

**Utvikling og karakterisering av faste dispersjoner  
med kurkumin til fotodynamisk terapi av  
bakterieinfeksjoner (aPDT)**

**Kristine Opsvik Wikene**



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Vår 2013



Masteroppgave i galenisk farmasi

# Utvikling og karakterisering av faste dispersjoner med kurkumin til fotodynamisk terapi av bakterieinfeksjoner (aPDT)

Kristine Opsvik Wikene

Veiledere:

Professor Hanne Hjorth Tønnesen, Avdeling for farmasi, UiO

Post doc. Anne Bee Hegge, Avdeling for farmasi, UiO

Ph.D. Ellen Bruzell, NIOM a/s

Masteroppgaven inngår som en del av et større samarbeidsprosjekt som er finansiert av Norges Forskningsråd: *Cancer and antimicrobial photodynamic therapy: Development of nanostructured drug formulations*. Prosjektet ledes av forskningsgruppen *PharmaLuxLab* ved Farmasøytisk institutt, i samarbeid med Radiumhospitalet – Montebello, Nordisk Institutt for Odontologiske Materialer a/s (NIOM a/s) – Ullevål, NovaMatrix – Sandvika, University of Iceland – Island, University of Insubria at Como – Italia, og Biologisk institutt ved Universitetet i Oslo.

Masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasi på Farmasøytisk institutt på Universitetet i Oslo og ved NIOM a/s i perioden mai 2012 til mai 2013.

© Kristine Opsvik Wikene

2013

Utvikling og karakterisering av faste dispersjoner med kurkumin til fotodynamisk terapi av bakterieinfeksjoner (aPDT)

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo, Oslo, Norge

## Sammendrag

Antibiotikaresistens er et økende problem verden rundt. Fotodynamisk terapi (PDT) av bakterieinfeksjoner omgår de tradisjonelle mekanismene for resistensutvikling [1], og ingen resistens mot PDT hos bakterier er foreløpig observert [2]. Kurkumin undersøkes som en potensiell fotosensibilisator til antimikrobiell fotodynamisk terapi (aPDT). Det terapeutiske potensialet til kurkumin er begrenset av dårlig vannløselighet og følsomhet for hydrolytisk og fotolytisk degradering, samt begrenset fototoksisitet mot Gram-negative bakterier [3-10]. Økning av kurkumins løselighet i vandig medium kan oppnås ved å formulere amorf kurkumin med mer hydrofile hjelpestoffer som helt eller delvis omslutter det hydrofobe molekylet og beskytter det mot det vandige miljøet. Dannelse av overmettede løsninger med kurkumin har blitt studert som en faktor som kan bedre den fototoksiske effekten kurkumin har i vandig miljø. I en overmettet løsning med kurkumin inneholder oppløsningen mer løst kurkumin i en viss tidsperiode enn den kunne inneholdt under normale forhold. Ulike overmettede løsninger med kurkumin har tidligere vist god fototoksisitet mot Gram-positive bakterier og noen Gram-negative bakterier [6, 7, 10, 11]. Utvikling og karakterisering av fire ulike faste dispersjoner som kan danne overmettede løsninger med kurkumin ved hydrering ble utført. Dispersjonene bør ha god termisk og fysisk stabilitet og høy fototoksisk effekt. Faste dispersjoner ble laget ved frysetørring av kurkumin med to ulike konsentrasjoner av metyl- $\beta$ -cyclodekstrin (M $\beta$ CD). En lav konsentrasjon av polymer, hyaluronsyre (HA) eller hydroksypropyl metylcellulose (HPMC), ble tilsatt løsningene med kurkumin og M $\beta$ CD rett før frysetørring. Resultatet var porøse, amorfe produkter som løste seg raskt ved kontakt med vann og dannet overmettede løsninger av kurkumin etter oppløsning i buffer. Produktene beholdt den opprinnelige amorfe strukturen ved lagring både ved romtemperatur og ved 40 °C, og ved bestråling til 22 540 kJ/m<sup>2</sup> (300-800 nm) som tilsvarer 1,2 millioner luxtimer i henhold til ICH Guideline [81]. Produktet med HA og lavest konsentrasjon M $\beta$ CD dannet en svært ustabil overmettet løsning som raskt felte ut etter oppløsning i fosfatbuffer. Dette produktet ble følgelig ikke inkludert i forsøk på fototoksisitet. Produktet med HA og høyest konsentrasjon M $\beta$ CD viste god fototoksisk effekt på *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*; ~0,5 % bakterieoverlevelse med kurkuminkonsentrasjonene 5  $\mu$ M – 25  $\mu$ M

og lysdose  $11 \text{ J/cm}^2$  (blått lys)). Produktene med HPMC viste utmerket effekt på *E. faecalis* i alle kurkuminkonsentrasjoner testet (ingen overlevende bakterier med kurkuminkonsentrasjonene  $0,5 \text{ }\mu\text{M}$  –  $25 \text{ }\mu\text{M}$ ) med lysdose  $11 \text{ J/cm}^2$  (blått lys). Produktene med HPMC ble også testet på *Escherichia coli* (*E. coli*) med god fototoksisk effekt; ingen overlevende bakterier med kurkuminkonsentrasjonene  $5 \text{ }\mu\text{M}$  –  $25 \text{ }\mu\text{M}$  og lysdose  $32 \text{ J/cm}^2$  (blått lys). Produktet med HA og høyest konsentrasjon M $\beta$ CD og HPMC-produktene er meget lovende til bruk i aPDT og bør undersøkes videre.

## **Forord**

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, og ved Nordisk Institutt for Odontologiske Materialer a/s (NIOM a/s) i perioden mai 2012 – mai 2013. Masteroppgaven ble skrevet under veiledning av professor Hanne Hjorth Tønnesen, post doc. Anne Bee Hegge og dr. scient. Ellen Bruzell.

En stor takk rettes til mine veiledere for en spennende og lærerik masteroppgave. Dere har gitt meg gode kritiske tilbakemeldinger på arbeidet og mulighet til å arbeide selvstendig, hvilket jeg har lært svært mye av. Faglige diskusjoner, veiledning i praktisk arbeid på laboratoriet og alltid en åpen dør har jeg satt stor pris på. Jeg vil også takke Ivar Grove for mange interessante diskusjoner rundt analysemetoder, teknikker og kjemi, Tina Riise Tuveng for rådgivning på laboratoriet ved oppstart med oppgaven og Inger-Sofie Dragland for veiledning på bakterielaboratoriet. Arbeidet på avdelingen og på NIOM a/s for *PharmaLuxLab* med så flotte folk rundt meg har gjort perioden utrolig trivelig, og har i aller høyeste grad gitt mersmak.

Til slutt vil jeg takke familie, samboer og venner for faglige og ikke-faglige diskusjoner, tålmodighet og forståelse for mine lange arbeidsdager og interne idemyldring på kvelds- og nattestid.

Oslo, 15. mai 2013

Kristine Opsvik Wikene





## Forkortelser

CD	Cyklodekstrin
CFU	Kolonidannende enheter
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EC	Etylcellulose
EtOH	Etanol
HA	Hyaluronsyre
HP $\beta$ CD	Hydroksypropyl-beta-cyklodekstrin
HP $\gamma$ CD	Hydroksypropyl-gamma-cyklodekstrin
HPLC	Høytrykksvæskekromatografi
HPMC	Hydroksypropyl metylcellulose
IC	«Internal conversion»
ISC	«Intersystem crossing»
LOD	Deteksjonsgrense
LOQ	Kvantifiseringsgrense
M $\beta$ CD	Metyl-beta-cyklodekstrin
MeOH	Metanol
MQ-vann	Milli Q-vann
PBS	Fosfatbufret saltvann
PS	Fotosensibilisator
rhVEGF	Rekombinant human vaskulær endotel vekstfaktor
RM $\beta$ CD	«Randomly methylated» beta-cyklodekstrin
rpm	Rotasjoner per minutt
RSD	Relativt standardavvik
SBE $\beta$ CD	Sulfobutyleter-beta-cyklodekstrin
SD	Standardavvik
TSB	Trypton soya næringsmedium
UV	Ultrafiolett
VIS	Synlig
VR	«Vibrational relaxation»

(1:X-HA) Frysetørret produkt med molforhold 1:X mellom kurkumin og M $\beta$ CD, der X er 1 eller 3, med 0,1 % (w/v) HA.

(1:X-HPMC) Frysetørret produkt med molforhold 1:X mellom kurkumin og M $\beta$ CD, der X er 1 eller 3, med 0,1 % (w/v) HPMC.



# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>1</b>
<b>Forord</b> .....	<b>3</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>5</b>
<b>Hensikt</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>13</b>
1.1. Fotokjemi og fotodynamisk terapi .....	13
1.1.1. Type I- og Type II-reaksjoner .....	14
1.1.2. Antimikrobiell fotodynamisk terapi .....	16
1.2. Kurkumin .....	18
1.2.1. Forekomst og bruk av kurkumin .....	18
1.2.2. Fysikalsk-kjemiske og fotokjemiske egenskaper .....	18
1.2.3. Kurkumin som fotosensibilisator.....	20
1.3. Overmetning.....	21
1.4. Formulering.....	23
1.4.1. Cyklodekstriner .....	24
1.4.1.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til M $\beta$ CD.....	25
1.4.1.2. Farmasøytisk bruk av cyklodekstriner .....	26
1.4.1.3. Inklusjonskompleksring .....	26
1.4.1.4. Støkiometri ved kurkumin-cyklodekstrin-inklusionskompleksring.....	27
1.4.1.5. Selvassosiering og dannelse av ikke-inklusionskomplekser.....	28
1.4.1.6. Funksjon i produkter med kurkumin.....	29
1.4.2. Hyaluronsyre .....	29
1.4.2.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HA .....	29
1.4.2.2. Biologiske egenskaper og nye bruksområder .....	30
1.4.2.3. Funksjon i produkter med kurkumin.....	31
1.4.3. Hydroksypropyl metylcellulose.....	32
1.4.3.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HPMC.....	32
1.4.3.2. Farmasøytiske bruksområder .....	33
1.4.3.3. Funksjon i produkter med kurkumin.....	34
<b>2. Materialer og metoder</b> .....	<b>35</b>
2.1. Apparater.....	35
2.2. Råvarer og løsemidler .....	37

2.2.1.	Råvarer.....	37
2.2.2.	Løsemidler .....	38
2.3.	Annet utstyr .....	39
2.4.	Validering av HPLC-metode.....	41
2.4.1.	HPLC instrumentering.....	41
2.4.2.	Systemets egnethet .....	41
2.4.3.	Tillaging av standardløsninger .....	41
2.4.4.	Kromatografiske betingelser.....	42
2.4.5.	Spesifisitet .....	42
2.4.6.	Linearitet.....	42
2.4.7.	Presisjon.....	43
2.4.8.	Nøyaktighet .....	43
2.4.9.	Deteksjonsgrense .....	44
2.4.10.	Kvantifiseringsgrense .....	44
2.4.11.	Kvantifiseringsområde.....	45
2.5.	Faseløselighet .....	45
2.6.	Ristetid .....	46
2.7.	Tillaging av produkter .....	46
2.8.	Karakterisering av ferske produkter .....	48
2.8.1.	Vanninnhold .....	48
2.8.2.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	48
2.9.	Svinn under produksjon .....	48
2.10.	Hydreringstid .....	49
2.11.	Absorpsjonsspektra.....	49
2.12.	Fotostabilitet .....	49
2.12.1.	Vanninnhold .....	50
2.12.2.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	51
2.12.3.	Absorpsjonsmåling av bestrålte prøver .....	51
2.12.4.	Fluorescens spektroskopi.....	51
2.13.	Akselerert holdbarhet .....	52
2.13.1.	Vanninnhold .....	52
2.13.2.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	52
2.13.3.	Absorpsjonsmåling .....	52

2.14.	Generell holdbarhet .....	53
2.14.1.	Vanninnhold .....	53
2.14.2.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	53
2.15.	Differential Scanning Calorimetry .....	53
2.16.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer) .....	54
2.17.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer) .....	54
2.18.	Bakterieinaktiveringsforsøk.....	54
2.18.1.	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	54
2.18.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	55
<b>3.</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>57</b>
3.1.	Validering av HPLC-metode.....	57
3.1.1.	Systemets egnethet .....	57
3.1.2.	Spesifisitet .....	58
3.1.3.	Linearitet.....	59
3.1.4.	Presisjon.....	60
3.1.5.	Nøyaktighet .....	61
3.1.6.	Deteksjonsgrense .....	62
3.1.7.	Kvantifiseringsgrense .....	62
3.1.8.	Kvantifiseringsmråde.....	63
3.2.	Faseløselighet .....	64
3.3.	Ristetid .....	65
3.4.	Karakterisering av ferske produkter .....	66
3.4.1.	Vanninnhold .....	66
3.4.2.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	66
3.5.	Svinn under produksjon .....	66
3.6.	Hydreringstid.....	68
3.7.	Absorpsjonsspektra .....	69
3.8.	Fotostabilitet.....	71
3.8.1.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	72
3.8.2.	Absorpsjonsmåling av bestrålte prøver .....	74
3.8.3.	Fluorescensspektroskopi.....	76
3.9.	Akselerert holdbarhet .....	79
3.9.1.	Kvantifisering av kurkumininnhold.....	79

3.9.2.	Absorpsjonsmåling .....	81
3.10.	Generell holdbarhet .....	82
3.11.	Differential Scanning Calorimetry .....	84
3.12.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer) .....	87
3.13.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer) .....	90
3.14.	Bakterieinaktiveringsforsøk.....	92
3.14.1.	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	92
3.14.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	92
<b>4.</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>94</b>
4.1.	Faseløselighet .....	94
4.2.	Frysetørrete produkter .....	96
4.3.	Frysetørrete produkter i løsning .....	97
4.3.1.	Hydrering .....	97
4.3.2.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer) .....	98
4.3.3.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer) .....	100
4.4.	Fotostabilitet.....	104
4.5.	Holdbarhet .....	106
4.6.	Bakterieinaktiveringsforsøk .....	106
4.6.1.	Fototoksisitet på <i>E. faecalis</i> .....	107
4.6.2.	Fototoksisitet på <i>E. coli</i> .....	109
<b>5.</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Veien videre .....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Referanseliste.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Vedlegg.....</b>	<b>119</b>
7.1.	Faseløselighet .....	119
7.2.	Ristetid .....	119
7.3.	Svinn under produksjon .....	120
7.4.	Absorpsjonsspektra .....	120
7.6.	Akselerert holdbarhet .....	123
7.7.	Differential Scanning Calorimetry .....	124
7.8.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer).....	127
7.9.	Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer).....	129

## **Hensikt**

Antibiotika som penicilliner, tetrasykliner og makrolider utgjør de vanligste legemidlene ved behandling av både lokale og systemiske bakterieinfeksjoner i dag. Til tross for mye forskning og utvikling av flere antibiotika etter oppdagelsen av penicillinet i 1929 av Sir Alexander Flemming, er resistensutvikling et økende problem [12]. Fotodynamisk terapi (PDT) med kurkumin som fotosensibilisator (PS) i overmettede løsninger har vist gode antibakterielle effekter på flere typer bakterier [6-8, 11, 13]. Denne masteroppgaven har som hensikt å formulere, karakterisere og optimalisere topikale formuleringer av kurkumin basert på metyl- $\beta$ -cyklodekstrin (M $\beta$ CD) og en polymer, her valgt hyaluronsyre (HA) og hydroksypropyl metylcellulose (HPMC). Dette ble gjort ved å optimalisere produksjonsprosessen for å gi høyt innhold av kurkumin, studere interaksjoner mellom kurkumin og hjelpestoffene, vurdere fotostabilitet og termisk stabilitet, og å undersøke den fotodynamiske effekten av kurkumin i utvalgte formuleringer på bakterier.



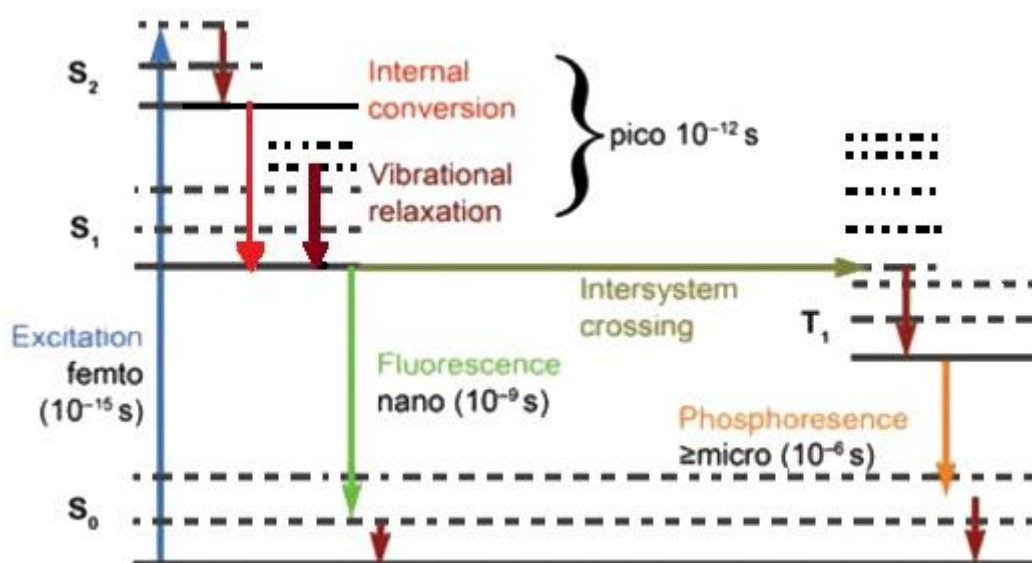


# 1. Innledning

## 1.1. Fotokjemi og fotodynamisk terapi

Fotodynamisk terapi (PDT) er en form for lysbehandling som forutsetter at tre elementer er til stede: et lysabsorberende molekyl, lys med bølgelengder som molekylet kan absorbere og oksygen. Resultatet kan være dannelsen av toksiske forbindelser som reaktive oksygenforbindelser (ROS), radikaler og fotoprodukter [14]. PDT benyttes i dag mot en rekke tilstander: akne, blærekreft, kolonkreft, humant papillomavirus og forstadier til lesjoner i livmorhalsen [15], og aldersrelatert makuladegenerasjon [16].

Forutsetningen for en fotoreaksjon er at fotonenergien som blir absorbert tilsvarer forskjellen i to elektronnivåer («fotokjemis første lov»), som kan forklares ut fra et såkalt Jablonskidiagram (Figur 1.1) [17].



**Figur 1.1** – Jablonskidiagram som viser reaksjonstidene til de forskjellige prosessene som kan skje etter absorpsjon av fotonenergi (fritt fra [17]).

Jablonskidiagrammet viser de fotofysiske prosessene som kan forekomme ved absorpsjon av fotoner av et atom eller molekyl (Figur 1.1). De horisontale linjene representerer elektronnivåer med ulik energi; de striplete, horisontale linjene er elektronenes ulike vibrasjonsnivåer;  $S_{0,2}$  er singlettilstander og representerer molekylære orbitaler;  $T_1$  angir første

tripletttilstand [17]. Etter absorpsjon av fotonenergi eksiteres et valenselektron i et atom eller molekyl til en tilstand tilsvarende energien som ble absorbert: Dette kan være første, andre eller en høyere eksitert tilstand. Dersom den absorberte energien svarer til en høyere eksitert tilstand enn første, eller høyere vibrasjonsnivåer, antas det at noe energi frigjøres og elektronet faller ned til den første eksiterte tilstanden,  $S_1$ , via «vibrational relaxation» (VR) til elektronnivået under og/eller «internal conversion» (IC) til  $S_1$  [17]. Fra den eksiterte tilstanden med anti-parallell elektronspin kan energi frigjøres i form av varme eller fluorescens når elektronet faller tilbake til grunntilstanden,  $S_0$ . Energien til det emitterte fotonet er alltid mindre enn energien til det absorberte fotonet; derav forskyvning av emisjonsspektra til lengre bølgelengder enn de respektive absorpsjonsspektra («Stoke's skift»). Ellers er emisjonsspektra generelt speilbilder av molekylets absorpsjonsspekter [17].

Fra  $S_1$  kan elektroner gå over til en trippletttilstand,  $T_1$ , via «intersystem crossing» (ISC). Dette er et elektronnivå med litt mindre energi enn singletttilstanden, og med parallell elektronspin. Prosessen kalles derfor en forbudt spin-prosess. Herfra kan mer energi absorberes og elektronet eksiteres til ulike vibrasjonsnivåer og eksiterte tilstander som i singletttilstanden. Som en forbudt spin-prosess er prosessen og levetiden lengre enn singlett-prosessene. Dette innebærer at flere hendelser oftere inngår enn kun emisjon: emisjon fra  $T_1$  kalt fosforescens som også er en forbudt spin-prosess, eller deaktivering ved kollisjon med andre molekyler, ofte assosiert med fotokjemiske reaksjoner [17].

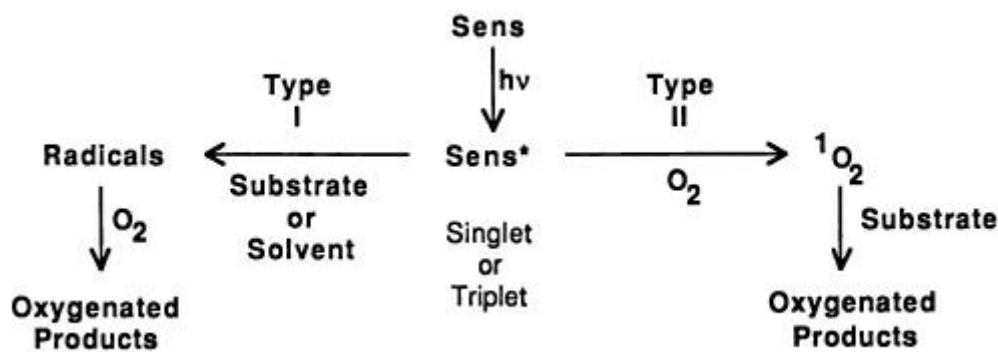
### **1.1.1. Type I- og Type II-reaksjoner**

Fra  $T_1$  kan en fotosensibilisator (PS) reagere via to fotoreaksjoner, Type I og Type II, hvorav den ene krever oksygen. I Type I-reaksjonen reagerer et substrat eller solventen med den eksiterte PS og danner radikaler ved overføring av et hydrogenatom eller et elektron. Radikalet reagerer raskt med oksygen hvis dette er til stede, og danner oksygenerte forbindelser (Figur 1.2). Oksygenradikalene som dannes er reaktive og vil reagere med nærliggende molekyler og således fortsette en kjedereaksjon. Dersom oksygen ikke er til stede vil det dannede radikalet kunne rekombineres, dimerisere eller på andre måter prøve å stabilisere seg [18, 19]. Et eksempel på en Type I-reaksjon er flavin-sensibilisert

fotodegradering av metionin, som resulterer i deaminering og dekarboksylering av metionin, flavin i grunntilstanden og hydrogenperoksid [20].

Type II-reaksjonen er en fotooksidasjonsprosess der energi overføres fra PS i triplettilstand til oksygen i grunntilstand (triplet,  $^3\text{O}_2$ ) og danner singlet oksygen ( $^1\text{O}_2$ ) (Figur 1.2).  $^1\text{O}_2$  har nå samme elektronspin som andre molekyler i grunntilstand og oksiderer raskt mange biologiske molekyler som lipider, nukleinsyrer og proteiner som kan føre til dødelige skader på organismen [18, 21]. Kjente reaksjoner er addisjon av  $^1\text{O}_2$  til alkener med allyliske hydrogenatomer (som umettede fettsyrer og kolesterol) slik at det dannes hydroperoksider, addisjon av  $^1\text{O}_2$  til diener i heterosykler (som histidin) slik at det dannes endoperoksider, og reaksjoner mellom  $^1\text{O}_2$  og organiske sulfider (som metionin) med dannelsen av korresponderende sulfoksider [20].

Begge typene reaksjoner kan foregå samtidig i et system på konkurrerende vis, og én prosess kan være dominerende [18].



**Figur 1.2** – Type I og Type II fotokjemisk reaksjon der eksitert fotosensibilisator (Sens\*) enten reagerer med oksygen, subtrat eller solvent og danner oksygenerte produkter [19].

### 1.1.2. Antimikrobiell fotodynamisk terapi

Antibiotikaresistens er et stadig økende problem grunnet utstrakt bruk av antibiotika verden over. Utvikling av resistens hos bakteriene mot flere typer antibiotika, gjør dagens antibiotika mindre effektive.

Antimikrobiell fotodynamisk terapi (aPDT) kombinerer en PS som ikke er mørketoksisk med synlig lys for å danne ROS, frie radikaler og andre fotoprodukter for å drepe mikrobielle celler [2]. ROS som dannes under lysaktivering av PS initierer flere oksidative reaksjoner lokalt, og kan skade bakterienes cellevegg, lipidmembraner, enzymer og nukleinsyrer, som igjen kan føre til bakteriedrap [1]. Den eksakte mekanismen er ikke kjent og varierer fra PS til PS og med oksygentilgang.  $^1\text{O}_2$  diffunderer omtrent 20-150 nm i avhengig av diffusjonsmediet ( $^1\text{O}_2$  kan diffundere lenger i lipidfase enn i vandig miljø), hvilket krever tett assosiasjon mellom PS og target ved lysaktivering [22]. Ettersom  $^1\text{O}_2$  og andre ROS kan angripe flere vitale deler av bakteriene samtidig, antas det at bakteriene ikke klarer å bli resistente mot alle angrepspunktene og føre overlevelsesgenene videre, hvilket gjør aPDT til et svært aktuelt satsningsområde innen infeksjonsbehandling [1]. Om bakterier kan utvikle resistens, for eksempel ved fortykning av celleveggen, oppregulering av antioksidanter eller utvikling av effektive efflux-pumper, har ennå ikke blitt observert, men utelukkes ikke [2].

Lysaktivering av PS som absorberer stråling ved bølgelengder  $< 500$  nm impliserer at aPDT med slike PS er mest aktuelt ved lokaliserte infeksjoner, som behandling av infeksjoner på huden og i munnhulen. Ved systemiske bakterieinfeksjoner bør PS absorbere stråling ved lengre bølgelengder for at strålingen skal kunne penetrere vev dypt nok til å eksitere PS. Aktivering ved hjelp av en lysprobe er mulig for å nå indre organer, men kan vanskelig aktivere en PS i systemkretsløpet som deretter skal nå spredte bakterieinfeksjoner før eksitert PS reagerer med vertsceller eller går tilbake til grunntilstanden uten fotoreaksjoner [1]. Ufullstendig bakteriedrap innebærer at infeksjonen kan blusse opp igjen. Kombinasjon av aPDT med konvensjonell behandling er mulig hvis det antas at infeksjonen har spredd seg utenfor aPDT behandlingens rekkevidde. Lokal lysaktivering er en fordel for de mange aktuelle bruksområdene, da det minimaliserer bivirkninger utenfor applikasjonsområdet. I tillegg til dannelsen av ROS og andre oksygenerte produkter er det to etterfølgende mekanismer som er foreslått å være avgjørende for inaktivering av bakteriene: i) DNA-skade og skade på cellemembranen som resulterer i lekkasje av cellens innhold eller ii) inaktivering

av enzymer og transportsystemer i membranen, for eksempel ved oksidering av proteiner, aminosyrer, eller nukleinsyrer for genekspressjon [1]. Lokalisering av target og PS, spekteret til lyskilden, penetrasjonsevnen til strålingen i infeksjonsområdet og bakterietype er faktorer som avgjør graden av fototoksisk effekt av en bestemt PS.

Gram-positive bakterier er generelt mer følsomme overfor aPDT enn Gram-negative bakterier grunnet forskjellig interaksjon mellom PS og bakteriens cellemembran. Gram-positive bakterier har et relativt porøst lag av peptidoglykan og lipoteikoinsyre utenfor cellemembranen [23] som gjør at PS under en viss størrelse både kan adherere, bindes og passere inn i cytoplasma og bindes til cellebestanddeler. Gram-negative bakterier, derimot, har en mer impermeabel overflate bestående av en indre og ytre cellemembran, og periplasma med peptidoglykan mellom membranene [23]. Hamblin *et. al* (2004) har beskrevet ulike studier der effekten av PS på Gram-negative bakterier er undersøkt: Det er mulig at  $^1\text{O}_2$  kan penetrere cellemembraner og således reagere som beskrevet tidligere [1]. Det er antatt at PS som reagerer hovedsakelig via Type I-mekanismer må penetrere cellemembranen til Gram-negative bakterier for å føre til bakteriedrap, mens PS som reagerer via Type II-mekanismer ikke behøver å penetrere cellemembranen siden det viser seg at Type II-reaksjoner er mer effektive enn Type I mot Gram-negative bakterier [1].

Det er viktig at PS kan inaktivere og drepe både Gram-negative og Gram-positive bakterier. Bred antibakteriell fototoksisk effekt impliserer at PS kan brukes mot infeksjoner med flere typer bakterier. Fototoksisitet overfor ulike bakterier varierer med type PS, konsentrasjon, formulering og lysdose. Positivt ladede PS foretrekkes i aPDT for å få en bredere fototoksisk effekt mot både Gram-negative og Gram-positive bakterier. Slike PS kan interagere/penetrere den negativt ladede bakterieoverflaten bedre enn nøytrale eller negativt ladede PS [1]. Dersom PS ikke har kationiske egenskaper i seg selv, kan PS konjugeres med kationiske molekyler eller inkorporeres i positivt ladede bærere og på denne måten penetrere eller assosieres tettere med den negativt ladede overflaten til bakteriene [1]. Fargestoffet kurkumin er uladet ved nøytral og sur pH, men har likevel vist utmerket fototoksisk effekt på *Escherichia coli* (*E. coli*) i optimaliserte bærersystemer [6, 13].

## 1.2. Kurkumin

### 1.2.1. Forekomst og bruk av kurkumin

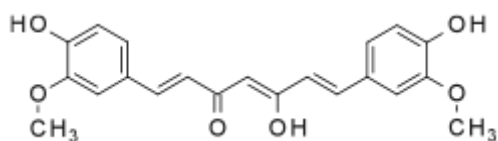
Kurkumin er en komponent i krydderet gurkemeie, en viktig bestanddel i indisk og arabisk matkultur, som kommer fra tørket og finpulverisert rot av *Curcuma longa* L. [10]. *Curcuma longa* L. regnes som en medisinsplante og har blitt brukt i tradisjonell folkemedisin i India i tusenvis av år. India er også verdens største konsument av planten. [10]. I Kina og sør-østlige deler av Asia har planten lenge vært brukt som smakstilsetning, konserveringsmiddel og fargestoff [24]. Planten har også blitt brukt til behandling av inflammasjonstilstander [25], sår, luftveissykdommer, leversykdommer og leddsykdommer [26].

Kommersielt tilgjengelig kurkumin består av en blanding av tre kurkuminoider: kurkumin, demetoksy- og bisdemetoksykurkumin, hvorav de to sistnevnte utgjør opptil 30 % av innholdet i produkter merket «ren kurkumin» [27]. Kurkumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-metoksyfenyl)-1,6-diene-3,5-dion) består av to konjugerte elektronsystemer som absorberer lys og gir pulveret sin karakteristiske gul-oransje farge [10]. En rekke og svært ulike effekter er studert og registrert for kurkumin: Antimikrobiell effekt, anti-apoptotisk, antiinflammatorisk [28], kolesterolsenkende [29], antikoagulerende [30], antitumor [31], antikarsinogen [32] med flere [24]. Flere kliniske studier pågår per i dag (13.03.13) med kurkumin mot atopisk astma, ulike kreftformer med og uten metastaser, strålingsindusert dermatitt, Alzheimer, osteoartritt med flere [33]. Kurkumin i konsentrasjoner som ikke er toksiske uten lys gir også antibakterielle effekt mot flere bakterier i kombinasjon med lys [10].

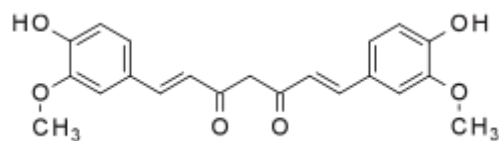
### 1.2.2. Fysikalsk-kjemiske og fotokjemiske egenskaper

Til tross for at interessen for kurkumin som et potensielt legemiddel og som PS i PDT er stadig økende, er bruken av denne forbindelsen innviklet grunnet dårlig vannløselighet og dårlig stabilitet i løsning. Den dårlige vannløseligheten kan forklare hvorfor kurkumin er svært lite toksisk ved oralt inntak, med en anbefalt øvre grense på 12 g/dag. Lite tas opp fra tarmen, og biotilgjengelig kurkumin metaboliseres og elimineres raskt [25, 34]. Tidligere studier har vist at kurkumin har svært dårlig løselighet i vann ved pH < 7 og at løseligheten bedres i alkaliske løsningsmidler, men at den hydrolytiske stabiliteten ved pH > 7 er dårlig.

En reduksjon i pH fra 7,5 til 6,0 har vist en reduksjon i hydrolytisk degraderings hastighet med en faktor  $10^3$  [4].



**Figur 1.3** – Kurkumin i enol-form



**Figur 1.4** – Kurkumin i keto-form

$\beta$ -diketon-strukturen kan gjennomgå tautomerisering i løsnings mellom enol- og ketostrukturer, avhengig av løsemiddelet (Figur 1.3 og 1.4) [35]. En økning i løsningsmiddelets polaritet forskyver keto  $\leftrightarrow$  enol likevekten mot enol-formen [35] og systemet går mot en konjugering av  $\pi$ -elektronssystemene til de to feruloyl-kromoforene [36]. Kurkumin,  $C_{21}H_{20}O_6$ , foreligger primært i enol-form i løsnings (Figur 1.3) [37]. I enol-formen har molekylet tre ioniserbare protoner, en fra hver av de fenoliske OH-gruppene og den tredje fra enolen, med  $pK_a$ -verdier mellom  $\sim 7,7$ - $10,7$  avhengig av løsemiddel og metode [36]. Dette innebærer at kurkumin i løsnings vil være på sin mest nøytrale form ved pH 7,4 [36].

Kurkumin er lett oppløselig i alkoholer, men er også mer fotolabil i løsnings enn som fast stoff. De fotokjemiske egenskapene til kurkumin avhenger av polariteten av mediet, som således påvirker evnen til å danne fototoksiske forbindelser [37, 38]. Kurkumin har absorpsjonsmaksimum mellom 408-430 nm, det vil si i blått lys. Absorpsjonsmaksimum avhenger av løsningsmiddelet, og forskyves mot lengre bølgelengder i mer polart medium med flere hydrogenbindingsakseptorer og -donorer [36]. Fluorescensmaksimum varierer tilsvarende avhengig av løsningsmiddelet, mellom 494-538 nm i aprotiske løsningsmidler og mellom 535-560 nm i protiske løsningsmidler, avhengig av løsningsmiddelets evne til å påvirke intra- og intermolekylære hydrogenbindinger for kurkumin [37].

Enol-formen er forbundet med en kraftig intramolekylær hydrogenbinding [39] som påvirker de fotokjemiske egenskapene til kurkumin. Disse er ennå ikke fullstendig kartlagt, men det ser ut til at eksitert kurkumin destabiliseres når den intramolekylære hydrogenbindingen i keto-enol-delen forstyrres av intermolekylære hydrogenbindinger mellom kurkuminmolekyler og polare løsningsmidler [35]. Da tettere intramolekylær hydrogenbinding fremmer intramolekylær protonoverføring i eksitert tilstand (ESIPT), blir ESIPT-hastigheten tregere jo svakere den intramolekylære hydrogenbindingen mellom enol- og ketoenheten er [35].

En oversikt over de fysikalsk-kjemiske og fotokjemiske egenskapene til kurkumin er gitt i Tabell 1.1.

<b>Kurkumin</b>	
IUPAC-navn:	1,7-bis(4-hydroxy-3-metoksyfenyl)-1,6-diene-3,5-dion [40]
Molekylformel:	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> [40]
Molekylvekt:	368,38 g/mol [40]
Farge:	Gul-oransje pulver [40]
Løselighet:	~0,03 µM i vann ved pH < 7 [3]. Løselig i alkohol og iseddik; gir brun-rød farge i baser og lys gul farge i syrer [40]
pKa:	~7,7-10,7 avhengig av eksperimentelle parametre (tre ioniserbare protoner) [36]
Smeltepunkt:	183 °C [40]
Hydrolytisk stabilitet:	T <sub>1/2</sub> 1,32 – 276 min ved pH > 7 [41]
Absorpsjonsmaksimum:	~420 nm, ~430-434 nm i protiske løsningsmidler, ~423-428 nm i metanol [36]
Fluorescensmaksimum:	~494-538 nm i aprotiske løsningsmidler, ~535-560 nm i protiske løsningsmidler [36]
Fotostabilitet:	Fotolabil [5]

**Tabell 1.1** – Fysikalsk-kjemiske og fotokjemiske egenskaper til kurkumin.

### 1.2.3. Kurkumin som fotosensibilisator

Den ideelle PS skal være lett og rimelig å syntetisere, ha høy kjemisk renhet, ikke være mørketoksisk, skal nå og distribueres selektivt i målceller eller -bakterier, akkumuleres raskt i tumor/bakterie, har kort halveringstid i normalt vev, ha høy absorpsjonskoeffisient, absorbere stråling ved bølgelengder som penetrerer normalvev ned til target dersom target ikke er overflattisk, og danne store mengder fototoksiske produkter [42].



Kurkumin har flere av disse gunstige egenskapene. Kurkumin kan enkelt syntetiseres med høy kjemisk renhet [43]; opptak i både kreftceller og flere bakterier er effektivt, og lite akkumulerer i friskt vev sammenlignet med tumorvev [36]; den fototoksiske effekten er signifikant både i ulike celletyper og i bakterier selv ved lave konsentrasjoner og lysdoser, og fototoksisiteten er konsentrasjonsavhengig [9, 44]; kurkumin er ikke toksisk verken for tumorvev, normalvev eller bakterier uten lys i de konsentrasjonene som behøves for fototoksisitet [9, 10, 44]; kurkumin har sitt absorpsjonsmaksimum i synlig lys, slik at bruk av skadelig UV-stråling kan unngås, med relativt høy molar absorptans ( $\epsilon \sim 20\,000 - 50\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) avhengig av løsningsmiddelet [36]. Ulempen med kurkumin som PS er at molekylet absorberer  $< 500 \text{ nm}$ , hvilket har forholdsvis lav penetrasjonsevne i vev. Dette begrenser likevel ikke bruken i aPDT ved overflatiske bakterieinfeksjoner der strålingen ikke behøver å trenge gjennom flere lag vev for å nå målet.

Fototoksisisk effekt av kurkumin på bakterier har blitt studert gjentatte ganger og gode resultater er beskrevet [6, 7, 10, 13]. Dahl *et al.* (1989) studerte mekanismen bak den fototoksiske effekten til kurkumin på flere bakterier, og fant ut at binding av kurkumin til celleoverflaten ikke var nødvendig for fototoksisitet [10]. Dette indikerer at de reaktive forbindelsene som dannes er relativt langlivede, slik at de kan diffundere mot target og assosieres før det reagerer. Hydrogenperoksid er en relativt langlivet oksygenforbindelse og er trolig involvert, mens  $^1\text{O}_2$  er svært reaktiv og kortlivet i vandig medium [10]. Haukvik *et al.* (2009) detekterte kun dannelse av veldig små mengder  $^1\text{O}_2$  etter bestråling av ulike kurkuminprodukter ( $25 \mu\text{M}$ ) [6]. Dette utelukker likevel ikke dannelsen av  $^1\text{O}_2$  ved fotoaktivering av kurkumin.

### 1.3. Overmetning

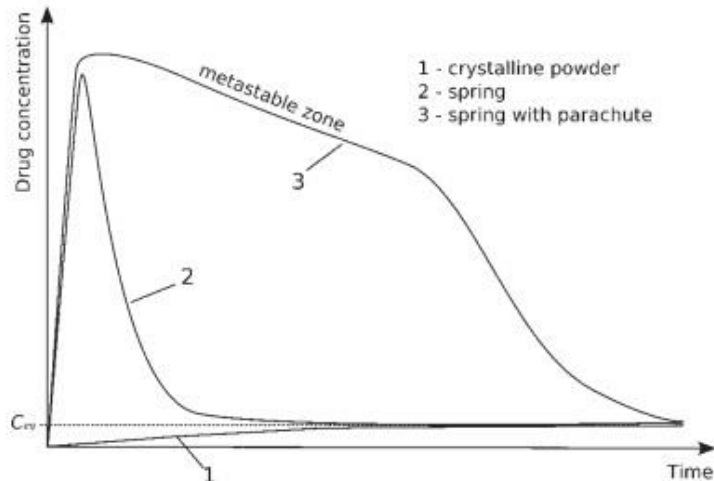
En overmettet løsning inneholder mer løst stoff enn en mettet løsning, der det er likevekt mellom løst og fast stoff. Graden av overmetning beregnes ved å sammenligne konsentrasjonen av et stoff i løsningen med konsentrasjonen av stoffet i det samme mediet ved likevekt [45]. Slike løsninger er termodynamisk ustabile og har en tendens til å gå tilbake til likevekten som tilsvarer en mettet løsning ved å felle ut den mengden stoff som er over

likevektskonsentrasjonen [45]. Hvis man klarer å stabilisere denne overmettede tilstanden lenge nok, kan det føre til at oppløst stoff får nok tid til å absorberes for eksempel over en membran i gastrointestinal traktus før det feller ut og elimineres. Økt absorpsjon fra tarmen kan gi økt biotilgjenglighet, med påfølgende biologisk effekt i kroppen. Tilsvarende gjelder opptak av en PS av bakterier i et bakterieinfisert, fuktig sår på huden eller i munnhulen. Denne effekten kan forklares med Fick's lov om diffusjon [46]:

$$dm/dt = (Dk/h)xAx\Delta C \quad (\text{Likning 1})$$

der  $dm/dt$  er diffusjonshastigheten over membranen,  $D$  er diffusjonskoeffisienten til legemiddelet i membranen,  $k$  er fordelingskoeffisienten til legemiddelet i membranen,  $h$  er membranens tykkelse,  $A$  er tilgjengelig overflateareal og  $\Delta C$  er konsentrasjonsgradienten, det vil si forskjellen i legemiddelkonsentrasjon på utsiden og innsiden av membranen [46]. Jo større konsentrasjonsgradienten er, jo større blir diffusjonshastigheten over membranen med påfølgende høyere biotilgjenglighet. Større konsentrasjonsgradient kan oppnås med overmetning. Konsentrasjonen av legemiddelet blir høyere enn normalt utenfor membranen og mer legemiddel diffunderer over membranen for å utjevne konsentrasjonsforskjellen.

En termodynamisk, overmettet løsning av et legemiddel kan bare dannes fra en høyverdig energiform av legemiddelet (i forhold til krystallformen), eller en annen form som er raskt oppløselig. Dette kalles en «spring» (Figur 1.5) [45]. Som beskrevet over er dette systemet ustabil og oppløst legemiddel har en tendens til å felle ut. For å kunne utnytte de økte konsentrasjonene av et legemiddel man kan få av slike overmettede løsninger, må den økte konsentrasjonen opprettholdes lenge nok til at legemiddelet kan absorberes. Bruk av hjelpestoffer som forsinker aggregering og/eller krystallisering, kalles i denne sammenheng «parachute» (Figur 1.5) [45].



**Figur 1.5** – Illustrasjon av «spring» og «parachute» i overmettede løsninger. Profil 1: oppløsning av den mest stabile, krystallinske formen av et stoff. Profil 2: Oppløsning av en høyenergi «spring»-form av et stoff uten hjelpestoffer som forsinker utfelling. Profil 3: Oppløsning av en høyenergi «spring»-form av et stoff med hjelpestoffer som forsinker utfelling.  $C_{eq}$  representerer løseligheten ved likevekt [45].

I formuleringer med kurkumin er det ønskelig å holde en overmettet løsning stabil lenge nok til at kurkumin adsorberes og/eller absorberes av bakteriene man ønsker å utøve fototoksisk effekt på, eventuelt også i perioden det appliserte produktet bestråles for å danne ROS og andre fototoksiske forbindelser i nærheten av bakteriene.

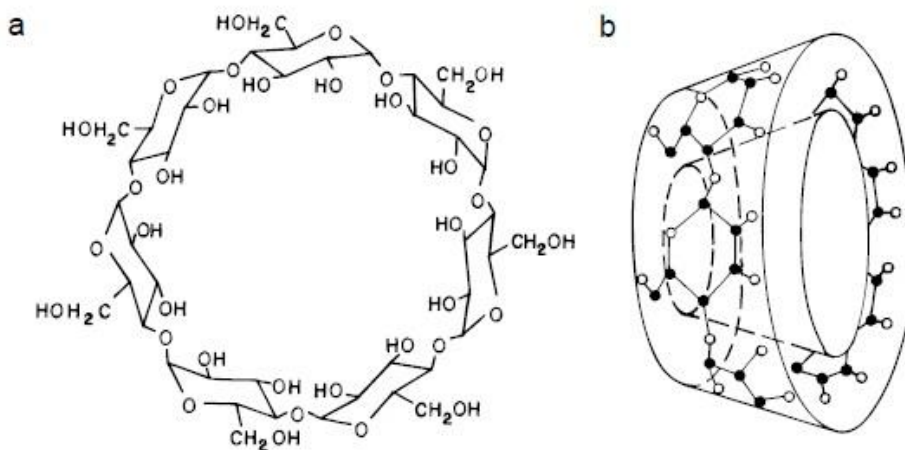
## 1.4. Formulering

Solubilisering og stabilisering er de største utfordringene ved anvendelse av kurkumin som PS i PDT og aPDT. Dannelsen av overmettede systemer som inneholder kurkumin i en form som raskt løses i kontakt med væske i konsentrasjoner over metningskonsentrasjonen, kan signifikant øke biotilgjengeligheten og absorpsjonen av kurkumin. Som tidligere studert, blant andre av Gosangari og Dyakonov (2013), kan ulike hjelpestoffer solubilisere kurkumin slik at det dannes en overmettet løsning med påfølgende høyere biotilgjengelighet [47]. I denne oppgaven var det ønskelig å lage en formulering som danner et overmettet system som holder kurkumin på monomer form lenge nok til optimal dannelse av fototoksiske forbindelser som kan utøve en effekt. Aggregering vil føre til redusert halveringstid i eksitert tilstand og at det

dannes færre fototoksiske produkter [42]. Til dette har et cyclodekstrin blitt benyttet som bærer for å solubilisere kurkumin. Kompleksdannelsen er en likevekt mellom fritt kurkumin og bærer og inkorporert kurkumin i hulrommet i cyclodekstrinet. En polymer tilsettes derfor for økt stabilisering av det overmettede systemet, samt for additiv eller synergistisk solubiliseringseffekt. Produktene frysetørres for å bedre holdbarheten, gjøre de enkle å dosere og for å kunne danne overmettede løsninger på applikasjonsområdet. Frysetørrede produkter oppløses raskt i kontakt med vandig medium, enten de ønskes oppløst før applisering eller løst i et fuktig sår. Oppløsningen av de faste dispersjonene med kurkumin bør gi «burst release» av kurkumin med påfølgende stabil overmetning i en tid tilsvarende perioden etter oppløsning før bestråling, bestrålingstiden og eventuelt også en periode etter bestråling, avhengig av bakterietypen.

### **1.4.1. Cyclodekstriner**

Cyclodekstriner (CD) er sykliske oligosakkarider bestående av  $\alpha$ -D-glykopyranoseenheter [48]. CD kan bestå av ulikt antall glykopyranoseenheter; de mest kjente er  $\alpha$ -CD bestående av seks enheter,  $\beta$ -CD bestående av syv enheter (Figur 1.6), og  $\gamma$ -CD av åtte enheter [49]. På grunn av glykopyranoseenheterenes stolformasjon med manglende fri rotasjon rundt bindingene som knytter dem sammen, danner CD smultring-strukturer med hydrofil overflate og et mer hydrofobt indre [48]. Dette hulrommet inne i CD er delvis okkupert av vannmolekyler i vandig løsning, men da dette er en energetisk ugunstig tilstand (polar-apolar-interaksjoner), kan vannmolekylene lett fortrenkes dersom mindre polare stoffer med rett størrelse tilsettes mediet [49]. Dermed kan CD brukes til å øke den tilsynelatende vannløseligheten til mindre vannløselige molekyler som kurkumin. Ulik substituering av hydroksygruppene, og dermed endring av mulighetene for hydrogenbindinger intra- og intermolekylært, gir ulik grad av vannløselighet; generelt bedre vannløselighet for CD med små substituenten enn for usubstituerte CD [48].



Figur 1.6 – a) Den kjemiske strukturen og b) smultring-formen til  $\beta$ -CD [48].

#### 1.4.1.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til M $\beta$ CD

Metyl- $\beta$ -cyclodekstrin (M $\beta$ CD) er middels store molekyler med både hydrofile og hydrofobe egenskaper. Dette gjør at de både er løselig i vann og i organiske løsningsmidler [50], hvilket er en gunstig egenskap i produksjon av formuleringer med kurkumin. De fysikalsk-kjemiske egenskapene til M $\beta$ CD benyttet her er gitt i Tabell 1.2.

<b>Cavasol ® W7 M / Methyl-<math>\beta</math>-cyclodextrin</b>	
Kjemisk karakterisering:	Cyklodekstrinderivat
Molekylvekt:	1310 g/mol
Utseende:	Hvitt pulver
Løselighet:	800 g/L i vann ved 25 °C
pH:	Ikke aktuelt
Smeltepunkt:	165 – 172 °C [50], 180 – 182 °C [51]
Glasstransisjonstemperatur:	Ikke oppgitt
Tørketap:	Maks 7 %

Tabell 1.2 – Fysikalsk-kjemiske egenskaper til M $\beta$ CD [50, 51].

#### 1.4.1.2. Farmasøytisk bruk av cyclodekstriner

Ved å øke løseligheten til lite vannløselige legemidler, kan man oppnå samme biologiske effekt av en mindre dose, og på denne måten redusere kostnader ved produksjon og bivirkninger *in vivo*. Studier er gjort på formuleringer med CD både for oral, sublingual, nasal, pulmonal, intravenøs, okulær og dermal administrasjon av legemidler som ikke oppnår ønsket legemiddelkonsentrasjon *in vivo*, eller gir ugunstige bivirkninger [52]. CD er allerede inkludert i flere markedsførte legemidler, eksempelvis: HP $\beta$ CD i Sporanox® (Janssen), SBE $\beta$ CD i Vfend® (Pfizer), og HP $\gamma$ CD i Voltaren Ophtha® (Thea Laboratoires) [16].

Overflaten til CD er hydrofil med mange hydrogendonorer og -akseptorer, og de krysser derfor generelt ikke lipofile membraner [52]. Hydrofobe molekyler inkludert i hulrommet til CD kan derimot danne nye interaksjoner med lipofile overflater og membraner, og således frigjøres fra CD. Ved behandling av overflatiske bakterieinfiserte sår er sårflaten dekket av en væske som omringer bakteriene [53]. Ettersom CD øker absorpsjon og penetrasjonsevnen til lipofile legemidler gjennom vandige diffusjonslag [52], kan CD i preparater for sårbehandling bedre kontakten mellom aktivt legemiddel og bakteriene, og således fremme tette interaksjoner og eventuelt opptak av legemiddel i bakteriene. CD har vært inkludert som solubilisator i formuleringer med kurkumin for aPDT tidligere, og vist seg å være gode nanobærere som kan bidra til dannelsen av overmettede løsninger av kurkumin i vandig medium [8, 13]. De gunstige egenskapene vist i disse studiene gir gode indikasjoner på at slike preparater med kurkumin og CD kan brukes i faste dispersjoner for tillaging av overmettede løsninger med kurkumin før applisering på infisert område, eller danne slike oppløsninger *in situ*. Slike produkter kan brukes til behandling av bakterieinfeksjoner og her blande/løse seg raskt i sårvæsken og holde kurkumin på monomerform.

#### 1.4.1.3. Inklusjonskompleksring

Inklusjonskompleksene som dannes mellom et legemiddel (D) og et eller flere CD danner en likevekt i løsning mellom fritt legemiddel og kompleksert:  $CD_x + D \leftrightarrow CD_x:D$  [49].

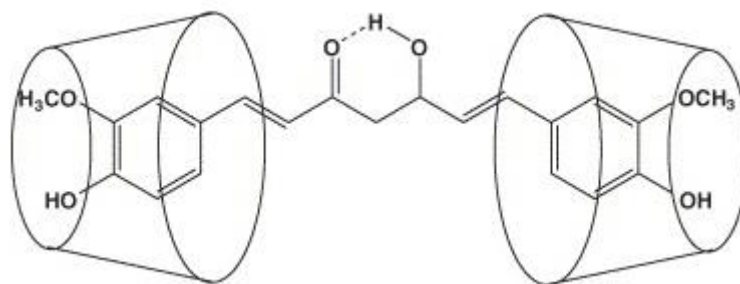
Dannelsen av CD-inklusionskomplekser involverer hovedsakelig uspesifikke, svake bindinger i motsetning til kovalente bindinger [48]. Kompleksring med CD innebærer at løseligheten

til et lipofilt legemiddel kan øke betraktelig; de spektrale egenskapene og reaktiviteten til legemiddelet endres; legemiddelet beskyttes mot miljøet rundt; degraderingshastigheten kan senkes eller øke, eller forbli uendret; CD forsinker også aggregering og utfelling av legemiddelet [49].

Hulrommet i  $\beta$ -CD er  $\sim 0,78$  nm bredt og dypt, med et volum på  $\sim 262$  Å<sup>3</sup> [49], hvilket innebærer at det ikke kan romme molekyler større enn dette. Deler av større molekyler som elektronisk og sterisk passer inn kan likevel inkluderes. Ved inklusjon av slike større molekyler vil flere CD kunne pakke seg rundt molekylet dersom dette er sterisk mulig [54].

#### **1.4.1.4. Støkiometri ved kurkumin-cyklodekstrin-inklusionskompleksring**

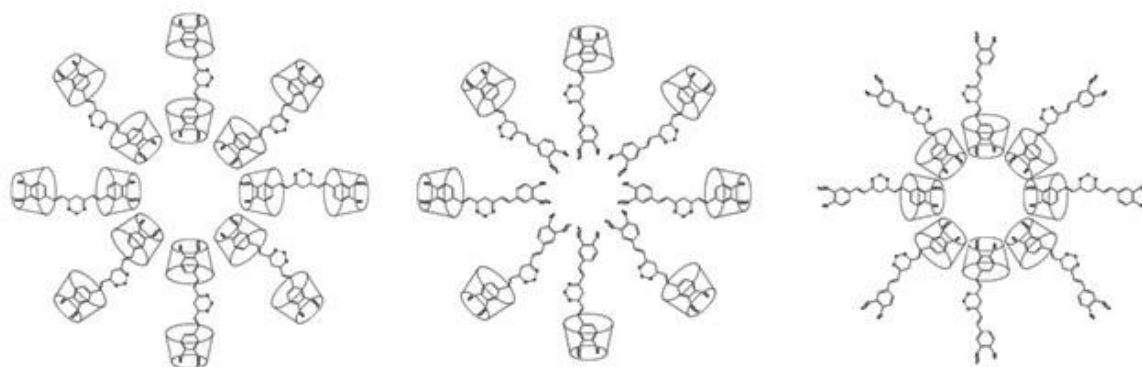
Molekylstørrelse tatt i betraktning, burde kurkumin være et for stort molekyl ( $\sim 19$  Å langt og 6 Å bredt) for å passe helt inn i hulrommet til et  $\beta$ -CD ( $\sim 7,8$  Å bredt) [55]. Det er derfor rimelig å anta at to  $\beta$ -CD-molekyler danner kompleks med kurkumin sammen, én på hver ende av kurkuminmolekylet (Figur 1.7). Flere studier gjort på kurkumin og  $\beta$ -CD konkluderer med dannelsen av 1:2-komplekser mellom kurkumin og  $\beta$ -CD [3, 55-57], og det er derfor trolig at kurkumin i størst grad danner samme type kompleks med M $\beta$ CD. En annen studie, utført av Baglole *et al.* (2005), viser at inklusjon av en ende av kurkuminmolekylet inn i hulrommet til CD, sterisk hindrer inklusjon av den andre enden inn i et nytt CD [58]. Studien konkluderer med at en 1:1-modell mellom kurkumin og  $\beta$ -CD passer bedre. Det kan følgelig forventes både 1:1- og 1:2-kompleksring mellom kurkumin og M $\beta$ CD, i større eller mindre grad.



**Figur 1.7** – Foreslått 1:2-kompleksing mellom kurkumin og to CD. Merk at de relative størrelsene ikke er korrekte [58].

#### 1.4.1.5. Selvassosiering og dannelse av ikke-inklusionskomplekser

Det er kjent at CD og CD-komplekser kan selvassosiere, og at de interagerer med hverandre via uspesifikke, svake bindinger som hydrogenbindinger og van der Waalske bindinger. I tillegg kan CD og CD-kompleksene danne vannløselige aggregater i vandig løsning, og disse kan solubilisere lite vannløselige legemidler i form av ikke-inklusionskomplekser eller micelle-lignende strukturer [59]. Dette kan gi en additiv solubiliseringseffekt som kan gjøre enkle fase-løselighetsdiagrammer misvisende [59]; flere ulike studier behøves for endelig å konkludere støkiometrien til kurkumin/M $\beta$ CD-komplekser. Figur 1.8 viser mulighetene for interaksjoner mellom kurkumin og M $\beta$ CD. Ett eller to M $\beta$ CD kan inkludere hver ende av kurkuminmolekylet i hulrommet; ved 1:1-kompleksing kan frie ender av kurkuminmolekylene interagere med hverandre via van der Waalske bindinger og danne micellelignende strukturer med hydrofob indre ved høye konsentrasjoner. M $\beta$ CD kan interagere med hverandre via hydrogenbindinger, og aggregere i micellelignende strukturer med hydrofilt indre.



**Figur 1.8** – Foreslåtte interaksjoner mellom 1:2-komplekser og 1:1-komplekser mellom kurkumin og CD (fritt etter [58]).



#### **1.4.1.6. Funksjon i produkter med kurkumin**

M $\beta$ CD ble inkludert i produktene med kurkumin for å solubilisere det hydrofobe molekylet. Både via inklusjonskomplekser og ikke-inklusionskomplekser kan M $\beta$ CD øke kurkumins løselighet i vandig medium. Ved oppløsning av produktene i buffer eller sårveske, fungerer M $\beta$ CD som kurkumins «spring» ettersom kompleksene er mer hydrofile enn kurkumin alene (jfr. Figur 1.5). Etter oppløsning kan M $\beta$ CD trolig også fungere som «parachute» og delvis stabilisere den overmettede løsningen med kurkumin via overnevnte interaksjoner i en viss tidsperiode.

#### **1.4.2. Hyaluronsyre**

Hyaluronsyre (HA) er et lineært polysakkarid bestående av annenhver N-acetylglykosamin og glukuronsyre som disakkarider [60]. Kjedene opptrer som relativt stive, vridde spiraler i vandig løsning grunnet intramolekulære hydrogenbindinger, og allerede ved konsentrasjoner < 0,1 % (w/v) danner HA nettverk [60]. Scott studerte i 1989 sekundærstrukturene til HA i vandig løsning. Her ble klynger av CH-grupper beskrevet, og hvordan de danner hydrofobe områder på HA tilsvarende 8 CH-enheter [61]. Evnen HA har til å danne nettverk i løsning allerede ved lave konsentrasjoner, samt å ha både hydrofile og hydrofobe egenskaper, gjør denne polymeren interessant i formuleringer der hydrofobe molekyler ønskes solubilisert og stabilisert i vandig løsning.

##### **1.4.2.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HA**

HA er en hydrofil polymer som til tross for hydrofobe områder kun er løselig i vann. De hydrofobe områdene antas å være ankerpunkter ved polymerens biosyntese på lipofile cellemembraner [61]. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HA-kvaliteten som er benyttet her er listet i Tabell 1.3.

<b>Proturon™ LV-C</b>	
Kjemisk navn:	Natrium hyaluronat
Molekylvekt:	0,05 mill. – 0,1 mill. g/mol
Utseende	Hvitt pulver
Løselighet:	Løselig i vann, uløselig i organiske løsemidler [62]
pH:	6,0 – 7,0 i 0,1 % (w/v) vandig løsning
Smeltepunkt:	Ikke aktuelt
Glasstransisjonstemperatur:	Ukjent

**Tabell 1.3** – Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HA [63].

#### **1.4.2.2. Biologiske egenskaper og nye bruksområder**

I kroppen finnes HA flere steder i forskjellig mengde og med forskjellig molekylvekt; i størst grad i ledd og bindevev med en molekylvekt rundt  $10^6$ - $10^7$  g/mol, og i ung hud [60]. Syntesen skjer ved celleoverflater og reguleres av enzymet hyaluronan syntetase [60]. Funksjonen HA har i kroppen varierer med molekylstørrelsen og kjedelengden. Generelt er større molekyler plassregulerende og øker viskositet og retensjon av vann i vevet. De opprettholder homeostase ved å øke osmotisk trykk, justere tilgjengeligheten for andre makromolekyler og påvirke molekyltransport i vevet [60]. Kortere HA-fragmenter er involvert i angiogenese, inflammasjon og immunstimulering [64]. Halveringstiden til HA i blodet er kort, 2-5 min; deretter brytes mesteparten ned i lever [65].

Undersøkelser har vist at HA kan virke både bakteriostatisk og stimulerende på ulike bakterier, eller ikke påvirke veksten i det hele tatt [66]. Naturlig HA spiller også en viktig rolle i sårhelingsprosessen. I inflammasjonsfasen bindes HA til fibrinogen og bidrar i koaguleringsprosessen, medvirker til ødemdannelse for å bedre tilstrømmingen av celler og demper immunreaksjonene lokalt. I prolifereringsfasen bidrar HA til at fibroblaster tiltrekkes såret, og er viktig i strukturdannelse og promoterer keratinocyt-migrering og

prolifisering. I remodelleringsfasen medvirker HA til dannelsen av nye hudlag og arrdannelse [67]. Kjennskapen til funksjonen av HA, spesielt i hud og bløtvev, har ført til en enorm interesse for polymeren innen kosmetikk. På grunn av den unike molekylstrukturen kan HA syntetiseres med forskjellig molekylstørrelse, og kan frysetørres og modifiseres til å lage både svampstrukturer og membraner [66]. Kjemisk modifisering kan også endre biodegraderbarheten og halveringstiden *in vivo*, og kjemisk syntetisert HA kan derfor benyttes innen både regenerativ kirurgi og plastikkirurgi [66].

Det mest kjente bruksområdet for HA i dag er i rynkekrem. Da naturlig HA fjernes raskt fra hudoverflaten, har flere metoder blitt utviklet for å bremse nedbrytningen, blant dem biosyntese og minimalisering av kryssbinding [68]. HA har i dag blitt en «gullstandard» innen såkalte «filler»-produkter [68]. Injisering av HA i panneområdet, neseområdet, kinn og hake har gitt gode, rynkefrie resultater [69]. Naturligheten og den minimale risikoen forbundet med HA har økt populariteten.

### **1.4.2.3. Funksjon i produkter med kurkumin**

HA i produkter med kurkumin og M $\beta$ CD var tiltenkt en dobbeltrolle: helende og beskyttende i såret, samt fysisk stabiliserende i produktet. Allerede før 1992 var det studert og funnet interaksjoner mellom kurkumin og HA [70], blant andre kurkumin som katalysator for radikal-indusert depolymerisering av HA [71]. Fysiske interaksjoner mellom molekylene er derimot ikke beskrevet. Rollen HA spiller i sårheling gjør at den kan være gunstig for pasienten i et produkt basert på lokal baktericid effekt. Et hydrofobt område på HA på omtrent 8 CH-enheter tilsier at denne polymeren kan interagere både med M $\beta$ CD via hydrogenbindinger og kurkumin via van der Waalske bindinger. Interaksjoner med kurkumin med mulig økt løselighet i vandig medium gjør at HA kan fungere som en «spring» (jfr. Figur 1.5). Interaksjonen med både kurkumin og M $\beta$ CD gjør at HA også kan tenkes å stabilisere systemet etter oppløsning («parachute»). Den samtidige viskositetsøkningen er også nødvendig for å sikre jevn applisering av formuleringen på et affisert område.

### **1.4.3. Hydroksypropyl metylcellulose**

Hydroksypropyl metylcellulose (HPMC) er en etermodifikasjon av cellulose med variable mengder metoksy- og hydroksypropoksy-grupper [72]. Graden av substituering varierer avhengig av ønsket bruksområde og egenskaper [73]. HPMC er en inert, viskoelastisk polymer som spesielt på grunn av sin hydrofilisitet og gode evne til å svulle i løsning til ulik viskositet avhengig av sammensetning og konsentrasjon, er blitt mye brukt både i matproduksjon, kosmetikk og farmasøytiske preparater [72].

#### **1.4.3.1. Fysikalsk-kjemiske egenskaper til HPMC**

HPMC er en hydrofil polymer som er løselig i kaldt vann, og som reversibelt danner gel ved oppvarming og nedkjøling [73]. De fysikalsk-kjemiske egenskapene til HPMC er angitt i Tabell 1.4.

HPMC kan danne et hydrodynamisk, skjermende lag rundt et aktuelt legemiddel via tiltrekkende krefter som hydrogenbindinger, samt å øke viskositeten i mediet slik at molekylær bevegelse reduseres [74]. Dette er gunstige egenskaper dersom man ønsker å fysisk stabilisere overmettede løsninger.

<b>Hydroksypropyl metylcellulose</b>	
Kjemisk navn:	Cellulose, 2-hydroksypropylmetyleter
Molekylvekt:	0,01 mill. – 1,5 mill. g/mol
Viskositet (Pharmacoat® 603):	3 mPas i en 2 % (w/w) vandig løsning
Farge:	Hvitt eller nesten hvitt fibrøst eller granulært pulver
Løselighet:	Løselig i kaldt vann, praktisk uløselig i varmt vann og etanol
pH:	5,0 – 8,0 i en 2 % (w/w) vandig løsning
Smeltepunkt:	Ingen
Glasstransisjonstemperatur:	170 – 180 °C

**Tabell 1.4** – Fysikalsk-kjemiske egenskaper til hydroksypropyl metylcellulose [72, 75].

### **1.4.3.2. Farmasøytiske bruksområder**

Evnen HPMC har til å absorbere vann er bakgrunnen for den mest omfattende bruken av polymeren i dag: i kunstige øyedråper som Artelac® [76]. Polymeren forlenger adhesjonen på øyet og øker fuktigheten i cornea og conjunktiva.

HPMC er mye brukt både i orale, okulære, nasale og topikale formuleringer, samt i matproduksjon og kosmetikk [76]. Den brukes som bindemiddel, i tablettformasjoner, og som matriks for forlenget frisetting av legemidler til oral administrasjon, og i topikale, okulære, flytende orale og nasale preparater som fortykningsmiddel, emulgator og stabilisator for å forsinke utfelling av dispersjoner [45, 72, 76]).

HPMC har også tidligere blitt studert i formuleringer med kurkumin. Selv-emulgerende, lipidbaserte formuleringer og formuleringer med hydrofile bærere ble karakterisert med og

uten HPMC og polyvinylpyrrolidon (PVP) av Gosangari og Dyakonov i 2013. Det ble funnet at HPMC stabiliserer de overmettede systemene og resulterer i langt høyere kurkuminkonsentrasjoner i løsningene med HPMC enn uten [47]. Samme år publiserte Hegge *et al.* en artikkel der kurkumin var formulert med HP $\beta$ CD og HPMC med god stabiliserende effekt på den overmettede løsningen [13]. Kurkumin i en slik formulering var svært fototoksisk for *E.coli* [13]. Patel *et al.* (2009) formulerte kurkumin i en matriks-type transdermal formulering med HPMC og permeabilitetsfremmeren etylcellulose (EC), også med interessante resultater for andre topikale formuleringer med kurkumin og HPMC [77]. HPMC ble også nylig benyttet i en topikal formulering med rekombinant human vaskulær endotel vekstfaktor (rhVEGF) for sårbehandling med lovende resultater [78].

#### **1.4.3.3. Funksjon i produkter med kurkumin**

Evnen HPMC har til å stabilisere overmettede løsninger gjør den aktuell i produkter med kurkumin og M $\beta$ CD. HPMC ble valgt for å forsinke utfellingshastigheten i de overmettede oppløsningene med frysetørrede produkter («parachute»). HPMC øker viskositeten i vandige løsninger og bidrar således med å holde formuleringen på applikasjonsområdet med kurkumin jevnt fordelt utover på monomer form.

## **2. Materialer og metoder**

### **2.1. Apparater**

#### **Differential Scanning Calorimeter:**

DSC822e, Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio, USA

#### **Fluorimeter:**

System: Photon Technology International modular fluorescence system, London, Ontario, Canada

Software: FeliX32, Photon Technology International, London, Ontario, Canada

Lyskilde: 75 W xenonlampe

Monokromatorer: Model 101 med f/4 0.2-m Czerny-Turner konfigurasjon

#### **Frysebad:**

Hetofrig, Heigar, Heto Birkerød, Danmark

#### **Frysetørrer:**

Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Tyskland

#### **High Pressure Liquid Chromatographic system:**

Detektor: UV spectrophotometric detector, SPD-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan

Autoinjektor: SIL-10ADvp Autoinjector, Shimadzu, Kyoto, Japan

Pumpe: Liquid chromatograph, LC-9A, Shimadzu, Kyoto, Japan

Skriver: C-R3A Chromatopac, Shimadzu, Kyoto, Japan

Forkolonne: Nova-Pak® C18 4 µm, 3.9 x 20 mm Guard Column, Waters, Milford, Massachusetts, USA

Kolonne: Nova-Pak® C18, 3.9 x 150 mm Column, Waters, Milford, Massachusetts, USA

#### **Karl Fischer titrator:**

C20 Coulometric KF Titrator, Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio, USA

**Koloniteller:**

Acolyte, Symbiosis Europe, Cambridge, Storbritannia

**Lysboks med tre blå lysstoffrør:**

Polylux PT, Dreve, Unna, Tyskland

Lyskilde: Ralutec 9W/71, Radium, Tyskland

**pH-meter:**

pH 562 MultiCal® WTW GmbH, Weilheim, Tyskland

PHM210 Standard pH meter, MeterLab®, Radiometer analytical, Lyon, Frankrike

**Ristebrett:**

GmbH SM-30, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Tyskland

**Rotavapor:**

EL131, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Sveits

Vannbad: 461 Water Bath, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Sveits

**Sentrifuge:**

Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

**Spektrofotometer:**

UV-2101PC, UV-VIS scanning spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan

**Spiralutsåer:**

Whitley Automated Spiral Plater, Don Whitley Scientific Ltd., Shirley, England, UK

**Suntest:**

Suntest CPS+, Atlas, Linsengericht, Tyskland

Lyskilde: 1,8 kW xenonlampe med glassfilter (cut-off ~310 nm)

**Vekter:**

AD-4 Autobalance, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA



Sartorius Research R160P, Richmond Scientific Ltd., Lancashire, Storbritannia

XS205 DualRange®, Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio, USA

PM460 DualRange®, Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio, USA

## **2.2. Råvarer og løsemidler**

### **2.2.1. Råvarer**

#### **Agarskåler:**

Agar bacteriological (Agar No. 1), Oxoid Ltd., Basingstoke, Storbritannia

Tryptone soy broth, Oxoid Ltd., Basingstoke, Storbritannia

#### **Kurkumin:**

Kurkumin, syntetisert i henhold til Pabon [43], batch II, Farmaøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Oslo, Norge

#### **Hyaluronsyre:**

Proturon™ LV-C, sodium hyaluronat – 2222500, FMC BioPolymer, Brussel, Belgia

#### **Hydroksypropyl metylcellulose**

Pharmacoat® 603, substitusjonstype 2910, Shin-Etsu chemicals Co., Ltd., Niigata, Japan

#### **Metyl-β-cyclodextrin:**

Cavasol® W7M, Wacker Chemie AG, München, Tyskland

Methyl-β-cyclodextrin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

**Sitratbuffer:**

Citric acid monohydrate, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Potassium hydroxide, AnalaR Normapur pellets, VWR International, LLC, West Chester, Pennsylvania, USA

**Vekstmedium:**

Tryptone soy broth, Oxoid Ltd., Basingstoke, Storbritannia

**2.2.2. Løsemidler****Etanol:**

96 % EtOH, Arcus AS, Gjelleråsen, Norge

**Fosfatbuffer:**

PBS, Phosphate Buffered Saline 0,0067 M (PO<sub>4</sub>) without Ca and Mg, BioWhittaker®, Lonza, Basel, Sveits

**Karl Fischer reagens:**

CombiCoulomat fritless, Karl Fischer reagent for coulometric water determination for cells with and without diaphragmapura®, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

**Metanol:**

Methanol for liquid chromatography, LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

**Saltsyre:**

Hydrochloric acid fuming 37 %, VWR International, LLC, West Chester, Pennsylvania, USA

**Vann:**

Destillert vann, Aquatron water still A4000, Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Storbritannia

Milli-Q vann, Milli Q Integral 3, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

### **2.3. Annet utstyr**

#### **24-brønns plater:**

24-wells, Flat Bottom Cell+, Sarstedt, Inc., Newton, North Carolina, USA

#### **Enterococcus faecalis:**

*E. faecalis* (ATCC 19434), Oxoid Ltd., Basingstoke, Storbritannia

#### **Escherichia coli:**

*E. coli* (ATCC 25922), Oxoid Ltd., Basingstoke, Storbritannia

#### **Plastrør:**

Tube 15 ml, 120 x 17 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland

Tube 50 ml, 115 x 28 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland

#### **Filter (brukt til ikke-aseptiske prøver):**

Spartan 13/0.45 RC, 0.45 µm, Whatman International Ltd., Maidstone, Storbritannia

#### **Glasspipetter:**

Glass pasteur pipettes 230 mm, Article no 6121702, VWR International, LLC, West Chester, Pennsylvania, USA

#### **Glassrør:**

Tube 5 ml, 75 x 12 mm, PS, Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland

#### **Kanyler:**

Microlance™ 3 0,8 mm x 40 mm, 21G x 1 ½" - Nr. 2, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA

#### **Petriskåler:**

Peitriskål 90 x 14,2 mm u ribb aseptisk, Heger AS, Rjukan, Norge

#### **Sprøyter:**

Plastipak™ 5 ml sterile, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA

**Sterilfilter:**

Nalgene® bottle-top sterile filter units, capacity 150 ml, Nalge Nunc International Corp., Penfield, New York, USA

**Temperaturstrips:**

Temperature recording strips 37 – 65 °C, VWR International, LLC, West Chester, Pennsylvania, USA

## 2.4. Validering av HPLC-metode

### 2.4.1. HPLC instrumentering

HPLC analyser ble utført med et Shimadzu-system med C18-kolonne (jfr. «2.1 Apparater»).

### 2.4.2. Systemets egnethet

Systemets egnethet ble vurdert ved å bestemme kolonnens effektivitet (Likning 2), vurdere retensjonsfaktor for kurkumin (Likning 3) og beregne symmetrifaktor (Likning 4) [79]:

$$N = 5,54(t_R/W_h)^2 \quad (\text{Likning 2})$$

der N er antall teoretiske plater,  $T_R$  er retensjonstiden i minutter og  $W_h$  er toppens bredde ved halve topphøyden.

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (\text{Likning 3})$$

der k er retensjonsfaktoren,  $t_R$  er retensjonstiden og  $t_0$  er retensjonstiden til et stoff som ikke retarderes av stasjonærfasen (væskefronten).

$$A_s = W_{0,05}/2d \quad (\text{Likning 4})$$

der  $A_s$  er symmetrifaktoren,  $W_{0,05}$  er bredden av toppen ved en tjuendedel av topphøyden, og d er halve bredden av toppen ved en tjuendedel av topphøyden.

### 2.4.3. Tillaging av standardløsninger

Standardløsninger av kurkumin i metanol ble laget ved fortynning av en stamløsning i metanol ( $7,64 \times 10^{-3}$  M). Løsningene ble laget og oppbevart ved romtemperatur ( $22 \pm 2$  °C) i målekolber med glasskork og pakket med aluminiumsfolie.

Ved deteksjonsbølglengde 254 nm ble følgende standarder benyttet til fremstilling av standardkurve:  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M kurkumin i metanol.

Ved deteksjonsbølglengde 350 nm ble følgende standarder benyttet til fremstilling av standardkurve:  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M kurkumin i metanol.

Ved deteksjonsbølglengde 420 nm ble følgende standarder benyttet til fremstilling av standardkurve:  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $5,73 \times 10^{-7}$  M og  $9,55 \times 10^{-7}$  M kurkumin i metanol.

#### **2.4.4. Kromatografiske betingelser**

En omvendt-fase HPLC-analyse ble utført med isokratisk eluering med en væskestrøm på 0,8 ml/min, en kolonnetemperatur på  $22 \pm 2$  °C (romtemperatur), en mobilfase bestående av 0,5 % (w/v) sitronsyrebuffer (pH justert til  $3,0 \pm 0,1$  med KOH) og metanol (38:62) og deteksjonsbølglengder 254 nm, 350 nm og 420 nm. Injeksjonsvolumet var på 20 µL. Analysetid per prøve var 22 minutter. Kurkumin eluerte med retensjonstid mellom 11-13 minutter, avhengig av romtemperaturen.

#### **2.4.5. Spesifisitet**

Kurkumins absorpsjonsspektrum i Milli-Q vann (MQ-vann) med 1 % (v/v) metanol ble sammenlignet med 1 – 3 % (w/v) M $\beta$ CD, 0,1 % (w/v) HA) og 0,1 % (w/v) HPMC i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

#### **2.4.6. Linearitet**

Linearitet ble vurdert med kurkuminkonsentrasjonene  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M,  $2,00 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M,  $3,82 \times 10^{-6}$  M,  $4,50 \times 10^{-6}$  M,  $5,00 \times 10^{-6}$  M og  $1,25 \times 10^{-5}$  M i metanol for deteksjonsbølglengde 254 nm, med konsentrasjonene  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M,  $3,82 \times 10^{-6}$  M,  $4,50 \times 10^{-6}$  M,  $7,50 \times 10^{-6}$

M og  $1,25 \times 10^{-5}$  M i metanol for deteksjonsbølgelengde 350 nm, og med konsentrasjonene  $3,50 \times 10^{-7}$  M,  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $5,73 \times 10^{-7}$  M,  $9,55 \times 10^{-7}$  M,  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M,  $3,82 \times 10^{-6}$  M i metanol for deteksjonsbølgelengde 420 nm.

Korrelasjonskoeffisientene ble bestemt med lineær regresjon både for målt topphøyde og -areal i kromatogrammene.

### **2.4.7. Presisjon**

Instrumentets presisjon, metodens presisjon og intermediat presisjon ble målt og beregnet.

Instrumentets presisjon ble beregnet ut fra seks injeksjoner fra samme HPLC-rør med kurkuminkonsentrasjonene  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M og  $1,25 \times 10^{-5}$  M i metanol med deteksjonsbølgelengde 254 nm,  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M og  $4,50 \times 10^{-6}$  M med deteksjonsbølgelengde 350 nm, og  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $9,55 \times 10^{-7}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M med deteksjonsbølgelengde 420 nm. Relativt standardavvik (% RSD) ble beregnet for toppareal og topphøyde.

Metodens presisjon ble beregnet med  $5,73 \times 10^{-7}$  M kurkumin i metanol ( $n = 10$ ) fortynnet i to trinn fra en stamløsning med konsentrasjon  $7,64 \times 10^{-3}$  M. Toppareal og topphøyde ble registrert ved deteksjonsbølgelengde 420 nm, og % RSD ble beregnet.

Intermediat presisjon ble beregnet med løsningene  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M kurkumin i metanol med deteksjonsbølgelengde 254 nm,  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $2,50 \times 10^{-6}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M med deteksjonsbølgelengde 350 nm, og  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $5,73 \times 10^{-7}$  M og  $9,55 \times 10^{-7}$  M med deteksjonsbølgelengde 420 nm. Målingene ble gjort over seks måneder med 1-5 injeksjoner per løsning per uke, med nylagde løsninger annenhver uke. Gjennomsnittlig toppareal og topphøyde og % RSD ble beregnet for hver konsentrasjon og deteksjonsbølgelengde.

### **2.4.8. Nøyaktighet**

Nøyaktighet ble bestemt med seks injeksjoner fra samme HPLC-rør med tre kurkuminkonsentrasjoner for hver deteksjonsbølgelengde.  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M og  $1,25 \times 10^{-5}$  M kurkumin i metanol ble testet med deteksjonsbølgelengde 254 nm,  $1,25 \times 10^{-6}$

M,  $3,00 \times 10^{-6}$  M og  $4,50 \times 10^{-6}$  M ble testet med deteksjonsbølgelengde 350 nm, og  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $9,55 \times 10^{-7}$  M og  $3,82 \times 10^{-6}$  M ble testet med deteksjonsbølgelengde 420 nm. Faktisk kurkuminkonsentrasjon ble beregnet med regresjonslinjene fra linearitetsmålingen for toppareal og topphøyde, og % RSD ble bestemt.

#### 2.4.9. Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD) ble bestemt med signal-støy-ratio for deteksjonsbølgelengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm. For alle deteksjonsbølgelengdene ble det først gjort injeksjoner fra samme HPLC-rør med metanol ( $n = 3$ ). Kurkuminkonsentrasjonene  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M og  $2,25 \times 10^{-6}$  M ble målt ved deteksjonsbølgelengde 254 nm ( $n = 3$ );  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M og  $2,25 \times 10^{-6}$  M ble målt ved 350 nm ( $n = 3$ ); og  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $4,50 \times 10^{-7}$  M og  $5,73 \times 10^{-7}$  M ble målt ved 420 nm ( $n = 3$ ). Gjennomsnittlig topphøyde i cm for hver av konsentrasjonene ved samme deteksjonsbølgelengde ble registrert, samt gjennomsnittlig høyde av støyen i kromatogrammene med metanol. Deteksjonsgrensen ble beregnet med Likning 5 [80]:

$$LOD = (\text{konsentrasjon i prøve/topphøyde}) \times (\text{topphøyde støy}) \times 3 \quad (\text{Likning 5})$$

#### 2.4.10. Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble bestemt med signal-støy-ratio for deteksjonsbølgelengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm. For alle deteksjonsbølgelengdene ble det først gjort injeksjoner fra samme HPLC-rør med metanol ( $n = 3$ ). Kurkuminkonsentrasjonene  $1,50 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M og  $2,25 \times 10^{-6}$  M ble målt ved deteksjonsbølgelengde 254 nm ( $n = 3$ );  $1,25 \times 10^{-6}$  M,  $1,75 \times 10^{-6}$  M og  $2,25 \times 10^{-6}$  M ble målt ved 350 nm ( $n = 3$ ); og  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $4,50 \times 10^{-7}$  M og  $5,73 \times 10^{-7}$  M ble målt ved 420 nm ( $n = 3$ ). Gjennomsnittlig topphøyde i cm for hver av konsentrasjonene ved samme deteksjonsbølgelengde ble registrert, samt gjennomsnittlig høyde av støyen i kromatogrammene med metanol. Kvantifiseringsgrensen ble beregnet med Likning 6 [80]:

$$LOQ = (\text{konsentrasjon i prøve})/(\text{topphøyde}) \times (\text{topphøyde støy}) \times 10 \quad (\text{Likning 6})$$



### 2.4.11. Kvantifiseringsområde

Analytten kan kvantifiseres med en dokumentert presisjon og nøyaktighet mellom LOQ og høyeste kurkuminkonsentrasjon med akseptabel presisjon og nøyaktighet ved HPLC-separasjon og UV-deteksjon ved deteksjonsbølglengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm.

### 2.5. Faseløselighet

Om lag 18 mg kurkumin ble veid ut i hvert av 48 reagensrør med glasskork og beskyttet mot lys. En 10 % (w/v) løsning av M $\beta$ CD, en 0,1 % (w/v) løsning av HA, en 0,1 % (w/v) løsning av HPMC, en 10 % (w/v) løsning av M $\beta$ CD i 0,1 % (w/v) HA, og en 10 % (w/v) løsning av M $\beta$ CD i 0,1 % (w/v) HPMC ble laget i MQ-vann og gitte mengder ble tilsatt reagensrørene til følgende konsentrasjoner:

Løsninger med kurkumin og M $\beta$ CD	Løsninger med kurkumin, M $\beta$ CD og HA	Løsninger med kurkumin, M $\beta$ CD og HPMC
0,0 % M $\beta$ CD	0,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	0,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
0,1 % M $\beta$ CD	0,1 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	0,1 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
0,3 % M $\beta$ CD	0,3 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	0,3 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
0,5 % M $\beta$ CD	0,5 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	0,5 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
1,0 % M $\beta$ CD	1,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	1,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
2,0 % M $\beta$ CD	2,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	2,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
3,0 % M $\beta$ CD	3,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	3,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
6,0 % M $\beta$ CD	6,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	6,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC
10,0 % M $\beta$ CD	10,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HA	10,0 % M $\beta$ CD i 0,10 % HPMC

**Tabell 2.1** – Sammensetning av løsningene til faseøselighetsstudiet.

Det ble laget tre paralleller av hver sammensetning. Reagensrørene ble plassert på skrå i et stativ og ristet ved 225 rpm i 66 timer. Prøvene ble filtrert 0,45  $\mu$ m over i nye reagensrør med

glasskork og beskyttet mot lys. Filtratene ble fortynnet med metanol som angitt i Tabell 2.2, Vedlegg, før injesering på HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm. Konsentrasjonen av kurkumin ble beregnet ut fra standardkurven.

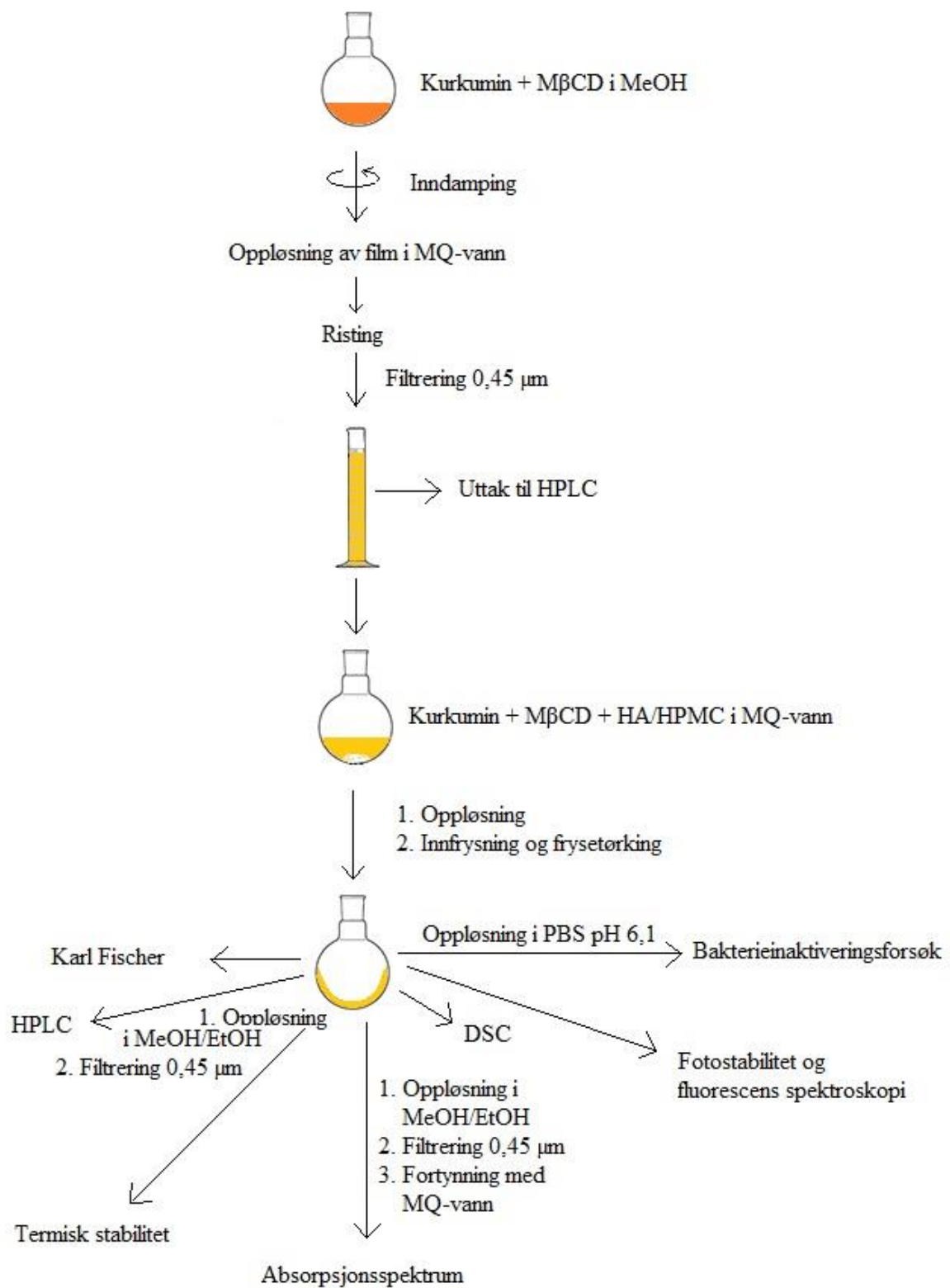
## 2.6. Ristetid

Mengde M $\beta$ CD tilsvarende 1:1 molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD ble veid ut i rundkolber beskyttet mot lys og korket (n = 4). Et volum tilsvarende 10 ml kurkumin stamløsning ( $7,64 \times 10^{-3}$  M i metanol) ble tilsatt og metanolen ble dampet inn på rotavapor. Deretter ble 10,5 ml MQ-vann tilsatt, og rundkolbene ble ristet ved 225 rpm. Nye prøver ble laget for hver av ristetidene på henholdsvis ½, 1, 2 og 24 timer. Etter risting ble prøvene filtrert 0,45  $\mu$ m og fortynnet 2500 ganger i metanol før analyse med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm. Konsentrasjonen av kurkumin ble beregnet ut fra standardkurven. Tilsvarende ble gjort for 1:3 molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD.

## 2.7. Tillaging av produkter

Mengde M $\beta$ CD tilsvarende 1:1 og 1:3 molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD ble veid ut i rundkolber (n = 4). Et volum tilsvarende 10 ml kurkumin stamløsning ( $7,64 \times 10^{-3}$  M i metanol) ble tilsatt, prøvene ble beskyttet mot lys og metanolen dampet inn på rotavapor. Deretter ble 10,5 ml MQ-vann tilsatt hver rundkolbe og prøvene ble oppløst ved risting i 1 time.

Etter risting ble prøvene filtrert over i målesylindere, og et lite uttak ble gjort fra hver parallell til analyse med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm. Gjenværende volum i målesylindere ble målt, og 0,1 % (w/v) HA eller HPMC ble veid ut i nye rundkolber beskyttet mot lys. Filtratet ble overført til disse, og det ble gitt tid til å løse polymeren fullstendig. Prøvene ble deretter frosset inn på frysebad (-40 °C) og koblet til frysetørreneren til primærtørking ved -45 °C (tilsvarende 0,07 mbar) i 20 timer og sekundærtørking ved -76 °C (tilsvarende 0,001 mbar) i 6 timer. Etter frysetørring ble kolbene tett med plastkork, forsegle med parafilm og oppbevart beskyttet mot lys. Figur 2.1 viser den generelle produksjons- og karakteriseringsprosessen.



**Figur 2.1** – Produksjons- og karakteriseringsprosessen for de ulike produktene.

## 2.8. Karakterisering av ferske produkter

### 2.8.1. Vanninnhold

Vanninnhold ble målt med Karl Fischer titrering med kolorimetrisk deteksjon samme dag som de frysetørrete produktene ble laget. Produktene ble ekvilibrert med luftfuktigheten i ~5 minutter med aluminiumsfolie løst tildekkende for å skjerme mot lys. Luftfuktigheten ble målt daglig. Vanninnhold rett etter frysetørring uten ekvilibrering ble gjort for én batch fra hvert produkt. Uttak på ~5 mg ble gjort fra hver parallell og overført til titratoren.

### 2.8.2. Kvantifisering av kurkumininnhold

To uttak på ~2 mg ble gjort fra hver parallell (ett uttak fra bunnen av kolben og ett fra siden av kolben) og løst i 10 ml metanol (for produktene med HA) eller etanol (for produktene med HPMC). Prøvene ble filtrert 0,45 µm og fortynnet 10 ganger for (1:1)-produktene og 25 ganger for (1:3)-produktene i metanol før kvantifisering med HPLC med deteksjonsbølgelengde 420 nm. Kurkumininnhold ble beregnet med Likning 7. Det ble korrigert for vanninnhold i beregningene.

$$\text{Curcumininnhold \% (w/w)} = (A \times X + B) \times F \times V \times M_w / (m(1 - W/100)) \times 100$$

(Likning 7)

A er stigningstallet og B skjæringspunktet med y-aksen for plott av topphøyde/toppareal av standardløsningene som funksjon av kurkuminkonsentrasjon, X er topphøyde eller toppareal i ukjent prøve; F er fortynningsfaktoren, V er volum i prøven før fortynning,  $M_w$  er molekylvekten til kurkumin (368,38 g/mol [40]); m er mengde innveid produkt, W er vanninnhold i produktet.

## 2.9. Svinn under produksjon

Svinn av kurkumin under produksjon før frysetørring ble beregnet for hver produksjon, der en liten mengde filtrert prøve etter risting ble fortynnet i metanol (1800 ganger for (1:1)-

produktene og 5000 ganger for (1:3)-produktene) og analysert med HPLC med deteksjonsbølgelengde 420 nm.

Adsorpsjon av kurkumin til sprøyte og filter ble vurdert ved å bruke  $3,82 \times 10^{-7}$  M,  $5,73 \times 10^{-7}$  M og  $9,55 \times 10^{-7}$  M kurkumin i metanol. Filtrerte løsninger ble sammenlignet med ufiltrerte løsninger med HPLC med deteksjonsbølgelengde 420 nm, og konsentrasjonen ble beregnet med lineær regresjon.

## 2.10. Hydreringstid

En liten mengde produkt (~5 mg) ble veid inn og lagt i en petriskål av glass med 20 ml MQ-vann (n = 4). Tiden før produktet var fullstendig løst (visuell deteksjon) ble tatt med en stoppeklokke.

## 2.11. Absorpsjonsspektra

En løsning med  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann ble laget ved å fortynne en stamløsning av kurkumin i metanol ( $7,63 \times 10^{-3}$  M). Innhold av metanol i prøven var da 1 % (v/v). Det ble tatt hensyn til innholdet av metanol i løsningene da spektrene ble tatt opp. Følgende løsninger ble laget i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol: 0,1-0,3 % (w/v) HA, 0,1 % (w/v) HPMC, 1-3 % (w/v) M $\beta$ CD,  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 0,1 % (w/v) HA/HPMC,  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 1-4 % (w/v) M $\beta$ CD, og  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 2 % (w/v) M $\beta$ CD og 0,1 % (w/v) HA/HPMC. Sistnevnte løsning med kurkumin, M $\beta$ CD og polymer ble benyttet som referanse. Et uttak fra ferske produkter ble løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol, filtrert 0,45  $\mu$ m og fortynnet i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol til antatt kurkuminkonsentrasjon  $7,64 \times 10^{-6}$  M, og absorpsjonsspekterne ble sammenlignet med absorpsjonsspekteret til referansen.

## 2.12. Fotostabilitet

Uttak ble gjort fra nylaget produkt for bestråling i SUNTEST CPS+ samt til mørkekontroller (n = 4). Uttakene som skulle bestråles ble overført til en petriskål av klart glass og fordelt i et jevnt, tynt lag (~1 mm). Uttakene til mørkekontroll ble overført til en petriskål av klart glass og fordelt i et jevnt, tynt lag (~1 mm). I petriskålene var det på forhånd plassert en

temperaturmålede strip. Skåler for bestråling ble dekket med et lag stram plastfolie (Gladpack). Folien ble perforert (8 hull) med en kanyle for å slippe ut eventuell fuktighet. Mørkekontrollene ble dekket med aluminiumsfolie i tillegg til uperforert plastfolie.

Petriskele ble plassert midt i SUNTEST-kammeret. Lyskilden var på forhånd kalibrert med XenoCal Sensor (Atlas, Chicago, Illinois, USA). Det ble innstilt på en dose tilsvarende 1,2 millioner luxtimer i henhold til minimumsdose anbefalt av ICH (Q1B, 1997) [81]:

- Ikke mindre enn 1,2 millioner luxtimer; refererer til synlig lys i bølgelengdeintervall 400-800 nm.
- Ikke mindre enn 200 wattimer/m<sup>2</sup> integrert nær-ultrafiolett stråling

Service av apparatet viste at strålingsnivået i SUNTESTen er på maksimum 765 W/m<sup>2</sup> mellom 300-800 nm. Med den innstilte lysdosen eksponeres prøvene for ~2,4 ganger høyere UV-dose enn anbefalt minimumsdose, totalt 22 540 kJ/m<sup>2</sup>. Prøvene ble eksponert i henhold til Option 1 ved bruk av xenonlampe og vindusglassfilter mellom strålingskilden og prøvene som filtrerte bort stråling < 300 nm. Dette oppsettet etterligner standarden for innendørs direkte sollys (ID65). Xenonlampen emitterer > 800 nm og avgir dermed varme. For kontroll av temperatur ble Black Standard Thermometer (BST) sensor innstilt på 0 °C og temperaturstrips benyttet, og Atlas SunCool koblet til for nedkjøling.

Forsøket med (1:1-HA) ble gjort to ganger på to batcher.

### **2.12.1. Vanninnhold**

Vanninnhold ble målt med Karl Fischer titrering med kolorimetrisk deteksjon før og etter bestråling etter ~5 minutters ekvilibrering med luftfuktighet uten plastfolie med aluminiumsfolie løst tildekkende for å skjerme mot lys. Et uttak på ~5 mg ble gjort fra hvert produkt og overført til titratoren.

### **2.12.2. Kvantifisering av kurkumininnhold**

Etter bestråling ble det veid ut ~2 mg (n = 2) som ble løst i metanol (for produktene med HA) eller etanol (for produktene med HPMC). Prøvene ble filtrert 0,45 µm og fortynnet med metanol før analyse med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm. Kurkumininnhold ble beregnet med Likning 7.

### **2.12.3. Absorpsjonsmåling av bestrålte prøver**

Absorpsjonsspekter ble tatt opp av bestrålt produkt, bestrålt ren kurkumin og mørkekontroller. Det ble veid ut ~2 mg fra hver prøve. De bestrålte produktene ble løst i 1 ml MQ-vann med 1 % (v/v) metanol og filtrert før opptak av absorpsjonsspekter. Prøvene med ren kurkumin ble løst i 7 ml metanol, fortynnet med MQ-vann til 1 % (v/v) total metanol og teoretisk kurkuminkonsentrasjon  $7,64 \times 10^{-6}$  M, og filtrert før opptak av absorpsjonsspekter. Mørkekontrollene ble løst i 10 ml MQ-vann med 1 % (v/v) metanol og filtrert før opptak av absorpsjonsspekter.

### **2.12.4. Fluorescens spektroskopi**

Fluorescensmåling ble utført på fast prøve (1:1-HA) og (1:3-HA) montert i faststoff prøveholder, og på oppløste prøver i en kvarts kyvette med 1 cm lysvei ved ~20 °C. Spektrene ble tatt opp med eksitasjons- og emisjonsslit på 2 nm og tre repetisjoner per prøve. Ved opptak av emisjonsspektra ble det montert et filter med cut-uff på 495 nm. Fast prøve ble eksitert ved 420 nm og emisjonsspekter ble tatt opp mellom 495-800 nm. Eksitasjonsspektra ble tatt opp ved emisjonsmaksimum mellom 300-500 nm. Instrumentet var utstyrt med en rød-sensitiv fotomultiplikator. En eksitasjon- og emisjonkorleksjon ble automatisk utført. Den faste prøven ble bestrålt i SUNTEST i 10 minutters intervaller og nedkjølt i 3 minutter mellom hvert emisjons- og eksitasjonsscan. Et nytt parti (1:3-HA) ble også bestrålt i 20 minutters intervaller. Etter bestråling av (1:1-HA)- og (1:3-HA)-prøver som beskrevet under «2.12 Fotostabilitet», ble nytt emisjon- og eksitasjonsscan utført.

### **2.13. Akselerert holdbarhet**

Fire rundkolber med nylaget produkt ble korket, tett med parafilm og beskyttet mot lys. Kolbene ble satt i varmeskap ved  $40 \pm 0$  °C. Vanninnhold og kurkumininnhold ble målt ukentlig, mens Differential Scanning Calorimetry (DSC) ble gjort annenhver uke. Etter fire uker ble absorpsjonsspekter tatt opp.

#### **2.13.1. Vanninnhold**

Vanninnhold i HA-produktene (n = 2) og HPMC-produktene (n = 4) ble bestemt etter henholdsvis 0, 7, 14, 21 og 28 dager. Korkene ble tatt av rundkolbene og åpningene løst dekket med aluminiumsfolie. Etter ekvilibrerings med luftfuktigheten i ~5 minutter ble uttak på ~5 mg tatt til beregning av vanninnhold med Karl Fischer titrering med kolorimetrisk deteksjon.

#### **2.13.2. Kvantifisering av kurkumininnhold**

Kurkumininnhold ble beregnet i de samme kolbene vanninnhold ble målt etter henholdsvis 0, 7, 14, 21 og 28 dager. ~2 mg (n = 2) ble overført til reagensrør og løst i metanol. Prøvene ble videre filtrert 0,45 µm over i nye reagensrør beskyttet mot lys, og yttligere fortynnet før kvantifisering med HPLC med deteksjonsbølglengde 350 nm. Kurkumininnhold ble beregnet med Likning 7.

#### **2.13.3. Absorpsjonsmåling**

Uttak på ~2 mg fra hver parallell ble overført til reagensrør, løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol og filtrert 0,45 µm over i nye reagensrør. Absorpsjonsspektra ble tatt opp mellom 190-700 nm i nylagde produkter og etter fire uker.



## **2.14. Generell holdbarhet**

(1:3-HA) (n = 8), (1:1-HPMC) (n = 4) og (1:3-HPMC) (n = 4) ble laget som beskrevet under «2.7 Tillaging av produkter». Én parallell (1:3-HA) ble oppbevart korket uten forsegling. Parallellene ble oppbevart ved  $20 \pm 2$  °C i fire uker.

### **2.14.1. Vanninnhold**

Vanninnhold ble bestemt i ferske produkter og etter fire uker med Karl Fischer titrering med kolorimetrisk deteksjon. Prøvene ble ekvilibrert med luftfuktigheten i ~5 minutter med aluminiumsfolie løst tildekkende for å skjerme mot lys. Et uttak på ~5 mg ble gjort fra hver parallell og overført til titratoren.

### **2.14.2. Kvantifisering av kurkumininnhold**

Kurkumininnhold ble bestemt i ferske produkter og etter fire uker. Uttak på ~2 mg (n = 2) fra hver parallell ble overført til reagensrør og løst i 10 ml metanol (for produktene med HA) eller etanol (for produktene med HPMC). Prøvene ble videre filtrert 0,45 µm over i nye reagensrør beskyttet mot lys, og ytterligere fortynnet (10 ganger for (1:1-HPMC) og 25 ganger for (1:3)-produktene) før analyse med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm. Kurkumininnhold ble beregnet med Likning 7.

## **2.15. Differential Scanning Calorimetry**

Termisk analyse ble utført på MβCD, HA, HPMC, (1:1-HA), (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) med DSC. Termisk analyse ble også utført på produkter bestrålt i SUNTEST (se «2.12 Fotostabilitet»), samt på produkter i studie på akselerert holdbarhet (se «2.13 Akselerert holdbarhet») etter henholdsvis 0, 14 og 28 dager. En liten mengde (~1,5 mg) prøve ble overført til aluminium-panner med ett hull og scannet under jevn strøm av nitrogengass fra 25-250 °C med en oppvarmingshastighet på 10 °C/min (n = 3). Kalibrering ble utført med standard indium prøver.

## 2.16. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer)

Uttak fra hvert av de frysetørrede produktene ( $n = 3$ ) tilsvarende  $\sim 5 \mu\text{M}$ ,  $\sim 10 \mu\text{M}$  og  $\sim 25 \mu\text{M}$  kurkumin ble løst i PBS pH 6,1 i plastrør. (1:1-HA) ble kun løst til  $\sim 25 \mu\text{M}$ .

Kurkumininnholdet i prøvene (1:1-HA), (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) var henholdsvis gjennomsnittlig 1,2 % (w/w), 4,5 % (w/w), 1,9 % (w/w) og 4,4 % (w/w).

Kurkuminkonsentrasjonen i løsningene ble kvantifisert umiddelbart etter oppløsning, og etter 1, 2, 3 og 4 timers oppbevaring ved  $20^\circ\text{C}$  beskyttet mot lys. Løsningene ble sentrifugert ved 6918 g (7500 rpm) i 30 minutter ved  $20^\circ\text{C}$  før 1 ml av supernatanten ble filtrert  $0,45 \mu\text{m}$ , fortynnet 1:1 med metanol (for produktene med HA) eller etanol (for produktene med HPMC) og filtrert igjen før kvantifisering med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm.

Kurkuminkonsentrasjon ble beregnet fra standardkurve.

## 2.17. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer)

Uttak fra tre paralleller fra hver av de frysetørrede produktene tilsvarende  $25 \mu\text{M}$  kurkumin ble løst i PBS pH 6,1 i plastrør. Kurkumininnholdet i prøvene (1:1-HA), (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) var henholdsvis gjennomsnittlig 3,4 % (w/w) 3,8 % (w/w), 2,3 % (w/w) og 4,2 % (w/w). Kurkuminkonsentrasjonen i løsningene ble kvantifisert umiddelbart etter oppløsning, og etter 8, 24, 32, 48 og 168 timers oppbevaring ved  $20^\circ\text{C}$  beskyttet mot lys. Løsningene ble sentrifugert ved 6918 g (7500 rpm) i 30 minutter ved  $20^\circ\text{C}$  før 1 ml av supernatanten ble filtrert  $0,45 \mu\text{m}$ , 2 ml metanol (for produktene med HA) eller etanol (for produktene med HPMC) ble tilsatt, og prøven ble igjen filtrert før kvantifisering med HPLC med deteksjonsbølglengde 420 nm og 254 nm. Kurkuminkonsentrasjonen ble beregnet fra standardkurve.

## 2.18. Bakterieinaktiveringsforsøk

### 2.18.1. *Enterococcus faecalis*

Bakterieinaktiveringsforsøk ble utført med oppløsninger av nylaget produkt (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) ( $n = 4$ ), og kontrolløsninger med  $0,5\text{--}25 \mu\text{M}$  kurkumin med 1 %

(v/v) etanol, 0,1 % (w/v) M $\beta$ CD, 0,1 % (w/v) HA og 0,1 % (w/v) HPMC i MQ-vann. *E. faecalis* ble sådd om daglig i trypton soya næringsmedium (TSB) og oppbevart ved 37 °C. Uttak fra bakteriekulturen dyrket over natt ble fortynnet i fosfatbufret saltløsning (PBS, pH 6,1) til > 1 x 10<sup>6</sup> kolonidannende enheter per ml (CFU/ml). (1:3-HA) ble løst i PBS (pH 6,1) til konsentrasjoner på ~5  $\mu$ M, ~10  $\mu$ M og ~25  $\mu$ M, og HPMC-produktene til ~0,5  $\mu$ M, ~1  $\mu$ M, ~2,5  $\mu$ M, ~5  $\mu$ M, ~10  $\mu$ M og ~25  $\mu$ M. Prøvene ble brukt direkte etter oppløsning. Kontroller med kurkumin ble fortynnet i PBS pH 6,1 fra en stamløsning i etanol (2,5 mM); M $\beta$ CD, HA og HPMC ble veid ut og løst i PBS pH 6,1 rett før bruk. Bakteriesuspensjonen ble blandet 1:1 med det oppløste produktet/referanseløsningen i 24-brønnsplater. Hvert forsøk inneholdt fire paralleller med bakteriesuspensjon og produkt (blandet 1:1) for lyseksposering og fire paralleller til mørkekontroll, samt fire paralleller med bakteriesuspensjon og PBS (pH 6,1, blandet 1:1) uten kurkumin for lyseksposering og fire paralleller til mørkekontroll. Platene ble inkubert ved 37 °C i 10 minutter før bestråling i 10 eller 20 minutter (tilsvarende lysdose på 11 J/cm<sup>2</sup> eller 22 J/cm<sup>2</sup> ( $\pm$  10 %)) i en lysboks med blått lys beskrevet tidligere [82]. Etter bestråling ble bakteriesuspensjonene fortynnet 40 ganger med PBS før inkubering ved 37 °C i 10 minutter. Etter inkubering ble de fortynnete bakteriesuspensjonene sådd ut på TSB agar med en automatisk spiralutsåer og inkubert ~24 timer ved 37 °C. Bakterieoverlevelse ble beregnet ved å telle CFU med en koloniteller. Antall paralleller for hver konsentrasjon og lysdose var  $\geq$  8 (4 x 2).

Statistisk signifikans av aPDT-behandlingen ble beregnet ved å sammenligne CFU/ml av de behandlede bakteriesuspensjonene og de bestrålte kontrollene, og bruke en to-utvalgs t-test med antatt lik varians (Minitab 16). En p-verdi mindre enn 0,05 ble vurdert som statistisk signifikant.

### **2.18.2. *Escherichia coli***

Fototoksisk effekt på *E. coli* ble utført med oppløsninger av nylaget produkt (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) (n = 4), og kontrolløsninger med 2,5–25  $\mu$ M kurkumin med 1 % (v/v) etanol, 0,1 % (w/v) M $\beta$ CD og 0,1 % (w/v) HPMC i MQ-vann. *E. coli* ble sådd om daglig i TSB og oppbevart ved 37 °C. Uttak fra bakteriekulturen dyrket over natt ble fortynnet i fosfatbufret saltløsning (PBS, pH 6,1) til > 1 x 10<sup>6</sup> CFU/ml. De frysetørrete produktene ble løst i PBS (pH 6,1) til kurkuminkonsentrasjoner på ~2,5  $\mu$ M, ~5  $\mu$ M, ~10  $\mu$ M og ~25  $\mu$ M, og ble brukt

direkte etter oppløsning. Kontroller med kurkumin ble fortynnet i PBS pH 6,1 fra en stamløsning i etanol (2,5 mM); M $\beta$ CD og HPMC ble veid ut og løst i PBS pH 6,1 rett før bruk. Bakteriesuspensjonen ble blandet 1:1 med det oppløste produktet/referanseløsningen i 24-brønnsplater. Hvert forsøk inneholdt fire paralleller med bakteriesuspensjon og produkt (blandet 1:1) for lyseksposering og fire paralleller til mørkekontroll, samt fire paralleller med bakteriesuspensjon og PBS (pH 6,1, blandet 1:1) uten kurkumin for lyseksposering og fire paralleller til mørkekontroll. Platene ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter før bestråling i 30 minutter (tilsvarende lysdose på 32 J/cm<sup>2</sup> ( $\pm$  10 %)) i en lysboks med blått lys beskrevet tidligere [82]. Etter bestråling ble bakteriesuspensjonene fortynnet 60 ganger med PBS før inkubering ved 37 °C i 60 minutter. Etter inkubering ble de fortynnede bakteriesuspensjonene sådd ut på TSB agar med en automatisk spiralutsåer og inkubert ~24 timer ved 37 °C. Bakterieoverlevelse ble beregnet ved å telle CFU med en koloniteller. Antall paralleller for hver konsentrasjon og lysdose var  $\geq 8$  (4 x 2).

Statistisk signifikans av aPDT-behandlingen ble beregnet ved å sammenligne CFU/ml av de behandlede bakteriesuspensjonene og de bestrålte kontrollene, og bruke en to-utvalgs t-test med antatt lik varians (Minitab 16). En p-verdi mindre enn 0,05 ble vurdert som statistisk signifikant.

### 3. Resultater

#### 3.1. Validering av HPLC-metode

Metoden er beskrevet og benyttet tidligere [3, 7, 83]. En begrenset validering ble gjort basert på ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [84] og inkluderte systemets egnethet, spesifisitet, linearitet, presisjon, nøyaktighet, LOD, LOQ og kvantifiseringsområde.

##### 3.1.1. Systemets egnethet

Systemets egnethet gir en forsikring om at det kromatografiske systemet gir en tilfredsstillende separasjon av analytt og eventuelle nedbrytningsprodukter eller hjelpestoffer innenfor en akseptabel tid.

Kolonnens effektivitet ble beregnet med Likning 2 for én prøve ved hver deteksjonsbølgelengde:

$$N_{254\text{ nm}} = 5,54 \times (13,048\text{min}/0,749\text{mm})^2 = 1681$$

$$N_{350\text{ nm}} = 5,54 \times (12,837\text{min}/0,684\text{mm})^2 = 1951$$

$$N_{420\text{ nm}} = 5,54 \times (12,860\text{min}/0,717\text{mm})^2 = 1782$$

Da det er god separasjon mellom kurkumin og andre ukjente topper i kromatogrammet vurderes kolonnens effektivitet som god nok til formålet.

Retensjonsfaktor for kurkumin ble beregnet med Likning 3 for én prøve ved hver deteksjonsbølgelengde:

$$k_{254\text{ nm}} = (13,048\text{min} - 1,629\text{min})/1,629\text{min} = 7,010\text{min}$$

$$k_{350\text{ nm}} = (12,837\text{min} - 1,629\text{min})/1,629\text{min} = 6,880\text{min}$$

$$k_{420\text{ nm}} = (12,860\text{min} - 1,629\text{min})/1,629\text{min} = 6,894\text{min}$$

Det er ønskelig med retensjonsfaktor  $> 2$  for å gi god avstand mellom væsketoppen og analytten i kromatogrammet. Retensjonen av kurkumin i forhold til væskefronten er gunstig for deteksjon og kvantifisering.

Symmetrifaktor ble beregnet med Likning 4 for én prøve ved hver deteksjonsbølgelengde:

$$A_{S\ 254\ nm} = 6,5\ mm / (2 \times 2,0\ mm) = 1,6$$

$$A_{S\ 350\ nm} = 6,7\ mm / (2 \times 1,7\ mm) = 2,0$$

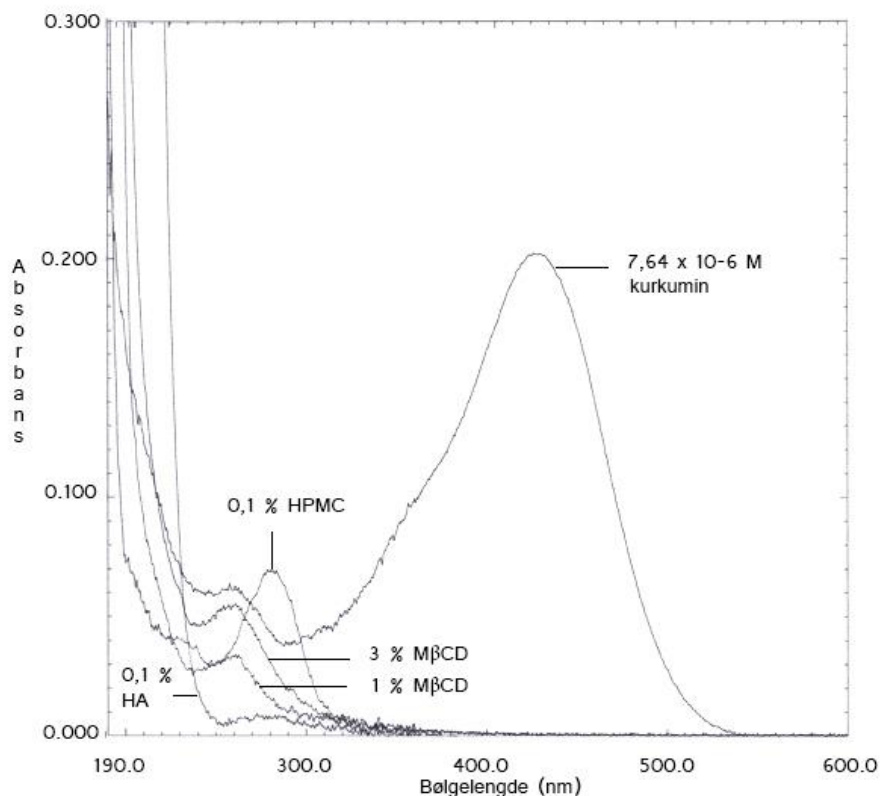
$$A_{S\ 420\ nm} = 7,0\ mm / (2 \times 1,5\ mm) = 2,3$$

Symmetriske topper er gunstig, men sjelden. En symmetrifaktor som varierer mellom 1,6 – 2,3 er akseptabel, men indikerer at topparealet burde benyttes fremfor topphøyden ved kvantifisering av kurkumin med denne metoden.

### 3.1.2. Spesifisitet

Metodens spesifisitet ble målt indirekte ved bruk av absorpsjonsspektra til stoffene som i større eller mindre grad kan befinne seg i prøvene som injeseres på kolonnen.

Absorpsjonsspektra av M $\beta$ CD, HA og HPMC viser ingen interferens med kurkumin ved deteksjonsbølgelengde 420 nm, og neglisjerbar interferens ved deteksjonsbølgelengde 350 nm og 254 nm (Figur 3.1) da prosentandelen hjelpestoff i løste, fortynnede prøver er  $< 0,001\ \%$  (w/v) og polymerene filtreres bort før separasjon på kolonnen.



**Figur 3.1** – Absorpsjonsspektra for  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin, 0,1 % (w/v) HA, 0,1 % (w/v) HPMC, 1 % (w/v) og 3 % (w/v) M $\beta$ CD tilsvarende 1:1- og 1:3-molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD, alle løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

### 3.1.3. Linearitet

Kromatogrammene indikerer at kurkumintoppens areal og høyde som funksjon av konsentrasjon viser en lineær sammenheng i konsentrasjonsområdet  $1,50 \times 10^{-6} - 1,25 \times 10^{-5}$  M (deteksjonsbølgelengde 254 nm),  $1,25 \times 10^{-6} - 1,25 \times 10^{-5}$  M (deteksjonsbølgelengde 350 nm) og  $3,50 \times 10^{-7} - 3,82 \times 10^{-6}$  M (deteksjonsbølgelengde 420 nm). For regresjonslinjen gitt kurkumintoppens areal ved 254 nm og 350 nm var stigningstallet  $3,0 \times 10^{-11}$  M og skjæringspunktet  $7,0 \times 10^{-7}$  M ( $r^2 > 0,998$ ); ved 420 nm var stigningstallet  $7,0 \times 10^{-12}$  M og skjæringspunktet  $2,0 \times 10^{-7}$  M ( $r^2 = 0,995$ ). For regresjonslinjen gitt kurkumintoppens høyde ved 254 nm 350 nm var stigningstallet  $2,0 \times 10^{-9}$  M og skjæringspunktet  $5,0 \times 10^{-7}$  M ( $r^2 > 0,999$ ); ved 420 nm var stigningstallet  $4,0 \times 10^{-10}$  M og skjæringspunktet  $2,0 \times 10^{-7}$  M ( $r^2 = 0,993$ ).

### 3.1.4. Presisjon

Instrumentets presisjon hadde en % RSD mellom 1,6-11,0 % avhengig av deteksjonsbølgelengde, beregning med toppareal eller topphøyde og kurkuminkonsentrasjon i prøven (Tabell 3.1). Verdien for % RSD var generelt lavere ved beregning med topphøyde (1,58-5,85 %) enn med toppareal (1,55-11,0 %), og ofte størst ved de laveste konsentrasjonene. Det var ønskelig med % RSD < 3 %, og dette ble lagt til grunn for fremtidige fortyninger av prøver med kurkumin.

$\lambda$	Kurkumin-konsentrasjon (M)	Instrumentets presisjon			
		Toppareal		Topp høyde	
		Gj.snitt	% RSD	Gj.snitt	% RSD
254 nm	$1,50 \times 10^{-6}$	16087	5,5	430	3,2
"	$3,00 \times 10^{-6}$	1866	2,8	1391	1,6
"	$1,25 \times 10^{-5}$	6259	1,7	7206	1,6
350 nm	$1,25 \times 10^{-6}$	17838	11,0	474	5,9
"	$3,00 \times 10^{-6}$	64372	1,6	1476	3,0
"	$4,50 \times 10^{-6}$	121031	5,1	2528	4,3
420 nm	$3,82 \times 10^{-7}$	32266	7,9	798	3,6
"	$9,55 \times 10^{-7}$	105263	4,2	2203	2,0
"	$3,82 \times 10^{-6}$	538158	2,6	10600	2,0

**Tabell 3.1** – Instrumentets presisjon ved deteksjonsbølgelengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm med ulike kurkuminkonsentrasjoner målt som topphøyde og toppareal.

Metodens presisjon hadde % RSD på 7,33 % beregnet på topphøyde i kromatogrammet og 8,18 % beregnet på toppareal (Tabell 3.2). Forskjellen i % RSD for metodens og instrumentets presisjon ved den gitte deteksjonsbølgelengden og kurkuminkonsentrasjon er akseptabel. Generelt høy % RSD er ikke gunstig og bør tas i betraktning ved vurdering av resultatene. Kondisjonering av kolonnen ble forlenget for å tilstrebe lavere «slope», helst < 700.

Intermediat presisjon ble inkludert for å vise variasjon mellom dager, inkludert metodens presisjon da nye løsninger ble laget jevnlig. Toppareal og -høyde for standardprøver for



kvantifisering av kurkumin i produktene ble samlet, og gjennomsnitt og % RSD ble beregnet (Tabell 3.2). Det var relativt stor variasjon hos alle standardprøvene, både for toppareal og topphøyde. Dette understreker viktigheten av å lage nye standardkurver for hver analyse, og minst én gang daglig ved langvarige analyser.

$\lambda$ (nm)	Kurkumin- kons. (M)	Metodens presisjon				Intermediat presisjon				
		Toppareal		Topp høyde		Ant. inj.	Toppareal		Topp høyde	
		Gj.snitt	% RSD	Gj.snitt	% RSD		Gj.snitt	% RSD	Gj.snitt	% RSD
254	$1,50 \times 10^{-6}$					14	12437	17,5	397	21,2
"	$2,50 \times 10^{-6}$					11	22330	22,1	655	31,5
"	$3,82 \times 10^{-6}$					51	81632	5,2	2214	18,2
350	$1,25 \times 10^{-6}$					14	17627	21,5	453	17,0
"	$2,50 \times 10^{-6}$					11	53495	9,5	1222	13,4
"	$3,82 \times 10^{-6}$					51	78824	12,8	1760	11,2
420	$3,82 \times 10^{-7}$					14	30710	33,2	803	34,4
"	$5,73 \times 10^{-7}$	53675	8,2	1246	7,3	11	59751	32,6	1496	39,6
"	$9,55 \times 10^{-7}$					51	93738	28,9	2356	27,8

**Tabell 3.2** – Metodens presisjon ved deteksjonsbølgelengde 420 nm og kurkuminkonsentrasjon  $5,73 \times 10^{-7}$  M ved bruk av topphøyde og toppareal. Intermediat presisjon ved deteksjonsbølgelengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm ved ulike kurkuminkonsentrasjoner ved bruk av topphøyde og toppareal.

### 3.1.5. Nøyaktighet

Beregnet kurkuminkonsentrasjon varierte ved måling av metodens nøyaktighet, og var generelt lavere enn teoretisk konsentrasjon der beregningene ble gjort på toppareal og høyere enn teoretisk konsentrasjon der beregningene ble gjort på topphøyde (Tabell 3.3).

Nøyaktigheten ble vurdert til å være akseptabel.

$\lambda$	Kurkumin- kons. (M)	Nøyaktighet			
		Toppareal		Topp høyde	
		Beregnet %	% RSD	Beregnet %	% RSD
254 nm	$1,50 \times 10^{-6}$	94	2,0	109	1,9
"	$3,00 \times 10^{-6}$	90	1,9	109	1,3
"	$1,25 \times 10^{-5}$	96	1,4	119	1,4
350 nm	$1,25 \times 10^{-6}$	124	4,6	145	3,8
"	$3,00 \times 10^{-6}$	88	1,1	115	2,5
"	$4,50 \times 10^{-6}$	96	4,3	124	3,9
420 nm	$3,82 \times 10^{-7}$	112	4,2	136	2,2
"	$9,55 \times 10^{-7}$	98	3,3	113	1,6
"	$3,82 \times 10^{-6}$	104	2,5	116	1,9

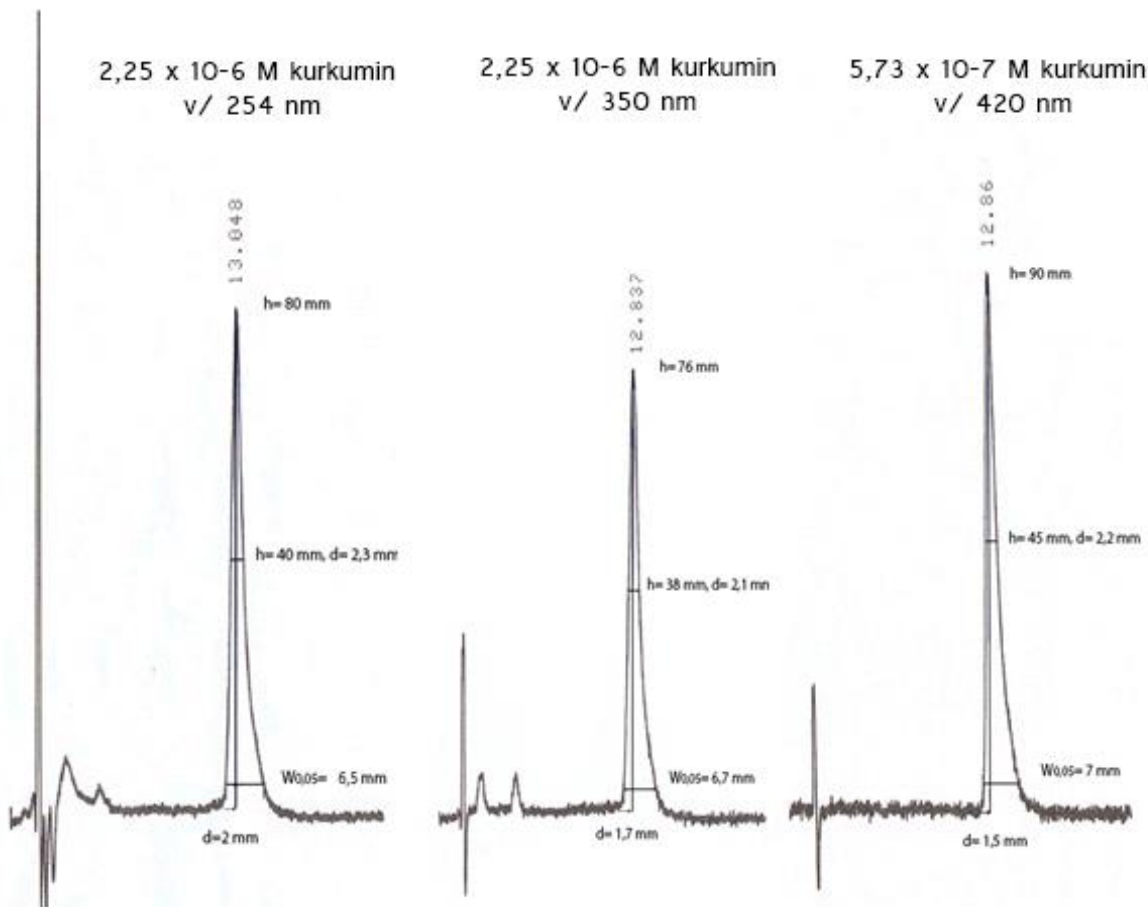
**Tabell 3.3** – Metodens nøyaktighet ved deteksjonsbølglengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm ved ulike kurkuminkonsentrasjoner. Prosent av teoretisk konsentrasjon i prøven og relativt standardavvik er gitt for kvantitering med topp høyde og toppareal.

### 3.1.6. Deteksjonsgrense

LOD ble fastsatt ut fra signal-til-støy forhold og ble beregnet til  $3,90 \times 10^{-7}$  M ved 254 nm,  $3,74 \times 10^{-7}$  M ved 350 nm og  $9,03 \times 10^{-8}$  M ved 420 nm (Figur 3.2).

### 3.1.7. Kvantifiseringsgrense

LOQ ble fastsatt ut fra signal-til-støy forhold og ble beregnet til  $1,31 \times 10^{-6}$  M ved 254 nm,  $1,25 \times 10^{-6}$  M ved 350 nm og  $3,02 \times 10^{-7}$  M ved 420 nm (Figur 3.2).



**Figur 3.2** – HPLC kromatogram av kurkumin ved deteksjonsbølglengdene 254 nm, 350 nm og 420 nm med retensjonstid (minutter), topphøyde (mm), toppbredde ved halve topphøyden og ved 1/20 av topphøyden (mm) samt halve diameteren ved 1/20 av topphøyden (mm).

### 3.1.8. Kvantifiseringsmråde

Kurkumin i en prøve kan kvantifiseres med en akseptabel presisjon og nøyaktighet mellom  $1,50 \times 10^{-6}$  –  $1,25 \times 10^{-5}$  M ved deteksjonsbølglengde 254 nm,  $1,25 \times 10^{-6}$  –  $4,50 \times 10^{-6}$  M ved deteksjonsbølglengde 350 nm, og  $3,82 \times 10^{-7}$  –  $3,82 \times 10^{-6}$  M ved deteksjonsbølglengde 420 nm med denne metoden.

### 3.2. Faseløselighet

Endring i kurkumins løselighet ble studert i vandige løsninger med økende mengde M $\beta$ CD med og uten 0,1 % (w/v) HA eller HPMC. Gjennomsnittlig konsentrasjon (n = 3) ble beregnet (Tabell 3.4). Løseligheten av kurkumin i MQ-vann uten M $\beta$ CD var for lav til å bli detektert med denne metoden, men økte og ble detekterbar i vandig løsning med 0,1 % HA (dog ikke kvantifiserbar). HPMC alene førte ikke til detekterbar kurkuminkonsentrasjon i de vandige løsningene uten M $\beta$ CD.

% (w/v) M $\beta$ CD	Kurkuminkonsentrasjon (M)			Økning i løselighet med HA	Økning i løselighet med HPMC
	÷ polymer	+0,1 % (w/v) HA	+0,1 % (w/v) HPMC		
0,0 %	-	2,45 x 10 <sup>-7</sup> <sup>1)</sup>	-	4,9-48,9 x	-
0,1 %	9,61 x 10 <sup>-7</sup>	1,45 x 10 <sup>-6</sup>	5,93 x 10 <sup>-7</sup>	1,5 x	0,6 x
0,3 %	4,12 x 10 <sup>-6</sup>	1,47 x 10 <sup>-5</sup>	2,00 x 10 <sup>-6</sup>	3,6 x	0,5 x
0,5 %	3,10 x 10 <sup>-5</sup>	1,94 x 10 <sup>-5</sup>	3,73 x 10 <sup>-6</sup>	0,7 x	0,1 x
1,0 %	1,01 x 10 <sup>-4</sup>	6,91 x 10 <sup>-4</sup>	3,01 x 10 <sup>-5</sup>	6,8 x	0,3 x
2,0 %	1,55 x 10 <sup>-4</sup>	1,05 x 10 <sup>-3</sup> <sup>2)</sup>	1,74 x 10 <sup>-5</sup>	6,8 x <sup>2)</sup>	0,1 x
3,0 %	2,57 x 10 <sup>-4</sup>	8,17 x 10 <sup>-4</sup> <sup>2)</sup>	3,63 x 10 <sup>-5</sup>	3,2 x <sup>2)</sup>	0,1 x
6,0 %	6,01 x 10 <sup>-4</sup>	9,88 x 10 <sup>-4</sup> <sup>2)</sup>	1,77 x 10 <sup>-4</sup>	1,6 x <sup>2)</sup>	0,3 x
10,0 %	9,09 x 10 <sup>-4</sup>	1,06 x 10 <sup>-3</sup> <sup>2)</sup>	4,19 x 10 <sup>-4</sup>	1,2 x <sup>2)</sup>	0,5 x

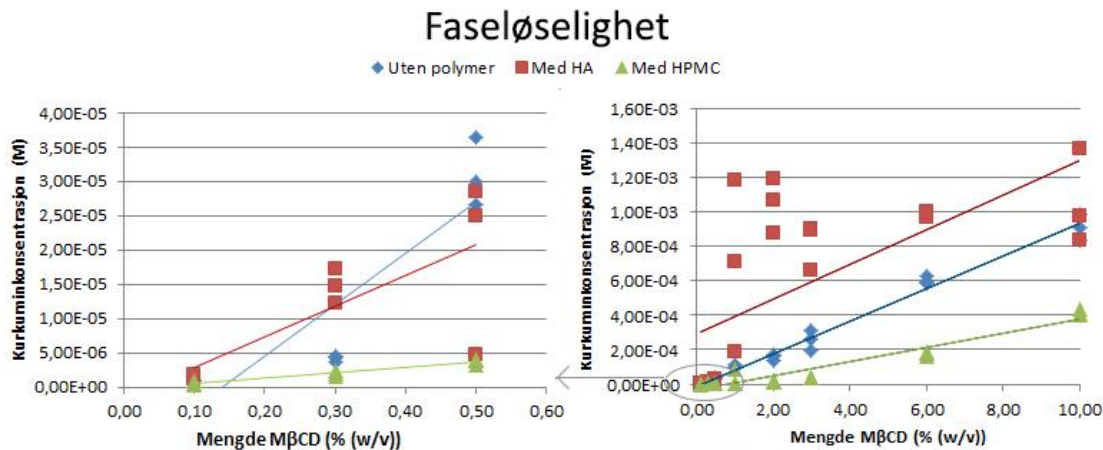
**Tabell 3.4** – Gjennomsnittlig løselighet av kurkumin i vandig løsning med økende mengde M $\beta$ CD med og uten 0,1 % (w/v) HA eller HPMC, samt relativ økning i løselighet ved tilstedeværelse av 0,1 % HA eller HPMC.

<sup>1)</sup> Under kvantifiseringsgrensen til metoden.

<sup>2)</sup> Løsningene oppnådde fullstendig oppløsning av kurkumin. Økning i kurkumins løselighet i MQ-vann med 0,1 % (w/v) HA og > 2 % (w/v) M $\beta$ CD sammenlignet med kun > 2 % (w/v) M $\beta$ CD er trolig høyere enn beregnet.

En økning i kurkumins løselighet med økende mengde M $\beta$ CD ble observert med og uten polymer i løsningen, hvilket også er observert tidligere [85]. Faseløselighetskurvene er alle av type A<sub>L</sub> (Figur 3.3), hvilket indikerer 1:1 inklusjonskompleksring mellom cyclodekstrin og kurkumin [86]. Løsningene med 0,1 % (w/v) HPMC oppnår lavest kurkuminkonsentrasjon uansett mengde M $\beta$ CD, og de med 0,1 % (w/v) HA høyest (Tabell 3.4). Ettersom

kurkuminkonsentrasjonen i løsningene uten M $\beta$ CD var under LOQ til metoden, kan ikke komplekseringskonstanten til kurkumin-cyklodekstrin-kompleksene beregnes direkte. Stigningstallene for de ulike faseløselighetskurvene viser forskjeller i relativ affinitet mellom kurkumin og M $\beta$ CD med og uten polymer i løsningen.



**Figur 3.3** – Kurkuminkonsentrasjon i løsninger med kurkumin med og uten 0,1 % (w/v) HA/HPMC og økende konsentrasjon M $\beta$ CD.

Det er en lineær sammenheng mellom løseligheten til kurkumin i vann med 0,1-10,0 % (w/v) M $\beta$ CD uten polymer ( $r_1^2 = 0,997$ ). Stigningstallet for regresjonslinjen mellom 0,1-10,0 % (w/v) M $\beta$ CD uten polymer er  $9,4 \times 10^{-5}$ . Det er også en lineær sammenheng mellom løseligheten til kurkumin i vann med HA og 0,1-1,0 % (w/v) M $\beta$ CD ( $r_2^2 = 0,915$ ). Over 1,0 % (w/v) M $\beta$ CD inneholdt ikke løsningene overskudd av kurkumin, og faseløselighetskurven kan ikke lenger benyttes til å vurdere støkiometri ved inklusjonskompleksing. Stigningstallet for regresjonslinjen mellom 0,1-1,0 % M $\beta$ CD med 0,1 % (w/v) HA er  $8,1 \times 10^{-4}$ . Det er også en lineær sammenheng mellom løseligheten til kurkumin i vann med HPMC og 0,1-10,0 % (w/v) M $\beta$ CD ( $r_3^2 = 0,969$ ). Stigningstallet for regresjonslinjen mellom 0,1-10,0 % M $\beta$ CD med 0,1 % (w/v) HPMC er  $4,1 \times 10^{-5}$ .

### 3.3. Ristetid

Vurdering av optimal ristetid for produktene ble gjort ved å se hvilken ristetid som ga størst utbytte. Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon ble beregnet for hver ristetid (Tabell 3.5, Vedlegg). 1 time risting på ristebrett ga høyest gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon for

(1:1), med noe lavere utbytte med ½ time risting (ikke signifikant ( $P > 0,05$ )), og enda lavere utbytte med 2 og 24 timer risting. ½ time og 1 time risting på ristebrett ga ingen nevneverdig forskjell i gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon for (1:3) med deretter minkende utbytte med lenger ristetid. 1 time ble valgt til standard ristetid ved produksjon av disse produktene.

### **3.4. Karakterisering av ferske produkter**

#### **3.4.1. Vanninnhold**

Målingene av vanninnhold gjenspeiler den variable luftfuktigheten gjennom året, spesielt med utslag på spredning mellom batcher (Tabell 3.6). Vanninnholdet i produktene varierte noe fra parallell til parallell og batch til batch, med et gjennomsnittlig vanninnhold på  $3,5 \pm 0,7$  % (w/w) før ekvilibrering med luftfuktigheten, og  $7,0 \pm 2,6$  % (w/w) etter ekvilibrering med luftfuktigheten (Tabell 3.6).

#### **3.4.2. Kvantifisering av kurkumininnhold**

Det ble tatt to uttak fra hver parallell for beregning av kurkumininnhold, dette for å se på homogenitet i produktene. Variasjonen innad i produktene var generelt ikke mer enn 0,3 % (w/w), men så mye som 1,2 % (w/w) og over 2 % (w/w) variasjon forekom. Gjennomsnittlig kurkumininnhold var høyere i (1:3)-produktene enn i (1:1)-produktene (Tabell 3.6).

### **3.5. Svinn under produksjon**

Mye kurkumin går tapt under produksjon. Det har blitt observert kurkuminrester i halsen på rotavaporen etter bruk, samt at noe henger igjen i rundkolbene som fast stoff etter risting. En del kurkumin faller også bort ved første filtrering etter at vandige produkter har stått til risting. Hvor mye dette totale tapet er, er beregnet ut fra tilsatt kurkumin stamløsning til produktene ( $7,64 \times 10^{-3}$  M) og konsentrasjon beregnet etter risting i 1 time og filtrering 0,45  $\mu\text{m}$ . Gjennomsnittlig svinn av kurkumin under produksjon før frysetørring er  $92 \pm 2,6$  % for (1:1)-produktene og  $59 \pm 6,1$  % for (1:3)-produktene (Tabell 3.6).

Det ble ikke observert noe svinn av kurkumin til filteret da kurkumin var fullstendig oppløst i metanol, med et gjennomsnittlig utbytte på  $101 \pm 1$  % (Tabell 3.7, Vedlegg). Ingen konsentrasjonsavhengig adhesjon ble observert med så lave konsentrasjoner som ble benyttet her.

Batchnr.:	Kurkumin- innhold % (w/w)	Vanninnhold (%)		Luft- fuktighet (%)	Svinn (%)
		før ekvilibrering	etter ekvilibrering		
<b>Produkt:</b>	(1:1-HA)				
1	$1,2 \pm 0,3$ (n = 4)	$4,3 \pm 1,3$	$6,9 \pm 2,8$	40,8	$92,0 \pm 0,9$
2	$1,4 \pm 0,2$ (n = 3)		$7,4 \pm 3,1$	48,0	$87,2 \pm 9,3$
3*	$3,4 \pm 2,2$ (n = 4)		$8,5 \pm 2,5$	39,6	$92,1 \pm 5,4$
4	$2,2 \pm 0,2$ (n = 5)		$5,6 \pm 1,4$	8,1	$91,5 \pm 2,8$
<b>Produkt:</b>	(1:3-HA)				
1	$4,5 \pm 0,3$ (n = 4)	$3,5 \pm 0,3$	$14,3 \pm 2,2$	51,1	$72,8 \pm 1,4$
2	$2,4 \pm 1,2$ (n = 4)		$5,5 \pm 1,4$	48,0	$56,8 \pm 7,3$
3	$6,2 \pm 0,3$ (n = 4)		$6,6 \pm 2,1$	39,6	$58,9 \pm 7,5$
4	$3,8 \pm 0,5$ (n = 8)		$8,7 \pm 2,0$	21,9	$53,0 \pm 1,9$
5	$4,9 \pm 0,8$ (n = 5)		$7,6 \pm 1,4$	24,1	$57,1 \pm 4,3$
6	$4,5 \pm 0,3$ (n = 4)		$5,6 \pm 0,9$	8,10	$54,4 \pm 3,6$
<b>Produkt:</b>	(1:1-HPMC)				
1	$2,1 \pm 0,3$ (n = 4)	$3,5 \pm 0,8$	$7,1 \pm 1,2$	16,6	$93,7 \pm 0,5$
2	$1,9 \pm 0,6$ (n = 4)		$8,1 \pm 2,2$	9,30	$91,5 \pm 0,3$
3	$2,3 \pm 0,8$ (n = 4)		$8,6 \pm 0,3$	10,5	$95,8 \pm 2,6$
<b>Produkt:</b>	(1:3-HPMC)				
1	$4,6 \pm 0,2$ (n = 4)	$2,5 \pm 0,3$	$4,5 \pm 1,1$	16,6	$54,3 \pm 3,6$
2	$4,4 \pm 0,4$ (n = 4)		$3,3 \pm 1,2$	9,30	$63,5 \pm 1,2$
3	$4,2 \pm 0,5$ (n = 4)		$3,4 \pm 0,4$	10,5	$58,1 \pm 2,6$

**Tabell 3.6** – Kurkumininnhold, vanninnhold og tap av kurkumin under produksjon i ferske produkter  $\pm$  SD.

\* Høyt gjennomsnittlig kurkumininnhold grunnet uteligger ( $6,9$  % (w/w)).

### 3.6. Hydreringstid

(1:1-HA)-produktene løste seg fullstendig i MQ-vann etter ~12 sekunder, mens (1:3-HA)-produktene løste seg etter ~5 sekunder (Tabell 3.8). Størsteparten av produktene løste seg i løpet av 2-4 sekunder, men enkelte aggregater i noen prøver brukte lenger tid på å løses fullstendig.

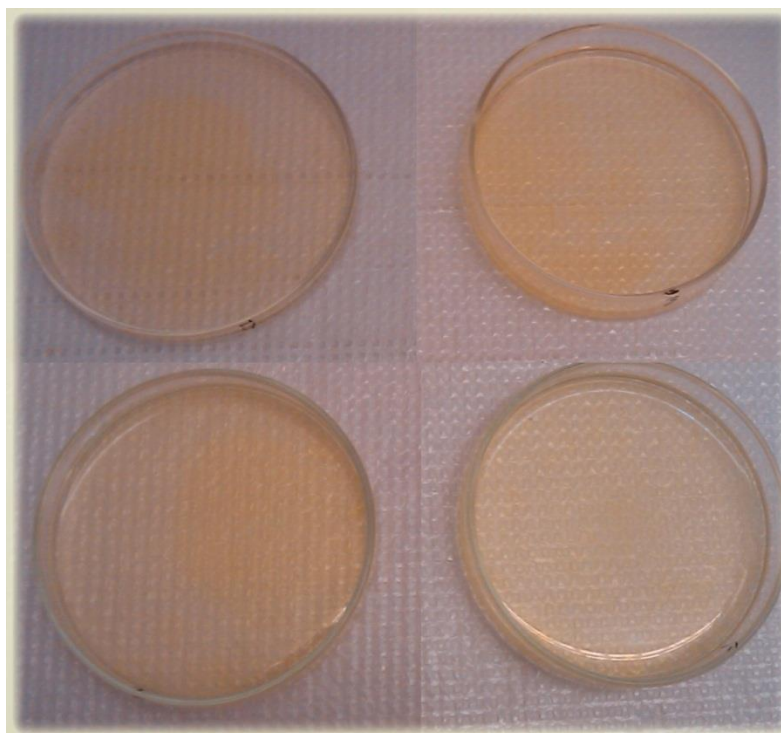
Produkt	Hydreringstid (sekunder)	Gjennomsnitt $\pm$ SD
(1:1-HA)	9	12 $\pm$ 4
(1:1-HA)	7	
(1:1-HA)	13	
(1:1-HA)	17	
(1:3-HA)	8	5 $\pm$ 3
(1:3-HA)	6	
(1:3-HA)	2	
(1:3-HA)	4	
(1:1-HPMC)	46	52 $\pm$ 4
(1:1-HPMC)	52	
(1:1-HPMC)	53	
(1:1-HPMC)	56	
(1:3-HPMC)	24	25 $\pm$ 3
(1:3-HPMC)	29	
(1:3-HPMC)	25	
(1:3-HPMC)	23	

**Tabell 3.8** – Tid i sekunder ( $\pm$  SD) før fullstendig oppløsning av produkt i MQ-vann.

Etter fullstendig hydrering så HA-løsningene gule ut, med «skyer» av kraftigere gul farge, og et blålig, tynt lag oppå (Figur 3.4). Dette oljelignende laget ble også observert under produksjon da MQ-vann ble tilsatt prøvene etter avdamping på rotavapor. Ettersom forskningsgruppen selv har syntetisert kurkumin (se «2.2.1 Råvarer») og renheten ble bestemt



til > 99 % (upubliserede resultater), vet vi ikke per i dag hva dette oljeaktige laget er.



**Figur 3.4** – (1:1-HA) (nederst) og (1:3-HA) (øverst) i MQ-vann umiddelbart etter oppløsning.

(1:1-HPMC) løste seg fullstendig i MQ-vann etter ~52 sekunder og (1:3-HPMC) etter ~25 sekunder (Tabell 3.8). Oppløsningen var jevnere i disse produktene til de var fullstendig oppløst, løsningen ble gradvis mer gul farget uten «skyer». Et oljelignende lag ble også observert på disse løsningene.

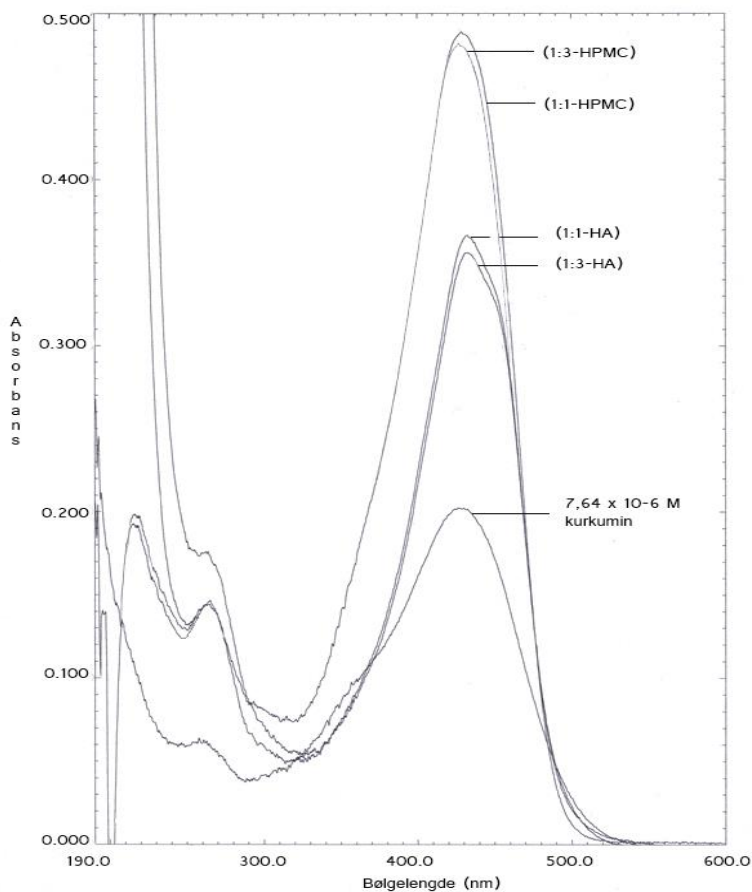
### 3.7. Absorpsjonsspektra

Det ble tatt opp absorpsjonsspektra av kurkumin, M $\beta$ CD, HA og HPMC til sammenligning og indirekte vurdering av spesifisiteten til HPLC-metoden. Kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol har sitt absorpsjonsmaksimum ved 426 nm med en skulder ved ~350 nm samt en liten topp ved 262 nm (Figur 3.1). M $\beta$ CD, HA og HPMC har absorpsjonsmaksimum ved henholdsvis 261 nm, 277 nm og 280 nm (Figur 3.1).

Kombinasjoner med kurkumin og hjelpestoffene førte til endringer i absorpsjonsspektrene. Oppløsning av kurkumin i 0,1 % (w/v) HA førte til redusert absorpsjon ved kurkumins absorpsjonsmaksimum og to maksima ved 367 nm og 430 nm (Figur 3.5, Vedlegg)

Oppløsning av kurkumin i > 0,1 % (w/v) HA ga mindre absorpsjon ved 430 nm, hvilket indikerer andre interaksjoner mellom polymeren og kurkumin ved høyere konsentrasjoner av polymeren (Figur 3.5, Vedlegg). Oppløsning av kurkumin i 0,1 % (w/v) HPMC førte til noe økt absorpsjon ved kurkumins absorpsjonsmaksimum og en større topp ved 280 nm (Figur 3.6, Vedlegg). Kombinasjon av kurkumin og 1-4 % (w/v) M $\beta$ CD doblet intensiteten ved kurkumins absorpsjonsmaksimum og ga et svakt blåskift (Figur 3.7, Vedlegg). Tilsetning av både 0,1 % (w/v) HA og 2 % (w/v) M $\beta$ CD til kurkumin medførte nesten en dobling i intensiteten ved kurkumins absorpsjonsmaksimum (Figur 3.8, Vedlegg). Tilsetning av 0,1 % (w/v) HPMC og 2 % (w/v) M $\beta$ CD til kurkumin ga doblet intensitet ved kurkumins absorpsjonsmaksimum og et lite blåskift her, samt økt intensitet ved 280 nm (Figur 3.6, Vedlegg). En endring i absorpsjonen ved tilsetning av økende mengde M $\beta$ CD, HA, HPMC eller både CD og polymer indikerer interaksjoner mellom kurkumin og hjelpestoffene av ulik grad og med forskjellige typer bindinger.

De frysetørrete produktene med HA hadde tilsvarende absorpsjonsspektra som referanseløsningen med kurkumin, 0,1 % (w/v) HA og 2 % (w/v) M $\beta$ CD (Figur 3.9). De frysetørrete produktene med HPMC hadde tilnærmet like absorpsjonsspektra som referanseløsningen med kurkumin, 0,1 % (w/v) HPMC og 2 % (w/v) M $\beta$ CD, men med en forskyvning av toppen ved 280 nm til 265 nm og en skarp topp ved 199 nm (Figur 3.9).



**Figur 3.9** – Absorpsjonsspektra for kurkumin ( $7,64 \times 10^{-6}$  M), (1:1-HA), (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) tilsvarende  $20 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

### 3.8. Fotostabilitet

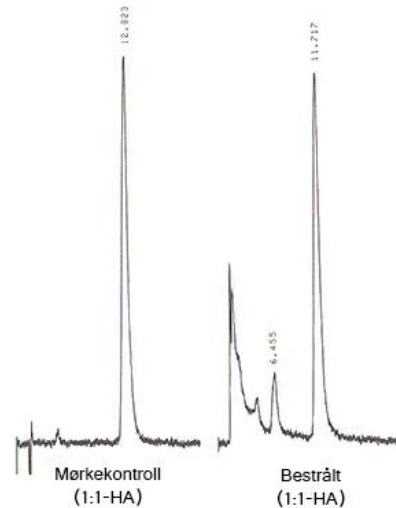
Før bestråling i SUNTEST fremstod (1:1)-produktene solgule, (1:3)-produktene gul-oransje og ren kurkumin oransje. Etter bestråling til lysdose  $22\,540 \text{ kJ/m}^2$  hadde mørkekontrollene en blassere farge enn den opprinnelige, bestrålt (1:1)-produktene var gjennomgående hvite, (1:3)-produktene var gjennomgående kremhvite (Figur 3.10), mens ren kurkumin var tilsynelatende uendret.



**Figur 3.10** – (1:3-HA) bestrålt i SUNTEST til lysdose 22 540 kJ/m<sup>2</sup> (til venstre) og (1:3-HA) mørkekontroll (til høyre). Temperaturstrips viser en temperaturøkning > 60 °C i de bestrålte prøvene, mens temperaturen har holdt seg < 37 °C i mørkekontrollen.

### 3.8.1. Kvantifisering av kurkumininnhold

Kurkumininnholdet i prøvene før og etter bestråling i SUNTEST ble beregnet med HPLC med deteksjonsbølglengde 350 nm for å fange opp både kurkumin og eventuelle nedbrytningsprodukter med absorpsjon ved lavere bølglengder. Det var god grunnlinjeseparasjon mellom ukjente topper i front med mellom 1 og 7 minutters retensjonstid, værende eksempelvis spaltningsprodukter, forurensninger eller komplekser med mobilfasen, og kurkumineluering etter ~11 minutter (Figur 3.11). Toppene detektert før 7 minutter hadde stedvis ikke grunnlinjeseparasjon, og ofte for lavt signal for deteksjon.



**Figur 3.11** – Typiske kromatogrammer for mørkekontroller og bestrålte prøver etter SUNTEST-bestråling.

Fotostabilitetsforsøket viser at kurkumininnholdet i produktene minket drastisk i løpet av bestrålingsperioden (Tabell 3.9 og 3.10). I noen paralleller med bestrålt (1:1-HA) økte derimot beregnet kurkumininnhold. Beregnet kurkumininnhold økte også i de fleste mørkekontrollene, bortsett fra i (1:3-HPMC) (Tabell 3.9 og 3.10). Den bestrålte prøven av ren kurkumin fikk en nesten dobling av beregnet kurkumininnhold, mens mørkekontrollen var tilnærmet uendret (Tabell 3.10). Inkluderte temperaturstrips i de bestrålte prøvene viste en maksimal temperatur i SUNTEST-kammeret på 60-65 °C, som trolig har vært innvirkende på utfallet.

<b>Produkt:</b>	<b>Kurkumininnhold % (w/w)</b>		
	<b>Før bestråling</b>	<b>Etter bestråling</b>	<b>% endring</b>
<b>(1:1-HA)</b>			
Bestrålt P1	2,30	0,06	-97,39
Bestrålt P2	2,35	0,16	-93,19
Bestrålt P3*	6,90	12,67	+83,62
Bestrålt P4	2,10	2,37	+12,86
Bestrålt P5	2,20	0,59	-73,18
Bestrålt P6	2,43	0,11	-95,47
Bestrålt P7	2,11	0,10	-95,26
Bestrålt P8	1,97	0,05	-97,46
Kontroll P1	2,30	2,20	-4,35
Kontroll P2	2,35	2,21	-5,96
Kontroll P3*	6,90	6,97	+1,01
Kontroll P4	2,10	2,33	+10,95
Kontroll P5	2,20	2,95	+34,09
Kontroll P6	2,43	6,57	+170,37
Kontroll P7	2,11	4,69	+122,27
Kontroll P8	1,97	3,45	+75,13
<b>(1:3-HA)</b>			
Bestrålt P1	3,75	0,02	-99,47
Bestrålt P2	5,50	0,03	-99,45
Bestrålt P3	4,45	0,02	-99,55
Bestrålt P4	5,55	0,02	-99,64
Kontroll P1	3,75	8,78	+134,13
Kontroll P2	5,50	9,95	+80,91
Kontroll P3	4,45	7,75	+74,16
Kontroll P4	5,55	7,87	+41,80

**Tabell 3.9** - Kurkumininnhold % (w/w) i (1:1-HA) og (1:3-HA) før og etter bestråling, inkludert prosentvis endring i kurkumininnhold etter bestråling.

\* Høyt kurkumininnhold før bestråling kan forklares med at filteret trolig sprakk under filtrering før frysetørring av det uferdige produktet.

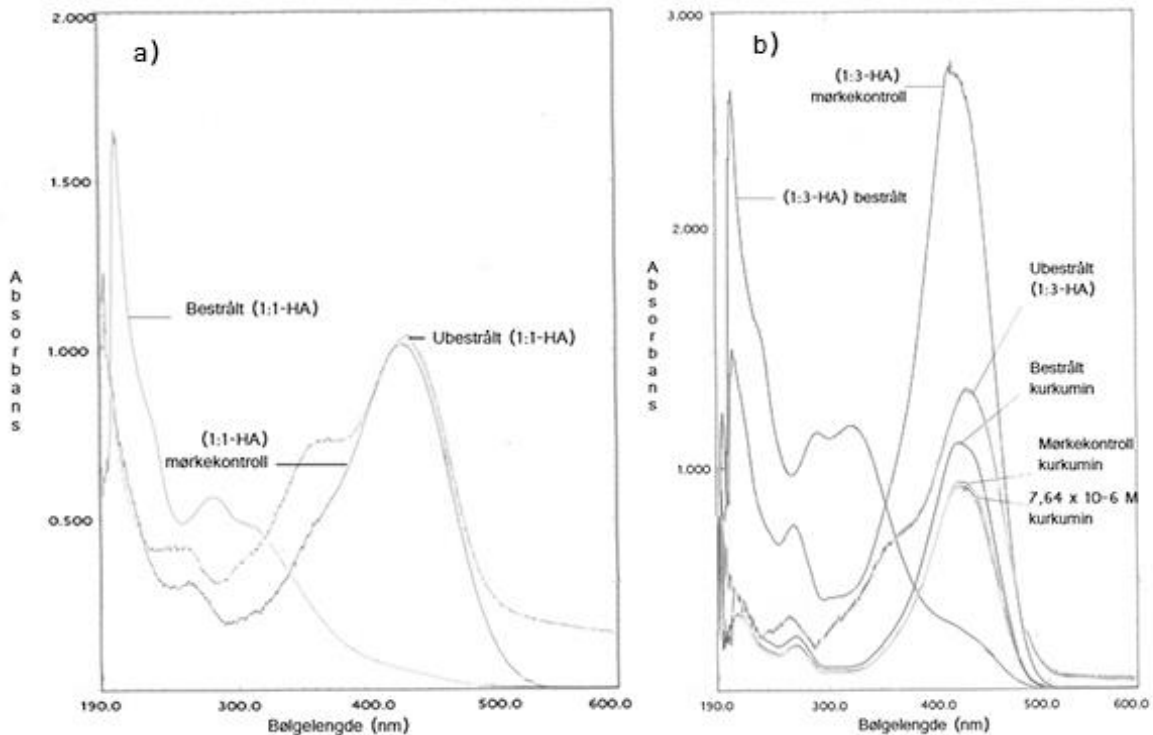
<b>Produkt:</b>	<b>Kurkumininnhold % (w/w)</b>		
	<b>Før bestråling</b>	<b>Etter bestråling</b>	<b>% endring</b>
<b>(1:1-HPMC)</b>			
Bestrålt P1	1,49	0,22	-85,2
Bestrålt P2	2,00	0,01	-99,5
Bestrålt P3	1,42	0,05	-96,5
Bestrålt P4	2,63	0,17	-93,5
Kontroll P1	1,49	1,78	+19,5
Kontroll P2	2,00	1,85	-7,50
Kontroll P3	1,42	2,17	+52,8
Kontroll P4	2,63	3,36	+27,8
<b>(1:3-HPMC)</b>			
Bestrålt P1	4,41	1,10	-75,1
Bestrålt P2	4,10	0,10	-97,6
Bestrålt P3	4,43	0,31	-93,2
Bestrålt P4	4,56	0,27	-93,4
Kontroll P1	4,41	3,96	-10,2
Kontroll P2	4,10	2,33	-43,2
Kontroll P3	4,43	4,29	-3,20
Kontroll P4	4,56	3,62	-20,6
<b>Kurkumin</b>			
Bestrålt	100	186,20	+86,20
Kontroll	100	101,86	+1,86

**Tabell 3.10** - Kurkumininnhold % (w/w) i (1:1-HPMC), (1:3-HPMC) og ren kurkumin før og etter bestråling, inkludert prosentvis endring i kurkumininnhold etter bestråling.

### 3.8.2. Absorpsjonsmåling av bestrålte prøver

Bestråling av (1:1-HA) til lysdose 22 540 kJ/m<sup>2</sup> i SUNTEST førte til redusert absorpsjon ved ~420 nm der kurkumin har sitt absorpsjonsmaksimum, og økt absorpsjon ved kortere bølgelengder. Mørkekontrollens absorpsjonsmaksimum er ved 423 nm i forhold til 430 nm i ubestrålt produkt, og absorpsjonen er forholdsvis redusert rundt 350 nm (Figur 3.12a).

Bestråling av (1:3-HA) medførte redusert absorpsjon rundt 420 nm, og to nye topper ved 285 nm og 317 nm. Mørkekontrollene hadde en blåforskyvning av absorpsjonsmaksimum fra 427 nm i ferskt produkt til 421 nm, samt økt intensitet ved denne bølgelengden (Figur 3.12b).

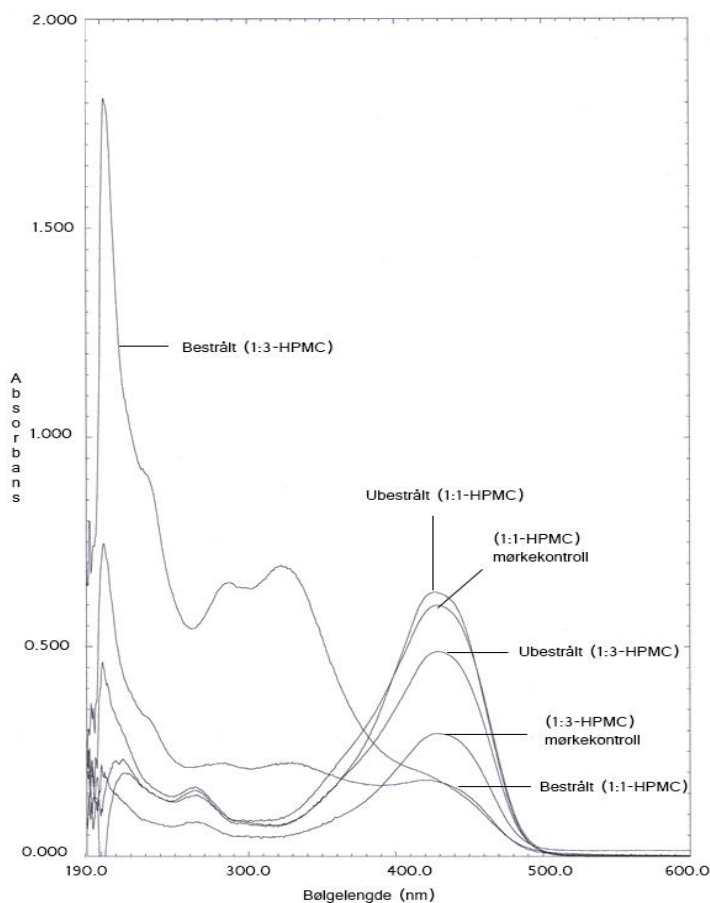


**Figur 3.12** – a) Absorpsjonsspektra for nylaget (1:1-HA), bestrålt (1:1-HA) og (1:1-HA) mørkekontroll løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol. b) Absorpsjonsspektra for nylaget (1:3-HA), bestrålt (1:3-HA) og fast kurkumin, (1:3-HA) og kurkumin mørkekontroll, og  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

Bestrålt ren kurkumin og mørkekontroll hadde samme form på absorpsjonsspektrene som ubestrålt kurkumin. Sammenlignet med spekteret til ubestrålt kurkumin hadde mørkekontrollen uendret intensitet, mens bestrålt kurkumin hadde økt intensitet ved 423 nm (Figur 3.12b).

Bestråling av (1:1-HPMC) medførte redusert absorpsjon rundt 420 nm, og relativt jevn absorpsjon mellom 250 nm og 450 nm med to små topper ved 283 nm og 329 nm. Mørkekontrollene hadde uendret absorpsjonsspekter i forhold til nylaget produkt (Figur 3.13).

Bestråling av (1:3-HPMC) medførte redusert absorpsjon rundt 420 nm, og økt absorpsjon ved kortere bølgelengder. To topper ved 286 nm og 326 nm kommer tydelig fram i spektrene. Mørkekontrollene hadde uendret absorpsjonsspekter i forhold til nylaget produkt (Figur 3.13).



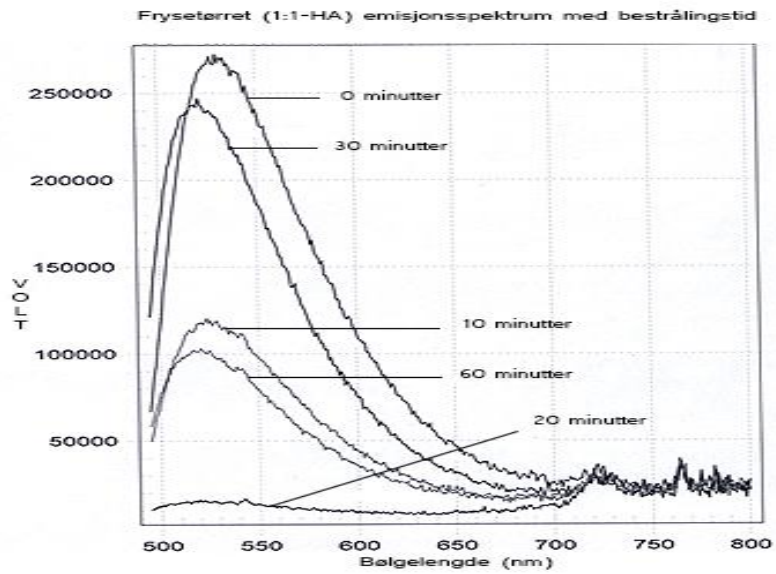
**Figur 3.13** – Absorpsjonsspektra for nylaget (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC), bestrålte produkter i SUNTEST til 22 540 kJ/m<sup>2</sup> og mørkekontroller løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

### 3.8.3. Fluorescensspektroskopi

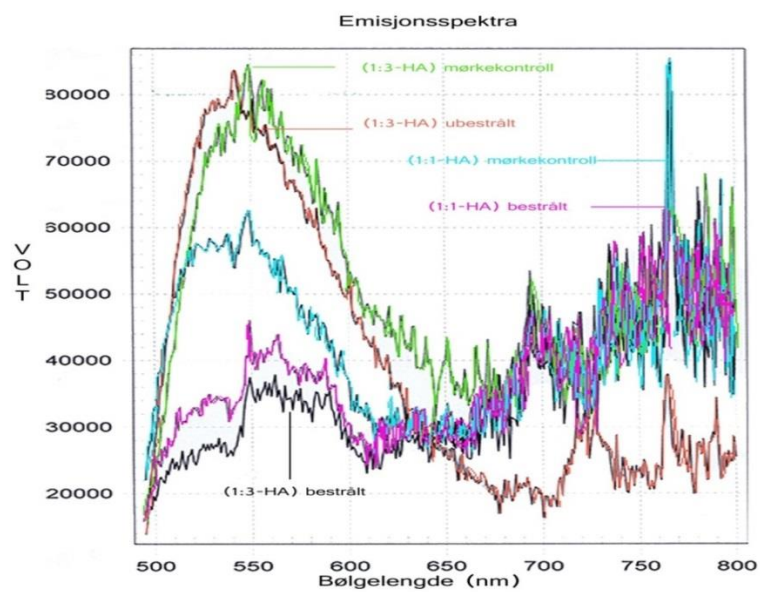
Fersk frysetørret (1:1-HA) eksitert ved 420 nm hadde emisjonsmaksimum ved 531 nm (Figur 3.14). Etter begynt bestråling var emisjonsmaksimum 524 nm. Det var ingen sammenheng mellom endring i intensitet ved emisjonsmaksimum og bestrålingstiden (Figur 3.14).

Emisjonsspekter av (1:1-HA) bestrålt til lysdose 22 540 kJ/m<sup>2</sup> viser en halvering i intensitet ved emisjonsmaksimum i forhold til mørkekontrollen, med tilnærmet uendret form og emisjonsmaksimum, og 3 ganger høyere intensitet i ferskt produkt enn i mørkekontrollen (Figur 3.15).

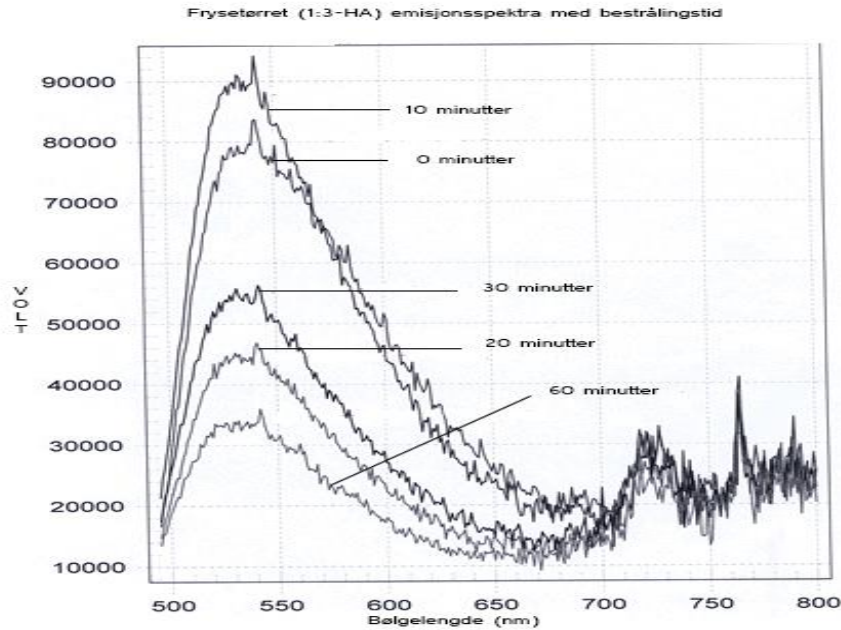




**Figur 3.14** – Emisjonsspektra for (1:1-HA) montert i prøveholder ubestrålt, og bestrålt i 0, 10, 20, 30 og 60 minutter i SUNTEST.

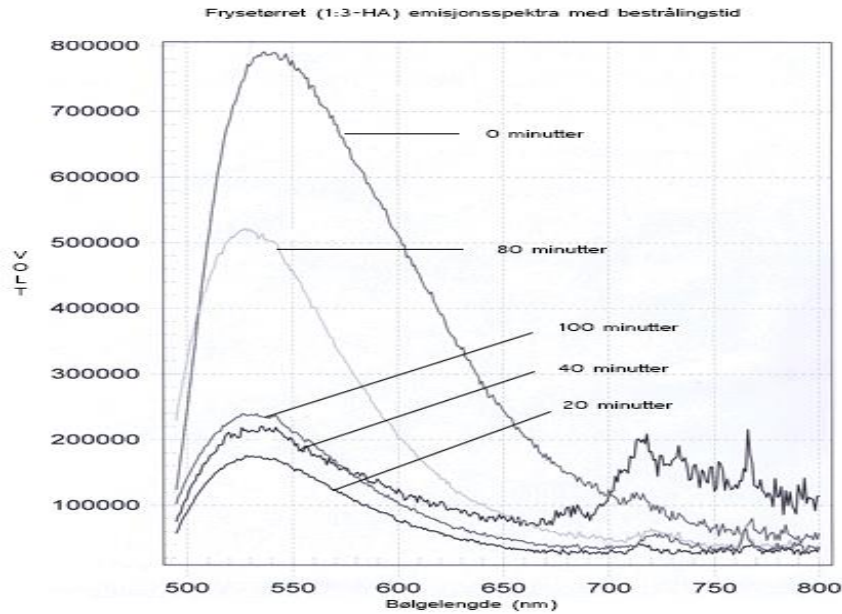


**Figur 3.15** - Emisjonsspektra for ubestrålt (1:3-HA), bestrålt (1:3-HA) og (1:1-HA) til 22 540 kJ/m<sup>2</sup>, og mørkekontroller for (1:3-HA) og (1:1-HA), alle som fast stoff i prøveholder.



**Figur 3.16** – Emisjonsspektra for (1:3-HA) montert i prøveholder ubestrålt, og bestrålt i 0, 10, 20, 30 og 60 minutter i SUNTEST.

Fersk frysetørret (1:3-HA) eksitert ved 420 nm hadde emisjonsmaksimum ved 541 nm (Figur 3.16). Emisjonsspektra til fast prøve montert i prøveholder viste noe høyere intensitet etter 10 minutter bestråling i SUNTEST-kammeret enn for ferskt produkt og en forskyvning til maksimum ved 534 nm. Intensiteten på spektrene ved emisjonsmaksimum varierte med bestrålingstiden (Figur 3.16). Gjentakelse av forsøket med lengre bestrålingsintervaller viste den samme trenden med økende og minkende intensitet ved emisjonsmaksimum (Figur 3.17). Emisjonsspekter av (1:3-HA) bestrålt til lysdose 22 540 kJ/m<sup>2</sup> i SUNTEST har redusert emisjon ved emisjonsmaksimum i forhold til mørkekontrollen (Figur 3.15). Mørkekontrollen med (1:3-HA) viser et skift i emisjonsmaksimum fra 541 nm til 550 nm med like høy intensitet i forhold til ferskt produkt, men høyere intensitet i mørkekontrollen ved lengre bølgelengder (Figur 3.15).

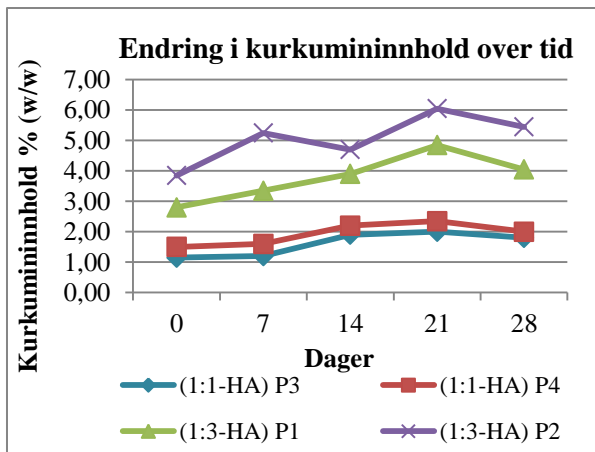


**Figur 3.17** – Emisjonsspektra for (1:3-HA) montert i prøveholder ubestrålt, og bestrålt i 20, 40, 80 og 100 minutter i SUNTEST.

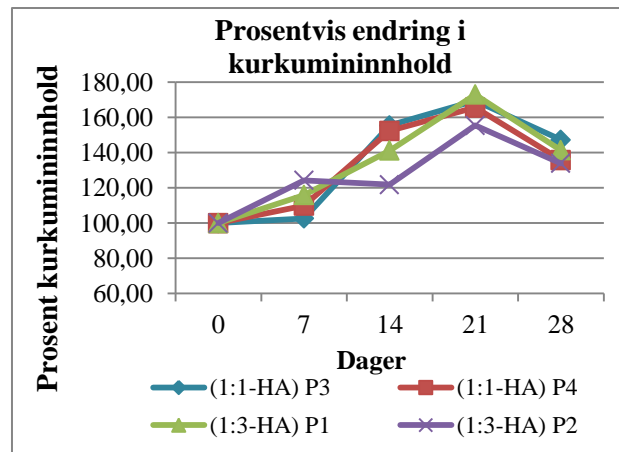
### 3.9. Akselerert holdbarhet

#### 3.9.1. Kvantifisering av kurkumininnhold

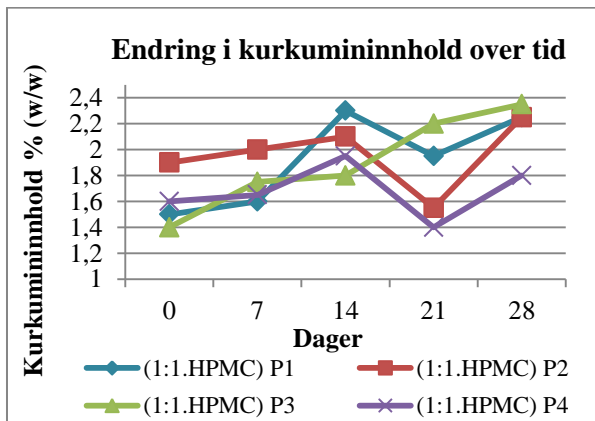
For både (1:1-HA) og (1:3-HA) (Figur 3.18 og 3.19) økte tilsynelatende kurkumininnholdet i løpet av de 14-21 første dagene før det sank igjen til ~1,4 ganger utgangsmengden (Tabell 3.11, Vedlegg). For både (1:1-HPMC) (Figur 3.20 og 3.21) og (1:3-HPMC) (Figur 3.22 og 3.23) økte gjennomsnittlig kurkumininnholdet i løpet av de første 14 dagene, men i mindre grad enn i produktene med HA. Det beregnede kurkumininnholdet sank igjen etter ~21 dager, mest uttalt i (1:3-HPMC), og økte deretter etter 28 dager til ~1,2 ganger utgangsmengden i (1:3-HPMC) og ~1,4 ganger utgangsmengden for (1:1-HPMC) (Tabell 3.12 og 3.13, Vedlegg).



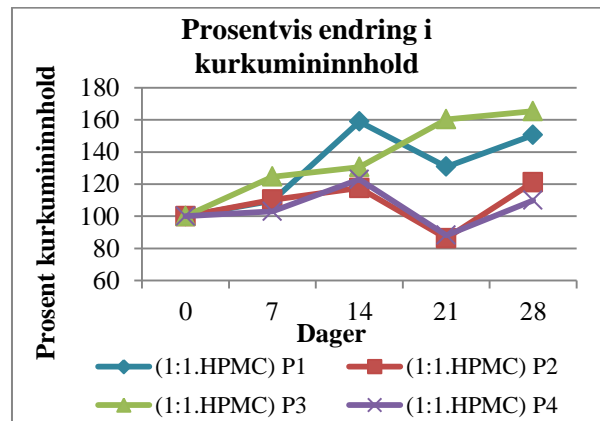
**Figur 3.18** – Gjennomsnittlig endring i kurkumininnhold % (w/w) i (1:1-HA) og (1:3-HA) i løpet av 28 dager ved 40 °C (n = 2).



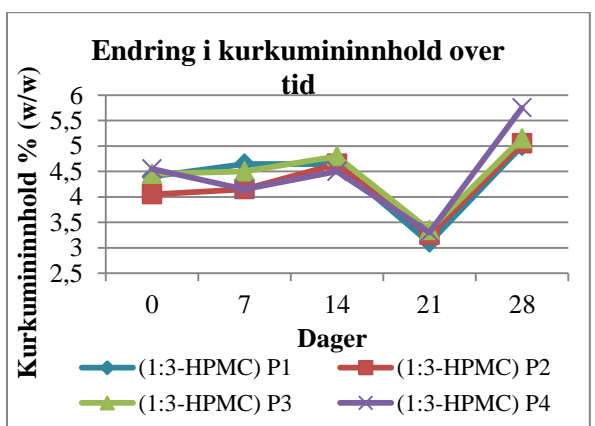
**Figur 3.19** – Prosentvis endring i gjennomsnittlig kurkumininnhold i HA-produktene i løpet av 28 dager ved 40 °C i forhold til utgangspunktet (dag 0) (n=2).



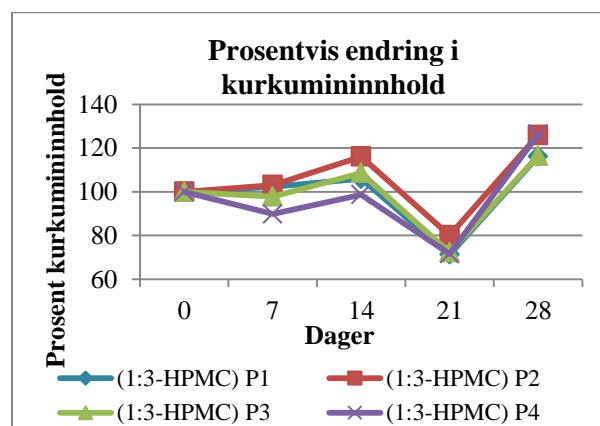
**Figur 3.20** – Gjennomsnittlig endring i kurkumininnhold % (w/w) i (1:1-HPMC) i løpet av 28 dager ved 40 °C (n = 4).



**Figur 3.21** – Prosentvis endring i gjennomsnittlig kurkumininnhold i (1:1-HPMC) i løpet av 28 dager ved 40 °C i forhold til utgangspunktet (dag 0) (n=4).



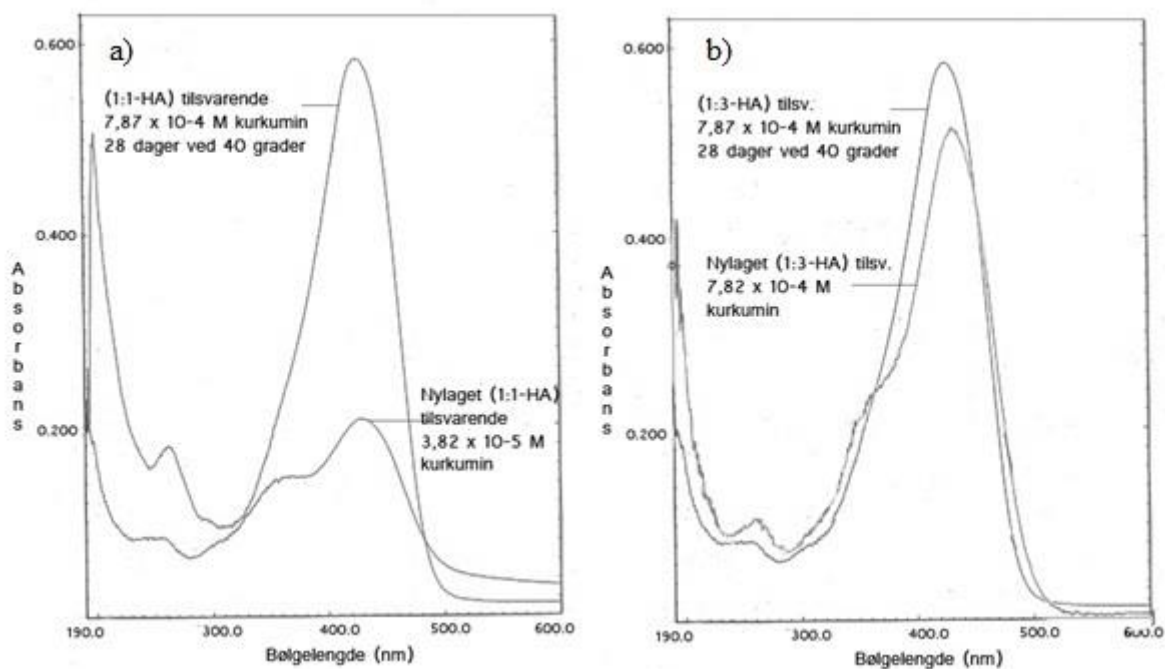
**Figur 3.22** – Gjennomsnittlig endring i kurkumininnhold % (w/w) i (1:3-HPMC) i løpet av 28 dager ved 40 °C (n = 4).



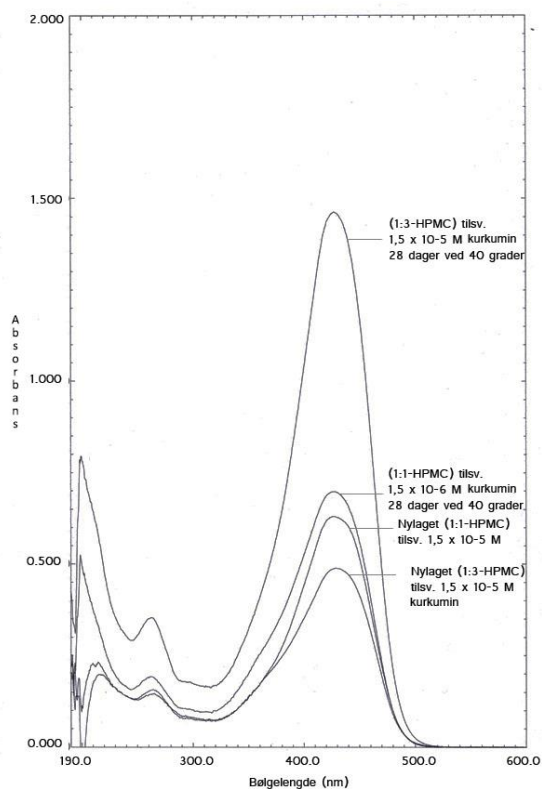
**Figur 3.23** – Prosentvis endring i gjennomsnittlig kurkumininnhold i (1:3-HPMC) i løpet av 28 dager ved 40 °C i forhold til utgangspunktet (dag 0) (n = 4).

### 3.9.2. Absorpsjonsmåling

(1:1-HA) lagret ved 40 °C i fire uker hadde økt intensitet ved 426 nm i forhold til ferskt produkt som hadde absorpsjonsmaksimum ved 430 nm (Figur 3.24a). Tilsvarende ble observert for (1:3-HA) lagret ved 40 ° i fire uker; absorpsjonsmaksimum ved 427 nm i ferskt produkt er blåforskjøvet til 421 nm og skulderen ved ~360 nm er borte (Figur 3.24b). (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) fikk økt absorpsjon ved 200 nm og ved absorpsjonsmaksimum 427 nm etter lagring ved 40 °C, men ellers uendret form på absorpsjonsspektrene (Figur 3.25).



**Figur 3.24** – a) Absorpsjonsspektra for nylaget (1:1-HA) og b) (1:3-HA), samt produktene lagret i fire uker ved 40 °C; alle løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.



**Figur 3.25** – Absorpsjonsspektra for nylaget (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC), samt produktene lagret i fire uker ved 40 °C, alle løst i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

### 3.10. Generell holdbarhet

Nylaget (1:3-HA) (n = 8), (1:1-HPMC) (n = 4) og (1:3-HPMC) (n = 4) ble oppbevart i fire uker ved  $20 \pm 2$  °C. Kurkumininnhold ble beregnet rett etter produksjon og etter fire uker ved bruk av HPLC-separasjon med UV-deteksjon ved deteksjonsbølgelengde 420 nm. Resultatet følger av Tabell 3.14 og Tabell 3.15. Det har vært en tilsynelatende økning kurkumininnhold i (1:3-HA) i løpet av de fire ukene. Alle parallellene med dette produktet viste en økning i beregnet kurkumininnhold i løpet av denne perioden bortsett fra parallell 1. Begge HPMC-produktene hadde en nedgang i beregnet kurkumininnhold i løpet av perioden (Tabell 3.15).

Produkt:	Kurkumininnhold % (w/w)		
	Initielt	Etter fire uker	% endring
(1:3-HA) P1	4,9	3,9*	-20,4
(1:3-HA) P2	3,7	4,2	+13,5
(1:3-HA) P3	3,5	4,7	+34,3
(1:3-HA) P4	3,6	4,4	+22,2
(1:3-HA) P5	3,7	5,1	+37,8
(1:3-HA) P6	3,9	4,9	+25,6
(1:3-HA) P7	3,8	4,6	+21,1
(1:3-HA) P8	3,7	4,8	+29,7
<b>Gj.snitt:</b>	<b>3,9</b>	<b>4,7</b>	<b>+20,5</b>
<b>SD:</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>18,2</b>

**Tabell 3.14** - Gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold i to uttak fra samme prøve (1:3-HA) etter 0 dager og 28 dager ved  $20 \pm 2$  °C. SD = standardavvik.

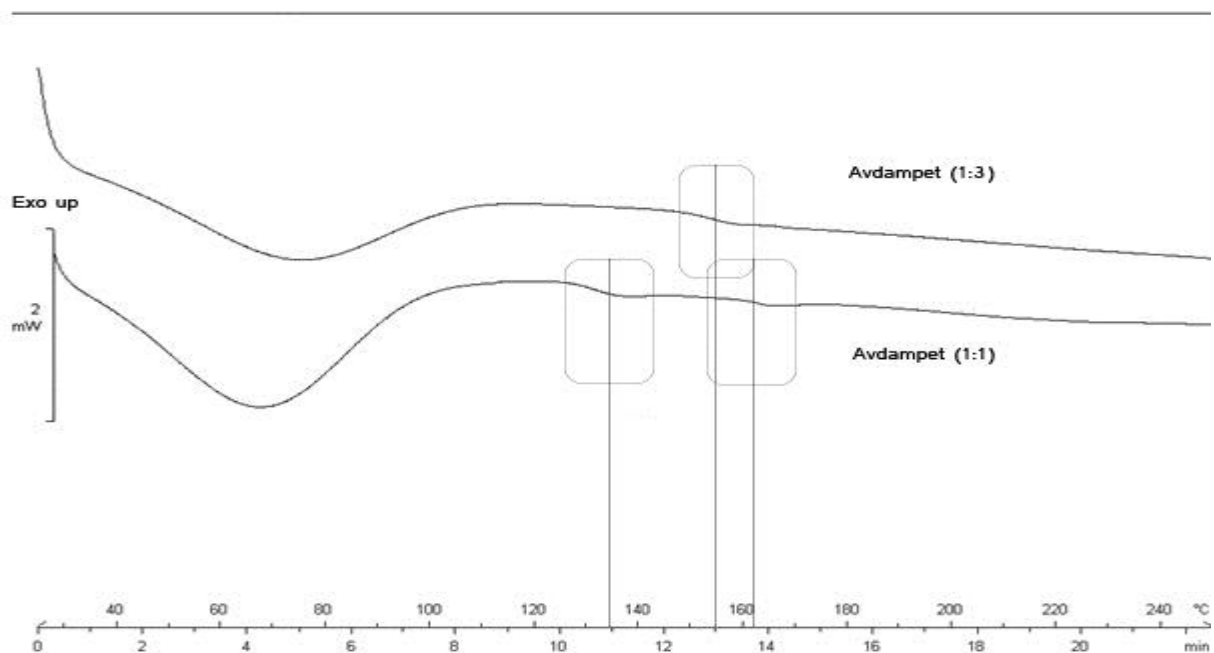
\* Parallell 1 ble utsatt for mest fuktighet i løpet av forsøksperioden.

Produkt:	Kurkumininnhold % (w/w)		
	Initielt	Etter fire uker	% endring
(1:1-HPMC) P1	3,0	1,6	-46,7
(1:1-HPMC) P2	1,8	1,7	-5,6
(1:1-HPMC) P3	2,4	1,6	-33,3
(1:1-HPMC) P4	2,1	1,8	-14,3
<b>Gj. snitt:</b>	<b>2,3</b>	<b>1,7</b>	<b>-25,0</b>
<b>SD:</b>	<b>0,5</b>	<b>0,1</b>	<b>18,5</b>
(1:3-HPMC) P1	4,0	3,7	-7,5
(1:3-HPMC) P2	3,9	3,8	-2,6
(1:3-HPMC) P3	4,5	3,6	-20,0
(1:3-HPMC) P4	4,3	3,8	-11,6
<b>Gj. snitt:</b>	<b>4,2</b>	<b>3,7</b>	<b>-10,4</b>
<b>SD:</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>7,4</b>

**Tabell 3.15** - Gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold i to uttak fra samme prøve (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) etter 0 dager og 28 dager ved  $20 \pm 2$  °C. SD = standardavvik.

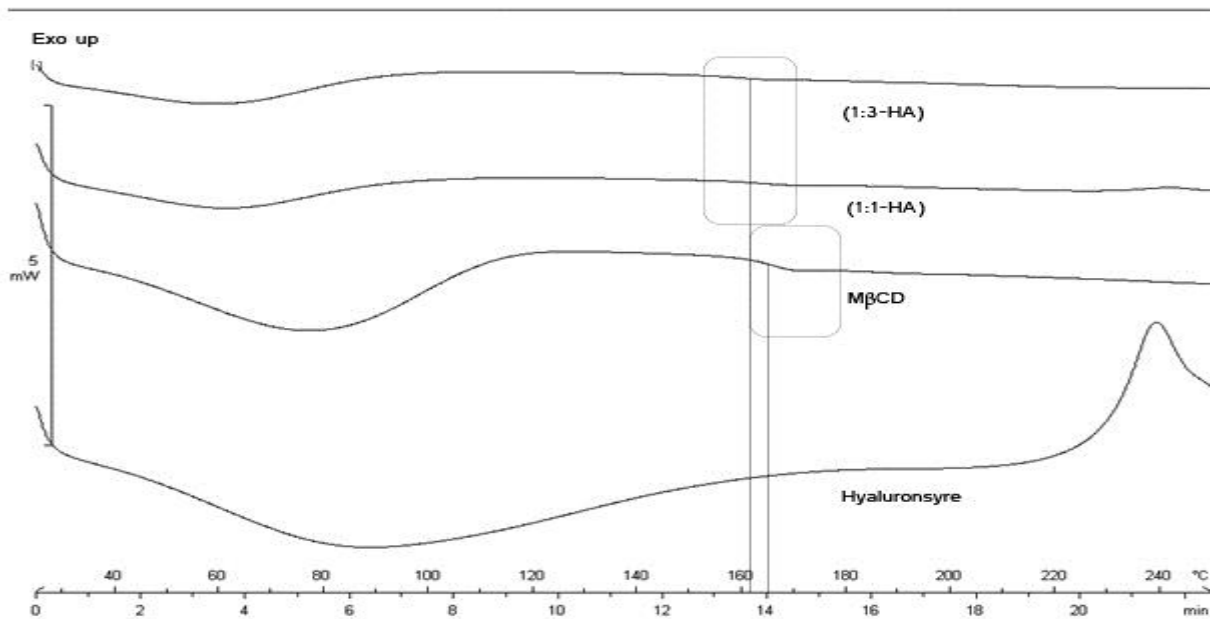
### 3.11. Differential Scanning Calorimetry

Krystallinsk kurkumin er rapportert å ha smeltepunkt ved 183 °C [40], men blir amorf etter tilsetning av M $\beta$ CD i molforhold 1:1 og 1:3 og avdamping av løsemiddelet (metanol) (Figur 3.26). Smeltepunktet til kurkumin var fraværende i alle produktene, både etter avdamping og etter frysetørring. M $\beta$ CD viste én T<sub>g</sub> ved ~164 °C; HA viste kun en eksoterm topp ved ~240 °C; HPMC viste én T<sub>g</sub> ved ~153 °C (Figur 3.27 og 3.28); amorf kurkumin har T<sub>g</sub> ~105 °C [13]. To glasstransisjonstemperaturer ble observert etter avdamping av (1:1), T<sub>g1</sub> ~135 °C og T<sub>g2</sub> ~162 °C; én T<sub>g</sub> ble observert etter avdamping av (1:3), T<sub>g</sub> ~155 °C (Figur 3.26). Kun T<sub>g2</sub> ble observert for (1:1-HA), og (1:3-HA) hadde en forskyvning av T<sub>g</sub> etter tilsetning av polymer og frysetørring, T<sub>g</sub> ~162 °C (Figur 3.27). (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) har tre glasstransisjonstemperaturer etter tilsetning av polymeren og frysetørring: T<sub>g1</sub> ~162 °C, T<sub>g2</sub> ~185 °C og T<sub>g3</sub> ~210 °C (Figur 3.28).

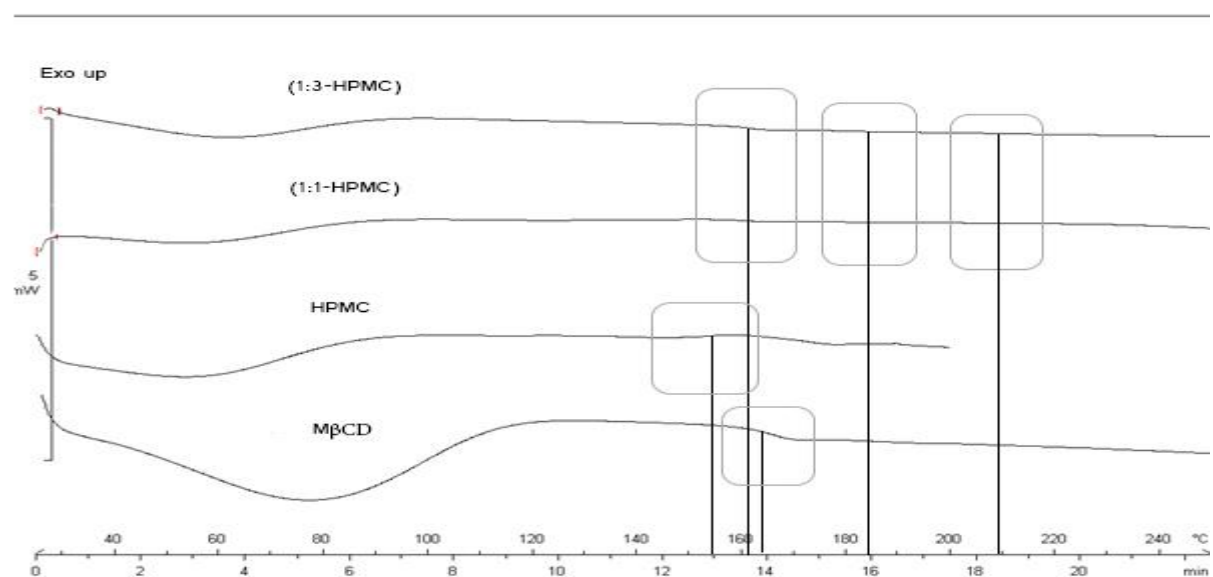


**Figur 3.26** – Termogram for (1:1) og (1:3) molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD etter avdamping av metanol. (1:1) viser to glasstransisjonstemperaturer, T<sub>g1</sub> ~135 °C og T<sub>g2</sub> ~162 °C. (1:3) viser én glasstransisjon ved T<sub>g</sub> ~155 °C. T<sub>g</sub> er markert med loddrett linje og boks.





**Figur 3.27** – Termogram for HA, M $\beta$ CD, nylaget (1:1-HA) og (1:3-HA). Ingen overlapp ble funnet mellom glasstransisjonstemperaturene til rene hjelpestoff og produktene; (1:1-HA) og (1:3-HA) har T<sub>g</sub> ~162 °C ; M $\beta$ CD har T<sub>g</sub> ~164 °C; ingen glasstransisjon eller smeltepunkt ble observert for HA, kun en eksoterm topp ved ~240 °C. T<sub>g</sub> er markert med loddrett linje og boks.

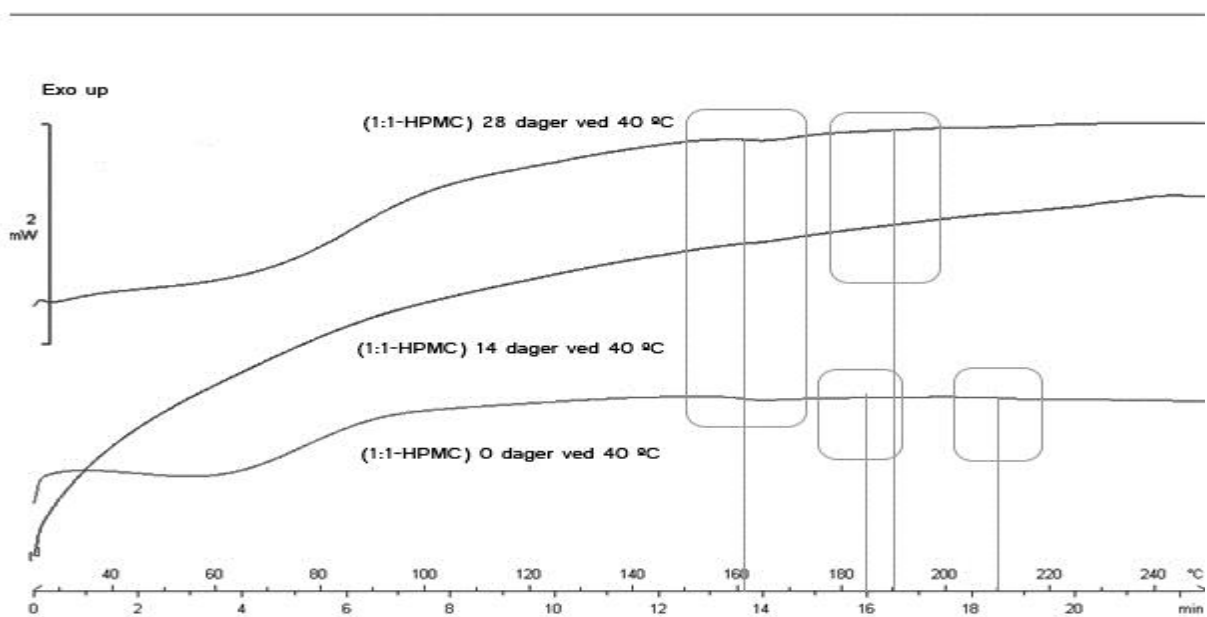


**Figur 3.28** - Termogram for HPMC, M $\beta$ CD, nylaget (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC). Ingen overlapp ble funnet mellom glasstransisjonstemperaturene til rene hjelpestoff og produktene; (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) har T<sub>g1</sub> ~162 °C, T<sub>g2</sub> ~185 °C og T<sub>g3</sub> ~210 °C; M $\beta$ CD har T<sub>g</sub> ~164 °C; HPMC har T<sub>g</sub> ~153 °C. T<sub>g</sub> er markert med loddrett linje og boks.

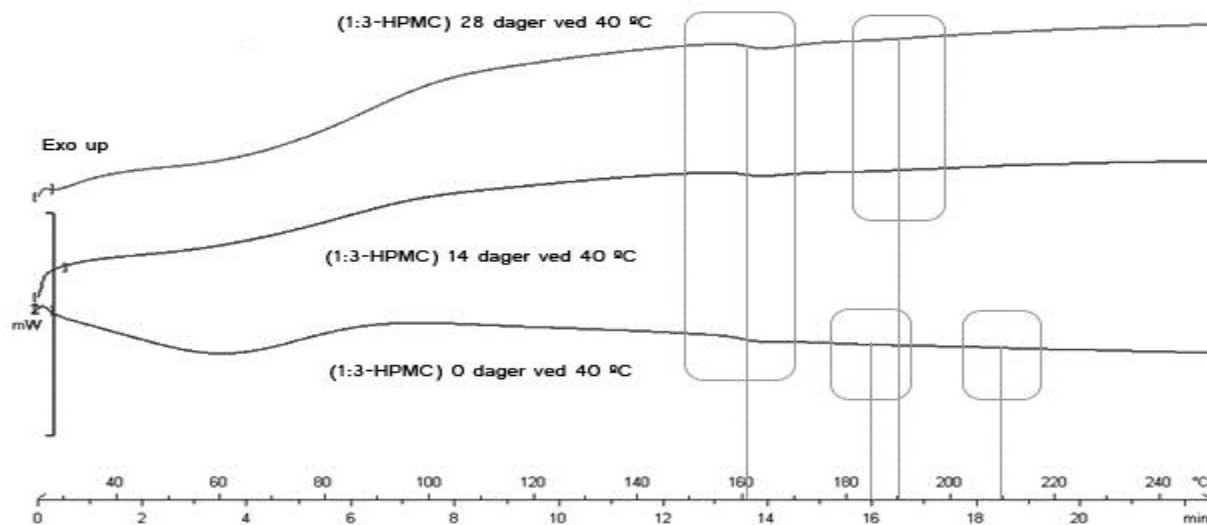
Ingen endring i termogrammene ble observert etter bestråling i SUNTEST. Bestrålt ren, krystallinsk kurkumin beholder S<sub>m</sub> ~183 °C (Figur 3.29, Vedlegg). De frysetørrede

produktene har tilsvarende uendrete glasstransisjonstemperaturer, både de bestrålte prøvene og mørkekontrollene ( $T_g \sim 162\text{ °C}$  for (1:1-HA) og (1:3-HA);  $T_{g1} \sim 162\text{ °C}$ ,  $T_{g2} \sim 185\text{ °C}$  og  $T_{g3} \sim 210\text{ °C}$  for (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC)) (Figur 3.30-3.33, Vedlegg).

Ingen endring ble observert i termogrammene for (1:1-HA) og (1:3-HA) tatt opp etter 14 og 28 dagers lagring ved  $40\text{ °C}$  sammenlignet med nylaget produkt (Figur 3.34 og 3.35, Vedlegg). For (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) var  $T_{g1} \sim 162\text{ °C}$  uendret,  $T_{g2}$  forskjøvet fra  $\sim 185\text{ °C}$  til  $\sim 191\text{ °C}$  og  $T_{g3} \sim 210\text{ °C}$  ikke lenger synlig (Figur 3.36 og 3.37).



**Figur 3.36** – Termogram for (1:1-HPMC) som nylaget produkt sammenlignet med de samme parallellene lagret i henholdsvis 14 dager og 28 dager i varmeskap ved  $40\text{ °C}$ .  $T_{g1} \sim 162\text{ °C}$ ,  $T_{g2} \sim 185\text{ °C}$  ( $\sim 191\text{ °C}$  etter lagring) og  $T_{g3} \sim 210\text{ °C}$ .



**Figur 3.37** – Termogram for (1:3-HPMC) som nylaget produkt sammenlignet med de samme parallellene lagret i henholdsvis 14 dager og 28 dager i varmeskap ved 40 °C.  $T_{g1}$  ~162 °C,  $T_{g2}$  ~185 °C (~191 °C etter lagring) og  $T_{g3}$  ~210 °C.

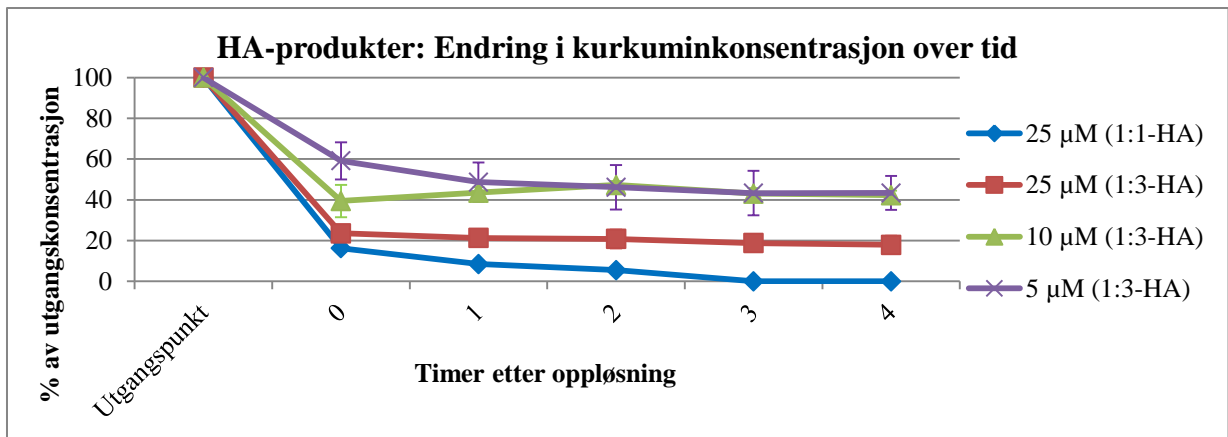
### 3.12. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer)

Et timesbasert forsøk viste endringen i mengde solubilisert kurkumin i løpet av de første 4 timene etter oppløsning av frysetørret produkt i PBS (pH 6,1). En nedgang i kurkuminkonsentrasjon ble observert under lagring av ~25  $\mu$ M (1:1-HA)-oppløsninger og ~5  $\mu$ M, ~10  $\mu$ M og ~25  $\mu$ M (1:3-HA)-, (1:1-HPMC)- og (1:3-HPMC)-oppløsninger i PBS pH 6,1 (Figur 3.38-3.40). En kraftig fargeendring ble observert i filteret etter filtrering (0,45  $\mu$ m) av supernatant for alle konsentrasjonene som ble undersøkt. Med tilstrebet ~25  $\mu$ M var nedgangen raskere for (1:1-HA) enn de andre produktene, og kunne utover 2 timers lagring observeres visuelt som bunnfall. Utgangskonsentrasjonen ble ikke oppnådd, med 16 % av 25  $\mu$ M etter oppløsning av (1:1-HA), ~24 % av 25  $\mu$ M etter oppløsning av (1:3-HA), ~37 % av 25  $\mu$ M etter oppløsning av (1:1-HPMC) og ~27 % av 25  $\mu$ M etter oppløsning av (1:3-HPMC) (Tabell 3.16, 3.19 og 3.20, Vedlegg). Etter 3 timer i fosfatbuffer kunne ikke mengden oppløst kurkumin lenger detekteres med HPLC i (1:1-HA). Løseligheten til kurkumin så ikke ut til å stabilisere seg i dette systemet i løpet av dette forsøket. Grunnet tilsynelatende dårlig stabilitet og raskt udetekterbar kurkuminkonsentrasjon ble ikke (1:1-HA) studert med lavere

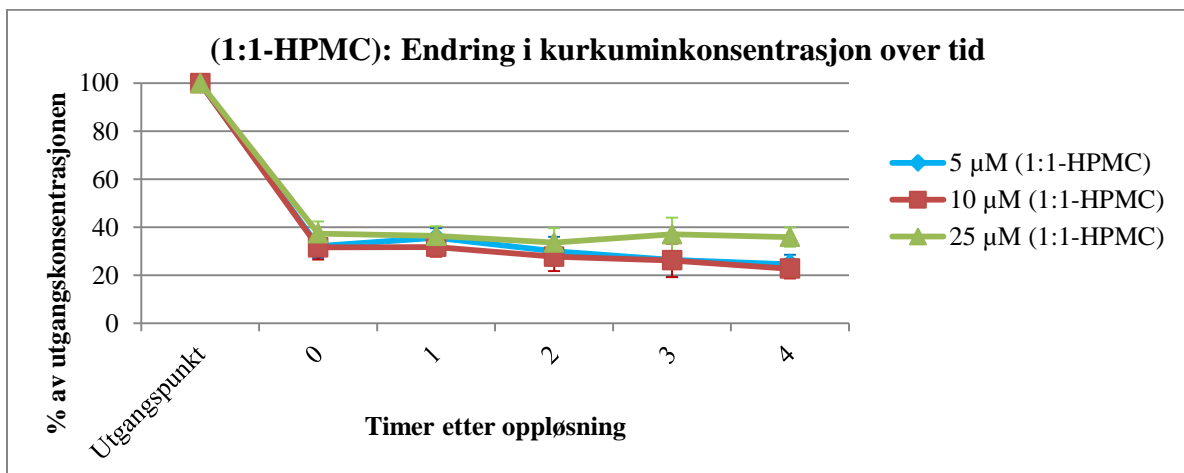
konsentrasjon. Kurkuminkonsentrasjonen i løsningene med tilstrebet 25  $\mu\text{M}$  var mest stabil for (1:1-HPMC), og minst stabil for (1:1-HA).

Heller ikke med kurkuminkonsentrasjonene 5  $\mu\text{M}$  og 10  $\mu\text{M}$  av (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) ble teoretisk kurkuminkonsentrasjon nådd, med ~60 % av 5  $\mu\text{M}$  etter oppløsning og filtrering (0,45  $\mu\text{m}$ ) av (1:3-HA), ~32 % av 5  $\mu\text{M}$  etter oppløsning og filtrering av (1:1-HPMC) og ~19 % av 5  $\mu\text{M}$  etter oppløsning og filtrering av (1:3-HPMC) (Tabell 3.17-3.19, Vedlegg). Med teoretisk kurkuminkonsentrasjon 10  $\mu\text{M}$  var oppnådd konsentrasjon etter oppløsning og filtrering av (1:3-HA) ~39 %, (1:1-HPMC) ~32 %, og (1:3-HPMC) ~21 % (Tabell 3.17, 3.18 og 3.20, Vedlegg).

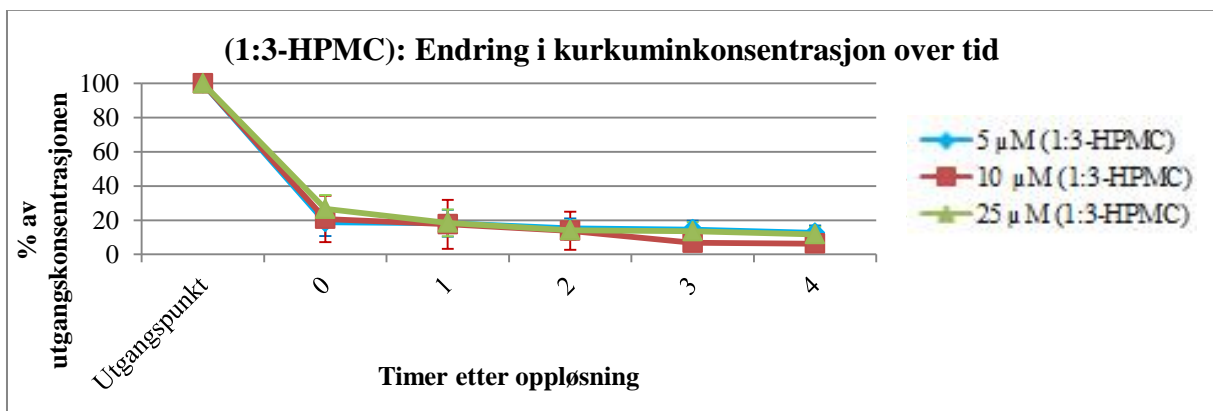
Nedgangen i kurkuminkonsentrasjon var mindre spredd for HPMC-produktene enn HA-produktene (Figur 3.38-3.40). Hastigheten på utfellingen av kurkumin var tregest for den høyeste teoretiske kurkuminkonsentrasjonen av (1:1-HPMC) og den laveste teoretiske kurkuminkonsentrasjonen av (1:3-HPMC) (Tabell 3.18-3.20, Vedlegg). I (1:3-HA) var det ingen signifikant endring i kurkuminkonsentrasjonen i løsningene med teoretisk kurkuminkonsentrasjon 10  $\mu\text{M}$ . Produktet hadde kun svak reduksjon i kurkuminkonsentrasjon i løsningene med teoretisk konsentrasjon 5  $\mu\text{M}$  og 25  $\mu\text{M}$  (Tabell 3.17, Vedlegg).



**Figur 3.38** – Prosent kurkuminkonsentrasjon av teoretisk konsentrasjon ( $\pm$  SD) umiddelbart etter oppløsning av (1:1-HA) (n = 3) til 25  $\mu$ M og (1:3-HA) (n = 3) til 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 25  $\mu$ M i PBS (pH 6,1) og inntil 4 timer etter oppløsning.



**Figur 3.39** - Prosent kurkuminkonsentrasjon av teoretisk konsentrasjon ( $\pm$  SD) umiddelbart etter oppløsning av (1:1-HPMC) (n = 3) til 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 25  $\mu$ M i PBS (pH 6,1) og inntil 4 timer etter oppløsning.

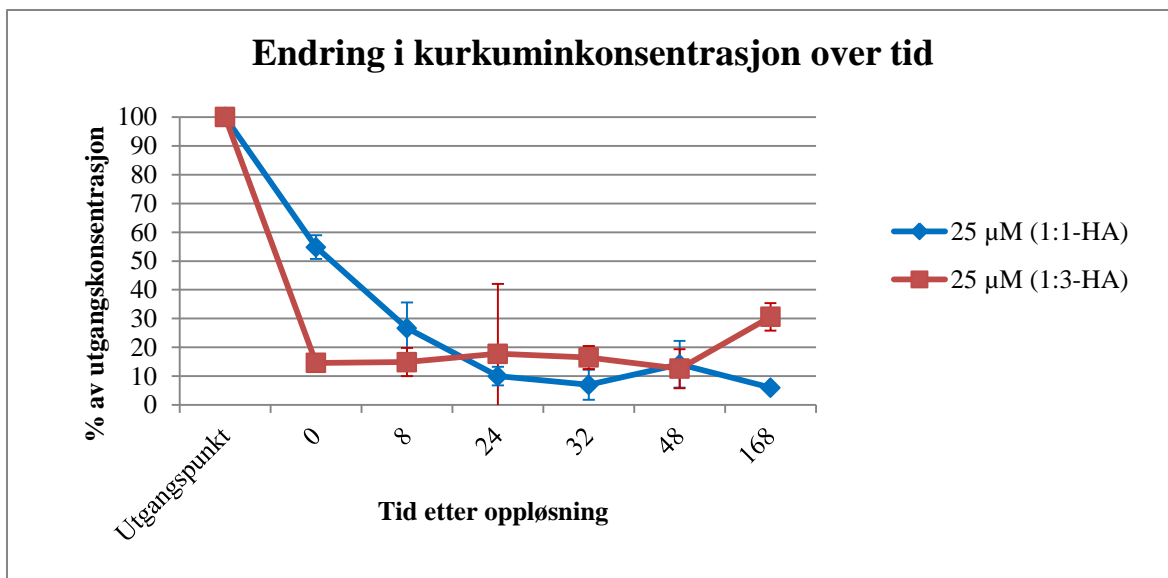


**Figur 3.40** - Prosent kurkuminkonsentrasjon av teoretisk konsentrasjon ( $\pm$  SD) umiddelbart etter oppløsning av (1:3-HPMC) (n = 3) til 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 25  $\mu$ M i PBS (pH 6,1) og inntil 4 timer etter oppløsning.

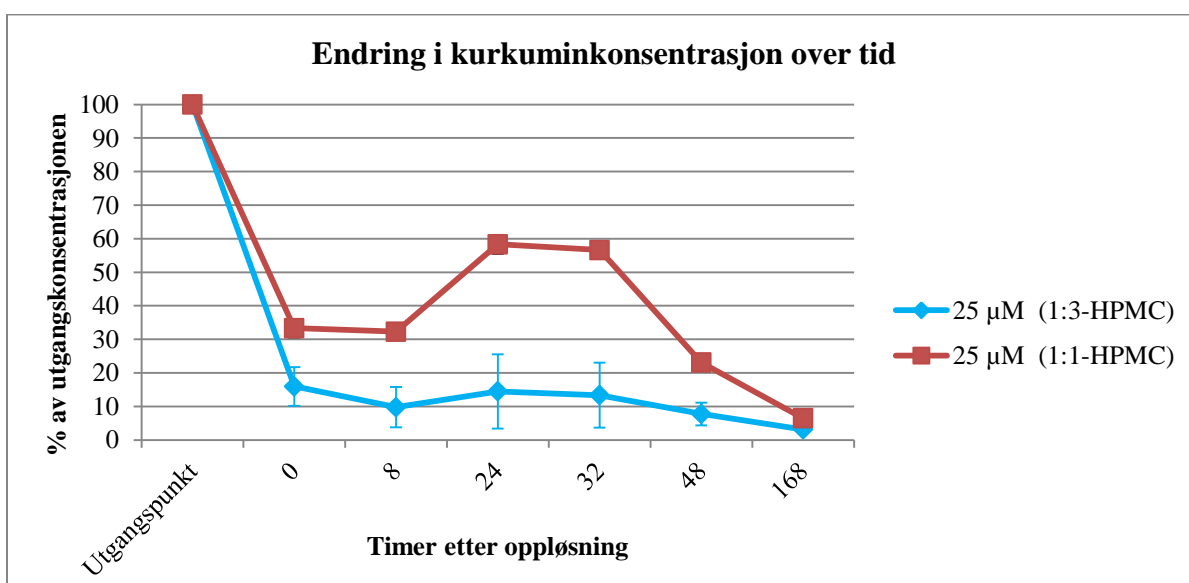
### 3.13. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer)

Teoretisk konsentrasjon ble ikke oppnådd for noen av produktene, med gjennomsnittlig  $\sim 13,7$   $\mu\text{M}$  kurkumin i (1:1-HA) umiddelbart etter oppløsning,  $3,6$   $\mu\text{M}$  i (1:3-HA),  $8,3$   $\mu\text{M}$  i (1:1-HPMC) og  $4,0$   $\mu\text{M}$  i (1:3-HPMC) (Tabell 3.21 og 3.22, Vedlegg). En nedgang i kurkuminkonsentrasjon ble observert under lagring av  $\sim 25$   $\mu\text{M}$  (1:1-HA) og (1:3-HA) i PBS (pH 6,1) (Figur 3.41). Nedgangen i (1:1-HA) var raskest de første 24 timene, deretter så løseligheten til kurkumin ut til å stabilisere seg i løsningen. Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon i (1:3-HA) var relativt stabil under hele forsøket, bortsett fra en observert økning etter 168 timer i motsetning til de første 48 timene. Det ble beregnet noe høyere kurkuminkonsentrasjoner i enkelte paralleller underveis.

En netto nedgang i kurkuminkonsentrasjon ble også observert under lagring av  $\sim 25$   $\mu\text{M}$  (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) i PBS (pH 6,1) (Figur 3.42). En økning i kurkuminkonsentrasjonen i alle løsningene mellom 24 og 32 timer etter oppløsning svarer til en induert overmetning av kurkumin, eller dannelsen av en molekylform tilsvarende kurkumin med høyere molar absorpsjonskoeffisient etter 8-24 timer, som feller ut, omstruktureres eller brytes ned etter 32 timer. Konsentrasjonen faller deretter mot omtrent lik kurkuminkonsentrasjon ved likevekt etter 7 dager i PBS. Utgangskonsentrasjonen på  $25$   $\mu\text{M}$  ble ikke nådd for noen av prøvene, men høyere initiell kurkuminkonsentrasjon ble beregnet i løsningene med (1:1-HPMC) enn i løsningene med (1:3-HPMC), samt et større potensiale for økning i beregnet kurkuminkonsentrasjon enn i løsningene med (1:3-HPMC).



**Figur 3.41** – Prosent kurkumin av 25 µM som teoretisk konsentrasjon etter oppløsning av (1:1-HA) og (1:3-HA) (n = 3) i PBS (pH 6,1) og endring over tid (± SD).



**Figur 3.42** – Prosent kurkumin av 25 µM som teoretisk konsentrasjon etter oppløsning av (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) (n = 3) i PBS (pH 6,1) og endring over tid (± SD). SD for (1:3-HPMC) < 2,5 %, lite synlig i figuren.

## 3.14. Bakterieinaktiveringsforsøk

### 3.14.1. *Enterococcus faecalis*

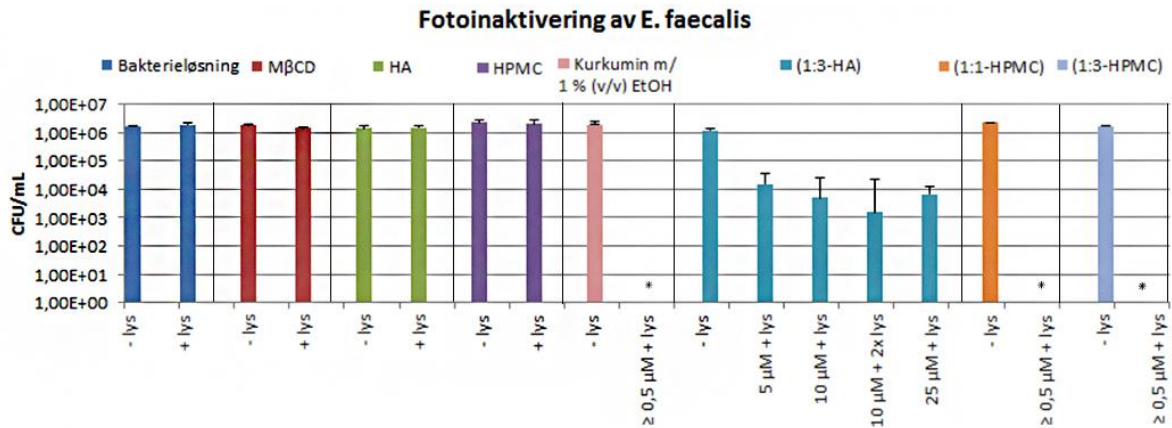
Den fototoksiske effekten av (1:3-HA) var signifikant ( $P < 0,05$ ). Det ble kun observert et fåtalls overlevende kolonier i enkelte paralleller (1:3-HA) etter eksponering med kurkuminkonsentrasjoner  $\geq 5 \mu\text{M}$  og lysdose  $\sim 11 \text{ J/cm}^2$ , men ingen etter eksponering med de samme kurkuminkonsentrasjonene fra HPMC-produktene. (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) med kurkuminkonsentrasjoner  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  i kombinasjon med lysdose  $\sim 11 \text{ J/cm}^2$  ga fullstendig inaktivering av *E. faecalis* tilsvarende  $\sim \log 6$  reduksjon i antall CFU/ml (Figur 3.43).

Eksponering for blått lys alene (opp til  $\sim 22 \text{ J/cm}^2$ ), hjelpestoffene, eller de frysetørrete produktene uten lys påvirket ikke bakteriene signifikant ( $P < 0,05$ ). Kontrolløsninger med  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  kurkumin i PBS pH 6,1 med 1 % (v/v) etanol ga fullstendig bakterieinaktivering tilsvarende  $\sim \log 6$  reduksjon i antall CFU/ml (Figur 3.4).

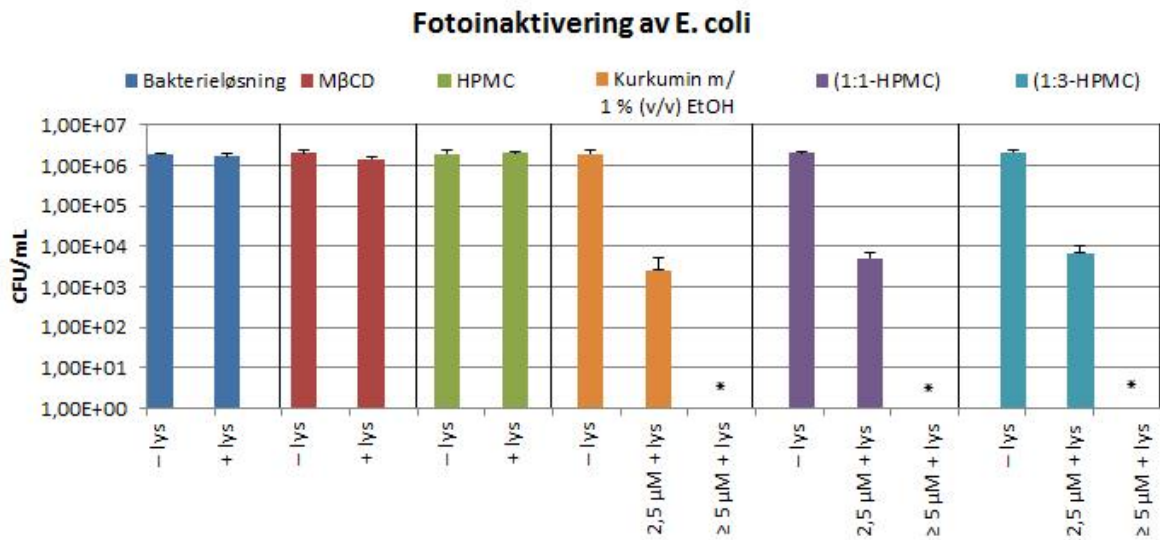
### 3.14.2. *Escherichia coli*

(1:1-HPMC), (1:3-HPMC) og kurkumin (i 1 % (v/v) etanol) i konsentrasjoner  $\geq 5,0 \mu\text{M}$  og lysdose  $32 \text{ J/m}^2$  ga fullstendig inaktivering av *E. coli* tilsvarende  $\sim \log 6$  reduksjon (Figur 3.44). 0,1 % (w/v) M $\beta$ CD og 0,1 % (w/v) HPMC hadde ingen signifikant påvirkning av *E. coli* ( $P > 0,05$ ) (Figur 3.44). Eksponering for blått lys alene i doser opp til  $\sim 32 \text{ J/cm}^2$  eller de frysetørrete produktene uten lys påvirket ikke bakteriekolonidannelsen signifikant ( $P > 0,05$ ) (Figur 3.44).





**Figur 3.43** – Koloniooverlevelse av *E. faecalis* etter behandling med og uten lys, etter behandling med MβCD, HA og HPMC med og uten lys, med kurkumin i 1 % (v/v) etanol med konsentrasjoner  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  med og uten lys, med (1:3-HA) med kurkuminkonsentrasjonene  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  (med enkel og dobbel lysdose) og  $25 \mu\text{M}$  med og uten lys, og med (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) med kurkuminkonsentrasjoner  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  med og uten lys. Lysdose  $11 \text{ J/cm}^2$ .



**Figur 3.44** – Koloniooverlevelse av *E. coli* etter behandling med og uten lys, etter behandling med MβCD og HPMC med og uten lys, og med kurkumin i 1 % (v/v) etanol, (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) med kurkuminkonsentrasjonene  $2,5 \mu\text{M}$  og  $\geq 5 \mu\text{M}$  med og uten lys. Lysdose  $32 \text{ J/cm}^2$ .

## 4. Diskusjon

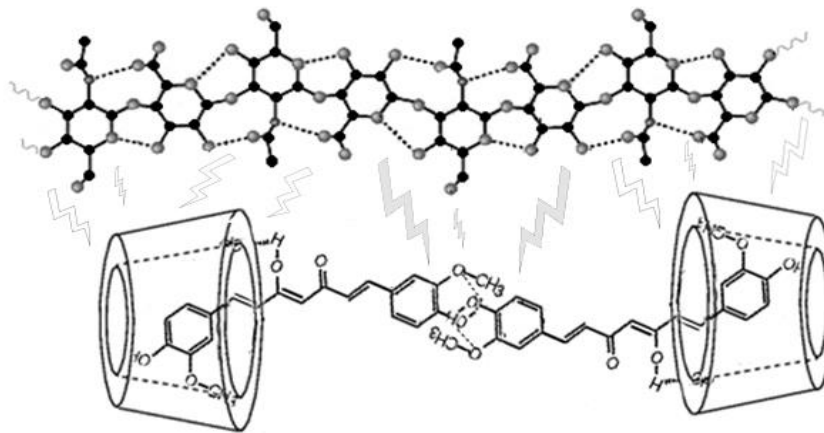
### 4.1. Faseløselighet

Grunnen til at økende konsentrasjon av M $\beta$ CD i vandige oppløsninger med overskudd av kurkumin ga økt løselighet av kurkumin (Figur 3.3) er trolig fordi CD danner inklusjonskomplekser med kurkumin og således skjerner det hydrofobe molekylet mot det polare miljøet og gjør kurkumin tilsynelatende løselig i vandig miljø [3]. Tilsetning av et hydrofobt stoff som kurkumin til en vandig løsning med M $\beta$ CD fortrenger vannmolekylene fra hulrommet i CD, og mer energetisk gunstige interaksjoner dannes med deler av kurkuminmolekylet som sterisk passer inn i hulrommet [49]. Interaksjonen som oppstår er reversibel, og det er mulig at man får et overmettet system som feller ut over tid. I tillegg til at M $\beta$ CD solubiliserer kurkumin, bidrar CD også til å holde kurkumin på monomerform. Fordi kurkumin er hydrofobt vil molekylene i vandig løsning søke sammen og aggregere, og slike aggregater kan skjermes for lysabsorpsjon og dannelsen av reaktive forbindelser [42]. Jo flere CD som er tilgjengelig for kompleksdannelse i løsning, jo større er sannsynligheten for at kurkumin befinner seg på monomerform i løsningen og således er lettere tilgjengelig for eksitasjon med blått lys og videre fotokjemiske reaksjoner.

Faseløselighetskurvene i Figur 3.3 er alle av typen A<sub>L</sub> [86]. Tidligere studier har vist og konkludert med både 1:1-kompleksring og 1:2-kompleksring mellom kurkumin og  $\beta$ CD [55, 56, 58]. Denne studien konkluderer med 1:1-kompleksring. Korrelasjonen mellom økende kurkuminkonsentrasjon og økende konsentrasjon av M $\beta$ CD var god, og det er følgelig meget sannsynlig at kurkumin og M $\beta$ CD danner 1:1 inklusjonskomplekser i vandig løsning både uten polymer og med HA/HPMC.

Lav konsentrasjon av HA (0,1 % (w/v)) påvirket kurkumins løselighet i CD-oppløsninger. Faseløselighetskurven er tilnærmet lineær med konsentrasjoner av M $\beta$ CD < 2 % (w/v) der det fremdeles er overskudd av kurkumin i løsningen. Dette indikerer at kurkumin og M $\beta$ CD også danner 1:1 inklusjonskomplekser med HA i løsningen. Effekten HA har på løseligheten til kurkumin ser ut til å være synergistisk med M $\beta$ CD. Økt kurkuminkonsentrasjon med HA uten M $\beta$ CD i løsningen og ytterligere økt kurkuminkonsentrasjon med økende mengde M $\beta$ CD i forhold til løsningene uten polymer tyder på at HA har en dobbel funksjon som både «spring»

og «parachute», ikke bare sistnevnte som HPMC. HA opptrer som en to-foldet heliks i vandige løsninger, med hydrofobe områder på størrelse med 8 CH-enheter. Dette gjør at HA kan danne van der Waalske bindinger og delvis stabilisere fritt kurkumin i løsningen [61]. HA stabiliserer også tilsynelatende inklusjonskompleksene ved å danne svake bindinger med den delen av kurkuminmolekylet som ikke er skjermet av CD, og med den hydrofile overflaten til CD (Figur 4.1). Dette kommer også fram av stigningstallet til faseføselighetskurven (mellom 0,1-1,0 % (w/v) M $\beta$ CD), som er høyere enn stigningstallene for faseføselighetskurvene til løsningene med HPMC og løsningene uten polymer (mellom 0,1-10,0 % (w/v) M $\beta$ CD). Dette indikerer at affiniteten kurkumin har for hulrommet i M $\beta$ CD er størst i løsningene med HA. Økt viskositet i vandige løsninger vil også bidra til forsinket utfelling og mindre mobilitet.



**Figur 4.1** – Foreslått interaksjon mellom kurkumin, M $\beta$ CD og HA i vandig løsning: her vist som 1:1-interaksjon mellom kurkumin og M $\beta$ CD, hydrofobe interaksjoner mellom kurkuminmolekylene, hydrofile interaksjoner mellom M $\beta$ CD og HA (hvite lyn), og hydrofobe interaksjoner mellom kurkumin og HA (grå lyn).

Lav konsentrasjon HPMC (0,1 % (w/v)) i vandige løsninger med overskudd av kurkumin og økende konsentrasjon av M $\beta$ CD påvirker også løseligheten til kurkumin. HPMC alene interagerer ikke med kurkumin på en måte som øker vannløseligheten (uendret kurkumintopp i kromatogrammene). Dette skyldes den totale hydrofilisiteten til HPMC med få muligheter for å danne ikke-kovalente bindinger med kurkumin i stor nok grad til å solubilisere det hydrofobe molekylet. Ved økende konsentrasjon av M $\beta$ CD medfører tilsetning av HPMC lavere kurkuminkonsentrasjoner enn i løsningene uten polymer (Figur 3.3). Dette kan skyldes delvis skjerming av det hydrofobe hulrommet i CD med et nettverk av hydrofile kjeder (HPMC) slik at kurkumin og M $\beta$ CD i mindre grad kan danne inklusjonskomplekser etter oppløsning. Størrelsemessig kan celluloseenheter på endene av HPMC-kjedene okkupere

hulrommet i CD. Dette kan også bidra til redusert solubilisering av kurkumin. Stigningstallet for faseføselighetskurven til kurkumin med 0,1 % (w/v) HPMC og økende konsentrasjon M $\beta$ CD var lavere enn stigningstallene for de to andre faseføselighetskurvene. Dette samsvarer med teorien om at HPMC delvis skjermes for hulrommet i CD slik at kurkumin får lavest affinitet for M $\beta$ CD i disse løsningsene.

## 4.2. Frysetørrete produkter

Etter tilsetning av MQ-vann til de uferdige produktene etter avdamping av metanol ble 1 time valgt som mest gunstig ristetid. Kurkuminkonsentrasjonene oppnådd for kortere og lengre ristetider var lavere, og indikerte mindre grad av kompleksering med M $\beta$ CD og stabilisering av kurkumin i løsningen, samt mulig degradering av kurkumin ved lengre risting i vandig løsning. Uløst kurkumin ble observert langs kolbeveggen. Dette trinnet antas å innvirke mest på det totale tapet av kurkumin under produksjon.

Kurkumininnhold i de frysetørrete produktene økte med økende M $\beta$ CD/kurkumin molforhold (Tabell 3.6). Reproduerbarheten til batchene er relativt god, men med en variasjon i kurkumininnhold > 0,3 % (w/w) bør tiltak vurderes for å bedre reproduerbarheten i fremtidige studier på disse produktene. Årsaken til variasjon i kurkumininnhold mellom batchene, samt mellom produktene i hver batch, er på dette tidspunkt ukjent. Det kan både skyldes operatørfeil, sammensetningen av produktene, produksjonsmetoden, ikke homogene produkter, og nøyaktigheten og presisjonen til HPLC-metoden. To uttak ble tatt fra hver kolbe ved beregning av kurkumininnhold (jfr. «2.8.2 Kvantifisering av kurkumininnhold»), men for å bedre kunne vurdere homogeniteten bør flere uttak tas fra flere steder i hver kolbe.

Medvirkende til variasjon innad i produktene og fra batch til batch er effektiviteten i kompleksdannelse av kurkumin med M $\beta$ CD under risting uten dannelse av større aggregater som faller bort ved filtrering, deteksjon og kvantifisering med HPLC, innfrysningstiden og temperaturforskjeller under produksjon og kvantifisering. Et kurkumininnhold på ~2,0 % (w/w) for (1:1)-produktene og ~4,4 % (w/w) for (1:3)-produktene er mer enn tre og fire ganger høyere enn for kurkumin produsert med henholdsvis 1:0,9 og 1:2,8 molar ratio med HP $\beta$ CD og 0,1 % HPMC [13]. Med høyt kurkumininnhold trenger man kun en liten mengde produkt for å oppnå ønsket kurkuminkonsentrasjon i bakterieforsøk. Dette er både praktisk og

økonomisk gunstig. (1:1-HA) ble ikke fullstendig karakterisert grunnet dårlig stabilitet i vandig løsning, hvilket vanskeliggjør bakterieforsøk og gir dårligere brukervennlighet.

Ingen av de nylagde produktenes T<sub>g</sub> overlappet med de for M $\beta$ CD, HA, HPMC eller amorf kurkumin. Det ble observert en endring i T<sub>g</sub> for (1:1) etter tilsats av 0,1 % (w/v) HA/HPMC og frysetørring. Dette indikerer at det er interaksjoner mellom kurkumin og hjelpestoffene, trolig inklusjonskomplekser som tidligere studert for kurkumin og M $\beta$ CD [3, 83], mellom inklusjonskompleksene og polymeren, samt mellom kurkumin og polymeren. Termogrammet til (1:3-HA) var derimot uendret, hvilket indikerer andre interaksjoner med hjelpestoffene i dette produktet. Etersom mer kurkumin sannsynligvis befinner seg utenfor komplekser med M $\beta$ CD i (1:1-HA) enn i (1:3-HA) tilsier det at en større andel interagerer med hydrofobe områder på HA og gir andre og tettere interaksjoner med polymeren enn i (1:3-HA). Det kommer også fram av overmetningsforsøkene, der (1:3-HA) var mer stabil i vandig løsning enn (1:1-HA), grunnet ulik grad av interaksjoner med hjelpestoffene (se «4.3 Frysetørrete produkter i løsning»). Relativt høye glasstransisjonstemperaturer svarer til produkter med god kinetisk stabilitet, da den molekylære bevegelse er minimal ved temperaturer  $\geq 50$  °C under T<sub>g</sub> [13]. Uendrete termogram for HA-produktene, og tilnærmet uendrete termogram for HPMC-produktene under den akselererte holdbarhetsstudien bygger opp om dette (se «4.5 Holdbarhet»).

### **4.3. Frysetørrete produkter i løsning**

#### **4.3.1. Hydrering**

Selv om de frysetørrete produktene løste seg raskt i kontakt med vann, brukte enkelte flak lenger tid på å løses fullstendig. Disse løste seg ved lett røring. Grunnet rask oppløsning av disse flakene ved bevegelse i mediet var det vanskelig å studere disse videre. At produktene løses raskt kan være gunstig ved applisering på fuktige, infiserte sår, og øker også brukervennligheten dersom produktene ønskes oppløst før applisering. Raskere oppløsning av (1:3)-produktene enn (1:1)-produktene gjenspeiler andelen solubilisator i produktene. En større andel M $\beta$ CD tilgjengelig for kompleksing gir hurtigere oppløsning av produktet i vandig medium. Raskere oppløsning av HA-produktene enn HPMC-produktene kan skyldes temperaturen på vannet (25 °C), da denne ble valgt for å simulere temperatur i sårveske åpent

mot omgivelser med romtemperatur. Løseligheten til HPMC avtar som nevnt med økende temperatur og er best løselig i kaldt vann (jfr. Tabell 1.4), mens løseligheten til HA ikke viser den samme temperaturavhengigheten.

#### **4.3.2. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer)**

Etter oppløsning var spesielt (1:1-HA) fysisk ustabil. Aggregater felte ut etter kort tid, og kurkuminkonsentrasjonen falt raskt. Produktet ble følgelig kun testet med teoretisk 25 µM, da konsentrasjonen falt raskt til under deteksjonsgrensen og 10 µM og 5 µM ville trolig ha for lav konsentrasjon til å detekteres allerede rett etter oppløsning. (1:3-HA) viste bedre fysisk stabilitet (Figur 3.38). (1:1-HPMC) viste bedre initiell stabilitet i vandig løsning enn (1:3-HPMC), som hadde raskere utfelling av kurkumin med påfølgende lavere kurkuminkonsentrasjon over tid (Figur 3.39 og 3.40). Forsøket viser at produktene initielt danner en overmettet løsning i PBS med varierende stabilitet, og at bedre stabilitet ble oppnådd med (1:3-HA) og HPMC-produktene enn (1:1-HA).

Ingen av de frysetørrede produktene resulterte i teoretisk konsentrasjon etter oppløsning i PBS (Figur 3.38-3.40). Årsaken til dette er mest sannsynlig ufullstendig oppløsning (aggregater), tap av kurkumin under filtrering før analyse, rask utfelling/aggregering og/eller adhesjon til plastrørene. Det er også en usikkerhet rundt beregningen av kurkumin- og vanninnhold som ble brukt til å kalkulere mengden frysetørret produkt som trengtes for å lage de ulike løsningene. Dette gjenspeiler repeterbarheten til HPLC-systemet og mulige ujevnheter i produktene, men bidraget er antagelig ikke like stort som det faktiske avviket som ble målt etter oppløsning. Som sett under validering av HPLC-metoden kan detektert toppareal per analyse variere med  $\sim 4,7 \pm 3,1$  % (Tabell 3.1). Dette innebærer at kvantifisert kurkumininnhold også kan variere med  $\sim 5$  % per analyse. Bidraget tilsvarer feilberegning av kurkumininnholdet med 0,2 % (w/w) hvis faktisk kurkumininnhold er 4,5 % (w/w), og et avvik i kurkuminkonsentrasjon etter oppløsning på  $< 1$  µM. Lavere faktisk kurkumininnhold vil gi tilsvarende mindre avvik i kurkuminkonsentrasjonen etter oppløsning.

Kurkumin er følsomt for hydrolyse, hvilket også kunne ha bidratt til nedgangen i kurkuminkonsentrasjonen. Dette er dog lite trolig i løpet av denne tidsperioden, da rapportert hastighetskonstant for nedbrytning av kurkumin i  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 5,97 er  $4,4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$  for andre ordens kinetikk [41], hvilket gir halveringstidene  $9,1 \times 10^3$  timer for  $25 \mu\text{M}$ ,  $2,3 \times 10^4$  timer for  $10 \mu\text{M}$  og  $4,5 \times 10^4$  timer for  $5 \mu\text{M}$ , og tilsats av CD øker den hydrolytiske stabiliteten [3]. Vanlige degraderingsprodukter ved hydrolyse av kurkumin, spesielt ved fysiologisk pH, er autoksidering til oksygenerte bisyklopentadion-produkter, vanillin, ferulsyre og feruloylmetan. Disse forventes å ha kortere retensjonstid i HPLC-systemet enn kurkumin. De detekteres best  $< 270 \text{ nm}$  og vil således ikke komme tydelig fram ved deteksjonsbølgelengde  $420 \text{ nm}$  [87, 88].

Nedgangen i kurkuminkonsentrasjon i løsningene med (1:1-HPMC) er langsommere enn nedgangen i løsningene med (1:3-HPMC) (Tabell 3.18-3.20, Vedlegg). Fra 0 til 4 timer minket kurkuminkonsentrasjonen i (1:1-HPMC)-løsningene med teoretisk  $5 \mu\text{M}$  og  $10 \mu\text{M}$  raskere enn løsningene med teoretisk  $25 \mu\text{M}$ . Prosent av teoretisk kurkuminkonsentrasjon var også høyest i (1:1-HPMC)-løsningene med teoretisk  $25 \mu\text{M}$ . Dette indikerer at en større mengde oppløst (1:1-HPMC) i buffer er mer stabil, muligens på grunn av høyere konsentrasjon av HPMC som øker viskositeten og forsinker utfelling av kurkumin. Fra 0 til 4 timer minket kurkuminkonsentrasjonen i (1:3-HPMC)-løsningene med teoretisk  $5 \mu\text{M}$  saktere enn løsningene med teoretisk  $10 \mu\text{M}$  og  $25 \mu\text{M}$ . Prosent av teoretisk kurkuminkonsentrasjon var høyest i (1:3-HPMC)-løsningene med teoretisk  $25 \mu\text{M}$  og lavest i løsningene med teoretisk  $5 \mu\text{M}$ . Dette indikerer at løsningene med høyere konsentrasjon M $\beta$ CD hindrer aggregatdannelse initielt effektivt og er en formålstjenlig «spring». Men disse oppløsningene er også mer ustabile i forhold til oppløsningene med lavere konsentrasjon M $\beta$ CD, og en høyere kurkuminkonsentrasjon i løsningene gir ytterligere destabilisering og raskere utfelling av kurkumin. De overmettede kurkuminløsningene av HPMC-produktene så ikke ut til å nå likevekt i løpet av de 4 første timene etter oppløsning i fosfatbuffer.

Produktet (1:1-HA) med teoretisk kurkuminkonsentrasjon  $25 \mu\text{M}$  hadde en rask nedgang i konsentrasjon i løpet av de første 2 timene da kurkuminkonsentrasjonen ennå var detekterbar med HPLC-systemet, og så ikke ut til å stabilisere seg selv om nedgangen fra 1 til 2 timers lagring var noe mindre enn fra første time (Figur 3.38). Dette indikerer at systemets likevekt

er forskjøvet mot fritt kurkumin i løsning som aggregerer fremfor å kompleksere med M $\beta$ CD. Produktet danner en overmettet løsning av kurkumin initielt, men kurkuminkonsentrasjonen synker raskt i den metastabile overmetningsfasen (jfr. Figur 1.5). Likevekt innstilles tilsynelatende i alle prøvene med (1:3-HA) etter ~3 timer. Høyest relativ likevektkonsentrasjon oppnås i prøve med lavest teoretisk kurkuminmengde (5  $\mu$ M) der likevektkonsentrasjonen er ~2,3  $\mu$ M som utgjør ~45,8 % av teoretisk konsentrasjon. Lavest relativ likevektkonsentrasjon oppnås i prøve med høyest teoretisk kurkuminkonsentrasjon (25  $\mu$ M), der likevektkonsentrasjonen er ~4,5  $\mu$ M som utgjør ~18,0 % av teoretisk konsentrasjon. (Tabell 3.16 og 3.17, Vedlegg). Dette gir en indikasjon på at produktet danner en overmettet løsning av kurkumin initielt med en løselighetsgrense i PBS på mellom 2-4  $\mu$ M der resterende kurkumin aggregerer eller adherer til plastrørene. Denne løselighetsgrensen beskriver løseligheten til kurkumin ved likevekt i et vandig system med 1:3 molforhold mellom kurkumin og M $\beta$ CD og HA. Variasjonen skyldes trolig variabel adsorpsjon av kurkumin til plastrørene ved ulike mengder kurkumin til stede samt ulik grad av aggregatdannelse og utfelling.

#### **4.3.3. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer)**

For å vurdere overmetning av kurkumin i oppløsninger av de frysetørrete produktene utover de fire første timene etter oppløsning, ble nye uttak fra nye batcher løst i PBS (pH 6,1) til teoretisk kurkuminkonsentrasjon 25  $\mu$ M. Prøvene med (1:1-HA) hadde et gjennomsnittlig kurkumininnhold over det generelle gjennomsnittet for dette produktet, som trolig skyldes ufullstendig filtrering før frysetørring. Teoretisk konsentrasjon ble ikke oppnådd for noen av produktene. Årsaken til dette er trolig den samme som nevnt over: ufullstendig oppløsning (aggregater), tap av kurkumin under filtrering, rask utfelling/aggregering og/eller adhesjon til plastrørene. Det er også en usikkerhet rundt beregningen av kurkumininnhold og vanninnhold som ble brukt til å kalkulere mengden frysetørret produkt som trengtes for å lage de ulike løsningene, som beskrevet i detalj under «4.3.2 Overmetning av kurkumin i vandig løsning (0-4 timer)».

Den raske nedgangen i kurkuminkonsentrasjonen etter oppløsning av (1:1-HA) skyldes antagelig dårlig stabilisering av den metastabile overmetningsfasen med høy



kurkuminkonsentrasjon med påfølgende forskyving av likevekten mot fritt kurkumin i løsningen. M $\beta$ CD og HA er effektive «springs», men mindre effektive «parachutes» i disse produktene. Stabilisering av kompleksert kurkumin med M $\beta$ CD og HA skjer først ved lavere kurkuminkonsentrasjon i løsningen. Kurkumin er følsomt for hydrolyse, men det ble ikke observert noen nye ukjente topper i kromatogrammene over tid ved deteksjonsbølgelengdene 420 nm og 254 nm. På bakgrunn av halveringstiden for kurkumin i bufferløsninger med konsentrasjon 25  $\mu$ M ( $9,1 \times 10^3$  timer = 379 dager) [41] burde ikke hydrolyse være hovedårsaken til nedgang i konsentrasjon. Av Figur 3.41 kommer det fram at oppløst (1:1-HA) når en tilnærmet likevekt av løseligheten til kurkumin etter ~32 timer. Denne batchen (1:1-HA) danner med andre ord en overmettet løsning i PBS som først når likevekt etter ~32 timer, avhengig av kurkumininnhold. Den bratte nedgangen i kurkuminkonsentrasjon de første 24 timene gir et tydeligere bilde på hvorfor konsentrasjonen raskt falt til under detekterbart nivå i det innledende forsøket som gikk over 4 timer. Grunnen til at mengdene til enhver tid er detekterbare ved 168 timers-forsøket skyldes trolig forskjellig kurkumininnhold i batchene som ble laget og benyttet, samt variabel og generelt dårlig fysisk stabilitet i vandig løsning. Enkelte avvikende resultater i noen av parallellene som tidvis trekker gjennomsnittlig kurkuminløselighet opp, kan komme av små aggregater av kurkumin som kommer gjennom filteret ved første filtrering, og som løses når metanol tilsettes for å felle HA.

Kurkuminkonsentrasjonen i parallellene med oppløst (1:3-HA) var relativt stabil gjennom hele forsøket, hvilket samsvarer med den fysiske stabiliseringen som tidligere ble observert av dette produktet i vandig løsning etter ~3 timer. Dette indikerer at likevektskonsentrasjonen av denne formuleringen med kurkumin er ~4  $\mu$ M. Med 8 timer mellom første og andre kvantifisering av kurkumin i løsningen kommer det ikke like godt fram at dette produktet også danner en overmettet løsning initielt. Løsningene når likevekt raskere enn batchen (1:1-HA) brukt i disse forsøkene. Noe variasjon mellom parallellene utover i forsøket skyldes trolig ulik grad av aggregering og oppløsning av disse etter filtrering (Tabell 3.21, Vedlegg). En økning i gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon i løpet av de siste 120 timene av forsøket med (1:3-HA) kan skyldes økt utfelling av kurkuminmolekyler som aggregerer og som kommer gjennom filteret og løses ved tilsetning av metanol, eller varianter av kurkumin med lik retensjonstid, men med høyere molar absorptivitet, på samme måte som den observerte økningen i kurkumininnhold i holdbarhetsstudiene. Grunnen til at vi ikke ser den samme trenden med (1:1-HA) kan være at dette produktet er mer ustabil enn (1:3-HA), slik at

kurkuminmolekylene som ikke er kompleksert eller holdt i løsning av van der Waalske interaksjoner med HA aggregerer og feller ut i større partikler enn i (1:3-HA); disse bunnfeller under sentrifugering og blir dermed ikke tatt med til analyse av kurkuminkonsentrasjon.

Forsinket utfelling/aggregering skyldes trolig en kombinasjon av egenskapene til M $\beta$ CD og HA. CD solubiliserer kurkumin og skjærer det hydrofobe molekylet mot det vandige miljøet, men det kreves overskudd av bærer i forhold til kurkumin for at flest mulig kurkuminmolekyler skal danne kompleks med solubilisatoren i stedet for å danne aggregater i løsningen. Det er en likevekt som forskyves mot fritt kurkumin etter hvert som kurkuminmolekyler feller ut, og solubilisert kurkumin minker stadig til den overmettede løsningen nærmer seg likevekt. HA virker stabiliserende ved å øke viskositeten og dermed redusere molekylenes bevegelse i systemet, og ved å interagere med komplekset og fritt kurkumin via van der Waalske krefter og hydrogenbindinger (jfr. «4.1 Faseløselighet»).

Kurkuminkonsentrasjonen i løsningene med (1:1-HPMC) hadde tydelig falt etter 7 dager etter oppløsning i buffer (Figur 3.42). Figuren viser at oppløsning av (1:1-HPMC) i fosfatbuffer danner overmettede løsninger av kurkumin som ikke når endelig likevekt i løpet av de første 48 – 168 timene etter oppløsning. En økning i beregnet kurkuminkonsentrasjon etter 24-32 timer kan vanskelig forklares på dette tidspunkt. Prøvene ble ikke utsatt for mekanisk påvirkning, og temperaturen var konstant. En temperaturøkning eller risting av prøvene kunne medført forskyvning av likevekten mellom fritt kurkumin og M $\beta$ CD og inklusjonskomplekset, kurkumin + M $\beta$ CD  $\leftrightarrow$  kurkumin:M $\beta$ CD<sub>x</sub>, mot høyre. Man kan ikke utelukke dannelsen av tilsvarende former for kurkumin som beskrevet tidligere, med høyere molar absorpsjon, etter ~24 timer, som igjen endrer molekylær formasjon eller feller ut etter ~32 timer. Økningen i kurkuminkonsentrasjon forekom i alle parallellene, og skyldes derfor trolig ikke oppløsning av aggregater av kurkumin etter filtrering.

Kurkuminkonsentrasjonen i løsningene med (1:3-HPMC) oppnådde kun halvparten av den initiale kurkuminkonsentrasjonen som i (1:1-HPMC)-løsningene. Denne stemmer overens med konsentrasjonene oppnådd med de samme produktene i overmetningsstudien over 4

timer. Også kurkuminkonsentrasjonen i (1:3-HPMC)-løsningene falt etter 7 dager etter oppløsning i buffer. Dette viser at også oppløsninger av (1:3-HPMC) i buffer danner overmettede løsninger av kurkumin som ikke når endelig likevekt i løpet av de første 48 – 168 timene etter oppløsning. Økningen i beregnet kurkuminkonsentrasjon etter 24-32 timer er vanskelig å forklare på dette tidspunkt og må undersøkes videre.

Sen innstilling av likevekt i oppløsningene av HPMC-produktene skyldes trolig i stor grad egenskapene til HPMC. CD solubiliserer kurkumin og skjærer det hydrofobe molekylet mot det vandige miljøet, og HPMC øker viskositeten og danner hydrofile interaksjoner med CD som holder inklusjonskompleksene på en viss avstand seg imellom, slik at hydrofobe interaksjoner mellom kurkuminmolekylene reduseres og interaksjoner med hulrommet i CD favoriseres. Høyere kurkuminkonsentrasjon i oppløsningene av (1:1-HPMC) enn (1:3-HPMC), som også ble observert i overmetningsforsøkene over 4 timer, er motstridende i forhold til fasefølselighetsforsøkene, der en økning i M $\beta$ CD-konsentrasjon i vandige løsninger med lav konsentrasjon HPMC ga økt kurkuminkonsentrasjon. Andre interaksjoner i oppløsninger av frysetørrede produkter enn i løsninger der kurkumin, M $\beta$ CD og HPMC kombineres direkte i vandig medium (som sett av absorpsjonsspektrene), kan være en årsak til disse observasjonene.

Overmetningsstudiene indikerer at (1:3-HA) stabiliseres bedre enn (1:1-HA), og (1:1-HPMC) bedre enn (1:3-HPMC). Oppløsninger av (1:3-HA) når likevekt med hensyn på kurkuminkonsentrasjonen etter ~3 timer, mens oppløsninger av (1:1-HA) er svært ustabile, faller raskt i kurkuminkonsentrasjon og når trolig en likevekt innen 32 timer. Oppløsninger av (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) viser bedre stabilitet enn (1:3-HA)-løsninger, og opprettholder overmetning av kurkumin i minst 48-168 timer i fosfatbuffer. For å være sikker på repeterbar kurkuminkonsentrasjonen i bakterieinaktiveringsforsøk ble det bestemt å bruke (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) umiddelbart etter oppløsning. (1:1-HA) ble konkludert med å være for ustabil for å få reproducerbare resultater i et bakterieinaktiveringsforsøk, da kurkuminkonsentrasjonen falt raskt og ikke så ut til å stabilisere seg. (1:1-HA) ble derfor ikke undersøkt videre.

#### 4.4. Fotostabilitet

Det er kjent at kurkumin er fotolabilt og blekes under bestråling [5]. Grad av degradering og fargeendring påvirkes av tilstedeværelsen av andre hjelpestoffer eller urenheter, om stoffet er fast eller i løsning, lyskilden, temperatur og temperaturforandringer, og vanninnhold [5].

Høyere absorbans for ren kurkumin bestrålt i SUNTEST enn mørkekontrollen samsvarer med den tilsynelatende økte mengden kurkumin (Figur 3.12b). Da retensjonstiden var uendret i forhold til mørkekontroll og ubestrålt kurkumin er det sannsynlig at det under bestråling med en temperaturøkning til ~60 °C i løpet av bestrålingsperioden dannes en form av kurkumin med høyere molar absorbans.

Man har tidligere sett at CD kan akselerere fotokjemisk nedbrytning, og at nedbrytningen av kurkumin er raskere i løsninger med CD enn i organiske løsemidler [3]. En nedgang i kurkumininnhold var følgelig forventet i de faste frysetørrede produktene etter bestråling med 22 540 kJ/m<sup>2</sup>. Bestråling av fire paralleller (1:1-HA) ga ikke reproducerbare resultater, og viste både økning og nedgang i kurkumininnhold (Tabell 3.9). Alle prøvene ble avfarget fra gult til kritthvite. Økningen i kurkumininnhold i den ene parallellen kan forklares med høyt kurkumininnhold før bestråling (6,9 % (w/w)); da en tilsvarende økning ble observert for ren kurkumin, er det sannsynlig at denne økningen også skyldes dannelsen av en annen form for kurkumin med høyere molar absorbans. En økning i kurkumininnhold i en parallell med normalt kurkumininnhold (2,1 % (w/w)) var derimot ikke forventet. Om denne økningen skyldes den samme formen for kurkumin som nevnt tidligere kan ikke bekreftes uten videre studier. For disse parallellene ble hvitt produkt veid ut og løst i metanol, og kurkumins distinkte gulfarge kom tilbake. Usikkerhet rundt måling av vanninnhold i prøvene med Karl Fischer titrering gjorde at hensyn til vanninnhold i beregningen av kurkumininnhold ble vurdert som årsak til den tilsynelatende økningen i kurkumininnhold. En større mengde vann som tas hensyn til i beregningene, fører til høyere beregnet kurkumininnhold. Men selv en justering av vanninnhold i beregningene til ekstremt lave verdier (0,1 % vann) resulterer i høyere kurkumininnhold etter bestråling enn før. Fire paralleller (1:1-HA) til ble bestrålt for å undersøke hvilken effekt bestråling har på dette produktet. Her fikk alle en nedgang i

kurkumininnhold. Det konkluderes med at bestråling av dette produktet bryter ned kurkumin og begrenser produktets holdbarhet hvis det er ubeskyttet mot lys. Også bestrålt (1:3-HA) viste en nedgang i beregnet kurkumininnhold på > 99 % og en nær total blekning av produktet til kremhvitt (Tabell 3.9). Oppløsning av bestrålt (1:1-HA) og (1:3-HA) ga svakt gule løsninger.

En nedgang i kurkumininnhold i HPMC-produktene etter bestråling samsvarer med den samtidige fotoblekingen av produktene til kremhvitt. Nedgangen i kurkuminkonsentrasjon i de bestrålte HPMC-produktene var tilnærmet den samme, og ingen beskyttende eller ekstra destabiliserende effekt ble observert med noen av hjelpestoffene. Det behøves flere forsøk for å konkludere om høyere CD-konsentrasjon i (1:3)-produktene fører til ytterligere fotokjemisk nedbrytning, om kurkumin brytes ned og hva det brytes ned til, eller om det dannes andre former med andre egenskaper, men lik retensjonstid på C18-kolonnen.

Mørkekontrollene med (1:1-HA) og (1:1-HPMC) fikk en variabel endring i beregnet kurkumininnhold, gjennomsnittlig en økning, (1:3-HA) en økning og (1:3-HPMC) en nedgang i gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold som alle er vanskelige å forklare (Tabell 3.9 og 3.10). Da disse prøvene var pakket i reflekterende aluminiumsfolie var temperaturen < 30 °C (kammertemperatur målt til  $15 \pm 1$  °C, Black Standard Temperature målt til  $29 \pm 1$  °C) i hele bestrålingsperioden, og det var ikke noen nevneverdig endring av vanninnhold da skålene var tett pakket også med uperforert plastfolie. Fargen var blassere for alle produktene. Videre studier behøves for å forklare disse resultatene. Absorpsjonsspektra ble tatt opp for alle prøvene, og viste økt absorbans < 380 nm i de bestrålte prøvene og tilnærmet fraværende kurkumintopp og en endring i spekteret for mørkekontrollene i forhold til nylaget produkt, spesielt en reduksjon i absorbans ved 356 nm og et blåskift for HA-produktene (Figur 3.12). Mørkekontrollene til HPMC-produktene hadde tilnærmet uendrete absorpsjonsspektra (Figur 3.13). Det generelt svakere spekteret for mørkekontrollen til (1:3-HPMC) kan skyldes større partikler i oppløsningen som ble filtrert bort (0,45 µm) før opptak av absorpsjonsspekter. Et skift mot kortere bølgelengder kan indikere spaltning av kurkumin eller reaksjoner, som syklisering, som bryter den lange kjeden med konjugerte dobbeltbindinger [89].

## 4.5. Holdbarhet

Et problem for kurkumin under lagring er oksidasjon, spesielt ved høy luftfuktighet [90]. Det er tidligere rapportert at fast kurkumin er termisk stabil < 60 °C, men at en økning i temperaturen kan medføre strukturelle endringer, polymerisering eller nedbrytning [91]. Da produktene er frysetørrete og kurkumin også er følsom for hydrolyse, ble kolbene korket grundig og oppbevart i varmeskap ved 40 °C for studie av akselerert holdbarhet og i laboratoriet ved ~20 °C for generell holdbarhet. Den ene parallellen (1:3-HA) som ble oppbevart ved ~20 °C uten forsegling hadde høyere vanninnhold enn de andre parallellene etter fire ukers oppbevaring, og lavere kurkumininnhold. Dette kommer trolig av mer hydrolytisk nedbrytning av kurkumin i denne parallellen i forhold til de andre parallellene med mer stabilt, lavt vanninnhold. Alle produktene fikk tilsynelatende økt kurkumininnhold under lagring ved 40 °C i fire uker, samt (1:3-HA) ved oppbevaring ved ~20 °C. Hva som medfører denne målte økningen i kurkumininnhold kan være det samme som ga økt beregnet kurkumininnhold i bestrålt kurkumin. Strukturell omorganisering av kurkumin kan forklare fenomenet, men det kan ikke konkluderes uten å foreta flere studier. Endringen i absorpsjonsspektrene for alle produktene bygger opp om teorien om at det har blitt dannet en form for kurkumin med en viss levetid som har høyere molar absorpsjonskoeffisient. I termogrammene fra DSC ble det ikke observert noen endring for HA-produktene. Dette indikerer at produktene er relativt stabile og holder seg i den opprinnelige amorfe strukturen. Termogrammene viser ikke at det har blitt dannet en annen form for kurkumin eller spaltningsprodukter med annen T<sub>g</sub>. Hvis det dannes en slik form har den mange likheter med kurkumin eksperimentelt. I termogrammene til HPMC-produktene ble det observert en forskyvning av T<sub>g2</sub> mot høyere temperatur; T<sub>g3</sub> er ikke lenger synlig. Dette kan indikere noe dårligere stabilitet i strukturene i disse produktene som kan være avgjørende for holdbarheten til produktene. En nedgang i kurkumininnhold i HPMC-produktene oppbevart ved ~20 °C i fire uker bygger opp om dette.

## 4.6. Bakterieinaktiveringsforsøk

De frysetørrete produktene (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) viste seg å være aktuelle for bakterieforsøk grunnet reproducerbare termiske egenskaper, høyt kurkumininnhold, rask

oppløsning og god nok stabilitet i løsning til bruk i forsøk. (1:1-HA) var ustabil i vandig løsning, og dannet raskt aggregater etter oppløsning, hvilket vanskeliggjorde forsøk med dette produktet på bakterier.

#### 4.6.1. Fototoksisitet på *E. faecalis*

Den fullstendige mekanismen bak kurkumins antibakterielle fototoksiske effekt er foreløpig ikke kjent [6, 92]. Grunnet kurkumins hydrofobe karakter forventes det at molekylet lokaliseres i lipidmembraner som yttermembraner og i endosomale og lysosomale membraner. Translokasjon av kurkumin over cellemembranen og lokalisering i lysosomer har blitt observert i WiDr celler, både for kurkumin alene og i formulering med Pluronic® [93]. *E. faecalis* har en relativt porøs overflate bestående av peptidoglykan og lipoteikoinesyre som lar PS som kurkumin passere [23]. Med inkubering i 10 minutter før lyseksponering, får trolig kurkuminmolekyler tid til å lokaliseres både i cellemembraner og i lysosomer (hvis de bindes og tas opp av bakteriene). Fototoksisitet av kurkumin på *E. faecalis* med denne metoden kan forventes å komme av lysaktivert og dannelse av reaktive intermediater og ROS i bakteriens yttermembran, ekstracellulært med diffusjon av ROS mot bakterieoverflaten, og dannelse av ROS i endosomer/lysosomer intracellulært. Dannelse av ROS i yttermembranen kan føre til polymerisering og fragmentering av lipidene, slik at cellemembranen åpnes og innholdet lekker ut [94]. Dannelse av ROS i lysosomer kan også gjøre disse lekk, slik at lysosomale enzymer slipper ut og bryter ned bakterien fra innsiden [94]. Langtlivete radikaler, som peroksid, som dannes ekstracellulært kan diffundere mot celleoverflaten og reagere med lipidene som over [10]. Haukvik *et al.* (2009) studerte naturlig fluorescens fra kurkumin i planktonisk *E. faecalis*, og fant relativ kraftig fluorescens fra hele bakterien, svarende til både adsorbent kurkumin til overflaten av bakterien, og intracellulær lokasjon [6].

Produktet (1:3-HA) viste lovende fototoksiske resultater på *E. faecalis*, spesielt med 10  $\mu\text{M}$  og lysdose 11-22  $\text{J}/\text{cm}^2$ .  $< 1\%$  overlevelse med  $\geq 5\ \mu\text{M}$  og lysdose 11  $\text{J}/\text{cm}^2$  er en svært god fototoksisk effekt (Figur 3.43). Det er dog viktig å fremheve at alle bakteriene bør inaktiveres for at en infeksjon ikke skal blusse opp igjen. Med (1:3-HA) kan denne effekten muligens oppnås dersom produktet administreres sammen med en lav dose antibiotika. Dette vil kunne redusere bruken av tradisjonelle antibiotika. Effekten produktet har på *E. faecalis* er

fremtredende, og det er tydelig at grad av overmetning og eventuell utfelling/aggregering av PS spiller inn. Variasjoner i kurkuminkonsentrasjon, aggregering og grad av overmetning i løsningene som ble testet, er faktorer som kan bidra til de observerte forskjellene i fototoksisitet. Som sett av overmetningsforsøkene med de samme konsentrasjonene, ser det ut til at en stor andel (1:3-HA) løst til 25  $\mu\text{M}$  aggregerer umiddelbart. Slike aggregater hemmer dannelsen av reaktive forbindelser, og fører til dårligere fototoksisk effekt [42]. Aggregering er trolig årsaken til at den høyeste kurkuminkonsentrasjonen av (1:3-HA) har dårligst effekt. Ettersom løsningene av produktet til behandling av *E. faecalis* ikke ble filtrert før bruk, var det en større andel av kurkumin i disse prøvene enn i overmetningsforsøkene.

Dobling av lysdosen med 10  $\mu\text{M}$  (1:3-HA) ga en begrenset økning i effekt uten praktisk betydning. Dette kan skyldes redusert eksitasjon av gjenværende kurkumin grunnet aggregering og utfelling, eller kort fotokjemisk halveringstid for oppløst kurkumin i PBS med påfølgende nedgang i antall kurkuminmolekyler tilgjengelig for radikaldannelse utover 10 minutter bestråling. Halveringstiden for fotokjemisk degradering av kurkumin i PBS pH 5 med 0,5 % (v/v) metanol og 5 % «randomly methylated»  $\beta$ -cyclodekstrin (RM $\beta$ CD) er rapportert å være 20,4 minutter med lysintensitet  $1,4 \times 10^5$  lux og  $18,6 \text{ W/m}^2$  [3]. Lysdosen og mengden CD i dette arbeidet er mye lavere, og det oppløste produktet inneholder ikke metanol, men kun en liten mengde HA. En tilsvarende eller lenger halveringstid er følgelig forventet for (1:3-HA). Liten effekt av doblet lysdose (20 minutter bestråling fremfor 10 minutter) skyldes derfor trolig aggregering og utfelling, og allerede forbruk av mesteparten tilgjengelig solubilisert kurkumin etter 10 minutter bestråling.

(1:3-HA) danner en mer ustabil overmettet løsning enn kurkuminkontrollen med 1 % (v/v) etanol. Kurkumin befinner seg her i større grad i aggregater enn i interaksjoner med bakterien, og ettersom likevekten forskyves bort fra interaksjoner med M $\beta$ CD og HA, søker en stadig større andel fritt kurkumin sammen. God stabilisering av kurkumin løst i PBS (pH 6,1) til overmettede løsninger med synergistisk effekt fra M $\beta$ CD og HPMC, kan være årsaken til bedre fototoksisk effekt av HPMC-produktene enn av (1:3-HA).



#### 4.6.2. Fototoksisitet på *E. coli*

Yttermembranen til *E. coli* er lite permeabel for lipofile molekyler, som de fleste PS er, og hindrer antagelig ROS å diffundere gjennom bakterieoverflaten og inn til mer sensitive mål inni bakterien [95]. Det antas videre at det å svekke strukturen i yttermembranen alene, ikke er nok for effektiv fototoksisitet, men at den indre lipidmembranen også må svekkes [95]. Da kurkumin er et hydrofobt molekyl, er det sannsynlig at den fototoksiske effekten kommer av at kurkumin inkludert i hulrommet i CD adherer til poriner eller andre strukturer i yttermembranen. Da M $\beta$ CD er minst 1,53 nm bredt [49] og porestørrelsen til et kjent *E. coli* porin (OmpF) er omtrent 1,16 nm i diameter [96], slipper ikke M $\beta$ CD gjennom porene; spesielt ikke dersom kurkumin er inkludert i hulrommet til CD. Adhert til bakterieoverflaten, eller på en annen måte i tett kontakt med bakteriene, kan molekylet eksiteres og danne ROS som skader transportproteinene, den indre lipidmembranen og enzymer inni bakterien. Lysaktivering av kurkumin ekstracellulært burde gi liten fototoksisk effekt gitt yttermembranens egenskaper, men observasjonen gjort av Dahl *et al.* (1989) der kurkumin, enten svakt bundet eller ekstracellulært, er ansvarlig for den fototoksiske effekten også på Gram-negative bakterier, gjør at påstanden ikke kan utelukkes uten flere studier på lokasjon av PS. Haukvik *et al.* (2009) studerte kurkumins fluorescens i planktonisk *E. coli*, men fant kun en diffus fluorescens, trolig fra adsorbent kurkumin til overflaten [6].

Kurkuminkontrollen, (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) viste tilnærmet lik, og svært god fototoksisk effekt på *E. coli* (Figur 3.44). HPMC-produktene kan sikre lettere dosering og jevnere applisering enn en enkel, overmettet løsning av kurkumin med 1 % (v/v) etanol. Hjelpstoffene bidrar til å stabilisere overmettetheten og gir bedre reproducerbarhet av dosering og kurkuminkonsentrasjon på infeksjonsområdet. Høy viskositet gir jevnere fordeling av produktet og bidrar til at det holder seg på infeksjonsområdet i behandlingsperioden. Tilsvarende produkt undersøkt av Hegge *et al.* (2013) med 1:2,8 molforhold mellom kurkumin og HP $\beta$ CD og med 0,1 % (w/v) HPMC viste også god fototoksisk effekt på *E. coli* med ingen overlevende bakterier med kurkuminkonsentrasjon 25  $\mu$ M og lysdose 14 J/cm<sup>2</sup> og 28 J/cm<sup>2</sup>, og 0,01 % overlevelse med 10  $\mu$ M og de samme lysdosene [13]. Den fototoksiske effekten til (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) på *E. coli* er sannsynligvis bedre enn produktet til Hegge *et al.*, lysdose tatt i betraktning, og svært lovende for videre studier.

## 5. Konklusjon

Amorfe faste dispersjoner av kurkumin i formuleringer med M $\beta$ CD og HA/HPMC ble laget ved frysetørring av overmettede vandige løsninger av kurkumin. Faseløselighetsstudier viste lineær økning i kurkuminkonsentrasjon i vandige løsninger med økende mengde M $\beta$ CD med og uten lav konsentrasjon HA eller HPMC, hvilket indikerer dannelsen av inklusjonskomplekser mellom ett CD og ett kurkuminmolekyl. De fire forskjellige produktene som ble laget hadde høyt kurkumininnhold, men løste seg likevel raskt i kontakt med vann. Etter oppløsning i vandig medium dannet produktene overmettede løsninger av kurkumin. De overmettede løsningene av produktene med HA nådde likevekt med hensyn på kurkuminkonsentrasjon raskere enn løsningene av produktene med HPMC. Dette innebærer bedre stabilisering av de overmettede løsningene med en kombinasjon av M $\beta$ CD og HPMC enn med en kombinasjon av M $\beta$ CD og HA, til tross for evnen HA har til å danne hydrofobe interaksjoner med kurkumin.

Den termiske stabiliteten til produktene var bedre enn den fotokjemiske. Kurkumininnhold i alle produktene økte tilsynelatende i løpet av fire uker ved 40 °C. Kurkumininnholdet økte også i (1:3-HA) i løpet av fire uker ved romtemperatur, mens det i produktene med HPMC minket. Dette kan forklares med dannelsen av en ny form av kurkumin med høyere molar absorpsjonskoeffisient. Det kreves flere studier for å identifisere denne formen. Ved bestråling av produktene med lysdose 22 540 kJ/m<sup>2</sup> ble produktene fotobleket og viste seg å være mer fotolabile enn ren kurkumin som fast stoff. Kurkumininnholdet minket i de bestrålte produktene, bortsett fra i to paralleller med (1:1-HA), og varierte mellom å øke og minke i mørkekontrollene som verken ble utsatt for stråling eller varme. Årsaken til denne observerte økningen i kurkumininnhold er ukjent.

(1:1-HA) var ustabil etter oppløsning, og ble følgelig ikke inkludert i bakterieinaktiveringsforsøk. (1:3-HA), (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) var fototoksiske overfor *E. faecalis*. (1:3-HA) medførte < 1 % bakterieoverlevelse med kurkuminkonsentrasjonene 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 25  $\mu$ M og lysdose 11 J/cm<sup>2</sup>, og HPMC-produktene og samme lysdose ga fullstendig drap med kurkuminkonsentrasjoner fra 0,5–25  $\mu$ M. HPMC-produktene viste like god antibakteriell fototoksisk effekt på *E. coli* som kontrolløsningene av kurkumin med 1 %

(v/v) etanol, med ingen overlevende bakterier med kurkuminkonsentrasjoner  $\geq 5 \mu\text{M}$ , og  $< 0,4$  % bakterieoverlevelse med kurkuminkonsentrasjon  $2,5 \mu\text{M}$  og lysdose  $32 \text{ J/cm}^2$ . Den fototoksiske effekten til HPMC-produktene anses å være svært lovende i forhold til tidligere undersøkte formuleringer av kurkumin.

## 6. Veien videre

Det er spesielt interessant å studere HPMC-produktene videre, da disse viste gunstig overmetning av kurkumin i vandig løsning, gode termiske og fotokjemiske egenskaper, og svært god fototoksisk effekt på *E. faecalis* og *E. coli*. Interaksjonen mellom kurkumin og HA, og HA og kurkumin-CD komplekser er også interessant for videre studier, da HA er en polymer som naturlig finnes i kroppen og har gunstige effekter på sårhelingsprosessen.

Det vil være viktig å gjenta holdbarhetsstudiene med flere paralleller, først og fremst av HPMC-produktene, for å bekrefte resultatene. Analyse av kurkumininnhold og nedbrytning burde utvides til å inkludere identifikasjon av spaltningsprodukter med LC-MS eller andre relevante metoder. Om kurkumininnholdet ikke minker i like stor grad som spaltningsproduktene øker, vil det indikere dannelsen av en annen form for kurkumin med høyere molar absorptivitet. En slik form kan studeres med spektroskopiske metoder inklusive fluorescens levetidsmålinger. Tilsvarende er også interessant å studere for fotokjemisk nedbrytning, med flere paralleller, identifikasjon av spaltningsprodukter, og bestråling med forskjellige lysdoser for å vurdere reaksjonshastighet og hastighetskonstant for faste produkter og oppløsninger sammenlignet med ren kurkumin.

Da HPMC-produktene viste meget god fototoksisk effekt på *E. faecalis* og *E. coli*, er det interessant å se effekten av lavere lysdoser. Det vil videre være spennende å vurdere fototoksisk effekt på *Pseudomonas aeruginosa* eller *Staphylococcus aureus*, da resistensutvikling hos disse bakteriene er spesielt økende, og alternativ antibakteriell behandling med aPDT er aktuelt [95]. Fototoksisk effekt på biofilmer er også interessant å undersøke, da disse generelt er mer motstanddyktige enn planktoniske bakterier [97]. God fototoksisk effekt på biofilmer vil være en svært gunstig egenskap ved bruk av slike produkter i aPDT. Lokalisering av kurkumin i planktoniske bakterier og i biofilmer vil også være meget interessant å undersøke, og aktuelt for å forstå den fototoksiske effekten bedre

## 7. Referanseliste

1. Hamblin MR, Hasan T. *Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochem Photobiol Sci. 2004; 3: 436-450.
2. Tegos GP, Hamblin MR. *Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps.* Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 196-203.
3. Tønnesen HH, Másson M, Loftsson T. *Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability.* Int J Pharm. 2002; 244: 127-135.
4. Tønnesen HH, Karlsen J. *Studies on curcumin and curcuminoids - V. Alkaline Degradation of Curcumin.* Z Lebensm Unters Forsch. 1985; 180: 132-134.
5. Tønnesen HH, Karlsen J, van Henegouwen GB. *Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin.* Z Lebensm Unters Forsch. 1986; 183: 116-122.
6. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. *Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations.* Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie. 2009; 64: 666-673.
7. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. *Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations: Studies on curcumin and curcuminoids, XLI.* Pharmazie. 2010; 65: 600-606.
8. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. *Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: Studies on curcumin and curcuminoids XLII.* J Pharm Sci. 2011; 100: 174-185.
9. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. *Photocytotoxicity of curcumin.* Photochem Photobiol. 1994; 59: 290-294.
10. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. *Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin.* Arch Microbiol. 1989; 151: 183-185.
11. Hegge AB, Nielsen TT, Larsen KL, Bruzell E, Tønnesen HH. *Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy-effect of cyclodextrin type and amount: Studies on curcumin and curcuminoids XLV.* J Pharm Sci. 2012; 101: 1524-1537.
12. Henriksen SD, Bøyre K. *Antibiotika.* Store Norske Leksikon [internett]. Hentet fra: <http://snl.no/antibiotika> (Oppdatert 2013, besøkt 02.04.2013).
13. Hegge AB, Vukicevic M, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. *Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoids L.* Eur J Pharm Biopharm. 2013; 83: 95-105.
14. Henderson BW, Dougherty TJ. *How does photodynamic therapy work?* Photochem Photobiol. 1992; 55:145-157.

15. Photocure. *Our products and technology*. Oslo: Photocure [internett]. Hentet fra: <http://www.photocure.com/Our-products-and-technology/> (Besøkt 09.04.2013).
16. Felleskatalogen AS. *Felleskatalogen*. Oslo: Felleskatalogen AS [internett]. Hentet fra: <http://www.felleskatalogen.no/medisin> (Oppdatert 2013, besøkt 12.05.2013).
17. Lichtman JW, Conchello J. *Fluorescence microscopy*. Nat Methods. 2005; 2: 910-919.
18. Moore DE. *Photophysical and Photochemical Aspects of Drug Stability*. I: Tønnesen HH, redaktør. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. London: CRC Press; 2004. s. 10-40.
19. Foote CS. *Type I and Type II Mechanisms of Photodynamic Action*. I: Heitz JR, Downum KR, redaktører. *Light-activated Pesticides*. Washington: American Chemical Society; 1987. s. 22-38.
20. Spikes JD. *Photosensitization*. I: Smith KC, redaktør. *The Science of Photobiology*. New York: Plenum Press; 1989. s. 79-110.
21. Gollnick K. *Type II Photosensitized Oxygenation Reactions*. I: Mayo FR, redaktør. *Oxidation of Organic Compounds*. Washington: American Chemical Society; 1968. s. 78-101.
22. Oleinick, NL. *Basic Photosensitization*. American Society for Photobiology. Photobiological Sciences Online [internett]. Hentet fra: <http://www.photobiology.info/Oleinick.html> (Oppdatert 09.09.2011, besøkt 13.05.13)
23. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, redaktører. *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. 7. utgave. Massachusetts: Blackwell Science Ltd.; 2004. s. 25-28.
24. Chattopadhyay I, Kaushik B, Uday, B, Ranajit BK. *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*. Cur Sci. 2004; 87: 44-53.
25. Ammon HP, Wahl MA. *Pharmacology of Curcuma longa*. Planta Med. 1991; 57: 1-7.
26. Ammon HP, Anazodo MI, Safayhi H, Dhawan BN, Srimal RC. *Curcumin: A potent inhibitor of leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL)*. Planta Med. 1992; 58: 226.
27. Tønnesen HH. *Studies on curcumin and curcuminoids XVIII. Evaluation of Curcuma products by the use of standardized reference colour values*. Z Lebensm Unters Forsch. 1992; 194: 129-130.
28. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. *Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004; 44: 97-111.
29. Rao DS, Sekhara NC, Satyanarayana MN, Srinivasan M. *Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat*. J Nutr. 1970; 100: 1307-1315.
30. Srivastava R, Dikshit M, Srimal RC, Dhawan BN. *Anti-thrombotic effect of curcumin*. Thromb Res. 1985; 40: 413-417.
31. Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, et al. *Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells*. Mol Cancer Ther. 2003; 2: 95-103.
32. Chen HW, Huang HC. *Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells*. Br J Pharmacol. 1998; 124: 1029-1040.

33. U.S. National Institutes of Health. *ClinicalTrials.gov*. U.S. National Institutes of Health [internett]. Hentet fra: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=curcumin&pg=1> (Besøkt 13.03.2013).
34. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. *Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic*. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 787-809.
35. Nardo L, Paderno R, Andreoni A, Másson M, Haukvik T, Tønnesen HH. *Role of H-bond formation in the photoreactivity of curcumin*. *Spectroscopy*. 2008; 22: 187-198.
36. Priyadarsini KI. *Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells*. *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev*. 2009; 10: 81-95.
37. Chignell CF, Bilskj P, Reszka K, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. *Spectral and photochemical properties of curcumin*. *Photochem Photobiol*. 1994; 59: 295-302.
38. Khopde SM, Priyadarsini I, Palit DK, Mukherjee T. *Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin*. *Photochem Photobiol*. 2000; 72: 625-631.
39. Nardo L, Andreoni A, Bondani M, Másson M, Tønnesen HH. *Studies on curcumin and curcuminoids. XXXIV. Photophysical properties of a symmetrical, non-substituted curcumin analogue*. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 97: 77-86.
40. The Merck Index. *Curcumin*. New Jersey: Merck & Co., Inc [internett]. Hentet fra: <http://www.medicinescomplete.com/mc/merck/2010/02673.htm> (Oppdatert 2012, besøkt 04.04.2013).
41. Tønnesen HH, Karlsen J. *Studies on curcumin and curcuminoids - VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution*. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1985; 180: 402-404.
42. Konan YN, Gurny R, Allémann R. *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. *J Photochem Photobiol B*. 2002; 66: 89-106.
43. Pabon HJ. *A synthesis of curcumin and related compounds*. *Rec Trav Chim Pays-Bas*. 1964; 83: 379-386.
44. Bruzell E, Morisbak E, Tønnesen HH. *Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations*. *Photochem Photobiol Sci*. 2005; 4: 523-530.
45. Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. *Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability?* *J Pharm Sci*. 2009; 98: 2549-2572.
46. Hillary AM. *Drug Delivery: The Basic Concepts*. I: Hillary AM, Lloyd AW, Swarbeck J, redaktører. *Drug Delivery and Targeting*. London: CRC Press; 2001. s. 1-48.
47. Gosangari S, Dyakonov T. *Enhanced dissolution performance of curcumin with the use of supersaturatable formulations*. *Pharm Dev Tech*. 2013; 18: 475-480.
48. Loftsson T, Brewster ME. *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*. *J PharmSci*. 1996; 85: 1017-1025.
49. Szejtli J. *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. *Chem Rev*. 1998; 98: 1743-1753.
50. Wacker Biosolutions. *HMS - datablad: Cavasol® W7 M*. München: Wacker-Chemie AG [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/dyqya2a> (Oppdatert 21.11.2012, besøkt 12.05.2013)

51. Sigma-Aldrich. *Methyl- $\beta$ -cyclodextrin*. St. Louis, Missouri: Sigma-Aldrich [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/c53fhnk> (Oppdatert 2013, besøkt 12.05.2013).
52. Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. *Cyclodextrins in drug delivery*. *Exp Opin Drug Deliv*. 2005; 2: 335-351.
53. Schichtling, E. *Sår*. Store Norske Leksikon [internett]. Hentet fra: [http://snl.no/.sml\\_artikkel/s%C3%A5r](http://snl.no/.sml_artikkel/s%C3%A5r) (Oppdatert 2013, besøkt 28.02.2013).
54. Connors KA. *The stability of cyclodextrin complexes in solution*. *Chem Rev*. 1997; 97: 1325-1357.
55. Tang B, Ma L, Wang H, Zhang G. *Study on the supramolecular interaction of curcumin and  $\beta$ -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application*. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 1355-1361.
56. Marcolino VA, Zanin GM, Durrant LR, Benassi MD, Matioli G. *Interaction of curcumin and bixin with  $\beta$ -cyclodextrin: Complexation methods, stability, and applications in food*. *J Agric Food Chem*. 2011; 59: 3348-3357.
57. Singh R, Tønnesen HH, Vogensen SB, Loftsson T, Másson M. *Studies of curcumin and curcuminoids. XXXVI. The stoichiometry and complexation constants of cyclodextrin complexes as determined by the phase-solubility method and UV-Vis titration*. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2010; 66: 335-348.
58. Baglole KN, Boland PG, Wagner BD. *Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins*. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2005; 173: 230-237.
59. Loftsson T, Másson M, Brewster ME. *Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*. *J Pharm Sci*. 2004; 93: 1091-1099.
60. Laurent TC. *Biochemistry of hyaluronan*. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1987; 442: 7-24.
61. Scott JE. *Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications*. I: Evered D, Whelan J, redaktører. *The biology of hyaluronan*. Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 1989. s. 6-15.
62. Sweetman SC, redaktør. Martindale: The Complete Drug Reference. *Hyaluronic acid*. London: Pharmaceutical Press [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/d8g8y4d> (Oppdatert 05.12.2011, besøkt 04.04.2013)
63. FMC BioPolymer. *Material safety data sheet: Proturon™ LV-C Sodium Hyaluronate*. Sandvika: FMC BioPolymer [internett]. Hentet fra: [http://www.fmc.com/msds/100000010021-MSDS\\_US-E.pdf](http://www.fmc.com/msds/100000010021-MSDS_US-E.pdf) (Oppdatert 29.01.2009, besøkt 12.05.2013).
64. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. *Hyaluronan fragments: An information-rich system*. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85: 699-715.
65. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. *Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit*. *Biochem J*. 1981; 200: 415-424.
66. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, Bernard GW. *Bacteriostatic effects of hyaluronic acid*. *J Periodontol*. 1999; 70: 370-374.
67. Frenkel JS. *The role of hyaluronan in wound healing*. *Int Wound J*. 2012.
68. Klein AW. *Soft tissue augmentation 2006: filler fantasy*. *Dermatol Ther*. 2006; 19: 129-133.



69. Andre P. *New trends in face rejuvenation by hyaluronic acid injections*. J Cosmet Dermatol. 2008; 7: 251-258.
70. Tønnesen HH. *Chemistry of Curcumin and Curcuminoids*. I: Ho CT, Lee CY, Huang MT, redaktører. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*. Washington: American Chemical Society; 1992. s. 143-153.
71. Tønnesen HH. *Studies on curcumin and curcuminoids*. XIV. *Effect of curcumin on hyaluronic acid degradation in vitro*. Int J Pharm. 1989; 50: 91-95.
72. Rogers TL. *Hypromellose*. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, redaktører. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/d6ke9r6> (Oppdatert 02.03.2012, besøkt 12.05.2013).
73. Ghosal K, Chakrabarty S, Nanda A. *Hydroxypropyl methylcellulose in drug delivery*. Der Pharmacia Sinica. 2011; 2: 152-168.
74. Raghavan SL, Trividic A, Davis AF, Hadgraft J. *Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers*. Int J Pharm. 2001; 212: 213-221.
75. Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. *Pharmacoat*. Tokyo: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd [internett]. Hentet fra: <http://www.elementoorganika.ru/files/pharmacoat.pdf> (Oppdatert 10.2004, besøkt 12.05.2013).
76. Sweetman SC, redaktør. Martindale: The Complete Drug Reference. *Hypromellose*. London: Pharmaceutical Press [internett]. Hentet fra: <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/2009/ms-5432-s.htm> (Oppdatert 30.01.2013, besøkt 12.05.2013).
77. Patel NA, Patel NJ, Patel RP. *Design and evaluation of transdermal drug delivery system for curcumin as an anti-inflammatory drug*. Drug Develop Ind Pharm. 2009; 35: 234-242.
78. Ji JA, Liu J, Shire SJ, Kamerzell TJ, Hong S, Billeci K, et al. *Characteristics of rhVEGF release from topical hydrogel formulations*. Pharm Res. 2010; 27: 644-654.
79. Pedersen-Bjerregaard S, Rasmussen KE. *Kvantitative analyser*. I: Pedersen-Bjerregaard S, Rasmussen KE, redaktører. *Legemiddelanalyse*. Bergen: Fagbokforlaget; 2004.
80. Pedersen-Bjerregaard S, Rasmussen KE. *Kvalitetsstandarder*. I: Pedersen-Bjerregaard S, Rasmussen KE, redaktører. *Legemiddelanalyse*. Bergen: Fagbokforlaget; 2004.
81. International Conference on Harmonisation. *ICH Topic Q1B: Photostability testing of new active substances and medicinal products*. London: European Medicines Agency [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/d5mlp36> (Oppdatert 01.1998, besøkt 12.05.2013).
82. Christensen T, Morisbak E, Tønnesen HH, Bruzell E. *In vitro photosensitization initiated by camphorquinone and phenyl propanedione in dental polymeric materials*. J Photochem Photobiol B. 2010; 100: 128-134.
83. Tomren MA, Másson M, Loftsson T, Tønnesen HH. *Studies on curcumin and curcuminoids*. XXXI. *Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin*. Int J Pharm. 2007; 338: 27-34.
84. International Conference on Harmonisation. *ICH Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. London: European Medicines Agency

- [internett]. Hentet fra: <http://tinyurl.com/3sxjc8l> (Oppdatert 06.1997, besøkt 12.05.2013).
85. Rupp A. *Solubilization of curcumin using a selected cyclodextrin*. Masteroppgave. Universitetet i Wien, Østerrike. 2012
  86. Higuchi T, Connors KA. *Phase solubility techniques*. Adv Anal Chem Instrum. 1965; 4: 212-217.
  87. Gordon ON, Schneider C. *Vanillin and ferulic acid: Not the major degradation products of curcumin*. Trends Mol Med. 2012; 18: 361-363.
  88. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. *Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products*. J Pharm Biomed Anal. 1997; 15: 1867-1876.
  89. Jagannathan R, Abraham PM, Poddar P. *Temperature-Dependent Spectroscopic Evidences of Curcumin in Aqueous Medium: A Mechanistic Study of Its Solubility and Stability*. J Phys Chem B. 2012; 116: 14533-14540.
  90. Paramera EI, Konteles SJ, Karathanos VT. *Stability and release properties of curcumin encapsulated in Saccharomyces cerevisiae,  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch*. Food Chem. 2011; 125: 913-922.
  91. Suresh D, Gurudutt KN, Srinivasan K. *Degradation of bioactive spice compound: Curcumin during domestic cooking*. Eur Food Res Tech. 2009; 228: 807-812.
  92. Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, van Henegouwen GB. *Studies on curcumin and curcuminoids IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems*. J Pharm Sci. 1987; 76: 371-373.
  93. Singh R, Tønnesen HH, Kristensen S, Berg K. *The influence of Pluronic on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX*. Photochem Photobiol Sci. 2013; 12: 559-575.
  94. Allison AC, Magnus IA, Young MR. *Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization*. Nature. 1966; 209: 874-878.
  95. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. *Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions*. J Photochem Photobiol B. 1992; 14: 262-266.
  96. Hancock, RE. *Role of porins in outer membrane permeability*. J Bacteriol. 1987; 169: 929-933.
  97. Mah TF, O'Toole GA. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol. 2001; 9: 34-39.

## 7. Vedlegg

### 7.1. Faseløselighet

Konsentrasjoner M $\beta$ CD	Fortynningsfaktor (uten polymer)	Fortynningsfaktor (HA)	Fortynningsfaktor (HPMC)
0,0 % M $\beta$ CD	2	2	2
0,1 % M $\beta$ CD	2	2	2
0,3 % M $\beta$ CD	2	12	2
0,5 % M $\beta$ CD	42	42	3
1,0 % M $\beta$ CD	200	2933	61
2,0 % M $\beta$ CD	400	4000	50
3,0 % M $\beta$ CD	400	4000	50
6,0 % M $\beta$ CD	800	4000	100
10,0 % M $\beta$ CD	1600	4000	400

**Tabell 2.2** – Fortynningsfaktor etter filtrering av de ulike løsningene med M $\beta$ CD med og uten HA eller HPMC og et overskudd av kurkumin.

### 7.2. Ristetid

Ristetid (timer):	Gjennomsnittlig konsentrasjon 1:1	Gjennomsnittlig konsentrasjon 1:3
½	4,67 x 10 <sup>-4</sup> M	4,33 x 10 <sup>-3</sup> M
1	4,71 x 10 <sup>-4</sup> M	4,33 x 10 <sup>-3</sup> M
2	3,69 x 10 <sup>-4</sup> M	3,23 x 10 <sup>-3</sup> M
24	1,31 x 10 <sup>-4</sup> M	2,10 x 10 <sup>-3</sup> M

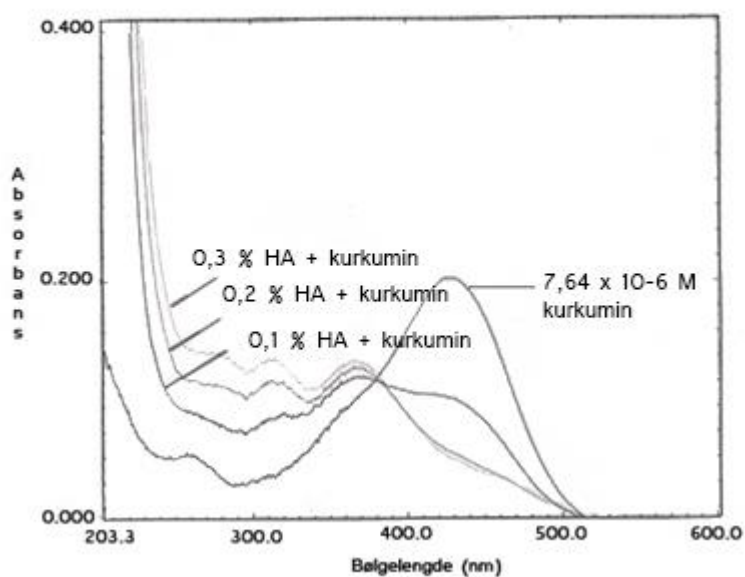
**Tabell 3.5** – Gjennomsnittlig konsentrasjon i fire paralleller kurkumin og M $\beta$ CD i MQ-vann etter ½ time, 1 time, 2 timer og 24 timer risting med 225 rpm ved ~22 °C.

### 7.3. Svinn under produksjon

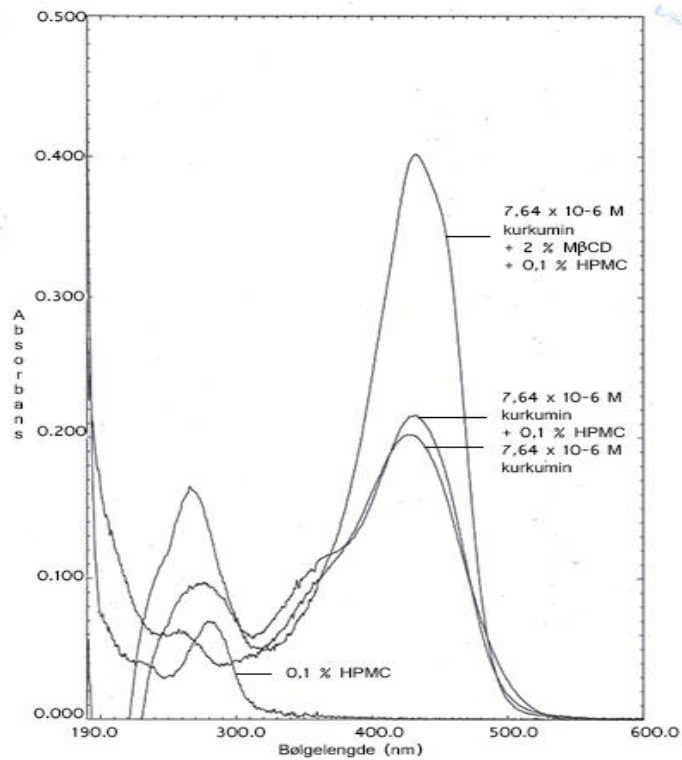
Faktisk konsentrasjon	Konsentrasjon		Utbytte etter filtrering
	Ufiltrerte	Filtrerte	
$3,82 \times 10^{-7}$ M	$4,20 \times 10^{-7}$ M	$4,19 \times 10^{-7}$ M	99,8 %
$5,73 \times 10^{-7}$ M	$6,05 \times 10^{-7}$ M	$6,20 \times 10^{-7}$ M	102,5 %
$9,55 \times 10^{-7}$ M	$1,05 \times 10^{-6}$ M	$1,07 \times 10^{-6}$ M	101,9 %

Tabell 3.7 – Beregnet konsentrasjon i løsninger av kurkumin i metanol med og uten filtrering, samt utbytte i filtrerte løsninger sammenlignet med ufiltrerte.

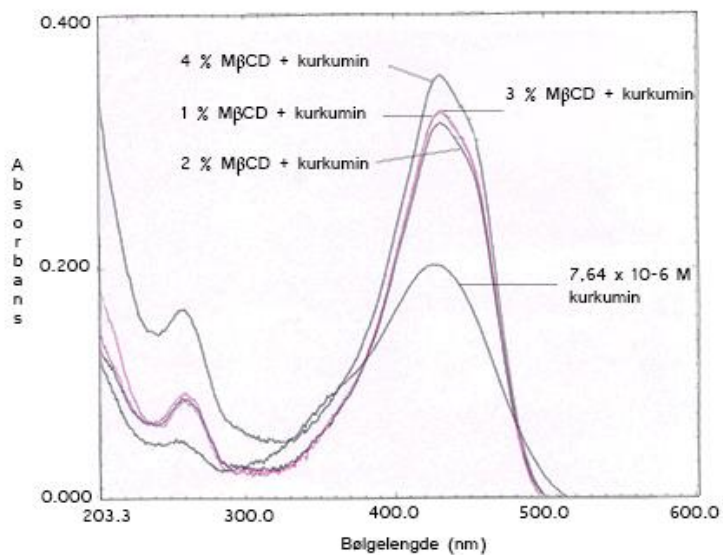
### 7.4. Absorpsjonsspektra



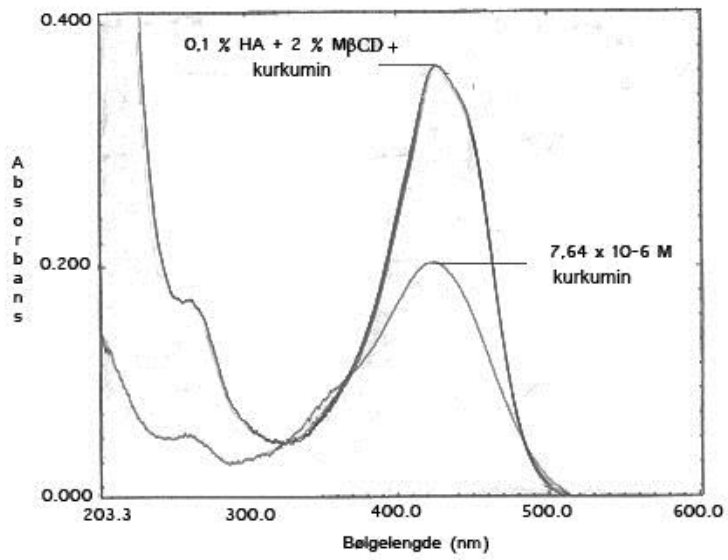
Figur 3.5 – Absorpsjonsspektra av  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol, og  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 0,1-0,3 % (w/v) HA i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.



**Figur 3.6** – Absorpsjonsspektra av  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol,  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 0,1 % (w/v) HPMC, og med 0,1 % (w/v) HPMC og 2 % (w/v) MβCD i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.



**Figur 3.8** – Absorpsjonsspektra av  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol, og  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 1-4 % (w/v) MβCD i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.



**Figur 3.8** - Absorpsjonsspektra av  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol, og  $7,64 \times 10^{-6}$  M kurkumin med 0,1 % (w/v) HA og 2 % M $\beta$ CD i MQ-vann med 1 % (v/v) metanol.

## 7.6. Akselerert holdbarhet

	<b>Kurkumininnhold % (w/w) i produkt etter gitt tid (dager):</b>				
<b>Produkt:</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
(1:1-HA) P3	1,2	1,2	1,9	2,0	1,8
(1:1-HA) P4	1,5	1,6	2,2	2,4	2,0
(1:3-HA) P1	2,8	3,4	3,9	4,9	4,1
(1:3-HA) P2	3,9	5,3	4,7	6,1	5,5

**Tabell 3.11** – Gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold i to uttak fra samme prøve (1:1-HA) og (1:3-HA) etter 0 dager, 7 dager, 14 dager, 21 dager og 28 dager ved 40 °C.

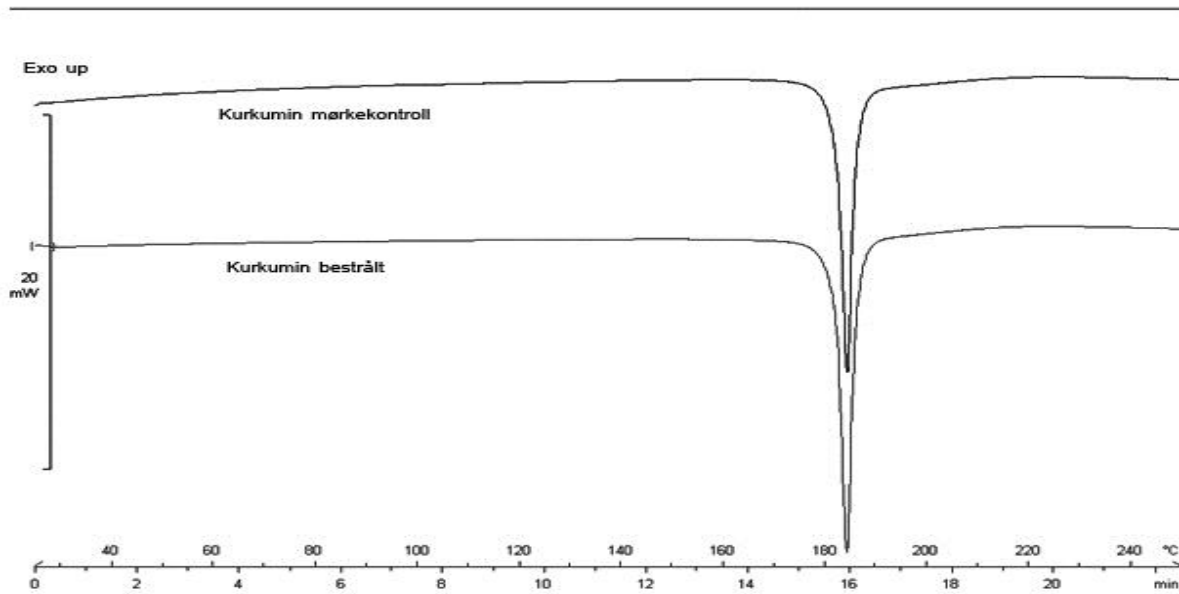
	<b>Kurkumininnhold % (w/w) i produkt etter gitt tid (dager):</b>				
<b>Produkt:</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
(1:1-HPMC) P1	1,5	1,6	2,3	2,0	2,3
(1:1-HPMC) P2	1,9	2,0	2,1	1,6	2,3
(1:1-HPMC) P3	1,4	1,8	1,8	2,2	2,4
(1:1-HPMC) P4	1,6	1,7	2,0	1,4	1,8

**Tabell 3.12** – Gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold i to uttak fra samme prøve (1:1-HPMC) etter 0 dager, 7 dager, 14 dager, 21 dager og 28 dager ved 40 °C.

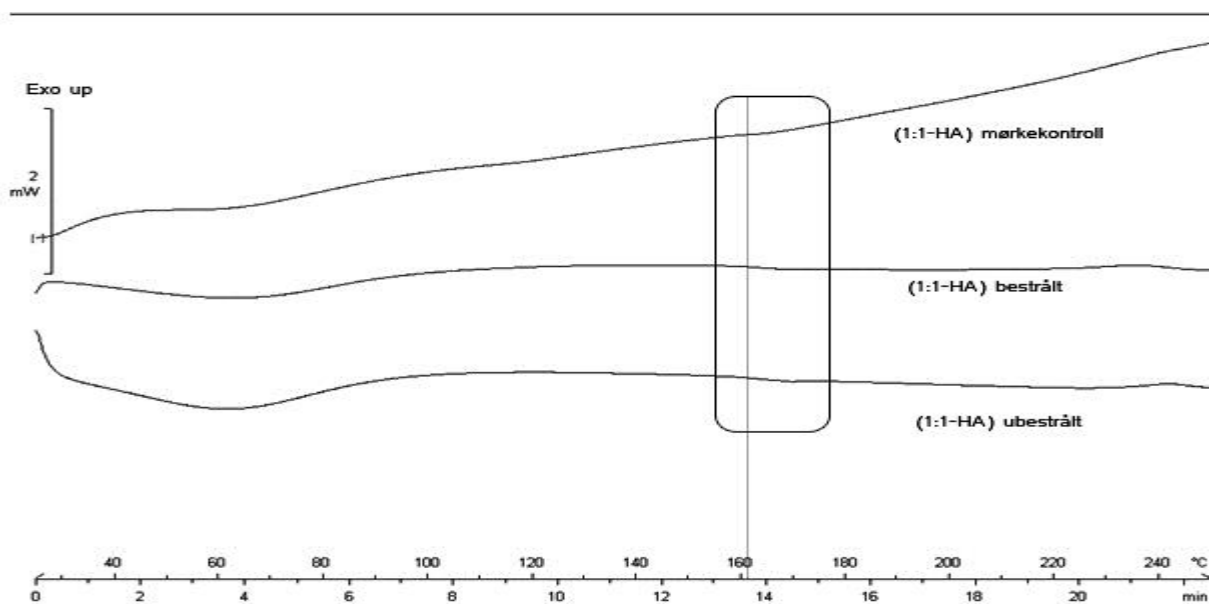
	<b>Kurkumininnhold % (w/w) i produkt etter gitt tid (dager):</b>				
<b>Produkt:</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
(1:3-HPMC) P1	4,4	4,7	4,7	3,1	5
(1:3-HPMC) P2	4,1	4,2	4,7	3,3	5,1
(1:3-HPMC) P3	4,5	4,5	4,8	3,4	5,2
(1:3-HPMC) P4	4,6	4,2	4,5	3,3	5,8

**Tabell 3.13** – Gjennomsnittlig beregnet kurkumininnhold i to uttak fra samme prøve (1:3-HPMC) etter 0 dager, 7 dager, 14 dager, 21 dager og 28 dager ved 40 °C.

## 7.7. Differential Scanning Calorimetry

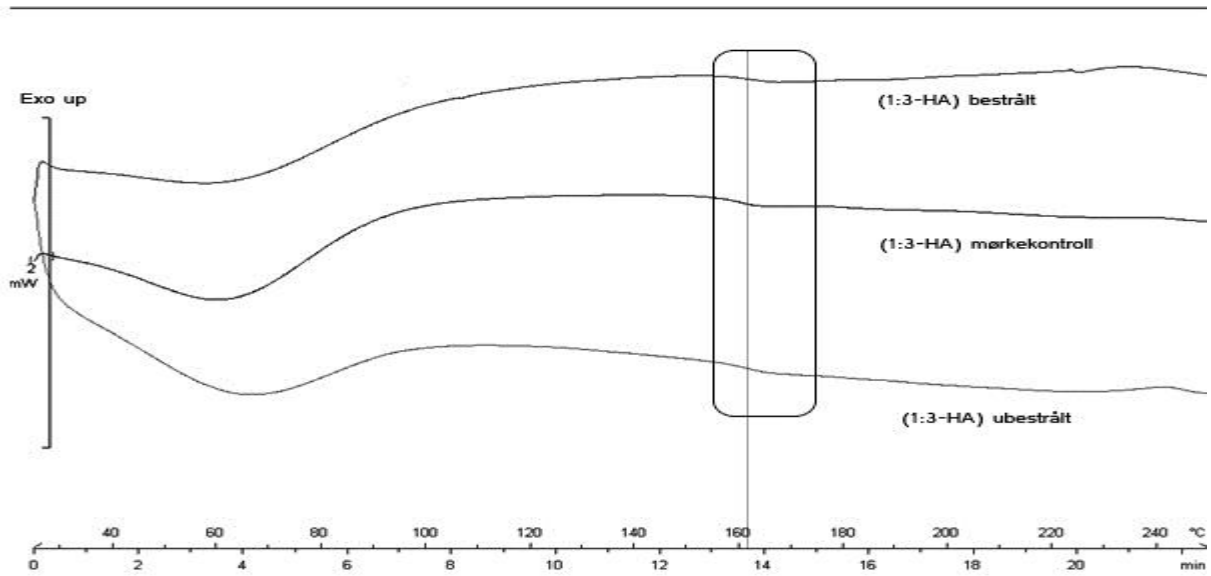


**Figur 3.29** – Termogram for krystallinsk kurkumin: bestrålt ( $22\,540\text{ kJ/m}^2$ ) og mørkekontroll med  $T_m \sim 183\text{ °C}$ .

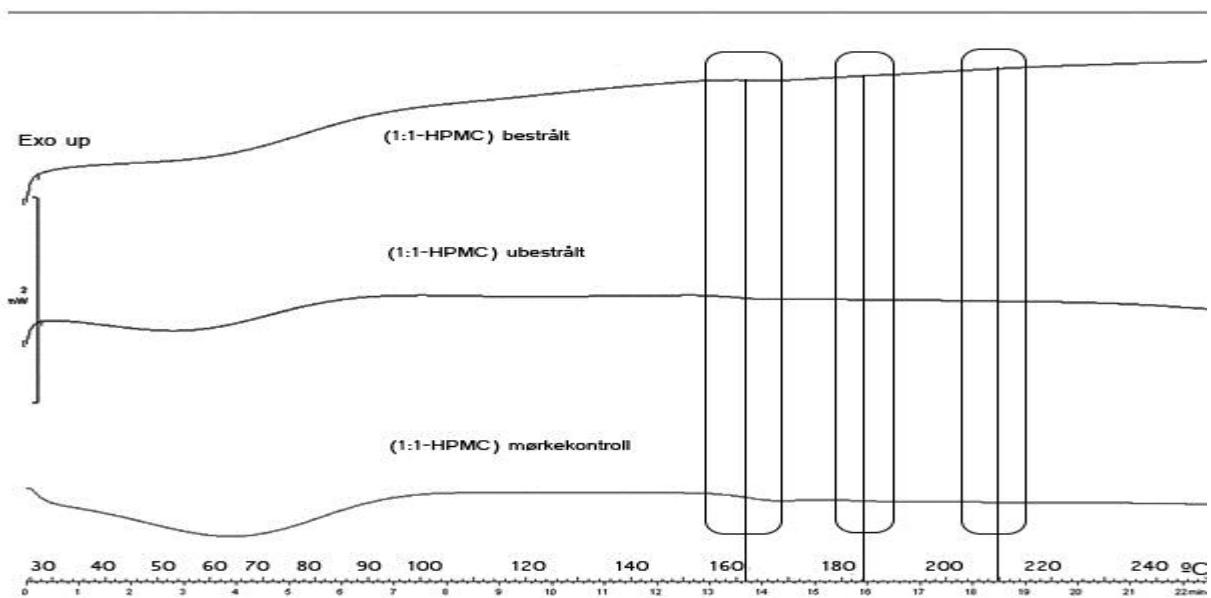


**Figur 3.30** – Termogram for (1:1-HA) som nylaget produkt sammenlignet med bestrålt produkt ( $22\,540\text{ kJ/m}^2$ ) og mørkekontroll.  $T_g \sim 162\text{ °C}$ .

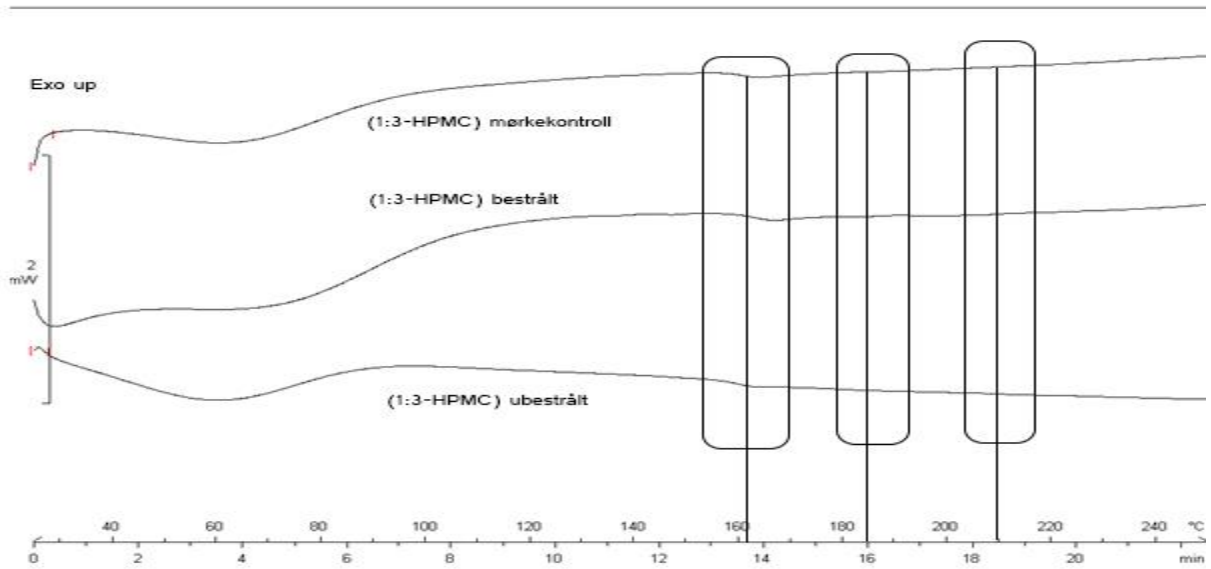




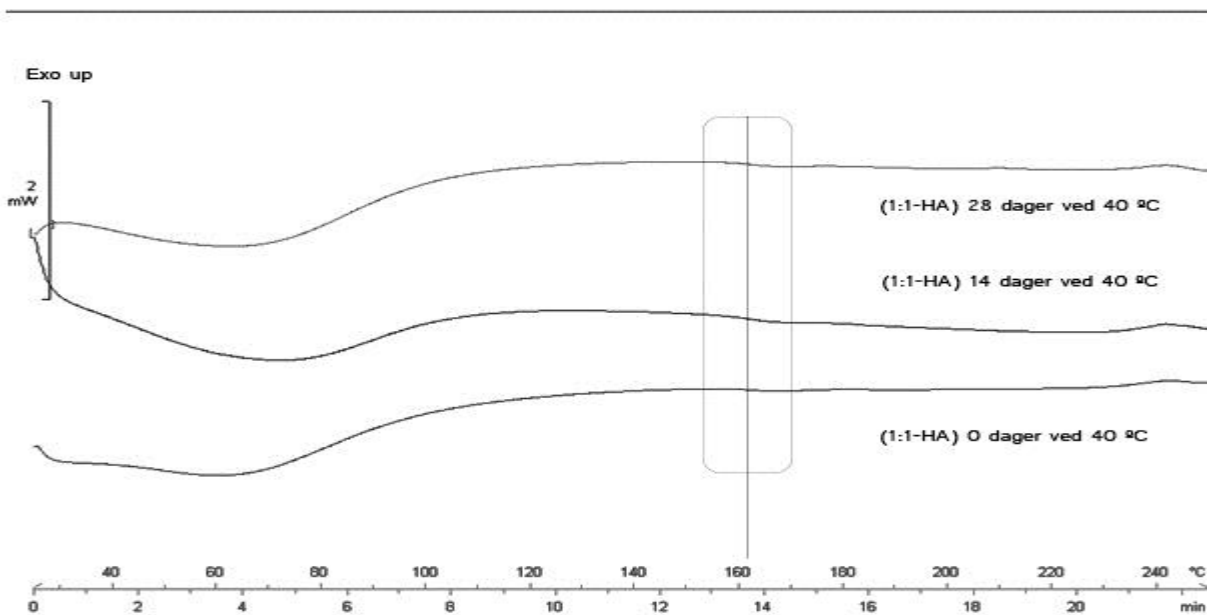
**Figur 3.31** – Termogram for (1:3-HA) som nylaget produkt sammenlignet med bestrålt produkt ( $22\,540\text{ kJ/m}^2$ ) og mørkekontroll.  $T_g \sim 162\text{ }^\circ\text{C}$ .



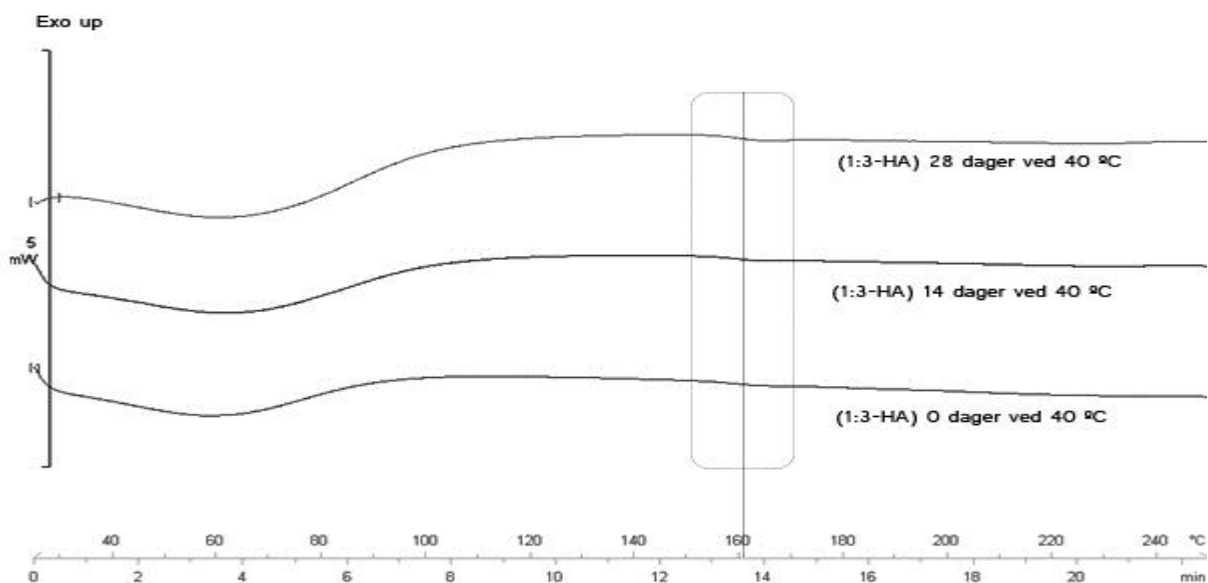
**Figur 3.32** – Termogram for (1:1-HPMC) som nylaget produkt sammenlignet med bestrålt produkt ( $22\,540\text{ kJ/m}^2$ ) og mørkekontroll.  $T_{g1} \sim 162\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{g2} \sim 185\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{g3} \sim 210\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figur 3.33** – Termogram for (1:3-HPMC) som nylaget produkt sammenlignet med bestrålt produkt (22 540 kJ/m<sup>2</sup>) og mørkekontroll. T<sub>g1</sub> ~162 °C, T<sub>g2</sub> ~185 °C, T<sub>g3</sub> ~210 °C.



**Figur 3.34** – Termogram for (1:1-HA) som nylaget produkt sammenlignet med de samme parallellene lagret i henholdsvis 14 dager og 28 dager i varmeskap ved 40 °C. T<sub>g</sub> ~162 °C.



**Figur 3.35** – Termogram for (1:3-HA) som nylaget produkt sammenlignet med de samme parallellene lagret i henholdsvis 14 dager og 28 dager i varmeskap ved 40 °C. Tg ~162 °C.

## 7.8. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-4 timer)

Tid (timer)	(1:1-HA) ~2,50 x 10 <sup>-5</sup> M	Standardavvik	(1:3-HA) ~2,50 x 10 <sup>-5</sup> M	Standardavvik
0	4,06 x 10 <sup>-6</sup> M	3,78 x 10 <sup>-7</sup> M	5,90 x 10 <sup>-6</sup> M	9,87 x 10 <sup>-7</sup> M
1	2,13 x 10 <sup>-6</sup> M	2,78 x 10 <sup>-7</sup> M	5,32 x 10 <sup>-6</sup> M	3,49 x 10 <sup>-7</sup> M
2	1,39 x 10 <sup>-6</sup> M	1,73 x 10 <sup>-8</sup> M	5,22 x 10 <sup>-6</sup> M	1,14 x 10 <sup>-6</sup> M
3	-	-	4,70 x 10 <sup>-6</sup> M	1,00 x 10 <sup>-6</sup> M
4	-	-	4,49 x 10 <sup>-6</sup> M	1,09 x 10 <sup>-6</sup> M

**Tabell 3.16** – Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:1-HA) og (1:3-HA) løst i PBS (pH 6,1) til ~25 µM etter 0, 1, 2, 3 og 4 timer.

<b>Tid (timer)</b>	<b>(1:3-HA) ~5,00 x 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>(1:3-HA) ~1,00 x 10<sup>-5</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>
<b>0</b>	2,99 x 10 <sup>-6</sup> M	7,92 x 10 <sup>-7</sup> M	3,94 x 10 <sup>-6</sup> M	4,58 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>1</b>	2,44 x 10 <sup>-6</sup> M	2,70 x 10 <sup>-7</sup> M	4,35 x 10 <sup>-6</sup> M	4,82 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>2</b>	2,54 x 10 <sup>-6</sup> M	1,87 x 10 <sup>-7</sup> M	4,73 x 10 <sup>-6</sup> M	5,44 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>3</b>	2,17 x 10 <sup>-6</sup> M	2,75 x 10 <sup>-7</sup> M	4,30 x 10 <sup>-6</sup> M	5,48 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>4</b>	2,29 x 10 <sup>-6</sup> M	2,26 x 10 <sup>-7</sup> M	4,23 x 10 <sup>-6</sup> M	4,16 x 10 <sup>-7</sup> M

**Tabell 3.17** – Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:3-HA) løst i PBS (pH 6,1) til ~5 µM og ~10 µM etter 0, 1, 2, 3 og 4 timer.

<b>Tid (timer)</b>	<b>(1:1-HPMC) ~5,00 x 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>(1:1-HPMC) ~1,00 x 10<sup>-5</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>
<b>0</b>	1,61 x 10 <sup>-6</sup> M	1,13 x 10 <sup>-6</sup> M	3,16 x 10 <sup>-6</sup> M	1,40 x 10 <sup>-6</sup> M
<b>1</b>	1,78 x 10 <sup>-6</sup> M	1,33 x 10 <sup>-6</sup> M	3,18 x 10 <sup>-6</sup> M	1,31 x 10 <sup>-6</sup> M
<b>2</b>	1,50 x 10 <sup>-6</sup> M	1,17 x 10 <sup>-6</sup> M	2,77 x 10 <sup>-6</sup> M	1,23 x 10 <sup>-6</sup> M
<b>3</b>	1,32 x 10 <sup>-6</sup> M	1,02 x 10 <sup>-6</sup> M	2,62 x 10 <sup>-6</sup> M	1,07 x 10 <sup>-6</sup> M
<b>4</b>	1,23 x 10 <sup>-6</sup> M	9,07 x 10 <sup>-7</sup> M	2,27 x 10 <sup>-6</sup> M	1,00 x 10 <sup>-6</sup> M

**Tabell 3.18** – Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:1-HPMC) løst i PBS (pH 6,1) til ~5 µM og ~10 µM etter 0, 1, 2, 3 og 4 timer.

<b>Tid (timer)</b>	<b>(1:1-HPMC) ~2,50 x 10<sup>-5</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>(1:3-HPMC) ~5,00 x 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>Standardavvik</b>
<b>0</b>	9,34 x 10 <sup>-6</sup> M	2,56 x 10 <sup>-6</sup> M	9,41 x 10 <sup>-7</sup> M	4,04 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>1</b>	9,10 x 10 <sup>-6</sup> M	2,54 x 10 <sup>-6</sup> M	9,15 x 10 <sup>-7</sup> M	3,92 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>2</b>	8,40 x 10 <sup>-6</sup> M	2,57 x 10 <sup>-6</sup> M	7,59 x 10 <sup>-7</sup> M	2,89 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>3</b>	9,27 x 10 <sup>-6</sup> M	3,21 x 10 <sup>-6</sup> M	7,26 x 10 <sup>-7</sup> M	2,63 x 10 <sup>-7</sup> M
<b>4</b>	8,98 x 10 <sup>-6</sup> M	2,75 x 10 <sup>-6</sup> M	6,28 x 10 <sup>-7</sup> M	2,22 x 10 <sup>-7</sup> M

**Tabell 3.19** – Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) løst i PBS (pH 6,1) til henholdsvis ~25 µM og ~5 µM etter 0, 1, 2, 3 og 4 timer.

Tid (timer)	(1:3-HPMC) ~1,00 x 10 <sup>-5</sup> M	Standardavvik	(1:3-HPMC) ~2,50 x 10 <sup>-5</sup> M	Standardavvik
0	2,07 x 10 <sup>-6</sup> M	6,78 x 10 <sup>-7</sup> M	6,66 x 10 <sup>-6</sup> M	1,67 x 10 <sup>-6</sup> M
1	1,76 x 10 <sup>-6</sup> M	7,18 x 10 <sup>-7</sup> M	4,61 x 10 <sup>-6</sup> M	1,14 x 10 <sup>-6</sup> M
2	1,38 x 10 <sup>-6</sup> M	5,55 x 10 <sup>-7</sup> M	3,55 x 10 <sup>-6</sup> M	1,21 x 10 <sup>-6</sup> M
3	6,73 x 10 <sup>-7</sup> M	8,43 x 10 <sup>-8</sup> M	3,37 x 10 <sup>-6</sup> M	1,25 x 10 <sup>-6</sup> M
4	6,26 x 10 <sup>-7</sup> M	3,11 x 10 <sup>-8</sup> M	2,94 x 10 <sup>-6</sup> M	8,42 x 10 <sup>-7</sup> M

**Tabell 3.20** – Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:3-HPMC) løst i PBS (pH 6,1) til ~10 µM og ~25 µM etter 0, 1, 2, 3 og 4 timer.

### 7.9. Overmetning av kurkumin i vandige prøver (0-168 timer)

Tid (timer)	(1:1-HA)	Standardavvik	(1:3-HA)	Standardavvik
0	1,37 x 10 <sup>-5</sup> M	1,03 x 10 <sup>-6</sup> M	3,56 x 10 <sup>-6</sup> M	7,43 x 10 <sup>-7</sup> M
8	6,68 x 10 <sup>-6</sup> M	2,23 x 10 <sup>-6</sup> M	3,72 x 10 <sup>-6</sup> M	1,22 x 10 <sup>-6</sup> M
24	2,51 x 10 <sup>-6</sup> M (1,88 x 10 <sup>-5</sup> M)	8,00 x 10 <sup>-7</sup> M (1,27 x 10 <sup>-5</sup> M)	4,46 x 10 <sup>-6</sup> M (2,04 x 10 <sup>-5</sup> M)	1,00 x 10 <sup>-6</sup> M (1,16 x 10 <sup>-5</sup> M)
32	1,74 x 10 <sup>-6</sup> M	1,31 x 10 <sup>-6</sup> M	4,12 x 10 <sup>-6</sup> M	9,89 x 10 <sup>-7</sup> M
48	3,53 x 10 <sup>-6</sup> M	2,03 x 10 <sup>-6</sup> M	3,15 x 10 <sup>-6</sup> M	1,69 x 10 <sup>-6</sup> M
168	1,51 x 10 <sup>-6</sup> M	2,55 x 10 <sup>-7</sup> M	7,65 x 10 <sup>-6</sup> M	1,19 x 10 <sup>-6</sup> M

**Tabell 3.21** - Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:1-HA) og (1:3-HA) løst i PBS (pH 6,1) til ~25µM (inkludert uteliggere i parentes) etter 8, 24, 32, 48 og 168 timer.

Tid (timer)	(1:1-HPMC)	Standardavvik	(1:3-HPMC)	Standardavvik
0	8,33 x 10 <sup>-6</sup> M	1,44 x 10 <sup>-6</sup> M	3,99 x 10 <sup>-6</sup> M	6,78 x 10 <sup>-7</sup> M
8	8,07 x 10 <sup>-6</sup> M	1,51 x 10 <sup>-6</sup> M	2,45 x 10 <sup>-6</sup> M	6,16 x 10 <sup>-7</sup> M
24	1,46 x 10 <sup>-5</sup> M	2,77 x 10 <sup>-6</sup> M	3,62 x 10 <sup>-6</sup> M	7,04 x 10 <sup>-7</sup> M
32	1,42 x 10 <sup>-5</sup> M	2,42 x 10 <sup>-6</sup> M	3,33 x 10 <sup>-6</sup> M	6,00 x 10 <sup>-7</sup> M
48	5,77 x 10 <sup>-6</sup> M	8,43 x 10 <sup>-7</sup> M	1,94 x 10 <sup>-6</sup> M	2,85 x 10 <sup>-7</sup> M
168	1,62 x 10 <sup>-6</sup> M	2,01 x 10 <sup>-7</sup> M	7,79 x 10 <sup>-7</sup> M	5,33 x 10 <sup>-8</sup> M

**Tabell 3.22** - Gjennomsnittlig kurkuminkonsentrasjon med standardavvik i (1:1-HPMC) og (1:3-HPMC) løst i PBS (pH 6,1) til ~25µM etter 8, 24, 32, 48 og 168 timer.