

Spraytørket pektin

–

Kryssbinding, karakterisering og mucoadhesive egenskaper

Hovedoppgave i galenisk farmasi

Branka Sefic



Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk – naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

2008

Forord

Denne hovedoppgaven er utført ved Avdeling for galenisk farmasi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden november 2006 til januar 2008.

En stor takk til min veileder professor Sverre Arne Sande og stipendiat Ellen Hagesæther for god veiledning.

En takk til ingeniør Helge Gundersen for god hjelp i bruk av laboratorieutstyr.

Jeg vil også takke professor Ragnar Bye som har utført Zn – målinger.

Takk også til Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for lån av nikon mikroskopet, og en takk til Torill Marie Rolfsen for hjelp med SEM bildene.

I tillegg vil jeg takke Khalid Hussain på GE og stipendiaten Wai Lam Yip for god hjelp til størrelsesmålingene.

Til slutt vil jeg takke alle ansatte ved avdelingen for bidrag til oppgaven og for et interessant år.

Blindern, januar 2008

Branka Sefic

Sammendrag

Det ble spraytørket 3 typer pektin med indigo under samme betingelser. DM 36, DM 70 og DA 20/DM 29 ble benyttet.

Deretter ble spraytørket DA 20/DM 29 og DM 36 pektin med indigo kryssbundet med enten sinkklorid eller sinkacetat. Dette ble gjort ifølge et fullfaktor design på to nivåer. Fire forskjellige faktorer ble undersøkt; type pektin, mengde sinkioner tilsatt, kryssbindingstid og type sinksalt brukt til kryssbinding av pektin.

Kun 10 av 16 forsøk ga et pulverprodukt, og disse ble brukt til videre forsøk.

Det ble tatt bilder av prøvene med både lysmikroskop og SEM for å se på utseende på partiklene og for å få en formening over størrelsesfordelingen. SEM bildene viste klare forskjeller mellom prøvene lagd av DM 36 og prøvene lagd av DA 20/DM 29. Bildene viste at prøver av DA 20/DM 29 hadde et mer uniformt utseende sammenlignet med prøver av DM 36.

Innhold av sink ble målt ved hjelp av atomabsorpsjon. Resultatet ble brukt for å si noe om hvor godt spraytørket pektin med indigo ble kryssbundet. Prøver kryssbundet med sinkacetat hadde høyest innhold av sink. Av prøvene som var kryssbundet med sinkklorid hadde prøver med DA 20/DM 29 høyest innhold av zink.

Størrelsesmåling med FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement) ble foretatt og disse samsvarte ikke med bildene som var tatt av prøvene.

Mucoadhesive egenskaper til prøvene ble forsøkt testet ved hjelp av tre forskjellige metoder. FBRM ble brukt for å sammenligne størrelsesfordeling til prøvene før og etter tilsetning av mucinløsning. Det ble sett etter størrelsesøkning som følge av aggregering av prøvene med mucinmolekylene. Dette ble ikke observert.

Teksturmåling ble brukt som en annen metode for testing av mucoadhesjon. Teksturmåleren ga utslag på mucoadhesjon for samtlige av prøvene. Det viste seg at mucoadhesjon var avhengig av sinkinnholdet, og disse to parametere var omvendt korrelerte.

Mucoadhesjon ble også testet på tynntarmen til gris, ved hjelp av ”roterende sylinder” - metode. Representative prøver ble testet og alle viste en god mucoadhesjon.

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.2	Målsetting.....	1
2	Forkortelser.....	2
3	Teori.....	3
3.1	Fysiologi.....	3
3.2	Mucinlaget.....	4
3.2.1	Mucin.....	4
3.3	Mucoadhesjon.....	5
3.3.1	Hvorfor mucoadhesjon?.....	5
3.3.2	Mucoadhesive molekyler.....	5
3.3.3	Hvordan foregår mucoadhesjon?.....	6
3.4	Pektin.....	8
3.4.1	Struktur.....	8
3.4.2	Kjemiske egenskaper.....	9
3.4.3	Stabilitet.....	9
3.4.4	Egenskaper.....	9
3.4.5	Kryssbinding med divalente kationer.....	10
3.5	Spraytørring.....	11
3.5.1	Fordeler med mikropartikulære mucoadhesive formuleringer.....	11
3.5.2	Prinsippet bak spraytørring [39].....	11
3.5.3	Spraytørket produkt.....	11
3.6	Størrelsesmåling.....	12
3.6.1	"Focused Beam Reflectance Measurement" [45].....	12
3.6.2	Statistikk for størrelsesmål.....	13
3.7	Statistisk forsøksplanlegging.....	14
3.7.1	Forsøksdesign.....	14
3.7.2	Faktorielt forsøk.....	14
3.7.3	Hvordan velge design?.....	15
3.7.4	Matematisk modellering.....	15
3.7.4.a	Prinsipalkomponentanalyse (PCA).....	15
3.7.4.b	"Partial least squares regression" (PLS).....	16
4	Materiale og utstyr.....	17
4.1	Materiale.....	17
4.1.1	Til sikting av indigo.....	17
4.1.2	Til opprensing av pektin.....	17
4.1.3	Til spraytørring.....	17
4.1.4	Til kryssbinding.....	17
4.1.5	Til lysmikroskop bilder.....	17
4.1.6	Til sinkmålinger.....	17
4.1.7	Til Lasentec®.....	18
4.1.8	Til Teksturmålinger.....	18
4.1.9	Til 0,1 M HCl.....	18
4.1.10	Til 1,0 M NaOH.....	18
4.1.11	Til Fosfatbuffer pH 6,8.....	18
4.2	Utstyr.....	19
4.2.1	Til sikting av indigo.....	19
4.2.2	Til opprensing av pektin.....	19
4.2.3	Til spraytørring.....	19
4.2.4	Til kryssbinding.....	19

4.2.5 Til lysmikroskop bilder	19
4.2.6 Til SEM bilder	19
4.2.7 Til Lasentec®	19
4.2.8 Til Teksturmålinger	19
4.2.9 Til ”roterende sylinder” - metode	19
4.3 Løsninger	20
4.3.1 0,1 M HCl	20
4.3.2 1,0 M NaOH	20
4.3.3 Fosfatbuffer pH 6,8:	20
5 Metode	21
5.1 Fargestoff	21
5.1.1 Sikting	21
5.2 Opprensing av pektin	21
5.2.1 Valg av pektintyper	21
5.2.2 Opprensing	21
5.3 Spraytørring	22
5.3.1 Innledende forsøk	22
5.3.2 Spraytørring hovedforsøk	23
5.4 Kryssbinding	24
5.4.1 Innledende forsøk	24
5.4.2 Kryssbinding av DM 70	24
5.4.3 Hovedforsøk kryssbinding	24
5.5 Lysmikroskop bilder	26
5.5.1 Tillaging av prøvene	26
5.6 SEM bilder	27
5.6.1 Tillaging av prøvene	27
5.7 Bestemmelse av sinkinnhold ved hjelp av atomabsorpsjon	27
5.7.1 Tillaging av prøvene	27
5.8 Lasentec®	28
5.8.1 Størrelsesmåling i vann	28
5.8.2 Relevante mål	28
5.8.3 Størrelsesmåling i etanol	28
5.8.4 Vil kryssbundet pektin svulle i løpet av 15 minutter?	29
5.8.5 Testing av mucoadhesjon	29
5.9 Bruk av Teksturmåler for testing av mucoadhesjon	30
5.9.1 Testoppsett	30
5.9.2 Innledende forsøk	31
5.9.3 Hovedforsøk	31
5.10 Bruk av ”roterende sylinder” - metode for testing av bioadhesjon	33
5.10.1 Oppsett	33
5.10.2 Innledende forsøk	33
5.10.3 Hovedforsøk	34
5.11 Modellering	35
5.11.1 Modellering på designvariablene og de forskjellige responsene	35
5.11.2 PCA på størrelsesmål	35
6 Resultat	36
6.1 Resultat spraytørring	36
6.1.1 Spraytørring	36
6.2 Resultat av kryssbinding	37
6.2.1 Innledende forsøk	37

6.2.2 Kryssbinding av DM 70 pektin	37
6.2.3 Kryssbinding hovedforsøk	37
6.3 Lysmikroskop bilder	38
6.4 SEM bilder	38
6.5 Bestemmelse av sinkinnhold ved hjelp av atomabsorpsjon	40
6.5.1 Oversikt over innholdet av sink	40
6.6 Størrelsesmåling ved Lasentec®	41
6.6.1 Størrelsesmåling i vann	41
6.6.2 Størrelsesmåling i etanol	42
6.6.3 Vil kryssbundet pektin svulle i løpet av 15 minutter?	43
6.6.4 Testing av mucoadhesjon	44
6.7 Teksturmålinger	45
6.7.1 Innledende forsøk	45
6.7.2 Hovedforsøk	45
6.8 ”Roterende sylider” - metode	47
6.8.1 Innledende forsøk	47
6.8.2 Hovedforsøk	47
6.8.3 Reproduserbarhet	48
6.9 Modellering	49
6.9.1 PLS på designvariablene og pulverform	49
6.9.2 PLS på designvariablene og sinkinnhold	50
6.9.3 PLS 1 på designvariable og M – B topp	52
6.9.4 PLS 1 på designvariable og Zn målt i % som X og M – B topp som responsen Y	53
6.9.5 PLS 1 på designvariable og median	53
6.9.6 PCA på størrelsesmål	54
7 Diskusjon	57
7.1 Spraytørring	57
7.2 Kryssbinding	57
7.2.1 Kryssbinding av HM pektin	57
7.2.2 Kryssbinding av LM pektin	57
7.3 Mikroskopbilder tatt med lysmikroskopet	58
7.3.1 Utseende og størrelse	58
7.4 SEM bildene	59
7.4.1 Utseende og størrelse	59
7.5 Sinkmåling	61
7.5 Lasentec®	62
7.5.1 Størrelsesmåling i vann	62
7.5.2 Størrelsesmåling i etanol	62
7.5.2 Testing av mucoadhesjon	62
7.6 Teksturmålinger	63
7.6.1 Mucoadhesjon	63
7.6.2 Parametere til teksturmåleren	63
7.6.3 AUC og Maksimalskraften	64
7.6.4 Kryssbindingsgraden og mucoadhesjon	66
7.7 Bioadhesjon på tarmen	68
7.7.1 Hva sier bildene?	68
8 Konklusjon	69
9 Referanseliste	70
10 Vedlegg	74

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Bioadhesjon er binding av syntetisk eller naturlig makromolekyl til biologisk vev. Når den bioadhesive interaksjonen skjer med mucinlaget, kalles den mucoadhesjon.

Mucoadhesive legemiddelformer kan forlenge passasjetiden gjennom gastrointestinal trakt og dermed sørge for økt biotilgjengelighet av legemidler.

Pektin er et surt, vannløselig, mucoadhesivt polysakkarid. Ved å kryssbinde pektin med divalente kationer vil løseligheten til pektin reduseres betraktelig. Et innkorporert legemiddel vil kunne beskyttes mot fysiologiske væsker. Frisetting av legemiddelet blir redusert, og stabilitet til legemiddelet beskyttes.

Spraytørket pektin er små kuler, og grunnet størrelsen vil bioadhesiviteten til pektinformuleringen øke. Ved å spraytørke en pektinløsning sammen med ett virkestoff, vil virkestoffet kunne inkorporeres i pektinmikrosfærene.

1.2 Målsetting

Det var ønskelig å undersøke hvilke effekter ulike typer pektin, konsentrasjon av sinkioner, type sinksalt og kryssbindingstiden vil ha på mucoadhesiviteten til sinkpektinat mikropartikler. I tillegg var det ønskelig å karakterisere disse mikropartikler og bestemme deres form og størrelse.

2 Forkortelser

AUC	Arealet under kurven
c25	25 persentilen
c75	75 persentilen
Da	Dalton
DA	”Degree of amidation”
DE	”Degree of esterification”
DM	”Degree of methoxylation”
FBRM	“Focused Beam Reflectance Measurement”
GIT	Gastrointestinal trakten
HM	Høyt metoksyleret
IBD	”Irritable bowel disease”
ICJ	”Ileocecal junction”
IQR	“Interquartile Range”
IQCS	”Interquartile coefficient of skewness”
LM	Lavt metoksyleret
Mw	Molekylvekt
PC	”Prinsippal komponent”
PLS	”Partial least squares regression”
Rpm	Rotasjoner per minutt

3 Teori

3.1 Fysiologi

Fordøyelseskanalen deles inn i munnhule, svelg, spiserør (øsofagus), magesekk, tynntarm, tykktarm og endetarm [1], og lengden på hele er fra 5 - 7 meter. Det er store variasjoner i pH og passasjetiden for mat/legemidler i de ulike delene av gastrointestinaltrakten (GIT) [2]. Opptak av de fleste legemidlene foregår i tynntarmen der overflatearealet er størst, cirka 200 m² [3].

Tabell 1: GITs egenskaper [2-4]

	pH	Passasjetiden	Lengden	Arealet	Bakterieantall
Magesekk	1 - 3,5	5 min - 2 timer			0-10 ²
Tynntarm	5 - 7,5	cirka 3 timer	400 – 650 cm	200 m ²	0-10 ⁷
Tykktarm	5,5 – 7	2 – 48 timer	90 – 150 cm	6 – 7 m ²	10 ¹²

Når det gjelder pH i magesekken, vil denne være avhengig av innholdet. Under et måltid vil pH øke til 3 – 7, men vil gå ned igjen innen 2 – 3 timer. Passasjetiden i magesekken kan også være veldig individuell, og kan komme opp mot 12 timer [3]. Også tykktarmen er utsatt for pH forandringer ettersom noen inflammatoriske tilstander kan redusere pH i tykktarmen. Mengden fiber i kosten, og bruk av antibiotika eller andre typer medisin som kan skape diaréliknende tilstander vil også ha innvirkning på passasjetiden.

3.2 Mucinlaget

Mucinlaget er en svak, viskoelastisk gel som dekker alle innvendige overflater av kroppen. Det består av 95 % vann, i tillegg til elektrolytter, proteiner, lipider og glykoproteiner. Det er glykoproteiner eller muciner som er ansvarlige for mucinlagets rheologiske egenskaper.

3.2.1 Mucin

I denne oppgaven vil det med uttrykket "mucin" menes glykoproteiner mucinlaget består av. Muciner er store makromolekyler som kommer sammen i enda større enheter ved hjelp av hydrofobe interaksjoner mellom amino syrer, hydrogenbindinger mellom sukker enheter og disulfidbindinger mellom cysteinenheter [5, 6]. Muciner er glykoproteiner som består av proteinkjerne og 60-80% karbohydrater. Karbohydratene består av hundrevis av oligosakkarider, som enten har sialinsyre eller L - fucose på terminalenden. Oligosakkaridene er bundet kovalent til serin og treonin på proteinkjernen [6]. Det er karbohydratsidekjedene som gjør mucinlaget hydrofilt [7]. Mucinmolekyl er negativt ladd grunnet sialinsyre og sulfat bestandeler. pK_a til sialinsyre er 2,6 [8].

I fortynnet løsning vil mucin være i utstrakt form når pH er 5 - 7, og lengden vil være ca 400 nm. Når pH er 4 eller lavere, vil mucinmolekylene aggregere [6].

3.3 Mucoadhesjon

Bioadhesjon er binding av syntetisk eller naturlig makromolekyl til biologisk vev [9]. Når den bioadhesive interaksjonen skjer med mucinlaget, kalles den mucoadhesjon [10, 11].

3.3.1 Hvorfor mucoadhesjon?

Mucoadhesive formuleringer vil kunne få en lengre residensid og dermed øke biotilgjengeligheten til legemiddelet [12]. De vil kunne komme i en tettere kontakt med den absorberende membranen. Denne kontakten vil føre til økt forskjell i konsentrasjonsgradienten til legemidlet [13] og til en kortere diffusjonsvei for et legemiddel, slik at membrantransporten forbedres. Den vil også kunne beskytte legemiddelet mot enzymatisk nedbrytning.

3.3.2 Mucoadhesive molekyler

Noen av egenskapene et mucoadhesivt molekyl bør ha er hydrogenbindende grupper, slik som $-OH$ og $-COOH$, ioniske ladninger, mulighet til å hydrere raskt, fleksibilitet som gjør det mulig for et mucoadhesivt molekyl å penetrere mucinnettverket, høy molekylvekt, og en overflatespenning som gjør det mulig å dehydrere mucinlaget [9]. Polymeren må kunne hydrere for å bli adhesivt, men overhydrering vil føre til dannelse av et glatt, slimete ("slippery mucilage") lag som ikke lenger vil være mucoadhesivt [14]. Polymeren skal ikke være toksisk, og den bør ikke interagere med legemiddelet den skal frakte [15].

De vanligste bioadhesive molekylerne er polymere. Fordelen med polymere er at de vanligvis ikke absorberes av GIT, slik at systematiske bivirkninger blir unngått [13].

Eksempel på noen bioadhesive polymere er: kitosan som er et kationisk polysakkarid [13], anionisk poly(akryl)syre [13], alginat, cellulose derivater som natrium karboxymetyl cellulose og hydroxypropylmethyl cellulose.

Mucoadhesive egenskaper til kationisk kitosan kan skyldes ioniske interaksjoner mellom protonerte aminogrupper på kitosan og anioniske deler av mucin, som sialinsyre [13, 16]. Mucoadhesive egenskaper til anioniske molekyler kan skyldes hydrogenbindinger mellom syregruppen på polymeren og mucin [13].

3.3.3 Hvordan foregår mucoadhesjon?

Den første etappen i mucoadhesjon antas å være en nærkontakt mellom det mucoadhesive materialet og mucinlaget. Deretter vil det mucoadhesive materialet diffundere inn i mucinlaget og de vil da være fysisk bundet til hverandre, i tillegg til at sekundære, kjemiske bindinger da vil kunne dannes.

Det finnes flere mekanismer og teorier som forklarer hvordan mucoadhesjon foregår. De er ikke ekskluderende, og flere av disse kan sammen forklare mucoadhesjon. Noen av disse er: a) elektronteorien, b) adsorpsjonsteorien, c) fukteteorien og d) diffusjonsteorien [17].

Elektronteorien foreslår en overføring av elektroner mellom det mucoadhesive materialet og mucinlaget, slik at det dannes et dobbeltlag av elektronladning mellom disse [17, 18].

Adsorpsjonsteorien foresår en adhesjon mellom det bioadhesive materialet og mucinlaget grunnet svake sekundære bindinger, slik som van der Waals og hydrogenbindinger [17, 18].

Fukteteorien sier noe om den adhesive egenskapen til flytende bioadhesive formuleringer. Den forklarer deres evne til å spre seg over en biologisk overflate [9, 18].

Diffusjonsteorien forklarer bioadhesjon som en sammenfletting av bioadhesive molekyler og mucin molekyler, slik at det dannes fysiske bindinger [17-19]. Denne sammenflettingen vil være avhengig av konsentrasjonsgradienten og diffusjonskoeffisienten. Kryssbinding av enten mucin eller det bioadhesive materialet vil kunne forhindre denne sammenflettingen, men noen av kjedeendene vil fortsatt være tilgjengelige for sammenfletting. Minimumslengden for en effektiv bioadhesjonsbinding antas å være 0.2-0.5 μm [20].

Vanninnholdet til mucinlaget og vannforflytning til det mucoadhesive materialet er også blitt foreslått som en adhesjonsmekanisme [21].

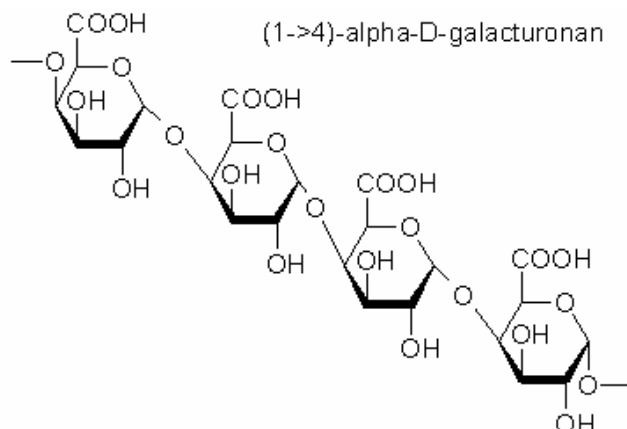
Brudd – teorien er en annen teori. Her vil en beregne kraften som kreves for å separere en formulering fra mucin etter at de har vært i kontakt i en bestemt periode og under en bestemt kraft. "Tensile stress" kan deretter beregnes ved å dele maksimumskraften som skal til for å separere med arealet som er involvert i den adhesive interaksjonen [17].

En in – vitro metode baserer seg på brudd – teorien. Det er blitt vanlig å bruke teksturmåler for å sammenligne mucoadhesive egenskaper til mucoadhesive formuleringer [22, 23].

3.4 Pektin

Pektin er et polysakkarid som er å finne i celleveggen til plantene, og vil variere fra plante til plante [24]. I industrien brukes pektin som fortykningsmiddel [25].

Pektin forblir inntakt i magesekken og tynntarmen og vil kunne brytes først av bakterieflora i tykktarmen [26].



Figur 1: Pektin

3.4.1 Struktur

Pektin er et lineært polysakkarid som består hovedsakelig av α -(1-4)D - galakturonsyre og 1,2D - rhamnose med D-galaktose og D-arabinose sidekjerder [27].

Rhamnose vil danne såkalte ”kinks” i den lineære konfigurasjonen [28]. Områder med mange sidegrupper kalles hårete områder, mens områder med lite sidegrupper kalles glatte [29].

Noen av karboksylsyrergruppene vil være i metyl ester formen. Graden av esterifisering (DE) vil variere avhengig av både pektinkilden [25] og kjemisk modifisering av pektin [30]. Når metoksyleringsgraden (DM) er over 50 % er pektin definert som høymetoksyliert (HM) pektin. Lavmetoksyliert (LM) pektin vil ha DM under 50 % [4]. Noen av karboksylgruppene kan omdannes til amid grupper og da vil pektinmolekylet være amidert. [25]

Det er amidierungsgraden (DA) og metoksyleringsgraden (DM) som brukes til å klassifisere pektin.

Molekylvekten til pektin kan variere mellom 20 000 til 400 000 [31], men gjennomsnittlig vekt ligger mellom 50 000 og 150 000 Da [27]. HM pektin har vanligvis høyere molekylvekt enn LM pektin. I naturen er pektinmolekylene HM og blir kjemisk modifiserte i ettertid til LM pektin. Deesterifisering av HM pektin med ammonia vil gi amidert pektin, mens deesterifisering av HM pektin med syre vil gi ikke – amidert LM pektin uten amidgruppene [30].

3.4.2 Kjemiske egenskaper

Pektin er vannløselig og negativt ladd ved nøytral pH. pK_a for syregruppen er omtrent 3,5 [4]. pK_a er lavere med lavere DM - grad [32]. Pektin med lavere metoksyleringsgrad har høyere vannløselighet i forhold til HM pektin [4].

Viskositeten til en pektinløsning vil blant annet være avhengig av M_w , DM, pH, ionestyrken i løsningen og temperaturen [33].

Amiderte pektiner er LM pektiner der noen av karboxylsyregruppene er amidert. De er mer tolerante overfor pH variasjoner og mengde av kalsium tilsatt [27].

3.4.3 Stabilitet

Ved høy temperatur blir pektin depolymerisert [29, 33]. I syre vil pektin kunne undergå hydrolyse og deesterifisere, og i base vil pektin kunne undergå β -eliminering hvis nabosukkeret er metoksyliert [29, 33]. HM pektin degraderes raskere enn LM pektin [29].

3.4.4 Egenskaper

Pektin er et løselig matfiber, og er et trygt tilsetningsstoff [29, 33]. Fysiologiske egenskaper til pektin er blant annet gunstig effekt på kolesterolnivået i blodet, gunstig effekt på forgiftning med toksiske kationer og på koagulasjonen [29]. Pektin er brukt i farmasøytisk formuleringsteknikk [29]. Blant annet kan pektin absorbere mange ganger sin egen vekt i vann og lage gel under spesielle betingelser. Pektin kan inngå ione-, H - bindinger, hydrofobe interaksjoner og koordinasjonsbånd [33].

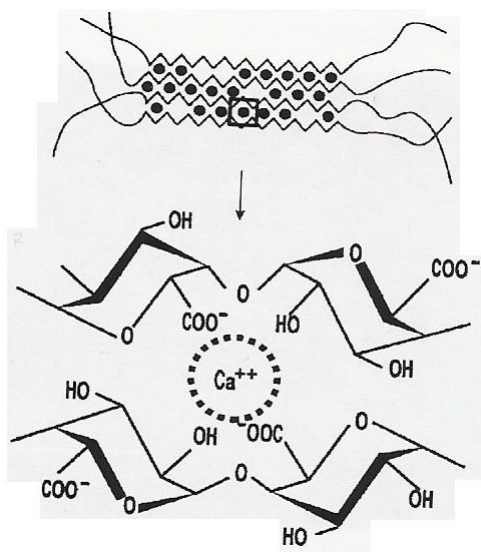
3.4.5 Kryssbinding med divalente kationer

Kryssbinding av pektin vil redusere løseligheten til pektin, slik at legemidler som er inkorporert i pektin vil diffundere saktere ut i mediumet i GIT [25].

LM pektin blir lettere kryssbundet ved hjelp av divalente kationer, som for eksempel kalsiumioner og kan danne uløselig pektinat gel [4, 34]. Det er observert at amidert pektin vil danne gel lettere enn ikke – amidert pektin, mens ikke – amidert pektin vil felle ut lettere i nærvær av divalente kationer [32].

Kryssbinding med divalente ioner forklares ofte ved hjelp av ”egg – boks” – modellen [35]. Fordeling av frie og esterifiserte karboksylsyre grupper er bestemmende for hvor sterk binding av divalente ioner er. For kryssbinding med kalsiumioner er det foreslått at 14 – 20 frie karboksylsyre grupper er nødvendige for at egg – boks strukturen skal bli stabilisert [32]. Egg - boks modellen vil forstyrres lite av amid gruppene som er mindre enn metyl gruppene [25].

Alternativer til egg – boks modellen er også blitt foreslått [36, 37].



Figur 2: Egg – boks modell

Pektin kryssbundet med divalente sinkioner har vist å holde bedre på legemidler, eroderer mindre og sveller mindre enn pektin kryssbundet med divalente kalsiumioner [38].

3.5 Spraytørring

Som tørkemetode vil spraytørring egne seg godt for termolabile stoffer og kan bli brukt til å tørke stoffer i både oppløsning og suspensjon [39, 40]. Spraytørring er den metoden, ved siden av frysetørring som er mest brukt til tørring av proteiner, peptider og enzymer [41].

3.5.1 Fordeler med mikropartikulære mucoadhesive formuleringer

Ved å redusere partikkelstørrelsen til en formulering vil arealet tilgjengelig for mucoadhesjon øke og formuleringen vil dekke en mye større mucus overflate. Etter adhesjon til mucin vil partiklene skylles vekk ved hjelp av de hydrodynamiske kreftene i tarmen. Dette vil føre til at partiklene ruller nedover tarmen og dermed mister kontakten med mucinlaget. Ved å bruke små partikler, som for eksempel spraytørkede partikler, vil de hydrodynamiske kreftene ha en mindre effekt og formuleringen vil ha en lengre residenstid [12]. I tillegg vil biotilgjengelighet av legemidler øke grunnet høyt overflate:volum forhold [10].

3.5.2 Prinsippet bak spraytørring [39]

Det finnes to hovedgrupper av spraytørrere; jetforstøver hvor løsningen går gjennom en dyse, og roterende forstøvere, hvor løsningen blir fordelt på en skive som spinner rundt, og væsken brytes opp i små dråper på kanten av skiven. Den forstøvede væsken blir sprayet inn i en strøm av varm luft og hver dråpe blir da tørket til en individuell partikkel. En spraytørrer med et tørkekammer som etterligner en syklon sørger for god sirkulasjon av luften, gjør varme- og massetransporten lettere og sørger for separasjon av tørkede partikler ved hjelp av sentrifugalkreftene. Spraytørrer med dyse er mye brukt for spraytørring av pektin [42-44].

3.5.3 Spraytørket produkt

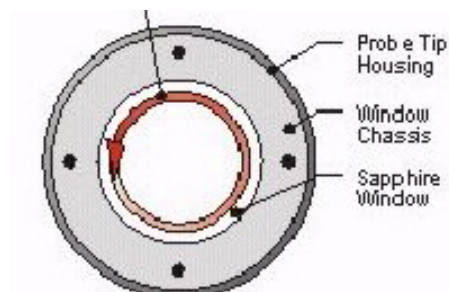
Spraytørkede produkter er lette å kjenne igjen ettersom partiklene har et karakteristisk utseende, i form av en hul mikrosfære. Dette kommer fra tørkeprosessen. Når dråpen kommer i kontakt med den varme luften, vil det raskt dannes en skorpe på overflaten med noe væske fortsatt inne i midten. Denne væsken vil fortsette å fordampe og utblåsing vil føre til huldannelse i mikrosfæren [39].

3.6 Størrelsesmåling

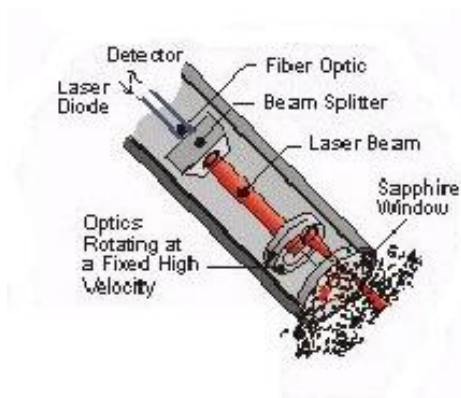
3.6.1 "Focused Beam Reflectance Measurement" [45]



Figur 3: Lasentec®

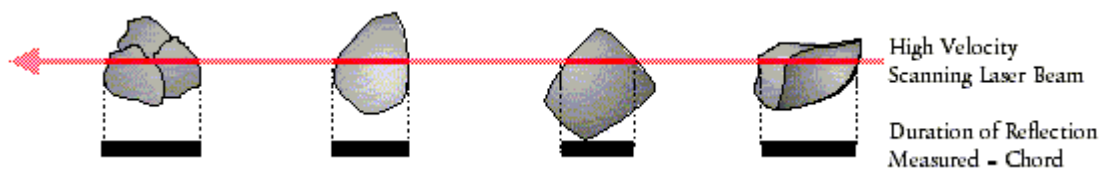


Figur 4: Bevegelsen til laserstrålen



Figur 5: Bevegelsen til laserstrålen ut fra proben

Lasentec® (se figur 3) bruker en FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement) probe. Laserstrålen sendes gjennom et rundt safirvindu som befinner seg på undersiden av proben. Den fokuserte laserstrålen vil følge en vei ved omkretsen (se figur 4 og figur 5) av safirvindet. Hastigheten på laserstrålen kan reguleres fra 2m/s – 6m/s. Når partiklene passerer safirvindet, vil strålen spres på overflaten til partiklene og reflekteres. Denne reflekteringen vil registreres til laserstrålen når den motsatte siden av partikkelen. Tiden denne refleksjonen varer registreres og ganges med hastigheten til laserstrålen. Dette blir kalt for kordlengde (se figur 6).



Figur 6: Laserstrålen treffer partikler og kordlengden blir registrert

3.6.2 Statistikk for størrelsesmål

Flere mål brukes for å beskrive størrelsesdata, blant disse er median, gjennomsnitt, 25 persentilen, 75 persentilen, moden og IQCS (interquartile coefficient of skewness) [46].

Median er den midterste målingen. Halvparten av alle målingene vil være mindre enn medianen, og den andre halvparten vil være større. Median er 50 persentilen, c_{50} . Når en distribusjon er helt symmetrisk, vil median være lik gjennomsnittet [47].

Moden er verdien der distribusjonskurven er høyest [48].

Den første persentilen, 25 persentilen (c_{25}), er den midterste verdien blant målingene som er mindre enn medianen. Den tredje persentilen, 75 persentilen (c_{75}), er den midterste verdien blant målingene som er større enn medianen [47].

IQCS sier noe om skjevheten til distribusjonskurven. Verdien til IQCS ligger mellom -1 og 1. En distribusjonskurve med en IQCS større enn 0 vil ha en forlenget hale mot høyere verdier. En normalfordelt distribusjonskurve vil ha en IQCS lik 0 [46].

$$\text{IQCS} = \frac{(c_{75} - \text{median}) - (\text{median} - c_{25})}{(c_{75} - \text{median}) + (\text{median} - c_{25})} \quad [46].$$

IQR er definert som området mellom c_{25} og c_{75} .

$$\text{IQR} = c_{75} - c_{25}$$

3.7 Statistisk forsøksplanlegging

Statistisk forsøksplanlegging innebærer å legge opp et forsøksdesign, for deretter å modellere matematisk på resultatene ved hjelp av statistikk. Forsøksdesign er avgjørende for hva man kan få ut av resultatene og hva man kan modellere på.

3.7.1 Forsøksdesign

Hensikten med forsøksdesign er å få bestemt flest mulig faktorer med færrest mulig forsøk. Samtidig gjør et forsøksdesign det enklere å bestemme samspillseffekter, altså om faktorer endrer sin innflytelse på et system avhengig av nivået til andre faktorer.

Et forsøksdesign velges ut fra hva som er ønskelig å få ut av forsøkene [49].

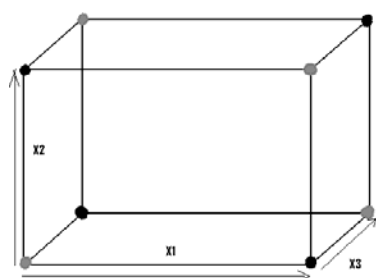
3.7.2 Faktorielt forsøk

Med faktorielt forsøk har man kontroll på faktorene/variablene man ønsker å undersøke, man velger selv nivået på disse og de kan varieres uavhengig av de andre variablene.

Ved et fullfaktorielt forsøk vil man kombinere variablene i alle mulige kombinasjoner på alle nivåer. For eksempel vil et fullfaktorielt 2 nivå (høy og lav) forsøk gi 2^n antall eksperimenter. Her vill n være antall faktorer.

Et redusert faktorielt forsøk vil gi 2^{n-k} antall forsøk, der k er en reduseringsfaktor. Et redusert faktorielt forsøk vil dermed ikke undersøke alle kombinasjoner av nivåer av alle faktorene.

I tillegg er det vanlig å legge inn 3 midtpunkter.



Figur 7: Et eksempel på et redusert (kun svarte hjørner) og fullt faktorforsøk (alle hjørner) på 2 nivåer med 3 variabler

Det er dataprogrammet som tar seg av beregninger av samspill. Hvilke samspill man kan beregne er avhengig av hvilken oppløsning designet har, eller hvor mye et design er redusert.

- Oppløsning VI: Alle hoved- og samspillseffekter er ublandet
 Oppløsning V: Alle hoved- og 2-faktor samspill er ublandet
 Oppløsning IV: Hovedeffekter er blandet med 3-faktor samspill og 2-faktor samspill er sammenblandet med 2-faktor samspill
 Oppløsning III: Hovedeffekter er blandet sammen med 2-faktor samspill

To faktorer som er sammenblandet med hverandre kan ikke beregnes adskilt matematisk [49, 50].

3.7.3 Hvordan velge design?

Screeningsdesign brukes når man skal undersøke mulige hovedeffekter [49, 50].

Optimaliseringsforsøk brukes for å finne ut hvilken kombinasjon av variablene vil gi best respons.

Hvilket design man velger er avhengig av hva man trenger å vite, og hvordan man tror responsen henger sammen med faktorene.

Forventes lineær sammenheng, og man vil utføre screening, velger man et 2 - nivå design.

Forventes ikke - lineær sammenheng, velger man flere nivåer.

Design velges når man mistenker samspill, for da blir det nødvendig å måle på hva som skjer når faktor A økes ved et nivå av faktor B kontra å øke faktor A ved et annet nivå av faktor B. Det er dette som skiller statistisk forsøksplanlegging fra vanlig statistikk [49, 50].

3.7.4 Matematisk modellering

Forskjellige metoder kan benyttes når resultatene skal tolkes, visualiseres og modelleres.

Hvilken metode man velger er avhengig delvis av hvilket design man har valgt og hvilke resultater man har fått.

3.7.4.a Prinsipalkomponentanalyse (PCA)

PCA gir mulighet for å oppdage mønstre, grupperinger, likheter og forskjeller mellom prøvene og variablene. Det skiller ikke mellom variable/faktorer og responser i PCA.

I multivariat dataanalyse dekomponeres dataene for å oppdage og modellere de skjulte fenomenene, og retninger med maksimum varians er direkte relatert til disse. Den første PC vil gå i den retningen maksimal variansen er, hvor spredningen på objektene er størst [51].

Viktige plott i PCA er: ”scoreplot”, ”loadings”, forklart varians

I ”scoreplot” er to PC - er plottet mot hverandre. Retningen for PC1 og PC2 er de to retningene som forklarer mest varians. Plottet brukes for identifisering av blant annet uteliggere, grupperinger og trender blant prøvene [51].

”Loadings” - plottet viser en sammenheng mellom variablene, og hvor mye hver variabel bidrar til hver PC. Variablene som er plassert nær hverandre i et ”loadings” plott vil kovariere positivt [52].

Forklart varians for hver X, vil gi informasjon om hvilken PC forklarer en gitt X.

3.7.4.b ”Partial least squares regression” (PLS)

PLS er en projeksjonsmetode der Y – variansen brukes til å finne Y – relevant struktur i X, og den fokuserer både på X- og Y- variansen. PC – er vil være latente variabler i datamatriksen. Modellen kan brukes til å predikere Y av gitt X [52].

Viktige plott i PLS er ”score” - plott, ”loadings” - plott, forklart varians, ”influence” – plott, regresjonskoeffisienter med standardavvik, predikert Y mot målt Y og responsflaten.

”Scoreplot” vil angi vekten til en prøve på PC.

”Loadings” – plottet angir bidraget fra en variabel/faktor på PC.

Forklart varians viser hvor mye av variasjonen i dataene er blitt forklart av de ulike PC – ene.

I ”influence” – plottet vil ”leverage” (hvor stor innflytelse en prøve har på modellen) til en prøve plottes mot standardavviket til prøven.

Regresjonskoeffisienter med standardavvik viser hvilke koeffisienter har signifikant effekt på responsen.

Predikert mot målt viser om variablene kan forklare variasjonen i Y. Uteliggere kan indikeres i dette plottet.

Responsflaten brukes hvis man har signifikante samspill. Da vil en kombinert effekt av variablene ikke være lik summen av hovedeffektene til de samme variablene hver for seg.

4 Materiale og utstyr

4.1 Materiale

4.1.1 Til sikting av indigo

Indigo	Batchnummer: 118687744106069	Fluka
Indigo	Batchnummer: 13014935006009	Fluka

4.1.2 Til opprensing av pektin

DM 36	Classic CU 701	Batchnummer: 00609007	Herbstreith & Fox
DM 70	Classic CU 201	Batchnummer: 00701043	Herbstreith & Fox
DA 20/DM 29	Amid CU 020	Batchnummer: 00603061	Herbstreith & Fox
Ethanolum 96 per centum			Arcus
Aceton proanalysy			Merck
Tørris			AGA

4.1.3 Til spraytørking

DM 36	Classic CU 701	Batchnummer: 00609007	Herbstreith & Fox
DM 70	Classic CU 201	Batchnummer: 00701043	Herbstreith & Fox
DA 20/DM 29	Amid CU 020	Batchnummer: 00603061	Herbstreith & Fox
Indigo	Batchnummer: 118687744106069		Fluka
Indigo	Batchnummer: 13014935006009		Fluka

4.1.4 Til kryssbinding

ZnCl ₂	Batchnummer: B707816550	Merck
Zn(CH ₃ COO) ₂ , 2H ₂ O	Batchnummer: 0600530	Prolab

4.1.5 Til lysmikroskop bilder

Glycerolum 85 per centum	NMD
--------------------------	-----

4.1.6 Til sinkmålinger

37 % Saltsyre (HCl)	Batchnummer: K33616217	Merck
---------------------	------------------------	-------

4.1.7 Til Lasentec®

Ethanolum 96 per centum		Arcus
ChitoClear®	Batchnummer: TM2455	Primex
Musin from porcine stomach, Type II	Batchnummer: 075K0676	Sigma

4.1.8 Til Teksturmålinger

Musin from porcine stomach, Type II	Batchnummer: 075K0676	Sigma
-------------------------------------	-----------------------	-------

4.1.9 Til 0,1 M HCl

37 % Saltsyre (HCl)	Batchnummer: K33616217	Merck
---------------------	------------------------	-------

4.1.10 Til 1,0 M NaOH

NaOH	Batchnummer: B640498029	Merck
------	-------------------------	-------

4.1.11 Til Fosfatbuffer pH 6,8

NaOH	Batchnummer: B640498029	Merck
Kaliumdihydrogenfosfat	Batchnummer: A837073707	Merck

4.2 Utstyr

4.2.1 Til sikting av indigo

Sikt 0,15 mm

Morter og pistill

4.2.2 Til opprensing av pektin

Sentrifuge IEC, Centra® MPL

Frysetørker Christ Loc-1, alpha 2-4

4.2.3 Til spraytørring

Spraytørker SD-06 labplant

0,5 mm dyse

4.2.4 Til kryssbinding

Sikt 0,15 mm

Frysetørker Christ Loc-1, alpha 2-4

4.2.5 Til lysmikroskop bilder

Nikon Eclipse TE 300 DV Fluorescensmikroskop

4.2.6 Til SEM bilder

Polaron E500 Sputter – coater, UK

JMS – 6400 SEM, JEOL, Japan

4.2.7 Til Lasentec®

Lasentec® D600VL (control interface for FBRM(Focused Beam Reflectance Measurement))

Laser Sensor Tecnology, Inc. USA Part No 814-0140

4.2.8 Til Teksturmålinger

TA-XT2®HR Texture Analyser

Kalibreringsloddet 2 kg, maksimumskraft 5 kg

4.2.9 Til ”roterende sylinder” - metode

Dissolutest Paddleapparat, Prolabo

Metallsylinder, 7cm x 2 cm

4.3 Løsninger

4.3.1 0,1 M HCl

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

4.3.2 1,0 M NaOH

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

4.3.3 Fosfatbuffer pH 6,8:

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

5 Metode

5.1 Fargestoff

Indigo ble valgt som fargemarkør på grunn av den sterke fargen og den lave vannløseligheten.

5.1.1 Sikting

På grunn av den lave vannløselighet vil indigo være suspendert i pektinløsningen før spraytørkingen. Når diameter på dysen i spraytørkeren er 0,5 mm, er det ønskelig med liten partikkelstørrelse på indigo. Indigo ble derfor knust i morter og siktet 0,15 mm.

5.2 Opprensing av pektin

5.2.1 Valg av pektintyper

Det ble undersøkt 3 pektintyper fra Herbstreith & Fox. Disse var DM 36, DM 70 og DA 20/DM 29.

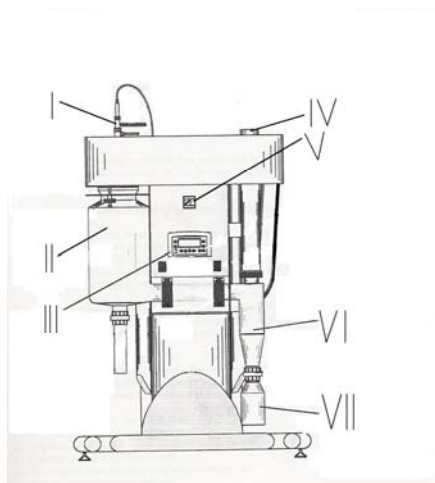
5.2.2 Opprensing

24 g pektin ble kokt under omrøring i 200 ml 80 % etanolløsning i 1 time. Dette ble gjort for å fjerne de hydrofile forurensingene. Høy temperatur antas å øke oppløsningshastigheten til hydrofile forurensinger. Pektin ble filtrert fra. Filtratet ble løst i 1600 ml rensset, ionebyttet vann. Pektin ble løst over natt under kraftig røring, og konsentrasjonen var da cirka 1,5 % w/v.

Dagen etter ble pektinløsningen sentrifugert med en hastighet på 4600 rpm i 240 minutter. Dette for å fjerne store hydrofobe aggregater som var igjen i pektinløsningen.

Supernatanten ble nedfrosset i rundkolber under rotering på et bad av acetone og tørris, og deretter frysetørket under lavt trykk på en frysetørker i minimum 48 timer.

5.3 Spraytørring



Figur 8: Spraytørker SD-06, I = Jetdyseoppsett, II = Tørkekammer, III = Display og kontrollenhet, IV = Eksosutgang, V = Peristaltisk pumpe, VI = Syklon, VII = Oppsamlingsbeholder

5.3.1 Innledende forsøk

Hensikten med forsøkene var å bli kjent med spraytørkeren, se om indigo, som er suspendert i pektinløsningen, sedimenterte mye i slangen, finne høyest konsentrasjon av pektin som er mulig å spraytørke og finne en konsentrasjon av indigo som gjør produktet sterkt farget. Innledende forsøk ble gjennomført med urensset DM 70, DM 36, DA 20/DM 29 og indigo. Tidligere erfaringer fra bruk av spraytørkeren tyder på at for høy pumpehastighet og for lav viftehastighet vil gi mye avsetning av pektinløsningen på veggene i tørkekammeret, og derfor ble pumpehastigheten holdt under 5 (280 ml vann/time). Temperatur ble satt til å være 200 °C. For å minimere tap av stoff i eksosen, ble viftehastigheten satt ned til 30.

Deblokkeringshastigheten var "slow" og dysestørrelsen var 0,5 mm.

Pektinkonsentrasjonen var 3,0 %, 4,0 % og 5,0 % w/w.

Indigokonsentrasjonen var 0,05 %, 0,1 % og 0,30 % w/w.

For at slangen og dysen ikke skulle tettes så ofte, ble prøvene oppvarmet til 50 °C. For å forhindre at indigo sedimenterte, ble prøvene satt på røring under spraytørring.

Eksosslangen gikk ut av vinduet, og vinduet måtte derfor holdes oppe. For å forhindre at temperaturen i tørkekammeret ble lavere på grunn av den ytre temperaturen, ble tørkekammeret innpakket i aluminiumsfolie.

Det var ønskelig å først finne en konsentrasjon på pektin som kunne anvendes på hver av de tre pektintypene, og deretter finne en konsentrasjon på indigo.

5.3.2 Spraytørring hovedforsøk

Det ble laget 3,0 % w/w løsning av opprenset, frysetørket DM 36, DM 70 og DA 20/DM 29. Løsningene sto på kraftig røring over natten. Dagen etter ble indigo tilsatt pektinløsningene slik at konsentrasjonen til indigo ble 0,30 % w/w. Suspensjonen sto på kraftig røring i 1 time. Deretter ble suspensjonen spraytørket under konstant omrøring og oppvarming (50 °C). Tørkekammeret og slangen som pumpet væsken opp ble innpakket i aluminiumsfolie. Spraytørkeren var innstilt på følgende:

- Temperatur: 200 °C
- Pumpehastighet: 3 (205 ml/time)
- Viftehastighet: 30 (3,5 m/s)
- Deblokkerings hastighet: Slow (10 ganger/minutt)
- Dysestørrelse: 0,5 mm

5.4 Kryssbinding

5.4.1 Innledende forsøk

Hensikten med forsøkene var å komme frem til en kryssbindingsmetode for de 3 forskjellige pektintypene.

Forsøk ble gjort på spraytørket DM 36 og ZnCl_2 .

Forskjellige konsentrasjoner av ZnCl_2 ble løst i 100 ml vann. 1,0 g spraytørket DM 36 ble siktet over denne sinkklorid - løsningen som sto på røring. Minimal kryssbindingstid ble satt ned til 10 minutter, og maksimal kryssbindingstiden ble valgt å være 4 timer. Etter kryssbindingsperioden ble kryssbundet pektin filtrert fra. Filtratet ble suspendert i 100 ml rensset, ionebyttet vann og kryssbundet pektin ble igjen filtrert fra. Prosedyren ble gjentatt 2 ganger. Dette ble gjort for å skylle vekk overflødige sinkioner.

Til slutt ble filtratet suspendert i 100 ml rensset, ionebyttet vann.

Det ble deretter forsøkt med 2 tørkemetoder. Ved bruk av den éne metoden ble suspensjonen helt over til en petriskål og tørket i tørkeskapet på 50 °C. Ved bruk av den andre metoden ble suspensjonen nedfrosset i en rundkolbe under rotering på et bad av aceton og tørris, og deretter frysetørket under lavt trykk på en frysetørker i minimum 48 timer. Målet var å få et produkt i pulverform.

5.4.2 Kryssbinding av DM 70

HM pektin er vanskelig å kryssbinde med divalente ioner, men det er blitt gjort tidligere med sink [53]. Derfor ble det forsøkt å kryssbinde spraytørket DM 70 med ZnCl_2 . 1,1g spraytørket pektin med indigo ble forsøkt kryssbundet med 1,0 % w/v, 2,0 % w/v og 4,0 % w/v ZnCl_2 .

Overflødige sinkioner ble skylt vekk på samme måte som beskrevet ovenfor. Tørkemetoden som ble brukt var frysetørking, beskrevet i 5.4.1.

Kryssbindingstiden ble ikke bestemt på forhånd, men suspensjonen ble observert underveis i hele forsøket. Maksimum kryssbindingstid ble satt til fire timer.

Også her var målet å få et produkt i pulverform.

5.4.3 Hovedforsøk kryssbinding

Forsøk ble gjort på DM 36, og DA 20/DM 29 spraytørket med indigo som beskrevet i 5.3.2.

Sinksalt (ZnCl_2 eller $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), ble løst i rensset, ionebyttet vann slik at det ble 100 ml til sammen. Løsningen ble satt på røring til alt var løst. Når $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ble brukt, ble

løsningsen oppvarmet til 70 °C for å øke løseligheten til saltet. Løsningen ble holdt varm også under kryssbindingsperioden, men temperaturen ble satt ned til 40 °C. 1,1 gram pektin ble siktet 0,3 mm over sinkløsningen. Etter bestemt kryssbindingsperiode ble kryssbundet pektin filtrert fra løsningen. Overflødige sinkioner ble skylt med rensset vann som beskrevet i 5.4.1. Filtratet ble så suspendert i 100 ml vann og frysetørket som beskrevet i 5.4.1. Produktet ble til slutt veid inn og utbyttet ble beregnet.

Det ble bestemt å lage et oppsett for et fullt faktorforsøk på 2 nivåer. Designet skulle omfatte fire forskjellige faktorer: pektintype (DM 36 og DA 20/DM 29), salttype (ZnCl_2 og $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), konsentrasjon av sinkioner (omregnet til saltmengde i gram i tabell 2), og kryssbindingstid.

Midtpunkt ble ikke valgt fordi det var to kategoriske variable i designet: pektintype og salttype.

Tabell 2: Design for kryssbinding

Forsøk	Saltmengde	Salttype	Kryssbindingstid	Pektintype
1	1,35 g	ZnCl_2	10 minutter	DA 20/DM 29
2	1,35 g	ZnCl_2	4 timer	DA 20/DM 29
3	2,70 g	ZnCl_2	10 minutter	DA 20/DM 29
4	2,70 g	ZnCl_2	4 timer	DA 20/DM 29
5	2,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	10 minutter	DA 20/DM 29
6	2,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	4 timer	DA 20/DM 29
7	4,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	10 minutter	DA 20/DM 29
8	4,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	4 timer	DA 20/DM 29
9	1,35 g	ZnCl_2	10 minutter	DM 36
10	1,35 g	ZnCl_2	4 timer	DM 36
11	2,70 g	ZnCl_2	10 minutter	DM 36
12	2,70 g	ZnCl_2	4 timer	DM 36
13	2,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	10 minutter	DM 36
14	2,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	4 timer	DM 36
15	4,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	10 minutter	DM 36
16	4,00 g	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	4 timer	DM 36

Etter utførte forsøk ble prøvene delt inn i prøver som var i pulverform og prøver som ikke var i pulverform. Prøvene som var i pulverform ble brukt i videre forsøk.

5.5 Lysmikroskop bilder

Til dette forsøket ble prøve 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 15 og 16 benyttet. Dette var prøver som var i pulverform og vil heretter betegnes som prøver_{vellykkede}. I tillegg ble spraytørket DM 36 og DA 20/DM 29 (med indigo) benyttet.

Mikroskopering ble utført med 1000 gangers forstørrelse. Bildene ble tatt med fasekontrast, fra undersiden av prøven. Hensikten med forsøket var å se på størrelsen på prøvene og sammenligne de med hverandre. Bildene skulle sammenlignes med SEM bilder og størrelsesfordeling målt med Lasentec.

5.5.1 Tillaging av prøvene

Prøvene ble tillaget ved å legge litt prøve på et objektglass og dryppe 85 % glyserol direkte på prøven. Suspensjonen ble strøket utover objektglasset for å fordele partiklene utover.

Dekkglass ble så lagt på toppen av suspensjonen. For å holde dekkglasset festet godt på, ble et tynt lag av gjennomsiktig neglelakk påført rundt dekkglasset.

5.6 SEM bilder

Til dette forsøket ble prøver_{vellykkede} benyttet i tillegg til spraytørket DM 36 og DA 20/DM 29 (med indigo). Hensikten med forsøket var å se på forskjeller på utseende til prøvene, og samtidig sammenligne størrelsesfordeling med andre metoder for bestemmelse av størrelse. Forstørrelsen som var brukt er 6000 ganger for prøvene og 3000 ganger for spraytørket DM 36 og DA 20/DM 29 (med indigo).

5.6.1 Tillaging av prøvene

Hver prøve ble festet på et aluminiumstempel ved hjelp av en dobbeltsidig tape med samme diameter som aluminiumstempelet. Stempelet med tapen på ble dyppet ned i en prøvebeholder. Overflødig pulver ble så ristet vekk. Prøven ble så belagt med et Au/Pd lag og deretter undersøkt ved hjelp av SEM ("scanning electron microscope"). Forskjellige forstørrelser ble brukt.

5.7 Bestemmelse av sinkinnhold ved hjelp av atomabsorpsjon

Til dette forsøket ble prøver_{vellykkede} benyttet.

5.7.1 Tillaging av prøvene

Cirka $0,60 \pm 0,10$ mg av prøven ble veid inn og tilsatt 8 ml 37 % saltsyre. Saltsyre ble brukt for å bryte ned pektin. Innveid mengde ble notert. Prøvene ble varmet opp til kokepunktet. Løsningen ble dampet inn til det kun var litt igjen. Renset vann ble tilsatt og løsningen ble overført til en målekolbe, 25 ml. Det ble fylt opp med rensed vann til målestreken. Det ble laget fem paralleller av samtlige prøver.

1,0 ml av hver av parallellene ble tatt ut for spektroskopi målinger. Dette ble gjentatt 3 ganger for hver parallell.

5.8 Lasentec®

En Lasentec® med soft-ware ble benyttet.

Hensikten med bruk av Lasentec® var å bestemme størrelsesfordeling på prøvene.

Målingene med Lasentec® skjer ved å ha en probe ned i en suspensjon, som er under omrøring. Dette gjøres for at partiklene ikke sedimenterer og for å ha flest mulig av partiklene tilgjengelig for måling.

Det er viktig at prøvene er suspendert i en væske de ikke er løselige i.

5.8.1 Størrelsesmåling i vann

Til dette forsøket ble prøver_{vellykkede} benyttet.

70 mg av prøven ble suspendert i 190 ml destillert vann i et begerglass. Proben og røreverket ble satt ned i begerglasset, og suspensjonen satt på røring i 30 sekunder før målingene ble startet.

Dataprogrammet var innstilt på at en måling skulle ta 30 sekunder.

Størrelsen på partiklene ble målt under kraftig omrøring. Det ble målt 10 repetisjoner for hver prøve. Målingene ble foretatt kontinuerlig.

5.8.2 Relevante mål

Det ble bestemt at relevante mål på størrelsen var c_{25} , median, gjennomsnitt, IQCS, IQR og c_{75} .

For disse ble det beregnet et gjennomsnitt og standardavvik for hver av prøvene.

Beregningene ble gjort med Microsoft Office Excel 2003.

5.8.3 Størrelsesmåling i etanol

Til dette forsøket ble prøve 12 benyttet. Dette ble gjort for å sammenligne størrelsen på prøven i vann og i sprit.

I tillegg ble det målt på spraytørket (med indigo), ikke - kryssbundet pektin. Dette for å sammenligne størrelsen før og etter kryssbinding.

70 mg av prøven ble suspendert i 200 ml ethanolum 96 per centum i et begerglass. Proben og røreverket ble satt ned i begerglasset, og suspensjonen satt på røring i 30 sekunder før målingene ble startet.

For ikke – kryssbundet pektin ble 200 mg av stoffet benyttet.

Dataprogrammet var innstil på at en måling skulle ta 30 sekunder. Det ble målt 10 repetisjoner og målingene ble tatt kontinuerlig.

5.8.4 Vil kryssbundet pektin svulle i løpet av 15 minutter?

Til dette forsøket ble prøve 9 benyttet.

70 mg av prøven ble suspendert i 200 ml destillert vann i et begerglass. Proben og røreverket ble satt ned i begerglasset, og suspensjonen satt på røring i 30 sekunder før målingene ble startet.

Dataprogrammet var innstil på at en måling skulle ta 30 sekunder. Det ble tatt målinger kontinuerlig i 15 minutter. c25, c75, median, gjennomsnitt og IQCS ble tatt med i resultatene for de fem første og de fem siste målingene.

Hensikten med forsøket var å se om en størrelsesøkning blir observert fra prøven blir tilsatt vannet og til det er gått 15 minutter. Dette ble gjort for å utelukke at en eventuell økning i størrelsen på partiklene i forsøk beskrevet i 5.8.5 etter tilsetning av mucin skyldes en forsinket svelling i vann.

5.8.5 Testing av mucoadhesjon

Kitosan ble brukt for sammenligning og for validering av metoden. Kitosan er kjent for å ha gode mucoadhesive egenskaper [54, 55]. Kitosan er svak base og er generelt ikke løselig når pH er over 6,5 og vil derfor være suspendert i destillert vann [56].

Først ble størrelsesmålingene av kitosan foretatt på samme måte som det som er beskrevet for prøvene i avsnittet 5.8.1. Deretter ble det tilsatt 10 ml 3,0 % w/w mucinløsning.

Suspensjonen ble satt på røring i 4 minutter før nye målinger ble utført. Det ble igjen målt 10 repetisjoner for prøven, og hver måling tok 30 sekunder.

Størrelsen på partiklene før tilsetning av mucinløsning og etter tilsetning av mucinløsning ble sammenlignet. Det ble sett etter en størrelsesøkning som en indikasjon på en interaksjon mellom prøven og mucin.

Fra prøven ble tilsatt vannet til alle målingene ble utført på en prøve gikk det cirka 15 minutter.

Prosedyren beskrevet i dette avsnittet ble gjort på samtlige av prøvene brukt i 5.8.1, og det ble sett etter størrelsesøkning etter tilsetning av mucinløsning.

5.9 Bruk av Teksturmåler for testing av mucoadhesjon

Det ble benyttet en teksturmåler med soft-ware.

5.9.1 Testoppsett

En probe med en diameter på 1,0 cm med en dobbelsidet tape på undersiden ble benyttet for festing av pektinprøver. Proben med tapen på ble dyppet ned i en prøvebeholder. Pulveret som hadde festet seg ble ytterligere presset mot tapen ved dunking. Overflødig pulver ble så ristet vekk. Denne metoden ble også brukt av Bredenberg og Nyström [57]. Proben ble festet på den øvre, bevegelige delen av teksturmåleren. På undersiden ble en bit (1,25 cm x1,25 cm) filterpapir festet.

Kraften og test avstanden ble kalibrert før prøveapplisering.

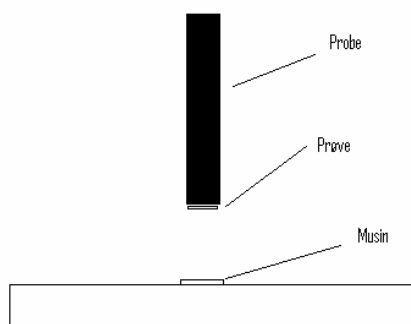
40 μ l av 3 % w/w mucinløsning i fosfatbuffer, pH 6,8, ble pipettert til filterpapiret. Testen ble startet straks etter.

Viktige parametere i dette forsøket var kontakttiden og testhastigheten.

Testhastigheten er hastigheten proben beveger seg oppover med etter en bestemt kontakttid.

Kontakttiden er den tiden proben har vært i kontakt med underlaget, før proben begynner å bevege seg oppover.

Under et forsøk vil proben, med prøvene på, bevege seg med en på forhånd bestemt hastighet nedover, til den kommer i kontakt med filterpapiret. Kontakten vil vare en på forhånd bestemt tid og under en på forhånd bestemt kraft. Deretter vil proben bevege seg oppover med en gitt hastighet. Kraften som er nødvendig for å rive undersiden og oversiden fra hverandre vil registreres.



Figur 9: Oppsettet på tekstur-måleren

5.9.2 Innledende forsøk

Hensikten med innledende forsøk var å komme frem til riktige verdier for testhastighet ("post test speed") og kontakttiden. I dette forsøket tilsvarte kontakttiden tiden prøvene var i kontakt med mucinløsningen.

Først ble kontakttiden holdt på 100 sekunder, mens testhastigheten ble variert.

Testhastighetene det ble testet på var 0,01 mm/s, 0,05 mm/s og 0,1 mm/s.

Deretter ble testhastigheten holdt på 0,1 mm/s og kontakttiden variert.

Kontakttiden det ble gjort forsøk på var 300 sekunder, 100 sekunder og 60 sekunder.

5.9.3 Hovedforsøk

Til dette forsøket ble prøver_{vellykkede} benyttet.

Først ble en 3,0 % w/w mucinløsning laget. Mucin ble løst i fosfatbuffer (pH 6,8) under røring i en time.

Teksturmåleren ble innstilt på følgende:

- Mode: "measure force in tension"
- Pre test speed: 2,0 mm/s
- Post test speed: 0,1 mm/s
- Test distance: 3,0 mm
- Kraft: 203,9 g
- Kontakttiden: 100 s

Kraften og test avstanden ble kalibrert før prøveapplisering.

40 µl av 3,0 % w/w mucinløsningen ble pipettert til filterpapiret. Testen ble startet straks etter det.

Det ble målt 5 paralleller av hver prøve.

For å justere for ikke – spesifikk interaksjon ble det i tillegg målt 5 paralleller av hver prøve mot fosfatbuffer istedenfor mucin. Det ble også målt 5 paralleller av probe mot mucin, filterpapir mot mucin, og tape mot mucin uten påføring av prøvene. Målingene med filterpapir mot mucin og probe mot mucin er blindprøver. Det ble notert verdier for maks kraft (toppen) og kraft x tid (arealet under grafen) for hver parallell.

Verdiene ble overført til Microsoft Office Exel 2003, der gjennomsnittsverdien med standardavvik ble beregnet. Dette ble gjort etter at uteliggere ble fjernet. Verdier som lå 1,5 x IQR over 75 persentilen eller 1,5 x IQR under 25 persentilen ble betraktet som uteligere [47]. $IQR = Q_3 - Q_1$, der Q_3 er 75 persentilen og Q_1 er 25 persentilen.

Gjennomsnittsverdier for maks kraft for alle prøver mot mucin og mot buffer ble tegnet inn i et histogram. Det samme ble gjort for verdiene for AUC (arealet under kurven). Det ble i tillegg tegnet grafer for en representativ parallell for hver av prøvene.

5.10 Bruk av ”roterende sylinder” - metode for testing av bioadhesjon

Kryssbundet pektin ble testet for bioadhesjon på tynntarmen til gris. Tarmen ble hentet fra lokalt slakteri tidlig på dagen og brukt innen 5 timer. Tarmen ble oppbevart kaldt i ringeracetat - løsning inntil den ble brukt.

5.10.1 Oppsettet

Metoden som ble brukt kalles ofte for ”roterende sylinder” - metode” [13].

For å teste mucoadhesjon på tarmen ble et frissettingsapparat brukt (se figur 11). Dette er et padleapparat med 6 kar. Kun to av karene ble benyttet til forsøk. Disse ble fylt opp med 500 ml fosfatbuffer (pH 6,8). En ca. 7,0 cm lang bit av tynntarmen ble rensset med fosfatbuffer, vrent og satt på en metallsylider med en diameter på 2,0 cm (se figur 10), som etter påføring av prøvene ble satt på frissettingsapparatet.



Figur 10: Metallsylider med tarmen på



Figur 11: Frissettingsapparat

5.10.2 Innledende forsøk

Hensikten med forsøkene var å finne en fremgangsmåte for hvordan kryssbundet pektin skulle appliseres på tarmen. Målet var å utnytte fargekontrasten for å kvantifisere pektinmengden som henger igjen på tarmen etter utførte forsøk. Under innledende forsøk ble det bestemt en rotasjonshastighet og en rotasjonstid.

Det ble først forsøkt med forskjellige konsentrasjoner av pektin suspendert i fosfatbuffer. Deretter ble det forsøkt med forskjellige mengder tørrstoff. Tørrstoffmengden ble siktet 0,3 mm over tarmen som allerede er satt på sylindere som beskrevet i 5.10.1. Prøvene ble siktet for å prøve å få et tynt lag av stoff på tarmen, som er jevnt fordelt utover et begrenset område.

Etter at tørrstoff ble påført tynntarmen ble sylindren skrudd fast til apparaturen. Sylindren ble satt på rotering med en rotasjonshastighet på 50 rpm. Apparatet ble stoppet etter 5, 10 og 15 minutter. Det ble sett etter en forandring i tørrstoffmengden som er igjen på tarmen. Det samme ble gjentatt med rotasjonshastighet på 100 rpm og 150 rpm.

5.10.3 Hovedforsøk

I dette forsøket ble prøve 2, 4, 9 og 12 benyttet. Dette var et representativt utvalg av de samtlige prøvene.

En bit av tynntarmen ble klargjort som beskrevet i 5.10.1. Sylindren ble så satt på apparaturen og rotert med 150 rpm i 5 minutter. Dette ble gjort for å skylle vekk overflødig mucin på overflaten, slik at mucinlaget var mest mulig lik på alle prøvene.

Systemet holdt 37 °C. Etter 5 minutter ble sylindren tatt ut.

0,0015 g av prøven ble siktet 0,3 mm over et begrenset område på tarmen.. Sylindren ble skrudd tilbake til apparaturen. Den roterte med 150 rpm i 10 minutter.

Sylindren ble tatt ut og tarmbiten ble tatt av sylindren. Den ble klipt på en side og lagt flat på et kortblad. For å få tarmbiten tørr, ble kortbladet satt inn i kjøleskap til neste dag. Dagen etter ble det tatt bilder av prøvene og av ”null” prøven.

For å få en ”null” prøve, ble prøve 2 benyttet. Prosedyren for denne prøven var den samme som beskrevet ovenfor, men rett etter påsetting av tørrstoffet ble tarmbiten klipt og lagt flat på et kortblad, og kortbladet ble lagt inn i kjøleskapet til tørk til neste dag. ”Null” prøven representerer prøvene ved tiden 0, uten noen rotasjonstid.

5.11 Modelling

Det var ønskelig å modellere på dataene for å se om det er en sammenheng mellom designvariablene og de forskjellige responsene, slik som partikkelstørrelse, pulverform, og maksimalkraften for spesifikk interaksjon målt på teksturmåleren (M – B topp).

M – B angir verdiene for spesifikk interaksjon målt på teksturmåleren.

M står for ”mucin”, og B står for ”buffer”, som i dette tilfellet er fosfatbuffer.

Verdiene som er målt for samtlige av prøvene mot buffer er da trukket fra verdiene som er målt for de samme prøvene mot mucin.

Det var i tillegg ønskelig å modellere dataene for størrelse for seg selv.

5.11.1 Modelling på designvariablene og de forskjellige responsene

For å identifisere signifikante faktorer og samspill ble det utført 6 PLS 1 analyser.

Designvariablene ble definert som X, og ble brukt som X – variablene i tillegg til samspillsledd. Dette ble gjort i tre av fem PLS 1 analyser. Responsen Y var forskjellig i hver analyse. X₂ variablene er designvariablene ekskludert salttypen. Prøver som var kryssbundet med sinkacetat var da også tatt ut av analysen.

PLS 1 analyser:

- 1) X mot pulverform
- 2) X mot målt sinkinnhold i %
- 3) X₂ mot målt sinkinnhold i %
- 4) X mot M – B topp
- 5) X + Zn målt i % mot M – B topp
- 6) X mot median

Alle dataene ble sentrert og vektet 1/STDev. Samspillsledd ble også tatt med i PLS 1 analysene, og de ble kjørt med full kryssvalidering og usikkerhets test.

5.11.2 PCA på størrelsesmål

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

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

6 Resultat

6.1 Resultat spraytørking

6.1.1 Spraytørking

Det var vanskelig å jobbe med pektinkonsentrasjoner høyere enn 3,0 % w/w. Løsningene med en høyere pektinkonsentrasjon stivnet fort i slangen på vei til pumpen, selv etter bruk av aluminiumsfolie rundt slangen for å beskytte pektinløsningen fra ytre temperaturpåvirkninger. Det var kun DA 20/DM 29 pektin som var mulig å spraytørke med en konsentrasjon på 4 % w/w, men løsningen tettet ofte dysen, og spraytørkingen måtte avbrytes flere ganger. For at alle pektintyper skulle ha samme pektinkonsentrasjon, ble en konsentrasjon på 3,0 % w/w valgt.

For at spraytørkingen skulle gå raskest mulig var det ønskelig med en høyest mulig pumpehastighet. En høy pumpehastighet var også ønskelig for å unngå sedimentering av fargestoffet.

Det var likevel ønskelig med minst mulig avsetning av løsningen på veggene på tørkekammeret og et produkt som ikke er fuktig. En pumpehastighet på 4 og 5 ga mye avsetning av pektinløsningen på veggene, selv om aluminiumsfolie ble brukt for å redusere temperaturnedgang i tørkekammeret. Derfor ble det bestemt å bruke en hastighet på 3 (205 ml/time). En høyere pumpehastighet ga et produkt med mer fuktighet.

Inntemperaturen var innstilt på 200 °C, noe som førte til en uttemperatur på cirka 100 °C. Uttemperaturen er viktig for å hindre kondensering av vann i systemet.

En indigokonsentrasjon på 0,30 w/w ble valgt etter innledende forsøk. Denne konsentrasjonen ga en sterk nok farge.

6.2 Resultat av kryssbinding

6.2.1 Innledende forsøk

Det ble tatt utgangspunkt i at konsentrasjonen på sinkioner skulle være 0,10 M og 0,20 M.

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

Når tørkeskapet ble brukt som en tørkemetode, ble tørrstoffet liggende som en hard skorpe på bunnen av petriskålen.

Å bruke frysetørring som tørkemetode ga et mye finere produkt. Produktet var i form av pulver både når kryssbindingsperioden var 10 minutter og 4 timer, for begge Zn – konsentrasjoner.

6.2.2 Kryssbinding av DM 70 pektin

Kryssbinding av DM 70 viste seg å ikke gi et pulver produkt. Forforsøk med spraytørket DM 36 pektin viste at en homogen suspensjon var raskere observert når konsentrasjon av $ZnCl_2$ var høyere. Derfor ble det valgt en høyere konsentrasjoner av $ZnCl_2$ til forsøk med spraytørket DM 70. I tillegg ble også en lavere konsentrasjon valgt ettersom DM 70 pektin vil ha færre bindingssteder for divalente ioner. Filtringen var vanskelig å gjennomføre uansett konsentrasjon. Spraytørket DM 70 pektin i $ZnCl_2$ løsningen dannet en gel, men det var tydelig at det ikke var en suspensjon, slik som det var tilfellet med spraytørket DM 36 pektin. Det var kun forsøket med den høyeste sinkkonsentrasjonen og en kryssbindingstid på 4 timer som kunne utføres i sin helhet, men sluttproduktet så ikke ut som innledende forsøk utført med DM 36 pektin. Etter frysetørring var produktet ikke i pulverform. Det ble bestemt å ikke bruke DM 70 pektin under videre forsøk.

6.2.3 Kryssbinding hovedforsøk

Innledende forsøk ble gjort med spraytørket DM 36 pektin og $ZnCl_2$ og skulle gjelde også for spraytørket DA 20/DM 29 pektin. Det ble brukt 1,10 g spraytørket pektin under forsøk.

Grunnen til dette var at indigo utgjør 0,10 g av dette. Etter utført forsøk ble hver prøve veid.

Kun produkter med et homogent utseende i form av pulver ble tatt med i beregningen. De resterende produktene ble ikke tatt med i videre forsøk.

Tabell 3: Utbytte etter kryssbinding

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
g	-	0,8	0,7	0,7	-	-	-	0,9	0,7	0,7	0,6	0,6	-	-	1,0	0,9

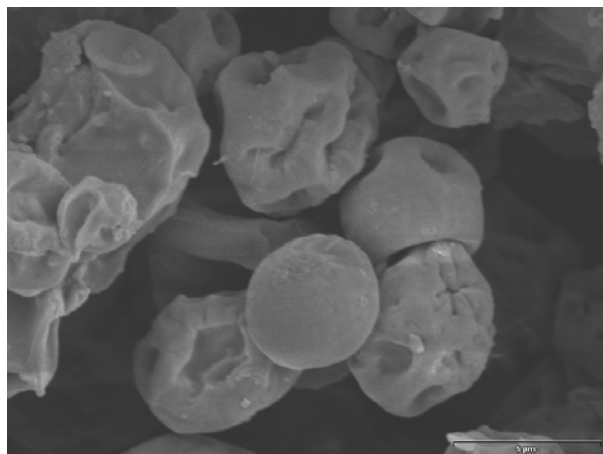
I tabell 3 er kun utbytte for produktene i pulverform tatt med. Disse prøvene blir i oppgaven kalt for prøver_{vellykkede}.

6.3 Lysmikroskop bilder

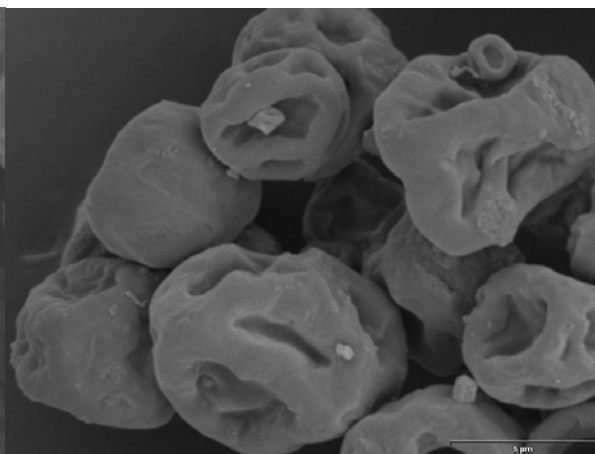
Bildene er å finne i vedlegg fra og med side 74 til og med side 85.

6.4 SEM bilder

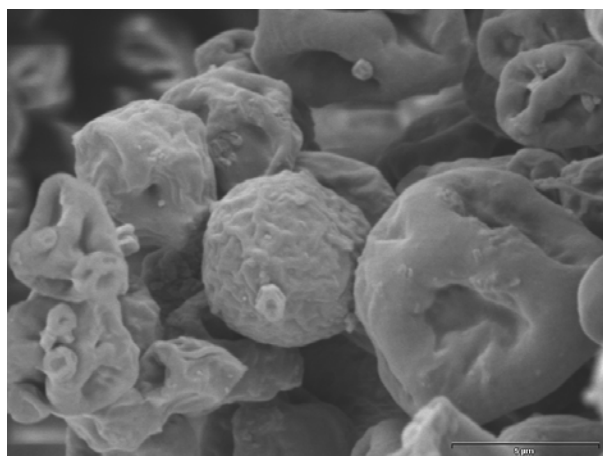
Linjalen som er tegnet inn i SEM bildene er i figur 12 – figur 21 lik 5 µm, og i figur 22 og figur 23 er den lik 10 µm.



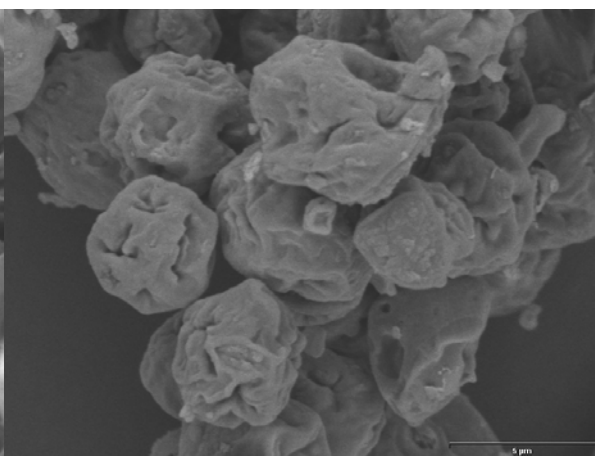
Figur 12: Prøve 2, 6000 x forstørrelse
Amidert, lite sinkklorid, 4 timer



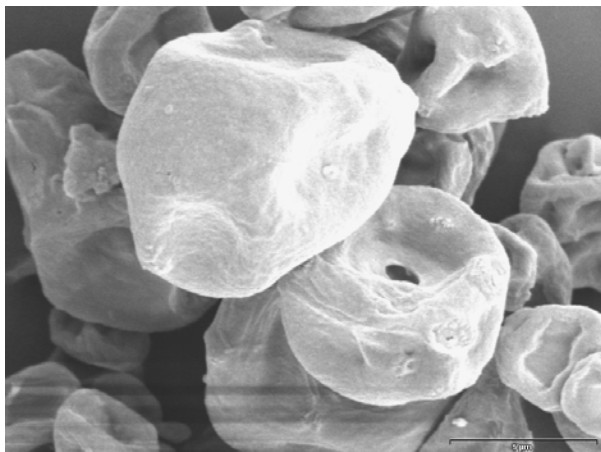
Figur 13: Prøve 3, 6000 x forstørrelse
Amidert, mye sinkklorid, 10 minutter



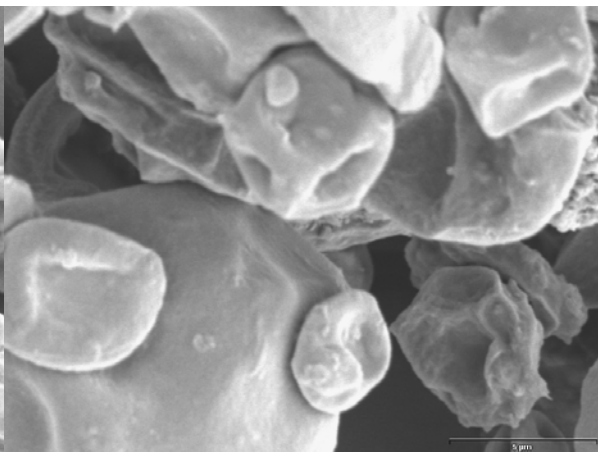
Figur 14: Prøve 4, 6000 x forstørrelse
Amidert, mye sinkklorid, 4 timer



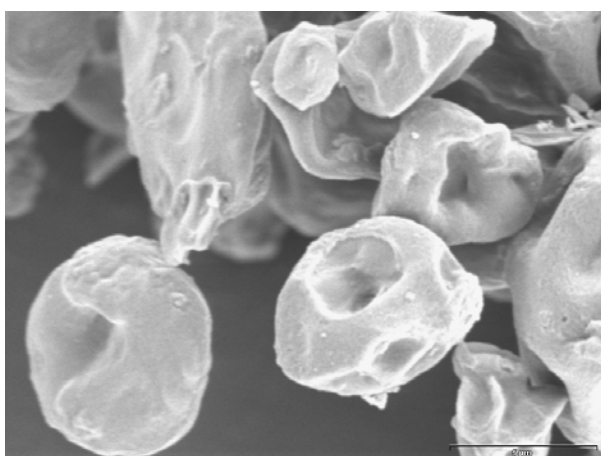
Figur 15: Prøve 8, 6000 x forstørrelse
Amidert, mye sinkacetat, 4 timer



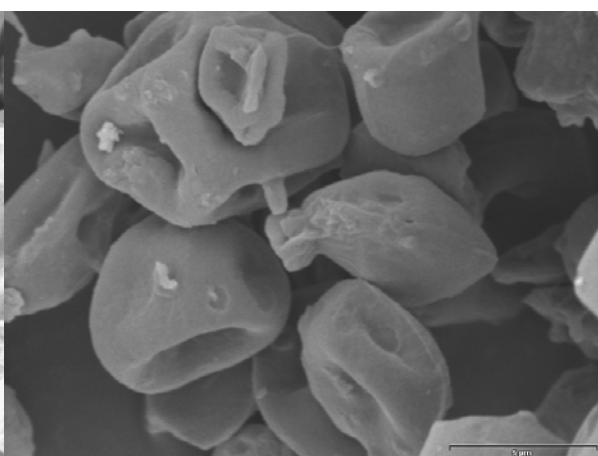
Figur 16: Prøve 9, 6000 x forstørrelse
DM 36, lite sinkklorid, 10 minutter



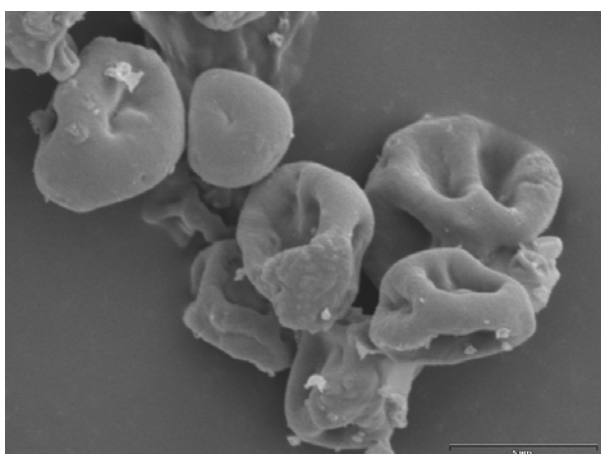
Figur 17: Prøve 10, 6000 x forstørrelse
DM 36, lite sinkklorid, 4 timer



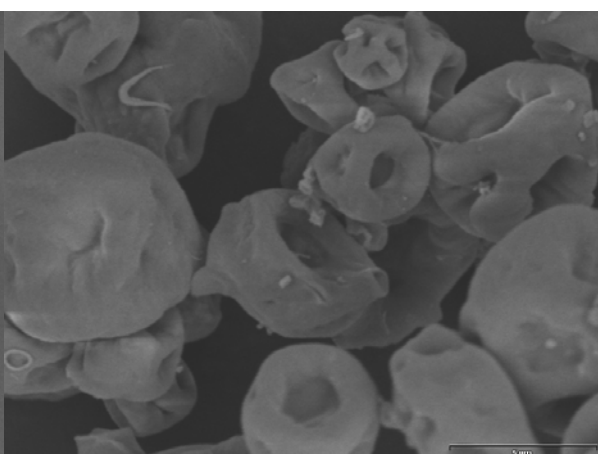
Figur 18: Prøve 11, 6000 x forstørrelse
DM 36, mye sinkklorid, 10 minutter



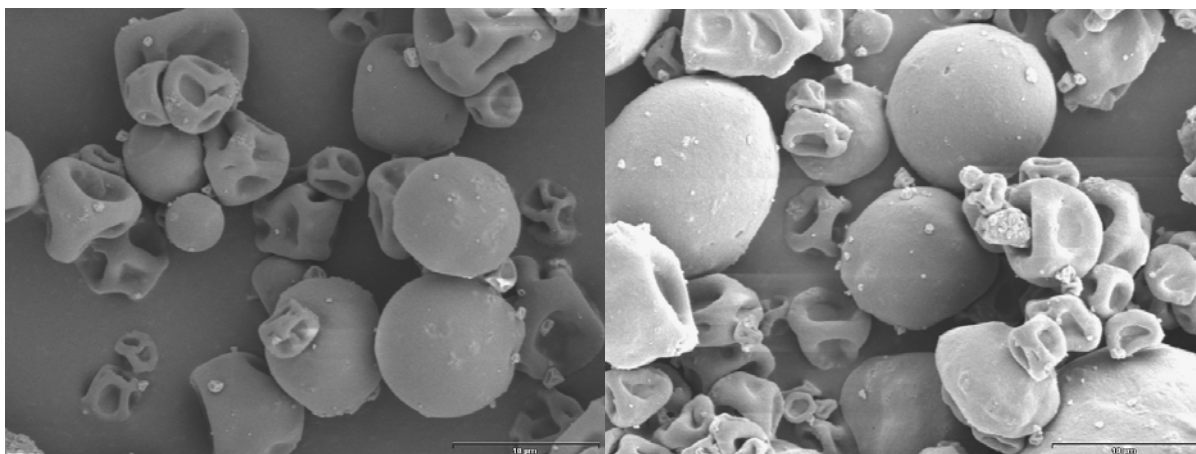
Figur 19: Prøve 12, 6000 x forstørrelse
DM 36, mye sinkklorid, 4 timer



Figur 20: Prøve 15, 6000 x forstørrelse
DM 36, mye sinkacetat, 10 minutter



Figur 21: Prøve 16, 6000 x forstørrelse
DM 36, mye sinkacetat, 4 timer



Figur 22: Spraytørket DA 20/DM 29, 3000 x

Figur 23: Spraytørket DM36, 3000 x

SEM bildene var veldig like. Det er Prøve 8 som skiller seg mest fra de andre. Overflaten til partiklene i prøve 8 er grovere enn overflaten til alle andre partikler. Men foldene er derimot mye smalere. Partiklene som ikke er kryssbundet, men kun spraytørket har flere runde kuler. På figur 21 ser vi i midten en partikkel med et utblåsningshull, noe som ikke er uvanlig for et spraytørket produkt.

Prøve 2, 3, 4 og 8 var mer homogene med hensyn til formen på partiklene enn prøve 9, 10, 11, 12, 15 og 16. Partikler med et hull i midten ble observert på bildene til prøve 9, 11 og 16.

6.5 Bestemmelse av sinkinnhold ved hjelp av atomabsorpsjon

6.5.1 Oversikt over innholdet av sink

Tabell 4: Sinkinnhold i prøvene som er kryssbundet med $ZnCl_2$

	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 9	Prøve 10	Prøve 11	Prøve 12
% Sink	4,9±0,3	4,9±0,2	5,0±0,2	3,7±0,3	3,9±0,3	4,4±0,3	4,8±0,4

Tabell 5: Sinkinnhold i prøvene som er kryssbundet med $Zn(CH_3COO)_2$

	Prøve 8	Prøve 15	Prøve 16
% Sink	5,7±0,2	5,7±0,2	5,8±0,3

Prøvene som er kryssbundet med $Zn(CH_3COO)_2$ hadde høyere sinkinnhold enn prøvene som er kryssbundet med $ZnCl_2$.

6.6 Størrelsesmåling ved Lasentec®

Størrelsesfordeling var større enn det som er observert på bildene tatt med SEM og lysmikroskopet.

6.6.1 Størrelsesmåling i vann

Tabell 6: Størrelsesparametere for kryssbundet pektin

	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
Prøve 2	18,24± 0,09µm	29,6±0,1µm	39,22±0,09µm	46,1±0,2µm	0,184±0,007
Prøve 3	17,1±0,1µm	27,3±0,1µm	33,3±0,1µm	40,59±0,05µm	0,133±0,005
Prøve 4	17,14±0,04µm	27,40±0,04µm	32,61±0,03µm	40,48±0,06µm	0,121±0,002
Prøve 8	17,23±0,07µm	27,81±0,08µm	34,31±0,09µm	41,7±0,1µm	0,137±0,003
Prøve 9	16,10±0,06µm	26,28±0,05µm	30,86±0,4µm	40,16±0,08µm	0,154±0,003
Prøve 10	19,08±0,08µm	31,7±0,1µm	38,7± 0,1µm	49,1±0,2µm	0,163±0,005
Prøve 11	17,25±0,03µm	27,93±0,04µm	32,80±0,08µm	42,14±0,05µm	0,142±0,003
Prøve 12	15,8±0,2µm	26,2±0,3µm	32,2±0,3µm	40,7±0,3µm	0,166±0,005
Prøve 15	16,8±0,2µm	27,2±0,1µm	34,9±0,1µm	41,7±0,1µm	0,160±0,005
Prøve 16	17,29±0,07µm	28,3±0,1µm	38,8±0,2µm	45,9±0,2µm	0,230±0,006

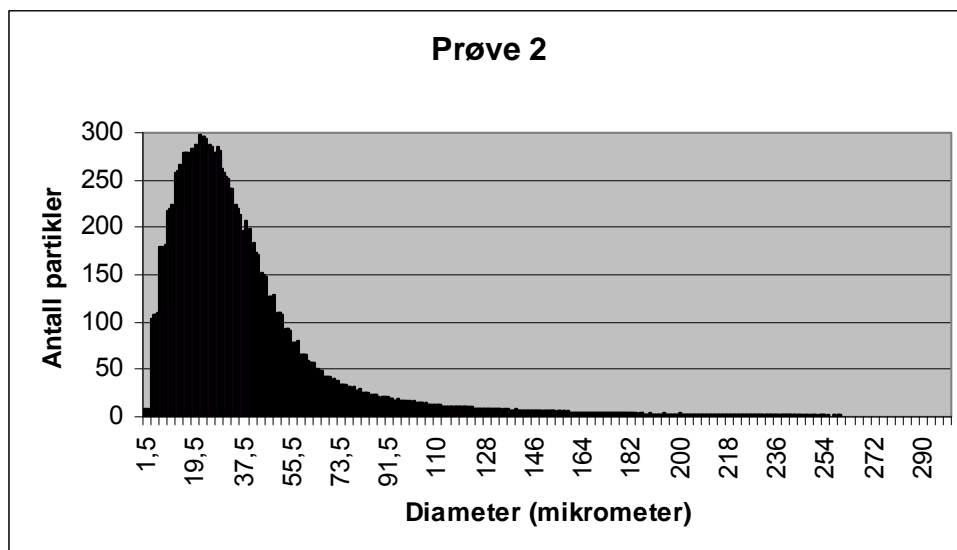
Størrelsesfordeling til prøvene var veldig like. Median og gjennomsnitt er veldig lik for alle med 3 prøver som skiller seg ut. Prøve 2, 10 og 16 har de største verdine.

Sortert etter størrelsen på median ville rekkefølgen ha vært følgende: Prøve12<Prøve 9<Prøve 15<Prøve 3<Prøve 4<Prøve 8<Prøve 11<Prøve 16<Prøve 2<Prøve 10.

Rekkefølgen på størrelsen på IQR er: Prøve 4<Prøve3<Prøve 9<Prøve 8<Prøve 11~Prøve 12=Prøve 15<Prøve 2<Prøve 16<Prøve 10.

Prøve 2, Prøve 16 og Prøve 10 hadde høyest IQR, gjennomsnitt og median. Prøve 16 har i tillegg en veldig høy IQCS.

Figur 23 viser ett eksempel på størrelsesfordeling for prøve 2. Størrelsesfordelingsgrafer for de resterende prøvene er å finne i vedlegg fra og med side 87 til og med side 90.



Figur 24: Størrelsesfordeling til prøve 2

For samtlige av prøvene var skjevheten til størrelsesfordeling positiv, noe som også er lett å se på grafene i vedlegg fra og med side 87 til og med side 90.

6.6.2 Størrelsesmåling i etanol

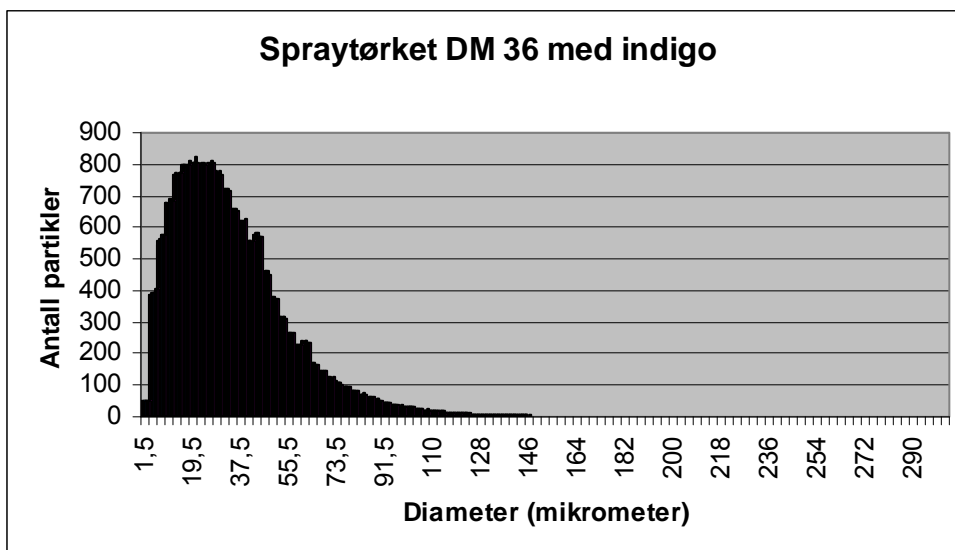
Tabell 7: Størrelsesparametere i etanol sammenlignet med størrelsesparametere i vann for prøve 12

	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
I vann	15,8±0,2µm	26,2±0,3µm	32,2±0,3µm	40,7±0,3µm	0,166±0,005
I etanol	17,2±0,2 µm	28,37±0,07µm	33,6±0,1 µm	41,92±0,08µm	0,096±0,006

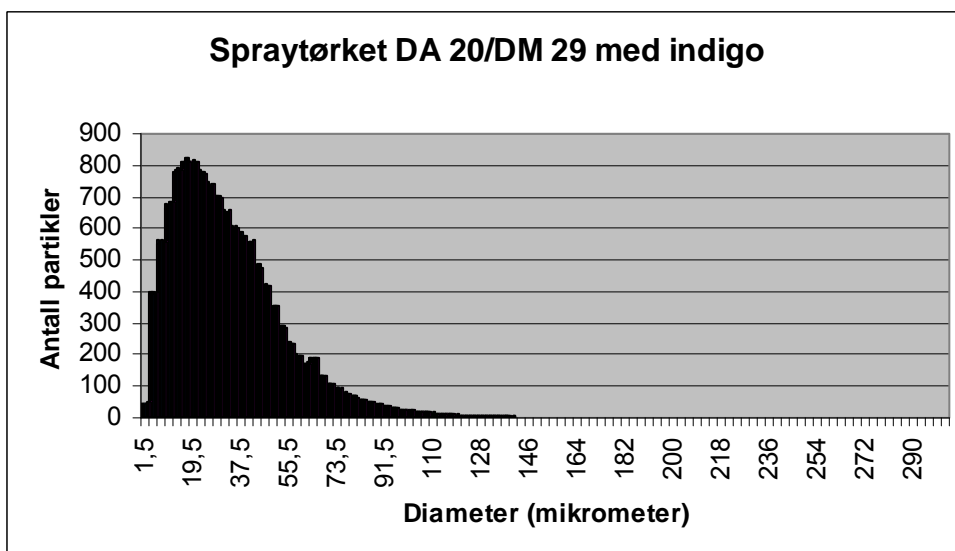
Ut fra tabell 7 kan det konkluderes med at prøvene ikke var større i vann sammenlignet med målingene utført i etanol.

Tabell 8: Størrelsesparametere for spraytørket, ikke kryssbundet DM 36 (1) og DA 20/DM 29 (2) med indigo.

	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
1	17,65±0,06 µ	29,56±0,08 µ	33,91±0,06 µ	43,89±0,08 µ	0,092±0,002
2	16,92±0,05 µ	28,48±0,03 µ	32,73±0,02 µ	42,74±0,03 µ	0,105±0,002



Figur 25: Størrelsesfordeling for spraytørket DM 36 med indigo



Figur 26: Størrelsesfordeling for spraytørket DA 20/DM 29 med indigo

6.6.3 Vil kryssbundet pektin svulle i løpet av 15 minutter?

Tabell 9: Gjennomsnittsverdier av fem første og fem siste målinger for prøve 9

	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
5 første	14,5±0,2 μm	24,3±0,4 μm	30,0±0,5 μm	39,0±0,9 μm	0,20±0,01
5 siste	14,7±0,4 μm	25,4±0,5 μm	30,4±0,3 μm	39,0±0,3 μm	0,12±0,01

Det var ingen signifikante forskjeller mellom størrelsesfordeling for de fem første og de fem siste målingene ifølge dobbeltsidig t-test ($p > 0,05$).

Det var signifikante forskjeller i beregnet IQCS og dette kan muligens forklares med at noen av aggregatene som var til stedet forsvant, men dette påvirket ikke resten av størrelsesmålene.

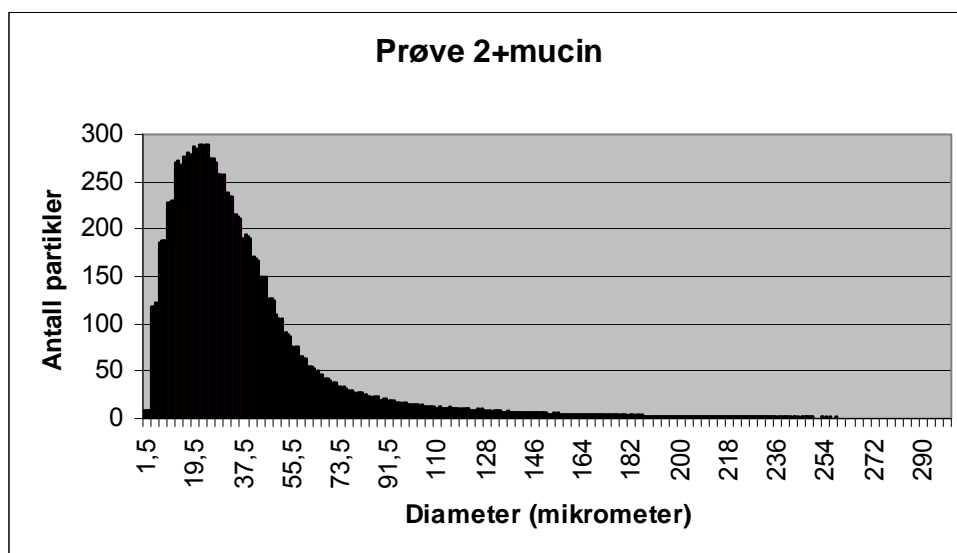
6.6.4 Testing av mucoadhesjon

Det er målt størrelsesøkning for kitosan og denne var betydelig (se tabell 10). Dette tyder på at tilsetning av mucin økte aggregering av kitosanpartiklene som er suspendert i løsningen.

Tabell 10: Størrelsesparametere for kitosan

	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
Kitosan	13±2 µm	20±3 µm	29±4 µm	33±7 µm	0,4±0,2
Kitosan+mucin	21±1 µm	48,5±0,6 µm	55,3±0,9 µm	80,8±0,7 µm	0,09±0,3

Det ble ikke målt noen størrelsesøkning i noen av pektinprøvene etter tilsetning av mucin. Samtlige av verdiene til samtlige av prøvene ble noe mindre etter tilsetning av mucinløsning. Tabellen med verdiene for prøvene etter tilsetning av mucin er å finne i vedlegg på side 86. Et eksempel på størrelsesfordeling for prøve 2 tilsatt mucin kan ses på figur 27. Grafer med størrelsesfordeling til de resterende prøvene tilsatt mucin er å finne i vedlegg fra og med side 87 til og med side 90.



Figur 27: Størrelsesfordeling til prøve 2 tilsatt mucin

6.7 Teksturmålinger

6.7.1 Innledende forsøk

Under forsøk med testhastighet på 0,01 mm/s og 0,05 mm/s ble det observert altfor mye stoff igjen på filterpapiret med mucin på og dette tydet på kohesivt brudd i prøven. Derfor ble det bestemt å bruke en hastighet på 0,1 mm/s.

Det var liten forskjell på verdiene til maksimalkraften mellom forsøk utført med forkjellig testvarighet. En kontakttid på 100 sekunder ble valgt.

6.7.2 Hovedforsøk

Grafer som viser variasjonen av kraften (g) under eksperimentet som funksjon av tiden (s) for eksperimenter utført mot buffer og eksperimenter utført mot mucin er i vedlegg fra og med side 91 til og med side 94.

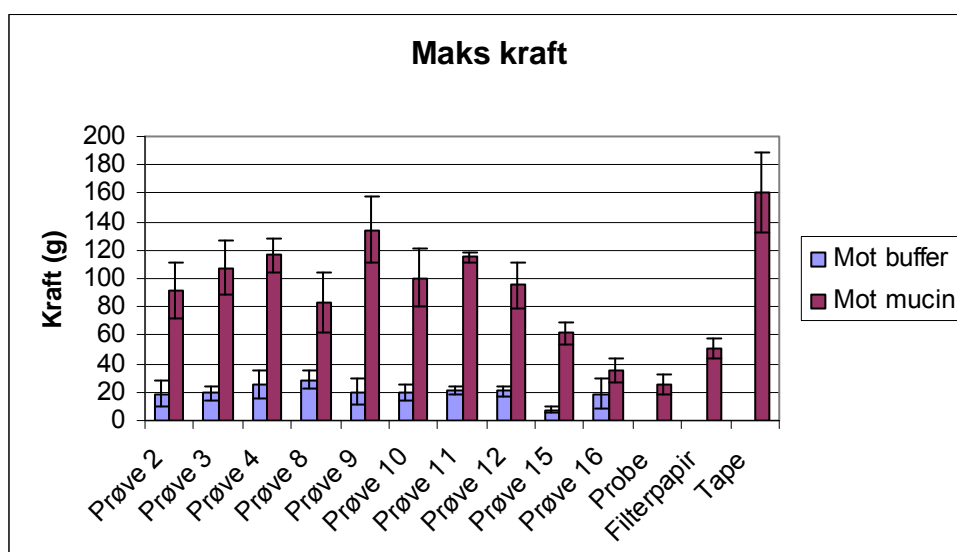
Det er også vanlig å tegne grafer som viser variasjon av kraften oppgitt i Newton som funksjon av avstanden. Avstanden kan lett omgjøres fra tiden ved å gange tiden med testhastigheten som er konstant under hele forsøket.

Verdier for blindprøver ble også tegnet inn i grafene. Dette er verdier for filterpapir mot mucin og verdier for probe mot mucin (se 5.9.3). Det ble valgt en representativ graf for hver av prøvene.

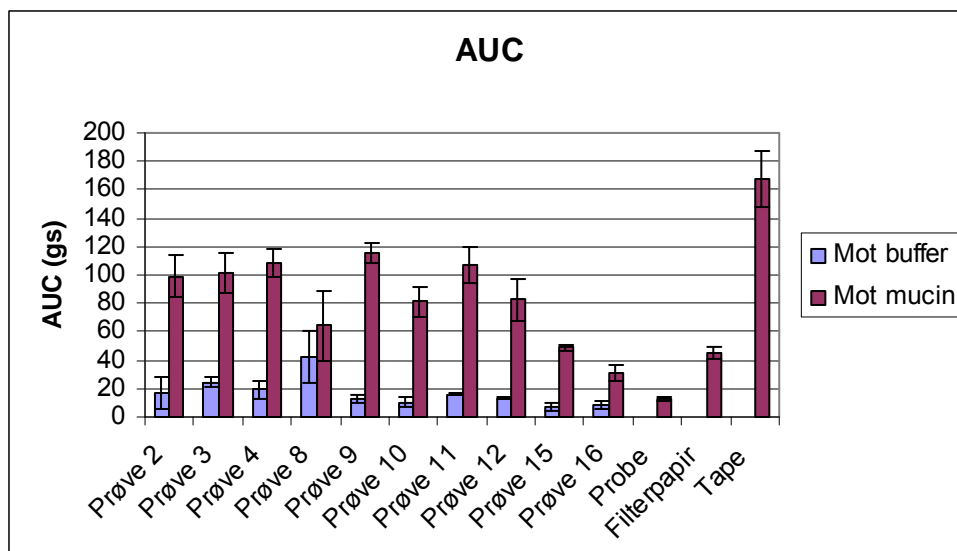
Gjennomsnittsverdier for maks kraft for alle prøver mot mucin og mot buffer er å finne på figur 28.

Gjennomsnittsverdiene for AUC for alle prøver mot mucin og mot buffer er å finne i figur 29.

AUC vil representere total adhesjonsarbeid ("total work of adhesion"). Det er det totale arbeidet som skal til for å få prøvene adskilt fra underlaget.



Figur 28: Maks kraft



Figur 29: Arealet under kurven

6.8 "Roterende sylider" - metode

6.8.1 Innledende forsøk

Det viste seg å være vanskelig å klare å applisere en bestemt mengde kryssbundet pektin. Det ble først forsøkt å applisere pektin på tynntarmen i form av en suspensjon i fosfatbuffer, pH 6,8. På den måten ville kryssbundet pektin være prehydrert og partiklene ville ha fått tid til å svulle før applisering på tarmen. Det var vanskelig å få hele suspensjonsmengden over på tarmbiten. Med mindre væskevolum ble suspensjonen vanskelig å overføre. Konsentrasjon av partiklene ble så redusert, men dette ga for lite farge på tarmen. Det var ønskelig med en større partikkelkonsentrasjon slik at partiklene kunne observeres på tarmen grunnet fargekontrasten mellom fargen på partiklene og fargen på tarmbiten.

Det ble bestemt å bruke tørrstoff istedenfor.

Ved påføring av tørrstoff var det viktig å prøve å påføre et enkelt lag av partiklene, "monolayer", og dette lot seg best gjøre ved bruk av sikting.

Det ble bestemt å påføre partikler på kun en side av tarmbiten, av praktiske årsaker. Når tarmbiten senere skulle klippes av sylindere og legges flat på et kortblad, var det enklest å utføre det når det var stoff kun på den ene siden.

Med en rotasjonshastighet på 50 rpm ble det observert en liten forskjell i tørrstoffmengden på tarmen etter 0, 5, 10 og 15 minutter.

Med en rotasjonshastighet på 100 rpm ble det observert en liten forskjell i tørrstoffmengden på tarmen etter 0, 5 og 10 minutter, og forskjellen var større etter 15 minutter.

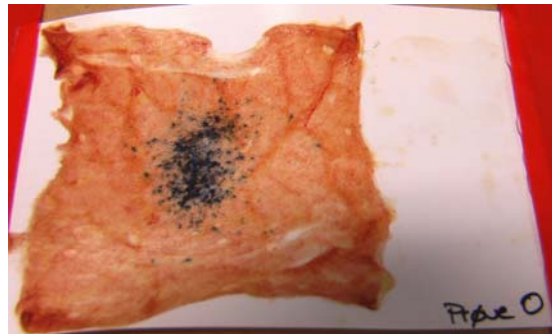
Det var ønskelig å forkorte rotasjonstiden, og derfor ble en rotasjonshastighet på 150 rpm prøvd.

Her ble det observert en liten forskjell etter 5 minutter, og en større forskjell etter 10 minutter. Etter 15 minutter var det altfor lite stoff igjen på tarmen, noe som ikke var gunstig for en senere fotografering av tarmen.

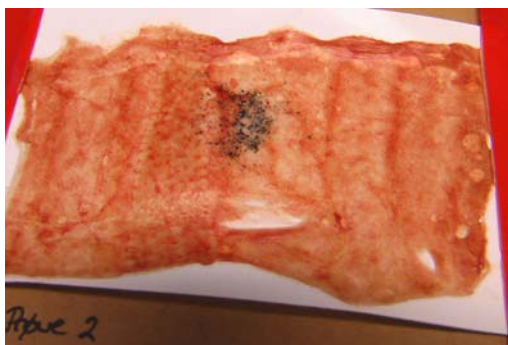
En rotasjonstid på 10 minutter med en rotasjonshastighet på 150 rpm ble vagt.

6.8.2 Hovedforsøk

Figur 30 viser hvor mye stoff det var tilsatt før forsøk ble utført. Figur 31-34 viser resultat etter utført forsøk.



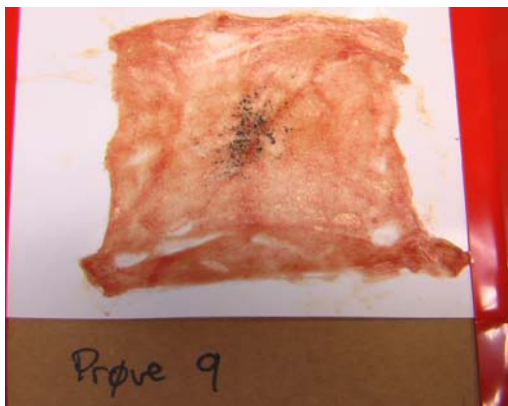
Figur 30: Prøve 0



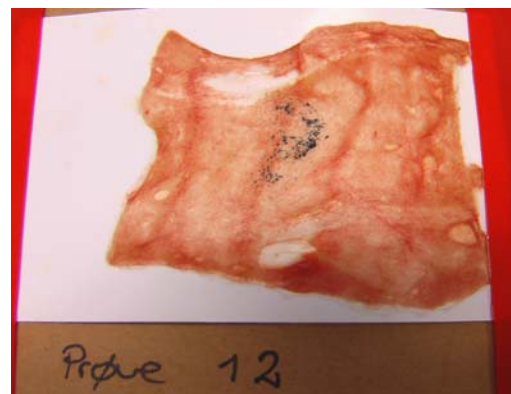
Figur 31: Prøve 2



Figur 32: Prøve 4



Figur 33: Prøve 9



Figur 34: Prøve 12

6.8.3 Reproduserbarhet

En del av stoffet forsvant i sikten. Det var vanskelig å få et like tynt partikkellag på alle prøver, og å fordele stoffet utover samme arealet for alle prøvene.

6.9 Modelling

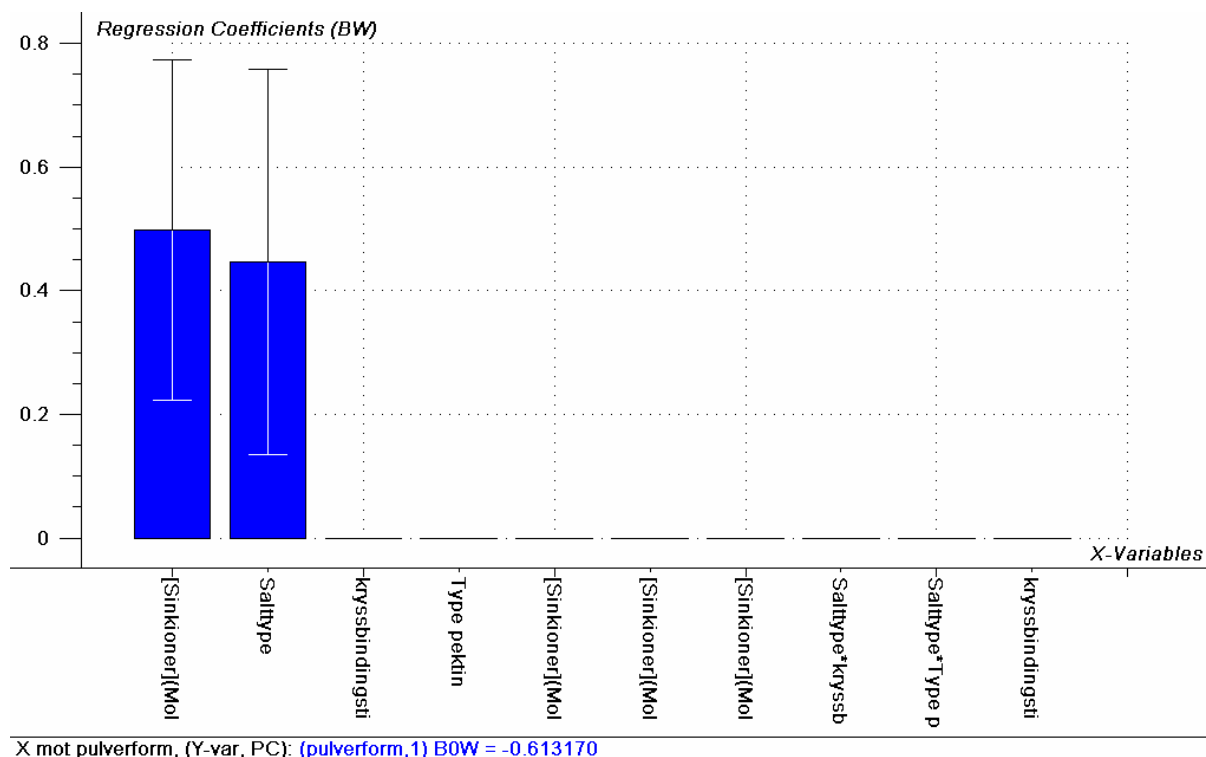
PLS 1 analyse ble utført fordi noen av forsøk beskrevet i 5.4.3 ikke ga et pulverprodukt og dermed var designdata ufullstendige. PLS 1 kan brukes på ikke – design datasett.

6.9.1 PLS på designvariablene og pulverform

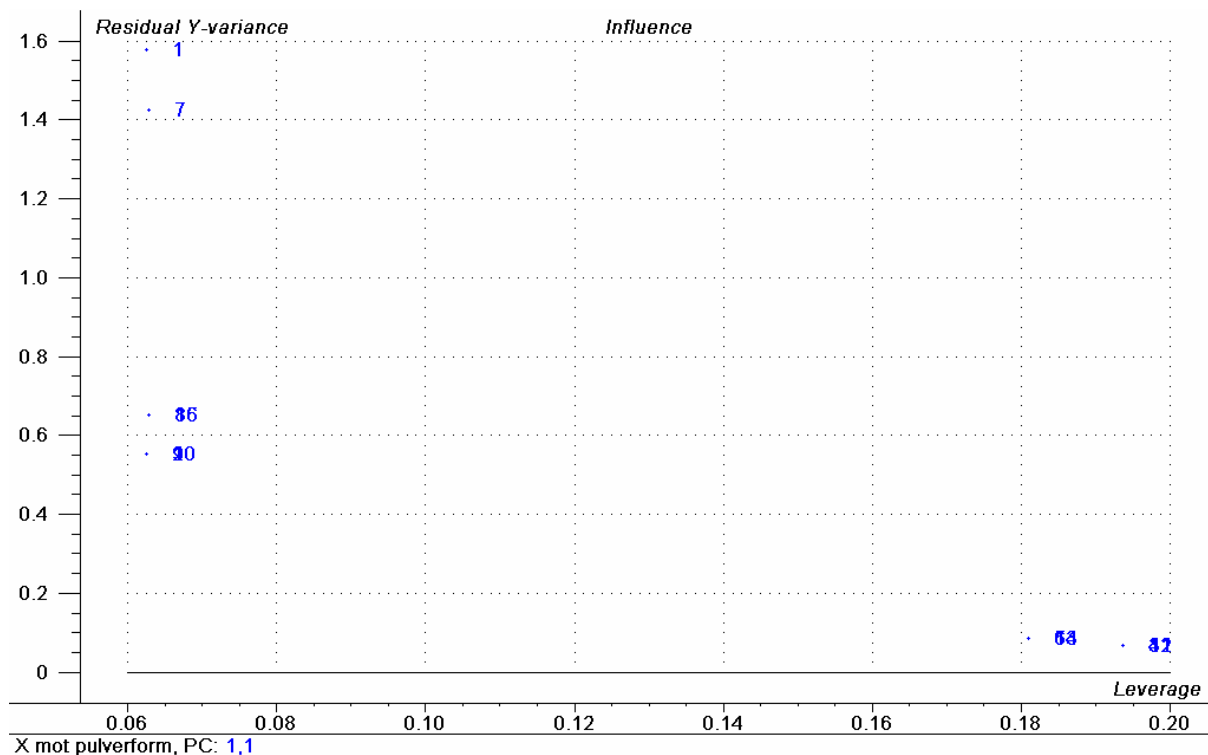
Det ble utført en PLS 1 regresjon på designvariablene som variable (X) og pulverform (Y), der produkt i pulverform (prøver_{vellykkede}) var definert som 1 og produkt som ikke var i pulverform etter kryssbinding og frysetørking var definert som 0. Analysen er å finne i vedlegg på side 95.

Det er to signifikante effekter, og begge er hovedeffekter. Disse er konsentrasjon av sinkioner og salttypen. Begge har en positiv effekt på Y. Salttypen er en kategorisk variabel der sinkacetat er definert som 0, og sinkklorid er definert som 1, altså vil sinkklorid ha en positiv effekt på Y.

Det er 58 % av Y som forklares av PC 1. Dette forklarte lite av totalvariansen.



Figur 35: Signifikante regresjonskoeffisienter i en PLS 1 analyse på designvariable (X) og pulverform (Y)

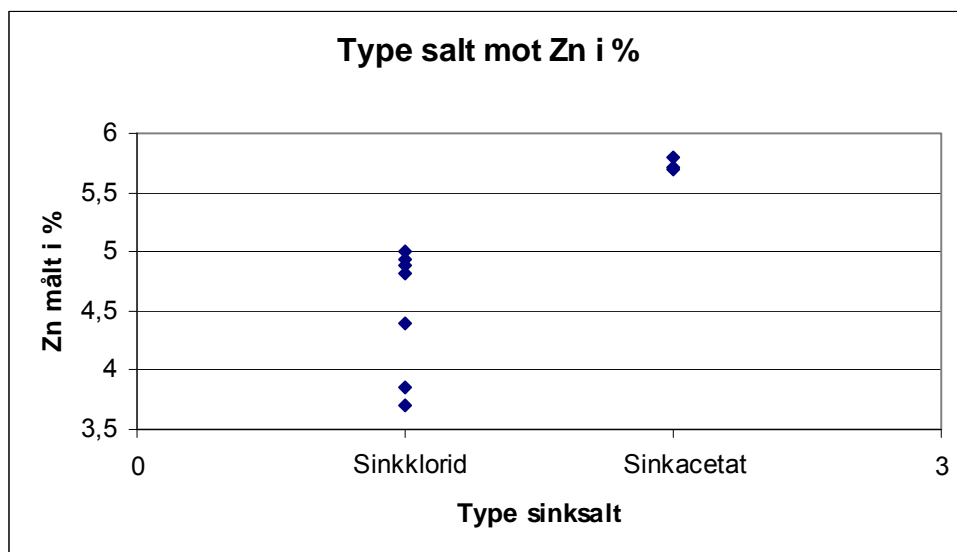


Figur 36: "Influence" - plottet

6.9.2 PLS på designvariablene og sinkinnhold

Det ble utført en PLS 1 regresjon på designvariablene som variable (X) og målt sinkinnhold i prosent som respons (Y).

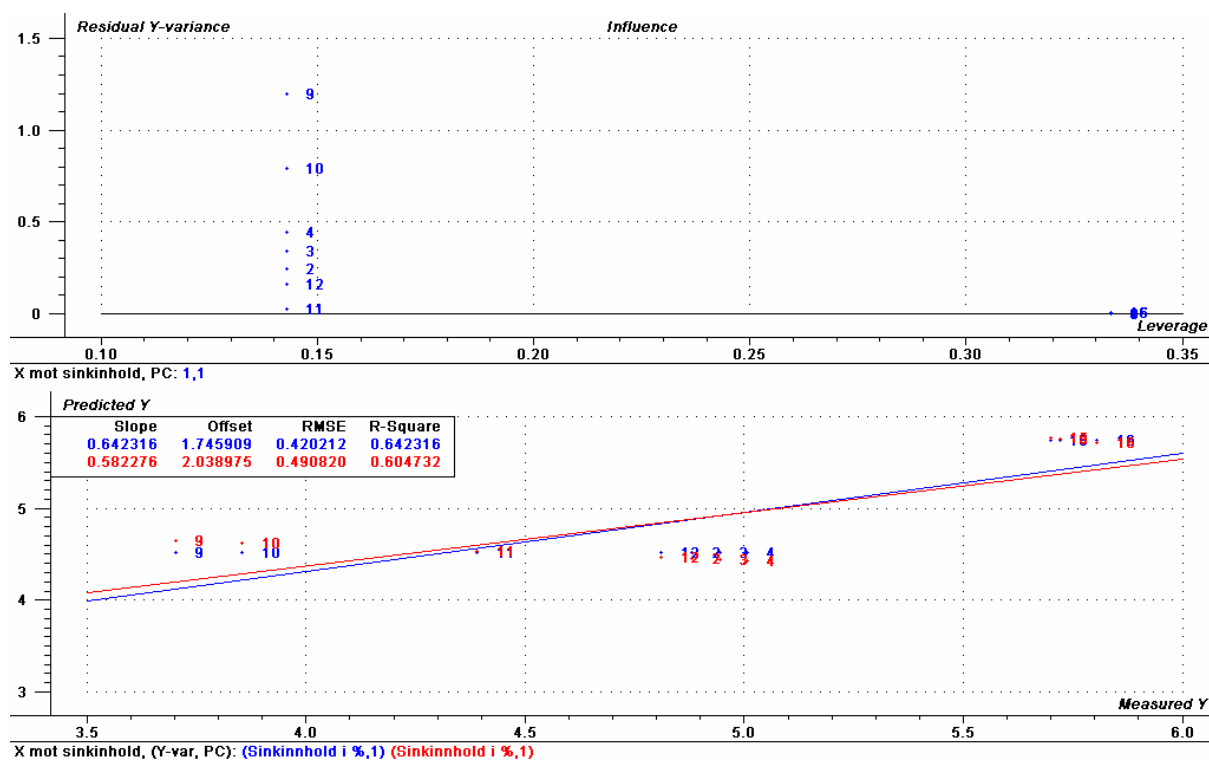
Det er kun en signifikant effekt og det er type sinksalt brukt til kryssbinding av pektin. Den har negativ effekt (-0,8) på sinkinnhold. Salttypen er en kategorisk variabel der sinkacetat er 0, og sinkklorid er 1, altså vil sinkklorid ha negativ effekt på målt sinkinnhold. Salttypen forklarer 64 % av variasjonen i Y. Antall PC som benyttes i modellen er en.



Figur 37: Type kryssbindingssalt plottet mot Zn målt i %.

Figur 37 viser også at prøvene som er kryssbundet med sinkacetat hadde høyest innhold av sink.

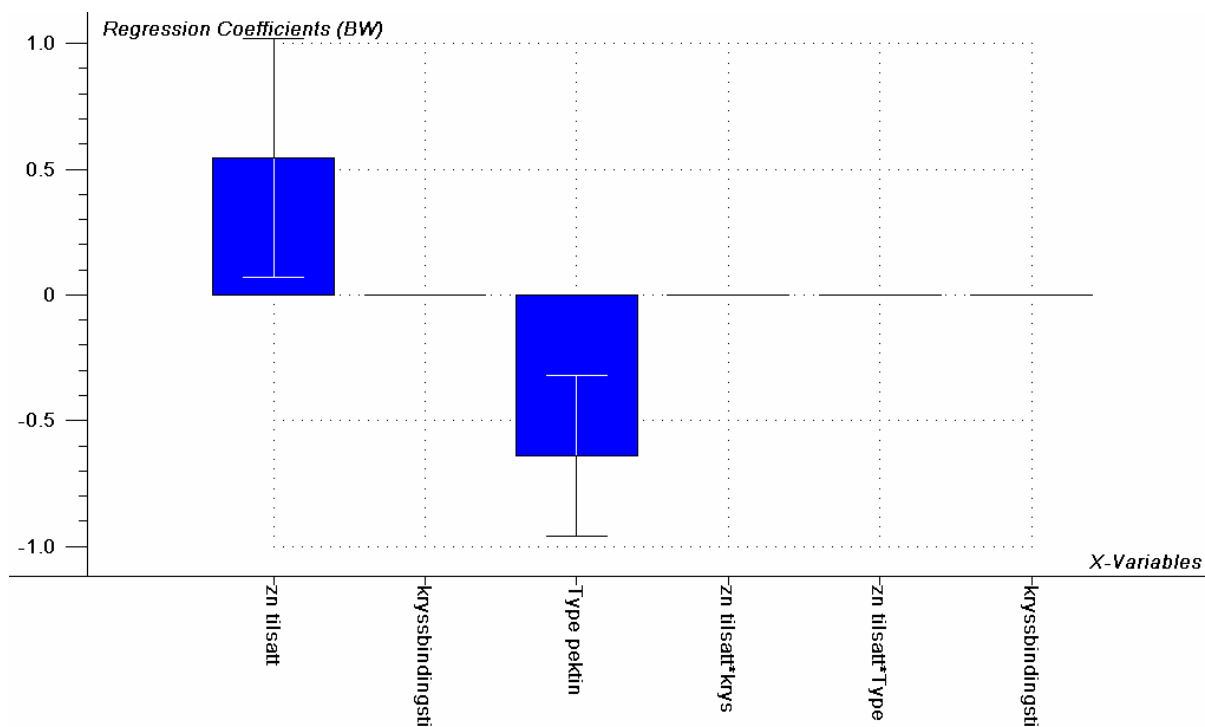
Dette vil være i samsvar med PLS 1 analysen som var utført.



Figur 38: Øverst på figuren: "Influence" – plottet, Nederst på figuren: "predikert mot målt" - plottet

Det er klare grupperinger i modellen og dette kan lett oppdages i "influence" – plottet og "predikert mot målt" – plottet. Det er prøve 8, prøve 15 og prøve 16 som er ansvarlige for hele modellen. Dette er forventet ettersom det er disse prøvene som er kryssbundet med sinkacetat.

Derfor var det ønskelig å lage en PLS 1 regresjons analyse kun på prøver som er kryssbundet med sinkklorid. Her er kun 3 designvariable brukt og disse er definert som X_2 , og responsen (Y) er målt sinkinnhold i prosent. Analysen er å finne i vedlegg på side 95.



X2 mot sinkinnh..., (Y-var, PC): (Sinkinnhold i %,1) B0W = 7.415253

Figur 39: Signifikante regresjonskoeffisienter i en PLS 1 analyse på designvariable (X_2) og sinkinnhold målt i %

Signifikante variable er type pektin og konsentrasjon av sink tilsatt. Økt konsentrasjon av sinkioner vil ha en positiv effekt på Y. Type pektin er en kategorisk variabel og DM 36 er definert som 1, altså vil DM 36 ha en negativ innvirkning på Y. Det er type pektin som har størst påvirkning på modellen.

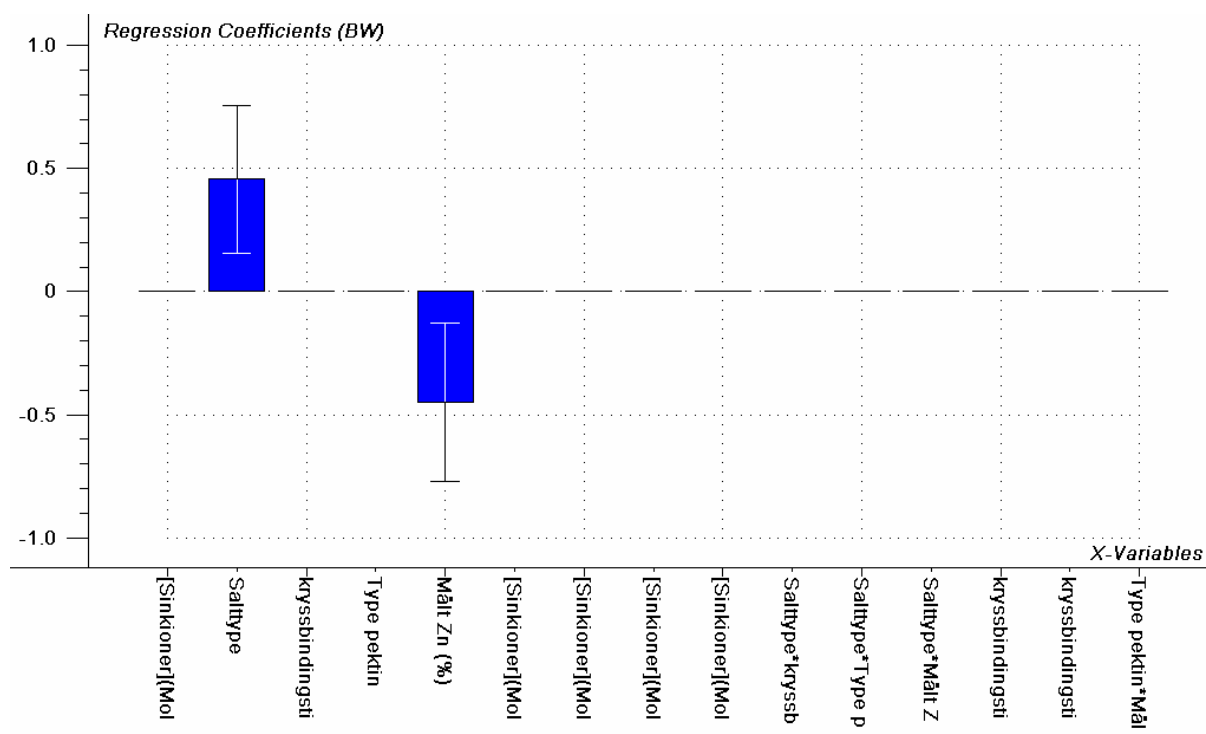
Modellen forklares av kun en PC. 82 % av Y blir forklart av PC 1.

6.9.3 PLS 1 på designvariable og M – B topp

Det ble utført en PLS 1 regresjon på designvariable og M – B topp og den eneste signifikante effekten var type sinksalt brukt til kryssbinding av pektin. Den har positiv effekt (0,82) på sinkinnhold. Salttypen forklarer 68 % av variasjonen i Y. Salttypen er en kategorisk variabel der sinkacetat er 0, og sinkklorid er 1, altså vil sinkklorid ha positiv effekt på målt M – B topp. Modellen bruker kun en prinsippal komponent (PC). Prøve 8 og 16 hadde størst standardavvik og residual, men ble ikke fjernet fra modellen ettersom 2 av 3 prøver som er kryssbundet med sinkacetat da hadde forsvunnet.

6.9.4 PLS 1 på designvariable og Zn målt i % som X og M – B topp som responsen Y

I denne PLS 1 analysen er X variablene definert som designvariablene i tillegg til Zn målt i %. Analysen er å finne i vedlegg på side 96. Kun en PC forklarer modellen. 90 % av X brukes til å forklare 74 % av Y. Signifikante effekter er saltypen og målt Zn i %. Verdien på deres residualer er 0,46 for saltypen og -0,45 for målt Zn i %.



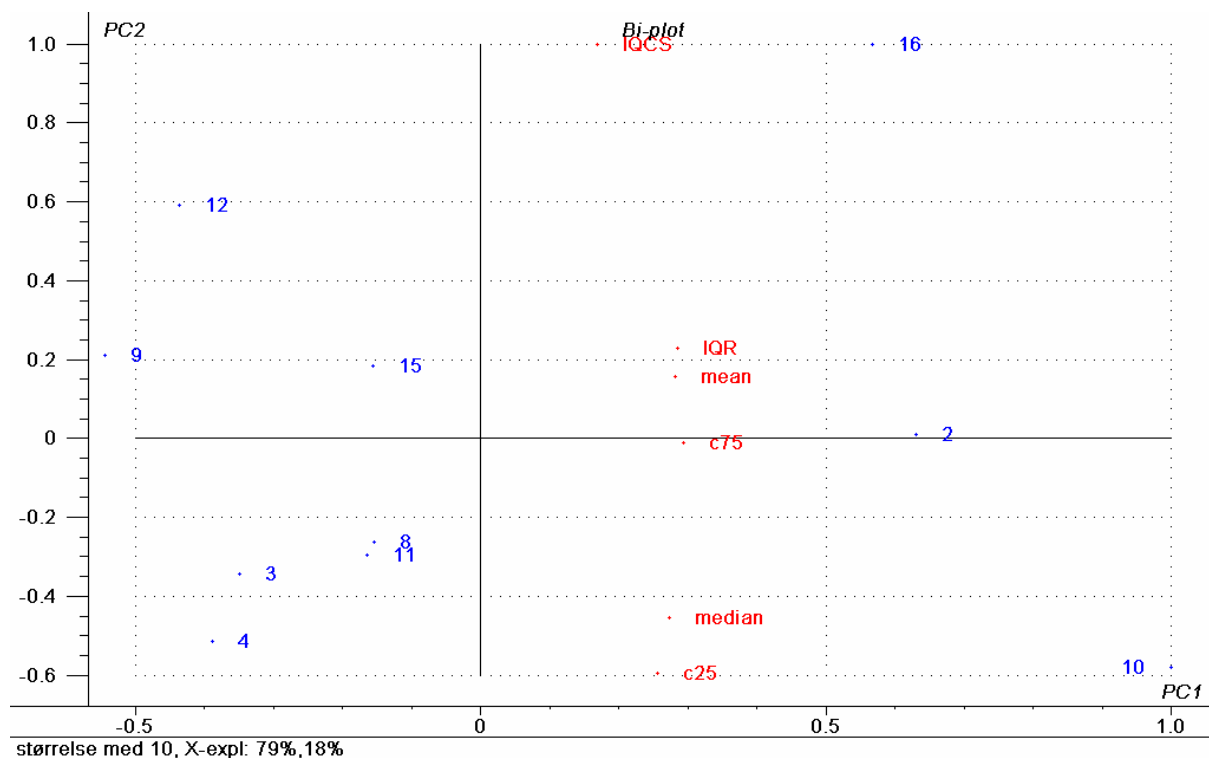
X+Zn målt i % m..., (Y-var, PC): (M-B (g),1) B0W = 5.004478

Figur 40: Signifikante regresjonskoeffisienter i en PLS 1 analyse på designvariable og Zn målt i % (X) og M – B topp som Y

6.9.5 PLS 1 på designvariable og median

I denne analysen ble det ikke funnet noen signifikante faktorer. Sannsynligvis er det andre underliggende faktorer som forklarer forskjeller i størrelsen på prøvene.

6.9.6 PCA på størrelsesmål

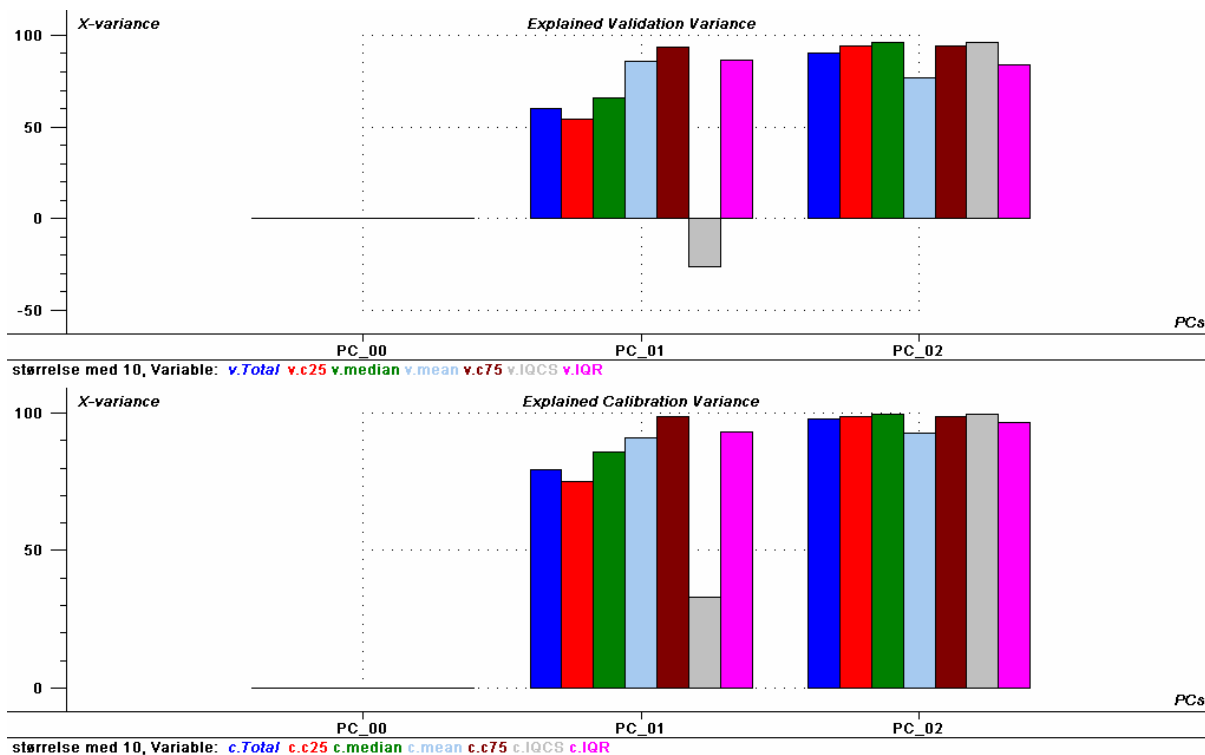


Figur 41: "Scoreplot" og "loadingsplot" av størrelsesmålene og prøvene

Ut fra biplotet (figur 41) kan det ses to klare grupperinger. Prøve 2, 10 og 16 skiller seg fra de andre prøvne. Dette er prøver som hadde de høyeste verdiene på samtlige av størrelsesmål.

Prøve 10 har høyest median og c25, og prøve 16 har høyest IQCS.

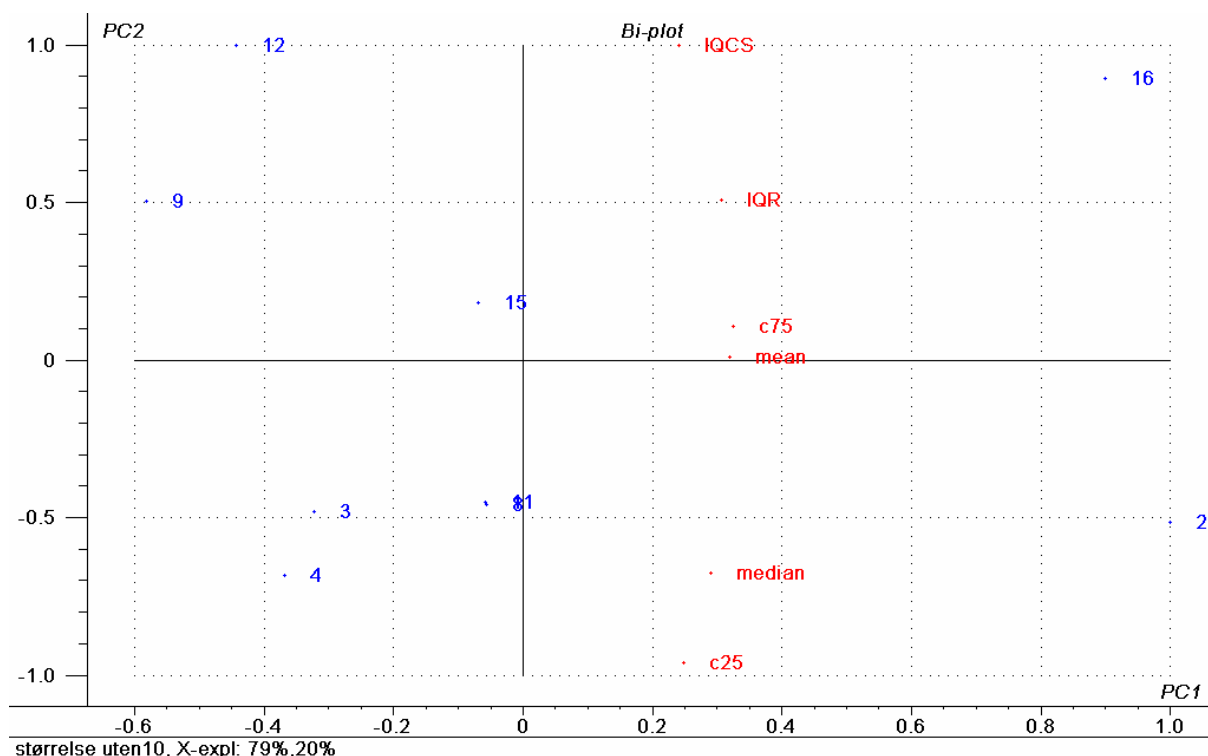
Det er ikke observert noen trender og dette er i samsvar med PLS 1 analysen utført på median, der ingen signifikante faktorer ble funnet blant designvariablene.



Figur 42: Forklart validerings varians plott (øverst) og forklart kalibrerings varians plott (nederst)

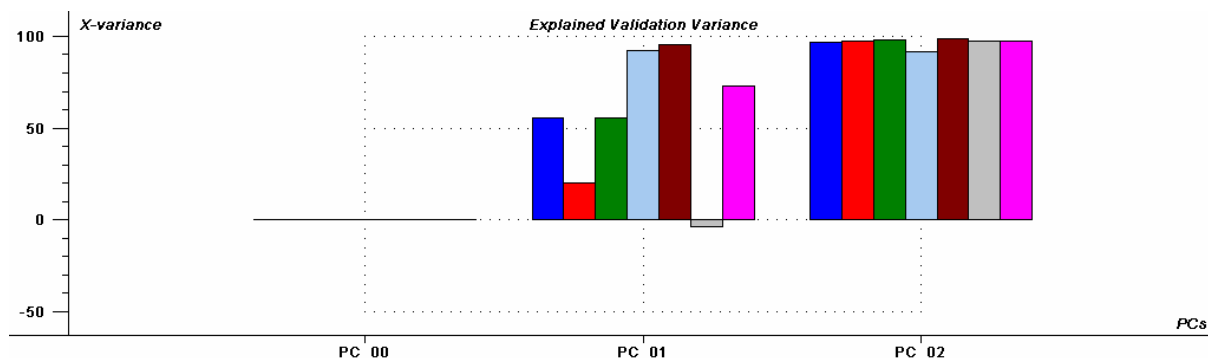
På figur 42 kan det ses hvilken variabel blir forklart av hvilken PC. Modellen forklares av 2 PC – er. De fleste variablene blir mest forklart av PC 1, men IQCS forklares best av PC 2. Alle størrelsesparametere er positivt korrelerte med hverandre. 79 % av variansen forklares av PC 1, 18 % av variansen forklares av PC 2.

Prøve 10 ble tatt ut, ettersom den hadde størst residual, og en ny PCA analyse ble utført. Modellen ble veldig lik den første, 79 % av variansen ble forklart av PC 1 og 20 % av variansen ble forklart av PC 2. Begge PCA analysene er å finne i vedlegg på side 97.

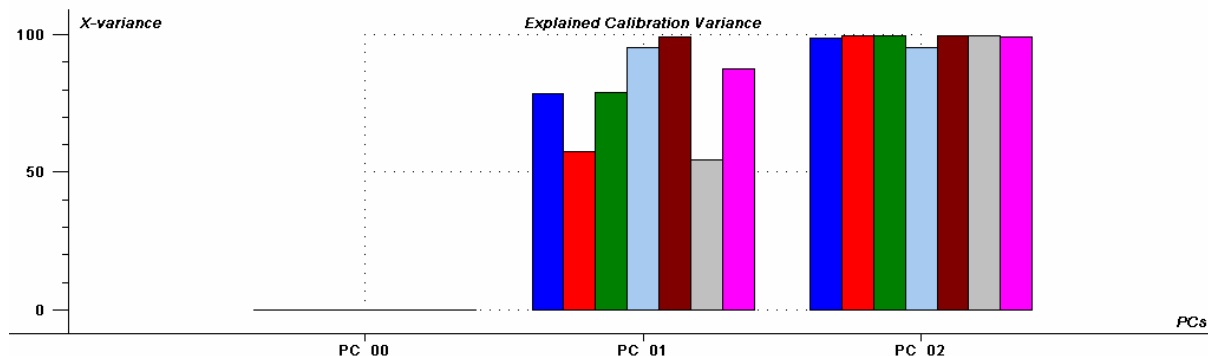


størrelse uten10, X-expl: 79%,20%

Figur 43: "Scoreplot" og "loadingsplot" av størrelsesmålene og prøvene (uten prøve 10)



størrelse uten10, Variable: v.Total v.c25 v.median v.mean v.c75 v.IQCS v.IQR



størrelse uten10, Variable: c.Total c.c25 c.median c.mean c.c75 c.IQCS c.IQR

Figur 44: Forklart validerings varians plott (øverst) og forklart kalibrerings varians plott (nederst)

7 Diskusjon

7.1 Spraytørring

Temperaturen bør være så høy som mulig for best mulig tørkeprosess, men lav nok til å ikke ødelegge pektin [58]. Temperaturen ble valgt fra litteraturen [59].

7.2 Kryssbinding

Lee med kollegaer [42] brukte 1 M CaCl_2 i 10 minutter for å kryssbinde spraytørket pektin. Det er dette som er utgangspunktet for mengde sink og kryssbindingstiden brukt.

7.2.1 Kryssbinding av HM pektin

Grunnen til at HM pektin, DM 70 i dette tilfellet, ikke kunne danne et fullverdig produkt skyldes trolig manglende seter (lommer) for divalente ioner. Pillay med kollegaer [60] fant også ut at kryssbinding av DM 75 pektin med kalsiumklorid ikke klarte å danne pellets. Det er blitt foreslått at Zn^{2+} ioner er mindre selektive og at de derfor kryssbinder mer omfattende enn Ca^{2+} [61]. En av årsakene kan være ioneradius, som er mindre for Zn^{2+} (88 pm) enn for Ca^{2+} (114 pm) [37]. Dermed vil flere ioner få plass i lommer mellom pektinkjedene og dette vil redusere kjedefleksibiliteten ytterligere. I tillegg har Ca^{2+} høyere koordinasjonstall (7 - 9) enn Zn^{2+} (4 - 6) og vil tiltrekke vannmolekylene bedre, ettersom den foretrukne liganden for kalsiumioner er oksygen. Zn^{2+} vil gi best kjedeimmobilisering og lavest hydrering [37].

Hagesæther med kollegaer [53] klarte å kryssbinde HM pektin med Zn^{2+} og å danne kuler som forble intakte, men disse hadde en diameter større enn 1 mm.

7.2.2 Kryssbinding av LM pektin

Kryssbinding av begge LM spraytørkede pektin var vellykket og ga et produkt i pulverform. Lootens med kollegaer [62] fant at amidering hadde lite reduserende effekt av kryssbinding. De konkluderte med at amiderte galakturonsyre enheter danner komplekser med Ca^{2+} ioner minst like effektivt som ikke - amiderte. Tho med kollegaer [63] fant at graden av amideringen påvirket kryssbinding med Ca^{2+} og konkluderte med at kryssbinding av amidert pektin ikke kan forklares fullstendig med egg – boks modellen.

7.3 Mikroskopibilder tatt med lysmikroskopet

Utseende for spraytørket produkt er tidligere beskrevet som en hul sfære [40, 41], noen ganger med et lite hull i overflaten [39]. Lee med kollegaer [42] fant at pektinmikrosfærene fikk sprekker direkte etter spraytørring, men disse var ikke synlige etter kryssbinding med 1,0 M CaCl₂. Giunchedi med kollegaer fant at spraytørket pektin dannet partikler som var sfæriske med glatt overflate[43]. Disse var ikke kryssbundet.

7.3.1 Utseende og størrelse

Mange av bildene var uklare, og det var vanskelig å se formen på partiklene. De fleste prøvene så likevel ut til å ha sfæriske partikler, men som i tillegg var noe deformerte. Prøve 3, prøve 4 og prøve 15 så ut til å ha flest partikler som var mindre enn 10 µm. Bortsett fra en partikkel på bildet til prøve 9 var det ikke observert noen partikler med en størrelse større enn 15 µm.

Bilder av ikke kryssbundet, spraytørket pektin med indigo viste at ikke - amidert pektin dannet noe større partikler, og at det var kun ikke – amidert pektin som hadde flere partikler med en diameter større enn 10 µm, men disse var i mindretallet. De fleste av partiklene som ikke var kryssbundet hadde et kuleformet utseende og var ifølge bildene større i diameter enn partiklene som var kryssbundet.

Disse observasjonene tyder på at divalente sinkjoner vil holde pektinmolekylene tettere til hverandre, noe som vil føre til at partiklene får en mindre diameter. Dette er i samsvar med resultatet til Sriamornsak [64] som fant at økt konsentrasjon av kalsiumioner førte til mindre diameter på partiklene.

Giunchedi med kollegaer fant at spraytørket pektinpartikler var mindre enn 10 µm, og dysen som da er blitt brukt var 0,7 mm.

Sannsynligvis er størrelsen på partiklene bestemt av prosessparametere under spraytørring, spesielt konsentrasjon av løsningen og dysestørrelsen [40, 41]. Begge vil ha en positiv effekt på størrelsen på partiklene. En løsning med bedre løselighet vil gi partikler av mindre størrelse [41]. Partiklene vil strøkke raskere ved lav løselighet, og dermed ikke ha tid til å krympe.

Amidert pektin (DA 20/DM 29) løste seg raskere i vann, men det var vanskelig å si noe om løseligheten. For DA 20/DM 29 var den observerte partikkeldiameteren mindre enn for DM 36.

Prøvene var spraytørket under like forhold og dette er sannsynligvis grunnen til at de fleste prøvene så like ut på mikroskopbildene.

7.4 SEM bildene

SEM bildene var mer detaljerte enn bildene tatt med lysmikroskopet. Partiklene kom bedre til synet og formen og strukturen på enkeltpartiklene var derfor lettere å observere.

7.4.1 Utseende og størrelse

Prøve 9, 10 og 11 hadde et eksempel hver på en partikkel med en diameter større enn 10 μm . Ingen av de andre prøvene hadde et eksempel på så store partikler.

Bilder tatt av partiklene som ikke var kryssbundet viste større partikler enn de som var kryssbundet med mange av partiklene med en diameter større enn 10 μm .

Det var synlig at amidert spraytørket pektin hadde partikler som var mindre i diameter i forhold til ikke – amidert pektin.

Det var synlig at prøve 9, 10, 11, 12, 15 og 16 (av DM 36) hadde en større variasjon i form og størrelse i forhold til prøve 2, 3, 4 og 8 (av DA 20/DM 29). Prøve 2, 3, 4 og 8 var rundere i formen.

Samtlige av prøvene hadde store folder på overflaten, og dette skyldes trolig kryssbindingen, ettersom bilder tatt av spraytørket pektin som ikke er kryssbundet hadde langt flere runde partikler.

Pillay med kollegaer [37] fant at pektin kryssbundet med Zn^{2+} vil fange mindre mengde legemiddel. Dette vil trolig skyldes Zn^{2+} , som vil oppta plassen til legemidlet.

I denne oppgaven kan det motsatte være tilfellet, indigo kan oppta plassen mellom pektinkjedene som er tenkt for Zn^{2+} , og dette kan føre til at mindre Zn^{2+} får plass i disse lommene. Stabiliteten til mikrosfærene blir da forstyrret, og dette kan gi sfærene et deformert utseende.

El – Gibaly [38] fant at pektinkuler kryssbundet med lavere konsentrasjon av sink ga mikrosfærer med flere sprekker og større porer enn pektinkuler kryssbundet med høyere konsentrasjon av sink. I tillegg hadde mikrosfærene som inneholdt større konsentrasjon av legemiddel også større porer og var større i diameteren i forhold til mikrosfærene med mindre konsentrasjon av legemiddel.

En annen forklaring på utseende til prøvene kan være måten partiklene er kryssbundet på. Pillay med kollegaer [65] konkluderte med at deformert utseende på deres pektinkuler kryssbundet med kalsiumioner skyldes perifert krymping under kryssbinding, som finner sted i første stadiet av kryssbinding.

For å få runde partikler er det viktig at perifert kryssbinding av partiklene skjer umiddelbart etter at pektin kommer i kontakt med divalente ioner [65]. Med perifert kryssbinding menes kryssbinding på overflaten av partiklene.

Utilstrekkelig kryssbinding kan gi et deformert, kollapset utseende til pektinpartiklene [65].

7.5 Sinkmåling

Under kryssbinding med sinkacetat ble temperaturen holdt høyere enn under kryssbinding med sinkklorid. Dette er trolig grunnen til at pektin kryssbundet med sinkacetat har høyere innhold av sink enn pektin kryssbundet med sinkklorid. Høyere temperatur vil trolig føre til at eventuelle hydrogenbindinger blir brutt, og seter for divalente kationer blir lettere tilgjengelige. Xu med kollegaer [66] konkluderte med at temperatur hadde sterk innvirkning på graden av kryssbinding av pektin med Ca^{2+} . Høyere temperatur førte til høyere prosent av kalsiumioner i sluttproduktet.

Når det er noen prøver som ikke gir fullverdig produkt (pulverform), kan dette skyldes at sinkioner ikke klarer å kryssbinde fort nok til å forhindre elektrostatisk frastøtting som kommer av frie galakturonsyre enheter, slik at pektinmolekyler blir mer utstrakte i løsningen. Utstrekning vil fremmes av høyere temperatur [67].

En annen årsak til at pektin kryssbundet med sinkacetat har høyere innhold av sink kan være løseligheten til sinkacetat. Overskuddet til sinkacetat, som har en dårligere løselighet i vann enn sinkklorid, vil ikke kunne skylles vekk fullstendig. Dermed vil også sink som ikke er med på å kryssbinde pektin bli målt.

Blant prøvene som var kryssbundet med sinkklorid hadde prøvene som inneholdt amidert pektin høyere innhold av sink. Disse prøvene var også rundere i formen, samtidig som variasjon i størrelsen var mindre sammenlignet med prøvene som inneholdt ikke – amidert pektin. Dette kommer trolig av at amidert pektin danner lettere geler med divalente kationer. Amidert pektin som var brukt til forsøk ble løst raskere enn ikke – amidert pektin. Dette kan være en årsak til at flere av prøvene med amidert pektin ikke var vellykket og ikke hadde dannet et pulverprodukt. Pektinmolekylene i spraytørket amidert pektin vil da raskere bli utstrakte og vil trolig ikke bli kryssbundet fort nok til å forbli i form av mikropartikler. Dermed vil produktet ikke være i pulverform.

7.5 Lasentec®

7.5.1 Størrelsesmåling i vann

Størrelsesfordeling målt med Lasentec® var ikke i samsvar med verken bilder tatt med lysmikroskopet eller bilder tatt med SEM. Både median og gjennomsnittsverdiene var langt høyere enn noen av partiklene som var observert på bildene.

Grunnen til dette kan være aggregat dannelse.

Høye gjennomsnittsverdier vil være forventet ettersom skjevheten til samtlige av grafene til samtlige prøver er positiv.

Lasentec® ble ikke kalibrert før den ble tatt i bruk og dette kan kanskje være årsaken til høye verdier målt med Lasentec® i forhold til størrelsen observert på bildene som er tatt av prøvene. De aller minste partiklene vil ikke kunne komme med på størrelsesfordelingsgrafene ettersom Lasentec® har en nedre deteksjonsgrense på 1 µm.

7.5.2 Størrelsesmåling i etanol

Målingene foretatt i etanol for prøve 12 viste at partiklene ikke var større i vann enn i etanol, altså var dette en indikasjon på at prøvene ikke sveller i vann.

Det var tenkt at de høye verdiene på størrelsesmålene i avsnittet 6.6.1 kanskje kunne skyldes kryssbindingen. Teorien var at sinkionene kunne kryssbinde pektin slik at flere kuler kom sammen og dannet aggregater. Ettersom verdiene på størrelsesmålene på spraytørket pektin som ikke var kryssbundet også var høye (se tabell 8) var dette ikke tilfellet. Kryssbindingen vil derfor ikke føre til aggregatdannelse.

7.5.2 Testing av mucoadhesjon

Det var ikke observert noen størrelsesøkning for noen av prøvene etter tilsetning av mucinløsning. Både salinsyregrupper på mucin og eventuelle frie karboksylsyre grupper på pektinmolekylene vil være ioniserte og elektrostatisk frastøting vil finne sted. I tillegg vil kryssbindingen øke kjedeimmobilitet og kjedesammenfletting mellom pektin og mucin vil være forhindret.

7.6 Teksturmålinger

Under testing av mucoadhesjon med teksturmåler var partiklene komprimerte (se avsnitt 5.9.1). Dermed ble fordelingen med å ha mikropartikler (se avsnitt 3.5.1) redusert og arealet som var tilgjengelig for mucoadhesjon ble redusert, men fortsatt stort på grunn av en ru overflate.

7.6.1 Mucoadhesjon

Ved fysiologisk pH vil de fleste av karboksylgruppene til pektin og sialinsyregruppene til mucin være ioniserte. Hydrogenbinding vil da i dette tilfellet være begrenset på grunn av elektrostatiske frastøtting. Eventuell mucoadhesjon bør da skyldes sammenfletting av kjedeendingene til pektin og mucin [7].

Thirawong med kollegaer [23] kom frem til at amidert, men ikke kryssbundet pektin hadde større mucoadhesive egenskaper enn ikke amidert, LM pektin.

Dette gjelder for ikke kryssbundet pektin, og de samme amidgruppene er da trolig involvert i kryssbindingen og dette vil føre til kjedeimobilisering, slik at samme resultat ikke var forventet.

Å styrke mucuslaget vil være nødvendig for en sterk mucoadhesjon, og dette vil trolig skje når polymer kjeder sammenflettes med mucin, eller på grunn av dehydrering av mucus grunnet vannbevegelser [21]. Dehydrering av mucin vil kunne finne sted grunnet kapillærkreftene som vil være til stede når en ru overflate kommer i kontakt med en løsning.

7.6.2 Parametere til teksturmåleren

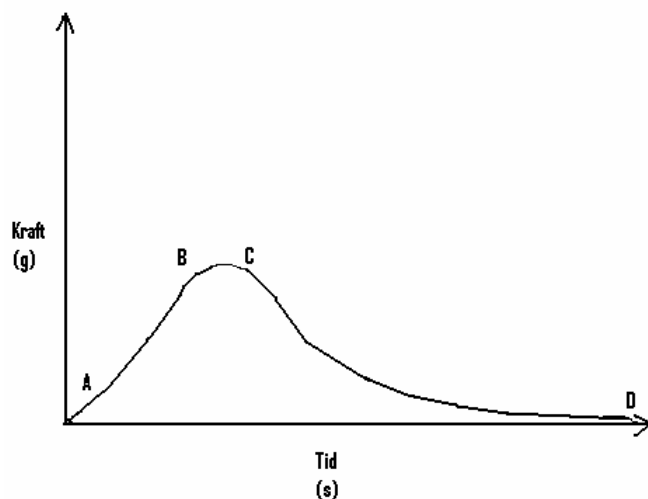
Testhastigheten på $0,1 \text{ mms}^{-1}$ er blitt foreslått tidligere [68, 69] når mucoadhesjon av faste formuleringer skulle måles med teksturmåler.

Det var ønskelig å holde hastigheten lav ettersom dette best vil gjenspeile en in – vivo situasjon, og vertikale krefter og bevegelser er sjeldne in – vivo [70].

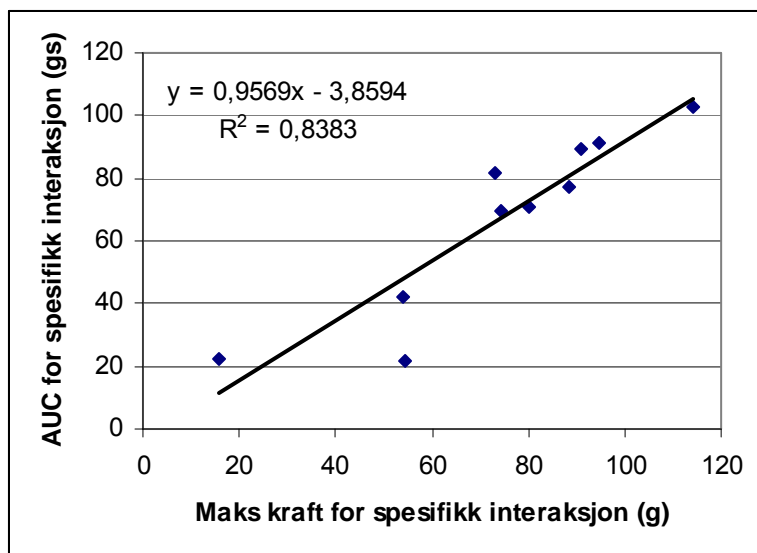
Hägerström og Edsman [70] kom fram til at kontakttiden ikke hadde signifikant innvirkning på bruddstyrken mellom polymere og mucin, og de konkluderte derfor med at kjedesammenfletning og sekundære kjemiske bindinger finner sted innen 2 minutter, som var den korteste kontakttiden. Dette gjelder for geler. For tørre formuleringer vil kontakttiden ha en større betydning [68, 69] og derfor ble en kontakttid på fem minutter undersøkt i innledende forsøk i 5.9.2. Kontakttiden hadde ingen signifikant effekt på AUC og maksimalkraften.

7.6.3 AUC og Maksimalskraften

Figur 45 viser et eksempel på variasjonen av kraften (g) som funksjon av tiden (s) ved bruk av teksturmåling. Under begynnelsen av målingen med teksturmåleren vil kraften først øke (avstanden AB), for så å nå et maksimum, plåtå (sekvensen BC). Punkt D vil kalles bruddpunktet [68]. Da er det ingen kontakt mellom underlaget og prøvene.



Figur 45: Variasjon av kraften som funksjon av tiden



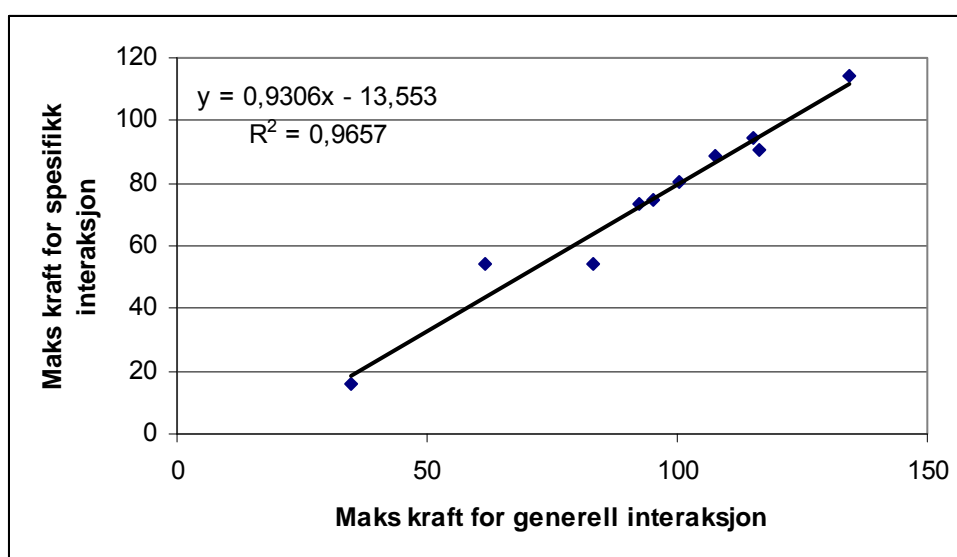
Figur 46: Korrelasjon mellom AUC for spesifikk interaksjon (M – B AUC) og Maks kraft for spesifikk interaksjon (M – B topp)

En korrelasjon mellom parametere i figur tyder på at begge parametere sier det samme om bruddstyrken. Både AUC og maksimal kraften kan derfor brukes for å beskrive mucoadhesjon.

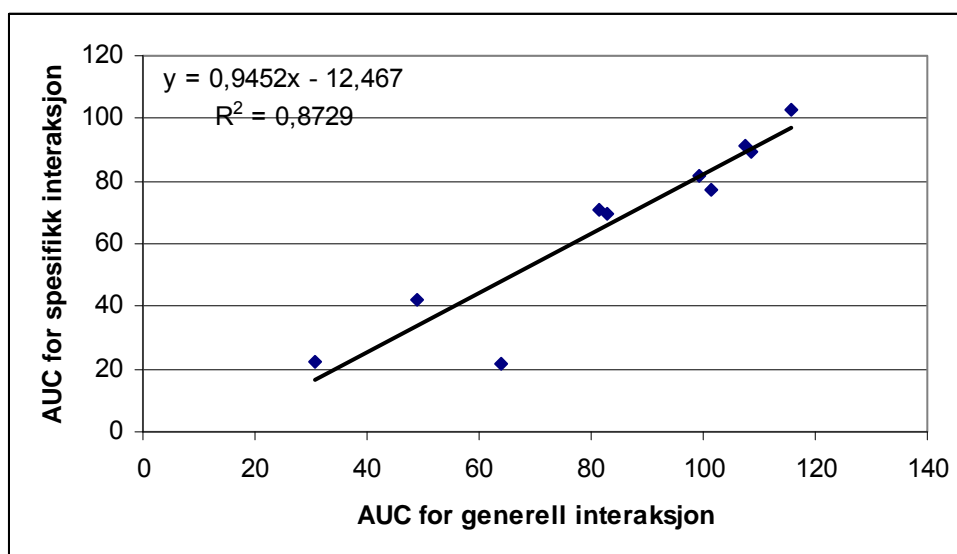
Verdiene som er brukt er AUC og maks kraft for spesifikk interaksjon mellom pektin og mucin. Også generelle verdier til AUC og maks kraft for prøvene vil kunne si det samme om mucoadhesjon. Grunnen til dette er en sterk korrelasjon mellom verdiene for generell og verdiene for spesifikk interaksjon se figur 47 og 48.

På figurene i avsnittet 6.7.2 kan det ses at gjennomsnittsverdiene for prøvene mot buffer er lave og veldig like for samtlige av prøvene. Dette er spesielt synlig på figur 28.

”Roterende sylinder” – metoden som er beskrevet i 5.10 vil ikke kunne skille mellom spesifikk og ikke – spesifikk mucoadhesjon.



Figur 47: Figuren viser en korrelasjon mellom generell og spesifikk interaksjon



Figur 48: Figuren viser en korrelasjon mellom generell og spesifikk interaksjon

Trekkes verdiene til filterpapir som blindprøven fra verdiene for spesifikk interaksjon til prøvene, vil ikke prøve 8, 15 og 16 ha mucoadhesive egenskaper ifølge teksturmålingene. Dette kan ses på grafene i vedlegg fra og med side 91 til og med side 92.

Dersom verdiene til probe som blindprøven trekkes fra verdiene for spesifikk interaksjon til prøvene, vil prøve 16 være den eneste prøven som ikke har mucoadhesive egenskaper ifølge teksturmålingene (se vedlegg fra og med side 93 til og med side 94).

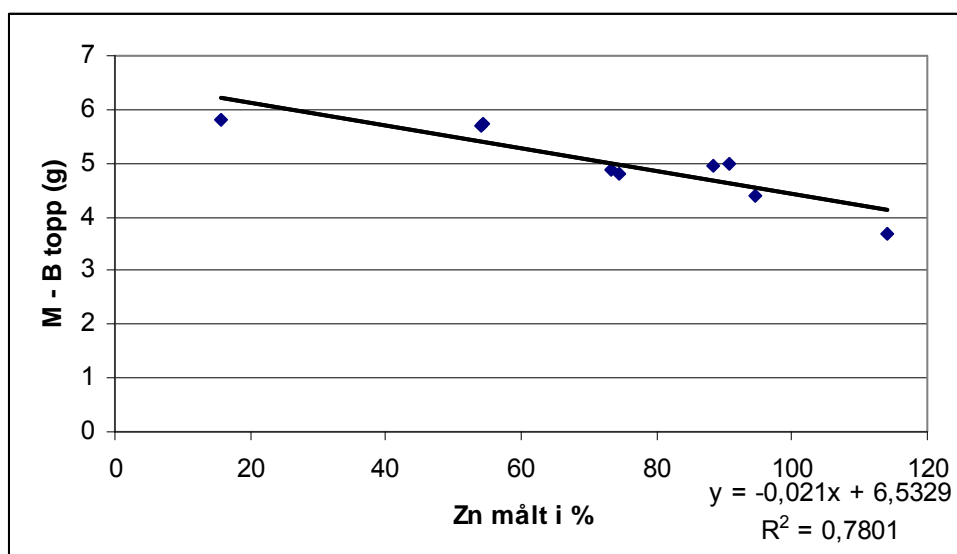
Ingen av blindprøvene er optimale. Dersom proben brukes som blindprøven, vil den gi altfor lite utslag på AUC og maksimumskraften ettersom overflaten til proben er veldig glatt.

Filterpapir vil derimot gi for mye utslag ettersom kapillærkreftene vil trekke mucinløsningen opp i filterpapiret.

7.6.4 Kryssbindingsgraden og mucoadhesjon

Det var forventet at sinkinnholdet vil ha påvirkning på målt mucoadhesjon. Saltypen er den eneste signifikante variabel for målt Zn i % (se 6.9.2). Sinkklorid vil da ha negativ effekt på målt Zn i %. I avsnittet 6.9.3 var det forklart at saltypen er den eneste signifikante faktoren til spesifikk mucoadhesjon (M – B topp). Her vil sinkklorid ha positiv effekt på M – B topp. Årsaken til målt mucoadhesjon med teksturmåler vil derfor skyldes graden av kryssbindingen, og dette kan ses i avsnitt 6.9.4.

Høyere sinkinnhold vil si at prøven har en høyere grad av kryssbinding og vil dermed ha en lavere verdi for spesifikk mucoadhesjon. Figur 49 viser det samme.



Figur 49: Korrelasjon mellom målt Zn – innhold og maksimumskraften for spesifikk interaksjon etter at prøve 10 er tatt ut.

Sammenlignet med resultatene i avsnittet 6.6.4 der det ikke var målt noen form for mucoadhesjon for pektinprøvene, ga teksturmålingene utslag på mucoadhesjon. Grunnen til at det her var observert utslag på mucoadhesjon kan kanskje skyldes fosfatbufferen. Fosfat vil kunne danne uløselige komplekser med sink [71]. Bourgeois med kollegaer [72] kom til en tilsvarende konklusjon. Da hadde kalsium ioner dannet et kalsium – fosfat kompleks og fremmet svekkelse av kryssbinding av pektin. Når kalsiumioner fjernes fra pektinmolekylene vil karboksylsyrergruppene være tilgjengelige for å danne hydrogenbindinger med mucinmolekylene. I tillegg vil mobiliteten til pektinmolekylet øke og dette vil fremme kjedesammenfletting mellom pektinmolekylene og mucinmolekylene. Prøve 9 hadde lavest sinkprosent, dermed lavest kryssbindingsgrad og hadde derfor som forventet høyest verdi på mucoadhesjon målt på teksturmåleren.

7.7 Bioadhesjon på tarmen

7.7.1 Hva sier bildene?

Bildene viser at biadhesjon til prøvene var høy. I forsøket som er utført var en rotasjonshastighet på 150 rpm (se forklaring i 6.8.1) brukt. Det er vanlig å bruke en mye lavere rotasjonshastighet, som vanligvis ligger på rundt 75 rpm [13]. Etter 10 minutter med en rotasjonshastighet på 150 rpm var det fortsatt observert at noe av prøvene var igjen på tarmen (se 6.8.2).

Reproduserbarheten til testen er dårlig og eventuelle forskjeller kan være tilfeldige.

Bioadhesjon kan skyldes ion – utveksling og utfelling av sink – fosfat [72]. Både ion – utveksling og utfelling av sink – fosfat vil kunne føre til frigjøring av sinkioner fra pektinmolekylene. Dette vil kunne føre til at frie karboksylsyre gruppene gjøres tilgjengelige for hydrogenbindinger, slik at mucoadhesjon fremmes. Samtidig vil mobiliteten til pektinmolekylene øke, slik at kjedesammenfletting mellom pektinmolekylene og mucinmolekylene lettes.

I tillegg er dette den eneste testen utført under en forhøyet temperatur (37 °C). Pektin sveller lettere under høyere temperatur og dette vil fremme videre ion – utveksling og mobiliteten til pektinmolekylene.

En annen årsak til at bioadhesiviteten til prøvene kan være tilstedeværelsen av mikrovilli i tynntarmen. Dermed vil mikropartikler lettere kunne feste seg til tarmbiten, og forbli der uten å bli skylt vekk av hydrodynamiske krefter.

8 Konklusjon

Testene på teksturmåleren viste at innhold av sink var negativt korrelert med mucohesive egenskaper til prøver. Prøve 9 som inneholdt lavest mengde sink hadde høyest verdi for AUC og maksimumskraft.

PLS 1 analyse på designfaktorer som variable (X) og M – B topp som responsen (Y) viste at det kun var en signifikant variabel, og det var saltpyen. Prøvene med sinkacetat hadde lavest M – B topp.

PLS 1 analyse på designfaktorer som variable (X) og sinkinnhold målt i % som responsen (Y) viste også kun saltpyen som signifikant variabel. Prøvene med sinkacetat hadde høyest innhold av Zn.

Sannsynligvis skyldes økt sinkinnhold i prøvene kryssbundet med sinkacetat den høye temperaturen som ble brukt under forsøket.

Forskjellen på størrelsen på prøvene var liten. Dette ble bekreftet av bildene tatt med lysmikroskopet, av SEM bildene og av størrelsesmålinger med Lasentec®.

SEM bildene ga best beskrivelse av prøvene.

Mikropartikler som ikke var kryssbundet var ifølge bildene rundere i formen og de hadde en større diameter sammenlignet med mikropartiklene som var kryssbundet med sink.

Prøver med amidert pektin var rundere i formen og hadde et mer uniformt utseende sammenlignet med prøver med ikke – amidert pektin.

Prøvene utviste gode mucoadhesive egenskaper ved bruk av ”roterende sylinder” – metoden, og av metodene som er undersøkt er det denne metoden som best vil kunne etterligne en ”in – vivo” situasjon.

Store forskjeller i mucoadhesjon og størrelse mellom prøver med amidert pektin og ikke – amidert pektin ble ikke observert.

9 Referanseliste

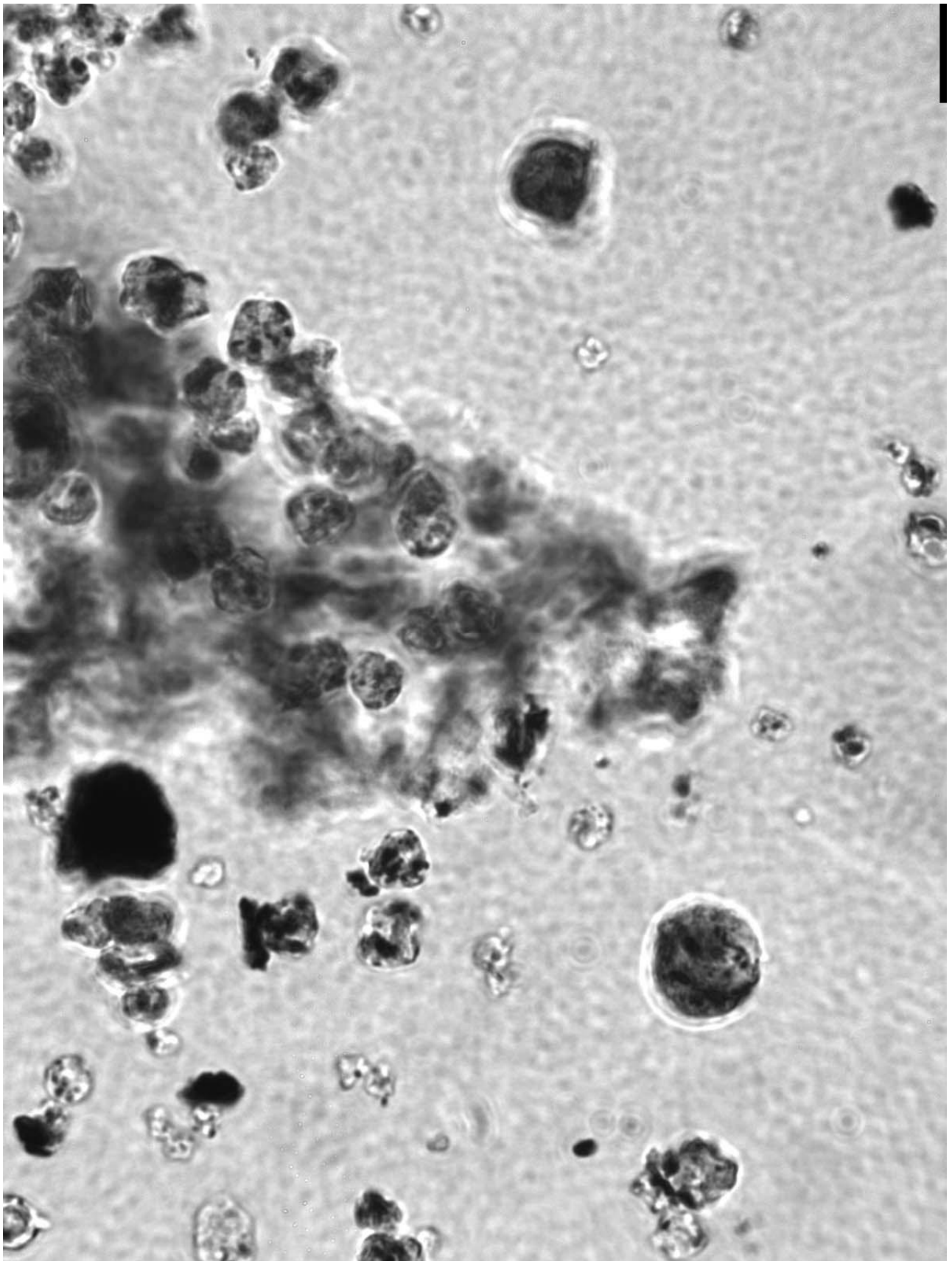
1. Haug, E., O. Sand, and Ø.V. Sjaastad, *Fordøyelsessystemet*, in *Menneskets Fysiologi*. 1992, Universitetsforlaget AS: Oslo. p. 372 - 409.
2. Friend, D.R., *Colon-Specific Drug Delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991. **7**(1): p. 149-199.
3. Ashford, M., *The gastrointestinal tract - physiology and drug absorption*, in *Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design*, M.E. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Edinburgh. p. 217 - 233.
4. Vandamme, T.F., et al., *The use of polysaccharides to target drugs to the colon*. *Carbohydrate Polymers*, 2002. **48**(3): p. 219-231.
5. Patel, M.M., et al., *Mucin/poly(acrylic acid) interactions: A spectroscopic investigation of mucoadhesion*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(5): p. 1184-1190.
6. Hong, Z.N., et al., *Atomic force microscopy reveals aggregation of gastric mucin at low pH*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(6): p. 3458-3466.
7. Liu, L.S., et al., *Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues*. *Biomaterials*, 2005. **26**(29): p. 5907-5916.
8. Tur, K.M. and H.S. Ch'ng, *Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. **160**(1): p. 61-74.
9. Peppas, N.A. and P.A. Buri, *Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues*. *Journal of Controlled Release*, 1985. **2**: p. 257-75.
10. Vasir, J.K., K. Tambwekar, and S. Garg, *Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003. **255**(1-2): p. 13-32.
11. Gu, J.M., J.R. Robinson, and S.H.S. Leung, *Binding of Acrylic Polymers to Mucin Epithelial Surfaces - Structure-Property Relationships*. *Crc Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1988. **5**(1): p. 21-67.
12. Duchene, D. and G. Ponchel, *Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how?* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1997. **44**(1): p. 15-23.
13. Werle, M., et al., *Analytical methods for the characterisation of multifunctional polymers for oral drug delivery*. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2007. **3**(2): p. 111-116.
14. Mortazavi, S.A. and J.D. Smart, *An Investigation of Some Factors Influencing the in-Vitro Assessment of Mucoadhesion*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995. **116**(2): p. 223-230.
15. Dhawan, S., A.K. Singla, and V.R. Sinha, *Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods*. *Aaps Pharmscitech*, 2004. **5**(4).
16. Lehr, C.M., et al., *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992. **78**(1): p. 43-8.
17. Chickering, D.E. and E. Mathiowitz, *Definitions, mechanisms and theories of bioadhesion*, in *Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches and development*. 1999, Marcel Dekker: New York. p. 1-10.
18. Geraghty, P.B., et al., *An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels*. *Biomaterials*, 1997. **18**(1): p. 63-67.
19. Jabbari, E., N. Wisniewski, and N.A. Peppas, *Evidence of Mucoadhesion by Chain Interpenetration at a Poly(Acrylic Acid) Mucin Interface Using Atr-Ftir Spectroscopy*. *Journal of Controlled Release*, 1993. **26**(2): p. 99-108.

20. Chickering, D.E., J.S. Jacob, and E. Mathiowitz, *Bioadhesive Microspheres .2. Characterization and Evaluation of Bioadhesion Involving Hard, Bioerodible Polymers and Soft-Tissue*. Reactive Polymers, 1995. **25**(2-3): p. 189-206.
21. Mortazavi, S.A. and J.D. Smart, *An Investigation into the Role of Water-Movement and Mucus Gel Dehydration in Mucoadhesion*. Journal of Controlled Release, 1993. **25**(3): p. 197-203.
22. Tamburic, S. and D.Q.M. Craig, *A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. **44**(2): p. 159-167.
23. Thirawong, N., et al., *Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **67**(1): p. 132-140.
24. Van Buren, J.P., *Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness*, in *The Chemistry and Technology of Pectin*, R.H. Walter, Editor. 1991, Academic Press: San Diego. p. 1-18.
25. Liu, L.S., et al., *Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route*. Biomaterials, 2003. **24**(19): p. 3333-3343.
26. Kosaraju, S.L., *Colon targeted delivery systems: Review of polysaccharides for encapsulation and delivery*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(4): p. 251-258.
27. Chourasia, M.K. and S.K. Jain, *Polysaccharides for colon targeted drug delivery*. Drug Delivery, 2004. **11**(2): p. 129-148.
28. Oakenfull, D.G., *The Chemistry of High-Methoxyl Pectins*, in *The Chemistry and Technology of Pectin*, R.H. Walter, Editor. 1991, Academic Press: San Diego. p. 87-93.
29. Thakur, B.R., R.K. Singh, and A.K. Handa, *Chemistry and uses of Pectin A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997. **37**(1): p. 47-73.
30. Axelos, M.A.V. and J.-F. Thibault, *The Chemistry of Low - Methoxyl Pectin Gelation*, in *The Chemistry and Technology of Pectin*, R.H. Walter, Editor. 1991, Academic Press: San Diego. p. 109 - 117.
31. Florence, A.T. and D. Attwood, *Natural gums and mucilages*, in *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 1998, Macmillan Press: London. p. 335-337.
32. Ralet, M.C., et al., *Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties*. Carbohydrate Research, 2001. **336**(2): p. 117-125.
33. Sakai, T., et al., *Pectin, Pectinase, and Protopectinase - Production, Properties, and Applications*. Advances in Applied Microbiology, 1993. **39**: p. 213-294.
34. Ashford, M., et al., *An Evaluation of Pectin as a Carrier for Drug Targeting to the Colon*. Journal of Controlled Release, 1993. **26**(3): p. 213-220.
35. Grant, G.T., et al., *Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations - Egg-Box Model*. Febs Letters, 1973. **32**(1): p. 195-198.
36. Braccini, I. and S. Perez, *Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited*. Biomacromolecules, 2001. **2**(4): p. 1089-1096.
37. Pillay, V., et al., *Novel modulation of drug delivery using binary zinc-alginate-pectinate polyspheres for zero-order kinetics over several days: Experimental design strategy to elucidate the crosslinking mechanism*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005. **31**(2): p. 191-207.
38. Ei-Gibaly, I., *Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **232**(1-2): p. 199-211.

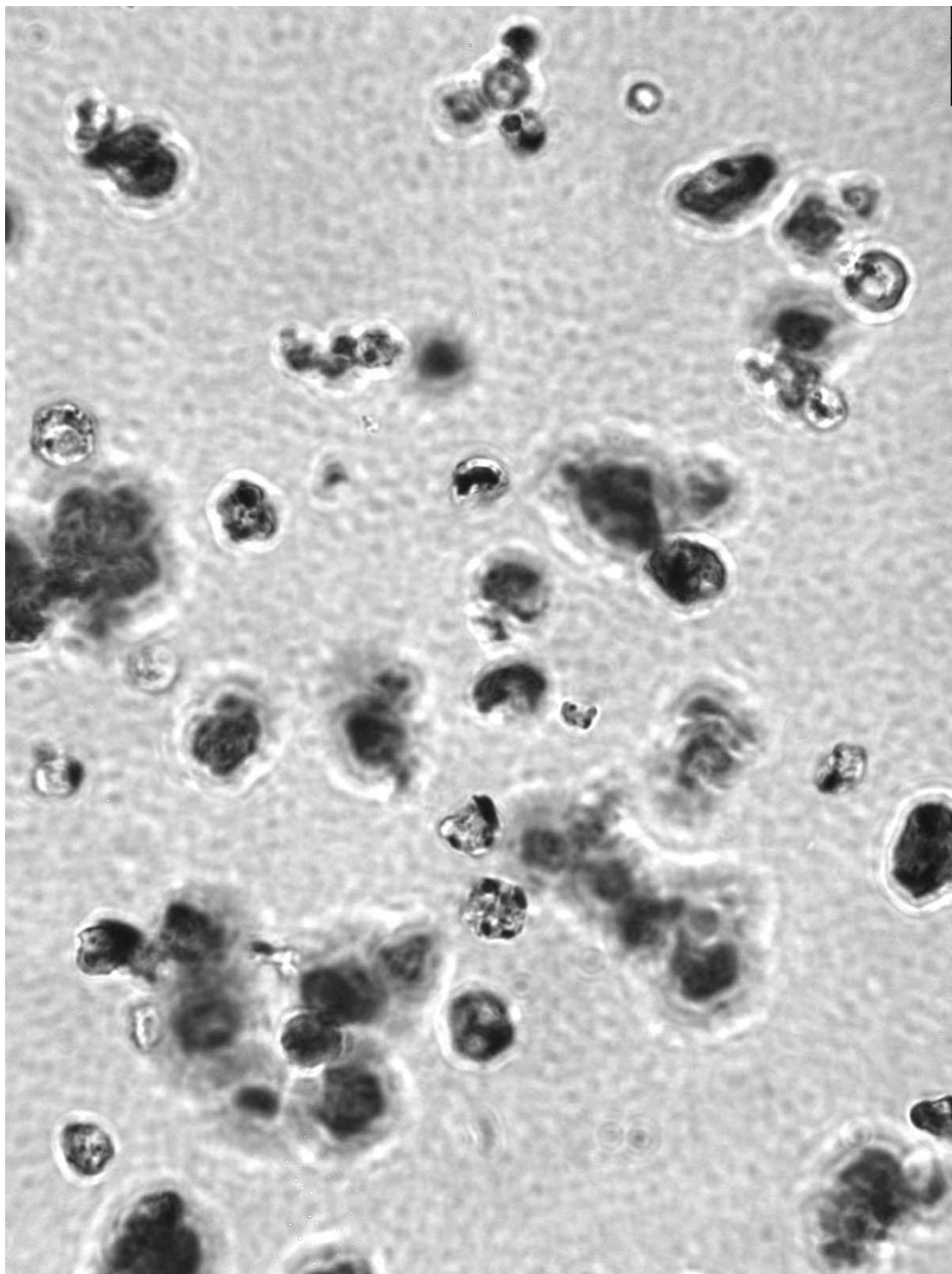
39. Aulton, M.E., *Drying*, in *Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design*, M.E. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Edinburgh. p. 389 - 390.
40. Elversson, J., et al., *Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **92**(4): p. 900-910.
41. Elversson, J. and A. Millqvist-Fureby, *Particle size and density in spray drying - Effects of carbohydrate properties*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005. **94**(9): p. 2049-2060.
42. Lee, C.M., et al., *Pectin microspheres for oral colon delivery: Preparation using spray drying method and in vitro release of indomethacin*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2004. **9**(3): p. 191-195.
43. Giunchedi, P., et al., *Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999. **9**(1): p. 1-7.
44. Orhan, Z., et al., *The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres - Their evaluation in an animal osteomyelitis model*. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 2006. **88B**(2): p. 270-275.
45. Lasentec. *FRBM detailed principle*. [cited 2007 07.11.]; Available from: http://www.psprozesstechnik.ch/Englisch/PARTICLE/LASENTEC_E/lasentec_fbrm_prinzipel.htm
46. Staniforth, J., *Particle-size analysis*, in *Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design*, M.E. Aulton, Editor. 2002, Churchill Livingstone: Edinburgh. p. 152-165.
47. Moor, D.S. and G.P. McCabe, *Describing Distributions with Numbers*, in *Introduction to the Practice of Statistics*. 1999, W. H. Freeman and Company. p. 41-57.
48. Moor, D.S. and G.P. McCabe, *The Normal Distributions*, in *Introduction to the Practice of Statistics*. 1999, W. H. Freeman and Company. p. 66-70.
49. Esbensen, K.H., *Introduction to Experimental Design*, in *Multivariate Data Analysis - in practice*. 1994, CAMO Process: Oslo. p. 361-446.
50. Thelin, B., *Försöksplanering och optimering för experimentalisten*, in *Anvendelse av kjemometri innen forskning og industri*, R. Nordvedt, et al., Editors. 1996, Tidsskriftforlaget Kjemi: Oslo. p. 81-105.
51. Esbensen, K.H., *Principal Component Analysis (PCA) - Introduction*, in *Multivariate Data Analysis - in practice*. 1994, CAMO Process: Oslo. p. 19-65.
52. Esbensen, K.H., *Multivariat Calibration (PCR/PLS)*, in *Multivariate Data Analysis - in practice*. 1994, CAMO Process: Oslo. p. 115-144.
53. Hagesaether, E., R. Bye, and S.A. Sande, *Ex vivo mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007.
54. Hassan, E.E. and J.M. Gallo, *A Simple Rheological Method for the Invitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength*. *Pharmaceutical Research*, 1990. **7**(5): p. 491-495.
55. He, P., S.S. Davis, and L. Illum, *In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. **166**(1): p. 75-88.
56. Hejazi, R. and M. Amiji, *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **89**(2): p. 151-165.
57. Bredenberg, S. and C. Nystrom, *In-vitro evaluation of bioadhesion in particulate systems and possible improvement using interactive mixtures*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2003. **55**(2): p. 169-177.
58. LabPlant, *LabPlant Quality, Safety & Innovation*. 2003.

59. Monsoor, M.A., *Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin*. Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(3): p. 362-367.
60. Pillay, V. and R. Fassihi, *In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract - I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(2): p. 229-242.
61. Aslani, P. and R.A. Kennedy, *Studies on diffusion in alginate gels .1. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen*. Journal of Controlled Release, 1996. **42**(1): p. 75-82.
62. Lootens, D., et al., *Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin*. Food Hydrocolloids, 2003. **17**(3): p. 237-244.
63. Tho, I., S.A. Sande, and P. Kleinebudde, *Cross-linking of amidated low-methoxylated pectin with calcium during extrusion/spheronisation: Effect on particle size and shape*. Chemical Engineering Science, 2005. **60**(14): p. 3899-3907.
64. Sriamornsak, P., *Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **8**(3): p. 221-227.
65. Pillay, V. and R. Fassihi, *In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract - II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(2): p. 243-256.
66. Xu, C., et al., *Calcium pectinate capsules for colon-specific drug delivery*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005. **31**(2): p. 127-134.
67. Nordby, M.H., et al., *Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. Rheology*. Biomacromolecules, 2003. **4**(2): p. 337-343.
68. Ponchel, G., et al., *Bioadhesive analysis of controlled-release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems*. Journal of Controlled Release, 1987. **5**(2): p. 129-41.
69. Tobyn, M.J., J.R. Johnson, and P.W. Dettmar, *Factors Affecting in-Vitro Gastric Mucoadhesion .1. Test Conditions and Instrumental Parameters*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1995. **41**(4): p. 235-241.
70. Hagerstrom, H. and K. Edsman, *Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001. **53**(12): p. 1589-1599.
71. Reinhold, J.G., et al., *Decreased Absorption of Calcium, Magnesium, Zinc and Phosphorus by Humans Due to Increased Fiber and Phosphorus Consumption as Wheat Bread*. Journal of Nutrition, 1976. **106**(4): p. 493-503.
72. Bourgeois, S., et al., *In vitro and in vivo evaluation of pectin beads for the colon delivery of beta-lactamases*. Journal of Drug Targeting, 2005. **13**(5): p. 277-284.

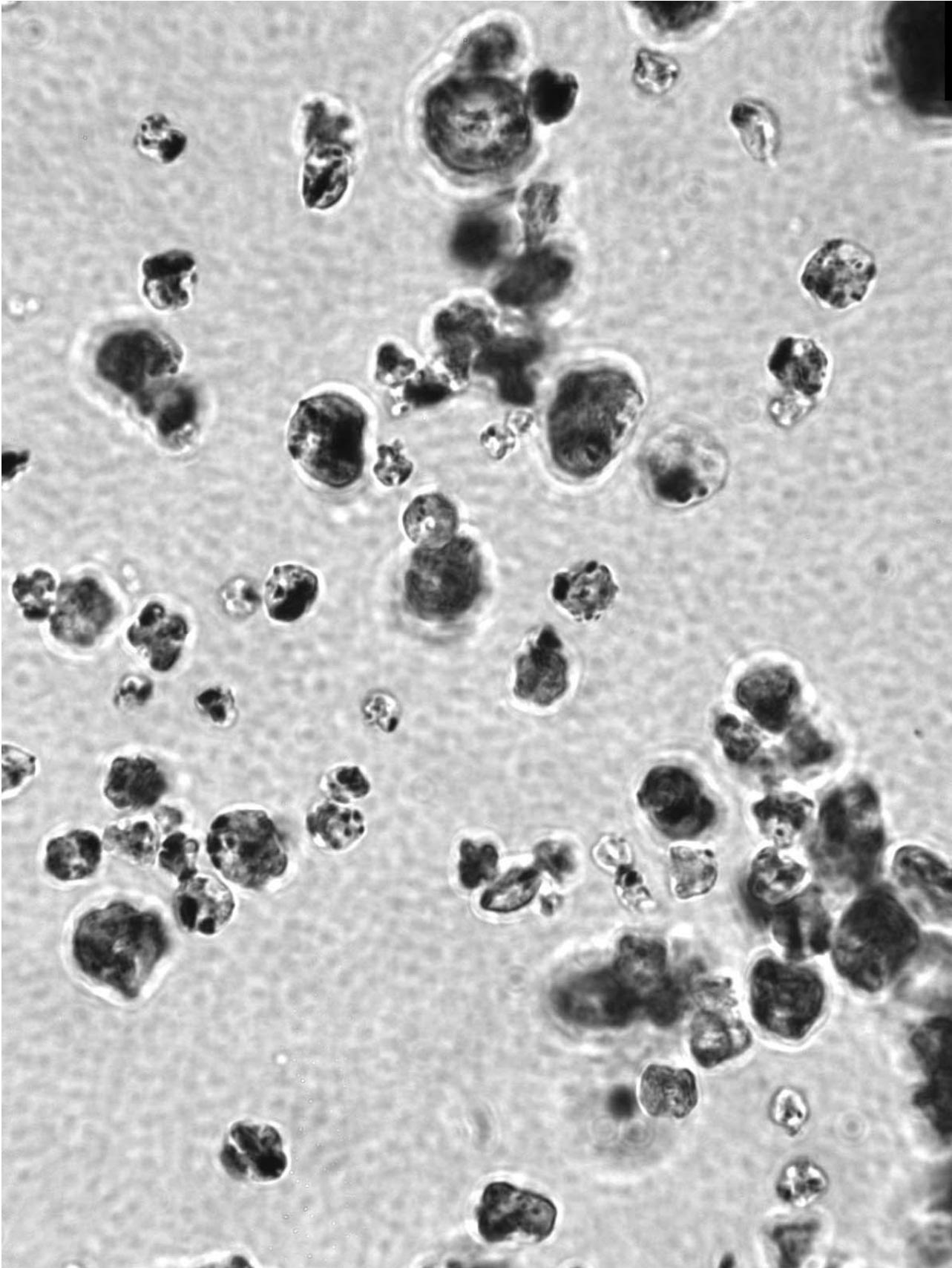
10 Vedlegg



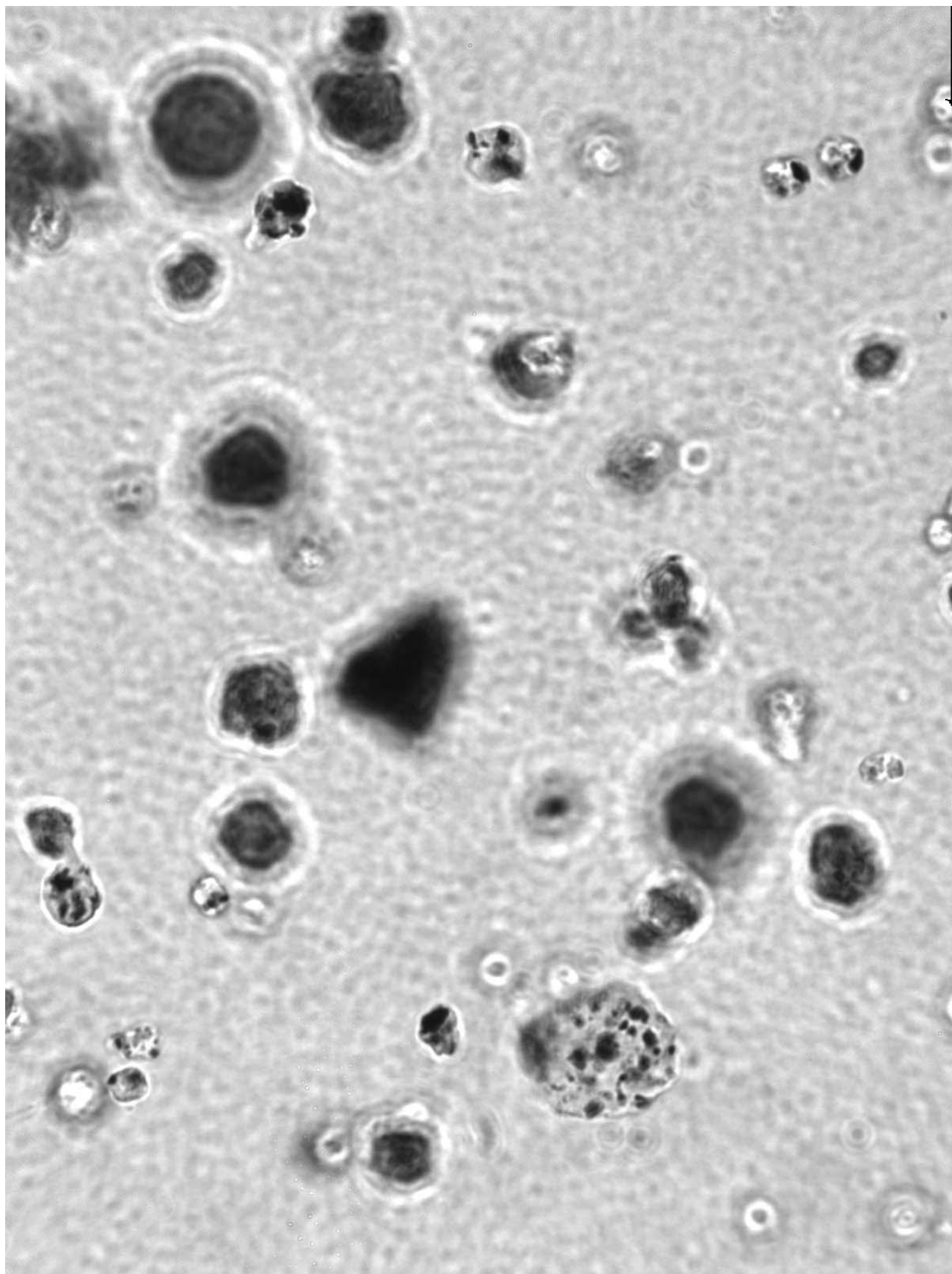
Prøve 2 10µm = _____



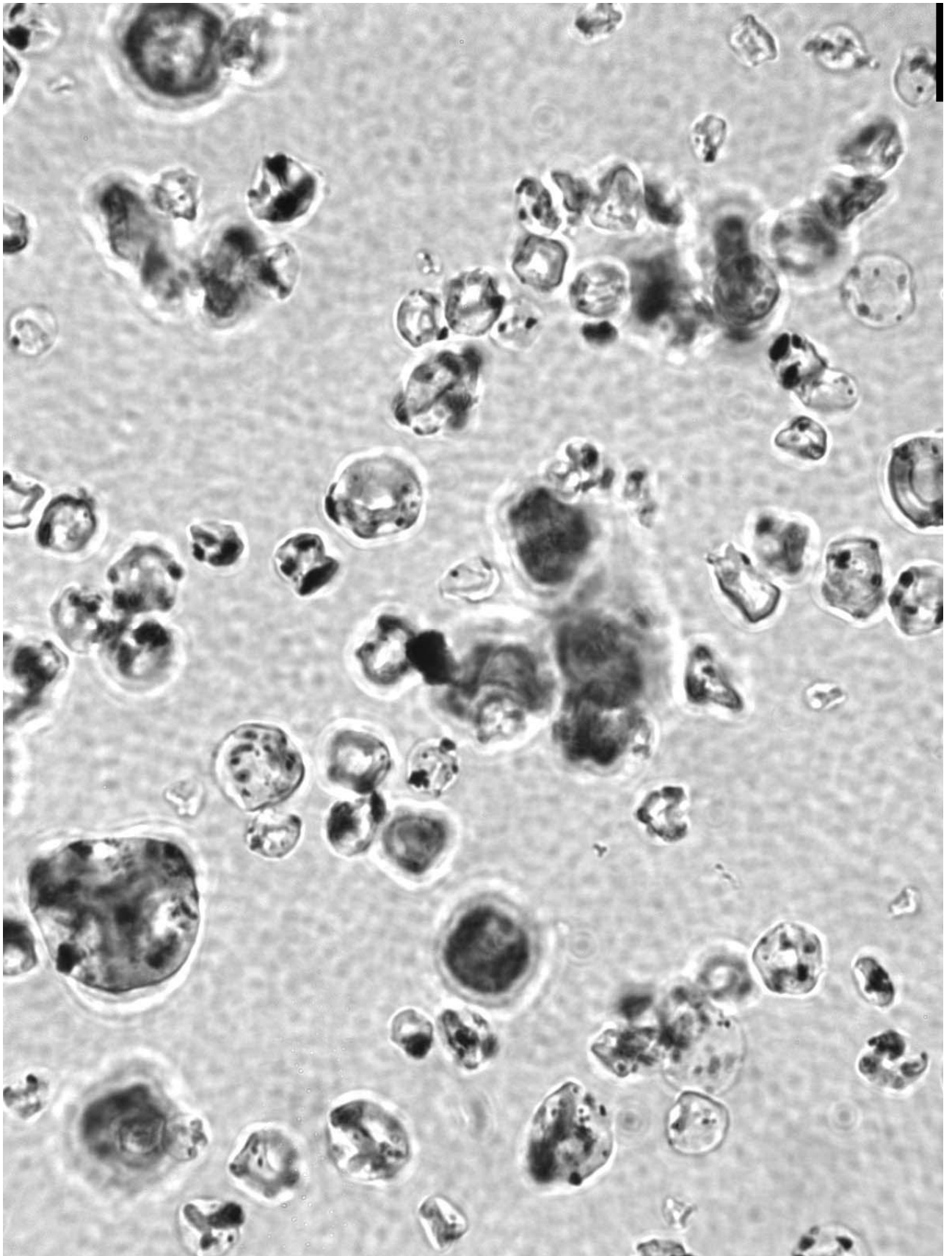
Prøve 3 10 μ m = _____



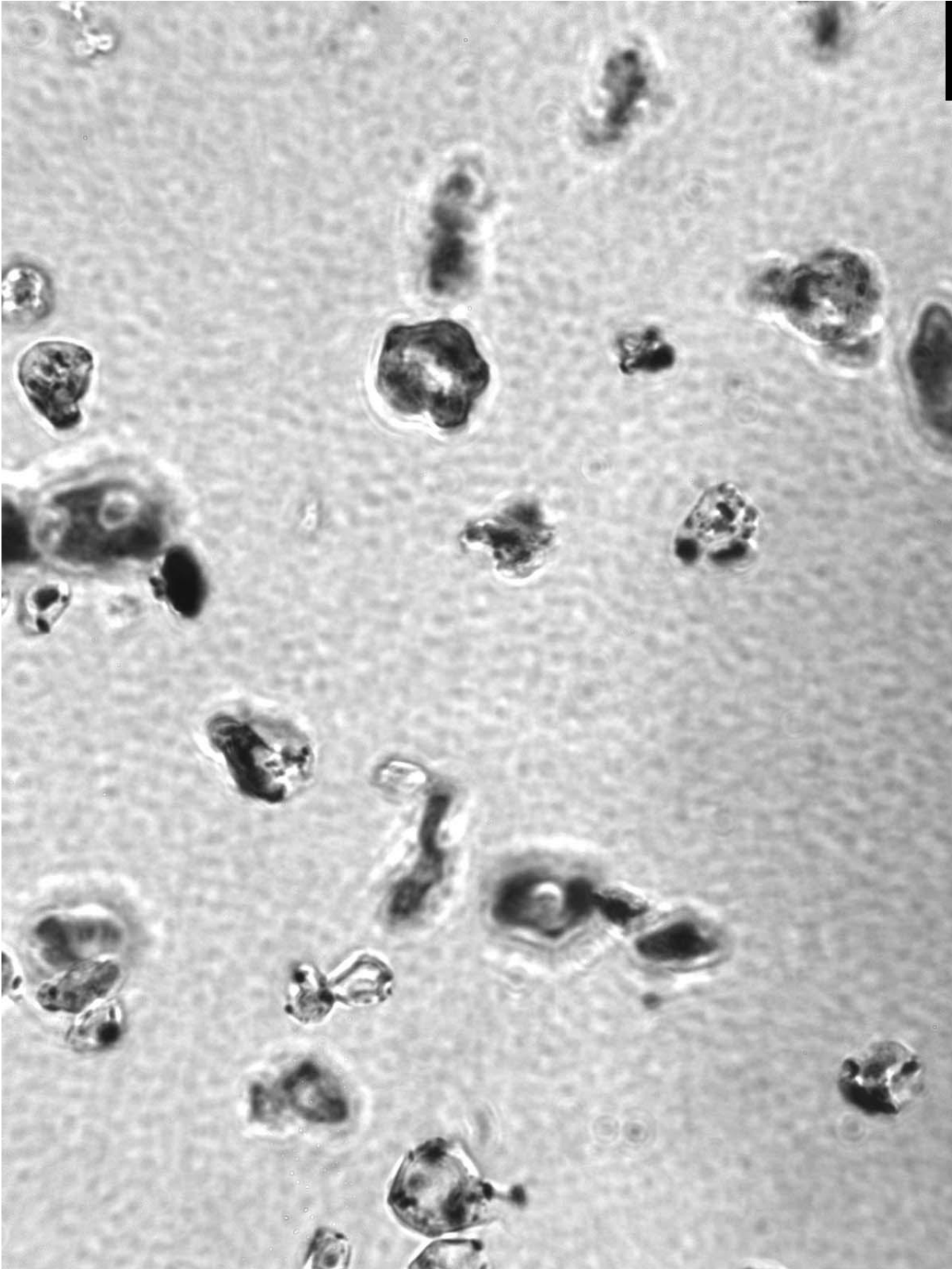
Prøve 4 10µm = _____



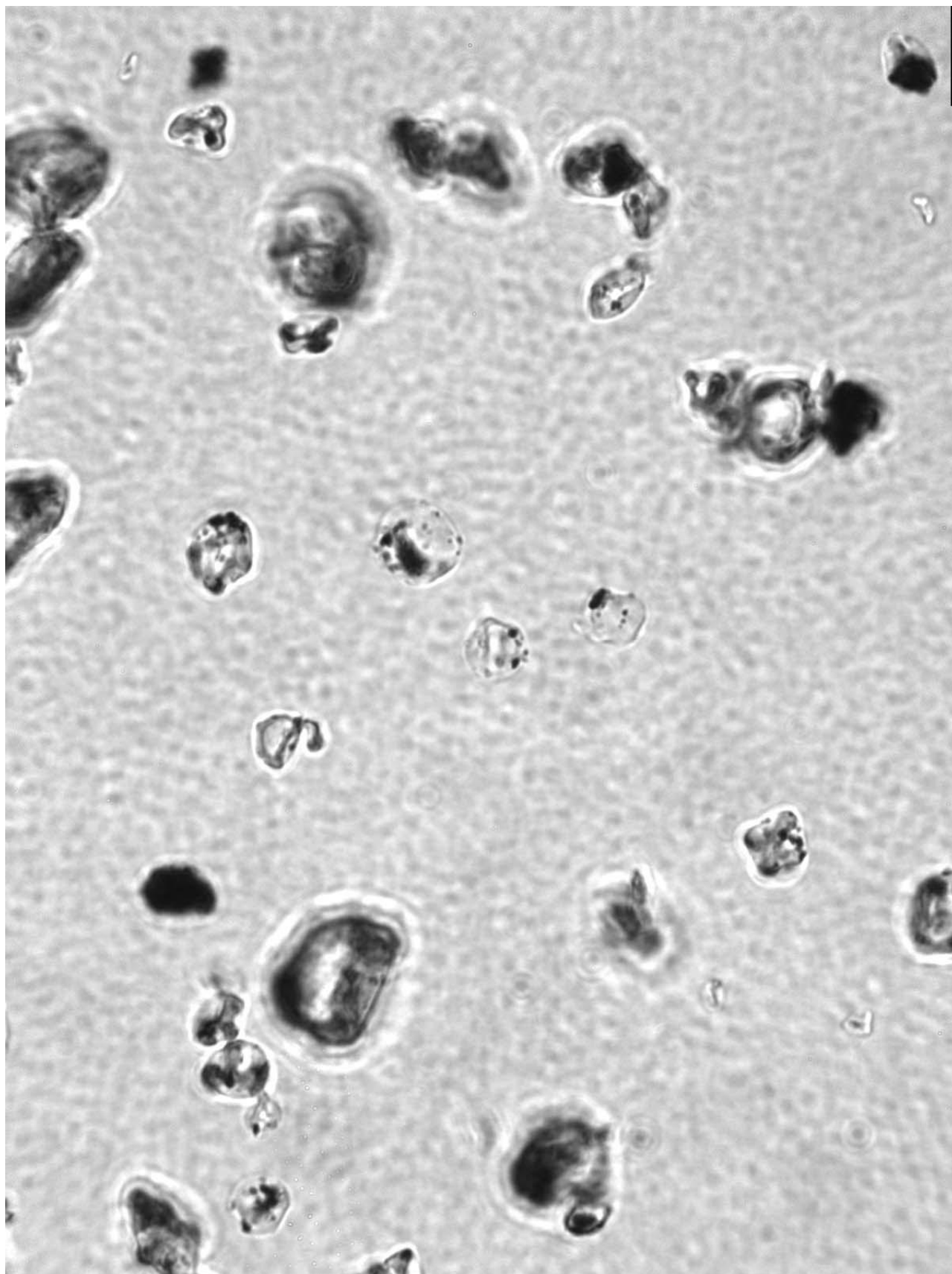
Prøve 8 10 μ m = _____



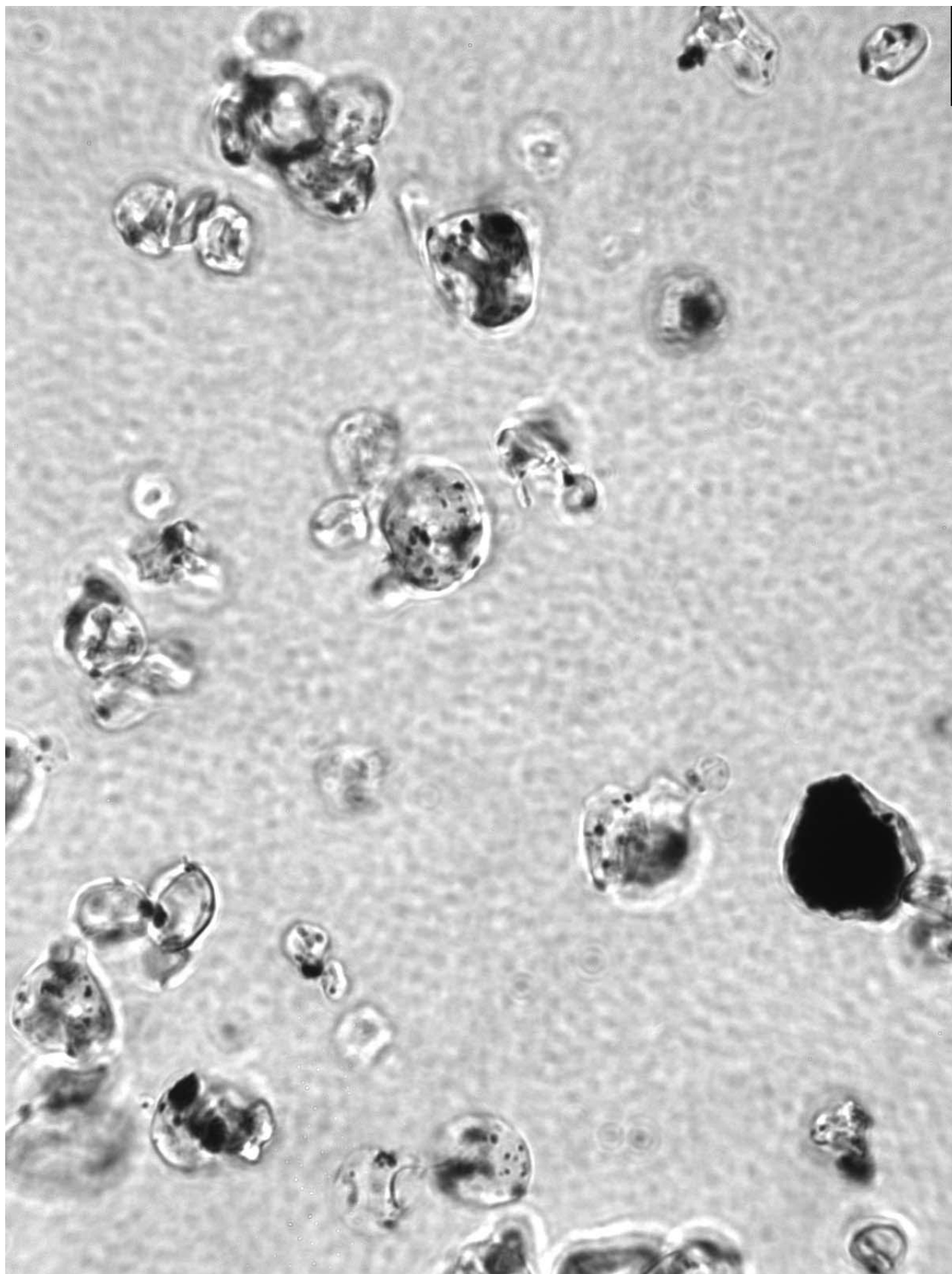
Prøve 9 10 μ m = _____



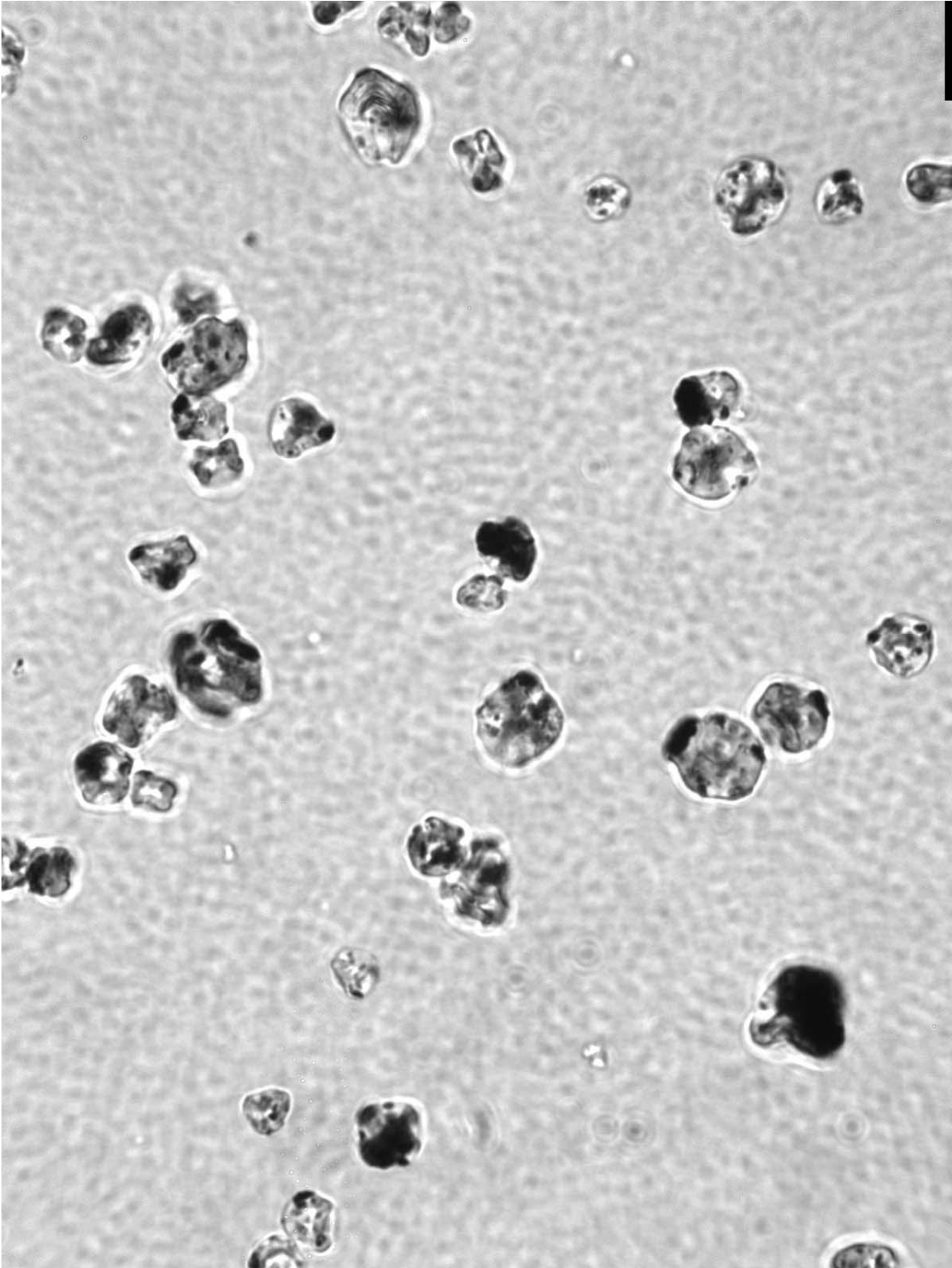
Prøve 10 10µm = _____



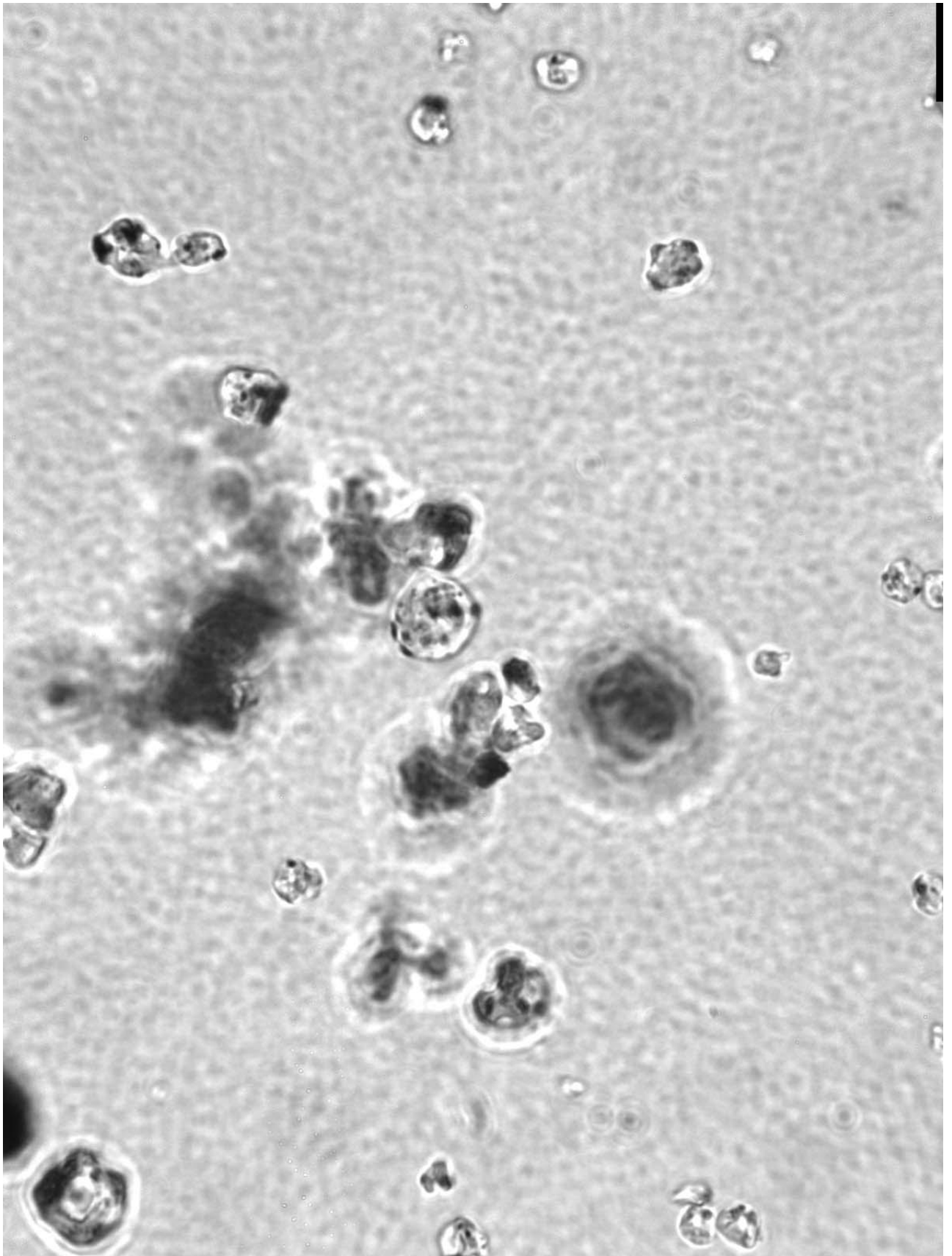
Prøve 11 10 μ m = _____



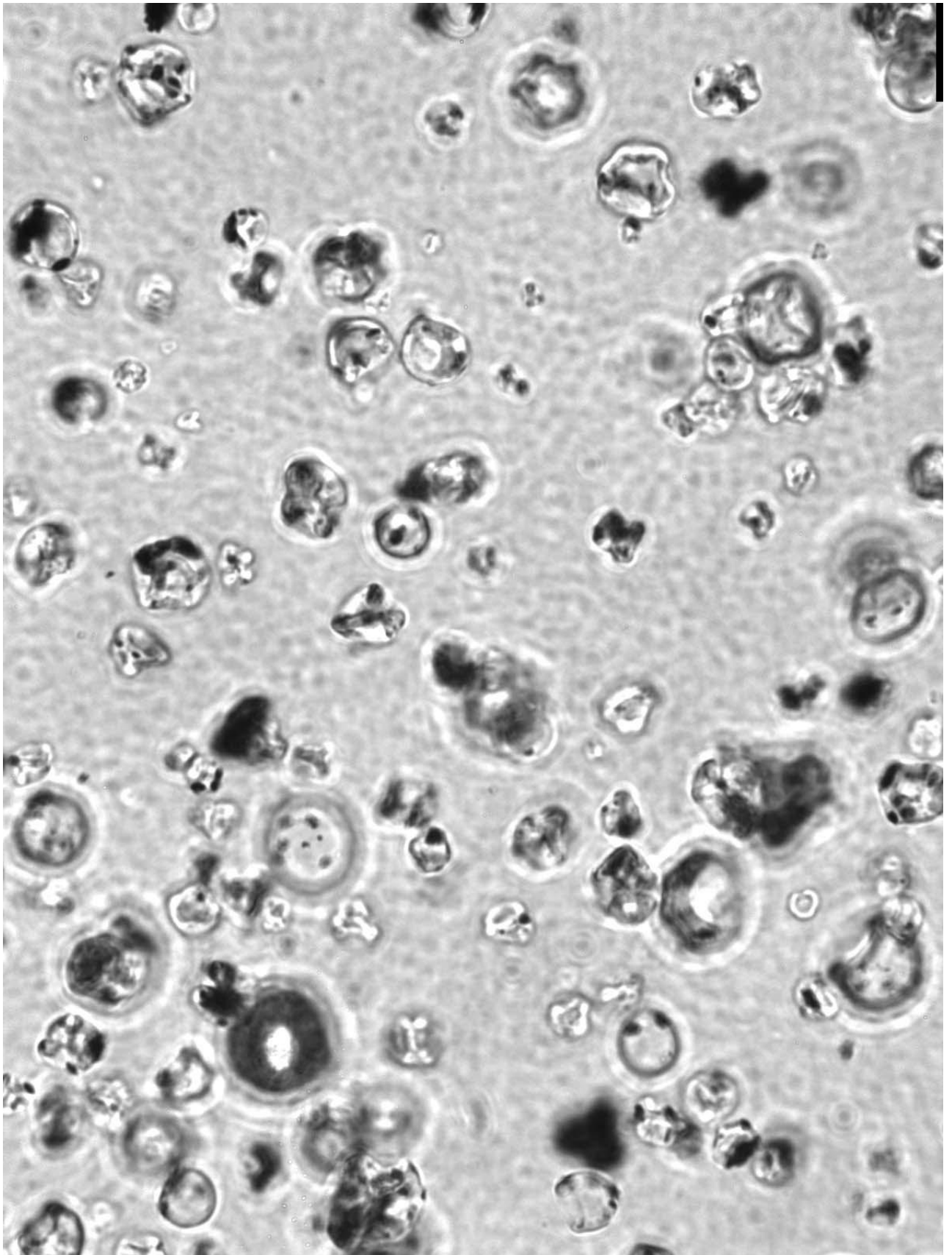
Prøve 12 10 μ m = _____



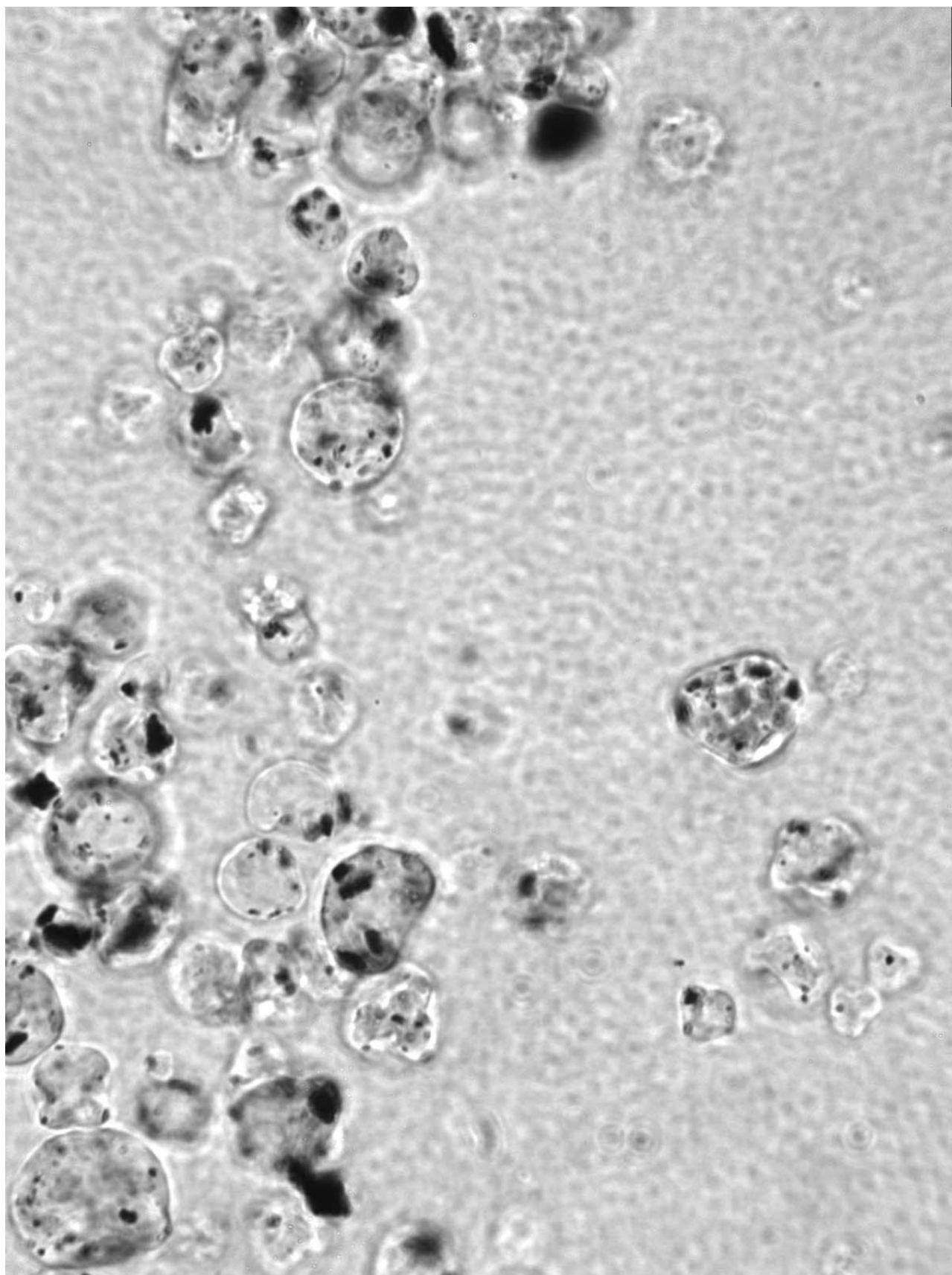
Prøve 15 10µm = _____



Prøve 16 10 μ m = _____



Spraytørket DA 20/DM 29 med indigo 10 μ m = _____

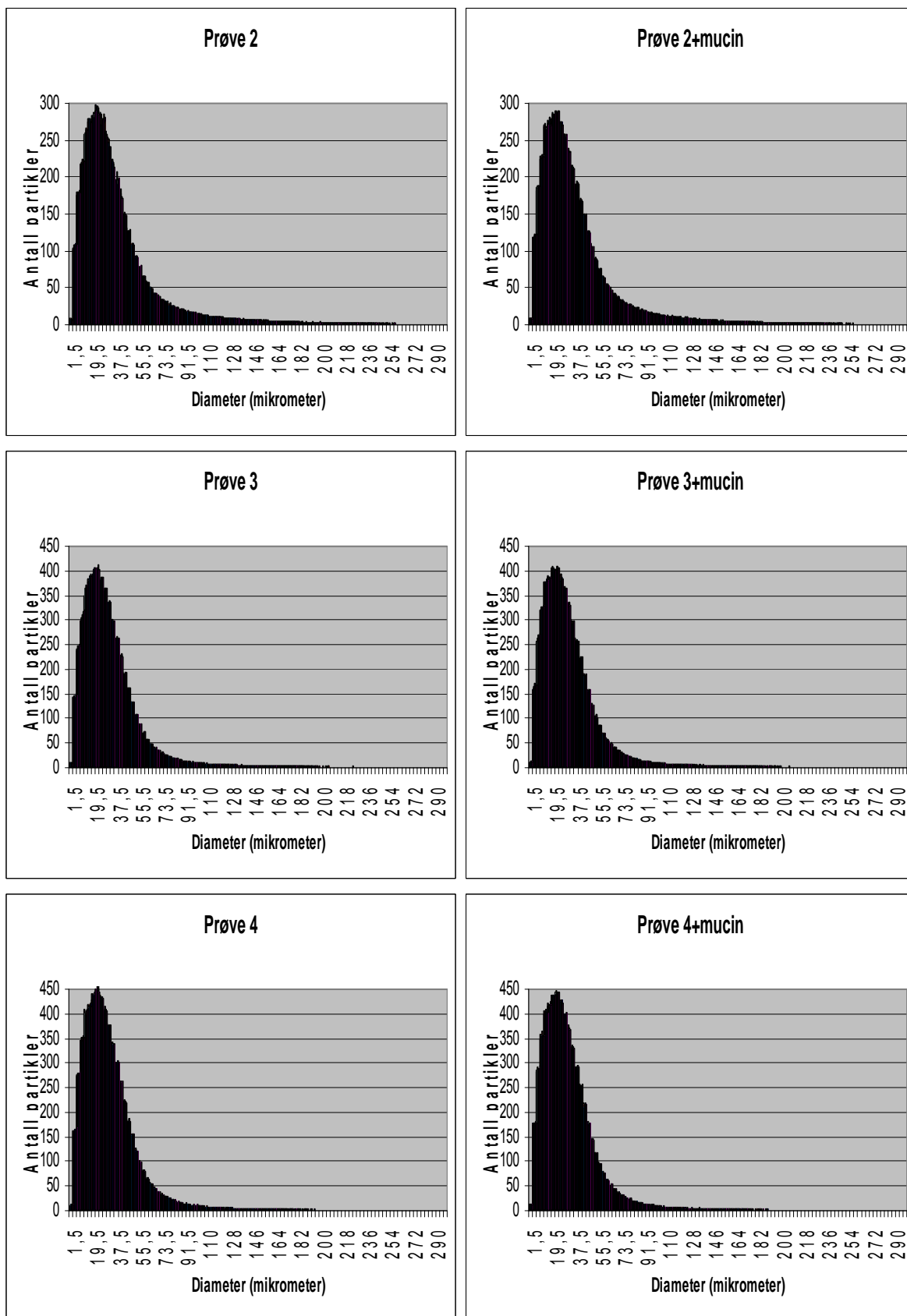


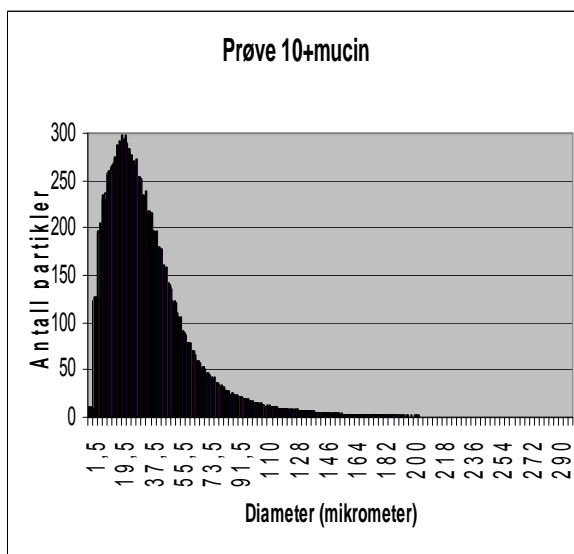
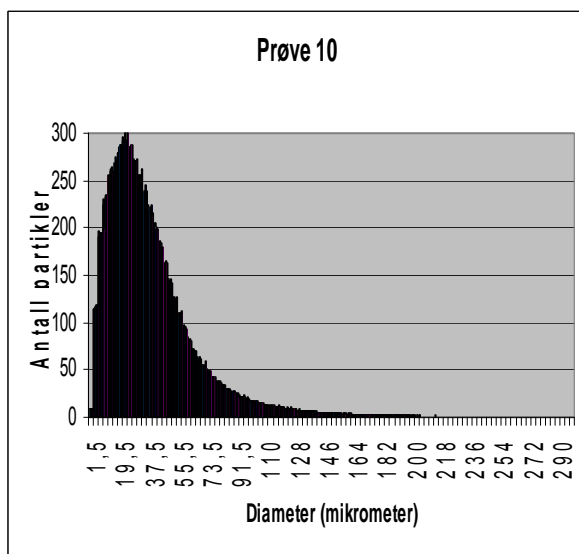
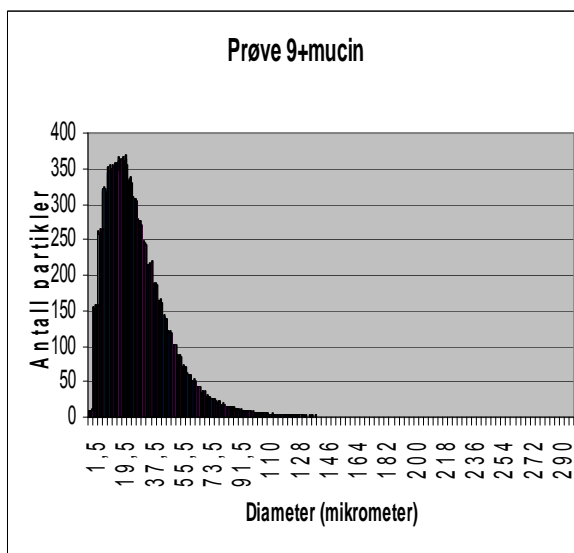
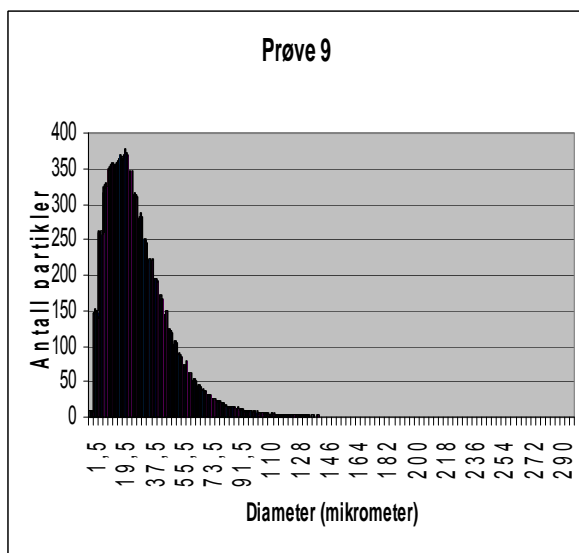
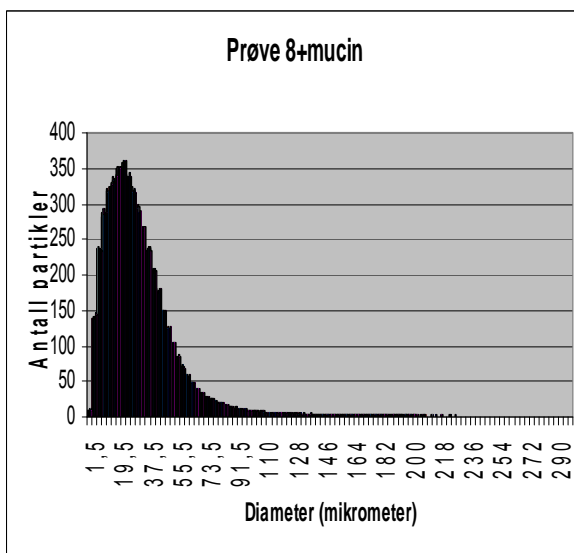
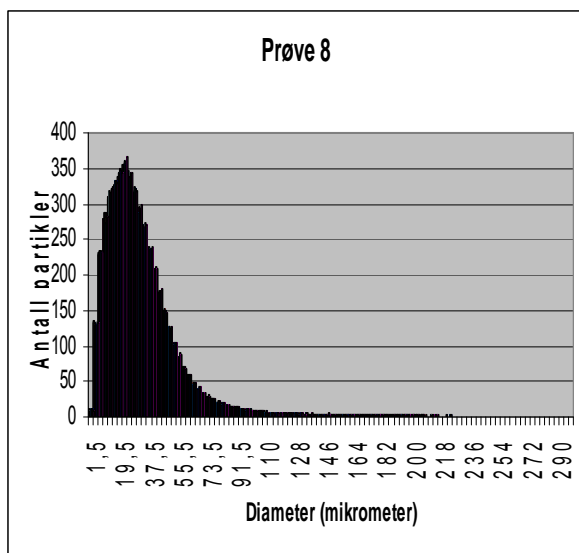
Spraytørket DM 36 med indigo 10 μ m = _____

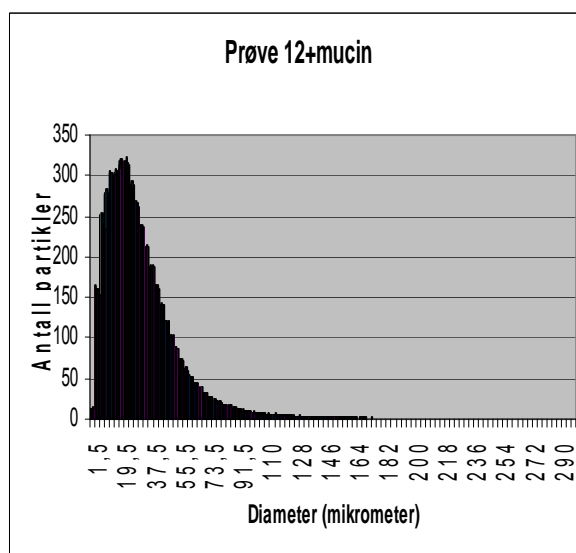
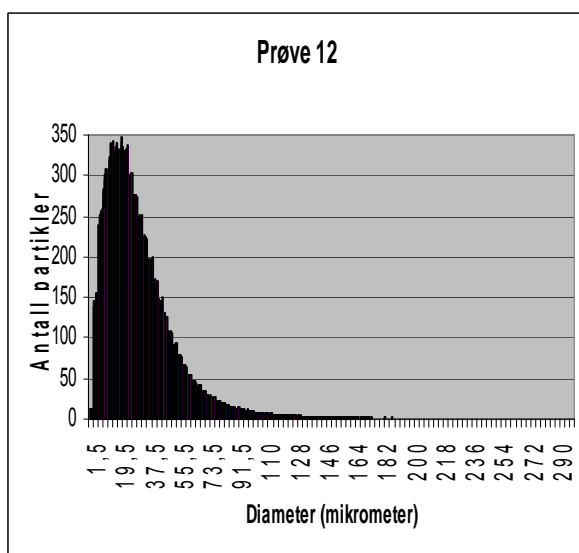
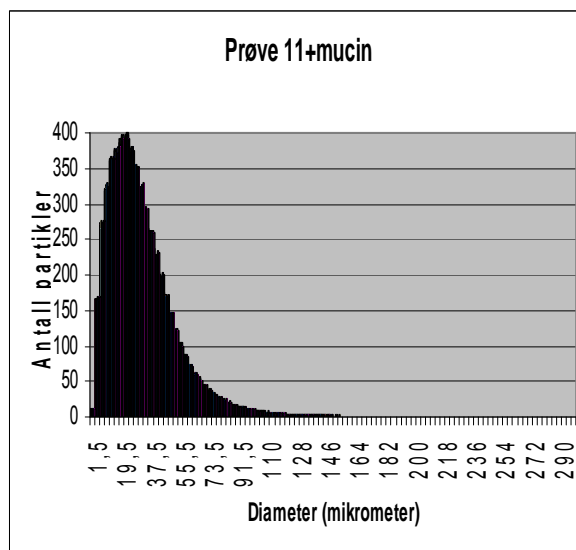
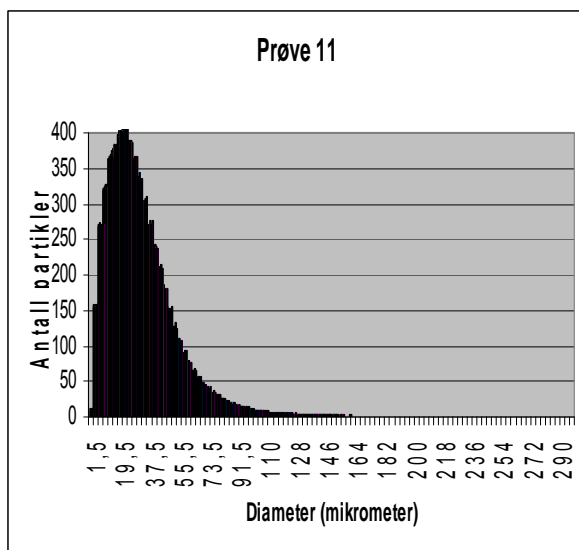
Størrelsesparametere (gjennomsnittsverdier) for kryssbundet pektin etter tilsetning av musinløsning fra 6.6.4

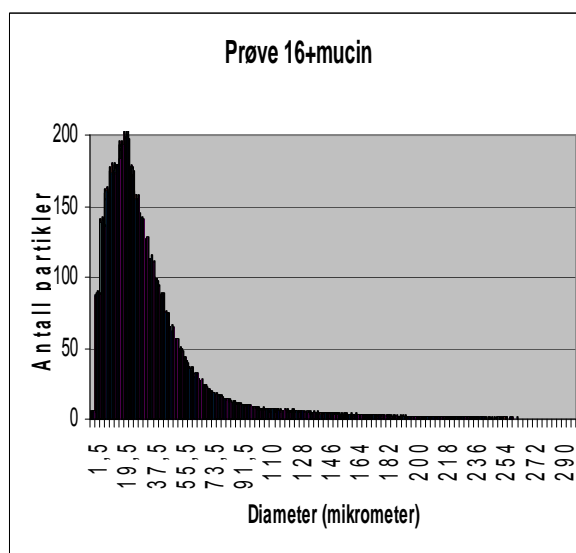
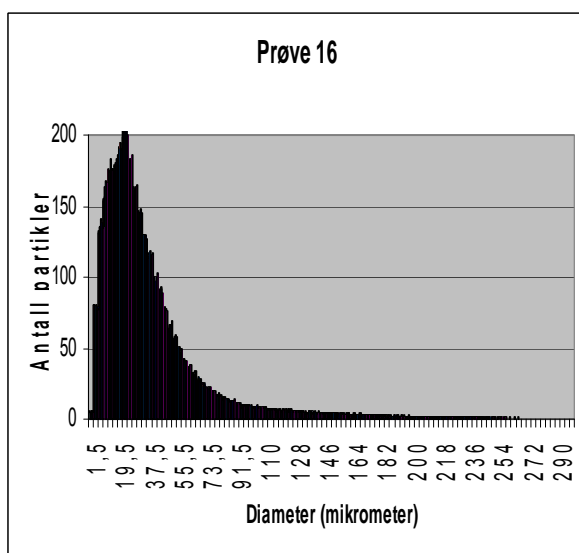
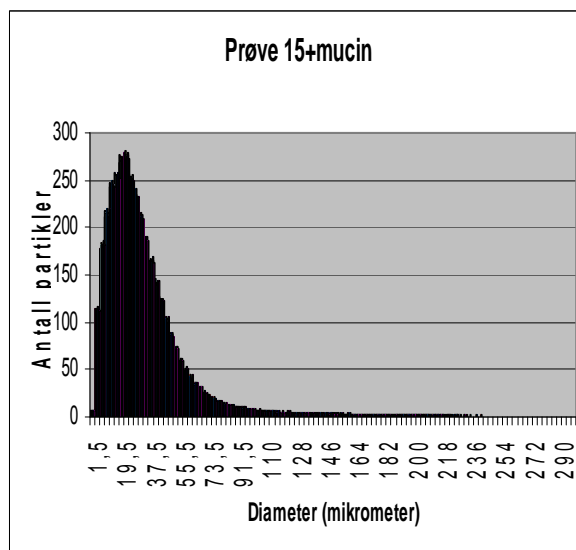
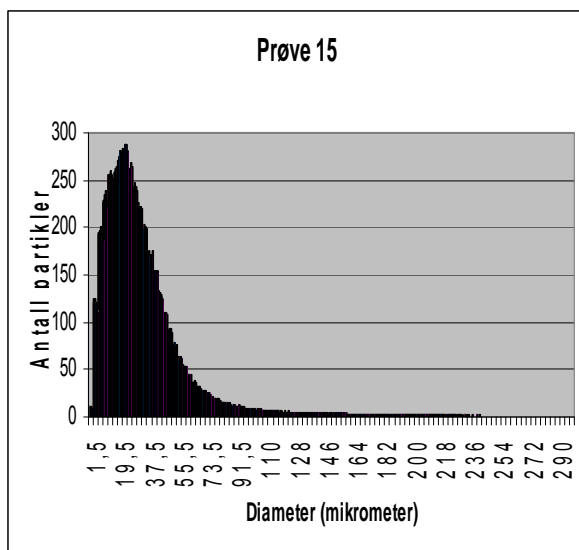
	c25	Median	Gjennomsnitt	c75	IQCS
Prøve 2	17,6 µm	29,1 µm	38,6 µm	45,6 µm	0,177
Prøve 3	16,6 µm	26,8 µm	32,8 µm	40,1 µm	0,130
Prøve 4	16,8 µm	27,0 µm	32,1 µm	40,0 µm	0,119
Prøve 8	17,0 µm	27,6 µm	34,0 µm	41,5 µm	0,138
Prøve 9	15,9 µm	26,0 µm	30,5 µm	39,8 µm	0,154
Prøve 10	18,6 µm	31,0 µm	37,8 µm	48,2 µm	0,162
Prøve 11	16,9 µm	27,5 µm	32,2 µm	41,6 µm	0,140
Prøve 12	15,8 µm	26,1 µm	31,9 µm	40,6 µm	0,164
Prøve 15	16,8 µm	27,1 µm	34,8 µm	41,6 µm	0,167
Prøve 16	16,9 µm	27,9 µm	38,1 µm	45,3 µm	0,229

Størrelsesfordeling til de forskjellige prøvene før og etter tilsetning av mucinløsning. Fra 6.6.1 og 6.6.4

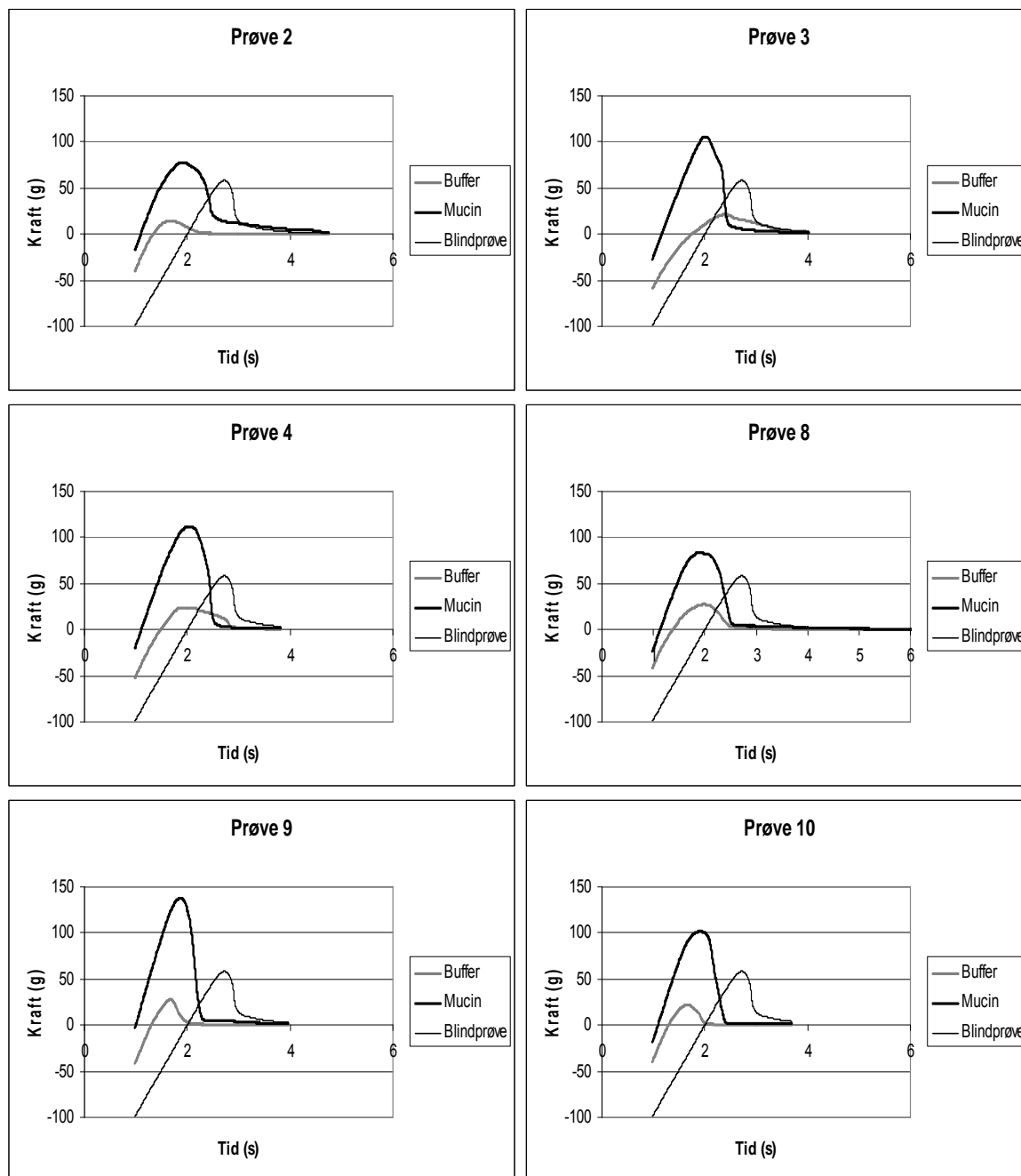


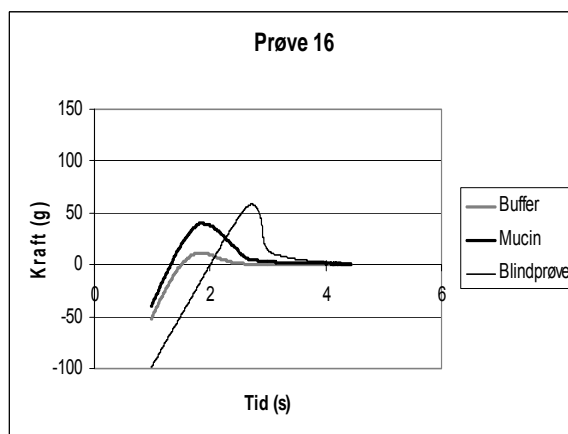
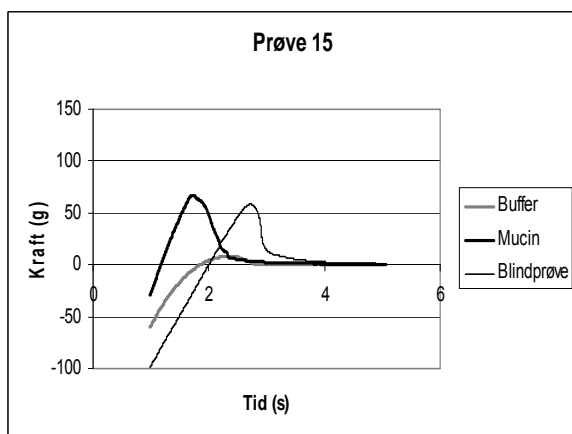
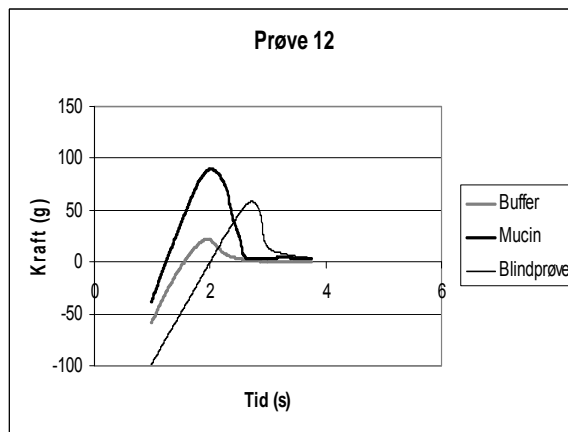
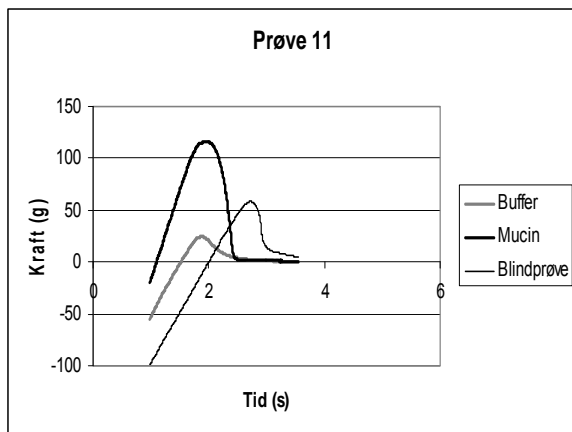




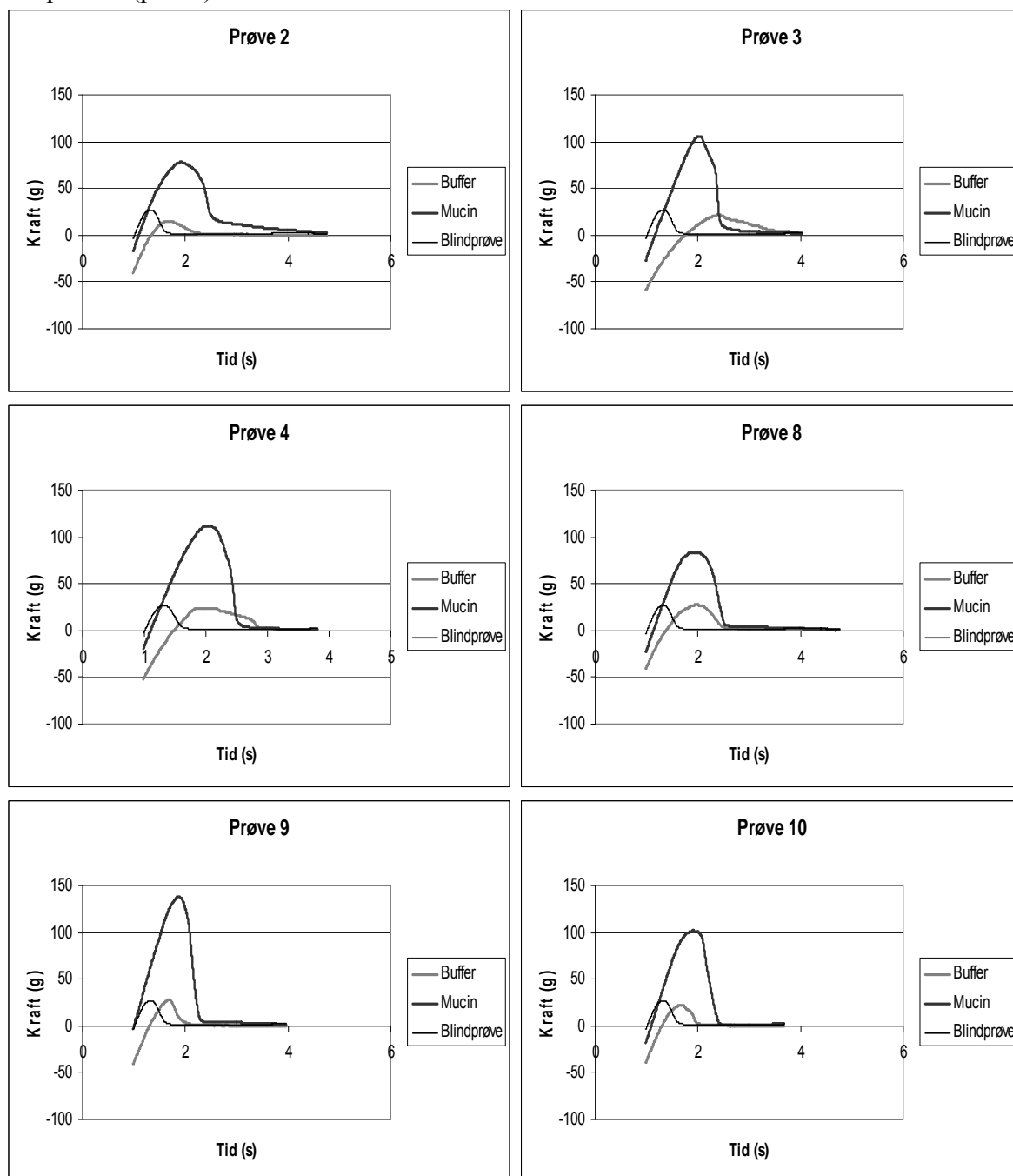


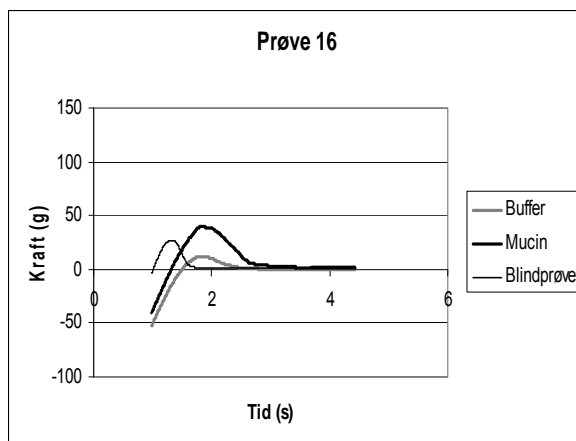
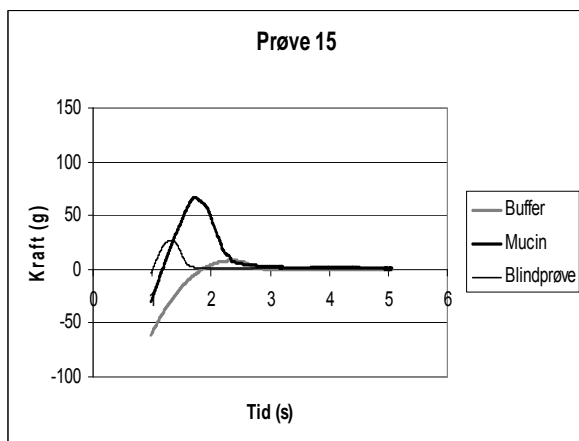
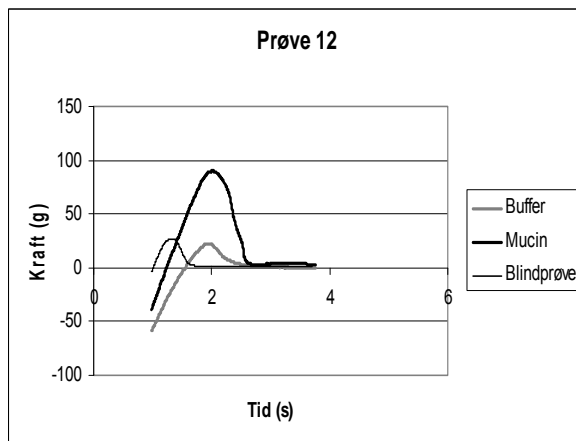
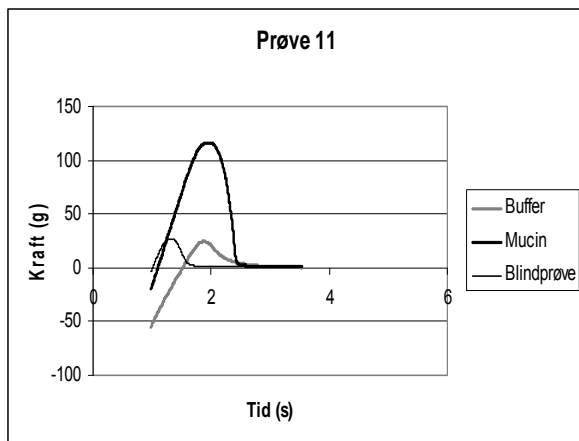
Representative grafer for hver av prøvene testet mot buffer og mot mucin i tillegg til blidprøven (Filterpapir) fra 6.7.2



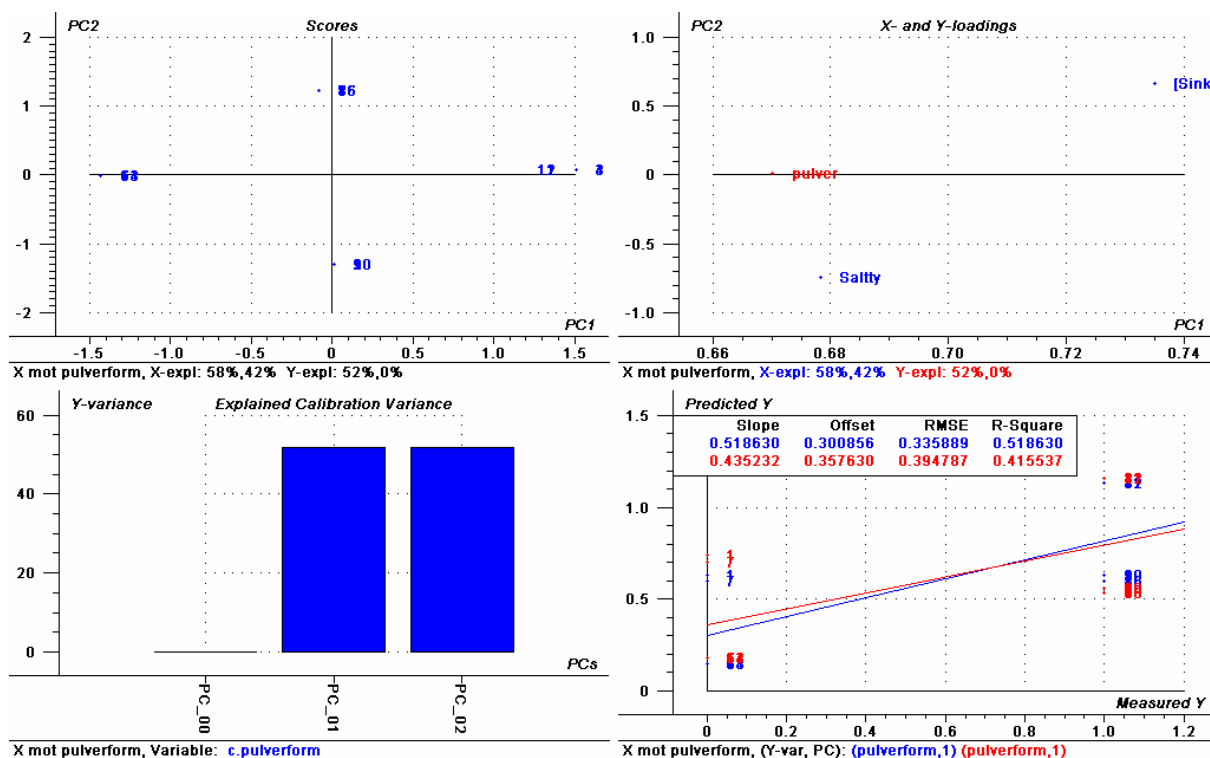


Representative grafer for hver av prøvene testet mot buffer og mot mucin i tillegg til blidprøven (probe) fra 6.7.2

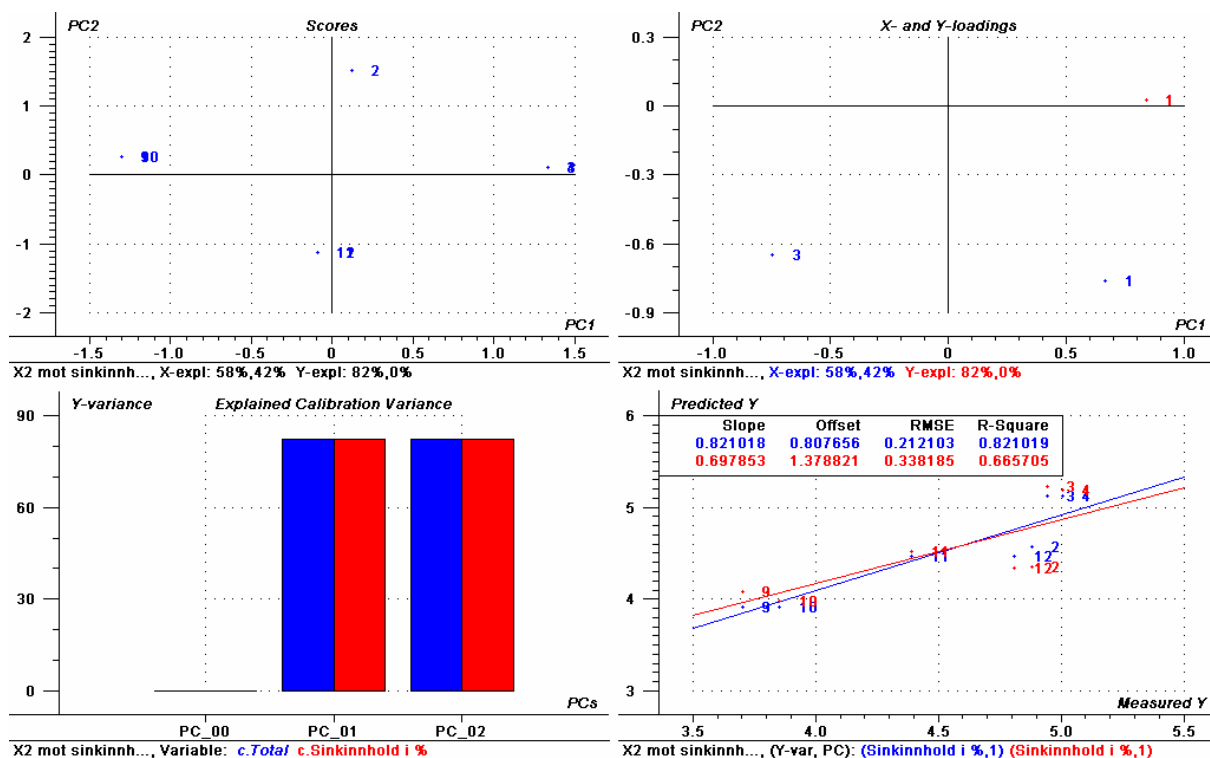




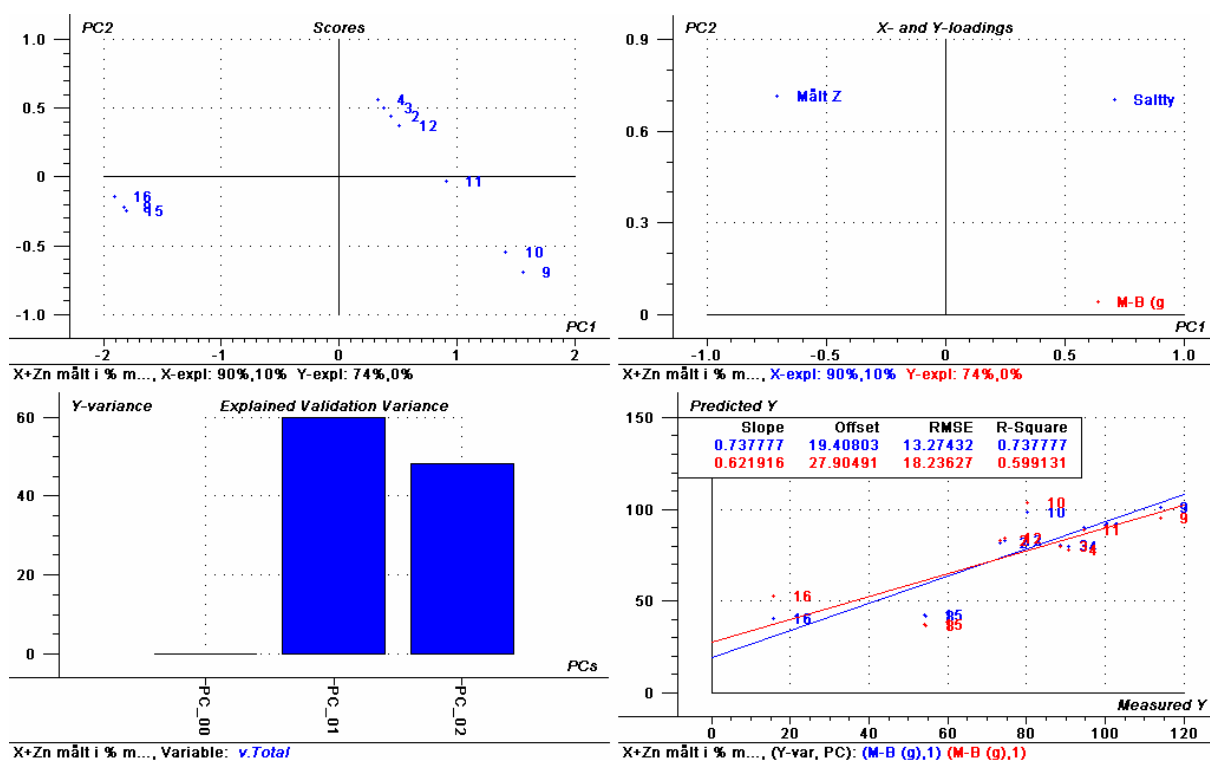
PLS 1 modell: Designvariable mot pulverform fra 6.9.1



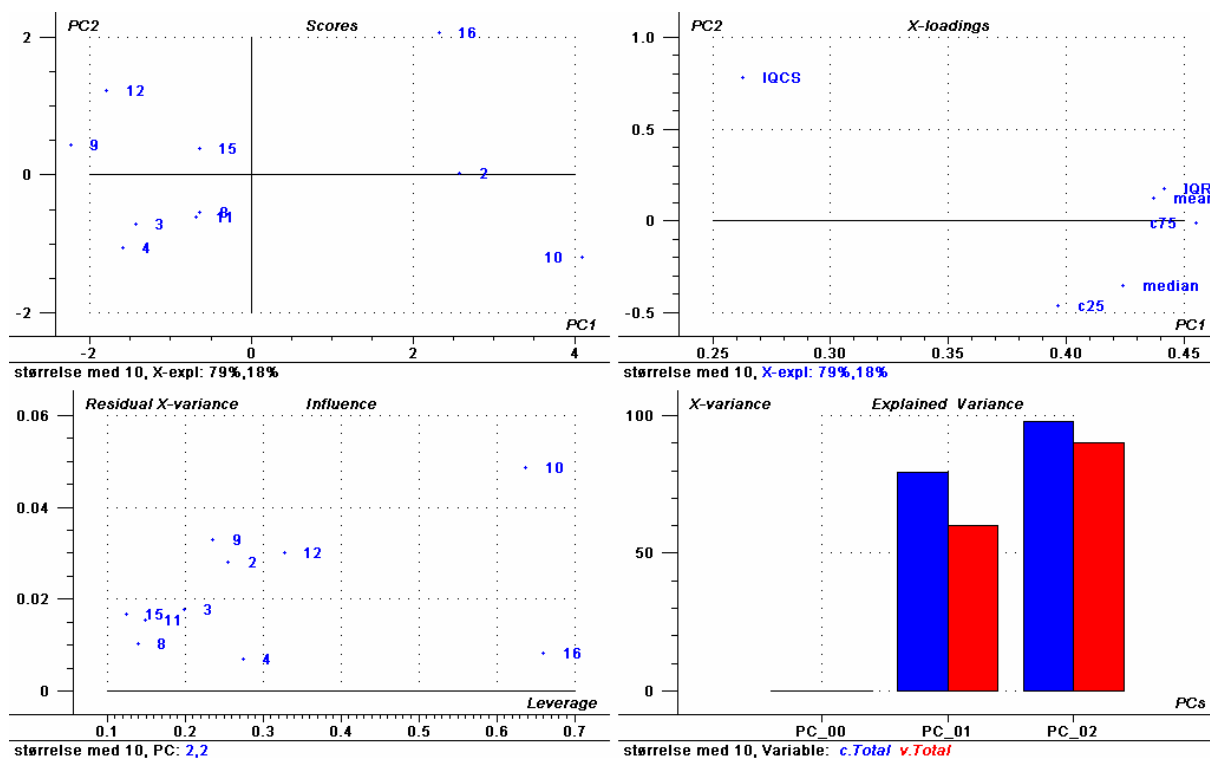
PLS 1 Modell: X₂ mot sinkinnhold i % fra 6.9.2



PLS 1 modell: Designvariable og Zn målt i prosent som X og M – B topp som Y fra 6.9.4



PCA analyse på størrelsesmål fra 6.9.6



PCA analyse på størrelsesmål etter uttak ak prøve 10 fra 6.9.6

