

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARIN PLUT

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARIN PLUT

**PROUČEVANJE PROCESNIH PARAMETROV ZA
IZDELAVO GELA KSANTANA**

**INVESTIGATION OF THE PROCESS PARAMETERS
FOR PREPARATION OF THE XANTHAN GEL**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v Leku farmacevtski družbi d.d., v Razvojnem centru Slovenije, na področju Farmacevtske tehnologije pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Mihe Homarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se družini, Evelini, Niki in vsem prijateljem, ki so me podpirali in mi stali ob strani ob pisanju magistrske naloge, predvsem pa iskrena hvala mentorju za ponujeno možnost opravljanja magistrske naloge v Lek-u. Posebno se zahvaljujem tudi dr. Mihi Homarju, ki je z mano z veseljem delil svoje znanje ter mi bil v podporo ves čas med izvajanjem praktičnega dela ter tekom pisanja magistrske naloge, prav tako pa tudi Denisu in vsem tehnikom za pomoč med delom.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Mihe Homarja, mag. farm.

Karin Plut

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD.....	1
1.1 SUSPENZIJE	1
1.2 POLIMERNI GELI IN NJIHOVA REOLOGIJA	3
1.3 BIOPOLIMERI	4
1.3.1 Uporaba gumijev v farmaciji	5
1.3.2 Ksantan	6
1.4 REOLOGIJA.....	10
1.4.1 Viskoelastične lastnosti snovi	12
1.4.2 Merjenje viskoelastičnih lastnosti z oscilatornimi testi.....	13
1.4.3 Tipi reometrov in senzorskih sistemov	13
1.5 METODA NAČRTOVANJA POSKUSOV (DESIGN OF EXPERIMENTS- DoE)	14
2 NAČRT ZA DELO	16
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.1.1 Polisorbat 80 (Croda Chocques SAS).....	17
3.1.2 Simetikon emulzija (DOW corning corporation USA).....	17
3.1.3 Natrijev benzoat (Merck KGaA)	17
3.1.4 Natrijev citrat dihidrat (Merck KGaA).....	17
3.1.5 Citronska kislina monohidrat (Merck KGaA).....	18
3.1.6 Glicerol (Nordische oelwerke Walther Carroux)	18
3.1.7 Ksantan (Danisco France SAS)	18
3.1.8 Maltodekstrin (Roquette freres)	18
3.1.9 Titanov dioksid (Tioxide Europe SRL)	19
3.1.10 Demineralizirana voda (Lek d. d.)	19

3.2	APARATURE	19
3.3	METODE	20
3.3.1	<i>Postopek priprave vzorcev</i>	20
3.3.2	<i>Ocena mejnih območij merjenja parametrov ter časovnih komponent pri izdelavi ksantanskega gela</i>	25
3.3.3	<i>Izdelava vzorcev po principu DoE</i>	26
3.3.4	<i>Reološke metode</i>	28
3.3.5	<i>Obdelava DoE podatkov</i>	29
3.3.6	<i>Metoda merjenja gostote</i>	30
3.3.7	<i>Sedimentacijska metoda</i>	30
3.3.8	<i>Vizuelna kontrola</i>	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1	REZULTATI REOLOŠKIH MERITEV	31
4.2	REZULTATI MERJENJA GOSTOT.....	49
4.3	REZULTATI SEDIMENTACIJE VZORCEV	50
4.4	REZULTATI VIZUELNE KONTROLE	53
4.5	IZBOR KLJUČNIH PROCESNIH PARAMETROV ZA IZDELAVO KSANTANSKEGA GELA.....	54
5	SKLEP	55
6	LITERATURA	56

KAZALO SLIK

SLIKA 1: FAZE RELAKSACIJE V RAZREDČENEM POLIMERNEM GELU: A) NEDEFORMIRAN GEL; B) KRATKI ČASI: GEL IN SOL POLIMERI SO RAZTEGNJENI IN PORAVNANI; C) VMESNI ČAS: SOL POLIMERI SE RELAKSIRAJO VENDAR JE MREŽA GELA ŠE VEDNO DEFORMIRANA; D) DOLGI ČASI: POLIMER V MREŽI SE RELAKSIRA VENDAR OSTAJA V RAVNOTEŽNI DEFORMACIJI (POVZETO PO 2).	3
SLIKA 2: STRUKTURNA FORMULA KSANTANSKE MOLEKULE (PRIREJENO PO 14)	6
SLIKA 3: SHEMATSKI PRIKAZ ODVISNOSTI VISKOZNOSTI OD STRIŽNE HITROSTI ZA DILATANTNI, NEWTONSKI IN PSEVDOPLASTIČNI SISTEM, PRIKAZAN NA LOGARITEMSKI SKALI (PRIREJENO PO 38)	10
SLIKA 4: SHEMATSKI PRIKAZ ODVISNOSTI STRIŽNE NAPETOSTI DILATANTNEGA, NEWTONSKEGA IN PSEVDOPLASTIČNEGA SISTEMA OD STRIŽNE HITROSTI (PRIREJENO PO 38)	10
SLIKA 5: PRIKAZ STRIGA NA PRIMERU DVEH VZPOREDNIH PLOŠČ, MED KATERIMA SE NAHAJA TEKOČINA (PRIREJENO PO 37)	12
SLIKA 6: PRIKAZ MASE VZORCA V ODVISNOSTI OD ČASA V OBLIKI DIAGRAMA, KO JE KSANTAN DODAN PRVI	22
SLIKA 7: PRIKAZ MASE VZORCA V ODVISNOSTI OD ČASA V OBLIKI DIAGRAMA, KO JE KSANTAN DODAN ZADNJI	24
SLIKA 8: PRIKAZ IZMERJENIH REOLOŠKIH PARAMETROV VZORCEV S TREMI MERITVAMI IN RSD ZA VSE 4 MERJENE PARAMETRE ...	33
SLIKA 9: PRIKAZ IZMERJENIH REOLOŠKIH PARAMETROV VZORCEV S TREMI MERITVAMI IN SD ZA VSE 4 MERJENE PARAMETRE	34
SLIKA 10: GRAFIČNI PRIKAZ REOLOŠKIH PARAMETROV ZA VSE IZDELANE VZORCE (ELASTIČNI MODUL, VISKOZNI MODUL, VISKOZNOST, TOČKA PREKRIŽANJA, TOČKA VPLIVA PREKRIŽANJA IN TEMPERATURE, POJAV SKUPKOV NEHIDRATIRANEGA KSANTANA)	38
SLIKA 11: GRAFIČNI PRIKAZ VPLIVA PROUČEVANIH PARAMETROV NA ELASTIČNI MODUL	39
SLIKA 12: GRAFIČNI PRIKAZ VPLIVA PROUČEVANIH PARAMETROV NA VISKOZNI MODUL	40
SLIKA 13: FREKVENČNA ODVISNOST ELASTIČNEGA, VISKOZNEGA MODULA TER KOMPLEKSNE VISKOZNOSTI ZA VODNE POLISAHARIDNE SISTEME. SPEKTER A) RAZREDČENA RAZTOPINA, B) PREMREŽEN GEL, C) ŠIBEK GEL, D) MOČAN GEL (PRIREJENO PO 12).	41
SLIKA 14: SPEKTER ELASTIČNEGA, VISKOZNEGA MODULA TER KOMPLEKSNE VISKOZNOSTI ZA NAKLJUČNO IZBRAN VZOREC N07 ...	42
SLIKA 15: GRAFIČNI PRIKAZ VPLIVA PROUČEVANIH PARAMETROV NA VISKOZNOST	42
SLIKA 16: GRAFIČNI PRIKAZ VPLIVA PROUČEVANIH PARAMETROV NA TOČKO PREKRIŽANJA	43
SLIKA 17: GRAFIČNI PRIKAZ STRIŽNE NAPETOSTI, PRI KATERI PRIDE DO TOČKE PREKRIŽANJA ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA	44
SLIKA 18: GRAFIČNI PRIKAZ VPLIVA PROCESNIH PARAMETROV NA NASTANEK SKUPKOV NEHIDRATIRANEGA KSANTANA	45
SLIKA 19: DIAGRAM TREH MERITEV GOSTOT VSAKEGA VZORCA	49
SLIKA 20: TURKEY PAIRWISE STATISTIČNA PRIMERJAVA VZORCEV	51
SLIKA 21: INTERVAL PLOT DIAGRAM ZA SEDIMENTE VZORCEV	52
SLIKA 22: BOXPLOT DIAGRAM ZA SEDIMENTE VZORCEV	52

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: PRIPRAVA VZORCEV Z IZBRANIMI PROCESNIMI PARAMETRI	21
PREGLEDNICA II: PRIKAZ PRIPRAVE VZORCEV POD RAZLIČNIMI POGOJI, ČE JE BIL KSANTAN DODAN NA ZAČETKU	22
PREGLEDNICA III: PRIKAZ PRIPRAVE VZORCEV POD RAZLIČNIMI POGOJI, ČE JE BIL KSANTAN DODAN NA KONCU.....	23
PREGLEDNICA IV: FAKTORJI IN NJIHOVO OBMOČJE MERJENJA	26
PREGLEDNICA V: PREGLED ŠTEVILA POSKUSOV ZA DELNI IN POPOLNI FAKTORSKI NAČRT ZA ŠTEVILO PREISKOVANIH FAKTORJEV OD 2 DO 10 (POVZETO PO 43).....	27
PREGLEDNICA VI: PRIKAZ POVPREČNIH VREDNOSTI REOLOŠKIH PARAMETROV PRI SEGREVANIH VZORCIH	31
PREGLEDNICA VII: PRIKAZ POVPREČNIH VREDNOSTI REOLOŠKIH PARAMETROV PRI VZORCIH IZDELANIH NA SOBNI TEMPERATURI .	31
PREGLEDNICA VIII: PRIKAZ IZMERJENIH REOLOŠKIH PARAMETROV VZORCA N15 NAREJENEGA PRI OBEH MEJNIH TEMPERATURNIH OBMOČJIH	32
PREGLEDNICA IX: REZULTATI REOLOŠKIH MERITEV PONOVLJENIH VZORCEV.....	34
PREGLEDNICA X: REZULTATI REOLOŠKIH MERITEV VSEH VZORCEV	35
PREGLEDNICA XI: PRIKAZ REOLOŠKIH MERITEV ZA PRESEJAN IN NEPRESEJAN VZOREC N07, POMERJEN OB RAZLIČNEM ČASU PO NASTANKU IZDELAVE.....	36
PREGLEDNICA XII: PRIMERJAVA REOLOŠKIH MERITEV MED PRESEJANIM IN NEPRESEJANIM VZORCEM N11, POMERJENIM OB RAZLIČNEM ČASU PO NASTANKU IZDELAVE.....	36
PREGLEDNICA XIII: PRIKAZ IZRAČUNANIH GOSTOT VZORCEV.....	49
PREGLEDNICA XIV: DELEŽ SEDIMENTA V POSAMEZNIH VZORCIH.....	50
PREGLEDNICA XV: PRIKAZ POJAVA SKUPKOV KSANTANA V VZORCIH	54

POVZETEK

Naravni gumiji so zelo široko uporabljeni biopolimeri v farmacevtskih izdelkih, saj s tvorjenjem gela omogočajo farmacevtskim oblikam želen način sproščanja oz. doziranja. Suspenzije, disperzni sistemi sestavljeni iz notranje trdne in zunanje tekoče faze, mnogokrat vsebujejo biopolimere, ki z geliranjem spremenijo reologijo suspenzije, da je ustrezna za aplikacijo s strani uporabnika.

Z magistrsko nalogo smo se odločili raziskati vpliv procesnih parametrov na izdelavo gela ksantana. Ksantan je zaradi svoje netoksičnosti, temperaturne stabilnosti ter zmožnosti povečanja viskoznosti raztopinam izredno priljubljen naravni polisaharid, saj se uporablja kot stabilizator in zgoščevalo. Pri naših poskusih raziskovanja vplivov procesnih parametrov na ksantanski gel smo se osredotočili samo na nekatere specifične parametre. Opazovali smo vpliv temperature, homogenizacije, hitrosti mešanja, nabrekanja ter časa dodajanja ksantana. Poskusi so bili statistično zasnovani tako, da je bilo za določitev vpliva posameznega parametra potrebno najmanjše število narejenih poskusov. S programom MODDE smo izdelali predpis za vsak posamezen vzorec, po katerem smo ga nato naredili. Vzorce smo ovrednotili z reološkimi testi, metodo sedimentacije, metodo merjenja gostote s steklenim valjem ter vizuelno kontrolo. Obenem nam je uspelo optimizirati metodo centrifugiranja, saj v predhodni študiji le-ta ni bila ustrezna za ovrednotenje posedanja delcev v vzorcih.

S pomočjo statistične analize smo ugotovili, da procesni parametri v proučevanih mejah zelo malo vplivajo na ksantanski gel, saj se je izkazalo, da so bile vrednosti meritev vzorcev primerljive ter naš tehnološki postopek izdelave vzorcev robusten. Največji vpliv je imela homogenizacija, nato pa ji je sledilo nabrekanje. Temperatura ter hitrost mešanja v proučevanih mejah nista imela vpliva na ksantanski gel. Čas dodajanja ksantana v raztopino je vplival na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana, ki pa so po enem tednu tudi razpadli. Statistična obdelava meritev po sedimentacijski metodi je pokazala, da je statistično različen le en vzorec, kar je bilo pričakovano, saj so bili parametri pri tem vzorcu najbolj neoptimalni.

Ključne besede: ksantanski gel, polimeri, reologija, načrtovanje eksperimentov, procesni parametri

ABSTRACT

Natural gums are biopolymers that are widely used in various pharmaceutical formulations, as they are gelling agents and that way enable releasing pharmaceutical substance and its dosing in a desired way. Suspensions, disperse systems composed of inner solid phase and outer liquid phase, often contain biopolymers which form a gel and this way change the rheology of suspension.

Our aim was to investigate the process parameters for the preparation of xanthan gel. Xanthan is a non-toxic, thermostable natural polysaccharide that has the ability of increasing viscosity of the solution. Consequently, it is widely used as a stabilizing and thickening agent. The main focus of our research was to investigate the influence of specific process parameters on the xanthan gel. The observed parameters were temperature, homogenisation, speed of mixing, swelling and time of adding xanthan into the dispersion. Our experiments were statistically designed to establish the influence of parameters with minimall number of experiments. The working procedure was prepared for each sample using MODDE program. Samples were evaluated with rheological tests, sedimentation method, method of measuring density with glass cylinder and visual control. We succeeded in optimizing the centrifugation method, since in the previous study it was not suitable for evaluation of the sedimentation of particles in the samples.

Statistical analysis showed that the researched process parameters in the defined limits had small influence on xanthan gel, as the measurements were comparable across all the samples and our procedure of their preparation was robust. Homogenization had the strongest effect, followed by swelling step. Temperature and mixing had no effect in the tested ranges. Time of xanthan addition had an influence on xanthan lump formation. After one week these lumps dissolved. Statistical analysis of the results obtained during sedimentation method showed statistically significant difference in only one of the samples, which was expected since the parameters of this particular sample were the least optimal.

Key words: xanthan gel, polymers, rheology, design of experiments, process parameters

SEZNAM OKRAJŠAV

DE	dekstrozni ekvivalent
DoE	design of experiments (načrtovanje eksperimentov)
G'	elastični modul
G	strižni modul
G''	viskozni modul
G^*	kompleksni strižni modul
MLR	multipla linearna regresija
o/min	obratov na minuto
O/V	tip emulzije olje v vodi
ppm	parts per million
RSD	relativna standardna deviacija
rpm	revolutions per minute
SD	standardna deviacija
w/v	masno- volumski delež
γ	strižna deformacija
$\dot{\gamma}$	strižna hitrost
η	viskoznost
η^*	kompleksna viskoznost
θ	fazni zamik
τ	strižna napetost

1 UVOD

1.1 Suspenzije

Disperzni sistem je sistem, ki je sestavljen iz vsaj dveh faz; snovi, ki je dispergirana (notranja faza) v kontinuirani (zunanji) fazi. Odvisno od velikosti delcev, ki so dispergirani v sistemu, ločimo molekularne, koloidne ter grobo disperzne sisteme. Suspenzije uvrščamo med grobo disperzne sisteme, saj vsebujejo delce večje od velikosti $0,5\ \mu\text{m}$. Prav tako med grobo disperzne sisteme uvrščamo tudi emulzije (1).

Odvisno od načina aplikacije se suspenzije v farmaciji delijo na parenteralne, topikalne ter peroralne suspenzije, uporabljajo pa se prav tako tudi za očesno aplikacijo. Lahko se nahajajo tudi v obliki aerosolov, ki se nanašajo topikalno na kožo ali preko dihalnih poti. Razlogov za izdelavo suspenzij je več, in sicer se za izdelavo suspenzije odločimo, če je zdravilna učinkovina netopna v dostavnem sistemu; da prikritimo grenak okus učinkovine; da povečamo stabilnost oz. da dosežemo zadržano/kontrolirano sproščanje učinkovine. Od aplikacije suspenzije pa so odvisne tudi fizikalne lastnosti le-te. Tako imajo peroralne suspenzije običajno večjo viskoznost in lahko vsebujejo večjo količino dispergiranih delcev, medtem ko so parenteralne suspenzije po drugi strani manj viskozne in vsebujejo manj kot 5 % delcev (1).

V sistemu suspenzije bi bilo idealno, da bi se notranja faza enotno dispergirala ter da ne bi tvorila sedimenta. Vendar v realnosti temu ni tako, saj je to zaradi medfazne napetosti med tekočim medijem ter trdnimi delci termodinamsko zelo nestabilen sistem. Da bi se zmanjšala stična površina med delci in tekočino, delci tvorijo aglomerate. Pri flokuliranih suspenzijah so delci med seboj povezani s šibkimi van der Waalsovimi vezmi oz. s fizikalno adsorbcijo makromolekul. Takšen sistem je pri suspenzijah zaželen, saj se delci ob rahlem pretresenju zopet hitro redispergirajo in s tem zagotavljajo enotnost odmerjanja. Za razliko od flokulirane pa pri deflokulirani suspenziji delci ostanejo dispergirani dlje časa, vendar pa se ob pojavu sedimentacije tvori pogača. Redispergiranje pogače je izredno energetsko potratno in zato v takšnem primeru ponavadi ni mogoče zagotoviti enakomernega odmerka suspenzije (1).

Ker so suspenzije torej termodinamsko nestabilni sistemi, stremijo k temu, da bi prešle v bolj stabilno stanje, kar pa se odraža v naslednjih pojavih:

- ❖ kontrolirani flokulaciji
- ❖ rasti kristalov
- ❖ flotaciji
- ❖ tvorbi pogače

Sedimentacijo delcev opisujemo s tako imenovano Stokes-ovo enačbo:

$$v = \frac{d^2 \cdot (\rho_1 - \rho_2) \cdot g}{18 \cdot \eta_0} \quad \text{Enačba 1}$$

Pri čemer predstavlja:

- **v** hitrost sedimentacije (cm/s),
- **d** premer delcev (cm)
- **ρ_1** gostoto dispergirane faze (kg/cm^3) in **ρ_2** gostoto medija (kg/cm^3)
- **g** gravitacijo
- **η_0** viskoznost medija ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)

Hitrost usedanja delcev lahko zmanjšamo s pomočjo sredstev, ki povečujejo viskoznost (derivati celuloze, naravni gumiji,...), vendar suspenzija obenem ne sme biti preveč viskozna, saj je s tem oteženo apliciranje iz vsebnika, poleg tega pa je omejena tudi difuzija učinkovine preko viskoznega sloja. Iz Enačbe 1 lahko razberemo, da ima največji vpliv na sedimentacijo prav premer delcev. Na gostoto dispergirane faze ne moremo vplivati, zato lahko spreminjamo le gostoto medija (1).

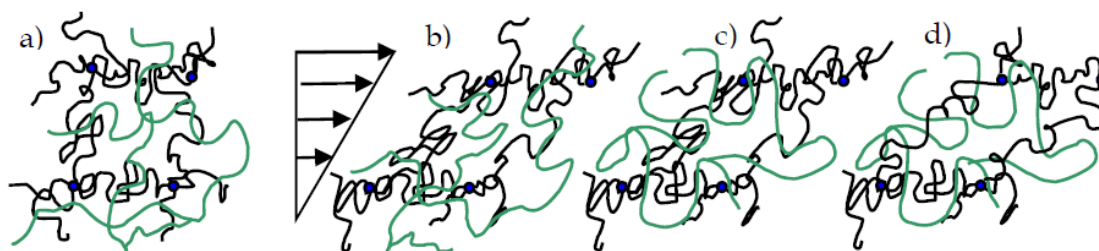
Pomen reoloških lastnosti suspenzij

Z vidika reološkega ovrednotenja suspenzij je zelo pomembna stabilnost suspenzij, ki je med drugim tudi posledica viskoznosti, saj iz Stokes-ove enačbe izhaja, da ima viskoznost vpliv na hitrost sedimentacije. Ustrezna viskoznost je pomembna tudi s stališča, da se zagotovi primeren odmerek in enostavna aplikacija. Če se delci učinkovine prehitro posedejo na dno, ni mogoče zagotoviti ustreznega volumna zdravila s pravilnim odmerkom učinkovine. Če suspenzijo uporabljamo za zunanjo uporabo, potem se mora enostavno nanašati na kožo, vendar pa obenem ne sme biti preveč tekoča, da lahko obstane na koži. Suspenzija za parenteralno uporabo mora biti dovolj tekoča, da se lahko aplicira z injekcijsko iglo. Tako

je potrebno narediti kompromis pri viskoznosti tako z vidika enostavne aplikacije kot tudi z vidika zagotavljanja enakomernosti odmerka (1).

1.2 Polimerni geli in njihova reologija

Polimerni geli so premrežene strukture, ki se obnašajo kot viskoelastične trdne snovi. Lahko so mehki in deformabilni obenem pa zavzemajo neko obliko kot trdna snov. Gel sestavlja en velik razvejan polimer, sestavljen iz več manjših medsebojno povezanih polimernih enot. Odvisno od fizikalne strukture polimera lahko razdelimo polimerne gele na šibke, močne ter pseudo gele (2). Med močne gele spadajo tisti, pri katerih so polimerne enote premrežene med seboj z ireverzibilnimi kemijskimi vezmi in po deformaciji, če so te vezi prekinjene, ne morejo zavzeti zopet prvotnega položaja. Nasprotno šibke gele sestavljajo notranje vezi, ki se lahko prekinajo, vendar se po deformaciji lahko povrnejo nazaj v prvotno stanje. Primer šibkih gelov so biopolimeri ter koloidni geli (3). Lastnosti gela ter s tem jakost vezi polimernih enot in strukturo lahko nadziramo s tem, da spreminjamo mikrostrukturo polimera ter količino tekočine, ki je potrebna za nastanek gela. Jakost gela je namreč odvisna od števila in gostote prečnih vezi med polimernimi verigami (4). S spreminjanjem molekulske mase polimernih verig povečujemo prostor med prečnimi vezmi gela. Tako lahko naredimo bolj mehak gel. Prav tako lahko enako dosežemo, če trdemu gelu dodamo tekočino (5). V razredčeni raztopini se polimerne verige razpletejo ter imajo različne relaksacijske čase, ki povedo, kako hitro lahko polimer po deformaciji zopet zavzame nazaj ravnotežno stanje (6). Polimerne verige, ki so del gelirnega premreženja, se relaksirajo bolj počasi kot prosti polimer v raztopini, saj sta oba konca polimera pri gelu namreč vezana s prečnimi vezmi, v raztopini pa sta oba konca verige prosta (Slika 1) (2).



Slika 1: Faze relaksacije v razredčenem polimernem gelu: a) nedeformiran gel; b) kratki časi: gel in sol polimeri so raztegnjeni in poravnani; c) vmesni čas: sol polimeri se relaksirajo vendar je mreža gela še vedno deformirana; d) dolgi časi: polimer v mreži se relaksira vendar ostaja v ravnotežni deformaciji (povzeto po 2).

Prav tako je od jakosti vezi v gelu odvisna tudi stopnja nabrekanja gela, ki je definirana kot volumen frakcije gela v nabreklem stanju. Bolj trdni geli nabrekajo manj kot mehki, ki lahko nabreknejo kar za nekajkrat svoje prvotne velikosti (5). Za idealno premrežen polimerni gel velja, da je kritična gelirna točka določena tam, kjer sta vrednosti elastičnega modula (G') in plastičnega modula (G'') enaki (2).

1.2.1.1 Frekvenčno odvisno obnašanje gelov

Za idealen gel je značilen elastični odziv, ko je elastični modul veliko večji od viskoznega in neodvisen od frekvence. Pri gelih z nepravilnostmi v strukturi je odziv na strižno silo odvisen od frekvence, vrednosti obeh dinamičnih modulov pa se prav tako povečujeta odvisno od dane frekvence. Pri nizkih frekvencah prevladuje elastična deformacija gela, saj med delci prevladuje Brownovo gibanje in je deformacija lahko reverzibilna, medtem ko se pri visokih frekvencah polimerne verige ne uspejo dovolj hitro reverzibilno deformirati, saj jih omejujejo premreženja, ki prispevajo k večji viskozni komponenti (5).

1.3 Biopolimeri

Biopolimerne gele lahko razdelimo v tri večje razrede: nukleinske kisline, proteini ter polisaharidi. Najbolj raziskani med temi razredi so nedvomno polisaharidi, saj zaradi velike molekulske mase ($>1 \times 10^6$) v raztopini zavzemajo zelo velik volumen. To pomeni, da nekateri med njimi zlahka tvorijo gel, saj prispevajo velik delež k povečanju viskoznosti raztopine. Drugi razlog, da so dobro raziskani, pa je tudi ta, da so na voljo v velikih količinah v primerjavi s proteini ali nukleinskimi kisljinami (7). Polisaharide, ki se uporabljajo v farmaciji, delimo glede na izvor v štiri večje skupine, in sicer: polisaharidi pridobljeni iz alg (agar, karagenan); rastlinski polisaharidi (tragakant gumi, pektin, guar gumi); celulozni derivati (hidroksimetilceluloza) ter polisaharidi mikrobnega izvora (ksantan, dekstran) (8). Lahko pa jih razdelimo tudi po strukturi glede na to ali so sestavljeni iz enakih ali različnih sladkornih enot, na homogene in heterogene polisaharide. Med zadnje spadajo pektini, sluzi ter gumiji (9). V nadaljevanju se bom osredotočila na gumije, saj je ksantan polisaharid iz skupine gumijev, katerega reološke lastnosti bomo proučevali z našim eksperimentalnim delom. Gumiji so visokomolekularni polimeri sestavljeni iz različnih polisaharidov. So produkti naravnega izvora, in sicer bodisi rastlinskega, morskega, živalskega ali mikrobiološkega. Različni avtorji pa gumije definirajo tudi drugače. Tako gumiji kot sluzi so hidrokoloide. Sestavljajo jih hidrofilne molekule, ki v prisotnosti vode tvorijo viskozne raztopine ali gele. Linearni polisaharidi zavzemajo več prostora in lahko tvorijo bolj

viskozne raztopine, medtem ko razvejani polisaharidi lažje tvorijo gele in so bolj stabilni, saj med stranskimi verigami molekul ne prihaja do večjih interakcij (10, 11, 12).

1.3.1 Uporaba gumijev v farmaciji

Gumiji izkazujejo kompleksno, premreženo polimerno strukturo, zaradi katere imajo tako adhezivne kot kohezivne lastnosti, ki se s pridom uporabljajo v farmacevtski industriji. Uporabni so kot veziva v tabletah, kot razgrajevala, suspendirna sredstva, zgoščevala, gelirna sredstva, kot stabilizatorji v koloidnih raztopinah, emulgatorji ter kot pomožne snovi v nekaterih farmacevtskih oblikah (8, 10, 11).

Gumiji kot emulgatorji ter suspendirna sredstva

Gumiji učinkovito stabilizirajo emulzije ter suspenzije, saj preprečijo koalescenca kapljic oz. združevanje delcev, prav tako pa povečujejo hidracijo okoli suspendiranih delcev, zato najbolje delujejo v prisotnosti sredstev za močenje. Prav tako so uporabni kot zgoščevala in stabilizatorji, saj z vodo tvorijo disperzijo in povečajo viskoznost kontinuirane faze, tako da se suspendirani delci zadržijo dovolj dolgo, da se lahko zagotovi enotnost odmerka (8, 10, 11).

Uporaba gumijev v oblikah z zadržanim sproščanjem

Gumiji se uporabljajo v tabletah, suspenzijah in v matriks sistemih kot sredstvo za zadržano sproščanje. Ko pride polimer v stik z vodo, se navlaži in tvori gel ter tako omogoča sproščanje učinkovine z difuzijo skozi daljši čas (8, 10, 11).

Gumiji kot sredstvo za oblaganje

Veliko gumijev se lahko uporablja kot sredstvo za oblaganje, saj omogočajo zadržano sproščanje učinkovine in jo obenem tudi zaščitijo pred razgradnjo v želodcu (8, 10, 11).

Uporaba pri mikroenkapsuliranju

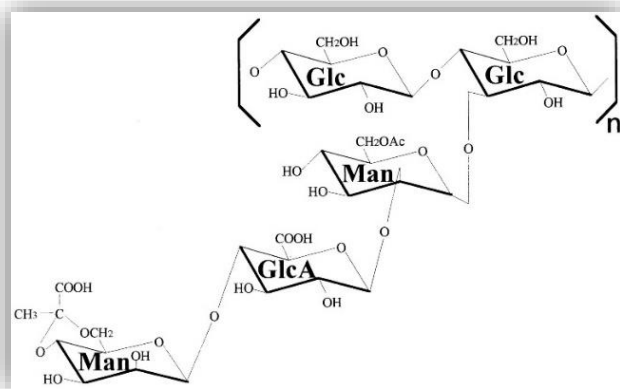
Gumiji zaradi svoje sposobnosti tvorjenja obloge najdejo svoje mesto tudi pri mikroenkapsuliranju zdravilnih učinkovin z zadržanim sproščanjem. Primeri gumijev, ki se uporabljajo v ta namen, so guar gumi, ksantan gumi ter gumi akacije (8, 10, 11).

Gumiji kot gelirno sredstvo

Gumiji lahko tvorijo gel sami ali v kombinaciji z drugimi geli ali ioni. Geliranje je rezultat številnih inter ter intramolekularnih vezi, ki tvorijo tridimenzionalno premreženje, znotraj katerega se ujamejo molekule vode. Takšne asociacije se zgodijo pod določenimi fizikalnimi pogoji, kot so sprememba pH-ja, temperature oz. kemijskimi, kot je na primer dodatek določenih reagentov ali ionov. Tako galaktomanani delujejo sinergistično s karagenani in ksantanskim gumijem pri tvorbi elastičnega gela. Pri alginski kislini pa nastanek takšnega gela povzroči dodatek kalcijevih ionov (8, 10, 11).

1.3.2 Ksantan

Obstaja veliko različnih naravnih polisaharidov proizvedenih s fermentacijo mikrobov, kot so na primer dekstran, pululan, skleroglukan,... Vendar je od vseh najbolj poznan in široko



Slika 2: Strukturna formula ksantanske molekule (prirejeno po 14)

uporabljen v farmacevtski industriji le ksantan (12). Zato smo se za našo magistrsko nalogo odločili, da proučimo gel, ki ga tvori ksantan. Ksantan je naravni polisaharid ter pomemben gumi v industriji. Zaradi svojih pseudoplastičnih reoloških lastnosti, temperaturne stabilnosti, kompatibilnosti z drugimi sestavinami in netoksičnosti se uporablja v

farmacevtski, kozmetični in živilski industriji kot stabilizator oz. emulgator, saj močno poveča viskoznost raztopin. Proizvaja ga bakterija *Xanthomonas campestris*, aerob, ki pri svojem metabolizmu potrebuje kisik. Sodi med bolj raziskane polimere zaradi svojih pozitivnih lastnosti, s katerimi bi lahko nadomestil mnoge naravne in sintetične vodotopne gele. Sestavlja ga osnovna pentasaharidna enota, dveh glukoz, dveh manoz in ene glukuronske kisline, ki se n-krat ponovi. Glavno verigo predstavljata dve β -D-glukozni enoti vezani na mestih 1 in 4. Stranska veriga je sestavljena iz treh enot in vsebuje D-glukuronsko kislino vezano med dve manoz. Terminalna D-manoza ima vezan piruvični kislini ostanek, D-manoza vezana na glavno verigo ima vezano na mestu O-6 acetilno skupino (Slika 2). Ksantan je polimer anionskega značaja. Takšna polimerna enota lahko obstaja v

obliki enojnega, dvojnega ali trojnega heliksa, ki tvori komplekse z drugimi polimernimi molekulami (14).

Za šibke gele, kot je ksantanski gel, je značilno, da so njihovi reološki spektri zelo podobni spektrumu močnih gelov. Pri obojih je namreč pri dovolj majhnih deformacijah G' signifikantno večji od G'' ves čas frekvenčno odvisnega območja, oba modula pa prav tako izkazujejo zelo majhno frekvenčno odvisnost. Kompleksna viskoznost se zmanjšuje z naraščajočo frekvenco s koeficientom strmine približno -1. Vendar pa ločimo spekter močnega gela od šibkega po odvisnosti deformacije od majhnih strižnih napetosti (13). Pri konstantni strižni sili se struktura močnega gela podre, medtem ko šibek gel začne teči (12). Dejstvo, da so močni geli neodvisni od strižnih obremenitev do približno 25 % celotne obremenitve, uvršča ksantanski gel med šibke gele, ki kažejo viskoelastičen linearen odziv le pri obremenitvah manjših od 5 % celotne obremenitve, ki jo gel premore. Pri velikih deformacijah se struktura močnih gelov (npr. agarosa) poruši in se ne more nazaj obnoviti brez taljenja oz. restrukturiranja. Nasprotno pa se struktura šibkih gelov po deformaciji obnovi, saj se pri njih izrazi plastično obnašanje (13).

1.3.2.1 Ksantan v farmacevtskih izdelkih

Ksantanski gumi se v farmaciji uporablja predvsem kot zgoščevalo, stabilizator za pripravo emulzij in suspenzij, saj s tvorbo gelske rešetke preprečuje, da bi se delci posedali, kot pomožna snov za pripravo ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem ter v farmacevtskih oblikah za peroralno in dermalno aplikacijo (15). Prav tako kot vsi ostali naravni polimeri je ksantan široko uporabljen kot pomožno sredstvo v farmaciji, saj je biorazgradljiv, varen, tvori gel ter ima manj stranskih učinkov kot sintezni polimeri. Njegova potencialna prednost bi lahko bila ničelna kinetika sproščanja zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema, vendar pa se tu obenem pojavi slabost ksantana, saj je sproščanje odvisno tudi od pH-ja ter ionov v mediju (16).

1.3.2.2 Reološke lastnosti ksantana

Viskoznost ksantanske raztopine je odvisna od več dejavnikov, kot je koncentracija polimera, koncentracija dodane soli v raztopini, pH ter temperatura. Vpliv teh parametrov na reološke lastnosti ksantana so proučevali v več študijah. V nadaljevanju bom opisala podrobneje le vpliv temperature, vpliv vseh ostalih drugih dejavnikov na viskoznost ksantana ter interakcije ksantana z galaktomanani pa bom povzela na podlagi znanih dejstev o reologiji ksantana (14).

Vpliv temperature

Ksantan je polimer, ki je temperaturno dobro obstojen. Raztopine ksantana pri zmernih temperaturah so zelo viskozne. Temperatura raztopine, v katero dodamo ksantan, ima namreč velik vpliv pri razporejanju strukturnih enot v ksantanu ter njegovi konformaciji. Ugotovljeno je, da se glede na temperaturo ksantan lahko nahaja v obliki heliksa ali pa njegove monomerne enote zavzamejo naključen položaj (17). Viskoznost se načeloma z naraščajočo temperaturo raztopine zmanjšuje, ta proces je popolnoma reverzibilen med 10 °C - 80 °C, vmes pa nastopi za ksantan značilno obnašanje. Do temperature raztopine 40 °C viskoznost pada, med 40 °C - 60 °C se viskoznost povečuje z naraščajočo temperaturo. Nad 60 °C pa se z naraščajočo temperaturo viskoznost manjša. Te spremembe viskoznosti glede na temperaturo so povezane s strukturnimi spremembami ksantanske molekule. Pri nizkih temperaturah raztopin se nahaja polimer v urejeni strukturi, ki pa z naraščajočo temperaturo prehaja v neurejeno stanje (18, 19, 20). Temperatura prehoda ksantanske molekule iz urejenega v neurejeno stanje se lahko spreminja glede na koncentracijo dodane soli ter neodvisno od koncentracije polimera. Pri monovalentni (npr. natrijev klorid, NaCl) in divalentni soli (npr. kalcijev klorid, CaCl₂) temperatura prehoda ksantanske molekule narašča z naraščajočo koncentracijo soli v raztopini (19, 20).

Vpliv pH-ja

Razlike v pH-ju med 1 in 13 ne vplivajo na viskoznost ksantanske raztopine. Ko pH raztopine preseže 9, se ksantan močno deacetilira, medtem ko pri pH-ju nižjem od 3 pride do depiruvizacije ter deacetilacije (14). Polimerne verige postanejo pri nižjem pH-ju bolj fleksibilne zaradi šibkejših elektrostatskih odbojev, poleg tega pa se pojavi več samopovezovanja znotraj molekule med karboksilnimi skupinami na ksantanskih stranskih verigah, saj je na voljo več prostih mest za tvorbo vodikovih vezi (21). Tako depiruviziran kot deacetiliran ksantan pa izkazujeta podobne reološke lastnosti kot nativna oblika ksantana (14).

Vpliv koncentracije soli in polimera

Stopnja pseudoplastičnosti, viskoznost in prehod iz gelu podobnega obnašanja do pseudoplastičnega so povsem odvisni od koncentracije ksantana (20).

Viskoznost ksantanske raztopine se povečuje skladno z naraščajočo koncentracijo polimera v raztopini. S tem se tvori več intermolekularnih interakcij, zato tudi narašča molekulska

masa celotne polimerske molekule. Odvisno od koncentracije ksantana v raztopini na viskoznost vpliva tudi dodana sol. Pri majhni koncentraciji polimera (pod približno 0,25%) ob dodatku majhne količine monovalentne soli, kot je na primer NaCl, viskoznost rahlo upade, saj se zmanjšajo intermolekularne elektrostatske sile med molekulami (20, 22, 23). Pri visokih koncentracijah ksantana pa se viskoznost poveča, prav tako se le-ta tudi poveča, če dodamo velike količine soli. S tem se namreč povečajo interakcije med molekulami polimera, kar vpliva na viskoznost raztopine (17, 24). Ko pa sol preseže 0,1 % w/v, viskoznost postane neodvisna od koncentracije dodane soli (14). Podoben učinek na viskoznost kot monovalentne soli imajo tudi mnoge druge dvovalentne soli, kot so kalcijeve in magnezijeve soli ter trivalentna sol kot je natrijev citrat (20, 22) .

Interakcije ksantana z galaktomanani in drugimi polisaharidnimi molekulami

Pomembna lastnost ksantana je tudi njegova interakcija z drugimi galaktomanani, polisaharidi iz enot manoze in galaktoze, kot sta guar gel in semenska sluz rožičevca, saj pride v takšnem primeru do sinergizma viskoznosti, ki pa se zmanjša ob prisotnosti soli (14, 26, 27, 28). Ksantan sodi med polimere, ki imajo med pravilno zaporedje enot vrinjene nepravilnosti ter v vodi tvorijo šibki gel, medtem ko tvori semenska sluz rožičevca koloidno polimerno raztopino (14, 29). Na podlagi študij so ugotovili, da ksantan, ki je v manjši meri acetiliran, s sluzjo rožičevca tvori močnejši gel kot pa acetiliran, saj se v zadnjem primeru težje tvorijo vezi z drugimi polimernimi molekulami (29). Poleg tega se vezi z galaktomanani lažje tvorijo, ko je ksantan raztopljen pri nizki temperaturi (40°C) galaktomanan pa pri višji temperaturi (80°C) (14).

Iz rezultatov študije lahko povzamemo, da je reološko obnašanje raztopine riževega škroba in ksantana predvsem odvisno od koncentracije ksantanskega gumija v raztopini (23). Tako je bilo v tej študiji ugotovljeno, da je pri majhnih koncentracijah ksantana v raztopinah z riževim škrobom opazno, da se navidezna viskoznost manjša z naraščajočo temperaturo, vendar so te spremembe v viskoznosti manjše kot v primerjavi z drugimi hidrokoloidi (30, 31, 32). Da to velja tudi za ksantanske raztopine kot same, je bilo narejeno tudi nekaj študij, ki so to trditev potrdile. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da se vpliv temperature na reološko obnašanje ksantana zmanjšuje z naraščajočo koncentracijo polimera (32, 32). Navidezna viskoznost ksantanskega gela se izrazito spreminja pod vplivom strižnih sil; večje kot so strižne sile, manjša je viskoznost (32).

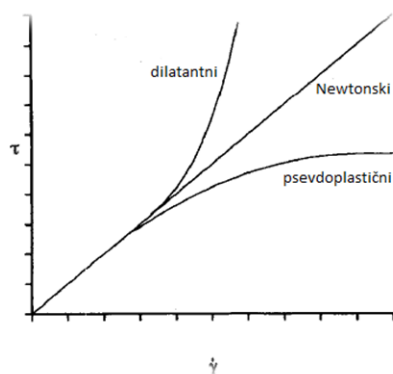
1.4 Reologija

Reologija, kakor je ta termin prvi vpeljal prof. Eugene C. Bingham, je veda o deformacijah, preoblikovanju snovi, pretočnih lastnostih le-teh ter obnašanju kapljev in pod vplivom različnih strižnih sil (35, 36, 37). V farmaciji ima pomembno vlogo, saj nam omogoča vpogled v fizikalno stabilnost vhodnih snovi, pokaže nam, kako se določena snov obnaša pod različnimi pogoji ter nam tako pomaga optimizirati proizvodne procese ter s tem izboljšati kakovost končnega izdelka (34).

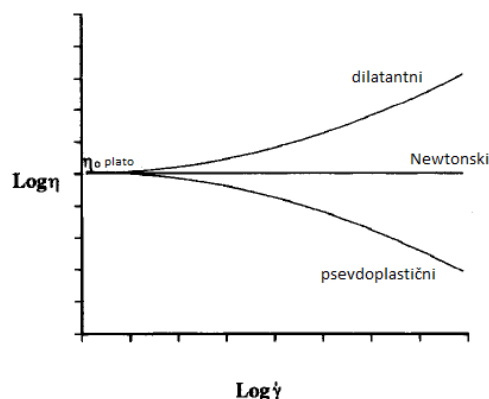
Glede na reološko obnašanje delimo sisteme na Newtonske ali idealne ter na ne-Newtonske ali realne. Newtonski sistemi so sistemi, pri katerih je viskoznost (η) odvisna le od zračnega tlaka ter temperature, tokovni pogoji pa nanje ne vplivajo (Enačba 2) (Slika 3 in 4) (33). Strižna napetost je pri takšnem sistemu sorazmerna s kotno hitrostjo deformacije (35).

$$\eta = \tau / (d\gamma / dt) = \tau / \dot{\gamma} \quad [\text{Pa.s.}]$$

Enačba 2



Slika 4: Shematski prikaz odvisnosti strižne napetosti dilatantnega, Newtonskega in psevdoplastičnega sistema od strižne hitrosti (prirejeno po 38)



Slika 3: Shematski prikaz odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti za dilatantni, Newtonski in psevdoplastični sistem, prikazan na logaritemski skali (prirejeno po 38)

V realnosti pa je takšnih sistemov bolj malo, saj viskoznost pri konstantnem tlaku in temperaturi ni konstantna, temveč je odvisna tudi od drugih dejavnikov kot so čas in smer delovanja strižne sile ter jakost le-te (33, 37, 38). Tako med ne-Newtonske sisteme uvrščamo: pseudoplastične, dilatantne, plastične, tiksotropne, reopektične in viskoelastične sisteme. Medtem, ko so prvi trije omenjeni sistemi časovno neodvisni, pa so zadnji trije odvisni od časa (33). Večina polimerov izkazuje pseudoplastično obnašanje v območju

nizkih strižnih hitrosti (37). Pri opisovanju reoloških lastnosti moramo poznati nekaj splošnih definicij, s katerimi lahko ponazorimo obnašanje oz. reologijo snovi (35).

Strižni tok

Strižni tok opisuje gibanje tekočine v plasteh, ki drsijo ena mimo druge. Pri majhnih strižnih silah je tok laminaren in je primeren za določanje viskoznosti, medtem ko se pri večjih strižnih silah ustvari turbulenten tok in je zato viskoznost težje opredeliti (36).

Strižna napetost

Strižna napetost je razmerje med silo, ki deluje na ploskev (F) ter njeno površino (S). Pri telesih, ki se obnašajo elastično, velja Hookov zakon, kar pomeni, da je strižna napetost sorazmerna z deformacijo, ki jo izrazimo s kotom zasuka (θ). Pri zelo majhnih kotih oz. deformacijah pa lahko izrazimo strižno napetost kot produkt strižnega modula (G) in strižne deformacije (γ) (Enačba 3) (34).

$$\tau = \frac{F}{S} = G \cdot \theta = G \cdot \gamma \text{ [Pa]} \quad \text{Enačba 3}$$

Strižna deformacija

Strižna deformacija oz. strig (γ) je sprememba, ki nastane na sistemu pod vplivom strižne sile-sile, ki deluje v smeri ploskve (Enačba 4) (35, 37).

$$\gamma = \frac{\Delta d}{h} = \tan \theta \cong \theta \quad \text{Enačba 4}$$

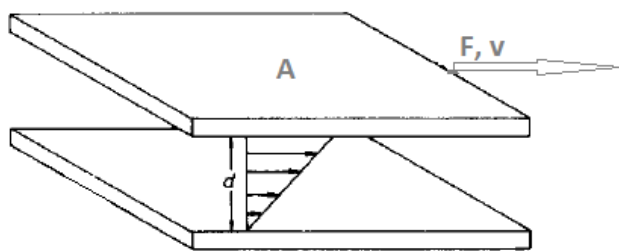
Viskoznost

Je lastnost snovi, ki opisuje njen upor proti strižni deformaciji. Definirana je kot razmerje med strižno napetostjo in strižno hitrostjo (Enačba 5) (37, 38).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad \text{Enačba 5}$$

Viskoznost lahko razložimo na sistemu dveh vzporednih plošč, ko ena miruje, druga pa se giblje v neki smeri s silo F (slika 5). Med njima je tekočina, ki ji lahko določimo viskoznost na podlagi sile (F), ki deluje na ploščo, razdalje med ploščama (d), hitrosti, s katero se premika ena izmed plošč (v) ter površine premikajoče plošče (A) (Enačba 6) (35).

$$F = \eta \cdot A \cdot \frac{v}{d} \quad \text{Enačba 6}$$



Slika 5: Prikaz striga na primeru dveh vzporednih plošč, med katerima se nahaja tekočina (prirejeno po 37)

Poleg dinamične viskoznosti poznamo še kinematično viskoznost (ν), ki je definirana kot razmerje med dinamično viskoznostjo in gostoto snovi (ρ) pri določeni temperaturi (Enačba 7) (34).

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} [m^2 \cdot s^{-1}] \quad \text{Enačba 7}$$

Strižna hitrost

Strižna hitrost je definirana kot sprememba hitrosti v smeri y , pravokotno na smer x oz. kot odvod strižne deformacije po času (Enačba 8) (36).

$$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy} = \frac{d\gamma}{dt} [s^{-1}] \quad \text{Enačba 8}$$

1.4.1 Viskoelastične lastnosti snovi

Pri opisovanju viskoelastičnih lastnosti snovi je izredno pomembno poudariti čas delovanja sile na snov, saj je vsaka snov lahko elastična ali viskozna, odvisno od tega, v kakšnih časovnih okvirih jo opazujemo. Pri zelo dolгих opazovalnih časih pod neko napetostjo trdne snovi tečejo kot tekočine, pri kratkih časih pa lahko opazimo, da se tekočine obnašajo kot trdne snovi (6, 7, 36, 37).

Viskoelastične lastnosti izkazujejo naravna in sintetična vlakna, kovine pri povišani temperaturi, koloidne suspenzije, polimeri in delno tudi beton (39, 41).

Pri majhnih deformacijah je za telesa značilno linearno viskoelastično obnašanje, kar pomeni, da zanje velja Hookov zakon elastičnosti ter Newtonov zakon viskoznosti (40).

1.4.2 Merjenje viskoelastičnih lastnosti z oscilatornimi testi

Viskoelastične lastnosti snovi lahko merimo pod nedestruktivnimi strižnimi pogoji, ko je viskoelastičen odziv linearen oz. v območju nelinearnega viskoelastičnega odziva v območju destruktivnih strižnih pogojev (33). V nadaljevanju magistrske naloge pri poglavju metode bodo opisani dinamično-oscilatorni testi, ki jih izvajamo v območju linearnega odziva, saj bomo ta test uporabili tudi pri testiranju reoloških lastnosti ksantana. S pomočjo oscilatorne reologije lahko najbolj natančno izmerimo kritično točko geliranja, ko viskoelastična tekočina prehaja v viskoelastično trdno snov (2). S tem ko spreminjamo amplitudo in frekvenco deformacije, lahko opazujemo različne vrste obnašanja snovi v različnih časovnih okvirih ter tako bolje razumemo strukturne lastnosti opazovanega sistema (2, 42, 43).

Osnovni princip oscilatorne reologije je povzročiti vzorcu sinusoidno strižno deformacijo ter nato izmeriti napetostni odgovor (42).

1.4.3 Tipi reometrov in senzorskih sistemov

Za proučevanje reoloških lastnosti snovi pod oscilacijskimi pogoji lahko uporabljamo rotacijske reometre, ki imajo bodisi nastavljivo strižno hitrost ali nastavljivo strižno napetost. Reometer z nastavljivo strižno napetostjo ima nekaj prednosti pred reometrom z nastavljivo strižno hitrostjo, saj lahko pri zadnjem uporabljamo večje število merilnih tehnik, vzorce lahko testiramo pod širokim spektrom različnih strižnih napetosti, prav tako pa lahko izvajamo meritve pri zelo nizkih strižnih deformacijah (36, 37, 40).

Primeren senzorski sistem pa izberemo na podlagi vrste tekočine, ki jo analiziramo ter pogojev, ki jih imamo pri merjenju. Ločimo naslednje tipe senzorskih sistemov:

- senzorski sistem koaksialnih valjev
- senzorski sistem plošče in stožca
- senzorski sistem dveh vzporednih plošč (36, 37).

1.5 Metoda načrtovanja poskusov (Design of Experiments- DoE)

Pri izvajanju poskusov v farmacevtski industriji se dostikrat srečamo z vprašanjem, kako z najmanjšim možnim številom eksperimentov pridobiti največ informacij. V ta namen uporabimo metodo DoE. Ta metoda nam zagotavlja, da z obzirom na stroške in informacije naredimo optimalno število poskusov, s katerimi pridobimo največ informacij, ki nas zanimajo o nekem procesu. Ta metoda se uporablja tako v farmacevtski industriji kot v proizvodnji hrane, marketingu, kemični industriji, avtomobilski industriji,...

Odvisno od našega cilja lahko metodo DoE uporabimo za tri različne eksperimentalne načrte: reševanje faktorjev, optimizacijo ter test robustnosti. Pri reševanju faktorjev nas predvsem v osnovi zanima, kateri faktorji bistveno vplivajo na naš proces ter v kakšnem obsegu. Optimizacija nam omogoča vpogled v interakcije pomembnih faktorjev, ki se odražajo v optimalnih procesnih pogojih. Ker je optimizacija bolj kompleksna od reševanja faktorjev, je za njo potrebno tudi večje število narejenih poskusov. Pri testu robustnosti pa gre predvsem zato, da se določi občutljivost nekega produkta na majhne spremembe faktorjev.

Nov pristop načrtovanja eksperimentov se v splošnem loči od »tradicionalnega« v tem, da se pri »tradicionalnem« načinu načrtovanja vzorcev spreminja le en faktor hkrati, dokler se ne zazna izboljšave procesa. Poleg tega se težko oceni tudi vpliv šuma, ki ga ne moremo razlikovati od dejanskih vplivov faktorjev. To se predvsem odrazi takrat, ko med faktorji obstajajo interakcije in ne moremo zagotovo trditi, da je optimizacija posledica le enega faktorja, ki smo ga spreminjali. Zato je DoE v tem primeru bistveno boljši pristop, saj omogoča načrtovanje eksperimentov, pri katerih se hkrati spreminjajo vsi ključni parametri. Ta metoda nam tudi omogoča, da ocenimo vpliv šuma na odzive.

Načrtovalec poskusov mora določiti nekaj začetnih pogojev kot so: število faktorjev in njihovo območje, število odzivov in cilj, ki ga zanima. Ko so zbrani vsi rezultati meritev, podatke obdelamo s pomočjo regresijske analize. Model nam nato pove, kateri faktorji so pomembni in kako vplivajo na naše rezultate. Rezultati so predstavljeni v obliki grafov, ki nam omogočajo lažjo prepoznavo odzivov na izbrane začetne pogoje.

Princip delovanja metode DoE temelji na izbranem referenčnem standardu ter reprezentativnih eksperimentih. Načrt si lahko predstavljamo v obliki kocke, v središču katere se nahaja standard, po prostoru kocke pa so razporejeni ostali poskusi.

Obstaja več vrst načrtovanja eksperimentov, odvisno od števila faktorjev, ki nas zanimajo. **Popoln faktorski načrt** je primeren za preiskovanje vpliva dveh ali treh faktorjev. Ta dizajn je namenjen rešetanju faktorjev in upošteva tri do pet ponovitev standarda oz. srednje točke kocke z namenom, da se določi eksperimentalna napaka. **Delni faktorski načrt** se prav tako v veliki meri uporablja pri dizajnu rešetanja faktorjev, prav tako pa tudi pri testu robustnosti. Poznamo pa še **sestavljen faktorski načrt**, ki se uporablja pri optimizaciji.

Faktorje lahko delimo na kontrolirane in nekontrolirane. Spremembe kontroliranih faktorjev opazimo in smo na le-te ustrezno pripravljeni, medtem ko nekontrolirane faktorje kot sta sobna temperatura in vlažnost težje ohranjamo pod nadzorom, obenem pa imajo ti faktorji lahko tudi nekontroliran vpliv na naš proces. Druga in obenem najpogostejša delitev faktorjev je na kvantitativne in kvalitativne. Pri tretji delitvi faktorjev pa se le-ti delijo na procesne faktorje in zmes faktorjev.

Pomembna stopnja pri načrtovanju eksperimenta je tudi izbira ustreznega regresijskega modela. Ločimo linearni, interakcijski ter kvadratni polinomski model. Najbolj kompleksen od naštetih je kvadratni, ki zahteva več eksperimentov od ostalih dveh modelov. Linearni pa je najbolj preprost z najmanj eksperimenti. Če je naš cilj optimizacija, potem imamo na voljo le kvadratni model. Pri rešetanju sta primerna tako linearni kot interakcijski, pri testu robustnosti pa uporabljamo linearni model.

Skupaj z regresijskim modelom izberemo v naslednji stopnji tudi eksperimentalni dizajn. Program MODDE predlaga ustrezen eksperimentalni dizajn za naš izbran problem na podlagi števila faktorjev, njihove narave, nivoja ter izbranega cilja.

Glavna prednost metode DoE je, da nam omogoča organiziran pristop s pomočjo katerega lahko izvajamo tako enostavne kot dokaj zapletene eksperimente. V primerjavi z drugimi pristopi je pri metodi DoE potrebno manjše število narejenih eksperimentov, s katerimi pa pridobimo bolj uporabne informacije kot pri drugih metodah, saj načrt že zajame vpliv vseh faktorjev (43).

2 NAČRT ZA DELO

V magistrski nalogi bomo proučili vpliv procesnih parametrov (čas nabrekanja ksantana, hitrost mešanja, homogenizacija, temperatura priprave, vrstni red dodajanja ksantana) na fizikalne lastnosti gela ksantana, ki jih bomo ovrednotili z reološkimi testi, z merjenjem gostote, sedimentacijo ter vizuelno kontrolo.

Pri načrtovanju eksperimentov bomo uporabili metodo DoE ter poskušali najti takšne parametre za izdelavo ksantanskega gela, da bi bil tehnološki postopek najbolj optimalen in ekonomičen.

Na podlagi literaturnih podatkov o vplivu procesnih parametrov na reološke lastnosti ksantanskega gela ter na podlagi izvedenih poskusov v laboratoriju bomo z metodo DoE postavili maksimalne in minimalne proučevane meje posameznih parametrov ter v okviru le teh testirali različne priprave gela. Le te bomo na koncu ovrednotili z različnimi metodami, sočasno pa bomo poskušali optimizirati tudi metodo centrifugiranja, ki so jo uporabili že v predhodni študiji, kjer so raziskovali vpliv pomožnih snovi in procesnih parametrov na reologijo ksantana. Želeli so namreč razviti analizno metodo, s katero bi ustrezno ovrednotili posedanje delcev, vendar jim zaradi variabilnosti rezultatov to ni uspelo.

Prav tako bomo preverili, če ima temperatura raztapljanja ksantana pri sobni oziroma pri povišani temperaturi različen vpliv na reološke rezultate. Poskušali bomo dokazati, da so reološke lastnosti ksantana enake po obeh postopkih.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Polisorbat 80 (Croda Chocques SAS)

Polisorbat 80, s kemičnim imenom polioksietilen 20 sorbitan monooleat, je hidrofilni neionski surfaktant, disperzno sredstvo, s karakterističnim vonjem in nekoliko grenkim okusom. Pri 25 °C je rumena oljnata tekočina. Uporablja se kot emulgator pri pripravi stabilnih O/V farmacevtskih emulzij, kot sredstvo za močenje pri peroralnih in parenteralnih suspenzijah ter v kozmetičnih in prehrabnih izdelkih. (44, 45).

3.1.2 Simetikon emulzija (DOW corning corporation USA)

Simetikon emulzija je emulzija tipa O/V. Vsebuje simetikon, ki je dispergirani v vodi. Simetikon je kemijsko zmes metiliranih linearnih silicijevih polimerov s ponavljajočo enoto $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$, stabiliziranih s končnimi trimetilsiloksi enotami $[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}-]$ in silicijevim dioksidom. Praktično je netopen v etanolu (95 %) in vodi. Tekoča faza je topna v benzenu, kloroformu in etru, silicijev dioksid pa v teh topilih ostane kot usedlina. V našem primeru vsebuje simetikon emulzija 30 % polidimetilsiloksana, ostalo pa predstavlja voda, silicijev dioksid, konzervansi ter emulgatorji. Simetikon emulzija se uporablja kot protipenilo v koncentracijah 1-50 ppm. Prisotna je tudi v antacidih kot sredstvo za razgradnjo tablet oz. kapsul (45).

3.1.3 Natrijev benzoat (Merck KGaA)

Natrijev benzoat z empirično formulo $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$ in molekulsko maso 144,11g/mol se nahaja v obliki belih granul oz. kristaliničnega rahlo higroskopičnega praška. Je brez vonja in ima neprijetno sladek-slan okus. Prvotno se uporablja kot antimikrobni konzervans v kozmetični, živilski in farmacevtski industriji. Uporablja se v koncentracijah 0,02–0,5 % v peroralnih aplikacijah, 0,5 % v parenteralnih izdelkih ter 0,1–0,5 % v kozmetičnih izdelkih. V nekaterih primerih se natrijev benzoat uporablja pred benzojsko kislino, saj ima boljšo topnost (45).

3.1.4 Natrijev citrat dihidrat (Merck KGaA)

Natrijev citrat dihidrat z empirično formulo $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in molekulsko maso 294,10 g/mol se nahaja v obliki belega kristaliničnega praška ali v obliki brezbarvnih kristalov, brez vonja, s slanim okusom in hladilnim učinkom. Primarno se uporablja za uravnavanje pH-ja

raztopin (0,3–2,0 %), pri takšnih koncentracijah pa se prav tako lahko uporablja tudi kot kelator ionov (45).

3.1.5 Citronska kislina monohidrat (Merck KGaA)

Citronska kislina monohidrat z molsko maso 210,14 g/mol ima empirično formulo $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$. Je v obliki brezbarvnih/prosojnih kristalov ali kot bel kristalinični prašek, brez vonja in z močnim kislim okusom. V farmaciji se uporablja kot sredstvo za uravnavanje pH-ja v koncentracijah od 0,1 do 2,0 % ter kot kelirajoče sredstvo v koncentracijah od 0,3 do 2 % (45).

3.1.6 Glicerol (Nordische oelwerke Walther Carroux)

V različnih farmakopejah ima glicerol različna poimenovanja, tako je v jugoslovanski farmakopeji poimenovan kot koncentriran glicerol, v evropski in britanski kot glicerol in v ameriški kot glicerol. Je v obliki higroskopske, viskozne tekočine, brez vonja in barve. V primerjavi s saharozo ima 0,6 – krat bolj sladek okus. V farmaciji se uporablja na širokem področju, in sicer v peroralnih, oftalmičnih, topikalnih in parenteralnih pripravkih. V peroralnih raztopinah se uporablja kot topilo (5,0–15,0 %), antimikrobno sredstvo (< 20 %) in agens za povečanje viskoznosti (45).

3.1.7 Ksantan (Danisco France SAS)

Ksantanski gumi je polisaharid naravnega izvora, in sicer ga proizvaja aerob *Xanthomonas campestris*. Nahaja se v obliki kremno- belega finega praška, brez vonja. Ima anionski značaj in ponavadi ni kompatibilen s kationskimi surfaktanti ali polimeri, saj povzročijo precipitacijo gumija. Široko se uporablja v peroralnih in topikalnih farmacevtskih formulacijah, kozmetiki in hrani kot suspendirajoče sredstvo (suspenzije z zadržanim sproščanjem, običajne suspenzije) in stabilizator. Uporablja pa se tudi kot zgoščevalo (45).

3.1.8 Maltodekstrin (Roquette freres)

Maltodekstrin predstavlja zmes glukoze, disaharidov in polisaharidov. Pridobiva se z delno hidrolizo škroba. Dekstrozni ekvivalent (DE) je vrednost, ki nam pove stopnjo hidrolize škroba in znaša pri tej zmesi manj kot 20. Zmes sladkorjev se pojavlja v obliki belega, rahlo higroskopičnega praška ali v obliki granul, ki so topne v vodi. V farmacevtskih izdelkih se uporablja kot sredstvo za oblaganje tablet oz. kot vezivo (45, 46, 47).

3.1.9 Titanov dioksid (Tioxide Europe SRL)

Titanov dioksid z empirično formulo TiO_2 in molekulsko maso 79,88 g /mol je bel, nehigroskopen, amorfni prašek, brez vonja in okusa. Kot bel pigment se zaradi visokega lomnega količnika izkorišča v peroralnih farmacevtskih formulacijah, kozmetiki (sončne kreme) in plastični industriji. V farmacevtskih izdelkih se titanov dioksid uporablja predvsem kot bel pigment za filmsko oblaganje, v suspenzijah, pri sladkornem oblaganju tablet ter želatinskih kapsulah (45).

3.1.10 Demineralizirana voda (Lek d. d.)

Voda, očiščena ionov, namenjena za farmacevtsko uporabo iz sistema Lek d.d.

3.2 Aparature

- ❖ 600 ml čaše
- ❖ Kovinske žličke
- ❖ Kapalke
- ❖ Čolnički za tehtanje
- ❖ Plastične epruvete Eppendorf; 1,5 ml
- ❖ 100 ml steklen valj
- ❖ Magnetno mešalo Yellow line MST digital, IKA, Nemčija
- ❖ Propelersko mešalo EUROSTAR power- b, IKA-WERKE, Nemčija
- ❖ Centrifuga Sigma 3-30 K, Sigma, Nemčija
- ❖ Tehnica VIBRA AJP, Shinko Denshi, Japonska
- ❖ Analitska tehnica METTLER TOLEDO AX205 DR, Mettler Toledo, Švica
- ❖ Precizna tehnica METTLER TOLEDO XS4002 S/M, Mettler Toledo, Švica
- ❖ Rotacijski reometer Haake Rheostress RS75, Thermo Scientific, ZDA
- ❖ Vodna kopel Haake A5B, Thermo Scientific, ZDA
- ❖ Homogenizator ULTRA-TURRAX T25, Ika, Nemčija

3.3 Metode

3.3.1 Postopek priprave vzorcev

Vzorci od N01 do N16

Pri vseh vzorcih smo uporabili enak tip propelerskega mešala ter vse pripravili v 600 ml steklenih čašah. Če je bil predpis za pripravo vzorca brez segrevanja, smo ga pripravili pri sobni temperaturi, drugače smo na koncu, ko so bile vse sestavine dodane v vzorec, vzorec segrevali še eno uro na vodni kopeli pri 90 °C. Kako smo postopali v primeru, ko smo dodajali ksantan kot prvi/zadnji, je natančneje obrazloženo v nadaljevanju. V vsakem primeru pa je bil ksantan dodan v vzorec sobne temperature. Če je bila predpisana hitrost 300 o/min, smo vse sestavine mešali pri tej hitrosti, enako smo naredili tudi, če je bila predpisana hitrost 900 o/min. Če je bila predpisana homogenizacija, smo homogenizirali 10 min pri 10000 o/min, drugače smo ta korak izpustili, prav tako smo pustili ksantan nabrekati 30 min, če je tako pisalo v predpisu, drugače smo nadaljevali po postopku brez nabrekanja. To je veljalo za vse vzorce od N01 do vključno vzorca N16, procesni parametri in postopek priprave za vsak vzorec so popisani v Preglednici I.

Izbor mešala, posode ter možnosti procesnih parametrov, ki smo jih spreminjali pri pripravi vzorcev, so bile naslednje:

Tip mešala: propelersko mešalo

Posoda: 600 ml steklena čaša

Hitrost mešanja: 300/900 o/min

Nabrekanje: DA 30 min/NE

Homogenizacija: 10 min pri 10 000 o/min/NE

Segrevanje vzorca/ temperatura: ena ura na vodni kopeli pri 90°C/NE (sobna temperatura)

Dodajanje ksantana: prvi/zadnji

Vzorci N17, N18 in N19, poskusi na sredini merjenja območij procesnih parametrov

Vzorci N17, N18 in N19 so bili vsi pripravljeni po enakem predpisu, saj so predstavljali sredino merjenih območij procesnih parametrov oz. so bili kazalci ponovljivosti metode. Pri

vseh vzorcih smo uporabili propellersko mešalo, 600 ml stekleno čašo ter spodaj našete parametre, ki pa so povzeti tudi v Preglednici I:

Hitrost mešanja: 600 o/min

Nabrekanje: 30 min

Homogenizacija: 10 min pri 10 000 o/min

Segrevanje: ena ura na vodni kopeli pri 57, 5 °C

Dodajanje ksantana: prvi

Preglednica I: Priprava vzorcev z izbranimi procesnimi parametri

Exp. Name	Run Order	Temperatura	Homogenizacija	Hitrost mešanja	Nabrekanje	Dodajanje ksantana
N01	1	25	Da	300	Da	Zadnji
N02	15	90	Da	300	Da	Prvi
N03	18	25	Ne	300	Da	Prvi
N04	4	90	Ne	300	Da	Zadnji
N05	2	25	Da	900	Da	Prvi
N06	19	90	Da	900	Da	Zadnji
N07	9	25	Ne	900	Da	Zadnji
N08	6	90	Ne	900	Da	Prvi
N09	8	25	Da	300	Ne	Prvi
N10	12	90	Da	300	Ne	Zadnji
N11	3	25	Ne	300	Ne	Zadnji
N12	5	90	Ne	300	Ne	Prvi
N13	7	25	Da	900	Ne	Zadnji
N14	11	90	Da	900	Ne	Prvi
N15	10	25	Ne	900	Ne	Prvi
N16	13	90	Ne	900	Ne	Zadnji
N17	14	57,5	Da	600	Da	Prvi
N18	17	57,5	Da	600	Da	Prvi
N19	16	57,5	Da	600	Da	Prvi

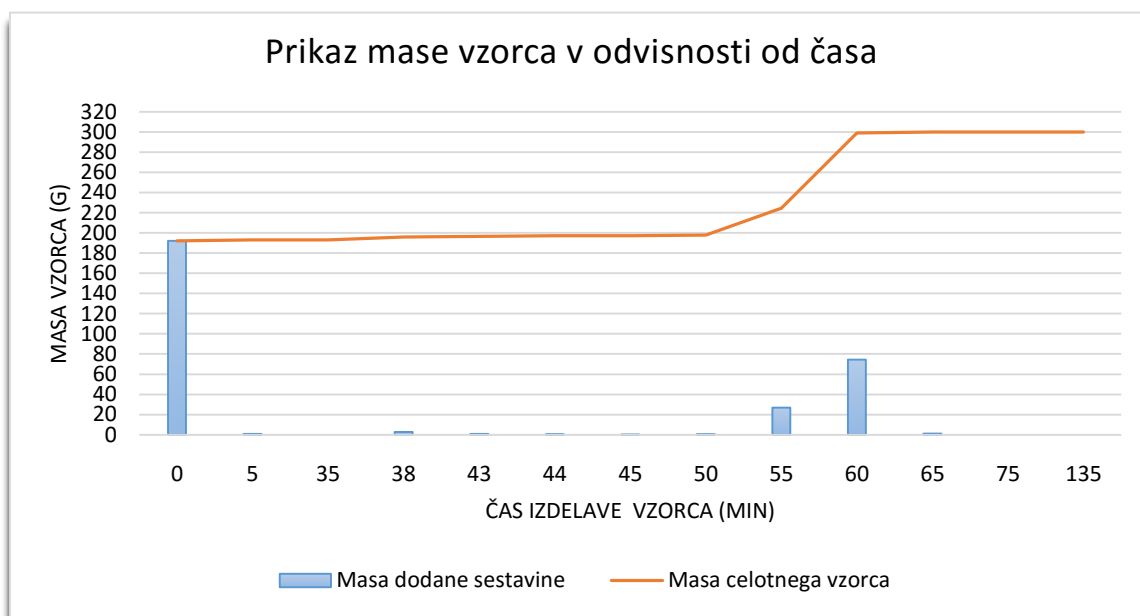
Za lažjo predstavo priprave vzorcev smo ponazorili postopek glede na dodajanje ksantana v vzorec kot prvega ali kot zadnjega, saj se je le v teh dveh primerih razlikoval vrstni red dodajanja sestavin. Postopek priprave vzorcev je bil sledeč:

❖ **1. Ksantan dodan prvi, vzorec izdelan pri sobni temperaturi**

Pri pripravi vzorcev, kjer je bil ksantan dodan prvi, smo ponazorili prikaz priprave v diagramu (Slika 6) za lažjo predstavitev ter pri tem sledili Preglednici II.

Preglednica II: Prikaz priprave vzorcev pod različnimi pogoji, če je bil ksantan dodan na začetku

Sestavina	Količina (g)	Čas mešanja dodane sestavine (min)	Celokupni čas izdelave vzorca (min)
Voda	192,221	/	0
Ksantan	0,807	5	5
Nabrekanje	/	30	35
Polisorbat 80	2,691	3	38
Simetikon emulzija	0,807	5	43
Na benzoat	0,538	1	44
Na citrat	0,161	1	45
Citronska kislina	0,404	5	50
Glicerol	26,906	5	55
Maltodekstrin	74,395	5	60
Titanov dioksid	1,076	5	65
Homogeniziranje	/	10	75
Segrevanje	/	60	135



Slika 6: Prikaz mase vzorca v odvisnosti od časa v obliki diagrama, ko je ksantan dodan prvi

❖ V 600 ml čašo smo dodali ustrezno količino vode po predpisu. Nad čašo smo ustrezno namestili propelersko mešalo tako, da je mešalo segalo približno 1 cm nad dno čaše. Nato smo na čolniček natehtali ustrezno količino gumi ksantana ter ga kvantitativno prenesli v čašo z vodo, ki se je mešala s propelerskim mešalom ob predpisanih obratih za vzorec iz Preglednice I. Vse skupaj smo nato mešali predpisan čas. Če je bilo predpisano nabrekanje (30 min), je le to vedno sledilo po prepisanem časovnem mešanju gumi ksantana.

❖ Po končanem času nabrekanja, oz. če ga ni bilo, smo nadaljevali z dodajanjem ostalih sestavin. Vsako snov smo posebej natehtali v čolniček ter kvantitativno prenesli v mešajoč se vzorec ter mešali predpisan čas.

❖ Če je bilo predpisano homogeniziranje, smo homogenizator namestili 1 cm od dna čaše, tako da sta bili v vzorcu potopljeni obe odprtini homogenizatorja ter homogenizirali predpisan čas pri predpisanih obratih. Če homogenizacija ni bila predpisana, smo ta del izpustili.

❖ Če je bilo predpisano segrevanje, smo vzorec postavili v segreto vodno kopel pri 57,5 °C oz. 90 °C ter ga segrevali eno uro ob predpisani hitrosti mešanja.

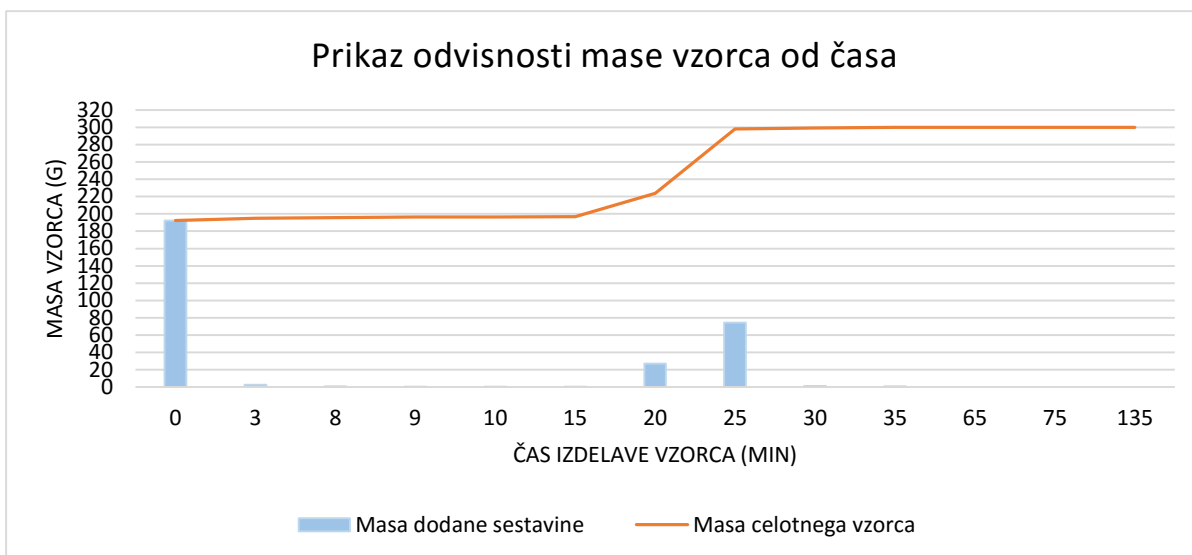
❖ 2. Ksantan dodan zadnji, vzorec izdelan pri sobni temperaturi

Če je bilo predpisano, da dodamo ksantan zadnji, smo sledili Preglednici III. Postopek priprave vzorcev je bil podoben kot je opisan pri zgornji točki (če je ksantan dodan prvi) le, da se je od prejšnje točke razlikoval v vrstnem redu dodajanja sestavin oz. procesnih parametrov.

Preglednica III: Prikaz priprave vzorcev pod različnimi pogoji, če je bil ksantan dodan na koncu

Sestavina	Količina (g)	Čas mešanja dodane sestavine (min)	Celokupni čas izdelave vzorca (min)
Voda	192,221	/	0
Polisorbat 80	2,691	3	3
Simetikon emulzija	0,807	5	8
Na benzoat	0,538	1	9
Na citrat	0,161	1	10
Citronska kislina	0,404	5	15
Glicerol	26,906	5	20
Maltodekstrin	74,395	5	25
Titanov dioksid	1,076	5	30
Ksantan	0,807	5	35
Nabrekanje	/	30	65
Homogeniziranje	/	10	75
Segrevanje	/	60	135

Prikaz priprave vzorcev, ki so imeli ksantan dodan kot zadnjo sestavino, pa je za lažjo predstavbo prikazan tudi v spodnjem diagramu (Slika 7).



Slika 7: Prikaz mase vzorca v odvisnosti od časa v obliki diagrama, ko je ksantan dodan zadnji

❖ 3. Vzorci, ki so bili segrevani

Vzorci, ki so imeli predpisano segrevanje na 90 °C, so bili pripravljeni enako kot je opisano v zgornjih postopkih. Dodatno smo na začetku ter koncu segrevanja stehali čašo z vzorcem ter izračunali količino izparele vode. Vzorcem smo po segrevanju na vodni kopeli dodali izparelo vodo. Ko smo v vzorec nato dodali vodo na sobni temperaturi, se je izparevanje vode iz vzorca ustavilo, saj se je celoten vzorec ohladil. Vzorce smo nato mešali 5-10 min na magnetnem mešalu.

Vzorci N20 do N24 pripravljeni z namenom izboljšanja modela in prikaza ponovljivosti metode

Vzorci od N20 do N24 so poskusi, pripravljeni z enakimi procesnimi parametri kot že zgoraj omenjeni vzorci. Njihov namen je bil izboljšati model ter pokazati ponovljivost metode. Tako je priprava vzorca N20 enaka pripravi N04 (le da v primeru vzorca N20 mešanja s propellerskim mešalom pri segrevanju na vodni kopeli ni bilo), N21 je enak kot N06, N22 je enak kot N08, N23 je enak kot N10 in N24 kot vzorec N12.

Vzorec N15 pripravljen pri obeh mejnih temperaturnih vrednostih

Z naključno izbranim vzorcem N15 smo želeli preveriti, ali je enako, če dodajamo ksantan v vzorec pri sobni temperaturi ter ga nato segrevamo, ali pa ga dodajamo v že ogret vzorec

na 90 °C. Postopek priprave vzorca N15 pri sobni temperaturi je opisan že v zgornjem postopku, za pripravo vzorca pri 90 °C pa je bil postopek sledeč:

- ❖ V 600 ml čašo smo natehtali ustrezno količino vode po predpisu. Čašo z vodo smo postavili v ogreto vodno kopel na 90 °C ter nad čašo ustrezno namestili propellersko mešalo, in sicer tako, da je mešalo segalo približno 1 cm nad dnom čaše. S termometrom smo izmerili temperaturo vzorca in ko je bila le- ta 90 °C, smo začeli z dodajanjem sestavin. Na čolniček smo natehtali ustrezno količino gumi ksantana ter ga kvantitativno prenesli v čašo z vodo, ki pa se je že mešala s propellerskim mešalom ob predpisanih obratih za vzorec iz Preglednice I (900 o/min). Vse skupaj smo nato mešali toliko časa, kot je razvidno iz Preglednice II.
- ❖ Nadaljevali smo z dodajanjem ostalih sestavin po enakem postopku kot je zgoraj že opisano pri dodajanju ksantana na začetku ter jih mešali predpisan čas.
- ❖ Ko smo v čašo dodali zadnjo sestavino, smo vzorec vzeli iz vodne kopeli ter počakali, da se ohladi. Odstotek izparele vode smo izračunali iz celokupne teoretične mase vzorca na začetku ter končne mase vzorca po segrevanju, ki pa smo jo lahko stehtali. K vzorcu smo dodali izračunano maso izparele vode ter mešali na magnetnem mešalu 5-10 min.

3.3.2 Ocena mejnih območij merjenja parametrov ter časovnih komponent pri izdelavi ksantanskega gela

Pri izdelavi vzorcev smo morali za proučevane procesne parametre določiti mejne vrednosti območja merjenja ter čas izvajanja določenih pogojev. Le te smo izbrali na podlagi literaturnih podatkov različnih študij, za nekatere pa smo morali sami eksperimentalno preveriti, do katere maksimalne in minimalne mejne vrednosti jih lahko izpostavimo.

Pri temperaturi smo določili kot minimalno temperaturo sobno temperaturo in maksimalno temperaturo 90 °C. Sobno temperaturo smo določili zato, ker je to običajna temperatura v laboratorijih, kjer se odvija postopek izdelave gela, 90 °C pa smo izbrali na podlagi študije, ki je že bila narejena za vpliv temperature na reologijo ksantana, in sicer so v tej študiji raziskovali vpliv temperature na ksantanski gel pri 80 °C (14). Odločili smo se, da preverimo, če je to res maksimalna vrednost, do katere se spremembe ksantanske molekule še odvijajo reverzibilno, zato smo za 10 °C povečali temperaturni interval.

Na podlagi literaturnih podatkov smo določili, da bomo vzorce nabrekli 30 min, izbira hitrosti mešanja vzorcev pa je bila naša eksperimentalna odločitev (48, 49, 50). Določili smo spodnjo mejo mešanja, in sicer 300 o/min, ko se je vzorec že začel ustrezno mešati ter zgornjo mejo 900 o/min, ko je bilo mešanje vzorca v čaši še mogoče in se suspenzija ni dvigala čez stene čaše.

Čas homogenizacije 10 min in hitrost 10000 o/min, čas dodajanja posameznih sestavin v suspenzijo ter čas segrevanja 1h smo določili na podlagi predhodnih izkušenj ter prejšnjih eksperimentalnih poskusov, ki so bili že narejeni na tem področju (50).

3.3.3 Izdelava vzorcev po principu DoE

Vzorce smo izdelali po principu DoE. Za naš načrt rešetanja faktorjev smo uporabili delni faktorski načrt ter linearni model. Program nam je naredil tabelo, kjer so bile pri vsakem vzorcu predpisane vrednosti spremenljivk ter pogoji, pri katerih smo nato izdelali vzorec. Spreminjali smo 5 faktorjev, katerih mejne minimalne in maksimalne vrednosti smo vnesli v program MODDE, le-ta pa nam je potem izdelal načrt priprave vzorcev (Preglednica I in IV).

Preglednica IV: Faktorji in njihovo območje merjenja

FAKTOR	OBMOČJE
Temperatura	Sobna temperatura; 90°C
Homogenizacija	Da; ne
Hitrost mešanja	300 o/ min; 900 o/min
Nabrekanje	Da; ne
Čas dodajanja ksantana	Prvi; zadnji

Program nam je predlagal tudi run order oz. zaporedje priprave vzorcev, tako da so bili le-ti naključno razporejeni. Z randomizacijo smo tako zmanjšali vpliv zunanjih dejavnikov in možnost napake, saj se razlike v delovnih pogojih kot so spremembe v vlažnosti zraka, sobne temperature, sestave materialov in drugih dejavnikov med samo pripravo vzorcev lahko spreminjajo in vplivajo na rezultate.

V Preglednici I so zajeti vsi vzorci, ki nam jih je predlagal program, vsak vzorec z vsemi kombinacijami maksimalnih in minimalnih vrednosti posameznega parametra. Tako smo lahko hkrati opazovali vpliv več faktorjev hkrati oz. njihovo soodvisnost. Zadnji trije vzorci imenovani tudi kot poskusi v centralni točki, N17, N18 in N19, so bili vzorci pripravljeni na enakih pogojih z enako izbranimi procesnimi parametri. Njihovi pogoji so namreč ustrezali

sredini merjenih območij procesnih parametrov. S tem smo določili eksperimentalno napako oz. ponovljivost metode.

Ker smo proučevali 5 procesnih parametrov, smo morali upoštevati delni faktorski načrt s 16 načrtovanimi poskusi, ki predstavlja alternativo 2^5 popolnemu faktorskemu načrtu z 32 poskusi. Za alternativo smo se odločili zato, ker se popolni faktorski načrt večinoma ne uporablja v industrijski praksi, saj bi le-ta zahteval preveliko število izdelanih poskusov za enako količino dobljenih informacij. Pri popolnem faktorskem načrtu bi morali s k številom proučevanih parametrov narediti $N=2^k$ poskusov, torej v našem primeru s petimi preiskovanimi faktorji 32 poskusov, mi pa smo se zato odločili za delni faktorski načrt s 16 poskusi, kakor je označeno s krepkim tiskom tudi v Preglednici V (43).

Preglednica V: Pregled števila poskusov za delni in popolni faktorski načrt za število preiskovanih faktorjev od 2 do 10 (povzeto po 43)

Število preiskovanih faktorjev (k)	Število poskusov Popoln faktorski načrt	Število poskusov Delni faktorski načrt
2	4	/
3	8	4
4	16	8
5	32	16
6	64	16
7	128	16
8	256	16
9	512	32
10	1024	32

Kot je razvidno iz Preglednice V, se z večanjem preiskovanih faktorjev število poskusov močno zvečuje, zato bi bilo s popolnim faktorskim načrtom realno narediti le poskuse za do 4 preiskovane faktorje. Nasprotno so pri delnem faktorskem načrtu poskusi v bolj obvladljivi različici, zato smo tudi v našem primeru izbrali delni faktorski načrt, ki je zahteval 16 narejenih poskusov ter 3 dodatne poskuse z enakimi pogoji za ovrednotenje ponovljivosti modela in rezultatov.

3.3.4 Reološke metode

Reološko merjenje vzorcev temelji na dveh testih, s katerimi smo ovrednotili naše vzorce. Prvi je test pri konstantni frekvenci oscilacije, pri katerem se spreminja amplituda strižnih sil na vzorec in nam omogoča meritve v območju deformacij. S tem testom smo v petdesetih točkah narejenih meritev vzorca ob različnih amplitudah določili območje linearnosti. S točko kritične vrednosti, kjer območje naprej ni več linearno, začnejo vrednosti dinamičnih količin padati, kar pomeni da je tu prehod iz linearnega v nelinearno viskoelastično obnašanje.

Z drugim testom, testom pri konstantni amplitudi in spreminjajoči frekvenci, pa merimo lastnosti snovi v območju nedestruktivnih pogojev in iz teh meritev dobimo informacije o stopnji geliranosti, tipu mikrostrukture, premreženosti polimerov,... Za disperzije je ta test manj informativen, lahko pa nam poda informacijo o roku uporabnosti. Če je $G' > G''$ pri nizkih frekvencah, bi morali v disperziji zaradi takšne gelske strukture delci plavati na površju in ne sedimentirati (51, 52).

Postopek merjenja z rotacijskim reometrom Haake Rheostress RS75 :

❖ Pri merjenju smo uporabljali merilni sistem stožec-plošča. Vzorce smo rahlo premešali ter nalili na ploščo reometra, tako da je bil prostor med ploskvama reometra zapolnjen z vzorcem. Merili smo pri reži približno 0,095 mm, natančno razdaljo reže je določil reometer sam. Vzorce smo merili pri spodaj opisanih pogojih.

Pogoji merjenja:

Nastavljena temperatura: $T = 23,00\text{ °C} \pm 0,20\text{ °C}$

Oscilacijski amplitudni test: $\tau = 0,05000 - 100,0\text{ Pa}$

$$\omega = 1,000\text{ Hz}; T = 23,00\text{ °C}$$

Oscilacijski frekvenčni test: $\tau = 0,2500\text{ Pa}$

$$\omega = 0,01000\text{ Hz} - 20,00\text{ Hz}; T = 23,00\text{ °C}$$

Pri merjenju smo spremljali naslednje parametre: G' , G'' , točko prekrížanja ($G' = G''$) ter $|\eta^*|$.

3.3.5 Obdelava DoE podatkov

S pomočjo programa MODDE smo izdelali 4 grafe za vsak proučevan parameter ter tako lažje razbrali vpliv posameznih procesnih parametrov nanj. Pri tem smo uporabili metodo multiple linearne regresije (MLR).

Prvi graf pri vsakem od posameznih parametrov se imenuje graf ponovitev in nam omogoča hiter pregled variabilnosti poskusov. Če je variacija znotraj posameznega poskusa veliko manjša od celotne variacije vseh eksperimentov, potem lahko zaključimo, da ta napaka ne vpliva na analizo podatkov in je model dober.

Drugi graf predstavlja vsebino vrednosti vseh parametrov skupaj ter prikazuje statistične parametre R^2 , Q^2 , veljavnost ter ponovljivost. Za nas sta pomembna R^2 in Q^2 . R^2 predstavlja ujemanje modela z našimi podatki. Vrednosti so med 0 in 1, kjer predstavlja 0 zelo slab model in 1 odličen model. Če dosežemo vrednost $R^2 = 1$, potem ležijo točke v grafu opazovanih vrednosti v odvisnosti od pričakovanih na premici. Q^2 pa je dejansko najbolj pomemben pokazatelj tistega, kar nas najbolj zanima, torej uporabnosti modela. Pove nam njegovo napovedno moč, torej kako dobro lahko podatke z njim napovemo. Da je model dober, se smatra, da so vrednosti statističnih parametrov v okviru naslednjih vrednosti: razlika med R^2 in $Q^2 < 0,2$ - $0,3$; $Q^2 > 0,5$; veljavnost $> 0,25$ ter ponovljivost $> 0,5$.

Tretji graf, graf koeficientov, ima pomembno vlogo pri interpretaciji modela. Sestavljen je iz intervala zaupanja, ki je pokazatelj signifikantnosti posameznih parametrov, prav tako pa je uporaben za določanje najbolj pomembnih faktorjev vpliva. Če interval zaupanja zajema ničlo ($y=0$), potem je ta parameter statistično nesignifikanten. Tak parameter lahko izbrišemo in podatke znova zmodeliramo. Najožji interval zaupanja, ki si ga želimo pri našem modelu, se doseže z idealnim dizajnom, modelom z nizkim RSD in dovolj eksperimenti.

Zadnji oz. četrti graf pri vsakem proučevanem parametru pa je graf rezidualov. Reziduali predstavljajo razliko med opaženo in pričakovano vrednostjo. S tem grafom najlažje najdemo eksperimente, ki izstopajo. Točke, ki jih predstavljajo posamezni vzorci, so razporejene v premico in vsako točko, ki ne leži blizu te premice, lahko privzamemo kot izstopajočo. Pri tem je treba omeniti, da je za verodostojne rezultate potrebnih vsaj 12 do 15 narejenih poskusov, saj v nasprotnem primeru skozi točke težko narišemo premico. Pri izstopajočih točkah si lahko pomagamo z stranskimi intervali, ki kažejo na še dovoljene

izstopajoče točke oz. nas opozarjajo, kdaj moramo ukrepati. Opozorilna meja je $\pm 3SD$ in meja, kjer moramo ukrepati $\pm 4SD$. To pomeni, da so vse točke, ki se nahajajo znotraj intervala $\pm 3SD$ dobre za model in jih lahko obdržimo, vse točke zunaj intervala $\pm 4SD$ pa statistično signifikantno odstopajo in je bolje, da jih zavržemo (43).

3.3.6 Metoda merjenja gostote

Vzorcem smo izmerili gostote s 100 ml steklenim valjem, in sicer tako, da smo vzorec nalili v valj do 100 ml in stehali maso vzorca. Tako smo iz mase in volumna po formuli za gostoto (Enačba 9) izračunali gostoto v g/ml ter za vsak vzorec naredili tri meritve.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad \text{Enačba 9}$$

3.3.7 Sedimentacijska metoda

Želeli smo tudi ovrednotiti morebitne razlike med vzorci in njihovimi usedlinami oz. kako dobra gelska struktura gela ksantana se tvori pri posamezni izbiri procesnih parametrov. Sedimentacijska metoda je bila uporabljena že v študiji, kjer so hoteli določiti optimalne pogoje centrifugiranja, ki bi omogočili, da bi v vzorcih dobili največ sedimenta (50).

To jim ni popolnoma uspelo, saj v nobenem vzorcu ni bilo možno točno in ponovljivo določiti deleža sedimenta.

Postopek naše sedimentacijske metode je bil sledeč:

Izmerili smo mase praznih plastičnih epruvet ter nato odpipetirali vanje približno 1 ml homogenega vzorca ($\sim 2,1$ g), ki je bil predhodno zmešan na magnetnem mešalu (približno 5-10 min). Ponovno smo stehali plastično epruveto z vzorcem. Vzorce smo nato centrifugirali pri 28 000 rpm, 30 min pri sobni temperaturi. Nato smo supernatant iz plastičnih epruvet odlili ter trikrat z demineralizirano vodo sprali stene epruvete, da je v epruveti na dnu ostala le še usedlina brez supernatanta. Odprte plastične epruvete smo nato postavili v stojala ter izmerili njihovo maso čez tri dni. Tako smo dobili maso epruvete in usedline, s čimer smo lahko izračunali delež usedline pri posameznem vzorcu. Za vsak vzorec smo naredili tri paralelke.

3.3.8 Vizuelna kontrola

Vzorce smo po izdelavi s prostim očesom pregledali ter jih presejali skozi sito $710 \mu\text{m}$, da smo lažje opazili morebitne skupke nehidratiranega ksantana v vzorcu. Če so skupki pri sejanju ostali na situ, smo le-te nato dali nazaj v vzorec.

4 Rezultati in razprava

4.1 Rezultati reoloških meritev

Pri vzorcih, ki so bili segrevani, smo morali v našem primeru upoštevati tudi delež izparele vode ter ga ustrezno nadomestiti. Vzorcem, ki so se na vodni kopeli mešali pri 300 o/min je izparelo približno 25% začetne mase, vzorcem mešanim na 900 o/min pa okoli 39% začetne mase.

Vzorci, ki so bili testirani na vodni kopeli pri 90 °C, se v povprečnih vrednostih elastičnih in viskoznih modulov ne razlikujejo bistveno od preostalih vzorcev narejenih na sobni temperaturi. Prav tako so podobne vrednosti segrevanih vzorcev z nesegrevanimi pri viskoznosti in točki prekrivanja, kar prikazujeta Preglednici VI in VII .

Preglednica VI: Prikaz povprečnih vrednosti reoloških parametrov pri segrevanih vzorcih

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]
N02	2,7080	1,5471	0,4964	1,411
N04	3,0472	1,6665	0,5528	1,514
N06	3,0604	1,6612	0,5542	1,500
N08	2,9786	1,6231	0,5399	1,465
N10	2,6725	1,5575	0,4923	1,423
N12	2,4772	1,5037	0,4612	1,383
N14	3,2635	1,7407	0,5887	1,570
N16	2,5131	1,4186	0,4593	1,290
N20	2,3166	1,4511	0,4351	1,353
N21	3,3022	1,7425	0,5942	1,577
N22	2,4582	1,5661	0,4639	1,460
N23	2,7029	1,5389	0,4950	1,394
N24	2,8212	1,6536	0,5205	1,512
Povprečje	2,7940	1,5900	0,5118	1,450

Preglednica VII: Prikaz povprečnih vrednosti reoloških parametrov pri vzorcih izdelanih na sobni temperaturi

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]
N01	3,1334	1,6805	0,5659	1,523
N03	3,1747	1,6638	0,5705	1,481
N05	3,2492	1,7466	0,5871	1,569
N07	3,2249	1,7002	0,5802	1,531
N09	3,0590	1,6670	0,5545	1,516
N11	2,2387	1,3384	0,4151	1,234
N13	3,2108	1,7262	0,5802	1,559
N15	2,5113	1,4387	0,4604	1,313
Povprečje	2,9753	1,6202	0,5392	1,466

Povprečni vrednosti elastičnega modula pri segrevanih in nesegrevanih vzorcih se razlikujeta za 0,1813 Pa, medtem ko se povprečni viskozni modul med vzorci, pripravljenimi na sobni temperaturi ter tistimi segretim na 90 °C, razlikuje za 0,0301 Pa. Razlika v povprečni viskoznosti je 0,0274 kg/m*s, povprečna vrednost točke prekrivanja pa se med segrevanimi in nesegrevanimi vzorci razlikuje za 0,0156 Pa.

Tako lahko sklepamo, da so spremembe pri segrevanju ksantana do 90 °C reverzibilne ter da temperatura raztopine, v katero dodamo ksantan, ne vpliva na reologijo le-tega. To potrdi tudi statični F test, ki pokaže enakost varianc ter t-test, ki pokaže, da so razlike med vzorci nesignifikantne.

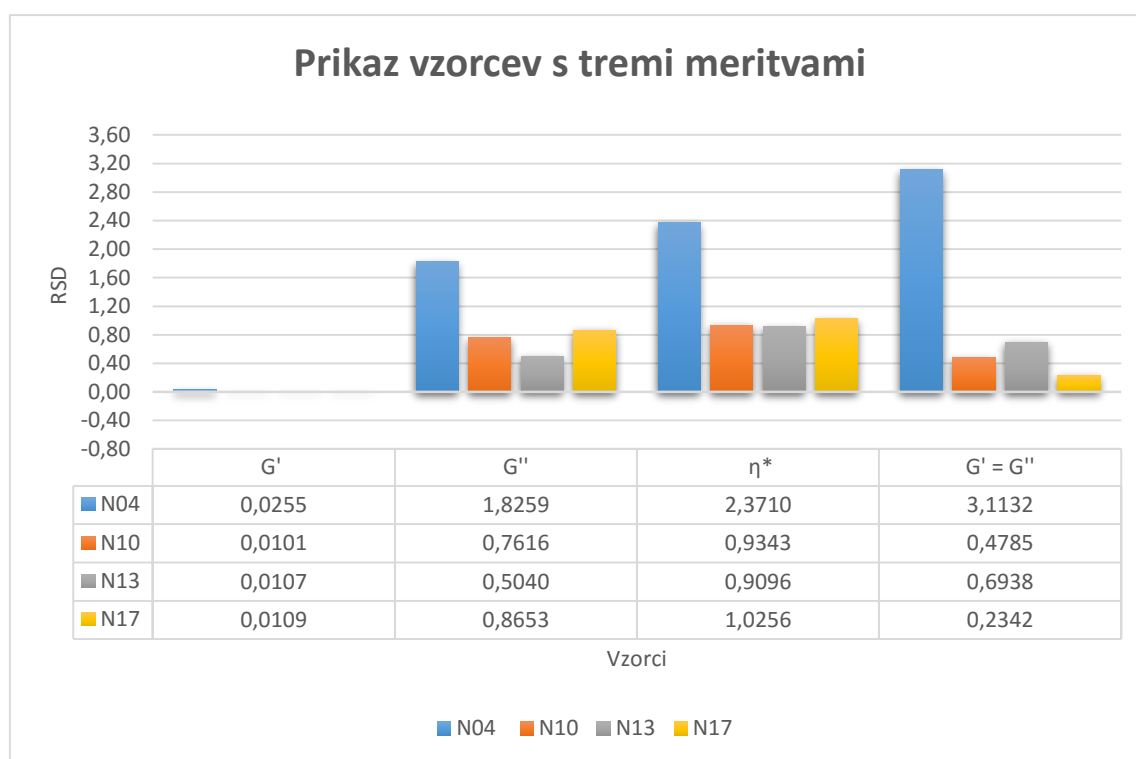
V študijah je opisano, da so bili poskusi narejeni pri dodajanju ksantana v segreto raztopino na 80 °C, mi pa smo vzorce segrevali šele na koncu po dodatku vseh surovin, vključno s ksantanom (14). V enem od poskusov smo preverili tudi morebitno razliko, če vzorec segrevamo na koncu oz. če vzorec izdelamo s segreto disperzijo na 90 °C. Rezultati reoloških meritev so pokazali naslednje povprečne vrednosti elastičnega, viskoznega modula, viskoznosti ter točke prekrivanja (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Prikaz izmerjenih reoloških parametrov vzorca N15 narejenega pri obeh mejnih temperaturnih območjih

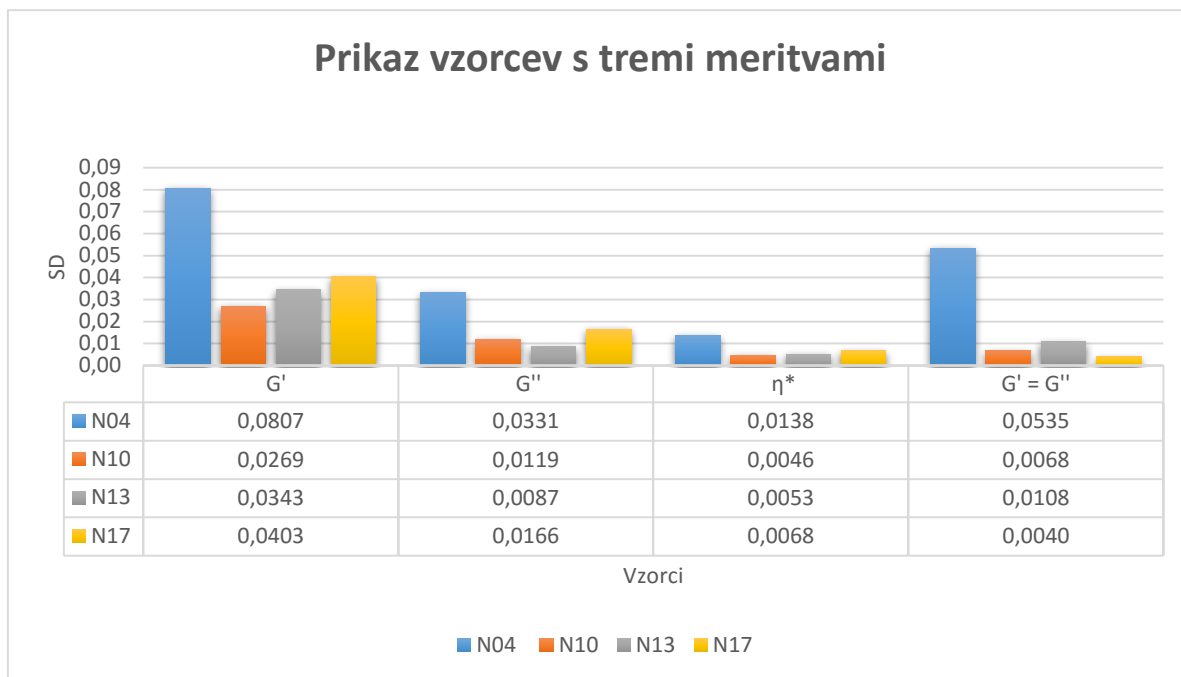
Vzorec N15	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]
N15 sobna temp.	2,5113	1,4387	0,4604	1,313
N15 90°C	2,0002	1,4287	0,3912	1,361
Razlika med vzorcema	0,5111	0,0100	0,0692	0,048

Ker imamo le dve meritvi vzorca N15 izdelanega pri dveh različnih pogojih, statistično ne moremo dokazati ali so razlike med njima signifikantne ali ne, lahko pa opazimo iz teh meritev, da so razlike med njima največje pri elastičnem modulu in kompleksni viskoznosti. Elastični modul je namreč pri vzorcu, pri katerem smo dodali ksantan v disperzijo sobne temperature, večji kot v primeru ksantana dodanega v že segret vzorec na 90 °C. To se sklada z literaturnimi podatki, ki navajajo, da pri povišani temperaturi pride do denaturacije ksantanske molekule, ki pa se ob ohlajanju povrne v renaturirano obliko. Takšna renaturirana oblika je bistveno manj strukturirana, kar kaže na manjši elastični modul, saj je takšen gel slabše premrežen in sestavljen iz več nedokončanih zavojev, ki prosto segajo izven molekule (27). Višja kompleksna viskoznost vzorca izdelanega pri sobni temperaturi je posledica višjega elastičnega modula, kar sledi iz definicije kompleksne viskoznosti, ki je odvisna od kompleksnega modula, le ta pa od elastičnega in viskoznega (33) .

Vzorci, ki smo jih pripravili z metodo DoE, smo pomerili z reometrom ter pri tem naredili dva testa; test pri konstantni amplitudi ter test pri konstantni frekvenci. Zanimale so nas vrednosti, ki smo jih pridobili s testom pri konstantni frekvenci in spreminjajoči amplitudi, saj smo s tem testom določili linearno viskoelastično območje ter povprečne vrednosti elastičnih, viskoznih modulov, točke prekrivanja $G' = G''$ ter kompleksne viskoznosti posameznega vzorca. Pri vsakem vzorcu smo naredili povprečje sedmih točk, in sicer od tretje do desete po vrsti merjenja, saj so bile tu vrednosti modulov pri vseh vzorcih konstantne. Nekatere vzorce smo pomerili trikrat, da smo s tem pokazali ponovljivost meritev. Primer vzorcev, ki so bili izmerjeni trikrat ter njihova ponovljivost, glede na RSD in SD, je razvidna s Slike 8 in 9.



Slika 8: Prikaz izmerjenih reoloških parametrov vzorcev s tremi meritvami in RSD za vse 4 merjene parametre



Slika 9: Prikaz izmerjenih reoloških parametrov vzorcev s tremi meritvami in SD za vse 4 merjene parametre

RSD je bil pri vseh ponovljenih vzorcih relativno nizek, t.j. do 3 %, standardna deviacija pa do 0,08. Ker so bile razlike med posameznimi vzorci dosti večje (RSD čez 14 % in SD 0,146), sklepamo, da meritve niso signifikantno vplivale na rezultate modela.

Rezultati sredinskih vzorcev, ki nakazujejo na ponovljivost meritev, so prikazani v Preglednici IX.

Preglednica IX: Rezultati reoloških meritev ponovljenih vzorcev

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]	CrossOver*T [Pa]
N17	3,692	1,9177	0,6621	1,725	3,763
N18	3,4872	1,8358	0,6272	1,667	3,537
N19	3,5863	1,8877	0,645	1,709	3,645
Povprečje	3,5885	1,8804	0,6448	1,7003	3,6483
SD	0,1024	0,0414	0,0175	0,0300	0,1130
RSD [%]	2,8541	2,2035	2,7066	1,7617	3,0983

RSD za vzorce N17, N18 in N19, pripravljene po enakem postopku, je nizek, približno 3 %, standardna deviacija pa doseže največjo vrednost 0,11, kar pomeni, da so meritve ponovljenih vzorcev relativno dobre in kažejo na dobro ponovljivost metode.

Po reoloških meritvah smo dobili sledečo tabelo z naslednjimi vrednostmi (Preglednica X).

Preglednica X: Rezultati reoloških meritev vseh vzorcev

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]	CrossOver*T [Pa]	Skupki ksantana
N01	3,1334	1,6805	0,5659	1,523	3,135	0
N02	2,7080	1,5471	0,4964	1,411	2,709	0
N03	3,1747	1,6638	0,5705	1,481	3,257	0
N04	3,0472	1,6665	0,5528	1,514	3,101	1
N05	3,2492	1,7466	0,5871	1,569	3,320	0
N06	3,0604	1,6612	0,5542	1,500	3,080	0
N07	3,2249	1,7002	0,5802	1,531	3,241	1
N08	2,9786	1,6231	0,5399	1,465	3,055	0
N09	3,0590	1,6670	0,5545	1,516	3,098	0
N10	2,6725	1,5575	0,4923	1,423	2,656	0
N11	2,2387	1,3384	0,4151	1,234	2,196	1
N12	2,4772	1,5037	0,4612	1,383	2,486	0
N13	3,2108	1,7262	0,5802	1,559	3,266	0
N14	3,2635	1,7407	0,5887	1,570	3,356	0
N15	2,5113	1,4387	0,4604	1,313	2,582	0
N16	2,5131	1,4186	0,4593	1,290	2,537	0
N17	3,6920	1,9177	0,6621	1,725	3,763	0
N18	3,4872	1,8358	0,6272	1,667	3,537	0
N19	3,5863	1,8877	0,6450	1,709	3,645	0
N20	2,3166	1,4511	0,4351	1,353	2,262	1
N21	3,3022	1,7425	0,5942	1,577	3,377	0
N22	2,4582	1,5661	0,4639	1,460	2,448	0
N23	2,7029	1,5389	0,4950	1,394	2,670	0
N24	2,8212	1,6536	0,5205	1,512	2,876	0
Povprečje	2,9537	1,6364	0,5376	1,487	2,986	
SD	0,4058	0,1460	0,0674	0,1238	0,4360	
RSD	13,7372	8,9194	12,5324	8,329	14,603	
Max. vrednost	3,6920	1,9177	0,6621	1,725	3,763	
Min. vrednost	2,2387	1,3384	0,4151	1,234	2,196	

Kot je razvidno iz Preglednice X, od vseh vzorcev najbolj odstopa vzorec N11.

Skupki nehidratiranega ksantana se po izdelavi opazijo pri vzorcih N04, N07, N11 in N20. Le- ti sčasoma, ko vzorec stoji, razpadejo. Vzorca N07 in N11 smo pomerili presejana, ko sta vsebovala skupke nehidratiranega ksantana, in čez čas, nepresejana, ko so te skupki razpadli. Razlike v reoloških meritvah med presejanim in nepresejanim vzorcem prikazujeta Preglednici XI in XII .

Preglednica XI: Prikaz reoloških meritev za presejan in nepresejan vzorec N07, pomejen ob različnem času po nastanku izdelave

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]	CrossOver*T [Pa]
N07_nepresejan (7.6.2016)	3,3877	1,7717	0,6084	1,6950	2,9450
N07_nepresejan (7.6.2016)	3,4765	1,8111	0,6239	1,7120	3,0790
N07_nepresejan (9.6.2016)	3,5047	1,7914	0,6264	1,6770	3,1490
N07_nepresejan (11.7.2016)	3,2249	1,7002	0,5802	1,5310	3,2410
N07_presejan (11.7.2016)	3,2432	1,7241	0,5846	1,5440	3,2970
Povprečje	3,3674	1,7597	0,6047	1,6318	3,1422
SD	0,1293	0,0464	0,0216	0,0871	0,1384
RSD	3,8405	2,6353	3,5647	5,3371	4,4056

RSD do 5,34 % pri točki prekrivanja modulov kaže na dokaj majhne razlike med meritvami glede na čas merjenja vzorca N07. Meritve smo statistično ovrednotili tudi s F in t- testom. S F testom smo postavili dve hipotezi, in sicer ničelno o enakosti varianc ter alternativno, da so variance med seboj statistično različne. Dokazali smo enakost varianc, t-test pa nam je pokazal, da so meritve, narejene z enomesečnim zamikom, signifikantno različne pri naslednjih parametrih: elastičnem modulu, viskoznem modulu, viskoznosti ter točki prekrivanja obeh modulov (Crossover). Pri teh parametrih so bile razlike med meritvami z enomesečnim zamikom signifikantno različne. Pri točki prekrivanja pri določeni strižni napetosti (Crossover*T) pa smo sprejeli ničelno hipotezo ter s tem zaključili, da variance med seboj niso signifikantno različne.

Preglednica XII: Primerjava reoloških meritev med presejanim in nepresejanim vzorcem N11, pomejenim ob različnem času po nastanku izdelave

Vzorec	G' [Pa]	G'' [Pa]	η [Pas]	CrossOver [Pa]	CrossOver*T [Pa]
N11_presejan (9.6.2016)	1,6200	1,2085	0,3217	1,2020	0,7528
N11_presejan (9.6.2016)	1,6220	1,1838	0,3196	1,1640	0,9080
N11_presejan (9.6.2016)	1,6585	1,2009	0,3259	1,1840	0,9313
N11_nepresejan (11.7.2016)	2,2387	1,3384	0,4151	1,2340	2,1960
Povprečje	1,7848	1,2329	0,3456	1,1960	1,1970
SD	0,3031	0,0711	0,0464	0,0297	0,6707
RSD	16,9829	5,7663	13,4360	2,4841	56,0288

RSD 56,03 % in SD do 0,67 pri vzorcu N11 prikazujeta opazno razliko v reoloških meritvah pri presejanem/nepresejanem vzorcu po določenem času. Pri slednjem vzorcu se viskoznost pri staranem vzorcu poveča na račun razpadlih skupkov nehidratiranega ksantana, kar pa ne

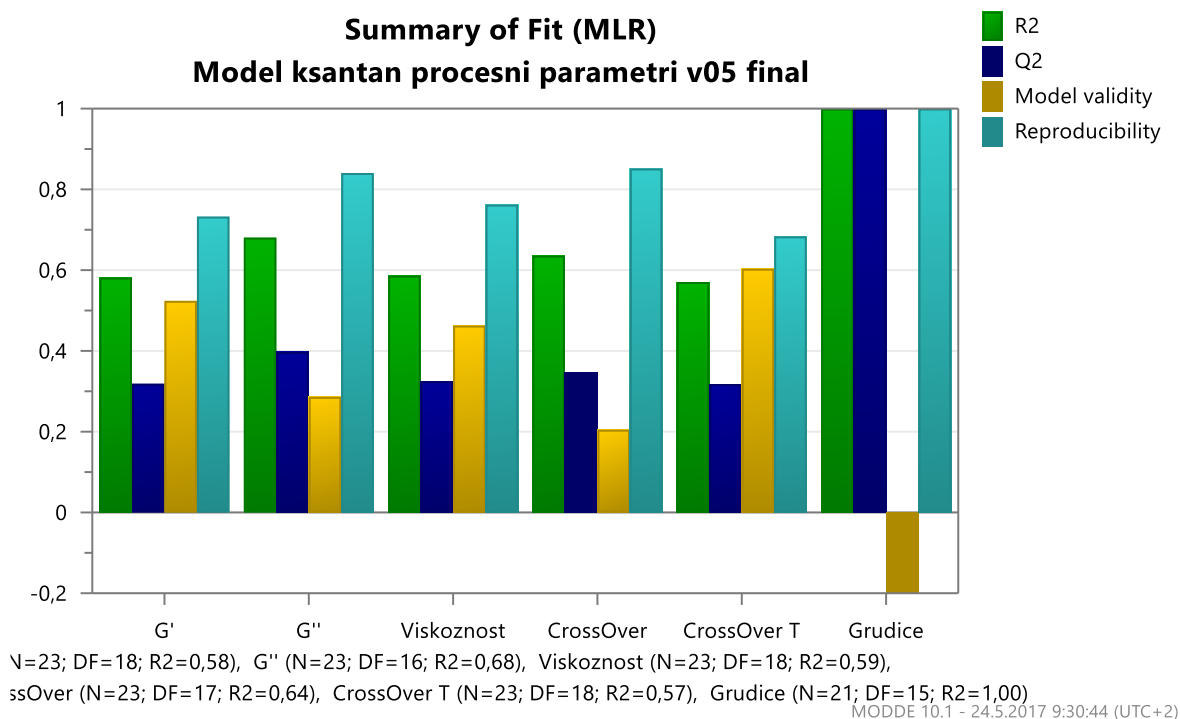
drži za vzorec N07, pri katerem se viskoznost po razpadu skupkov še malo zmanjša. Po enomesečnem merjenju od prve narejene meritve tako v vzorcu N11 ni bilo več skupkov, zato sklepamo, da bi bila meritev presejanega vzorca tako kot pri vzorcu N07 podobna nepresejani. Prav tako se pri staranem vzorcu povečajo vse ostale vrednosti, tako elastičnega in dinamičnega modula kot tudi točke prekrivanja obeh modulov ter strižne napetosti, pri kateri se zgodi prekrivanje. Ker postopek merjenja vzorcev ni bil standardiziran in so bili vzorci pomerjeni ob različnem času po nastanku izdelave, lahko sklepamo, da na reološke meritve verjetno vpliva tudi čas, kdaj po izdelavi je bil vzorec pomejen. Vendar so razlike med temi meritvami manjše od razlik med meritvami posameznih vzorcev (razvidno iz RSD in SD vrednosti iz Preglednic X in XI) zato lahko zaključimo, da te razlike signifikantno ne vplivajo na naše modele. Prav tako je bilo presenetljivo, da pri vzorcu N07 razpad skupkov ksantana ni vodil do povečanja viskoznosti kot na primer pri vzorcu N11, iz česar lahko sklepamo, da na reologijo vzorcev poleg časa vplivajo tudi drugi parametri, ki smo jih proučevali v okviru naloge. Pri metodi DoE smo uporabili tako v primeru vzorcev N11 in N07 meritvi staranih vzorcev, ko so skupki nehidratiranega ksantana razpadli. Reološki meritvi smo izvedli na nepresejanih vzorcih tako kot pri vseh ostalih vzorcih, kjer je bila začetna meritev že ustrezna, saj vzorcev ni bilo potrebno presejati. V nasprotnem primeru merjenje vzorca s skupki ksantana zaradi nehomogenosti le-tega ni bilo mogoče.

S programom MODDE smo dobili grafični prikaz vseh proučevanih parametrov, ki so nam omogočali boljši vpogled v statistično obravnavo dobljenih rezultatov. Šest grafov je predstavljalo posamezne proučevane parametre, graf na Sliki 10 pa skupek vseh dobljenih rezultatov povzetih v enem grafu.

Vsak graf je predstavljen s štirimi pokazatelji, ki nam podajo informacijo o tem, kako dober je posamezen model. Prvi pokazatelj R^2 predstavlja ujemanje modela z našimi podatki, Q^2 napovedno moč modela, veljavnost modela prikazuje ustreznost izbranega modela v splošnem ter četrti pokazatelj prikazuje ponovljivost modela.

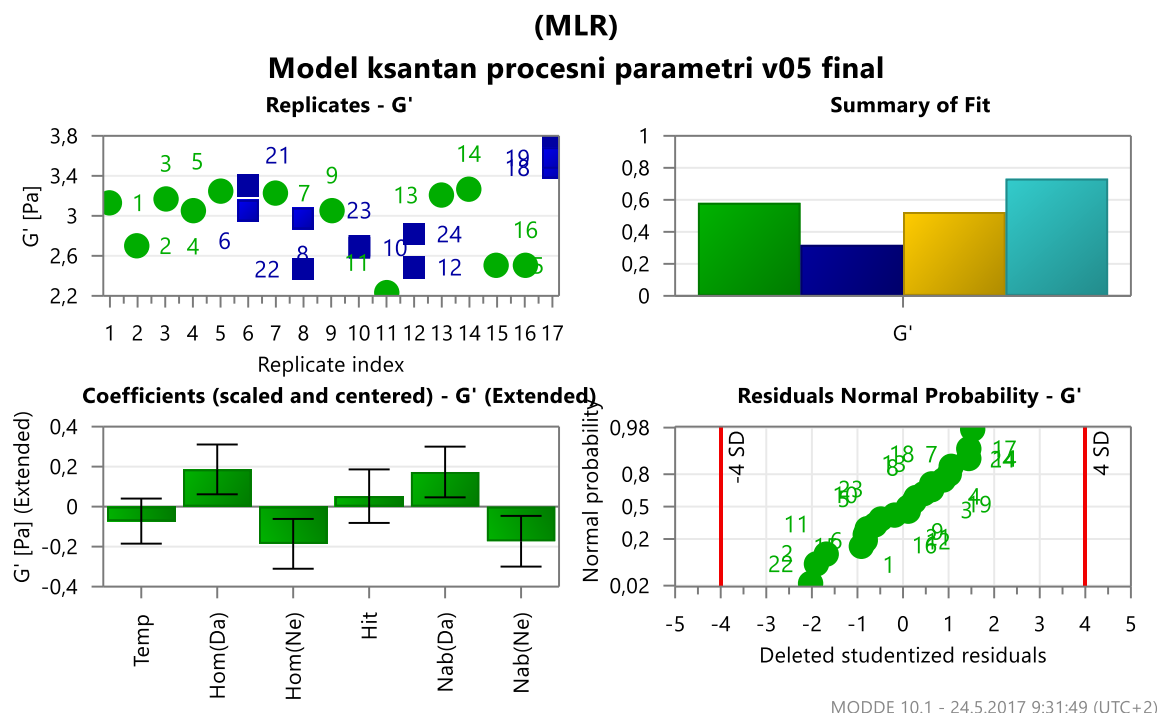
Dober model mora imeti pokazatelje v okviru naslednjih referenčnih vrednosti:

- ❖ razlika $R^2 - Q^2 < 0,2 - 0,3$;
- ❖ $Q^2 > 0,5$;
- ❖ veljavnost $> 0,25$;
- ❖ ponovljivost $> 0,5$ (43).



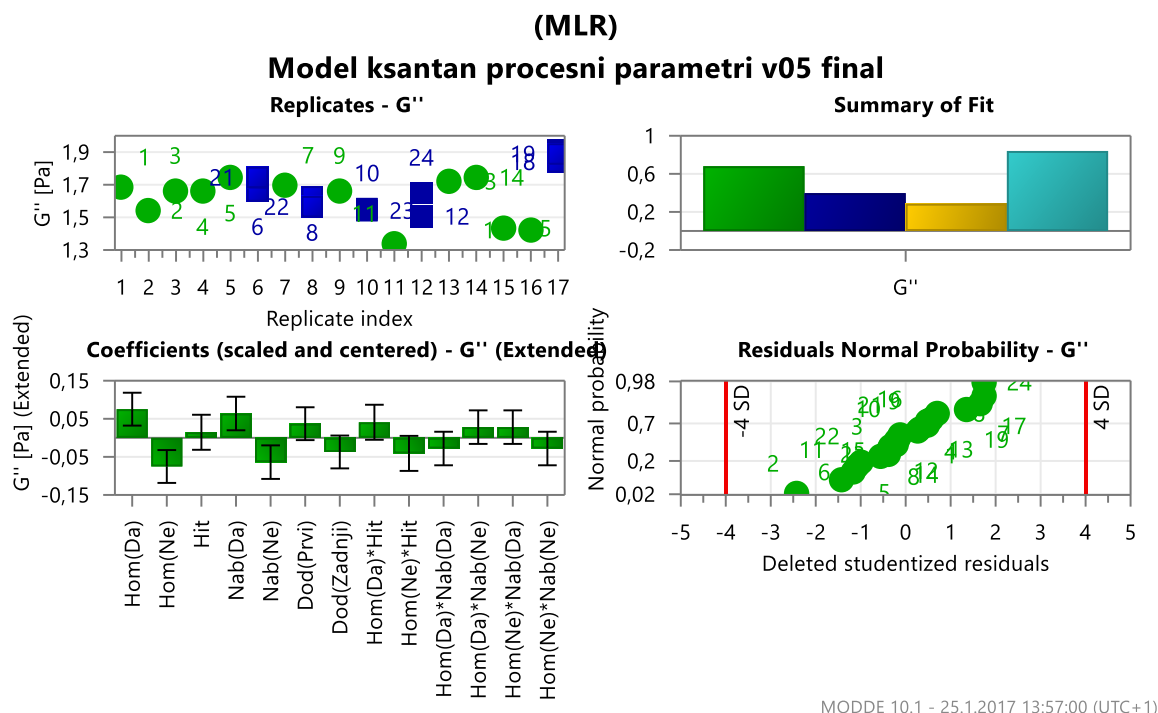
Slika 10: Grafični prikaz reoloških parametrov za vse izdelane vzorce (elastični modul, viskozni modul, viskoznost, točka prekrivanja, točka vpliva prekrivanja in temperature, pojav skupkov nehidratiranega ksantana)

Iz grafa na Sliki 10 lahko razberemo, da ima največji R^2 pojav skupkov nehidratiranega ksantana, kar pomeni, da se tu model najbolj ujema z našimi podatki, poleg tega pa je tu tudi največja napovedna moč modela, kar prikazuje najvišji Q^2 ter najvišja dosežena ponovljivost. Omenjen model pa ima negativno veljavnost, kar pomeni, da model še vedno ni dovolj dober za napovedovanje iskanega vpliva prametra. Čeprav je kriterij ponovljivosti dosežen pri vseh modelih, veljavnost pa ni dosežena le pri modelu točke prekrivanja elastičnega in viskoznega modula, z danimi modeli ne moremo v celoti razložiti vseh vplivov procesnih parametrov na reologijo ksantanskega gela. Posledično je napovedna moč modelov zato manjša.



Slika 11: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na elastični modul

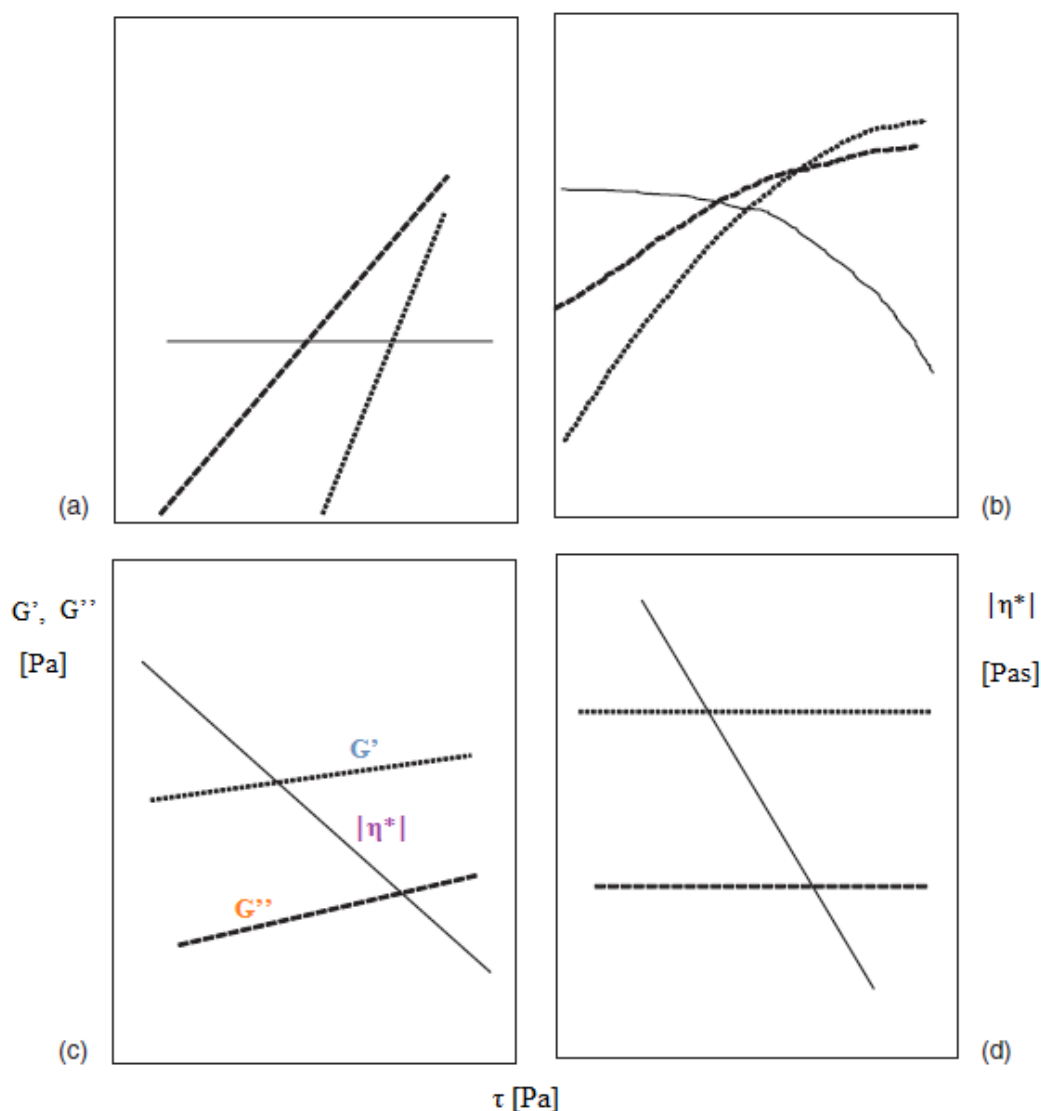
Slika 11 povzema rezultate vpliva procesnih parametrov na elastični modul. R^2 ima vrednost 0,581 in Q^2 0,319. Razlika med njima znaša 0,262, veljavnost modela $> 0,25$, prav tako tudi ponovljivost ustreza kriterijem za dober model, saj je večja od 0,5. Vrednost Q^2 , ki prikazuje napovedno moč modela pa je manjša od 0,5, kar pomeni, da z našim modelom za napovedovanje vpliva procesnih parametrov na elastični modul lahko le v 32 % napovemo njihov vpliv na reologijo ksantanskega gela. Iz grafa koeficientov opazimo, da ima na elastični modul največji vpliv homogenizacija. Graf rezidualov ne pokaže izstopajočih vrednosti, saj večina poskusov leži približno na premici, ki gre skozi točko 0,50 %.



Slika 12: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na viskozni modul

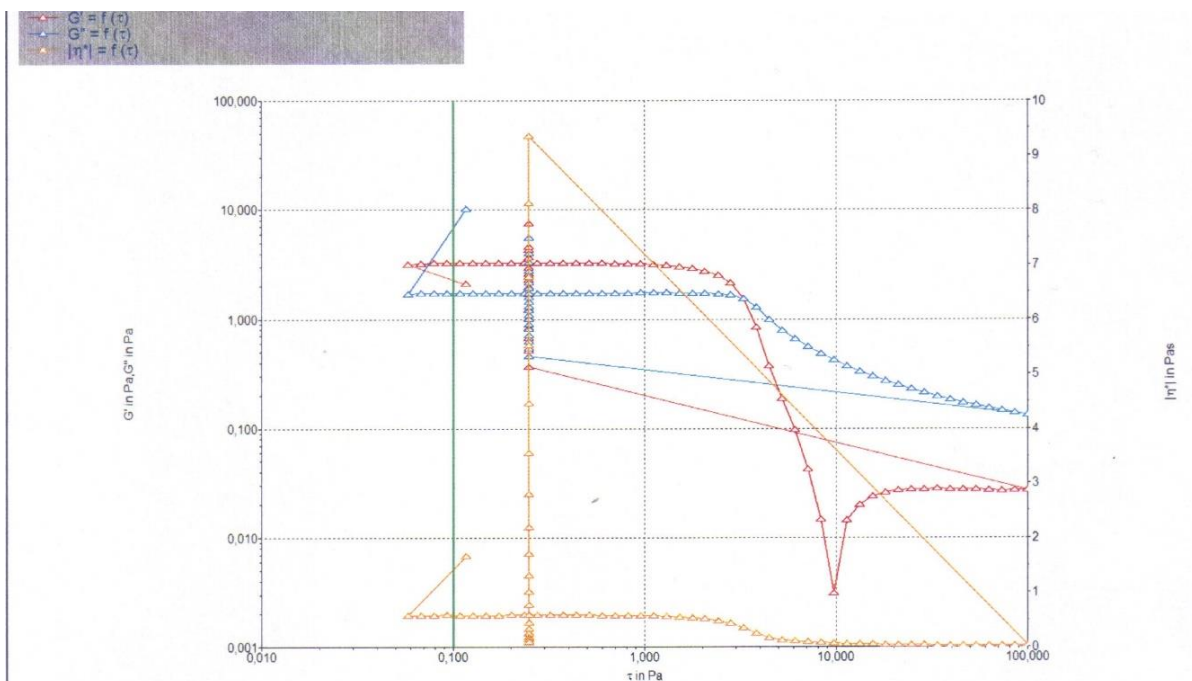
Vpliv proučevanih procesnih parametrov na viskozni modul prikazuje Slika 12. R^2 ima vrednost 0,681, Q^2 pa 0,397. Razlika med njima je 0,284, kar ustreza referenčnim vrednostim za dober model. Napovedna moč modela za G'' je slaba, saj Q^2 ni večji od 0,5, kar pomeni, da je model za napovedovanje vpliva parametrov ustrezen v 40%. Ponovljivost je dobra, saj je večja kot 0,5, vendar lahko zaključimo, da ima model v splošnem slabo napovedno moč. Tako kot na elastični modul, ima tudi na viskozni modul največji vpliv homogenizacija, nato pa ji po vplivu sledi nabrekanje. Graf rezidualov ne pokaže izstopajočih meritev.

Iz trenda spektrov vrednosti elastičnih in viskoznih modulov smo lahko razbrali ali gre pri našem ksantanskem gelu za močan ali šibek gel. Na podlagi značilnih krivulj za razredčeno raztopino, premrežene gele ter šibke in močne gele smo z našimi rezultati potrdili, da spada ksantanski gel med šibke gele (Sliki 13 in 14).

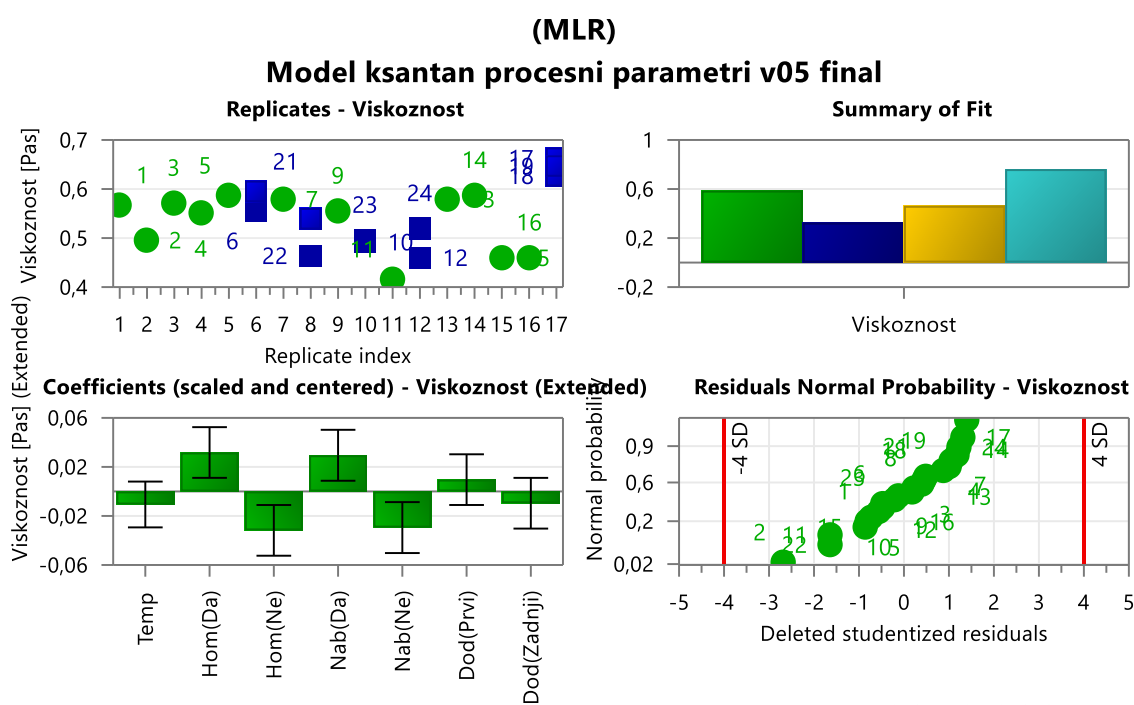


Slika 13: Frekvenčna odvisnost elastičnega, viskoznega modula ter kompleksne viskoznosti za vodne polisaharidne sisteme. Spekter a) razredčena raztopina, b) premrežen gel, c) šibek gel, d) močan gel (prirejeno po 12).

Čeprav bi po našem spektru izmerjenega naključnega ksantanskega vzorca N07 težko ločili ali je šlo pri našem vzorcu za močan ali šibek gel, če podrobno pogledamo, vidimo, da krivulji G' in G'' nista povsem vzporedni, zato smo opredelili naš gel kot šibek (Slika 14).



Slika 14: Spekter elastičnega, viskoznega modula ter kompleksne viskoznosti za naključno izbran vzorec N07



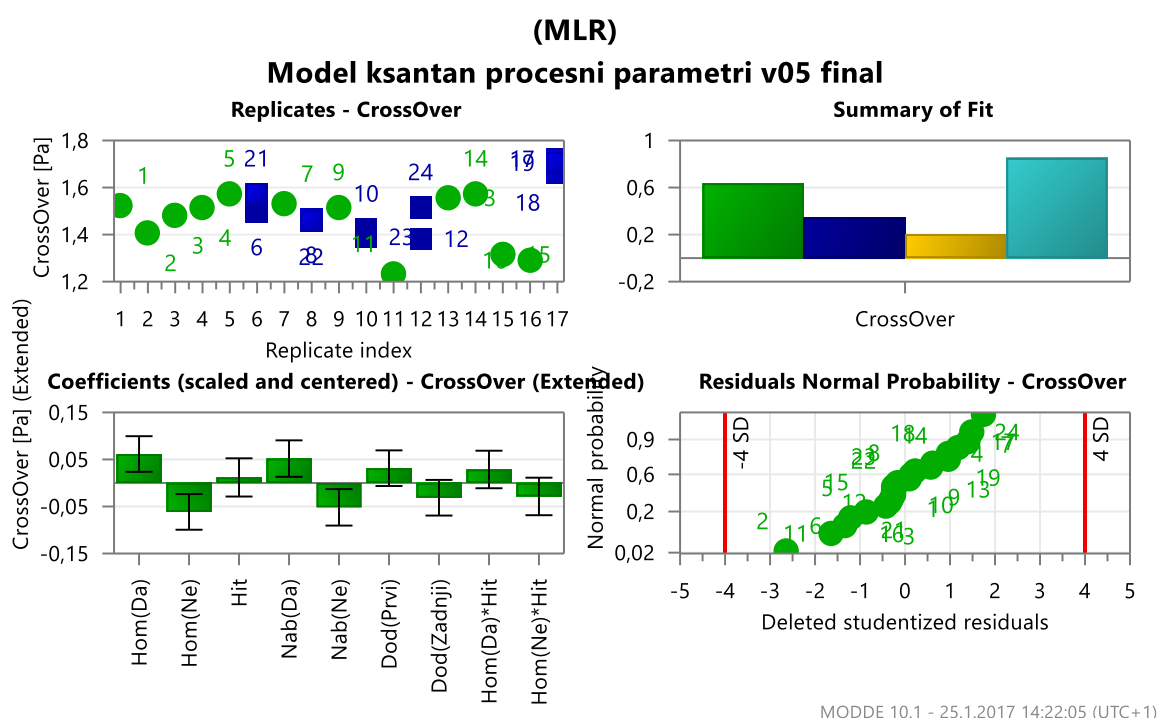
MODDE 10.1 - 25.1.2017 14:18:06 (UTC+1)

Slika 15: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na viskoznost

Slika 15 povzema rezultate vpliva procesnih parametrov na viskoznost.

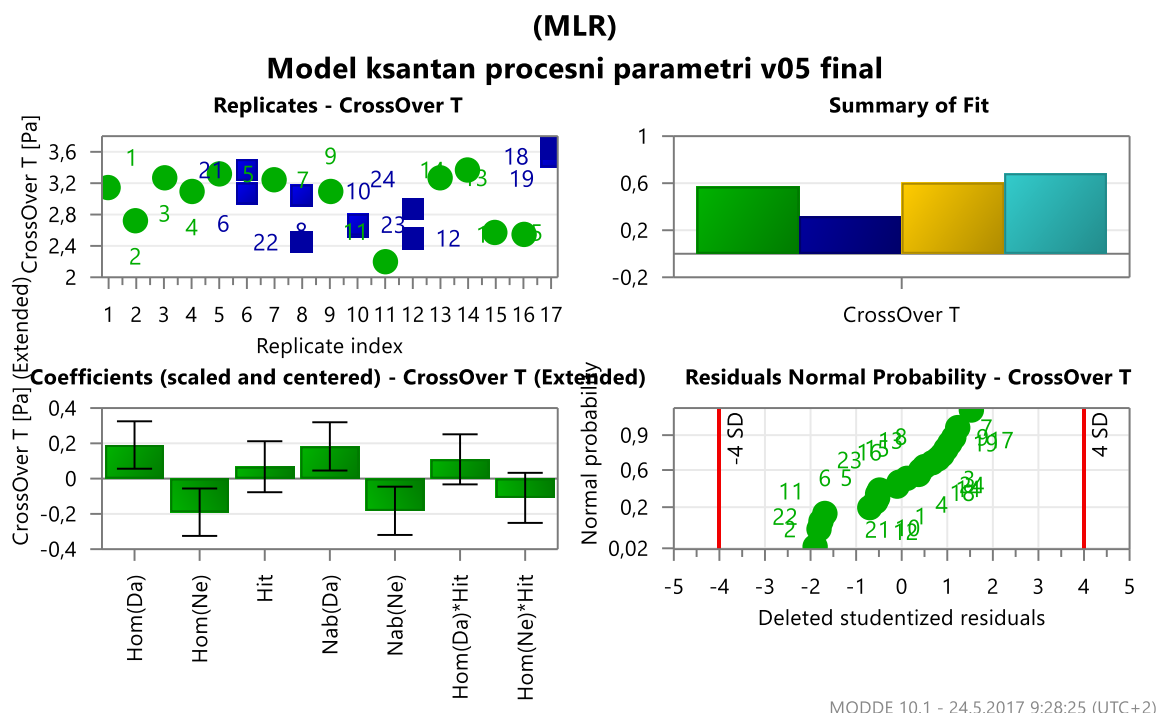
Graf vpliva procesnih parametrov na viskoznost ima vrednosti R^2 0,587 in Q^2 0,325. Njuna medsebojna razlika 0,262 ustreza referenčni vrednosti za dober model. Veljavnost in ponovljivost sta ustrezni, vendar pa Q^2 pod 0,5 prikazuje slabo napovedno moč modela. Graf koeficientov nam prikazuje, da ima največji vpliv na viskoznost homogenizacija ter na drugem mestu nabrekanje. Graf rezidualov ne pokaže izstopajočih vrednosti.

Spodnja slika povzema rezultate vpliva procesnih parametrov na točko prekrivanja elastičnega ter viskoznega modula (Slika 16).



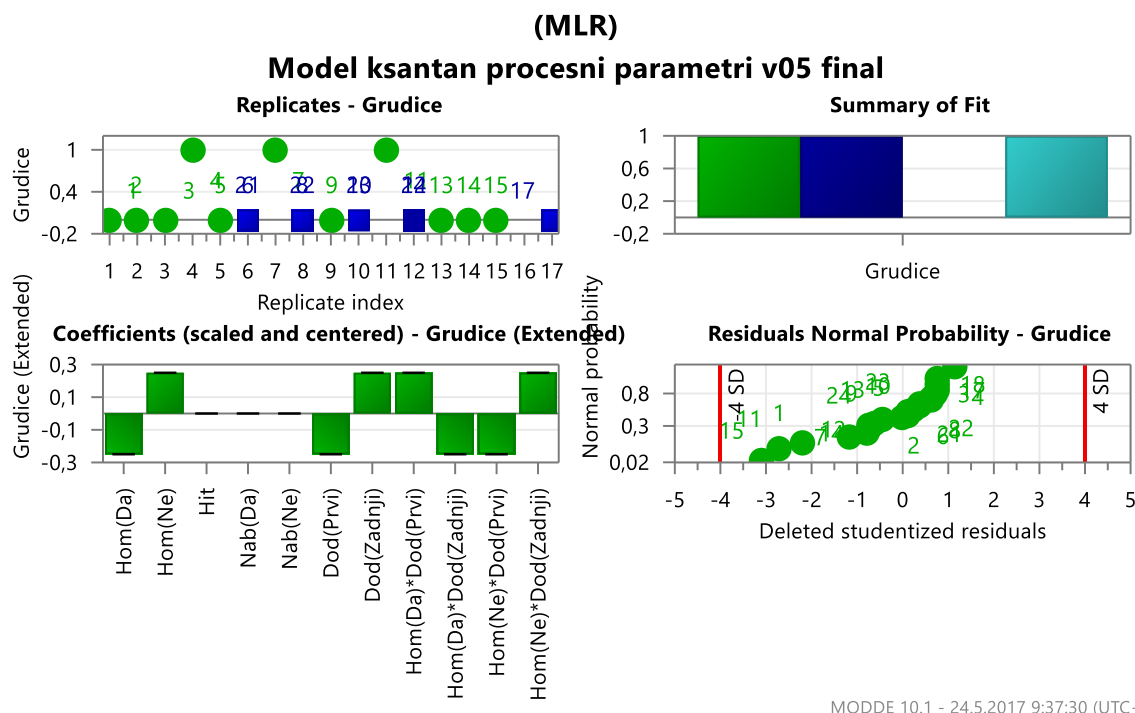
Slika 16: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na točko prekrivanja

Model za napovedovanje vpliva procesnih parametrov na točko prekrivanja ima vrednosti R^2 0,636 in Q^2 0,204. Razlika med R^2 in Q^2 je 0,432, kar je večje od priporočil za dober model. Prav tako priporočilom ne ustreza napovedna moč modela, saj je vrednost manjša od 0,25 (0,204). Čeprav je ponovljivost dobra, pa so vsi ostali indikatorji izven mej priporočil, zato je ta model izmed vseh naših modelov najslabši, saj z njim lahko le v 20% napovemo vpliv procesnih parametrov na reologijo. Iz grafa koeficientov razberemo, da ima na točko prekrivanja največji vpliv homogenizacija ter nato nabrekanje.



Slika 17: Grafični prikaz strižne napetosti, pri kateri pride do točke prekrivanja elastičnega in viskoznega modula

Slika 17 povzema rezultate vpliva procesnih parametrov na strižno napetost, pri kateri pride do prekrivanja elastičnega in viskoznega modula. R^2 ima vrednost 0,571, napovedna moč modela Q^2 pa dosega vrednost 0,318, kar še vedno ne ustreza kriterijem za dobro napovedovanje vplivov. Statistično nesignifikanten vpliv na to, pri kateri strižni napetosti bo prišlo do točke prekrivanja, imajo vsi parametri, katerih intervali zaupanja potekajo skozi $y=0$, torej temperatura, hitrost mešanja, čas dodajanja, interakcija temperature in nabrekanja ter interakcija homogenizacije in nabrekanja. Velik vpliv pa ima homogenizacija. Model ima v splošnem dobro veljavnost in ponovljivost, vendar zaradi slabše napovedne moči lahko le v 32 % napovemo vpliv parametrov na strižno napetost pri točki prekrivanja.



MODDE 10.1 - 24.5.2017 9:37:30 (UTC+2)

Slika 18: Grafični prikaz vpliva procesnih parametrov na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana

Slika 18 prikazuje grafe vpliva procesnih parametrov na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana, s katerimi dosežemo najvišje želene R^2 , Q^2 , in ponovljivost, saj so vrednosti vseh treh indikatorjev 1. Veljavnosti ni mogoče izračunati, kar nakazuje, da model mogoče ni ustrezen. Vrednost N16 je pri grafu rezidualov izstopala iz območja 4SD, kar smo upoštevali pri modelu ter ga ponovno zmodelirali brez slednjega vzorca. Neustrezna veljavnost modela je lahko posledica prisotnosti izstopajočih vrednosti, neustreznega modela oz. problema v transformaciji pri modelu. Prav tako lahko pride do tako nizke veljavnosti tudi pri zelo dobrem modelu, če so ponovitve skoraj identične oz. je model preveč občutljiv (53).

Na podlagi vseh DoE modelov lahko zaključimo, da ima od vseh procesnih parametrov tako na elastični modul kot tudi na viskozni modul, viskoznost, točko prekrivanja obeh modulov ter strižno napetost pri kateri se zgodi to prekrivanje, največji vpliv homogenizacija. Po vplivu ji sledi nabrekanje, medtem ko vsi ostali parametri nimajo signifikantnega vpliva. Modeli imajo ustrezno ponovljivost ter dobro ujemanje z našimi podatki, vendar pa je boljši pokazatelj dobrega modela Q^2 , ki pa je pri vseh teh modelih nizek. Pri modelu vpliva procesnih parametrov na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana ima največji vpliv homogenizacija ter čas dodajanja ksantana v disperzijo. Naši modeli pri načrtovanju vpliva procesnih parametrov na ksantanski gel ne dosegajo vseh referenčnih vrednosti, zato za

napovedovanje vplivov niso najprimernejši, omogočajo pa vpogled v vpliv posameznih parametrov ter oceno njihove pomembnosti.

O vplivu homogenizacije na ksantanski gel v literaturi nismo našli podatkov, vendar smo predvidevali, da homogenizacija dobro vpliva na končno disperzijo ksantana. Vzorcem, pri katerih smo uporabili homogenizator in jih 10 min homogenizirali pri 10 000 o/min, v nobenem primeru niso na koncu nastali skupki slabo hidratiranega ksantana, ki so za končni izdelek nezaželen pojav. Skupki ksantana so sicer v tistih vzorcih, pri katerih so nastali, sčasoma razpadli (po približno enem tednu do štirinajst dni), vendar pa je nastanek takšnih skupkov takoj po izdelavi vzorcev moteč dejavnik, saj onemogoča enakomerno odmerjanje v končne vsebnike. Z DoE grafov lahko razberemo, da imata homogenizacija kot tudi čas dodajanja ksantana v disperzijo pomemben vpliv na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana. Z reološkimi testi smo pri omenjenih vzorcih s pojavom skupkov ksantana opazili, da se pri vzorcu N11 pojavi izrazito odstopanje od ostalih vzorcev v nižjih vrednostih dinamičnih modulov, prav tako izstopa v najnižji viskoznosti in najnižji vrednosti točke prekrivanja elastičnega in viskoznega modula, kar nakazuje na najšibkejšo gelsko strukturo izmed vseh testiranih gelov. Vrednosti dinamičnih modulov se namreč manjšajo z manjšim številom in močjo interakcij med molekulami polimera. Točka prekrivanja pri nizki amplitudi pa se pojavlja pri šibkeje strukturiranih gelih, kar se odraža v vzorcu N11 (27). Vzorec N11 je bil namreč pripravljen z izborom kombinacije procesnih parametrov, za katere DoE grafi kažejo v prid nastanka skupkov nehidratiranega ksantana. Pri vzorcu N11 ni bilo prisotne homogenizacije, prav tako je bil ksantan v disperzijo dodan zadnji, nabrekanje ni bilo prisotno. Sodeč po grafu vpliva procesnih parametrov na pojav skupkov ksantana, sta prva dva parametra najpomembnejša za nastanek skupkov, medtem ko nabrekanje vpliva na ostale merjene parametre. Z vidika tvorbe gela predvidevamo, da se je pri tem vzorcu tvorila najslabša gelska rešetka, saj je to razvidno tudi iz sedimentacijske metode, kjer se ta vzorec statistično signifikantno razlikuje od ostalih po največji masi sedimenta. Metoda merjenja gostot ni pokazala signifikantnega izstopanja vzorca N11, z vizuelno kontrolo in sejanjem skozi sito 710 μm pa smo potrdili pojav skupkov slabo hidratiranega ksantana.

Hitrost mešanja se kot procesni parameter pri naših rezultatih ni pokazal kot signifikantno pomemben pri vplivu na reološke lastnosti gela ksantana. V naši magistrski nalogi smo testirali dve mejni območji, in sicer mešanje pri 300 o/min ter mešanje pri 900 o/min. Po

pregledu literature smo našli nekaj podatkov o vplivu hitrosti mešanja na naravni polisaharid agar gel, ki se prav tako kot ksantan uporablja za zgoščevanje raztopin in kot stabilizator. V tej študiji so pripravili 1% in 3% agar gel. Izpostavili so ju različnim pogojem kot so: priprava gela brez mešanja, mešanje pri 400 o/min ter pri 900 o/min. Ugotovili so, da so bili geli, ki so bili pripravljeni z mešanjem, močnejši v primerjavi s tistimi, pri katerih mešanja ni bilo. Prav tako so ugotovili, da je imel agar gel, ki je bil mešan pri največji hitrosti (900 o/min), največje vrednosti elastičnega modula. Poleg hitrosti mešanja so v tej študiji proučevali še vpliv koncentracije agarja na konstrukcijo gela in kot pričakovano, so nastali močnejši geli pri višji koncentraciji. Vsi geli, mešani pri 900 o/min, so v tej študiji izkazovali vrednosti elastičnega modula precej nad vrednostmi viskoznega, kar nakazuje na izrazito elastičnost proučevanih gelov. Na podlagi rezultatov so predvidevali, da agar pri višji hitrosti mešanja tvori več superheliksov in s tem močnejše premreženje (54). Iz naših rezultatov zgoraj omenjenega ne moremo potrditi pri gelu ksantana, saj vrednosti elastičnega ali viskoznega modula niso nakazovale razlik med vzorci mešanimi pri različnih hitrostih. To smo lahko razbrali iz reoloških testov kot tudi iz sedimentacijske metode in metode merjenja gostot.

Naslednje od proučevanih procesnih parametrov je bilo nabrekanje ksantana. Pri tem smo imeli dve možnosti priprave, ali smo vzorec pustili 30 min nabrekati ali pa nabrekanja po dodatku ksantana ni bilo. V zadnjem primeru se je po predpisanem času mešanja ksantana v disperzijo dodala nova sestavina. Ker je ksantan v območju od pH 3 do pH 10 zelo obstojen, nabrekanje nima večjega vpliva na njegove reološke lastnosti. Ima pa zelo pomemben vpliv na nabrekanje ionska moč medija, kar pa prav tako v naši nalogi ni bil preiskovan parameter (55). Iz reoloških testov smo videli, da ima največji vpliv na elastičen, viskozen modul, viskoznost ter točko prekrižanja za homogenizacijo prav nabrekanje. Na nastanek skupkov ksantana pa nabrekanje ni imelo signifikantnega vpliva. S procesa tehnološkega procesa bi bilo najbolj optimalno, da nabrekanja ne bi bilo potrebno izvajati, saj bi morala v tem primeru disperzija ksantana nabrekati 30 min, kar pa je v industriji časovno potratno in zato bistveno bolj primerno, če se nabrekanje nadomesti z drugimi hitrejšimi procesnimi parametri, ki omogočajo na koncu enako kvaliteten končni produkt.

Procesni korak dodajanja ksantana se je pri naših rezultatih pokazal kot drugi najpomembnejši procesni parameter poleg homogenizacije pri vplivu na nastanek skupkov nehidratiranega ksantana. Po rezultatih DoE ima namreč signifikanten vpliv na pojav

skupkov ksantana le homogenizacija ter čas dodajanja ksantana v disperzijo, medtem ko ostali parametri na nastanek skupkov ksantana nimajo signifikantnega vpliva. Vendar pa model za napovedovanje skupkov nehidratiranega ksantana ne dosega ustrezne veljavnosti, zato ne moremo izključiti tudi morebiten vpliv ostalih dejavnikov. Če je bil ksantan dodan zadnji in je bila pripravljena disperzija brez homogenizacije, ob sočasno izbranem procesnem parametru kot je nizka hitrost (300 o/min), so se pojavili skupki nehidratiranega ksantana, kar je verjetno posledica neoptimiziranega postopka. Hidrokoloide, med katere sodi naravni gumi ksantan, je potrebno namreč dobro dispergirati v mediju, da ohranijo svojo funkcionalnost (12). Zato smo morali zagotoviti ustrezno hidratacijo ksantanskega gumija, da smo na koncu dobili viskozno disperzijo. Vendar pa v vseh poskusih nismo uspeli dobro dispergirati ksantana, saj so se nam pri štirih poskusih na koncu postopka priprave v vzorcu pojavili skupki ksantana, kar pomeni, da končni izdelek ni bil primeren. Glavni faktorji, ki so vplivali na hidratacijo hidrokoloida ksantana so bili: dispergirano delcev ksantana v mediju, hitrost mešanja, velikost delcev ksantana ter sestava medija (12). To lahko razložimo s tem, da je bilo v disperziji raztopljenih že veliko predhodno dodanih surovin in se ksantan ni dobro dispergiral, prav tako pa je bila onemogočena tudi hidratacija, saj je bilo na voljo manj molekul vode, ki bi obdale molekule ksantana. Ko smo ksantan dodali takoj na začetku v demineralizirano vodo, se je namreč v vseh poskusih ustrezno dispergiral in hidratiral ter skupkov ksantana ni bilo. Za hidrokoloide je znano dejstvo, da se z večanjem velikosti delcev hidrokoloida le-ta lažje dispergira, a hkrati počasneje hidratira. Prav tako visoka ionska moč medija ter prisotnost velike količine drugih trdnih snovi v mediju upočasnijo hidratacijo. Disperzije, v katerih se hidrokoloid slabo dispergira, pa lahko izboljšamo z dodatnim predmešanjem hidrokoloida ksantana z ostalimi surovinami kot so sladkorji, soli, olja, alkohol ter škrob (12).

V okviru reoloških meritev smo torej dobili primerljive vrednosti G' , G'' med vzorci kot tudi viskoznosti ter točke prekrivanja G' in G'' . Iz rezultatov reoloških testov je razvidno, da je pri vseh vzorcih povprečna vrednost $G' > G''$, kar nakazuje na gelski značaj ksantanskih disperzij (38).

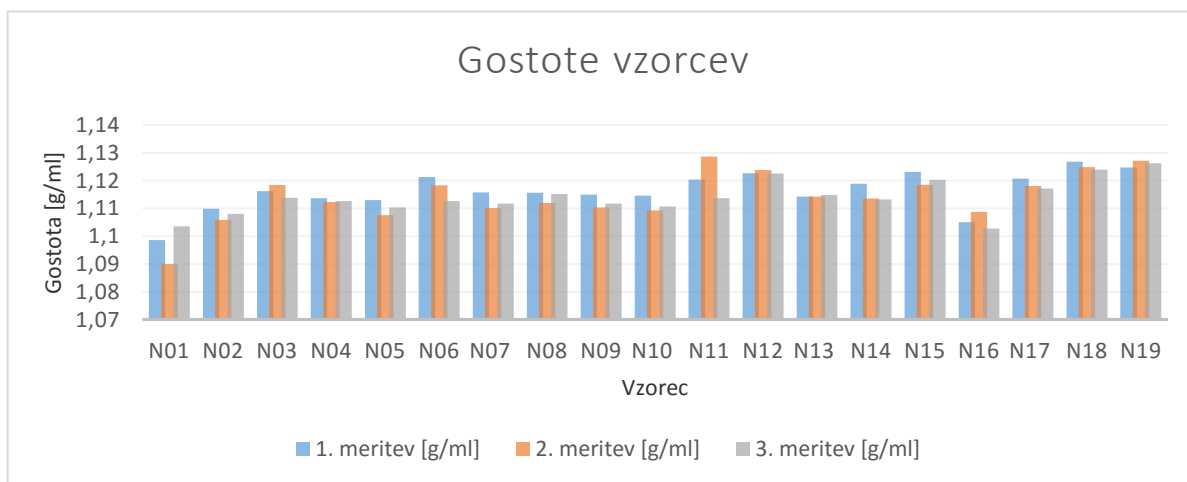
4.2 Rezultati merjenja gostot

Metoda merjenja gostote z valjem ni pokazala signifikantnih razlik med vzorci, kot je razvidno s Slike 19. Najverjetnejši razlog za podobnost vzorcev je precejšnja nenatančnost metode.

Preglednica XIII prikazuje gostote treh meritev vsakega vzorca in izračunan RSD. Iz preglednice je razvidno, da so povprečne gostote pri vseh vzorcih približno 1,1 g/ml in se med seboj ne razlikujejo signifikantno.

Preglednica XIII: Prikaz izračunanih gostot vzorcev

Vzorec	1. meritev ρ [g/ml]	2. meritev ρ [g/ml]	3. meritev ρ [g/ml]	Povprečna gostota [g/ml]	RSD
N01	1,099	1,090	1,104	1,097	0,629
N02	1,110	1,106	1,108	1,108	0,182
N03	1,116	1,118	1,114	1,116	0,207
N04	1,114	1,112	1,113	1,113	0,064
N05	1,113	1,108	1,110	1,110	0,246
N06	1,121	1,118	1,113	1,117	0,394
N07	1,116	1,110	1,112	1,113	0,262
N08	1,116	1,112	1,115	1,114	0,179
N09	1,115	1,110	1,112	1,112	0,213
N10	1,115	1,109	1,111	1,112	0,251
N11	1,120	1,129	1,114	1,121	0,672
N12	1,123	1,124	1,123	1,123	0,066
N13	1,114	1,114	1,115	1,114	0,032
N14	1,119	1,114	1,113	1,115	0,280
N15	1,123	1,119	1,120	1,121	0,207
N16	1,105	1,109	1,103	1,106	0,274
N17	1,121	1,118	1,117	1,119	0,165
N18	1,127	1,125	1,124	1,125	0,131
N19	1,125	1,127	1,126	1,126	0,107



Slika 19: Diagram treh meritev gostot vsakega vzorca

4.3 Rezultati sedimentacije vzorcev

Vse vzorce smo centrifugirali v plastičnih epruvetah pri enakih pogojih in po koncu centrifugiranja optično ocenili delež usedline, nato pa te usedline po sušenju po treh dneh tudi stehali. Preglednica XIV nam prikazuje deleže sedimenta v plastičnih epruvetah, v večini primerov deleže sedimenta treh meritev in njihov RSD, pri treh vzorcih pa je bilo narejenih sedem meritev.

Preglednica XIV: Delež sedimenta v posameznih vzorcih

Vzorec	1. meritev [delež]	2. meritev [delež]	3. meritev [delež]	4. meritev [delež]	5. meritev [delež]	6. meritev [delež]	7. meritev [delež]	Povprečje	RSD
N01	0,0058	0,0045	0,0087	/	/	/	/	0,0063	34,1854
N02	0,006	0,006	0,0052	/	/	/	/	0,0057	8,5397
N03	0,0102	0,0094	0,0114	/	/	/	/	0,0103	9,5947
N04	0,0075	0,0052	0,0079	/	/	/	/	0,0069	20,5852
N04	0,0114	0,0072	0,0068	/	/	/	/	0,0084	29,9951
N05	0,006	0,0068	0,006	/	/	/	/	0,0063	7,5974
N06	0,0051	0,0069	0,005	/	/	/	/	0,0057	18,8908
N06	0,0092	0,006	0,0069	/	/	/	/	0,0074	21,9669
N07	0,0507	0,0513	0,0607	/	/	/	/	0,0542	10,3504
N07	0,0079	0,0071	0,0068	/	/	/	/	0,0072	7,8618
N07	0,0078	0,0062	0,0058	0,006	0,0062	0,0061	0,0079	0,0066	13,4153
N08	0,0113	0,0068	0,0096	0,0094	0,008	0,0068	/	0,0086	20,5592
N08	0,0049	0,0062	0,0066	/	/	/	/	0,0059	14,5795
N09	0,0062	0,0071	0,0152	/	/	/	/	0,0095	52,011
N10	0,0069	0,0078	0,0088	/	/	/	/	0,0078	12,0036
N11	0,137	0,1022	0,1386	/	/	/	/	0,1259	16,3279
N12	0,0075	0,0099	0,0066	/	/	/	/	0,008	21,2237
N13	0,0059	0,0067	0,0076	/	/	/	/	0,0067	12,1865
N14	0,0061	0,0061	0,0086	/	/	/	/	0,007	20,8836
N15	0,0025	0,0092	0,0085	/	/	/	/	0,0067	54,4672
N16	0,007	0,007	0,0062	/	/	/	/	0,0067	7,3714
N17	0,0066	0,0084	0,006	0,0095	0,0088	0,0113	/	0,0084	23,1289
N18	0,0089	0,0112	0,0086	/	/	/	/	0,0096	15,0091
N19	0,007	0,0053	0,0052	/	/	/	/	0,0058	17,165

RDS posameznih vzorcev treh ponovitev doseže največjo vrednost 54,5 % pri vzorcu N15, kar prikazuje zelo veliko variabilnost med meritvami enakega vzorca, in mnogo večjo od variabilnosti med posameznimi vzorci, zato o signifikantnih razlikah med vzorci na podlagi sedimentacijske metode ne moremo govoriti. Med povprečnimi vrednostmi izstopa vzorec N11 z deležem 0,126, kar je opazno večje od vseh ostalih povprečij vzorcev.

Turkey Pairwise primerjava s 95 % intervalom zaupanja pokaže, da je statistično različen vzorec le N11 (Slika 20). Ta test vrednost q opazovano izračuna iz parov povprečij vseh vzorcev in jo primerja z vrednostjo q kritično (56).

Tukey Pairwise Comparisons

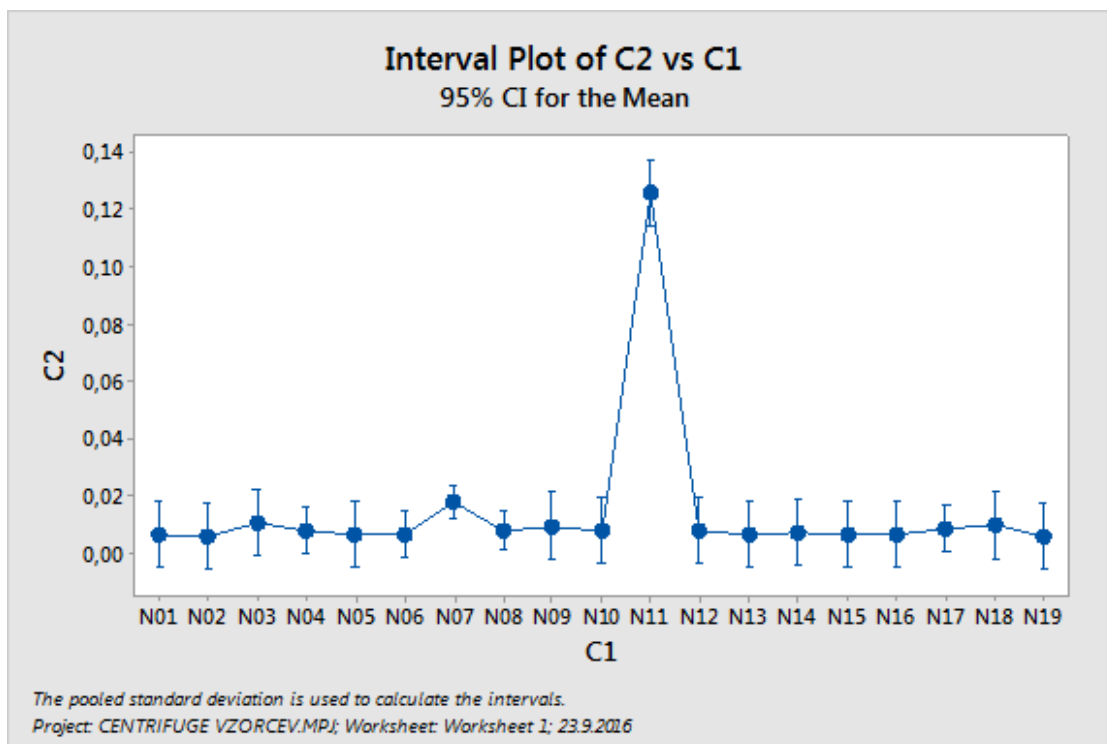
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
N11	3	0,1259	A
N07	13	0,01773	B
N03	3	0,010347	B
N18	3	0,009590	B
N09	3	0,00954	B
N17	6	0,008437	B
N12	3	0,008013	B
N10	3	0,007802	B
N08	9	0,007714	B
N04	6	0,007657	B
N14	3	0,006952	B
N15	3	0,00675	B
N13	3	0,006738	B
N16	3	0,006734	B
N06	6	0,006520	B
N01	3	0,00631	B
N05	3	0,006292	B
N19	3	0,005813	B
N02	3	0,005743	B

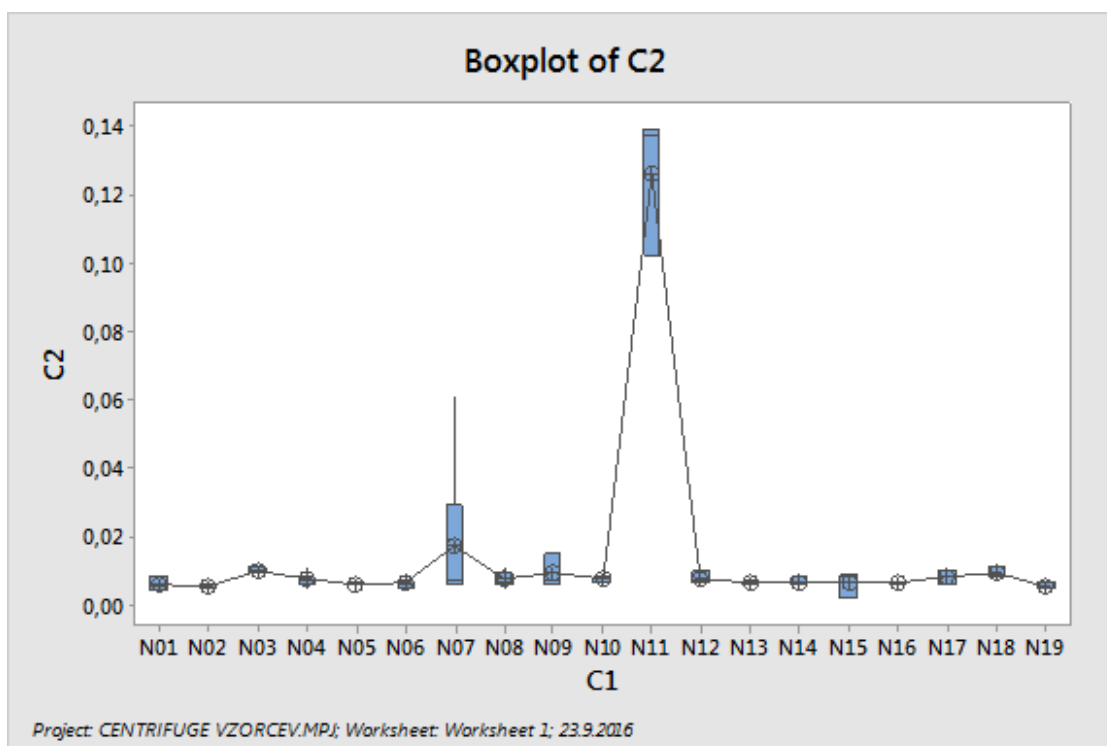
Means that do not share a letter are significantly different.

Slika 20: Turkey Pairwise statistična primerjava vzorcev

Rezultate centrifugiranja vzorcev ter mase sedimenta v vsakem vzorcu povzemata grafa na Slikah 21 in 22. Na abscisni osi so prikazani vzorci, medtem ko so na oordinatni osi mase sedimenta v deležih. Boxplot diagram prikazuje porazdelitev mas sedimenta pri posameznem vzorcu in vidimo lahko, da signifikantno izstopa le vzorec N11, saj se povprečje mas sedimenta pri tem vzorcu ne pokriva z ostalimi.



Slika 21: Interval Plot diagram za sedimente vzorcev



Slika 22: Boxplot diagram za sedimente vzorcev

Statistična Turkey analiza centrifugiranja vzorcev pokaže signifikantno izstopanje vzorca N11. Vzorec N11 kaže na to, da se pri izbiri takšnih procesnih parametrov tvori slabša gelska rešetka in je zato posledično več usedline. To lahko potrdimo tudi z reološkimi testi, in sicer z najmanjšo vrednostjo elastičnega modula 2,2387 Pa, viskoznega modula 1,3384 Pa, viskoznostjo 0,4151 Pas, točko prekrivanja pri 1,234 Pa ter strižno napetostjo, pri kateri pride do točke prekrivanja 2,196 Pa. Reološke meritve uvrščajo vzorec N11 med vzorec z najmanjšimi vrednostmi merjenih parametrov. Izdelan je pri sobni temperaturi, brez homogenizacije ter ima ksantan dodan zadnji. Pripravljen je bil brez nabrekanja, mešan pri 300 o/min. Pri vzorcu je bilo po izdelavi opaziti tudi skupke nehidratiranega ksantana. Sicer nesignifikantno statistično izstopanje kaže po Slikah 21 in 22 sodeč tudi vzorec N07, ki se je od vzorca N11 razlikoval le po tem, da je bil mešan pri 900 o/min ter da je nabrekal. Prav tako pa so bili tudi pri tem vzorcu opazni skupki slabo hidratiranega ksantana. Iz DoE rezultatov lahko sklepamo, da hitrost mešanja nima signifikantnega vpliva na reologijo ksantana, da pa lahko nabrekanje takoj za homogenizacijo pripomore k drugačnim reološkim parametrom, ki kažejo na razlike med vzorcema N07 in N11 pri sedimentacijski metodi.

Turkey statistična analiza razlik med segrevanimi in nesegrevanimi vzorci ne pokaže, prav tako o nesignifikantnosti vpliva temperature na naše vzorce kažejo tudi DoE rezultati, kar pomeni, da se je verjetno pri vseh vzorcih tvorila podobna gelska rešetka. To pomeni, da je bilo v vseh palstičnih epruvetah na dnu približno enako sedimenta. To je pomembno s stališča aplikacije zdravila, kot so na primer suspenzije, saj si želimo, da se zdravilna učinkovina ne bi posedala na dno. Z uporabo ksantana dosežemo, da se v vodnih disperzijah tvori gel, ki upočasni sedimentacijo in omogoča enakomerno odmerjanje. Gledano s področja tehnološkega procesa pa nam rezultati o vplivu temperature na ksantanski gel kažejo, da le-ta nima vpliva nanj do 90 °C, kar pomeni, da morebitne spremembe v temperaturi pri segrevanju suspenzij tekom tehnološkega procesa izdelave končnega zdravila ne vplivajo na njegovo reologijo.

4.4 Rezultati vizuelne kontrole

Pri vizuelni kontroli vzorcev oz. pri presejanju skozi sito smo opazili, da vsebujejo vzorci N04, N07 in N11 vidne skupke ksantana, ki pa se, ko vzorec dalj časa stoji (približno en teden do 14 dni) hidratirajo. Ti skupki so bili nekaj milimetrov veliki, mlečno bele barve, mehke konsistence in okrogle oblike. Plavali so na gladini vzorca, tako da so prekrili zgornjo površino vzorca. Pojav nehidratiranega ksantana smo strnili v spodnji preglednici

(Preglednica XV). Največ jih je vseboval vzorec N11, medtem ko sta jih imela vzorca N04 in N07 veliko manj.

Preglednica XV: Prikaz pojava skupkov ksantana v vzorcih

Vzorec	N01	N02	N03	N04	N05	N06	N07	N08	N09	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19
Skupki ksantana [DA/ NE]	NE	NE	NE	DA	NE	NE	DA	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

4.5 Izbor ključnih procesnih parametrov za izdelavo ksantanskega gela

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili o izbranih procesnih parametrih za izdelavo ksantanskega gela, smo želeli na koncu določiti tiste ključne procesne parametre, s katerimi bi izdelali najboljši ksantanski gel. Želeli bi si, da bi imel gel čim višji elastični in viskozni modul, čim višjo točko prekrižanja omenjenih modulov ter da na koncu v vzorcu ne bi bilo prisotnih skupkov nehidratiranega ksantana. Jakost gela je namreč definirana z elastičnim in viskoznim modulom in je odvisna od gostote premreženj znotraj gela. Čim višje vrednosti tako elastičnega kot viskoznega modula namreč kažejo na bolj močan gel, medtem ko višja točka prekrižanja pomeni, da struktura gela razpade ob višjih vrednostih obeh modulov, kar je zaželena lastnost gelov za farmacevtsko uporabo (2, 27). Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da so ključni procesni parametri za izdelavo gela naslednji: homogenizacija, nabrekanje ter čas dodajanja ksantana v disperzijo. Temperatura se pri naših vzorcih ni izkazala kot pomemben parameter pri reoloških lastnostih, kar potrjujejo tudi literaturni viri. Prav tako se z metodo DoE hitrost mešanja pri nas ni pokazala kot vpliven procesni parameter, čeprav bi bile na tem področju potrebne še dodatne raziskave, da bi njen vpliv bolje proučili, saj verjetno ni zanemarljiv.

5 Sklep

V okviru našega raziskovalnega dela smo uspeli določiti ključne procesne parametre, ki vplivajo na reološke lastnosti ksantanskega gela ter preveriti vpliv povišane temperature do 90°C na ksantanski gel. Poleg tega nam je uspelo tudi optimizirati metodo centrifugiranja, s katero smo lahko ustrezno ovrednotili posedanje delcev. Glede vpliva procesnih parametrov na reološke lastnosti ksantanskega gela smo ugotovili naslednje:

- Na vse proučevane merjene reološke parametre (vrednosti elastičnega ter viskoznega modula, na točko prekrivanja omenjenih modulov, viskoznost) ter na pojav skupkov nehidratiranega ksantana najbolj vpliva homogenizacija.

- Nabrekanje ima takoj za homogenizacijo drugi največji vpliv na vse merjene reološke parametre. Ne vpliva pa na pojav skupkov ksantana v disperziji.

- Temperatura se v našem proučevanem območju, od sobne do povišane temperature 90°C, ni izkazala kot signifikanten procesni parameter, ki bi vplival na reološke lastnosti ksantanskega gela.

- Vrstni red dodajanja pomožnih snovi v disperzijo je bil poleg homogenizacije eden ključnih parametrov za nastanek skupkov nehidratiranega ksantana. Takšnih skupkov v končnem izdelku ne bi smelo biti, saj s tem ne bi bilo omogočeno enakomerno odmerjanje suspenzije.

- Hitrost mešanja disperzije se v naših proučevanih mejah (300 o/min ter 900 o/min) ni izkazala kot signifikanten parameter.

- S sedimentacijsko metodo smo določili le en statistično različen vzorec, kar pa je bila posledica priprave vzorca z najbolj neoptimalnimi procesnimi parametri.

Po celotnem pregledu rezultatov vseh metod smo zaključili, da je tehnološki postopek izdelave robusten v okviru proučevanih parametrov. V okviru nadaljnjih študij bi bilo smiselno natančneje proučiti vplive pomembnih procesnih parametrov ter določiti tudi njihove optimalne vrednosti, pri katerih bi bil gel najbolj ustrezen ter postopek izdelave najhitrejši.

6 Literatura

1. Kulshreshtha A.K., Singh O.N.; Wall G.M.: Pharmaceutical suspension. From formulation development to manufacturing, Springer 2010, New York: 39, 40, 50-59, 167.
2. Anne M. Grillet, Nicholas B. Wyatt and Lindsey M. Gloe (2012). Polymer Gel Rheology and Adhesion, Rheology, Dr. Juan De Vicente (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, InTech. :59–81.
3. Solomon MJ, Spicer PT. Microstructural regimes of colloidal rod suspensions, gels, and glasses. V 2010. str. 1391–400.
4. Gottlieb M, Macosko CW, Benjamin GS, Meyers KO, Merrill EW. Equilibrium modulus of model poly(dimethylsiloxane) networks. *Macromolecules*. julij 1981.;14(4):1039–46.
5. Patel SK, Malone S, Cohen C, Gillmor JR, Colby RH. Elastic modulus and equilibrium swelling of poly(dimethylsiloxane) networks. *Macromolecules*. september 1992.;25(20):5241–51.
6. Larson RG, Larson RG. CHAPTER 1 – Introduction to Constitutive Equations for Viscoelastic Fluids. *Const Equations Polym Melts Solut*. 1988.;1–28.
7. Picout DR, Ross-Murphy SB. Rheology of biopolymer solutions and gels. *ScientificWorldJournal*. 24. marec 2003.;3:105–21.
8. G. Franc. Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts. *Planta Medica* 55. 1989.;493–7.
9. Umek A. Farmakognozija - študijsko gradivo. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2002: 21-26.
10. Jani GK, Shah DP, Prajapati VD, Jain VC. Gums and mucilages: Versatile excipients for pharmaceutical formulations. 2009.;4(5):309–23.
11. Goswami S, Naik S. Natural gums and its pharmaceutical application. *J Sci Innov Res JSIR*. 2014.;3(31):112–21.

12. Williams PA, Sworn G. Handbook of Industrial Water Soluble Polymers. April 2007. :23–6.
13. Ross-Murphy SB, Shatwell KP. Polysaccharide strong and weak gels. Biorheology. 30(3–4):217–27.
14. García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol Adv. 1. november 2000.;18(7):549–79.
15. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M. Naslov: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije.
16. Prakash U, Singh L, Sharma V. International research journal of pharmacy role of xanthan gum (*xanthomonas compestris*) in gastroretentive drug delivery system: an overview. Int Res J Pharm. 2013.;4(4):35–8.
17. Choppe E, Puaud F, Nicolai T, Benyahia L. Rheology of xanthan solutions as a function of temperature, concentration and ionic strength. Carbohydr Polym. 2010.;82(4):1228–35.
18. Morris ER. Molecular Origin of Xanthan Solution Properties. junij 1977.;45:81–9.
19. Milas M, Rinaudo M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. Carbohydr Res. 1979.;76(1):189–96.
20. Zatz JL, Knapp S. Viscosity of Xanthan Gum Solutions at Low Shear Rates. J Pharm Sci. april 1984.;73(4):468–71.
21. Kennedy JRM, Kent KE, Brown JR. Rheology of dispersions of xanthan gum, locust bean gum and mixed biopolymer gel with silicon dioxide nanoparticles. Mater Sci Eng C. 2015.;48:347–53.
22. Phillips GO, Williams PA. Handbook of Hydrocolloids. 2009.;186–203.
23. Kim C, Yoo B. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. J Food Eng. 2006.;75(1):120–8.
24. Milas M, Rinaudo M, Tinland B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. Polym Bull. avgust

1985.;14(2):157–64.

25. Maier H, Anderson M, Karl C MK. Chapter 8 – Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. *Ind Gums*. 1993.;181–226.
26. Casas JA, García-Ochoa F. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. *J Sci Food Agric*. januar 1999.;79(1):25–31.
27. Gašperlin M, Rozman B, Baumgartner S. Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih. *Farm Vestn*. 2005.;2:109–14.
28. Talukdar MM, Kinget R. Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. *Int J Pharm*. 1995.;120(1):63–72.
29. Tako M, Nakamura S. D-Mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. *FEBS Lett*. 1986.;204(1):33–6.
30. Speers RA, Tung MA. Concentration and Temperature Dependence of Flow Behavior of Xanthan Gum Dispersions. *J Food Sci*. januar 1986.;51(1):96–8.
31. Marcotte M, Taherian Hoshahili AR, Ramaswamy HS. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Res Int*. 2001.;34(8):695–703.
32. Katzbauer B. Properties and applications of xanthan gum. *Polym Degrad Stab*. 1998.;59(1):81–4.
33. Žumer M, Zupančič Valant A, Florjančič U et al. Seminar iz aplikativne reologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko inženirstvo, Katedra za kemijsko inženirstvo, 1997: 7-13, 20-22, 30-41.
34. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
35. Slavič J: Dinamika, mehanska nihanja in mehanika tekočin. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo, Ljubljana 2014: 160-162.
36. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2007.
37. Barnes H. A., Hutton J. F., K. Walters F. R.S.: An introduction to rheology, Elsevier,

- Netherlands, 1989. :1–54, 97–114.
38. Ravanagh GM, Ross-Murphy SB. Rheological characterisation of polymer gels. *Prog Polym Sci.* 1998.;23:533–62.
 39. Anseth KS, Bowman CN, Brannon-Peppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials.* 1996.;17(17):1647–57.
 40. Umek Andrej: *Mehanika deformabilnih teles.* Didakta, Radovljica, 1998: 292-308.
 41. Macosko CW. *Rheology : principles, measurements, and applications.* 1994.;109.
 42. G.I.T. Laboratory Journal 3-4/2007, pp 68-70, GIT VERLAG GmbH & Co. KG, Darmstadt (http://www.mate.tue.nl/~wyss/files/Wyss_GIT_Lab_J_2007.pdf).
 43. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-World, C. Wikström, S. World: *Design of Experiments, Principles and Applications*, Umetrics AB, Januar, 2008.
 44. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notice/pf35-4-polysorbate-80.pdf, dostopano dne 29.8.2016.
 45. <https://nurirjawati.files.wordpress.com/2012/01/handbook-of-pharmaceutical-excipients-6th-edition.pdf>, dostopano dne 29.8.2016.
 46. <https://www.cargill.com/pharmaceutical/pharma-products/glucose-liquids-spray-dried>, dostopano dne 05.02.2017.
 47. Tekavčič Glover T, Trobevšek P: *Formularium Slovenicum 3.0: Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji* 3rd ed. 2011.; 206.
 48. Mandala IG, Bayas E. Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocoll.* 2004.;18:191–201.
 49. Kulkarni N, Wakte P, Naik J. Development of floating chitosan-xanthan beads for oral controlled release of glipizide. *Int J Pharm Investig.* 2015.;5(2):73–80.
 50. Turk I. Vpliv pomožnih snovi in procesnih parametrov na reološke lastnosti gela ksantana. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo; 2016.
 51. <http://www.wee-solve.de/en/frequency-sweep.html>, dostopano dne 18.9.2016.
 52. <http://www.wee-solve.de/en/amplitude-sweep.html>, dostopano dne 18.9.2016.

53. User guide to BioPAT® MODDE Version 10.1. http://www.sartorius.co.jp/fileadmin/media/global/products/Manual_BioPAT_MODDE_10.1.pdf , dostopano dne 24.02.2017.
54. Ross KA, Pyrak-Nolte LJ, Campanella OH. The effect of mixing conditions on the material properties of an agar gel—microstructural and macrostructural considerations. *Food Hydrocoll.* 2006.;20(1):79–87.
55. Govedarica B, Sovány T, Pintye-Hódi K, Škarabot M, Baumgartner S, Mušević I, idr. Addressing potent single molecule AFM study in prediction of swelling and dissolution rate in polymer matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012.;80(1):217–25.
56. Abdi H, Williams LJ. Newman-Keuls Test and Tukey Test. 2010.;1–11.