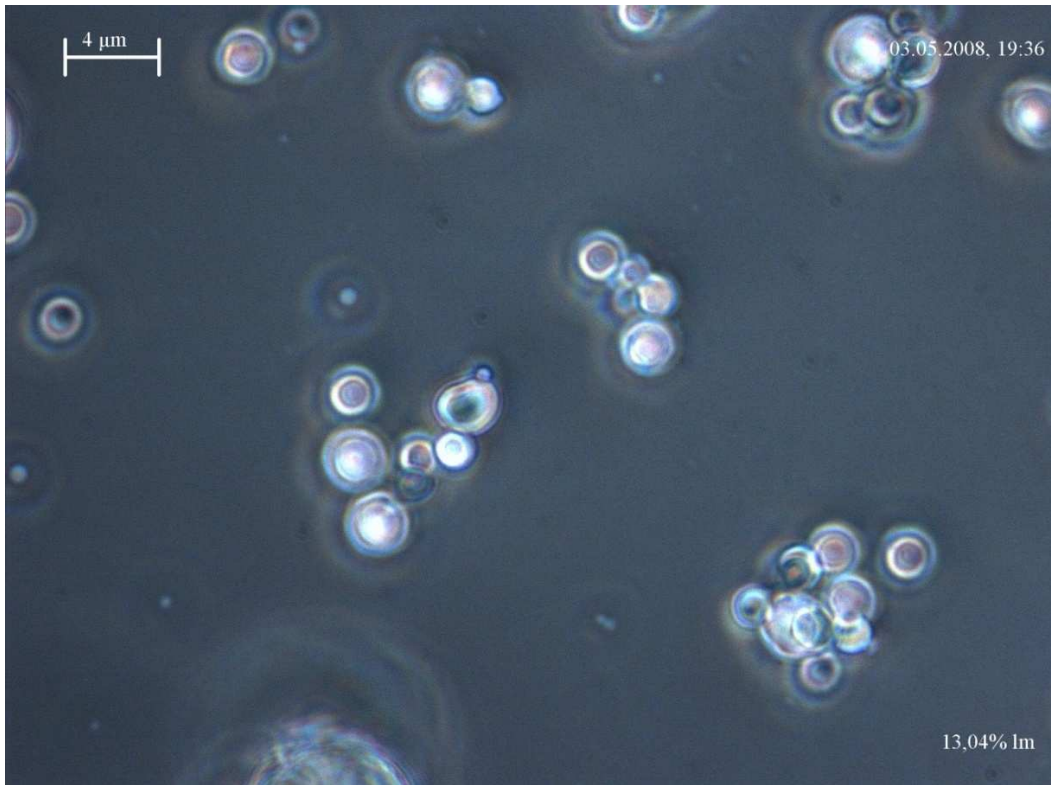
33,33 % paracetamol



23,08 % paracetamol



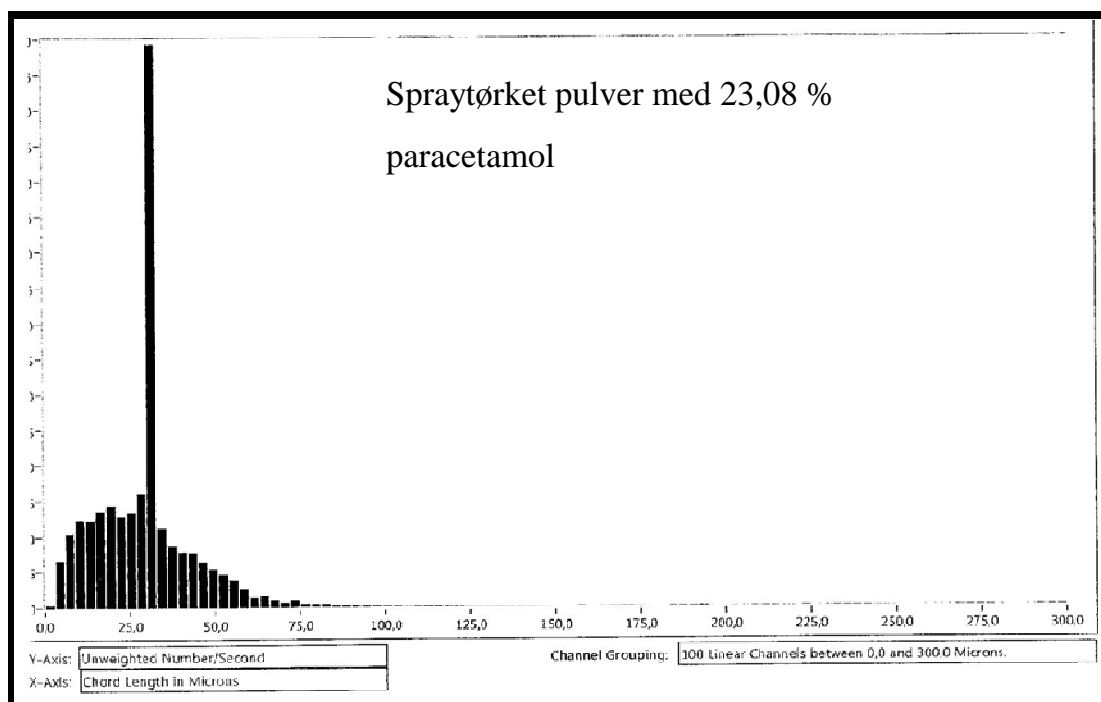
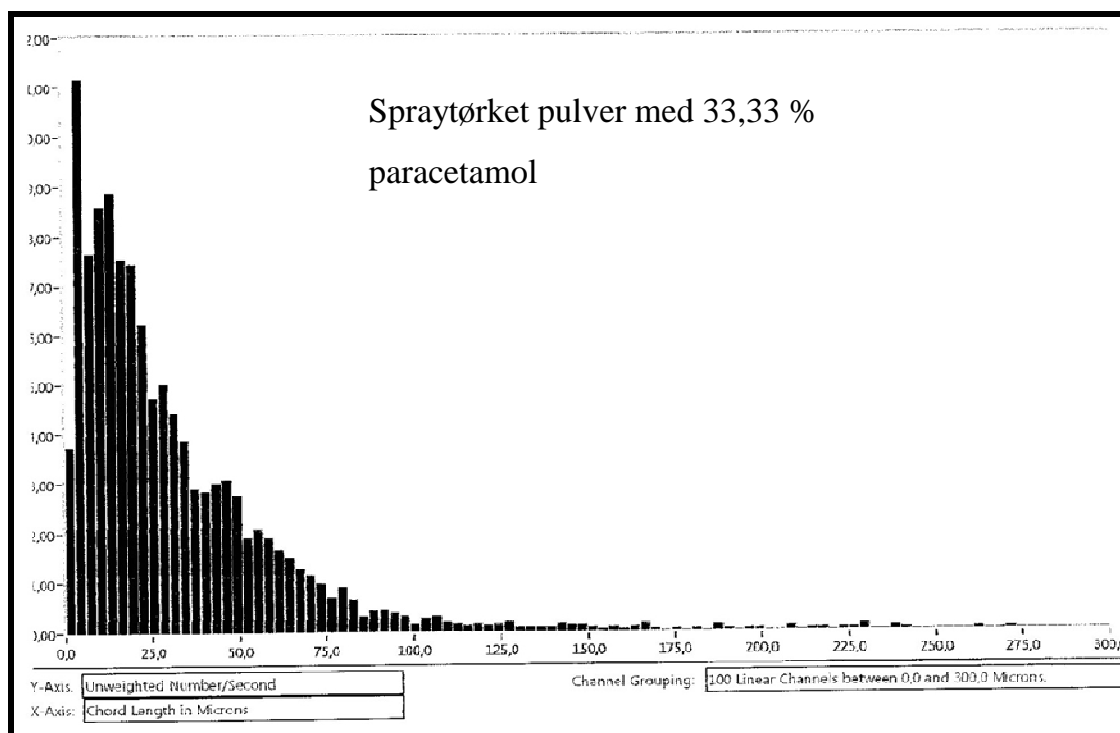
13,04 % paracetamol

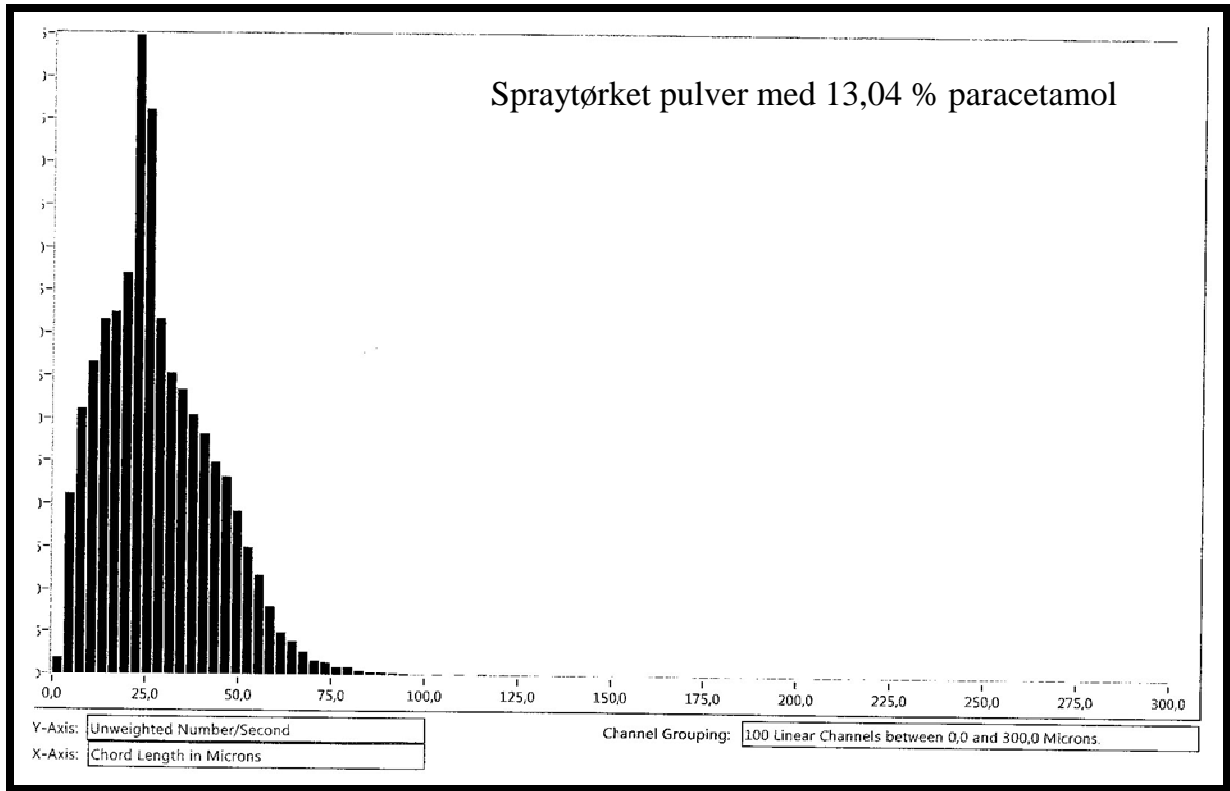


Vedlegg 3: Størrelsesfordeling for spraytørket og kryssbundet pektin fra 6.10

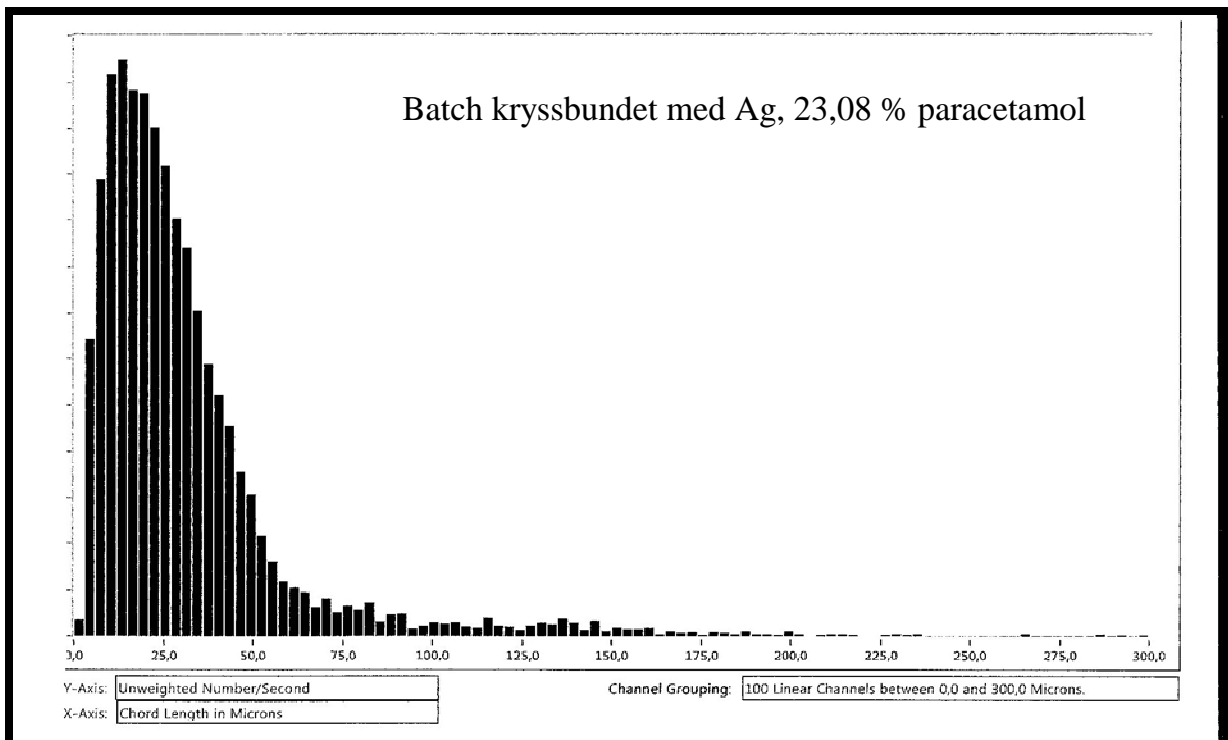
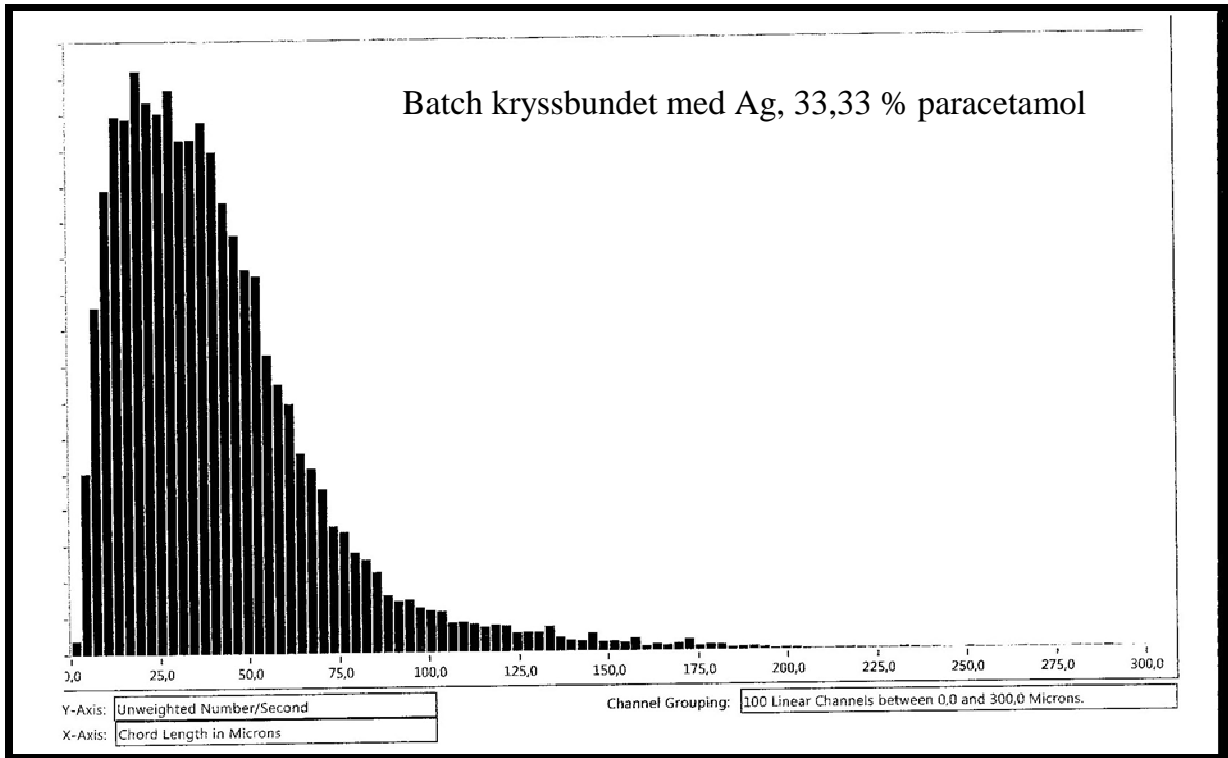
”Størrelsesmåling ved Lasentec[®]”

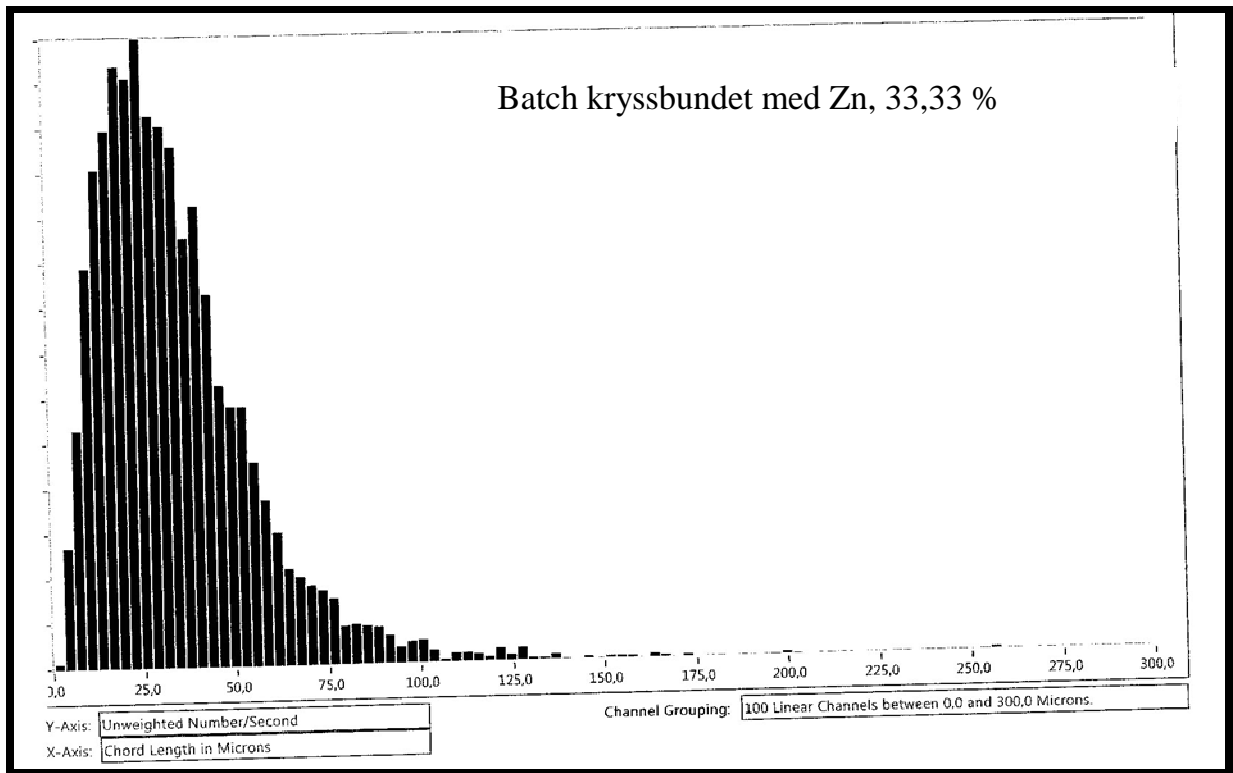
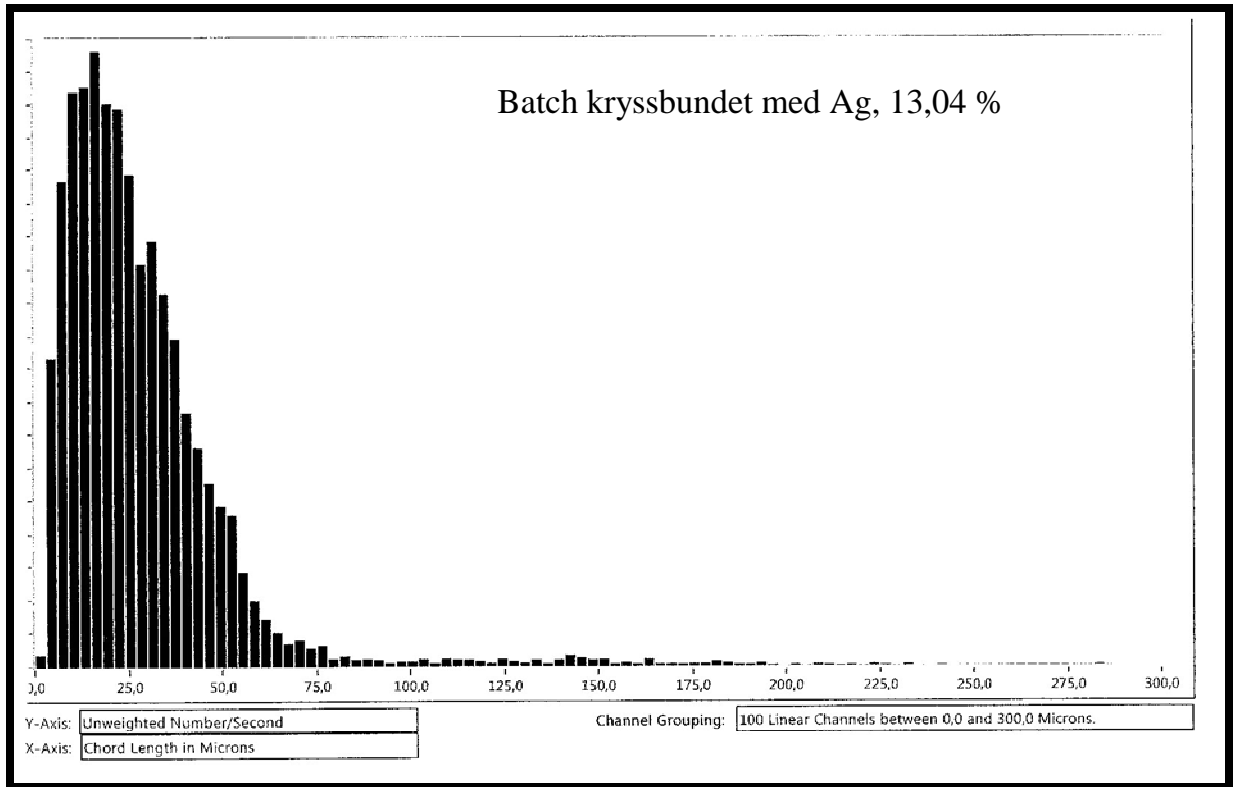
Størrelsesfordelinger for spraytørket pektin med paracetamol

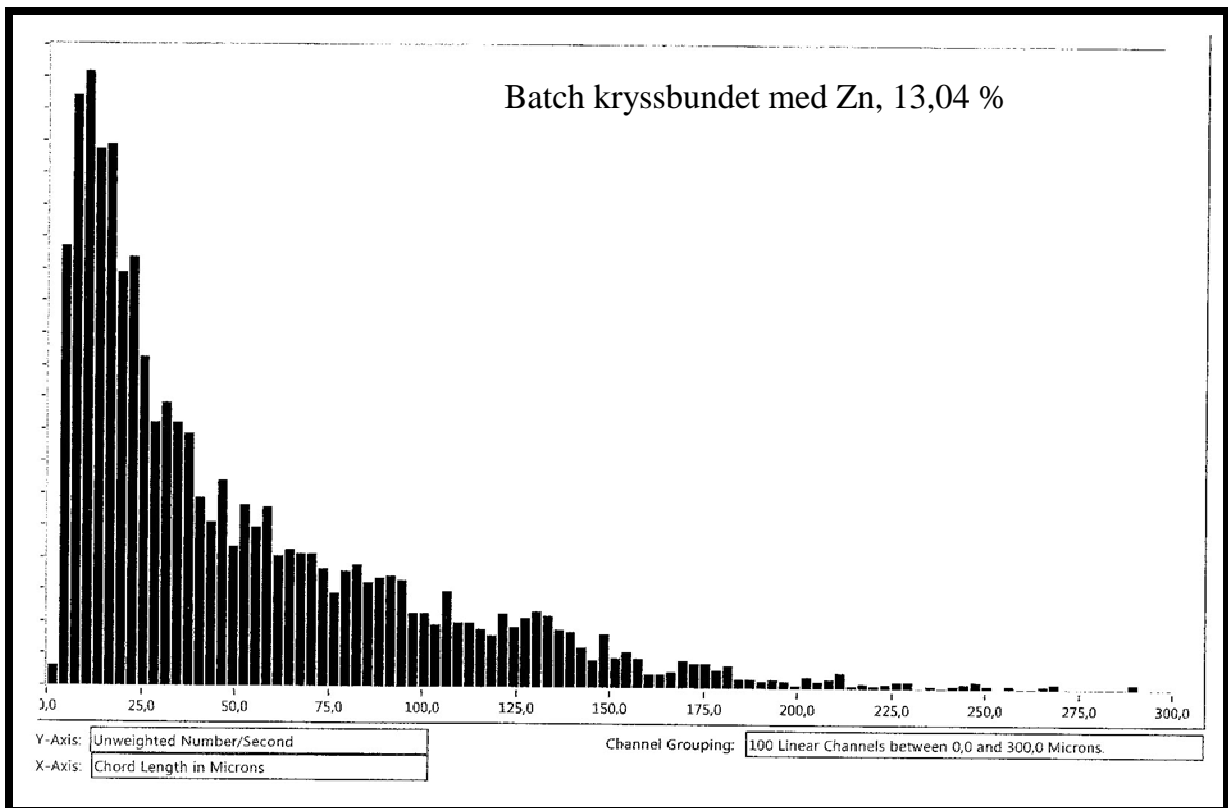
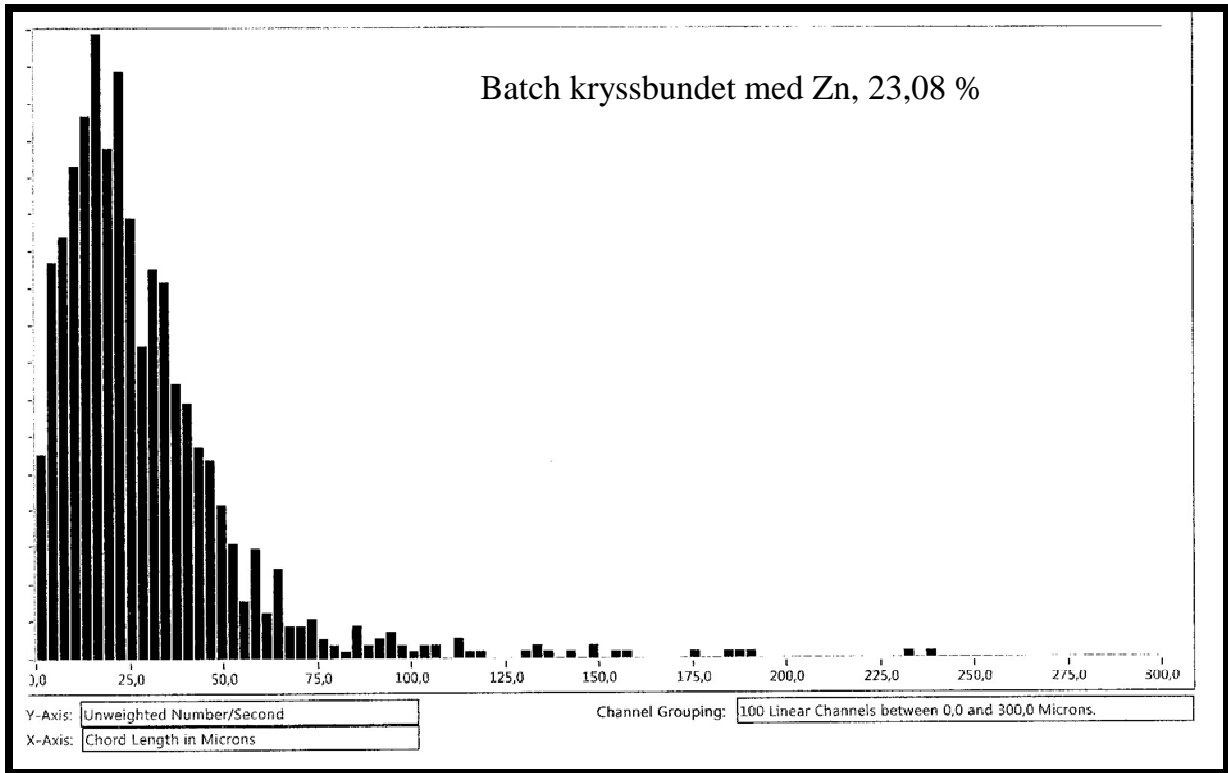


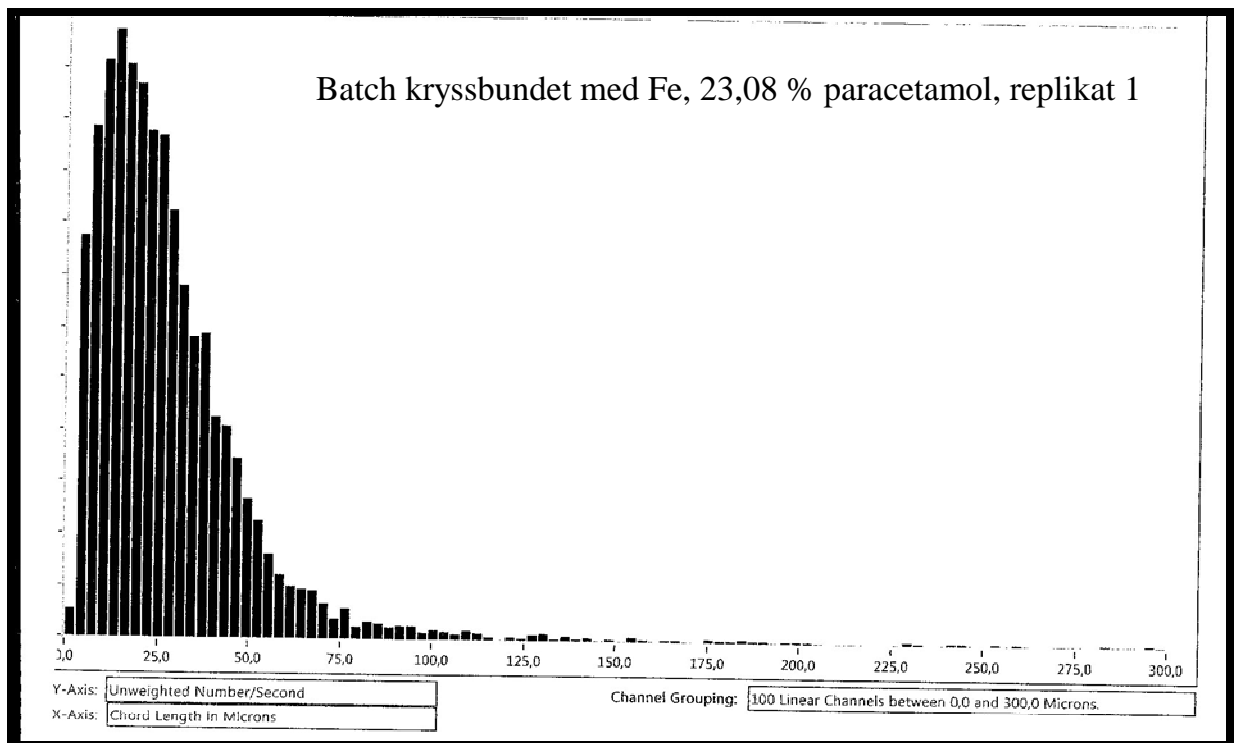
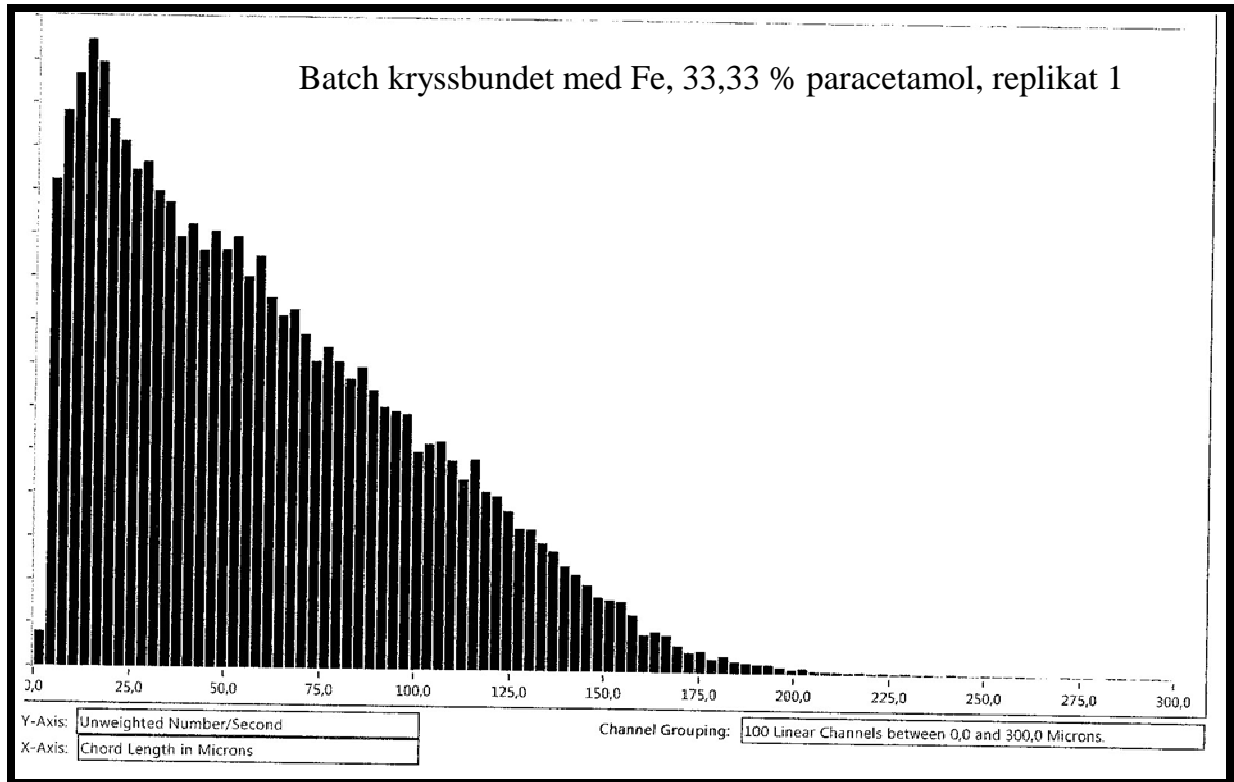


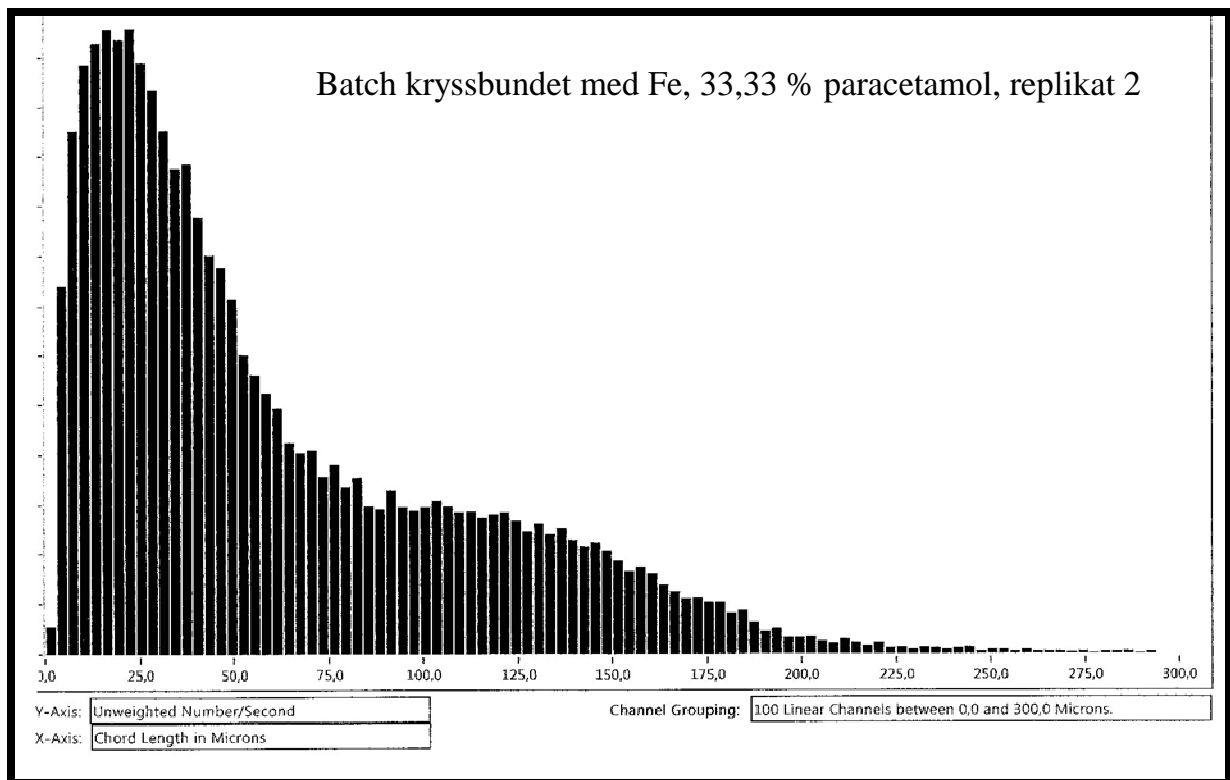
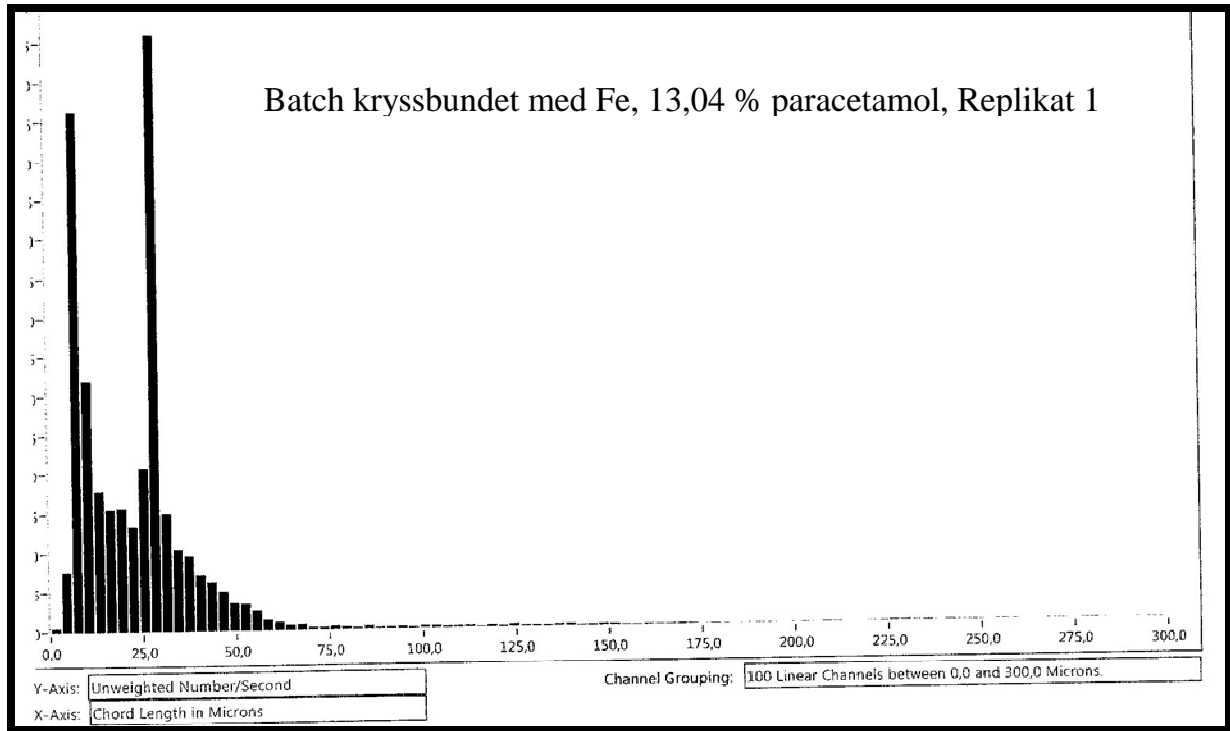
Størrelsesfordelinger for krossbundne partikler med forskjellige ioner

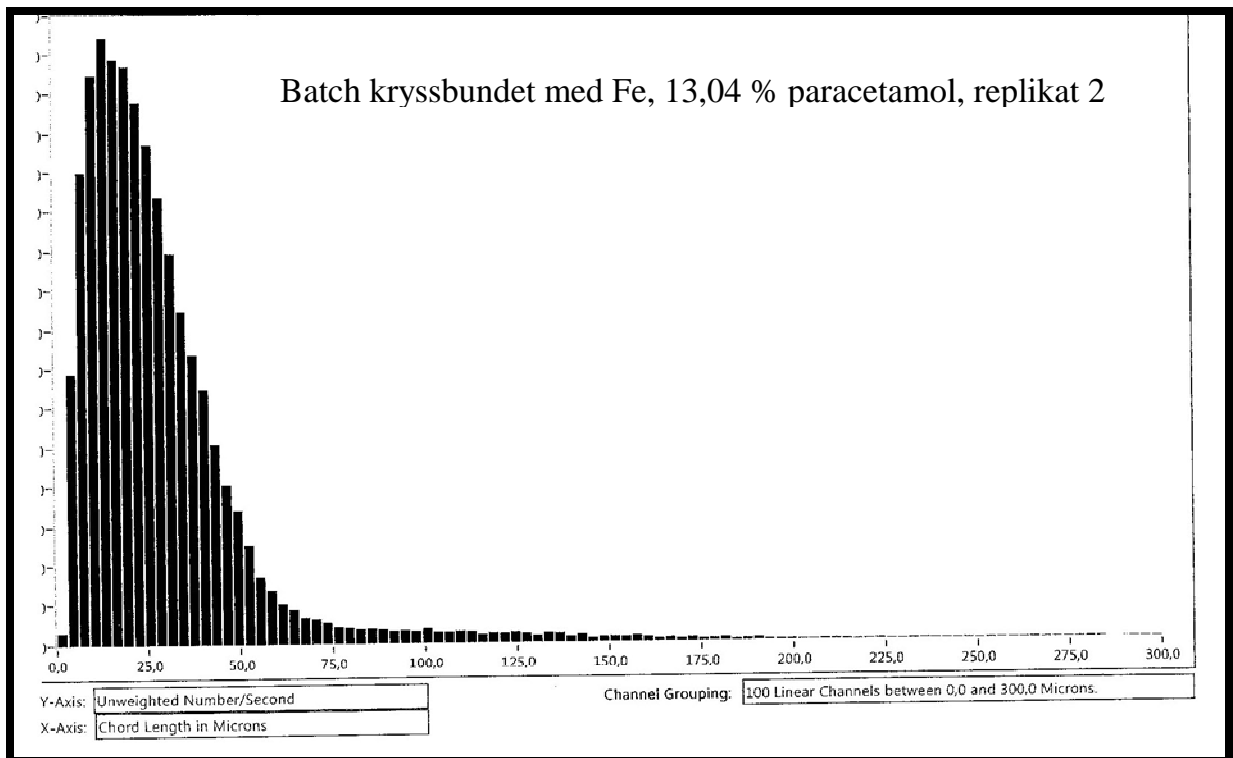
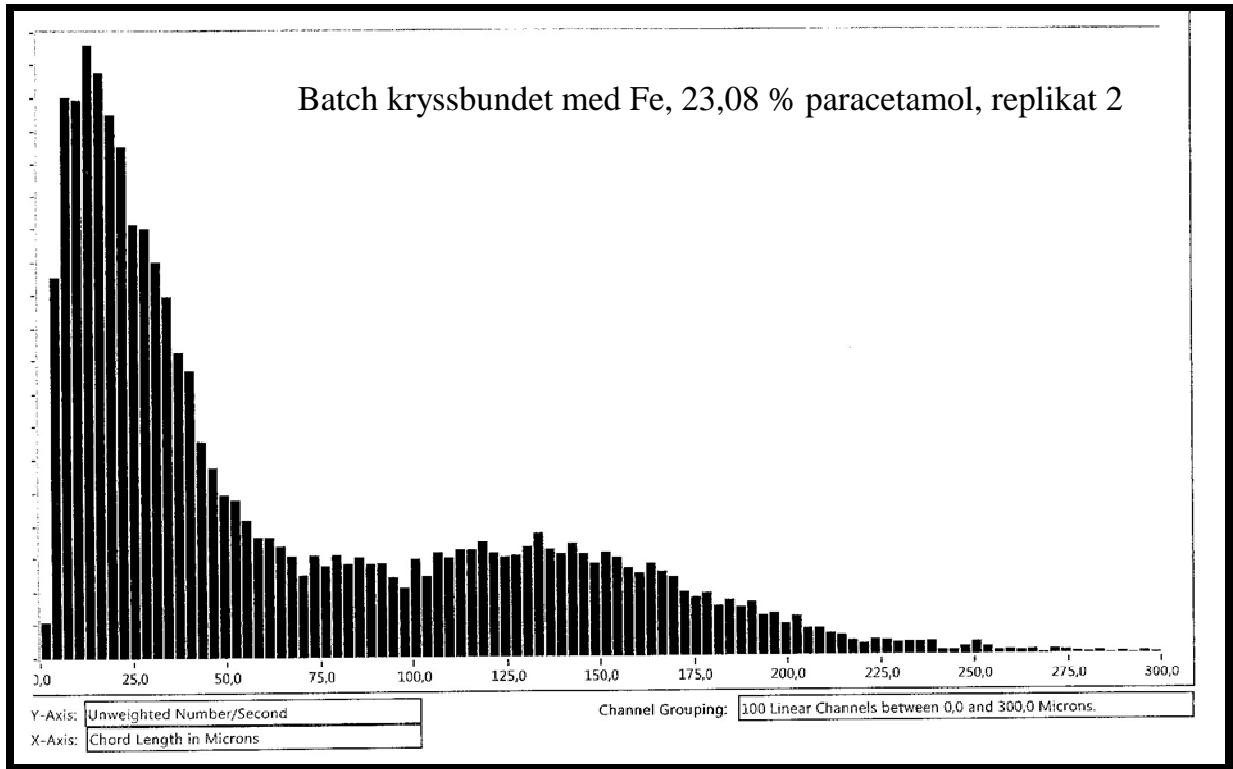


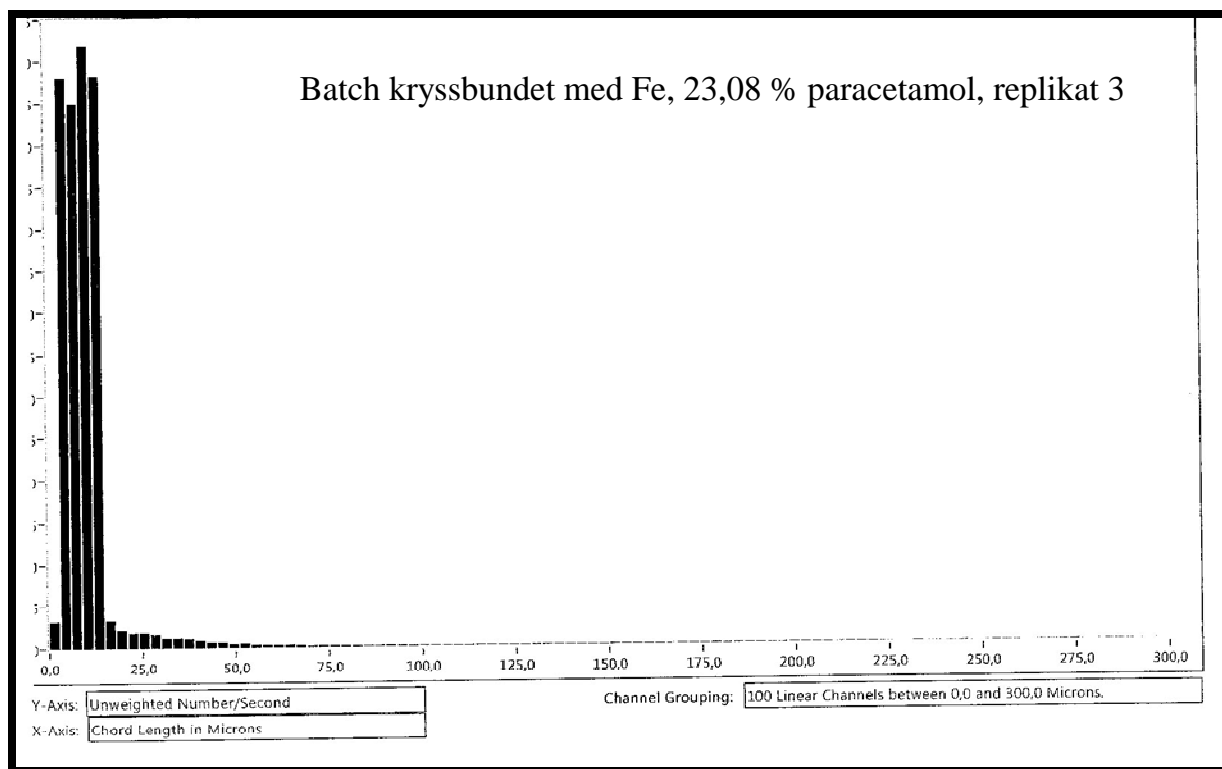
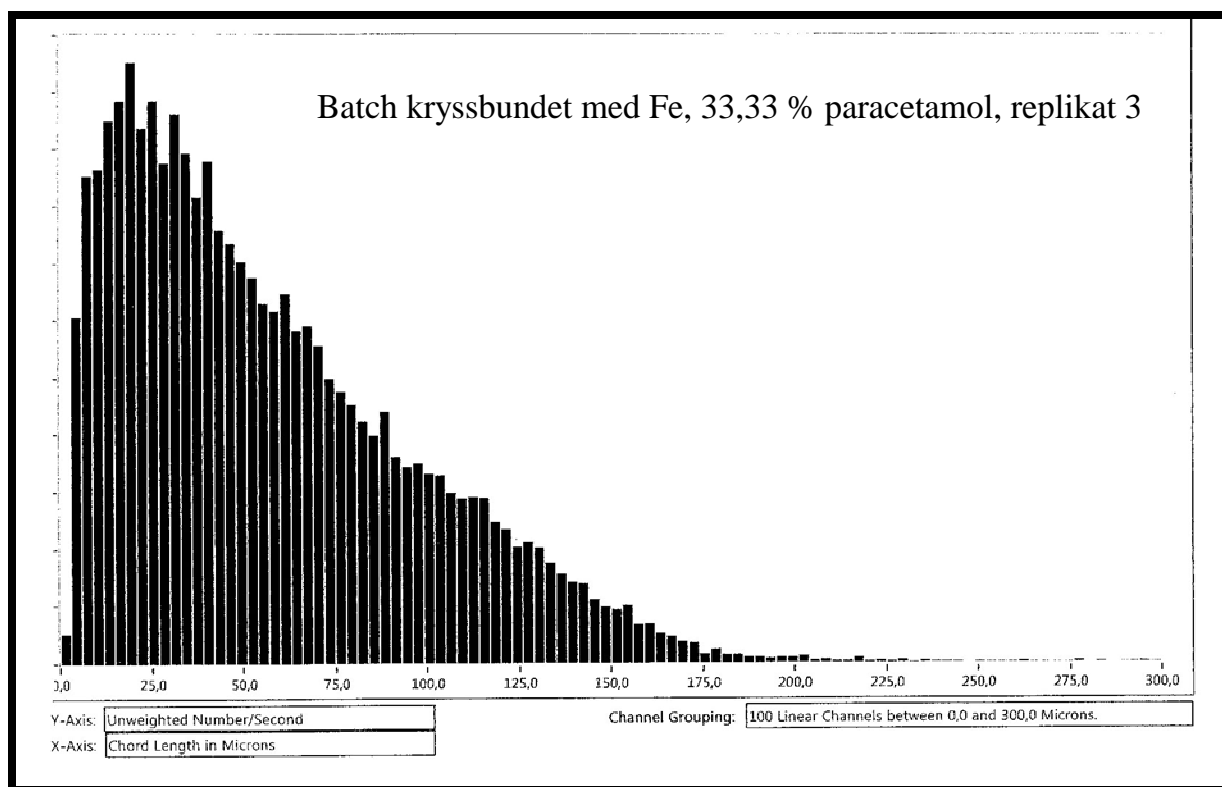


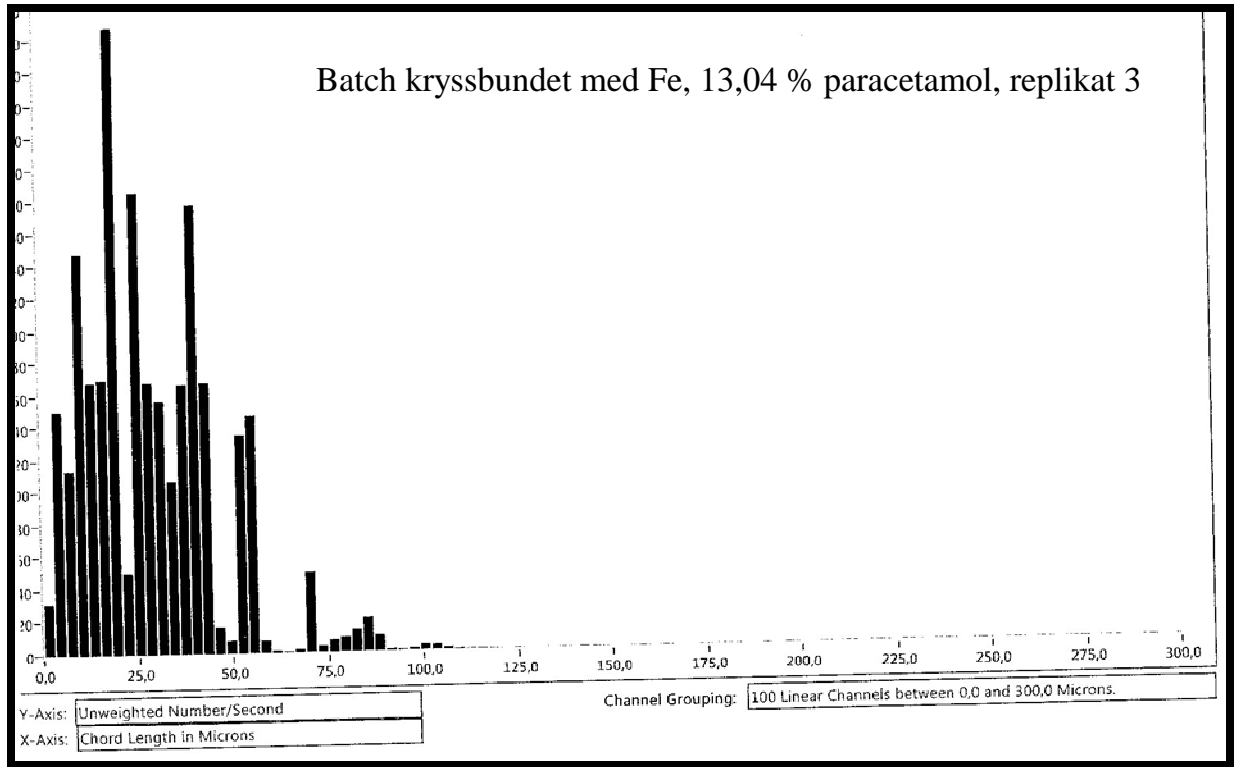






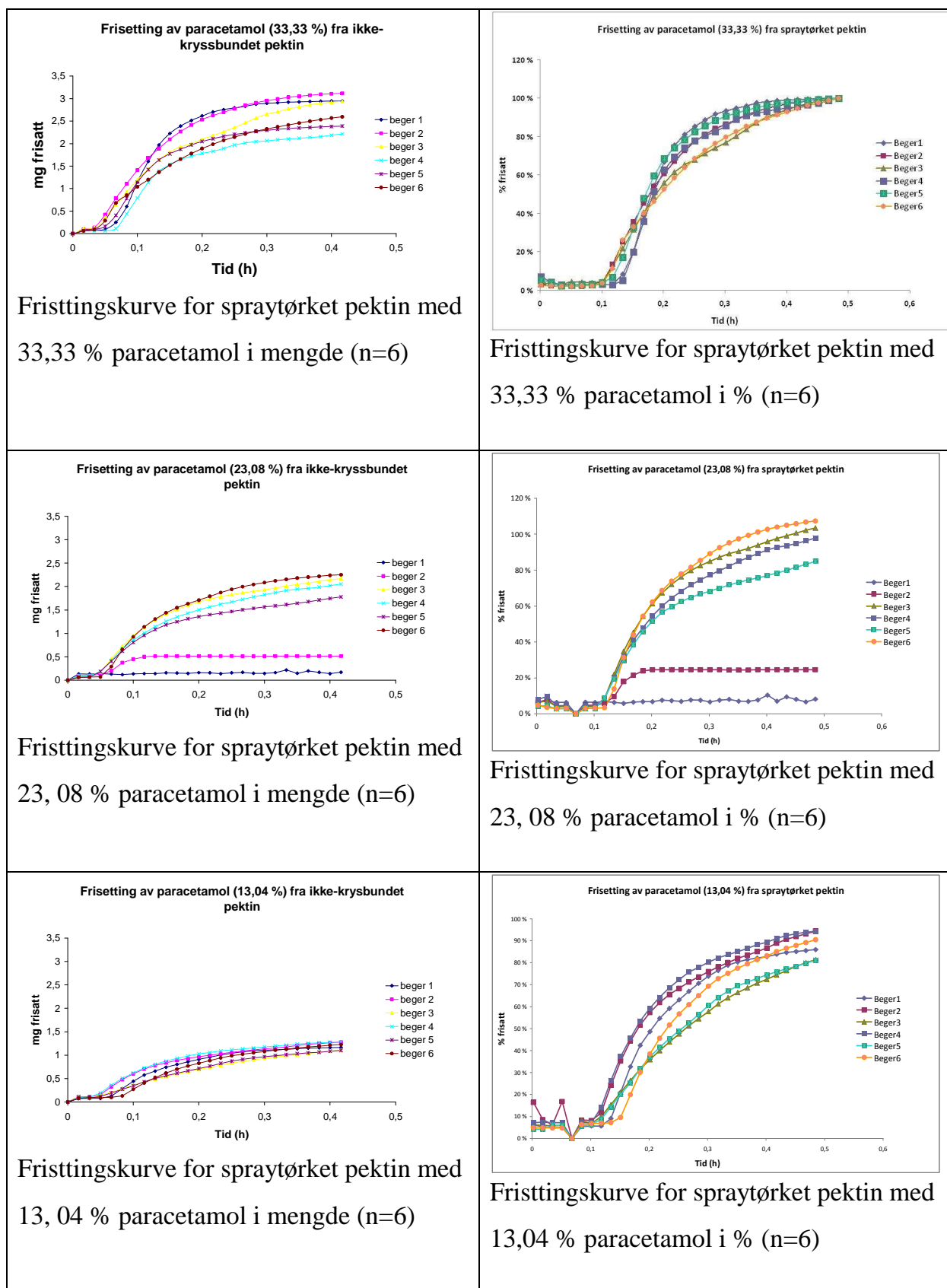




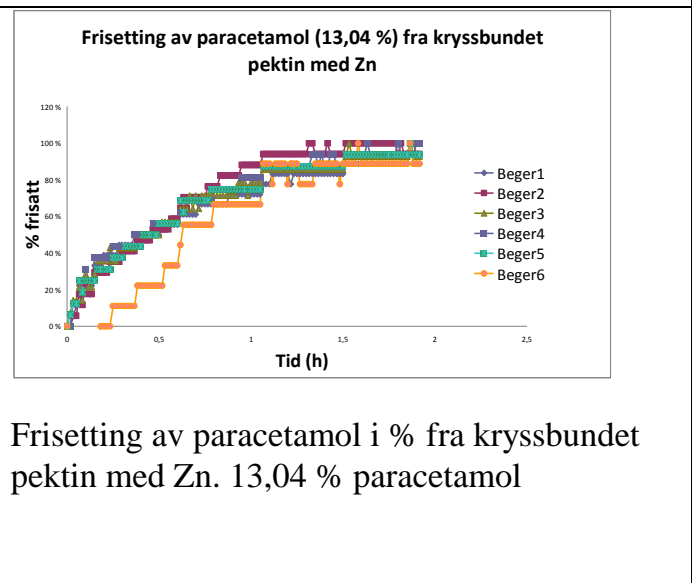
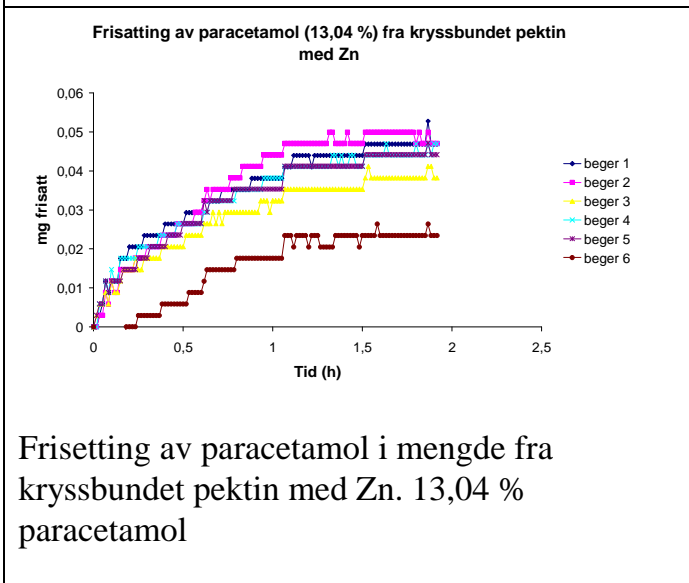
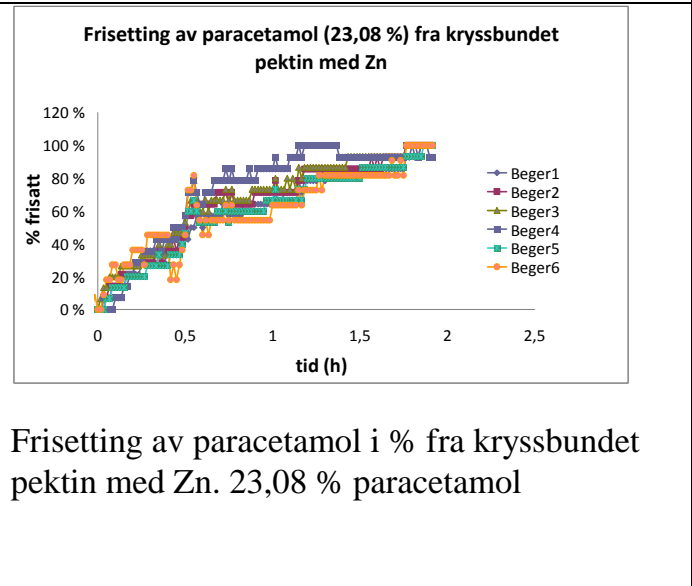
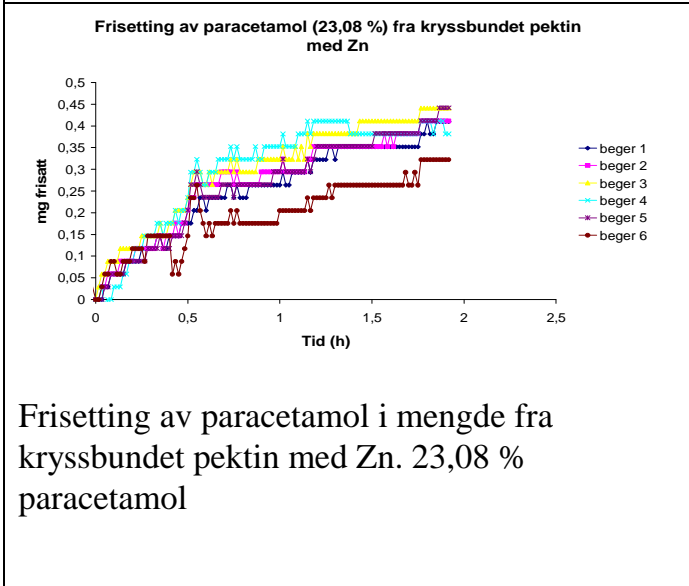
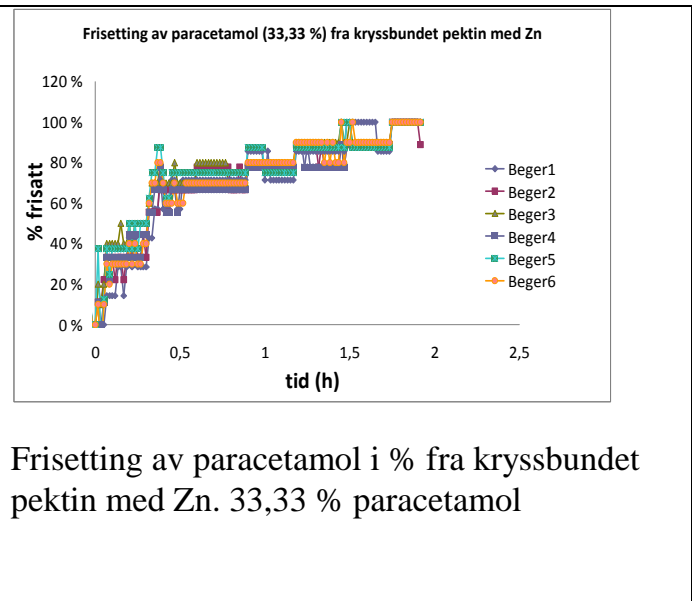
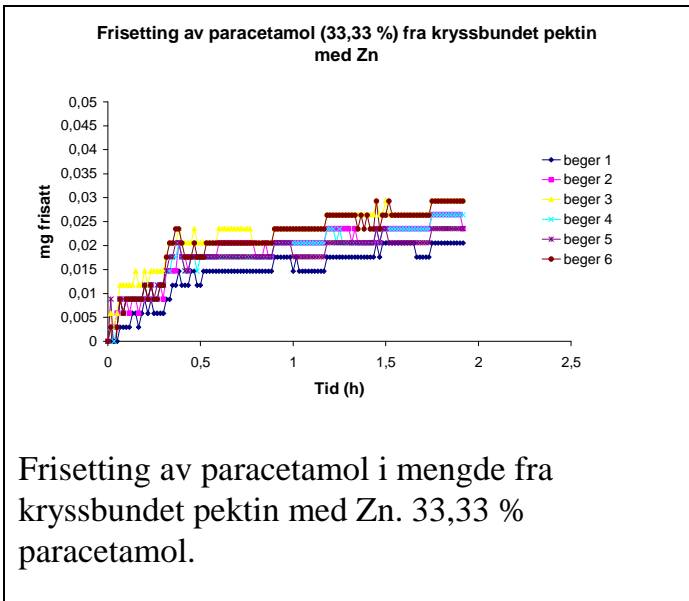


Vedlegg 4: Frisettingskurver fra avsnitt 6.11 "Frisettingsforsøk"

Frisettingskurver for paracetamol fra ikke-kryssbundet pektin

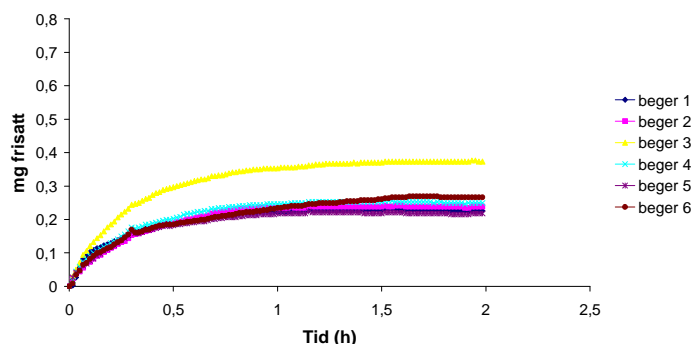


Frisettingskurver for paracetamol fra kryssbundet pektin med Zn



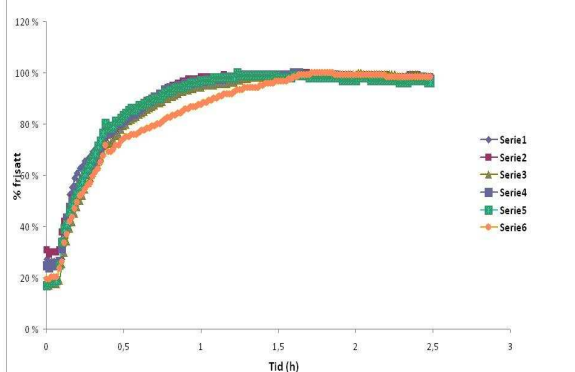
Frisettingskurver for paracetamol fra kryssbundet pektin med Ag

Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Ag



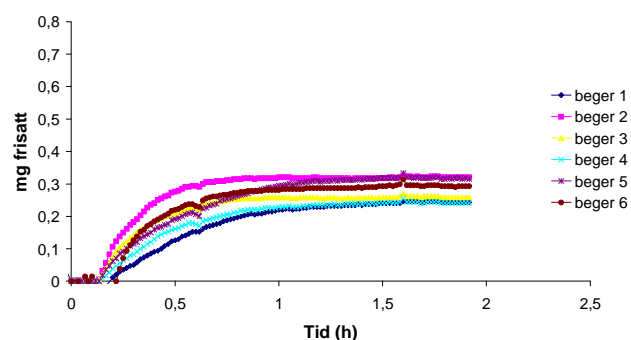
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Ag. 33,33 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Ag



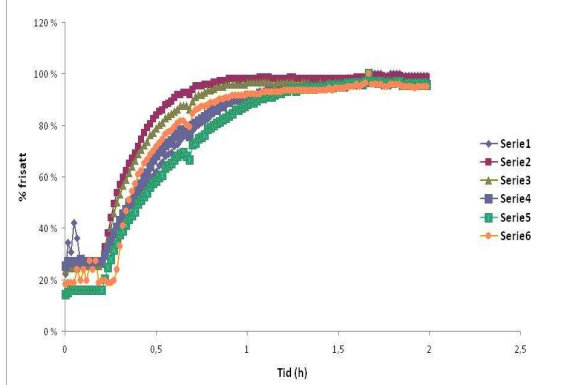
Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Ag. 33,33 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Ag



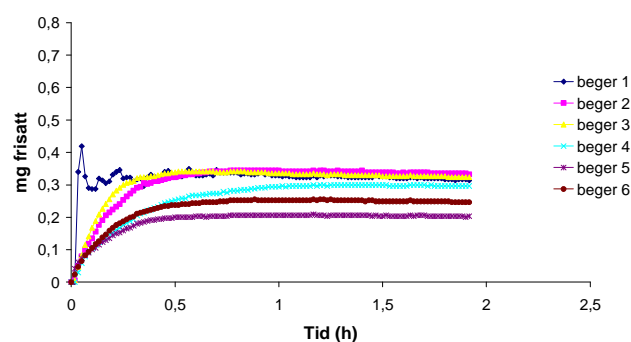
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Ag. 23,08 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin



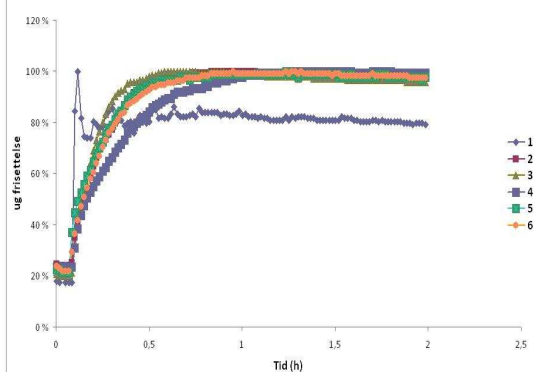
Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Ag. 33,33 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (13,04%) fra kryssbundet pektin med Ag



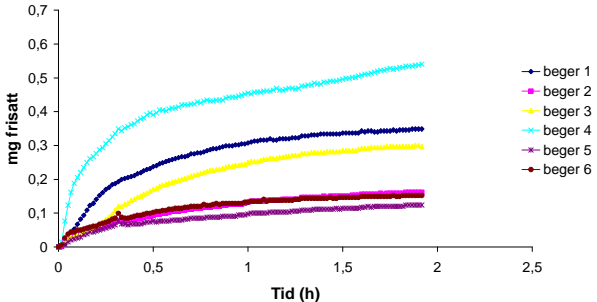
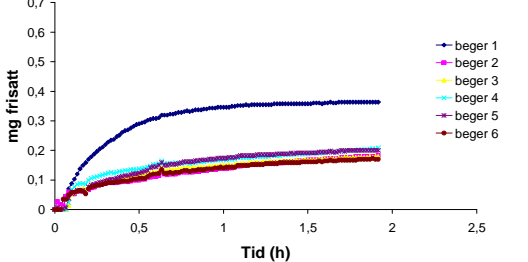
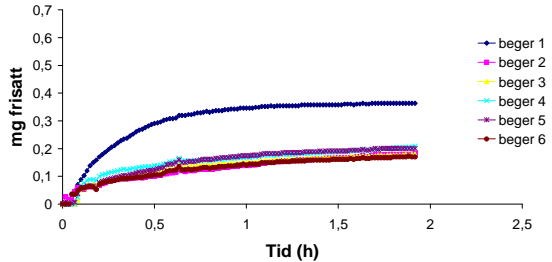
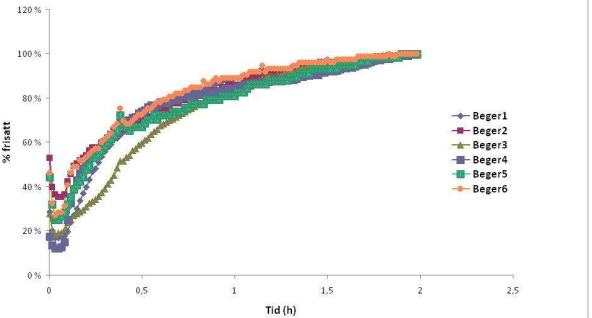
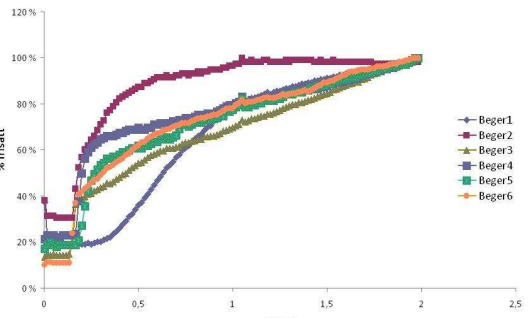
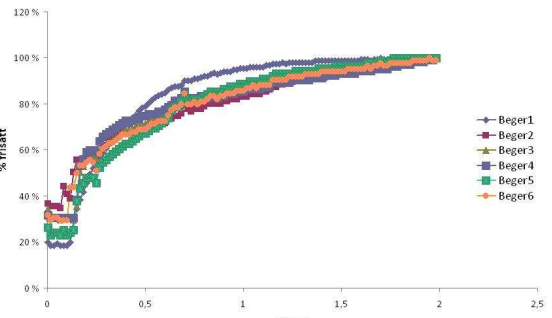
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Ag. 13,04 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (13,04 %) fra kryssbundet pektin med Ag

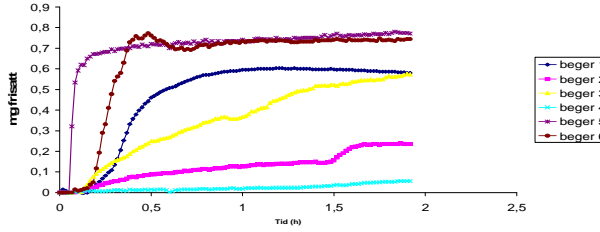
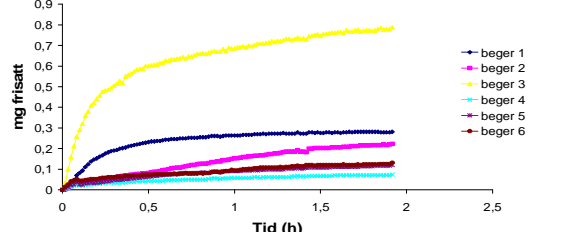
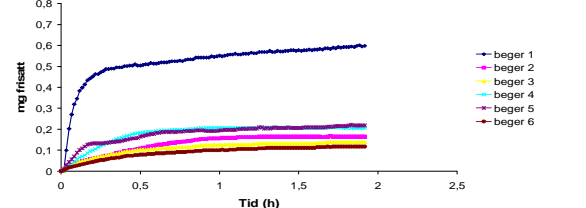
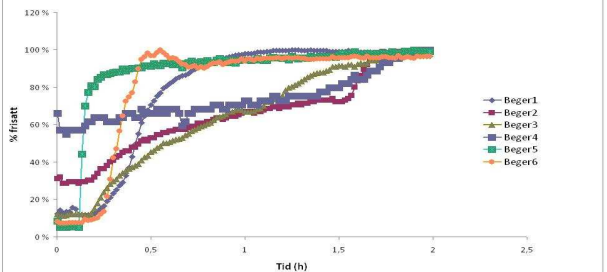
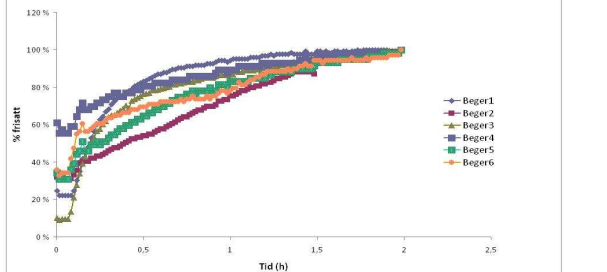
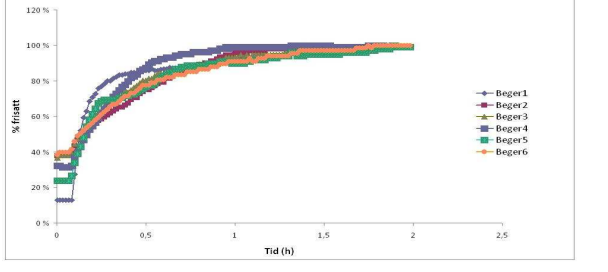


Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Ag. 33,33 % paracetamol.

Frisettingskurver for paracetamol fra kryssbundet pektin med Fe (33,33 % paracetamol)

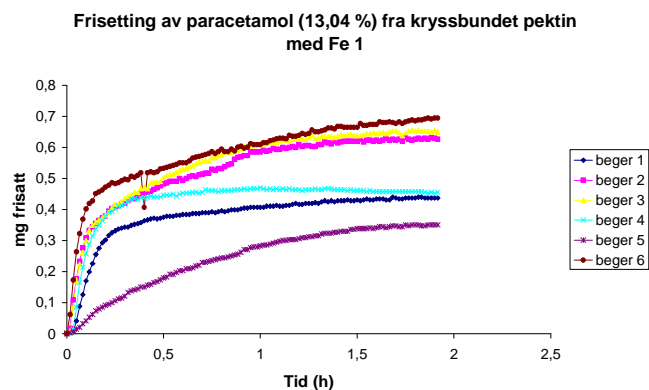
Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
<p data-bbox="264 395 763 437">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe 1</p>  <p data-bbox="185 823 725 938">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 33,33 % paracetamol.</p>	<p data-bbox="938 395 1375 437">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="864 751 1404 866">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 33,33 % paracetamol.</p>	<p data-bbox="1547 395 2051 437">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe 3</p>  <p data-bbox="1476 783 2016 898">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 33,33 % paracetamol.</p>
<p data-bbox="309 991 674 1002">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="185 1385 819 1465">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 33,33 % paracetamol</p>	<p data-bbox="981 991 1346 1002">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="864 1369 1368 1485">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe. 33,33 % paracetamol</p>	<p data-bbox="1603 991 1973 1002">Frisetting av paracetamol (33,33 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="1476 1369 2110 1449">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe. 33,33 % paracetamol</p>

Frisettingskurver for paracetamol fra kryssbundet pektin med Fe (23,08 % paracetamol)

Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
<p data-bbox="257 406 772 438">Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Fe 1</p>  <p data-bbox="179 726 728 845">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 23,08 % paracetamol.</p>	<p data-bbox="952 406 1467 438">Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Fe 2</p>  <p data-bbox="862 758 1568 837">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 23,08 % paracetamol.</p>	<p data-bbox="1668 406 2184 438">Frisetting av paracetamol (23,08%) fra kryssbundet pektin med Fe 3</p>  <p data-bbox="1590 710 2184 829">Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 23,08 % paracetamol.</p>
<p data-bbox="302 885 728 901">Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="179 1228 817 1308">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 23,08 % paracetamol</p>	<p data-bbox="974 885 1400 901">Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="862 1228 1500 1308">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 23,08 % paracetamol</p>	<p data-bbox="1713 885 2139 901">Frisetting av paracetamol (23,08 %) fra kryssbundet pektin med Fe</p>  <p data-bbox="1590 1212 2184 1332">Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 23,08 % paracetamol</p>

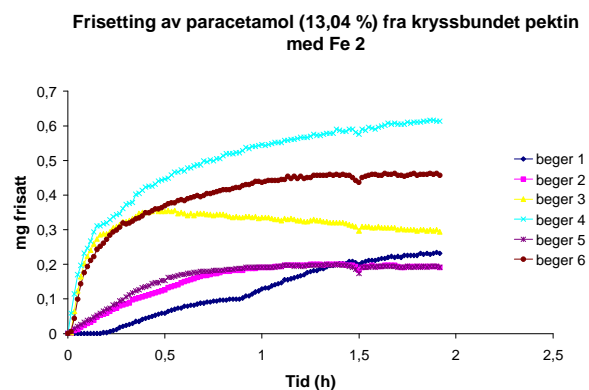
Frisettingskurver for paracetamol fra kryssbundet pektin med Fe (13,04 % paracetamol)

Replikat 1



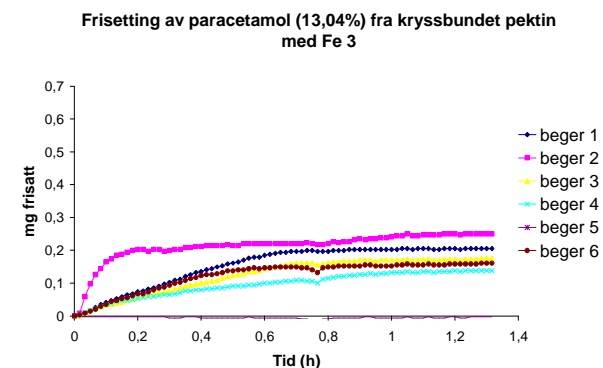
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 13,04 % paracetamol.

Replikat 2



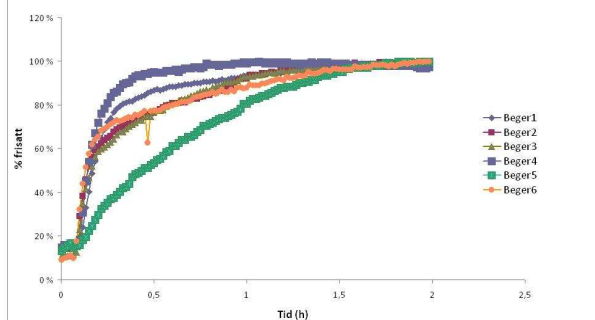
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 13,04 % paracetamol.

Replikat 3



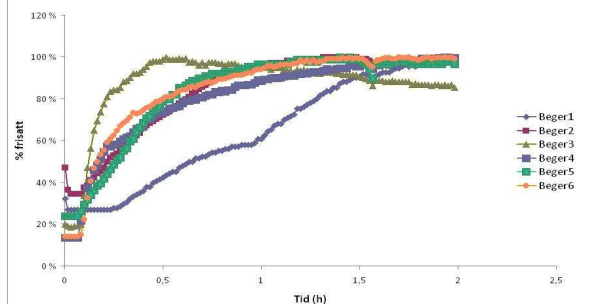
Frisetting av paracetamol i mengde fra kryssbundet pektin med Fe. 13,04 % paracetamol.

Frisetting av paracetamol (13,04 %) fra kryssbundet pektin med Fe



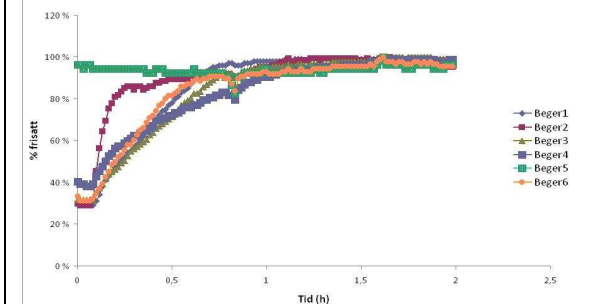
Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 13,04 % paracetamol

Frisetting av paracetamol (13,04 %) fra kryssbundet pektin med Fe



Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 13,04 % paracetamol

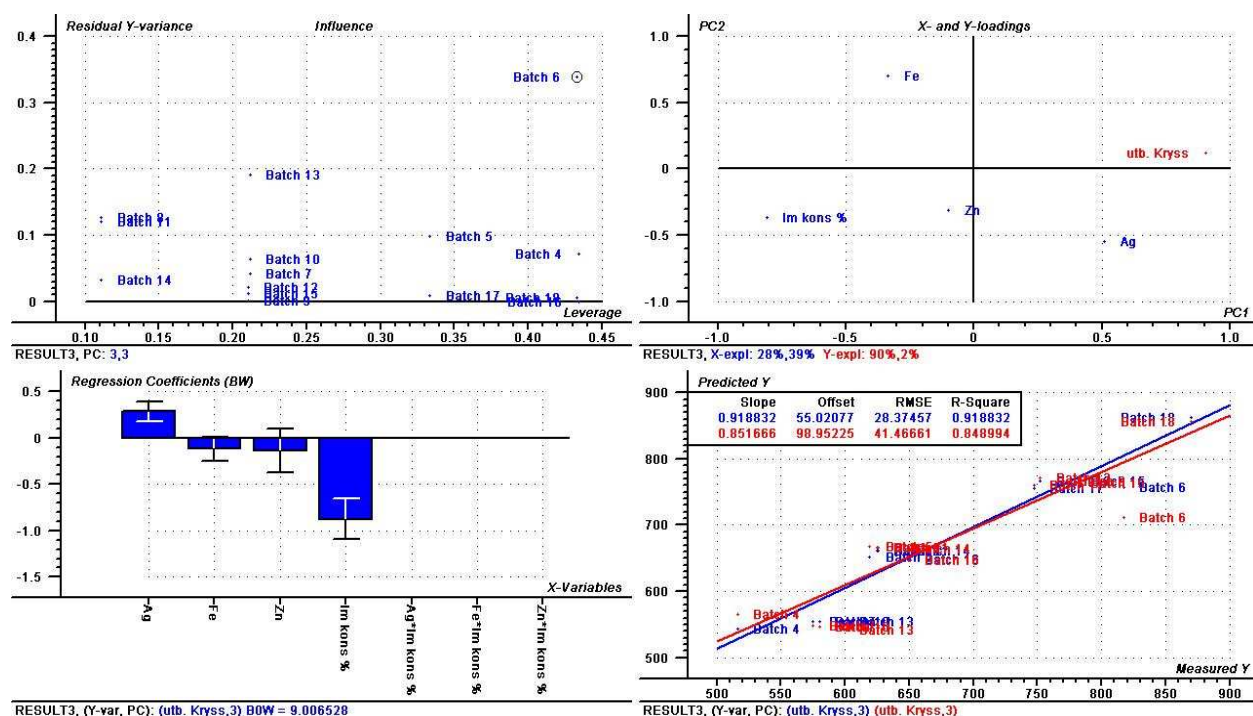
Frisetting av paracetamol (13,04 %) fra kryssbundet pektin med Fe



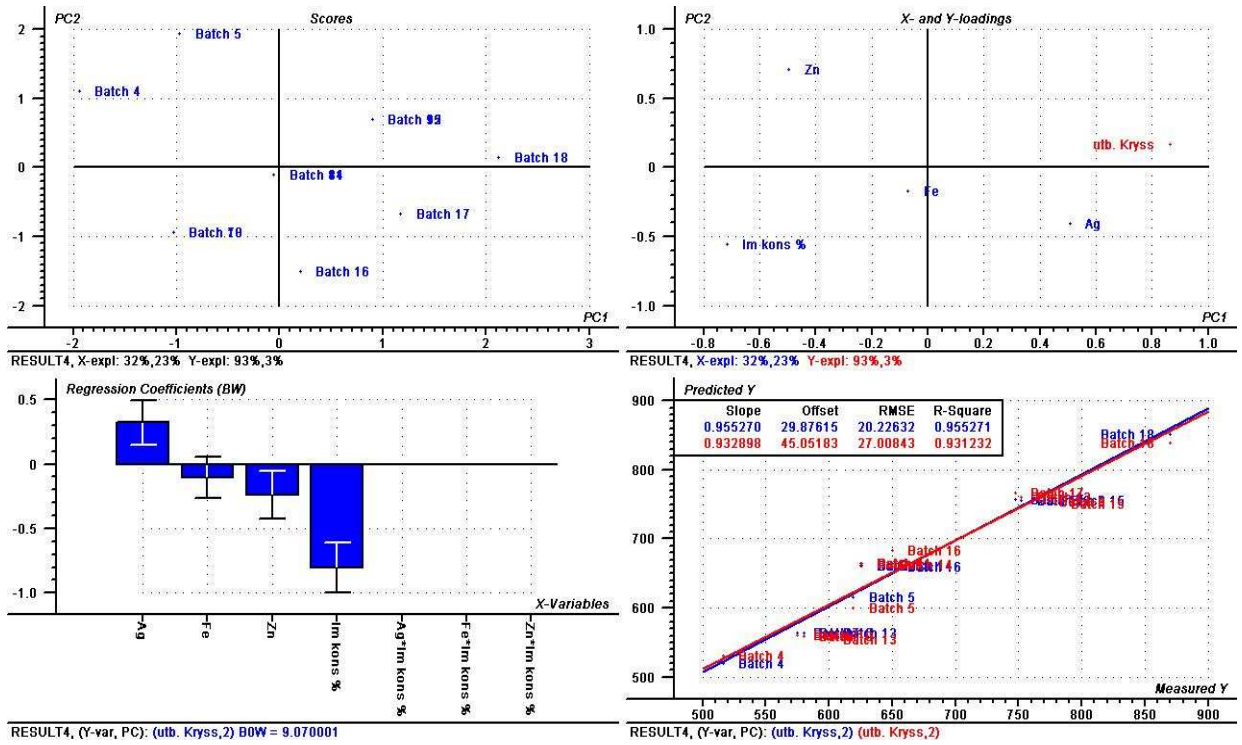
Frisetting av paracetamol i % fra kryssbundet pektin med Fe 13,04 % paracetamol

Vedlegg 5:

I kurvene nedenfor viser Batch 1-3 spraytørket pulver med legemiddelkonsentrasjon på henholdsvis 33,33 %, 23,08 % og 13,33 %. Batch 3-18 er kryssbundet, der 3-6 er kryssbundet med $ZnCl_2$, 7-15 er kryssbundet med $FeCl_3$ og 16-18 med $AgNO_3$.

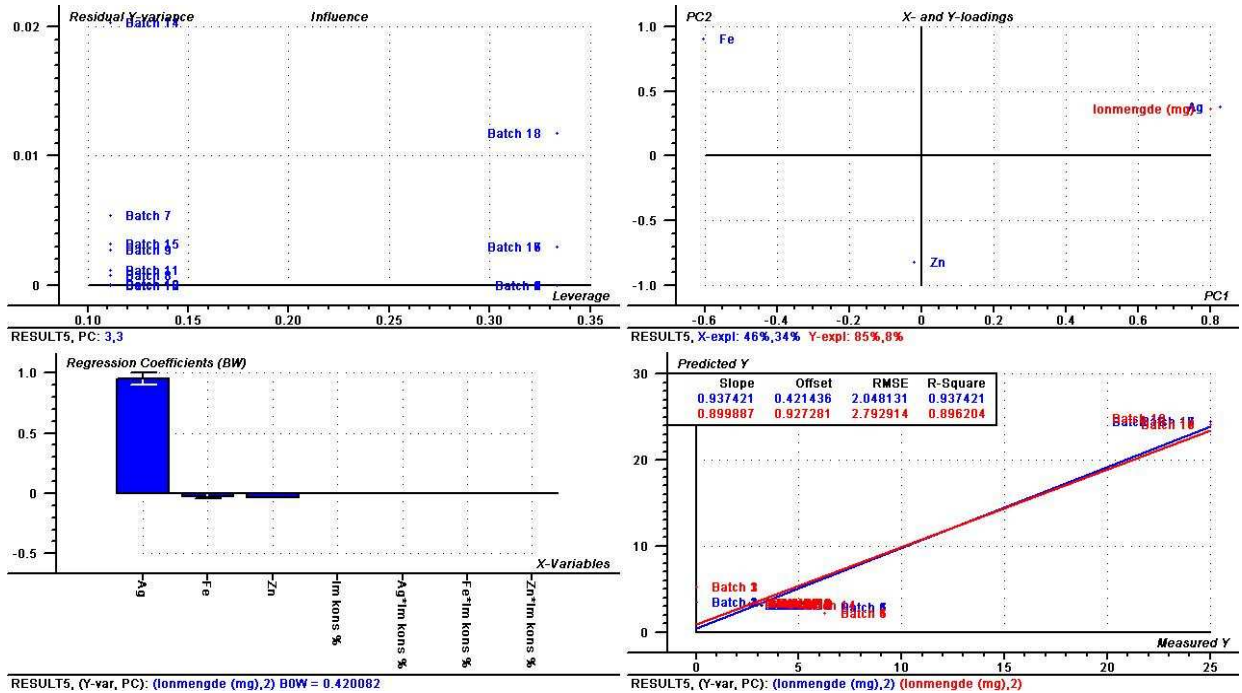
Modellering fra 6.8.3 "Modellering på utbytte etter kryssbinding"**Modellering mot utbytte etter kryssbinding med uteligger**

Vedlegg

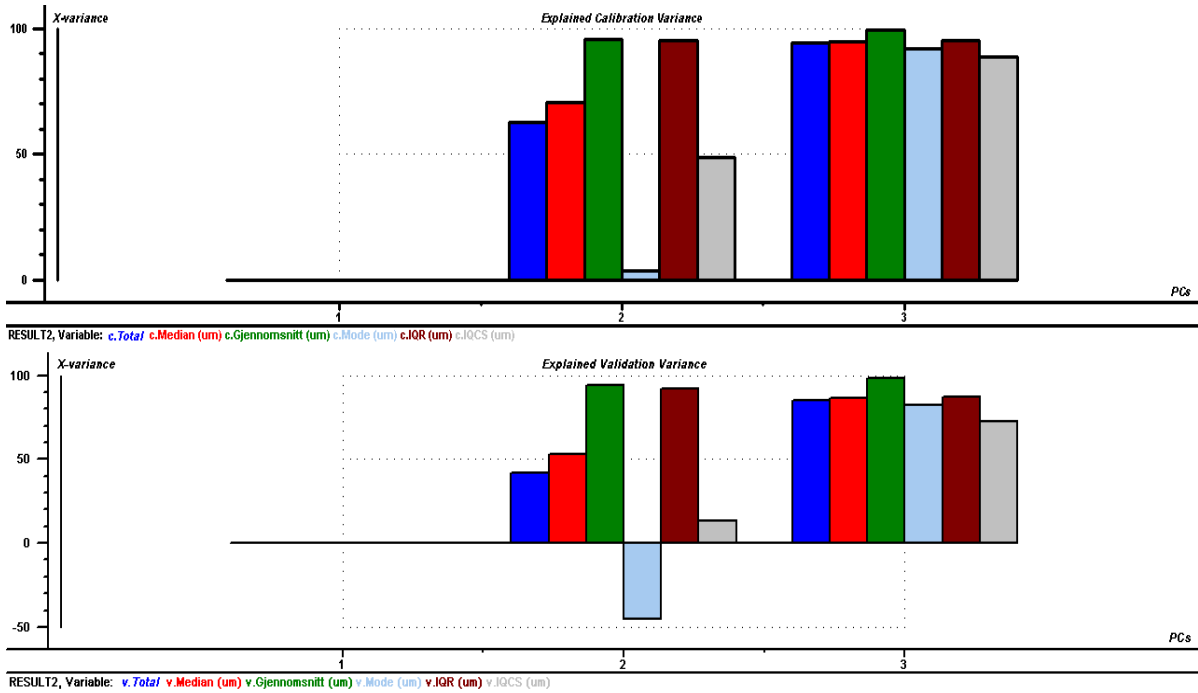


Modellering mot utbytte etter kryssbinding uten uteligger

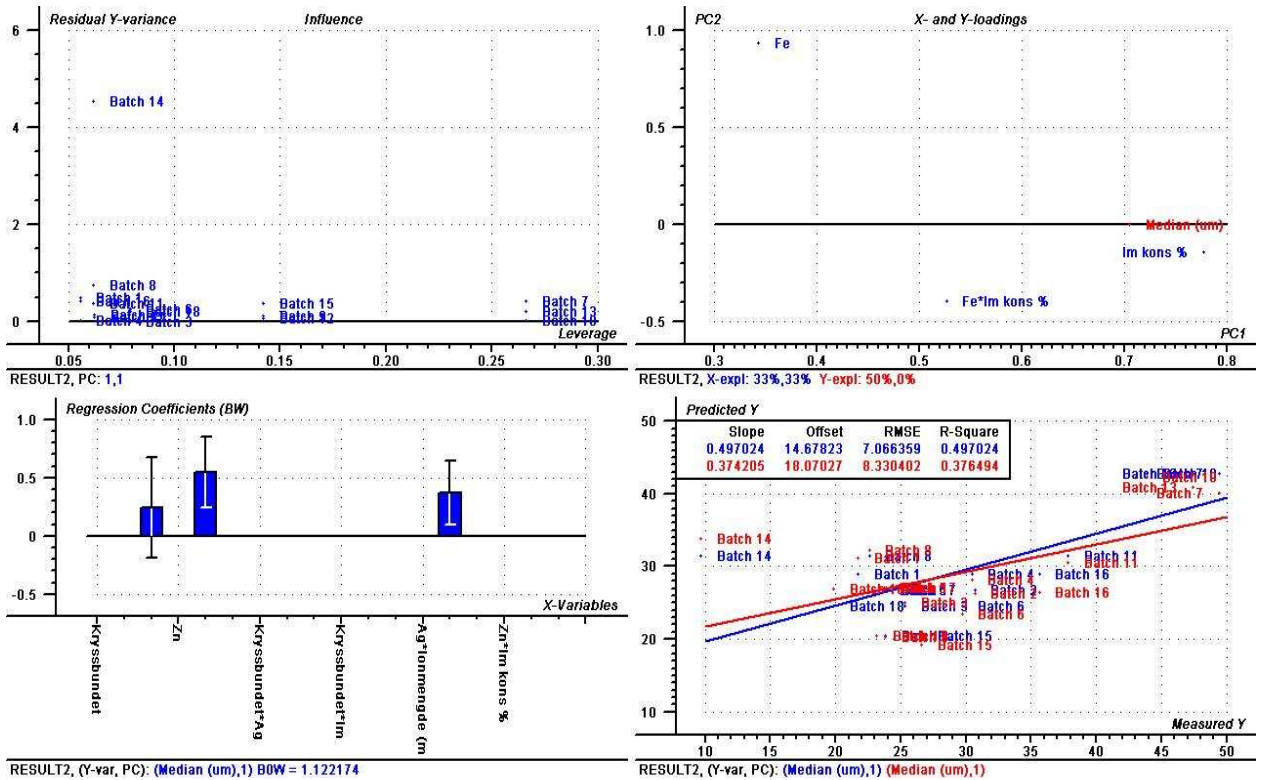
Modellering fra avsnitt 6.9.1 "Modellering på ionemengde som respons"



Modellering fra 6.10.3 "Modellering på partikkelstørrelse"



Forklart varians plott fra PCA på størrelsesmål



Modellering på designvariabler og partikkelstørrelse (Median)